

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2539

การตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* spp. ในเนื้อไก่สดแช่เย็น
จากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตต่าง ๆ ใน กรุงเทพมหานคร

Detection of *Campylobacter* spp. in frozen fresh
chicken meat from markets and supermarkets in
Bangkok

จรรยา สิ้นเดิมสุข และ สุวณี สุขเวชย์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และ
ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

579.3
จ167ก
ร.2

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
 ทุนอุดหนุนการวิจัย
 จาก
 งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2539

การตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* spp. ในเนื้อไก่สดแช่เย็น
 จากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตต่าง ๆ ใน กรุงเทพมหานคร

Detection of *Campylobacter* spp. in frozen fresh
 chicken meat from markets and supermarkets in
 Bangkok

จริยา สีนเดิมสุข และ สุวณี สุขเวชัย
 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และ
 ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี
 คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

๕ ๑๕๑๐

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณฝ่ายวิจัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณจิตติมา ปิตะรังสี นักวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ที่ให้เชื้อ *Campylobacter jejuni* และสุดท้ายขอขอบคุณ อาจารย์วันชาติ สุมโนจิตราภรณ์ ที่ได้ช่วยตรวจทานและช่วยพิมพ์บางส่วนของงานวิจัย

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2543



สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
รูปร่างและการก่อโรคของ <i>Campylobacter</i>	2
คุณสมบัติทางกายภาพและการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Campylobacter</i>	3
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ความมุ่งหมายและความสำคัญของการศึกษา	7
วิธีการวิจัย	9
วัสดุและอุปกรณ์	9
การทดลอง	9
1. ทดสอบวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Campylobacter</i>	9
2. การตรวจหาเชื้อ <i>Campylobacter</i> spp. จากเนื้อไก่สด	11
3. การวิเคราะห์เชื้อ <i>Campylobacter</i> spp.	13
ผลการทดลอง	16
1. ทดสอบวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Campylobacter</i>	16
2. การตรวจหาเชื้อ <i>Campylobacter</i> spp. จากเนื้อไก่สด	17
3. การวิเคราะห์เชื้อ <i>Campylobacter</i> spp.	18
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	21
บรรณานุกรม	23
ภาคผนวก media และ reagents	29

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างเนื้อไก่สดแช่เย็นจากตลาดสดและซูเปอร์มาเก็ต ในเขตกรุงเทพมหานคร ในช่วงฤดูร้อนตั้งแต่มีนาคม 2540 ถึง มิถุนายน 2542 ทำการตรวจแยกเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยวิธี membrane filter และวิธี streak plate โดยวิธี membrane filter จะพบ *Campylobacter* spp. ในส่วนต่าง ๆ ของเนื้อไก่ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบในส่วนเครื่องในไก่ (ตับและหัวใจ) 34/46 (73.9%) ปีกไก่ 23/40 (57.5%) น่องไก่ 21/38 (55.3 %) และอกไก่ 7/37 (18.9 %) เมื่อใช้วิธี streak plate เปรียบเทียบ พบ *Campylobacter* spp. ในส่วนเครื่องในไก่ 18/46 (39.1%) ปีกไก่ 11/40 (27.5%) น่องไก่ 12/38 (31.6%) และอกไก่ 3/37 (8.1%) โดยวิธี membrane filter technic จะให้ผลการหา *Campylobacter* spp. เป็นสองเท่าของวิธี streak plate technic. การวิเคราะห์หา species ของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้ 15 สายพันธุ์ พบ *Campylobacter coli* 10/15 (66.6%) *Campylobacter jejuni* 4/15 (26.6%) และพบ *Campylobacter fetus fetus* 1/15 (6.6%)

Abstract

Frozen fresh chicken meat samples were collected from markets and supermarkets in Bangkok during the summer of March 1997 - June 1999 to determine the isolation rate of *Campylobacter* spp. by membrane filter and streak plate methods. The isolation rates in different parts of chicken meat samples by membrane filter technic were 34/46 (73.9%) in viscera (liver and heart), 23/40 (57.5%) in wings, 21/38 (55.3%) in legs, and 7/37 (18.9%) in breasts. When streak plate technic was used for comparison, *Campylobacter* spp. were found in 18/46 (39.1%) of viscera, 11/40 (27.5%) of wings, 12/38 (31.6%) of legs and 3/37 (8.1%) of breasts. The membrane filter technic yields 2 fold more of *Campylobacter* spp. than the streak plate technic. The identification of 15 isolates showed that 10/15 (66.6%) were *Campylobacter coli* , 4/15 (26.6%) were *Campylobacter jejuni* and 1/15 (6.6%) were *Campylobacter fetus fetus*.

บทนำ

โรคอักเสบของกระเพาะอาหารและลำไส้ (gastroenteritis) ที่เกิดจากจุลินทรีย์นั้นมีมากมาย ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่เกิดจากโปรโตซัว , ไวรัส และแบคทีเรีย สำหรับแบคทีเรียมานี้ในอดีตที่ผ่านมาพบว่า แบคทีเรียใน Fam. Enterobacteriaceae จะเป็นกลุ่มที่พบว่าเป็นปัญหาต่อการสาธารณสุข ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เมื่อพบว่าผู้ป่วยเข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาลก็จะส่งตรวจเพื่อหาเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. เป็นสำคัญ แต่อย่างไรก็ดีในช่วงสิบปีมานี้เริ่มมีการรายงานมากขึ้นเกี่ยวกับแบคทีเรีย genus อื่นๆ นอกเหนือไปจากเชื้อที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งนับวันจะยังมีรายงานเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆของการเกิด gastroenteritis อันเนื่องมาจากเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศพัฒนาจะมีสถิติชัดเจน *Campylobacter* spp. พบครั้งแรกที่ก่อให้เกิดโรคกับคนคือปี 1940 ซึ่งพบว่ามีกระเพาะของเชื้อ *Campylobacter* spp. จากการดื่มน้ำนมที่ไม่ได้พาสเจอร์ไรซ์ จากนั้นในปี 1972 ได้มีกลุ่มนักวิจัยชาวเบลเยียมได้ทำการศึกษาจนพบว่าเชื้อที่ให้เกิดโรคที่อวัยวะนี้คือ *Campylobacter jejuni* (Brewer 1993)

รูปร่างและการก่อโรคของ *Campylobacter*

เชื้อ *Campylobacter* แต่ก่อนถูกจัดอยู่ใน Fam. Spirillaceae ปัจจุบันจัดอยู่ใน Fam. *Campylobacteraceae* ซึ่ง genus *Campylobacter* แบ่งออกได้เป็น 18 species และ subspecies (Murray et al.1995) เชื้อ *Campylobacter* มาจากภาษากรีก "Campilo" แปลว่าโค้ง และ "bacter" แปลว่าท่อน ทั้งนี้เพราะ *Campylobacter* มีรูปร่างลักษณะเป็นท่อนโค้ง คีดสีแกรมลบ แต่การคีดสีจะจางมากจนแทบมองไม่เห็น ดังนั้นในการย้อมสีแกรมจะต้องย้อมด้วยสี safranin นานกว่าปกติ 2-3 นาที จึงจะเห็นรูปร่างเซลล์ได้ ขนาดของเซลล์จะมีลักษณะพอมบางเล็กกว่าแบคทีเรียทั่วไป คือมีขนาด 0.2-0.5 μ ยาว 0.5-5 μ เซลล์มักจะเรียงเป็นสองเซลล์และจะเห็นรูปร่างคล้ายนกบินหรือเหมือนตัวอักษร S สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วย polar flagellum ที่ขั้ว โดยพบเพียง 1 เส้น อาจพบที่ขั้วใดขั้วหนึ่งหรือทั้งสองขั้วเลยก็ได้ การเคลื่อนที่ของเชื้อ *Campylobacter* จะคล้ายกับการทำงานของสว่าน (Morris and Patton 1985 ; Brewer 1993 ; Pattison et al. 1995)

จากการที่เชื้อคีดสีแกรมลบ จึงได้มีการศึกษา somatic antigens (O antigen) บนผนังเซลล์ พบว่ามีความหลากหลายเหมือนแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ตัวอย่างเช่น จากการศึกษา *C. jejuni* พบว่าประกอบด้วย somatic antigens ถึง 90 ชนิด (Murray et al. 1994) จากการศึกษาของ Owen et al. 1997 ได้ทำการแยกเชื้อ *C. jejuni* จากผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบในประเทศอังกฤษ จำนวนทั้งสิ้น 398

สายพันธุ์ ทำการศึกษา heat stable antigens พบว่ามีทั้งสิ้น 33 heat stable antigens และ serotype ที่พบมากถึง 34 % ของสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา ก็คือ heat stable antigen 1 (HS1) และ heat stable antigen 4 (HS 4)

ในการก่อให้เกิดโรคพบว่า ปริมาณเชื้อที่เข้าสู่ร่างกายและทำให้เกิดโรค (infective dose) มีจำนวนเพียง 500 เซลล์ก็สามารถทำให้เกิดอาการของโรคได้แล้ว เซลล์จะสามารถเข้าไปอยู่ใน epithelial cell ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่และถ้าร่างกายไม่สามารถกำจัดได้ก็จะทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบได้ (*Campylobacter enteritis*) Incubation period ของเชื้อ *Campylobacter* spp. ประมาณ 3-5 วัน คนไข้จะมีอาการคล้ายไข้หวัด อาเจียน มีอาการปวดท้องเป็นพักๆและตามมาด้วยอาการท้องเดิน ถ่ายอุจจาระเป็นมูกเลือด ในผู้ใหญ่อาการจะสามารถหายเองได้ภายใน 2-6 วันหรือไม่เกิน 2 สัปดาห์และจะเป็นพาหะของโรคอยู่หลายเดือน สำหรับเด็กเล็กอาจพบอุจจาระเป็นมูกเลือดโดยไม่มีอาการท้องเดิน (Pattison *et al.* 1995; Murray *et al.* 1995 ; Nester *et al.* 1995 ; CFAN 2000)

คุณสมบัติทางกายภาพและการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Campylobacter*

เชื้อ *Campylobacter* จัดเป็นเชื้อที่ต้องการสิ่งแวดล้อมที่ต่างออกไปจาก enteric pathogens ทั่วไป นั่นคือในการเลี้ยงเชื้อให้เจริญเติบโตจะเลี้ยงในบรรยากาศปกติไม่ได้ เพราะเชื้อตัวนี้ต้องการบรรยากาศแบบ microaerophilic condition นั่นคือต้องการ O_2 เล็กน้อยประมาณ 5% แต่ถ้าไม่มี O_2 เลยเชื้อก็จะอยู่ไม่ได้ ทั้งนี้เพราะในขบวนการสร้างพลังงานของ *Campylobacter* จะต้องผ่านเข้า Kleb-cycle ภายหลังจากเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโตแล้วเชื้อจะสามารถอยู่ได้ในบรรยากาศปกติ แต่จะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นาน คือจะอยู่ได้นาน 2-3 วัน นอกจากนั้นรูปร่างของเซลล์ก็จะเปลี่ยนแปลงไป มีรูปร่างกลมๆหรือรูปไข่ (coccoid shape)(Pattison *et al.* 1995; Perez-Perez and Blaser 2000) *Campylobacter* ชอบอุณหภูมิที่สูงกว่า pathogens ทั่วไป พบว่าในการแยก *Campylobacter* ควรจะใช้อุณหภูมิ $42^{\circ}C$ ซึ่งจะสามารถแยกเชื้อออกมาได้มากกว่าการเลี้ยงไว้ที่ $37^{\circ}C$ (Zanetti *et al.* 1996) สำหรับอุณหภูมิในการเก็บเชื้ออยู่ได้นานควรจะอยู่ในช่วง $4^{\circ}C$, ทั้งนี้เพราะจากการเลี้ยงเชื้อ *Campylobacter* ที่ $4^{\circ}C$, $10^{\circ}C$, $22^{\circ}C$, และ $37^{\circ}C$ พบว่า *Campylobacter* จะมีชีวิตอยู่ได้ 202 ชม., 117 ชม. , 43 ชม. และ 22 ชม ตามลำดับ (Buswell *et al.* 1998)

การแยกเชื้อ *Campylobacter* ในห้องปฏิบัติการจึงต้องเลี้ยงโดยให้อยู่ในบรรยากาศที่ประกอบด้วย O_2 5% CO_2 10% และ N_2 85% และเนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* เป็นเชื้อที่มาจากลำไส้ของคน สัตว์ต่าง ๆ ซึ่งจะมีเชื้อในลำไส้ที่เป็น normal flora มากมาย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ขึ้นจึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะช่วยยับยั้งเชื้อ normal flora เพื่อเชื้อ *Campylobacter* จะได้สามารถจะแข่งขันกับเชื้อ normal flora ตัวอื่น ๆ นอกจากนั้นยังใช้คุณสมบัติที่เชื้อ *Campylobacter* มีขนาดพอมบาง

กว่าแบคทีเรีย normal flora ในลำไส้ จึงทำการแยกโดยใช้ bacterial filter ที่มีรูขนาดเล็กประมาณ 4-6 micrometer ในการแยกเชื้อ *Campylobacter* ออกจากเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน (Sahay *et al.* 1995 ; Aspinall *et al.* 199 ; Brewer 1993) จากการที่ *Campylobacter* มีคุณสมบัติจำเพาะคือรูปร่างเป็นท่อน โค้งติดสปีแกรมลบและการเคลื่อนที่แบบการทำงานของสว่าน จะเป็นการวินิจฉัยเบื้องต้นว่าเป็น genus *Campylobacter* (Perez-perez and Blaser 2000.) เมื่อเชื้อ *Campylobacter* เจริญเติบโตบน plate จะมี 2 แบบ คือแบบหนึ่ง culture จะมีลักษณะแบนสีเทาหรือไม่มีสี เนื้อละเอียด โปร่งแสง ขอบ culture ไม่เรียบ มักจะเจริญไปตามรอย streak ไม่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว อีกชนิดจะมีลักษณะเป็นโคโลนี กลม หนูน ขอบเรียบ โคโลนีมีขนาดเล็กมากจนถึงขนาดปานกลาง เนื้อมัน โปร่งแสง ถ้าเลี้ยงในอาหารที่มีเลือดผสมอยู่พบว่าไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดง (Morris and Patton 1985 , Koneman *et al.* 1988)

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาติดตามแนวโน้มของการระบาดของโรคที่เกิดจากการกินอาหาร (food borne disease) ของ Slutsker *et al.* 1998 โดยติดตามมาเป็นเวลา 15 ปีได้พบว่าแนวโน้มของเชื้อก่อโรคจากการกินอาหารนั้นได้เปลี่ยนแปลงไปจากที่พบว่าสาเหตุของโรคเกิดจาก *Salmonella* serotype ต่างๆ มาจนปัจจุบันกลับกลายมาเป็นเชื้อตัวใหม่คือ *Campylobacter jejuni* และ *E. coli* 0157:H7 ซึ่งจากรายงานพบว่าเชื้อ *Campylobacter* spp. สามารถก่อโรค *Campylobacter* enteritis ทั้งประเทศพัฒนา กำลังพัฒนาและด้อยพัฒนา ซึ่ง *Campylobacter* จะเป็นปัญหาในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ซึ่งส่วนมากมักเกิดอาการไม่มากและอาจหายเองได้ (Germani *et al.* 1994 ; Hogue *et al.* 1994 ; Puthuchearry *et al.* 1994 ; Ramiro-Cruz *et al.* 1994 ; Lindblom *et al.* 1995 ; Sahay *et al.* 1995 ; Gedlu and Aseffa 1996 ; Figura *et al.* 1997 ; Owen *et al.* 1997 ; Barnes *et al.* 1998) species ที่มีรายงานของการเกิด enteritis มากที่สุด คือ *C. jejuni* รองลงมาคือ *C. coli* (Coker and Adefeso 1994; Figura *et al.* 1997; Musmanno *et al.* 1998) สำหรับ species อื่นที่มีรายงานการเกิด enteritis แต่ไม่บ่อยก็คือ *C. upsaliensis* , *C. sputorum* , *C. concisus* , *C. jejuni ssdoylei* (Lindblom *et al.* 1995 ; Musmanno *et al.* 1998) นอกจากนั้นมีรายงานว่า *Campylobacter* spp. อื่นๆ พบว่าให้เกิดโรคในช่องปากได้ เช่น *C. retus* ก่อโรคเยื่อหุ้มฟันอักเสบ (periodontitis) เป็นต้น: (Tanner *et al.* 1998..)

อย่างไรก็ตามในการศึกษครั้งนี้จะมุ่งเน้นที่เชื้อ *C. jejuni* เป็นสำคัญเพราะเป็นเชื้อที่พบบ่อยมากในการก่อโรคลำไส้อักเสบ จึงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุข โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กเล็ก ซึ่งจะเกิดอาการรุนแรงจนถึงกับต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ซึ่งอาการจะเริ่มจากอาการปวดกลางท้องมีอาการไข้ อาเจียน เสียท้อง ท้องเดินและพบว่าประมาณ 48 % ของเด็กที่พบอาการรุนแรง

จะถ่ายอุจจาระเป็นมูกเลือด (Hoque *et al.* 1994 ; Puthucheary *et al.* 1994 ; Barnes *et al.* 1998) และมักพบในเด็กชายมากกว่าเด็กหญิง (Puthucheary *et al.* 1994 ; Coker and Adefeso 1994)

จากการศึกษาของ Figura *et al.* 1997 ได้ศึกษาผู้ป่วยเด็กจำนวน 6403 ราย ซึ่งป่วยด้วยโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ ใน Tuscany ในประเทศอิตาลี ในช่วงปี 1981-1990 สามารถตรวจพบเชื้อที่เป็นสาเหตุ ลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ *Campylobacter* 10.8 % , *Salmonella* 8.4% , *Aeromonas* 1.4 % , *Yersinia enterocolitica* 0.3 % ส่วน *Shigella* พบน้อยมาก หรือจากการศึกษาของ Hogue *et al.* 1994 ได้ศึกษาเด็กที่มีช่วงอายุ 1-35 เดือนที่ป่วยด้วยอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงในประเทศบังกลาเทศ โดยเก็บ specimen ด้วยวิธี rectal swab จากเด็กเหล่านี้ 1207 รายพบว่าปัญหาของการเกิดท้องเดินอย่างรุนแรงนั้นมาจาก Rotavirus 26%, *Campylobacter* 26%, enterotoxigenic *E. coli* 15%, *Vibrio cholerae* 01 7%, *Vibrio* spp. 9%, *Shigella* 4% และ *Salmonella* น้อยกว่า 1%

สำหรับในสหรัฐอเมริกาที่เช่นกันพบว่าโรคลำไส้อักเสบซึ่งเกิดจาก *C. jejuni* จะพบมากเป็นอันดับสองรองจากเชื้อ *E. coli* (สายพันธุ์ ETEC) สำหรับเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. จะพบเป็นอันดับห้าและหก (Schaechter *et al.* 1993) ซึ่งในแต่ละปีจะมีรายงานว่ามีคนป่วยด้วยเชื้อ *Campylobacter* sp มากกว่า 2 ล้านคนในสหรัฐอเมริกา (Tauxe 1992)

เชื้อ *Campylobacter* spp. นอกจากจะพบว่าก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารเป็นอันดับต้นๆ แล้วก็พบว่าบางครั้งจะสามารถเกิดการระบาดโรคท้องร่วงได้ เช่น จากการดื่มน้ำที่ไม่ได้รับการดูแลจากรัฐฯ (Duke *et al.* 1996; CFSAN. 2000) น้ำนมที่ไม่ได้ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์หรือพาสเจอร์ไรซ์ไม่เพียงพอ (Morgan *et al.* 1994; Fahey *et al.* 1995) หรือกินผักสดที่พบว่ามีการปนเปื้อนกับเนื้อไก่ดิบ (MMWR 1998) สำหรับการระบาดที่น่าสนใจก็คือการระบาดกับเด็กนักเรียนในแถบ Gloucestershire พบว่ามีการระบาดของโรคลำไส้อักเสบในเด็กนักเรียนระดับประถม 8 ราย และระดับมัธยม 2 รายในเดือนพฤษภาคม 1995 และตรวจพบว่าเป็นเชื้อ *C. jejuni* ซึ่งสามารถทราบถึงสาเหตุได้ว่าเกิดมาจากนกที่ทำการเจาะปากขวณมที่ส่งมาแล้ววางไว้หน้าบ้าน ซึ่งจากการพบสาเหตุนี้ทำให้เชื่อว่าในช่วงเดือนพฤษภาคม-มิถุนายนของทุกๆปี ที่พบการเจ็บป่วยหลายพันรายที่ป่วยด้วยการติดเชื้อ *Campylobacter* ในประเทศอังกฤษและเวลส์ น่าจะเกิดจากการที่นกมาจิกปากขวณมทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* (Stuart *et al.* 1997) จากการสำรวจของ Pebody *et al.* 1997 ได้ทำการสำรวจการระบาดในระบบทางเดินอาหารเนื่องจากเชื้อ *Campylobacter* ในช่วงปี 1992-1994 .ในประเทศอังกฤษและเวลส์ ซึ่งรายงานโดย communicable disease surveillance center พบว่ามีการระบาดไม่มาก มีเพียง 21 ครั้ง และคนที่มีอาการรุนแรงจนถึงกับต้องเข้ารับรักษาในโรงพยาบาลมีเพียง 9 ราย ไม่มีรายงานว่าถึงตาย สาเหตุของการระบาดเกิดจากน้ำดื่มไม่มีคุณภาพ นมที่ไม่ได้พาสเจอร์ไรซ์หรือพาสเจอร์ไรซ์ไม่เพียงพอ รวมทั้งการกินอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะซึ่งจะเป็น

อาหารประเภทเนื้อไก่ นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าเชื้อ *Campylobacter* อาจก่อโรคอื่นๆ นอกเหนือไปจากการเกิดลำไส้อักเสบ เช่น ภาวะโลหิตเป็นพิษ (bacteremia) พบรายงานทั้งในคนที่มีสุขภาพดีและเกิดโรคแทรกซ้อนจากการป่วยด้วยโรคตับแข็ง ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยวิธีการกวดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมาก่อน species ที่พบมากที่สุดก็คือ *C. jejuni* (Pigrau *et al.* 1997 , Wang *et al.* 1998) พบภาวะครรภ์เป็นพิษทำให้มารดาและเด็กตายทำให้ต้องมีการระมัดระวังสำหรับหญิงตั้งครรภ์ที่มีการอักเสบของลำไส้จากเชื้อ *Campylobacter jejuni* (Meyer *et al.* 1997) พบเป็นสาเหตุของฝีในตับ (Brbdie 1995) พบแผลในกระเพาะอาหาร (Sahay *et al.* 1995) และที่สำคัญก็คือ *C. jejuni* และ *C. coli* ก่อให้เกิดโรค Guillain Barre Syndrome (GBS) ผู้ป่วยจะมีอาการอัมพาตอย่างเฉียบพลัน (Nachamkin 1997) จากการศึกษาผู้ป่วย GBS จำนวน 2628 ราย - 9575 ราย สามารถตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* 526 - 3830 ตามลำดับ (Buzby and Roberts 2000) หรือจากการศึกษา antibody ต่อเชื้อ *Campylobacter* ในผู้ป่วย GBS พบว่าปริมาณ antibody สูงถึง 25% (Hariharan *et al.* 1996), species ของ *Campylobacter* ที่มักเป็นสาเหตุของ GBS คือ *C. jejuni* serotype 19 เป็น antigen ที่ทนความร้อน (heat stable, HS 19) (Nishimura *et al.* 1997)

จากการที่เชื้อ *Campylobacter* spp. เป็นเชื้อที่มักพบเป็นประจำว่าเป็นสาเหตุของโรคลำไส้อักเสบ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยมากมายที่จะหาแหล่งที่อยู่ของเชื้อนี้ ซึ่งพบว่าเชื้อ *Campylobacter* จะกระจายอยู่ได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำต่างๆ บนผิวดิน เช่น แม่น้ำ ลำธาร ลำห้วย (Khalil *et al.* 1994; Arvanitidou *et al.* 1995 ; Duke *et al.* 1996) รวมทั้งตามแหล่งน้ำเสียที่ออกมาจากบ้านเรือนและจากโรงฆ่าสัตว์ (Koenraad *et al.* 1995 ; Franssen *et al.* 1996) พวกสัตว์เลี้ยงต่างๆ เช่น สุนัข แมว (Fernandez *et al.* 1994 ; Hald and Madsen 1997) สัตว์ทะเล เช่น หอย ปู ปลา (Wilson and Moore *et al.* 1996) ถึง (Tresierra-Ayala and Fernandez 1997) และพวกแมลง (Khalil *et al.* 1994) สำหรับแหล่งเชื้อที่สำคัญที่สามารถทำให้เกิดโรคในคนได้ก็คือ พวกปศุสัตว์ ทั้งนี้เพราะเชื้อ *Campylobacter* จะอยู่ได้ในลำไส้ของพวกปศุสัตว์ต่างๆ เช่น หมู วัว ควาย (Fahey *et al.* 1995 ; Ono *et al.* 1995) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกสัตว์ปีก เช่น ไก่ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดโรคในคน ซึ่งตรวจพบได้ในฟาร์มไก่ รวมทั้งนกมากมายหลายชนิด เช่น นกฮูก นกเขี้ยว นกกระจอก นกแก้ว เป็นต้น (Tresierra-Ayala *et al.* 1994 ; Fernandez *et al.* 1994 ; Tay *et al.* 1955 ; Jacobs-Reitsma 1995 ; Stern *et al.* 1995 ; Oyarzabal *et al.* 1995 ; Pearsou *et al.* 1996) นอกจากจะพบได้ในลำไส้ของปศุสัตว์แล้วยังมีรายงานพบว่าสามารถพบเชื้อนี้ได้โดยตรงจากน้ำนมวัว (Orr *et al.* 1995) เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่า *C. jejuni* และ *C. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคกับคนมีแหล่งที่มาจากปศุสัตว์ประเภทใดมากที่สุด Nielsen *et al.* 1997 ได้ทำการศึกษา serotype ของ *C. jejuni* , *C. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากอาหารเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ โดยแยกจากหมู วัว และไก่ พบว่า pattern serotype ของ *C. jejuni* และ *C. coli* ที่แยกได้

จากคนจะมีความคล้ายคลึงกัน pattern serotype ของ *C. jejuni* ที่แยกจากอาหารประเภทเนื้อไก่และเนื้อวัว ซึ่งสรุปว่าแหล่งของการเกิดโรค enteritis จาก *C. jejuni* ก็คืออาหารเนื้อไก่และเนื้อวัว Jacobs-Reitsma et al.1995 ได้ศึกษา *Campylobacter* ในฟาร์มเลี้ยงไก่ด้วยการตรวจไก่ตั้งแต่ฟักออกจากไข่โดยการตรวจไขไก่เป็นระยะๆ จนถึงเวลาที่ไก่ต้องส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ รายงานว่าไก่ที่เริ่มฟักออกมาใหม่จะยังไม่มี *Campylobacter* spp. และจะเริ่มตรวจพบเชื้อเมื่อไก่มีอายุ 3-4 สัปดาห์และตรวจพบว่าไก่มี *Campylobacter* 100% เมื่อไก่ถูกส่งเข้าไปโรงฆ่า ซึ่งการวิจัยนี้จะสอดคล้องกับการวิจัยของ Gregory et al. 1997 ได้ติดตามตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ตั้งแต่ฟักออกจากไข่รวมทั้งศึกษาสัตว์เลี้ยงที่อยู่ใกล้เคียงกับเล้าไก่อ้นั้นโดยวิธีทำ rectal swab พบว่าจะเริ่มตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* spp. เมื่อไก่มีอายุ 2-3 สัปดาห์ และจะตรวจพบ *Campylobacter* กับไก่ทุกตัวเมื่อไก่มีอายุ 42 วัน สำหรับสัตว์เลี้ยงต่างๆ ที่อยู่ใกล้บริเวณเล้าไก่จะพบภายใน 5 สัปดาห์หลังจากเริ่มตรวจพบเชื้อนี้ในไก่

สำหรับในเมืองไทยพบเชื้อ *Campylobacter* spp. ครั้งแรกในเด็กอายุต่ำกว่า 2 ขวบที่เข้าทำการรักษาที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วยโรคติดเชื้อและตรวจพบ *Campylobacter* ในกระแสเลือด ในปี 1981 โดยการรายงานของ สุวณี สุภเวชย์และคณะ ต่อมา Talor et al. 1991 ได้ทำการศึกษาเด็กไทยที่ป่วยด้วยโรคท้องร่วง 631 ราย พบว่าจะสามารถตรวจพบว่าเป็นเชื้อ *Campylobacter* spp. 93 ราย (15%) และเมื่อวิเคราะห์หา species พบว่าเป็นเชื้อ *C. jejuni* 62 ราย (10%) หรือเท่ากับ 67 % ของ *Campylobacter* spp. ส่วน *C. coli* พบ 14 ราย (2%) หรือ 15 % ของ *Campylobacter* spp. ที่เหลืออีก 17 รายจะเป็น atypical *Campylobacter* เช่น *C. upsaliensis*, *C. jejuni* doylei รวมทั้ง atypical *Campylobacter* ที่สามารถทน O_2 ได้ดี (aerotolerant)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ต้องการที่จะศึกษาถึงแหล่งแพร่กระจายของเชื้อ *Campylobacter* ในเมืองไทย โดยจะศึกษาเนื้อไก่สดที่ขายอยู่ตามตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตว่ามีโอกาสจะพบเชื้อ *Campylobacter* spp. ได้มากน้อยเพียงใด และถ้าตรวจพบ *Campylobacter* แล้ว ก็จะวิเคราะห์ว่าเป็น species อะไรบ้าง

ความมุ่งหมายความสำคัญและขอบเขตของการศึกษา

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกอาหารออกไปขายยังต่างประเทศเป็นรายใหญ่ของโลก ดังนั้นเชื้อก่อโรคที่มาจากอาหารจึงเป็นเรื่องที่ควรให้ความสนใจ ในบรรดาเชื้อโรคท้องร่วงที่พบว่าเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญตัวหนึ่งคือ *Campylobacter* ซึ่งในประเทศพัฒนา เช่น สหรัฐอเมริกาและประเทศอังกฤษจะพบสถิติของผู้ป่วยด้วยโรคท้องร่วงด้วยเชื้อ *Campylobacter* มาเป็นอันดับต้นๆ และพบมากกว่าเชื้อก่อโรคท้องร่วงที่บ้านเราให้ความสำคัญ คือ *Salmonella* และ

Shigella สำหรับประเทศกำลังพัฒนาและประเทศด้อยพัฒนาสถิติของเชื้อ *Campylobacter* จะน้อยมาก ทั้งนี้เพราะเชื้อมันเป็นเชื้อที่ต้องการการเลี้ยงเป็นพิเศษจึงจะเจริญเติบโตแต่อย่างไรก็ตามเมื่อผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาเชื้อโรคท้องร่วงในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการท้องร่วง ไม่ว่าจะเป็นประเทศกำลังพัฒนาหรือด้อยพัฒนาจะพบว่า *Campylobacter* จะเป็นเชื้อที่พบมากเป็นอันดับต้นๆ เช่นกัน

เชื้อ *Campylobacter* จากการสืบค้นเอกสารงานวิจัยพบว่าเป็นเชื้อที่มีแหล่งกำเนิดจากอาหารประเภทเนื้อไก่มากกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่น และในบรรดาอาหารสัตว์ที่ประเทศไทยส่งไปขายยังต่างประเทศพบว่าเนื้อไก่เป็นอาหารที่ส่งไปขายเป็นอันดับต้นๆของการส่งออก ดังนั้นจึงเลือกที่จะทำการวิจัยการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในอาหารไก่ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต ถ้าหากเชื้อ *Campylobacter* เป็นเชื้อที่ต้องกำหนดให้เป็นเชื้อต้องห้ามในการส่งออกของอาหาร ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ก็เพื่อ

1. ศึกษาถึงเทคนิคที่เหมาะสมที่จะใช้ในการแยกเชื้อ *Campylobacter* จากอาหารเนื้อสัตว์
2. ทำให้ทราบถึงการปนเปื้อนของ *Campylobacter* ที่ขายอยู่ในท้องตลาดว่ามีอย่างน้อยเพียงใด
3. ศึกษาว่า *Campylobacter* spp. ไດ ที่พบในอาหารเนื้อไก่สด

เพื่อให้การศึกษานี้บรรลุถึงวัตถุประสงค์ ขอบเขตของการศึกษาจะดำเนินเป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้

- ทดสอบว่าเทคนิคในการตรวจหา *Campylobacter* จากอาหารไก่ เป็นวิธีที่ไวขนาดใด โดยการทดลองใช้เชื้อ *Campylobacter* มาทดลองเลี้ยงดู แล้วหาว่าปริมาณ *Campylobacter* ที่เซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงจนเจริญเติบโต
- ทำการเก็บตัวอย่างอาหารไก่ โดยแยกประเภทเป็น ดับไก่ หัวใจไก่ น่องไก่และอกไก่ โดยเก็บตัวอย่างจากตลาดสด และซูเปอร์มาเก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร แล้วนำมาเพิ่มจำนวนเชื้อ *Campylobacter* spp. จากนั้นทำการแยกเชื้อโดยวิธี streak plate และ membrane filter technic
- เมื่อแยกเชื้อ *Campylobacter* ได้ให้ทำการวิเคราะห์ว่าเป็น species อะไร โดยศึกษา phenotypic characterization

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

- เนื้อไก่สด ซื้อมาจากตลาดสด และซูปเปอร์มาเก็ตในเขตกรุงเทพฯ
- แบคทีเรีย ใช้เชื้อ *Campylobacter jejuni* 8 สายพันธุ์ จากภาควิชาจุลชีววิทยา และ
อิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อนและสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร
- อุปกรณ์ - side arm Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml รวมทั้งเครื่องแก้วต่างๆ
 - gas generating kit : anaerobic system br 38 (Oxoid, England)
 - culture media, test media และ reagents สำหรับวิเคราะห์ *Campylobacter*
 spp.
 - ยาปฏิชีวนะ vancomycin
 trimethoprim
 amphotercin B
 sodium cefoperazone (cefobid)
 nalidixic acid disc 30 µg
 cephalothin disc 30 µg
 - anaerobic jar (E. Merck, Germany)
 - ถังก๊าซ บรรจุ O₂ 5% CO₂ 10% และ N₂ 85%
 - Incubator shaker

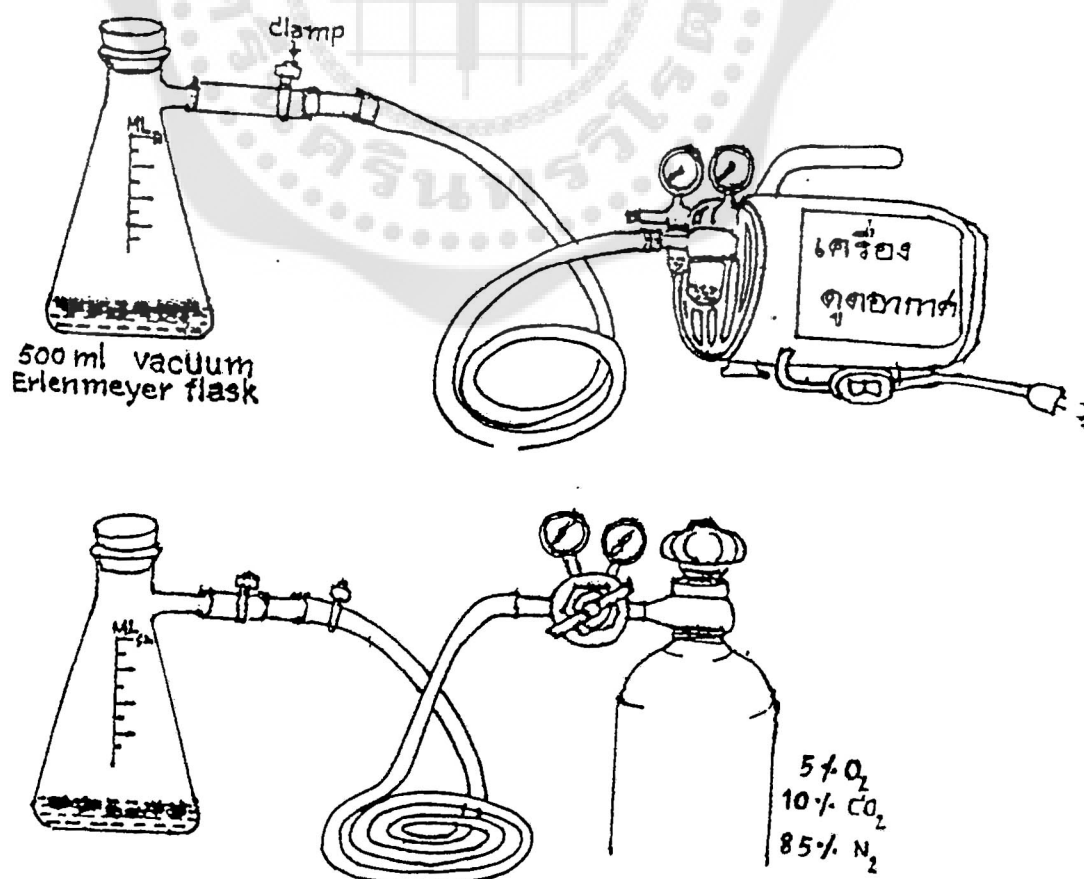
การทดลอง

1. ทดสอบวิธีในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Campylobacter*

เนื่องจาก *Campylobacter* spp. เป็นเชื้อที่ตายง่าย การเพาะเลี้ยงยุ่งยากเพราะต้องการบรรยากาศชนิด microaerophilic ในการเพาะเลี้ยงให้ขึ้นจึงจำเป็นต้องทดสอบว่าวิธีการที่ใช้สามารถเพาะเลี้ยง *Campylobacter* spp. ให้ขึ้นได้จริงหรือไม่และถ้าขึ้นจำนวนเซลล์ที่ต้องใช้ก็น้อยเพียงใด

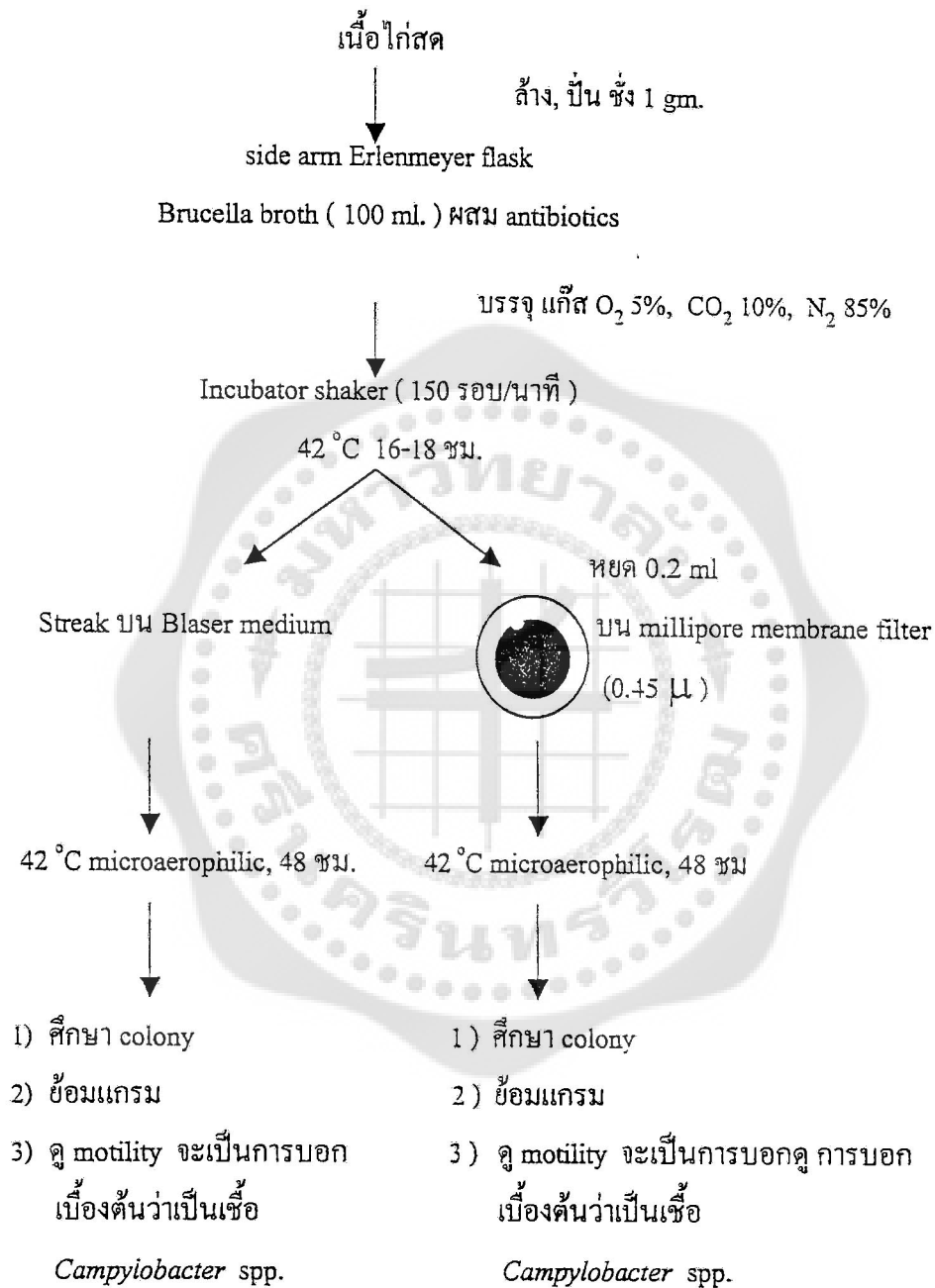
ใช้เชื้อ *C. jejuni* จำนวน 8 สายพันธุ์ มาทำการเพาะเลี้ยงใน Brucellar broth โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 °C ด้วยบรรยากาศ microaerophilic โดยใช้ gas generating kit anaerobic system br 38 (Oxoid, England) และใช้ anaerobic jar ของ (E. Merck, Germany) สามารถจุจานเพาะเลี้ยงเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ซม. ได้ 10 จาน เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำเชื้อที่เจริญมาปรับจำนวนเชื้อโดยนำมาเทียบความขุ่นให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland nephelometer แล้วนำมาเจือจางด้วย Brucella broth

ให้มี dilution 1/150 , 1/300, 1/600, 1/1200 และ 1/2400 นำเอา dilution แต่ละ dilution มาทำ plate count โดยใช้ Brucella blood agar (ก่อนจะใส่เชื้อลงไปบน plate ต้องนำ plate ไปทำให้ผิวหน้าอาหารแห้งด้วยการอบที่ 42 °C 30 นาที เพราะถ้างานเลี้ยงไม่แห้ง เชื้อจะเจริญกระจายคลุมจานเพาะเลี้ยงไม่ form เป็นโคโลนี.) ให้ทำ dilution ละ 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่ 42 °C โดยเลี้ยงในบรรยากาศ microaerophilic เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้น pipette แต่ละ dilution dilutionละ 1 ml ใส่ลงใน Brucella broth 100 ml ที่บรรจุใน side-arm Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml. แล้วทำการดูดก๊าซภายใน flask ออกพร้อมทั้งบรรจุก๊าซจากถังก๊าซที่มี O₂ 5% CO₂ 10% และ N₂ 85% โดยปล่อยก๊าซให้มีความดันเพียง 20 mmHg เท่านั้น ทำการดูดก๊าซออกและบรรจุก๊าซจากถังทำทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าบรรยากาศใน flask นั้นเป็น microaerophilic จริง ก่อนนำไปบ่มในเครื่องเขย่าให้ตรวจสอบว่าจุลินทรีย์ ปิด flask และท่อที่ใช้ในการใส่ก๊าซนั้นปิดสนิทแน่นดีแล้ว ให้นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า incubation shaker (New Brunswick Scientific) ตั้งรอบที่ 150 รอบต่อนาที ตั้งอุณหภูมิที่ 42 °C เขย่าเป็นเวลา 16-18 ชม. แล้วตรวจดูเซลล์ ด้วยวิธี wet mount technic และ Gram stain (Doyle and Roman , 1982)



2. การตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* spp. จากเนื้อไก่สด

เชื้อเนื้อไก่จากตลาดสดต่างๆและจากซุปรูปเอร์มาเก็ต ตลาดสดที่เก็บตัวอย่างไก่ได้แก่ ตลาดบางแค ตลาดคลองทวีวัฒนา(พุทธมณฑล 4) ตลาดบางกะปิ ตลาดหัวหมาก ตลาดคลองตัน ตลาดลาดพร้าว ตลาดเทเวศน์ ตลาดอโศก ตลาดเทคโนบางกะปิ สำหรับซุปรูปเอร์มาเก็ต จากเซ็นทรัล ปิ่นเกล้า ตั้งฮั่วเส็งและพาต้า ชิ้นส่วนที่วิเคราะห์คือ ออกไก่ น่องไก่ ปีกไก่ ดับไก่ และหัวใจไก่ นำมาล้างน้ำ 1 ครั้ง เาะกระดูกออกแล้วนำมาบด ชั่งเนื้อไก่ 1 กรัม ใส่ลงใน side-arm Erlenmeyer flask ที่มี Brucellar broth 100 ml ผสมด้วยยาปฏิชีวนะ sodium cefoperazone 1.5 mg, vancomycin 1 mg, trimethoprim 1.5 mg และ amphotericin B 0.2 mg บรรจุ O_2 5% CO_2 10% N_2 80% ลงใน side-arm Erlenmeyer flask วิธีบรรจุเช่นเดียวกับหัวข้อ 1 นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ตั้งอุณหภูมิ 42 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 16-18 ชม. จากนั้นนำมาทำการ isolate เชื้อ แบ่งเป็น 2 วิธี โดย direct streak plate technic บน Blaser medium (Campy-BAP) ใช้ Brucella agar เป็น base medium ผสมด้วย human blood group O 5% และใส่ยาปฏิชีวนะต่อไปนี้ vancomycin 10 mg/L, trimethoprim 5 mg/L, polymyxin B 2,500 IU/L, sodium cefoperazone 15 mg/L และ amphotericin B 2 mg/L (Koneman *et al.*, 1988) และอีกวิธีโดยการใช้ membrane filter technic โดยใช้ bacterial membrane filter ที่มีขนาดรู 0.45 micrometer ให้วางลงบน Blaser medium จากนั้น pipette เชื้อจาก side-arm Erlenmeyer flask มา 0.2ml แล้วหยดเป็นหยดเล็กกระจายให้ทั่วแผ่น membrane filter แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ยกเอา membrane filter ออก นำ plate ทั้งหมดเลี้ยงใน anaerobic jar ซึ่งใส่ gas generating kit ชนิด anaerobic system br 38 (Oxoid, England) บ่มที่ 42 °C เป็นเวลา 48 ชม. (ควรอ่านที่ 24 ชม. 48 ชม. และ 72 ชม. แต่จะเป็นการสิ้นเปลือง gas pack จึงอ่านช่วงเวลาเดียวคือ 48 ชม.) จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะน่าจะเป็น *Campylobacter* ซึ่งได้บรรยายไว้ใน cultural characteristics มาทำการย้อมแกรมเพื่อศึกษา morphology ซึ่งจะติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนโค้งพอมบาง บางครั้งเห็นการเรียงเซลล์เป็นแบบ S shape และปีกนก จากนั้นศึกษาการเคลื่อนที่แบบการทำงานของสว่านก็พอจะเป็นการบอเบื้องต้นว่าเป็น genus *Campylobacter* ให้ collect เชื้อ *Campylobacter* spp. ไว้ใน Brucella broth ที่ผสม 0.16 % agar ซึ่งสามารถเลี้ยงในบรรยากาศปกติแล้วทำการ sub-culture ทุก 2-3 วัน (เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการใช้ gas generating kit) เพื่อจะวิเคราะห์ว่าเป็น *Campylobacter* species อะไร ด้วยการศึกษาด้าน phenotypic characterization ต่อไป



(Doyle, and Roman 1982, Morris and Patton 1985, Koneman *et al.* 1988)

3. การวิเคราะห์เชื้อ *Campylobacter* spp.

ให้นำเชื้อ *Campylobacter* spp. มาเลี้ยงบน Blaser medium ในบรรยากาศ microaerophilic แล้วบ่ม 48 ชม. จากนั้นนำเชื้อมา suspen ใน Brucella broth ให้ได้เชื้อจนมีความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFaland nephelometer standard หมายเลข 1 (จะมีเชื้อ 3×10^8 cells/ml) เพื่อศึกษา phenotypic characterization ของเชื้อ *Campylobacter* ซึ่งสามารถจะแยกเชื้อนี้ออกมาได้เป็น species ให้ใช้เชื้อ 0.1 ml. ต่อหนึ่งการทดสอบ ซึ่งการทดสอบมีดังต่อไปนี้

3.1) Temperature tolerance

โดยการถ่ายเชื้อ 0.1 ml. ลงใน Brucella broth ที่ผสม 0.16 % agar จากนั้นเลี้ยงในบรรยากาศปกติที่อุณหภูมิ 5 °C, 25 °C, 37 °C (42 °C ไม่ได้ทำการทดลองเพราะเวลาเลี้ยงใช้อุณหภูมิ 42 °C) อ่านผลว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตหรือไม่ภายในระยะเวลา 7 วัน

3.2) 1% glycine tolerance

เตรียม 1 % glycine โดยใช้ Brucella broth + 0.16 % agar เป็น base medium แล้วใส่เชื้อลงไป บ่ม 37 °C ที่บรรยากาศปกติ อ่านผลภายในระยะเวลา 7 วัน ว่าเชื้อเจริญเติบโตหรือไม่

3.3) NaCl tolerance

ให้เตรียม 3.5 % NaCl ใน base medium แล้วบ่ม 37 °C ในบรรยากาศปกติ ดูการเจริญเติบโตของเชื้อภายใน 7 วัน

3.4) Glucose fermentation

เตรียม 1% glucose ใน base medium พร้อมทั้งใส่ 0.002 % phenol red เพื่อใช้เป็นตัวบอกว่า glucose ถูก ferment หรือไม่โดยดูจากสี ถ้ามีสีเหลืองเกิดขึ้นแสดงว่าสามารถ ferment glucose ได้

3.5) MacConkey agar

ใช้ MacConkey agar (BBL, USA) เตรียมเป็น slant ให้ถ่ายเชื้อ *Campylobacter* spp. ลงบนผิวหน้าอาหารแล้วเลี้ยงด้วยบรรยากาศแบบ microaerophilic บ่ม 37 °C 48 ชม. จากนั้นดูการเจริญเติบโตของเชื้อจากรอย streak

3.6) H₂S production การดูความสามารถให้ H₂S ทำ 2 วิธี

3.6.1) โดยใช้ lead acetate strip ให้ทำการถ่ายเชื้อที่เลี้ยงไว้ 48 ชม. ใส่ลงใน 0.02% L- cystein ใน base medium (Brucellar broth – 0.16% agar) แล้วห้อยแขวนแผ่น lead acetate เพื่อตรวจสอบว่ามี H₂S เกิดขึ้นหรือไม่ ถ้าแผ่น lead acetate มีสีดำแสดงว่าแบคทีเรียใช้ L- cystein แล้วให้ H₂S ออกมา

3.6.2) โดยใช้ TSI agar เตรียม TSI slant (BBL, USA.) ถ่ายเชื้อด้วยการปักลงไป ในอาหารและ streak บนผิวหน้า slant บ่มในบรรยากาศ microaerophilic 37 °C 48 ชม. อ่านผลถ้าเห็นสีดำในเนื้ออาหารแสดงว่า แบคทีเรียสามารถใช้ sodium thiosulfate ใน TSI แล้วให้ H₂S ซึ่ง H₂S จะทำปฏิกิริยากับ ferrous sulfate ที่มีอยู่ในอาหาร

3.7) Nitrate reduction test

เตรียม 1% KNO₃ ใน base medium จากนั้นถ่ายเชื้อ 0.1 ml ลงไปแล้วบ่ม 37 °C ในบรรยากาศปกติเมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน ให้ทดสอบด้วย nitrate reagent A และ B โดยใช้อย่างละ 0.25 ml. จะเห็นสีแดงเกิดขึ้นภายใน 1-2 นาที แสดงว่า nitrate ถูก reduce เป็น nitrite แต่ถ้าไม่เห็นสีแดงให้เติมผงสังกะสีลงไป ถ้ายังคงไม่เห็นสีแดงแสดงว่า NO₃ ถูก reduce แต่ถ้าเห็นสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่า NO₃ ไม่ได้ถูก reduce (ทั้งนี้เพราะผงสังกะสีสามารถ reduce NO₃⁻ ให้เป็น NO₂⁻)

3.8) Hippurate hydrolysis test

การทดสอบ rapid hippurate hydrolysis ใช้วิธีการของ Hwang and Ederer (1975) ให้เตรียม 1% sodium hippurate ด้วยน้ำกลั่น โดยบรรจุลงใน tube เล็ก 0.4ml. จากนั้นใช้เชื้อที่เลี้ยง 48 ชม. ใน Brucella blood agar โดยใช้ 1 loop ใส่ลงใน 0.4 ml. 1% sodium hippurate แล้วบ่มใน water 37°C 2 ชม. เมื่อครบกำหนดให้ค่อยๆใส่ (overlay) 3.5% ninhydrin reagent ลงไป 0.2 ml. แล้วบ่มต่อ 10 นาที ถ้า sodium hippurate

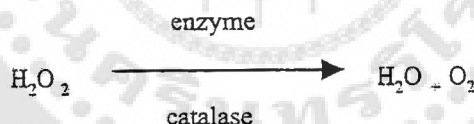
ถูก hydrolyse จะเห็นสีม่วงเข้ม ถ้าเห็นสีม่วงจางหรือไม่มีสีให้ถือว่าไม่มีการ hydrolyse sodium hippurate

3.9) Antimicrobial susceptibility testing

streak เชื้อ *Campylobacter* spp. ลงบน Brucella blood agar ซึ่งจะต้องใช้วิธี streak ที่ๆ ไปมาและ streak ด้วยกัน 3 ระบาย เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อจะขึ้นอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นใช้ sterilized forcep คีบยาปฏิชีวนะ nalidixic acid และ cephalothin disc ขนาดความเข้มข้นของ ยาปฏิชีวนะ 30 microgram ลงบน Brucella blood agar plate ที่ streak เชื้อไว้แล้ว บ่มที่ 37 °C ในบรรยากาศ microaerophilic condition ให้วัด zone ที่เกิดขึ้นจะต้องมากกว่า 19 mm และ 18 mm ตามลำดับถึงจะถือว่า sensitive ต่อยาปฏิชีวนะ nalidixic acid และ cephalothin

3.10) การทดสอบหา enzyme catalase และ oxidase

การทดสอบ enzyme catalase โดยการหยด 3% H_2O_2 ลงบน slide จากนั้นเอาเชื้อที่ เลี้ยงใน Brucella blood agar 48 ชม. มาแตะลงบนหยด H_2O_2 ถ้าเห็นฟองอากาศเกิดขึ้น แสดงว่ามี enzyme catalase ดังสมการ



การทดสอบ enzyme oxidase

ใช้กระดาษ whatman filter paper No. 1 ชุบ 1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride จากนั้นถ่ายเชื้อที่เลี้ยงไว้ 48 ชม. ใน Brucella blood agar มา 1 loop แล้ว จีดลงบนกระดาษที่ชุบน้ำยาถ้าเกิดสีม่วงภายใน 5-10 วินาทีแสดงว่ามี enzyme oxidase ซึ่ง เกิดจากการที่ oxidase enzyme ไป oxidize tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ซึ่งเป็นพวก redox dye ทำให้เห็นสีม่วงของ indophenol blue เกิดขึ้น

ผลการทดลอง

1. ทดสอบวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Campylobacter*

เนื่องจากการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในอาหารที่ขายตามตลาดสด และซูปเปอร์มาเก็ต โอกาสที่เชื้อจะตายในระหว่างการขนส่งจากโรงฆ่าไก่มาถึงตลาดและจากตลาดมาถึงผู้บริโภค ดังนั้น ถ้าจะใช้วิธีการตรวจโดยไม่ใช้เทคนิคในการเพิ่มจำนวนเชื้อ *Campylobacter* เสียก่อนโอกาสที่จะตรวจพบเชื้อคงน้อย ดังนั้นจึงใช้วิธีของ Doyle and Roman 1982 ภายหลังจากใส่เชื้อลงไปใน side-arm Erlenmeyer flask แล้วบรรจุก๊าซที่มี O_2 5% CO_2 10% และ N_2 85 % เข้าไปแทนที่บรรยากาศภายใน Flask ซึ่งเมื่อนำเอววิธีนี้มาทดลองเลี้ยงเชื้อพบว่า *Campylobacter* สามารถขึ้นได้ทุก dilution ตั้งแต่ dilution ที่ 1/150 ถึง 1/2400 ทำการตรวจสอบให้แน่ใจว่าเป็นเชื้อ *Campylobacter* โดยการย้อมแกรมและดูการเคลื่อนที่ของเซลล์และสามารถคำนวณจำนวนเซลล์ที่ใส่ลงไปเลี้ยงโดยการทำ viable cell count โดยวิธี spread plate technic บนอาหาร Blaser medium ก็จะรู้จำนวนเซลล์ในแต่ละสายพันธุ์ที่ทำการถ่ายใส่เพาะเลี้ยงใน side-arm Erlenmeyer flask ตัวอย่างเช่น *C. jejuni* สายพันธุ์ที่ 1 มีจำนวนเซลล์คือ 15.6×10^4 CFU/ml และสามารถเพาะเลี้ยงขึ้นใน flask ที่เจือจางเชื้อ 1/2400 ดังนั้นจำนวนเซลล์ที่ใส่ใน flask dilution ก็คือ $15.6 \times 10^4 / 2400 = 65$ เซลล์ จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *C. jejuni* ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ พบว่าวิธีนี้สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อขึ้นได้ตั้งแต่ 2 เซลล์ขึ้นไป และค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่สามารถขึ้นได้ด้วยเทคนิคนี้คือ 30 เซลล์ ดังตาราง 1

ตาราง 1 จำนวนเซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงขึ้นใน Brucella broth

<i>C jejuni</i> (สายพันธุ์)	จำนวน โคโลนีที่พบได้บนจานเลี้ยงเชื้อ (CFU/ml)	จำนวนเซลล์ที่น้อยที่สุดที่เลี้ยงขึ้นบน Brucella broth
1	15.6×10^4	65
2	21.6×10^3	9
3	8.6×10^4	36
4	10.8×10^4	45
5	74.4×10^3	31
6	4.8×10^4	20
7	1.8×10^3	74
8	4.8×10^3	2
		ค่าเฉลี่ย 30

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Campylobacter* spp. จากเนื้อไก่สด

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อไก่สดมาจากตลาดสดและซูเปอร์มาเก็ตพบว่า ในแต่ละครั้งของการเก็บจะตรวจไม่พบเลย หรือถ้าพบก็จะพบเป็นอัตราส่วนค่อนข้างสูง การที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะว่าเชื้อ *Campylobacter* spp. เป็นเชื้อที่ตายง่าย ดังนั้นถ้าไปเก็บในช่วงที่ไม่เหมาะสมก็จะไม่พบ ยกเว้นอยู่ในตลาดสดเดียวที่พบทุกครั้งที่เราไปเก็บ คือ ตลาดสดคลองทวีวัฒนา เนื่องจากสะดวกในการไปเก็บ เพราะอยู่ใกล้บ้านและเมื่อถามผู้ขายทำให้รู้ว่าระยะเวลาที่ผู้ขายได้เนื้อไก่สดมา จนถึงเวลาที่ไปซื้อตัวอย่างมานั้นประมาณ 4 ชม. ดังนั้นในการรายงานครั้งนี้จะคำนวณเฉพาะตัวอย่างที่เก็บแล้วสามารถตรวจพบเชื้อว่าพบเป็นจำนวนเท่าใดกับจำนวน specimen ที่เก็บ แต่ครั้งที่เก็บจะเก็บมา 12 ตัวอย่าง และแบ่งออกเป็นสาม ปีกไก่ ออกไก่ น่องไก่ และเครื่องในไก่ (หัวใจ , ตับ) ภายหลังจากการทำการเพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ I แล้วทำการ isolate เชื้อ *Campylobacter* spp. โดยวิธี streak plate technic กับ วิธี membrane filter technic ซึ่งจากการแยกเชื้อโดยใช้ membrane filter technic จะพบ *Campylobacter* spp. โดยเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยดังนี้ ส่วนของเครื่องในไก่ 73.9% ส่วนปีกไก่ 57.5% ส่วนน่องไก่ 55.3% และส่วนอกไก่พบ 18.9% แต่ถ้าทำการแยกเชื้อโดยวิธี streak plate technic จะพบ *Campylobacter* spp. ต่ำกว่าวิธี membrane filter technic ประมาณ 1:2

Campylobacter จะพบในส่วนเครื่องในไก่ 39.1 % ปีกไก่ 27.5% . น่องไก่ 31.6 % และอกไก่ 8.1% การที่พบในส่วนอกไก่อีกต่ำกว่าส่วนอื่นๆ เพราะอกไก่จะไม่มีหนังไก่หุ้มดังนั้นเมื่อนำมาล้าง เชื้อ *Campylobacter* spp. จะถูกชะล้างออกไปได้ง่ายกว่า ผลการแยกเชื้อ *Campylobacter* จากส่วนต่างๆ ของเนื้อไก่สด แสดงไว้ในตาราง 2

ตาราง 2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เชื้อที่ตรวจพบในส่วนต่างๆ ของเนื้อไก่สดโดยวิธี streak plate technic และ membrane filter technic.

เนื้อไก่สด	streak plate technic		membrane filter technic	
	จำนวน	พบเชื้อ (%)	จำนวน	พบเชื้อ (%)
เครื่องในไก่	46	18 (39.1%)	46	34 (73.9%)
ปีกไก่	40	11(27.5%)	40	23 (57.5%)
น่องไก่	38	12 (31.6%)	38	21 (55.3%)
อกไก่	37	3 (8.1%)	37	7 (18.9%)

3. การวิเคราะห์เชื้อ *Campylobacter* spp.

จากเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้ 85 สายพันธุ์ พบว่า สามารถเลี้ยงจนรอดพอที่จะมาทำการวิเคราะห์ว่าเป็น species อะไร เพียง 15 สายพันธุ์เท่านั้น ทั้งนี้เพราะระยะเวลาจากตอนแยกเชื้อจนกระทั่งมาถึงการวิเคราะห์เชื้อจะใช้เวลา 1 ปีพอดี เนื่องจากการทำงานวิจัยนี้จะใช้ช่วงเวลาปิดเทอม ในช่วงเดือนมีนาคม ถึง พฤษภาคมเท่านั้น ทำให้เชื้อ *Campylobacter* spp. ตายเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เพราะเป็นเชื้อ fastidious microorganism ต้องการบรรยากาศชนิด microaerophilic จึงจะอยู่ได้ จึงเหลือเพียง 15 สายพันธุ์เท่านั้นที่นำมาทำการวิเคราะห์หาว่าเป็น species อะไร

การวิเคราะห์ใช้ phenotypic characteristics ซึ่งจะดูจากความสามารถเจริญเติบโตบน 1% glycine, 3.5 % NaCl, ที่อุณหภูมิต่างๆ 25 °C 37 °C และ 42 °C และ MacConkey agar, ความสามารถในการเคลื่อนที่แบบการทำงานของสว่าน ความทนทานหรือไวต่อยาปฏิชีวนะ nalidixic acid , cephalothin รวมทั้งคุณสมบัติทางชีวเคมี ดัง ตารางที่ 3 ของ Hunt and Abeyta 1995

Table 3. Differential characteristics of medically important campylobacters*

Characteristic	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. fetus fetus</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>"C. upsallensis"</i>
Growth at 25°C	-	-	-	+	D	-
Growth at 35-37°C	+	+	+	+	+	+
Growth at 42°C	+	+	+	D	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
3.5% NaCl	-	-	-	-	-	-
H ₂ S, lead acetate strip	+	+	+	+	+	+
H ₂ S, TSI	-	D	-	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	-
Oxidase	+	+	+	+	+	-
MacConkey's agar	+	+	+	+	+	+
Motility (wet mount)	+	+	+	+	+	-
Growth in 1% glycine	+	+	+	+	+	+
Glucose utilization	-	-	-	-	-	-
Hippurate hydrolysis	S ⁺	S	R	R	R	S
Resistance to naladixic acid	S ⁺	S	R	R	R	S
Resistance to cephalothin	R	R	R	S ⁺	S	S

*Symbols: +, 90% or more of strains are positive; -, 90% or more of strains are negative; D, 11-89% of strains are positive; R, resistant; S, susceptible.

¹Proposed species name.

²Small amount of H₂S on fresh (<3 days) TSI slants.

³Hippurate-negative *C. jejuni* have been reported.

⁴Nalidixic acid-resistant *C. jejuni* have been reported.

⁵Cephalothin-resistant *C. fetus* subsp. *fetus* strains have been reported.

NOTE: *C. hyointestinalis* requires H₂ for vigorous growth and grows very poorly in O₂, CO₂, N₂ gas mixture. Use Campy Pak gas generating envelopes without catalyst for all incubations if analyzing samples for this species. *"C. upsallensis"* does not grow in the FDA medium due to its sensitivity to antibiotics. Please call for more information.

Chart information adapted from T.J. Barret, C.M. Patton, and G.K. Morris (1988). Lab. Med. 19:96-102.

จากการอ่านผล phenotypic characteristics ของ *Campylobacter* 15 สายพันธุ์ มาเทียบกับ ตารางที่ 3 พบว่าเป็น *C. coli* 10 สายพันธุ์ (26.6 %) *C. jejuni* 4 สายพันธุ์ (26.6 %) และ *C. fetus fetus* 1 สายพันธุ์ (6.6 %)



สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

1. ทดสอบวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Campylobacter*

Atabay และ Corry 1997 ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* spp. จากเนื้อไก่สดที่เก็บมาจากซูเปอร์มาเก็ตมาทำการแยกเชื้อโดยใช้อาหาร enrichment media ต่างๆ พบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* ทั้งนี้เพราะเชื้อนี้เป็นเชื้อที่ตายง่ายต้องการบรรยากาศแบบ microaerophilic ดังนั้นก่อนที่จะทำการแยกเชื้อควรจะต้องทำการเพิ่มจำนวนเชื้อโดยเลี้ยงในอาหารและสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม โดยใช้วิธีของ Doyle และ Roman 1982 ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ โดยใช้วิธีของ Doyle และ Roman พบว่าจะสามารถตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ได้แม้จะมีเพียง 2 เซลล์

2. การตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* spp. จากเนื้อไก่สด

จากการเก็บเนื้อไก่สดจากตลาดและซูเปอร์มาเก็ตมาตรวจพบว่าจะพบในเปอร์เซ็นต์ที่สูงในส่วนของเครื่องในไก่ (ตับ และ หัวใจ) 73.9 % ซึ่งจะสอดคล้องกับการศึกษาของ Fernandez และ Pison 1996 ที่ตรวจพบ *Campylobacter* spp. จากตับไก่พบถึง 92.9 % หรือจากการศึกษาในเนื้อไก่สดจำนวน 1853 ห่อ ที่นำมาจากประเทศเยอรมัน เดนมาร์กและฝรั่งเศส จะพบ *Campylobacter* spp. 619 ตัวอย่าง (33%) (Geihausen et al. 1996) สำหรับ Willis and Murrays 1997 ได้ตรวจหาเชื้อเฉพาะ *Campylobacter jejuni* โดยตรวจจากตลาดซูเปอร์มาเก็ตแห่งเดียว จะทำการเก็บเนื้อไก่มาตรวจทุกเดือนจนครบ 1 ปี ซึ่งตรวจพบว่า *C. jejuni* 69 % (229/300) และช่วงที่พบสูงสุดก็คือ เมษายนถึงตุลาคม จะพบสูงมากกว่า 90 % และจะพบต่ำสุดในช่วง ธันวาคม จะพบ 7% ซึ่งเป็นช่วงที่ไก่จะมีการหมุนเวียนออกขายซ้ำทำให้มีช่วงเวลาเก็บนาน ดังนั้นเชื้อ *C. jejuni* จึงตรวจไม่ค่อยพบสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* spp. ในงานวิจัยนี้จะทำช่วงมีนาคม-มิถุนายน ซึ่งเป็นช่วงหน้าร้อน จึงสามารถตรวจได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้การ isolate เชื้อโดยวิธี membrane filter technic ซึ่งจะสอดคล้องกับการศึกษาของ Aspinall et al. 1996 ที่ได้ทำการเปรียบเทียบการแยกเชื้อ *Campylobacter upsaliensis* โดยใช้ selective media ชนิด CCDA (charcoal cefazolin sodium desoxycholate agar) , ชนิด CAT (blood free charcoal - base agar ผสม cefoperazone, amphotericin, teicoplanin) เทียบกับวิธี membrane filter technic พบเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ 29 % , 84% และ 90 % ตามลำดับ สำหรับ Musmanno et al.... 1998 ได้ใช้ membrane filter technic พบว่าสามารถตรวจพบ unusual *Campylobacter* เพิ่มขึ้น 20% ของ *Campylobacter*

ทั้งหมดที่แยกได้ ดังนั้นวิธี membrane filter technic จึงเหมาะในการแยกเชื้อ *Campylobacter* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง species ที่ไม่ค่อยพบบ่อยๆ

3. การวิเคราะห์เชื้อ *Campylobacter* spp.

จากการวิเคราะห์หา species ของ *Campylobacter* พบว่า *C. coli* พบมากที่สุด 66.6%, *C. jejuni* 26.6% และ *C. fetus fetus* 6.6% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fernandez และ Pison 1996 :ซึ่งตรวจแยก species *Campylobacter* จากตับไก่ พบ *C. coli* 78.6 % และ *C. jejuni* 21.4%

สำหรับการวิเคราะห์นี้พบว่าการทดสอบความไวและดื้อยาปฏิชีวนะ nalidixic acid และ cephalothin ไม่เป็นไปตามตาราง 3 ของ Hunt and Abeyta 1995 พบ *C. coli* ดื้อยา nalidixic acid 100% และ *C. jejuni* ดื้อยา nalidixic acid 75% ซึ่งคุณสมบัติการดื้อยานี้ Koenraad *et al.* 1995 ได้ทำการแยกเชื้อ *Campylobacter* spp. จากแหล่งน้ำเสียของโรงงานฆ่าไก่และโรงงานบำบัดน้ำเสีย จำนวน 209 สายพันธุ์ พบว่าดื้อยาปฏิชีวนะ nalidixic acid disc ถึง 50% (เชื้อ *C. coli* และ *C. jejuni* จะเป็นเชื้อส่วนใหญ่ที่พบในสิ่งแวดล้อมและเคยไวต่อยาปฏิชีวนะ nalidixic acid)

Koenraad *et al.* สรุปว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ nalidixic acid เพื่อใช้ในการจัดจำแนก species โดยการแนะนำของ National Committee Clinical Laboratory Standard (NCCLS) ไม่สามารถจะใช้ได้อีกต่อไป ซึ่งการวิเคราะห์ species ครั้งนี้จึงไม่ได้ใช้การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ nalidixic acid ด้วยเช่นกัน

จากการที่ไก่เป็นแหล่งสำคัญของการเกิดโรค *Campylobacter enteritis* จึงได้มีการวิจัยที่จะลดปริมาณของเชื้อ *C. jejuni* ที่ออกมาจากลำไส้ไก่ โดยการสร้างภูมิคุ้มกันเมื่อไก่เริ่มฟักเป็นเป็นตัว โดยฉีด killed *C. jejuni* vaccine พบว่าเมื่อทำการตรวจหาเชื้อภายหลังการสร้างภูมิคุ้มกันแล้วจำนวน *C. jejuni* ที่ตรวจจากซีไก่อลดลงไป 2 % (Widders *et al.* 1996) หรือจากการทดลองของ Morishita *et al.* 1997 ให้ไก่ได้กินอาหารที่ผสม probiotics โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* กับ *Streptococcus faecium* เป็นเวลา 1-3 วัน แล้วตรวจหาเชื้อ *C. jejuni* จากซีไก่อ พบว่าจำนวนเชื้อจะลดลงไป 70%

บรรณานุกรม

- Arvanitidou, M., G. A. Stathopoulos, T. C. Constantinidis, and V. Katsouyannopoulos. 1995. The occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. in river and lake waters. *Microbiol. Res.* 150(2), 153-8.
- Aspinall, S. T., D. R. Wareing, P. G. Hayward, and D. N. Hutchinson. 1996. A comparison of a new campylobacter selective medium (CAT) with membrane filtration for the isolation of thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 30(6), 645-50.
- Atabay, H.I. and J.E. Corry. 1997. The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 83(5), 619-26.
- Barnes, G. L., E. Uren, K. B. Stevens, and R. F. Bishop. 1998. Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993. *J. Clin. Microbiol.* 36(1), 133-8.
- Brewer S. 1993. *Campylobacter jejuni*. <http://www.agen.url.edu/~foodsaf/11016.html>.
- Brmboic, B. 1995. Multiple abscesses of the liver caused by *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Gastroenterol.* 20(4), 307-9.
- Buswell, C. M., Y. M. Herlihy, L. M. Lawrence, J. T. McGuigan, P. D. Marsh, C. W. Keevil, and S. A. Leach. 1998. Extended survival and persistence of *Campylobacter spp.* in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2), 733-41.
- Buzby J. C. and T. Roberts. 2000. Estimated annual coats of *Campylobacter* associated Guillain-Barre Syndrome. <http://151.121.66.126/epubs/pdf/aer756/>
- Center Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). 2000. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap4.html>.
- Coker, A. O., and A. O. Adefeso. 1994. The changing patterns of *Campylobacter jejuni/ coli* in Lagos, Nigeria after ten years. *East. Afr. Med. J.* 71(7), 437-40.
- Doyle, M. P. and D. J. Roman. 1982. Recovery of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from inoculated foods by selectiver enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1343-1353.

- Duke, L. A., A. S. Breathnach, D. R. Jenkins, B. A. Harkis, and A. W. Codd. 1996. A mixed outbreak of cryptosporidium and campylobacter infection associated with a private water supply. *Epidemiol. Infect.* 116(3), 303-8.
- Fahey, T., D. Morgan, C. Gunneburg, G. K. Adak, F. Majid, and E. Kaczmarek. 1995. An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis associated with failed milk pasteurisation. *J. Infect.* 31(2), 137-43.
- Fernandez, H. and V. Pison. 1996. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. *Int. J. Food. Microbiol.* 29(1), 75-80
- Fernandez, H., K. Kahler, R. Salazar, and M. A. Rios. 1994. Prevalence of thermotolerant species of *Campylobacter* and their biotypes in children and domestic birds and dogs in southern Chile. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 36(5), 433-6.
- Figura, N., P. Guglielmetti, A. Zanchi, R. Signori, A. Rossolini, H. Lior, M. Russi, and R. A. Musmanno. 1997. Species, biotype and serogroup of *Campylobacter* spp. isolated from children with diarrhoea over a ten-year period. *New. Microbiol.* 20(4), 303-10.
- Fransen, N. G., A. M. van-den-Elzen, B. A. Urlings, and P. G. Bijker. 1996. Pathogenic micro-organisms in slaughterhouse sludge- a survey. *Int. J. Food. Microbiol.* 33(2-3), 245-56.
- Gedlu, E., and A. Aseffa. 1996. *Campylobacter* enteritis among children in north-west Ethiopia: a 1-year prospective study. *Ann. Trop. Paediatr.* 16(3), 207-12.
- Geihausen, B., H. Schutt Gerowitt, S. Aleksic, R. Koenen, G. Mauff, and G. Pulverer. 1996. *Campylobacter* and *Salmonella* contaminating fresh chicken meat. *Zentralbl. Bakteriol.* 284(2-3), 241-5.
- Germani, Y., M. Morillon, E. Begaud, H. Dubourdieu, R. Costa, and J. Thevenon. 1994. *J. Clin. Microbiol.* 32(6), 1532-6.
- Gregory, E., H. Barnhart, D. W. Dreesen, N. J. Stern, and J. L. Corn. 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence. *Avian. Dis.* 41(4), 890-8.
- Hald, B. and M. Madsen. 1997. Healthy puppies and kittens as carriers of *Campylobacter* spp., with special reference to *Campylobacter upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 35(12), 3351-2.
- Hariharan, H., K. Naseema, C. Kumaran, J. Shanmugam, M. D. Nair, and K. Radhakrishnan. 1996. Detection of *Campylobacter jejuni* *C. coli* infection in patients with Guillain-Barre syndrome by serology and culture. *New. Microbiol.* 19(3), 267-71.

- Hoque, S. S., A. S. Faruque, D. Mahalanabis, and A. Hasnat. 1994. Infectious agents causing acute watery diarrhoea in infants and young children in Bangladesh and their public health implications. *J. Trop. Pediatr.* 40(6), 351-4.
- Hunt, J. M. 1995. *Campylobacter*. In: FDA. Bacteriological analytical manual. eighth ed. AOAC International. Arlington.
- Hwang, M. N. and G. M. Ederner. 1975. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 114-115.
- Jacobs-Reitsma, W. F., A. W. van de Giessen, N. M. Bolder, and R. W. Mulder. 1995. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol. Infect.* 114(3), 413-21.
- Khalil, K., G. B. Lindblom, K. Mazhar, and B. Kaijser. 1994. Flies and water as reservoirs for bacterial enteropathogens in urban and rural areas in and around Lahore, Pakistan. *Epidemiol. Infect.* 113(3), 435-44.
- Koenraad, P. M., R. Ayling, W. C. Hazeleger, F. M. Rombouts, and D. G. Newell. 1995. The speciation and subtyping of campylobacter isolates from sewage plants and waste from a connected poultry abattoir using molecular techniques. *Epidemiol. Infect.* 115(3), 485-94.
- Koenraad, P. M., W. F. Jacobs Reitsma, T. Van. Der Laan., R. R. Beumer, and F. M. Rombouts. 1995. Antibiotic susceptibility of campylobacter isolates from sewage and poultry abattoir drain water. *Epidemiol. Infect.* 115(3), 475-83.
- Koneman, E. W., S. D. Allen, V. R. Dowell, W. M. Jands, H. M. Sommers, and W. C. Winn. 1988. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. third ed. Lippincott Co. Philadelphia.
- Lindblom, G. B., C. Ahren, J. Chagalucha, R. Gabone, B. Kaijser, L. A. Nilsson. E. Sjogren, A. M. Svennerholm, and M. Temu. 1995. *Campylobacter jejuni* coli and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in faeces from children and adults in Tanzania. *Scand. J. Infect. Dis.* 27(6), 589-93.
- Lindblom, G. B., E. Sjogren, J. Hansson Westerberg, and B. Kaijser. 1995. *Campylobacter upsaliensis*, *C. sputorum sputorum* and *C. Concisus* as common causes of diarrhoea in Swedish children. *Scand. J. Infect. Dis.* 27(2), 187-8.
- Mahol, C. R., and G. Manuselis 1995. Text book of diagnostic microbiology. W. B. Saunders company, Philadelphia.
- Meyer, A., T. Stallmach, D. Goldenberger, and M. Altwegg. 1997. Lethal maternal sepsis caused by *Campylobacter jejuni*: pathogen preserved in placenta and identified by molecular methods. *Mod. Pathol.* 10(12), 1253-6.

- MMWR. Morb. 1998. Outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with cross-contamination of food—Oklahoma. Mortal Wkly. Rep. 47(7), 129-31.
- Morgan, D., C. Gunneberg, D. Gunnell, T. D. Healing, S. Lamerton, N. Soltanpoor, D. A. Lewis, and D. G. White. 1994. An outbreak of *Campylobacter* infection associated with the consumption of unpasteurised milk at a large festival in England. Eur. J. Epidemiol. 10(5), 581-5.
- Morishita, T. Y., P. P. Aye, B. S. Harr, C. W. Cobb, and J. R. Clifford. 1997. Evaluation of an avian-specific to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. Avian. Dis. 41(4), 850-5.
- Morris, G. K. and C. M. Patton. 1985. *Campylobacter*. In: Lennette, E. H. (ed.) Manual of clinical microbiology. fourth ed. American society for microbiology. Washington.
- Murray, P. R., G. S. Kobayashi, M. A. Pfaller, and K. S. Rosenthal. 1994. Medical microbiology. second edition. Wolf International Edition Published. London.
- Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover. 1995. Manual of clinical microbiology. sixth edition. American society for microbiology. Washington D. C.
- Musmanno, R. A., M. Russi, N. Figura, P. Guglielmetti, A. Zanchi, R. Signori, and A. Rossolini. 1998. Unusual species of campylobacter isolated in the Siena Tuscany area, Italy. New Microbiol. 21 (1), 15-22.
- Nachamkin, I. 1997. Microbiologic approaches for studying *Campylobacter* species in patients with Guillain-Barre syndrome. J. Infect. Dis. 176 suppl. 2, S106-14.
- Nester, E. W., C. E. Roberts, and M. T. Nester. 1995. Microbiology: a human perspective. Wm. C. Brown Publishers. IA.
- Nielsen, E. M., J. Engberg, and M. Madsen. 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 19(1), 47-56.
- Nishimura, M., M. Nukina, S. Kuroki, H. Obayashi, M. Ohta, J. J. Ma, T. Saida, and T. Uchiyama. 1997. Characterization of *Campylobacter jejuni* isolates from patients with Guillain-Barre syndrome. J. Neuro. Sci. 153(1), 91-9.
- Ono, K., H. Masaki, and Y. Tokumaru. 1995. Isolation of *Campylobacter* spp. from slaughtered cattle and swine on blood-free selective medium. J. Vet. Med. Sci. 57(6), 1085-7.
- Orr, K. E., N. F. Lightfoot, P. R. Sisson, B. A. Harkis, J. L. Tweddle, P. Boyd, A. Carroll, C.J. Jackson, D. R. Wareing, and R. Freeman. 1995. Direct milk excretion of *Campylobacter jejuni* in a dairy cow causing cases of human enteritis. Epidemiol. Infect. 114(1), 15-24.

- Owen, R. J., E. Slater, D. Telford, T. Donovan, and M. Barnham. 1997. Subtypes of *Campylobacter jejuni* from sporadic cases of diarrhoeal disease at different locations in England are highly diverse. *Eur. J. Epidemiol.* 13(7), 837-40.
- Oyarzabal, O. A., D. E. Conner, and F. J. Hoerr. 1995. Incidence of campylobacters in the intestine of avian species in Alabama. *Avian. Dis.* 39(1), 147-51.
- Pattison, J. R., R. N. Gruneberg, J. Holton, G. L. Ridgway, G. Scott and A. P. R. Wilson. 1995. A practical guide to clinical bacteriology. John Willey and Sons Ltd. London.
- Pearson, A. D., M. H. Greenwood, R. K. Feltham, T. D. Healing, J. Donaldson, D. M. Jones, and R. R. Colwell. 1996. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(12), 4614-20.
- Pebody, R.G., M.J. Ryan, P.G. Wall. 1997. Outbreaks of campylobacter infection: rare events for a common pathogen. *Commun. Dis. Rep. CDR. Rev.* 7(3), R33-7.
- Perez-Perez G. I. and M. I. Blaser. 2000. *Campylobacter* and *Helicobacter*. <http://www.md.huji.ac.il/microbiology/book/ch023.htm>.
- Pigrau, C., R. Bartolome, B. Almirante, A. M. Planes, J. Gavalda, and A. Pahissa. 1997. Bacteremia due to *Campylobacter* species: clinical findings and antimicrobial susceptibility patterns. *Clin. Infect. Dis.* 25(6), 1414-20.
- Puthucheary, S. D., N. Parasakthi, S. T. Liew, and Y. W. Chee. 1994. *Campylobacter enteritis* in children: clinical and laboratory finding in 137 cases. *Singapore. Med. J.* 35(5), 453-6.
- Ramino-Cruz, J., F. Cano, A. V. Bartlett, and H. Mendez. 1994. Infection, diarrhea, and dysentery caused by *Shigella* species and *Campylobacter jejuni* among Guatemalan rural children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13(3), 216-23.
- Sahay, P., A. P. West, D. Birkenhead, and P. M. Hawkey. 1995. *Campylobacter jejuni* in the stomach. *J. Med. Microbiol.* 43(1), 75-7.
- Schaechter, M., G. Medoff, and B. E. Eisenstein. 1993. Mechanism of microbial disease. second edition. William and Wilkin. Maryland.
- Slutsker, L., S. F. Altekruze, and D. L. Swerdlow. 1998. Foodborne diseases. Emerging pathogens and trends. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 12(1), 199-216.
- Stern, N. J., M. R. Clavero, J. S. Bailey, N. A. Cox, and M. C. Robach. 1995. *Campylobacter* spp. in broilers on the farm and after transport. *Poult. Sci.* 74(6), 937-41.

- Stuart, J., F. Sufi., C. McNulty, and P. Park. 1997. Outbreak of *Campylobacter* enteritis in a residential school associated with bird pecked bottle tops. *Commun. Dis. Rep. CDR. Rev.* 7(3), R38-40.
- Supavej, S., U. Lexomboon, and S. Simasathien. 1981. *Campylobacter* enteritis in Thai children: a preliminary study. *J. Parasit. Trop. Med. Assoc. Thai.* 8, 14-17.
- Talor, D. V., J. A. Kiehlbauch, W. Tee, Ch. Pitarangsi, and P. Echeverria. 1991. Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea. *J. Inf. Dis.* 163:1062-1067.
- Tanner, A., M. F. Maiden, P. J. Macuch, L. L. Murray, and Jr R. L. Kent. 1998. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 25(2), 85-98.
- Tauxe, R. V. 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in United States and other industrialized nations. In: Nachamkin L., M. T. Braser, and L. S. Tompkins (e.d.), *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. American society for microbiology. Washington D.C.
- Tay, S. T., S. D. Puthucheary, S. Devi, and I. Kautner. 1995. Characterisation of *Campylobacters* from Malaysia. *Singapore. Med. J.* 36(3), 282-4.
- Tresierra-Ayala A., H. Fernandez. 1997. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* species in domestic and wild monkeys from Peru. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 44(1), 61-4.
- Tresierra-Ayala A., M. E. Bendayan, A. Bernuy, G. Pereyra, and H. Fernandez. 1994. Chicken as potential contamination source of *Campylobacter lari* in Iquitos, Peru. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 36(6), 497-9.
- Widders, P. R., R. Perry, W. I. Muir, A. J. Husband, and K. A. Long. 1996. Immunisation of chickens to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*. *Br. Poult. Sci.* 37(4), 765-78.
- Willis, W. L., and C. Murray. 1997. *Campylobacter jejuni* seasonal recovery observations of retail market broilers. *Poult. Sci.* 76(2), 314-7.
- Wilson, I. G., and J. E. Moore. 1996. Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. *Epidemiol. Infect.* 116(2), 147-53.
- Zanetti, F., O. Varoli, S. Stampi, and G. De Luca. 1996. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 33(2-3), 315-21.

ภาคผนวก media และ reagents

Brucella blood agar

Brucella agar ประกอบด้วย

peptone จาก meat	10.0	gm
peptone จาก casein	10.0	gm
yeast extract	2.0	gm.
D+glucose	1.0	gm.
NaCl	5.0	gm.
Agar	13.0	gm.

เมื่อเตรียมเป็นสารละลายแล้วให้เข้า sterile ใช้ 121°C 15 นาที เมื่อจะเท plate ให้ผสมเลือดกลุ่ม O ให้เลือดมีความเข้มข้น 5 %

Brucella broth ผสม 0.16 % agar

Brucella broth มีส่วนประกอบของอาหารเหมือนกับ Brucella agar แต่ไม่มี agar เมื่อเตรียมแล้วให้ผสม agar ให้ agar มีความเข้มข้น 0.16% ใช้เป็น base medium ในการผสมกับสารอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อ เช่น 1% glucose, 1% glycine, 0.02% L-cystein, 3.5% NaCl, 1% KNO_3

MacConkey agar

peptone	17.0	gm.
Proteose peptone	3.0	gm.
lactose	10.0	gm.
bile salt	1.5	gm.
NaCl	5.0	gm.
agar	13.5	gm.
neutral red	0.03	gm
crystal violet	0.001	gm.
D.W.	1000	ml
pH	6.8	

Triple sugar iron agar (TSI)

beef extract	3.0	gm.
yeast extract	3.0	gm.
peptone	15.0	gm.
proteon peptone	5.0	gm.
lactose	10.0	gm.
sucrose	1.0	gm.
dextrose	1.0	gm.
fenous sulfate	0.2	gm.
NaCl	5.0	gm.
sodium thiosulfate	0.3	gm.
agar	12.0	gm.
D.W.	1000	ml.
PH 7.4		

TSI อาหารนี้จะใช้ในการทดสอบ H_2S ให้เตรียมเป็น slant และให้ใช้หมดใน 1 อาทิตย์

Nalidixic acid disc

nalidixic acid disc (BBL, Cockeysville, USA) มียาปฏิชีวนะอยู่ $30 \mu g/disc$ เก็บไว้ในตู้เย็น ($4^{\circ}C$)

Cephalothin disc

Cephalothin disc ของ BBL Cockeysville, USA มีความเข้มข้น $30 \mu g/disc$ เก็บไว้ในตู้เย็น ($4^{\circ}C$)

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

ยาปฏิชีวนะเหล่านี้เป็นพวกยาฉีดเพื่อใช้รักษาผู้ป่วย ซึ่งยาปฏิชีวนะที่ใช้คือ Vancomycin , trimethoprim, amphotericin B และ sodium cefoperazone (มีชื่อทางการค้าว่า cefobid) ให้นำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide จนยาปฏิชีวนะละลายจนหมด เก็บไว้ในตู้เย็นที่ $4^{\circ}C$

1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride

N'N'N'N'- tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (BDH, England)

1 gm.

น้ำกลั่น

100 ml.

ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการทดสอบ

1% sodium hippurate

sodium hippurate (sigma, St. Louis; USA) 1 ml.

น้ำกลั่น

100 ml

ให้ใส่ 0.4 ml. ในหลอดจกเกลียวขนาดเล็กแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น (-20 °C)

3.5% ninhydrin reagent

ninhydrin (sigma, St. Louis; USA) 0.35 gm

acetone 5.0 ml.

Butanol 5.0 ml.

ใช้ acetone และ butanol ผสมกันจากนั้นผสม ninhydrin เขย่าให้เข้ากัน ให้เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการทดสอบ

3% H₂O₂

hydrogen peroxide 30% (E.Merck, Germany) 10 ml.

น้ำกลั่น

90 ml.

ให้เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C

Nitrate reagents

solution A

sulfanilic acid 0.8 ml.

5N. acetic acid 100 ml.

solution B

dimethyl- α - naphthylamine 0.6 ml.

5N. acetic acid 100 ml.

Lead acetate strip

ตัดกระดาษกรอง Whatman no. ให้เป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าให้มีขนาดประมาณ 1x4 ซม. จากนั้นนำไปชุบกับ lead acetate ที่อิ่มตัวโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย อบให้แห้งเก็บไว้ในขวดปิดสนิท เก็บในตู้เย็น 4 °C

