อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์ห้องวิจัย

1. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) 37°C และ 42°C
2. เครื่องชั่ง
3. กระจกสไลด์ (Slide)
4. หลอดทดลอง ขนาด 16×150 mm.
5. ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
6. เข็มเขี่ยเชื้อ (inoculating loop)
7. โถบ่มสูญญากาศ (anaerobic jar)
8. กล้องจุลทรรศน์
9. ปากคีบ (forceps)
10. กระบอกตวง (cylinder)
11. สีย้อมแกรม (Gram stain)
12. สารละลายแอลกอฮอล์ 70% - 90%
13. กระดาษกรอง (Whatman filter paper)
14. เครื่องสั่นเขย่า
15. น้ำกลั่น
16. ยาปฏิชีวนะ

อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง

1. ไม้พันสำลีฆ่าเชื้อ (cotton swab sterile)
2. ถุงยางพลาสติก (plastic bages)
3. ปากคีบ (forcep)
4. กระติกน้ำแข็ง (Ice box)
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์

6. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
7. สำลีชุบแอลกอฮอล์
8. สติกเกอร์ (sticker)
9. มาร์กเกอร์ (maker)
10. หนังยาง

สารเคมี

1. Tryptone Soya Broth
2. *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base Modified (CCDA-Preston)
3. CCDA Selective Supplement SR0155E
4. *Campylobacter* Growth Supplement (Liguid) SR0232E
5. Preston *Campylobacter* Selective Supplement SR0204E
6. Anaeropack Microaero
7. เลือดม้า (Horse Blood)

วิธีการ

โรงฆ่าและสัตว์ที่นำเข้าฆ่า

โรงฆ่าสัตว์

ชื่อโรงฆ่าสัตว์ดอนดู่ ตั้งอยู่อำเภอเมือง หาดทรายฟอง นครหลวงเวียงจันทน์ ประเทศลาว เป็นโรงฆ่าสัตว์ที่ใหญ่อันดับหนึ่ง ในประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว โรงฆ่าสัตว์แห่งนี้สร้างในปี ค.ศ. 1979 เป็นโรงฆ่าสัตว์ 2 ประเภท คือ โค-กระบือ และ สุกร ได้ทำการฆ่าสัตว์ในอาคารเดียวกัน การฆ่าแต่ละวัน ในเวลากลางคืนของทุกๆ วัน สามารถฆ่าโค-กระบือประมาณ 80-100 ตัว/ครั้ง สุกรประมาณ 60-80 ตัว/ครั้ง หรือต่อวัน แล้วแต่ความต้องการของตลาด

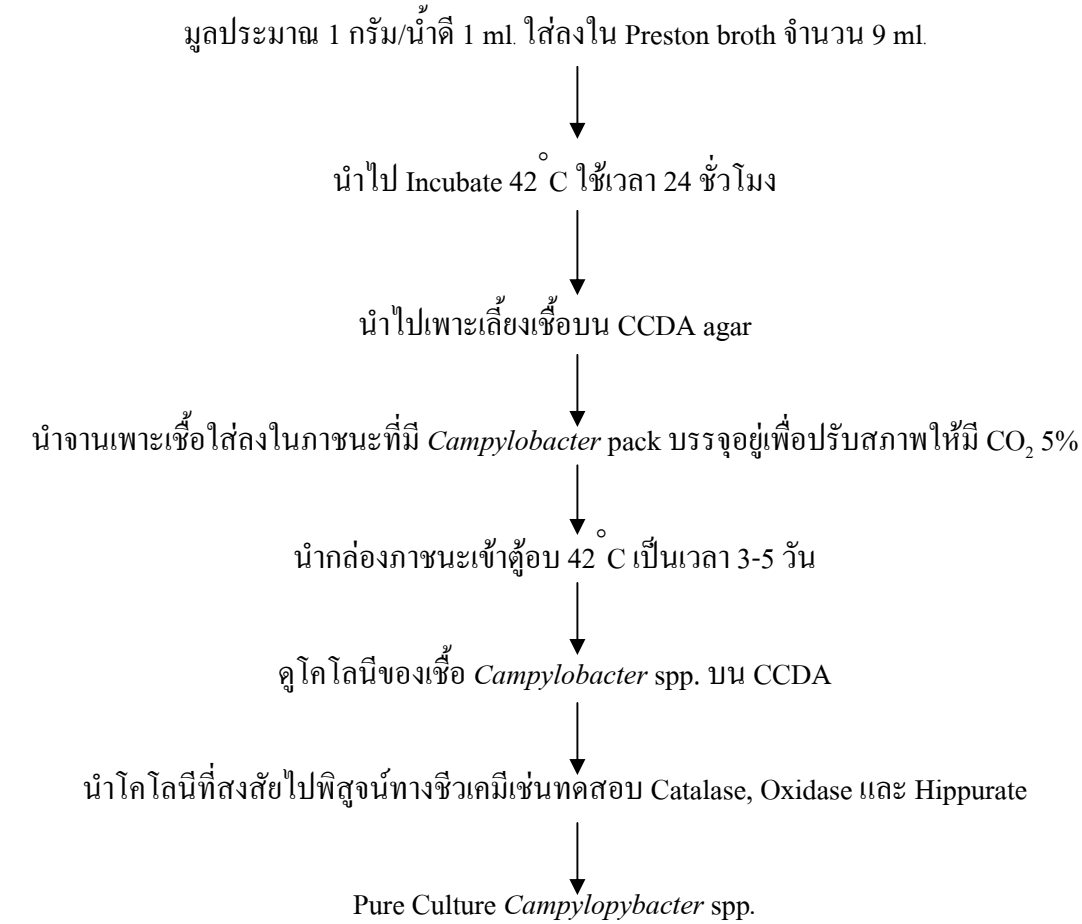
สัตว์ที่ส่งเข้าโรงฆ่า

มาจากหลายจังหวัดในทั่วประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว นายร้อย (พ่อค้าที่นำโค-กระบือมาจำหน่าย) นายห้าง (ผู้ซื้อโค- กระบือไปฆ่าชำแหละหรือผู้ซื้อไปเลี้ยง) การขนส่งสัตว์ถึงโรงฆ่าบางจังหวัดใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน สัตว์ที่นำเข้าฆ่า โค-กระบืออายุประมาณ 6-10 ปี และสุกรอายุประมาณ 10 เดือนขึ้นไป ตัวอย่าง ที่นำมาวิจัย คือ มูลและน้ำดีสัตว์ที่นำเข้าฆ่ามาจากทางภาคเหนือมีจังหวัด เชียงขวาง และอุดมชัย ทางภาคกลางมาจาก จังหวัด คำม่วน และทางภาคใต้มาจากจังหวัดสาระวัน

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างสำหรับส่งตรวจได้แก่ อุจจาระ และน้ำดี หลังการฆ่าโค-กระบือใหม่ๆ เอาเครื่องในออก ก็เอาถุงพลาสติกไปใส่อุจจาระ อยู่ที่ในลำไส้ใหญ่ ส่วนปลายประมาณ 1-2 กรัม หลังจากนั้นใช้ไม้ฆ่าเชื้อพันสำลี (sterile cotton swab) ป้ายเอาอุจจาระจากถุงพลาสติก หรือจากลำไส้ใหญ่ลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (Carry blair's transport medium 0.16%) ใส่ขวดละ 1 ตัวอย่างแล้วปิดฝาให้สนิท สำหรับการเก็บน้ำดีโดยใช้กระบอกเข็มฉิดยาดูดเอาจากถุงน้ำดีลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Prestons broth จำนวน 9 ml. ใส่หลอดละประมาณ 1-2 ml. ต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ในกล่องน้ำแข็ง แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อทำการเพาะเชื้ออย่างรวดเร็ว กรณีที่ต้องนำส่งต่อไกล หรือยังไม่ได้นำส่งภายใน 24 ชั่วโมง ให้เก็บตัวอย่างที่ 4 $^{\circ}$C

<u>วิธีการแยกเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยใช้วิธีของ Public Health Laboratory Service (1999)</u>



<u>วิธีการ 1</u>

ขั้นตอนที่ 1 นำตัวอย่างใส่ลงใน Preston broth นำไป incubate 37 °C ใน water bath 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 นำตัวอย่างใน Preston broth หยดลงบน sterile filter membrane ที่วางอยู่บน BSA 6 หยดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีใช้ sterile forcep คีบ filter membrane ออก

ขั้นตอนที่ 3 นำ BSA plate ใส่ลงใน Microaerobic jar ใส่ *Campylobacter* pack ลงใน Microaerobic jar ปิดฝาให้สนิทนำไป incubate ที่ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 4 หลังจาก 48 ชั่วโมง ดูผลการขึ้นของเชื้อ โดย โคโลนีของ *Campylobacter* spp. บน BSA มีลักษณะ รูปร่างไม่แน่นอน แบน แผ่เล็กน้อย ค่อนข้างใส สีออกชมพู-น้ำตาลเยิ้ม

<u>วิธีการ 2</u>

ขั้นตอนที่ 1 นำตัวอย่างใส่ลงใน Preston broth นำไป incubate 37 °C ใน Water bath 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 นำตัวอย่างใน Preston broth 1 หยด หยดลงบน CCDA agar แล้ว streak ให้ทั่ว plate

ขั้นตอนที่ 3 นำ CCDA agar ใส่ลงใน Microaerobic jar ใส่ *Campylobacter* pack ลงใน Microaerobic jar ปิดฝาให้สนิทนำไป incubate ที่ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 4 หลังจาก 48 ชั่วโมง ดูผลการขึ้นของเชื้อ โดย โคโลนีของ *Campylobacter* spp. บน CCDA agar มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน แบนแผ่เล็กน้อย ขุ่นเยิ้ม ค่อนข้างเหนียว สีออกเทา ถ้าทิ้งไว้หลายวัน ผิวหน้า จะมีลักษณะมัน และเป็น Pearl sheen

<u>วิธีการ 3</u>

ขั้นตอนที่ 1 นำตัวอย่างใส่ลงใน Preston broth นำไป incubate 42 °C ใน Water bath 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 นำหลอดตัวอย่างมาเขย่า เอาลูปเผาไฟแล้วจุ่มลงในหลอดแล้ว streak บน CCDA agar ให้ทั่ว plate

ขั้นตอนที่ 3 นำ CCDA agar ใส่ลงใน microaerobic jar ใส่ *Campylobacter* pack ลงใน microaerobic jar ปิดฝาให้สนิทนำไป incubate ที่ 42 °C นาน 3-5 วัน

ขั้นตอนที่ 4 หลังจาก 3-5 วัน ดูผลการขึ้นของเชื้อ โดยโคโลนีของ *Campylobacter* spp. บน CCDA agar มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน แบนแผ่เล็กน้อย ขุ่นเยิ้ม ค่อนข้างเหนียว สีออกเทา ถ้าทิ้งไว้หลายวัน ผิวหน้า จะมีลักษณะมัน และเป็น Pearl sheen

สำหรับตัวอย่างน้ำดีทำโดยวิธี ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 นำน้ำดี 1-2 ml ใส่ลงใน Preston broth นำไป incubate 42 °C ใน water bath 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 นำหลอดตัวอย่างมาเขย่า เอาลูปเผาไฟแล้วจุ่มลงในหลอดแล้ว streak บน CCDA agar ให้ทั่ว plate

ขั้นตอนที่ 3 นำ CCDA agar ใส่ลงใน microaerobic jar ใส่ *Campylobacter* pack ลงใน microaerobic jar ปิดฝาให้สนิทนำไป incubate ที่ 42 °C นาน 3-5 วัน

ขั้นตอนที่ 4 หลังจาก 3-5 วัน ดูผลการขึ้นของเชื้อ โดย โคโลนีของ *Campylobacter* spp. บน CCDA agar มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน แบนแผ่เล็กน้อย ขุ่นเยิ้ม ค่อนข้างเหนียว สีออกเทา ถ้าทิ้งไว้หลายวัน ผิวหน้า จะมีลักษณะมัน และเป็น Pearl sheen

<u>การย้อมสีแกรมเพื่อทดสอบดูลักษณะของเซลล์และการติดสีแกรม</u>

ป้ายเชื้อลงบนกระจกสไลด์ แล้วย้อมสีแกรมตามวิธีของ gram คือ วางสไลด์ที่ smear เชื้อแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้น Fix โดยผ่านเปลวไฟ 3 ครั้ง จึงย้อมด้วยสี carbol gentian violet นาน 1 นาที แล้วรินสีทิ้ง หยด gram's iodine 1 นาที แล้วเทสีทิ้งไป จากนั้น decolorized ด้วย 95% ethanol ประมาณ 15 วินาที และ counter stained ด้วย fuchsin 15 วินาที เท fuchsin ทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำซับให้แห้ง ดูลักษณะการติดสีแกรม และรูปร่างของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

การเพาะแยกเชื้อจากอุจจาระควรทำโดยการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทันที ถ้ามีเหตุล่าช้าในการส่งตรวจไปประมาณ 2 ชั่วโมง ควรเก็บไว้ใน Cary-Blair transport medium ที่ 4 °C แล้วจึงเพาะเชื้อลง selective media คือ BSA หรือ CCDA agar

ทำการย้อมแกรมและตรวจสอบโดยใช้การทำ hanging drop หากพบว่า เซลล์ติดสีแกรมลบ และมีรูปร่างเป็นท่อนโค้งหรือเป็นเกลียว มีการเคลื่อนที่หมุนเป็นเกลียวหรือเคลื่อนที่แบบดวงสว่าน มีลักษณะโค้งงอคล้ายปีกนก หรือเห็นรูปอักษร S บางครั้งเห็นเซลล์หลายเซลล์ เรียงต่อกันเป็นสาย ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *Campylobacter* ให้นำไปทำการทดสอบทางชีวเคมีต่อไป

การยืนยันตัวอย่างที่ให้ผล Positive

ตัวอย่างที่ให้ผล Positive นำไปทดสอบทางชีวเคมีต่อไป

การทดสอบทางชีวเคมี

1. **การทดสอบหาเอนไซม์ Catalase test**

หยดสารละลาย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซค์ลงบนสไลค์ จากนั้นถ่ายเชื้อที่สงสัยว่าจะเป็น *Campylobacter* spp. ที่เลี้ยงไว้ 48 ชั่วโมง ลงไป ดูการเกิดฟองแก๊ส ถ้ามีฟองแก๊สแสดงว่ามีเอ็นไซม์ Catalase ผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น แสดงว่าผลการทดสอบเป็นลบ

2. **การทดสอบหาเอ็นไซม์ Oxidase test**

ใช้กระดาษกรอง Whatman filter paper No.1 ชุบสารละลาย 1% Tetrametyl-p-phenylenediamine dihydrochloride จากนั้นถ่ายเชื้อที่เลี้ยงไว้ 48 ชั่วโมงมา 1 ลูปขีดลงบนกระดาษกรองที่ชุบน้ำยา ถ้าเกิดสีม่วงภายใน 5-10 วินาที แสดงว่ามีเอนไซม์ oxidase ผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีม่วงผลการทดสอบเป็นลบ

3. **การทดสอบการย่อยสลาย Hippuric acid**

ถ่ายเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *Campylobacter* spp. ลงใน hippurate broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วให้ค่อยๆ ใส่สารละลาย ninhydrin 3.5% 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 10 นาที ถ้าเกิดสีม่วงแสดงว่าเป็นเชื้อ *C. jejuni* ถ้าไม่มีสีแสดงว่าผลเป็นลบ (ไม่ใช่ *C. jejuni* อาจเป็น *C.* coli)

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัยของภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ และห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ระยะเวลาทำการวิจัย

ครั้งที่ 1 ในฤดูร้อน เริ่มเดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนสิงหาคม 2549
ครั้งที่ 2 ในฤดูฝน เริ่มเดือนพฤษภาคม ถึงเดือน กันยายน 2549

การเก็บตัวอย่างในฤดูร้อน (กุมภาพันธ์-เมษายน 2549) มีจำนวน 2 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่าง caecum content จำนวน 106 ตัวอย่าง จากโค-กระบือ รายละเอียดจำนวนตัวอย่างแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่าง caecum content ทั้งหมด 106 ตัวอย่างที่เก็บในฤดูร้อน 2 ครั้ง

ตัวอย่าง	ตัวผู้	ตัวเมีย	รวม
มูลโค	31	4	35
มูลกระบือ	48	23	71
รวม	79	27	106

การเก็บตัวอย่างในฤดูฝน (พฤษภาคม-กันยายน 2549) จำนวน 4 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่าง caecum content จำนวน 160 ตัวอย่างจากโค-กระบือและตัวอย่างน้ำดี (Bile) จำนวน 100 ตัวอย่าง จากกระบือที่โรงฆ่าสัตว์ดอนดู่ นครหลวงเวียงจันทน์ ประเทศลาว รายละเอียดจำนวนตัวอย่างแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนตัวอย่าง caecum content ทั้งหมด 160 ตัวอย่าง และน้ำดี จำนวน 100 ตัวอย่าง ที่เก็บในฤดูฝนทั้ง 4 ครั้ง

ตัวอย่าง	ตัวผู้	ตัวเมีย	รวม
มูลโค	41	6	47
มูลกระบือ	81	32	113
น้ำดีกระบือ	82	18	100
รวม	204	56	260

สำหรับวิธีการแยกเชื้อ *Campylobacter jejuni*. โดยใช้วิธีของ Public Health Laboratory Service (1999) สรุปโดยย่อ คือ ตัวอย่าง caecum content ประมาณ 1 กรัม ใส่ลงใน Preston broth จำนวน 9 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะเชื้อบน CCDA agar (Oxid, Hampshire, England) นำจานเพาะเชื้อใส่ลงในภาชนะที่มี *Campylobacter* pack (BBL, Coekeysville, Md) บรรจุอยู่เพื่อปรับสภาพให้มี CO_2 5% และนำกล่องภาชนะเข้าตู้อบ 42 °C เป็นเวลา 3-5 วัน นำโคโลนีที่สงสัยบนจานเพาะเชื้อไปพิสูจน์ยืนยันเชื้อด้วยการย้อมสีแกรมและพิสูจน์ทางชีวเคมี เช่น ทดสอบ Catalase, Oxidase และ Hippurate PHLS (1999)