



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความเป็นไปได้ของแบคทีเรียคัดแยกจากไก่ที่ปลอดจากแคมไพโลแบคเตอร์ที่มีฤทธิ์
ยับยั้งการเจริญเติบโตแคมไพโลแบคเตอร์

The study of bacteria isolated from Campylobacter-free chicken to inhibit the growth of
Campylobacter spp.

โดย ผศ.ดร.ประพนธ์ศักดิ์ จวีร์ราช

เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2553

สัญญาเลขที่ MRG4780059

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความเป็นไปได้ของแบคทีเรียคัดแยกจากไก่ที่ปลอดจากแคมไพโลแบคเตอร์ที่มีฤทธิ์
ยับยั้งการเจริญเติบโตแคมไพโลแบคเตอร์

The study of bacteria isolated from Campylobacter-free chicken to inhibit the growth of
Campylobacter spp.

ผศ.ดร.ประพันธ์ศักดิ์ จวีระราช

ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงแต่สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและคณะกรรมการต่าง ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับทุนวิจัยโครงการ **MRG4780059** นี่เป็นอย่างสูง ที่ให้โอกาสการพัฒนาดตนเองในการทำวิจัยเองในประเทศไทย ซึ่งด้วยเงินทุนวิจัยดังกล่าวทำให้ข้าพเจ้าได้พัฒนาขีดความสามารถของตนเองเป็นอย่างสูงในการทำวิจัย ตั้งโจทย์วิจัยและมีเครือข่ายในการทำวิจัย และข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ที่เป็น **Mentor** และขอขอบคุณคุณ วสันต์ จันทรสนิทในการช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ รศ.อรุณรัตน์ จวีระราชที่ช่วยเหลือในเรื่อง **Molecular** ของ **Campylobacter** กลุ่มนักศึกษาปริญญาโทของหลักสูตรสัตวแพทย์สาธารณสุขที่ศึกษาหัวข้อวิจัยในเรื่อง **Campylobacter** และขอขอบคุณภรรยาและลูกที่เป็นกำลังใจสนับสนุนการทำงานที่ดีโดยตลอด

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: **MRG4780059**

ชื่อโครงการ: การศึกษาความเป็นไปได้ของแบคทีเรียคัดแยกจากไก่ที่ปลอดจากแคมไพโลแบคเตอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตแคมไพโลแบคเตอร์

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: ผศ.ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ฉวีราช

ภาควิชาสัตวแพทยศาสตร์ สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: chaveerach@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี 6 เดือน

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลชีพประจำถิ่นใน Cecal content ไก่ที่เลี้ยงในระบบหลังบ้านและเข้มข้นเพื่อการคำนวณว่ามีที่ 29-77% (similar index) โดยศึกษาด้วยวิธี RAPD และ Phylogenetic trees และแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มที่ปลอดและไม่ปลอดจากเชื้อ Campylobacter ที่มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 46% (similar index) และในขณะเดียวกันยังสามารถแบ่งกลุ่มย่อยตามวิธีการเลี้ยงหลังบ้านและในอุตสาหกรรมได้อีกด้วยค่า similar index ส่วนการศึกษาการระบาดวิทยาตามวิธีการข้างต้น ของเชื้อ Campylobacter ในฟาร์มทั้งสองระบบ พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรม และตัวเชื้อยังถูกแบ่งกลุ่มไปตามแหล่งที่มาได้อีกด้วย ส่วนการศึกษา Probiotic bacteria พบว่าเชื้อจุลชีพประจำถิ่นจากไก่ที่ปลอดจากเชื้อ Campylobacter จำนวน 23 ตัวอย่างมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ 10 ตัวอย่าง Campylobacter ในการทดลองนอกกายสัตว์โดยที่ Lactobacillus LH10 ให้ผลดีที่สุดแต่ให้ผลไม่แน่นอนในการทดลองร่วมกับเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ส่วนการทดลองคัดเลือกสมุนไพรพบว่า มีสมุนไพรไทย 6 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ Campylobacter ในหลอดทดลอง และมีฤทธิ์ลดจำนวน Campylobacter ในลูกไก่ทดลองได้ การศึกษานี้ได้พบถึงความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรเพื่อการพัฒนาเป็นวิธีป้องกันการลุกลามของ Campylobacter ในไก่ได้ต่อไป

คำหลัก: แคมไพโลแบคเตอร์ ไก่หลังบ้าน โปรไบโอติก เชื้อจุลชีพประจำถิ่น สมุนไพรไทย

Abstract

Project Code: MRG4780059

Project Title: The study of bacteria isolated from Campylobacter-free chicken to inhibit the growth of Campylobacter spp.

Investigator: Assist. Prof. dr. Prapansak Chaveerach

Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine Khon
Kaen University

E-mail Address: chaveerach@kku.ac.th

Project Period: 2 years and 6 months

Micro flora bacteria variation of Campylobacter-free and Campylobacter chickens were found between 29-77% similarity index by using RAPD and Phylogenetic tree analysis. This method could also divided chickens from back yard and intensive rearing systems at 46% similarity index as well. Genetically epidemiology study was clearly found 2 groups from intensive and backyard chicken rearing system. 23 Probiotic bacteria isolations were demonstrated inhibitory activity on 10 isolation of Campylobacter in particularly Lactobacillus LH 10 but non inhibitory effect on Campylobacter in co-culture media was found. In addition the experiment on the selection of Thai herbs, 6 Thai herb species were found inhibitory activity on Campylobacter. The effectiveness was demonstrated on Campylobacter in young broilers as well. The further study need to be explored the active ingredients and studied on chicken experiment.

Keywords: Campylobacter, Back yard Chicken, Probiotic, Normal Flora, Thai herbs

สารบัญ

บทนำ	1
วิธีการทดลองและผลการทดลอง	2
อภิปรายผลการทดลอง	26
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในประเทศไทยมีการเลี้ยงไก่เพื่อบริโภคเองในครัวเรือน และหรือเพื่อการค้าค่อนข้างจะมาก และแพร่หลาย มากไปกว่านั้น คือการเลี้ยงไก่เพื่อการส่งออก ซึ่งประเทศไทยนับเป็นผู้ส่งออกเนื้อไก่ในระดับต้นๆ ของโลก เนื่องจากปัญหาการตกค้างของยาในผลผลิตทางปศุสัตว์ อันก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคในระยะยาว เช่น ผู้ป่วยที่แพ้ต่อยาปฏิชีวนะนั้น ๆ ยาที่เหมาะสมมีผลทำให้การสร้างเซลล์ในร่างกายที่ผิดปกติ สิ่งที่เกิดขึ้นดังกล่าวเป็นเพราะมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเพิ่มผลผลิต การเจริญเติบโต หรือเพื่อป้องกันโรคในสัตว์เอง ในปัจจุบันกันอย่างกว้างขวาง ขณะเดียวกันการผลิตสัตว์ไว้เพื่อบริโภคในกลุ่มประเทศยุโรป ได้ลดการใช้ยาปฏิชีวนะใช้เพื่อผสมอาหารให้สัตว์กิน ซึ่งเริ่มมีผลต่อการใช้ไนวนวงการปศุสัตว์และรณรงค์อย่างแพร่หลาย ซึ่งสอดคล้องกันกับความต้องการขององค์การค้าโลก (WTO) และมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) ที่ออกกฎเพื่อกำหนดการใช้ยาปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ในอาหารสัตว์ลง ซึ่งในแถบประเทศที่เจริญแล้วเช่น ยุโรป อเมริกา หรือ ญี่ปุ่น ต่างมีมาตรการปกป้องประชาชนในประเทศเหล่านั้น โดยการห้ามให้นำเข้าที่มียาปฏิชีวนะปนเปื้อนเข้ามาขายในประเทศ ซึ่งจะกระทบโดยตรงต่อการผลิตไก่เนื้อเพื่อการส่งออกของประเทศไทย และเป็นอุตสาหกรรมค่อนข้างใหญ่ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้เลี้ยงไก่เนื้อ และธุรกิจอื่นๆ อีกตามลำดับ ในภาวะปัจจุบันซึ่งมีการแข่งขันทางการตลาดในระดับโลกค่อนข้างสูง ถ้าประเทศไทยสามารถผลิตไก่เนื้อ โดยปราศจากเชื้อ *Campylobacter* ได้นับเป็นผลดีโดยรวมต่อการปศุสัตว์ไทยและสุขภาพของคนไทยในที่สุด

ขั้นตอนในการป้องกันเชื้อ *Campylobacter* เพื่อไม่ให้ปนเปื้อนในอาหารเพื่อสำหรับคนบริโภคที่ดีที่สุด คือ การลดจำนวนเชื้อลงในระดับฟาร์ม ซึ่งมีหลายๆ วิธีด้วยกัน เช่น การใช้ Sanitation ในฟาร์ม personal hygiene, ทดลองใช้ Vaccine, disinfection ที่อุปกรณ์, เครื่องมือ, น้ำเลี้ยงไก่, อาหารสัตว์ ร่องนอนในฟาร์มต่างๆ เหล่านี้ ไม่ค่อยได้ผลดีมากนัก ดังนั้น การป้องกันการ colonise ของเชื้อในไก่นั้น ต้องการหลากหลายวิธีเพื่อที่ลดจำนวนเชื้อในไก่

ธรรมชาติในร่างกายสัตว์ของ(รวมทั้งไก่) ต่างมี normal flora อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารทำหน้าที่เป็นเจ้าบ้านเพื่อป้องกัน pathogenic bacteria ที่จะก่อเกิดอันตรายต่อ host ไม่ให้เจริญเติบโตได้ ซึ่งรูปแบบการป้องกันของ good normal flora อาจจะมีได้

1. สร้างสาร Physiological substance ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ pathogenic bacteria
2. สร้างสาร Bacteriocin, สารโปรตีน (anti-microbial compound) ที่จำเพาะเจาะจงต่อ pathogenic bacteria
3. แย่งบริเวณยึดเกาะในการเดินอาหาร

จากเหตุผลข้างบน วิธีการใช้ Probiotic เพื่อป้องกันหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Campylobacter* น่าจะเป็นวิธีการที่ดีต่อสุขภาพสัตว์ และคนในท้ายที่สุด การใช้ Probiotic ในไก่มีรายงาน

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

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

วัตถุประสงค์

- 1.เพื่อให้ได้ Bacteria ที่มีความสามารถเป็น Probiotic bacteria ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Campylobacter* spp.
- 2.เพื่อทราบถึงความแตกต่างของ Normal flora Profile ในระบบทางเดินอาหารของไก่ในพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ไก่เนื้อ
- 3.เพื่อทราบถึงผลของ isolated probiotic bacteria ต่อ *Campylobacter* ในไก่ทดลอง

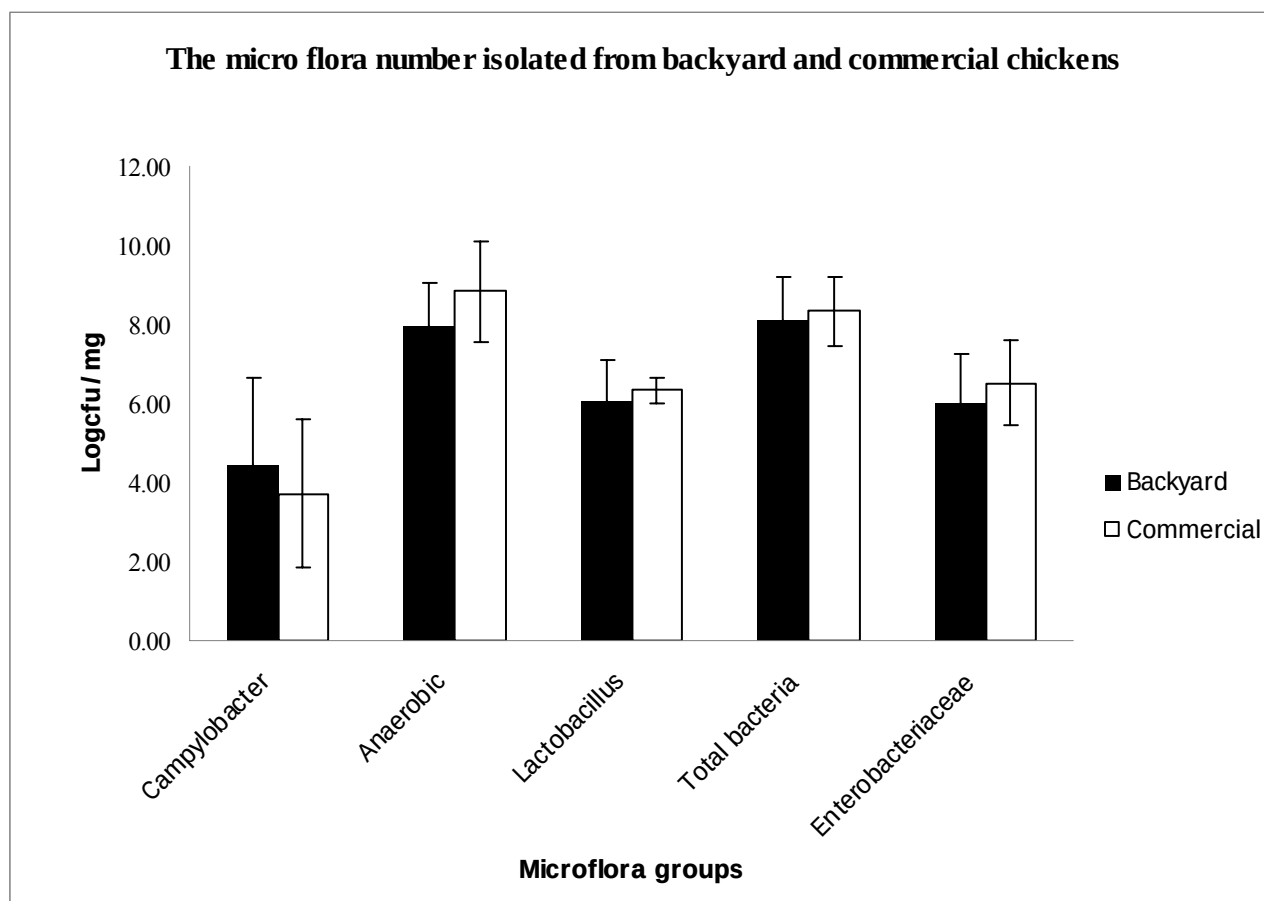
วิธีการทดลองและผลการทดลอง

1. การแยก bacteria จากไก่ที่ปราศจาก *Campylobacter* infection

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

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

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



2. การศึกษาความแตกต่างระหว่าง Normal flora profile ของไก่พันธุ์พื้นบ้านและไก่พันธุ์เนื้อ

นำตัวอย่างจาก Contents ในลำไส้ตันไก่ทั้ง 2 ชนิดที่มีการเลี้ยง 2 รูปแบบมาศึกษาข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพโดยสุ่มนำ Content จากลำไส้ตันไก่ที่มีผลการคัดแยกเชื้อพบว่ามีเชื้อ Campylobacter และไก่ที่ปลอดจากเชื้อ Campylobacter เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างไก่ที่มีผลการปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ Campylobacter และการศึกษาเชื้อ Campylobacter ที่แยกได้จากไก่ในระบบฟาร์มและไก่ที่เลี้ยงหลังบ้าน รวมทั้งศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ Campylobacter ที่มาจากไก่ต่างชนิดการเลี้ยงกัน โดยวิธี RAPD และ Phylogenetic tree

2.1การทดลองศึกษาความหลากหลายของ Contents ในลำไส้ต้นไก่จากไก่ที่เลี้ยงในฟาร์มและไก่ที่เลี้ยงหลังบ้าน นำ Cecal contents ประมาณ 1 กรัมมาละลายลงใน PBS ที่ pH 7 มาปั่นที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เท Supernatants ทิ้ง แล้วนำ Pellet ที่ได้นำไปสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (RBC Real Genomics, USA) ใช้ Primers 7 ชนิด (ตารางที่ 1) แล้วนำผลผลิตนั้นไปเพิ่มจำนวนลำดับเบสตามขั้นตอนของ PCR คร่าวๆดังนี้ (1) denaturation step at 94°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. แล้วนำผลผลิตที่ได้ทดสอบกับ Agarose gel electrophoresis (1.0% w/v in TAE) แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide และทดสอบด้วยแสง UV แล้วนำผลผลิตที่ได้นำไปศึกษาหาความสัมพันธ์ด้วยเครื่อง Fingerprinting II program (BioRad, USA)

ตารางที่ 1 Primers ที่ใช้ในกระบวนการ RAPD เพื่อศึกษาความหลากหลายของ Normal flora ใน Contents ของลำไส้ต้นไก่จากไก่ที่เลี้ยงในระบบฟาร์มและหลังบ้าน

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

ผลการทดลองพบว่า

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

รูปภาพที่ 2

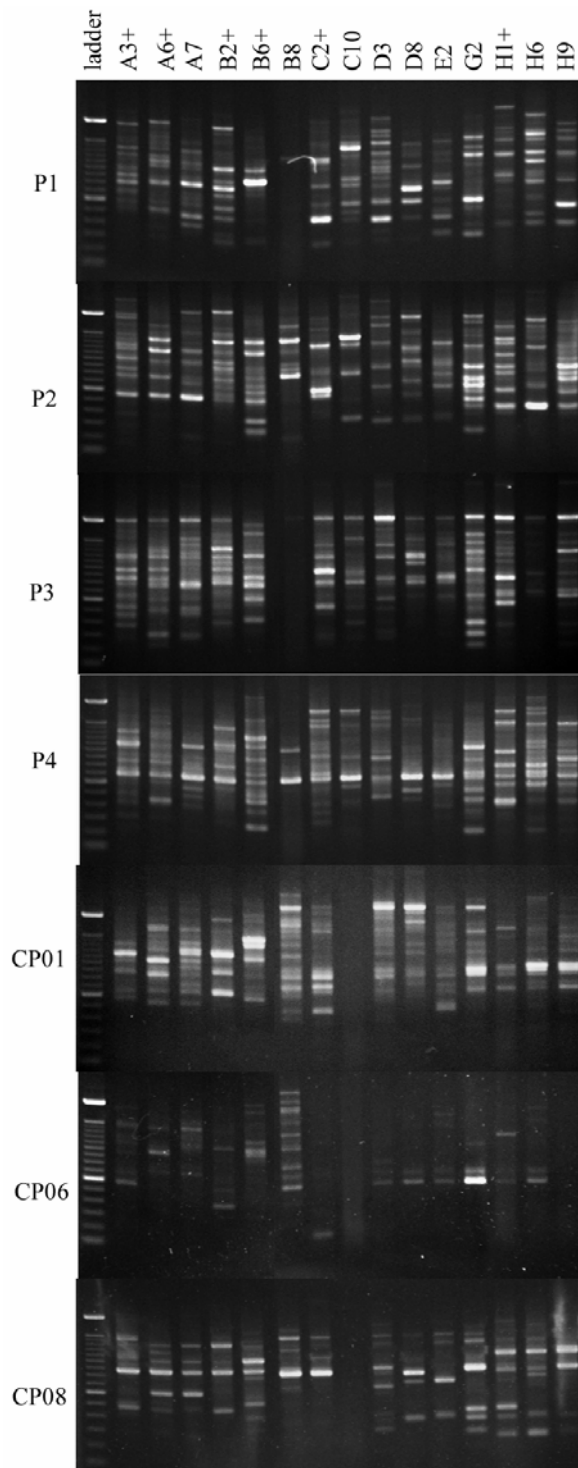
Gel image of DNA amplified using universal primers from microflora bacteria in the ceecal contents. Samples were prepared from backyard and commercial boiler chickens at 40 and 35 day, respectively.

Ladder = molecular marker

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

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

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

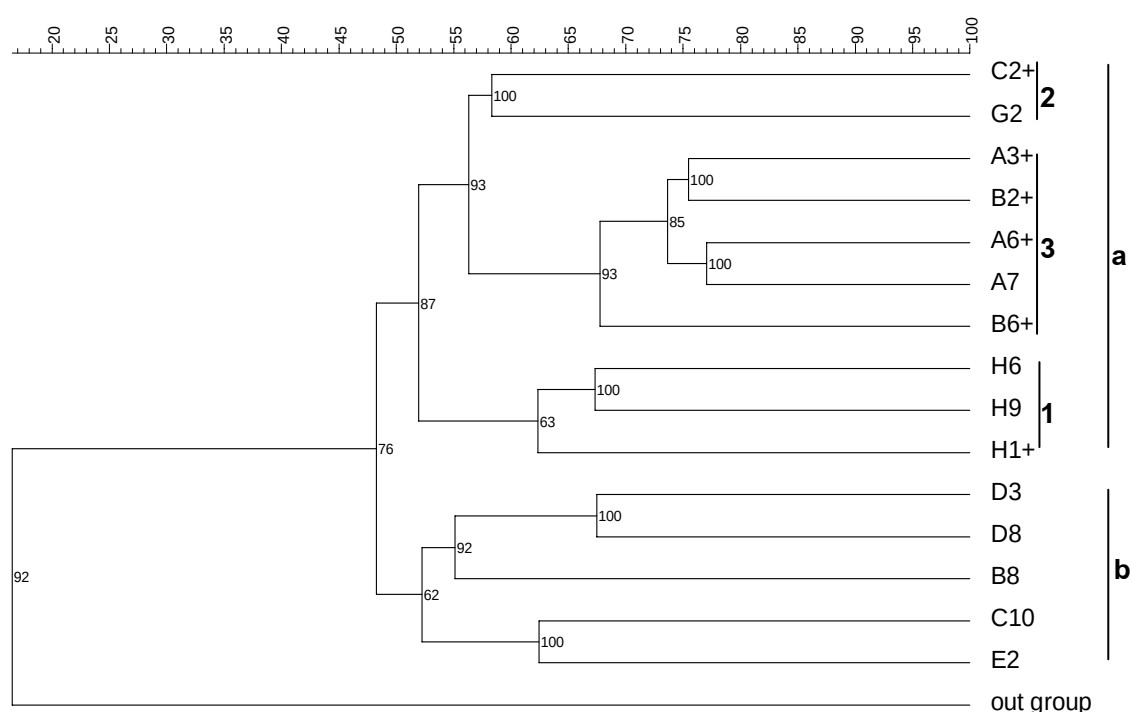


รูปภาพที่ 3 Phylogenetic tree of DNA from normal bacteria in the chickens ceca constructed using Fingerprinting II program. Similarly index of normal flora in positive and negative chicken ceecal contents to *Campylobacter* infection separated by culturing method.

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

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

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



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

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

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

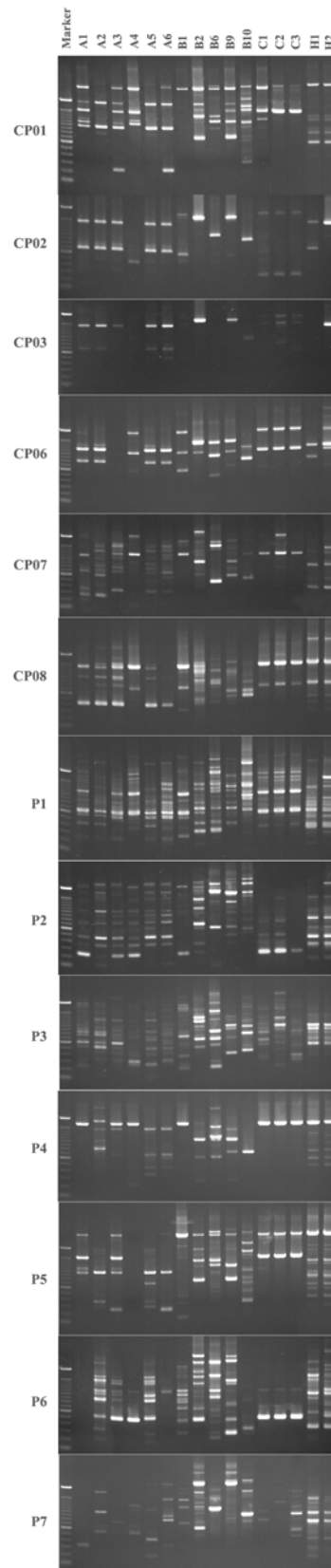
ผลการทดลอง

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

รูปภาพที่ 4 Gel image of DNA amplified from *Campylobacter* isolated from backyard and commercial broiler chickens

A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1, B2, B6, B9, B10 samples were from back yard chickens

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

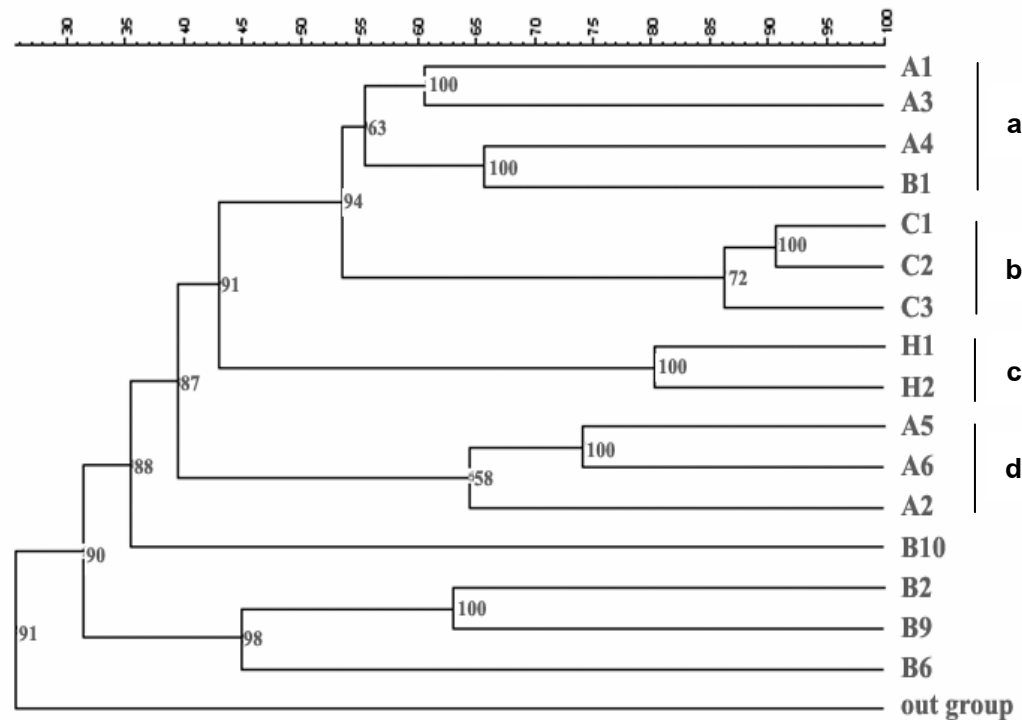


รูปภาพ ที่ 5 Phylogenetic tree showing the relationship of 16s DNA sequences found in isolated *Campylobacter* colonies from backyard and commercial broiler chickens. The tree was

constructed by using Fingerprinting II program. Similarly index of *Campylobacter* was demonstrated.

A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1, B2, B6, B9, B10 were from backyard chickens

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



อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาถึงปริมาณเชื้อ *Normal flora* ในลำไส้ต้นไก่ ที่มีความแตกต่างในระบบการเลี้ยง คือ ไก่จากฟาร์มเลี้ยงแบบเข้มข้น และไก่จากหลังบ้านที่ปล่อยเลี้ยงตามธรรมชาติแล้ว พบว่าไก่เลี้ยงไว้หลังบ้านมีค่าเฉลี่ยของเชื้อ *Campylobacter* มากกว่าในกลุ่มของไก่ที่มาจากฟาร์ม ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในต่างประเทศที่การเลี้ยงไก่อินทรีย์ (organic chicken farming) มีความซุกที่สูงกว่าการเลี้ยงไก่ในระบบฟาร์ม ซึ่งไก่หลังบ้านมีโอกาสได้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ พื้นดิน สัตว์มีชีวิตเล็กๆ มากกว่าไก่ที่เลี้ยงในฟาร์ม สิ่งแวดล้อมต่างๆ เหล่านี้ต่างเป็นตัวส่งผ่านเชื้อ *Campylobacter* สู่ไก่ได้เป็นอย่างดี แต่หาว่าความแตกต่างระหว่างเชื้อ *Campylobacter* ในไก่ 2 ระบบนี้มีไม่มาก และไม่มีนัยทางสถิติ ทำให้เราทราบว่าไก่ที่เลี้ยงทั้ง 2 ระบบนี้เป็นแหล่งปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* สูงและพร้อมที่จะแพร่กระจายเข้ามาสู่กระบวนการผลิตอาหาร (เนื้อไก่) ที่ปนเปื้อนเชื้อนี้และขณะเดียวกันพร้อมเข้าสู่ผู้บริโภคได้ ถ้าผู้บริโภคไม่ได้ทำหรือเตรียมอาหารที่มีความร้อนที่เหมาะสมต่อการฆ่าเชื้อนี้ได้ ดังนั้นไก่เนื้อที่เลี้ยงทั้ง 2 ระบบจึงเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อคนเป็นอันมาก

ขณะที่ *Normal flora* ในลำไส้ต้นไก่ทั้ง 2 ระบบนั้นแนวโน้มที่ไก่เลี้ยงในฟาร์มจะมีปริมาณของ *Normal flora* ในกลุ่มของ *Anaerobic*, *Lactobacillus*, *Total bacteria* และ *Enterobacteriaceae*

มากกว่า แต่ไม่มีนัยทางสถิติทำให้เห็นภาพว่าไก่ฟาร์มน่าจะมีความหลากหลายของ Normal flora ในเชิงปริมาณมากกว่าไก่ที่เลี้ยงกันหลังบ้าน ซึ่งข้อมูลน่าจะสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของ Normal flora ในลำไส้ต้นไก่ในการเลี้ยง 2 ระบบ โดยวิธีทางอนุวิทยาโดยใช้เทคนิค RAPD และ Phylogenetic tree analysis ที่ทำให้พบว่าสามารถแยกไก่ที่เลี้ยงโดย 2 ระบบนี้โดยอาศัยความแตกต่างและความเหมือนของแถบ DNA ของตัวอย่างในลำไส้ต้นไก่ ได้เป็นกลุ่มไก่ที่ปลอดเชื้อ Campylobacter หรือมาจากไก่ไม่ปลอดเชื้อ Campylobacter นับว่าเป็นข้อมูลใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ข้อสันนิษฐานว่าในกลุ่มไก่ที่ปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ Campylobacter น่าจะมีกลุ่มของ Normal flora บางกลุ่มที่ไม่เหมือนกันอาศัยอยู่ ทำให้สามารถแยกไก่ออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ซึ่งในกลุ่มที่ปลอดเชื้อ Campylobacter นั้น เป็นที่น่าสนใจว่า จะเป็น Normal flora กลุ่มใดเพราะจะได้เป็นแหล่งนำทางในการเพาะแยกเชื้อที่มีผลหรือฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Campylobacter และพัฒนากลุ่ม Normal flora ดังกล่าว ที่อาจจะให้ผลให้การเจริญเติบโตของ Campylobacter ในลำไส้ต้นไก่ได้ ในการทดลองนี้จึงเลือกกลุ่มแบคทีเรีย Lactobacillus หรือ Anaerobic ที่เคยมีรายงานในเรื่องคุณสมบัติการมีศักยภาพต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย เช่น Campylobacter และ Salmonella ไปแล้วนั้น ในการทดลองครั้งนี้ได้พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวให้ผลยับยั้ง Campylobacter ได้ และเป็นกลุ่ม Lactobacillus และ Anaerobic ในการทดสอบ Agar well diffusion ในเบื้องต้นไปแล้วนั้น แต่เมื่อทำการศึกษาร่วมในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแล้วพบว่าไม่พบฤทธิ์การยับยั้ง เหตุผลอันเป็นไปได้น่าจะ เพราะว่า Lactobacillus (ชนิดที่ให้ผลดีที่สุด LH10) น่าจะไม่สามารถเจริญเติบโตในหลอดทดลองที่ได้เตรียมไว้ จึงทำให้มีผลสรุปเบื้องต้นว่า LH10 ไม่น่าจะเหมาะสมนำมาทดลองในไก่ทดลองจนกว่าจะได้ผลการทดลองในหลอดทดลองที่ให้ผลดี ผลที่เกิดขึ้นอาจจะเพราะ LH10 ไม่ได้อยู่ในภาวะ Microaerophilic ได้จริง ๆ ซึ่งต้องมีการปรับหรือแก้ไข หรือทดลองซ้ำก่อนจึงจะทำการทดลองในไก่ทดลองทางผู้วิจัยจึงได้ปรับเปลี่ยนไปศึกษาสมุนไพร ซึ่งน่าจะให้ผลดีและคงทนในสภาวะต่าง ๆ ได้ดี จึงเป็นการปรับแผนการทดลอง ผลการทดลองพบว่าสมุนไพรสมอพิเภกได้ผลดีที่สุดดังรายงานเบื้องต้นแล้ว เมื่อทดลองทั้งในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวก็ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ซึ่งสารประกอบในสมอพิเภกน่าจะเป็นกลุ่มสารที่ละลายในแอลกอฮอล์ เช่น แทนนิน นั้นพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มลบได้ ในการทดลองในไก่ทดลองเบื้องต้น ทำให้ทราบว่าสมอพิเภกสามารถลดจำนวนเชื้อ Campylobacter ลงได้บ้างนับว่าเป็นจุดประจักษ์ให้ศึกษาและพัฒนาต่อไปอีกถึงคุณสมบัติวิธีใช้ รวมถึงผลการออกฤทธิ์ต่อเชื้อ Campylobacter ได้อย่างไร

ซึ่งผลการทดลองสมุนไพรที่ได้นับว่าเป็นข้อมูลใหม่ และเป็นแนวทางใหม่ที่จะช่วยลดจำนวน Campylobacter ลงในไก่เนื้อได้ และยังคงต้องศึกษาข้อมูลอีกมากในการพัฒนาเพื่อที่จะสามารถสร้างหรือผลิตสารสมุนไพรดังกล่าวในเชิงการทดลองที่มีกลุ่มตัวอย่างใหญ่และหลากหลายขึ้นเพื่อจะได้ทราบถึงผลของการใช้ในวงการอุตสาหกรรมการเลี้ยงจริง ๆ เพราะถ้าผสมผสานสมุนไพรในน้ำหรืออาหารได้สำเร็จแล้ว และมีฤทธิ์การควบคุมหรือป้องกันเชื้อ Campylobacter ได้ แล้วจะนับว่า เป็นนวัตกรรมใหม่ที่ น่าสนใจและต่อยอดเนื่องจากตลาดการค้าขายไก่เนื้อนั้นใหญ่ และกว้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณการบริโภคเนื้อไก่ทั่วโลก

การศึกษาข้อมูลของสมุนไพรไทยในเชิงลึกได้ทำการวางแผนการทดลองในปีถัดมาของผู้วิจัยเพื่อต่อยอดองค์ความรู้ของผู้วิจัยที่พยายามปรับปรุงที่มีอยู่ขึ้นมา เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในไก่เนื้อ รวมทั้งอาจจะเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศก็ได้ในอนาคต

3. การทดสอบเชื้อที่แยกได้ต่อการเจริญเติบโตของ *Campylobacter* spp.

3.1 วิธี agar diffusion assay

หลังจากการเลี้ยงเชื้อที่แยกมาจากไก่ (ที่ปลอดจาก *Campylobacter*) Supernatant จะถูกเก็บ และหยดลงในหลุม ใน agar plate ที่ได้เลี้ยง *Campylobacter* เอาไว้แล้ว หลังจากนั้น plates จะถูกบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 h. ที่สภาพอากาศ Microaerophilic แล้ว Inhibition zone จะถูกวัดและบันทึกไว้

ผลการทดลอง พบว่า มีจำนวน Normal flora 23 ชนิดที่แยกจาก Normal flora จากไก่ที่ปลอดจากเชื้อ *Campylobacter* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* จำนวน 10 ชนิดที่แยกมาจากไก่ทั้งฟาร์ม และที่เลี้ยงหลังบ้าน (การเพาะแยกเบื้องต้น) เมื่อเส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมทดสอบมีความกว้าง 6 มม. (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3. 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. ¹ isolated bacteria from backyard chickens and ² isolated bacteria from commercial chickens. ^a, *Campylobacter* isolated from backyard and ^b *Campylobacter* isolated from Commercial chickens.

Campylobacter	A1^a	A2^a	A4^a	B1^a	B2^a	B6^a	B9^a	C1^b	H1^b
Isolated bacteria									
¹ BA72	10	8	9	7	10	9	10	8	8
² I8.1L	15	15	13	11	12	12	13.5	11	10
² LH5	15	12	13	12	13.5	12	13.5	11	11
² I10.1L	-	16	14	13	15	13	14	11	12
² I9.1L	12	10	11	8	8	8	8	8	9
¹ A5.5	15	12	13	11	14	12.5	13.5	12	12.5
² I4.1L	16	13.5	13	13	117	15	14	12.5	14
¹ BL52	16	13	11	12	14	13	13	10	13.5
¹ A3.3	13	13	14	12	14	12	12	11.5	12.5

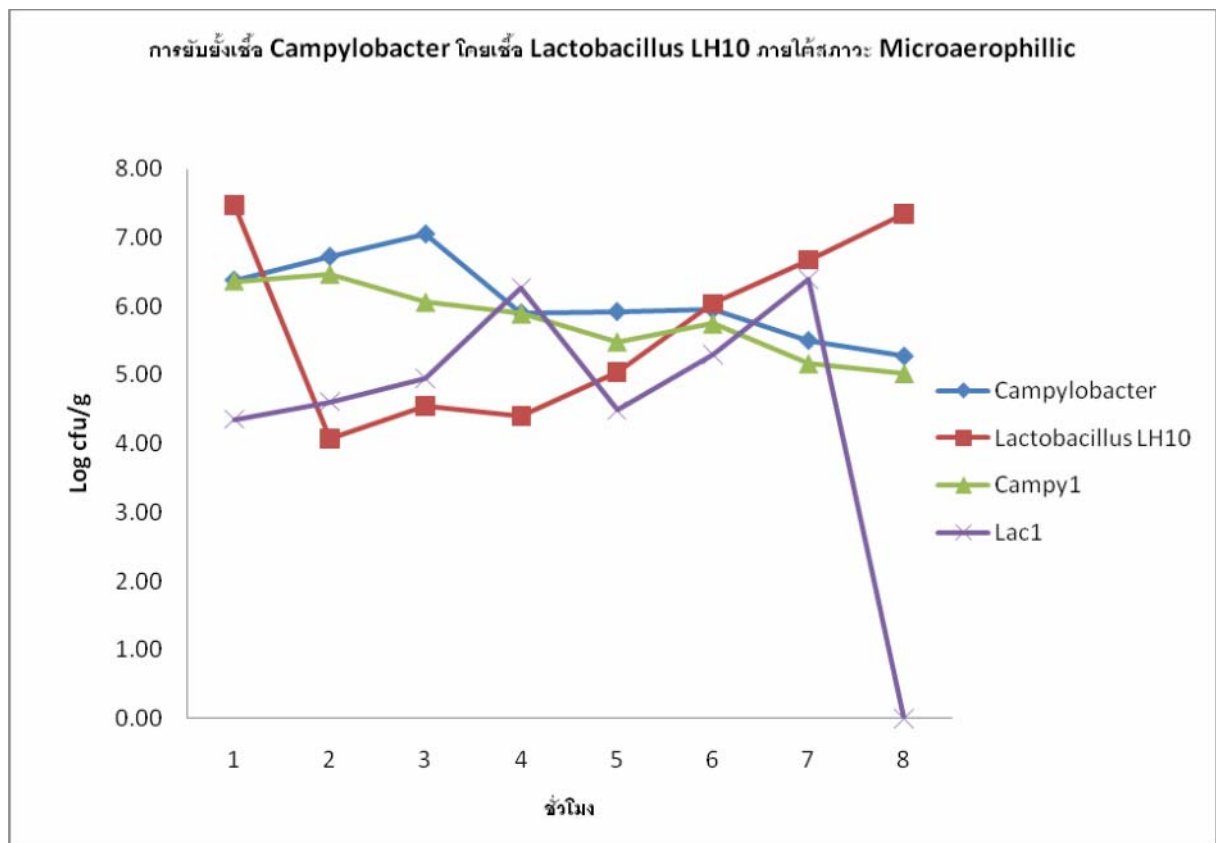
¹ BL44	13	12	12	11	13	11	11	11.5	14
² I2.1L	9	11	12	9	11.5	10	8	8	11
² I1.1L	14	16	16	16	17	15	13.5	14	13
¹ A.3.1	12	13	12	-	13	13	13	12	11
¹ A3.2	13.5	13.5	13	13	14	13	14	12.5	13
¹ A5.1	12.5	11.5	13	11	13	12	12.5	12	12
¹ A5.4	17	13	16	12	16	13	13	14.5	15.5
¹ BL8	13	13.5	13	12	14	16	13	13.5	13
¹ BL3	12	13	15.5	12	15	13	12.5	15	12
¹ BL5.1	14	13	13.5	14	15.5	13	13	14	14
¹ BA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
² CL3	12	12.5	12	12	14	13.5	12	12.5	11.5
² L5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
² L3	14	13.5	16	13	14	13	17	13.5	17
² LH10	13.5	13	12.5	12	12.5	12.5	14	13.5	17
² LH9	12	12	13	12	13	11	13	12	11
² M8	14	13	13	13	-	14	13	13	-
² M4	-	-	-	-	-	6.5	-	-	-
² I8.2L	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2 การทดสอบเชื้อที่ได้คุณสมบัติ Probiotic ในขวดทดลองต่อการเจริญเติบโตของ *Campylobacter* *Campylobacter* จะถูกเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในขวดทดลอง ภายใต้สภาพ microaerophilic ที่ 37°C เชื้อ bacteria ที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นที่สามารถเป็น Probiotic จะถูกย้ายเข้าไปในขวดทดลองเดียวกันที่มี *Campylobacter* เจริญอยู่ ตัวอย่างจากขวดทดลองจะถูกเก็บ เพื่อศึกษาความอยู่รอดได้ของเชื้อ *Campylobacter* และ Probiotic bacteria

ในการทดลองนี้ *Campylobacter* ได้ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MH เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ขณะที่ *Lactobacillus* LH10 ถูกเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขวดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้ถูกปรับบรรยากาศภายในให้เป็น Microaerophilic โดยการปรับสัดส่วนอากาศกับก๊าซที่ได้มีสัดส่วน O₂:CO₂:N₂ เป็น 5:10:75 โดยบริษัทที่น่าเชื่อถือ เมื่อได้สภาวะอากาศที่เหมาะสมแล้วนำขวดทั้งหลายเหล่านี้ไปนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 1 บรรยากาศ เสร็จแล้วนำเชื้อ *Campylobacter* จำนวน 150 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในช่วงที่ 1 และ *Lactobacillus* LH10 จำนวน 150 ไมโครลิตร ลงในช่วงที่ 2 ส่วนขวดที่ 3 นำ *Campylobacter* และ *Lactobacillus* LH10 จำนวนละ 75 ไมโครลิตรใส่ลงไป แล้วนำขวดทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เก็บ

ตัวอย่างจากขวดทดลองโดยปราศจากเชื้อในช่วงเวลาที่ 0 24 30 36 48 60 66 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ นำตัวอย่างที่มีการเจือจางที่เหมาะสมมาเพาะแยกเชื้อโดยวิธี Spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ CCDA ที่มีสารปฏิชีวนะผสม แล้วนำไปบ่มเชื้อที่ 37C ภายใต้สภาวะ Microaerophilic สำหรับ *Campylobacter* เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ Anaerobic สำหรับ *Lactobacillus* LH10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีมานับและบันทึก

ผลการทดลองพบว่า ในช่วงแรกที่ *Campylobacter* มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นที่ 6.38 log cfu/ml และเมื่อชั่วโมงที่ 36 จำนวน *Campylobacter* ได้ลดจำนวนลงมาถึง 5.9 log cfu/ml หลังจากนั้น จำนวน *Campylobacter* ลดลงมาถึง 5.28 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 72 ขณะที่ *Lactobacillus* เมื่อเริ่มต้นมีจำนวนเชื้อที่ 7.48 log cfu/ml ในช่วง 24 30 36 จำนวนเชื้อลดลงมาถึง 4.08 4.56 และ 4.21 ตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อค่อยๆเจริญเติบโตขึ้นจนถึง 7.35 log cfu/ml เมื่อบ่มเชื้อที่ 72 ชั่วโมง ในขวดที่ 3 ที่มีเชื้อ *Campylobacter* และ *Lactobacillus* LH10 ผสมอยู่ด้วยกันพบว่า จำนวนเชื้อ *Campylobacter* ที่ชั่วโมงที่ 6 24 มีปริมาณ 6.36 และ 6.46 log cfu/ml ตามลำดับ หลังจากนั้นจำนวนเชื้อค่อยๆลดลงไปตามเวลาจนกระทั่งถึง 5.02 log cfu/ml ที่ 72 ชั่วโมง จำนวนเชื้อ *Campylobacter* มีปริมาณต่ำกว่าเชื้อ *Campylobacter* ในขวดที่ 1(control) เล็กน้อย ขณะที่เชื้อ *Lactobacillus* LH10 ที่ 6 ชั่วโมง มีปริมาณที่ 4.36 log cfu/ml และที่ 24 30 36 มีปริมาณเชื้ออยู่ที่ 4.61 4.95 และ 6.28 log cfu/ml ตามลำดับ แล้วเพิ่มขึ้นเป็น 5.3, 6.4 log cfu/ml ที่ ชั่วโมงที่ 60 และ 66 ตามลำดับ จนชั่วโมงที่ 72 จำนวน *Lactobacillus* LH10 ลดลงจนถึงไม่สามารถเพาะเชื้อได้ (รูปภาพที่ 6)



รูปภาพที่ 6 แสดงผลของ *Lactobacillus* LH 10 และ *Campylobacter* ในขวดทดลองที่ปรับสภาพ Microaerophilic ภายใต้อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0, 24, 30, 36, 48, 60, 66 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

3.3 การศึกษาคุณสมบัติของ Bacteria ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Campylobacter*

คุณสมบัติการมี Bacteriocin (Protein peptide-like substance)

คุณสมบัติการผลิต hydrogen peroxide

คุณสมบัติการผลิต acidity

คุณสมบัติการทนต่อความร้อน

คุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ

ผลการทดลอง ไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากผลการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไม่ได้ผลที่ดี

4. การทดสอบ Probiotic ต่อ *Campylobacter* ในไก่ทดลอง

4.1 การทดสอบ Colonisation ของ Probiotic bacteria ในไก่ทดลอง

ไก่จะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มอายุ Probiotic bacteria จะถูกป้อนให้ไก่ในวันต่างๆ เพื่อให้ทราบถึงการ colonise ได้ของ Probiotic bacteria วิธีการพิสูจน์โดยใช้ Molecular approach จาก caecal contents ของไก่แต่ละตัว โดยวิธี DNA finger print

4.2 การทดสอบ Colonisation ของ *Campylobacter* spp. ในไก่ทดลอง

ไก่จะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มอายุเช่นเดียวกับการทดลองหัวข้อ 4.1 วิธีการพิสูจน์จะใช้หลักการเดียวกัน

4.3 การทดสอบผลของ Probiotic bacteria เพื่อป้องกันการ colonise ของ *Campylobacter*

ไก่จะถูกป้อนด้วย Probiotic bacteria ตามโปรแกรมที่ได้ข้อมูลจากข้อ 4.1 หลังจากนั้นไก่จะถูกป้อนเชื้อ *Campylobacter* เมื่อสิ้นสุดการทดลองจำนวน *Campylobacter* จะถูกนับจาก caecal contents

ผลการทดลอง ไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากผลการทดลองในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไม่ได้ผลการทดลองที่ดี

5. การทดสอบสารสมุนไพร

ขั้นตอนที่ 1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร คัดเลือกพืชสมุนไพร 60 ชนิด ที่มีรายงานว่ามีการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้ นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* spp. การเตรียมสารสกัดพืชสมุนไพร

การสกัดพืชสมุนไพรอย่างหยาบ

พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษามีทั้งแบบสดและแบบแห้ง โดยแบบแห้งซื้อจากร้านขายสมุนไพรหมอเหรียญ 43/2 หมู่ที่ 14 บ้านหนองแขว ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งจัดเก็บไว้ในถุงกระดาษ

หนาสีน้ำตาล มีอายุการเก็บไม่เกิน 6 เดือน และแบบสดซื้อจากร้านค้าที่ขายสมุนไพรสดในตลาดสด บางลำพู เขตเทศบาลเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
การเตรียมสมุนไพรเพื่อทำการบดเพื่อทำเป็นผงยา

1. นำสมุนไพรที่คัดเลือกแล้วมาล้างให้สะอาด ทิ้งไว้ให้เสด็จน้ำแล้วทำการ
หั่นให้เป็นชิ้นย่อย ๆ แล้วจึงนำไปอบแห้งในตู้อบสมุนไพร โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 45 – 50°C จน
แห้งสนิทใช้ระยะเวลาประมาณ 8-10 ชั่วโมง

2. นำสมุนไพรที่ผ่านการอบแห้งแล้วนำมาบดโดยใช้เครื่องบด เพื่อให้ได้ผงยา

3. เก็บผงยาที่ได้ใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ นำไปไว้ในโถสุญญากาศ เพื่อทำการวิจัยต่อไป

การเตรียมสารสกัดผงยาสมุนไพรด้วย 95% ethanol โดยใช้วิธีการหมัก(maceration)

1. ชั่งผงยาสมุนไพรประมาณ 50 กรัม ใส่ flask ขนาด 500 มล. นำมาแช่ใน 95% ethanol ปริมาตร 250 มล. หมักนาน 2 วัน ในระหว่างการหมักมีการเขย่า flask ด้วยเครื่องเขย่าสารความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นระยะ ๆ เมื่อครบกำหนดทำการเก็บสารสกัด โดยผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

2. นำสารสกัดที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ(rotary vacuum evaporator) เมื่อ สารสกัดมีปริมาตรลดลงเหลือ 1 ใน 3 ของสารสกัดขั้นต้น จึงนำเอาสารสกัดที่ได้มาถ่ายใส่ลงใน evaporating dish นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จนกระทั่งได้สารสกัดที่แห้งหรือเข้มข้น

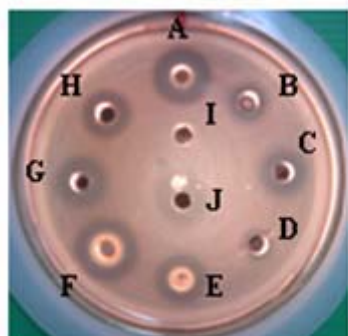
3. ทำการเก็บสารสกัดแห้งหรือเข้มข้นที่ได้ในขวดเก็บสาร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเตรียมทำ การวิจัยขั้นตอนต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรต่อเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยวิธี agar well diffusion

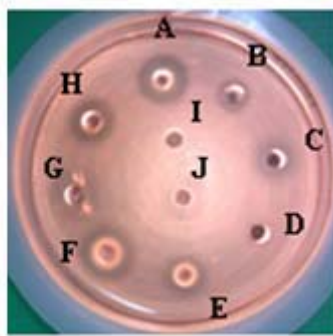
วิธีการทดสอบ หยดสารสกัดหยาบพืชสมุนไพรความเข้มข้น 200 มก./มล. ด้วยปิเปตใส่ในหลุมปริมาตร หลุมละ 35 ไมโครลิตร โดยที่งานเพาะเชื้อ 1 งานจะทดสอบสารสกัดได้ 5 ชนิด ที่เหลือ 2 หลุม จะเป็น ตัวควบคุมโดยที่ตัวควบคุมผลลบใช้น้ำกลั่น ส่วนตัวควบคุมผลบวกจะใช้ 5% glacial acetic acid ทำการ ทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มภายใต้สภาพ microaerophilic condition ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจบันทึกผลวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณเชื้อที่ไม่เจริญลักษณะโซนใส (clear zone) รอบหลุมสารสกัด สมุนไพรแต่ละชนิดหน่วยเป็นมิลลิเมตร แล้วหาค่าเฉลี่ยบันทึกผลและบันทึกภาพ คัดเลือกสารสกัดหยาบ จากพืชที่ให้ผลดีไปทดสอบการทดลองต่อไป

ผลการทดลองพบว่า จากการนำพืชสมุนไพรจำนวน 60 ชนิด มาสกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธี maceration โดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลายแล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบ สุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) แล้วนำสารสกัดหยาบความเข้มข้น 200 มก./มล. ไปทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* โดยวิธี agar well diffusion บนอาหาร Semi-Solid Brucella Agar พบพืชสมุนไพร 6 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยก่อให้เกิดบริเวณโซนใสเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 7) มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 14.80-22.40 มม. ได้แก่ สาร สกัดหยาบจากผลสมอไทย ผลมะขามป้อม ใบชุมเห็ดเทศ ดอกสารภี ผลยอ และใบพลู ให้ผล

22.40±1.29, 17.80±1.09, 16.13±1.29, 15.50±0.57, 15.30±0.92 และ 14.80±0.89 มม. ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมผลบวกให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเป็น 29.20±0.67 มม. เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* ทั้ง 10 ชนิดของสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด พบว่า สารสกัดจากผลสมอไทย ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ คือ 22.40 มม. ($P<0.05$) ดังแสดงผลในตารางที่ 4 และเมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารสกัดจากพืชทั้ง 6 ชนิด ให้มีค่าเป็น 6.5 ก่อนทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น ผลพบว่า สารสกัดจากพืชทั้ง 6 ชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ตารางที่ 5)



Campylobacter isolate A4



Campylobacter isolate B2

ภาพที่ 7 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Campylobacter* spp. (A4 และ B2) ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Semi-Solid Brucella Agar. (ใช้ 35 µl ของสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 200 มก./มล. ต่อหลุม)
 A = สมอไทย, B = ราชดัด, C = พลู, D = ยอ, E = สารภี, F = มะขามป้อม, G = ชุมเห็ดเทศ
 H = ส้มโอ, I = น้ำกลั่น (กลุ่มควบคุมผลลบ), J = 5% glacial acetic acid (กลุ่มควบคุมผลบวก)

ตาราง ที่ 4 แสดงผลของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* 10 ตัวอย่างที่ได้จากไก่

Campylobacter	การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (มม.)*					
	สมอไทย	มะขามป้อม	ชุมเห็ดเทศ	สารภี	พลู	ยอ
A1	21±0.09	19±0.00	18±0.00	16±0.06	15±0.00	15±0.07
A2	22±0.00	17±0.05	15±0.00	15±0.06	15±0.00	15±0.07
A4	23±0.00	19±0.00	16±0.00	16±0.00	15±0.07	14±0.00
A6	21±0.00	16±0.00	16±0.00	15±0.00	17±0.00	15±0.00
B1	22±0.09	18±0.00	16±0.06	15±0.07	14±0.07	15±0.00
B2	22±0.08	18±0.05	18±0.01	15±0.00	15±0.08	15±0.00
B6	22±0.08	18±0.00	14±0.00	16±0.00	15±0.00	15±0.00
B7	24±0.04	18±0.00	15±0.00	16±0.00	17±0.06	15±0.00

B9	25±0.08	16±0.00	17±0.00	16±0.06	15±0.00	15±0.00
B10	22±0.04	19±0.05	16±0.00	15±0.06	15±0.07	15±0.00
ค่าเฉลี่ย*	22.40±1.29 ^a	17.80±1.09 ^b	16.13±1.29 ^c	15.50±0.57 ^{cd}	15.30±0.92 ^{cd}	14.80±0.89 ^d

a,b,c,cd,d ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)* ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ
 น้ำกลั่น คือ negative control ซึ่งแสดงผล no clear zone ต่อเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท (isolates) ที่ทำการทดสอบ 5% glacial acetic acid คือ positive control ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส เท่ากับ 29.02±0.67 มม.

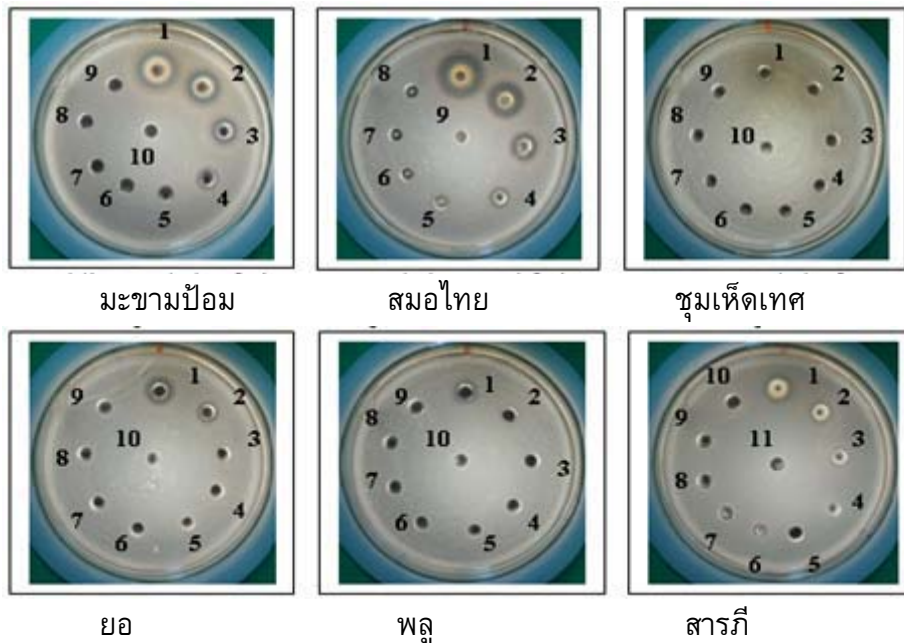
A1, A2, A4, A6, B1, B2, B6, B7, B9 และ B10 คือ *Campylobacter* ที่แยกได้จากไก่เส้นผ่านศูนย์กลางหลุม เท่ากับ 6 มม.

สารสกัดจากพืชสมุนไพร	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (มม.)
สมอไทย ไม่ได้ปรับค่า pH 2.80 หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	22.00±1.00 NC
มะขามป้อม ไม่ได้ปรับค่า pH 2.56 หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	18.33±1.15 NC
ชุมเห็ดเทศ ไม่ได้ปรับค่า pH 4.55 หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	16.33±1.53 NC
สารภี ไม่ได้ปรับค่า pH 3.85 หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	15.67±0.58 NC
ยอ ไม่ได้ปรับค่า pH 3.65 หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	14.67±0.58 NC
พลู ไม่ได้ปรับค่า pH 5.67 หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	15±0.00 NC
NC = no clear zone, ไม่เกิดโซนใส (clear zone)	

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Campylobacter* spp. ของสารสกัดจากพืชทั้ง 6 ชนิด เมื่อทำการปรับค่าพีเอช (pH)

ขั้นตอนที่ 2 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (minimal inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดหายาจากพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยวิธี agar well diffusion

ผลการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืช 6 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากสมอไทย มะขามป้อม ชุมเห็ดเทศ สารภี ยอ และพลู ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเป็นที่ยืนยันว่าสารสมุนไพรออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อเพิ่มหรือหรือลดลงของความเข้มข้นที่ใช้ และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อพบว่า ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ



ภาพที่ 8 แสดงระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร ต่อเชื้อ *Campylobacter* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Semi-Solid Brucella Agar.

1 = 200 มก./มล., 2 = 100 มก./มล., 3 = 50 มก./มล., 4 = 25 มก./มล., 5 = 12.5 มก./มล.,
6 = 6.25 มก./มล., 7 = 3.12 มก./มล., 8 = 1.56 มก./มล., 9 = 0.78 มก./มล.,
10, 11 = น้ำกลั่น

จากตารางที่ 6 พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดอยู่ในช่วง 25-200 มก./มล. โดยสารสกัดจากผลสมอไทย และผลมะขามป้อมสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ได้ดีที่สุดโดยให้ค่า MIC เท่ากับ 25 มก./มล. รองลงมาคือ สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ และดอกสารภี มีค่า MIC เท่ากับ 50 มก./มล. ส่วนสารสกัดจากใบพลูพบว่า ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ได้ต่ำสุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200 มก./มล.

พืชสมุนไพร	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (มม.)									
	ความเข้มข้นของสารสกัด (มก./มล.)									
	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200	pH
สมอไทย	-	-	-	-	-	10	15	18	22	2.80

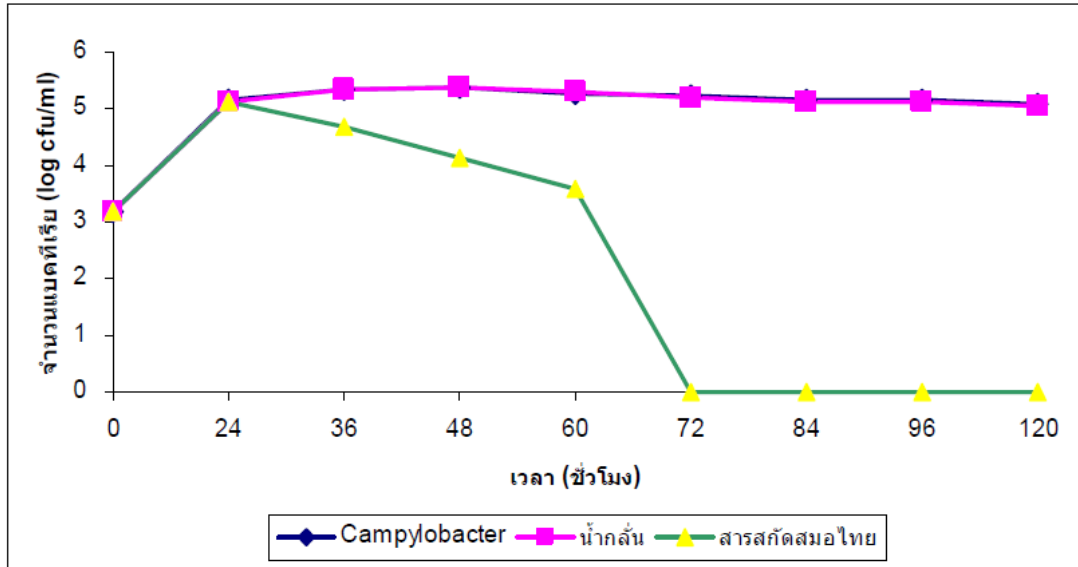
มะขามป้อม	-	-	-	-	-	10	14	17	20	2.56
ชมพูเห็ดเทศ	-	-	-	-	-	-	12	14	16	4.55
ยอ	-	-	-	-	-	-		10	15	3.65
สารภี	-	-	-	-	-	-	15	13	8	3.85
พลู	-	-	-	-	-	-	-	-	14	5.67

ตารางที่ 6 เส้นผ่านศูนย์กลางโซนไฮสที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ของสารสกัดหยาบพืชสมุนไพร ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการเจริญและการหลั่งกรดของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในขวดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton Broth การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton Broth ที่เติมสารสกัดจากผลสมอไทย ในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 และ 120 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า

Mueller-Hinton Broth ที่เติมสารสกัดจากผลสมอไทยหรือไม่ได้เติมสารสกัดใด ๆ ในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จำนวน *Campylobacter* ในขวดที่ 1 พบว่า จำนวนเชื้อมีการเจริญเติบโตคงที่ที่ $5.22 \pm 0.10 \log_{10}$ CFU/ml จนสิ้นสุดการทดลอง ผลการทดลองของขวดที่ 2 (น้ำกลั่น) จะมีลักษณะคล้ายกันกับการเจริญเติบโตของเชื้อ *Campylobacter* ในขวดที่ 1 จนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนในขวดที่ 3 พบว่า จำนวนเชื้อได้เริ่มลดลงจาก $5.11 \pm 0.04 \log_{10}$ CFU/ml ในชั่วโมงที่ 24 และลดลงเรื่อย ๆ ที่ชั่วโมงที่ 60 พบว่ามี *Campylobacter* $3.58 \pm 0.11 \log_{10}$ CFU/ml และเมื่อที่ 72 ชั่วโมง ไม่สามารถเพาะเชื้อได้จากตัวอย่างที่ 3 (ต่ำกว่า 10^2 CFU/ml) จนสิ้นสุดการทดลองจากภาพที่ 9 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ ($\log_{10}$ CFU/ml) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว



ภาพที่ 9 ผลสารสกัดจากผลสมอไทยที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. ต่อ *Campylobacter* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Broth เทียบกับเวลาที่ 0 ชั่วโมงถึง 120 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการเพิ่มจำนวนและการเหลือรอดของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่ทดลอง

การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ทดสอบ เตรียมสารละลายเชื้อ *Campylobacter* isolate (A2) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland nephelometer standard 0.5 จากนั้นเจือจางด้วย 0.85% sterile normal saline เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml ไก่ทดลอง ใช้ไก่เนื้อ คณะแพทยอายุ 1 วัน จำนวน 40 ตัว จากบริษัทเบทาโกรเกษตรอุตสาหกรรม สาขาร้อยเอ็ดได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มทั้งหมดโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยแบ่งลูกไก่ 40 ตัวออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ให้อาหารและน้ำตามปกติเป็นเวลา 7 วัน (เพื่อปรับให้เข้ากับสภาพแวดล้อม)

แผนการทดลอง

กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับสารสกัดฯ, ไม่ได้รับเชื้อ

กลุ่มที่ 2 ไม่ได้รับสารสกัดฯ, ได้รับเชื้อ (ที่อายุ 9 วัน)

กลุ่มที่ 3 เริ่มได้รับสารสกัดฯ ในขนาด 2 เท่าของค่า MIC ก่อนได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 4 เริ่มได้รับสารสกัดจากพืชที่ผลิตในเชิงการค้า (commercial herbal medicine extract)

การเลี้ยงไก่ แต่ละกลุ่มเลี้ยงแบบปล่อยพื้นบนพื้นปูนรองพื้นด้วยแกลบ ขนาด 0.6 x 1.0 เมตร โดยแยกเลี้ยงในแต่ละคอกที่สร้างห่างกัน 2.50 เมตร ให้แสงสว่างตลอด 24 ชั่วโมงให้น้ำและอาหารกินเต็มที่ตลอดเวลา อาหารใช้อาหารสำหรับลูกไก่เนื้อระยะแรก โปรตีนไม่น้อยกว่า 21% และไม่มียาปฏิชีวนะผสม

การให้เชื้อแก่ไก่ ไก่แต่ละตัวในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 จะได้รับเชื้อขนาด 1×10^6 CFU/ml ใน 0.85% sterile normal saline 500 ไมโครลิตร โดยการป้อนทางปากเมื่อไก่อายุ 9 วันและได้อาหารก่อนป้อนเชื้อ 2 ชั่วโมงการให้สารสกัดหยาบพืชสมุนไพร ไก่จะได้รับสารสกัดติดต่อกัน 4 วันโดยเริ่มวันที่ 8, 9, 10, 11 โดยสารสกัดหยาบพืชสมุนไพรจะละลายในน้ำกลั่นโดยให้สารสกัดมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 มก./มล. ก่อนป้อนเข้ากระเพาะพักโดยตรง ในปริมาณ 0.5 มล. ด้วยกระบอกฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยป้อนให้ไก่ทุกตัวเมื่ออายุไก่ได้ 6 วัน ทำ cloaca swab ลูกไก่ ในแต่ละกลุ่มทุกตัว

เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อโดยใช้ก้านสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแห้งเข้าไปในทวารไก่ลึกประมาณ 2.5 ซม. หรือป้ายอุจจาระที่ติดอยู่ที่ cloaca ของไก่ แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองปิดฝาหลอดให้แน่น บรรจุในถังส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขทันที หลังจากนั้นทำ cloacal swabs ทุกวันจนกระทั่งลูกไก่อายุได้ 8 วัน การเก็บตัวอย่างเมื่อลูกไก่อายุ 12 วัน ไก่ทุกตัวจะถูกทำสลับโดยวิธีฉีด 70% alcohol เข้าสมอง แล้วทำการผ่าซากเก็บลำไส้บริเวณไส้ตัน (caecum) เพื่อตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* โดยเก็บ caecum ทุกตัวนำกากอาหาร (caecal content) ที่อยู่ในไส้ตัน ของไก่แต่ละตัวมา 1 กรัม เพื่อทำการเจือจาง 10 เท่าด้วย 0.1% peptone water (PW) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นเจือจางลำดับขั้นครั้งละ 10 เท่าจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จึงนำตัวอย่างที่ได้มาเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ภายใต้ microaerophilic condition แล้วจึงนับจำนวนโคโลนี เพื่อแสดงผลจำนวนโคโลนีเป็นค่า $\log_{10}$ CFU/g เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่พบในแต่ละกลุ่ม

ผลการทดลองพบว่า จากการตรวจนับจำนวนเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) จากไส้ตันไก่ จำนวน 40 ตัว ไม่พบเชื้อในกลุ่มที่ 1 (ไม่ได้ป้อนเชื้อ) ในกลุ่มควบคุมที่ 2 (ป้อนเชื้อ), กลุ่มที่ 3 (ป้อนสารสกัดหยาบสมุนไพร

ไทย) และกลุ่มที่ 4 (ป้อนสารสกัดพืชชิงพาดิษฐ์) พบว่า มีค่าเป็น 8.07 ± 0.62 , 5.72 ± 2.05 และ $7.20 \pm 0.96 \log_{10}$ CFU/g ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 7 จะเห็นว่า จำนวนเชื้อ *Campylobacter* ของไก่ในกลุ่มที่ 3 (ป้อนสารสกัดหยาบสมุนไพรไทย) และกลุ่มที่ 4 (ป้อนสารสกัดพืชชิงพาดิษฐ์) มีจำนวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการป้อนเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และไก่ในกลุ่มที่ 3 (ป้อนสารสกัดหยาบสมุนไพรไทย) มีจำนวนเชื้อ *Campylobacter* น้อยกว่ากลุ่มที่ 4 (ป้อนสารสกัดพืชชิงพาดิษฐ์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพรสมอไทย และสารชิงพาดิษฐ์ต่อ *Campylobacter* ในไก่ทดลอง ในช่วงอายุ 0-12 วัน

กลุ่มทดลอง	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี ($\log_{10}$ CFU/g) *
กลุ่มที่ 1 (ไม่ได้ป้อนเชื้อ)	UD
กลุ่มที่ 2 (ป้อนเชื้อ)	8.07 ± 0.62^a
กลุ่มที่ 3 (ป้อนสารสกัดหยาดสมอไทย)	5.72 ± 2.05^b
กลุ่มที่ 4 (ป้อนสารสกัดพืชเชิงพาณิชย์)	7.20 ± 0.96^a

^{a,b} ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

* ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

UD = จำนวนโคโลนีต่ำกว่า 100 CFU/ml, หรือตรวจไม่พบ

อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาค้นคว้านี้ทำให้ทราบว่าไก่ที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเพื่อการค้า และเพื่อเป็นอาหารภายในครัวเรือน (หลังบ้าน) ต่างเป็นแหล่งสะสมเชื้อ *Campylobacter* ซึ่งไก่ไม่แสดงอาการแต่อย่างใดลักษณะภายในดูแล้วปกติมีสุขภาพดี จึงเป็นเหตุผลให้จะต้องมีการเฝ้าระวังเชื้อและควบคุมเชือนี้ในไก่เนื้อเนื่องจากเมื่อเชือนี้ยังคงอยู่ในไก่และไก่ตัวที่มีเชื้อสามารถแพร่เชื้อสู่ไก่ตัวอื่นรวมทั้งสิ่งแวดล้อมด้วยขณะเดียวกันเมื่อไก่ถูกนำเข้ามาสู่กระบวนการบริโภคไก่ยังสามารถปลดปล่อยเชื้อในกระบวนการฆ่าไก่และมีการปนเปื้อนอย่างหนักในโรงฆ่าหรือกระบวนการฆ่า ทำให้เนื้อไก่มีเชือนี้ปนเปื้อนที่ผิวหนัง และเมื่อนำไปบริโภคแล้วจะทำให้ผู้บริโภคเจ็บป่วยด้วยอาการ *Campylobacteriosis* ได้ การค้นหาสารหรือจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้ง *Campylobacter* จึงเป็นความต้องการอย่างเร่งด่วน

ไก่เนื้อที่เลี้ยงหลังบ้านและเลี้ยงในฟาร์มในระดับอุตสาหกรรมนั้นมีจำนวนมากในประเทศไทย การค้นหาสิ่งที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อ จึงมีความจำเป็นอย่างมากโดยการทดลองของผู้วิจัย ได้ตั้งสมมุติฐานของการทดลองนี้อยู่บนพื้นฐานที่ถ้าไก่ปลอดเชื้อ *Campylobacter* แล้วไก่ตัวนั้นน่าจะมีบางสิ่งในตัวไก่ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้และในการทดลองของเราพบว่า Normal flora profile ในไก่ที่มีความแตกต่างกันในสภาพแวดล้อมและแหล่งการเลี้ยงแตกต่างกันจะมีความแตกต่างกันโดยที่ไก่ที่เลี้ยงหลังบ้านถูกแยกออกจากไก่ที่เลี้ยงในอุตสาหกรรมโดยวิธี RAPD และ Phylogenetic tree ซึ่งผลการทดลองนี้พบจำนวนแถบ DNA ของไก่ทั้ง 2 กลุ่มถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน อาจจะเป็นเพราะไก่ถูกเลี้ยงแตกต่างกันโอกาสสัมผัสกับสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ พื้นดิน แมลง อาหาร น่าจะมีผล Normal flora ในไก่ทั้ง 2 กลุ่มนี้

เมื่อคัดแยกกลุ่ม Normal flora เพื่อเสาะหาจุลินทรีย์ที่ดีในการยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* จากผลการทดลองพบว่าเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Anaerobic* นั้นมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต *Campylobacter* ได้เป็นจำนวนหลาย ๆ กลุ่มและหลายเชื้อที่ได้คัดแยกออกมาจากไก่ที่ปลอดเชื้อ *Campylobacter* ตามสมมุติฐานข้างต้น และเมื่อนำกลุ่มเชื้อที่ดีนั้นมาทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อ *Campylobacter* ในสภาวะต่างๆ แล้วปรากฏว่าเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (*Lactobacillus*) จึงไม่สามารถนำเชือนี้มาพัฒนาต่อไปได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดบางประการ โดยตามสมมุติฐานข้างต้นที่ผลการปลอดเชื้อ *Campylobacter* ในไก่นั้นน่าจะเกิดจากทำงานร่วมกันผลของแบคทีเรียดีหลายๆ ชนิดหรือ หลายๆ กลุ่มแบคทีเรียในตัวไก่ (ไม่ใช่ชนิดเดียว) ช่วยกันทำงานต่อต้านเชื้อ *Campylobacter* ได้ ซึ่งข้อส่วนนี้งานนี้ยังไม่มีข้อสรุป และยังเป็นการยากต่อการพิสูจน์ตามความเชื่อนี้ได้ จึงต้องมีการพัฒนาแนวคิดนี้ต่อไป

ส่วนเชื้อ *Campylobacter* ที่สามารถคัดแยกออกมาได้จากไก่หลังบ้านและไก่ที่เลี้ยงในอุตสาหกรรม เพื่อศึกษาความเหมือนหรือความแตกต่างของเชื้อในแง่การระบาดของเชื้อในไก่เนื้อที่เลี้ยงโดย 2 ระบบ พบว่า *Campylobacter* จาก 2 แหล่งหรือระบบการผลิตมีความแตกต่างกันและถูกจัดกลุ่ม

แยกออกจากกันอย่างเห็นได้ชัดจากการวิเคราะห์โดย Phylogenetic tree โดยใช้วิธีของ RAPD ซึ่งพอสรุปได้ว่าเชื้อ *Campylobacter* ที่ระบาดในกลุ่มของไก่หลังบ้าน และไก่เลี้ยงแบบอุตสาหกรรม เป็น

จากผลการศึกษา เมื่อทำการทดสอบสารสกัดสมุนไพรจำนวน 60 ชนิด พบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ethanol) จากพืชสมุนไพร 6 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ได้ เมื่อพิจารณาจากสารสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีรายงานการแยกพบในส่วนต่าง ๆ ของพืช พบว่ามีหลายชนิดส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม 6 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ alkaloids, flavonoids, terpenoids, lectins, polyphenols และ tannins ซึ่งสารประกอบทั้งหมดนี้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่สกัดได้จากพืชจะแตกต่างกันไป เช่น สารกลุ่ม alkaloids จะออกฤทธิ์ขัดขวางหรือยับยั้งการสร้าง nucleic acid สารกลุ่ม flavonoids จะออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์และออกฤทธิ์ต่อเซลล์เมมเบรน (Tsuchiya et al., 1996) สารกลุ่ม terpenoids จะออกฤทธิ์ต่อเซลล์เมมเบรน (Ramar Perumal Samy, Ponnampalam Gopalakrishnakone, 2008) สารกลุ่ม lectins จะออกฤทธิ์แบบแข่งขัน หรือขัดขวางการสร้าง metabolite ที่จำเป็นต่อเซลล์แบคทีเรีย ทำให้เซลล์แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและหยุดการแบ่งตัว สารกลุ่ม polyphenols จะออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้าง metabolite ที่จำเป็นต่อเซลล์แบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อสงสัยถึงเงื่อนไขหรือปัจจัยที่จะทำให้ได้สารสำคัญดังกล่าวนี้จากพืช รวมทั้งกรรมวิธีในการสกัดเพื่อสกัดเอาสารสำคัญดังกล่าวออกมาเพราะฉะนั้น จึงได้มีการใช้ตัวทำละลายหลาย ๆ ชนิดในการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากพืช ซึ่งตัวทำละลายที่นิยมใช้ได้แก่ เมทานอล (methanol) หรือ เอทานอล (ethanol) ใช้สำหรับสกัดสารจำพวก อัลคาลอยด์, ตัวทำละลายอะซิโตน (acetone) สำหรับสกัดสารจำพวกฟลาโวนอยด์ และ สเตอรอยด์, ตัวทำละลายเฮกเซนไดเอทิลอีเทอร์ (hexane diethyl ether) และคลอโรฟอร์ม (chloroform) สำหรับสกัดสารจำพวก ไขมันที่ละลายในน้ำมัน ขี้ผึ้ง ไลปิด และ เอสเตอร์, ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) สำหรับสกัดสารจำพวก เทอปีนอยด์, ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) สำหรับสกัดสารจำพวก เอสเตอร์, ตัวทำละลายเอทานอล (ethanol) สำหรับสกัดสารจำพวก สเตอรอล โพลีฟีนอล แทนนิน และน้ำสำหรับสกัดสารประกอบ

ที่ละลายในน้ำได้ เช่น ไกลโคไซด์ โพลีแซคคาไรด์ โพลีเปปไทด์ และ แลคติน ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายเนื่องจากมีความสามารถในการสกัดสารได้กว้างมากทั้ง flavonoids, tannins และ alkaloids สามารถละลายได้ในตัวทำละลายชนิดนี้ เมื่อนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 60 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Campylobacter* พบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจากพืช 6 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สารสกัดจากลูกสมอไทย สารสกัดจากมะขามป้อม สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ สารสกัดจากดอกสารภี สารสกัดจากผลยอติบ และ สารสกัดจากใบพลู ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างกันในด้านประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารสกัดจากพืชทั้ง 6 ชนิด โดยที่สารสกัดจากลูกสมอไทย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดโดยให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสรอบ ๆ ปากหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อกว้างที่สุด และให้ระดับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ต่ำที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 25 มก./มล. มีหลายงานวิจัยที่ได้รายงานผลการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมอไทย ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ก่อโรคหลาย ๆ ตัว เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ อาทิเช่น สารสกัดจากลูกสมอไทยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ อย่างเช่นเชื้อ *Salmonella Typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* จากรายงานการศึกษาข้างบนและจากผลการวิจัยนี้ สารสกัดจากลูกสมอไทยที่สกัดโดยเอทานอลน่าจะมีสาร flavonoids, tannins และ alkaloids สามารถฆ่าเชื้อ *Campylobacter* ได้ จึงเป็นจุดที่น่าสนใจนำไปศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดจากลูกสมอไทยนี้มาใช้ทดแทนสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีความแตกต่างกันในหลายปัจจัยที่ทำการศึกษาดังเช่น ปริมาณเชื้อที่ให้, ช่วงระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ, อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้, ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งระยะเวลาและอุณหภูมิในการเพาะเชื้อ การเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลที่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดลูกสมอไทย จึงเป็นเรื่องยากการออกฤทธิ์ในสมุนไพร ดังจะเห็นได้จากสมุนไพรสูตรผสมที่มีสมอไทย ซึ่งมีสารออกฤทธิ์สำคัญคือ แทนนิน (tannin) เป็นส่วนผสมหลักและมีสมุนไพรตัวอื่นผสมอยู่ในอัตราส่วนที่ต่ำกว่าจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสูตรผสมอื่น ๆ เมื่อดูจากขนาดไซนัสที่กว้างกว่าผลที่ได้จากการศึกษาที่ได้ทดสอบในห้องปฏิบัติการถึงแม้ว่าสารสกัดจากลูกสมอไทยจะให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* ได้ดีที่สุด จากจำนวนสารสกัดจากพืชทั้งหมด 60 ชนิด เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในตัวไก่จะเห็นว่า การให้สารสกัดจากลูกสมอไทยก่อนให้เชื้อสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ ทั้งนี้เชื่อว่าฤทธิ์ในการทำลายเชื้อส่วนหนึ่งน่าจะมาจาก แทนนิน (tannins) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในผลสมอไทย และการออกฤทธิ์ของแทนนิน (tannins) นั้นเกิดขึ้นจากการเข้าทำปฏิกิริยากับโปรโตพลาสซึม (protoplasm) ของแบคทีเรียทำให้เกิดการตกตะกอนแต่การออกฤทธิ์ของแทนนิน (tannins) ไม่ได้เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น เพราะสามารถทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อที่สัมผัสได้ โดยพบว่าเมื่อให้โดยการกินในขนาดที่ต่ำจะทำให้เนื้อเยื่อทางเดินอาหารชั้นนอกตกตะกอนทำให้การซึมผ่านลดลงและช่วยป้องกันเนื้อเยื่อชั้นในจากปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรีย แต่ถ้าให้ในขนาดที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนในชั้นที่ลึกลงไปของผนังทางเดินอาหาร เกิดการอักเสบ และท้องเสียได้ นอกจากนั้นยังมีข้อมูลว่า การให้แทนนิน (tannins) ในรูปป้อนจะไม่เหมาะที่จะให้โดยการป้อนทางปาก เพราะว่าคุณสมบัติความเป็นกรดอ่อนนอกจากจะมีฤทธิ์จับกับโปรตีนของเยื่อบุของทางเดินอาหารแล้ว ยังถูกทำลายได้โดยเร็วจากสภาพต่างในบริเวณลำไส้เล็กอย่างไรก็ตามเนื่องจากการเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรครั้งนี้ ใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ซึ่งนอกจากแทนนิน (tannins) แล้วย่อมมีสารสำคัญชนิดอื่น ๆ เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียของสารสำคัญเหล่านั้นภายในตัวไก่ยังไม่ทราบ จึงต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 ได้ส่งผลงานไปตีพิมพ์ที่ Elsevier publisher for International Journal of Food Microbiology ในเรื่อง Antibacterial activity of medicinal plant crude extracts against *Campylobacter* spp. isolated from chickens ผลไม่ถูกรับเข้าตีพิมพ์ เหตุผลตามจดหมายแนบ และอยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงแล้วส่งไปยังวารสารระดับนานาชาติอื่นแทน

1.2 กำลังอยู่ในขั้นตอนการเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์เรื่อง

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

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ยังไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์

3. นำพื้นฐานความรู้และความชำนาญในการสอนนักศึกษาระดับปริญญาโทสาขาสัตวแพทย์สาธารณสุข ที่ทำงานและวิทยานิพนธ์ภายใต้หัวข้อ *Campylobacter* จำนวน 3 คน

3.1 Risk factors of *Campylobacter* contamination on pig carcasses

from slaughterhouse นักศึกษาชื่อ นายสุธิตล ไชยชิน สถานะ จบการศึกษาและมีผลงานตีพิมพ์ใน วารสาร สัตวแพทย์ มข. (ตามมาตรฐานของสกอ. TCI)

3.2 Efficacy of medicinal plant crude extracts on growth inhibition of *Campylobacter* spp. isolated from chickens. นักศึกษาชื่อ นายชัยพร สร้อยคำ สถานะ จบการศึกษา(กำลังอยู่ในขั้นตอนการเตรียมส่งตีพิมพ์)

3.3 Prevalence and Risk Factors of *Campylobacter* spp. Contamination on Organic and Conventional Broiler Flocks นักศึกษาชื่อ นายเทวิน แสงวสิน สถานะ จบการศึกษาและมีผลงานตีพิมพ์ใน วารสาร สัตวแพทย์ มข. (ตามมาตรฐานของสกอ. TCI)

4. การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

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.

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 Soikum¹, Prapansak Chaveerach^{1*}, Komkrich Pimpukdee¹, Peerapol Sukon²

Affiliations:

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

²Department 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 diarrheal 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 *Campylobacter* in the adjusted media broth. Consequently, 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 double concentration of its MIC value (50 mg/bird) for 4 days by crop gavage, and commercial herbal product, respectively. At aged 9 days, chickens in all groups except group 1 were orally inoculated with 1 x 10⁶ 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 explained by the colonization mechanisms of *Campylobacter* which is a predominant *Campylobacter jejuni* species in gastrointestinal tracts of chickens. It was believed as normal avian microbiota because chicken generally remains asymptomatic clinical sign despite carrying a huge number of the bacteria up to 10⁸ 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 infection (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 antibiotics 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 antibacterial activity of medicinal plants or herbs to replacing antibiotic use in the livestock on pathogens causing human diarrhea are remarkable. The use of alternative medicinal plant to cure diarrhea symptoms in human has been occasionally existence 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 gravimetric 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 µm 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, Basingstoke, Hampshire, U.K.). The plates were kept at 42°C under microaerophilic conditions (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) 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 used 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 1.0×10^8 CFU/ml) then, 150 μ l 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 μ l volumes of 200 mg/ml of each reconstituted extract was pipetted into wells. Sterilized water (35 μ l) was used as negative control and 5% glacial acetic acid (15 μ l) was used as a positive control. The plates were incubated at 37°C under microaerophilic 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 triplicate. 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 μ l of *Campylobacter* isolate (A2), containing approximately 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 μ l 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 microaerophilic atmosphere, adjusted to a pressure at 1 bar in the bottle, was established by exchanging the air with gas from a cylinder containing 5% O₂, 10% CO₂ and 85% N₂(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 μ 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 double 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 μ 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 log₁₀ 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 which 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 1×10^6 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 $0.6 \times 1.0 \text{ m}^2$) 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 Ethic 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 calculated 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 $3.18 \pm 0.00 \log_{10}$ CFU/ml at the beginning. After 24 h, the numbers were $5.16 \pm 0.02 \log_{10}$ 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 $3.18 \pm 0.00 \log_{10}$ CFU/ml at the beginning then the numbers wre $5.11 \pm 0.00 \log_{10}$ CFU/ml at 24 h. After that the numbers were gradually decreased to 4.70 ± 0.02 , 4.1 ± 0.08 and $3.58 \pm 0.11 \log_{10}$ CFU/ml at 36, 48 and 60 h respectively. 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 $8.07 \pm 0.62 \log_{10}$ 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 dissolve in aqueous 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 multi-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 multi-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 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* 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 understood 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°C (Park., 2002), the higher metabolic temperatures (42 °C) found in poultry species may predispose poultry to be a prominent 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 caecum. 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 multi-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, fowl 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 of Ethnopharmacology*. 62, 183-193.
- 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 Guillain-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., Bhattacharyya, 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, time of colonization, and prevalence. *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. *Avian 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.
- Oyofe, B.A., Buhari A Oyofe., 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 Pharmaceutical 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 eastern 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 published 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 cofereence, 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., Nørnung, 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. *Avian 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*. *Avian 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.

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 microflora 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°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°C under microaerophilic condition generating by using gas package (BBL, Becton Dickinson, USA) in anaerobic jars for 48 h. Thereafter, one typical colony of each strain of *Campylobacter* was transferred into Mueller-Hinton (MH) (Oxoid, CM 405, Basingstoke, UK) broth and kept at 37°C under microaerophilic 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 for 24 h at 37°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°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°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 vortex 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 rpm for 30 sec. For washing step, 400 μL of W1 buffer was added to the GD column and centrifuge at 13,000 rpm 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 rpm for 30 sec. Discard the flow-through and return the GD column to 2 ml collection tube and then centrifuge at 13,000 rpm 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 rpm 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 microaerophilic condition on MH broth (Oxoid,). 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 200 μL of lysozyme 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 MgCl_2 , 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 Lactobacillus, 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 Campylobacter-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 Chaichin¹, 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 into 2 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 was 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.

ปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนแคมไพโลแบคทีเรียในซากสุกรในโรงฆ่าสัตว์

สุทธิดล ไชยชิน¹, ประพันธ์ศักดิ์ ฉวีราช² คมกริช พิมพ์ภักดี

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนแคมไพโลแบคทีเรียในซากสุกรในระบบโรงฆ่าสุกร

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

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

0.05) และจากการวิจัยพบค่าความสัมพันธ์ความเสี่ยง (Odds ratio) ต่อการปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรของกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุลชีพ 3.69 เท่า ต่อกลุ่มที่มีการควบคุมจุลชีพในซากสุกร ($P < 0.05$; 95% CI [1.99 – 6.87])

ข้อสรุป สรุปว่าปัจจัยเสี่ยงสำคัญในการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกร คือ การปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์จากลำไส้สุกร และมีดของพนักงานตรวจโรคสัตว์

คำสำคัญ: ปัจจัยเสี่ยง แคมไพโลแบคเตอร์ ซากสุกร โรงฆ่าสัตว์

¹ คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสุรินทร์ อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000

² ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ: โทรศัพท์ 044-153090

บทนำ

แคมไพโลแบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ จัดอยู่ใน Family Campylobacteraceae มีลักษณะเซลล์รูปร่างเป็นแท่งโค้งหรือเป็นเกลียว (spiral shape) จะคล้ายปีกนก หรืออาจมีรูปร่างเหมือนเครื่องหมายจุลภาคหรือมีรูปร่างคล้ายตัวเอส (curved, S) ขนาดกว้างประมาณ 0.2 – 0.8 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 0.5 – 5.0 ไมโครเมตร เมื่อเซลล์อายุมากขึ้นหรือสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศเป็นเวลานาน จะมีการเปลี่ยนรูปร่างเป็นแบบทรงกลม (coccus) ลักษณะทั่วไปของเชื้อแคมไพโลแบคทีเรีย ไม่สร้างสปอร์ มีแฟล็กเจลลัม (flagella) สามารถเคลื่อนไหวได้ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นการเคลื่อนไหวแบบเกลียวสว่าน (corkscrew-like motion) ที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40 – 42 องศาเซลเซียส ไม่ทนความเค็มและความเป็นกรดสูง (pH < 6.5) แคมไพโลแบคทีเรียส่วนใหญ่ต้องสภาวะบรรยากาศแบบ microaerophilic (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) และส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase test) แคมไพโลแบคทีเรียที่ตรวจพบในสุกรส่วนใหญ่จะเป็น *C. coli* (ซีโรไทป์ O:30 และ O:46 ซึ่งตรวจโดยวิธีการทดสอบปฏิกิริยาที่ไม่ทำให้เกิดการตกตะกอนของเม็ดเลือดในภาดทดสอบขนาดเล็ก ซึ่งออกแบบโดย Penner and Hennessy) โดยพบ 34 - 46% ในสุกร [1] และพบว่า *C. coli* เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อแคมไพโลแบคทีเรียในคนด้วย [2, 3] โดยที่ผู้ป่วยจะมีการ อูจาระร่วงเป็นน้ำหรือมีเลือดปน เมื่ออาการพัฒนานานขึ้นอาจพบภาวะอาการทางระบบประสาทของโรคในกลุ่มอาการ Guillain-Barré syndrome (GBS) ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขทั้งของประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศที่กำลังพัฒนา และเป็นอุปสรรคของการผลิตอาหารอันมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนแคมไพโลแบคทีเรียผ่านทางเนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์สู่ผู้บริโภค ในปี 2003 มีรายงานของสมาชิกประเทศในกลุ่มยุโรปพบจำนวนผู้ป่วยเป็นโรคแคมไพโลแบคทีเรียไอซิส 48.9 ต่อประชากร 100,000 คน [4] และในปีเดียวกันที่สหรัฐอเมริกาพบว่ามีสัดส่วนผู้ป่วย 12.6 ต่อประชากร 100,000 คน [5] มีรายงานพบว่าเด็กที่อายุน้อยกว่า 14 ปี จำนวน 2,001 คน ที่ป่วยด้วยอาการท้องเสียที่เข้ารับรักษาในโรงพยาบาลในเขตกรุงเทพมหานครในปี 2000 – 2005 พบว่าการติดเชื้อแคมไพโลแบคทีเรีย 2.9% [6] แนวโน้มของผู้ป่วยที่ป่วยด้วยสาเหตุอาหารเป็นพิษในประเทศไทยมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในปี พ.ศ.2551 สำนักโรคติดต่อ 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 พบว่าในได้หวั่นพบความชุกของแคมไพโลแบคทีเรียในซากสุกร 13.8% [8] และประเทศนอร์เวย์รายงานความชุกของแคมไพโลแบคทีเรียในซากสุกรก่อนที่จะมีการใช้ลมเย็นเป่าปรับอุณหภูมิผิวซากสุกร 56.7% [9] และประเทศเนเธอร์แลนด์ได้รายงานความชุกแคมไพโลแบคทีเรียในซากสุกรที่ชำแหละ 9% [10] และในปี 1996 สหรัฐอเมริกาโดย United States Department of Agriculture (USDA) รายงานความชุกของแคมไพโลแบคทีเรียในซากสุกร 31.5% [11] และมีรายงานวิจัยพบความชุกแคมไพโลแบคทีเรียในซาก 21.1% [12] ส่วนในประเทศเบลเยียมมีรายงานความชุกของแคมไพโลแบคทีเรีย 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] มีรายงานการพบแคมไพโลแบคทีเรียในช่องอกและในช่องท้อง 58.9% และ 44.6% ตามลำดับ [13] ในอังกฤษพบว่าการปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคทีเรียในเนื้อสุกร 6.3% [14] สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษาถึงความชุกของ *C. coli* พบในเนื้อสุกร 60% และไม่พบ *C. jejuni* ในสุกร [15]

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้าง เพื่อศึกษาปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนแคมไพโลแบคทีเรียในซากสุกรในระบบโรงฆ่าสุกร เพื่อใช้เป็นแนวทางในวางแผนควบคุมป้องกันการปนเปื้อนแคมไพโลแบคทีเรียในอนาคตต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

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

แบ่งกลุ่มตัวอย่างการศึกษาค้างนี้ เริ่มตั้งแต่ภายหลังจากการลวกซากและชำแหละ การตัดคอ การเปิดผ่าซาก จนถึงขั้นตอนการตรวจเนื้อโดยพนักงานตรวจโรค โดยกำหนดกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤต เป็นกลุ่มที่มีความเข้มงวดเรื่องวิธีปฏิบัติในโรงฆ่าสุกรที่ถูกสุกสุกตามหลักวิธีปฏิบัติ มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) 9009-2549 และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤตซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการปฏิบัติในโรงฆ่าสุกรที่ถูกสุกสุกโดยปล่อยให้ดำเนินงานตามปกติ ตามรูปแบบหรือวิธีการที่บุคลากรในโรงฆ่าเคยปฏิบัติ ซึ่งทั้งหมดทำการศึกษาค้างในสุกรที่เข้าโรงฆ่าสุกรจำนวน 28 ตัวต่อกลุ่มการทดลองโดยแบ่งจุดวิกฤตมี 3 จุดคือ จุดที่มีการตัวหัว จุดที่มีการ

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

ผลการศึกษา

ผลจากการวิจัยครั้งนี้พบว่า ความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียที่ตรวจพบในซากสุกร ณ จุดวิกฤตต่างๆ ของ กลุ่มที่ไม่มีการควบคุม (กลุ่มที่ 1) และที่มีการควบคุม (กลุ่มที่ 2) ได้ผลดัง **Table 1**. จากผลการวิจัยพบว่าเมื่อนำจำนวนของการให้ผลบวกกับการตรวจหาแคมไฟโลแบคทีเรียมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ความเสี่ยง (Odds ratio) ด้วยโปรแกรม EpiInfo เวอร์ชัน 6.04d ปี 2004 โดยใช้วิธี Chi-square test หรือ Fisher's Exact test ในการวิเคราะห์พบว่าจุดที่มีการเปิดผ่าซาก ณ ตำแหน่งซากสุกรพบว่ากลุ่มที่ไม่มีการควบคุมมีความสัมพันธ์ความเสี่ยงกับการปนเปื้อนแคมไฟโลแบคทีเรีย 19.46 เท่า ของกลุ่มที่มีการควบคุม ($P < 0.05$; 95% CI [2.11 – 450.61]) และจุดที่มีการตรวจซากโดยพนักงานตรวจโรคสัตว์ ณ ตำแหน่งซากสุกรและมีด พบว่ากลุ่มที่ไม่มีการควบคุมมีความสัมพันธ์ความเสี่ยงกับการปนเปื้อนแคมไฟโลแบคทีเรีย 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 ที่ตำแหน่งแนวสันหลังของกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมมีความสัมพันธ์ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแคมไฟโลแบคทีเรีย 5 เท่า ของกลุ่มที่มีการควบคุม ($P < 0.05$; 95% CI [1.12 – 24.03]) ดังแสดงใน **Table 2**. หากนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์ความเสี่ยง (Odds ratio) ของกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมเทียบกับกลุ่มที่มีการควบคุมในซากสุกรพบว่า กลุ่มที่ไม่มีการควบคุมมีความสัมพันธ์ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแคมไฟโลแบคทีเรียในซากสุกร 3.69 เท่า ของกลุ่มที่มีการควบคุม ($P < 0.05$; 95% CI [1.99 – 6.87]) ดังแสดงใน **Table 3**.

วิจารณ์ และสรุป

ค่าความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียที่ตรวจพบในซากสุกรของกลุ่มที่มีการควบคุม แนวโน้มของค่าความชุกในซากสุกรทุกจุดมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ คือ 8.33%, 4.17%, 4.17% และหากพิจารณาภาพรวมของความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียในทุกๆ จุด ทั้งกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤต พบว่าช่วงจุดที่มีการตัดหัวสุกรไปยังจุดที่มีการเปิดผ่าซาก ค่าความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียมีค่าลดลงและกลับมาเพิ่มอีกครั้งในจุดที่มีการตรวจซากโดยพนักงานตรวจโรคสัตว์และในซากสุกร 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] ที่พบว่าความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียจะกลับมาเพิ่มอีกครั้งในช่วงที่มีการผ่าซากและชั้นสูตรซากแสดงให้เห็นว่าการเปิดผ่าซากและชั้นสูตรซากมีโอกาสนปนเปื้อนเชื้อแคมไฟโลแบคทีเรียได้มากขึ้น

ค่าความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียของจุดที่มีการตัดหัวสุกรในกลุ่มที่มีการควบคุมเป็น 6.25% และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมเป็น 31.25% ซึ่งพบว่าที่ตำแหน่งซากค่าความชุกของการปนเปื้อนแคมไฟโลแบคทีเรียของกลุ่มที่มีการควบคุมเป็น 8.33% และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมเป็น 33.33% ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมาก

ค่าความชุกการปนเปื้อนแคมไฟโลแบคทีเรียของจุดที่มีการเปิดซากสุกรในกลุ่มที่มีการควบคุม (5.55%) และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุม (27.77%) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ตำแหน่งซากของกลุ่มที่มีการควบคุม ค่าความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียแตกต่างกันถึง 41.66% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่มีการควบคุม และพบว่าแนวโน้มค่าความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในซากสุกรจะลดลงในกลุ่มที่มีการควบคุมอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Malakauskas และคณะที่พบว่าการปนเปื้อนแคมไฟโลแบคทีเรียในซากสุกรมาจากการปนเปื้อนเชื้อที่มาจากระบบทางเดินอาหารในช่วงกระบวนการผลิตในโรงฆ่า [19]

ค่าความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียของจุดที่มีการตรวจซากสุกรในกลุ่มที่มีการควบคุม (6.25%) และกลุ่มที่ไม่มีการควบคุม (41.67%) ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และหากดูรายละเอียดจากผลการทดลองพบว่าที่ตำแหน่งมีดที่ใช้ในการตรวจซากสุกรของพนักงานตรวจโรคสัตว์พบว่ากลุ่มที่มีการควบคุม (8.33%) และกลุ่มไม่มีการควบคุม (41.67%) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การปนเปื้อนของแคมไฟโลแบคทีเรียที่เกิดจากการใช้มีดอาจทำให้มีการปนเปื้อนข้ามมายังซากน้อยกว่าจุดที่มีการตรวจซากน่าจะเป็นเหตุผล เพราะพนักงานฆ่าหรือผู้ปฏิบัติในแต่ละจุดจะใช้ผู้ปฏิบัติจุดละคน ซึ่งเมื่อสุกรแต่ละตัวผ่านจากจุดหนึ่งมายังอีกจุดหนึ่งพนักงานจะมีการเปลี่ยนมีดหรือลับคมมีดก่อนที่จะปฏิบัติกับซากสุกรตัวต่อไปซึ่งอาจมีการปนเปื้อนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับจุดที่มีการตรวจซากสุกร โดยพนักงานตรวจโรคสัตว์ ซึ่ง ณ จุดนี้ผู้ปฏิบัติหรือพนักงานตรวจโรคสัตว์จะเข้ามาทำการตรวจเมื่อซากสุกรมารอ ณ จุดนี้ครบ 10 ตัว แล้วทำการตรวจพร้อมๆ กัน ซึ่งการใช้มีดในจุดนี้จึงมีโอกาสนที่ปนเปื้อนแคมไฟโลแบคทีเรียได้มากกว่าจุดอื่นๆ ที่มีการใช้มีด ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากค่าความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียที่ตำแหน่งมีด ณ จุดต่างๆ พบว่าค่าความชุกของแคมไฟโลแบคทีเรียจากตำแหน่งมีด จากจุดที่มีการตรวจซากสุกร จะมีค่าความชุกมากกว่าจุดที่มีการตัดหัวสุกรและจุดที่มีการเปิดผ่าซากสุกร ในกลุ่มที่ไม่มีการควบคุม 41.67%, 29.17%, 24.00% ตามลำดับ

จุดซากสุกรค่าความซุกของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ ตำแหน่ง ทวารหนัก หาง ขาหลัง แนวสันหลัง ของกลุ่มที่มีการควบคุมและกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมมีค่าความซุกไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่ามีแนวโน้มของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ลดลงในกลุ่มที่มีการควบคุมจุด ในทุกตำแหน่งที่กล่าวมา และมีค่าความซุกของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ตำแหน่งคอ และที่ตำแหน่งคอเป็นตำแหน่งที่มีค่าความซุกของแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรมากที่สุดคือ 29.17% และ 50.00% ในกลุ่มที่มีการควบคุมและไม่มีการควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งคอก็คือตำแหน่งที่อยู่ต่ำที่สุดเมื่อมีการแขวนซากสุกร จึงทำให้น้ำล้างซากสุกรหรือสิ่งสกปรกต่าง ๆ ไหลมารวมกันที่บริเวณรอยตัดของคอ เมื่อนำไปตรวจสอบเชื้อจึงพบว่ามีความซุกมากกว่าตำแหน่งอื่นๆ ที่ตรวจพบบนซากสุกร ดังนั้นหากมีการล้างทำความสะอาดซากด้วยน้ำที่มีส่วนผสมคลอรีนหรือน้ำสะอาดในบริเวณตำแหน่งนี้จะช่วยลดปริมาณของเชื้อที่สะสมบริเวณนี้ได้

การปฏิบัติตามมาตรฐาน มกอช. 9009-2549 สามารถช่วยลดการปนเปื้อนของแคมไพโลแบคเตอร์ในกระบวนการผลิตได้ กล่าวคือค่าความซุกของแคมไพโลแบคเตอร์จากกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมเป็น 46.67% ลดเหลือ 19.17% ในกลุ่มที่มีการควบคุม และหากเปรียบเทียบความซุกของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ของซากสุกรในภาพรวมของทุกจุดวิกฤตของกลุ่มที่มีการควบคุมและไม่มีการควบคุม 11.64% (33/288) และ 38.54% (111/288) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะพบว่าระดับการปนเปื้อนหากเปรียบเทียบกับประเทศที่พัฒนาแล้วซึ่งมีค่าความซุกของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรเช่น สหรัฐอเมริกา 21.1 - 31.5% [11, 12] เบลเยียม 17% [14] ไต้หวัน 13.8% [8] เนเธอร์แลนด์ 9% [10] อังกฤษ 6.3% [14] ส่วนในประเทศไทยที่เคยมีรายงานพบ 60% [15] ในซากสุกร ซึ่งจะพบว่าค่าความซุกที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้หากมีการควบคุม (11.64%) จะมีค่าความซุกอยู่ในเกณฑ์ประเทศที่พัฒนาแล้ว (6.3 - 31.5%) นั้นข้อมูลจากการทดลองครั้งนี้สนับสนุนให้เห็นความสำคัญของมาตรการในการควบคุมความเข้มงวดให้เป็นไปตามมาตรฐาน มกอช. 9009-2549 จะมีผลทำให้การตรวจพบแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรลดน้อยลง

การใช้ถุงพลาสติกหุ้มรอบบริเวณทวารหนักตั้งแต่ช่วงขั้นตอนหลังจากที่สุกรขุนด้วยเครื่องล้างซากและเครื่องขุนสุกรแล้ว แสดงให้เห็นถึงค่าสัมพันธความเสี่ยงของการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ที่จุดที่มีการเปิดซากสุกร ณ ตำแหน่งซากสุกร 19.46 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมกับกลุ่มที่มีการควบคุมซึ่งสอดคล้องกับความเห็นของ Borch et al. (1996) [16] ที่แสดงให้เห็นถึงจุดวิกฤตที่มีโอกาสในการปนเปื้อนเชื้อโรคในกระบวนการฆ่าสุกร

ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกร คือ การปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์จากลำไส้สุกรมายังซากสุกร และการปนเปื้อนจากมิดที่ใช้ในการปฏิบัติงานของพนักงานตรวจโรคสัตว์โดยเกิดการปนเปื้อนข้าม ดังนั้นการป้องกันการปนเปื้อนอาจจะจากลำไส้สุกรมายังซากสุกรด้วยการใช้ถุงพลาสติกหุ้มรอบบริเวณทวารหนักซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนหรือโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรได้ และพบความสัมพันธ์ความเสี่ยง (Odds ratio) ต่อการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรของกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต 3.69 เท่า ต่อกลุ่มที่มีการควบคุมจุดในซากสุกร การปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรพบมากในจุดที่มีการเปิดผ่าซากโดยเฉพาะตำแหน่งซาก 45.83% (11/24) และจุดที่มีการตรวจซากของพนักงานตรวจโรคสัตว์ ทั้งตำแหน่งซาก 41.67% (10/24) และตำแหน่งมิด 41.67% (10/24) และที่จุดตรวจซากสุกร ตำแหน่งคอ พบการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ 50.00% (12/24) ในกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุด และมิดที่ใช้ปฏิบัติงานก็เป็นปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนของแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกร ณ จุดที่มีการตรวจซากสุกรถึง 7.86 เท่า และจุดนี้เป็นจุดที่มีค่าสัมพันธความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกร ณ ตำแหน่งซาก 16.43 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมกับกลุ่มที่มีการควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มงวดในการปฏิบัติตามมาตรฐาน มกอช. 9009-2549 แสดงให้เห็นความชัดเจนในการปฏิบัติของพนักงานตรวจโรคสัตว์เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรที่เกี่ยวข้องกับเรื่องสุขอนามัยและการใช้มิดในการตรวจซากสุกรซึ่งสอดคล้องกับแนวทางปฏิบัติของโรงฆ่าสุกรในสาธารณรัฐเชด ในปี คศ. 2001 จนถึงปี คศ. 2003 ซึ่งสามารถลดการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรจากค่าความซุกในซากสุกร 18% เหลือเป็น 0% ในปี คศ. 2003 [3]

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ นายชัยพร สร้อยคำ ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือในห้วงปฏิบัติการ 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. Steinhäuserová I, Nebola M, Mikulíková 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, Worawattanukul 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.