รายงานการวิจัย

เรื่อง

การตรวจแยกชนิดเชื้อ *Campylobacter* ที่พบในเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

Identification of Species of *Campylobacter* Isolated from Pork and Chicken using Polymerase Chain Reaction Technique

โดย

ภาวิน ผดุงทศ
ดวงพร พิชผล
ณัฐวุฒิ สถิตเมธี
ทองกร มีแย้ม

สาขาวิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เสนอต่อโครงการงานวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2545
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ร่วมวิจัยขอขอบคุณ

- โครงการงานวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2546 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- คณาจารย์ และ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การตรวจแยกชนิดเชื้อ *Campylobacter* ที่พบในเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ภาวิน ผดุงทศ, ดวงพร พิชฌล, ณัฐวุฒิ สถิตเมธี, ทองกร มีแย้ม
สาขาวิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจแยกชนิดของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จากเนื้อสุกร และเนื้อไก่ที่จำหน่ายในตลาดสดในเขตจังหวัดเชียงใหม่ด้วยเทคนิค Multiplex PCR จำนวนเชื้อ *Campylobacter* จากเนื้อสุกร และเนื้อไก่ที่ใช้ในการศึกษาเท่ากับ 10 และ 29 ตัวอย่างตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *C.coli* เป็น *Campylobacter* ที่พบเป็นส่วนใหญ่ทั้งในเนื้อสุกร (60%) และเนื้อไก่ (72.14%) พบเชื้อ *C.jejuni* ในเนื้อไก่จำนวน 5 ตัวอย่าง (17.24%) แต่ไม่พบเชื้อ *C.jejuni* ในเนื้อสุกรเลย ผลการศึกษาชนิดของเชื้อ *Campylobacter* ที่พบในตลาดสดครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่โรงฆ่าสุกร ฟาร์มสุกร และโรงฆ่าไก่ซึ่งพบเชื้อ *C.coli* เป็นส่วนใหญ่ ส่วนที่ฟาร์มไก่พบ *C.jejuni* มากที่สุด ในอนาคตควรมีการศึกษาความเสี่ยงของการถ่ายทอดเชื้อ *Campylobacter* จากสัตว์สู่ผู้บริโภคในประเทศไทยต่อไป

Identification of Species of *Campylobacter* Isolated from Pork and Chicken using Polymerase Chain Reaction Technique

Pawin Padungtod, Duangporn Pichpol, Nuttawooti Sthitmatee, Tongkorn Meeyam

Veterinary Public Health Section, the Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

Abstract

A multiplex PCR assay was used to determine the specie of *Campylobacter* isolated from chicken and pork samples collected from fresh market in Chiang Mai area. A total of 10 and 29 *Campylobacter* isolates from pork and chicken were processed. Results showed that *C.coli* was the predominant species of *Campylobacter* in both pork (60%) and chicken (72.14%). *C.jejuni* was found in pork, which was similar to what was observed at pig farm and both pig and chicken slaughterhouse in northern Thailand. However, *C.jejuni* was more frequently isolated from chicken at the farms. Further study should be conducted to determine the risk of *Campylobacter* transmission from food animal to consumer in Thailand.

บทนำ

เชื้อ *Campylobacter spp.* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอ็อกซิเจนต่ำ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบทั้งในประเทศที่ พัฒนาแล้วและประเทศที่กำลังพัฒนา (Nachamkin,1999) โดยเฉพาะในประเทศพัฒนาแล้วเช่นสหรัฐอเมริกา เชื้อ *Campylobacter* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่มีอุบัติการณ์ก่อโรคสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิดอื่น (Acheson,2001) เช่น *Shigella, E,coli, Salmonella* และ *Listeria* ในประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น ประเทศไทย เชื้อ *Campylobacter spp.* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค ในเด็กแรกเกิดช่วงอายุ 1-4 ปี เป็นส่วนใหญ่ สาเหตุของการติดเชื้อ *Campylobacter spp.* นั้น ในต่าง ประเทศ พบว่ามักเกิดจากการบริโภคเนื้อไก่ (Deming, et al.,1987) หรือนมสด (Kalman, et al.,2000) และมีรายงานการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter*ในอาหารหลายชนิด สำหรับในประเทศไทยก็มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* ในอาหารที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด โดยมีรายงานความชุกระหว่าง 11-12 % (Rasrinual, et al.,1988)

เชื้อ *Campylobacter spp.* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถอาศัยอยู่ในสัตว์บริโภคหลายชนิดโดยไม่ทำให้เกิดโรคหรือความผิดปกติแต่อย่างใด (Garcia, et al.,1983) โดยเฉพาะในสุกรและไก่ซึ่งเป็นแหล่งของเชื้อ *Campylobacter spp.* มีการตรวจพบเชื้อ *Campylobacter jejuni* และ *Campylobacter coli* ซึ่งเป็นเชื้อ *Campylobacter* ที่ก่อให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบสูงถึง 99% ของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* ทั้งหมด (Nachamkin, et al.,2000) เชื้อ *Campylobacter* ทั้งสองชนิดนี้สามารถเจริญ ได้ดีในอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จึงสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างมาก หากมีการปนเปื้อนในเนื้อสุกร หรือเนื้อไก่ที่จำหน่ายในตลาดสดในประเทศไทยซึ่งไม่มีการควบคุมอุณหภูมิของการเก็บรักษาเนื้อ จากการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทยพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter spp.* ในเนื้อสุกร และไก่ ระหว่าง 40-60% อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานการศึกษาทางระบาดวิทยาของการแพร่กระจายของเชื้อ *Campyolobacter* จากฟาร์มผู้ผลิตสุกรและไก่ ผ่านโรงฆ่าสัตว์ ตลาดสด ที่จำหน่ายเนื้อสัตว์มายังผู้บริโภคซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่มีความจำเป็น สำหรับการประเมินความเสี่ยงของผู้บริโภคที่จะได้รับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิดนี้จากการ บริโภคเนื้อสุกร และไก่

ปัจจุบันได้มีรายงานการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

ซึ่งสามารถประยุกต์ ใช้ทั้งในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างชนิดต่างๆ (Lawson, et al.,1998) การตรวจแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย (Padungtod, et al.,2002) และการเปรียบเทียบลายพิมพ์ของสารพันธุกรรม (Hanninen, et al.,1998, Lind, et al.,1996)ซึ่งการประยุกต์ใช้เทคนิคเหล่านี้ยังผลให้ได้ข้อมูล ที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางระบาดวิทยาอย่างยิ่ง

จากการศึกษาวิจัยในต่างประเทศได้มีรายงานการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา ในการแยก ชนิดของเชื้อ *Campylobacter spp.* หลายรายงาน (Fermer and Engvall,1999, On,1998, Wang, et al.,2002)ซึ่งแต่ละกระบวนที่มีรายงานก็มีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกันไป สำหรับโครงการวิจัยในครั้งนี้ จะใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการแยก species ของเชื้อ *Campylobacter* ที่ได้มีรายงานในปีที่ผ่านมา (Wang, et al.,2002)ซึ่งมีข้อดี คือ สามารถแยก species ของเชื้อ *Campylobacter* ชนิดที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงซึ่งเป็นชนิดที่ก่อโรคในคนได้ทุก species ในกระบวนการเพียงขั้นตอนเดียวซึ่งจะช่วยให้ประหยัดสารเคมี และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ นอกจากนี้ยัง สามารถใช้เซลล์แบคทีเรียทั้งเซลล์ในประบวนการตรวจ ซึ่งเป็นการลดขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม ลงอีกด้วย

ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2543 สาขาวิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้ดำเนินโครงการวิจัยร่วมกับ Population Medicine Center, Michigan State University, ประเทศสหรัฐอเมริกา ในหัวข้อ " ระบาดวิทยา และความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ในอุตสาหกรรม การเลี้ยงสุกร และไก่ ในภาคเหนือของประเทศไทย" โดยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *Campylobacter* จากฟาร์มสุกรและไก่ ผ่าน โรงฆ่าสัตว์ มายังตลาดสดที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ ทั้งนี้ในช่วง 3 ปีที่ผ่านมาได้ทำการเก็บตัวอย่างจาก ฟาร์มสุกร, ฟาร์มไก่, โรงฆ่าสุกร, โรงฆ่าไก่, เขียงจำหน่ายเนื้อสุกร และเขียงจำหน่ายเนื้อไก่ในตลาดสด ตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ตรวจความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ และได้เก็บเชื้อที่ตรวจแยกไว้ใน ตู้แช่เยือกแข็ง เพื่อทำการศึกษาต่อไป

โครงการวิจัยที่เสนอในครั้งนี้มีเป้าหมายหลักเพื่อตรวจแยกชนิดของเชื้อ *Campylobacter* ที่พบในเนื้อสุกร และเนื้อไก่ ที่ได้ตรวจแยกและเก็บไว้ในช่วงที่ผ่านมา ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญประกอบการศึกษาทางระบาดวิทยาของการแพร่กระจายเชื้อ *Campylobacter* จากฟาร์มผู้ผลิตสุกรและไก่สู่ผู้บริโภค นอกจากนี้สารพันุกรรมของเชื้อที่สกัดได้ยังสามารถนำไปศึกษาเปรียบเทียบลายพิมพ์ของ สารพันธุกรรมของเชื้อที่สกัดได้ต่อไปอีกด้วย

ขอบเขต และระเบียบวิธีวิจัย

1.แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

1.1 การเก็บตัวอย่าง (Sample Collection)

ทำการศึกษาในเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อไก่ และเนื้อสุกร ที่ดำเนินการ เก็บตัวอย่างระหว่างเดือน พ.ค. – ก.ค. 2544 โดยมีจำนวนเชื้อทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง ตัวอย่างเนื้อสุกร เก็บจากตลาดเมืองใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ โดยเลือกเก็บจากสุกรตัว เดียวกับที่ได้ทำการ เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจแยกเชื้อที่ฟาร์ม และที่โรงฆ่าสุกร ตัวอย่างเนื้อไก่เก็บจาก ตลาดหนองดอก อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน โดยเลือกเก็บจากไก่เล้าเดียวกับที่เก็บตัวอย่างจากฟาร์ม และโรงฆ่าไก่ จำนวนตัวอย่างที่เก็บ และ แยกเชื้อได้ แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างเนื้อสุกรและเนื้อไก่ และจำนวนเชื้อ *Campylobacter* ที่ใช้ในการศึกษา

	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนเชื้อ *Campylobacter*	%
เนื้อสุกร	69	16	23.19
เนื้อไก่	72	34	47.22
รวม	141	50	35.5

1.2 การแยกและวินิจฉัยเชื้อเบื้องต้น (Primary isolation and identification)

ตัวอย่างเนื้อสุกร และเนื้อไก่จะนำมาแยกเชื้อ *Campylobacter* ตามวิธีมาตรฐาน โดยการจุ่มชิ้นเนื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวBolton broth และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (5%O_2, 10%CO_2) หลังจากนั้นป้ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Karmali agar และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะออกซิเจนต่ำ หลังจาก 48 ชั่วโมง ทดสอบโคโลนีที่สงสัยด้วย Catalase และ Oxidase test รวมทั้งย้อมสีแกรม เชื้อ *Campylobacter* จะให้ผลบวกกับทั้ง Catalase และ oxidase test เมื่อย้อมด้วยสีแกรมจะติดสีแกรมลบ

เชื้อ *Campylobacter* ที่แยกได้จะถูกเก็บไว้ในคลังเชื้อใน 30%Glycerol ใน Mueller-Hinton broth ที่ –70 องศาเซลเซียส

2. การแยกชนิดของเชื้อ *Campylobacter*

2.1 การเพาะเชื้อจากคลังเชื้อ (Recovery Isolation)

ทำการเพาะเชื้อจากหลอดที่เก็บไว้ในตู้เยือกแข็ง โดยใช้ไม้พันสำลีจุ่ม หรือป้ายลงบนวุ้นสำหรับเพาะเชื้อผสมเลือด (Brucellla agar with 5% horse blood) บ่มในอุณหภูมิ 42°C 40-48 ชั่วโมง

2.2 การเตรียมสารพันธุกรรมต้นแบบ (Preparation of DNA template)

ละลายแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Bolton broth) โดยใช้ไม้พันสำลีป้ายเชื้อคนในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว 3 ml ปรับความเข้มข้นให้ประมาณ 10^8 cfu/ml โดยใช้เครื่องวัดการผ่านของเหลว (Colorimeter) แบ่งสารละลายแบคทีเรียเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งใช้สกัดสารพันธุกรรมปริมาณ 1 ml (2.2.1) ส่วนที่เหลือทำการเจือจาง 1:100 ในน้ำบริสุทธิ์ เพื่อแยก species ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (2.2.2)

2.2.1 การเตรียมสารพันธุกรรมโดยการสกัดด้วย Phenol-chloroform

2.2.2 การเตรียมสารพันธุกรรมโดยการต้มเซลล์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสทำในเครื่องหมุนเวียนอุณหภูมิ โดยส่วนผสมของแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย [Wang, 2002 #668]

- 800 μM deoxynucleoside triphosphate
- 2.5 μl 10X reacton buffer (500mM Tris-HCl pH8.3)
- 100 mM KCl, 50 $(NH_4)_2SO_4$
- 20 mM $MgCl_2$
- 0.5 μM C.jejuni and C.iari primer (Table2)
- 1 μM C.coli and C.fetus primer
- 2 μM C.upssaliensis primers
- 0.2 μM 23s rRNA primers
- 1.25 U Taq DNA polymerase
- 2.5 μl cell template
- Sterile water qs 25 μl

เครื่องหมุนเวียนอุณหภูมิตั้งค่าอุณหภูมิดังนี้

- 95°C 6 นาที
- หมุน 30 รอบ ระหว่าง 95°C 30 วินาที, 59°C 30วินาที 72°C 30วินาที
- 72°C 7 นาที

ตารางที่ 2 Primer sequence ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส [Wang, 2002 #668]

Primer	*Product Size (bp)*	*Sequence (3' – 5')*	*Target gene*
CJF	323	ACT TCT TTA TTG CTT GCT GC	*C.jejuni hipO*
CJR		GCC ACA ACA AGT AAA GAA GC	
CCF	126	GTA AAA CCA AAG CTT ATC GTG	*C.coli glyA*
CCR		TCC AGC AAT GTG TGC AAT G	
CLF	251	TAG AGA GAT AGC AAA AGA GA	*C.lari glyA*
CLR		TAC ACA TAA TAA TCC CAC CC	
CUF	204	AAT TGA AAC TCT TGC TAT CC	*C.upsaliensis glyA*
CUR		TCA TAC ATT TTA CCC GAG CT	
CFF	435	GCA AATATA AAT GTA AGC GGAGAG	*C.fetus sapB2*
CFR		TGC AGC GGC CCC ACC TAT	
23SF	650	TAT ACC GGT AAG GAG TGC TGG AG	*C.jejuni* 23S rRNA
23SR		ATC AAT TAA CCT TCG AGC ACC G	

2.4 ดูผลของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยวิธี Electrophoresis ใช้ความเข้มข้นของ agarose gel 1.5% ย้อมด้วย ethidium bromide 0.05%

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

รายงานสัดส่วนของ *Campylobacter* แต่ละ specie ที่ตรวจพบโดยเปรียบเทียบสัดส่วนของ *Campylobacter* แต่ละ specie ที่ตรวจพบในตัวอย่างชนิดต่างๆ โดยใช้ ตัวสถิติ χ^2 หรือ Fisher exact test (Rosner,1995)

ผลการวิจัย

เชื้อ *Campylobacter* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดยการเพาะเชื้อจากคลังเชื้อซึ่งถูกเก็บไว้ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2540-2543 โดยใช้ 30% glycerol เป็นสารรักษาสภาพของเซลซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mulleur-Hinton broth ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส การเพาะเชื้อจากคลังเชื้อทำโดยเขี่ยเชื้อจากคลังลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Brucella agar ที่เติมเลือดม้า 5% ผลปรากฏว่า อัตราการเพาะเชื้อ *Campylobacter* กลับมาจากคลังของเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 78% โดยแบ่งเป็นตัวอย่างจากเนื้อสุกร 62.5% และเนื้อไก่ 85.29% ตามลำดับ (ตารางที่3) เชื้อที่เพาะขึ้นได้นี้จะถูกนำไปแยกสารพันธุกรรมเพื่อแยกชนิดของเชื้อด้วยวิธี Multiplex PCR

การแยกชนิดของเชื้อด้วยวิธี Multiplex PCR ซึ่งประยุกต์มาจากวิธีของ Wang และคณะ (2002) โดยใช้เชื้อ *Campylobacter jejuni* 33560 เป็นเชื้ออ้างอิง ผลการเปรียบเทียบการเตรียมสารพันธุกรรมต้นแบบระหว่างการสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธี Phenol-Chloroform และสารพันธุกรรมจากการต้มเซลที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้สารพันธุกรรมต้นแบบที่เตรียมโดยการต้มเซลที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ให้ผลดีกว่าการสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธี Phenol-Chloroform ในระยะเวลาการนำไปแยกชนิดด้วยวิธี Multiplex PCR ไม่เกิน 1 เดือน ซึ่งความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่หมาะสมที่สุด คือ 1:1 นอกจากนี้ความเข้มข้นของ Mg_2Cl ที่ให้ผลดีที่สุด คือ 20 mM

ผลการแยกชนิดของเชื้อ *Campylobacter* จากตัวอย่างเนื้อสุกร และเนื้อไก่ พบว่าในตัวอย่างเนื้อสุกรที่สามารถแยกเชื้อ *Campylobacter* ได้นั้น จะมีเชื้อ *C.coli* เป็นจำนวนมากที่สุดคือ 60% รองลงมาคือเชื้อ *Campylobacter* อื่นๆ 20% และไม่ใช่เชื้อ *Campylobacter* 20% โดยในตัวอย่างเนื้อสุกรทั้งหมดไม่สามารถตรวจพบบเชื้อ *C.jejuni* ส่วนตัวอย่างเนื้อไก่ชนิดของเชื้อ *Campylobacter* ที่พบมากที่สุดคือ *C.coli* 72.14% รองลงมาคือ*C.jejuni* 17.24% เชื้อ *Campylobacter* ชนิดอื่นๆ 3.45% และเชื้ออื่นๆ 6.90% (ตารางที่ 4) นอกจากนี้เชื้อ *C.jejuni* และ เชื้อ *C.coli* เป็นเชื้อก่อโรคในคนที่สำคัญสามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างจากเนื้อไก่ได้มากกว่าเนื้อสุกร อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 เชื้อ *Campylobacter* ที่เพาะเชื้อจากอุณหภูมิ –70 องศาสเซลเซียส เพื่อนำไปแยกชนิดของเชื้อด้วยวิธี Multiplex PCR

ตัวอย่าง	เชื้อ *Campylobacter* ที่เก็บไว้	เชื้อ *Campylobacter* ที่นำไปแยกชนิด	%
เนื้อสุกร	16	10	62.5
เนื้อไก่	34	29	85.29

ตารางที่ 4 จำนวนเชื้อ Campylobacter ชนิดต่างๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อสุกร และเนื้อไก่

	เนื้อสุกร (n=10)	เนื้อไก่ (n=34)	p-value
C.coli	6(60%)	21(72.14%)	0.322
C.jejuni	0(0%)	5(17.24%)	0.302
Other *Campylobacter*	2(20%)	1(3.45%)	0.156
No PCR product	2(20%)	2(6.9%)	0.267

วิจารณ์ และ สรุปผล

จากผลการเพาะเชื้อจากคลังเชื้อที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส มีอัตราของการเพาะเชื้อทั้งหมดเท่ากับ 78% โดยแบ่งเป็นตัวอย่างจากเนื้อสุกร 62.5% และ ตัวอย่างจากเนื้อไก่ 85.29% การเก็บเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็งเชื้อ*Campylobacter* ไว้ที่อุณหภูมิต่ำถึง –70 องศาเซลเซียสทำให้สูญเสียเชื้อไปบางส่วน อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น สัดส่วนของ Glycerol ที่มากเกินไป หรือน้อยเกินไป รวมทั้งระยะเวลาในการเก็บอาจมีผลกับเชื้อ อัตราการเพาะเชื้อจากคลังเชื้ออาจเพิ่มสูงขึ้นถ้าเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เช่น Bolton broth หรือ Mueller-Hinton broth ก่อนเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทันที นอกจากนี้การใช้ Skim milk เป็นสารป้องกันเซลในการแช่แข็งแทน Glycerol อาจทำให้อัตราการเพาะเชื้อเพิ่มสูงขึ้นได้

การประยุกต์ใช้วิธี Multiplex PCR ของ Wang และคณะ(2002) ในการแยกชนิดของเชื้อ *Campylobacter* จากตัวอย่างเนื้อสุกร และเนื้อไก่ พบว่าผลบวกกับ 23s RNA primer เท่านั้น โดยไม่ให้ผลบวกกับ Primer อื่นๆ เป็นจำนวน 20% และ 3.45% ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าเชื้อเหล่านี้อาจเป็น *Campylobacter* ชนิดอื่นๆ *Arcobacter spp.* หรือ *Helicobacter spp.* นอกจากนี้ตัวอย่างจากเนื้อสุกร 20% และตัวอย่างจากเนื้อไก่ 6.9% ที่ให้ผลลบกับวิธี Multiplex PCR แต่ให้ผลบวกกับวิธีทางแบคทีเรียวิทยา เนื่องจากวิธีการทางอณูชีวโมเลกุลมีความจำเพาะมากกว่าวิธีทางแบคทีเรียวิทยา อย่างไรก็ตามซึ่งวิธี Multiplex PCR นี้ สามารถตรวจหาได้โดยต้องมีปริมาณสารพันธุกรรมมต้นแบบ คือ *C.jejuni* 10^{8} – 10^{13} CFU/ml , *C.coli* และ *C.upsaliensis* 10^{6}-10^{13} CFU/ml , *C.lari* 10^{7}-10^{10} CFU/ml และ *C.fetus subsp.fetus* 10^{2}-10^{13} CFU/ml การแยกชนิดของเชื้อ *Campylobacter* ด้วยวิธี Multiplex PCR เป็นวิธีที่สะดวกและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การใช้เทคนิคอื่นๆร่วมด้วยจะช่วยเพิ่มความไว และความจำเพาะของวิธีการนี้ได้ เช่น Filtration-enrichment culture, RFLP, หรือ Nested PCR นอกจากนี้การปนเปื้อนของเชื้อระหว่างขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการอาจทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้

ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในโรงฆ่าสุกร ฟาร์มสุกร และ โรงฆ่าไก่ ซึ่งพบเชื้อ *C.coli* เป็นส่วนใหญ่ และไม่พบเชื้อ *C.jejuni* ในฟาร์มสุกรเลย ส่วนการศึกษาที่ฟาร์มไก่พบ *C.jejuni* มากที่สุด (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่) ซึ่งอาจบ่งบอกถึงการถ่ายทอดจากฟาร์มสัตว์มาสู่ตลาดที่จำหน่ายเนื้อสัตว์เพื่อบริโภค

การศึกษาการแยกชนิดของเชื้อ *Campylobacter* จากอาหารที่มาจากสัตว์ยังมีไม่มากนัก ซึ่งจากผลการทดลองในการแยกชนิดเชื้อจากเนื้อสุกร และ เนื้อไก่ ซึ่งพบ *C.coli* เป็นจำนวนมากที่สุด (60% และ 72.14 % ตามลำดับ) ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Rangsrinual และคณะ (1988) ซึ่งผลการสำรวจเนื้อสุกรในประเทศไทยพบ *C.coli* เป็นส่วนใหญ่ในเนื้อสุกร (71%) แต่พบ *C.jejuni* เป็นส่วนใหญ่ในเนื้อไก่ (76%) (Rasrinaul, et al.,1988) ส่วนรายงานของ Cloak and Fratamico (2002) ซึ่งใช้เทคนิค Mulptiplex PCRในการแยกเชื้อโดยศึกษาในเนื้อสุกรพบเชื้อ *C.coli* (86.9%) เป็นจำนวนมากที่สุด (Cloak and Fratamico,2002) ส่วนการศึกษาชนิดของเชื้อ *Campylobacter* ของเนื้อไก่ พบเชื้อ *C.jejuni* (80%) เป็นส่วนใหญ่ (Rivoal, et al.,1999) ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบ *C.coli* เป็นส่วนใหญ่ในเนื้อไก่ ซึ่งการพบเชื้อC.coli มากในเนื้อไก่ที่เก็บจากตลาดอาจเกิดได้จากการปนเปื้อนระหว่างเล้าไก่ คนงาน หรือสิ่งแวดล้อมอื่นๆ นอกจากนี้ความแตกต่างระหว่างการทดลองอาจเกิดได้จากสถานที่ และวิธีการเก็บตัวอย่าง รวมทั้งวิธีทางห้องปฏิบัติการในการแยกเชื้อ และแยกชนิดของเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

1. Acheson, D. 2001. Foodborne diseases update: current trends in foodborne diseases. Medscape Infectious diseases 4(10):1017.
2. Cloak, O., and P. Fratamico. 2002. A multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of CAmpylobacter jejuni and Campylobacter coli from a Swine Processing Facility and Characterization of isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Antibiotic Resistance Profiles. Journal of Food Protection 65 (2):266-273.
3. Deming, M., R. Tauxe, P. Blake, S. Dixon, B. Fowler, S. Jones, E. Lockamy, C. Patton, and R. Sikes. 1987. Campylobacter enteritis at a university: transmission from eating chicken and from cats. American journal of epidemiology 126 (3):526-534.
4. Fermer, C., and E. Engvall. 1999. Specific PCR identification and differentiation of the thermophillic *Campylobacter jejuni, C.coli, C.lari,* and *C.upsaliensis.* Journal of Clinical Microbiology 37(10):3370-3373.
5. Garcia, M., M. Eaglesome, and C. Rigby. 1983. Campylobacter important in veterinary medicine. Veterinary bulletin 53(9):793-818.
6. Hanninen, M., S. Pajarre, M. Klossner, and H. Rautelin. 1998. Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by Pulsed-Field Gel Elctrophoresis. Journal of Clinical Microbiology 36(6):1787-1789.
7. Kalman, M., E. Szollosi, B. Czermann, M. Zimanyi, S. Szekeres, and M. Kalman. 2000. Milkborne Campylobacter infection in Hungary. Journal of food protection 63(10):1426-1429.
8. Lawson, A. J., M. S. Shafi, K. Pathak, and J. Stanley. 1998. Detection of campylobacter in gastroenteritis: comparison of direct PCR assay of faecal samples with selective culture. Epidemiology and infection 121:547-553.
9. Lind, L., E. Sjogren, K. Melby, and B. Kaijser. 1996. DNA fingerprinting and serotyping of Campylobacter jejuni isolates from epidemic outbreak. journal of clinical microbiology 34(4):892-896.

10. Nachamkin, I. 1999. Campylobacter and Arcobacter, p. 716-726. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 7 ed. ASM press, Washington DC.

11. Nachamkin, I., J. Engberg, and F. M. Aaestrup. 2000. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of Campylobacter species, p. 45-66. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), Campylobacter, 2 ed. ASM press, Washington DC.

12. On, S. 1998. In vitro genotypic variation of Campylobacter coli documented by pulsed-field gel electrophoretic DNA profiling: implications for epidemiological studies. FEMS microbiology letters 165:341-346.

13. Padungtod, P., R. Hanson, D. Wilson, B. Julia, J. Linz, and J. Kaneene. 2002. Identification of *Campylobacter jejuni* isolates from cloacal and carcass swabs of chicken in Thailand by 5' nuclease fluorogenic polymerase chain reaction assay. Journal of Food Protection 65(11):1712-1716.

14. Rasrinaul, L., O. Suthienkul, P. Echeveria, D. Taylor, J. Seriwatana, A. Bangtrakulnonth, and U. Lexsomboon. 1988. Foods as a source of enteropathogens causing childhood diarrhea in Thailand. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 39(1):97-102.

15. Rasrinual, L., O. Suthienkul, P. Echeverria, D. Taylor, J. Seriwatana, A. Bangtrakulnonth, and U. Lexomboon. 1988. Foods as source of enteropathogens causing childhood diarrhea in Thailand. American journal of tropical medicine and hygiene 39(1):97-102.

16. Rivoal, K., M. Denis, G. Salvat, P. Collin, and g. Ermel. 1999. Molecular characterization of the diversity of Campylobacter spp. isolates collected from poultry slaughterhouse:analysis of cross contamination. Letters in Applied microbiology 29:370-374.

17. Rosner, B. 1995. Fundamental of biostatistics, 4 ed. Duxbery press, New York.

18. Wang, G., C. Clark, M. Taylor, C. Pucknell, C. Barton, L. Price, D. Woodward, and F. Rodgers. 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni, C.coli, C.lari, C.upsaliensis,* and *C.fetus subsp.fetus*. Journal of Clinical Microbiology 40(12):4744-4747.