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