



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

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

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

รศ.น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย
รศ.สพ.ญ.ดร.รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
รศ.สพ.ญ.ดร.ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย

ภาควิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข และภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
39 ถ.อรัญญิก วัฒนา กรุงเทพมหานคร 10330

แหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัย
งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กันยายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สัญญาเลขที่ GAB_APS_๒๙_๕๖_๓๑_๐๒ ในการสนับสนุนทุนวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ ทศพล ชำรงสุวรรณกิจ ที่ช่วยเหลือในการทำวิจัย และการจัดทำต้นฉบับ และบุคลากรภาควิชาอายุรศาสตร์ สัตวแพทย์สาธารณสุข และเภสัชวิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างทำวิจัย

บทคัดย่อ

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

ABSTRACT

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

สารบัญเรื่อง

บทนำ	2
วัตถุประสงค์การวิจัย	4
วิธีการดำเนินการ	4
แยกเชื้อที่มีคุณสมบัติ Generally recognized as safe (GRAS) ได้แก่ <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Enterococcus faecium</i> จากมูลไก่	5
ตรวจสอบความปลอดภัยของเชื้อตามคำแนะนำของ EFSA	15
ทดสอบคุณสมบัติการทนกรด และการทนน้ำดีของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก	17
ตรวจสอบยืนยัน species ของเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา	19
ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อการป้องกันการติดเชื้อ <i>Campylobacter jejuni</i> ในไก่เนื้อ	20
ผลการวิจัย	23
การอภิปรายผลการวิจัย	36
ภาคผนวก	39
เอกสารอ้างอิง	41
ประวัติคณะผู้วิจัย	43

สารบัญตาราง

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

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

CE = competitive exclusion

EU = European Union

EFSA = European Food Safety Authority

SCAN = the Scientific Committee on Animal Nutrition

GRAS = Generally recognized as safe

bp = base pairs

μl = microlitre

μg = microgram

ml = milliliter

°C = degree celcius

MIC = minimum inhibitory concentration

CFU = colony-forming units

FCR = feed conversion ratio