ในหลายๆ ประเทศ โดยส่วนใหญ่แล้วมักจะได้ผลดีต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ในไก่ แต่ไม่ค่อยได้ผลดีมากนักในการกำจัดเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่ ซึ่งการพัฒนาหา Protiotic ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Campylobacter* นั้นเปิดกว้างเพื่อทั้งการศึกษาวิจัยอีกมาก

ในความหลากหลายของชีวพันธุ์ในแถบประเทศเขตร้อนชื้น ตั้งประเทศไทย มีความร้อนชื้น, ส่วนประกอบของอาหารที่ให้ไก่กินจะเป็นตัวคัดเลือกโดยธรรมชาติเบื้องต้น, สภาพแวดล้อม,พันธุ์ไก่ โดยเฉพาะไก่บ้านพื้นเมือง (Native chicken) น่าจะมีชนิดของ Bacteria ที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Campylobacter* ได้ดังนั้นการพัฒนาหา bacteria ที่มีคุณสมบัติเป็น Probiotic ในไก่ เพื่อที่จะได้ใช้เป็นวิธีป้องกันการ colonise ของเชื้อ *Campylobacter* ในไก่นับว่าเป็นปัจจัยเร่งด่วนแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในแง่การผลิตสัตว์เพื่อการค้าระหว่างประเทศหรือแม้แต่สุขภาพโดยรวมของประชาชน

วัตถุประสงค์

1.เพื่อให้ได้ Bacteria ที่มีความสามารถเป็น Probiotic bacteria ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Campylobacter* spp.

2.เพื่อทราบถึงความแตกต่างของ Normal flora Profile ในระบบทางเดินอาหารของไก่ในพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ไก่เนื้อ

3.เพื่อทราบถึงผลของ isolated probiotic bacteria ต่อ *Campylobacter* ในไก่ทดลอง

วิธีการทดลองและผลการทดลอง

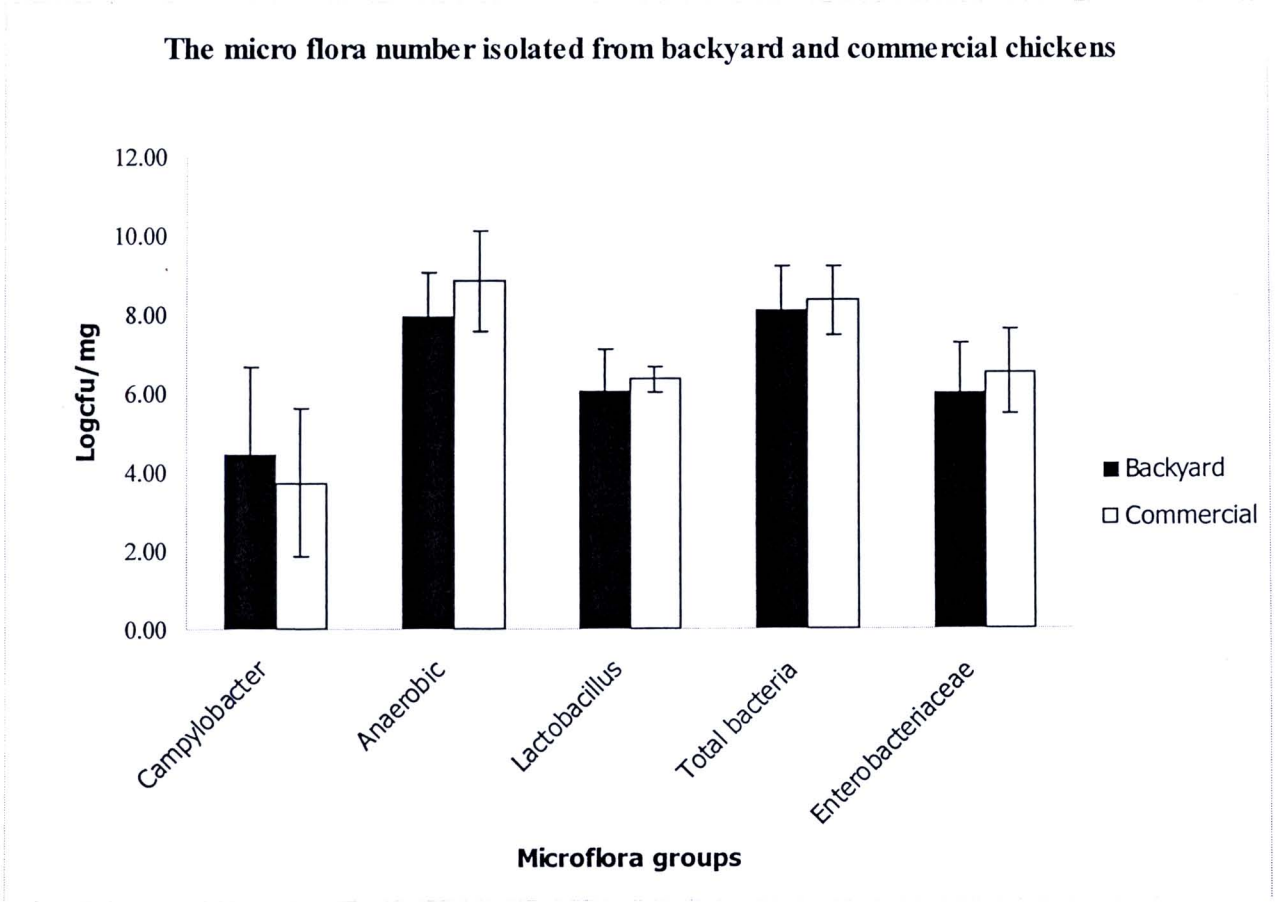
---

1. การแยก bacteria จากไก่ที่ปราศจาก *Campylobacter* infection

ไก่พื้นบ้าน 10-15 ตัว จากแหล่งเลี้ยงหลังบ้าน และฟาร์มเพื่อการค้าที่อยู่รายรอบจังหวัดขอนแก่นอย่างน้อย 17 แห่งจะถูกสุ่มมาพิสูจน์เพื่อเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* โดยวิธีเพาะเลี้ยงโดยวิธีเพาะแยกเชื้อโดยแยกกลุ่มเป็นไก่หลังบ้าน (Backyard) และไก่พันธุ์เนื้อ (Broiler) ไก่ทั้งหมดจะถูกทำให้ตายอย่าง Ceacum จะถูกเก็บเพื่อแยกเชื้อ Normal flora ในกลุ่มต่างๆ เช่น Lactobacillus, Enterobacteriaeceae, Bacteriodes, etc. เชื้อจะถูกกักเก็บไว้ใน stock ที่ (-20°C) เพื่อจะทดสอบคุณสมบัติที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Campylobacter* ต่อไป

ผลการทดลอง จากการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อ Campylobacter พบว่าไก่ที่เลี้ยงหลังบ้านมีปริมาณเชื้อ Campylobacter สูงกว่าไก่ที่เลี้ยงในฟาร์ม 0.73 log cfu/g ขณะที่เชื้อ Anaerobic, Lactobacillus, Ttotal bacteria และ Enterobacteriaceae ในฟาร์มมีปริมาณสูงกว่าที่พบในไก่หลังบ้าน 0.87, 0.27, 0.21 and 0.53 log cfu/g ตามลำดับ (รูปภาพที่ 1)

รูปภาพที่ 1. The Microflora bacteria numbers from reared (dark bar) and commercial (white bar) chickens. Group 1, 2, 3, 4 and 5 were represented as a group of Campylobacter, Anareobic, Lactobacillus, Enterobacteriaceae and Total bacteria numbers respectively. *, different significant at $p< 0.05$.



2. การศึกษาความแตกต่างระหว่าง Normal flora profile ของไก่พันธุ์พื้นบ้านและไก่พันธุ์เนื้อ

นำตัวอย่างจากContents ในลำไส้ตันไก่ทั้ง 2 ชนิดที่มีการเลี้ยง 2 รูปแบบมาศึกษาข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพโดยสุ่มนำ Content จากลำไส้ตันไก่ที่มีผลการคัดแยกเชื้อพบว่ามีเชื้อ Campylobacterและไก่ที่ปลอดจากเชื้อ Campylobacter เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างไก่ที่มีผลการปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ Campylobacter และการศึกษาเชื้อ Campylobacter ที่แยกได้จากไก่ที่ในระบบฟาร์มและไก่ที่เลี้ยงหลังบ้าน รวมทั้งศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ Campylobacter ที่มาจากไก่ต่างชนิดการเลี้ยงกัน โดยวิธี RAPD และ Phytogenetic tree

2.1การทดลองศึกษาความหลากหลายของ Contents ในลำไส้ตันไก่จากไก่ที่เลี้ยงในฟาร์มและไก่ที่เลี้ยงหลังบ้าน นำ Ceacal contents ประมาณ 1 กรัมมาละลายลงใน PBS ที่ pH 7 มาปั่นที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เท Supernatants ทิ้ง แล้วนำ Pellet ที่ได้นำไปสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (RBC Real Genomics, USA) ใช้ Primers 7 ชนิด (ตารางที่ 1) แล้วนำผลผลิตนั้นไปเพิ่มจำนวนลำดับเบสตามขั้นตอนของ PCR คร่าวๆดังนี้ (1) denaturation step at 94^{o}C for 5 min; (2) 40 cycles of denaturation at 94^{o}C for 45 s, annealing at 38^{o}C for 45 s, extension at 72^{o}C for 1 min; (3) a final extension at 72^{o}C for 10 min. แล้วนำผลผลิตที่ได้ทดสอบกับ Agarose gel electrophoresis (1.0% w/v in TAE) แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide และทดสอบด้วยแสง UV แล้วนำผลิตที่ได้นำไปศึกษาหาความสัมพันธ์ด้วยเครื่อง Fingerprinting II program (BioRad, USA)

ตารางที่ 1 Primers ที่ใช้ในกระบวนการ RAPD เพื่อศึกษาความหลากหลายของ Normal flora ใน Contents ของลำไส้ตันไก่จากไก่ที่เลี้ยงในระบบฟาร์มและหลังบ้าน

Primers	Sequence
P1	CTC TCT CTC TCT CTC TTg
P2	CTC TCT CTC TCT CTC TAC
P3	CTC TCT CTC TCT CTC TgC
P4	CAC ACA CAC ACA CAA C
CP01	CAA TCg CCg T
CP06	TTC CAg CTg C
CP08	CCg CAg CCA A

ผลการทดลองพบว่า

2.1 มีความหลากหลายของ Normal flora ในลำไส้ตันไก่มากทำให้ค่า Similar Index แสดงที่อยู่ระหว่าง 29-77% โดยที่ความหลากหลายนี้สามารถถูกแบ่งเป็นกลุ่มได้คร่าวๆเป็นกลุ่มไก่ที่มีเชื้อ Campylobacter (a) และไก่กลุ่มปลอดเชื้อ Campylobacter (b) ตามผลการคัดแยกเชื้อเบื้องต้นโดยวิธีเพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งในระหว่างนี้กลุ่ม a และ b มีความเหมือนอยู่ที่ Similar Index 46% และที่น่าสนใจเมื่อในกลุ่ม a ยังสามารถถูกแยกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่มคือเป็นไก่กลุ่มมาจากไก่เลี้ยงหลังบ้าน (3a) และไก่ฟาร์ม (1aและ2a) อย่างชัดเจนและในกลุ่ม 2a ในกลุ่มใหญ่ (a) นั้นพบว่ากลุ่มไก่ที่มาจากหลังบ้านมีความเหมือนกันถึง 67% (Similar Index) และเหมือนกันมากกว่าไก่มาจากกลุ่มฟาร์ม (รูปภาพที่ 2 และ 3)

รูปภาพที่ 2

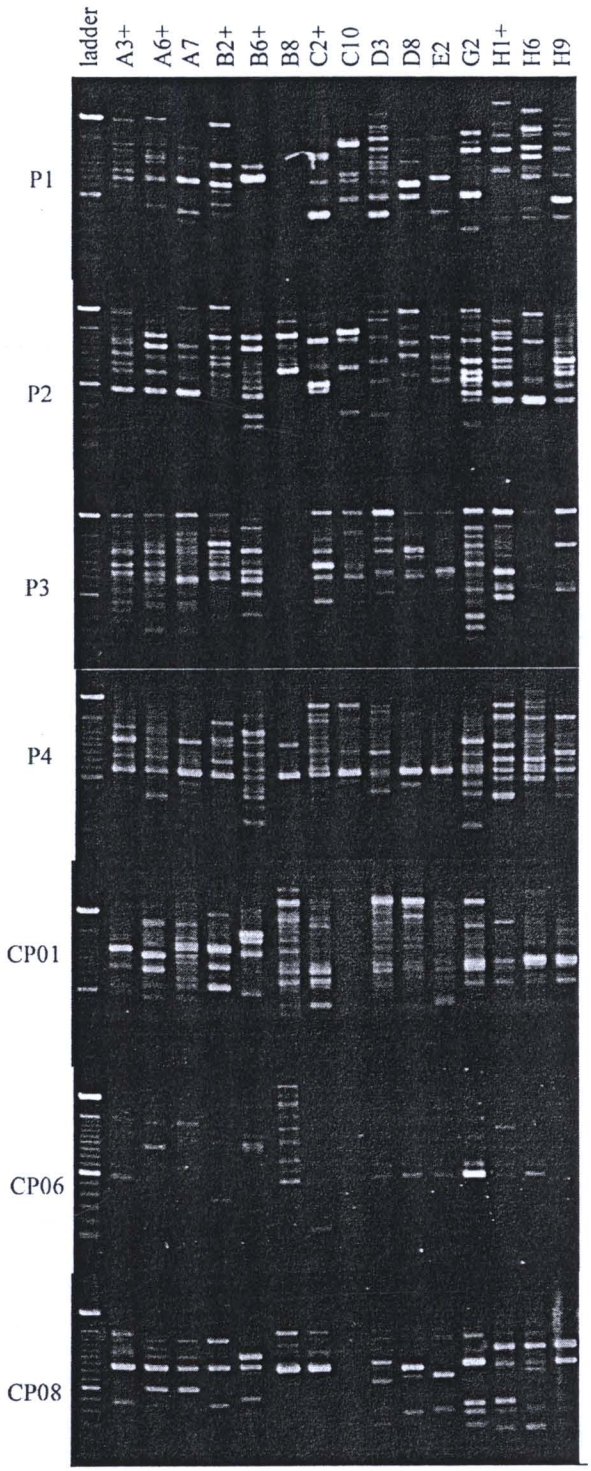
Gel image of DNA amplified using universal primers from microflora bacteria in the ceacal contents. Samples were prepared from backyard and commercial boiler chickens at 40 and 35 day, respectively.

Ladder = molecular marker

A3, A6, A7, B2, B6 and B8 were ceacal contents of chickens from backyard system.

C2, C10, D3, D8, E2, G2, H1, H6 and H9 were ceacal contents of chickens from commercial system.

+ and non above the letter were positive and negative to Campylobacter infection by using culturing method.

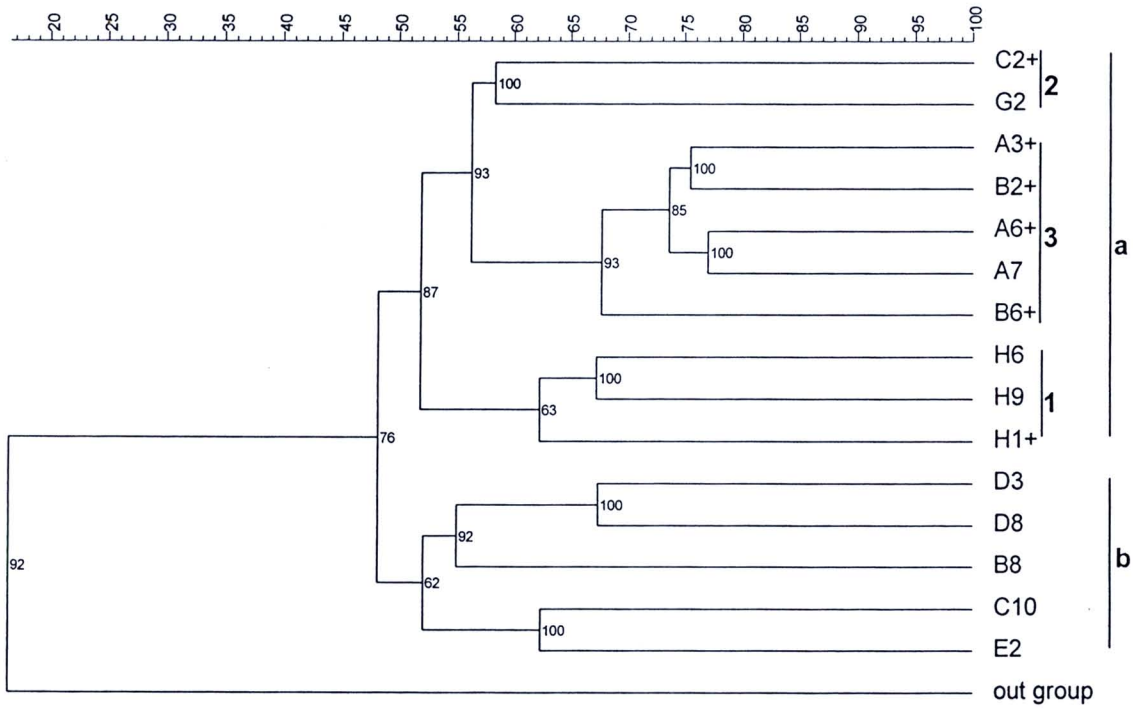

ladder
A3+
A6+
A7
B2+
B6+
B8
C2+
C10
D3
D8
E2
G2
H1+
H6
H9
P1
P2
P3
P4
CP01
CP06
CP08

รูปภาพที่ 3 Phylogenetic tree of DNA from normal bacteria in the chickens ceca constructed using Fingerprinting II program. Similarly index of normal flora in positive and negative chicken ceacal contents to Campylobacter infection separated by culturing method.

A, B were ceacal contents of chickens came from backyard chickens.

C, E, D, G, H were ceacal contents of chickens came from commercial broiler chickens.

+ and non above the letter were positive and negative to Campylobacter infection by using culturing method.



2.2 การทดลองศึกษาหาความสัมพันธ์ของเชื้อ Campylobacter ที่แยกได้จากฟาร์มและหลังบ้านโดยนำเชื้อ Campylobacter ที่แยกได้จากไก่หลังบ้านจำนวน 11 ตัวอย่าง และเชื้อ Campylobacter ที่แยกได้จากไก่ฟาร์มจำนวน 5 ตัวอย่าง นำมาศึกษาโดยการนำเชื้อตัวอย่างทั้งหลายนี้มาเพาะเชื้อตามวิธีการเพาะแยกเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเสร็จแล้วนำแต่ละตัวอย่างเชื้อไปปั่นที่ 7,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการเก็บ pellet และทิ้ง supernatant ออกไป นำ pellet mได้เข้าสู่กระบวนการแยก DNA โดยวิธีการตามที่ได้อธิบายข้างบนแล้ว ในการศึกษาความแตกต่างของเชื้อนี้ได้ใช้ primer จำนวน 13 ชนิด (ตารางที่2) แล้วดำเนินการในการทดลองดังวิธีข้างต้น

ตารางที่ 2 13 RAPD Primers sequencing used in the PCR procedure to study the relationship of Campylobacter isolation from backyard and commercial broiler chickens

Primer Name	Sequence (5' to 3')
P1	CAGGgCC CTT C
P2	TCC CGAGgCT g
P3	AAT CGGGCTGg
P4	GGG TAA CGC C
P5	CAA TCG CCG T
P6	GTT GCG ATC C
P7	CAA ACG TCGG
Cp1	CAA TCG CCG T
Cp3	CCC CAA CAA C
Cp6	TTC CAG CTG C
Cp7	TTG AAC GAT G
Cp8	CCG CAG CCA A

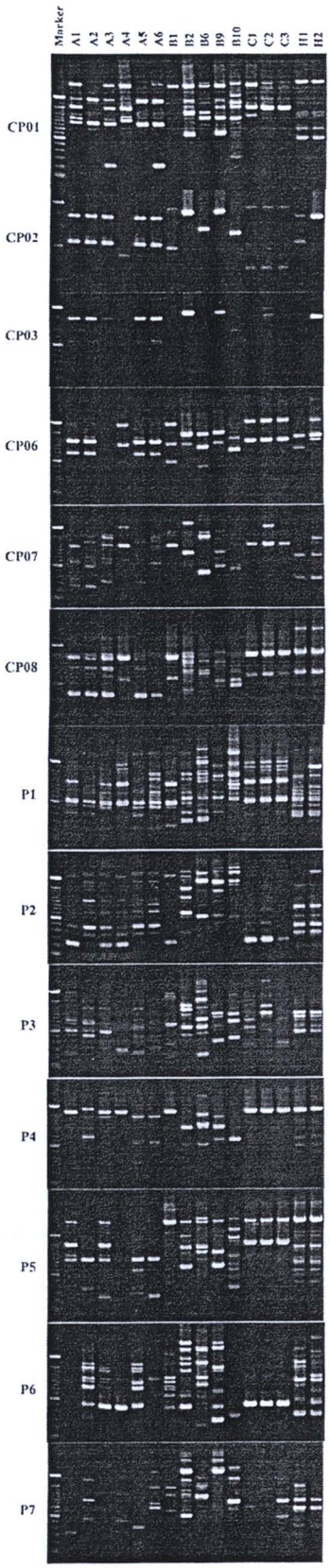
ผลการทดลอง

พบว่ามีความหลากหลายของเชื้อ Campylobacter และสามารถถูกแบ่งกลุ่มคร่าวๆได้เป็น a b c d e ตามอธิบายในภาพที่ 5 ซึ่งเป็นการแยกกลุ่มที่ชัดเจนที่ similarity index 56% 63% และ 42% ตามลำดับ (a, d และ e) เป็นเชื้อ Campylobacter ที่แยกได้จากไก่หลังบ้านขณะที่กลุ่มที่ similarity index 86% 61% (b และ c) เป็นเชื้อ Campylobacter ที่แยกได้จากไก่ในฟาร์ม (รูปภาพที่ 4 และ 5)

รูปภาพ ที่ 4 Gel image of DNA amplified from Campylobacter isolated from backyard and commercial broiler chickens

A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1, B2, B6, B9, B10samples were from back yard chickens

C, C2, C3, H1, H2 were from commercial broiler chickens



รูปภาพ ที่ 5 Phylogenetic tree showing the relationship of 16s DNA sequences found in isolated Campylobacter colonies from backyard and commercial broiler chickens. The tree was