ผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่

นางกัลยา เจือจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2496-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF POMEGRANATE PEEL EXTRACT ON SALMONELLA SPP. ISOLATED FROM CHICKENS

Mrs. Kanlaya Chuachan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Avian Medicine
Department of Veterinary Medicine
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2002

ISBN 974-17-2496-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่
โดย	กัลยา เจือจันทร์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตว์ปีก
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.นันทวัน บุณยะประภัศร

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

………………………………………….. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…………………………………………… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ดวงนฤมล ประชัญคดี)

………………………………………….. อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์)

………………………………………….. อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร.นันทวัน บุณยะประภัศร)

……………………………………………กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ประจักษ์ พุ่มวิเศษ)

……………………………………………กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน)

กัลยา เจือจันทร์ : ผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ (EFFECT OF POMEGRANATE PEEL EXTRACT ON *SALMONELLA* SPP. ISOLATED FROM CHICKENS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.น.สพ.ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ.ดร.นันทวัน บุณยะประภัศร จำนวนหน้า 64 หน้า. ISBN 974-17-2496-9.

นำเปลือกผลทับทิมแห้งมาบด และสกัดสารสำคัญด้วยวิธีการหมักในเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดที่ผ่านการกรองนำไปทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ สารสกัดหยาบที่ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ในหลอดทดลอง ด้วยวิธี Macrobroth (tube) dilution method ผลพบว่า สารสกัดที่เตรียมได้นี้สามารถฆ่าทำลายเชื้อที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 100 ตัวอย่าง และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าทำลายเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC) อยู่ระหว่าง 1.25-2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่ (78 เปอร์เซ็นต์) ถูกฆ่าได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดคือ 1.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสารสกัดเปลือกผลทับทิมไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Salmonella* Enteritidis (SE) ในตัวไก่ ให้ไก่แต่ละตัวได้รับเชื้อ SE ในขนาด 1×10^4 colony-forming unit โดยการป้อนปากที่อายุ 3 วัน และได้รับสารสกัดเปลือกผลทับทิมในขนาด 12.5 หรือ 25 มิลลิกรัมต่อตัว ติดต่อกัน 3 วันโดยการป้อนเข้ากระเพาะพักโดยตรง ซึ่งไก่แต่ละกลุ่มได้รับสารสกัดเปลือกผลทับทิมในช่วงเวลาต่างกัน กล่าวคือ ก่อนได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง และหลังได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง เมื่อไก่อายุได้ 7 วันนำไก่ทั้งหมดมาผ่าซากเก็บไส้ตันเพื่อตรวจหาเชื้อ *Salmonella* group D ผลพบว่า ไก่ที่ได้รับสารสกัดเปลือกผลทับทิมก่อนได้รับเชื้อ SE มีจำนวนตัวที่ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* group D จากไส้ตันน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ภาควิชา อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต..
สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตว์ปีก	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..
ปีการศึกษา 2545	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม................................

#4375551231 : MAJOR AVIAN MEDICINE
KEY WORD: POMEGRANATE PEEL / *SALMONELLA* SPP. / CHICKEN

KANLAYA CHUACHAN : EFFECT OF POMEGRANATE PEEL EXTRACT ON *SALMONELLA* SPP. ISOLATED FROM CHICKENS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIROJ SASIPREEYAJAN, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : PROF. NUNTAVAN BUNYAPRAPHATSARA, Ph.D.
64 PP. ISBN 974-17-2496-9.

Dry pomegranate peel were powdered and extracted by maceration using ethyl alcohol (95%). Then the extract was filtered and evaporated under vacuum. This crude extract exhibited microbicidal action on 100 isolates of *Salmonella* spp. isolated from chickens. The minimal bactericidal concentration (MBC) determined by macrobroth (tube) dilution method was 1.25% - 2.5 % (w/v). Seventy-eight isolates showed MBC 1.25%. The crude extract was evaluated for its efficacy against *Salmonella* Enteritidis (SE) in broiler chicks. Each chick was orally inoculated with 1×10^4 colony-forming units of SE at 3-day-old. Crude extract was given at 12.5 or 25 mg/bird for 3 days by crop gavage. Birds received the crude extract 24 hrs before or 24 hrs after receiving the SE. All birds were killed at 7 day of age. Rate of *Salmonella* group D isolation from ceca of each treatment was compared. The results revealed that birds which received the crude extract before receiving the SE had the lowest isolate rate with scientific significant ($p<0.05$).

Department Veterinary Medicine Student's signature..
Field of study Avian Medicine Advisor's signature..
Academic year 2002 Co-advisor's signature..

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รศ.น.สพ.ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา และให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.นันทวัน บุณยะประภัศร ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการสกัดสมุนไพร รวมทั้งให้คำปรึกษาจนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้เงินทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนการวิจัยในทุกๆ ด้าน

ขอขอบคุณ ศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ (ภายใต้ความร่วมมือขององค์การอนามัยโลก) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อบางส่วนที่ใช้ในการทดสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รศ.น.สพ.ดร.ธงชัย เฉลิมชัยกิจ และ คุณมณฑล เลิศวรปรีชา ที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีทุกครั้ง

ขอขอบคุณ WHO National Salmonella and Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทดสอบแยกซีโรไทป์ของเชื้อที่ใช้ศึกษาทั้งหมด

ขอขอบคุณ น.สพ.กาญจน์ เชื้อศิริ ที่คอยให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณ สพ.ญ.อชินี รุญเจริญ และ น.สพ.อาคม ชีวะเกรียงไกร เพื่อนรักที่คอยรับฟังปัญหาและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ท้ายที่สุดนี้ใคร่ขอขอบคุณ สามีและลูกชาย ญาติพี่น้อง และโดยเฉพาะอย่างยิ่งบิดาและมารดา ที่คอยห่วงใยและเป็นแรงผลักดันให้มีความอดทนและตั้งใจตลอดมา

กัลยา เจือจันทร์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย……………………………………………………………ง

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ………………………………………………………..จ

กิตติกรรมประกาศ……………………………………………………………………………ฉ

สารบัญตาราง……………………………………………………………………………...ญ

สารบัญภาพ……………………………………………………………………………..ฎ

บทที่ 1 บทนำ…………………………………………………………………………………1

ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา……………………………………………..1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย……………..……………………………………………...4

วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ…………………………………………………………………4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……………………………………………………………...4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……………………………………………………5

เชื้อ *Salmonella* spp……………………………………………………………………..5

ก. ลักษณะของเชื้อ…………………………………………………………………5

ข. แหล่งของเชื้อ……………………………………………………………………..6

ค. การจำแนกชนิดของเชื้อ…………………………………………………………6

ง. โครงสร้างทางแอนติเจนของเชื้อ…………………………………………………8

จ. การแยกซีโรกรุ๊ปของเชื้อ…………………………………………………….10

ฉ. โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ……………………………………………………..11

ทับทิม (Pomegranate)…………………………………………………………………14

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย…………………………………………………………………..18

การเตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิม…………………………………………………..18

การศึกษาผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ โดยการหาค่า MBC (Minimal bactericidal concentration)………………………..20

ก. การเก็บรวบรวมเชื้อ *Salmonella* spp………………………………………..20

ข. การทดสอบแยกซีโรกรุ๊ปและซีโรไทป์ของเชื้อ………………………………..20

ค. การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ…………………………………………………...20

ง. วิธีทดสอบ……………………………………………………………………21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)

การศึกษาผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่ โดยวิธี Agar dilution………………………………………………..22

ก. การเตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิมในอาหารเลี้ยงเชื้อ……………………..22

ข. การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ…………………………………………………...23

ค. วิธีทดสอบ……………………………………………………………………24

การศึกษาผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่ โดยการหาค่า MIC (Minimal inhibitory concentration)…………..24

ก. การเตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิมในอาหารเลี้ยงเชื้อ……………………..24

ข. การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ…………………………………………………...24

ค. วิธีทดสอบ……………………………………………………………………24

การศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่..……………..25

การศึกษาเบื้องต้นถึงผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมในการต้านเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่ เมื่อทดสอบในตัวไก่..………………………25

บทที่ 4 ผลการทดลอง……..…………………………………………………………….…29

ผลการแยกซีโรกรุ๊ปของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่…………………………29

ผลการแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่…………………………29

ปริมาณผงของสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่เตรียมได้……………………………………30

ค่า MBC ของผงสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่….30

ผลการทดสอบสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่ โดยวิธี Agar dilution………………………………………………..30

ค่า MIC ของผงสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่……………………………………………………………………..….30

ผลการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ …………31

ผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมในการต้านเชื้อ *Salmonella* Enteritidis เมื่อทดสอบในตัวไก่……………………………………………………………………35

บทที่ 5 วิจารณ์ ข้อคิดเห็น และ สรุปผลการทดลอง……………………………………...37

รายการอ้างอิง……………………………………………………………………………..43

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

หน้า
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์...53

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อ *Salmonella* spp. แต่ละ Species และ Subspecies……………………………………………………………………7
2.2 จำนวนซีโรไทป์ในแต่ละ Species และ Subspecies ของเชื้อในสกุล *Salmonella* ………..8
4.1 ผลการแยกซีโรกรุ๊ปของเชื้อ *Salmonella* spp……..……………………………………..29
4.2 ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ *Salmonella* spp.ที่แยกได้จากไก่……………………..…………..………………………..30
4.3 ผลทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp.ที่แยกได้จากไก่..…………...32-35
4.4 การตรวจพบเชื้อ *Salmonella* group D ในไส้ตันไก่ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่อายุ 7 วัน ……………………..……………………………………………………..…36

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

2.1 รูปร่างของเชื้อ *Salmonella* spp. เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน……………………………………………………………………..5
2.2 โครงสร้างทางแอนติเจนของเชื้อในตระกูล Enterobacteriaceae………………………10
3.1 วิธีการหมักผงเปลือกผลทับทิม………………………..…………………………………18
3.2 เครื่องกลั่นภายใต้สูญญากาศ (Rotary evaporator)…………………………………..19
3.3 การเก็บรักษาผงสารสกัดเปลือกผลทับทิมในขวดแก้วสีชา……………………………..19
3.4 การละลายของสารสกัดเปลือกผลทับทิมใน Mueller Hinton broth……………..……..22
3.5 ลักษณะที่ปรากฏในหลอดทดสอบหลังบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง……....22

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

เนื้อไก่และผลิตภัณฑ์จากไก่ จัดเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญแหล่งหนึ่งของประชากรโลก และแนวโน้มความต้องการมีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง สำหรับประเทศไทยการเลี้ยงไก่เนื้อจัดเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เพราะไม่เพียงแต่เป็นการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศเท่านั้น ยังเป็นสินค้าหมวดปศุสัตว์ที่สามารถนำเงินตราต่างประเทศเข้าสู่ประเทศสูงสุด เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์จากปศุสัตว์ชนิดอื่นๆ โดยมีสัดส่วนกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ของประเทศ (สำนักนโยบายเศรษฐกิจระหว่างประเทศ, 2545: 44) ทั้งนี้สัดส่วนผลผลิตเนื้อไก่เพื่อการส่งออกและบริโภคภายในประเทศ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541-พ.ศ. 2544 อยู่ระหว่าง 30 เปอร์เซ็นต์และ 70 เปอร์เซ็นต์ (สมาคมผู้ผลิตไก่เพื่อส่งออกไทย สมาคมผู้เลี้ยงเป็ดเพื่อการค้าและการส่งออก สมาคมผู้ผลิต ผู้ค้า และส่งออกไข่ไก่ สมาคมผู้ผลิตและแปรรูปสุกรเพื่อการส่งออก และสมาคมผู้เลี้ยงไก่พันธุ์, 2545: 12) และในปี พ.ศ. 2544 ประเทศไทยสามารถส่งออกเนื้อไก่ไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้มากถึง 437,870 ตัน คิดเป็นมูลค่า 41,345 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2543 ที่ส่งออกได้ 337,410 ตัน หรือเพิ่มขึ้น 29.77 เปอร์เซ็นต์ (กรมปศุสัตว์, กองสัตวแพทย์สาธารณสุข, 2545)

สำหรับประเทศคู่ค้าที่สำคัญและนำเข้าเนื้อไก่จากประเทศไทยมากที่สุดคือ ประเทศญี่ปุ่น รองลงมาคือ กลุ่มประเทศในสหภาพยุโรป (นโยบายความปลอดภัยด้านอาหารของสหภาพยุโรป, 2544: 46; สถานการณ์การส่งออกไก่เนื้อปี 2544-2545, 2544: 10) สิงคโปร์ เกาหลีใต้ และฮ่องกง (นโยบายความปลอดภัยด้านอาหารของสหภาพยุโรป, 2544: 46) โดยมีประเทศจีน สหรัฐอเมริกา และบราซิล เป็นประเทศคู่แข่งทางการค้าที่สำคัญในตลาดญี่ปุ่น และมีประเทศสมาชิกสหภาพยุโรป และบราซิล เป็นคู่แข่งทางการค้าที่สำคัญในตลาดสหภาพยุโรป (ศูนย์สารสนเทศการค้าระหว่างประเทศ, กลุ่มงานวิเคราะห์ข้อมูลการค้า, 2544: 52)

เมื่อจำหน่ายเนื้อไก่ได้มากขึ้น การผลิตไก่เนื้อย่อมเพิ่มขึ้นตามไปด้วย จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพและชีวภัณฑ์อื่นๆ ในปริมาณที่สูงขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ จากรายงานของกลุ่มงานเศรษฐกิจการปศุสัตว์ กองส่งเสริมการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ (2543: 45) แสดงให้เห็นว่า เวชภัณฑ์ ชีวภัณฑ์ และอาหารเสริมสำหรับสัตว์ ที่ประเทศไทยนำเข้าจากต่างประเทศในปี พ.ศ. 2543 หากพิจารณาเฉพาะส่วนที่นำมาใช้กับไก่ (ทั้งไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พันธุ์) พบว่า มีมูลค่าสูงถึง 2,561.475 ล้านบาท คิดเป็น 20.5 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการนำเข้าทั้งหมด ทั้งนี้ยาต้านจุลชีพถูกจัดเป็นเวชภัณฑ์ที่มีการนำมาใช้มากที่สุด โดยมีมูลค่านำเข้า 761.09 ล้านบาท รอง

ลงมาได้แก่ วัคซีนและไวตามิน-แร่ธาตุสำหรับผสมอาหาร ซึ่งมีมูลค่านำเข้า 613.67 และ 610.69 ล้านบาท ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม ผู้บริโภคได้ให้ความสนใจในความปลอดภัยด้านอาหารกันมากขึ้น โดยเฉพาะผู้บริโภคในสหภาพยุโรป นับตั้งแต่มีการแยกพบเชื้อ *Enterococcus* ที่ดื้อต่อยา Vancomycin หรือเชื้อวีอาร์อี (Vancomycin-resistant enterococci; VRE) ได้เป็นครั้งแรกจากผู้ป่วยในประเทศฝรั่งเศส เมื่อปี พ.ศ. 2529 (Association of Medical Microbiologists, 1997) ก่อนที่จะมีรายงานการแยกพบเชื้อชนิดเดียวกันนี้ในสหรัฐอเมริกา สหราชอาณาจักร เยอรมนี เนเธอร์แลนด์ สเปน ซาอุดิอาระเบีย (Qadri and Postle, 1996) และพบได้ทั่วโลกในที่สุด (Association of Medical Micro- biologists, 1997; Stobberingh et al., 1999) ซึ่งเชื้อ *Enterococcus* นี้ จัดเป็นเชื้อที่พบได้ตามปกติในทางเดินอาหารของคนและสัตว์หลายชนิด (Association of Medical Microbiologists, 1997; National Health and Medical Research Council, 2002) แต่สามารถก่อโรคได้โดยเฉพาะผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือได้รับยาต้านจุลชีพติดต่อกันเป็นเวลานาน หรือไตล้มเหลว เป็นต้น (Cetinkaya, Falk and Mayhall, 2000; National Health and Medical Research Council, 2002) โดยเชื้อ *Enterococcus* สามารถทำให้เกิดปัญหาดังต่อไปนี้ได้ เช่น การติดเชื้อในระบบขับถ่ายปัสสาวะ แผลติดเชื้อหลังการผ่าตัด ภาวะโลหิตเป็นพิษ ลิ้นหัวใจอักเสบ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น (Association of Medical Microbiologists, 1997; Cetinkaya, Falk and Mayhall, 2000; National Health and Medical Research Council, 2002; Community Health Administration, 2003) ตัวยาที่นิยมใช้เป็นทางเลือกสุดท้ายหรือใช้รักษาในรายที่มีการติดเชื้อรุนแรง คือ Vancomycin หรือ Teicoplanin (Manitoba Health Public Health, 1998; National Health and Medical Research Council, 2002) แต่เมื่อเชื้อเกิดการดื้อยา Vancomycin ปัญหาที่ตามมาคือเชื้อมักจะดื้อต่อยาตัวอื่นๆ ด้วย เช่น Aminoglycosides, Cephalosporins และ Clindamycin เป็นต้น (Otero, 1999) ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อยังสามารถถ่ายทอดยีนที่ดื้อยานี้ให้กับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ ได้ด้วย โดยเฉพาะเชื้อ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* และ 3rd generation cephalosporin resistant *Streptococcus pneumoniae* (Cetinkaya, Falk and Mayhall, 2000)

มีข้อมูลที่สนับสนุนว่า การใช้ Avoparcin ซึ่งมีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับ Vancomycin เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต (Growth promoter) ในอาหารสัตว์ มีผลทำให้แยกพบเชื้อวีอาร์อีในสัตว์เพิ่มขึ้น และมีโอกาสที่เชื้อจะถูกถ่ายทอดมาสู่คนได้ ทางสหภาพยุโรปจึงได้ออกมาตรการห้ามใช้ Avoparcin เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 เป็นต้นมา ซึ่งภายหลังการออกมาตรการนี้ ปรากฏว่าการตรวจพบเชื้อวีอาร์อีในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะในฟาร์มไก่ และในอุจจาระของประชาชนทั่วไปลดลงอย่างชัดเจน ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2541 ทางสหภาพ ยุโรปจึงได้

ประกาศยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตอีก 4 ชนิด ได้แก่ Tylosin, Spiramycin, Zinc bacitracin และ Virginiamycin โดยให้เหตุผลว่า ยาเหล่านี้มีโครงสร้างใกล้เคียงกับยาต้านจุลชีพที่ใช้ในมนุษย์ (Wegener et al., 2000)

ศักดิ์ชาย วงศ์เกียรติสุภาพ (2543: 38-45) ได้แปลสรุป Council Regulation (EC) No 1804/1999 ของสหภาพยุโรป ในประเด็นที่เกี่ยวกับการผลิตปศุสัตว์ปลอดสารพิษ ซึ่งมีสาระสำคัญบางส่วนที่น่าสนใจว่า ห้ามใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีใดๆ ในการรักษาและป้องกันโรคในสัตว์แต่ถ้าหากสัตว์เลี้ยงเจ็บป่วยหรือได้รับบาดเจ็บให้รีบทำการรักษาด้วยสมุนไพร (Phytotherapeutic medicinal products) และหากจำเป็นต้องรักษาด้วยเวชภัณฑ์ที่ผลิตจากสารเคมี ให้ใช้ในปริมาณน้อยที่สุดเท่าที่จำเป็น นอกจากนั้นยังห้ามใช้สารเร่งการเจริญเติบโต รวมทั้งยาปฏิชีวนะ ยากันบิด และสารเคมีต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์

จนถึงปี พ.ศ. 2545 สหภาพยุโรปได้ยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อเป็นอาหารไปแล้วหลายชนิด ได้แก่ กลุ่ม Nitrofurans, กลุ่ม Nitroimidazole, กลุ่ม Beta-agonists, Chloramphenicol, Carbadox, Olaquindox, *Aristolochia* spp., Chloroform, Dapsone, Chlorpromazine, Colchicine และ Avoparcin รวมทั้งยังได้ประกาศเพิกถอนยากันบิดและยาอื่นๆ ที่ใช้เป็นวัตถุเติมในอาหารสัตว์ (Feed additives) อีก ได้แก่ Amprolium, Meticlopindol, Meticlopindol+Methylbenzoquate, Amprolium+Ethopabate, Dimetridazole, Nicarbazin, Arprinocide, Dinitolamide และ Ipronidazole นอกจากนี้ยังมีนโยบายที่จะยกเลิกการใช้ยาผสมในอาหารสัตว์เพื่อเป็นการเร่งการเจริญเติบโต ที่มีเพียง 4 ชนิดได้แก่ Avilamycin, Flavophospholipol, Monensin และ Salinomycin ในอนาคตอีกด้วย (กรมปศุสัตว์, กองควบคุมยาสัตว์, 2545)

ดังนั้น หากประเทศไทยยังต้องการเป็นหนึ่งในประเทศผู้ผลิตและผู้ส่งออกเนื้อไก่รายใหญ่ของโลก และโดยเฉพาะมีสหภาพยุโรปเป็นตลาดส่งออกที่สำคัญ จำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนกลยุทธ์ในการผลิต เพื่อให้ได้สินค้าตรงตามความต้องการของตลาด ซึ่งนอกจากจะก่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศแล้ว ยังเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่สินค้าอีกด้วย

ประเทศไทยมีพืชสมุนไพรมากมายหลายชนิด ซึ่งน่าจะนำมาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงสัตว์ได้ จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า เปลือกผลทับทิมเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีการนำมาใช้รักษาโรคบิด (Dysentery) และอาการท้องเสียในคน (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม, 2533: 112-114; นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, บรรณาธิการ, 2541: 331) ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อได้หลายชนิดทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อโปรโตซัว อาทิเช่น *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Entamoeba histolytica*

และ *Balantidium coli* เป็นต้น (อำนาจ ศรีรัตนบัลล์, 2543: 100) ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเปลือกผลทับทิมมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อปัญหาในไก่ โดยเชื้อที่เลือกศึกษาคือเชื้อ *Salmonella* spp.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่เมื่อทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro*)
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่เมื่อทดสอบในตัวไก่ (*In vivo*)

วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

ขั้นแรกได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ ของสารสกัดเปลือกผลทับทิมในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำผลที่ได้ทดสอบเบื้องต้นในไก่ทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบสรรพคุณทางยาของสารสกัดเปลือกผลทับทิม ในการนำมาใช้เพื่อต้านการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่
2. เป็นแนวทางศึกษาเพื่อพัฒนาการใช้สมุนไพรเปลือกผลทับทิม แทนการใช้ยาต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่

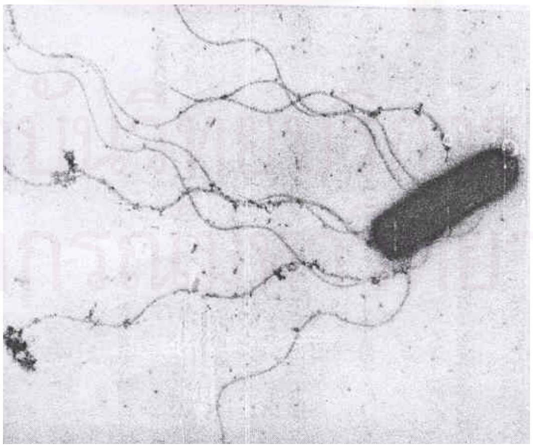
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *Salmonella* spp.

ก. ลักษณะของเชื้อ

เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีขนาด 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่ยาวและมีอยู่รอบเซลล์ (Peritrichous flagella) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ยกเว้น *Salmonella* Pullorum, *Salmonella* Gallinarum และบางสายพันธุ์ที่ไม่มีแฟลกเจลลา สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ยกเว้น *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Choleraesuis) สร้างกรดและก๊าซจากการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส อุณหภูมิที่เจริญได้คือ 37-45 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่สุดที่ 42 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำได้ดีแม้ในสภาวะแช่แข็ง ซึ่งเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตไว้เท่านั้นและสามารถเพิ่มจำนวนได้ใหม่เมื่อนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง แต่เชื้อจะไม่ทนความร้อน พบว่าถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที หรือ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ยกเว้น *Salmonella* Senftenberg ที่ทนความร้อนได้ดีกว่าซีโรไทป์ (Serotype) หรือ ซีโรวาร์ (Serovar) อื่นๆ 10-20 เท่า โดยต้องให้ความร้อนถึง 62 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จึงจะสามารถทำลายเชื้อได้ (Aroon Bangtrakulnonth, 2002: 41-42)



รูปที่ 2.1 รูปร่างของเชื้อ *Salmonella* spp. เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (ที่มา: Alcamo, 1983: 544)

ข. แหล่งของเชื้อ

เชื้อ *Salmonella* spp. จัดเป็นเชื้อโรคที่พบได้ทุกหนทุกแห่ง และพบได้ทั่วโลก สามารถแยกเชื้อได้จากทางเดินอาหารของคนและสัตว์อีกหลายชนิด ทั้งสัตว์เลือดอุ่นและสัตว์เลือดเย็น (Clarke and Gyless, 1993: 134; Quinn et al., 1994: 226; Hirsh, 1999: 75) โดยเฉพาะจิ้งจกและงูพบว่าเป็นสัตว์ที่มีการติดเชื้อได้เสมอๆ ซึ่งมักไม่แสดงอาการป่วยแต่สามารถแยกเชื้อได้ และบางครั้งอาจพบได้หลายซีโรไทป์ในสัตว์ตัวเดียวกัน (Hirsh, 1999: 76) นอกจากนั้นเชื้อยังสามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานถึง 9 เดือนหรือมากกว่านั้น เมื่อปนเปื้อนอยู่ในดินที่ชื้นแฉะ น้ำ มูลสัตว์ หรืออาหารสัตว์ โดยเฉพาะส่วนประกอบที่ทำมาจากเลือดป่น กระดูกป่น หรือปลาป่น (Clarke and Gyless, 1993: 134; Quinn et al., 1994: 226; Hirsh, 1999: 76)

ค. การจำแนกชนิดของเชื้อ

ปัจจุบันเชื้อในสกุล *Salmonella* แบ่งออกเป็น 2 Species ตามข้อตกลงของ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ในสหรัฐอเมริกา ดังนี้ 1) *Salmonella enterica* และ 2) *Salmonella bongori* โดย *Salmonella enterica* ประกอบด้วย 6 Subspecies (subsp.) ได้แก่ Subspecies I (enterica), II (salamae), IIIa (arizonae), IIIb (diarizonae), IV (houtenae) และ VI (indica) ส่วน *Salmonella bongori* มี 1 Subspecies คือ Subspecies V ซึ่งการแบ่ง Species และ Subspecies จะใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) (Aroon Bangtrakulnonth, 2002: 38) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ทั้งนี้ *Salmonella enterica* จัดว่ามีบทบาทสำคัญที่สุดในการก่อปัญหาต่อสุขภาพของคนและสัตว์ (Heuzenroeder et al., 2001: 2) และสามารถแบ่งย่อยได้อีก 2,480 ซีโรไทป์ (Popoff, 2001 cited in Aroon Bangtrakulnonth, 2002: 40) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อ *Salmonella* spp. แต่ละ Species และ Subspecies

Species	*Salmonella enterica*						*Salmonella bongori*
Subspecies	*Enterica*	*Salamae*	*Arizonae*	*diarizonae*	*houtenae*	*indica*	
คุณสมบัติ							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 ชั่วโมง)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Culture with KCN	-	-	-	-	+	-	+
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	- (75%)	+ (75%)	-	d	-
Lysis by phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Usual habitat	Warm-blooded animals	Cold-blooded animals					

+ = 90% หรือมากกว่า ให้ผลบวก

- = 90% หรือมากกว่า ให้ผลลบ

d = ปฏิกิริยาแตกต่างกันขึ้นกับซีโรไทป์ของเชื้อ

ที่มา : Popoff (2001) อ้างถึงใน Aroon Bangtrakulnonth (2002: 39)

ตารางที่ 2.2 จำนวนซีโรไทป์ในแต่ละ Species และ Subspecies ของเชื้อในสกุล *Salmonella*

Species	Subspecies	**ปี พ.ศ.**	
		2540	2544
Salmonella enterica	subsp. *enterica*	1,435	1,478
	subsp. *salamae*	485	489
	subsp. *arizonae*	94	94
	subsp. *diarizonae*	321	327
	subsp. *houtenae*	69	71
	subsp. *indica*	11	12
Salmonella bongori		20	21
	รวม	**2,435**	**2,501**

ที่มา : Popoff (2001) อ้างถึงใน Aroon Bangtrakulnonth (2002: 40)

ง. โครงสร้างทางแอนติเจนของเชื้อ

แอนติเจนที่สำคัญของเชื้อ *Salmonella* spp. มี 3 ชนิด ได้แก่

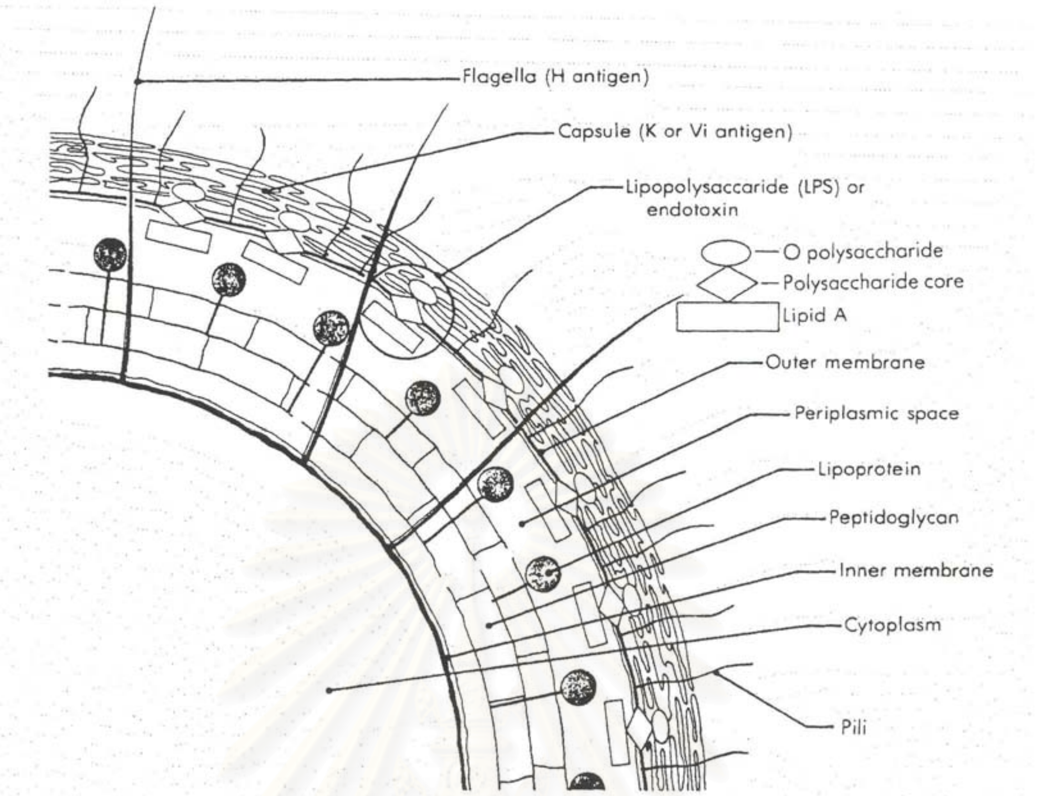
1. โอแอนติเจน (O antigen หรือ Somatic antigen) เป็นส่วนหนึ่งของเมมเบรนชั้นนอก (Outer membrane) ประกอบด้วยน้ำตาลต่างชนิดเชื่อมต่อกัน แล้วยึดติดกับส่วนที่เป็นพอลิแซกคาไรด์ คอร์ (Polysaccharide core หรือ Region core) และลิพิดเอ (Lipid A) ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 2.2) ชนิดและจำนวนของน้ำตาล รวมทั้งรูปแบบการเชื่อมต่อกันระหว่างน้ำตาลแต่ละชนิด (Alpha หรือ Beta glycosidic linkage) ทำให้มีโอแอนติเจนแตกต่างกันได้หลายแบบ (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537: 204; Hirsh, 1999: 75) โดยอาศัยคุณสมบัติของโอแอนติเจนนี้สามารถแบ่งเชื้อออกเป็นซีโรกรุ๊ป (Serogroup) ต่างๆ แต่ละกรุ๊ปมีโอแอนติเจนให้ชื่อเป็นเลขอารบิค ทั้งนี้จะเริ่มจาก กรุ๊ป A มีโอแอนติเจน 1,2,12 ไปจนถึง กรุ๊ป Z ซึ่งตรงกับ โอกรุ๊ป 50 (O group 50) ต่อจากนั้นจะเป็น โอกรุ๊ป 51 เรื่อยไป จนถึง โอกรุ๊ป 67 (Aroon Bangtrakulnonth, 2002: 42)

เนื่องจากโอแอนติเจนอยู่รวมกับสารประกอบอื่น ในรูปของลิโพพอลิแซกคาไรด์ (Lipopolysaccharide) จึงทำให้สามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียสได้นานถึง 2 ชั่วโมง 30 นาที ทนต่อเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดอ่อนๆ ได้ดี (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537: 208, Aroon Bangtrakulnonth, 2002: 42)

2. เอช หรือแฟลกเจลลา แอนติเจน (H antigen หรือ Flagella antigen) เป็นส่วนประกอบของสารประเภทโปรตีน เชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนมากจะมีเอชแอนติเจน 2 เฟส (Phase) คือ เฟส 1 เรียกว่า เฟสจำเพาะ (Specific phase) และเฟส 2 เรียกว่า เฟสไม่จำเพาะ (Non-specific phase) ซึ่งแอนติเจนของเฟส 1 จะให้ชื่อเป็นตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก โดยเริ่มจาก a ถึง z แต่เนื่องจากในปัจจุบันนี้ ได้พบแอนติเจนมีอยู่มากกว่าจำนวนตัวอักษร แอนติเจนที่พบระยะหลังจึงให้ชื่อเป็น z_1 ถึง z_{59} (Aroon Bangtrakulnonth, 2002: 42) ส่วนแอนติเจนเฟส 2 มีอยู่หลายชนิด กำหนดด้วยตัวเลข โดยอาศัยคุณสมบัติของเอชแอนติเจนทำให้แบ่งเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นซีโรไทป์ต่างๆ ได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544: 93) ซึ่งเชื้อ ซีโรไทป์หนึ่งๆ อาจมีเอชแอนติเจนมากกว่า 1 ชนิด แอนติเจนอาจอยู่ในเฟส 1 หรือ ในเฟส 2 หรือในทั้ง 2 เฟส (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537: 208) ตัวอย่างซีโรไทป์ที่มีแอนติเจนเฟสเดียวเช่น *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Dublin เป็นต้น และซีโรไทป์ที่ไม่มีเอชแอนติเจน เช่น *Salmonella* Gallinarum เป็นต้น (Aroon Bangtrakulnonth, 2002: 42)

เอชแอนติเจนถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน (100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) แอลกอฮอล์ และกรดต่างๆ (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537: 208)

3. วีไอ แอนติเจน (Vi antigen) เป็นแอนติเจนที่คลุมอยู่รอบนอกโอแอนติเจน เป็นสารประกอบพอลิแซกคาไรด์ ถูกทำลายได้ด้วยความร้อน (60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง) กรดและฟีนอล (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537: 208) ซีโรไทป์ที่มีวีไอแอนติเจน ได้แก่ *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi C และ *Salmonella* Dublin ซึ่งจะทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงกว่าซีโรไทป์ที่ไม่มีวีไอแอนติเจน (Aroon Bangtrakulnonth, 2002: 42-43) วีไอแอนติเจนอาจบดบังโอแอนติเจน ทำให้เชื้อไม่จับกลุ่มตกตะกอน (Agglutinate) กับโอแอนติซีรัมในตอนแรก หลังทราบผลทดสอบด้วยวีไอแอนติซีรัมแล้ว ต้องละลายเชื้อในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อทำลายวีไอแอนติเจน แล้วจึงนำเอาตะกอนเชื้อทดสอบกับโอแอนติซีรัมต่อไป (Aroon Bangtrakulnonth, 2002: 56)


Flagella (H antigen)
Capsule (K or Vi antigen)
Lipopolysaccaride (LPS) or endotoxin
O polysaccharide
Polysaccharide core
Lipid A
Outer membrane
Periplasmic space
Lipoprotein
Peptidoglycan
Inner membrane
Cytoplasm
Pili

รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางแอนติเจนของเชื้อในตระกูล Enterobacteriacae
(ที่มา: นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544: 86)

จ. การแยกซีโรกรุ๊ปของเชื้อ

ในการแยกซีโรกรุ๊ปและซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. จะใช้วิธีทดสอบทางซีรัมวิทยา (Serological test) โดยอาศัยคุณสมบัติในการจับกลุ่มตกตะกอน (Agglutination) ระหว่างแอนติเจนที่ผิวเซลล์กับแอนติซีรัมจำเพาะ ซึ่งจะทำหลังจากที่เชื้อผ่านการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นแล้ว ในกรณีที่ต้องการระบุถึงระดับซีโรไทป์ของเชื้อ ต้องใช้แอนติซีรัมจำนวนมากและมีขั้นตอนมากมาย ห้องปฏิบัติการทั่วไปจึงมักรายงานถึงระดับซีโรกรุ๊ปของเชื้อ ซึ่ง Aroon Bangtrakulnonth (2002: 55-56) ได้แนะนำวิธีการและขั้นตอนในการตรวจไว้ดังนี้

1. หยดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ 1 หยด เขี่ยเชื้อจาก Triple sugar iron (TSI) agar slant มาละลายในน้ำเกลือ กวนให้เข้ากัน แล้วสังเกตว่าเกิดการจับกลุ่มตกตะกอนภายใน 30 วินาทีหรือไม่ หากเกิดการตกตะกอนแสดงว่า เชื้อดังกล่าวไม่สามารถทดสอบซีโรไทป์ได้เนื่องจากเชื้อเกิดการผ่าเหล่า (Mutation) ทำให้สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์โอแอนติเจน หรือทำให้ตำแหน่งที่สัมผัสกันระหว่างโอแอนติเจนกับพอลิแซกคาไรด์ คอร์ขาดหายไป (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537: 204) เป็นผลให้เชื้อตกตะกอนกับน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์

และตกตะกอนกับแอนติซีรัมทุกชนิด ดังนั้นจะไม่สามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็นซีโรไทป์ใด) ถ้าไม่ตกตะกอนกับน้ำเกลือ จึงทดสอบต่อได้

2. หยดแอนติซีรัม *Salmonella* Polyvalent A-67 และ *Salmonella* Polyvalent A-I บนกระจกสไลด์อย่างละ 1 หยด และเขี่ยเชื้อจาก TSI agar slant มาทดสอบกับแอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิด กวนให้เข้ากันดีกับแอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิด สังเกตปฏิกิริยาการจับกลุ่มตกตะกอนที่เกิดขึ้น ซึ่งจะเห็นภายใน 30-60 วินาที ถ้าจับกลุ่มตกตะกอนกับแอนติซีรัมชนิดใด แสดงว่าเชื้อมีแอนติเจนชนิดนั้น แต่เนื่องจากในขั้นตอนนี้ใช้แอนติซีรัมรวมหลายชนิด จึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นกรุ๊ปใด อาจเป็นชนิดใดชนิดหนึ่งระหว่าง *Salmonella* group A ถึง *Salmonella* group I ในกรณีที่ให้ผลบวกต่อ *Salmonella* Polyvalent A-I แต่ถ้าให้ผลลบต่อ *Salmonella* Polyvalent A-I แต่ให้ผลบวกต่อ *Salmonella* Polyvalent A-67 แสดงว่าเชื้อนี้อยู่ระหว่างช่วง *Salmonella* group J ถึง *Salmonella* group O:67

3. หลังจากนั้นให้ทดสอบกับแอนติซีรัมเดี่ยวแต่ละกรุ๊ป คือ *Salmonella* group A, B, C, D, E ถึง I ถ้าให้ผลบวกต่อกรุ๊ปใดให้รายงานว่าเป็น *Salmonella* group นั้น

ฉ. โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ

เชื้อ *Salmonella* spp. บางซีโรไทป์ค่อนข้างมีความจำเพาะต่อโฮสต์ (Relatively host-specific) อาทิเช่น *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Abortusequi, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Abortusovis, *Salmonella* Typhisuis และ *Salmonella* Pullorum และ *Salmonella* Gallinarum ที่มักก่อโรคเฉพาะในคน ม้า โค แกะ สุกร และสัตว์ปีก ตามลำดับ (Clarke and Gyless, 1993: 134; Barrow, Huggins and Lovell, 1994 cited in Okamura et al., 2001; Gast, 1997b: 81; Hirsh, 1999: 77) เป็นต้น ส่วนซีโรไทป์อื่นๆ พบว่าเป็นปัญหาได้ในสัตว์หลายชนิดรวมถึงคนด้วย

โรคที่พบในคน

สาเหตุทั่วไปของการติดเชื้อในคน เกิดจากการรับประทานอาหารและน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป สัตว์หลายชนิดเป็นพาหะนำเชื้อมาสู่คนได้ แต่ไก่และไข่ไก่ถูกจัดว่าเป็นแหล่งของเชื้อที่สำคัญที่สุดแหล่งหนึ่ง (Coyle et al., 1988 cited in Byrd et al., 1999: 40, Clarke and Gyless, 1993: 134; Gast, 1997a: 97, 1997b: 81; Hirsh, 1999: 77) ทั้งนี้เพราะไก่มีความชุก (Prevalence) ในการติดเชื้อสูง และมีการเลี้ยงเป็นจำนวนมากเพื่อการบริโภคทั่วโลก อย่างไรก็ตาม ไม่ใช่ทุกคนที่ได้รับเชื้อแล้วจะแสดงอาการของโรค (Horrox, ed., 1995, VII) ทั้งนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องเช่น ซีโรไทป์ของเชื้อ ปริมาณของเชื้อ และความต้านทานของแต่ละคน เป็นต้น (Hirsh, 1999: 77)

สำหรับอาการของโรคที่พบในคนนั้น จากข้อมูลที่รวบรวมโดยนงลักษณ์ สุวรรณพินิจ (2544: 94-97) และ Aroon Bangtrakulnonth (2002: 44) รายงานว่า สามารถจำแนกออกเป็น 3 แบบคือ

- ไข้เอนเทอริก (Enteric fevers) ประกอบด้วย โรคไข้ไทฟอยด์ (Typhoid) และพาราไทฟอยด์ (Paratyphoid) เชื้อที่เป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์คือ *Salmonella* Typhi ส่วนพาราไทฟอยด์มีสาเหตุจากเชื้อ *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Paratyphi B และ *Salmonella* Paratyphi C ทั้ง 2 โรคนี้มีอาการคล้ายกัน แต่พาราไทฟอยด์หรือไข้รากสาดเทียมมีความรุนแรงน้อยกว่า ทางติดต่อที่สำคัญคือการได้รับอาหารและน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป เมื่อเชื้อไปถึงลำไส้เชื้อจะบุกรุกผ่านชั้นเยื่อเมือกทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ จากนั้นเชื้อจะเข้าต่อมน้ำเหลืองของลำไส้ก่อนผ่านเข้าสู่กระแสเลือดแล้วกระจายไปยังตับ ถุงน้ำดี ม้าม ไต และไขกระดูก รวมทั้งเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (Lymphoid tissue) ของอวัยวะต่างๆ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ท้องอืดหรือท้องผูก ตับและม้ามโต อุจจาระร่วงอาจมีเลือดปนออกมาด้วย ถ้าผนังลำไส้ถูกทำลายมากอาจทำให้ลำไส้ทะลุได้ เชื้อที่เข้าสู่อวัยวะอื่นๆ อาจทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนได้ เช่น เยื่อหุ้มกระดูกอักเสบเป็นหนอง กระดูกอักเสบ มีฝีหนองในไต ถุงน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน เป็นต้น

- ภาวะโลหิตเป็นพิษ (Septicemia) สาเหตุมักเกิดจาก *Salmonella* Choleraesuis เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะไปเจริญและเพิ่มจำนวนในกระแสเลือด ดังนั้นผู้ป่วยจะไม่มีอาการอุจจาระร่วง แต่จะมีอาการไข้สูง หนาวสั่น น้ำหนักลดลง การแยกเชื้อจะพบเชื้อในกระแสเลือดเท่านั้น แต่เชื้อสามารถกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ ทำให้ปอดอักเสบ ไตอักเสบ ไขกระดูกอักเสบ ลิ้นหัวใจอักเสบ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ

- ลำไส้อักเสบ (Enterocolitis, Gastroenteritis) สาเหตุเกิดจากเชื้อหลายซีโรไทป์ด้วยกัน ซึ่งเชื้อจะติดเข้าไปกับอาหาร โดยเฉพาะอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไข่ และนม เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะแทรกผ่านชั้นเยื่อเมือกของลำไส้อย่างรวดเร็ว เข้าไปเพิ่มจำนวนในชั้น Lamina propria ของลำไส้เล็กส่วนปลายและลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดการอักเสบ ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้อาเจียน อุจจาระร่วงรุนแรง ปวดท้องและมีไข้เล็กน้อย ซีโรไทป์ที่แยกพบได้บ่อยและก่อโรครุนแรงคือ *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium

โรคที่พบในไก่

จากข้อมูลที่รวบรวมไว้โดย จิโรจ ศศิปรียจันทร์ (2544: 93-97), Gast (1997a: 97-104) และ Shivaprasad (1997: 81-86) สามารถแยกโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในไก่ออกเป็น 3 โรค ดังนี้

- โรคขี้ขาว (Pullorum disease) มีสาเหตุจากเชื้อ *Salmonella* Pullorum การเกิดโรคพบได้ทุกช่วงอายุ แต่อัตราการตายจะสูงในไก่อายุน้อย โดยเฉพาะช่วงอายุ 2-3 สัปดาห์แรก ส่วนไก่ใหญ่มักไม่แสดงอาการ ไก่ที่ป่วยจะมีอาการท้องเสีย มีมูลสีขาวติดที่ก้น หากลูกไก่หายใจเอาเชื้อเข้าไปขณะอยู่ในตู้ฟัก จะแสดงอาการและมีรอยโรคในระบบหายใจ
- โรคไทฟอยด์ (Fowl typhoid) เกิดจากเชื้อ *Salmonella* Gallinarum ไก่อายุน้อยกว่า 1 เดือน อาการจะเหมือนโรคขี้ขาว แต่สภาพการเกิดโรคจะเป็นแบบเรื้อรัง และมีไก่ทยอยตายไปเรื่อยๆ ส่วนการเกิดโรคในไก่รุ่นและไก่ใหญ่มักเป็นแบบเฉียบพลัน อาการที่พบคือ หน้าซีด หงอนเหี่ยว ท้องเสีย และอาจถึงตายได้
- โรคพาราไทฟอยด์ (Paratyphoid infections) เกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp. ซีโรไทป์อื่นๆ นอกเหนือจาก *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* และ 2 ซีโรไทป์ที่กล่าวมาข้างต้น การเกิดโรคเป็นได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง การตายจะพบได้ในลูกไก่อายุไม่เกิน 2 สัปดาห์ แต่ถ้าอายุมากกว่านั้นมักจะไม่แสดงอาการของโรคทั้งที่มีเชื้ออยู่ในลำไส้ และมีการกระจายของเชื้อไปยังอวัยวะภายในต่างๆ ไก่ส่วนหนึ่งจึงเป็นพาหะแพร่เชื้อเข้าสู่ฝูงได้ตลอดเวลา ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้ที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของคนด้วยได้แก่ *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium

ในระหว่าง *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium นี้ *Salmonella* Enteritidis นับว่ามีความรุนแรงในการก่อโรคมากกว่า (Spackman, 1989: 16) และแยกพบได้บ่อยกว่าทั้งจากฝูงไก่ (Lahellec et al., 1985; Cooper, Nicholas and Bracewell, 1992; Ebel, David and Mason, 1992) และผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Salmonella* spp. (Humphrey et al., 1996 cited in Hang'ombe et al., 1999: 597; Duchet-Suchaux et al., 1997: 559)

จากการศึกษาของ Okamura และคณะ (2001) แสดงให้เห็นว่า *Salmonella* Enteritidis สามารถเจริญแฝงอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่ไก่ได้ดี โดยพบสัดส่วนจำนวนตัวที่แยกพบเชื้อสูงกว่าการให้เชื้อซีโรไทป์อื่นๆ ที่ใช้ศึกษาในครั้งเดียวกัน อันได้แก่ *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Heidelberg และ *Salmonella* Montevideo ทั้งนี้แม่ไก่ที่ได้รับเชื้อทั้งจากการทดลองและจากธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการป่วย และสามารถให้ไข่ได้ตามปกติ (Timoney et al.,1989; Humphrey, 1990: 5; O'Brien, 1990: 120; Ziprin and DeLoach, 1993: 628; Miyamoto et al., 1997: 297) การปนเปื้อนเชื้อที่ไข่ เกิดขึ้นได้ 2 ทางคือ 1) เชื้อในระบบสืบพันธุ์ของแม่ไก่ ผ่านเข้าไปในไข่ ก่อนที่จะมีการวางไข่ (Vertical contamination) และ 2) เชื้อจากสิ่งแวดล้อมภายนอกตัวแม่ไก่ผ่านเปลือกไข่เข้าไป (Horizontal contamination) (Cox, Berrang and Cason, 2000: 1571-1572) ไข่ที่มีการปนเปื้อนเชื้อของ *Salmonella* Enteritidis ส่วนหนึ่งตัวอ่อนจะตายตั้งแต่อยู่ในไข่ฟัก (Dead-in-shell chicken embryo) (Kabilika, 1997 cited in Hang'ombe et al., 1999: 597) แต่ลูกไก่ที่ฟักออกมาได้จะทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อไปสู่ลูกไก่ตัวอื่นๆ ในโรงฟักได้ด้วย (Bailey, Cox and Berrang, 1994; Carson, Bailey and Cox, 1994) ลูกไก่ที่ได้รับเชื้อผ่านไข่หรือได้รับขณะที่อายุยังน้อย หากรอดตายจากโรคส่วนหนึ่งจะมีสภาพร่างกายไม่สมบูรณ์ แคระแกร็น การเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ และกลายเป็นพาหะของโรคต่อไป (จิโรจ ศศิปรียจันทร์, 2544: 93-97; Gast, 1997a: 97-104; Shivaprasad, 1997: 81-86)

ถึงแม้ *Salmonella* Pullorum และ *Salmonella* Gallinarum จะทำให้เกิดการติดเชื้อและเป็นพาหะเฉพาะในสัตว์ปีก ไม่ก่อโรคหรือเป็นพาหะในคน แต่จะมีผลกระทบต่อคนได้ เมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะรักษาการติดเชื้อในสัตว์ปีก ส่งผลให้เกิดปัญหาการติดเชื้อดื้อยาในคนด้วย (จิโรจ ศศิปรียจันทร์, 2544: 94)

ทับทิม (Pomegranate)

ทับทิมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Punica granatum* L. เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีการกล่าวถึงสรรพคุณว่า สามารถรักษาโรคบิดและอาการท้องเสียในคนได้ โดยส่วนที่นำมาใช้เป็นยาเพื่อรักษาโรคนั้น มีทั้งส่วนที่เป็นเปลือกผล (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม, 2533: 112-114; นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, บรรณาธิการ, 2541: 331) เปลือกต้น เปลือกราก ใบและผลอ่อน (นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, บรรณาธิการ, 2541: 330-331)

Wandee Gritsanapan และ Malyn Chulasiri (1983) ได้ทำการสกัดสมุนไพรไทยจำนวน 35 ชนิดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำให้แห้งหรือกึ่งแห้งขึ้นกับชนิดของสมุนไพร สารสกัดหยาบ (Crude extract) ที่ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอุจจาระผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสีย ด้วยวิธี Agar-disc diffusion ผลพบว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมสามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* แต่ยังไม่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecalis* (เดิมเรียก *Streptococcus faecalis*), *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi และ *Aeromonas hydrophila* ที่ใช้ทดสอบในครั้งนั้น

สุรีย์ ประเสริฐสุข และ มรกต สุกโชติรัตน์ (2529) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 18 ชนิดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคบิดในคน ทั้งนี้ได้เลือกใช้น้ำกลั่น เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และไดเอธิลอีเทอร์เป็นตัวทำละลาย โดยใช้วิธีการหมัก (Maceration) เมื่อหมักครบ 5 วัน นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) จากนั้นนำผงสารสกัดทดสอบต่อเชื้อ *Shigella* sp. 4 ชนิด

ได้แก่ *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* และ *Shigella boydii* โดยวิธี Agar-disc diffusion ผลพบว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมเมื่อสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เกือบทั้งหมด ยกเว้นเพียง *Shigella boydii*

Anesini และ Perez (1993) ได้ทำการสกัดสารสำคัญจากเปลือกผลทับทิม โดยการต้มในน้ำเดือด จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อจุลชีพ ด้วยวิธี Agar-well diffusion ผลพบว่า สารสกัดหยาบที่ได้นี้สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Aspergillus niger* และในปีถัดมา Perez และ Anesini (1994) ได้รายงานผลการศึกษาออกมาเพิ่มเติมว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีเดียวกันนั้น สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Typhi ได้ด้วย จากการทดสอบด้วยวิธี Agar-well diffusion เช่นเดียวกัน

Malyn Chulasiri, Rungravi Temsiririrkkul, Srichan Boonchai และคณะ (1995) ได้ทำการสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ของเหลวที่ได้นำไปกรอง ส่วนที่ผ่านการกรองนำไปทำให้ข้นโดยการระเหยเอาส่วนของแอลกอฮอล์ออก จากนั้นนำไปละลายในน้ำ กรองเอาเฉพาะส่วนที่ละลายน้ำได้ไปทำให้แห้งโดยวิธี Spray drying จนได้ผงของสารสกัด ซึ่งสารสกัดนี้เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Agar-disc diffusion ผลพบว่า สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Pseudomonas aeruginosa* แต่ไม่ได้ผลต่อเชื้อ *Escherichia coli* จากนั้น Malyn Chulasiri, Kleophant Thakerngpol และ Rungravi Temsiririrkkul (1995) ได้รายงานผลการศึกษาออกมาต่อเนื่องว่า สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่ได้มาด้วยวิธีการเดียวกัน สามารถฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* จากการทดสอบในหลอดทดลอง และสังเกตผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และในปีเดียวกัน Malyn Chulasiri, Rungravi Temsiririrkkul, Arunee Saraya และคณะ (1995) ได้ใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิมที่ได้มาด้วยวิธีการเดียวกับ 2 รายงานข้างต้น เป็นองค์ประกอบสำคัญในการเตรียมยาบ้วนปาก ผลพบว่า ยาบ้วนปากที่เตรียมขึ้นไม่แสดงพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสของเหงือกที่เลี้ยงในหลอดทดลอง เมื่อสัมผัสกันนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ในทางกลับกันได้แสดงผลอย่างเด่นชัดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปากที่ทำการทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* และ *Lactobacillus* spp. อีกทั้งสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำลาย ภายหลังนำน้ำลายจากอาสาสมัครทั้งที่มีสุขภาพช่องปากดีและที่มีปัญหาจากฟันผุและ/หรือกลิ่นปากสัมผัสกับยาบ้วนปากนี้ แต่ยาบ้วนปากนี้ยังไม่สามารถทำลายเชื้อ *Candida albicans*

หลังจากนั้น 1 ปี Malyn Chulasiri (1996) ได้นำเสนอผลการเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อเครื่องมือ (Instrument disinfectant) จากสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่ได้มาด้วยวิธีการเดียวกับ 3 รายงานข้างต้น ซึ่งพบว่า สามารถใช้ฆ่าเชื้อที่ผิวภาชนะที่นำมาทดสอบได้ โดยเชื้อที่นำมาทดสอบมีทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* spores, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* และ *Trichophyton mentagrophyte* ซึ่งมีเพียง *Shigella flexneri* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ค่อนข้างดื้อต่อน้ำยาฆ่าเชื้อที่เตรียมได้นี้ และในปีต่อมา M Chulasiri (1997) ได้นำเอาสารสกัดเปลือกผลทับทิมดังกล่าวมาเตรียมเป็นสบู่เหลวฆ่าเชื้อ (Antiseptic liquid soap) ซึ่งจากการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลชีพ ด้วยวิธี Agar-disc diffusion พบว่า สบู่เหลวฆ่าเชื้อนี้สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* Typhi, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophyte*, *Trichophyton rubrum* และ *Aspergillus niger* ได้ดี และเมื่อประยุกต์ใช้กับผิวหนังพบว่า จุลชีพบนมือของอาสาสมัครลดลง ภายหลังการฟอกด้วยสบู่เหลวชนิดนี้

ในช่วงเวลาใกล้เคียงกันนี้ Navarro และคณะ (1996) ได้นำเสนอผลการสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเมธิลแอลกอฮอล์ หลังทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans*

จากงานวิจัยต่างๆ ที่กล่าวมาทั้งหมดนั้น แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเปลือกผลทับทิมมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด แต่เนื่องจากแหล่งของวัตถุดิบต่างกัน ขั้นตอนการสกัดที่ไม่เหมือนกัน หรือแม้กระทั่งเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้ทดสอบแตกต่างกัน ทำให้มีบางรายงานที่ให้ผลขัดแย้งกับที่กล่าวถึงในข้างต้น อาทิเช่น Caceres และคณะ (1991) รายงานว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยแอลกอฮอล์ 88 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ahmad, Mehmood และ Mohammad (1998) ที่พบว่า สารสกัดเปลือกผลทับทิมที่เตรียมได้ไม่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เช่นกัน รวมทั้งไม่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* Typhimurium และ *Proteus vulgaris* ไม่ว่าจะสกัดด้วยน้ำ เฮกเซน หรือแอลกอฮอล์

อย่างไรก็ตาม เชื้อจุลชีพที่ใช้ทดสอบในการศึกษาต่างๆ ที่กล่าวมานั้น ทั้งหมดเป็นเชื้อที่แยกได้จากคน ดังนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการทดสอบผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อจุลชีพที่แยกได้จากไก่โดยตรง เพื่อผลที่เชื่อถือได้ในการนำไปใช้จริงในไก่

สารสำคัญในส่วนของเปลือกผลทับทิมมีหลายชนิด หากพิจารณาแยกเป็นกลุ่มของสารสำคัญจะพบว่ามี Flavonoids (Du, Wang and Francis, 1975; Mavlyanov et al., 1997) และ Tannins (Kakiuchi et al., 1986; Satomi et al., 1993; Mavlyanov et al., 1997) เป็นส่วนประกอบหลัก โดยเฉพาะ Tannins ซึ่งมีรายงานว่าพบได้ประมาณ 26-28 เปอร์เซ็นต์ (วัฒนา วิริวุฒิกร, 2539: 158) หรืออาจพบได้มากถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Duke and Ayensu, 1985 cited in Schubert, Lansky and Neeman, 1999) นอกจากนั้นในแต่ละกลุ่มยังสามารถแบ่งย่อยเป็นสารสำคัญเดี่ยวๆ ได้อีกหลายชนิด ถึงแม้จะมีการกล่าวถึงว่า Tannins มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพได้ (พรรนิภา ชุมศรี, 2526: 188) แต่ยังไม่มีรายงานฉบับใดระบุได้ว่า สารสำคัญใดบ้างในเปลือกผลทับทิมที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว และต้องใช้ตัวทำละลายหรือใช้วิธีการสกัดอย่างไรจึงจะเหมาะสม จากการศึกษาของ Malyn Chulasiri, Rungravi Temsiririrkkul, Srichan Boonchai และคณะ (1995), Malyn Chulasiri และคณะ (1995), Malyn Chulasiri, Rungravi Temsiririrkkul, Arunee Saraya และคณะ (1995) และ M Chulasiri (1997) แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลายครั้งแรก แล้วใช้น้ำเป็นตัวทำละลายครั้งที่ 2 จะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมถึงเชื้อ *Salmonella* Typhi ซึ่งอยู่ในกลุ่มของเชื้อที่กำลังสนใจศึกษาด้วย นอกจากนี้ Malyn Chulasiri, Rungravi Temsiririrkkul, Srichan Boonchai และคณะ ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกผลทับทิมเปรียบเทียบกับ Tannic acid ต่อเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ให้ผลคล้ายกัน และมีความแรง (Potency) ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของ Tannic acid ถึงแม้ในภายหลัง Malyn Chulasiri และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์ทางเคมีเบื้องต้นพบว่า สารสกัดดังกล่าวมีส่วนประกอบของ Hydrolyzable tannins แต่สาร Tannins ดังกล่าวนี้ ไม่ใช่ทั้ง Tannic acid และ Gallic acid

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

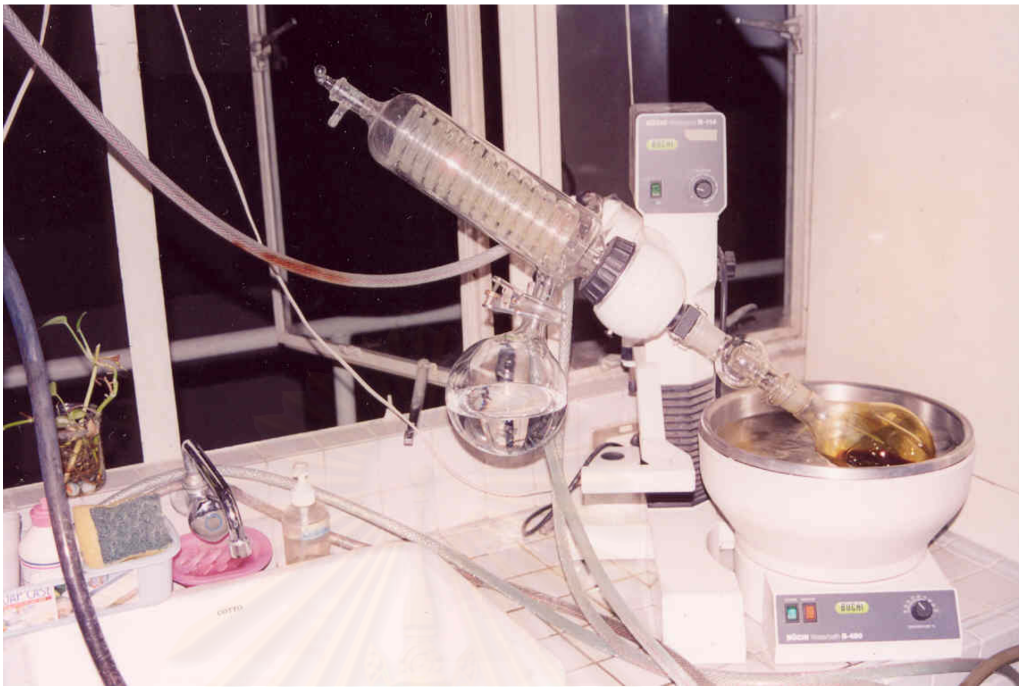
การเตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิม

ซื้อเปลือกผลทับทิมแห้งจากร้านขายสมุนไพรในกรุงเทพมหานคร นำมาคัดแยกสิ่งปลอมปนออก จากนั้นนำมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบด ชั่งน้ำหนักผงเปลือกผลทับทิมที่ได้ แล้วแบ่งใส่ถุงผ้าขาวบางขนาด 5 นิ้ว x 10 นิ้ว ที่เย็บเตรียมไว้แล้ว โดยแต่ละถุงใส่ผงเปลือกผลทับทิมไม่เกินครึ่งหนึ่งของความจุของถุง มัดปากถุงให้แน่น นำมาวางซ้อนกันในภาชนะเพื่อทำการหมัก ซึ่งในที่นี้ใช้ถังสเตนเลสขนาดใหญ่ที่มีฝาปิด (ดังแสดงในรูปที่ 3.1) ส่วนตัวทำละลายที่เลือกใช้คือ เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากสามารถสกัดสารได้กว้างมาก (นันทวัน บุณยะประภัศร และคณะ, 2532)

สำหรับขั้นตอนการหมักนั้น เริ่มจากเทเอธิลแอลกอฮอล์ให้ท่วมถุงผงเปลือกผลทับทิม ปิดฝาถังให้สนิท เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด ทำการเก็บสารสกัด โดยกรองตัวทำละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman filter paper No. 1, Whatman, England) ส่วนที่เป็นกาก (Marc) นำไปหมักตามขั้นตอนเดิม ส่วนที่เป็นของเหลวนำไปทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส (ดังแสดงในรูปที่ 3.2) จนได้ผงของสารสกัดที่มีสีน้ำตาลเข้ม ชั่งน้ำหนักผงสารสกัดที่ได้ทั้งหมด แบ่งบรรจุลงในขวดสีชา ปิดฝาให้แน่น (ดังแสดงในรูปที่ 3.3) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ในการเตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิมครั้งนี้ ได้ทำการหมักซ้ำรวมทั้งหมด 12 ครั้ง ใน 6 ครั้งแรกหมักนานครั้งละ 1 คืน อีก 5 ครั้งต่อมาหมักนานครั้งละ 2 คืน และในครั้งสุดท้ายหมักทิ้งไว้นาน 7 คืน จึงทำการเก็บสารสกัด

รูปที่ 3.1 วิธีการหมักผงเปลือกผลทับทิม



รูปที่ 3.2 เครื่องกลั่นภายใต้สูญญากาศ (Rotary evaporator)

รูปที่ 3.3 การเก็บรักษาผงสารสกัดเปลือกผลทับทิมในขวดแก้วสีชา

การศึกษาผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ โดยการหาค่า MBC (Minimal bactericidal concentration)

ก. การเก็บรวบรวมเชื้อ *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ทั้งหมดเป็นเชื้อที่แยกได้จากไก่ ซึ่งมีจำนวน 100 ตัวอย่าง (Isolate) 89 ตัวอย่างเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างที่ส่งเข้ามาตรวจที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อีก 11 ตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ (ภายใต้ความร่วมมือขององค์การอนามัยโลก) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับเชื้อ *Salmonella* spp. 89 ตัวอย่างที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการภาควิชาอายุรศาสตร์นั้น เป็นเชื้อที่เก็บรวบรวมไว้แล้วจากตัวอย่างที่ส่งเข้ามาตรวจตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540-2544 จำนวน 19 ตัวอย่าง ส่วนที่เหลือเป็นตัวอย่างที่แยกได้จากไข่ตายโคม (Dead-in-shell chicken embryo) และไส้ตัน (Ceca) ลูกไก่อายุ 1 วัน ที่ส่งมาจากโรงฟักไข่ของบริษัทเอกชน ในช่วงปี พ.ศ. 2545

ในระหว่างการรวบรวมเชื้อ *Salmonella* spp. ให้ครบ 100 ตัวอย่าง เชื้อแต่ละตัวอย่างที่แยกได้จะเพาะลงบน Tryptic soy agar (TSA) (Pronadisa®, Hispanlab, S.A.) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะทำการศึกษาในลำดับต่อไป

ข. การทดสอบแยกซีโรกรุ๊ปและซีโรไทป์ของเชื้อ

ก่อนทำการแยกซีโรกรุ๊ปของเชื้อ จะเพาะเชื้อลงใน TSI agar slant (Pronadisa®, Hispanlab, S.A.) จากนั้นดำเนินตามขั้นตอนที่แนะนำไว้โดย Aroon Bangtrakulnonth (2002: 55-56) ดังแสดงรายละเอียดไว้ในบทที่ 2 (จ) ส่วนการแยกซีโรไทป์ของเชื้อนั้นได้ส่งตัวอย่างไปยัง WHO National Salmonella and Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งได้ให้ความอนุเคราะห์ทดสอบหาซีโรไทป์ของเชื้อทั้ง 100 ตัวอย่างนี้

ค. การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ

ทำการเพาะเชื้อ *Salmonella* spp. ที่เก็บรวบรวมไว้ ลงบน Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar (Pronadisa®, Laboratorios, Conda, S.A.) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง เลือก 1 โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. เพาะต่อบน Blood agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปแตะเอาโคโลนีของเชื้อมาละลายใน Sterile phosphate-buffered saline pH 7.0 (PBS) แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland nephelometer standards 0.5 โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น (Oxoid turbidometer, Oxoid Limited) ซึ่งในขั้นตอนนี้จะทำให้มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU (Colony-forming units) ต่อมิลลิลิตร เสร็จแล้ว

เจือจางเชื้อใน PBS ในสัดส่วน 1:100 ตามวิธีของ Baron, Peterson และ Finegold (1994: 170-171) เพื่อให้เชื้อมีปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ Broth dilution นั่นคือ 10^5-10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537: 138)

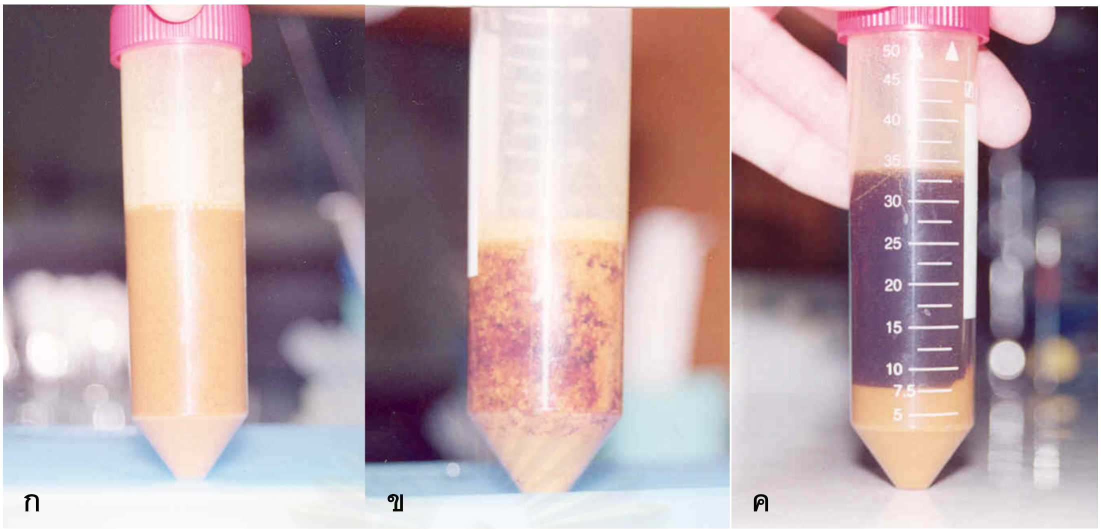
ง. วิธีทดสอบ

เลือกใช้วิธี Macrobroth (tube) dilution โดยยึดแนวปฏิบัติที่แนะนำไว้โดย Baron และคณะ (1994: 168-174) ดังนี้ ทำการละลายสารสกัดเปลือกผลทับทิมใน Mueller Hinton broth (MHB) (Pronadisa®, Hispanlab, S.A.) ให้มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นเจือจางใน MHB ให้ความเข้มข้นลดลงทุกๆ 2 เท่า (Two-fold serial dilution) จนถึงหลอดที่ 9 ซึ่งมีความเข้มข้นของสารสกัดฯ 0.078 เปอร์เซ็นต์ แต่ละหลอดจะมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร และมีหลอดที่ไม่มีสารสกัดฯ เป็นหลอดควบคุม จากนั้นเติมเชื้อ *Salmonella* spp. ที่เตรียมไว้ทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร (หลังเติมเชื้อแต่ละหลอดจะมีความเข้มข้นของสารสกัดลดลงครึ่งหนึ่งและปริมาณเชื้อลดลงครึ่งหนึ่งจากที่เตรียมไว้เช่นกัน) นำหลอดทดสอบเข้าบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง

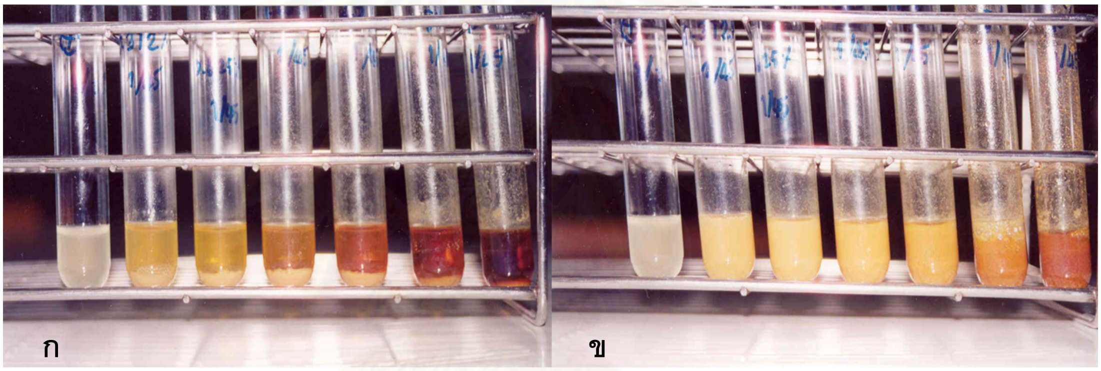
เฉพาะหลอดควบคุมของเชื้อแต่ละตัวอย่าง ก่อนนำเข้าบ่ม ให้นำมาหาปริมาณเชื้อตั้งต้นโดยการทำ Total plate count บน Standard Methods Agar (SMA) (Pronadisa®, Laboratorios, Conda, S.A.)

เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด นำของเหลวจากทุกหลอดยกเว้นหลอดควบคุม ไปหาปริมาณเชื้อทั้งหมดโดยการทำ Total plate count บน SMA ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีเชื้อ *Salmonella* spp. ขึ้นไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเชื้อตั้งต้น ถือเป็นค่า MBC (Minimal bactericidal concentration หรือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าทำลายเชื้อ) ของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp.

จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่า เมื่อละลายสารสกัดเปลือกผลทับทิมใน MHB จะให้สีน้ำตาลเข้มจนถึงน้ำตาลอ่อนตามระดับความเข้มข้น และอยู่ในรูปสารแขวนตะกอน (Colloid) (ดังแสดงในรูปที่ 3.4 และ 3.5) แม้จะมี DMSO (Dimethyl sulfoxide) เป็นตัวช่วยทำละลายถึง 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในทุกๆ ความเข้มข้นของสารสกัดฯ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MBC ที่ได้ไม่แตกต่างกันไม่ว่าจะเติม DMSO ด้วยหรือไม่ก็ตาม ดังนั้นจึงไม่สามารถอ่านค่า MIC (Minimal inhibitory concentration หรือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ) ของสารสกัดฯ ต่อเชื้อได้ เพราะค่า MIC ในการทดสอบโดยวิธีนี้ ตัดสินจากการสังเกตไม่พบความขุ่นเนื่องจากการเจริญของเชื้อด้วยตาเปล่า



รูปที่ 3.4 การละลายของสารสกัดเปลือกผลทับทิมใน Mueller Hinton broth
ก) ขณะเขย่าให้เข้ากันดี ข) ปล่อยทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ค) เมื่อตกตะกอนโดยสมบูรณ์



รูปที่ 3.5 ลักษณะที่ปรากฏในหลอดทดสอบหลังบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง
ก) ก่อนเขย่า ข) หลังเขย่า

การศึกษาผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่โดยวิธี Agar dilution

ก. การเตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เนื่องจากสารสกัดเปลือกผลทับทิมไม่ละลายเป็นสารละลาย (Solution) ใน MHB แต่มีลักษณะเป็นสารแขวนตะกอนและเกิดการตกตะกอนได้ในเวลาต่อมา ทำให้การกระจายตัวของสารสกัดฯ ไม่สม่ำเสมอในหลอดทดลอง จึงได้เตรียมสารสกัดฯ ให้อยู่ในรูปของ Agar เพื่อให้สารสกัดฯ มีการกระจายตัวทั่วถึงและมีความเข้มข้นเท่ากันในทุกๆ จุดที่สัมผัสกับเชื้อ

ทั้งนี้ในการเตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิมใน Agar นั้น ได้ดัดแปลงวิธีการของ Baron และคณะ (1994: 178-179) และ European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious

Diseases (ESCMID) (2000) ซึ่งเป็นการเตรียมสารละลายยาต้านจุลชีพใน Agar ในความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบต่อเชื้อแบคทีเรีย แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารสกัดฯ แทนยาต้านจุลชีพ ดังนั้นจึงมีขั้นตอนดังนี้ ขั้นแรกเตรียมสารสกัดฯ ในสารละลาย DMSO 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 2 มิลลิลิตร เขย่าให้สารสกัดฯ ละลาย (มีลักษณะเป็นสารแขวนตะกอนในทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดฯ) จากนั้นนำไปผสมกับ Mueller Hinton agar (MHA) (Pronadisa®, Hispanlab, S.A.) (ขณะที่ยังเหลวและมีอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส) จำนวน 18 มิลลิลิตร รวมเป็น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี แล้วเทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ทิ้งให้ Agar แข็งตัว ก่อนนำมาใช้ทดสอบต่อไป ซึ่งจานเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละอันจะมีความเข้มข้นของสารสกัดฯ เพียง 1 ระดับ คือ 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 หรือ 0.156 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเฉพาะ DMSO 2 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย DMSO 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 2 มิลลิลิตรผสมกับ MHA 18 มิลลิลิตร) เป็น Control plate ในขณะเดียวกันเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฉพาะสารสกัดฯ โดยไม่มี DMSO อีก 1 ชุด เพื่อเปรียบเทียบผล

ในระหว่างการเตรียม Agar ครั้งนี้พบว่า เมื่อใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิมเข้มข้น 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีผลทำให้ Agar ไม่แข็งตัว จึงไม่สามารถทดสอบได้ใน 2 ระดับดังกล่าว

ข. การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ

เชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อ *Salmonella* Enteritidis 1 ตัวอย่าง ซึ่งสุ่มจากเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ในกลุ่มที่ถูกฆ่าทำลายได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกผลทับทิม 1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เลือกศึกษาผลต่อเชื้อซีโรไทป์นี้เพราะเป็นซีโรไทป์ที่แยกพบมากที่สุด และมีบทบาทสำคัญต่อทั้งสุขภาพของคนและไก่ ส่วนที่กำหนดว่าต้องเป็นตัวอย่างที่ถูกฆ่าทำลายได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดฯ 1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ในการศึกษาครั้งนี้ และจะมีการนำตัวอย่างนี้ไปทดสอบผลของสารสกัดฯ ในตัวไก่ต่อไป

ในการเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบนั้น ปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียมเชื้อเพื่อหาค่า MBC โดยเมื่อได้สารละลายเชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland nephelometer standards 0.5 นำเชื้อไปเจือจางด้วย PBS ในสัดส่วน 1:10 แล้วเจือจางต่อใน PBS ในสัดส่วน 1:2 ก่อนนำไปใช้

ค. วิธีทดสอบ

นำสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ไป Spread บนผิวหน้า Agar ให้ทั่ว ดังนั้นแต่ละระดับความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่ทดสอบ จึงสัมผัสกับเชื้อในจำนวนที่ใกล้เคียงกับจำนวนเชื้อที่ใช้ทดสอบหาค่า MBC โดยวิธี Macrobroth dilution

นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมดเข้าบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง แล้วจึงอ่านผล

การศึกษาผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่โดยการหาค่า MIC (Minimal inhibitory concentration)

ก. การเตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดสอบหาค่า MIC ได้เลือกใช้วิธี Agar dilution โดยดัดแปลงวิธีการของ Baron และคณะ (1994: 178-179) และ EUCAST of ESCMID (2000) ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมเช่นเดียวกับในการทดสอบผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่โดยวิธี Agar dilution แต่ไม่ได้เติม DMSO และปรับขนาดของสารสกัดฯ ใน MHA ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงทุกๆ 2 เท่า จนถึงต่ำสุดที่ 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วน Control plate จะมีเฉพาะ MHA

ข. การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ

เชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ตัวอย่างเดียวกับที่ใช้ทดสอบผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมโดยวิธี Agar dilution และมีขั้นตอนการเตรียมเชื้อจนได้สารละลายเชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland nephelometer standards 0.5 เช่นเดียวกัน จากนั้นนำไปเจือจางด้วย PBS ในสัดส่วน 1:10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^4 CFU ต่อ 1 ไมโครลิตร

ค. วิธีทดสอบ

ใช้ Multi-point inoculator จุ่มลงในสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วแตะบนผิวหน้า Agar ซึ่งแต่ละจุดที่เข็มเพาะเชื้อ (Inoculating needle) สัมผัสกับ Agar จะมีสารละลายเชื้อประมาณ 1 ไมโครลิตรหรือมีเชื้อประมาณ 10^4 CFU ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมในการทดสอบโดยวิธีนี้ จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อเข้าบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง แล้วจึงอ่านผล

การศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่

ยึดหลักการจาก Quinn และคณะ (1994: 95-102) ดังนี้ เตรียมเชื้อแต่ละตัวอย่างให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland nephelometer standards 0.5 แล้วใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อชุบลงในสารละลายเชื้อ กดสำลีกับข้างหลอดเพื่อไม่ให้มีปริมาณเชื้อติดสำลีมากเกินไป นำมาถูบนผิวหน้า MHA ให้ทั่ว โดยถู 3 ทิศทาง เอียง 60 องศาซึ่งกันและกัน ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แล้วจึงวาง Antibiotic disc ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ Antibiotic disc dispenser จากนั้นนำเข้าบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

Antibiotic disc ที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้เป็นของ Oxoid® (Basingstoke, Hampshire, England) ทั้งหมด ซึ่งเป็นตัวยาที่นิยมนำมาใช้รักษาการติดเชื้อในสัตว์ปีก ทั้งนี้ได้แก่ (ตัวเลขในวงเล็บคือ ขนาดของตัวยาในแต่ละ Disc)

Neomycin (30 ไมโครกรัม)
Gentamicin (10 ไมโครกรัม)
Amoxycillin (10 ไมโครกรัม)
Norfloxacin (10 ไมโครกรัม)
Colistin sulphate (10 ไมโครกรัม)
Doxycycline hydrochloride (30 ไมโครกรัม)
Amoxycillin (20 ไมโครกรัม) + Clavulanic acid (10 ไมโครกรัม)
Sulphamethoxazole (23.75 ไมโครกรัม) + Trimethoprim (1.25 ไมโครกรัม)

การศึกษาเบื้องต้นถึงผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมในการต้านเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่ เมื่อทดสอบในตัวไก่

ตัวอย่างเชื้อที่ใช้ทดสอบ : เชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ตัวอย่างเดียวกับที่ใช้ทดสอบผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมโดยวิธี Agar dilution และที่ใช้ทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดฯ

การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ทดสอบ : เตรียมสารละลายเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland nephelometer standards 0.5 จากนั้นเจือจางด้วย PBS เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร แบ่งสารละลายเชื้อส่วนหนึ่งนำไปหาปริมาณเชื้อที่แท้จริงโดยการทำ Total plate count บน SMA อีกส่วนหนึ่งนำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดฯ ในตัวไก่ต่อไป

การให้เชื้อแก่ไก่ : ไก่แต่ละตัวได้รับเชื้อขนาด $1x10^4$ CFU ใน PBS 100 ไมโครลิตร โดยการป้อนปากเมื่อไก่อายุ 3 วัน และได้อดอาหารก่อนป้อนเชื้อ 2 ชั่วโมง ซึ่งจากการศึกษาของ Corrier และคณะ (1994) พบว่าเมื่อให้เชื้อ *Salmonella* Enteritidis แก่ไก่ในขนาด 10^4 CFU ต่อ

ตัวที่อายุเดียวกันนี้ สามารถตรวจพบเชื้อจากไส้ตันได้ถึง 16-18 ตัวจากทั้งหมด 20 ตัว (80-90 เปอร์เซ็นต์) ที่อายุ 10 วัน

การให้สารสกัดเปลือกผลทับทิมแก่ไก่ : การให้สารสกัดฯ จะให้ติดต่อกัน 3 วัน โดยละลายในน้ำกลั่นก่อนป้อนเข้ากระเพาะพักโดยตรง ทั้งนี้ขนาดที่ให้แก่ไก่พิจารณาจากค่า MBC ที่ดีที่สุดจากการทดสอบในหลอดทดลอง ซึ่งในที่นี้คือ 1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือ 1.25 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร หรือ 12.5 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนั้นขนาดตั้งต้นที่เลือกป้อนให้แก่ไก่คือ 12.5 มิลลิกรัมต่อตัว (1X) และอีกขนาดที่ให้แก่ไก่คือ 25 มิลลิกรัมต่อตัว (2X) (เพิ่มเป็น 2 เท่า) โดยละลายในน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรต่อตัวเท่ากัน

อาหาร : ใช้อาหารสำหรับไก่เนื้อระยะแรก ซึ่งมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 21 เปอร์เซ็นต์ และไม่มียากันบิดและยาปฏิชีวนะ

การเลี้ยง : ไก่แต่ละกลุ่มเลี้ยงในกรงยกพื้นสูง ขนาด 0.6x1.0 ตารางเมตร อยู่ในบริเวณเดียวกัน ให้แสงสว่างตลอด 24 ชั่วโมง ให้น้ำและอาหารกินเต็มที่ตลอดเวลา

ไก่ทดลอง :

ใช้ไก่เนื้อคละเพศอายุ 1 วัน จำนวน 180 ตัว ทำการเก็บตัวอย่างมูลไก่จากกระดาษรองกล่องลูกไก่ พร้อมทั้งสุ่มลูกไก่ออกมา 20 ตัวผ่าเก็บไส้ตัน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในไก่ก่อนการทดลอง ที่เหลืออีก 160 ตัวสุ่มแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว แต่ละกลุ่มได้รับสารสกัดฯ และเชื้อ *Salmonella* Enteritidis แตกต่างกันดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับสารสกัดฯ, ไม่ได้รับเชื้อ
กลุ่มที่ 2 ไม่ได้รับสารสกัดฯ, ได้รับเชื้อ (ที่อายุ 3 วัน)
กลุ่มที่ 3 เริ่มได้รับสารสกัดฯ ในขนาด 1X ก่อนได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 4 เริ่มได้รับสารสกัดฯ ในขนาด 2X ก่อนได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง
(กลุ่มที่ 3 และ 4 ได้รับสารสกัดที่อายุ 2-4 วัน และได้รับเชื้อที่อายุ 3 วัน)
กลุ่มที่ 5 เริ่มได้รับสารสกัดฯ ในขนาด 1X หลังได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 6 เริ่มได้รับสารสกัดฯ ในขนาด 2X หลังได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง
(กลุ่มที่ 5 และ 6 ได้รับสารสกัดที่อายุ 4-6 วัน และได้รับเชื้อที่อายุ 3 วัน)
กลุ่มที่ 7 ได้รับเฉพาะสารสกัดฯ ในขนาด 1X ที่อายุ 4-6 วัน
กลุ่มที่ 8 ได้รับเฉพาะสารสกัดฯ ในขนาด 2X ที่อายุ 4-6 วัน

เมื่อไก่อายุ 7 วัน ทำการผ่าซากเก็บไส้ตันเพื่อตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp.

การเพาะแยกเชื้อ : สำหรับขั้นตอนในการเพาะแยกเชื้อ *Salmonella* spp. จากไส้ตันไก่นั้นเบื้องต้นได้ดัดแปลงวิธีของ Corrier และคณะ (1994: 299) โดยเก็บไส้ตันแยกรายตัวในถุงพลาสติกที่ใหม่และสะอาด จากนั้นใช้กรรไกรตัดชิ้นเนื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดย่อยไส้ตันให้

เป็นชิ้นเล็กๆ เติม Buffered peptone water (BPW) pH 7.5 ตัวอย่างละ 30 และ 50 มิลลิลิตร สำหรับไส้ตันที่เก็บเมื่ออายุ 1 และ 7 วัน ตามลำดับ ปิดผนึกปากถุงพลาสติกด้วยความร้อน โดยใช้ Plastic sealer จากนั้นนำถุงตัวอย่างเข้าเครื่อง Masticator (IUL instruments, Barcelona, Spain) เปิดให้เครื่องทำงานนาน 20 วินาทีต่อถุง (ดัดแปลงจากวิธีของ Wooley, Gibbs และ Shotts,Jr. (1999: 247) และ Corrier และคณะ (1991: 338)) ก่อนนำเข้าบ่มเพาะเชื้อ สำหรับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและขั้นตอนในการเพาะแยกเชื้อ *Salmonella* spp. ในลำดับต่อไป ได้ดัดแปลงจากวิธีที่แนะนำไว้โดย Aroon Bangtrakulnonth และคณะ (1995), O Suthienkul และคณะ (1995) และ Aroon Bangtrakulnonth (2002: 48-49) ดังนี้

เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด ให้นำถุงตัวอย่างออกมาจากตู้บ่มเพาะเชื้อ ใช้กรรไกรตัดปากถุงให้เป็นรู แล้วใช้ปิเปตดูดถ่ายของเหลวจำนวน 100 ไมโครลิตร หยดลงบน Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) medium (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) และอีก 1 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดที่มี Tetrathionate broth (TTB) (Pronadisa®, Laboratorios, Conda, S.A.) 15 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดเข้าบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ ตัวอย่างที่ทำให้สีของ MSRV medium เปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินใส เป็นสีขาวขุ่นรอบๆ จุดที่หยดเชื้อ (เชื้อ *Salmonella* spp. ที่มีแฟลกเจลลา จะเคลื่อนที่ไปรอบๆ จุดที่หยดเชื้อ) จากนั้นใช้เข็มเขี่ย (Straight wire) แตะเชื้อ ณ จุดที่แผ่ไปไกลที่สุด เพาะใน TSI agar slant ส่วนของเหลวจาก TTB ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มแล้วนำไปป้ายบน XLD agar ก่อนใช้ลูป (Loop) แตะเชื้อจากตำแหน่งที่ป้ายลงครั้งแรก แล้ว Streak เชื้อให้กระจายเพื่อเชื้อจะได้ขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ นำทั้ง TSI agar slant และ XLD agar เข้าบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่ (91.6 เปอร์เซ็นต์ (Ewing and Ball, 1996 cited in Aroon Bangtrakulnonth, 2002: 9)) ที่ขึ้นบน XLD agar จะมีสีแดง รูปร่างกลม ขนาดปานกลาง ตรงกลางมีสีดำเนื่องจากมีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ เลือกลักษณะโคโลนีดังกล่าวนำไปเพาะยืนยันใน TSI agar slant

การบ่มเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดข้างต้น จะใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดถัดไป ยกเว้น MSRV medium ที่ต้องบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างที่สามารถเปลี่ยนสีของ TSI agar slant ให้มีสีเหลืองที่ก้นหลอด และมีสีแดงที่ผิวหน้า Slant ทั้งนี้อาจมีหรือไม่มีการสร้างก๊าซและไฮโดรเจนซัลไฟด์ จะนำไปตรวจยืนยันด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาและหาซีโรกรุ๊ปของเชื้อที่ตรวจพบ ตามวิธีของ Aroon Bangtrakulnonth (2002: 55-56) ดังรายละเอียดในบทที่ 2 (จ)

ส่วนการเพาะแยกเชื้อจากกระดาษรองกล่องลูกไก่ ใช้ไม้พันสำลีจุ่ม BPW ให้เปียก แล้วเช็ดมูลไก่ที่เปื้อนอยู่บนกระดาษ สุ่มให้กระจายทั่วบริเวณ (1 ช่องบรรจุลูกไก่ 25 ตัว ใช้ไม้พันสำลี

4 อันต่อ 1 ช่อง) จุ่มไม้พันสำลีทิ้งไว้ในหลอด BPW 10 มิลลิลิตร นำเข้าบ่มเพาะเชื้อ วิธีการในลำดับต่อไปปฏิบัติเช่นเดียวกับการเพาะแยกเชื้อจากไส้ตัน

สำหรับการเพาะแยกเชื้อจากอาหารและน้ำที่ใช้เลี้ยงไก่ ได้สุ่มอาหารและน้ำที่ใช้เลี้ยงไก่มาจำนวน 25 กรัมและ 25 มิลลิลิตรตามลำดับ เพาะเชื้อลงใน BPW เป็นขั้นต้นเช่นเดียวกับการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างอื่นๆ แต่ใช้ BPW ในขั้นตอนนี้ 225 มิลลิลิตรต่อ 1 ชนิดตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากันดีใน Erlenmeyer flask ก่อนนำเข้าบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ วิธีการในลำดับต่อไปเช่นเดียวกับการเพาะแยกเชื้อจากไส้ตัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ : วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยการเปรียบเทียบสัดส่วนจำนวนตัวที่ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* group D ด้วย Chi-square test

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการแยกซีโรกรุ๊ปของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่

จากเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง สามารถแยกเป็นกรุ๊ปต่างๆ ตามคุณสมบัติของโอแอนติเจนได้ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้เป็น *Salmonella* group D ถึง 71 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *Salmonella* group C, B, E และ I ซึ่งมีจำนวน 12, 8, 8 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ผลการแยกซีโรกรุ๊ปของเชื้อ *Salmonella* spp.

ซีโรกรุ๊ป	**รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด**	**เก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2540-2544**	**เก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2545**	**จากศูนย์ติดตามการดื้อยาฯ**
B	8	3	5	0
C	12	10	0	2
D	71	6	62	3
E	8	0	3	5
I	1	0	0	1

ผลการแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่

จากการทดสอบหาซีโรไทป์ของเชื้อทั้ง 100 ตัวอย่าง โดย WHO National Salmonella and Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า เชื้อใน

กรุ๊ป B ประกอบด้วย *Salmonella* Typhimurium 6 ตัวอย่าง และ *Salmonella* Stanley 2 ตัวอย่าง

กรุ๊ป C ประกอบด้วย *Salmonella* Albany 3 ตัวอย่าง, *Salmonella* Hadar 3 ตัวอย่าง, *Salmonella* Haardt 2 ตัวอย่าง, *Salmonella* Virchow 2 ตัวอย่าง, *Salmonella* Brunei 1 ตัวอย่าง และ *Salmonella* Newport 1 ตัวอย่าง

กรุ๊ป D ประกอบด้วย *Salmonella* Enteritidis 70 ตัวอย่าง และ *Salmonella* Blockley 1 ตัวอย่าง

กรุ๊ป E ประกอบด้วย *Salmonella* Orian 3 ตัวอย่าง, *Salmonella* Weltevreden 3 ตัวอย่าง และ *Salmonella* Anatum 2 ตัวอย่าง

กรุ๊ป I มี 1 ตัวอย่าง คือ *Salmonella* Hvittingfoss

ปริมาณผงของสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่เตรียมได้

น้ำหนักรวมของผงสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่ได้ในครั้งนี้คิดเป็น 24.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับน้ำหนักผงเปลือกผลทับทิมแห้งตั้งต้น

ค่า MBC ของผงสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่

สารสกัดเปลือกผลทับทิมที่เตรียมได้ในครั้งนี้ มีฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ ทั้ง 100 ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยให้ค่า MBC อยู่ที่ระดับ 1.25 ถึง 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทั้งนี้ตัวอย่างเชื้อส่วนใหญ่ (78 ตัวอย่าง) ถูกฆ่าทำลายได้ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดฯ 1.25 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลืออีก 22 ตัวอย่างถูกฆ่าทำลายได้ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดฯ ที่สูงขึ้นคือ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่

Salmonella group	**จำนวนตัวอย่างที่ถูกฆ่าทำลายได้ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดฯ**				
	5 **เปอร์เซ็นต์**	2.5 **เปอร์เซ็นต์**	1.25 **เปอร์เซ็นต์**	0.625 **เปอร์เซ็นต์**	0.312 **เปอร์เซ็นต์**
B	8	8	8	0	0
C	12	12	10	0	0
D	71	71	56	0	0
E	8	8	4	0	0
I	1	1	0	0	0
รวม	100	100	78	0	0

ผลการทดสอบสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่โดยวิธี Agar dilution

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิม สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ได้ แม้ถูกเตรียมรวมอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งหรือ Agar และความเข้มข้นของสารสกัดฯ ต่ำสุดที่ไม่พบเชื้อขึ้นเลยคือ 0.312 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทั้งที่เติมและไม่เติม DMSO

ค่า MIC ของผงสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่

ค่า MIC ของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่นำมาทดสอบ คือ 0.312 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ผลการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่า มีเชื้อเพียง 13 ตัวอย่างจากทั้งหมด 100 ตัวอย่างที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 1 ชนิดขึ้นไป ซึ่งยาที่พบว่ามีการดื้อของเชื้อมากที่สุดคือ Doxycycline hydrochloride รองลงมาคือ Amoxycillin, Sulphamethoxazole+Trimethoprim, Neomycin และ Gentamicin ซึ่งมีตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลดังกล่าวจำนวน 8, 6, 5, 2 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อแยกผลการดื้อยาของเชื้อตามกรุ๊ป พบว่า เชื้อจำนวน 3 ใน 8 ตัวอย่างของกรุ๊ป B มีการดื้อยา ซึ่งทั้ง 3 ตัวอย่างนี้ดื้อต่อ Sulphamethoxazole+Trimethoprim และ Doxycycline hydrochloride เหมือนกัน และมี 1 ตัวอย่าง ที่ดื้อต่อ Amoxycillin ด้วย สำหรับกรุ๊ป C นั้น จากทั้งหมด 12 ตัวอย่าง พบการดื้อยา 4 ตัวอย่าง และทั้ง 4 ตัวอย่าง ดื้อต่อ Doxycycline hydrochloride ในจำนวนนี้มี 1 ตัวอย่างที่ดื้อต่อ Neomycin ด้วย ส่วนเชื้อในกรุ๊ป D พบการดื้อยา 5 ใน 71 ตัวอย่าง เชื้อ 4 ตัวอย่าง ดื้อต่อ Amoxycillin และ อีก 1 ตัวอย่างดื้อต่อ, Sulphamethoxazole+Trimethoprim กรุ๊ป E พบการดื้อยาเพียง 1 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 8 ตัวอย่าง แต่ดื้อต่อยาทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ Gentamicin, Neomycin, Amoxycillin, Sulphamethoxazole+Trimethoprim และ Doxycycline hydrochloride ส่วน กรุ๊ป I มี 1 ตัวอย่าง และไม่พบการดื้อยาต่อทั้ง 8 ชนิดที่นำมาทดสอบ

ยาที่ให้ผลกึ่งกลาง (Intermediate) ในการทดสอบ คือ Colistin sulphate, Doxycycline hydrochloride และ Neomycin ซึ่งเชื้อที่ทำให้เกิดผลดังกล่าวนั้นมีจำนวน 8, 4 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ

จากเชื้อที่นำมาศึกษาทั้งหมด 100 ตัวอย่าง พบว่า เชื้อทั้ง 100 ตัวอย่างไวต่อ Norfloxacin และ Amoxycillin+Clavulanic acid, 99 ตัวอย่างไวต่อ Gentamicin, 97 ตัวอย่างไวต่อ Neomycin, 95 ตัวอย่างไวต่อ Sulphamethoxazole+Trimethoprim, 94 ตัวอย่างไวต่อ Amoxycillin, 92 ตัวอย่างไวต่อ Colistin sulphate และ 88 ตัวอย่างไวต่อ Doxycycline hydrochloride

เมื่อเปรียบเทียบผลการดื้อยากับค่า MBC ที่ได้พบว่า เชื้อ 11 ใน 13 ตัวอย่างที่มีการดื้อยาถูกฆ่าทำลายได้ด้วยสารสกัดเปลือกผลทับทิมในระดับความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนที่เหลืออีก 2 ตัวอย่าง ถูกฆ่าทำลายได้ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นคือ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ตารางที่ 4.3 ผลทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่

ตัวอย่างหมายเลข	**กรุ๊ป**	**ซีโรไทป์**	**ค่าMBC**	**ชนิดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ**							
				NOR	CN	N	CT	AMC	AML	SXT	DO
1	B	Stanley	1.25	S	S	S	I	S	S	S	S
2	B	Stanley	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
3	B	Typhimurium	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
4	B	Typhimurium	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
5	B	Typhimurium	1.25	S	S	S	S	S	R	R	R
6	B	Typhimurium	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
7	B	Typhimurium	1.25	S	S	S	S	S	S	R	R
8	B	Typhimurium	1.25	S	S	S	S	S	S	R	R
9	C	Albany	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
10	C	Haardt	2.5	S	S	S	S	S	S	S	R
11	C	Albany	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
12	C	Albany	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
13	C	Brunei	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
14	C	Haardt	1.25	S	S	S	S	S	S	S	I
15	C	Hadar	1.25	S	S	S	S	S	S	S	R
16	C	Hadar	1.25	S	S	S	S	S	S	S	R
17	C	Hadar	1.25	S	S	I	I	S	S	S	I
18	C	Newport	1.25	S	S	R	S	S	S	S	R
19	C	Virchow	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
20	C	Virchow	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
21	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
22	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
23	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
24	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
25	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
26	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
27	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
28	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S

ตารางที่ 4.3 ผลทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ (ต่อ)

ตัวอย่างหมายเลข	กรุ๊ป	ซีโรไทป์	ค่าMBC	ชนิดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ							
				NOR	CN	N	CT	AMC	AML	SXT	DO
29	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
30	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
31	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
32	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
33	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
34	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
35	D	Enteritidis	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
36	D	Blockley	1.25	S	S	S	S	S	S	S	I
37	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
38	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	I	S	S	S	S
39	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
40	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
41	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	I	S	S	S	S
42	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
43	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
44	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
45	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
46	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
47	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
48	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	I	S	S	S	S
49	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
50	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
51	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
52	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
53	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
54	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
55	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
56	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S

ตารางที่ 4.3 ผลทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ (ต่อ)

ตัวอย่างหมายเลข	**กรุ๊ป**	**ซีโรไทป์**	**ค่าMBC**	**ชนิดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ**							
				NOR	CN	N	CT	AMC	AML	SXT	DO
57	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
58	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
59	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
60	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
61	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	I	S	S	S	S
62	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	R	S	S
63	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	R	S	S
64	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
65	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
66	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
67	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
68	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
69	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
70	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
71	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
72	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	I	S	S	S	S
73	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
74	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
75	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	R	S	S
76	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	R	S	S
77	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
78	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
79	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
80	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
81	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
82	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
83	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
84	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S

ตารางที่ 4.3 ผลทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ (ต่อ)

ตัวอย่างหมายเลข	กรุ๊ป	ซีโรไทป์	ค่าMBC	ชนิดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ							
				NOR	CN	N	CT	AMC	AML	SXT	DO
85	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
86	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
87	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
88	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
89	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	R	S
90	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
91	D	Enteritidis	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
92	E	Orian	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
93	E	Orian	2.5	S	S	S	I	S	S	S	S
94	E	Orian	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S
95	E	Weltevreden	2.5	S	R	R	S	S	R	R	R
96	E	Anatum	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
97	E	Anatum	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
98	E	Weltevreden	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
99	E	Weltevreden	1.25	S	S	S	S	S	S	S	S
100	I	Hvittingfoss	2.5	S	S	S	S	S	S	S	S

NOR = Norfloxacin, CN = Gentamicin, N = Neomycin, CT = Colistin sulphate, AMC = Amoxycillin + Clavulanic acid, AML = Amoxycillin, SXT = Sulphamethoxazole + Trimethoprim, DO = Doxycycline hydrochloride

จากผลการทดสอบ กำหนดให้ S = มีความไว (Susceptible), I = ให้ผลกึ่งกลาง (Intermediate) และ R = ดื้อยา (Resistant)

ผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมในการต้านเชื้อ *Salmonella* Enteritidis เมื่อทดสอบในตัวไก่

ในการเพาะแยกเชื้อ *Salmonella* group D จากไส้ตันไก่เมื่อไก่อายุ 7 วัน (4 วันหลังให้เชื้อ) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จะเห็นว่า ไก่ในกลุ่มที่ 5 ซึ่งได้รับสารสกัดฯ ในขนาด 1X หลังได้รับเชื้อ มีจำนวนตัวที่ตรวจพบเชื้อมากที่สุด คือ 18 ตัวจาก 20 ตัว ซึ่งพบในสัดส่วนที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมได้รับเชื้อ (ตรวจพบ 15 ตัวจาก 20 ตัว) ส่วนการพบเชื้อในกลุ่มที่ 6 (ได้รับสารสกัดฯ ในขนาด 2X

หลังได้รับเชื้อ) ถึงแม้จะตรวจพบเชื้อได้น้อยลงคือ ตรวจพบ 9 ตัวจาก 20 ตัว และแตกต่างจากกลุ่มที่ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่สัดส่วนจำนวนตัวที่ตรวจพบเชื้อไม่แตกต่างทางสถิติจากกลุ่มที่ 2

สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฯ ก่อนได้รับเชื้อ พบว่า สัดส่วนจำนวนตัวที่ตรวจพบเชื้อต่ำกว่ากลุ่มควบคุมได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งที่ให้ในขนาด 1X และ 2X (กลุ่มที่ 3 และ 4 ซึ่งตรวจพบ 1 ตัวจาก 20 ตัว และ 5 ตัวจาก 20 ตัว ตามลำดับ) นอกจากนั้นสัดส่วนจำนวนตัวที่ตรวจพบเชื้อของกลุ่มที่ 3 ไม่แตกต่างทางสถิติ จากกลุ่มควบคุมไม่ได้รับเชื้อ (กลุ่มที่ 1) อีกด้วย

ไก่ที่ได้รับเฉพาะสารสกัดฯ อย่างเดียว ทั้ง 2 ขนาด (กลุ่มที่ 7 และ 8) ไม่พบการติดเชื้อที่ไส้ตัน การเพาะแยกเชื้อจากอาหารและน้ำที่ใช้เลี้ยงไก่ทดลอง และจากกระดาษรองกล่องลูกไก่ตรวจไม่พบเชื้อเช่นกัน

ตารางที่ 4.4 การตรวจพบเชื้อ *Salmonella* group D ในไส้ตันไก่ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่อายุ 7 วัน

กลุ่ม	**การได้รับสารสกัดเปลือกผลทับทิม**	**จำนวนตัวที่ตรวจพบ *Salmonella* group D**
1	ไม่ได้รับสารสกัดฯ ไม่ได้รับเชื้อ	0/20*$^{\text{จ}}$
2	ไม่ได้รับสารสกัดฯ ได้รับเชื้อ	15/20$^{\text{กข}}$
3	เริ่มได้รับสารสกัดฯ ขนาด 1X ก่อนได้รับเชื้อ	1/20$^{\text{งจ}}$
4	เริ่มได้รับสารสกัดฯ ขนาด 2X ก่อนได้รับเชื้อ	5/20$^{\text{คง}}$
5	เริ่มได้รับสารสกัดฯ ขนาด 1X หลังได้รับเชื้อ	18/20$^{\text{ก}}$
6	เริ่มได้รับสารสกัดฯ ขนาด 2X หลังได้รับเชื้อ	9/20$^{\text{ขค}}$
7	ได้รับเฉพาะสารสกัดฯ ขนาด 1X	0/20$^{\text{จ}}$
8	ได้รับเฉพาะสารสกัดฯ ขนาด 2X	0/20$^{\text{จ}}$

* จำนวนตัวที่ตรวจพบเชื้อ/จำนวนตัวที่ตรวจทั้งหมด

$^{\text{กขคงจ}}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

บทที่ 5

วิจารณ์ ข้อคิดเห็น และ สรุปผลการทดลอง

เชื้อที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ หากพิจารณาเฉพาะตัวอย่างที่เก็บรวบรวมในช่วงปี พ.ศ. 2545 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่แยกเก็บได้จากไข่ตายโคมและจากไส้ตันลูกไก่อายุ 1 วัน จะพบว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ถึง 62 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 70 ตัวอย่าง และเป็น *Salmonella* Typhimurium เพียง 3 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับ Lahellec และคณะ (1985), Cooper และคณะ (1992), Ebel และคณะ (1992) และ Laksana Kantama และ Panida Jayanetra (1996) ที่รายงานว่า สามารถแยกพบเชื้อ *Salmonella* Enteritidis จากฝูงไก่ได้ในสัดส่วนที่สูงกว่าซีโรไทป์อื่นๆ และเป็นไปตามข้อสรุปของ Hansenson และคณะ (1992) อ้างถึงใน Miyamoto และคณะ (1999: 498) ที่กล่าวไว้ว่า ไข่ไก่เป็นแหล่งของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่สำคัญที่สุด ซึ่งไข่อาจได้รับเชื้อจากแม่ไก่โดยตรงหรือได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมแล้วผ่านเปลือกไข่เข้าไป (Cox et al., 2000: 1571-1572) ตัวอ่อนส่วนหนึ่งตายตั้งแต่อยู่ในไข่ฟัก (ไข่ตายโคม) (Kabilika, 1997 cited in Hang'ombe et al., 1999: 597) ในขณะที่ส่วนหนึ่งสามารถฟักออกมาเป็นตัวได้ (Bailey et al., 1994; Carson et al., 1994) และทำให้ตรวจเจอเชื้อได้ตั้งแต่อายุ 1 วัน (Kabilika, 1997 cited in Hang'ombe et al., 1999: 597) ทั้งนี้ลูกไก่อาจได้รับเชื้อตั้งแต่อยู่ในไข่ หรือได้รับหลังฟักออกมาเป็นตัวแล้วขณะอยู่ในโรงฟักไข่ (Gast and Beard, 1989; Cox et al., 1992; Gast and Holt, 1998) ซึ่งเชื้อนอกจากจะเข้าสู่ร่างกายลูกไก่ทางการกินแล้ว ยังผ่านเข้าไปกับลมหายใจได้อีกด้วย (Nakamura et al, 1997; Gast, Mitchell and Holt, 1998; Holt, Mitchell and Gast, 1998) และตำแหน่งที่เชื้อเข้าไปเจริญได้ดีที่สุดในทางเดินอาหารของไก่ คือ ไส้ตัน (Fanelli et al., 1971) แม้จะให้เชื้อเข้าทางหลอดลม และสามารถตรวจพบเชื้อได้หลังให้เชื้อนาน 6 ชั่วโมง (Nakamura et al., 1995)

ปริมาณผงของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม เมื่อสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมได้ในครั้งนี้ คิดเป็น 24.69 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักผงเปลือกผลทับทิมแห้งตั้งต้น ซึ่งปริมาณที่ได้นี้แตกต่างจากผลการศึกษาของ Wandee Gritsanapan และ Malyn Chulasiri (1983) ที่ใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบคิดเป็น 29.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Navarro และคณะ (1996) ใช้เมธิลแอลกฮอล์เป็นตัวทำละลาย และได้สารสกัดหยาบคิดเป็น 20.1 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้จะไม่มีการวิเคราะห์ถึงชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่เป็นส่วนประกอบภายใน แต่จากคุณภาพของวัตถุดิบที่แตกต่างกัน วิธีการและขั้นตอนในการสกัด รวมทั้งชนิดของตัวทำละลายที่ไม่เหมือนกัน ย่อมส่งผลให้เกิดความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่สกัดได้ ดังผลการศึกษาของ Kusumoto และคณะ (1995) ที่

สกัดสารจากเปลือกผลทับทิมด้วยวิธีการเดียวกัน แต่ใช้น้ำและเมธิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย พบว่า ได้สารสกัดหยาบคิดเป็น 25.9 และ 18.0 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำหนักผงเปลือกผลทับทิมแห้งตั้งต้น ตามลำดับ แสดงว่า สารประกอบในเปลือกผลทับทิมเป็นสารที่มีขั้ว (Polar compound) มากกว่าสารที่ไม่มีขั้ว (Non-polar compound) เนื่องจากละลายในน้ำได้มากกว่าในเมธิลแอลกอฮอล์

เมื่อพิจารณาจากสารสำคัญที่มีรายงานการแยกพบในส่วนของเปลือกผลทับทิมพบว่ามีหลายชนิดส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม Flavonoids (Du, Wang and Francis, 1975; Mavlyanov et al., 1997) และกลุ่ม Tannins (Okuda et al., 1980; Kakiuchi et al., 1986; Satomi et al., 1993; Mavlyanov et al., 1997) เป็นหลัก ซึ่งสารในแต่ละกลุ่มยังมีสารสำคัญชนิดย่อยๆ ที่เป็นสมาชิกอีกหลายชนิด นอกจากนี้อาจพบสารกลุ่ม Alkaloids (Debelmas et al., 1973; Arseculeratne, Gunatilaka and Panabokke, 1985) และ Saponin (Debelmas et al., 1973) ได้ด้วย เมื่อยังไม่สามารถระบุได้ว่า สารสำคัญชนิดใดบ้างในส่วนของเปลือกผลทับทิมนอกเหนือจาก Tannins ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นการใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย จึงน่าจะเหมาะสมที่สุด เพราะแอลกอฮอล์มีความสามารถในการสกัดสารได้กว้างมาก (นันทวัน บุณยะประภัศร และคณะ, 2532: 57) ทั้ง Flavonoids, Tannins และ Alkaloids สามารถละลายได้ในตัวทำละลายชนิดนี้ (พรรนิภา ชุมศรี, 2526: 189; วันดี กฤษณพันธ์, 2526: 257; เอมอร โสมนะพันธุ์, นันทวัน บุณยะประภัศร และ นพมาศ สรรพคุณ, 2529: 123) และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสารระหว่างเอธิลแอลกอฮอล์กับเมธิลแอลกอฮอล์ พบว่าให้ผลใกล้เคียงกัน (นันทวัน บุณยะประภัศร และคณะ, 2532: 57) แต่เมธิลแอลกอฮอล์มีความเป็นพิษมากกว่า ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้เอธิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย

เมื่อนำสารสกัดเปลือกผลทับทิมมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ พบว่าทั้ง 100 ตัวอย่าง ถูกฆ่าทำลายได้ในการทดสอบในหลอดทดลอง โดยสารสกัดเปลือกผลทับทิมให้ค่า MBC อยู่ระหว่าง 1.25-2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Perez และ Anesini (1994), Malyn Chulasiri (1996) และ M Chulasiri (1997) ถึงแม้เชื้อที่ใช้ทดสอบในทั้ง 3 ครั้งนั้นเป็นเชื้อ *Salmonella* Typhi และเป็นเชื้อที่แยกได้จากคน ในขณะที่เชื้อที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้เป็นซีโรไทป์อื่นที่ต่างออกไปและเป็นเชื้อที่แยกได้จากไก่ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเปลือกผลทับทิมออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ได้โดยไม่จำเพาะต่อซีโรไทป์ของเชื้อ และผลจากการทดสอบพบว่า เชื้อที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่ถูกฆ่าทำลายได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกผลทับทิม เท่ากับ 1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งระดับดังกล่าวเป็นระดับที่ดีที่สุดที่พบในการศึกษาครั้งนี้

เนื่องจากสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่เตรียมได้ไม่ละลายเป็นสารละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวหรือ MHB แต่ให้ส่วนผสมที่มีลักษณะเป็นสารแขวนตะกอน และเกิดการตกตะกอนได้ในเวลาต่อมา (พบผลเช่นเดียวกันนี้แม้ละลายด้วยน้ำ, แอลกอฮอล์ หรือแม้แต่ใช้ DMSO 100 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งลักษณะที่ปรากฏนี้ตรงกับข้อมูลของสรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์ (2531) อ้างถึงในวัฒนา วิริวุฒิกร (2539: 159) ที่กล่าวว่า Tannins เมื่อละลายอยู่ในน้ำจะมีสภาพเป็นสารแขวนตะกอน ดังนั้นค่า MBC ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Macrobroth dilution อาจไม่ใช่ค่า MBC ที่แท้จริงของสารสกัดฯ อย่างไรก็ตามเมื่อยังไม่สามารถหาตัวทำละลายที่เหมาะสมได้ ย่อมสรุปแน่นอนไม่ได้เช่นกัน เนื่องจากการทดสอบหาค่า MBC ของสารต้านจุลชีพตามวิธีมาตรฐานนิยมใช้วิธี Broth dilution (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537: 144; Baron et al.,1994: 172)

เมื่อนำสารสกัดเปลือกผลทับทิมมาเตรียมใน Agar เพื่อแก้ปัญหาการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอของสารสกัดฯ ใน Broth และเพื่อให้สารสกัดฯ มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อในระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ ผลพบว่าสารสกัดฯ ที่เตรียมใน Agar สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่นำมาศึกษาได้ที่ความเข้มข้น 0.312 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ถึงแม้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวิธีนี้กับค่า MBC ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี Macrobroth dilution ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะนำมาเปรียบเทียบกันไม่ได้ เนื่องจากไม่ได้อยู่ในมาตรฐานการทดสอบเดียวกัน แต่เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำรูปแบบมาใช้ศึกษาหาค่า MIC ต่อไป และอาจเป็นแนวทางในการนำไปใช้กับสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดอื่นที่มีข้อจำกัดด้านการละลายเช่นเดียวกับสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมนี้

การใช้หรือไม่ใช้ DMSO ในระดับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เพื่อช่วยในการละลายของสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่เตรียมได้นี้ ทั้งเมื่อเติมใน Broth และ Agar ไม่พบความแตกต่างทั้งต่อการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis และการออกฤทธิ์ของสารสกัดฯ ดังนั้นในการทดสอบลำดับต่อไปจึงไม่ใช้ DMSO

ค่า MIC ของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่นำมาศึกษาครั้งนี้คือ 0.312 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งต่ำกว่าค่า MBC ที่ได้ทดสอบไว้ (1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ผลที่ปรากฏนี้เหมือนกับยาต้านจุลชีพทั่วไปที่ค่า MIC มักต่ำกว่าค่า MBC(Prescott, 1999: 38) แต่ถ้าค่า MBC และ MIC เหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน (ต่างกันไม่เกินสองความเข้มข้น) ถือว่ายาต้านจุลชีพนั้นเป็นชนิดฆ่าทำลายเชื้อ (Bactericidal agent) (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537: 131) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า สารสกัดเปลือกผลทับทิมออกฤทธิ์เป็นชนิดฆ่าทำลายเชื้อ เนื่องจากค่า MIC ต่ำกว่าค่า MBC เพียงสองความเข้มข้นเท่านั้น

จากผลการศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ ต่อยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้รักษาการติดเชื้อในสัตว์ปีก โดยภาพรวมจะเห็นว่า จำนวนตัวอย่างที่มีการดื้อยานั้นยังพบในสัดส่วนที่ต่ำ (13 ใน 100 ตัวอย่าง) และเชื้อที่ดื้อยาส่วนใหญ่ (8 ใน 13 ตัวอย่าง) ดื้อต่อยาเพียงชนิดเดียวใน 8 ชนิดที่นำมาทดสอบ ซึ่งอาจกล่าวในทางกลับกันได้ว่า ยาทั้ง 8 ชนิดนี้มีโอกาสให้ผลสัมฤทธิ์สูงในการนำมาใช้รักษาการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในไก่ สำหรับยาที่พบว่ามีการดื้อของเชื้อมากที่สุด 3 ลำดับแรกคือ Doxycycline hydrochloride, Amoxycillin และ Sulphamethoxazole+Trimethoprim (แต่พบเชื้อที่ให้ผลดังกล่าวเพียง 8, 6 และ 5 ตัวอย่างตามลำดับเท่านั้น) ซึ่งมีความเป็นไปได้เพราะยาทั้ง 3 ชนิดนี้มีการนำเข้ามาใช้รักษาการติดเชื้อในสัตว์ไม่น้อยกว่า 20 ปี และยังใช้อยู่จนถึงปัจจุบัน (จิโรจ ศศิปรียจันทร์, สัมภาษณ์, 10 เมษายน 2546) ในขณะเดียวกันพบว่าเชื้อทั้ง 100 ตัวอย่างไวต่อ Norfloxacin และ Amoxycillin+Clavulanic acid ดังนั้นยาทั้ง 2 ชนิดนี้จึงมีความน่าสนใจในการนำมารักษาการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในไก่ โดยไม่ต้องรอผลการทดสอบความไวเชื้อต่อยาปฏิชีวนะจากห้องปฏิบัติการ รวมทั้งยา Gentamicin ซึ่งพบว่ามีเชื้อเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่ดื้อต่อยาชนิดนี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ เกรียงศักดิ์ สายธนู และ เยาวภา เจิงกลิ่นจันทร์ (2541) ที่รายงานไว้ว่าเชื้อ *Salmonella* spp. ซีโรไทป์ต่างๆ ทั้งที่แยกได้จากคนและไก่ ส่วนใหญ่ดื้อต่อ Sulphamethazine, Sulphamethoxazole, Oxytetracycline และ Tetracycline ในขณะเดียวกัน เชื้อกลับมีความไวต่อ Norfloxacin และ Gentamicin มากที่สุด อย่างไรก็ตามการใช้ Gentamicin รักษาการติดเชื้อในไก่มีเพียงรูปแบบเดียวคือ ให้โดยการฉีด จึงไม่สะดวกในทางปฏิบัติเมื่อต้องให้ยาแก่ไก่ทั้งฝูง

เป็นที่น่าสังเกตว่า ตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ดื้อต่อยาตั้งแต่ 2-3 ชนิด ตรงกับข้อสรุปของ Prescott (1999: 42) ที่ว่า ความยุ่งยากในการรักษาการติดเชื้อซีโรไทป์นี้ เป็นผลมาจากเชื้อมักดื้อยาพร้อมกันหลายชนิด (Multiple antibiotic resistance) ที่น่าสนใจยิ่งกว่านั้นคือ การดื้อยาของเชื้อในกรุ๊ป E ซึ่งมี 1 ตัวอย่าง คือ *Salmonella* Weltevreden ที่ดื้อต่อยา 5 ชนิด ได้แก่ Gentamicin, Neomycin, Amoxycillin, Sulphamethoxazole+Trimethoprim และ Doxycycline hydrochloride ตัวอย่างนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ติดตามการดื้อยาฯ และเป็นตัวอย่างที่แยกเก็บได้จากอุจจาระของไก่พื้นเมือง ถึงแม้จะเป็นการทดสอบเพียง 1 ตัวอย่าง แต่ผลที่ปรากฏทำให้ตระหนักว่า การเลี้ยงไก่พื้นเมืองซึ่งต้องใช้เวลานานกว่าที่ไก่จะมีขนาดโตพอสำหรับนำมาประกอบอาหาร และส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงปล่อยให้ไก่คุ้ยเขี่ยหาอาหารกินเองตามธรรมชาติ จะทำให้ไก่มีโอกาสได้รับเชื้อดื้อยาที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้มากขึ้น ซึ่งเชื้อดื้อยาที่พบในกรณีนี้น่าจะเป็นเชื้อที่ปนเปื้อนออกมากับอุจจาระคน เนื่องจาก สุมาลี บุญมา และคณะ (2541) Sumalee Boonmar และคณะ (1998) ได้สำรวจการดื้อยาของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่

แยกได้จากคน พบว่า เชื้อ *Salmonella* Weltevreden เป็นอีกซีโรวาร์หนึ่งที่พบว่าดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด และมีอุบัติการที่เพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณารูปแบบการดื้อยาของเชื้อทั้ง 13 ตัวอย่างกับค่า MBC ที่ได้จากการทดสอบกับสารสกัดเปลือกผลทับทิม พบว่า มีเชื้อเพียง 2 ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ค่า MBC เท่ากับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เชื้อ 1 ใน 2 ตัวอย่างดื้อต่อยาเพียง 1 ชนิด (Doxycycline hydrochloride) ในขณะที่อีก 1 ตัวอย่างดื้อต่อยา 5 ชนิด (Gentamicin, Neomycin, Amoxycillin, Sulphamethoxazole+Trimethoprim และ Doxycycline hydrochloride) ส่วนเชื้อที่เหลืออีก 11 ตัวอย่างให้ค่า MBC 1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่า สารสกัดเปลือกผลทับทิมสามารถฆ่าเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะได้ จึงเป็นจุดที่น่าสนใจนำไปศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดฯ มาใช้ทดแทนสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวยาที่พบการดื้อของเชื้อ *Salmonella* spp.

เมื่อนำสารสกัดเปลือกผลทับทิมมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ในตัวไก่ จะเห็นว่า การให้สารสกัดฯ ก่อนให้เชื้อสามารถป้องกันการติดเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ในไส้ตันไก่ได้ ในขณะที่การให้สารสกัดฯ ภายหลังจากที่เชื้อเข้าไปเจริญในไส้ตันแล้ว ถ้าให้ในขนาดที่สูงอาจมีผลทำลายเชื้อได้บ้าง แต่ไม่ทำให้จำนวนตัวที่ตรวจพบเชื้อที่ไส้ตันแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดฯ อย่างไรก็ตามการออกฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อส่วนใหญ่น่าจะเกิดขึ้นขณะที่สารสกัดฯ สัมผัสกับเชื้อโดยตรงในทางเดินอาหารส่วนต้น เพราะในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฯ ก่อนได้รับเชื้อ (กลุ่มที่ 3 และ 4) ได้รับสารสกัดฯ ด้วยเช่นกันในวันที่ได้รับเชื้อ ทั้งนี้เชื่อว่าฤทธิ์ในการทำลายเชื้อส่วนหนึ่งมาจาก Tannins ที่มีอยู่ในส่วนของสารสกัดฯ เพราะเมื่อพิจารณาจาก คุณสมบัติของ Tannins ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในเปลือกผลทับทิม พบว่าการออกฤทธิ์ของ Tannins นั้นเกิดขึ้นจากการเข้าทำปฏิกิริยากับโปรโตพลาสม (Protoplasm) ของจุลชีพทำให้เกิดการตกตะกอน (Coagulation) (พรรนิภา ชุมศรี, 2526: 195) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Malyn Chulasiri และคณะ (1995) ที่พบการจับกลุ่มและแตกตัวของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหลอดทดลองหลังสัมผัสกับสารสกัดเปลือกผลทับทิมเมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แต่การออกฤทธิ์ของ Tannins ไม่ได้จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อจุลชีพเท่านั้น เพราะสามารถทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อที่สัมผัสได้ โดยพบว่าเมื่อให้โดยการกินในขนาดที่ต่ำจะทำให้เนื้อเยื่อทางเดินอาหารชั้นนอกตกตะกอน ทำให้การซึมผ่าน (Permeable) ลดลง และช่วยป้องกันเนื้อเยื่อชั้นในจากปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรีย แต่ถ้าให้ในขนาดที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนในชั้นที่ลึกลงไปของผนังทางเดินอาหาร เกิดการอักเสบ และท้องเสียได้ (พรรนิภา ชุมศรี, 2526: 194) นอกจากนั้นยังมีข้อมูลว่า การให้ Tannins ในรูปอิสระไม่เหมาะที่

จะให้ทางปาก เพราะนอกจากจะมีฤทธิ์จับกับโปรตีนของเยื่อบุของทางเดินอาหารแล้ว ยังถูกทำลายได้โดยเร็วจากสภาพด่างในบริเวณลำไส้เล็ก (พรรนิภา ชุมศรี, 2526: 195)

อย่างไรก็ตามเนื่องจากการเตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิมครั้งนี้ ใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย ซึ่งนอกจาก Tannins แล้วย่อมมีสารสำคัญชนิดอื่นๆ เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียของสารสำคัญเหล่านั้นภายในร่างกายยังไม่ทราบแน่นอน ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการศึกษาเพื่อหารูปแบบการใช้และขนาดที่เหมาะสมต่อไป

สรุป สารสกัดเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ ทั้งเมื่อทดสอบในหลอดทดลองและทดสอบในตัวไก่

ข้อเสนอแนะ แม้สารสกัดเปลือกผลทับทิมจะสามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ได้ในตัวไก่ แต่การจะนำเอาสารสกัดเปลือกผลทับทิมมาใช้ต้านการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวไก่โดยตรงนั้น ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก เนื่องจากยังขาดข้อมูลสนับสนุนหลายประการ อาทิเช่น สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ กลไกการออกฤทธิ์ในตัวไก่ และผลกระทบต่อตัวไก่ เป็นต้น แต่จากประสิทธิภาพในการฆ่าทำลายเชื้อจุลชีพของสารสกัดเปลือกผลทับทิมในห้องปฏิบัติการทั้งจากการศึกษาของนักวิจัยท่านอื่นๆ และจากการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้เห็นศักยภาพของสารสกัดเปลือกผลทับทิม ในการนำมาศึกษาเพื่อพัฒนารูปแบบการใช้ที่เหมาะสมต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกรียงศักดิ์ สายธนู และ เยาวภา เจิงกลิ่นจันทร์. 2541. การดื้อยาและการถ่ายทอดการดื้อยาของซาลโมเนลล่าที่แยกได้จากคนและสัตว์ปีก. ในการสัมมนาระดับชาติเพื่อกำหนดแนวทางการแก้ไขปัญหา Non-Typhoidal Salmonellosis ในประเทศไทยครั้งที่ 2, หน้า 61-87. 24-25 ธันวาคม 2541 ณ อาคาร 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิโรจ ศศิปรียจันทร์. 2544. การจัดการและโรคสำคัญในไก่เนื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ธนาเพรส แอนด์ กราฟฟิค.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: NOBLE PRINT.

นโยบายความปลอดภัยด้านอาหารของสหภาพยุโรป. 2544. สาส์นไก่และการเกษตร 49 (6): 46-49.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นันทวัน บุณยะประภัศร, นพมาศ สรรพคุณ, วีณา จิรัจฉริยากูล และ เอมอร โสมนะพันธุ์. 2532. เภสัชวินิจฉัย เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, บรรณาธิการ. 2541. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร: ประชาชน.

ปศุสัตว์, กรม. กองควบคุมยาสัตว์. 2545. รายการยาที่ห้ามการใช้นอกเหนือจากฉลาก (Extra label use) ในสัตว์ที่บริโภคเป็นอาหาร. กรุงเทพมหานคร: กองควบคุมยาสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ปศุสัตว์, กรม. กองส่งเสริมการปศุสัตว์, กลุ่มงานเศรษฐกิจการปศุสัตว์. 2543. ข้อมูลเศรษฐกิจการปศุสัตว์ประจำปี 2543. กรุงเทพมหานคร: กลุ่มงานเศรษฐกิจการปศุสัตว์ กองส่งเสริมการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ปศุสัตว์, กรม. กองสัตวแพทย์สาธารณสุข. 2545. สินค้าปศุสัตว์ที่กองสัตวแพทย์สาธารณสุขรับรองมาตรฐานในปี 2544. กรุงเทพมหานคร: กองสัตวแพทย์สาธารณสุข กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พรรนิภา ชุมศรี. 2526. แทนนิน และ โพลี่ฟีนอล. ใน เภสัชวินิจฉัย เล่ม 1, หน้า 188-198. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วัฒนา วิริวุฒิกร. 2539. ความสำคัญของแทนนินที่มีต่ออุตสาหกรรมอาหาร (บทความวิชาการ). อาหาร 26 (3): 157-167.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2533. พจนานุกรมโรคและสมุนไพรไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

วันดี กฤษณพันธ์. 2526. ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์. ใน เภสัชวินิจฉัย เล่ม 1, หน้า 249-260. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศักดิ์ชาย วงศ์เกียรติสุภาพ, ผู้แปลสรุป. 2543. ผลิตภัณฑ์ปศุสัตว์ปลอดสารพิษสหภาพยุโรป. ธุรกิจอาหารสัตว์ 17 (72): 37-52.

ศูนย์สารสนเทศการค้าระหว่างประเทศ, กลุ่มงานวิเคราะห์ข้อมูลการค้า. 2544. ไก่ไทยในตลาดต่างประเทศ. สาส์นไก่และการเกษตร 49 (9): 47-52.

สถานการณ์การส่งออกไก่เนื้อปี 2544-2545. 2544. สาส์นไก่และการเกษตร 49 (12): 9-10.

สมาคมผู้ผลิตไก่เพื่อส่งออกไทย สมาคมผู้เลี้ยงเป็ดเพื่อการค้าและการส่งออก สมาคมผู้ผลิต ผู้ค้าและส่งออกไข่ไก่ สมาคมผู้ผลิตและแปรรูปสุกรเพื่อการส่งออก และสมาคมผู้เลี้ยงไก่พันธุ์. 2545. ไก่เนื้อ. ใน สถิติสินค้าปศุสัตว์ 2545. หน้า 6-21. (ม.ป.ท.)

สุมาลี บุญมา, อรุณ บ่างตระกูลนนท์, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์, ชาติชาย หนุนภักดี และ อำนาจ พัวพลเทพ. 2541. การศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อซัลโมเนลลาที่แยกได้จากคนและเนื้อไก่แช่แข็งในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2536, 2537 และ 2539. ในประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 24 และการประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ 4 ประจำปี 2541 ในวาระฉลอง 50 ปี สัตวแพทยสมาคมฯ, หน้า 174-179. 5-7 สิงหาคม 2541 ณ บางกอกคอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ โรงแรมเซ็นทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร.

สุรีย์ ประเสริฐสุข และ มรกต สุกโชติรัตน์. 2529. ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคบิด (บทคัดย่อ). ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 12, หน้า 344-345. 20-22 ตุลาคม 2529 ณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

สำนักนโยบายเศรษฐกิจระหว่างประเทศ. 2545. อุตสาหกรรมไก่เนื้อ (ตอนที่ 1). โลกปศุสัตว์ 1 (4): 44-47.

เอมอร โสมนะพันธุ์, นันทวัน บุณยะประภัศร และ นพมาศ สรรพคุณ. 2529. เภสัชวินิจฉัย เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

อำนาจ ศรีรัตนบัลล์. 2543. โรคลำไส้: การวินิจฉัย และการรักษา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Ahmad, I., Mehmood, Z. and Mohammad, F. 1998. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. J. Ethnopharm. 62: 183-193.

Alcamo, I.E. 1983. Fundamentals of microbiology. USA: Addison-Wesley Publishing.

Anesini, C. and Perez, C. 1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. J. Ethnopharm. 39: 119-128.

Arseculeratne, S.N., Gunatilaka, A.A.L. and Panabokke, R.G. 1985. Studies on medicinal plants of Sri Lanka. Part 14: Toxicity of some traditional medicinal herbs. J. Ethnopharmacol. 13: 323-335.

Association of Medical Microbiologists. 1997. The facts about vancomycin-resistant enterococci (VRE)[Online]. Available from: http://www.amm.co.uk/pubs/fa_vre.htm[2001, August 24]

Bailey, J.S., Cox, N.A. and Berrang, M.E. 1994. Hatchery-acquired Salmonellae in broiler chicks. Poult. Sci. 73: 1153-1157.

Bangtrakulnonth, A. 2002. Protocols for isolation, identification, serotyping and susceptibility testing of *Salmonella*. A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response (CSR), in collaboration with Centers for Disease Control and Prevention, USA, Danish Veterinary Laboratory, Denmark and National Salmonella and Shigella Center, Thailand.

Bangtrakulnonth, A., Marnrim, N., Kusum, M., Yuthayong, P., Sutivigit, Y., Jiamwatasuk, N. and Saitanu, K. 1995. Detection of Salmonellae from fecal specimens: a comparison of modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis and selenite-F broth. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 26 (Suppl 2): 235-237.

Baron, E.J., Peterson, L.R. and Finegold, S.M. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 9 th ed. St. Louis: Mosby.

Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornruangwong, S., Samosornsuk, S., Kaneko, K. and Ogawa, M. 1998. Significant increase in antibiotic resistance of *Salmonella* isolates from human and chicken meat in Thailand. Vet. Microbiol. 62: 73-80.

Byrd, J.A., DeLoach, J.R., Corrier, D.E., Nisbet, D.J. and Stanker, L.H. 1999. Evaluation of *Salmonella* serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. Avian Dis. 43: 39-47.

Caceres, A., Alvarez, A.V., Ovando, A.E. and Samayoa, B.E. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases: 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. J. Ethnopharm. 31: 193-208.

Carson, J.A., Bailey, J.S. and Cox, N.A. 1994. Transmission of *Salmonella typhimurium* during hatching of broiler chicks. Avian Dis. 38: 583-588 .

Cetinkaya, Y., Falk, P. and Mayhall, C.G. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. Clin. Microbiol. Reviews 13(4): 686-707.

Chulasiri, M. 1996. A water soluble component with antimicrobial activity from pomegranate rind: an ingredient in an instrument disinfectant. Mahidol Univ. J. 3 (2): 43-47.

Chulasiri, M. 1997. A water soluble component with antimicrobial activity from pomegranate rind: an ingredient in an antiseptic liquid soap. Thai J. Phytopharm. 4 (1): 25-30.

Chulasiri, M., Temsiririrkkul, R., Boonchai, S., Saralamp, P., Pimsan, N., Lohakarn, P. and Noonai, A. 1995. A water soluble component with antimicrobial activity from pomegranate rind: antimicrobial potency and stability study. Mahidol J. Pharm. Sci. 22 (1): 1-7.

Chulasiri, M., Temsiririrkkul, R., Saraya, A., Prachyabrued, W., Termvidchakorn, O., Sripairojthikoon, W. and Pariyakanok, P. 1995. A water-soluble component with antimicrobial activity from pomegranate rind: an ingredient in antiseptic mouthwash. Mahidol J. Pharm. Sci. 22 (4): 150-159.

Chulasiri, M., Thakerngpol, K. and Temsiririrkkul, R. 1995. A water-soluble component with antimicrobial activity from pomegranate rind: electron microscopic and preliminary chemical studies. Mahidol J. Pharm. Sci. 22 (3): 107-112.

Clarke, R.C. and Gyless, C.L. 1993. *Salmonella*. In: C.L. Gyless and C.O. Thoen with twenty-eight contributors (eds), Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2 nd ed., pp. 133-153. Iowa: Iowa State Univ. Press.

Community Health Administration. 2003. Guidelines for the prevention and control of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in long term care facilities[Online]. Available from: http://www.edcp.org/guidelines/vre96.html[2003, March 17]

Cooper, G.L., Nicholas, R. and Bracewell, C.D. 1992. Serological and bacteriological investigations of chicken from flocks infected with *Salmonella enteritidis*. Vet. Rec. 125: 567-572.

Corrier, D.E., Hargis, B., Hinton, Jr., A., Lindsey, D., Caldwell, D., Manning, J. and DeLoach, J. 1991. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chicks to invasive *Salmonella enteritidis*. Avian Dis. 35: 337-343.

Corrier, D.E., Hollister, A.G., Nisbet, D.J., Scanlan, C.M., Beier, R.C. and DeLoach, J.R. 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.

Cox, N.A., Bailey, J.S., Blankenship, L.C. and Gildersleeve, R.P. 1992. Research note: *In ovo* administration of a competitive exclusion culture treatment to broiler embryos. Poult. Sci. 71: 1781-1784.

Cox, N.A., Berrang, M.E. and Cason, J.A. 2000. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs- a review. Poult. Sci. 79: 1571-1574.

Debelmas, A.M., Dobremez, J.F., Michel, S. and Benarroche, L. 1973. Medicinal plants of Nepal. Plant Med. Phytother. 7: 104.

Du, C.T., Wang, P.L., Francis, F.J. 1975. Anthocyanins of pomegranate*, Punica granatum*. J. Food Sci. 40: 417.

Duchet-Suchaux, M., Mompart, F., Berthelot, F., Beaumont, C., Lechopier, P. and Pardon, P. 1997. Differences in frequency, level, and duration of cecal carriage between four outbred chicken lines infected orally with *Salmonella enteritidis*. Avian Dis. 41: 559-567.

Ebel, E.D., David, M.J. and Mason, J. 1992. Occurrence on *Salmonella enteritidis* in the U.S. commercial egg industry: report on a national spent hen survey. Avian Dis. 36: 646-654.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. CMI. 6: 509-515.

Fanelli, M.J., Sadler, W.W., Franti, C.E. and Brownell, J.R. 1971. Localization of Salmonellae within the intestinal tract of chickens. Avian Dis. 15: 366-375.

Gast, R.K. 1997a. Paratyphoid infections. In: B.W. Calnek, H. John Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif (eds.), Diseases of Poultry, 10 th ed., pp. 97-121. Iowa: Iowa State Univ. Press.

Gast, R.K. 1997b. *Salmonella* infections. In: B.W. Calnek, H. John Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif (eds.), Diseases of Poultry, 10 th ed., pp. 81-82. Iowa: Iowa State Univ. Press.

Gast, R.K. and Beard, C.W. 1989. Age-related changes in the persistence and pathogenicity of *Salmonella typhimurium* in chicks. Poult. Sci. 68: 1454-1460.

Gast, R.K. and Holt, P.S. 1998. Persistence of *Salmonella enteritidis* from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. Poult. Sci. 77: 1759-1762.

Gast, R.K., Mitchell, B.W. and Holt, P.S. 1998. Airborne transmission of *Salmonella enteritidis* infection between groups of chicks in controlled-environment isolation cabinets. Avian Dis. 42: 315-320.

Gritsanapan, W. and Chulasiri, M. 1983. A preliminary study of antidiarrheal plants: I, Antibacterial activity. Mahidol Univ. J. Pharm. Sci. 10 (4): 119-123.

Hang'ombe, B.M., Sharma, R.N., Skjerve, E. and Tuchili, L.M. 1999. Occurrence of *Salmonella enteritidis* in pooled table eggs and market-ready chicken carcasses in Zambia. Avian Dis. 43: 597-599.

Heuzenroeder, M.W., Murray, C.J., Dalcin, R.M. and Barton, M. 2001. Molecular basis of benign colonisation of *Salmonella* Sofia in chickens: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC.

Hirsh, D.C. 1999. *Salmonella*. In: D.C. Hirsh and Y.C. Zee (eds), Veterinary Microbiology, pp. 75-79. Massachusetts: Blackwell Science.

Holt, P.S, Mitchell, B.W. and Gast, R.K. 1998. Airborne horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* in molted laying chickens. Avian Dis. 42: 45-52.

Horrox, N. ed. 1995. *Salmonella.* International Hatchery Practice 10(2): I-XVI.

Humphrey, T.J. 1990. Public health implication of the infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. World. Poult. Sci. J. 46: 5-13.

Kakiuchi, N., Hattori, M., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Okuda, T. and Namba, T. 1986. Studies on dental caries prevention by traditional medicines: VIII, Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. Chem. Pharm.Bull. 34 (2) 720-725.

Kusumoto, I.T., Nakabayashi, T., Kida, H., Miyashiro, H., Hattori, M., Namba, T. and Shimotohno, K. 1995. Screening of various plant extracts used in Ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease. Phytother. Res. 9: 180-184.

Lahellec, C., Colim, P., Bennejean, G., Paquin, J., Guillerm, A. and Debois, J.C. 1985. Influence of resident *Salmonella* on contamination of broiler flocks. Br. Poult. Sci. 26: 179-186.

Laksana Kantama and Panida Jayanetra. *Salmonella enteritidis* outbreak in Thailand: study by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 27 (1): 119-125.

Manitoba Health Public Health. 1998. What you should know about vancomycin resistant enterococci (VRE)[Online]. Available from: http://www.gov.mb.ca/health/publichealth/cdc/fs/vre2.pdf[2003, March 17]

Mavlyanov, S.M., Islambekov, S.Y., Karimdzhanov, A.K. and Ismailov, A.I. 1997. Polyphenols of the fruits of some varieties of pomegranate growing in Uzbekistan. Chem. Nat. Comp. 33 (1): 98-99.

Miyamoto, T., Baba, E., Tanaka, T., Sasai, K., Fukata, T. and Arakawa, A. 1997. *Salmonella enteritidis* contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. Avian Dis. 41: 296-303

Miyamoto, T.,Kitaoka, D., Withanage, G.S.K., Fukata, T., Sasai, K. and Baba, E. 1999. Evaluation of the efficacy of *Salmonella enteritidis* oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. Avian Dis. 43: 497-505.

Nakamura, M., Nagamine, N., Takahashi, T., Norimatsu, M., Suzuki, S. and Sato, S. 1995. Intratracheal infection of chickens with *Salmonella enteritidis* and the effect of feed and water deprivation. Avian Dis. 39: 853-858.

Nakamura, M., Takagi, M., Takahashi, T., Suzuki, S., Sato, S. and Takehara, K. 1997. The effect of the flow of air on horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* in chickens. Avian Dis. 41: 354-360.

National Health and Medical Research Council. 2002. Emergence of vancomycin resistant enterococci in Australia[Online]. Available from: http://www.nhmrc.gov.au/publications/reports/cd12rep.htm[2003, March 17]

Navarro, V., Villarreal, M., Rojas, G. and Lozoya, X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. J. Ethnopharm. 53: 143-147.

O'Brien, J.D.P. 1990. Aspects of *Salmonella enteritidis* control in poultry. World. Poult. Sci. J. 46: 119-123.

Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K. and Baba, E. 2001. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. Avian Dis. 45: 61-69.

Okuda, T., Hatano, T., Nitta, H. and Fujii, R. 1980. Hydrolysable tannins having enantiomeric dehydrohexanhydroxydiphenoyloup: revised structure of terchebin and structure of granatin B. Tetrahedron lett. 21: 4361-4364.

Otero, R.B. 1999. Vancomycin-resistant enterococcus (VRE): Infection control-prevention of spread[Online]. Available from: http://www.cinetwork.com.otero/vre.html[2001, August 11]

Perez, C. and Anesini, C. 1994. *In vitro* antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. J. Ethnopharm. 44: 41-46.

Prescott, J.F. 1999. Antimicrobial chemotherapy. In: D.C. Hirsh and Y.C. Zee (eds.), Veterinary microbiology, pp. 28-45. Massachusetts: Blackwell Science.

Qadri, S.M.H. and Postle, A.G. 1996. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) as normal flora of the intestine in patients at a tertiary care hospital[Online]. Available from: http://www.kfshrc.edu.sa/annals/166/69-105.html[2001, August 11]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. 1994. Clinical veterinary microbiology. Spain: Wolfe Publishing.

Satomi, H., Umemura, K., Ueno, A., Hatano, T., Okuda, T. and Noro, T. 1993. Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L. Biol. Pharm. Bull. 16 (8): 787-790.

Schubert, S.Y., Lansky, E.P. and Neeman, I. 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J. Ethnopharm. 66: 11-17.

Shivaprasad, H.L. 1997. Pullorum disease and fowl typhoid. In: B.W. Calnek, H. John Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif (eds.), Diseases of Poultry, 10 th ed., pp. 82-96. Iowa: Iowa State Univ. Press.

Spackman, D. 1989. *S. enteritidis* on the wane. World Poult. 53: 16-17.

Stobberingh,E., van den Bogaard, A., London, N., Driessen, C., Top, J. and Willems, R. 1999. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of the Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans?. Antimicrob. Agents Chemother. 43(9): 2215-2221.

Suthienkul, O., Siripanichgon, K., Pariyanonda, A., Chantrasri, C., Sangpetchsong, V., Utrarachakit, F., Punchitton, S., Bangtrakulnonth, A., Sangkasuwan, P., Kittigul, L. and Vathanophas, K. 1995. Rapid *Salmonella* detection in frozen food by modified technique using modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 26 (Suppl 2): 238-241.

Timoney, J.F., Shivaprasad, H.L., Baker, R.C. and Rowe, B. 1989. Egg transmission after infection of hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. Vet. Rec. 125:600-601.

Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M. and Bager, F. 2000. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe[Online]. Available from: http://www.cdc.gov/[2000, September 27]

Wooley, R.E., Gibbs, P.S. and Shotts, Jr., E.B. Inhibition of *Salmonella typhimurium* in the chicken intestinal tract by a transformed avirulent avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 43: 245-250.

Ziprin, R.L. and DeLoach, J.R. 1993. Comparison of probiotics maintained by *in vivo* passage through laying hens and broilers. Poult. Sci. 72: 628-635.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางกัลยา เจือจันทร์ เกิดวันพุธที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2513 ที่จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วุฒิการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปีการศึกษา 2537 จากนั้นเข้ารับราชการตำแหน่งอาจารย์ระดับ 4 ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตั้งแต่ปี พ.ศ 2537 ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 6 เข้ารับการศึกษาต่อระดับปริญญาโทที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2543 ด้วยทุนพัฒนาอาจารย์