

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ *Salmonella* Enteritidis

การตรวจแยก *Salmonella* Enteritidis

ทำการเก็บตัวอย่างจากมูลไก่ และน้ำเสียจากโรงฆ่าชำแหละไก่ในเขตจังหวัดขอนแก่น ตัวอย่างละ 50 ตัวอย่าง เพื่อตรวจหาเชื้อ *S. Enteritidis* ด้วยวิธี ISO 6597: 2002 ดังนี้ นำตัวอย่างจำนวน 25 g (มูลไก่) หรือ 25 ml (น้ำเสีย) ไปบ่ม (enrich) ใน triptic soy broth (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) 225 ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาหยดลงบน Modified Semisolid Rappaport Vassilisdis medium (MSRV; Merck) ที่บริเวณขอบจานเพาะเชื้อ จำนวน 3 จุด จุดละ 2 loopful แล้ว incubate ที่ 42 °C 24 ชั่วโมง เลือก colony ที่ให้ผลบวกมาเพาะเชื้อต่อใน xylose-lysine-desocholate agar (XLD; Merck) และ Hektoen enteric agar (HE; Merck) แล้ว incubate ที่ 37 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือก colony ที่ให้ผลบวกมาเพาะเชื้อใน triple sugar iron agar (TSI; Merck) และ motility indole-lysine agar (MIL; Merck) โคลินิที่ให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองจัดว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* ซึ่งจะนำไปทำการจำแนกกลุ่มด้วยการทดสอบการตกตะกอนกับ O-antigen (Biotechnical; Bangkok, Thailand) จากนั้นส่งตรวจยืนยันวีโรวาร์ Enteritidis ที่สถาบันวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การทดสอบการดื้อต่อสารต้านจุลชีพ

นำเชื้อ *S. Enteritidis* มาทำการทดสอบการดื้อต่อสารต้านจุลชีพจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ amoxicillin 10 µg (AML), ciprofloxacin 5 µg (CIP), gentamicin 10 µg (GEN), nalidixic acid 30 µg (NA), norfloxacin 10 µg (NOR), sulfamethoxazole/trimethoprim 25 µg (SXT), tetracycline 30 µg (TE) ด้วยวิธี disk diffusion test (Oxoid; Hampshire, England) (NCCLS, 2002)

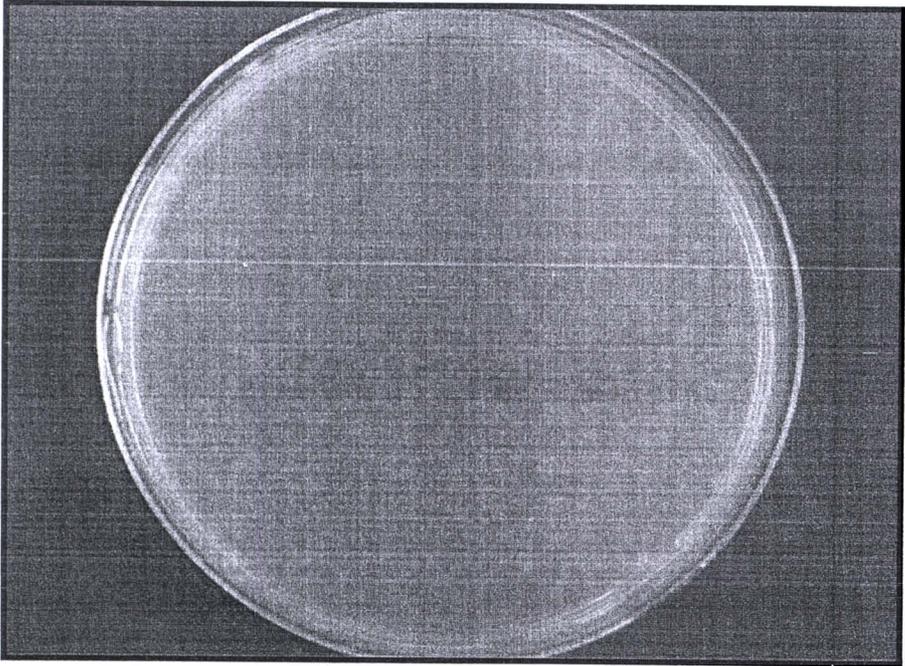
3.2 ขั้นตอนการแยกหาแบคทีเรียโอฟาจ

การตรวจแยกแบคทีเรียโอฟาจ

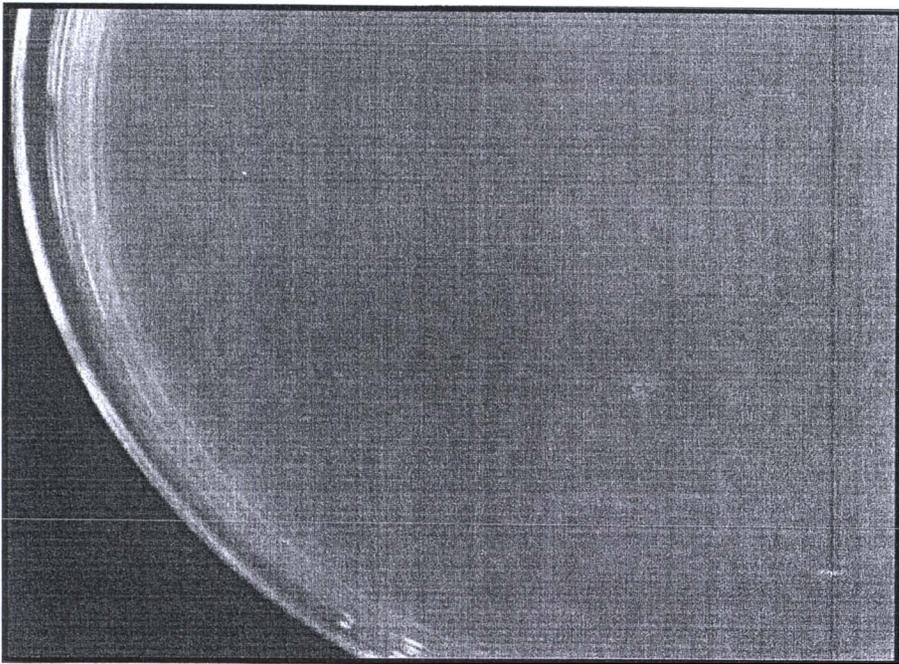
การค้นหาแยกโอฟาจจะใช้เชื้อ *S. Enteritidis* ที่แยกได้มา เพื่อแยกหา *Salmonella phages* จากมูลไก่ และน้ำเสียจากโรงฆ่าไก่ โดยนำตัวอย่างมาผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 μ -pore-size filter แล้วเติม *S. Enteritidis* 10^5 cfu/ml. ปริมาตร 100 μ l ผสมลงในน้ำตัวอย่างที่กรองแล้ว 1 มล. แล้วผสมกับ 1.5 มล. TSA ที่อุ่นไว้ที่ 45°C แล้วเทลงบน TSA plate ที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ แล้วนำไปบ่มที่ 37°C 1 คืน ต่อกันนั้นใช้ Sterile saline 15 มล. ล้างบน TSA แล้วเทน้ำล้างนั้นผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μ -pore-size filter หลังจากนั้นให้เติม *S. Enteritidis* 10^7 cfu/ml. ปริมาตร 100 μ l ผสมลงในน้ำตัวอย่างที่กรองแล้ว 1 มล. แล้วผสมกับ 1.5 มล. TSA ที่อุ่นไว้ที่ 45°C แล้วเทลงบน TSA plate ที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ แล้วนำไปบ่มที่ 37°C 1 คืน ต่อกันนั้นใช้ sterile saline 15 มล. ล้างบน TSA แล้วเทน้ำล้างนั้นผ่านกระดาษกรอง 0.22 μ -pore-size filter ให้ทำแบบนี้อยู่ 3 ครั้งเพื่อที่จะได้ phages ที่บริสุทธิ์

การเก็บ Phage plaques จาก plate ที่มีลักษณะเป็น Single plaques แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ 3 ครั้งกับเชื้อ *S. Enteritidis* ตามวิธีของ Xie et al (2005) การนำ *Salmonella phages* ที่ทำให้บริสุทธิ์มาวัดหาความเข้มข้นด้วยวิธีไตเตรด ทำ dilution series และนับ Single plaques แล้วคำนวณความเข้มข้นตามวิธีของ Xie et al (2005)

การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอฟาจ โดยใช้สารละลายไวรัสปริมาณ 10 ml (1×10^{10} PFU/ml) เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีเชื้อ *S. Enteritidis* 10^5 cfu/ml. เลี้ยงไว้ข้ามคืนปริมาณ 500 ml. นำไปบ่มเขย่าด้วยความเร็ว 180 rpm ที่ 37°C 5 ชั่วโมง แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 10 ml. นำไปบ่มเขย่าด้วยความเร็ว 180 rpm ที่ 37°C 10 นาที จากนั้นนำสารละลายไวรัสไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm 15 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านด้วย membrane filter ขนาด 0.22 ไมครอนเมตร เก็บส่วนที่กรองได้ไว้ในหลอดปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 4°C เพื่อสามารถนำไปใช้ได้ต่อไป



(ก)

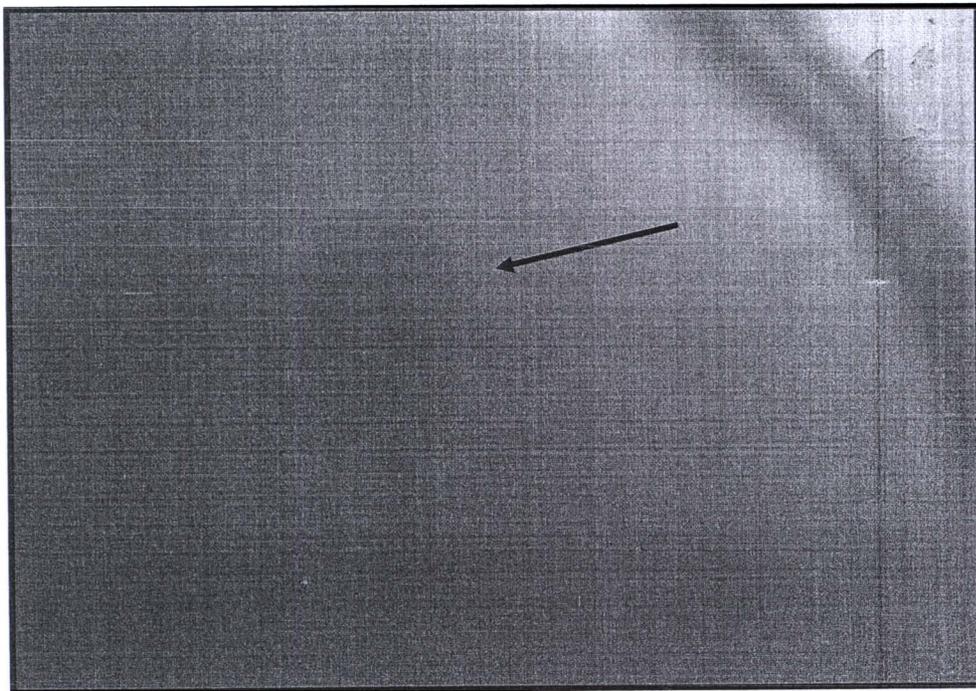


(ข)

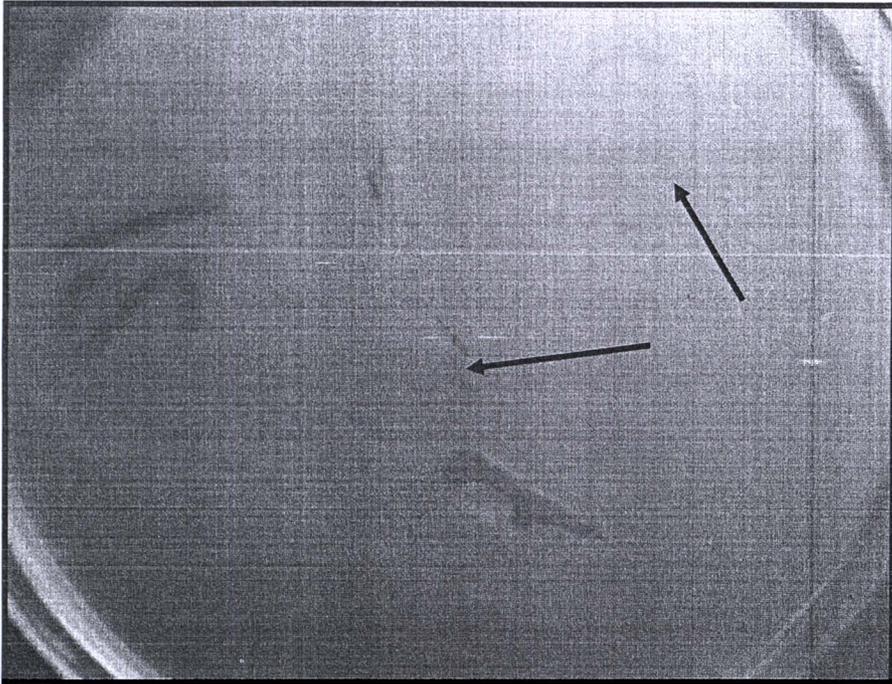
ภาพที่ 3.1 ลักษณะของ Plaque เกิดจากแบคทีริฟาจของเชื้อ *S. Enteritidis* (ก) และ (ข)

การทดสอบประสิทธิภาพของฟาจในการทำลายเชื้อ *S. Enteritidis* แบบ *In Vitro*

นำ *Salmonella* phages ขนาดความเข้มข้น 10^{10} PFU ที่ได้ มาทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *S. Enteritidis* 10^5 cfu/ml. โดยใช้สารละลายไวรัสปริมาณ 2 ml. ผสมกับเชื้อ *S. Enteritidis* ในระยะ log phase ปริมาตร 2 ml. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 180 rpm ที่ 37°C 24 ชั่วโมง ทำการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียฟาจด้วยวิธี double agar layer plaque assay โดยนับ plaque ที่เกิดขึ้น และคำนวณค่าออกมาเป็น plaque forming unit per ml. (PFU/ml.)



(ก)

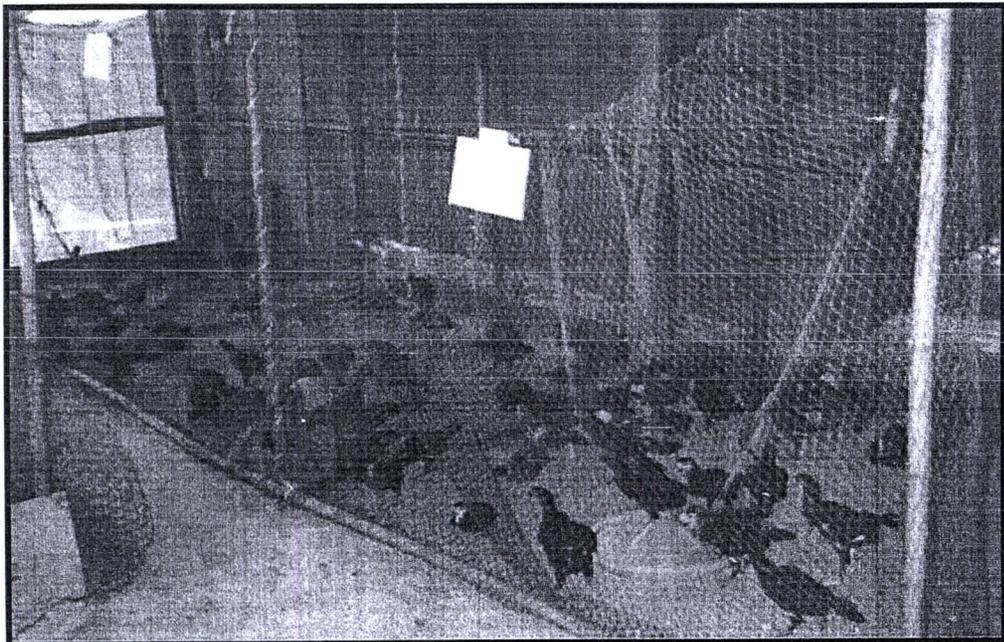


(ข)

ภาพที่ 3.2 ลักษณะของ Clear zone ของการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีริโอฟาจต่อเชื้อ S. Enteritidis (ก) และ (ข)

3.3 กลุ่มตัวอย่าง

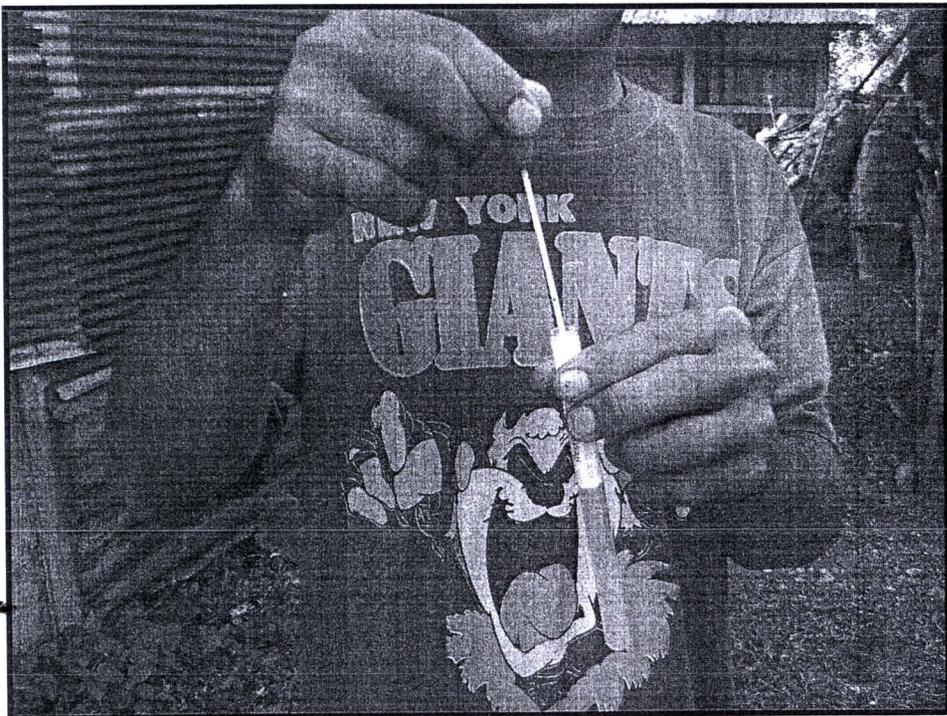
ทำการคัดเลือกไก่พื้นเมืองอายุประมาณ 1 เดือน จำนวน 80 ตัว ที่มีสุขภาพสมบูรณ์ และตรวจไม่พบเชื้อซัลโมเนลลาในมูล โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว ด้วยวิธีการสุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) ส่วนกลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มทดลอง (Treatment) ที่แปรตามวิธีการให้แบคทีเรียฟาจ



ภาพที่ 3.3 การแบ่งกลุ่มไก่พื้นเมืองพันธุ์ลูกผสมตามการทดลอง



(ก)



(ข)

ภาพที่ 3.4 การเก็บตัวอย่างมูลของไก่พื้นเมืองพันธุ์ลูกผสม

(ก) การป้ายทวาร (ข) ใส่ในหลอดทดลอง



กลุ่ม	ขั้นตอนการดำเนินงาน
กลุ่มควบคุมที่ 1	ป้อน S. Enteritidis ขนาด 10^5 cfu/ml
กลุ่มทดลองที่ 2	ป้อน S. Enteritidis ขนาด 10^5 cfu/ml จากนั้นทำการพ่น (สเปร์) แบคทีเรียฟาจ ความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml เข้าไปในกรงไก่ ติดต่อกัน 3 วัน
กลุ่มทดลองที่ 3	ป้อน S. Enteritidis ขนาด 10^5 cfu/ml จากนั้นนำแบคทีเรียฟาจความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml ผสมอาหารให้ไก่กิน ติดต่อกัน 3 วัน
กลุ่มทดลองที่ 4	ป้อน S. Enteritidis ขนาด 10^5 cfu/ml จากนั้นนำแบคทีเรียฟาจความเข้มข้น 10^{10} cfu/ml ผสมน้ำให้ไก่กิน ติดต่อกัน 3 วัน

3. ทำการเก็บตัวอย่างมูลไก่ทุกตัว เพื่อตรวจหาเชื้อ S. Enteritidis ในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ ร่วมกับการสังเกตลักษณะทั่วไปของไก่ด้วย เช่น สภาพของมูลไก่ การกินอาหาร การกินน้ำ และลักษณะการเดิน เป็นต้น