บทคัดย่อ

Campylobacter เป็นเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ ที่เป็นสาเหตุสำคัญก่อให้เกิดอาการอักเสบของระบบทางเดินอาหาร ที่มักมีสาเหตุเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของเชื้อในเนื้อไก่และอาหาร วิธีการทางจุลชีววิทยาถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเชื้อนี้ ซึ่งจะใช้เวลานาน ประมาณ 10-14 วัน และต้องใช้วิธีการเลี้ยงและอาหารพิเศษจึงจะสามารถแยกเชื้อสายพันธุ์สำคัญคือ *C. jejuni* และ *C. coli* ได้ ในการประกันคุณภาพของเนื้อไก่ส่งออกตลอดจนด้านความปลอดภัยของอาหาร การตรวจหาเชื้อนี้ด้วยความรวดเร็วแม่นยำจะมีประโยชน์มาก วิธี duplex PCR ที่ใช้ในการวิจัยนี้จะให้ผลการตรวจสอบภายใน 6-8 ชม หลังการบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อ 24 ชม การวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการแยกดีเอ็นเอของเชื้อแบบรวดเร็วและง่ายจากเนื้อไก่และได้ผลการตรวจที่รวดเร็วและถูกต้อง โดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ product size ของ PCR ได้ที่ 460 bp และ 160 bp แสดงว่าเป็นเชื้อ *C. jejuni* และ band เดียวที่ 460 bp คือ *C. coli* จากการศึกษาตัวอย่างเนื้อไก่ 391 ตัวอย่าง จาก 20 โรงงาน พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* จำนวนมากโดยเฉพาะจากไก่สดแช่เย็นมากกว่าไก่สดแช่แข็งได้ผลความไวของวิธี PCR 92.0% และ ความจำเพาะ 64.2% ค่าที่ได้นี้ใช้วิธีมาตรฐานจุลชีววิทยาเป็นค่ากำหนดผล 100% ซึ่งวิธี PCR ที่ใช้ตรวจจะพบการปนเปื้อนได้โดยไม่จำเป็นต้องมีเชื้อที่มีชีวิตในขณะนั้น และอาจตรวจพบเชื้อในปริมาณที่วิธีทางจุลชีววิทยาตรวจไม่ได้ ทำให้ค่าที่นำมาแปลผลมี false positive สูงขึ้น การตรวจโดย immunoassayได้ผลความไวของวิธี 96.9% และ ความจำเพาะ 68.8% ซึ่งให้ผลความจำเพาะไม่สูงมากเช่นกัน และยังตรวจผลได้แค่ genus ของเชื้อเท่านั้น คำนวณค่าใช้จ่ายสำหรับสารที่ใช้ในวิธี PCR จะถูกกว่าวิธี immunoassay และ วิธีทางจุลชีววิทยา และที่สำคัญคือการตรวจให้ผลที่ชัดเจน แม่นยำ สม่ำเสมอ ง่ายและรวดเร็ว

จากการทดสอบ sensitivity pattern ต่อยาปฏิชีวนะ 8 ชนิด คือ ampicillin, amoxy-clavulanic acid, cephalothin, ciprofloxacin, erythromycin, nalidixic acid, norfloxacin และ tetracycline โดยวิธี disk diffusion พบว่า *Campylobacter* จากเนื้อไก่ที่แยกได้ในช่วงตั้งแต่ สิงหาคม 2543 จนถึง ธันวาคม 2544 รวมทั้งหมด 259 สายพันธุ์ พบว่ามีความไวต่อ amoxy-clavulanic acid มากที่สุด (>90%) รองลงมาคือ erythromycin (> 60%) ส่วนยาปฏิชีวนะที่เหลือนั้น ความไวจะต่ำกว่า 40% พบว่าหลายสายพันธุ์ให้ผลในการตรวจสอบโดย nalidixic acid, cephalothin และ การใช้สาร hippuric acid ผิดไปจากที่ควรเป็น การใช้สมุนไพรจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ลง ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้าน *Campylobacter* ของสมุนไพรจำนวน 24 ชนิด และจากผลเบื้องต้นได้เลือกสมุนไพร 5 ชนิด คือ ข่า กะทกรก สาบแร้งสาบกา พลู และ ยอดิบ ไว้ทดสอบฤทธิ์ต่อ *Campylobacter* ที่แยกจากตัวอย่างเนื้อไก่ 179-190 สายพันธุ์ โดยวิธี disk diffusion ผลการทดสอบเมื่อดูจากขนาด zone > 15 mm ขึ้นไป พบว่า พลูมีฤทธิ์ต้านเชื้อดีที่สุด ถึงกว่า 90% รองลงมาคือ สาบแร้งสาบกา (62%)

การศึกษาฤทธิ์ของสารพิษที่หลั่งออกมาจากเชื้อและที่แยกจากผนังเซลล์ของตัวเชื้อ พบว่ามีพิษต่อเซลล์ 2 ชนิด (KATO III และ Vero cells) ที่ใช้ตรวจสอบโดยมีระดับของความเป็นพิษที่ค่า ED_{50} แตกต่างกัน คือ พิษมาก (จำนวนเชื้อ 20 และ10%) ปานกลาง (61 และ 51%) และ น้อย (19 และ 39%) สามารถนำผลที่ได้มาศึกษาเชิงวิชาการด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพที่มีผลเกี่ยวข้องของโรคกับเชื้อกลุ่มนี้ได้

การศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามเป้าหมายที่ตั้งไว้ คาดหวังว่า วิธี duplex PCR นี้สามารถพัฒนาต่อไปเป็นชุดสำเร็จใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *C. jejuni* และ *C. coli* รวมทั้งการให้บริการการตรวจเชื้อแก่หน่วยงานราชการและเอกชนที่ต้องการ รวมทั้งการถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อให้เป็นประโยชน์ต่อการประกันคุณภาพและมาตรฐานความปลอดภัยของอาหารและเนื้อสัตว์ที่ผลิตในประเทศไทย

Abstract

Campylobacter, a gram negative bacteria, has become the most frequently identified cause of bacterial food-borne gastroenteritis. The transmission to human is mainly by contamination in raw chicken, and food. Conventional microbiological method has been used as standard technique for the identification of this bacteria. It is certainly laborious and time comsuming between 10-14 days. The bacteria isolation is required special conditions and selective media until final confirmation to be *C. jejuni* and *C. coli* which are dominant strains involved in enteritis. For chicken export and food safety control, rapid and accurate identification of contamination is very important. The duplex PCR used in this study can give the result within 6-8 h after the 24 h enrichment process. The technique proposed for extracting crude DNA from organisms is also rapid and simple to manipulate from chicken-sample culture and gives the accurate results. The duplex PCR assay was developed using two primer sets. Primer set I amplified a 460 bp fragment present in *C. jejuni* and *C. coli*. Primer set II amplified a 160 bp target unique for *C. jejuni*. From 20 slaughter facilities, 391 chicken samples were obtained to study by conventional method and PCR. A number of 320 were identified by conventional method to be contaminated with *Campylobacters* and more from overnight fresh cooled chicken than the fresh frozen one. The result from PCR gave 92.0% sensitivity and 64.2% specificity comparing to 100% sensitivity and specificity set for conventional method. PCR can detect the target DNA without the presence of viable cells. PCR should detect a trace amount of DNA obtaining from low bacteria number whereas conventional method cannot detect in some cases. Therefore, the false positive of PCR was recorded high and brought down the percentage of specificity in the test. Immunoassay gave sensitivity and specificity for 96.9% and 68.8% respectively and can report only for the genus of the organisms. The cost for PCR is reasonable cheaper than immunoassay and conventional method. PCR gives the discriminate result with accuracy, consistent, simple and rapid.

The sensitivity patterns of the isolated *Campylobacters* with 8 antibiotics, *i.e*., ampicillin, amoxy-clavulanic acid, cephalothin, ciprofloxacin, erythromycin, nalidixic acid, norfloxacin and tetracycline, were identified by disk diffusion. Between August-December 2001, 259 isolated strains were found to be sensitive mostly to amoxy-clavulanic acid (>90%) and erythromycin (> 60%) whereas the response with other antibiotics was less than 40%. Many strains gave some ambiguous results on nalidixic acid, cephalothin and with hippuric acid. The application of medicinal herb may be the alternative way for decreasing the antibiotics usage in animal farm. The sensitivity of 24 plants were tetsed and 5 plants, i.e., *Alpinia galanga, Passiflora foetida, Ageratum conyzoides, Piper betel and Morinda citrifolia,* were selected for the consecutive study with the isolated organisms from chicken samples. *Piper betel* showed the strongest antibacterial activity (90%) with 179-190 isolated strains observing with inhibition zone >15 mm, the *Ageratum conyzoides* became the second (62%)

The exotoxin and endotoxin from cell associated were studied the cytotoxic effect on 2 cell lines (KATO III and Vero cells). The ED_{50} of a number of isolated toxins effected on these 2 cell lines were classified as strong (20 and 10%), medium (61 and 51%) and low (19 and 39%). These results have impact for further study in medical sciences on toxin with the coincidence between bacterial infection and severity of some diseases.

Th aim of this study was fulfilled. The duplex PCR technique used in this study has the potential for developing as diagnostic kit for *C. jejuni* and *C. coli*. The researchers can give service, including the technology transfer to the governmental and private sectors of interest for *Campylobacter* identification. This will result in the quality assurance and safety of food and meat products in Thaland.