รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การใช้ competitive exclusion (CE) ในการป้องกันการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในสัตว์ปีก

Application of competitive exclusion (CE) for prevention of avian campylobacter infection

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

รศ.น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย

รศ.สพ.ญ.ดร.รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

รศ.สพ.ญ.ดร.ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย

ภาควิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข และภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

39 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

แหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัย

งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กันยายน 2557

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอบขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สัญญาเลขที่ GAB_APS_๒๙_๕๖_๓๑_๐๒ ในการสนับสนุนทุนวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ ทศพล ธำรงสุวรรณกิจ ที่ช่วยเหลือในการทำวิจัย และการจัดทำต้นฉบับ และบุคลากรภาควิชาอายุรศาสตร์ สัตวแพทยสาธารณสุข และเภสัชวิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างทำวิจัย

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* จากมูลไก่จำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้อที่มีความไวรับต่อยาต้านจุลชีพตามมาตรฐานของ European Food Safety Authority และให้ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนกรดและน้ำดี อยู่ในเกณฑ์ดี เพื่อนำเชื้อดังกล่าวมาใช้เป็น competitive exclusion (CE) เพื่อทดสอบการป้องกันการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในไก่เนื้อ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติผ่านการคัดเลือก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* 1/4, *Bacillus subtilis* 206/1 และ *Enterococcus faecium* 122 เมื่อนำ CE ทั้ง 3 ชนิดป้อนปากให้ไก่เนื้อในช่วง 3 วันแรกติดต่อกัน ปริมาตรตัวละ 0.5 มิลลิลิตร ทำการป้อนเชื้อ *Campylobacter jejuni* ความเข้มข้น 2×10^7 CFU/ml ให้แก่ไก่เนื้อที่อายุ 14 วัน ผลปรากฏว่าปริมาณเชื้อ *C. jejuni* ที่แยกได้จากไก่เนื้อที่อายุ 17, 21, 35 และ 41 วัน ในทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า FCR ที่อายุ 14 และ 41 วัน และค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อจำนวนไก่ ที่อายุ 41 วัน ในทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ABSTRACT

The aim of this study was to screen bacteria in the group of *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. and *Enterococcus faecium* from 60 chicken feces bringing them to test antimicrobial susceptibilities which were used guidelines from European Food Safety Authority, acid and bile tolerances in the laboratory. The good qualified bacteria including *Lactobacillus acidophilus* 1/4, *Bacillus subtilis* 206/1 and *Enterococcus faecium* 122 were used as competitive exclusion for testing prevention of campylobacter infection in broilers. Broilers were orally inoculated with CE for 1-3 days of age consecutively, 0.5 ml in each. At 14 days of ages, broilers were challenged with *Campylobacter jejuni*, 2 x 10^7 CFU/ml. The concentration of *C. jejuni* from all groups was not statistically different at 17, 21, 35 and 41 days. Fed conversion ratio at 14 and 41 days and body weight gain/chicken at 41 days were not statistically different also.

สารบัญเรื่อง

บทนำ 2

วัตถุประสงค์การวิจัย 4

วิธีการดำเนินการ 4

แยกเชื้อที่มีคุณสมบัติ Generally recognized as safe (GRAS) ได้แก่*Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* จากมูลไก่ 5

ตรวจสอบความปลอดภัยของเชื้อตามคำแนะนำของ EFSA 15

ทดสอบคุณสมบัติการทนกรด และการทนน้ำดีของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก 17

ตรวจสอบยืนยัน species ของเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา 19

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อการป้องกันการติดเชื้อ *Campylobacter jejuni* ในไก่เนื้อ 20

ผลการวิจัย 23

การอภิปรายผลการวิจัย 36

ภาคผนวก 39

เอกสารอ้างอิง 41

ประวัติคณะผู้วิจัย 43

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตารางที่1ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus*แต่ละ species 6
ตารางที่ 2 ผล catalase และ oxidase test ของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus*, *Bacillus*และ *Enterococcus*spp. 7
ตารางที่ 3 primers ที่ใช้ในการพิสูจน์เชื้อ *Lactobacillus* 10
ตารางที่ 4 primers ที่ใช้ในการพิสูจน์เชื้อ *Bacillus* 11
ตารางที่ 5 primers ที่ใช้ในการพิสูจน์เชื้อ*Enterococcus* 14
ตารางที่ 6 ค่า Breakpoints (µg/ml) ของยาต้านจุลชีพทั้ง10 ชนิด 16
ตารางที่ 7 ชนิดของ CE หรือผลิตภัณฑ์ สำหรับไก่เนื้อแต่ละกลุ่ม 21
ตารางที่ 8 จำนวนสเตรนทั้งหมดของ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* ที่แยกได้ 23
ตารางที่ 9 จำนวนสเตรนที่มีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับค่า breakpointsที่กำหนดไว้ของ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* 24
ตารางที่ 10 ค่า MIC ของ *Lactobacillus* spp., ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 27 สเตรน 25
ตารางที่ 11 ค่า MIC ของ *Bacillus* spp., ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 15 สเตรน 27
ตารางที่ 12 ค่า MIC ของ *Enterococcus faecium*ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 9 สเตรน 28
ตารางที่ 13 อัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบในสภาวะกรด pH 2.5 29
ตารางที่ 14 อัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบในสภาวะที่เติม oxgall bile 0.3% 31
ตารางที่ 15 ปริมาณเชื้อ*C. jejuni*ที่ตรวจพบจากตัวอย่างมูลไก่และไส้ตัน 34
ตารางที่ 16 ค่า FCR และ Body weight gain 35

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

CE = competitive exclusion

EU = European Union

EFSA = European Food Safety Authority

SCAN = the Scientific Committee on Animal Nutrition

GRAS = Generally recognized as safe

bp = base pairs

μl = microlitre

μg = microgram

ml = milliliter

^{o}C = degree celcius

MIC = minimum inhibitory concentration

CFU = colony-forming units

FCR = feed conversion ratio

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การใช้ competitive exclusion (CE) ในการป้องกันการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในสัตว์ปีก

(ภาษาอังกฤษ) Application of competitive exclusion (CE) for prevention of avian campylobacter infection

ผู้รับผิดชอบโครงการ

1. รศ.น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย หัวหน้าโครงการวิจัย

   (Assoc. Prof. Dr. Niwat Chansiripornchai) email: cniwat@chula.ac.th

2. รศ.สพ.ญ.ดร.รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
   (Assoc. Prof. Dr. Rungtip Chuanchueun) email: rchuanchuen@yahoo.com

3. รศ.สพ.ญ.ดร.ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย

   (Assoc. Prof. Dr. Piyarat Chansiripornchai) email: spiyarat@hotmail.com

   ภาควิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข และ ภาควิชาเภสัชวิทยา

   คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   39 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02 218 9412 โทรสาร 02 252 9575

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่สามารถผลิตเนื้อไก่และไข่ไก่จำนวนมากเกินความต้องการของผู้บริโภคภายในประเทศ ส่งผลให้สามารถส่งออกผลิตภัณฑ์เหล่านี้ไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้ โดยใน พ.ศ.2552 ประเทศไทยสามารถส่งออกสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกไปจำหน่ายต่างประเทศมีมูลค่าสูงถึง 54,000 ล้านบาท(กรมปศุสัตว์, 2554)ดังนั้นอุตสาหกรรมการผลิตเนื้อไก่และไข่ไก่จึงถือเป็นอุตสาหกรรมสำคัญที่สามารถหล่อเลี้ยงชีวิตและครอบครัวของเกษตรกรไทย ซึ่งเป็นคนส่วนใหญ่ของประเทศ โดย พ.ศ.2553 มีเกษตรกรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสัตว์ปีก รวม 2,979,763 ครัวเรือน(กรมปศุสัตว์, 2554)อย่างไรก็ตามด้วยข้อกำหนดขององค์กรการค้าโลกทำให้ประเทศต่างๆ โดยเฉพาะประเทศพัฒนาแล้ว ซึ่งเป็นคู่ค้าสำคัญในการนำเข้าสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก ไม่สามารถใช้พิกัดอัตราภาษีในการกีดกันการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศที่มีต้นทุนต่ำกว่าและอาจมีคุณภาพสินค้าที่ดีกว่าเข้ามาในประเทศของตน เพื่อประโยชน์ในการปกป้องผู้ผลิตภายในประเทศได้ ดังนั้นประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตรจึงอาศัยข้ออ้างในเรื่องคุณภาพสินค้า เพื่อเป็นการกีดกันทางการค้าโดยทางอ้อม ปัญหาโรคติดเชื้อที่เกิดขึ้นในกระบวนการเลี้ยงและการผลิตเนื้อไก่และไข่ไก่ ถือเป็นข้ออ้างสำคัญในการปฏิเสธไม่รับซื้อสินค้าของประเทศผู้นำเข้า โดยเฉพาะโรคที่สามารถติดต่อจากสัตว์ปีกมายังมนุษย์ได้ เช่น โรคไข้หวัดนก โรคติดเชื้อซัลโมเนลลา โรคติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ และโรคติดเชื้อลิสทีเรีย เป็นต้น โรคไข้หวัดนก และโรคติดเชื้อซัลโมเนลลา เป็นโรคติดเชื้อที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางและเพียงพอที่จะสามารถนำความรู้จากงานวิจัยต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและควบคุมโรค แต่โรคติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ และโรคติดเชื้อลิสทีเรีย เป็นโรคที่ยังต้องการศึกษาวิจัยอีกมาก โดยเฉพาะโรคติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เป็นโรคที่มีอุบัติการณ์ของโรคในมนุษย์ที่อาศัยในประเทศพัฒนาเพิ่มขึ้นทุกปี โดยในสหภาพยุโรป พ.ศ. 2542 และ พ.ศ. 2547 พบอุบัติการณ์ในมนุษย์ที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบจากแคมไพโลแบคเตอร์ จำนวน120,462 คน และ183,961 คน ตามลำดับและอุบัติการณ์โดยรวม คือ47.6 ต่อประชากร 100,000 คน ซึ่งสูงกว่าอุบัติการณ์ลำไส้อักเสบจากเชื้อซัลโมเนลลา(EFSA, 2006)ในประเทศสหรัฐอเมริกา *Campylobacter* enteritis เป็นสาเหตุของโรคลำไส้อักเสบในผู้ป่วยประมาณ 2 ล้านคนต่อปี ซึ่งมากกว่าจำนวนผู้ป่วยที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อซัลโมเนลลา และชิกเจลลา (*Shigella*) รวมกัน (Tauxe et al., 1988; Tauxe, 1997)

สัตว์ปีกเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญที่สุดของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ โดยเฉพาะ *Campylobacter jejuni* เป็นสปีชีส์ที่พบได้บ่อยในสัตว์ปีก แบคทีเรียชนิดนี้ไม่ก่ออาการทางคลินิกในไก่ (Shane, 2000) ส่งผลให้เกิดการละเลยในมาตรการป้องกันโรคในสัตว์ปีก โดยมีรายงานว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์มีสาเหตุจากการบริโภคเนื้อสัตว์ และร้อยละ 80 ของเคสเหล่านี้มีสาเหตุมา

จากเนื้อสัตว์ปีก(ICGFI, 1999)โดยแคมไพโลแบคเตอร์ที่มักพบเป็นสาเหตุของโรคลำไส้อักเสบจากแคมไพโลแบคเตอร์ คือ C*ampylobacter jejuni* ในประเทศไทยมีรายงานความชุกของ*C.jejuni* ในฝูงไก่เนื้อถึงร้อยละ 65 (Chansiripornchai and Sasipreeyajan, 2009) ใน พ.ศ. 2536 มีรายงานการศึกษาอุบัติการณ์ของโรคลำไส้อักเสบจากแคมไพโลแบคเตอร์ในผู้ป่วยในประเทศไทย โดยทำการศึกษาในเด็กที่อายุต่ำกว่า 5 ปี จำนวน 416 คน พบว่ามีสาเหตุจากการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ 61 คน หรือร้อยละ 15 (Taylor et al., 1993)โรคติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์เป็นโรคติดต่อระหว่างคนและสัตว์ที่สำคัญ มนุษย์ที่ติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ จะแสดงอาการอักเสบของกระเพาะและลำไส้อย่างเฉียบพลัน แม้การปนเปื้อนเชื้อเพียงเล็กน้อย (300-500 เซลล์) และยังทำให้เกิดอาการneuromuscular paralysis (Guillain Barré syndrome) ตามมา(Mishu and Blaser, 1993) แคมไพโลแบคเตอร์เป็นแบคทีเรียที่คาดหมายว่าเมื่อประเทศสมาชิกในสหภาพยุโรป ประสบความสำเร็จในการควบคุมแคมไพโลแบคเตอร์ในสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกได้แล้ว เชื้อนี้จะได้รับการจัดอยู่ในรายชื่อของเชื้อที่ต้องทำการตรวจสอบอย่างเข้มข้นก่อนนำเข้าผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกสู่กลุ่มประเทศยุโรป เช่นเดียวกับ ซัลโมเนลลา และไวรัสไข้หวัดนกดังนั้นการศึกษาวิธีการในการป้องกันและควบคุมโรคแคมไพโลแบคเตอร์ในไก่ในประเทศไทย ถือเป็นการเตรียมตัวล่วงหน้า ในการผลิตไก่ในประเทศไทย และเป็นการป้องกันการกีดกันทางการค้าจากประเทศผู้นำเข้าเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์ไก่ที่อาจมีขึ้น

นอกจากปัญหาการก่อโรคในมนุษย์แล้ว พบว่าการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในสัตว์ปีกนั้นมีความสัมพันธ์กับการปรากฏของแบคทีเรียต้านยาปฏิชีวนะในผู้ป่วย ดังนั้นการลดอัตราการแพร่กระจายเชื้อและการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในฝูงไก่พันธุ์และไก่เนื้อจะสามารถช่วยลดโอกาสการติดเชื้อในผู้บริโภคได้ ซึ่งก่อให้เกิดผลดีทั้งด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจ แต่อุปสรรคสำคัญของการแก้ปัญหาคือข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในกระบวนการผลิตสัตว์ปีกในประเทศไทยอยู่ในวงจำกัดมาก โดยเฉพาะยังไม่ทราบระบาดวิทยา จุดวิกฤตหรือจุดเสี่ยงที่เป็นแหล่งสะสม และการแพร่เชื้อเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในกระบวนการผลิตสัตว์ปีก ซึ่งการควบคุมโรคนี้ยังต้องการความรู้อย่างมากในเรื่องระบาดวิทยา การติดเชื้อ กระบวนการเกิดโรคในสัตว์ปีก เพื่อพัฒนากลไกที่เหมาะสมในการป้องกันโรค ซึ่งเป็นสิ่งที่ท้าทายอย่างมากต่อนักวิชาการโรคสัตว์ปีก และประการสำคัญเป็นการเตรียมข้อมูลให้พร้อมก่อนที่แคมไพโลแบคเตอร์ อาจประกาศให้เป็นจุลชีพก่อโรคที่ต้องทำการตรวจสอบอย่างเข้มข้นในการนำเข้าสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกของประเทศคู่ค้า

การหามาตรการช่วยลดการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในไก่ สามารถทำได้โดยการให้แบคทีเรียไม่ก่อโรคเพื่อแข่งขันในทางเดินอาหารของไก่ก่อนที่จะมีการติดเชื้อ *Campylobacter* (competitive exclusion) ซึ่งสอดคล้องกับนโยบายของทั้งสหภาพยุโรป และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาที่

ประกาศห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในการเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ในสหภาพยุโรปแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์อยู่ภายใต้การควบคุมอย่างเข้มงวดของ Regulation 1831/2003 EU ตามแนวทางการทดสอบที่เสนอโดย the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) (Becquet, 2003)ซึ่งเน้นการทดสอบความปลอดภัยต่อสัตว์มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม โดยประเด็นหลักอยู่ที่การตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดได้ (SCAN, 2003) การใช้แบคทีเรียที่ไม่ได้ผ่านการตรวจสอบอย่างรอบคอบโดยเฉพาะการถ่ายทอดยีนดื้อยา อาจกลายเป็นดาบสองคมที่สร้างปัญหาการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้ไม่แตกต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะ และที่ผ่านมาในประเทศไทยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียเพื่อใช้เป็น CE กันอย่างกว้างขวาง แต่ยังไม่มีการทดสอบอย่างจริงจังและถูกต้องทั้งสายพันธุ์ ความปลอดภัยและประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. พัฒนาผลิตภัณฑ์ CE เพื่อใช้ในการป้องกันการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในไก่เนื้อ
2. ศึกษาประสิทธิภาพของ CE ในการป้องกันการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในไก่เนื้อ

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย มี 5ระยะ ประกอบด้วย

ระยะที่ 1 แยกเชื้อที่มีคุณสมบัติ Generally recognized as safe (GRAS)ได้แก่*Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* จากมูลไก่

ระยะที่ 2 ตรวจสอบความปลอดภัยของเชื้อตามคำแนะนำของ EFSA

ระยะที่ 3 ทดสอบคุณสมบัติการทนกรด และการทนน้ำดีของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก

ระยะที่ 4 ตรวจสอบยืนยัน species ของเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

ระยะที่ 5 ทดสอบประสิทธิภาพของCE ต่อการป้องกันการติดเชื้อ *Campylobacter jejuni*ในไก่เนื้อ

ระยะที่ 1 แยกเชื้อที่มีคุณสมบัติ Generally recognized as safe (GRAS) ได้แก่*Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* จากมูลไก่

ดำเนินการเก็บตัวอย่างมูลไก่ จากฟาร์มไก่พื้นเมือง จำนวน 4 ฟาร์ม และฟาร์มไก่ไข่จำนวน 1 ฟาร์ม ที่ไม่มีประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างละ 10, 10, 10, 10 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ และขนส่งตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* ในห้องปฏิบัติการต่อไป

การแยกเชื้อ *Lactobacillus*

แยกเชื้อ *Lactobacillus*โดยใช้วิธี pour plate method ตามวิธีมาตรฐาน Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the Enumeration of mesophilic Lactic acid bacteria(ISO-15214, 1998)โดยนำตัวอย่างมูลไก่น้ำหนัก 1 กรัม มาละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วไปเปตตัวอย่างปริมาตร1 มิลลิลิตร ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะชนิด de Mans Rogosa and Sharpe Agar (MRS) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างมูลไก่ ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แล้วนำไปอบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C นาน 24-48 ชั่วโมง

การแยกเชื้อ *Bacillus*

แยกเชื้อ *Bacillus* โดยใช้วิธีประยุกต์จากวิธีมาตรฐานของ Microbiology general guidance for enumeration of *Bacillus cereus*(ISO-7932, 1993)โดยใช้ loop เขี่ยตัวอย่างมูลไก่ที่ละลายในน้ำเกลือ 0.85% ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีความจำเพาะชนิด Manitol Egg Yolk Polymyxin-B agar (MYP agar) โดยทำการเขี่ยเชื้อเพื่อแยกเชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) แล้วนำไปอบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C นาน 24ชั่วโมง

การแยกเชื้อ *Enterococcus*

แยกเชื้อ *Enterococcus*โดยใช้วิธีประยุกต์จากวิธีมาตรฐานของ European Community Project SMT4 CT98-2235 (European, 2003)โดยใช้ loop เขี่ยตัวอย่างมูลไก่ที่ละลายในน้ำเกลือ 0.85% ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีความจำเพาะชนิด SF-Streptococcus agar (SF agar) โดยทำการเขี่ยเชื้อเพื่อแยกเชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) แล้วนำไปอบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C นาน 24-48ชั่วโมง

การเลือกเก็บแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus*

ลักษณะเฉพาะทางโคโลนีของ *Lactobacillus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MRS จะมีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร ส่วนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีมีสีขาวขุ่น รูปร่างกลมหรือรี

ลักษณะ*Bacillus* แต่ละ species ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MYP มีลักษณะแตกต่างกันดังตารางที่1

ตารางที่1ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus*แต่ละ species

สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนี	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)
B. subtilis	สีเหลือง นูน เป็นเมือกเล็กน้อย	2-4
B. licheniformis	สีเหลืองหรือขาวใส เป็นเมือกหนา	3-5
B. mycoides	สีเหลืองหรือชมพูอ่อน แบนราบ ขอบไม่เรียบ	3-6
B. laterosporus	สีเหลืองหรือขาว นูน ขอบเรียบ	1-3

ลักษณะของ *Enterococcus*ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด SF มีขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด เมื่ออบเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง จะมีสีของโคโลนีแตกต่างกัน โดย *Enterococcus faecium*มีสีชมพูอ่อน และ *Enterococcus faecalis* มีสีแดงเข้ม

เมื่อเชื้อเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว เลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายกัน 1-5 โคโลนี โดย *Lactobacillus*, *Bacillus*และ *Enterococcus*จะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวของ MRS, TSB และ BHI ตามลำดับ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อปริมาตร 1,480 ไมโครลิตร ในกลีเซอรอล ปริมาตร 360 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อเบื้องต้นด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี

การตรวจพิสูจน์ชนิดแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธีทางชีวเคมี

การตรวจคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา

ตรวจดูลักษณะของ *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* ด้วยการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี Gram stainซึ่งเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบ *Lactobacillus* และ*Bacillus* ย้อมติดสีม่วง รูปร่างเป็นท่อน (gram positive, rod) ส่วน *Enterococcus* นั้นย้อมติดสีม่วง รูปร่างกลม (gram positive, cocci)

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น

ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นสำหรับ *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* ได้แก่ การทำ catalase test และ oxidase test ซึ่งสำหรับ catalase test ทดสอบโดยเขี่ยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียลงบนแผ่นสไลด์ หยดสารละลาย3% hydrogen peroxide (H_2O_2) ลงบนเชื้อแบคทีเรีย ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นให้ผลบวกต่อ catalase test ส่วน oxidase test ทำการทดสอบโดยหยดสารละลาย oxidase reagent ลงบน filter paper แล้วเขี่ยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียลงบน filter paperสังเกตการณ์เปลี่ยนสีของเชื้อแบคทีเรีย โดยถ้าเปลี่ยนเป็นสีม่วง แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นให้ผลบวกต่อ oxidase test แต่หากเชื้อแบคทีเรียไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าให้ผลลบต่อการทดสอบ โดยผลการทดสอบ catalase test และ oxidase test สำหรับ *Lactobacillus*, *Bacillus*และ *Enterococcus* สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่2 ผล catalase และ oxidase test ของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* spp.

แบคทีเรีย	catalase test	oxidase test
Lactobacillus spp.	-	not tested
Bacillus spp.	+	-
Enterococcus spp.	+	+

การตรวจพิสูจน์ยืนยัน *Lactobacillus*, *Bacillus*และ *Enterococcus* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

ในขั้นตอนแรกจะดำเนินการยืนยันเชื้อระดับจีนัสของ *Lactobacillus*และ*Bacillus*ส่น *Enterococcus*นั้นจะระบุถึงระดับสปีชีส์ เนื่องจากเชื้อ *Enterococcus* บางชนิด เช่น *Enterococcus*

faecalis เป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) ที่สามารถก่อโรคได้ จึงไม่เหมาะสมสำหรับการนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็น CE สำหรับสัตว์ต่อไป

การเตรียม DNA template ด้วยวิธี whole cell boiled lysate (Kwon et al., 2004)

เตรียมเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus*, *Bacillus*และ *Enterococcus* ใน MRS, MYP และ SF agar ตามลำดับ บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร และต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ปั่นแยกตะกอนที่ 12,000 xg นาน 5 นาที เก็บของเหลวส่วนใสซึ่งมี DNA ที่อุณหภูมิ -80°C

การตรวจพิสูจน์ยืนยันเชื้อ*Lactobacillus* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา(Dubernet et al., 2002; Kwon et al., 2004)

ใช้เทคนิค PCR เพื่อยืนยัน genus และ species ของ*Lactobacillus*ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ genus คือ R16-1 และ LbLMA1-rev และตรวจพิสูจน์ species จำนวน 7 species ได้แก่ *L. casei* group, *L. acidophilius*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. plantarum* และ *L. rhamnosus* ด้วย primer ที่มีความจำเพาะดังแสดงในตารางที่3 โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ดังนี้

- DNA template 10 µl
- 10 µM ของ primers 1 µl
- 2.5x PCR mastermix 25 µl
- DNase free water ให้ได้ปริมาตรรวม 50 µl

นำส่วนผสมที่เตรียมเข้าเครื่อง PCR Thermocylcer ซึ่งขั้นตอนสำหรับ PCR amplification ประกอบด้วย

1.	Initial denaturation	94 °C, 2 นาที
2.	Denaturation	94 °C, 20วินาที
	Annealing	51°C, 40วินาที
	Extension	68°C, 30วินาที
	จำนวน 35 รอบ	
3.	Final extension	68°C, 7นาที

จากนั้นตรวจสอบ PCR products ใน agarose gel และย้อมด้วยสารละลาย 0.5 µg/ml ethidium bromide นาน 15 นาที อ่านผลด้วยเครื่อง UV transilluminator

ตารางที่3 primers ที่ใช้ในการพิสูจน์เชื้อ *Lactobacillus*

Primers	ลำดับเบส (5'-3')	ความจำเพาะ	ขนาดของ PCR products (bp)	ที่มา
R16-1	CTTGTA CAC ACC GCC CGT CA	Genus-specificity	250	(Dubernet et al., 2002)
LbLMA1-rev	CTC AAA ACT AAA CAAAGT TTC			
IDL03R	CCACCTTCCTCCGGTTTGTCA	All *lactobacillus*		
IDL04F	AGGGTGAAGTCGTAACAAGTAGCC	All *lactobacillus*		
IDL11F	TGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCG	*L. casei* group	727	
IDL22R	AACTATCGCTTACGCTACCACTTTGC	*L. acidophilius*	606	
IDL31F	CTGTGCTACACCTAGAGATAGGTGG	*L. delbrueckii*	184	(Kwon et al., 2004)
IDL42R	ATTTCAAGTTGAGTCTCTCTCTC	*L. gasseri*	272	
IDL52F	ACCTGATTGACGATGGATCACCAGT	*L. reuteri*	1105	
IDL62R	CTAGTGGTAACAGTTGATTAAAACTGC	*L. plantarum*	428	
IDL73R	GCCAACAAGCTATGTGTTCGCTTGC	*L. rhamnosus*	448	

การตรวจพิสูจน์ยืนยันเชื้อ*Bacillus* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา(Wu et al., 2006)

ทำการยืนยัน genus และ species ของ *Bacillus*ด้วยเทคนิค Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) ตามวิธีที่อธิบายโดย Wu และคณะในปี 2006 โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ระบุ genus ด้วยการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วย B-K1F และ B-K1R primers โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ดังนี้

- DNA template 5 µl
- 10 µM ของ forward primer 1 µl
- 10 µM ของ reward primer 1 µl
- 2.5x PCR mastermix 12.5 µl
- DNase free water ให้ได้ปริมาตรวม 25 µl

นำส่วนผสมที่เตรียมเข้าเครื่อง PCR Thermocycler ซึ่งขั้นตอนสำหรับ PCR amplification ประกอบด้วย

1.	Initial denaturation	94 °C, 3 นาที
2.	Denaturation	94 °C, 30วินาที
	Annealing	63°C, 30วินาที
	Extension	72°C, 2นาที
	จำนวน 25 รอบ	
3.	Final extension	72°C, 10นาที

จากนั้นตรวจสอบ PCR products ใน agarose gel และย้อมด้วยสารละลาย 0.5 µg/ml ethidium bromide นาน 15 นาที อ่านผลด้วยเครื่อง UV transilluminator โดย *Bacillus* จะให้ PCR products ขนาด 1,114 bp (ตารางที่ 4)

ตารางที่4 primers ที่ใช้ในการพิสูจน์เชื้อ *Bacillus*

Primers	ลำดับเบส (5'-3')	ความจำเพาะ	ขนาดของ PCR products (bp)
B-K1F	TCACCAAGGCRACGATGCG	All Bacillus	1,114 (Wu et al., 2006)
B-K1R	CGTATTCACCGCGGCATG		

2. ยืนยัน species ของ *Bacillus* โดยการตัด PCR products ด้วยเอนไซม์ *Alu*I และ*Taq*I (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA) ซึ่ง Bacillus แต่ละ species จะให้รูปแบบของ DNA หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I และ*Taq*I ที่แตกต่างกัน จึงสามารถใช้ในการระบุ species ของ *Bacillus* ได้ โดยทำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ดังนี้

ปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I ในปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย

- PCR products 10 µl
- *Alu*I1 µl
- 10x buffer Tango 2 µl
- DNase free water 7 µl

นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 6 ชั่วโมง

ปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์*Taq*Iในปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย

- PCR products 10 µl
- *Taq*I1 µl
- 10x buffer Tango 2 µl
- DNase free water 7 µl

นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 6 ชั่วโมง

จากนั้นตรวจสอบรูปแบบ ARDRAใน2%agarose gel ด้วย gel electrophoresis แล้วอ่านผลด้วยเครื่อง UV transilluminator

การตรวจพิสูจน์ยืนยันเชื้อ*Enterococcus*ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา(Ke et al., 1999; Jackson et al., 2004)

ใช้เทคนิค PCR เพื่อยืนยัน genus และ species ของ*Enterococcus*ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ genusคือ Ent1 และ Entr2 primers (ตารางที่ 5)และตรวจพิสูจน์ species ได้แก่ *Enterococcus faecium*โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวมเท่ากับ 25 µl ดังนี้

- DNA template 5 µl
- 10 µM ของ forward primer 1 µl

- 10 µM ของ reward primer 1 µl
- 2.5x PCR mastermix 12.5 µl
- DNase free water ให้ได้ปริมาตรรวม 25 µl

นำส่วนผสมที่เตรียมเข้าเครื่อง PCR Thermocycler ซึ่งขั้นตอนสำหรับ PCR amplification ประกอบด้วย

- Initial denaturation 95 °C, 4 นาที
- Denaturation 95°C, 30วินาที
  Annealing 55°C, 1นาที
  Extension 72°C, 1นาที
  จำนวน 25 รอบ
- Final extension 72°C, 7นาที

จากนั้นตรวจสอบ PCR products ใน agarose gel และย้อมด้วยสารละลาย 0.5 µg/ml ethidium bromide นาน 15 นาที อ่านผลด้วยเครื่อง UV transilluminator

ตารางที่5primers ที่ใช้ในการพิสูจน์เชื้อ*Enterococcus*

Primers	ลำดับเบส (5'-3')	ความจำเพาะ	ขนาดของ PCR products (bp)	
Ent1	TACTGACAAACCATTCATGATG	Genus-specific	112	(Ke et al., 1999)
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
FM1	GAAAAAACAATAGAAGAATTAT	*E. faecium*	215	(Wu et al., 2006)
FM2	TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA			

ระยะที่ 2 ตรวจสอบความปลอดภัยของเชื้อตามคำแนะนำของ EFSA

European Food Safety Authority (EFSA, 2012) ได้กำหนดข้อควรพิจารณาสำหรับเชื้อแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็น probiotics ไว้ว่าควรมีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ (มีค่า MICs น้อยกว่าหรือเท่ากับค่า breakpoint ที่กำหนดไว้) จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol และ tylosin ซึ่ง tylosin ใช้สำหรับการทดสอบความไวรับต่อเชื้อ *Enterococcus faecium* เท่านั้น ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 6 เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อที่นำมาใช้เป็น competitive exclusion หรือ probiotics สำหรับสัตว์จะไม่มีการถ่ายทอดยีนดื้อยาไปสู่มนุษย์

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

นำเชื้อ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* ที่แยกได้จากมูลไก่ มาทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol และ tylosin เพื่อคัดเลือกหาเชื้อที่มีความไวรับต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 10 ชนิด โดยการหาค่า MICs ด้วยวิธี two-fold agar dilution method ตามวิธีของ (CLSI, 2011) โดยใช้ค่า Breakpoints ดังแสดงในตารางที่6 โดยมี *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 เป็นเชื้อควบคุม

ในการหาค่า MICs เริ่มจากเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ และเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar (MHA; Difco, MD, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C นาน 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อลงในน้ำเกลือ 0.85% เพื่อปรับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ 0.5 Mcfarland และทำการเจือจางอีก 10 เท่า เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^{7}เซลล์/มิลลิลิตร ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate นำ multiple inoculators จุ่มลงในเชื้อที่เตรียมไว้ แตะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ผสมยาต้านจุลชีพที่ความเข้มข้นต่างๆ ทิ้งไว้จนจุดถ่ายเชื้อแห้ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C นาน 20-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ตารางที่6ค่า Breakpoints (µg/ml) ของยาต้านจุลชีพทั้ง10 ชนิด

	ampicillin	vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindeamycin	tetracyclin	chloramphenicol	tylosin
Lactobacillus delbrueckii/helveticus	1	2	16	16	16	1	1	4	4	n.r.*
Lactobacillus acidophilus group	1	2	16	16	16	1	1	4	4	n.r.
Lactobacillus fermentum	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4	n.r.
Lactobacillus reuteri	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4	n.r.
Lactobacillus salivarius	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	n.r.
Lactobacillus plantarum/pentosus	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8	n.r.
Lactobacillus rhamnosus	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4	n.r.
Lactobacillus casei/paracasei	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4	n.r.
Bacillus spp.	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8	n.r.
Enterococcus faecium	2	4	32	1024	128	4	4	4	16	4

*n.r. means not required

ระยะที่ 3ทดสอบคุณสมบัติการทนกรด และการทนน้ำดีของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก

การทดสอบการทนกรด (Acid tolerance) (Hyronimus et al., 2000)

เชื้อที่มีความไวรับต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 9 ชนิด จะนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป ได้แก่ การทนกรด (acid tolerance) และการทนน้ำดี (bile tolerance)

การทดสอบการทนกรด ดัดแปลงจากวิธีการของ Hyronimus และคณะ (2000) โดยนำเชื้อแบคทีเรียเจริญในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงแบ่งเชื้อดังกล่าวปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 5 มิลลิลิตรของอาหารเหลว MRS (pH 2.5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0 และ 3 ของการบ่ม นำไปนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี pour plate technique ด้วยอาหารแข็ง MRS เขย่าให้เชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อกระจายทั่ว แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24-72ชั่วโมง นำผลที่ได้มาคำนวรหาอัตราการอยู่รอด (survival rate) ของเชื้อทดสอบ โดยแทนค่าในสูตร

$$\text{อัตราการอยู่รอด (\%)} = \frac{\log N}{\log No} \times 100$$

เมื่อ log N คือ อัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบชั่วโมงที่ 3

เมื่อ log N_0คือ อัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบชั่วโมงเริ่มต้น

การทดสอบการทนน้ำดี (Acid tolerance) (Hyronimus et al., 2000)

การทดสอบการทนน้ำดี ดัดแปลงจากวิธีการของ Hyronimus และคณะ (2000) โดยนำเชื้อแบคทีเรียเจริญในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงแบ่งเชื้อดังกล่าวปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 5 มิลลิลิตรของอาหารเหลว MRS ที่ผสม oxgall bile 0.3% (Gilliland et al., 1984)นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0 และ 24 ของการบ่ม นำไปนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี pour plate technique ด้วยอาหารแข็ง MRS เขย่าให้เชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อกระจายทั่ว แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24-72ชั่วโมง นำผลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการอยู่รอด (survival rate) ของเชื้อทดสอบ โดยแทนค่าในสูตร

$$\text{อัตราการอยู่รอด (\%)} = \frac{\log N}{\log No} \times 100$$

เมื่อ log N คือ อัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบชั่วโมงที่ 24

เมื่อ log N_0คือ อัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบชั่วโมงเริ่มต้น

ระยะที่ 4 ตรวจสอบยืนยัน species ของเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

ดำเนินการตรวจสอบยืนยัน species ของเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา สำหรับเชื้อ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ตามวิธีการของ Kwon และคณะ (2004) และ Wu และคณะ (2006) ซึ่งวิธีปฏิบัติการในรายละเอียดได้กล่าวไว้แล้วในการทดลองระยะที่ 2

ระยะที่ 5ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อการป้องกันการติดเชื้อ *Campylobacter jejuni* ในไก่เนื้อ

ไก่เนื้อพันธุ์ Cobb 500 อายุ 1 วัน ที่ไม่ได้ผ่านการทำวัคซีนจำนวน 210 ตัว นำมาแบ่งกลุ่ม เป็นกลุ่มละ 21 ตัว จำนวน 10 กลุ่ม โดยได้รับเชื้อแบคทีเรีย CE ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*1/4, *Bacillus subtilis* 206/1 และ *Enterococcus faecium* 122 ซึ่งให้ด้วยการป้อนปากที่อายุ 1, 2 และ 3 วัน ติดต่อกันนาน 3 วัน โดยแต่ละเชื้อให้ปริมาตรเท่ากับ0.5 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 7

สุ่มเก็บตัวอย่างมูลไก่ กลุ่มละ 5 ตัวอย่างที่อายุ 11 วัน เพื่อตรวจสอบว่าไก่ในแต่ละกลุ่ม ไม่พบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ก่อนทำการทดลองทำการป้อนเชื้อ *Campylobacter jejuni* ที่แยกได้ตัวอย่างลำไส้ไก่ในฟาร์ม ความเข้มข้น 2 x 10^7 CFU/ml ให้แก่ไก่เนื้อที่อายุ 14 วัน แล้วจึงสุ่มเก็บตัวอย่างมูลไก่กลุ่มละ 15 ตัวอย่าง ที่อายุ 17, 21, 28 และ 35 วัน เพื่อนำไปนับปริมาณเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCD และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่อายุ 41วัน ผ่าเก็บไส้ตันเพื่อนำไปนับปริมาณเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCD ตลอดการทดลองมีการชั่งน้ำหนัก 3 ครั้งที่อายุ 1, 14 และ 41 วัน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า FCR และ body weight gain/chicken ในแต่ละกลุ่ม

ตารางที่ 7 แสดงชนิดของ CE หรือผลิตภัณฑ์ สำหรับไก่เนื้อแต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่	CE or product	ความเข้มข้น
1	*Lactobacillus acidophilus* 1/4	2 x 10^8 CFU/ml
2	*Bacillus subtilis* 206/1	2 x 10^8 CFU/ml
3	*Enterococcus faecium*122	2 x 10^8 CFU/ml
4	*Lactobacillus acidophilus*1/4 + *Bacillus subtilis 206/1*	4 x 10^8 CFU/ml
5	*Lactobacillus acidophilus 1/4* + *Enterococcus faecium* 122	4 x 10^8 CFU/ml
6	*Bacillus subtilis 206/1* + *Enterococcusfaecium*122	4 x 10^8 CFU/ml
7	*Lactobacillus acidophilus* 1/4 + *Bacillus subtilis 206/1* + *Enterococcus faecium* 122	6 x 10^8 CFU/ml
8	Commercial product (AVIPROB™)	2 x 10^8 CFU/ml
9	positive control	-
10	negative control	-

การเจือจางตัวอย่างมูลไก่ และ cecal contents

ชั่งตัวอย่างมูลไก่ ตัวอย่างละ 0.5 กรัม มาละลายในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร (10-fold dilution) ทำให้เจือจางเพื่อให้ปริมาณเชื้อในตัวอย่างลดลงตามลำดับ แล้วจึงนำตัวอย่างเชื้อที่ได้ระดับความเจือจางต่างๆ กัน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง mCCD แล้วจึงกวนให้ทั่วจานเพาะเชื้อ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 48 ชั่วโมงที่สภาวะ microaerobic แล้วจึงนับปริมาณเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ตามวิธีของ ISO 10272-2

ชั่งตัวอย่าง cecal contents ตัวอย่างละ 1 กรัม มาละลายในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (10-fold dilution) ทำให้เจือจางเพื่อให้ปริมาณเชื้อในตัวอย่างลดลงตามลำดับ แล้วจึงนำตัวอย่างเชื้อที่ได้ระดับความเจือจางต่างๆ กัน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

mCCD แล้วจึงกวนให้ทั่วจานเพาะเชื้อ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 48 ชั่วโมงที่สภาวะ microaerobicแล้วจึงนับปริมาณเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ตามวิธีของ ISO 10272-2

การนับปริมาณเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์(ISO-10272-2, 2006)

กรณีที่ 1 สำหรับกรณีทั่วไป พบเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่าคือ เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ปริมาณตั้งแต่ 15 ถึง 150 โคโลนี คำนวณหาปริมาณเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ตั้งต้น ได้จากสูตร

$$N = \frac{\sum a}{V\ x\ [n1+(0.1\ x\ n2)]x\ d}$$

เมื่อ $\sum a$คือ ผลรวมของจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่สงสัยว่าคือเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ซึ่งมีค่าอย่างน้อย 15 โคโลนีใน 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

V คือ ปริมาณของ inoculum ที่ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร

n_1 คือ จำนวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้สำหรับ dilution แรกที่ตรวจพบเชื้อ

n_2 คือ จำนวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้สำหรับ dilution ที่สองที่ตรวจพบเชื้อ

d คือ ค่า dilution factor สำหรับการทำ dilution ต่างๆ

กรณีที่2 สำหรับ dilution แรก ที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่าคือ เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์น้อยกว่า15โคโลนีคำนวณหาปริมาณเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ตั้งต้น ได้จากสูตร

$$N = \frac{\sum a}{V\ x\ n\ x\ d}$$

เมื่อ $\sum a$คือ ผลรวมของจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่สงสัยว่าคือเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 2 ถาด

V คือ ปริมาณของ inoculum ที่ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร

nคือ จำนวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

dคือ ค่า dilution factor สำหรับ initial suspension

ผลการวิจัย

ระยะที่ 1 แยกเชื้อที่มีคุณสมบัติ Generally recognized as safe (GRAS) ได้แก่*Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* จากมูลไก่

จากตัวอย่างมูลไก่ทั้งหมดจำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาเพาะแยกเชื้อใน selective medium ได้แก่ MRS, MYP และ SF agar เพื่อแยกหาเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติ generally recognized as safe (GRAS) ซึ่งได้แก่*Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* ตามลำดับ จากนั้นดำเนินการตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* ด้วยการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้การย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี Gram stain ซึ่งเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบ *Lactobacillus* และ *Bacillus* ย้อมติดสีม่วง รูปร่างเป็นท่อน (gram positive, rod) ส่วน *Enterococcus* นั้นย้อมติดสีม่วง รูปร่างกลม (gram positive, cocci) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นสำหรับเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ การทำ catalase test และ oxidase test และทำการยืนยันจีนัสของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* และ *Bacillus* ส่วน *Enterocoocus* จะทำการยืนยันสีปีชีส์ให้ทราบว่าเป็น *Enterococcus faecium* ดังกล่าวด้วยเทคนิค PCR เนื่องจากเชื้อ *Enterococcus* บางชนิด เช่น *Enterococcus faecalis* สามารถเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) ที่สามารถก่อโรคได้ได้จำนวนสเตรนรวมเท่ากับ 346 สเตรน ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนสเตรนทั้งหมดของ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* ที่แยกได้

Bacteria	จำนวนของสเตรน
Lactobacillus spp.	195
Bacillus spp.	93
Enterococcus faecium	58
รวม	346

ระยะที่ 2 ตรวจสอบความปลอดภัยของเชื้อตามคำแนะนำของ EFSA

นำสเตรนที่แยกได้ทั้งหมด 346 สเตรน มาทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ ซึ่งสำหรับเชื้อ *Lactobacillus* spp. *Bacillus* spp. ตามมาตรฐานของ EFSA ได้กำหนดชนิดของยาปฏิชีวนะที่ต้องผ่านการทดสอบจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline และ chloramphenicol ส่วนเชื้อ *Enterococcus faecium* มาตรฐานของ EFSA ได้กำหนดชนิดของยาต้านจุลชีพที่ต้องผ่านการทดสอบจำนวน 10 ชนิด ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 6 ได้แก่ ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tylosin, tetracycline และ chloramphenicol ซึ่งค่า breakpoints ได้แสดงไว้แล้วในส่วนของวิธีดำเนินการวิจัยซึ่งผลการทดลองพบว่า มีจำนวนทั้งสิ้น 51 สเตรนที่มีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับค่า breakpoints ที่กำหนดไว้ ดังแสดงในตารางที่ 9-12

ตารางที่ 9 จำนวนสเตรนที่มีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับค่า breakpoints ที่กำหนดไว้ของ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium*

Bacteria	จำนวนของสเตรน
Lactobacillus spp.	27
Bacillus spp.	15
Enterococcus faecium	9
รวม	51

ตารางที่ 10 ค่า MIC ของ *Lactobacillus* spp., ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 27 สเตรน

ลำดับที่	สเตรน	MIC (µg/ml)								
		ampicillin	vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracycline	chloramphenicol
1	L 1/3	0.5	1	2	4	4	0.5	0.25	0.5	1
2	L 1/4	0.5	0.5	2	1	2	0.25	<0.125	0.5	2
3	L 5/3	1	1	4	8	4	0.5	0.5	1	1
4	L 8/1	0.25	1	1	2	1	<0.125	0.25	0.5	0.5
5	L 8/2	0.5	0.5	2	2	8	0.5	0.5	2	1
6	L 10/2	0.5	0.5	1	2	4	0.5	0.5	1	1
7	L 14/4	0.25	0.5	0.5	1	2	0.25	0.25	0.5	0.5
8	L 17/1	1	1	4	4	8	0.5	0.5	2	2
9	L 19/1	0.5	0.5	2	4	4	0.5	0.25	1	1
10	L 19/2	0.5	1	4	4	8	0.5	0.5	2	1
11	L 22/2	0.5	0.5	2	2	4	0.5	0.5	1	0.5
12	L 23/1	0.25	0.5	1	1	2	0.25	0.25	0.5	0.5
13	L 27/1	0.125	0.5	2	2	4	0.5	0.5	1	0.5
14	L 27/2	0.5	1	2	4	4	0.5	0.25	0.5	0.5
15	L 28/1	0.25	0.5	1	1	2	0.5	0.5	1	0.5

ลำดับที่	สเตรน	MIC (µg/ml)								
		ampicillin	vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracycline	chloramphenicol
16	L 31/3	0.5	0.5	2	2	2	0.25	0.25	0.5	0.5
17	L 31/4	0.5	0.5	1	1	1	0.25	0.25	0.5	1
18	L 35/2	0.25	0.25	2	2	4	0.5	0.5	1	1
19	L 38/1	0.25	0.5	1	1	2	0.25	0.25	0.5	0.5
20	L 40/1	0.125	0.5	1	2	2	0.25	0.5	1	0.5
21	L 44/1	0.25	0.5	2	2	4	0.5	0.5	1	0.5
22	L 44/4	0.25	0.25	1	2	2	0.5	0.25	1	1
23	L 48/1	0.5	0.5	4	4	4	0.5	0.5	2	1
24	L 49/4	0.25	0.5	1	2	2	0.25	0.25	0.5	0.5
25	L 50/1	0.125	0.5	0.5	2	4	0.25	0.5	1	0.5
26	L 55/4	0.25	0.5	2	2	2	0.5	0.5	0.5	1
27	L 58/3	0.5	0.5	4	4	4	0.5	0.5	1	1

ตารางที่11ค่า MIC ของ *Bacillus* spp., ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 15 สเตรน

ลำดับที่	สเตรน	MIC (µg/ml)							
		vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracycline	chloramphenicol
1	B 201/1	1	0.25	1	<2	2	2	1	2
2	B 204/1	2	1	4	4	2	2	2	4
3	B 205/2	2	1	2	4	<0.5	1	2	2
4	B 206/1	2	0.5	<0.5	4	<0.5	1	0.5	2
5	B 206/2	1	0.25	1	<2	<0.5	1	0.5	2
6	B 210/1	2	0.5	4	4	<0.5	2	1	2
7	B 214/2	0.5	0.25	<0.5	4	1	0.5	0.5	<1
8	B 217/2	1	1	2	<2	<0.5	1	1	2
9	B 220/1	1	0.25	<0.5	<2	<0.5	1	2	2
10	B 224/1	0.5	0.5	<0.5	<2	<0.5	0.5	1	2
11	B 227/2	1	1	<0.5	4	<0.5	2	0.5	2
12	B 230/1	0.5	0.5	1	<2	<0.5	1	2	2
13	B 230/2	1	0.5	<0.5	<2	<0.5	0.5	1	2
14	B 235/1	0.5	0.5	<0.5	<2	<0.5	0.5	0.5	2
15	B 239/1	0.5	0.25	<0.5	<2	<0.5	1	1	2

ตารางที่ 12 ค่า MIC ของ *Enterococcus faecium*ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 9 สเตรน

		MIC (µg/ml)									
ลำดับที่	สเตรน	ampicillin	vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tylosin	tetracycline	chloramphenicol
1	E 107	0.5	2	8	128	32	1	1	0.5	1	4
2	E 110	1	4	16	256	64	2	1	1	2	4
3	E 114	0.5	1	4	64	32	<0.5	0.5	0.5	0.5	2
4	E 118	0.5	0.5	8	128	32	<0.5	0.5	1	1	<1
5	E 122	2	2	16	256	64	<0.5	2	0.5	2	2
6	E 130	1	1	8	128	32	1	1	1	2	4
7	E 135	0.5	2	16	128	64	<0.5	1	1	1	2
8	E 144	1	2	8	64	32	<0.5	0.5	0.5	1	4
9	E 172	2	4	16	128	64	2	1	1	2	4

ระยะที่ 3 ทดสอบคุณสมบัติการทนกรด และการทนน้ำดีของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก

นำตัวอย่างทั้ง 51 สเตรน ที่ผ่านการคัดเลือกความไวรับต่อยาปฏิชีวนะตามมาตรฐานของ EFSA มาทดสอบคุณสมบัติการทนกรด ซึ่งผลการนับปริมาณเชื้อ สามารถคำนวณหาอัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบ ได้ดังแสดงในตารางที่ 13 และ 14

ตารางที่ 13 อัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบในสภาวะกรด pH 2.5

ลำดับที่	สเตรน	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)		อัตราการอยู่รอด (%)
		เวลา 0 ชั่วโมง	เวลา 3 ชั่วโมง	
1	L 1/3	5.98	5.66	94.60
2	L 1/4	6.95	6.73	96.85
3	L 5/3	6.35	5.95	93.58
4	L 8/1	6.77	6.35	93.82
5	L 8/2	6.65	5.86	88.11
6	L 10/2	6.92	6.51	93.98
7	L 14/4	6.53	6.10	93.36
8	L 17/1	6.95	5.86	84.37
9	L 19/1	6.63	5.45	82.27
10	L 19/2	6.65	5.97	89.69
11	L 22/2	6.74	6.65	98.74
12	L 23/1	6.95	6.63	95.41
13	L 27/1	6.57	5.97	90.87
14	L 27/2	6.73	6.13	91.16
15	L 28/1	6.69	6.11	91.40
16	L 31/3	6.86	6.66	97.13
17	L 31/4	6.96	6.73	96.78
18	L 35/2	6.35	5.94	93.58
19	L 38/1	6.73	6.06	90.02
20	L 40/1	6.79	6.40	94.27
21	L 44/1	6.53	5.96	91.41

22	L 44/4	6.89	6.41	93.04
23	L 48/1	6.88	6.60	95.96
24	L 49/4	6.52	5.90	90.46
25	L 50/1	6.92	6.46	93.39
26	L 55/4	6.86	6.20	90.38
27	L 58/3	6.29	5.86	93.19
28	B 201/1	6.53	6.63	101.57
29	B 204/1	6.91	6.52	94.36
30	B 205/2	6.45	5.95	92.19
31	B 206/1	6.82	6.92	101.47
32	B 206/2	6.65	5.99	90.04
33	B 210/1	6.63	5.63	84.99
34	B 214/2	6.86	6.91	100.77
35	B 217/2	6.82	6.38	93.54
36	B 220/1	6.53	5.97	91.43
37	B 224/1	6.95	6.20	89.23
38	B 227/2	6.38	5.88	92.15
39	B 230/1	6.83	6.65	97.30
40	B 230/2	6.86	5.91	86.16
41	B 235/1	6.68	6.40	95.77
42	B 239/1	6.74	6.45	95.67
43	E 107	6.88	5.97	86.74
44	E 110	6.95	6.63	95.36
45	E 114	6.41	5.87	91.69
46	E 118	6.64	5.11	77.03
47	E 122	6.66	6.62	99.39
48	E 130	6.80	6.27	92.25
49	E 135	6.74	6.63	98.45
50	E 144	6.77	5.98	88.34
51	E 172	6.64	5.88	88.61

ตารางที่14 อัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบในสภาวะที่เติม oxgall bile 0.3%

ลำดับที่	สเตรน	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)		อัตราการอยู่รอด (%)
		เวลา 0 ชั่วโมง	เวลา 24 ชั่วโมง	
1	L 1/3	6.30	5.95	94.45
2	L 1/4	6.77	7.71	113.93
3	L 5/3	6.95	6.53	93.91
4	L 8/1	6.82	5.95	87.12
5	L 8/2	6.65	5.89	88.54
6	L 10/2	6.35	6.48	102.08
7	L 14/4	5.98	5.87	98.15
8	L 17/1	6.58	5.88	89.36
9	L 19/1	6.72	5.28	78.55
10	L 19/2	6.89	7.28	105.69
11	L 22/2	6.86	6.58	95.95
12	L 23/1	6.73	5.95	88.48
13	L 27/1	6.41	5.95	92.78
14	L 27/2	6.51	6.42	98.74
15	L 28/1	6.81	6.56	96.28
16	L 31/3	6.87	5.91	86.03
17	L 31/4	6.91	6.62	95.87
18	L 35/2	6.89	7.00	101.56
19	L 38/1	6.73	6.25	92.82
20	L 40/1	6.69	6.38	95.31
21	L 44/1	6.41	6.52	101.61
22	L 44/4	6.88	6.55	95.25
23	L 48/1	6.80	6.11	89.87
24	L 49/4	6.53	5.63	86.22
25	L 50/1	6.74	5.95	88.25
26	L 55/4	5.97	5.93	99.36

27	L 58/3	6.53	5.89	90.28
28	B 201/1	6.93	6.56	94.72
29	B 204/1	6.73	6.94	103.21
30	B 205/2	6.78	6.06	89.34
31	B 206/1	6.69	8.76	130.97
32	B 206/2	6.55	5.98	91.30
33	B 210/1	6.79	6.74	99.27
34	B 214/2	6.95	6.53	93.90
35	B 217/2	6.89	6.95	100.87
36	B 220/1	6.81	8.38	123.13
37	B 224/1	6.92	7.15	103.32
38	B 227/2	6.59	6.76	102.57
39	B 230/1	6.88	8.12	118.16
40	B 230/2	6.76	6.52	96.47
41	B 235/1	6.95	6.89	99.18
42	B 239/1	6.35	6.53	102.75
43	E 107	5.98	4.94	82.63
44	E 110	6.82	4.89	71.66
45	E 114	6.64	5.10	76.72
46	E 118	6.35	4.96	78.07
47	E 122	6.99	6.30	90.10
48	E 130	6.89	5.69	82.58
49	E 135	6.64	4.98	75.06
50	E 144	6.94	4.24	61.09
51	E 172	6.74	5.06	75.07

ระยะที่ 4 ตรวจสอบยืนยัน species ของเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

จากตัวอย่างเชื้อที่ผ่านการคัดเลือก และนำมาทดสอบการทนกรดและการทนน้ำดีทั้ง 51 สเตรน เมื่อพิจารณาจากทั้งในแง่ของความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ การมีประสิทธิภาพในการทนกรด และน้ำดี จึงสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็น CE ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* 1/4, *Bacillus subtilis* 206/1 และ *Enterococcus faecium* 122 สำหรับเชื้อในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. ได้แก่ สเตรน L 1/4 และ B 206/1 แล้วจึงนำทั้ง 2 สเตรน มาตรวจยืนยันสปีชีส์ ด้วยเทคนิค PCR ดังที่ได้กล่าวรายละเอียดไว้ในส่วนของวิธีดำเนินการวิจัย

ผลการทดลองพบว่าสเตรน L 1/4 และ B 206/1คือ เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* และ*Bacillus subtilis* ตามลำดับ

ระยะที่ 5ทดสอบประสิทธิภาพของCE ต่อการป้องกันการติดเชื้อ *Campylobacter jejuni* ในไก่เนื้อ

ทำการป้อนเชื้อ *Campylobacter jejuni*ที่แยกได้ตัวอย่างลำไส้ไก่ในฟาร์ม ความเข้มข้น 2 x 10^7 CFU/ml ให้แก่ไก่เนื้อที่อายุ 14 วัน จากนั้นดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างมูลไก่ กลุ่มละ 15 ตัวอย่าง ที่อายุ 17, 21, 28 และ 35 วัน ส่วนที่อายุ 41 วัน ทำการการุณยฆาต และเก็บตัวอย่างไส้ตัน กลุ่มละ 21 ตัวอย่างเพื่อนำมานับปริมาณเชื้อ *Campylobacter jejuni* ใน mCCD agar ได้ผลดังแสดงในตารางที่15 ซึ่งผลการทดลองพบว่าปริมาณเชื้อ *Campylobacter jejuni* ในแต่ละกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่15 ปริมาณเชื้อ*C. jejuni*ที่ตรวจพบจากตัวอย่างมูลไก่และไส้ตัน

กลุ่ม	ปริมาณเชื้อ *C. jejuni* (log CFU/ml)				
	อายุ 17 วัน	อายุ 21 วัน	อายุ 28 วัน	อายุ 35 วัน	อายุ 41 วัน
1	5.80 ± 0.86	5.47 ± 0.64	6.18 ± 0.88	6.24 ± 0.55	6.48 ± 0.99
2	5.94 ± 0.89	6.23 ± 0.66	6.38 ± 0.51	6.53 ± 0.71	6.75 ± 1.00
3	6.29 ± 0.81	6.39 ± 0.73	6.39 ± 0.59	6.09 ± 0.64	6.97 ± 1.03
4	6.43 ± 0.63	6.53 ± 0.41	6.31 ± 0.67	5.59 ± 0.45	6.01 ± 0.89
5	6.53 ± 0.59	6.50 ± 0.57	6.56 ± 0.53	6.10 ± 0.80	6.15 ± 1.19
6	6.22 ± 0.61	6.46 ± 0.94	6.26 ± 0.71	5.54 ± 0.37	6.02 ± 0.89
7	5.65 ± 0.47	6.55 ± 0.62	5.81 ± 0.47	5.82 ± 0.64	5.81 ± 0.65
8	6.78 ± 0.45	6.93 ± 0.76	6.74 ± 0.40	6.20 ± 1.02	6.52 ± 0.90
9	6.46 ± 0.52	6.86 ± 0.40	6.74 ± 0.82	6.79 ± 0.49	6.74 ± 1.03
10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*n.d. = ปริมาณเชื้อน้อยกว่า 1 log CFU/ml

ในการเลี้ยงครั้งนี้ ได้ตรวจวัดประสิทธิภาพการเลี้ยง โดยพิจารณาจากค่า feed conversion ratio (FCR) และ Body weight gain/chicken ดังแสดงในตารางที่16 ซึ่งผลปรากฏว่า ค่าที่ได้ในแต่ละกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 16 ค่า FCR และ Body weight gain

กลุ่ม	FCR at 14 days	FCR at 41 days	Body weight gain/chicken at 41 days
1	1.14	1.82	1,212.06
2	1.19	1.84	1,256.80
3	1.16	1.77	1,128.48
4	1.13	1.82	1,149.85
5	1.17	1.74	1,084.80
6	1.15	1.78	965.34
7	1.14	1.68	1,061.06
8	1.15	1.72	1,263.46
9	1.14	1.72	1,148.21
10	1.18	1.79	1,156.47

การอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับ competitive exclusion (CE) เริ่มต้นตั้งแต่ปี 1973 โดย Nurmi และ Rantala ได้ทดลองป้อน gut content ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในลำไส้ไก่ ซึ่งได้มาจากไก่ที่โตเต็มวัย และปลอดเชื้อซัลโมเนลลา แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาลักษณะดังกล่าว อาจก่อให้เกิดความเสี่ยงจากการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่พึงประสงค์ได้ ดังนั้น จึงควรที่จะแยกชนิดของแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากเดินทางอาหารของไก่ก่อน นำไปพัฒนาเป็น competitive exclusion สำหรับป้อนให้ไก่ต่อไป นอกจากนี้แล้ว เรื่องความจำเพาะของเชื้อแบคทีเรียกับชนิดของโฮสต์ก็เป็นประเด็นหนึ่งที่สำคัญ กล่าวคือ มีรายงานการศึกษาที่ระบุถึงความสำคัญของ CE ที่จะนำมาป้อนให้สัตว์ชนิดใด ก็ควรจะแยกเชื้อ CE นั้นได้มาสัตว์ชนิดนั้น (host specificity) (Fuller, 1975) ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ จึงเลือกพัฒนา competitive exclusion ที่แยกได้จากมูลไก่ และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในห้องทดลอง ก่อนนำไปป้อนให้ไก่เนื้อต่อไป

หน้าที่หลักของ CE เมื่อเข้าสู่ทางเดินอาหารของสัตว์ คือ เข้าไปจับ receptor ในทางเดินอาหาร และ/หรือ แย่งสารอาหารที่สำคัญ ทำให้เชื้อโรคในกลุ่ม pathogenic bacteria เช่น *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Ehrmann et al., 2002) ดังนั้นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจในการช่วยลดและป้องกันการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในไก่ คือ การให้แบคทีเรียไม่ก่อโรคเพื่อแข่งขันในทางเดินอาหารของไก่ก่อนที่จะมีการติดเชื้อ *Campylobacter* (competitive exclusion) ซึ่งสอดคล้องกับนโยบายของทั้งสหภาพยุโรป และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาที่ประกาศห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในการเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ในสหภาพยุโรปแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์อยู่ภายใต้การควบคุมอย่างเข้มงวดของ Regulation 1831/2003 EU ตามแนวทางการทดสอบที่เสนอโดย the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) (Becquet, 2003)ซึ่งเน้นการทดสอบความปลอดภัยต่อสัตว์มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม โดยประเด็นหลักอยู่ที่การตรวจหาการปรากฏของยีนดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดได้ การใช้แบคทีเรียที่ไม่ได้ผ่านการตรวจสอบอย่างรอบคอบโดยเฉพาะการถ่ายทอดยีนดื้อยา อาจกลายเป็นดาบสองคมที่สร้างปัญหาการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้ไม่แตกต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะ

คุณสมบัติที่สำคัญของ CE คือ นอกจากเรื่องความจำเพาะต่อชนิดของโฮสต์แล้ว CE ควรเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารโดยปกติของสัตว์ชนิดนั้นๆ และมีความสามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ ทนต่อสภาวะเป็นกรด ในส่วนกระเพาะอาหาร เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารส่วนต้นของสัตว์ปีก มีความเป็นกรดสูง เช่นที่บริเวณ gizzard มีค่า pH 2.5-4.74 (Sturkie, 1976) และต้องสามารถทนต่อน้ำดีในส่วนของลำไส้เล็กได้

การศึกษาในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยสามารถแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterococcus faecium* จากมูลไก่ ได้จำนวน 346 สเตรน แล้วจึงนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 10 ชนิด เพื่อคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่มีความไวรับต่อยาจุลชีพ จึงได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 51 สเตรน นำเชื้อดังกล่าวไปทดสอบการทนกรด และการทนน้ำดี เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ CE ในห้องปฏิบัติการก่อนนำไปป้อนให้ไก่เนื้อ จากการผลการทดลอง ทั้งในแง่ของความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ การมีประสิทธิภาพในการทนกรด และน้ำดี จึงสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็น CE ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* 1/4, *Bacillus subtilis* 206/1 และ *Enterococcus faecium* 122 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด จัดอยู่ในกลุ่มที่ได้รับการรับรองว่าเป็นแบคทีเรียที่มีการตรวจสอบโดยทั่วไปแล้วว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognize as Safe; GRAS) ตามมาตรฐานขององค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา โดยแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ผ่านการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 10 ชนิด ว่าไม่เกิดการดื้อยาที่อาจจะส่งผ่านไปสู่ผู้บริโภคเนื้อสัตว์ได้ และยังให้ผลทดสอบต่อการทนกรด และการทนน้ำดีที่อยู่ในเกณฑ์ดีมาก

การวิจัยครั้งนี้ ทำการพัฒนา CE ที่แยกได้จากมูลไก่ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่แยกเชื้อจากอวัยวะในระบบทางเดินอาหารของไก่ เช่น crop, proventriculus, gizzard, ileum และ caecum เป็นต้น (Garriga et al., 1998; Ehrmann et al., 2002) แต่เชื้อที่แยกได้จากการมูลไก่ ให้ผลการทดสอบการทนกรด และการทนน้ำดี ที่อยู่ในเกณฑ์ดีมากเช่นเดียวกัน อีกทั้งไม่จำเป็นต้องฆ่าไก่เพื่อใช้ในการคัดเลือกหาเชื้อที่มีความเหมาะสมในการพัฒนาเป็น CE และเชื้อดังกล่าวก็ผ่านทดสอบความไวรับต่อยาจุลชีพ จากการอ่านค่า MIC ด้วยวิธี two-fold agar dilution ซึ่งมีความแม่นยำกว่าวิธี disk diffusion method ซึ่งเป็นวิธีการ screening เบื้องต้นเท่านั้น

เมื่อนำเชื้อ CE ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* 1/4, *Bacillus subtilis* 206/1 และ *Enterococcus faecium* 122 ป้อนให้ไก่เนื้อที่อายุ 1, 2 และ 3 วันติดต่อกัน แล้วจึงเชื้อป้อนเชื้อ *Campylobacter jejuni* ที่ความเข้มข้น 2 x 10^7 CFU/ml ที่แยกได้จากไก่เนื้อ แก่ไก่ทดลองที่อายุ 14 วัน และทำการนับเชื้อ *C. jejuni* จากไก่เนื้อทดลองที่อายุ 17, 21, 28, 35 จากมูลไก่ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่อายุ 41 วัน เก็บตัวอย่าง caecum มานับปริมาณเชื้อ *C. jejuni* จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *C. jejuni* ที่ป้อนให้ไก่ทดลองสามารถ colonize ในระบบทางเดินอาหารได้อย่างรวดเร็ว ตรวจพบเชื้อในมูลไก่ได้ภายใน 3 วันหลังจากการป้อนเชื้อ ปริมาณเชื้อ *C. jejuni*ที่ตรวจพบในแต่ละกลุ่มการทดลอง และประสิทธิภาพด้านการเลี้ยง (FCR, body weight gain/chicken) ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Robyn และคณะ (2013) (Robyn et al., 2013)ที่ทำการป้อนเชื้อ *Enterococcus faecalis* และทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อ *C. jejuni* ผลปรากฏว่า ไม่พบ

ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละกลุ่มการทดลอง ซึ่งประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจในที่นี้ คือ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ยังอยู่ระหว่างการศึกษาเกี่ยวกับ pathogenesis ของเชื้อ *C. jejuni* ว่ามีกลไกการยึดเกาะกับเซลล์ การเข้าเซลล์ และสารสำคัญที่เกี่ยวข้องในแต่ละกระบวนการอย่างไร สาเหตุใดที่เชื้อ *C. jejuni*สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีกโดยที่ไม่ทำให้สัตว์ปีกเกิดโรค ดังที่แสดงอาการระบบทางเดินอาหารและระบบประสาทในมนุษย์ ซึ่งหากนักวิทยาศาสตร์เข้าใจในกระบวนการแล้ว น่าจะทำให้ความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อ *C. jejuni* มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และนำไปสู่การศึกษาเพื่อช่วยลดปริมาณเชื้อ *C. jejuni*ในสัตว์ปีก ซึ่งถือเป็นแหล่งที่มาที่สำคัญสำหรับเชื้อชนิดนี้มาสู่มนุษย์ได้ในอนาคต

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. de Mans Rogosa and Sharpe Agar (MRS Agar) (Difco™, MD, USA)

• Proteose peptone	10.0 g
• Meat extract	8.0 g
• Yeast extract	5.0 g
• Tri-ammonium citrate	2.0 g
• Sodium acetate	0.5 g
• $Mg_2SO_4.7H_2O$	0.1 g
• K_2HPO_4	2.0 g
• Glucose	20.0 g
• Tween-80	1.0 g
• Tryptone	5.0 g
• Agar	15.0 g
• Distilled water	1,000 ml

2. Manitol Egg Yolk Polymyxin-B Agar (MYP Agar) (Difco™, MD, USA)

• Beef extract	1.0 g
• Peptone	10.0 g
• D-Mannitol	10.0 g
• NaCl	10.0 g
• Agar	15.0 g
• Phenol Red 0.2% aqueous solution	15.0 ml
• Distilled water	1,000 ml

3. SF-Streptococcus Agar (SF Agar)(Difco™, MD, USA)

• Tryptone	20.0 g
• Dextrose	5.0 g
• K_2PO_4	4.0 g

- NaCl 5.0 g
- Sodium Azide 0.5 g
- Agar 20.0 g
- Bromocresol purple 0.2% aqueous solution 32 mg
- Distilled water 1,000 ml

4. Muller Hinton Agar (MHA) (Difco™, MD, USA)

- Beef Extract Powder 2.0 g
- Acid Digest of Casein 17.5 g
- Starch 1.5 g
- Agar 17.0 g
- Distilled water 1,000 ml

5. Modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar (mCCD agar) (Oxoid™, USA)

- Meat extract 10.0 g
- Enzymatic digest of animal tissues 10.0 g
- Sodium chloride 5.0 g
- Charcoal 4.0 g
- Enzymatic digest of casein 3.0 g
- Sodium desoxycholate 1.0 g
- Iron (II) sulfate 0.25 g
- Sodium pyruvate 0.25 g
- Agar 12.0 g
- Distilled water 1,000 ml

ยาปฏิชีวนะ

1. Antibiotic solution for mCCD agar 1 litre

- Cefoperazone 0.032 g
- Amphotericin B 0.01 g
- Water 5 ml

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2554. สรุปข้อมูลและสถิติจำนวนไก่และเกษตรกรผู้เลี้ยงประจำปี 2554.

Becquet P. 2003. EU assessment of enterococci as feed additives. Int J Food Microbiol. 88(2-3): 247-254.

Chansiripornchai N and Sasipreeyajan J. 2009. PCR detection of four virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilitiesof adhesion to and invasion of INT-407 cells. J. Vet. Med. Sci. 71(6): 839-844.

CLSI CaLSI. 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first informational supplement. Vol. 31. In.

Dubernet S, Desmasures N and Gueguen M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiol Lett. 214(2): 271-275.

EFSA EFSA. 2006. Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004.

EFSA EFSA. 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. Vol. 10.

Ehrmann MA, Kurzak P, Bauer J and Vogel RF. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. J Appl Microbiol. 92(5): 966-975.

European c. 2003. On a generic approach to the safety assessment of microorganisms used in feed/food and feed/food production.

Fuller R. 1975. Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. J Gen Microbiol. 87(2): 245-250.

Garriga M, Pascual M, Monfort JM and Hugas M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. J Appl Microbiol. 84(1): 125-132.

Gilliland SE, Staley TE and Bush LJ. 1984. Importance of bile tolerance of Lactobacillus acidophilus used as a dietary adjunct. J Dairy Sci. 67(12): 3045-3051.

Hyronimus B, Le Marrec C, Sassi AH and Deschamps A. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol. 61(2-3): 193-197.

ICGFI ICGoFI. 1999. Safety of poultry meat: from farm to table.

ISO-7932. 1993. Microbiology general guidance for the enumeration of *Bacillus cereus* Conony-count Technique at 30 ^{O}C.

ISO-10272-2. 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for dection and enumeration of *Campylobacter* spp., Part 2: Colony-count technique.

ISO-15214. 1998. Microbiology food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the Enumeration of mesophilic Lactic acid bacteria Colony-count Technique at 30 °C. In.

Jackson CR, Fedorka-Cray PJ and Barrett JB. 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. J Clin Microbiol. 42(8): 3558-3565.

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M and Bergeron MG. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. J Clin Microbiol. 37(11): 3497-3503.

Kwon HS, Yang EH, Yeon SW, Kang BH and Kim TY. 2004. Rapid identification of probiotic Lactobacillus species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. FEMS Microbiol Lett. 239(2): 267-275.

Mishu B and Blaser MJ. 1993. Role of infection due to Campylobacter jejuni in the initiation of Guillain-Barre syndrome. Clin Infect Dis. 17(1): 104-108.

Nurmi E and Rantala M. 1973. New aspects of Salmonella infection in broiler production. Nature. 241(5386): 210-211.

Robyn J, Rasschaert G, Hermans D, Pasmans F and Heyndrickx M. 2013. In vivo broiler experiments to assess anti-Campylobacter jejuni activity of a live Enterococcus faecalis strain. Poult Sci. 92(1): 265-271.

SCAN. 2003. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. July 2001 updated April 2003.

Tauxe RV. 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. Emerg Infect Dis. 3(4): 425-434.

Tauxe RV, Hargrett-Bean N, Patton CM and Wachsmuth IK. 1988. Campylobacter isolates in the United States, 1982-1986. MMWR CDC Surveill Summ. 37(2): 1-13.

Taylor DN, Perlman DM, Echeverria PD, Lexomboon U and Blaser MJ. 1993. Campylobacter immunity and quantitative excretion rates in Thai children. J Infect Dis. 168(3): 754-758.

Wu XY, Walker MJ, Hornitzky M and Chin J. 2006. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of Bacillus species of environmental significance. J Microbiol Methods. 64(1): 107-119.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย
   ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Assoc.Prof.Dr.Niwat Chansiripornchai
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1022-01954-72-4
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
   ตำแหน่งวิชาการ รองศาสตราจารย์ (Associate Professor)
   ตำแหน่งบริหาร กรรมการบริหารหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต และวิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิตภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่
   ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   39 ถ.อังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 02 218 9412 โทรสาร 02 255 3910 โทรศัพท์เคลื่อนที่ 081 813 6931
   Email: cniwat@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับพ.ศ.
Utrecht University (The Netherlands)	Ph.D.	Infectious diseases and Immunology	2547
Swedish University of Agricultural Science (Sweden)	M.S.	Molecular Microbiology	2543
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	สพ.บ.	สัตวแพทยศาสตร์	2536

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ Avian Medicine, Veterinary Epidemiology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย	**ระยะเวลาดำเนินการ**	**แหล่งทุน**
1. การศึกษาความชุกของเชื้อ *ออร์นิโธแบคทีเรียม ไรโนเทรเคียอัลเลย์* ในพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทย	1 ปี ตุลาคม 2547 – กันยายน 2548	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2548
2. การตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคออร์นิโธแบคเทอริโอซิสในไก่เนื้อและไก่พันธุ์เนื้อ	8 เดือนมีนาคม 2548 – ตุลาคม 2548	บริษัท Eli Lilly Asia Inc. – Thailand branch)
3. การศึกษาความสามารถในการติดเชื้อเข้าเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis กับการปรากฏของยีนที่มีหน้าที่ในการติดเชื้อเข้าเซลล์	1 ปีตุลาคม 2547 – กันยายน 2548	ทุนเงินงบประมาณแผ่นดิน 2547
4. ความสัมพันธ์ของความสามารถในการติดเชื้อเข้าเซลล์ของเชื้อ *Campylobacter jejuni*กับการปรากฏของยีนที่เกี่ยวข้องในการติดเชื้อเข้าเซลล์	2 ปี มิถุนายน 2548 - พฤษภาคม 2550	ทุนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
5. การปกป้องการใช้ซัลโมเนลลาในไก่เนื้อโดยใช้ competitive exclusion” (ทุนสนับสนุนการวิจัยจาก	6 เดือนมกราคม 2549 – มิถุนายน 2549	บริษัท ITOCHU Corporation and ITOCHU Feed Mills Co., Ltd
6. การพัฒนาและทดสอบคุณลักษณะของไวโรโซมที่เตรียมจากเชื้อไวรัสเอเวี่ยนอินฟลูเอ็นซ่า ชนิดเอช5เอ็น1 (H5N1)	1 ปี มีนาคม 2549 – กุมภาพันธ์ 2550	ทุนสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรม

		และ เทคโนโลยีชีวภาพ แห่งชาติ
7. การพัฒนาวิธีการทดสอบอีไลซาและการยับยั้งการตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจสอบแอนติบอดีต่อของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ	1 ปี ตุลาคม 2549 – กันยายน 2550	กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2549
8. การป้องกันการติดเชื้อบิดในไก่โดยใช้ Immunoglobulin Y จากไข่ไก่	3 เดือน มกราคม 2550 – มีนาคม 2550	ทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงาน คณะกรรมการ อุดมศึกษา (สกอ.)
9. ประสิทธิภาพของวัคซีนซัลโมเนลลาเชื้อตายในการป้องกันการติดเชื้อ *Salmonella* Enteritidis	8 เดือน กรกฎาคม 2550 – กุมภาพันธ์ 2551	บริษัท กรุงเทพ เวทดรัก จำกัด
10. การเปรียบเทียบวัคซีนนิวคาสเซิลเสตรนที่แตกต่างกันในการป้องกันโรคนิวคาสเซิลในไก่	6 เดือน พฤศจิกายน 2550– พฤษภาคม 2551	บริษัท กรุงเทพ เวทดรัก จำกัด
11. การศึกษาการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในไข่ไก่เพื่อการบริโภคและอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียปนเปื้อนในฟาร์มไก่ไข่	2 ปี ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552	งบประมาณแผ่นดิน 2551
12. การสำรวจยีนดื้อยาของ *อี. โคไล* ที่แยกได้จากไก่เนื้อในประเทศไทย	8 เดือน กุมภาพันธ์ 2552 – กันยายน 2552	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2552
13. การทดสอบความไวของลินโคสเปคติน 100 ด้วยวิธี disk diffusion และวิธี MIC ต่อ	3 เดือน พฤษภาคม –	บริษัท ไฟเซอร์

เชื้อ *Ornithobacterium rhinotracheale*	สิงหาคม 2552	(ประเทศไทย) จำกัด
14. ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *Avibacterium paragallinarum*ที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทย	1 ปี ตุลาคม 2552 – กันยายน 2553	ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
15. การพัฒนาวิธีทดสอบอีไลซาและวิธีทดสอบการตกตะกอนของซีรัมสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุม*	1 ปี ตุลาคม 2552 – กันยายน 2553	ทุนรัชดาภิเษกสมโภชจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2552
16. ผลของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกผลทุเรียนต่อระบบภูมิคุ้มกันและโคเลสเตอรอลในไก่	1 ปี ตุลาคม 2552 – กันยายน 2553	ทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2553
17. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน NOBILIS REO+IB+G+ND	1 ปี ธันวาคม 2552 – พฤศจิกายน 2553	บริษัท อินเตอร์เว็ท (ประเทศไทย) จำกัด
18. การศึกษายีนที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อ*Pasteurella multocida* ที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทย	10 เดือน ธันวาคม 2552 – กันยายน 2553	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2553
19. ประสิทธิภาพของวัคซีนซัลโมเนลลาเชื้อเป็นและเชื้อตายต่อการติดเชื้อ *ซัลโมเนลลา* เอนเตอร์รัยติดิส	12 เดือน 30 เมษายน 2553- 31 มีนาคม 2554	บริษัท โลห์มัน แอนิมัล เฮลธ์ (ประเทศไทย) จำกัด
20. คุณลักษณะทางโมเลกุลและการพัฒนาชุดทดสอบอีไลซาในการวินิจฉัยโรคเลือดจางในไก่	2 ปี มิถุนายน 2553 - พฤษภาคม 2555	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
21. การศึกษาการส่งผ่านเชื้อ กระบวนการ	5 ปี 2553-2558	โครงการปริญญาเอก

เกิดโรค และกลยุทธ์ในการป้องกันโรคติดเชื้อ แคมไพโลแบคเตอริโอซิสในไก่		กาญจนาภิเษก (คปก.)
22. ประสิทธิภาพของวัคซีน Poulvac IC ABC Oil และ Poulvac IC ABC Gel ในการป้องกันการติดเชื้อ *Avibacterium paragallinarum*	12 เดือน พฤษภาคม 2553- เมษายน 2554	บริษัท ไฟเซอร์ (ประเทศไทย) จำกัด
23. ผลของสารสกัดเจลพอลิแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน *Durio zibethinus* ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและโคเลสเตอรอลในไก่	1 ปี ตุลาคม 2552 – กันยายน 2553	ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
24. การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี disk sensitivity และวิธี minimum inhibitory concentration ต่อ *ออร์นิโธแบคทีเรียม ไรโนเทรเคียอัลเลย์*	6 เดือน ตุลาคม 2553- เมษายน 2554	บริษัท โนวาร์ติส จำกัด
25. การทำลายฤทธิ์ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยยาฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ	6 เดือน ธันวาคม 2553- มิถุนายน 2554	บริษัท โนวาร์ติส จำกัด
26. ประสิทธิภาพของวัคซีนเชื้อตายซัลโมเนลลาต่อการติดเชื้อ *ซัลโมเนลลา กัลลินารุม*	12 เดือน มิถุนายน 2554- พฤษภาคม 2555	ทุนสนับสนุนการวิจัย บริษัท ฟิลโบร์ (ประเทศอิสราเอล) จำกัด
27. ประสิทธิภาพของวัคซีนซัลโมเนลลาต่อการติดเชื้อ *S.* Enteritidis	12 เดือน มีนาคม 2555- กุมภาพันธ์ 2556	ทุนสนับสนุนการวิจัย บริษัท อินเตอร์เว็ท (ประเทศไทย) จำกัด
28. การเปรียบเทียบความคงตัวของอะมอกซีซิลลิน	6 เดือน พฤษภาคม 2555- พฤศจิกายน 2556	บริษัท เวอร์แบค (ประเทศไทย) จำกัด
29. การตกค้างของ kitasamicin ในไก่เนื้อ	12 เดือน กันยายน 2555- สิงหาคม 2556	บริษัท ออคต้าเมมโมเรียล จำกัด

30. ประสิทธิภาพของวัคซีน Volvac AC gold Emul (โคไรซาชนิดสื่อน้ำมัน) และ Volvac AC gold Bacterin (โคไรซาชนิดสื่อเจล) ในการป้องกันการติดเชื้อ *Avibacterium paragallinarum*	ระยะเวลา 12 เดือน ตุลาคม 2555- กันยายน 2556	บริษัท Boehringer Ingelheim จำกัด
31. การเปรียบเทียบโปรแกรมวัคซีนนิวคาสเซิลในไก่เนื้อ”	ระยะเวลา 12 เดือน ธันวาคม 2555- พฤศจิกายน 2556	บริษัท ฟิลโบร์ (ประเทศอิสราเอล)
32. ประสิทธิภาพของวัคซีนของวัคซีน IC oil และ IC gel ในการป้องกันการติดเชื้อ *Avibacterium paragallinarum*	12 เดือน ธันวาคม 2555- พฤศจิกายน 2556	บริษัท Pfizer Animal Health จำกัด
33. การใช้ competitive exclusion (CE) ในการป้องกันการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในสัตว์ปีก	12 เดือน ตุลาคม 2555- กันยายน 2556	ทุนสนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ระยะเวลา
34. การพัฒนาชุดทดสอบอีไลซาสำหรับการตรวจวัดแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวม	12 เดือน ตุลาคม 2556-กันยายน 2557	รัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
35. ประสิทธิภาพของวัคซีนซัลโมเนลลาต่อการติดเชื้อซัลโมเนลลา” ทุนสนับสนุนการวิจัย	12 เดือน มิถุนายน 2557-พฤษภาคม 2558	บริษัท โซเอติส (ประเทศไทย) จำกัด

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ไม่เกิน 5 ปี)

7.2.1 Sohsuebngarm, D., Sasipreeyajan, J., Nithiuthai, S. and Chansiripornchai, N. 2014 The Efficacy of Artisunate, Chloroquin, Doxycyclin, Primaquine and Combination of Artisunate and Primaquin against Avian Malaria in Broilers. J. Vet Med. Sci (inpress)

7.2.2 Sarueng, E., Wanasawaeng, W., Sasipreeyajan, J. and Chansiripornchai, N. 2014. Efficacy of Live Infectious Bronchitis Vaccine Programs against Infection by QX-like Strain of Infectious Bronchitis Virus. Thai J. Vet. Med. 44(2): 187-194.

7.2.3 Sarachai, C., Sasipreeyajan, J. and Chansiripornchai, N. 2014. Characterization of Avian Influenza H5N1 Virosome. Pakistan Vet J. 34(2): 201-204.

7.2.4 Noonkhokhetkong, T., Chukiatsiri, K., Sasipreeyajan, J. and Chansiripornchai, N. 2013. Determination of Antimicrobial Susceptibility, Antimicrobial Resistance Genes and *In Vivo* Testing of Antimicrobial Susceptibility of *Avibacterium paragallinarum.*43(4): 525-531.

7.2.5 Wanasawaeng, W., Buatong, J., Chaichote, S. andChansiripornchai, N. 2013. Molecular characterization of chicken infectious anemia virus outbreaks during 2008-2011 in Thailand. Thai J Vet Med. 43(4): 497-520.

7.2.6 Bengtong, P.,Thomrongsuwannakij, T. and Chansiripornchai, N. 2013. Inactivation of Infectious Bronchitis Virus with various kinds of disinfectants. Thai J. Vet. Med. 43: 405-409.

7.2.7 Chansiripornchai, N., Pongthanes, S., Chansiripornchai, P. and Wanasawaeng, W. 2013. Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Antibodies against Chicken Infectious Anemia Virus. Thai J. Vet. Med. 43: 353-357.

7.2.8 Kitprathaung, N., Ngamrojanavanich, N., Chansiripornchai, P., Pongsamart, S. and Chansiripornchai, N. 2013. Effect of polysaccharide gel extracted from *Durio zibethinus* rind on immune responses, bacteria counts and cholesterol quantities in chickens. Thai J. Vet. Med. 43: 251-258.

7.2.9 ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย และนิวัตร จันทร์ศิริพรชัย. 2556. รายงานสัตว์ป่วย : ประสิทธิผลและผลข้างเคียงของอะมิทราซในการรักษาโรคขี้เรื้อนขุมขนแบบทั่วตัวในสุนัข. สัตวแพทยสาร. 64: 29-40.

7.2.10 Chansiripornchai, N., Wanasawaeng, W., Wongchidwan, N., Chaichote, S. and Sasipreeyajan, J. 2012. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Chicken Infectious Anemia Virus. Thai J. Vet. Med. 533-536.

7.2.11 Chukiatsiri, K., Sasipreeyajan, J., Blackall, P.J., Yuwatanichsampan, S. and Chansiripornchai, N. 2012. Serovar identification, antimicrobial sensitivity and virulence of *Avibacterium paragallinarum* isolated from chickens in Thailand. Avian Dis. Avian Dis. 56: 359-364.

7.2.12 Chansiripomchai, P., Chansiripomchai, N. and Pongsamart, S. 2012. Antibacterial Activity of Polysaccharide Gel from Durian Rinds against *Staphylococcus Intermedius* Isolated from Dogs. Indian Vet. J. 89 (2) : 74 – 75

7.2.13 Chansiripornchai, N., Mooljuntee, S. and Boonkhum, P. 2011. Antimicrobial Sensitivity of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Isolated from Chickens During 2007-2010. Thai J. Vet. Med. 41(4): 519-522.

7.2.14 Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A. and Sasipreeyajan, J. 2011. Sequence analysis of S1 genes of infectious bronchitis virus isolated in Thailand during 2008-2009: Identification of natural recombination in the field isolates. Virus Genes. 43(2): 254-260.

7.2.15 Mooljuntee, S. and Chansiripornchai, N. 2011. The toxin producing genes of Pasteurella multocida isolated from chickens in Thailand. Proc. 10th Chulalongkorn University Veterinary Annual conference, April 20-21, 2011. p. A15.

7.2.16 Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A.and Sasipreeyajan, J.2011. Development of RT-PCR Combined with Nested PCR for the Detection of Infectious Bronchitis Virus Development and application of one-step RT-PCR combined with nested PCR for detection of infectious bronchitis virus. Indian Vet. J. 88(3): 15-17.

7.2.17 Wanasawaeng, W. and Chansiripornchai, N. 2010. Molecular differentiation of Infectious Laryngotracheitis virus among Chick Embryo Origin, Tissue Culture Origin, and Field Isolates. Thai J. Vet. Med. 40(4): 393-398.

7.2.18 Chukiatsiri, K., Chotinun, S. and Chansiripornchai, N. 2010. An Outbreak of *Avibacterium paragallinarum* serovar B in a Thai Layer Farm. Thai J. Vet. Med. 40(4): 441-444.

7.2.19 Mooljuntee, S., Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. 2010. Prevalence of the Cellular and Molecular Antimicrobial Resistance against *E. coli* Isolated from Thai Broilers. Thai J. Vet. Med. 40(3):311-315.

7.2.20 Rawiwet, V., Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. 2010. Comparison of the efficacy of enrofloxacin against *Escherichia coli* or *Pasteurella multocida* infection in layer chickens. Thai J. Vet. Med. 40(3):297-301.

7.2.21 Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. 2010. Treatment of chronic generalized demodicosis in dogs using doramectin and amitraz. Indian Vet. J. 87(11): 1139-1141.

7.2.22 Sarachai, C., Sasipreeyajan, J. and Chansiripornchai, N. 2010. Avian influenza virus (H5N1) inactivation by Binary Ethylenimine. Thai J. Vet. Med. 40(1):30-34.

7.2.23 Sarachai, C., Chansiripornchai, N. and Sasipreeyajan, J. 2010. Efficacy of infectious bursal disease vaccine in broiler chickens receiving different vaccination programs. Thai J. Vet. Med. 40(1):1-8.

7.2.24 Pohuang, T., Chuachan, K., Chansiripornchai, N. and Sasipreeyajan, J. 2009. Efficacy of various strains of infectious bronchitis vaccine against nephropathogenic infectious bronchitis virus isolated from chickens in Thailand. Thai J. Vet. Med. 39(4): 319-324.

7.2.25 Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. 2009. Efficacy of permetrin at a prophylactic dose for ectoparasite infection. Thai J. Vet. Med. 39(4): 343-347.

7.2.26 Rawiwet, V.and Chansiripornchai, N. 2009. The efficacy of *E. coli* aroA-live vaccine in broilers against avian *E. coli* serotype O78 infection. Thai J. Vet. Med. 39(4): 337-342.

7.2.27 Chansiripornchai, N. 2009. Comparative Efficacy of Enrofloxacin and Oxytetracycline for different administration times in broilers after experimental infection with avian pathogenic *Escherichia coli.*Thai J. Vet. Med. 39(3): 231-236.

7.2.28 Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A.and Sasipreeyajan, J.2009. Pathogenesis of a new genotype infectious bronchitis virus isolated in chickens. Indian Vet J. 86(11): 1110-1112.

7.2.29 Chukiatsiri, K, Sasipreeyajan, J., Neramitmansuk, W. and Chansiripornchai, N. 2009. Efficacy of Autogenous Killed Vaccine of *Avibacterium paragallinarum*. Avian Dis. 53(3): 382-386.

7.2.30 Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A.and Sasipreeyajan, J.2009. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from the recent outbreaks in commercial flocks in Thailand. J. Vet. Sci. 10(2): 219-223.

7.2.31 Chansiripornchai, N., and Sasipreeyajan, J. 2009. PCR detection of four virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilitiesof adhesion to and invasion of INT-407 cells. J. Vet. Med. Sci. 71(6): 839-844.

7.2.32 Chansiripornchai, N. and Sasipreeyajan, J. 2009. Comparison of the efficacy of the immune complex and conventionally live vaccine in broilers against infectious bursal disease infection. Thai J. Vet. Med. 39(2): 115-120.

7.2.33 Wanasawaeng, W., Tawatsin, A., Sasipreeyajan, J., Poomvises, P. and Chansiripornchai, N. 2009. Development of inactivated Newcastle disease vaccine using palm oil as an Adjuvant. Thai J. Vet. Med. 39(1): 9-16.

7.2.34 Chansiripornchai, N., Chukiatsiri, K. and Sasipreeyajan, J. 2009. Efficacy of the autogenous and commercial killed vaccines prepared form aluminium hydroxide gel adjuvant of *Avibacterium paragallinarium*. Proc. The 5th International Poultry Science Conference 2009. 10-13 March 2009, Taba, Egypt. p. 218.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.3.1 เรื่อง “การพัฒนาชุดทดสอบอีไลซาสำหรับการตรวจวัดแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวม” ทุนสนับสนุนการวิจัย รัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระยะเวลา 12 เดือน ตุลาคม 2556-กันยายน 2557

7.3.2 เรื่อง “ประสิทธิภาพของวัคซีนซัลโมเนลลาต่อการติดเชื้อซัลโมเนลลา” ทุนสนับสนุนการวิจัย บริษัท โซเอติส (ประเทศไทย) จำกัด ระยะเวลา 12 เดือน มิถุนายน 2557-พฤษภาคม 2558

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) รศ.ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Assoc.Prof.Dr. Rungtip Chuanchuen

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-7498-00061-68-0
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
   ตำแหน่งวิชาการ รองศาสตราจารย์
   ตำแหน่งบริหาร ผู้อำนวยการศูนย์ติดตามการดื้อยาของโรคอาหารเป็นพิษ
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่
   ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   39 ถ.อังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 022189578 โทรสาร 022189577
   e-mail: rchuanchuen@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับพ.ศ.
Colorado State University	Ph.D.	Microbiology (Bacterial genetics)	2547
Colorado State University	M.S.	Animal sciences (Food safety)	2542
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	สพ.บ.	สัตวแพทยศาสตร์	2536

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

6.1 Moleculargenetics of bacteria

6.2 Molecular mechanisms of antimicrobial resistance

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการ

ชื่อโครงการวิจัย	**ระยะเวลาดำเนินการ**	**แหล่งทุน**
1. การศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของ MexXY และ OpmG ในการขับออกยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในซูโดโมนาสแอรูจิโนซ่า	สิงหาคม 2548 – กรกฎาคม2550	สำนักงานกองทุนวิจัย (สกว)
2. การเฝ้าระวังการดื้อต่อยาฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะของ *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย	ตุลาคม2548 – กันยายน2549	สภาวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2549
3. การผลิตโพลีโครนอลแอนตีบอดี้ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน ของระบบมัลติดรักซ์อิฟรักซ์ในเชื้อสูโดโมนาสแอรูจิโนซา	สิงหาคม2549 – กรกฎาคม2550	ทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. การดื้อยาและการถ่ายทอดยีนดื้อยาของจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะสำหรับสัตว์ที่จำหน่ายในประเทศไทย	ตุลาคม2549 – กันยายน2550	สภาวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2550
5. การตรวจหาและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาในเชื้อซาลโมเนลล่า	เมษายน2550 – มีนาคม255	ทุนรัชดาภิเษกสมโภชจุฬาลงกรณ์

ที่แยกได้จากไก่และสุกรในประเทศไทย		มหาวิทยาลัย
6. การศึกษาพันธุกรรมการดื้อยาและปัจจัยในการก่อความรุนแรงของโรคของเชื้อซาลโมเนลล่า เอ็นเทอริก้าที่แยกได้จากห่วงโซ่อาหาร	พฤษภาคม 2551- พฤษภาคม 2553	สำนักงานกองทุนวิจัย (สกว)
7. การศึกษา integrating conjugative elements (ICEs) ในเชื้อวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งทะเลเพาะเลี้ยงในประเทศไทย	กุมภาพันธ์- กันยายน 2552	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
8. การศึกษาอินทริกรอนส์ใน*Pseudomonas aeruginosa*และ *Acinetobacter baumannii*		ทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ไม่เกิน 5 ปี)

7.2.1 Chuanchuen, R., S. Khemtong, and P. Padungtod. 2007. Occurrence of *qacE/qacEΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 38(5):855-862มี impact factor 1.0

7.2.2 Khemtong, S. and R. Chuanchuen. 2008.Class 1 Integrons and *Salmonella* Genomic Island 1 among *Salmonellaenterica* Isolated from Poultry and Swine. Microb. Drug Resist. 14(1):65-70**.** มีimpact factor 2.4

7.2.3 Chuanchuen, R., Chailai Koowatananukul and Sirintip Khemtong. 2008. Characterization of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates. Southeast Asian J Trop Med Public Health.39(3):419-424.

7.2.4 Chuanchuen, R., P. Pathanasophon, S. Khemtong, W. Wannaprasat and P. Padungtod. 2008. Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in Salmonella isolates obtained from poultry and swine in Thailand. J. Vet. Med. Sci. 70(6):595-601มี impact factor 0.85

7.2.5 Chuanchuen, R. and W. Wannaprasat. 2008.Functional characterization of MexXY and OpmG in aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Southeast Asian J Trop Med Public Health.39(1):115-22.

7.2.6 Chuanchuen, R.,W. Wannaprasat, K. Ajariyakhajorna and H.P. Schweizer. 2008.Role of the MexXY multidrug efflux pump in moderate aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from *Pseudomonas* mastitis. Microbiol. Immunol. 52(8):392-8. มี impact factor 2.4

7.2.7 Ekkapobyotin, C, P. Padungtod and R. Chuanchuen.2008**.** Antimicrobial Resistance of *Campylobacter coli* Isolates from Swine in Thailand. International of Food Microbiology. 128: 325-328.

7.2.8 Chuanchuen, R. and P. Padungtod. 2009. Antibiotic Resistance Genes in *Salmonellaenterica* Isolates from Poultry and Swine in Thailand. J. Vet. Med. Sci. 71(10): 1349-1355.

7.2.9 Wannaprasat W, Padungtod P, Chuanchuen R. 2011. Class 1 integrons and virulence genes in Salmonella enterica isolates from pork and humans. Int. J. Antimicrob. Agents. 37(5):457-461.

7.2.10 **Chuanchuen R**, Ajariyakhajorn K, Koowatananukul C, Wannaprasat W, Khemtong S, Samngamnim S. 2011. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from dairy cows.Foodborne Pathog. Dis. 7(1):63-69.

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย
   ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Assoc.Prof.Dr.Piyarat Chansiripornchai
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน3-1006-00410-98-0
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
   ตำแหน่งวิชาการ รองศาสตราจารย์ (Associate Professor)
   ตำแหน่งบริหาร หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่
   ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   39 ถ.อังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 02-218-9725 โทรสาร 02-218-9731 โทรศัพท์เคลื่อนที่ 081 920 3617
   Email: spiyarat@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับพ.ศ.
Tokyo University of Agriculture and Technology (Japan)	Ph.D.	Animal Production	2542
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	สพ.บ. (Hons)	สัตวแพทยศาสตร์	2537

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ พิษวิทยาของสารกำจัดแมลงกลุ่มต่างๆ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
   7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย	**ระยะเวลาดำเนินการ**	**แหล่งทุน**
1. ผลของแผ่นปิดแผลของเจลทุเรียนต่อการปิดของบาดแผลผิวหนังบนตัวสุกรและสุนัข	1 ปี ตุลาคม 2547 – กันยายน 2548	งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2547-2548

   7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ไม่เกิน 5 ปี)

   7.2.1 Chansiripornchai, N., Pongthanes, S., Chansiripornchai, P. and Wanasawaeng, W. 2013. Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Antibodies against Chicken Infectious Anemia Virus. Thai J. Vet. Med. 43: 353-357.

   7.2.2 Kitprathaung, N., Ngamrojanavanich, N., Chansiripornchai, P., Pongsamart, S. and Chansiripornchai, N. 2013. Effect of polysaccharide gel extracted from *Durio zibethinus* rind on immune responses, bacteria counts and cholesterol quantities in chickens. Thai J. Vet. Med. 43: 251-258.

   7.2.3 ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย และนิวัตร จันทร์ศิริพรชัย. 2556. รายงานสัตว์ป่วย : ประสิทธิผลและผลข้างเคียงของอะมิทราซในการรักษาโรคขี้เรื้อนขุมขนแบบทั่วตัวในสุนัข. สัตวแพทยสาร. 64: 29-40.

7.2.4 Chansiripomchai, P., Chansiripomchai, N. and Pongsamart, S. 2012. Antibacterial Activity of Polysaccharide Gel from Durian Rinds against *Staphylococcus Intermedius* Isolated from Dogs. Indian Vet. J. 89 (2) : 74 – 75

7.2.5 Chansiripornchai, N., Mooljuntee, S. and Boonkhum, P. 2011. Antimicrobial Sensitivity of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Isolated from Chickens During 2007-2010. Thai J. Vet. Med. 41(4): 519-522.

7.2.6 Mooljuntee, S., Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. 2010. Prevalence of the Cellular and Molecular Antimicrobial Resistance against *E. coli* Isolated from Thai Broilers. Thai J. Vet. Med. 40(3):311-315.

7.2.7 Mooljuntee, S., Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. 2010. Prevalence of the Cellular and Molecular Antimicrobial Resistance against *E. coli* Isolated from Thai Broilers. Thai J. Vet. Med. 40(3):311-315.

7.2.8 Rawiwet, V., Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. 2010. Comparison of the efficacy of enrofloxacin against *Escherichia coli* or *Pasteurella multocida* infection in layer chickens. Thai J. Vet. Med. 40(3):297-301.

7.2.9 Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. 2010. Treatment of chronic generalized demodicosis in dogs using doramectin and amitraz. Indian Vet. J. 87(11): 1139-1141.

7.2.10 Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. 2009. Efficacy of permetrin at a prophylactic dose for ectoparasite infection. Thai J. Vet. Med. 39(4): 343-347.

7.2.11 นิวัตร จันทร์ศิริพรชัยกฤดา ชูเกียรติศิริปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัยและ อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์. 2551 (2008). ผลของสารสกัดจากผลมะขามป้อมต่อการติดเชื้อซัลโมเนลลาไทฟิมูเรียมในไก่เนื้อ. สัตวแพทยสาร. 59(1-2): 102-109.

7.2.12 ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย และ นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย. 2551 (2008). ผลของคาร์บาริลในขนาดที่ใช้รักษาโรคปรสิตภายนอกต่อค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและพยาธิสภาพของตับในไก่ไข่. สัตวแพทยสาร. 59(1-2): 1-11.

7.2.13 Chansiripornchai, N., Chansiripornchai, P. and Pongsamart, S. 2008. A Preliminary Study of Polysaccharide Gel Extracted from the Fruit-Hulls of Durian (*Durio zibethinus* Murr.) on Immune Responses and Cholesterol Reduction in Chicken. Acta Horticulturae. 786: 57-60.

7.2.14 Chansiripornchai, P. and Chansiripornchai, N. 2008. Treatment of Generalized demodicosis in a dog using Ivomectin. Indian Vet. J. 85(3): 315-316.

7.2.15 พรรณพิชญา ฟุ้งวิทยา ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย ชาญณรงค์ รอดคำ และ อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์. 2550 (2007). ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากผล

มะขามป้อมต่อเชื้อ*ซัลโมเนลลา* ไทฟิมูเรียมที่แยกได้จากไก่. ประมวลการประชุมวิชาการสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 33. 31 ต.ค. – 3 พ.ย. 50. โรงแรมโซฟิเทล เซ็นทารา แกรนด์ กรุงเทพฯ. หน้า 269-272.

7.2.16 Chansiripornchai, N., Chansiripornchai, P. and Pongsamart, S. 2007. A Preliminary Study of Polysaccharide Gel Extracted from the Fruit-Hulls of Durian (*Durio zibethinus* Murr.) on Immune Responses and Cholesterol Reduction in Chicken. Proceedings on International workshop on Medicinal and Aromatic plants. January 15-18, 2007. Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand. p. 105.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.3.1 เรื่อง “การพัฒนาชุดทดสอบอีไลซาสำหรับการตรวจวัดแอนติบอดีต่อโรคหวัดหน้าบวม” ทุนสนับสนุนการวิจัย รัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระยะเวลา 12 เดือน ตุลาคม 2556-กันยายน 2557

7.3.2 เรื่อง “ประสิทธิภาพของวัคซีนซัลโมเนลลาต่อการติดเชื้อซัลโมเนลลา” ทุนสนับสนุนการวิจัย บริษัท โซเอติส (ประเทศไทย) จำกัด ระยะเวลา 12 เดือน มิถุนายน 2557-พฤษภาคม 2558