เอกสารอ้างอิง

1. **Amit-Romach, E., D. Sklan, and Z. Uni.** 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. Poult Sci **83:**1093-8.
2. **Apajalahti, J. H., A. Kettunen, M. R. Bedford, and W. E. Holben.** 2001. Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. Appl Environ Microbiol **67:**5656-67.
3. **Chaveerach, P., L. J. Lipman, and F. van Knapen.** 2004. Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of Campylobacter jejuni/coli. Int J Food Microbiol **90:**43-50.
4. **Gong, J., R. J. Forster, H. Yu, J. R. Chambers, P. M. Sabour, R. Wheatcroft, and S. Chen.** 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. FEMS Microbiol Lett **208:**1-7.
5. **Hansson, I., E. O. Engvall, J. Lindblad, A. Gunnarsson, and I. Vagsholm.** 2004. Surveillance programme for Campylobacter species in Swedish broilers, July 2001 to June 2002. Vet Rec **155:**193-6.
6. **Hume, M. E., L. F. Kubena, T. S. Edrington, C. J. Donskey, R. W. Moore, S. C. Ricke, and D. J. Nisbet.** 2003. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. Poult Sci **82:**1100-7.
7. **Humphrey, T. J., D. G. Lanning, and G. C. Mead.** 1989. Inhibition of Campylobacter jejuni in vitro by broiler chicken caecal contents. Vet Rec **125:**272-3.
8. **Johansen, C. H., L. Bjerrum, K. Finster, and K. Pedersen.** 2006. Effects of a Campylobacter jejuni infection on the development of the intestinal microflora of broiler chickens. Poult Sci **85:**579-87.
9. **Kizerwetter-Swida, M., and M. Binek.** 2009. Protective effect of potentially probiotic Lactobacillus strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. Pol J Vet Sci **12:**15-20.
10. **Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer, and M. D. Lee.** 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. Appl Environ Microbiol **69:**6816-24.
11. **Mead, G. C., M. J. Scott, T. J. Humphrey, and K. McAlpine.** 1996. Observations on the control of Campylobacter jejuni infection of poultry by 'competitive exclusion'. Avian Pathol **25:**69-79.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

12. **Pearson, A. D., M. H. Greenwood, J. Donaldson, T. D. Healing, D. M. Jones, M. Shahamat, R. K. Feltham, and R. R. Colwell.** 2000. Continuous source outbreak of campylobacteriosis traced to chicken. J Food Prot **63:**309-14.

13. **Santini, C., L. Baffoni, F. Gaggia, M. Granata, R. Gasbarri, D. Di Gioia, and B. Biavati.** 2010. Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against Campylobacter jejuni. Int J Food Microbiol.

14. **Schoeni, J. L., and M. P. Doyle.** 1992. Reduction of Campylobacter jejuni colonization of chicks by cecum-colonizing bacteria producing anti-C. jejuni metabolites. Appl Environ Microbiol **58:**664-70.

15. **Tauxe, R. V.** 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. Emerg Infect Dis **3:**425-34.

16. **Tauxe, R. V.** 2002. Emerging foodborne pathogens. Int J Food Microbiol **78:**31-41.

17. **Tauxe, R. V.** 1998. Foodborne illnesses. Strategies for surveillance and prevention. Lancet **352 Suppl 4:**SIV10.

18. **Voetsch, A. C., T. J. Van Gilder, F. J. Angulo, M. M. Farley, S. Shallow, R. Marcus, P. R. Cieslak, V. C. Deneen, and R. V. Tauxe.** 2004. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal Salmonella infections in the United States. Clin Infect Dis **38 Suppl 3:**S127-34.

19. **Wine, E., M. G. Gareau, K. Johnson-Henry, and P. M. Sherman.** 2009. Strain-specific probiotic (Lactobacillus helveticus) inhibition of Campylobacter jejuni invasion of human intestinal epithelial cells. FEMS Microbiol Lett **300:**146-52.

20. **Wise, M. G., and G. R. Siragusa.** 2007. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. J Appl Microbiol **102:**1138-49.

ภาคผนวก

เรื่องที่ 1

1. Title:

Antibacterial activity of medicinal plant crude extracts against *Campylobacter* spp. isolated from chickens

Authors:

Chaiyaporn Soikum[1] , Prapansak Chaveerach[1*], Komkrich Pimpukdee[1], Peerapol Sukon[2]

Affiliations:

[1]Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen. 40002, Thailand

[2]Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen. 40002, Thailand

[*]Corresponding author E-mail: chaveerach@kku.ac.th

Abstract

Campylobacter, particularly *Campylobacter jejuni* contamination of poultry products, is an important pathogen causing gastroenteritis in healthy people, and with more severe complications in children, elderly, and individuals with underlying health problems. Because use of antibiotics in poultry production is prohibited, alternative pre-harvest interventions such as use of plant products and other natural products to reduce the carriage of *Campylobacter* in chickens are under extensive investigations. The study was conducted to determine whether ethanolic extracts of 60 medicinal plant species from 36 families which are effective plants on curing of diarreah human symptoms can in vitro inhibit the growth of 10 strains of *Campylobacter* spp. isolated from chickens and to evaluate whether the selected plant extract exhibiting the strongest anti-*Campylobacter* in vitro can prevent *Campylobacter* colonization in broiler chickens. In in vitro study, an agar-well diffusion method was used to screen the antibacterial activity of the thai plants and to determine the minimal inhibitory concentration of the selected plant extracts. Of the 60 study plants, only 6 (or 10%) medicinal plants (*Terminalia chebula*, *Phyllanthus emblica*, *Senna alata*, *Mammea siamensis*, *Morinda citrifolia,* and *Piper betel*) inhibited all strains of *Campylobacter* examined. Ethanolic extracts of *Terminalia chebula* and *Phyllanthus emblica* showed the strongest activity against *Campylobacter* isolation (A2) with the MIC value as low as 25 mg ml^{-1}. Also *Terminalia chebula* demonstrated wash-out effect on Campylobaccter in the adjusted media broth. Conseqeunly, the *Terminalia chebula* extract was selected for study against *Campylobacter* colonization in broiler chickens. The 1-day-old 40 chickens were randomly assigned into 4 groups of 10 chickens. At aged 8 days, chickens in group 1, 2, 3, and 4 were received no treatment (a negative control), no treatment (a positive control), the *Terminalia chebula* extract at duoble concentration of its MIC value (50 mg/bird) for 4 days by crop gravage, and commercial herbal product, respectively. At aged 9 days, chickens in all groups except group 1 were orally inoculated with 1 x 10^6 CFU/ml of *Campylobacter* isolate (A2). All chickens were allowed growing until aged 12 days before they were humanely killed. The caecum was aseptically removed and its content was subjected for *Campylobacter* enumeration. Although the *Terminalia chebula* extract could not prevent *Campylobacter* colonization in broiler chickens, it significantly decreased the bacterial load when compared with the positive control and with commercial herbal medicine ($P<0.05$). Therefore, ethanolic extracts of some medicinal plants have a high potential for further investigations to use as *Campylobacter* decontamination in poultry industry.

Keywords: Medicinal plants, Ethanolic extract, Antibacterial activity, Campylobacter, Chickens.

1. Introduction

Campylobacter is a common bacterial pathogen causing gastroenteritis in humans worldwide (Coker et al., 2002; Organization [WHO], 2000). *Campylobacter jejuni* is most commonly isolated from human with diarrheal diseases (Hariharan et al., 2004). Dose-response studies have shown that ingestion of about 10 to 500 cells of *C. jejuni* is sufficient to infect the human host (Ridley and Newell, 2004; Rosenquist et al., 2003). Individuals who are infected with *Campylobacter* may have symptoms of severe diarrhoea, fever, abdominal pain, nausea and vomiting that usually last for 5 to 7 days (Koenig, 2005; Tortora et al., 2002) in addition, the infection is usually more serious in children, elderly people and people with underlying health problems (Roberts et al.,1998). It was estimated that one out of 1,000 *Campylobacter* infections lead to the Guillain-Barre syndrome, an acute demyelinating disease characterized by muscular paralysis and leading to 2 to 3 % mortality (Allos, 1997). *Campylobacter* infection in humans were frequently associated with the consumption of *Campylobacter* contaminated meat products, especially poultry products (Wingstrand et al., 2006).

Chicken plays a major role as a main source of campylobacteriosis in humans. It may be explianed by the colonization mechanisms of *Campylobacter* which is a predominant *Campylobacter jejuni* species in gastrointestinal tracts of chickens. It was belived as normal avian microbiota because chicken generally remains asymptomatic clinical sign despite carring a huge number of the bacteria up to 10^8 colony forming units (cfu) per gram in intestinal content (Dhillon et al., 2006). In contrast with this hypothesis, some studies have been reported that *C. jejuni* is able to invade the chicken intestinal mucosa (Knudsen et al., 2006) and can cause systemic infection (Sanyal et al., 1984). In a recent finding, *C. jejuni* has particular colonization mechanisms by escaping rapid mucosal clearance and by fast replicating in chicken intestinal mucus, which result

in a persistent infection of chicken guts (Deun et al., 2008). Additionally, the ability to colonize the chicken gut varies between strains or dose infecton (Young et al., 1999), but once one chicken is infected, the bacterium spreads intensively through the whole flock, resulting in infection of almost 100% of the chickens (Lindblom et al., 1986). *C. jejuni* usually appears in broiler flocks at an age of 2–3 weeks (Gregory et al., 1997), which coincides with a drop in maternal antibody titers (Sahin et al., 2001). It has been reported that as few as 2–35 CFU/g (Knudsen et al., 2006; Stern et al., 1988) was sufficient for cecal colonization, while others mentioned a higher minimal inoculation dose, up to 5 - 10^4 CFU/g for 14-day-old chicks (Ringoir et al., 2007).

The use of antibotics for therapy and prevention of infectious diseases in modern intensive poultry production is probably not a rational solution for reducing *Campylobacter* incidence. Several studies have actually focused on that the partial association between the veterinary use of antibiotics and the emergence of resistant strains of *Campylobacter* are related to human enteritis (Desmonts et al., 2004; Luangtongkum et al., 2006; Pezotti et al., 2003). Currently, the use of antibiotics in feed to prevent colonization of *Campylobacter* in chickens has been prohibited throughout Western European countries. Therefore, the investigation of the abtibacterial activity of medicinal plants or herbs to replacing antibiotic use in the livestock on pathogents causing human diarrhea are remarkable. The use of alternative medicinal plant to cure diarrhea symptoms in human has been occasionally existance in developing countries. One challenging alternative to deal with Campylobacter infection is to use the traditional medicinal plants that have a potential for bacterial growth inhibition. Indeed, medicinal plant extracts have been developed and proposed for use in food as natural antimicrobials (Del Campo et al., 2000; Hsieh, 2000; Hsieh et al., 2001). However, there is still limited information in the use of medicinal plant extracts against *Campylobacter.*

Therefore, the objectives of this study were to investigate 60 species of Thai medicinal plants extracted by 95% ethanol for in vitro growth inhibition of *Campylobacter* spp. isolated from chickens and to test the effect of the selected plant extract against *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens.

2. Materials and Methods

2.1 Plant materials

Fresh and semi-dried samples of 60 medicinal plants purchased from the local markets of Thai traditional spices and medicinal plants in Khon Kaen, Thailand in January 2009 were used in this study (Table 1). Selection of the plant samples (plant species and plant parts) to use in this study was based on their ethnomedical information and bioactivity related to antibacterial effect practiced by Thai herbalists association. The samples were prepared and deposited at Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University.

All samples were washed under running tap water, sliced and air-dried at 50°C in a hot air oven. The final moisture content of plants was 5 to 8 % (w/w), which was determined by gravimetrical method. Dried samples were ground to powder using a mechanical grinder and kept separately in plastic bags in dry condition until use.

2.2 Plant extracts

Dried, powdered plant materials were extracted with 95 % ethanol. In brief, 50 grams of each plant sample was mixed with 250 ml of 95% ethanol (Ahmad et al., 1998) the mixtures were left overnight on a mechanical shaker at 190-220 rpm for 2 days at room temperature and then filtered through Whatman No.1 filter using Buchner funnel. The extracts were further concentrated to dryness under reduced pressure at 37°C in a rotary evaporator to make the final volume one-fourth of the original volume (Parekh et al., 2005). Finally, the residue was dried in a hot air oven and dissolved in sterile distilled water to a final 200 mg/ml. The extracts were filtered again using a 0.2 □m filter (CE 0297, Goettingen, Germany) to obtain the sterile extracts and the samples were then stored at 4°C until use.

2.3 In vitro antibacterial assays

2.3.1 Campylobacter preparation

In this study, 10 strains of *Campylobacter* isolated from locally conventional chickens kept frozen at -70°C in Mueller-Hinton (MH) (Oxoid, CM 405) broth containing 31 % (w/v) glycerol were used. The bacterial strains were thawed at room temperature. One loop of each stock solution was streaked on charcoal – cefoperazone – deoxycholate (CCDA) agar (Oxoid, CM 739, Bastingstoke, Hampshire, U.K.). The plates were kept at 42°C under microaerophilic conditions (5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2) generated by using a gas package (BBL, Becton Dickinson, USA) in anaerobic jar for 48 hours. Thereafter, one typical

colony of each strain of *Campylobacter* was transferred into a tube containing 10 ml of 85% normal saline solution. The concentration of the culture was adjusted with 85% normal saline solution to match 0.5 Mc Farland standard. This campylobacter culture was use in the experiment below.

2.3.2 Antibacterial screening

2.3.2.1 Agar-well diffusion assay

The antibacterial tests were performed using agar-well diffusion assay (Okeke et al., 200; Perez et al., 1990). The campylobacter culture from the above were adjusted to a McFarland turbidity of 0.5 (approximately 1.0 x 10^8 CFU/ml) then, 150 µl of an individual active culture of *Campylobacter* isolation was transferred into 14 ml of semi-solid brucella agar 0.75%(w/w) (Oxoid, Hampshire, England) at 50°C. The inoculated medium was swirled to distribute the *Campylobacter* and held at room temperature for 30 min. Subsequently, wells (diameter = 6 mm. and depth = 4 mm.) were bored in the agar, and 35 µl volumes of 200 mg/ml of each reconstituted extract was pipetted into wells. Sterilized water (35 µl) was used as negative control and 5% glacial acitic acid (15 µl) was used as a positive control. The plates were incubated at 37°C under microaerophillic atmosphere for 48 h, and then were observed for the presence of inhibition of bacterial growth that was indicated by a clear zone around the wells. Antibacterial activity was determined by measuring a diameter of an inhibiting zone in millimeters (including the well, 6 mm in diameter) with a Vernier caliper. The absence of a zone inhibition was interpreted as the absence of activity. Each plant extract was tested in tripicate. Only extracts that showed antibacterial activity with mean diameters of the clear zone at least or exceeding 15 mm. were proceeded for the MIC assay.

2.3.2.2 Minimal Inhibitory Concentration assay

In this step, minimal inhibitory concentration (MIC) of the selected plant extracts was determined. Concentrated extracts of the selected plants having antibacterial activity from the first screening were added in 0.85 % sterilize normal saline to make two-fold serial dilutions (7.8 to 200 mg/ml). Then, 150 µl of *Campylobacter* isolate (A2), containing appoximately 10^6 CFU/ml, was transferred into 14 ml of semi-solid brucella agar 0.75%(w/w) at 50°C. The inoculated medium was swirled to distribute the *Campylobacter* and held at room temperature for 30 min. A well (diameter = 6 mm. and depth = 4 mm.) was made aseptically in which 35 µl of each dilution of the extracts was transferred. The plates were incubated at 37°C under microaerophilic atmosphere for 48 h and were observed for the bacterial growth inhibition. The lowest concentration that can inhibit the bacterial growth was recorded as MIC of a crude extract. This study was done twice. Only a plant showing the best MIC value was selected for the next assay.

2.3.2.3. Inhibitory effect of the selected plant extract on *Campylobacter* in Mueller-Hinton (MH) broth bottle

2.3.2.3.1 Preparation of MH broth bottle

100 ml of MH broth was transferred into a bottle (200 ml) covered with rubber stopper and sealed with an aluminium cap, and then the bottle was heated at 121°C for 10 min. Briefly, the microaerophillic atmosphere, adjusted to a pressure at 1 bar in the bottle, was established by exchanging the air with gas from a cylinder containing 5% O_2, 10% CO_2 and 85% N_2(Chaveerach et al., 2003). After that, the bottle was sterilized again at 121°C for 15 min and kept at 4°C.

2.3.2.3.2 Inhibitory effect on *Campylobacter* isolation (A2)

In this assay, 150 □l of the active culture of *Campylobacter* (A2) was aseptically transferred into the MH broth bottle 1, 2 and 3 by using a sterile needle and syringe. In bottle 1, 0.5 ml of the *Terminalia chebula* extract (the extract showing the best anti-*Campylobacter* from the above assay) with a duoble concentration of its MIC (the extract dissolved in 0.5 ml distilled sterile water) was added at 24 h and 48 h. In bottle 2 (a negative control), 0.5 ml of sterile water was added at 24 h and 48 h. In bottle 3 (a positive control), the extract and sterile water were not added. All inoculated bottles were incubated at 42°C. Then, 1 ml of the samples was taken aseptically from each bottle by using a sterile syringe at 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 and 120 h and then was serially tenfold-diluted with 0.1% peptone water. Afterthat, 100 □l of appropriate dilutions was plated onto the CCD agar. A plate was incubated at 42°C under a microaerophilic atmosphere for 48 h. The typical colonies were recorded and expressed as $\log_{10}$ CFU/ml. This experiment was done twice.

2.4 Inhibitory effect of the selected plant extract on Campylobacter colonization in broilers

1-day-old 40 broilers were randomly assigned into 4 experimental groups in ehich there were 10 broilers in each group. In group 1 (a healthy control), chickens did not received any treatments. In group 2 (a positive control), chickens were orally inoculated with $1x10^6$ CFU/ml of *Campylobacter* isolation (A2) at day 9. In group 3, chickens were received the extract of *Terminalia chebula* with the double concentration (as above described) via crop gavage at day 8, 9, 10 and 11 while Campylobacter inoculation at day 9. In group 4, chickens were received commercial herbal medicine product with duoble concentration the similar treatment like group 3. Each group of chickens was maintained separately in floor pen (size 0.6 x 1.0 m^2) on clean rice husk. Light was continuous during the whole experimental period. All chickens were free allowed to feed (without antibiotic) and drinking water adlibitum until day 12 and then they were humanely killed. The caecum was aseptically removed to collect caecal content for *Campylobacter* isolation.

Experimental protocols on chickens in this study were approved by the Research and Animal Ethnic Committee of Khon Kaen University, Thailand. Animals care and use were conducted under the Guideline of FELASA.

2.5 Statistical analysis

In an agar well diffusion assay for antibacterial screening, descriptive statistics of antibacterial tests were calculated from a diameter of an inhibiting zone in millimeters of three replicates for each *Campylobacter* isolation. MIC of a crude extract of each selected medicinal plant was calculated from the average of two replicates.

In an assay for inhibitory effect of the selected plant extract on *Campylobacter* in Mueller-Hinton broth bottle, *Campylobacter* colonies were calulated from two replicates and expressed as $\log_{10}$ CFU/ml. The different of mean of Campylobacter number in each group was compared using simple t-test.

In an assay for inhibitory effect of the selected plant extract on *Campylobacter* colonization in broilers, analysis of variance (ANOVA) was conducted to compare $\log_{10}$ number of *Campylobacter* number among treatment groups with post hoc test using Duncan's multiple range test for comparison between pair of particular groups. A statistical significance was determined when P-value less than 0.05 using SPSS version 10.1.

3. Results

3.1 Anti-Campylobacter screening

Of ethanolic extracts of 60 plant species tested, only extracts of 6 plant species were demonstrated to have antibacterial activity against 10 strains of *Campylobacter* (Table 2 and Figure 1). These plants were *Terminalia chebula*, *Phyllanthus emblica*, *Cassia alata*, *Mammea siamensis*, *Morinda citrifolia* and *Piper betel* with the inhibition zones ranging from 15 to 25 mm. The ethanolic extract of *Terminalia chebula* was demonstrated the highest anti-Campylobacter activity with the average inhibiting zone of 22.4 mm. (Table 3).

3.1.2 MIC on Campylobacter

6 medicinal plants demonstrated strong anti-campylobacter activity were tested against *Campylobacter* isolation (A2) (Figure 2). Of 6 medicinal plants with 9 different concentrations: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 and 0.78 mg/ml, an ethanolic extract of *Terminalia chebula* and *Phyllanthus emblica* showed the strongest activity against *Campylobacter* isolation (A2) with the MIC value as low as 25 mg/ml, while the extract of *Piper betel* showed the weakest activity (MIC=200 mg/ml). With producing the largest inhibiting clear zone and showing the lowest MIC value, the *Terminalia chebula* extract was selected for the next assay.

3.1.3 Inactivation Campylobacter (A2) by Terminalia chebula in the MH broth bottle

In the bottle 1, Campylobacter number was 3.18±0.00 $\log_{10}$ CFU/ml at the beginning. After 24 h, the numbers were 5.16±0.02 $\log_{10}$ CFU/ml until the end of experiment the number still remained high. As well as in the bottle 3, the Campylobacter number was similar to the bottle 1. While in the bottle 3, The growth of the *Campylobacter* number was 3.18±0.00 $\log_{10}$ CFU/ml at the beginning then the numbers wre 5.11±0.00 $\log_{10}$ CFU/ml at 24 h. After that the numbers were gradually decreased to 4.70±0.02, 4.1±0.08 and 3.58±0.11 $\log_{10}$ CFU/ml at 36, 48 and 60 h respectivetly. After that the numbers of Campylobacter were under detection until the end of experiment (Figure 3).

3.2 Inhibitory effect of the selected plant extract against Campylobacter colonization in broilers

In the group 1, no campylobacter was found at the end of experiment. Campylobacter number in group 2 was on average 8.07±0.62 $\log_{10}$ CFU/g. Interestingly, in the group 3, Terminalia chebula significantly reduced Campylobacter number at 2.35 $\log_{10}$ CFU/g while commercial extract in the group 4 could decrease 0.87 $\log_{10}$ CFU/g *(P< 0.05)* (Table 4).

4. Discussion

Our results demonstrated that ethanolic extracts of 6 thai medicinal plants can in vitro inhibit various strains of *Campylobacter* isolated from chickens. Although several studies have been reported that extracts of several plants can in vitro inhibit various bacterial pathogens (Ramar Perumal Sammy and Ponampalam Gopalakrishnakone, 2008), few studies have been reported that plant extracts can inhibit *Campylobacter* in vitro. For example, aqueous extracts of Chinese leek inhibited *Campylobacter jejuni* and *coli* isolated from chickens (Lee et al., 2004), and roselle calyx extract inhibited antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni, coli* and *fetus* in agar plate and ground beef (Yin and Chao., 2008).

It is generally known that plants contain a number of organic components including alkaloids, terpenoids, flavones, quinines, phenol and tannins, all of which have antibacterial activity (Cowen, 1999). However, there is no doubt that a great number of factors can influence in vitro antibacterial properties of plant extracts such as cultivation conditions and extraction methods (Shene et al., 2009). Therefore, a variety of extractants are used to get antibacterial substances from plant extracts. Previous study, methanol or ethanol were reported to extract for alkaloid, sterols, polyphenols, tannins; acetone for flavonoids and steroids; hexane, diethyl ether or chloroform for fat soluble and esters; dichloromethane for terpenoid group; and water for the water soluble components like glycosides, polysaccharides, polypeptides and lectins, which are most effective against pathogens (Ramar Perumal Sammy and Ponampalam Gopalakrishnakone, 2008). Generally, water and alcohol (either methanol or ethanol) are mainly used for a large number of crude extract preparations for the initial anti-bacterial screening of plants. In this study, we used ethanol and water as an extractants. In our study, it was showed that the important ingredients of *Terminalia chebula* as anti-Campylobacter substances may disslove in aqeous solution. Clearly, water extractant did not showed any anti-Campylobacter activity. Therefore, although we do not know exactly what the anti-Campylobacter substances are, the plant extracts exhibiting anti-*Campylobacter* may contain substances that solubilize in ethanol such as phenolics (Acharyya et al., 2009). Some medicinal plants without anti-*Campylobacter* activity in this study may also contain the activity, if appropriate extraction solvents for those particular plants are used.

In this study, ethanolic extracts of 6 medicinal plants strongly exhibiting in vitro anti-*Campylobacter* activity were *Terminalia chebula*, *Phyllanthus emblica*, *Senna alata*, *Mammea siamensis*, *Morinda citrifolia,* and *Piper betel*, although degree of the inhibition differs among the plant extracts. Of these 6 plant extracts, the *Terminalia chebula* extract showed the best activity with the largest clear zone of inhibition and with MIC value as low as 25 mg/ml; therefore, we selected this plant extract for further evaluating its efficacy against *Campylobacter* colonization in broilers. Even though we could not find any report from literature search of *Terminalia chebula* extract against *Campylobacter* in vivo, several studies have been reported that this plant extract exhibits in vitro antibacterial effects against a wide range of bacterial pathogens. *Terminalia chebula* extracts are effective in inhibiting both gram-positive and gram-negative bacteria such as *Salmonella typhi, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis,* and *Pseudomonas aeruginosa* (Kannan et al., 2009), trimethoprim-sulphamethoxazole resistant uropathogenic *Eschericia coli* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (Bag et al., 2009). In addition, with a variety of extractants, *Terminalia chebula* extracts have antimicrobial effects against a wide range of bacterial pathogens: the extracts with ether, alcoholic, and water showed significant antibacterial activity against *Helicobacter pylori* (Malekzadwh et al., 2001); the extracts with methanol inhibited muti-drug resistant *Vibrio cholerae*, *Aeromonas hydrophila*, and *Bacillus subtilis* (Acharyya et al., 2009); and the extracts with acetone showed the highest activity against dental caries pathogens (Aneja and Joshi., 2009). All of these reports as well as our report indicate that *Terminalia chebula* has a potential for further development to use as an antimicrobial agent. However, comparison among published data is complicated because the outcome of a test is affected by many factors which vary among studies such as the volume of inoculum, growth phase, culture medium used, pH of media, and incubation time and temperature (Friedman et al., 2002).

While ethanolic extract of *Phyllanthus emblica, Senna alata, Mammea siamensis, Morinda citrifolia,* and *Piper betel* in vitro also exhibit anti-*Campylobacter* activity. In previous study, *Phyllanthus emblica* extract inhibited muti-drug resistance

Salmonella typhi (Rani and Khuller, 2004) and its volatile components show in vitro antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria (Liu et al., 2009). In according to our result, antibacterial activity of *Phyllanthus emblica* is less effective than that of *Terminalia chebula* (Ghosh et al., 2008). The crude extracts of *Senna alata* (also called *Cassia alata*) containing steroids, anthraquinone, glycosides, volatile oils, and tannins exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Micrococcus luteus, Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* (Adedayo et al., 2001), and against acne-inducing bacteria (Chomnawang et al., 2005). Of 3 alcoholic (methanolic, ethanolic, and petroleum ether) extracts of *Senna alata* leaves, the methanolic extract showed the highest antibacterial activity against various bacteria such as *Eschericia coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhi, Pseudomonas aeroginosa* and *Staphylococcus aureus* (Owoyale et al., 2005). *Morinda citrifolia* extract exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (Zaidan et al., 2005), and against various pathogenic bacteria isolated from aquatic organisms (Wei et al., 2008). Crude aqueous extract of *Piper betle* leaves caused plasma cell membrane damage and coagulation of the nucleoid, and significantly reducing acid producing properties of *Streptococcus mutans* (Nalina and Rahim, 2007). The methanolic extract of *Piper betel* was considerably more effect than aqueous extract against gram-positive and gram-negative bacteria (Nair and Chanda,2008).

Although chicken meat is recognized as the main source of *Campylobacter jejuni* contamination causing gastroenteritis in human (Wingstrand et al., 2006), colonization strategy of *Campylobacter* is not well undestood and is complicated resulting in persistent infection of the chicken gut (Deun et al., 2008). In addition, because thermophilic *Campylobacter* grow optimally at temperatures near 42^{o}C (Park., 2002), the higher metabolic temperatures (42 ^{o}C) found in poultry species may predispose poultry to be a prominant reservoir for thermotolerant *Campylobacter*. Control and management strategies to reduce the risk of campylobacteriosis are through careful management practices focus on innovation methods to avoid-cross-contamination from raw meat products (Horrocks et al., 2009). Reduction of pathogens before arrival to the abattoir is of great concern because pre-harvest interventions may diminish possible retail sources of infection, thereby decreasing human illness associated with foodborn pathogens (Vugia et al., 2003). Antimicrobial treatments exist for reducing *Campylobacter* loading of intestinal tract; however, because of potential residues and issues relating to antimicrobial resistance, use of antibiotics for pre-harvest control of *Campylobacter* is undesirable. Therefore, considerable research has been directed forward the development of alternative pre-harvest interventions to reduce the carriage of *Campylobacter* in chickens on the farm, but at present, none are widely available or accepted. In this study, the *Terminalia chebula* extract did the best among the 60 plant extracts against *Campylobacter*, therefore, the wash-out effect was found in the vitro study. We also found the decrease of Campylobacter load in the chicken ceacum. It may be unable to prevent *Campylobacter* colonization in chicken caecums because many factors are involved such as pharmacokinetics of the extract in a gastrointestinal tract of a chicken, and colonization mechanisms of *Campylobacter*. The result of this study was comparable with that of the previous study (Lengsfed et al., 2007) in which the polysaccharides extracted from immature fruit of okra plant inhibit adhesion of *Campylobacter jejuni* to mucosa isolated from poultry in vitro but not in vivo. These evidences indicate that many factors are play an important role in colonising of the chickens. Although *Terminalia chebula* extract can significantly reduce number of *Campylobacter* when compared with a positive control or even with a commercially medicinal plant product, this is unlikely to make a practical significance for a currently real use in poultry production because chickens were still colonized with *Campylobacter* in high number when compared with a negative control. However, *Terminalia chebula* has high potential for further development as a feed additive for *Campylobacter* decontamination in poultry industry and further studies both on the extract and/or its chemical constituents on the colonisation of chickens are needed to pinpoint of the findings.

Acknowledgements

The research performed has been part of the project MRG4780059 supported by The Thailand Research Fund (TRF) and Khon Kaen University.

References

Acharyya, S., Patra, A., Bag, P.K., 2009. Evaluation of the antimicrobial activity of some medicinal

plants against enteric bacteria with particular reference to muti-drug resistant *Vibrio cholerae*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 8, 231-237.

Adedayo, O., Anderson, W.A., Moo-Young, M., Snieckus, V., Patil, P.A., Kolawole, D.O., 2001. Phytochemistry and antibacterial activity of *Senna alata* flower. Pharmaceutical Biology. 39, 408-412.

Adhikari, B., 2003. Sparrow, file and rodents as reservoirs of *Campylobacter* spp. on a day farm. MVSc thesis, Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Ahmad, I., Mehmood, Z., Mohammad, F., 1998. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. Journal Ethnopharmacology. 62, 183-93.

Alam, M.T., Karim, M.M., Khan, S.N., 2009. Antibacterial activity of different organic extracts of Achyranthes aspera and Cassia alata. Journal of Science Research. 1, 393-398.

Allos, B.M., 1997. Association between *Campylobacter* infection and Guillan-Barre syndrome. Journal of Infectious Disease. 176(Supl 2), 125-128.

Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L., 1999. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. Emerging Infectious Diseases. 5, 28 – 35.

Aneja, K.R.,, Joshi, R., 2009. Evaluation of antimicrobial properties of fruit extracts of *Terminalia chebula* against dental caries pathogens. Jundishapur Journal of Microbiology. 2, 105-113.

Aslim, B., Yucel, N., 2008. In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic Origanum minutiflorum on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. Food Chemistry. 107, 602-606.

Barnhart, E.T., Sarlin, L.L., Caldwell, D.J., Byrd, J.A., Corrier, D.E., 1999. Evaluation of potential disinfectant for preslaughter broiler crop decontamination. Poultry Science. 78, 32-37.

Bag, A., Bhattacharyya, S.K., Bharati, P., Pal, N.K., Chattopadhyay, R.R., 2009. Evaluation of antibacterial properties of Chebulic myrobalan (fruit of *Terminalia chebula* Retz.) extracts against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and trimethoprim-sulphamethoxazole resistant uropathogenic *Escherichia coli*. African Journal of Plant Science. 3, 025-029.

Bjerrum, L., 2005. The intestinal microflora of broiler chickens: investigations on the microbial community and experimental infection studies. Thesis: Danish Institute for Food and Veterinary Research, Aarhus (Denmark).

Carter, G.R., Chengappa, M.M., Roberts, A.W., 1995. *Campylobacter* and *Helicobacter.* In G.R. Carter, M.M. Chengappa, A.W. Roberts, G.W. Claus, & Y. Rikihia (Eds.), Essentials of Veterinary Microbiology (5th ed., pp. 184-188).

Chaveerach, P., Lipman, I.J.A., Knapen, F., 2004. Antagonistic Activities of Several Bacteria on In Vitro Growth of 10 Strains of *Campylobacter jejuni/coli*. International Journal of Food Microbiology. 90 (1), 43-50.

Chattopadhyay, R.R., Bnattacharyya, S.K., Medda, C., Bag, A., Pal, N.K., 2008. Evaluation of growth inhibitory activity of black myrobalan (Fruit of *Terminalia chebula* Retz.) against uropathogenic *Escherichia coli*. International Journal of Chemical Science. 6 (3), 1406-1414.

Chomnawang, M.T., Surassmo, S., Nukoolkarn, V.S., Gritsanapan, W., 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. Journal of Ethnopharmacology. 101, 330-333.

Coker, A.O., Isokpehi, R.D., Thomas, B.N., Amisu, K.O., Obi, C.L., 2002. Human Campylobacteriosis in developing countries. Emerging Infectious Diseases. 8, 237-244.

Cowan, M.M., 1999. Plant Product as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews. pp.564-582.

Dachet, F., Prouzet-Mauleon, V., Oleastro, M., Megraud, F., Menard, A., 2004. Identification par PCR entemps reel et FRET des Campylobacters les plus frequents. In: 6th National Congress of the French Society of Microbiology, 10-12 May 2004, Bordeaux, No.444.

Del Campo, J., Amiot, M.J., Nguyen, C., 2000. Antimicrobial effect of Rosemary extract. Journal of food protection. 63, 1359-1368.

Desmonts, M.H., Lebeau, I., Avrain, L., Kempf, I., 2003. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolated from chickens in France between 1992 and 2002. In: Poster presented in

the 12th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter* and Related Organisms, 6-10. September 2003, Denmark.

Deun K.V., Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Broeck, W.V.D., Immerseel, F.P., Haesebrouck, F. 2008. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. Veterinary Microbiology. 130, 285-297.

Dhillon, A., Shivaprasad, H., Schaberg, D., Wier, F., Weber, S., Bandli, D., 2006. *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens. Avian Diseases. 50, 55–58.

Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E., 2002. Antimicrobial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection. 66 (10), 1811-1821.

Ghosh, A., Das, B.K., Roy, A., Mandal, B., Chandra, G., 2008. Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. Journal of Natural Medicine. 62, 259-262.

Gregory,E., Barnhart, H., Dreesen, D.W., Stern, N.J., Corn, J.L., 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, timeofcolonization,andprevalence. Avian Diseases. 41, 890-898.

Hariharan, H., Murphy, G.A., Kempf, I., 2004. *Campylobacter jejuni*: public health Hazards and potential control methods in poultry: a review. Veterinary Medicine-Czech. 49 (11), 441-446.

Horrocks, S.M., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., Ricke, S.C., 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. Anaerobe. 15, 18-25.

Hsieh, P.C., 2000. Antimicrobial effect of cinnamon extract. Taiwanese Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38, 184-193.

Hsieh, P.C., Mau, J.L., S.H., 2001. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. Journal of Food Microbiology. 18, 35-43.

Jacobs-Reitsma, W., 1995. *Campylobacter* bacteria in breeder flocks. Avian Diseases. 39, 355-359.

Kannan, P., Ramadevi, S.R., Waheeta, Hopper, 2009. Antibacterial activity of *Terminalia Chebula* fruit extract. African Journal of Microbiology Research. 3 (4), 180-184.

Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C., 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **43** (1995), 2839–2845.

Knudsen, K.N., Bang, D.D., Andresen, L.O., Madsen, M., 2006. *Campylobacter jejuni* strains of human and chicken origin are invasive in chickens after oral challenge. Avain Diseases. 50, 10-14.

Koenig, R., 2005. Genome comparison of four Campylobacter strains yields new genetic markers and clues to virulence. <www.eurekalert.org>. Accessed 21.02.05.

Lee, C.F., Han, C.K., Tsau, J.Y., 2004. In vitro inhibitory activity of Chinese leek extract against *Campylobacter* species. International Journal of Food Microbiology. 94, 169-174.

Lengsfeld, C., Faller, G., Hensel, A., 2007. Okra polysaccharides inhibit adhesion of *Campylobacter jejuni* to mucosa isolated from poultry *in vitro* but not *in vivo*. Animal Feed Science and Technology. 135, 113-125.

Lindblom,G.B., Sjorgren, E., Kaijser, B., 1986. Natural Campylobacter colonization in chickens raised under different environmental conditions. Journal of Hygiene (London). 96, 385-391.

Liu, X., Zhao, M., Luo, W., Yang, B., Jiang, Y., 2009. Identification of volatile components in *Phyllanthus emblica* L. and their antimicrobial activity. Journal of Medicinal Food. 12, 423-428.

Luangtongkum, T., Morishita, T.Y., Ison, A.J., Huang, S., McDermott, P.F., Zhang, Q., 2006. Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. In poultry. Applied and Environmental Microbiology. 72 (5), 3600-3607.

Malekzadeh, F., Ehsanifar, H., Shahanat, M., Levin, M., Colwell, R.R., 2001. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. International Journal of Antimicrobial Agents. 18, 85-88.

Nair R., Chanda, S., 2008. Antimicrobial activity of *Terminalia catappa, Manilkara zapota* and *Piper betel* leaf extract. Indian Journal of Pharmaceutical Science. 70, 390-393.

Nalina, T., Rahim, Z.H.A., 2007. The crude aqueous extract of *Piper betle* L. and its antibacterial effect towards *Streptococcus mutans*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 3, 10-15.

Nannapaneni, R., Chalova, V.I., Crandall, P.G., Ricke, S.C., Johnson, M.G., O'Bryan, C.A., 2009. Campylobacter and Arcobacter species sensitivity to commercial orange oil fractions. International Journal of Food Microbiology. 129, 43-49.

Okeke, M., Iroegbu, C.U., Eze, E.N., Okoli, A.S., Esimone, C.O., 2001. Evaluation of extracts of root of Landonphin owerrience for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology. 78 (2-3), 119-127.

Organization[WHO]. (2000). The increasing incidence of human Campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO consultation of expert, Copenhagen, Denmark, 21-25 November 2000 (draft version).

Owoyale, J.A., Olatunji, G.A., Oguntoye, S.O., 2005. Antifungal and antibacterial activities of and alcoholic extract of Senna alata leaves. Journal of Applied Science and Environmental Management. 9, 105-107.

Oyofo, B.A., Buhari A Oyofo., Decy Subekti., Periska Tjaniadi., Nunung Machpud., Komalarini, S. et al., 2002. " Enteropathogens Associated with Acute Diarrhea in Community and Hospital Patients in Jakarta, Indonesia " FEMS Immunology and Medical Microbiology. 34 (2), 139-146.

Parekh, J., Nair, R., Chanda, S., 2005. Preliminary screening of some folkloric plants from Western India for potential antimicrobial activity. Indian Journal of Phamaceutical Science. 37, 408-409.

Park, S., 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as Foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology. 74, 177-188.

Perez, C., Paul, M., Bazerque, P., 1990. An Antibiotic assay by the agar well diffusion method. Acta Bio Medica. 15, 113-115.

Pezzotti, G., Serafin, A.Luzzi., Mioni, R., Milan, M., Perin, R., 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in north easterm Italy. International Journal of Food Microbiology. 82, 281-7.

Phulan Rani, Neerai Khullar, 2004. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. Phytotherapy Rerearch. 18 (8), 670-673.

Piddock, L.J., Ricci, V., Pumbwe, L., Everett, M.J., Griggs, D.J., 2003. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 51, 19-26.

Ramar Perumal Samy, Ponnampalam Gopalakrishnakone, 2008. Therapeutic potential of plants as Anti-microbials for Drug Discovery. eCAM Advance Access pblished on June 24, 2008. doi: doi: 10.1093/eCAM/nen036.

Reilly, S.S., Gilliland, S.E., 2003. Improved Culturing Techniques for *Campylobacter*. Journal of Food Science. 68 (9), 2752-275.

Ridley, A.M., Newell, D.G., 2004. *Campylobacter jejuni* control and prevention of a major public health problem. In: Proceedings of an international EU-RAIN coference, Padua, 2-3 December 2004. Padua, Italy: Teagasc – The National Food Centre, 103-120.

Ringoir, D.D., Szylo, D., Korolik, V., 2007. Comparison of 2-day-old and 14-day-old chicken colonization models for *Campylobacter jejuni*. FEMS Immunology and Medicinal Microbiology. 49, 155-158.

Rosenquist, H., Nielsen, N.L., Sommer, H.M., Nørrung, B., Christensen, B.B., 2003. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. International Journal of Food Microbiology. 52 (3), 531-538.

Sahin, O., Zhang, Q., Meitzler, J.C., Harr, B.S., Morishita, T.Y., Mohan, R., 2001. Prevalence, antigenic specificity and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. Applied and Environmental Microbiology. 67, 3951–3957.

Sakharkar, P.R., Pati, A.T., 1998. Antimicrobial activity of Cassia alata. Indian Journal of Pharmaceutical Science. 60, 311-312.

Sanyal, S.C., Islam, K.M.N., Neogy, P.K.B., Islam, M., Speelman, P., 1984. *Campylobacter jejuni* diarrhoea model in infant chickens. Infection and Immunity. 43, 931-936.

Sato, Y., Oketani, H., Singyouchi, K., Ohtsubo, T., Kihara, M., Shibata, H., Higuti, T., 1997. Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of *Terminalia chebula* Rets. against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Biological Pharmaceutical Bulletin. 20 (4), 401-404.

Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 30, 3875-3883.

Shene, C., Reyes, A.K., Villarroel, M., Sineiro, J., Pinelo, M., Rubilar, M., 2009. Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murta extracts. European Food Research and Technology. 228, 467-475.

Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Research. **59**, 201–222.

Sorum, H., Sunde, M., 2001. Resistance to antibiotic in the normal flora of animal. Veterinary Research. 32, 227 – 241.

Stern, N.J., Bailey, J.S., Blankenship, L.C., Cox, N.A., McHan, F., 1988. Colonization characteristics of *Campylobacter jejuni* in chick caeca. Avain Diseases. 32, 330-334.

Tortora, G. J., Funke, B.R., Case, C.L., 2002. Gastroenteritis by *Campylobacter.* In G. J. Tortura, B.R. Funke, and C.L. Case (Eds.), Microbiologia (6th ed., pp.670).

Udayamputhoor, R.S., Hariharan, H., Van Lunen, T.A., Lewis, P.J., Heaney, S., Price, L., et al., 2003. Effects for diet formulations containing proteins from different sources on intestinal colonization by *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. Canadian Journal of Veterinary Research. 67, 204-212.

Vugia, D., Hadler, J., Chaves, S., Blythe, D., Smith, K., Morse, D., et al., 2003. Preliminary Food-Net data on the incidence of foodborne illness – selected sites, United States, 2002. Morbidity and Mortality Weekly Report. 52, 340–343.

Wei, L.S., Musa, N., Sengm, C.T., Wee, W., Shazili, N.A.M., 2008. Antimicrobial properties of tropical plants against 12 pathogenic bacteria isolated from aquatic organisms. African Journal of Biotechnology. 7, 2275-278.

Wingstrand, A., Neimann, J., Engberg, J., Nielsen, E., Gerner-Smidt, P., Wegener, H., Molbak, K., 2006. Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis. Denmark Emerging Infectious Diseases. 12, 280-285.

Yin, M.C., Chao, C. Y., 2008. Anti-*Campylobacter*, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. International Journal of Food Microbiology. 127, 73-77.

Young, C.R., Ziprin, R.L., Hume, M.E., Stanker, L.H., 1999. Dose response and organ invasion of day-of-hatch Leghorn chicks by different isolates of *Campylobacter jejuni.* Avain Diseases. 43, 763-767.

Zaidan, M.R.S., Noor Rain, A., Badrul, A.R., Adlin, A., Norazah, A., Zakiah, I., 2005. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Tropical Biomedicine. 22, 165-170.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

เรื่องที่ 2

อยู่ในขั้นตอนเตรียม Manuscript ก่อนส่งออกไป

2. Broiler commercial or Backyard Chickens as a potential source of developing probiotic bacteria for combating Campylobacter spp.

Chaveerach, P, Sirirat Reangpipat

Introduction

Campylobacteriosis mainly C. jejuni and C. coli is concerned as the acute food-borne gastroenteritis in developed countries (15-17). Increasing confirmed human cases in developed and developing countries have been reported. Young and the elderly people are vulnerable to the disease. Contaminated chicken meat with Campylobacter is an important source for the infection serving for human health risk (18). In commercial chicken farm, broilers are commonly hatched free of Campylobacter. Once infected campylobacter chicken present in the farm and then the spread of the infection was intensively found in most chickens (12). So, high prevalence of Campylobacter in chicken at farm, processing and chicken meat was found (5). Reduction of colonization in live chickens during production should be an extrapolation to minimize the risk of human exposure.

The prevention of pathogenic bacteria relies on prophylactic use of antibiotic. This proposing in broiler is prohibited throughout Western European countries under the regulation of EC 2160/2003. Due to awareness of public on the drug residue in chicken meat and the spread of antibiotic resistance in bacteria is concern. The alternative intervention method based on the use of free antibiotic and hazard chemical usage, in preventive program in the broiler farm is urgent need (17). One potential approach to control Campylobacter colonization is to manipulate the miroflora providing competitive exclusion (CE) for chickens. Administration of free-pathogenic microflora of healthy chicken feces could prevent the colonization of Salmonella. Several researcher have been investigated the effect of normal flora on the growth of pathogenic bacteria like Salmonella or Campylobacter (7). Also, the use of define or CE bacteria on the inhibition of Campylobacter was also demonstrated (7, 14). Hence, the use of probiotic bacteria to intervene the pathogenic bacteria invader of broilers could be essential method. Mostly, Lactobacillus and obligatory anaerobic bacteria were dominantly demonstrated the negative effect on Campylobacter growth in several studies (3, 13).

Intestinal microflora plays an important role in preventing of gut disease in human and animal health. It is believed that the potential bacteria could prevent the colonization of intestinal tract by the bacteria to produce bacteriocin or compete the site of adhesive at the intestinal villi (). Nevertheless, the source of quantification of potential bacteria combating Campylobacter growth could be free from Campylobacter infection chicken. In many reports, generally commercial chickens have been used to study and isolate the potential bacteria inhibiting Campylobacter or Salmonella but the variation of the effect on the activity could be found in the experiments (9, 11, 13, 19). According to the use of 16s Ribosomal DNA analysis of microbial profile in the chicken ceca, there has also demonstrated greater diversity of the bacterial population in the commercial chicken gut (1, 4). Perhaps, bacteria isolated from the lower or greater diversity of the microflora in the chicken gut may influence effectiveness on Campylobacter colonisation of the gut. The development of microflora in the gut during growth is also influenced by many factors like age (1, 10), feed (2), antibiotic (20). In the chicken ceca infected and non infected Campylobacter using 16s DNA sequences analysis, the structure of microbial population could divide into 2 groups of infection and non-infection chickens. Also microbial community of Lactobacillus spp., Klebsiella spp., and C. perfringens have been found in lower numbers in the infected chickens (8). This difference gives the opportunity to select the specific bacteria to inhibit Campylobacter in chickens.

However, The healthy adult chicken has considerable variation in the composition of normal flora in the gut (6). Due to the exposing the natural environments, the chicken rearing under organic system may possibly contains the potential bacteria against Campylobacter growth. The chicken could be the source of potential probiotic search whereas a lack of reports on the use of probiotic bacteria from organic chicken source is found. Under the rearing systems of chickens, commercial or organic may influence on the composition of normal flora in the chicken gut (20). The organic chicken farming has rapidly increased in numbers in Thailand, where existing old fashion of native chicken could be performed as backyard or organic chickens vice

versa. The system is allowed chickens free to enrich environment. Under the rearing pattern, the native chicken could withstand to some disease. Then, these chickens could possibly be the source to quantify such good bacteria to inhibit pathogenic bacteria.

The study was to our knowledge on the finding the relationship of microflora bacteria in chicken gut of commercial and backyard chickens and to quantify the potential bacteria demonstrating negative effect on the growth of Campylobacter.

Materials and Methods

Chicken maintenance and sample collection

On sampling for the experiment, 25 Backyard chickens were randomly obtained from local houses around Khon Kaen province. The chickens were free to access natural feed such as unprocessed rice, small insect, drinking water and so on. Chickens were not exposed to competitive exclusion, antibiotic or vaccination. The rearing of backyard chickens propagates around the country and has been used to perform of organic chickens. All chicken age were average on 40 weeks. While 5 broilers were randomly obtained from 5 commercial farm each where chickens were commercially hatched and feed. The diet for these chickens was a commercial feed, without competitive exclusion and free from antibiotic. The age of chickens was 35 weeks. The handling and killing of the chickens was under the protocol of FELASA (level C).

Culturability of Campylobacter and microflora

Chickens were euthanasia and caecum were collected. 1 gram of the fecal were transferred into 9 mL of buffered peptone water and made 10 fold dilution using PBS solution to culture for Campylobacter and microflora as Enterobacteriaceae, total bacteria, Lactobacillus and anaerobic bacteria. For the culture of campylobacter, approximate dilution was directly spread on CCDA (Oxoid, CM739) plates with selective antibiotic (SR 115, Oxoid, Basingstoke, UK). The plates were incubated at 37°C under microaerophilic condition using gas package BBL in anaerobic jars for 48 hr. For isolation of microflora, a serial ten-fold dilution with PBS was made and spread on the appropriate selective agar plates for Lactobacillus, Enterobacteriaceae, anaerobic and total bacteria. The plates were incubated as described elsewhere. The number of colony forming units was expressed and record as log cfu/g. The selected defined colonies of microflora were collected and kept at -70°C for antimicrobial activity further test.

Assessment of the inhibitory activity on Campylobacter

80 selected defined colony lactobacillus and anaerobic bacteria were selected from all negative campylobacter chickens and tested in duplicated for the anti-campylobacter potential on the growth of Campylobacter using a well diffusion agar assay.

Campylobacter

9 strains of Campylobacter spp. isolated from the chickens, maintained at -70^{o}C were thawed at room temperature. One loop of each stock solution was streaked on CCDA agar (Oxoid, CM 739, Basingstoke, UK) containing selective supplement (Oxoid, SR 115). The plates were kept at 42^{o}C under microaerophillic condition generating by using gas package (BBL, Becton Dickinscn, USA) in anaerobic jars for 48 h. Thereafter, one typical colony of each strain of Campylobacter was transferred into Meuller-Hinton (MH) (Oxoid, CM 405, Basingstoke, UK) broth and kept at 37^{o}C under microaerophillic atmosphere for 48 h. There cultures were utilized in the experiments.

Isolated microflora bacteria

80 selected microflora bacteria were isolated from Campylobacter-free chickens reared under commercial and backyard section as described above, were grown on the appropriate selective agar (Snel, 1996). An isolated colony of each bacterium was grown in MRS (Oxoid, CM 359) broth and aerobically incubated fro 24 h at 37^{o}C for Enterobacteriaceae and total bacteria and under anaerobic condition for Lactobacillus and anaerobic bacteria. After overnight incubation, the culture were collected and filtrated aseptically by using a filter of 0.2 µm pore size ( ). These supernatants were kept at -20^{o}C until use.

Relationship of Microflora in Campylobacter and Campylobacter-free chicken fecess

Extraction of DNA from chicken ceacum specimen

For the ceacal contents, the materials were obtained by squeezing the region of the ceacum with a sterile forceps. 1 g of ceacal content was dispersed in tube with 5 ml of a phosphate-buffered saline at pH 7.0 and was vortexed vigorously for 10 min at 8,800 rpm. The supernatant was discarded. The pellet was kept at -20^{o}C until DNA extraction. The total DNA was extracted by using DNA kit (RBC Real Genomics, USA). The procedure was followed the instruction of the company (RBC Bioscience). 200

μL of lysozyme buffer to lyses the cell wall of bacteria was added into the cell pellet tube and vortetx in order to resuspend the cell pellet. The cell pellet was incubated at room temperature for 10 min and invert the tube every 2-3 min. To treated the cell, 200 μL of GB Buffer was added and vortex for 5 sec. The incubated the cell at 70°C for 10 min until the cell lysate was clear. After that 5 μL of RNase A (10mg/ml) was added to the cell lysate and mixed well. The incubation at room temperature for 5 min was required.

To collect the DNA, 200 μL of ethanol (100%) was added into the cell lysate and vortex for 10 sec. The total mixture was placed into GD column on a 2 ml collection tube. The collection tube was closed the cap and centrifuge at 13,000 rmp for 30 sec. For washing step, 400 μL of W1 buffer was added to the GD column and centrifuge at 13,000 rmp for 30 sec and discarded the flow-through and return the GD column to 2 ml collection tube. Adding 600 μL of washing buffer to the GD column to the 2 ml collection tube and centrifuge at 13,000 rmp for 30 sec. Discard the flow-through and return the GD column to 2 ml collection tube and then centrifuge at 13,000 rmp for 3 min and to dry the column matrix. Transfer dried GD column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. The purified DNA was eluted by adding 100 μL of preheated elution buffer and centrifuge at 8,000 rmp for 30 sec. DNA was checked visually at 0.8% agarose gel electrophoresis.

Extraction DNA of Campylobacter isolation from backyard and commercial broiler chickens

11 campylobacter isolation form back yard chickens and 5 Campylobacter isolation from commercial broiler chickens were studied. The isolated bacterial were grown at 37°C under microaerophillic condition on MH broth (Oxiod,). The extraction of DNA isolated bacterial was followed the instruction of the company of Vio gene kit (RBC Real Genomics, USA). Bacterial samples were centrifuged at 7,500 rpm for 10 min. The pellet were resuspend in 200μl of lysozme buffer. The procedure was explained as above. The purified DNA was checked visually at 0.8% agarose gel electrophoresis.

RAPD reaction

The 7 RAPD primer sequences to study the relationship of microflora in chicken ceacum and the 13 RAPD primers to study the Campylobacter isolation from backyard and commercial broiler chickens were used in Table 2a and b, respectively. PCR amplication were performed using of 25 μL containing 1X buffer, 2.0mM MgCl2, 0.2mM each dNTP, 0.5 μM each primer, 10 ng genomic DNA and 1.25 units of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Amplification reactions were performed in a thermal cycler (Gene Amp PCR system 9700, Applied Biosystems) as following program: (1) denaturation step at 94°C for 5 min; (2) 40 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 38°C for 45 s, extension at 72°C for 1 min; (3) a final extension at 72°C for 10 min. These PCR products were detected by agarose gel electrophoresis (1.0% w/v in TAE), stained with ethidium bromide and finally photographed under UV light exposure.

Phylogenetic analysis

Each RAPD bands was considered as an independent character and the bands were scored visually as either absent (0) or present (1) for each band across all samples with the same primer pairs. Qualitative differences in band intensity were not considered. With the band data, a pair-wise genetic similarity matrix was generated among bacteria species using Ochiai similarity coefficients which were then converted to a genetic distance matrix. Based on the genetic distance matrix, cluster analysis was performed and corresponding dendrograms were constructed for bacteria species using the single linkage cluster method. Cophenetic correlations were computed from the clustering matrix in order to get the best fit dendrogram. All there analyses were done using the Fingerprinting II program (BioRad, USA).

Statistical Analysis

A mean of the bacteria as Campylobacter, anaerobic Lactobacilllus, total bacteria and Enterobacteriaceae numbers from backyard and commercial chickens of was compared using simple t-test. Significant difference was determined as $p < 0.05$.

Results

Microflora numbers in backyard and commercial chickens

In general, the number of anaerobic, lactobacillus, total bacteria and enterobacteriaceae bacteria in commercial chicken group was 0.87, 0.27, 0.21 and 0.53 log CFU/g slightly higher than in backyard chicken group, respectively. In contrast, the number of Campylobacter in backyard chicken group was 0.73 log CFU/g higher than in commercial chicken group. No difference in microflora number was found between two group chickens (Fig 1).

The inhibitory activity on Campylobacter

In agar diffusion well assay, a clear zone of 21 of 80 isolated bacteria were demonstrated the negative effect on the growth of 9 strains of Campylobacter (Table 1). Most effective bacteria were aerobic and lactobacillus bacteria. 11 isolated bacteria from backyard chickens and 10 isolated bacteria from the commercial chicken showed the negative effect on the 9 strain of Campylobacter.

16s DNA relationship of microflora bacterial in ceacal contents of backyard and commercial broiler chickens

High variation of the DNA profile of microflora of chickens from backyard and commercial system was found as similarity index was between 29-77% (Fig 2 and 3). On the result of phylogenetic tree, the biodiversity of microflora in the ceacal contents of the chickens was mostly divided into 2 groups corresponding to chickens as Campylobacter positive (a) and Campylobacter-negative (b) chickens on the result of cultural method (Fig 3). The microflora from the chickens of group a and b had a 46% similarity. Clearly, in the group b, chickens were group and negative to Campylobacter infection by cultural method. Whereas in the group a by biodiversity, at the similarity 52%, the DNA profile of chicken feces was divided into 3 groups as 1, 2 and 3 corresponding chickens from commercial, backyard and commercial broiler farm respectively. The samples as group 2 from the backyard chicken had more 67% similarity than those commercial chickens pattern as group 1 and 3.

Relationship of Campylobacter isolation of backyard and commercial broiler chickens

The 16s DNA profile using 13 primers of the 16 Campylobacter isolation is shown in figure 4. High variation of DNA band pattern was found particularly in chickens from backyard system (in chicken A and B). The profile band patterns of the samples were clustered into 5 distinct groups comprising group a, b, c, d and e as it illustrated by the phylogenetic tree (Fig 4). Obviously, the band pattern were group in backyard chickens as group a, d and e whereas the commercial chickens as group b and c. The DNA band pattern of backyard chickens was lower similarity at 56%, 63% and 43% in the group a, d and e comparing with the pattern of DNA of commercial chickens the similarity at 86% and 78% in the group b and c (Fig 5).

Conclusion

The study was demonstrated that

There are some potential flora bacteria which could inhibit the growth of Campylobacter.

There are no different number in Campylobacter between backyard and commercial chickens. Commercial and backyard chickens showed different of DNA profile of flora bacteria. Campylobacter and Campylobcater-free chickens could have relatively different of the DNA profile of flora bacteria

Fig. 2a The phylogenetic tree of the variation of flora bacteria in the fecal of Campylobacter (plus) and Campylobacter-free chickens (non plus) was shown. Group A, B and G were from backyard chickens and group C, D, E and H were from commercial chicken farms.

Fig. 2b The demonstration of the relationship of DNA profile of normal flora bacteria of fecal chicken with and without Campylobacter by using RAPD and microsatellite.

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

Table 1. Inhibitory effect of isolated bacteria from Campylobacter-free chickens on the growth of Campylobacter spp. was demonstrate by using agar diffusion method. The diameter of inhibition zone was measured in mm. Control was culture media without the growth of bacteria. Acetic acid was used as positive control.

Acknowledgement

The authors would like to thank Thailand Research Fun (TRF) for financial support.

References

1. **Amit-Romach, E., D. Sklan, and Z. Uni.** 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. Poult Sci **83:**1093-8.

2. **Apajalahti, J. H., A. Kettunen, M. R. Bedford, and W. E. Holben.** 2001. Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. Appl Environ Microbiol **67:**5656-67.

3. **Chaveerach, P., L. J. Lipman, and F. van Knapen.** 2004. Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of Campylobacter jejuni/coli. Int J Food Microbiol **90:**43-50.

4. **Gong, J., R. J. Forster, H. Yu, J. R. Chambers, P. M. Sabour, R. Wheatcroft, and S. Chen.** 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. FEMS Microbiol Lett **208:**1-7.

5. **Hansson, I., E. O. Engvall, J. Lindblad, A. Gunnarsson, and I. Vagsholm.** 2004. Surveillance programme for Campylobacter species in Swedish broilers, July 2001 to June 2002. Vet Rec **155:**193-6.

6. **Hume, M. E., L. F. Kubena, T. S. Edrington, C. J. Donskey, R. W. Moore, S. C. Ricke, and D. J. Nisbet.** 2003. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. Poult Sci **82:**1100-7.

7. **Humphrey, T. J., D. G. Lanning, and G. C. Mead.** 1989. Inhibition of Campylobacter jejuni in vitro by broiler chicken caecal contents. Vet Rec **125:**272-3.

8. **Johansen, C. H., L. Bjerrum, K. Finster, and K. Pedersen.** 2006. Effects of a Campylobacter jejuni infection on the development of the intestinal microflora of broiler chickens. Poult Sci **85:**579-87.

9. **Kizerwetter-Swida, M., and M. Binek.** 2009. Protective effect of potentially probiotic Lactobacillus strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. Pol J Vet Sci **12:**15-20.

10. **Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer, and M. D. Lee.** 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. Appl Environ Microbiol **69:**6816-24.

11. **Mead, G. C., M. J. Scott, T. J. Humphrey, and K. McAlpine.** 1996. Observations on the control of Campylobacter jejuni infection of poultry by 'competitive exclusion'. Avian Pathol **25:**69-79.

12. **Pearson, A. D., M. H. Greenwood, J. Donaldson, T. D. Healing, D. M. Jones, M. Shahamat, R. K. Feltham, and R. R. Colwell.** 2000. Continuous source outbreak of campylobacteriosis traced to chicken. J Food Prot **63:**309-14.

13. **Santini, C., L. Baffoni, F. Gaggia, M. Granata, R. Gasbarri, D. Di Gioia, and B. Biavati.** 2010. Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against Campylobacter jejuni. Int J Food Microbiol.

14. **Schoeni, J. L., and M. P. Doyle.** 1992. Reduction of Campylobacter jejuni colonization of chicks by cecum-colonizing bacteria producing anti-C. jejuni metabolites. Appl Environ Microbiol **58:**664-70.

15. **Tauxe, R. V.** 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. Emerg Infect Dis **3:**425-34.

16. **Tauxe, R. V.** 2002. Emerging foodborne pathogens. Int J Food Microbiol **78:**31-41.

17. **Tauxe, R. V.** 1998. Foodborne illnesses. Strategies for surveillance and prevention. Lancet **352 Suppl 4:**SIV10.

18. **Voetsch, A. C., T. J. Van Gilder, F. J. Angulo, M. M. Farley, S. Shallow, R. Marcus, P. R. Cieslak, V. C. Deneen, and R. V. Tauxe.** 2004. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal Salmonella infections in the United States. Clin Infect Dis **38 Suppl 3:**S127-34.

19. **Wine, E., M. G. Gareau, K. Johnson-Henry, and P. M. Sherman.** 2009. Strain-specific probiotic (Lactobacillus helveticus) inhibition of Campylobacter jejuni invasion of human intestinal epithelial cells. FEMS Microbiol Lett **300:**146-52.

20. **Wise, M. G., and G. R. Siragusa.** 2007. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. J Appl Microbiol **102:**1138-49.

เรื่องที่ 3

Risk factors of Campylobacter contamination on pig carcasses from slaughterhouse

Sudthidol Chaichin[1], Prapansak Chaveerach[2*], Komkrich Pimpukdee2

Abstract

Objective --- The study was to identify risk factors for Campylobacter contamination on pig carcasses in pigs slaughterhouse

Materials and Methods --- The study based on HACCP practice was divided into2 groups. The first group was strongly operation followed the good practice of Thai Agricultural Commodity and Food Standard (TACFS) 9009 – 2549. The second group was operation under common practice on slaughtering process. 28 pigs per group was passed through three critical points of slaughtering stage as behead, open (splitting carcass), and meat inspection. Each point was collected, carcass and knife. In each carcasses the sampling was done by smearing all five positions as rectum, tail, hind legs, vertical saddle and neck.

Results --- The results were found that the contamination of Campylobacter on pig carcasses slaughtered by common practice group in the critical point of behead, splitting carcass and meat inspection in carcass was 33.33% (8/24), 45.83% (11/24) and 41.67% (10/24) respectively. At the position of inspection, knife was found contamination at 41.67% (10/24). In the other group, using the plastic cover around the anus following TACFS method, it reduce contamination Campylobacter on pig carcasses from 45.83% (11/24) to 4.17% (1/24) ($P < 0.05$). Cleaning knife before and after to used can reduced contamination Campylobacter from 41.67% (10/24) reduced to 8.33% (2/24). The correlation risk (Odds ratio) of the contamination Campylobacter on carcass pigs of the group II wast 3.69 times the group I in the pig carcass. ($P < 0.05$; 95% CI [1.99 - 6.87])

Conclusion --- It was concluded that the important risk factors for contamination Campylobacter on pig carcass was fecal intestines contamination on pig carcasses and knife.

Keywords: Risk factors, Campylobacter, Pig carcasses, Slaughterhouse.

[1]Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan, Surin campus, Surin 32000, Thailand.
[2]Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.
*Corresponding author: 043-404202.

ปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรในโรงฆ่าสัตว์

สุทธิดล ไชยชิน[1], ประพันธ์ศักดิ์ ฉวีราช[2] คมกริช พิมพ์ภักดี

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรในระบบโรงฆ่าสุกร

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ กำหนดกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤต เป็นกลุ่มที่มีความเข้มงวดเรื่องวิธีปฏิบัติในโรงฆ่าสุกรที่ถูกสุขลักษณะตามหลักวิธีปฏิบัติ มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) 9009-2549 และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤตซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการปฏิบัติในโรงฆ่าสุกรที่ถูกสุขลักษณะโดยปล่อยให้ดำเนินงานตามปกติตามรูปแบบหรือวิธีการที่บุคคลากรในโรงฆ่าเคยปฏิบัติ ทำการศึกษาในสุกรที่เข้าโรงฆ่าสุกรจำนวน 28 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง แบ่งจุดวิกฤตมี 3 จุดคือ จุดที่มีการตัดหัว จุดที่มีการเปิดซาก จุดที่มีการตรวจซาก และแต่ละจุดมีการเก็บตัวอย่างที่ตำแหน่งต่างๆ คือ ซาก และมีด การเก็บตัวอย่างจากซากโดยการป้ายเชื้อทั้งหมด 5 ตำแหน่งคือ ทวารหนัก หาง ขาหลัง แนวสันหลัง คอ

ผลการศึกษา ผลการทดลองพบว่าการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต พบว่าในซากสุกรพบมากในจุดวิกฤตที่มีการตัดหัวสุกรที่ตำแหน่งซาก 33.33% (8/24) จุดวิกฤตที่มีการเปิดผ่าซาก ที่ตำแหน่งซาก 45.83% (11/24) จุดวิกฤตที่มีการตรวจซากของพนักงานตรวจโรคสัตว์ ที่ตำแหน่งซาก 41.67% (10/24) และตำแหน่งมีด 41.67% (10/24) และที่ซากสุกร ที่ตำแหน่งแนวสันหลัง 50.0% (12/24) การใช้ถุงพลาสติกหุ้มรอบบริเวณทวารหนักจะช่วยลดการปนเปื้อนได้จาก 45.83% (11/24) ลดลงเป็น 4.17% (1/24) ($P < 0.05$) และการทำความสะอาดมีดก่อนและหลังการใช้งาน จะช่วยลดการปนเปื้อนได้จาก 45.83% (11/24) ลดลงเป็น 4.17% (1/24) ($P <$

0.05) และจากการวิจัยพบค่าความสัมพันธ์ความเสี่ยง (Odds ratio) ต่อการปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรของกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต 3.69 เท่า ต่อกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤตในซากสุกร (P < 0.05 ; 95% CI [1.99 – 6.87])

ข้อสรุป สรุปว่าปัจจัยเสี่ยงสำคัญในการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกร คือ การปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์จากลำไส้สุกรและมีดของพนักงานตรวจโรคสัตว์

คำสำคัญ: ปัจจัยเสี่ยง แคมไพโลแบคเตอร์ ซากสุกร โรงฆ่าสัตว์

[1]คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000
[2]ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ: โทรศัพท์ 044-153090

สำนักงานคณะกรรมการ ห้องสมุดงานวิจัย

บทนำ

แคมไพโลแบคเตอร์ถูกจัดเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ จัดอยู่ใน Family Campylobacteraceae มีลักษณะเซลล์รูปร่างเป็นแท่งโค้งหรือเป็นเกลียว (spiral shape) จะคล้ายปีกนก หรืออาจมีรูปร่างเหมือนเครื่องหมายจุลภาคหรือมีรูปร่างคล้ายตัวเอส (curved, S) ขนาดกว้างประมาณ 0.2 – 0.8 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 0.5 – 5.0 ไมโครเมตร เมื่อเซลล์อายุมากขึ้นหรือสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศเป็นเวลานานจะมีการเปลี่ยนรูปร่างเป็นแบบทรงกลม (coccus) ลักษณะทั่วไปของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ไม่สร้างสปอร์ มีแส้ (flagella) สามารถเคลื่อนไหวได้ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นการเคลื่อนไหวแบบเกลียวสว่าน (corkskrew-like motion) ที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40 – 42 องศาเซลเซียส ไม่ทนความเค็มและความเป็นกรดสูง (pH < 6.5) แคมไพโลแบคเตอร์ส่วนใหญ่ต้องสภาวะบรรยากาศแบบ microaerophillic (5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2) และส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase test) แคมไพโลแบคเตอร์ที่ตรวจพบในสุกรส่วนใหญ่จะเป็น *C. coli* (ซีโรไทป์ O:30 และ O:46 ซึ่งตรวจโดยวิธีการทดสอบปฏิกิริยาที่ไม่ทำให้เกิดการตกตะกอนของเม็ดเลือดในถาดทดสอบขนาดเล็ก ซึ่งออกแบบโดย Penner and Hennessy) โดยพบ 34 - 46% ในสุกร [1] และพบว่า *C. coli* เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในคนด้วย [2, 3] โดยที่ผู้ป่วยจะมีอาการ อุจจาระร่วงเป็นน้ำหรือมีเลือดปน เมื่ออาการพัฒนานานขึ้นอาจพบภาวะอาการทางระบบประสาทของโรคในกลุ่มอาการ Guillain-Barré syndrome (GBS) ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขทั้งของประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศที่กำลังพัฒนา และเป็นอุปสรรคของการผลิตอาหารอันมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ผ่านทางเนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์สู่ผู้บริโภค ในปี 2003 มีรายงานของสมาชิกประเทศในกลุ่มยุโรปพบจำนวนผู้ป่วยเป็นโรคแคมไพโรแบคเทอริโอซีส 48.9 ต่อประชากร 100,000 คน [4] และในปีเดียวกันที่สหรัฐอเมริกาพบว่ามีสัดส่วนผู้ป่วย 12.6 ต่อประชากร 100,000 คน [5] มีรายงานพบว่าเด็กที่อายุน้อยกว่า 14 ปี จำนวน 2,001 คน ที่ป่วยด้วยอาการท้องเสียที่เข้ารักษาในโรงพยาบาลในเขตกรุงเทพมหานครในปี 2000 – 2005 พบว่ามีการติดเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ 2.9% [6] แนวโน้มของผู้ป่วยที่ป่วยด้วยสาเหตุอาหารเป็นพิษในประเทศไทยมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในปี พ.ศ.2551 สำนักระบาดวิทยา ได้รายงานผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง เฉียบพลัน 1,256,711 ราย อัตราป่วย 1,988.03 ต่อประชากร 100,000 คน เสียชีวิต 49 ราย อัตราตาย 0.08 ต่อประชากร 100,000 คน อัตราป่วยตาย 0.004% เมื่อพิจารณาข้อมูลย้อนหลัง 10 ปี พบว่าอัตราป่วยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 1,564.27 ต่อประชากร 100,000 คนในปี พ.ศ. 2542 (ค.ศ. 1999) เป็น 1,988.03 ต่อประชากร 100,000 คนในปี พ.ศ. 2551 [7]

การพบเชื้อในกระบวนการฆ่าและชำแหละสุกร พบว่าในไต้หวันพบความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกร 13.8% [8] และประเทศนอร์เวย์รายงานความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรก่อนที่จะมีการใช้ลมเย็นเป่าปรับอุณหภูมิผิวซากสุกร 56.7% [9] และประเทศเนเธอร์แลนด์ได้รายงานความชุกแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรที่ชำแหละ 9% [10] และในปี 1996 สหรัฐอเมริกาโดย United States Department of Agriculture (USDA) รายงานความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกร 31.5% [11] และมีรายงานวิจัยพบความชุกแคมไพโลแบคเตอร์ในซาก 21.1% [12] ส่วนในประเทศเบลเยี่ยมมีรายงานความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ 17% ในซาก (600 ตารางเซนติเมตร) และ 10% ในเนื้อที่ตัดแต่ง (25 กรัม) และ 3.9% ในเนื้อบด (25 กรัม) และพบว่าสัดส่วนของเชื้อ C. coli (16.7%) และ C. jejuni (75%) ในเนื้อสุกร [4] มีรายงานการพบแคมไพโลแบคเตอร์ในช่องอกและในช่องท้อง 58.9% และ 44.6% ตามลำดับ [13] ในอังกฤษพบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในเนื้อสุกร 6.3% [14] สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษาถึงความชุกของ *C. coli* พบในเนื้อสุกร 60% และไม่พบ *C. jejuni* ในสุกร [15]

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้ง เพื่อศึกษาปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรในระบบโรงฆ่าสุกร เพื่อใช้เป็นแนวทางในวางแผนควบคุมป้องกันการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในอนาคตต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำตัวอย่างของ Borch et al. (1996) [16] ซึ่งได้วิเคราะห์จุดวิกฤตตามหลักการ HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) มาเป็นรูปแบบในการกำหนดจุดวิกฤตโดยใช้วิธีวิจัยเชิงวิเคราะห์ ณ จุดเวลาหนึ่ง (cross-sectional study) เพื่อหาค่าสัมพันธ์ความเสี่ยงระหว่างกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤตและกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป EpiInfo เวอร์ชั่น 6.04d ปี 2004 นำมาทดสอบด้วย Chi – square (2 x 2) หรือ Fisher's Exact ทดสอบนัยสำคัญของความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤตและกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต โดยพิจารณาจากค่าสัมพันธ์ความเสี่ยง (Odd ratio: OR)

แบ่งกลุ่มตัวอย่างการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เริ่มตั้งแต่ภายหลังจากการลวกซากและขูดขน การตัดคอ การเปิดผ่าซาก จนถึงขั้นตอนการตรวจเนื้อโดยพนักงานตรวจโรค โดยกำหนดกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤต เป็นกลุ่มที่มีความเข้มงวดเรื่องวิธีปฏิบัติในโรงฆ่าสุกรที่ถูกสุขลักษณะตามหลักวิธีปฏิบัติ มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) 9009-2549 และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤตซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการปฏิบัติในโรงฆ่าสุกรที่ถูกสุขลักษณะโดยปล่อยให้ดำเนินงานตามปกติ ตามรูปแบบหรือวิธีการที่บุคคลากรในโรงฆ่าเคยปฏิบัติ ซึ่งทั้งหมดทำการศึกษาในสุกรที่เข้าโรงฆ่าสุกรจำนวน 28 ตัวต่อกลุ่มการทดลองโดยแบ่งจุดวิกฤตมี 3 จุดคือ จุดที่มีการตัวหัว จุดที่มีการ

เปิดซาก จุดที่มีการตรวจซากในแต่ละจุดมีการเก็บตัวอย่างที่ตำแหน่งต่างๆ คือ ซาก และมีด การเก็บตัวอย่างจากซากโดยการป้ายเชื้อทั้งหมด 5 ตำแหน่งคือ ทวารหนัก หาง ขาหลัง แนวสันหลัง คอ โดยมีการเก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบเชื้อจำนวน 288 ตัวอย่างต่อกลุ่มการทดลอง

ผลการศึกษา

ผลจากการวิจัยครั้งนี้พบว่า ความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ที่ตรวจพบในซากสุกร ณ จุดวิกฤตต่างๆ ของ กลุ่มที่ไม่มีการควบคุม (กลุ่มที่ 1) และที่มีการควบคุม (กลุ่มที่ 2) ได้ผลดัง **Table 1.** จากผลการวิจัยพบว่าเมื่อนำจำนวนของการให้ผลบวกกับการตรวจหาแคมไพโลแบคเตอร์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ความเสี่ยง (Odds ratio) ด้วยโปรแกรม EpiInfo เวอร์ชั่น 6.04d ปี 2004 โดยใช้วิธี Chi – square test หรือ Fisher's Exact test ในการวิเคราะห์พบว่าจุดที่มีการเปิดผ่าซาก ณ ตำแหน่งซากสุกรพบว่ากลุ่มที่ไม่มีการควบคุมมีความสัมพันธ์ความเสี่ยงกับการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ 19.46 เท่า ของกลุ่มที่มีการควบคุม ($P < 0.05$; 95% CI [2.11 – 450.61]) และจุดที่มีการตรวจซากโดยพนักงานตรวจโรคสัตว์ ณ ตำแหน่งซากสุกรและมีด พบว่ากลุ่มที่ไม่มีการควบคุมมีความสัมพันธ์ความเสี่ยงกับการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ 16.43 เท่า และ 7.86 เท่า ของกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤต ($P < 0.05$; 95% CI [1.78 – 381.24]) ($P < 0.05$; 95% CI [1.29 – 61.38]) ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ที่ตำแหน่งต่างๆ ของซากสุกรพบว่า ที่ตำแหน่งแนวสันหลังของกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมมีความสัมพันธ์ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ 5 เท่า ของกลุ่มที่มีการควบคุม ($P < 0.05$; 95% CI [1.12 – 24.03]) ดังแสดงใน **Table 2.** หากนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าสัมพันธ์ความเสี่ยง (Odds ratio) ของกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมเทียบกับกลุ่มที่มีการควบคุมในซากสุกรพบว่า กลุ่มที่ไม่มีการควบคุมมีความสัมพันธ์ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกร 3.69 เท่า ของกลุ่มที่มีการควบคุม ($P < 0.05$; 95% CI [1.99 – 6.87]) ดังแสดงใน **Table 3.**

วิจารณ์ และสรุป

ค่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ที่ตรวจพบในซากสุกรของกลุ่มที่มีการควบคุม แนวโน้มของค่าความชุกในซากสุกรทุกจุดมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ คือ 8.33%, 4.17%, 4.17% และหากพิจารณาภาพรวมของความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ในทุกๆ จุด ทั้งกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤต พบว่าช่วงจุดที่มีการตัดหัวสุกรไปยังจุดที่มีการเปิดผ่าซาก ค่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์มีค่าลดลงและกลับมาเพิ่มอีกครั้งในจุดที่มีการตรวจซากโดยพนักงานตรวจโรคสัตว์และในซากสุกร 6.25%, 5.55%, 6.25%, 19.17% และในกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤตมีค่าความชุกเป็น 31.25%, 27.77%, 41.67%, 46.67% ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จะมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Pearce et al. (2003) [17] และ Maria et al. (2009) [18] ที่พบว่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์จะกลับมาเพิ่มอีกครั้งในช่วงที่มีการผ่าซากและชันสูตรซากแสดงให้เห็นว่าการเปิดผ่าซากและชันสูตรซากมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ได้มากขึ้น

ค่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ของจุดที่มีการตัดหัวสุกรในกลุ่มที่มีการควบคุมเป็น 6.25% และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมเป็น 31.25% ซึ่งพบว่าที่ตำแหน่งซากค่าความชุกของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ของกลุ่มที่มีการควบคุมเป็น 8.33% และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมเป็น 33.33% ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมาก

ค่าความชุกการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ของจุดที่มีการเปิดซากสุกรในกลุ่มที่มีการความคุม (5.55%) และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุม (27.77%) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ตำแหน่งซากของกลุ่มที่มีการควบคุม ค่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์แตกต่างถึง 41.66% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่มีการควบคุม และพบว่าแนวโน้มค่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ที่ปนเปื้อนในซากสุกรจะลดลงในกลุ่มที่มีการควบคุมอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Malakauskas และคณะที่พบว่าการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรมาจากการปนเปื้อนเชื้อที่มาจากระบบทางเดินอาหารในช่วงกระบวนผลิตในโรงฆ่า [19]

ค่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ของจุดที่มีการตรวจซากสุกรในกลุ่มที่มีการควบคุม (6.25%) และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุม (41.67%) ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และหากดูรายละเอียดจากผลการทดลองพบว่าที่ตำแหน่งมีดที่ใช้ในการตรวจซากสุกรของพนักงานตรวจโรคสัตว์พบว่ากลุ่มที่มีการควบคุม (8.33%) และกลุ่มไม่มีการควบคุม (41.67%) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การปนเปื้อนของแคมไพโลแบคเตอร์ที่เกิดจากการใช้มีดอาจทำให้มีการปนเปื้อนข้ามมายังซากน้อยกว่าจุดที่มีการตรวจซากน่าจะเป็นเหตุผล เพราะพนักงานฆ่าหรือผู้ปฏิบัติในแต่ละจุดจะใช้ผู้ปฏิบัติจุดละคน ซึ่งเมื่อสุกรแต่ละตัวผ่านจากจุดหนึ่งมายังอีกจุดหนึ่งพนักงานจะมีการเปลี่ยนมีดหรือลับคมมีดก่อนที่จะปฏิบัติกับซากสุกรตัวต่อไปซึ่งอาจมีการปนเปื้อนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับจุดที่มีการตรวจซากสุกร โดยพนักงานตรวจโรคสัตว์ ซึ่ง ณ จุดนี้ผู้ปฏิบัติหรือพนักงานตรวจโรคสัตว์จะเข้ามาทำการตรวจเมื่อซากสุกรมารอ ณ จุดนี้ครบ 10 ตัว แล้วทำการตรวจพร้อมๆ กัน ซึ่งการใช้มีดในจุดนี้จึงมีโอกาสที่จะปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ได้มากกว่าจุดอื่นๆ ที่มีการใช้มีด ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากค่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ที่ตำแหน่งมีด ณ จุดต่างๆ พบว่าค่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์จากตำแหน่งมีด จากจุดที่มีการตรวจซากสุกร จะมีค่าความชุกมากกว่าจุดที่มีการตัดหัวสุกรและจุดที่มีการเปิดผ่าซากสุกร ในกลุ่มที่ไม่มีการควบคุม 41.67%, 29.17%, 24.00% ตามลำดับ

จุดชากสุกรค่าความชุกของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ ตำแหน่ง ทวารหนัก หาง ขาหลัง แนวสันหลัง ของกลุ่มที่มีการควบคุมและกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมมีค่าความชุกไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่ามีแนวโน้มของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ลดลงในกลุ่มที่มีการควบคุมจุด ในทุกตำแหน่งที่กล่าวมา และมีค่าความชุกของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ตำแหน่งคอ และที่ตำแหน่งคอเป็นตำแหน่งที่มีค่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกรมากที่สุดคือ 29.17% และ 50.00% ในกลุ่มที่มีการควบคุมและไม่มีการควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องจากตำแหน่งคอคือตำแหน่งที่อยู่ต่ำที่สุดเมื่อมีการแขวนชากสุกร จึงทำให้น้ำล้างชากสุกรหรือสิ่งสกปรกต่างๆ ไหลมารวมกันที่บริเวณรอยตัดของคอ เมื่อนำไปตรวจสอบเชื้อจึงพบว่ามีค่าความชุกมากกว่าตำแหน่งอื่นๆ ที่ตรวจพบบนชากสุกร ดังนั้นหากมีการล้างทำความสะอาดชากด้วยน้ำที่มีส่วนผสมคลอลีนหรือน้ำสะอาดในบริเวณตำแหน่งนี้จะช่วยลดปริมาณของเชื้อที่สะสมบริเวณนี้ได้

การปฏิบัติตามมาตรฐาน มกอช. 9009-2549 สามารถช่วยลดการปนเปื้อนของแคมไพโลแบคเตอร์ในกระบวนการผลิตได้ กล่าวคือค่าความชุกของแคมไพโลแบคเตอร์จากกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมเป็น 46.67% ลดเหลือ 19.17% ในกลุ่มที่มีการควบคุม และหากเปรียบเทียบความชุกของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ของชากสุกรในภาพรวมของทุกจุดวิกฤตของกลุ่มที่มีการควบคุมและไม่มีการควบคุม 11.64% (33/288) และ 38.54% (111/288) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะพบว่าระดับการปนเปื้อนหากเปรียบเทียบกับประเทศที่พัฒนาแล้วซึ่งมีค่าความชุกของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกรเช่น สหรัฐอเมริกา 21.1 - 31.5% [11, 12] เบลเยี่ยม 17% [14] ไต้หวัน 13.8% [8] เนเธอร์แลนด์ 9% [10] อังกฤษ 6.3% [14] ส่วนในประเทศไทยที่เคยมีรายงานพบ 60% [15] ในชากสุกร ซึ่งจะพบว่าค่าความชุกที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้หากมีการควบคุม (11.64%) จะมีค่าความชุกอยู่ในเกณฑ์ประเทศที่พัฒนาแล้ว (6.3 – 31.5%) นั้นข้อมูลจากการทดลองครั้งนี้สนับสนุนให้เห็นความสำคัญของมาตรการในการควบคุมความเข้มงวดให้เป็นไปตามมาตรฐาน มกอช. 9009-2549 จะมีผลทำให้การตรวจพบแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกรลดน้อยลง

การใช้ถุงพลาสติกหุ้มรอบบริเวณทวารหนักตั้งแต่ช่วงขั้นตอนหลังจากที่สุกรขูดขนด้วยเครื่องลวกชากและเครื่องขูดขนสุกรแล้ว แสดงให้เห็นถึงค่าสัมพันธ์ความเสี่ยงของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ที่จุดที่มีการเปิดชากสุกร ณ ตำแหน่งชากสุกร 19.46 เท่า เมื่อเทียบกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมกับกลุ่มที่มีการควบคุมซึ่งสอดคล้องกับความเห็นของ Borch et al. (1996) [16] ที่แสดงให้เห็นถึงจุดวิกฤตที่มีโอกาสในการปนเปื้อนเชื้อโรคในกระบวนการฆ่าสุกร

ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกร คือ การปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์จากลำไส้สุกรมายังชากสุกร และการปนเปื้อนจากมีดที่ใช้ในการปฏิบัติงานของพนักงานตรวจโรคสัตว์โดยเกิดการปนเปื้อนข้าม ดังนั้นการป้องกันการปนเปื้อนอุจจาระจากลำไส้สุกรมายังชากสุกรด้วยการใช้ถุงพลาสติกหุ้มรอบบริเวณทวารหนักซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนหรือโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกรได้ และพบความสัมพันธ์ความเสี่ยง (Odds ratio) ต่อการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกรของกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต 3.69 เท่า ต่อกลุ่มที่มีการควบคุมจุดในชากสุกร การปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกรพบมากในจุดที่มีการเปิดผ่าชากโดยเฉพาะตำแหน่งชาก 45.83% (11/24) และจุดที่มีการตรวจชากของพนักงานตรวจโรคสัตว์ ทั้งตำแหน่งชาก 41.67% (10/24) และตำแหน่งมีด 41.67% (10/24) และที่จุดตรวจชากสุกร ตำแหน่งคอ พบการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ 50.00% (12/24) ในกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุด และมีดที่ใช้ปฏิบัติงานก็เป็นปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนของแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกร ณ จุดที่มีการตรวจชากสุกรถึง 7.86 เท่า และจุดนี้เป็นจุดที่มีค่าสัมพันธ์ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกร ณ ตำแหน่งชาก 16.43 เท่า เมื่อเทียบกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมกับกลุ่มที่มีการควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเข้มงวดในการปฏิบัติตามมาตรฐาน มกอช. 9009-2549 แสดงให้เห็นความชัดเจนในการปฏิบัติของพนักงานตรวจโรคสัตว์เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกรที่เกี่ยวกับเรื่องสุขอนามัยและการใช้มีดในการตรวจชากสุกรซึ่งสอดคล้องกับแนวทางปฏิบัติของโรงฆ่าสุกรในสาธารณรัฐเชค ในปี คศ. 2001 จนถึงปี คศ. 2003 ซึ่งสามารถลดการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในชากสุกรจากค่าความชุกในชากสุกร 18% เหลือเป็น 0% ในปี คศ. 2003 [3]

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ นายชัยพร สร้อยคำ ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ และการสนับสนุนจาก สกว. ในโครงการ MRG4700859

เอกสารอ้างอิง

1. Nielsen EM, Engberg J, Madsen M. Distribution of serotypes of Campylobacter jejuni and C. coli from Danish patients, poultry, cattle and swine. FEMS Immunol Med Microbiol. 1997 Sep;19(1):47-56.
2. Gurtler M, Alter T, Kasimir S, Fehlhaber K. The importance of Campylobacter coli in human campylobacteriosis: prevalence and genetic characterization. Epidemiol Infect. 2005 Dec;133(6):1081-7.
3. Steinhauserova I, Nebola M, Mikulicova M. Prevalence of thermophilic Campylobacter spp. in slaughtered pigs in the Czech Republic, 2001-2003. vet Med-Czech. 2005;50(4):171-4.

4. Ghafir Y, China B, Dierick K, De Zutter L, Daube G. A seven-year survey of Campylobacter contamination in meat at different production stages in Belgium. international j of food microbiology. 2007;116:111-20.
5. CDC. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food -- 10 States, 2008. MMWR 2008. 2009;58(13):333-7.
6. Pruksananonda P, Athirakul K, Worawattanakul M, Varavithya W, Pisithpun A, Kitayaporn D, et al. Diarrhea among children admitted to a private tertiary-care hospital, Bangkok, Thailand: a case series. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2008 May;39(3):434-42.
7. สำนักงานระบาดวิทยา. สรุปรายงานเฝ้าระวังโรค 2551. สำนักงานระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2552
8. Yeh KS, Chen SP, Lin JH. One-year (2003) nationwide pork carcass microbiological baseline data survey in Taiwan. J Food Prot. 2005 Mar;68(3):458-61.
9. Nesbakken T, Eckner K, Rotterud OJ. The effect of blast chilling on occurrence of human pathogenic Yersinia enterocolitica compared to Campylobacter spp. and numbers of hygienic indicators on pig carcasses. Int J Food Microbiol. 2008 Mar 31;123(1-2):130-3.
10. Oosterom J, Dekker R, de Wilde GJ, van Kempen-de Troye F, Engels GB. Prevalence of Campylobacter jejuni and Salmonella during pig slaughtering. Vet Q. 1985 Jan;7(1):31-4.
11. McMullen LM. Intervention Strategies to Improve the Safety of Pork. Advances in Pork Production. 2000;11:165-73.
12. Alter T, Gaull F, Kasimir S, Gurtler M, Mielke H, Linnebur M, et al. Prevalences and transmission routes of Campylobacter spp. strains within multiple pig farms. Vet Microbiol. 2005;108:251-61.
13. Hurd HS, Brudyig J, Dickson J, Mirceta J, Poloyinski M, Matthew N, et al. Swine health impact on carcass contamination and human foodborne risk. Public Health Rep. 2008 May-Jun;3:343-51.
14. Little CL, Richardson JF, Owen RJ, Pinna Ed, Threlfall EJ. Campylobacter and Salmonella in raw red meats in the United Kingdom : Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003 - 2005. Food Microbiology. 2008;25:538-43.
15. Padungtod P, Kaneene JB. Campylobacter in food animals and humans in northern Thailand. J Food Prot. 2005 Dec;68(12):2519-26.
16. Borch E, Nesbakken T, Christensen H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. Int J Food Microbiol. 1996 Jun;30(1-2):9-25.
17. Pearce RA, Wallace FM, Call JE, Dudley RL, Oser A, Yoder L, et al. Prevalence of Campylobacter within a swine slaughter and processing facility. J Food Prot. 2003 Sep;66(9):1550-6.
18. Maria F-A, Matthias G, Andreas S. High bacterial contamination of pig tonsils at slaughter. Meat Science. 2009 October 2009;83(2):334-6.
19. Malakauskasa bM, Jorgensenb K, Nielsenc EM, Ojeniyib B, Olsenb JE. Isolation of Campylobacter spp. from a pig slaughterhouse and analysis of cross-contamination. International Journal of Food Microbiology. 2006;108:295-300.