จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาเปรียบเทียบความชุกและการต้านยาของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร

โดย

ธราดล เหลืองทองคำ
รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

มิถุนายน 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณจันทร์ธนู สัตยาวัฒนา คุณนเรศ หวังสูง คุณสหัส รัตนะโสภณชัย นายสัตวแพทย์ศักดิชญ์ อนุโลมสมบัติ รวมถึงฟาร์มทุกฟาร์มและเจ้าหน้าที่ประจำโรงเชือดทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์และความร่วมมือในการเก็บตัวอย่าง และให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อลงกร อมรศิลป์ ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานด้านอณูชีววิทยา ตลอดจนผู้ช่วยวิจัย นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ จนเป็นผลให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย	การศึกษาเปรียบเทียบความชุกและการต้านยาของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร
ชื่อผู้วิจัย	อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ธราดล เหลืองทองคำ รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	มิถุนายน 2555

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความชุกและรูปแบบการต้านยาของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร จากตัวอย่างลำไส้ไก่จำนวน 360 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อไก่จำนวน 120 ตัวอย่าง ที่เพาะแยกเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ พบว่า ไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพรจะพบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในอัตราส่วนที่สูงที่สุด คือ 73.33% (66/90) สำหรับตัวอย่างลำไส้ และ 96.67% (29/30) สำหรับตัวอย่างเนื้อไก่ ตามด้วยไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพร ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสารเสริมชีวนะ และไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะ ตามลำดับ สำหรับรูปแบบการต้านยาของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ที่แยกได้จากไก่กลุ่มต่างๆ พบว่า เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ส่วนใหญ่ที่แยกได้จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน/ฟลูออโรควิโนโลน อันได้แก่ กรดนาลิดิซิกและซิโปรฟลอกซาซิน ในขณะที่เชื้อเหล่านี้จะมีความไวรับต่อยาเจนตามัยซินและอิริโทรมัยซิน (ยกเว้นเชื้อที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ประมาณ 40% ของเชื้อในกลุ่มนี้จะดื้อต่อยาอิริโทรมัยซิน) ในส่วนของการดื้อต่อยาในกลุ่มเททราซัยคลิน พบว่า อัตราการดื้อต่อยาดังกล่าวจะแตกต่างกันออกไปในไก่แต่ละกลุ่ม โดยจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 33.33% ไปจนถึง 100.00% จากผลการศึกษาวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นอาจสรุปได้ว่า ความชุกของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในไก่ไทยสูงกว่าในไก่เนื้ออย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้อัตราการดื้อต่อยาในกลุ่มควิโนโลน/ฟลูออโรควิโนโลนที่พบค่อนข้างสูงในเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยทั้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นของมาตรการในการควบคุมและลดอุบัติการณ์ของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ที่ดื้อต่อยาฟลูออโรควิโนโลนในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ของประเทศไทย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title	Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chickens and Thai native chickens fed with and without probiotics or Thai medicinal plants supplemented feed
Investigators	Dr. Taradon Luangtongkum Associate Professor Dr. Rungtip Chuanchuen
Year	June 2012

Abstract

The main objective of this study was to determine the prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* strains isolated from broiler chickens and Thai native chickens fed with and without probiotics or Thai medicinal plants supplemented feed. From 360 intestinal samples and 120 carcass samples collected and cultured for *Campylobacter* spp., we noticed that the highest prevalence of this organism was observed in Thai native chickens fed with Thai medicinal plants supplemented feed [73.33% (66/90) for intestinal samples and 96.67% (29/30) for carcass samples], followed by Thai native chickens fed with diet containing no Thai medicinal plants, conventional broiler chickens, and conventional broiler chickens fed with probiotics supplemented feed. When antimicrobial resistance patterns of these isolated *Campylobacter* strains were determined, we found that the majority of *Campylobacter* isolates were resistant to ciprofloxacin and nalidixic acid, while they were susceptible to gentamicin and erythromycin except some *Campylobacter* isolates from intestinal tracts of Thai native chickens fed with regular diet (without Thai medicinal plants) that were resistant to erythromycin. The resistance rate to tetracycline varied between production types ranging from 33.33% to 100.00%. Together, these findings reveal that Thai native chickens had higher prevalence of *Campylobacter* spp. than broiler chickens. Regardless of poultry production practices, *C. jejuni* and *C. coli* in this study were generally resistant to fluoroquinolones, indicating the need for prudent measures to control and reduce the occurrence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in Thai poultry.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญตาราง	vi
สารบัญภาพ	vii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย	viii
บทนำ	1
การศึกษาและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัย	11
การอภิปรายผลการวิจัย	19
สรุปผลการวิจัย	23
ข้อเสนอแนะ	24
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	31

เลขหมู่
เลขทะเบียน 015554
วัน, เดือน, ปี 30 ส.ค.55

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	Oligonucleotide primers สำหรับ *Campylobacter* multiplex PCR ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้	9
ตารางที่ 2	ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ทำการทดสอบและเกณฑ์ที่ใช้บ่งชี้การดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp.	10
ตารางที่ 3	ความชุกและสายพันธุ์ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากลำไส้และเนื้อของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร	12
ตารางที่ 4	รูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร	16
ตารางที่ 5	รูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากเนื้อของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร	17
ตารางที่ 6	อัตราการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร	18
ตารางที่ 7	อัตราการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากเนื้อของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร	18

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	แผนภูมิการเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* spp. จากตัวอย่างเนื้อไก่	8
รูปที่ 2	PCR amplicons ของเชื้อ *Campylobacter* ที่ทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR	11

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

ATCC	American Type Culture Collection
bp	base pair(s)
BPW	buffered peptone water
C. coli	*Campylobacter coli*
C. jejuni	*Camoylobacter jejuni*
C. lari	*Campylobacter lari*
C. upsaliensis	*Campylobacter upsaliensis*
CFU	colony forming unit
CIP	ciprofloxacin
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
DNA	deoxyribonucleic acid
ERY	erythromycin
g	gram(s)
GEN	gentamicin
ISO	International Organization for Standardization
log	logarithmic growth phase
mCCDA	Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar
$MgCl_2$	magnesium chloride
MDR	multidrug resistance
MIC	minimum inhibition concentration
mPCR	multiplex polymerase chain reaction
µg	microgram(s)
µl	microliter(s)
µM	micromolar(s)
ml	milliliter(s)
mM	millimolar

NAL	nalidixic acid
NARMS	National Antimicrobial Resistance Monitoring System
No.	number(s)
PCR	polymerase chain reaction
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
spp.	species
TET	tetracycline
U	unit(s)
%	percentage

บทนำ

เชื้อ *Campylobacter* spp. จัดเป็นหนึ่งในเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขเป็นอย่างมาก ในกลุ่มประเทศอุตสาหกรรม เชื้อ *Campylobacter jejuni* ถือเป็นสาเหตุหลักอันดับหนึ่งของโรคอาหารเป็นพิษในคน (Butzler, 2004; Ruiz-Palacios, 2007) เชื้อนี้ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงโดยเฉลี่ยปีละประมาณ 400 – 500 ล้านคนทั่วโลก นอกจากนี้อุบัติการณ์ของโรคอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากเชื้อ *C. jejuni* โดยเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้วยังมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (Ruiz-Palacios, 2007) สำหรับประเทศไทย เชื้อ *Campylobacter* spp. ถือเป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงที่พบได้บ่อยที่สุดในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 12 ปี (Bodhidatta et al., 2002) หากพิจารณาถึงความสูญเสียอันเนื่องมาจากการติดเชื้อ *Campylobacter* spp. พบว่า เชื้อนี้ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากมายมหาศาล โดยคิดเป็นจำนวนเงินถึง 8 พันล้านดอลลาร์ สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกา และไม่ต่ำกว่า 500 ล้านปอนด์ สำหรับประเทศในเครือสหราชอาณาจักร (Buzby and Roberts, 1997; Humphrey et al., 2007; Sheppard et al., 2009) นอกจากเชื้อ *Campylobacter* spp. จะเป็นสาเหตุหลักของโรคอาหารเป็นพิษในคน และจัดเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดอาการอัมพาตของกล้ามเนื้อแขนและขาแบบไม่มีแรง (flaccid paralysis) หรือที่รู้จักกันในชื่อของ "Guillain Barré syndrome" แล้ว เชื้อนี้ยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการผลิตเนื้อไก่เพื่อการส่งออก เนื่องจากโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Campylobacter* spp. เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่มีไก่เนื้อเป็นแหล่งรังโรค (reservoir) สำคัญ ดังนั้นกลุ่มประเทศผู้นำเข้าเนื้อไก่ โดยเฉพาะกลุ่มสหภาพยุโรปซึ่งเป็นผู้นำเข้าเนื้อไก่รายใหญ่ของประเทศไทย จึงมีการเฝ้าระวังและป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในเนื้อไก่อย่างเข้มงวด และมีความเป็นไปได้ที่เชื้อ *Campylobacter* spp. จะได้รับการบรรจุอยู่ในรายชื่อของเชื้อที่ต้องทำการตรวจสอบอย่างเข้มงวดก่อนการนำเข้าและส่งออกเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์ไปยังกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อ *Campylobacter* spp. ในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นเพื่อป้องกันปัญหาการกีดกันทางการค้าอันเนื่องมาจากเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่อาจเกิดขึ้นได้ในอนาคตอันใกล้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อนี้อย่างเร่งด่วน

เนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* spp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก โดยเฉพาะในไก่เนื้อ ดังนั้นโอกาสที่เชื้อ *Campylobacter* spp. จากลำไส้จะปนเปื้อนเนื้อไก่ในระหว่างกระบวนการชำแหละและตัดแต่งซากจึงมีค่อนข้างสูง โดยทั่วไปการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ระดับฟาร์มถือเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่จะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในเนื้อไก่ ทั้งนี้เนื่องจากทางเดินอาหารของไก่เป็นแหล่งเดียวในห่วงโซ่อาหารที่เชื้อ

Campylobacter spp. จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ จากการประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณพบว่าการลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่ลง 2 หน่วย (2 log units) จะลดอุบัติการณ์ของโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุเนื่องมาจากเชื้อ *Campylobacter* spp. ลงได้ถึง 30 เท่า (Rosenquist et al., 2003) ดังนั้นการลดจำนวนเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ระดับฟาร์มจึงถือเป็นจุดวิกฤติ (critical control point) ที่สำคัญที่สุดจุดหนึ่งของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ ถึงแม้ในปัจจุบันฟาร์มไก่หลายฟาร์มในประเทศไทยได้มีการนำสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรมาใช้แทนยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ แต่การศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรที่นำมาใช้ในฟาร์มดังกล่าวยังมีอยู่อย่างจำกัด อีกทั้งยังไม่เคยมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรเหล่านี้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในระดับฟาร์ม

การลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ระดับฟาร์ม นอกจากจะช่วยลดโอกาสที่เชื้อจะปนเปื้อนเนื้อไก่ในระหว่างกระบวนการชำแหละและตัดแต่งซาก ซึ่งจะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อผู้บริโภคแล้ว การกระทำดังกล่าวยังช่วยลดโอกาสในการแพร่กระจายของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะจากไก่มาสู่คนอีกทางหนึ่งด้วย ในช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา เชื้อ *Campylobacter* spp. มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะการดื้อต่อยาในกลุ่มฟลูโอโรควิโนโลน (fluoroquinolones) ซึ่งเป็นหนึ่งในยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Campylobacter* spp. เป็นผลให้การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้ไม่สามารถดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการศึกษาในต่างประเทศพบว่าการเพิ่มขึ้นของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวที่พบในเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่เพาะแยกได้จากทั้งไก่และคน ส่วนหนึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการใช้ยากลุ่มนี้ (ตัวอย่างเช่น enrofloxacin) ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ที่ผ่านมาในอดีต (Endtz et al., 1991) เนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่พบในสัตว์สามารถถ่ายทอดมาสู่คนผ่านทางเนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อน ดังนั้นการเฝ้าระวังการเกิดการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในสัตว์ โดยเฉพาะในไก่ซึ่งถือเป็นแหล่งรังโรคสำคัญของเชื้อนี้จึงมีความสำคัญ

จากที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นจะเห็นได้ว่าการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อเป็นสิ่งจำเป็น อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อ *Campylobacter* spp. ในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อนี้ โดยเฉพาะการศึกษาในประเด็นที่เกี่ยวข้องกับความชุกและรูปแบบการต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่เพาะแยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทย ตลอดจนวิธีที่ใช้ในการควบคุมหรือลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในระดับฟาร์มเบื้องต้น ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้น่าจะเป็นประโยชน์โดยตรงทั้งต่อผู้บริโภคและต่ออุตสาหกรรมการผลิตเนื้อไก่เพื่อการส่งออก เพราะข้อมูลที่ได้ไม่เพียงแต่จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประเมินความเสี่ยงที่ผู้บริโภคจะได้รับเชื้อ *Campylobacter* spp. จากการบริโภคเนื้อไก่ แต่ข้อมูลเหล่านี้ยัง

สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวางแผนควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อ รวมทั้งใช้ในการวางแนวทางการแก้ไขและลดปัญหาการต้านยาของเชื้อจุลชีพที่สามารถถ่ายทอดจากสัตว์มาสู่คนได้อีกด้วย

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีอยู่ด้วยกัน 2 ประเด็น คือ

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความชุกและรูปแบบการต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรในการควบคุมหรือลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในระดับฟาร์มเบื้องต้น

การศึกษาและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *Campylobacter* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีอากาศหรือออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic bacteria) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษตัวอื่น เช่น *Salmonella* หรือ *Escherichia coli* เชื้อ *Campylobacter* จะไม่เพิ่มจำนวนในเนื้อสัตว์หรืออาหารที่มีการปนเปื้อน (Humphrey et al., 2007; Moore et al., 2005) เชื้อ *Campylobacter* โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในการก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคน อันได้แก่ *C. jejuni* และ *C. coli* จะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส (Shane and Montrose, 1985) โดยปกติเชื้อ *Campylobacter* สามารถพบได้ทั่วไปในทางเดินอาหารของปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง และสัตว์ป่า โดยเชื้อ *C. jejuni* จะพบมากในทางเดินอาหารของไก่และโค ในขณะที่เชื้อ *C. coli* จะพบมากในทางเดินอาหารของสุกร (Humphrey et al., 2007) เนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในทางเดินอาหารของสัตว์ปีกโดยเฉพาะไก่เนื้อ ดังนั้นโรคอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากเชื้อ *Campylobacter* จึงมักเกิดจากการบริโภคเนื้อไก่ที่ปรุงไม่สุกหรืออาหารที่ไม่ต้องผ่านความร้อน เช่น สลัด ที่มีการปนเปื้อนกับเนื้อไก่สด (Altekruse and Tollefson, 2003)

ถึงแม้สัตว์ปีก อันได้แก่ ไก่เนื้อ ไก่ไข่ ไก่งวง และเป็ด ตลอดจนนกที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติจะถือเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของเชื้อ *Campylobacter* spp. แต่ความชุกของเชื้อนี้ในสัตว์ปีกแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป (Newell and Fearnley, 2003; Shane, 2000) นอกจากนี้ในสัตว์ปีกชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันก็พบว่ามีความต้านทานต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในทางเดินอาหารที่แตกต่างกัน (Stern et al., 1990) จากการศึกษาในต่างประเทศทั้งในอเมริกา ยุโรป แอฟริกา เอเชีย และออสเตรเลีย พบว่าความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อจะอยู่ในช่วงตั้งแต่น้อยกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยประเทศในกลุ่มสแกนดิเนเวีย (Scandinavia) จะเป็นบริเวณที่มีความชุกของเชื้อนี้ต่ำที่สุด (Evans and Sayers, 2000; Luangtongkum et al., 2006; Newell and Fearnley, 2003; Perko-Makela et al., 2002; Refregier-Petton et al., 2001; Stern et al., 2001; Wedderkopp et al., 2001) สำหรับประเทศไทย Padungtod และ Kaneene (2005) ได้ทำการศึกษาความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อที่เลี้ยงในเขตภาคเหนือแถบจังหวัดเชียงใหม่และลำปาง โดยคณะผู้วิจัยพบว่าความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อที่ฟาร์มและโรงเชือดในบริเวณดังกล่าวจะอยู่ประมาณ 64 เปอร์เซ็นต์ และ 38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากเชื้อ *Campylobacter* spp. จะพบได้ในฟาร์มไก่เนื้อและโรงเชือดแล้ว เชื้อนี้ยังพบได้ในเนื้อไก่สดที่วางขายในตลาดอีกด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาในอดีตพบว่า 15 – 65 เปอร์เซ็นต์ ของเนื้อไก่ที่จำหน่ายในประเทศไทยมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* spp. (Padungtod and Kaneene, 2005; Suzuki and Yamamoto, 2009; Vindigni et al., 2007) ในขณะที่

8 – 100 เปอร์เซ็นต์ ของเนื้อไก่ที่ขายในแถบทวีปยุโรป อเมริกา แอฟริกา เอเชีย และออสเตรเลีย จะมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้ (Jorgensen et al., 2002; Padungton and Kaneene, 2003; Shane, 2000; Suzuki and Yamamoto, 2009; Zhao et al., 2001)

เนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* spp. สามารถพบได้เป็นจำนวนมากในทางเดินอาหารของไก่ตั้งแต่ก่อนเข้าสู่โรงเชือด ดังนั้นการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในเนื้อไก่จึงควรเริ่มต้นที่ฟาร์ม ทั้งนี้เพื่อลดโอกาสที่เชื้อ *Campylobacter* spp. จากลำไส้จะปนเปื้อนเนื้อไก่ในระหว่างกระบวนการชำแหละและตัดแต่งซาก โดยทั่วไปวิธีการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ *Campylobacter* spp. ในฟาร์มไก่เนื้อที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ ได้แก่ 1) การควบคุมป้องกันการติดเชื้อโดยอาศัยกระบวนการความมั่นคงทางชีวภาพ (biosecurity) เพื่อป้องกันหรือลดโอกาสที่เชื้อจะเข้าสู่ฟาร์ม กับ 2) การลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่จะเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารของไก่ โดยอาศัยวิธีการต่างๆ อาทิเช่น การใช้ competitive exclusion การใช้สารเสริมชีวนะ (probiotics) ตลอดจนการใช้แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) แบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) หรือการทำวัคซีน เป็นต้น (Lin, 2009; Stern et al., 2006; Wagenaar et al., 2006) ถึงแม้การศึกษาในอดีตที่ผ่านมาจะแสดงให้เห็นว่าสารเสริมชีวนะหรือสารสกัดจากสมุนไพรบางตัวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Campylobacter* spp. ได้ (Chang and Chen, 2000; Morishita et al., 1997; Wannissorn et al., 2005; Willis and Reid, 2008) แต่การศึกษาดังกล่าวเป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการหรือเป็นการทดลองที่ใช้ไก่จำนวนไม่มาก ไม่ใช่การศึกษาในระดับฟาร์ม ทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรเหล่านี้เมื่อนำไปใช้จริงในฟาร์มจะให้ผลในการควบคุมหรือลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ได้หรือไม่

ถึงแม้โรคอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากเชื้อ *Campylobacter* จะสามารถหายได้เองโดยไม่จำเป็นต้องทำการรักษา แต่การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะก็อาจมีความจำเป็นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงหรือป่วยเรื้อรังเป็นระยะเวลานานหลายสัปดาห์ โดยทั่วไปยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Campylobacter* จะเป็นยากลุ่มในแมคโครไลด์ (macrolides) เช่น อีริโทรมัยซิน (erythromycin) และยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน เช่น ซิโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) (Allos, 2001; Blaser, 1997) อย่างไรก็ตาม ในช่วงระยะเวลาประมาณ 20 ปีที่ผ่านมา อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยเฉพาะการดื้อต่อยาในกลุ่มฟลูโอโรควิโนโลนมีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Luangtongkum et al., 2009) การดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูโอโรควิโนโลนของเชื้อ *Campylobacter* spp. สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศต่างๆ ทั่วโลก เช่น ที่ประเทศสเปน 99 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่เพาะแยกได้จากไก่ และ 71 – 90 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อที่เพาะแยกได้จากคน ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1995 – 1998 มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ (Prats et al., 2000; Saenz et al., 2000) สำหรับประเทศไทย Boonmar และ คณะ (2007) พบว่า 77

เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่เพาะแยกได้จากไก่ และ 96 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อที่เพาะแยกได้จากคน มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูโอโรควิโนโลน (Boonmar et al., 2007) ในทำนองเดียวกัน Padungtod และ คณะ (2006) พบว่า 54 – 90 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่เพาะแยกได้จากไก่เนื้อที่ฟาร์มโรงเชือด และตลาดสดในจังหวัดเชียงใหม่และลำปางมีการดื้อต่อยาซิโปรฟลอกซาซิน (Padungtod et al., 2006) นอกจากเชื้อ *Campylobacter* spp. จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูโอโรควิโนโลน เชื้อนี้ยังสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มอื่น อาทิเช่น แมคโครไลด์ และ เทตทร้าซัยคลิน (tetracycline) ได้อีกด้วย Boonmar และคณะ (2007) พบว่า 14 – 17 เปอร์เซ็นต์ และ 26 – 57 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่เพาะแยกได้จากไก่และคนในประเทศไทยมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มแมคโครไลด์และเทตทร้าซัยคลินตามลำดับ (Boonmar et al., 2007) ซึ่งการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูโอโรควิโนโลนและแมคโครไลด์ในเวลาเดียวกันนั้นถือว่ามีความสำคัญทางคลินิกเป็นอย่างมาก เนื่องจากยาทั้ง 2 กลุ่มนี้เป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากเชื้อ *Campylobacter* spp. (Engberg et al., 2001)

เนื่องจากการศึกษาถึงความชุกและรูปแบบการต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในประเทศไทยมีอยู่อย่างจำกัด ประกอบกับยังไม่เคยมีการศึกษาถึงความชุกและการต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่เพาะแยกได้จากไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรในระดับฟาร์ม ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาเปรียบเทียบความชุกและรูปแบบการการต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร รวมทั้งศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรในการควบคุมหรือลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในระดับฟาร์มเบื้องต้น

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ประกอบด้วย 3 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 การเก็บตัวอย่างลำไส้และเนื้อไก่ ระยะที่ 2 การเพาะแยกและพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *Campylobacter* spp. และระยะที่ 3 การทดสอบการต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp.

ระยะที่ 1 การเก็บตัวอย่างลำไส้และเนื้อไก่

ตัวอย่างลำไส้ไก่จะเก็บจากไก่เนื้อและไก่ไทยที่ส่งเข้าโรงเชือด จำนวน 30 ลำไส้ต่อฟาร์ม จำนวนทั้งสิ้น 12 ฟาร์ม โดยแบ่งเป็นไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปจำนวน 3 ฟาร์ม ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะจำนวน 3 ฟาร์ม ไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปจำนวน 3 ฟาร์ม และไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพรจำนวน 3 ฟาร์ม ในทำนองเดียวกัน ตัวอย่างเนื้อไก่ที่นำมาตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* spp. จะมาจากไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปจำนวน 30 ตัว ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะจำนวน 30 ตัว ไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปจำนวน 30 ตัว และไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพรจำนวน 30 ตัว

เนื่องจากไก่ไทยมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าไก่เนื้อ ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงไก่ไทยจนได้น้ำหนักตามที่ตลาดต้องการจึงต้องใช้ระยะเวลานานกว่าของไก่เนื้อ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ อายุเฉลี่ยของไก่เนื้อที่ส่งเข้าโรงเชือดทั้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปและอาหารผสมสารเสริมชีวนะจะอยู่ประมาณ 40 วัน ในขณะที่ไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพรจะถูกส่งเข้าโรงเชือดที่อายุประมาณ 120 วัน และ 84 วัน ตามลำดับ สำหรับสารเสริมชีวนะที่ใช้ผสมอาหารให้ไก่กินจะมีเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นองค์ประกอบสำคัญ โดยสารเสริมชีวนะดังกล่าวจะใช้ผสมอาหารในอัตราส่วน 100 กรัม ของสารเสริมชีวนะต่ออาหาร 1 ตัน ซึ่งจะทำให้มีจำนวนของเชื้อ *Bacillus subtilis* อยู่ประมาณ 1×10^9 CFU ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยทั่วไปผู้เลี้ยงจะผสมสารเสริมชีวนะในอาหารให้ไก่กินตั้งแต่อายุ 1 วัน ไปจนกระทั่งส่งไก่เข้าโรงเชือด สำหรับในกรณีของสมุนไพรที่ใช้ผสมอาหารให้ไก่ไทยนั้นจะประกอบไปด้วยสมุนไพรที่สำคัญ 3 ตัว อันได้แก่ ฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน และไพล โดยสมุนไพรดังกล่าวจะใช้ผสมอาหารให้ไก่กินในอัตราส่วนสมุนไพร 1.8 กิโลกรัม ต่ออาหาร 1 ตัน ซึ่งไก่จะได้รับสมุนไพรตั้งแต่แรกเกิดจนกระทั่งส่งขาย

ระยะที่ 2 การเพาะแยกเชื้อและการพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *Campylobacter* spp.

ตัวอย่างลำไส้ไก่และเนื้อไก่จะถูกนำมาเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* spp. ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง หลังการเก็บตัวอย่าง ตามวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 การเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* spp. จากตัวอย่างลำไส้ไก่ จะใช้วิธี direct plating โดยลำไส้จะถูกเปิดผ่าด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นกากอาหารในลำไส้จะถูก streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด mCCDA แล้วเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ microaerobic condition (สภาวะแวดล้อมที่มีระดับออกซิเจนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์และคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์) โคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Campylobacter* spp. จะถูกนำมาตรวจยืนยันด้วยวิธีการทางชีวเคมีและอณูชีววิทยาต่อไป

2.2 การเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* spp. จากตัวอย่างเนื้อไก่ จะดำเนินการตามวิธีของ Moran และ คณะ (2009) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐาน ISO 10272 (Moran et al., 2009) ดังแสดงในรูปที่ 1

เนื้อไก่ 25 กรัม + buffered peptone water (BPW) 225 มล.

↓

25 มล. ของ BPW จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ + Bolton broth 225 มล.

↓ เพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้น เพาะบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 – 44 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ microaerobic environment

Subculture เชื้อ ลงบน mCCDA

↓ เพาะบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ microaerobic environment

โคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Campylobacter* spp. จะถูกนำมาตรวจยืนยันด้วยวิธีการทางชีวเคมีและอณูชีววิทยาต่อไป

รูปที่ 1 แผนภูมิการเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* spp. จากตัวอย่างเนื้อไก่

การพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *Campylobacter* spp. จะทำโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและอณูชีววิทยา โดยโคโลนีที่มีสีเทามันวาวลักษณะคล้ายเชื้อ *Campylobacter* spp. จะถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี อันได้แก่ oxidase test, catalase test, และ hippurate hydrolysis test โคโลนีที่ให้ผลทดสอบ

ทางชีวเคมีตรงกันกับเชื้อ *Campylobacter* spp. จะถูกพิสูจน์ยืนยันถึงสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี multiplex PCR (mPCR) ต่อไป โดยใช้ primers ที่เฉพาะเจาะจงกับ *C. jejuni*, *C. coli*, และ *C. lari* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบได้ค่อนข้างบ่อยในสัตว์ปีก การพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *Campylobacter* spp. ด้วยวิธี mPCR ในครั้งนี้จะอ้างอิงตามวิธีของ Wang และ คณะ (2002) โดยมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย (Wang et al., 2002) ดังนี้ ใน 50 µl ของแต่ละ mPCR reaction จะประกอบไปด้วย 1X PCR buffer, 3.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates, 0.2 µM 16S rRNA primers, 0.5 µM *C. jejuni* primers, 1.0 µM *C. coli* และ *C. lari* primers, 1.25 U ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase, และ 5 µl ของ whole-cell DNA template รายละเอียดของ primers ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นดังที่แสดงในตารางที่ 1 สำหรับ PCR cycle ที่ใช้จะเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 30 รอบ จากนั้นปิดท้ายด้วย final extension step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

ตารางที่ 1 Oligonucleotide primers สำหรับ *Campylobacter* multiplex PCR ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)
16SF	GGA TGA CAC TTT TCG GAG C	816
16SR	CAT TGT AGC ACG TGT GTC	
CJF	ACT TCT TTA TTG CTT GCT GC	323
CJR	GCC ACA ACA AGT AAA GAA GC	
CCF	GTA AAA CCA AAG CTT ATC GTG	126
CCR	TCC AGC AAT GTG TGC AAT G	
CLF	TAG AGA GAT AGC AAA AGA GA	251
CLR	TAC ACA TAA TAA TCC CAC CC	

ระยะที่ 3 การทดสอบการต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp.

เชื้อ *Campylobacter* spp. ที่เพาะแยกได้จากไก่กลุ่มต่างๆ และได้ทำการพิสูจน์ยืนยันเรียบร้อยแล้ว จะถูกนำมาทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะโดยวิธี agar dilution method ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) (CLSI, 2008) โดยเชื้อ *Campylobacter* spp. ดังกล่าวจะถูก subculture ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นองค์ประกอบ (blood agar) และทำการเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ microaerobic environment จากนั้นเชื้อที่ได้จะถูก

subculture ลงใน Mueller-Hinton broth แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ที่ระดับประมาณ 0.5 McFarland standard เชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ผ่านการปรับความเข้มข้นแล้วจะถูก inoculate ลงบน Mueller-Hinton agar ที่มียาปฏิชีวนะที่ทำการเจือจาง 2 เท่า (two-fold dilutions) และมีเลือดเป็นองค์ประกอบอยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ microaerobic environment การแปลผลการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. จะอ้างอิงตามเกณฑ์ของ National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) และ CLSI (2008) ดังแสดงในตารางที่ 2 ยาปฏิชีวนะที่ทำการทดสอบในครั้งนี้จะมีทั้งหมดด้วยกัน 5 ตัว ได้แก่ ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid และ tetracycline เชื้อ *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 จะเป็นเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุมสำหรับการทดสอบการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในครั้งนี้

ตารางที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ทำการทดสอบ และเกณฑ์ที่ใช้บ่งชี้การดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp.

Antimicrobial agent	Agar dilution test range (µg/ml)	MIC range of *C. jejuni* ATCC 33560 (µg/ml)	MIC breakpoint (µg/ml)		
			S	I	R
Ciprofloxacin (CIP)	0.008-512	0.06-0.5	≤ 1	2	≥ 4
Erythromycin (ERY)	0.06-512	1-8	≤ 8	16	≥ 32
Gentamicin (GEN)	0.06-128	0.5-4	≤ 2	4	≥ 8
Nalidixic acid (NAL)	0.25-512	8-32	≤ 16	32	≥ 64
Tetracycline (TET)	0.06-512	1-4	≤ 4	8	≥ 16

การวิเคราะห์ทางสถิติ

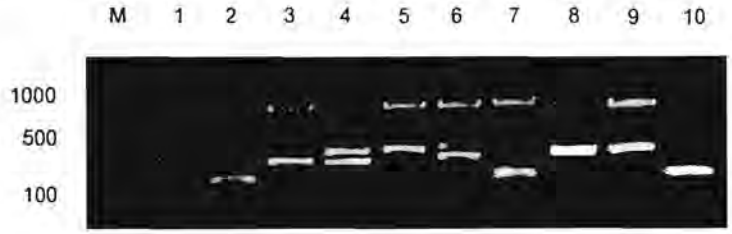
ภายหลังจากการเก็บรวบรวมข้อมูล ผลการทดลองทั้งหมดที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์และทดสอบทางสถิติ เพื่อตรวจสอบว่าความชุกและเปอร์เซ็นต์การต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ การทดสอบทางสถิติในครั้งนี้จะใช้ค่าไคสแควร์ (Chi-square test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) เป็นตัวทดสอบ

ผลการวิจัย

ความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp.ในตัวอย่างลำไส้และเนื้อไก่

จากลำไส้ของไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปจำนวน 90 ตัวอย่าง ลำไส้ของไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะจำนวน 90 ตัวอย่าง ลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปจำนวน 90 ตัวอย่าง และลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพรจำนวน 90 ตัวอย่าง พบว่า 35 ตัวอย่าง (38.89%) และ 30 ตัวอย่าง (33.33%) ของลำไส้ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้ผสมและผสมสารเสริมชีวนะให้ผลบวกกับเชื้อ *Campylobacter* spp. ในขณะที่ 57 ตัวอย่าง (63.33%) และ 66 ตัวอย่าง (73.33%) ของลำไส้ไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้ผสมและผสมสมุนไพรให้ผลบวกกับเชื้อนี้ ดังแสดงในตารางที่ 3 ในทำนองเดียวกันจากการศึกษาความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในเนื้อไก่ พบว่า ไก่ไทยมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* spp. มากกว่าไก่เนื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

หากพิจารณาถึงสายพันธุ์ของเชื้อ *Campylobacter* ที่พบในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่า มากกว่า 80.00% ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากตัวอย่างลำไส้และเนื้อไก่ของไก่เนื้อทั้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะจะเป็นเชื้อ *C. jejuni* (ตารางที่ 3) ในขณะที่สายพันธุ์ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากไก่ไทยจะพบทั้ง *C. jejuni* และ *C. coli* ในกลุ่มของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพร คณะผู้วิจัยพบว่า 30 จาก 57 ตัวอย่าง (52.63%) ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากลำไส้ และ 11 จาก 26 ตัวอย่าง (42.31%) ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากเนื้อไก่จะเป็นเชื้อ *C. coli* (ตารางที่ 3) ในทางตรงกันข้าม 89.39% ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพรจะเป็นเชื้อ *C. jejuni* ในขณะที่ 48.28% และ 37.93% ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อไก่กลุ่มดังกล่าวจะเชื้อ *C. jejuni* และ *C. coli* ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ตัวอย่างผลการพิสูจน์ยืนยันถึงสายพันธุ์ของเชื้อ *Campylobacter* ด้วยวิธี multiplex PCR แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 PCR amplicons ของเชื้อ *Campylobacter* ที่ทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR: *C. jejuni* positive control (1) *C. coli* positive control (2) *C. lari* positive control (3) mix infection ระหว่าง *C. jejuni* และ *C. lari* (4) ตัวอย่างเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากตัวอย่างลำไส้และเนื้อไก่ (5 – 10) และ 100 bp molecular weight marker (M)

ตารางที่ 3 ความชุกและสายพันธุ์ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากลำไส้และเนื้อของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร

Sample*	No. (%) of positive samples/ total no. of samples	No. (%) of positive samples			Average $\log_{10}$ number of *Campylobacter*
		C. jejuni	*C. coli*	Other *Campylobacter* species/mix infection	
Intestine					
B1	0 (0)/30	-	-	-	-
B2	26 (86.67)/30	25 (96.15)	0 (0)	1 (3.85)	6.37
B3	9 (30.00)/30	4 (44.44)	2 (22.22)	3 (33.33)	8.48
Total	35 (38.89)/90[a]	29 (82.86)[a]	2 (5.71)[a]	4 (11.43)[a]	7.43[a]
P1	0 (0)/30	-	-	-	-
P2	30 (100.00)/30	30 (100.00)	0 (0)	0 (0)	7.97
P3	0 (0)/30	-	-	-	-
Total	30 (33.33)/90[a]	30 (100.00)[b]	0 (0)[a]	0 (0)[a]	7.97[a]
T1	15 (50.00)/30	10 (66.67)	3 (20.00)	2 (13.33)	6.12
T2	27 (90.00)/30	0 (0)	27 (100.00)	0 (0)	7.98
T3	15 (50.00)/30	15 (100.00)	0 (0)	0 (0)	5.83
Total	57 (63.33)/90[b]	25 (43.86)[c]	30 (52.63)[b]	2 (3.51)[a]	6.64[a]
M1	30 (100.00)/30	24 (80.00)	1 (3.33)	5 (16.67)	7.49
M2	29 (96.67)/30	29 (100.00)	0 (0)	0 (0)	6.89
M3	7 (23.33)/30	6 (85.71)	1 (14.29)	0 (0)	5.92
Total	66 (73.33)/90[b]	59 (89.39)[a]	2 (3.03)[a]	5 (7.58)[a]	6.77[a]
Carcass					
B	17 (56.67)/30[a]	14 (82.35)[a]	2 (11.77)[a]	1 (5.88)[a]	3.20[a]
P	7 (23.33)/30[b]	7 (100.00)[a]	0 (0)[a]	0 (0)[a]	2.54[a]
T	26 (86.67)/30[c]	9 (34.62)[b]	11 (42.31)[b,c]	6 (23.08)[a]	2.81[a]
M	29 (96.67)/30[c]	14 (48.28)[b]	11 (37.93)[a,c]	4 (13.79)[a]	3.11[a]

* ตัวอย่างที่เก็บเพื่อตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในครั้งนี้จะมาจากลำไส้ของไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสารเสริมชีวนะ (B1 – B3) ลำไส้ของไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะ (P1 – P3) ลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพร (T1 – T3) และลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพร (M1 – M3) และจากเนื้อไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสารเสริมชีวนะ (B) เนื้อไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะ (P) เนื้อไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพร (T) และเนื้อไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพร (M)

[a, b, c] ตัวอักษรที่ต่างกันภายในกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน (ลำไส้หรือเนื้อไก่) ที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. จากตัวอย่างลำไส้และเนื้อไก่

จาก 157 ตัวอย่างของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร พบว่า 155 ตัวอย่าง (98.73%) มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ตัว ในทำนองเดียวกันจากการทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากเนื้อไก่จำนวน 70 ตัวอย่าง พบว่า 61 ตัวอย่าง (87.14%) มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ตัว โดยรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่พบได้บ่อยที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ CIP-NAL-TET รูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่แต่ละกลุ่มแสดงในตารางที่ 4 และ 5

หากพิจารณาถึงการดื้อต่อยาปฏิชีวนะแต่ละตัว คณะผู้วิจัยพบว่าเชื้อ *Campylobacter* spp. ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยในการศึกษาครั้งนี้จะดื้อต่อยาในกลุ่ม quinolones/fluoroquinolones อันได้แก่ nalidixic acid และ ciprofloxacin ในขณะที่อัตราการดื้อต่อยา gentamicin จะพบในอัตราส่วนที่ต่ำที่สุด คือ ประมาณไม่เกิน 4% สำหรับอัตราการดื้อต่อยา tetracycline ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยในครั้งนี้ จะแตกต่างกันไปในไก่แต่ละกลุ่ม โดยที่อัตราการดื้อต่อยาดังกล่าวจะอยู่ในช่วงระหว่าง 33.33% ไปจนถึง 100.00% การดื้อต่อยาในกลุ่ม macrolides อันได้แก่ erythromycin ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ค่อนข้างน่าสนใจ ถึงแม้เชื้อที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยโดยทั่วไปจะมีอัตราการดื้อต่อยา erythromycin ต่ำกว่า 15% แต่คณะผู้วิจัยพบว่าเกือบ 40% ของเชื้อที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพรจะมีการดื้อต่อยาดังกล่าว อย่างไรก็ตาม อัตราการดื้อต่อยา erythromycin ที่สูงถึงเกือบ 40% นี้ จะพบเฉพาะในเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้เท่านั้น ในขณะที่เชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพรจะไม่พบว่ามีการดื้อต่อยา erythromycin ปรากฏให้เห็น (ตารางที่ 6 และ 7)

การดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป หรือ multidrug resistance จะพบในเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพรเป็นหลัก โดย 42.59% ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่กลุ่มดังกล่าวจะมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป (ตารางที่ 6) โดยส่วนใหญ่รูปแบบของ multidrug resistance ที่พบจะเป็นการดื้อต่อยา CIP-ERY-NAL-TET (ตารางที่ 4) นอกจากการดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปจะพบในเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพรแล้ว การดื้อต่อยาในลักษณะของ multidrug resistance ดังกล่าว ยังพบได้ในเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างลำไส้และเนื้อไก่ของไก่เนื้อและไก่ไทยทั้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร อย่างไรก็ตามอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่กลุ่มต่างๆ เหล่านั้น จะมีจำนวนไม่เกิน 15% ของเชื้อทั้งหมดที่ทำการทดสอบ (ตารางที่ 6 และ 7) นอกเหนือไปจากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยยังพบว่าเชื้อ *C. jejuni* ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสารเสริมชีวนะจำนวน 1 ตัวอย่าง มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกตัวที่ทำการทดสอบ (CIP-ERY-GEN-NAL-TET) ในทางตรงกันข้ามมีเชื้อ *C. jejuni* จำนวน 11 ตัวอย่าง ที่ไม่พบว่ามีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มใดเลย โดยเชื้อดังกล่าวมาจากลำไส้ของไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะ 1 ตัวอย่าง ลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพร 1 ตัวอย่าง เนื้อของไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสารเสริมชีวนะ 3 ตัวอย่าง เนื้อของไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะ 4 ตัวอย่าง และเนื้อของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพร 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4 และ 5)

ประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะและสมุนไพรในการควบคุมเชื้อ *Campylobacter* spp.

จากข้อมูลความชุกและจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะ แสดงให้เห็นว่าสารเสริมชีวนะที่ผสมในอาหารให้ไก่กินในขนาดที่ใช้อยู่ในปัจจุบันนั้นอาจไม่เพียงพอต่อการยับยั้งหรือลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในทางเดินอาหารของไก่ในระดับฟาร์ม เนื่องจากความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารเสริมชีวนะจะอยู่ที่ 33.33% ในขณะที่ความชุกของเชื้อในไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารผสมสารเสริมชีวนะจะอยู่ที่ 38.89% นอกจากนี้จำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่พบในลำไส้ของไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารเสริมชีวนะ (7.97 log CFU/g feces) ก็ไม่แตกต่างกับจำนวนของเชื้อที่พบในลำไส้ของไก่เนื้อกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารผสมสารเสริมชีวนะ (7.43 log CFU/g feces) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) ในทำนองเดียวกันสมุนไพรที่ผสมในอาหารให้ไก่กินในขนาดที่ใช้อยู่ในปัจจุบันก็อาจไม่เพียงพอต่อการยับยั้ง

หรือลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในทางเดินอาหารของไก่ไทย เนื่องจากทั้งความชุกและจำนวนของเชื้อที่พบในลำไส้ของไก่ไทยกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสมุนไพร (73.33% และ 6.77 log CFU/g feces) นั้นไม่แตกต่างไปจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสมุนไพรผสมในอาหาร (63.33% และ 6.64 log CFU/g feces) อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 4 รูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร

Group (no. of total isolates tested)	Resistance pattern†	No. (%) of isolates in each pattern
Broiler chicken (33)	CIP-NAL	20 (60.60)
	CIP-NAL-TET	8 (24.24)
	NAL	2 (6.06)
	CIP-ERY-NAL-TET*	2 (6.06)
	CIP-ERY-GEN-NAL-TET*	1 (3.03)
Broiler chicken with probiotics (14)	CIP-NAL-TET	13 (92.86)
	No resistance	1 (7.14)
Native chicken (54)	CIP-NAL-TET	30 (55.56)
	CIP-ERY-NAL-TET*	21 (38.89)
	CIP-GEN-NAL-TET*	2 (3.70)
	CIP-TET	1 (1.85)
Native chicken with medicinal plants (56)	CIP-NAL-TET	27 (48.21)
	CIP-NAL	22 (39.29)
	CIP	2 (3.57)
	CIP-ERY-NAL-TET*	2 (3.57)
	ERY-NAL	1 (1.79)
	ERY	1 (1.79)
	No resistance	1 (1.79)

† CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline

* รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป (multidrug resistance pattern)

ตารางที่ 5 รูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากเนื้อของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร

Group (no. of total isolates tested)	Resistance pattern†	No. (%) of isolates in each pattern
Broiler chicken (17)	CIP-NAL	8 (47.06)
	CIP-NAL-TET	6 (35.29)
	No resistance	3 (17.65)
Broiler chicken with probiotics (7)	CIP-NAL-TET	2 (28.57)
	CIP-ERY-NAL-TET*	1 (3.03)
	No resistance	4 (57.14)
Native chicken (20)	CIP-NAL-TET	10 (50.00)
	CIP-NAL	7 (35.00)
	TET	1 (5.00)
	No resistance	2 (10.00)
Native chicken with medicinal plants (26)	CIP-NAL-TET	14 (53.85)
	CIP-NAL	7 (26.92)
	CIP-ERY-NAL-TET*	2 (7.69)
	ERY-NAL-TET	1 (3.85)
	CIP	1 (3.85)
	TET	1 (3.85)

† CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline

* รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป (multidrug resistance pattern)

ตารางที่ 6 อัตราการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร

Group (no. of isolates tested)*	No. (%) of *Campylobacter* spp. resistant to†					No. (%) of MDR‡
	CIP	ERY	GEN	NAL	TET	
B (33)	31 (93.94)[a]	3 (9.09)[a]	1 (3.03)[a]	33 (100.00)[a]	11 (33.33)[a]	3 (9.09)[a]
P (14)	13 (92.86)[a]	0 (0)[a]	0 (0)[a]	13 (92.86)[a]	13 (92.86)[b]	0 (0)[a]
T (54)	54 (100.00)[a]	21 (38.89)[b]	2 (3.70)[a]	53 (98.15)[a]	54 (100.00)[b]	23 (42.59)[b]
M (56)	53 (94.64)[a]	4 (7.14)[a]	0 (0)[a]	52 (92.86)[a]	29 (51.79)[a]	2 (3.57)[a]

* ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสารเสริมชีวนะ (B) ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะ (P) ไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพร (T) และไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพร (M)

† CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline

‡ Multidrug-resistant strains (MDR)

[a,b] ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 อัตราการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากเนื้อของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร

Group (no. of isolates tested)*	No. (%) of *Campylobacter* spp. resistant to†					No. (%) of MDR‡
	CIP	ERY	GEN	NAL	TET	
B (17)	14 (82.35)[a,c]	0 (0)[a]	0 (0)[a]	14 (82.35)[a,c]	6 (35.29)[a]	0 (0)[a]
P (7)	3 (42.86)[a]	1 (14.29)[a]	0 (0)[a]	3 (42.86)[a]	3 (42.86)[b]	1 (14.29)[a]
T (20)	17 (85.00)[b,c]	0 (0)[a]	0 (0)[a]	17 (85.00)[b,c]	11 (55.00)[a]	0 (0)[a]
M (26)	24 (92.31)[b,c]	3 (11.54)[a]	0 (0)[a]	24 (92.31)[b,c]	18 (69.23)[a]	3 (11.54)[a]

* ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสารเสริมชีวนะ (B) ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะ (P) ไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพร (T) และไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพร (M)

† CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline

‡ Multidrug-resistant strains (MDR)

[a,b,c] ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อต่ำกว่าในไก่ไทย ในขณะที่รูปแบบการต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยทั้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรจะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ เชื้อโดยส่วนใหญ่จะดื้อต่อ ciprofloxacin และ nalidixic acid แต่จะมีความไวรับต่อ gentamicin ในขณะที่อัตราการดื้อต่อ erythromycin จะพบมากในเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่ไทย ส่วนอัตราการดื้อต่อ tetracycline จะแตกต่างกันไปในไก่แต่ละกลุ่ม สำหรับอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปจะพบในเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพรเป็นหลัก

การที่ความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อต่ำกว่าในไก่ไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากอายุของไก่เนื้อและไก่ไทยที่ส่งเข้าโรงเชือดมีความแตกต่างกัน โดยทั่วไปไก่เนื้อที่ส่งเข้าโรงเชือดจะมีอายุประมาณ 6 สัปดาห์ ในขณะที่ไก่ไทยจะถูกส่งเข้าโรงเชือดเมื่ออายุประมาณ 10 – 18 สัปดาห์ จากการศึกษาที่ผ่านมาในอดีตพบว่าความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. เพิ่มมากขึ้นเมื่อไก่มีอายุมากขึ้น (Evans and Sayers, 2000; Luangtongkum et al., 2006; Newell and Fearnley, 2003; Northcutt et al., 2003) ดังนั้นจึงไม่น่าแปลกใจที่ความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่ไทยจะสูงกว่าในไก่เนื้อ นอกจากปัจจัยในเรื่องของอายุ สภาพการเลี้ยงก็น่าจะเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ทำให้ความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อและไก่ไทยมีความแตกต่างกัน เนื่องจากไก่ไทยมีโอกาสที่จะสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกมากกว่าไก่เนื้อซึ่งถูกเลี้ยงอยู่ในฟาร์มที่มีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) ที่เข้มงวด ดังนั้นนอกจากโอกาสที่จะพบเชื้อ *Campylobacter* spp. ได้ง่ายในไก่ไทย ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อที่พบในไก่ไทยก็น่าจะมีมากกว่าในไก่เนื้อ

หากพิจารณาถึงสายพันธุ์ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่พบในไก่กลุ่มต่างๆ คณะผู้วิจัยพบว่าเชื้อ *C. jejuni* เป็นสายพันธุ์หลักที่พบในไก่เนื้อทั้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะ ซึ่งผลการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาในอดีตที่พบว่ามากกว่า 65% ของเชื้อ *Campylobacter* ที่พบในฟาร์มไก่เนื้อจะเป็นเชื้อ *C. jejuni* (Evans and Sayers, 2000; Heuer et al., 2001; Luangtongkum et al., 2006; Wedderkopp et al., 2001) ในทางตรงกันข้ามเชื้อ *C. coli* จะพบได้มากในไก่ไทย โดยเฉพาะในลำไส้และเนื้อของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพร ถึงแม้ประมาณ 90% ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพรจะเป็นเชื้อ *C. jejuni* แต่เกือบ 40% ของเชื้อที่แยกได้จากเนื้อไก่กลุ่มดังกล่าวกลับเป็นเชื้อ *C. coli* การเพิ่มขึ้นของเชื้อ *C. coli* ที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่ที่พบในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Padungtod และ Kaneene (2005) ในอดีตที่

พบว่าอัตราส่วนของเชื้อ *C. coli* ที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่จะเพิ่มสูงขึ้นภายหลังการตัดแต่งซาก นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยดังกล่าวยังพบอีกว่าเนื้อไก่ที่จำหน่ายในเขตภาคเหนือของประเทศไทยมีการปนเปื้อนของเชื้อ *C. coli* มากกว่า *C. jejuni* (Padungtod and Kaneene, 2005)

การดื้อต่อยา ciprofloxacin และ nalidixic acid ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยทั้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรในอัตราส่วนที่สูงเกินกว่า 90% ค่อนข้างน่าสนใจและควรได้รับการเฝ้าระวัง เนื่องจากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของการดื้อต่อยาในกลุ่ม quinolones และ fluoroquinolones ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทย ในอดีตอัตราการดื้อต่อยา ciprofloxacin ของเชื้อ *Campylobacter* spp. จะพบไม่เกิน 90% (Boonmar et al., 2007; Padungtod et al., 2006) นอกจากผลการศึกษาวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม quinolones และ fluoroquinolones ในฟาร์มไก่เนื้อและไก่ไทย ถึงแม้ฟาร์มไก่หลายฟาร์มจะไม่ได้ใช้ยาในกลุ่ม fluoroquinolones เช่น enrofloxacin ในฝูงไก่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง แต่ถ้าฟาร์มเหล่านี้เคยมีการใช้ยาดังกล่าวในฟาร์ม ก็มีความเป็นไปได้ที่เชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม quinolones และ fluoroquinolones จะคงอยู่ในฟาร์ม ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในต่างประเทศที่พบว่าเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม quinolones และ fluoroquinolones สามารถคงอยู่ในสิ่งแวดล้อมภายในฟาร์มได้เป็นระยะเวลานาน แม้ฟาร์มเหล่านั้นจะหยุดการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มแล้วก็ตาม (Luangtongkum et al., 2006; Pedersen and Wedderkopp, 2003; Price et al., 2005) สาเหตุส่วนหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม quinolones และ fluoroquinolones ยังคงพบได้ในฟาร์ม อาจเนื่องมาจากการที่เชื้อนี้มีความสามารถในการดำรงชีวิตและเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดีกว่าเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่มีความไวรับต่อยาปฏิชีวนะ แม้แต่ในสภาพแวดล้อมที่ปราศจากปัจจัยโน้มนำ เช่น การปรากฏของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อมก็ตาม (Luo et al., 2005)

การดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่พบในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ค่อนข้างจะเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาที่ผ่านมาในอดีต (Luangtongkum et al., 2006; Luber et al., 2003) กล่าวคือ เชื้อ *Campylobacter* spp. ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากไก่จะมีความไวรับต่อยา erythromycin และ gentamicin โดยทั่วไปอัตราการดื้อต่อยา erythromycin และ gentamicin ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่จะอยู่ในช่วงไม่เกิน 10% และ 5% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการที่เชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพรมีอัตราการดื้อต่อยา erythromycin สูงถึงเกือบ 40% นั้น ส่วนหนึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากเชื้อ *C. coli* ซึ่งเป็นสายพันธุ์หลักของเชื้อ *Campylobacter* ที่พบในไก่กลุ่มนี้ เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าเชื้อ *C. coli* ไม่ว่าจะมีแหล่งที่มาจากไก่ ไก่งวง

หรือสุกร จะมีการดื้อต่อยาในกลุ่ม macrolides อาทิเช่น erythromycin ในอัตราส่วนที่สูงกว่า *C. jejuni* อย่างเห็นได้ชัด (Avrain et al., 2003; Luangtongkum et al., 2006; Saenz et al., 2000) เนื่องจากสายพันธุ์ของเชื้อ *Campylobacter* ที่พบในลำไส้ของไก่กลุ่มอื่นๆ โดยส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อ *C. jejuni* ดังนั้นจึงไม่น่าแปลกใจที่เชื้อเหล่านั้นจะมีอัตราการดื้อต่อยา erythromycin ต่ำกว่าเชื้อที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามหากพิจารณาถึงการดื้อต่อยาในกลุ่ม macrolides ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อไก่ คณะผู้วิจัยพบว่าอัตราการดื้อต่อยา erythromycin ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อไก่ไทยทั้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสมุนไพร ซึ่งประมาณ 40% ของเชื้อดังกล่าวจะเป็นเชื้อ *C. coli* กลับไม่สูงเหมือนกับอัตราการดื้อต่อยา erythromycin ของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างลำไส้ ผลการวิจัยดังกล่าวค่อนข้างน่าสนใจและควรทำการศึกษาเพิ่มเติมว่าทำไมเชื้อ *C. coli* ที่แยกได้จากเนื้อไก่ถึงมีอัตราการดื้อต่อยา erythromycin ต่ำกว่าเชื้อที่แยกได้จากลำไส้อย่างเห็นได้ชัด ถึงแม้อัตราการดื้อต่อยา tetracycline ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะสูงกว่าอัตราการดื้อต่อยา tetracycline ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่เคยมีการรายงานในประเทศไทยก่อนหน้านี้ (Boonmar et al., 2007) แต่อัตราการดื้อต่อยาดังกล่าวก็ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ปกติ ที่สามารถพบได้ในหลายๆ ประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส และไต้หวัน เป็นต้น (Avrain et al., 2003; Ge et al., 2003; Li et al., 1998; Luangtongkum et al., 2006)

การดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปของเชื้อ *Campylobacter* spp. เป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึง โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเชื้อเหล่านั้นมีการดื้อต่อยา ciprofloxacin และ erythromycin ไปพร้อมๆ กัน ทั้งนี้เนื่องจากยาทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าว เป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Campylobacter* spp. (Engberg et al., 2001) ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ การดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปจะพบในเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพรเป็นหลัก โดยเชื้อเหล่านี้จะดื้อต่อ ciprofloxacin/nalidixic acid erythromycin และ tetracycline เนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin และ erythromycin สามารถปนเปื้อนในเนื้อไก่ แล้วไปก่อให้เกิดโรคในผู้บริโภค ซึ่งจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อการรักษา ดังนั้นการลดการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่จึงมีความสำคัญ

จากข้อมูลความชุกและจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่พบในลำไส้ของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร แสดงให้เห็นว่าสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรที่ผสมในอาหารให้ไก่กินในขนาดที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (100 กรัม ของสารเสริมชีวนะที่มีเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นองค์ประกอบสำคัญ ต่ออาหาร 1 ตัน และ สมุนไพร อันประกอบไปด้วย ฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน และไพล จำนวน 1.8 กิโลกรัม ต่ออาหาร 1 ตัน) อาจไม่เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อหรือไม่มีประสิทธิภาพในการลด

จำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในทางเดินอาหารของไก่มากนัก อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรกับเชื้อที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อและไก่ไทยที่ไม่ได้รับสารดังกล่าว การใช้สารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ก็นับว่ามีความน่าสนใจไม่น้อย ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรจะมีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะบางตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปในอัตราส่วนที่ต่ำกว่าเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นหากจะมีการนำเอาสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อควบคุมหรือลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์ เช่น เชื้อ *Campylobacter* spp. ก็ควรมีการศึกษาถึงรูปแบบขนาด และวิธีการใช้สารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรดังกล่าวอย่างจริงจัง ทั้งนี้เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์และความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจสูงสุดต่อไปในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ดำเนินไปตามแผนงานที่วางไว้ โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึงความชุกและรูปแบบการต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร รวมทั้งทำการประเมินประสิทธิภาพของสารดังกล่าวในการควบคุมหรือลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในระดับฟาร์มเบื้องต้น จากการศึกษาซึ่งได้ดำเนินการเสร็จสมบูรณ์แล้วนั้น สามารถสรุปได้ว่า

1. ความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อและไก่ไทยมีความแตกต่างกัน โดยความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่พบในตัวอย่างลำไส้และเนื้อไก่ของไก่เนื้อจะต่ำกว่าของไก่ไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
2. ความชุกและจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสารเสริมชีวนะ จะไม่แตกต่างไปจากความชุกและจำนวนของเชื้อที่พบในไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะ ในทำนองเดียวกันความชุกและจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพร ก็ไม่แตกต่างไปจากความชุกและจำนวนของเชื้อที่พบในไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสมุนไพร
3. ไก่เนื้อจะพบเชื้อ *Campylobacter jejuni* เป็นหลัก ในขณะที่ไก่ไทยจะพบทั้งเชื้อ *Campylobacter jejuni* และ *Campylobacter coli*
4. โดยส่วนใหญ่ เชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยทั้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรจะดื้อต่อยาในกลุ่ม quinolones และ fluoroquinolones แต่จะมีความไวรับต่อยา gentamicin และ erythromycin ยกเว้นเชื้อที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพร จะพบว่าประมาณ 40% ของเชื้อดังกล่าวจะมีการดื้อต่อยา erythromycin ปรากฏให้เห็น สำหรับอัตราการดื้อต่อยา tetracycline นั้นจะแตกต่างกันไปในไก่แต่ละกลุ่ม
5. การดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปจะพบในเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั่วไปที่ไม่ได้ผสมสมุนไพรเป็นหลัก
6. สารเสริมชีวนะที่มีเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นองค์ประกอบสำคัญในขนาด 100 กรัม ต่ออาหาร 1 ตัน และสมุนไพรอันประกอบไปด้วยฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน และไพล ในขนาด 1.8 กิโลกรัม ต่ออาหาร 1 ตัน ที่ใช้เพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกายและเพื่อเสริมสร้างสุขภาพให้กับสัตว์จะไม่เพียงพอต่อการยับยั้งหรือลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในทางเดินอาหารของไก่ในระดับฟาร์ม

ข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงความชุกและรูปแบบการต้านยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร รวมศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสารเสริมชีวนะและสมุนไพรดังกล่าวในการควบคุมหรือลดจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในระดับฟาร์มเบื้องต้น ถึงแม้ผลการศึกษาวิจัยจะแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าไก่ไทยพบเชื้อ *Campylobacter* spp. มากกว่าไก่เนื้อ และเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อและไก่ไทยทั้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมและไม่ผสมสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพร จะมีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม fluoroquinolone ค่อนข้างสูง แต่เนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* spp. ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนที่ใช้ในการปรุงอาหารให้สุก ดังนั้นหากทำให้อาหารโดยเฉพาะเนื้อไก่สุกอย่างทั่วถึงก่อนการบริโภคก็จะช่วยลดความเสี่ยงของโรคอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากเชื้อ *Campylobacter* spp. และลดปัญหาที่จะเกิดจากเชื้อดื้อยาลงได้อย่างมาก นอกจากนี้เนื่องจากเชื้อที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ที่เก็บจากโรงเชือด จะมีเชื้อจำนวนไม่มากที่แยกได้จากเนื้อไก่ เป็นผลให้ผลการศึกษาวิจัยที่ได้อาจไม่สะท้อนถึงอันตรายของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่อาจเกิดขึ้นกับผู้บริโภคได้อย่างเต็มที่ ดังนั้นเพื่อให้ข้อมูลที่ได้สามารถสะท้อนให้เห็นถึงความสำคัญของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในฐานะของเชื้อแบคทีเรียหลักที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และเพื่อแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคในคนกับเชื้อที่พบในอาหารได้ดียิ่งขึ้น คณะผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นสำหรับงานวิจัยที่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต ดังนี้

1. เนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากเนื้อไก่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสารเสริมชีวนะนั้น จะมีจำนวนเชื้อที่นำมาทดสอบการต้านยาเพียงแค่ 7 ตัวอย่าง ถ้าหากเชื้อ 1 – 2 ตัว มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเกิดขึ้น ก็อาจส่งผลให้ภาพรวมของอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเสริมชีวนะสูงเกินกว่าความเป็นจริงได้ ดังนั้นเพื่อลดผลกระทบในลักษณะดังกล่าว จึงควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างของเชื้อที่จะนำมาทดสอบการต้านยาให้มากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจทำได้โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างของเนื้อไก่ในแต่ละกลุ่มที่จะทำการเก็บและนำมาเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* spp.
2. ข้อมูลที่ได้จะสมบูรณ์มากยิ่งขึ้นหากมีการศึกษาถึงลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของเชื้อที่ดื้อต่อยา fluoroquinolone หรือดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่มพร้อมกัน เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อเหล่านั้นเป็น clone เดียวกัน หรือมีความสัมพันธ์กันหรือไม่อย่างไร

3. เนื่องจากตัวอย่างลำไส้และตัวอย่างเนื้อไก่ที่ทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ไม่ได้มาจากไก่ฝูงเดียวกัน ทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อที่พบในลำไส้กับที่พบบนเนื้อไก่มีความสัมพันธ์กันอย่างไร และรูปแบบการดื้อยาที่เกิดขึ้นสอดคล้องกันหรือไม่ ดังนั้นหากมีการเก็บตัวอย่างเป็นลำดับขั้นของไก่ฝูงเดียวกันโดยเริ่มตั้งแต่ที่ฟาร์ม ต่อมายังโรงเชือด และสิ้นสุดที่เนื้อไก่ ข้อมูลที่ได้ก็ค่อนข้างน่าสนใจ เพราะอาจแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางพันธุกรรม จำนวน ความชุก ตลอดจนรูปแบบการดื้อยาของเชื้อที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่ได้
4. หากมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ *Campylobacter* spp. ในฟาร์ม และการปนเปื้อนของเชื้อในเนื้อไก่ ก็จะทำให้สามารถวางแนวทางในการจัดการเพื่อลดความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ได้อย่างถูกต้อง ซึ่งเท่ากับเป็นการลดอุบัติการณ์ของโรคอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากเชื้อ *Campylobacter* spp. อีกทางหนึ่งด้วย
5. การประเมินประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะและสมุนไพรในการควบคุมเชื้อ *Campylobacter* spp. ในระดับฟาร์มครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อต้องการทราบว่าสารเสริมชีวนะและสมุนไพรที่ใช้ผสมอาหารให้ไก่กินในขนาดที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน จะสามารถช่วยควบคุมหรือลดจำนวนของเชื้อดังกล่าวในทางเดินอาหารได้หรือไม่ การศึกษาจะอาศัยข้อมูลความชุกและจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่ที่ได้รับและไม่ได้รับสารดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากฟาร์มไก่แต่ละฟาร์มอาจมีการจัดการที่แตกต่างกันออกไป ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของความหนาแน่นของการเลี้ยง หรือระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ อาจส่งผลกระทบโดยตรงต่อความชุกและจำนวนของเชื้อที่พบได้ ดังนั้นการประเมินประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะและสมุนไพรในการควบคุมเชื้อ *Campylobacter* spp. ในระดับฟาร์มครั้งนี้ จึงเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น หากต้องการทราบถึงประสิทธิภาพของสารดังกล่าวอย่างเป็นทางการ ก็จำเป็นที่จะต้องควบคุมปัจจัยภายนอกอื่นๆ ไม่ให้มีผลกระทบต่อตัวแปรที่ต้องการศึกษา และถ้าสามารถทำได้ก็ควรออกแบบการทดลองโดยให้กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีความใกล้เคียงกันมากที่สุด นอกจากนี้หากจะมีการนำเอาสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์อย่างจริงจัง ก็ควรศึกษาถึงรูปแบบ ขนาด และวิธีการใช้สารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรเหล่านั้นในระดับฟาร์ม ตลอดจนความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ ความปลอดภัย และผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการนำสารเสริมชีวนะหรือสมุนไพรมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ควบคู่ไปด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Allos, B.M., 2001, *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis 32, 1201-1206.
2. Altekruse, S.F., Tollefson, L.K., 2003, Human campylobacteriosis: a challenge for the veterinary profession. J Am Vet Med Assoc 223, 445-452.
3. Avrain, L., Humbert, F., L'Hospitalier, R., Sanders, P., Vernozy-Rozand, C., Kempf, I., 2003, Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use. Vet Microbiol 96, 267-276.
4. Blaser, M.J., 1997, Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. J Infect Dis 176 Suppl 2, S103-105.
5. Bodhidatta, L., Vithayasai, N., Eimpokalarp, B., Pitarangsi, C., Serichantalergs, O., Isenbarger, D.W., 2002, Bacterial enteric pathogens in children with acute dysentery in Thailand: increasing importance of quinolone-resistant *Campylobacter*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 33, 752-757.
6. Boonmar, S., Morita, Y., Fujita, M., Sangsuk, L., Suthivarakom, K., Padungtod, P., Maruyama, S., Kabeya, H., Kato, M., Kozawa, K., Yamamoto, S., Kimura, H., 2007, Serotypes, antimicrobial susceptibility, and *gyr A* gene mutation of *Campylobacter jejuni* isolates from humans and chickens in Thailand. Microbiol Immunol 51, 531-537.
7. Butzler, J.P., 2004, *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect 10, 868-876.
8. Buzby, J.C., Roberts, T., 1997, Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. World Health Stat Q 50, 57-66.
9. Chang, M.H., Chen, T.C., 2000, Reduction of *Campylobacter jejuni* in a simulated chicken digestive tract by Lactobacilli cultures. J Food Prot 63, 1594-1597.
10. CLSI, 2008, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
11. Endtz, H.P., Ruijs, G.J., van Klingeren, B., Jansen, W.H., van der Reyden, T., Mouton, R.P., 1991, Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. J Antimicrob Chemother 27, 199-208.

12. Engberg, J., Aarestrup, F.M., Taylor, D.E., Gerner-Smidt, P., Nachamkin, I., 2001, Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. Emerg Infect Dis 7, 24-34.
13. Evans, S.J., Sayers, A.R., 2000, A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. Prev Vet Med 46, 209-223.
14. Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., 1998, *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*, *In*: Diagnostic Microbiology. Mosby, St. Louis, pp. 569-576.
15. Ge, B., White, D.G., McDermott, P.F., Girard, W., Zhao, S., Hubert, S., Meng, J., 2003, Antimicrobial-resistant *Campylobacter* species from retail raw meats. Appl Environ Microbiol 69, 3005-3007.
16. Heuer, O.E., Pedersen, K., Andersen, J.S., Madsen, M., 2001, Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. Lett Appl Microbiol 33, 269-274.
17. Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M., 2007, Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol 117, 237-257.
18. Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D.R., Bolton, F.J., Frost, J.A., Ward, L., Humphrey, T.J., 2002, Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. Int J Food Microbiol 76, 151-164.
19. Li, C.C., Chiu, C.H., Wu, J.L., Huang, Y.C., Lin, T.Y., 1998, Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *coli* by using E-test in Taiwan. Scand J Infect Dis 30, 39-42.
20. Lin, J., 2009, Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. Foodborne Pathog Dis 6, 755-765.
21. Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C.M., Zhang, Q., 2009, Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. Future Microbiol 4, 189-200.
22. Luangtongkum, T., Morishita, T.Y., Ison, A.J., Huang, S., McDermott, P.F., Zhang, Q., 2006, Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. Appl Environ Microbiol 72, 3600-3607.
23. Luo, N., Pereira, S., Sahin, O., Lin, J., Huang, S., Michel, L., Zhang, Q., 2005, Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. Proc Natl Acad Sci US A 102, 541-546.

24. Moore, J.E., Corcoran, D., Dooley, J.S., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D.A., Megraud, F., Millar, B.C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J.R., Rooney, P.J., Sails, A., Whyte, P., 2005, *Campylobacter*. Vet Res 36, 351-382.

25. Moran, L., Kelly, C., Madden, R.H., 2009, Factors affecting the recovery of *Campylobacter* spp. from retail packs of raw, fresh chicken using ISO 10272-1:2006. Lett Appl Microbiol 48, 628-632.

26. Morishita, T.Y., Aye, P.P., Harr, B.S., Cobb, C.W., Clifford, J.R., 1997, Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. Avian Dis 41, 850-855.

27. Newell, D.G., Fearnley, C., 2003, Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. Appl Environ Microbiol 69, 4343-4351.

28. Northcutt, J.K., Berrang, M.E., Dickens, J.A., Fletcher, D.L., Cox, N.A., 2003, Effect of broiler age, feed withdrawal, and transportation on levels of coliforms, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* on carcasses before and after immersion chilling. Poult Sci 82, 169-173.

29. Padungtod, P., Kaneene, J.B., 2005, *Campylobacter* in food animals and humans in northern Thailand. J Food Prot 68, 2519-2526.

30. Padungtod, P., Kaneene, J.B., Hanson, R., Morita, Y., Boonmar, S., 2006, Antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food animals and humans in northern Thailand. FEMS Immunol Med Microbiol 47, 217-225.

31. Padungton, P., Kaneene, J.B., 2003, *Campylobacter* spp in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. J Vet Med Sci 65, 161-170.

32. Pedersen, K., Wedderkopp, A., 2003, Resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish broilers at farm level. J Appl Microbiol 94, 111-119.

33. Perko-Makela, P., Hakkinen, M., Honkanen-Buzalski, T., Hanninen, M.L., 2002, Prevalence of campylobacters in chicken flocks during the summer of 1999 in Finland. Epidemiol Infect 129, 187-192.

34. Prats, G., Mirelis, B., Llovet, T., Munoz, C., Miro, E., Navarro, F., 2000, Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. Antimicrob Agents Chemother 44, 1140-1145.

35. Price, L.B., Johnson, E., Vailes, R., Silbergeld, E., 2005, Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* isolates from conventional and antibiotic-free chicken products. Environ Health Perspect 113, 557-560.

36. Refregier-Petton, J., Rose, N., Denis, M., Salvat, G., 2001, Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Prev Vet Med 50, 89-100.

37. Rosenquist, H., Nielsen, N.L., Sommer, H.M., Norrung, B., Christensen, B.B., 2003, Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. Int J Food Microbiol 83, 87-103.

38. Ruiz-Palacios, G.M., 2007, The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. Clin Infect Dis 44, 701-703.

39. Saenz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., Gastanares, M.J., Baquero, F., Torres, C., 2000, Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. Antimicrob Agents Chemother 44, 267-271.

40. Shane, S.M., 2000, *Campylobacter* infection of commercial poultry. Rev Sci Tech 19, 376-395.

41. Shane, S.M., Montrose, M.S., 1985, The occurrence and significance of *Campylobacter jejuni* in man and animals. Vet Res Commun 9, 167-198.

42. Sheppard, S.K., Dallas, J.F., Strachan, N.J., MacRae, M., McCarthy, N.D., Wilson, D.J., Gormley, F.J., Falush, D., Ogden, I.D., Maiden, M.C., Forbes, K.J., 2009, *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. Clin Infect Dis 48, 1072-1078.

43. Stern, N.J., Fedorka-Cray, P., Bailey, J.S., Cox, N.A., Craven, S.E., Hiett, K.L., Musgrove, M.T., Ladely, S., Cosby, D., Mead, G.C., 2001, Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operations. J Food Prot 64, 1705-1710.

44. Stern, N.J., Meinersmann, R.J., Cox, N.A., Bailey, J.S., Blankenship, L.C., 1990, Influence of host lineage on cecal colonization by *Campylobacter jejuni* in chickens. Avian Dis 34, 602-606.

45. Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Seal, B.S., 2006, Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. Antimicrob Agents Chemother 50, 3111-3116.

46. Suzuki, H., Yamamoto, S., 2009, *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in the world: a literature survey. J Vet Med Sci 71, 255-261.

47. Vindigni, S.M., Srijan, A., Wongstitwilairoong, B., Marcus, R., Meek, J., Riley, P.L., Mason, C., 2007, Prevalence of foodborne microorganisms in retail foods in Thailand. Foodborne Pathog Dis 4, 208-215.

48. Wagenaar, J.A., Mevius, D.J., Havelaar, A.H., 2006, *Campylobacter* in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. Rev Sci Tech 25, 581-594.

49. Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L., Rodgers, F.G., 2002, Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. J Clin Microbiol 40, 4744-4747.

50. Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., Thubthimthed, S., 2005, Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. Fitoterapia 76, 233-236.

51. Wedderkopp, A., Gradel, K.O., Jorgensen, J.C., Madsen, M., 2001, Pre-harvest surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* in Danish broiler flocks: a 2-year study. Int J Food Microbiol 68, 53-59.

52. Willis, W.L., Reid, L., 2008, Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. Poult Sci 87, 606-611.

53. Zhao, C., Ge, B., De Villena, J., Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D., Meng, J., 2001, Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. Appl Environ Microbiol 67, 5431-5436.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 วิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Campylobacter* spp.

Catalase test

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ให้กลายเป็นน้ำ (H_2O) และออกซิเจน (O_2) การทดสอบสามารถทำได้โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะเชื้อแบคทีเรียลงบนสไลด์แก้วที่สะอาด โดยระวังอย่าให้อาหารเลี้ยงเชื้อติดมาด้วย โดยเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงปน เนื่องจากอาจให้ผลการทดสอบเป็นบวกลวง (false positive results) หลังจากนั้นหยดสารละลาย 3% H_2O_2 ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ แล้วทำการอ่านผลการทดสอบ หากเกิดฟองอากาศขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากที่โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสัมผัสกับสารละลาย แสดงว่า ผลการทดสอบเป็นบวก แต่หากไม่เกิดฟองอากาศหรือเกิดฟองอากาศขึ้นเพียงเล็กน้อย แสดงว่า ผลการทดสอบเป็นลบ

หมายเหตุ การอ่านผลการทดสอบบนพื้นหลังสีดำจะช่วยให้เห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

Oxidase test

การทดสอบนี้เป็นการตรวจหาเอนไซม์ cytochrome oxidase ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอน และ กระบวนการ nitrate metabolic pathways ของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด การทดสอบสามารถทำได้โดยการใช้สารละลาย 1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (Kovac's oxidase reagent) หยดลงไปบนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง หรืออาจนำโคโลนีของเชื้อมาป้ายลงบนกระดาษกรองที่ชุ่มไปด้วยสารละลายดังกล่าว หากพบว่ามีสีม่วงเข้มเกิดขึ้นเมื่อสารละลายสัมผัสกับเชื้อภายในระยะเวลาไม่เกิน 10 วินาที แสดงว่า การทดสอบให้ผลเป็นบวก

หมายเหตุ การใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่มีธาตุเหล็กประกอบอยู่อาจทำให้เกิดผลบวกลวง (false positive results) ขึ้นได้ ดังนั้นจึงควรใช้อุปกรณ์เขี่ยเชื้อที่ทำมาจากพลาตินัม แก้ว หรือไม้ในการทดสอบ

Hippurate hydrolysis

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบหาเอนไซม์ hippuricase ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายสาร hippurate ให้กลายเป็นกรดเบนโซอิก (benzoic acid) และกรดอะมิโน glycine เมื่อกรดอะมิโน glycine ที่ได้จากกระบวนการออกซิเดชั่น ทำปฏิกิริยากับสารเคมี ninhydrin ก็จะทำให้เกิดสีม่วงเข้มเกิดขึ้น การทดสอบสามารถทำได้โดยการใส่เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงในสารละลาย 1% sodium hippurate แล้วทำการเพาะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย ninhydrin ลงไปและเพาะบ่มเชื้อต่ออีก 10 นาที หากมีสีม่วงเข้มเกิดขึ้น แสดงว่า การทดสอบให้ผลเป็นบวก

ภาคผนวก 2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Campylobacter* สายพันธุ์ต่างๆ

Genus and species	Growth at 25°C	Growth at 42°C	Hippurate hydrolysis	Catalase	H_2S in TSI agar	Indoxyl acetate hydrolysis	Nitrate to nitrite	Susceptible to 30 µg disk	
								Cephalothin	Nalidixic acid
C. jejuni	-	+	+	+	-	+	+	-	+
C. coli	-	+	-	+	-	+	+	-	+
C. lari	-	+	-	+	-	-	+	-	-
C. upsaliensis	-	+	+	-/weak+	-	+	+	+	+

ที่มา: Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., 1998, *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*, *In*: Diagnostic Microbiology. Mosby, St. Louis, pp. 569-576. (Forbes et al., 1998)

ภาคผนวก 3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. *Campylobacter* blood-free selective medium (modified CCDA)

Nutrient Broth No.2	25.0 g/l
Bacteriological charcoal	4.0 g/l
Casein hydrolysate	3.0 g/l
Sodium desoxycholate	1.0 g/l
Ferrous sulphate	0.25 g/l
Sodium pyruvate	0.25 g/l
Agar	12.0 g/l

2. CCDA selective supplement

Cefoperazone	32.0 mg/l
Amphotericin B	10.0 mg/l

3. Bolton broth

Meat peptone	10.0 g/l
Lactalbumin hydrolysate	5.0 g/l
Yeast extract	5.0 g/l
Sodium chloride	5.0 g/l
Alpha-ketoglutaric acid	1.0 g/l
Sodium pyruvate	0.5 g/l
Sodium metabisulphite	0.5 g/l
Sodium carbonate	0.6 g/l
Haemin	0.01 g/l

4. Bolton broth selective supplement

Cefoperazone	20.0 mg/l
Vancomycin	20.0 mg/l
Trimethoprim	20.0 mg/l
Amphotericin B	10.0 mg/l
Lysed horse blood	50 ml

5. Buffered peptone water

Peptone	10.0 g/l
Sodium chloride	5.0 g/l
Disodium phosphate	3.5 g/l
Monopotassium phosphate	1.5 g/l

6. Mueller Hinton broth

Beef extract powder	2.0 g/l
Acid digest of casein	17.5 g/l
Soluble starch	1.5 g/l

7. Blood agar base NO.2

Proteose peptone	15.0 g/l
Liver digest	2.5 g/l
Yeast extract	5.0 g/l
Sodium chloride	5.0 g/l
Agar	12.0 g/l

8. Catalse test reagent (formulation per liter)

Deionized water	900.0 ml
Hydrogen peroxide, 30%, stable	100.0 ml

9. Oxidase test reagent (formulation per 100 ml)

N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	0.60 g
Stabilizing agent	0.02 g
Dimethly sulfoxide (DMSO)	100.0 ml

10. Hippurate hydrolysis test reagent

Sodium hippurate broth (approximate formula per liter purified water):

Heart muscle, infusion from (solids)	10.0 g
Peptic digest of animal tissue	10.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Sodium hippurate	10.0 g

Ninhydrin solution (formulation per 100 ml):

Ninhydrin	3.5 g
Acetone	50.0 ml
Butanol	50.0 ml

ภาคผนวก 4 เกณฑ์ที่ใช้บ่งชี้การดื้อยาของเชื้อ *Campylobacter* spp. ต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ

CLSI Subclass	Antimicrobial Agent	Antimicrobial Concentration Range (µg/ml) 1998-2004	Breakpoints (µg/ml) E-test (1998-2004)			Antimicrobial concentration Range (µg/ml) 2005-2009	Breakpoints (µg/ml) Microbroth dilution (2005-2009)		
			S	I	R		S	I	R
Aminoglycosides	Gentamicin	0.016-256	≤ 4	8	≥ 16	0.12-32	≤ 2	4	≥ 8
Lincosamides	Clindamycin	0.016-256	≤ 0.5	1-2	≥ 4	0.03-16	≤ 2	4	≥ 8
Macrolides	Azithromycin	0.016-256	≤ 0.25	0.5-1	≥ 2	0.015-64	≤ 2	4	≥ 8
	Erythromycin	0.016-256	≤ 0.5	1-4	≥ 8	0.03-64	≤ 8	16	≥ 32
Ketolides	Telithromycin	NT	NT	NT	NT	0.015-8	≤ 4	8	≥ 16
Phenicols	Florfenicol	NT	NT	NT	NT	0.03-64	≤ 4	N/A	N/A
	Chloramphenicol	0.016-256	≤ 8	16	≥ 32	NT	NT	NT	NT
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	0.002-32	≤ 1	2	≥ 4	0.015-64	≤ 1	2	≥ 4
Quinolones	Nalidixic acid	0.016-256	≤ 16	N/A	≥ 32	4-64	≤ 16	32	≥ 64
Tetracyclines	Tetracycline	0.016-256	≤ 4	8	≥ 16	0.06-64	≤ 4	8	≥ 16

Breakpoints Used for Susceptibility Testing of *Campylobacter*. Breakpoints established by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) were used when available. CLSI breakpoints are available only for erythromycin, ciprofloxacin, and tetracycline.

N/A - Not applicable; NT - Not tested