

การตรวจเชื้อ *Campylobacter* spp. จาก rectal swab ของผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการ รักษาในสถาบันบำบัดโรคทางเดินอาหารด้วยวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR

ณัฏฐา ตระกูลสุนทรชัย^{1,2}, บุญช่วย เอี่ยมโกศลาก², เสกสรรค์ สโมรสสุข³, Shinji Yamasaki⁴, วรรดา สโมรสสุข^{3*}

Received: April 10, 2012

Revised & Accepted: May 24, 2012

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ใช้วิธี multiplex PCR สำหรับตรวจหาเชื้อ *cdtB* ของเชื้อ *Campylobacter* spp. จาก rectal swab ของผู้ป่วยเด็กอายุตั้งแต่แรกเกิดถึง 14 ปี ซึ่งมีการอุจจาระร่วง และเข้ารับการรักษาสถาบันบำบัดโรคทางเดินอาหาร จากการตรวจตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 691 ตัวอย่างด้วยวิธี multiplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* จำนวน 28 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.1) โดยแยกเป็น *C. jejuni* จำนวน 24 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.5) และ *C. coli* 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.6) เมื่อใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถแยกเชื้อ *Campylobacter* ได้ 16 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.3) แยกเป็น *C. jejuni* จำนวน 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.2) และ *C. coli* จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.1) แสดงให้เห็นว่าวิธี multiplex PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจหาและจำแนกสปีชีส์ของ *Campylobacter* ได้ดีกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน

คำสำคัญ: *Campylobacter*, Rectal swab, Multiplex PCR, *cdtB* gene

¹ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

² กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันบำบัดโรคทางเดินอาหาร

³ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

⁴ Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, Japan

* ผู้รับผิดชอบบทความ

***cdtB* gene-based multiplex PCR for detection of *Campylobacter* spp. isolated from rectal swab culture of diarrheal children in Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute**

Nutta Tragulsoontornchai^{1,2}, Boonchuay Eampokalap², Seksun Samosornsuk³
Shinji Yamasaki⁴, Worada Samosornsuk^{3*}

Abstract

Multiplex PCR technique was used for detecting the *cdtB* gene of *Campylobacter* spp. isolated from rectal swabs of diarrheal children at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute. Of the 691 samples analyzed by the multiplex PCR, 28 (4.1 %) were positive for *Campylobacter* spp.; 24 samples (3.5 %) for *Campylobacter jejuni* and 4 samples (0.6 %) for *Campylobacter coli*. The conventional culture method could detect 15 isolates (2.2 %) of *C. jejuni* and 1 isolate (0.1 %) of *C. coli* from all rectal swab samples. These data showed that the *cdtB* gene-based multiplex PCR technique provided better result for detection and identification of *Campylobacter* spp. than that of the conventional culture method.

Keywords: *Campylobacter*, Rectal swab, Multiplex PCR, *cdtB* gene

¹ The Master of Medical Technology Program, Graduate School, Thammasat University,

² Medical Technology Laboratory, Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute

³ Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus

⁴ Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, Japan

*Corresponding author: (e-mail: sworada@hotmail.com)

บทนำ

Campylobacter spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่ง ลักษณะโค้งงอหรือเป็นเกลียว และเจริญเติบโตได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจนน้อย (microaerophilic) มี flagella ช่วยในการเคลื่อนที่⁽¹⁾ พบปนเปื้อนได้มากในเนื้อสัตว์ต่างๆ เช่น เนื้อไก่ เนื้อหมู และผลิตภัณฑ์จากวัว⁽²⁾ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง โดยเฉพาะประชากรในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วพบว่า *Campylobacter* spp. เป็นเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงที่สำคัญ โดยมีรายงานการติดเชื้อในชาวยุโรปตะวันตกประมาณร้อยละ 1 ต่อปี⁽²⁾ ในประเทศไทยพบว่า *Campylobacter* spp. เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงในเด็ก^(3, 4) โดยเฉพาะเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 6 เดือน⁽⁵⁾

Campylobacter spp. สร้างสารพิษได้หลายชนิด แต่สารพิษที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางถึงความรุนแรงในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพคือ cytolethal distending toxin (CDT) ซึ่งค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1988 โดย Johnson และ Lior พบว่า *C. jejuni* มียีน *cdt* ซึ่งประกอบด้วยยีน *cdtA*, *cdtB* และ *cdtC*⁽⁶⁾ ในปี ค.ศ.1996 Pickett และคณะได้ศึกษาอุบัติการณ์ของการสร้าง CDT toxin ของเชื้อ *C. jejuni* และพบว่ามีความเป็นไปได้ที่ *Campylobacter* ทุกสปีชีส์มียีน *cdtB*⁽⁷⁾ จึงมีการศึกษายีน *cdt* เพื่อใช้เป็นเป้าหมายสำหรับตรวจหาและแยกสปีชีส์ของ *Campylobacter* spp. จากสิ่งส่งตรวจ รวมทั้งมีการนำเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) มาช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะของการตรวจอีกด้วย⁽⁸⁻¹²⁾ โดยทั่วไปการเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* จากอุจจาระและการจำแนกสปีชีส์จะมีวิธีการเฉพาะในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาบางแห่งเท่านั้น เนื่องจากต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์และความชำนาญเป็นพิเศษ นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายยังสูง เพราะวัสดุที่ใช้มีราคาแพง เช่น อาหารเพาะเชื้อที่เป็น selective medium แผ่นกระดาษกรอง nitrocellulose membrane รวมทั้งช่องสำหรับผลิตแก๊ส (gas pack) ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำวิธี multiplex PCR สำหรับตรวจหายีน *cdtB* มาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับตรวจและแยกสปีชีส์ของ *Campylobacter* spp. ใน rectal swab ของผู้ป่วยเด็กโรคอุจจาระร่วง

วัสดุและวิธีการศึกษา

ตัวอย่างและการเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* spp.

ตัวอย่างอุจจาระเก็บจากเด็กอายุตั้งแต่แรกเกิดถึง 14 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรคอุจจาระร่วง และเข้ารับการรักษาที่สถาบันบำราศนราดูร ตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ.2553 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2554 จำนวนทั้งสิ้น 691 รายตัวอย่างอุจจาระใน rectal swabs ที่เก็บใน Cary-Blair transport medium และผ่านการตรวจเพาะเชื้อในงานประจำของห้องปฏิบัติการของสถาบันบำราศนราดูรแล้ว นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อ *Campylobacter* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ อาหาร modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA) ซึ่งประกอบด้วย *Campylobacter* blood-free selective agar base (Oxoid, Basingstoke, UK) และ *Campylobacter* selective supplements (Oxoid, SR0155, Basingstoke, UK), อาหาร Skirrow medium ซึ่งประกอบด้วย Blood agar base No.2 (Oxoid, Basingstoke, UK), 5 % sheep blood (Envimed Co., Ltd, Thailand) และ *Campylobacter* selective supplements (Oxoid, SR0069, Basingstoke, UK) และ อาหาร sheep blood agar

ขั้นตอนการเพาะเชื้อโดยนำ rectal swab มาแขวงใน normal saline solution ปลอดเชื้อปริมาตร 500 μ l หยดสารแขวนลอยของ rectal swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCDA และ Skirrow medium จานละ 50 μ l และกระจาย (streak) เชื้อเป็น 4 ระบาย ส่วนอาหาร sheep blood agar เพาะเชื้อด้วยวิธี filter paper method โดยวางกระดาษกรอง nitrocellulose membrane (ขนาดรู 0.45 μ m) ลงบนอาหาร ด้วยวิธีปลอดเชื้อ หยดสารแขวนลอยของ rectal swab ปริมาตร 100 μ l ลงบนกระดาษกรองข้างๆ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบกระดาษกรองออก นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดใส่ถุงพลาสติกใส แล้วเติมแก๊สผสมที่มีอัตราส่วน 5% O₂, 10% CO₂ และ 85% N₂ ป่มที่อุณหภูมิ 35 ถึง 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สารแขวนลอย rectal swab ที่เหลือจากการเพาะเชื้อ นำมาเติม 15 % Glycerol Brain heart infusion ปริมาตร 200 μ l เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

การวินิจฉัยสปีชีส์ด้วยวิธีทดสอบทางชีวเคมี

นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Campylobacter* ไปย้อมสีแกรม และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากเห็นลักษณะแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างโค้งงอหรือเป็นเกลียวโค้งคล้ายปีกนก และผลการทดสอบ oxidase ให้ผลบวก และทดสอบการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะมีออกซิเจน (aerobic condition) *Campylobacter* จะไม่เจริญในสภาวะนี้ แต่เจริญในสภาวะ microaerophilic condition ทดสอบ hippurate ต่อ เพื่อจำแนกสปีชีส์ *C. jejuni* ซึ่งให้ผลบวก ต่างจาก *Campylobacter* สปีชีส์อื่น⁽²³⁾

การสกัดแยกสารพันธุกรรมต้นแบบ (DNA template) จากโคโลนี

ใช้ inoculation loop กวาดโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCDA และ Skirrow ในระนาบที่ 1 และ 2 ประมาณ 1 loopful และกวาดโคโลนีที่เจริญบน sheep blood agar จากวิธีเพาะเชื้อ filter paper method ลงใน 1X TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200 μ l โคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดแยกหลอดกัน ทำให้โคโลนีกระจายไม่เป็นก้อน ต้มเป็นเวลา 10 นาทีและแช่ในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm 10 นาที และดูดส่วนใสที่มี crude DNA เก็บใส่ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR

การทำ multiplex PCR

องค์ประกอบของสารละลายสำหรับการทดสอบ PCR 1 ปฏิกริยา ในปริมาตรสุทธิ 20 μ l ประกอบด้วย 10x Ex Taq DNA polymerase buffer (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 2.5 mM dNTP, PCR primer 3 คู่⁽¹³⁾ ดังแสดงในตารางที่ 1, 0.5 U Ex Taq DNA polymerase และ boiled template 1 μ l ที่สกัดจากโคโลนี จากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA อัตโนมัติ Gene Amp PCR 9700 (Applied Biosystem, Singapore) โดยป้อนคำสั่งให้เครื่องทำงานตามเวลาด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสม (ตารางที่ 1) จากนั้นวิเคราะห์ผลการเพิ่มจำนวนของ DNA โดยวิธี gel electrophoresis บน 2 % agarose gel ตรวจดูแถบ DNA โดยเครื่องฉายแสงยูวี (Gibthai Co., Ltd, Thailand) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล ในกรณีที่ multiplex PCR ให้ผลบวก สารแขวนลอย rectal swab ที่เก็บรักษาไว้จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อ *Campylobacter* ซ้ำอีกครั้ง เชื้อที่ใช้ควบคุม

คุณภาพของการทดสอบได้แก่ *C. jejuni* ATCC 43422, *C. coli* ATCC 43478 และ *C. fetus* ATCC 27374

การวิเคราะห์ข้อมูล

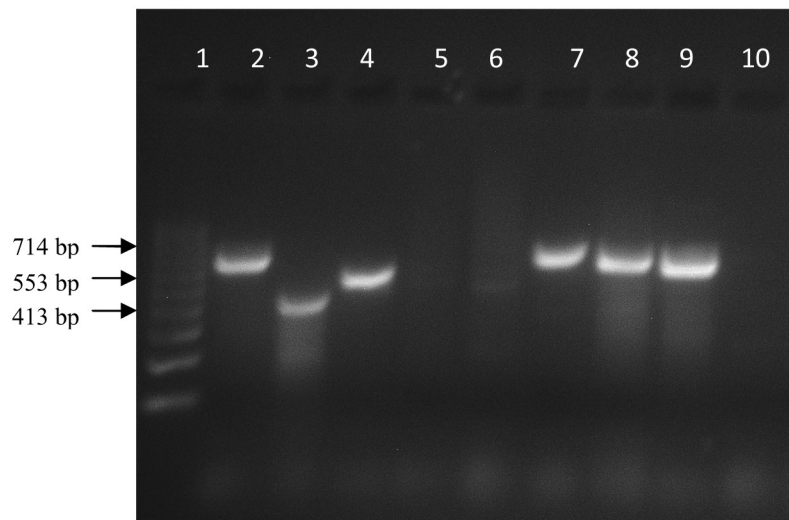
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจพบ *Campylobacter* จากวิธี multiplex PCR และวิธีเพาะเชื้อ คือ χ^2 test โดยกำหนดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ด้วยวิธี multiplex PCR สามารถอ่านผลได้อย่างชัดเจน โดยแถบดีเอ็นเอเป้าหมายจำเพาะต่อเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. fetus* มีขนาดเท่ากับ 714 bp, 413 bp และ 553 bp ตามลำดับ (รูปที่ 1) ผลการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Campylobacter* 28 ราย (ร้อยละ 4.1) แยกเป็น *C. jejuni* 24 ราย (ร้อยละ 3.5) และ *C. coli* 4 ราย (ร้อยละ 0.6) (ตารางที่ 2) แยกเป็นช่วงอายุตั้งแต่แรกเกิดจนถึง 1 ปี จำนวน 11 ราย (ร้อยละ 5.9) ช่วงอายุมากกว่า 1 ปีขึ้นไปจนถึง 5 ปี จำนวน 15 ราย (ร้อยละ 3.9) และช่วงอายุตั้งแต่ 5 ปีขึ้นไปจนถึง 14 ปี จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 1.7) ทั้งนี้ส่วนใหญ่ที่พบเป็นสปีชีส์ *C. jejuni* โดยพบเป็นจำนวน 9, 13 และ 2 ราย เรียงตามลำดับกลุ่มอายุแสดงผลเป็นร้อยละ (รูปที่ 2) ผลของการเพาะเชื้อตัวอย่างจำนวน 691 ราย สามารถเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* ได้ 16 ราย (ร้อยละ 2.3) ซึ่งมาจากการเพาะเชื้อได้ในครั้งแรก 15 ราย และจากการนำสารแขวนลอย rectal swab ที่ให้ผลบวกเฉพาะวิธี multiplex PCR มาเพาะเชื้อซ้ำ 1 ราย ผลการทดสอบทางชีวเคมียืนยันเป็น *C. jejuni* 15 ราย (ร้อยละ 2.2) และเป็น *Campylobacter* spp. 1 ราย (ร้อยละ 0.1) ซึ่งทำการตรวจแยกเป็นสปีชีส์ *C. coli* ด้วยวิธี multiplex PCR เชื้อ *C. jejuni* เพาะแยกได้จากอาหาร sheep blood agar 14 ราย (ร้อยละ 2) อาหาร mCCDA 2 ราย (ร้อยละ 0.3) และอาหาร Skirrow medium 2 ราย (ร้อยละ 0.3) ส่วน *C. coli* เพาะแยกได้จากอาหาร sheep blood agar, อาหาร mCCDA และอาหาร Skirrow medium นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอย่าง rectal swab ที่ตรวจพบเชื้อ *C. jejuni* จำนวน 5 ราย มีการติดเชื้อร่วมกับเชื้อชนิดอื่นซึ่งสามารถก่อโรคอุจจาระร่วงได้แก่ *Salmonella* group C, *Aeromonas sobria*, *A. caviae*, *A. trota* และ *Plesiomonas shigelloides*

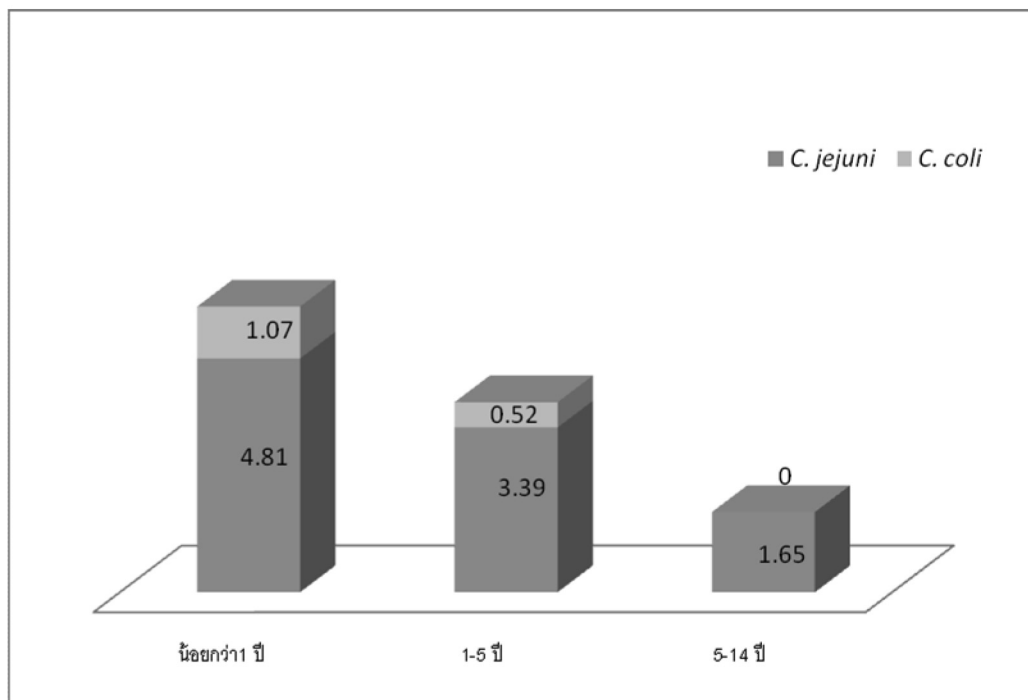
(ตารางที่ 3) ขณะที่ไม่พบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงชนิดอื่นในตัวอย่าง rectal swab ที่ตรวจพบ *C. coli* จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติได้ค่า P - value < 0.05 (P = 0.00) สรุปได้ว่า

วิธี multiplex PCR ให้ผลการตรวจหา *Campylobacter* แตกต่างจากวิธีเพาะเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 1 ผล electrophoresis ของยีน *cdtB* ด้วยวิธี multiplex PCR

1: 100-bp DNA ladder, 2: *C. jejuni* ATCC 43432, 3: *C. coli* ATCC 43478, 4: *C. fetus* ATCC 27374, 5 และ 6: Negative samples, 7, 8 และ 9: Positive samples for *C. jejuni*, 10: Negative control



รูปที่ 2 ร้อยละของสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *C. jejuni* และ *C. coli* แบ่งตามช่วงอายุ

ตารางที่ 1 รายละเอียดของ primer และ multiplex PCR condition สำหรับตรวจหา *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. fetus* ⁽¹³⁾

Primer	Sequence (5'-3')	Target	Amplicon size (bp)	Primer conc.(mM)
Cj-spBU5	ATCTTTTAACCTTGCTTTTGC	<i>C. jejuni</i> , <i>cdtB</i>	714	2.5
Cj-spBR6	GCAAGCATTAATAATCGCAGC			
Cc-spBU5	TTTAATGTATTATTGCGCGC	<i>C. coli</i> , <i>cdtB</i>	413	3.0
Cc-spBR5	TCATTGCCTATGCGTATG			
Cf-spBU6	GGCTTTGCAAAACCAGAAG	<i>C. fetus</i> , <i>cdtB</i>	553	5.0
Cf-spBR3	CAAGAGTTCCTCTTAAACTC			

PCR conditions: Denaturation 94°C, 30 seconds; Annealing 55°C, 30 seconds ; Extension 72°C, 30 seconds
Total cycles = 30 cycles

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัย *Campylobacter* จากตัวอย่าง rectal swabs ด้วยวิธี multiplex PCR และวิธีเพาะเชื้อ

วิธีการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (ร้อยละ)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	รวม
multiplex PCR	691	24 (3.5)	4 (0.6)	28 (4.1)
เพาะเชื้อ	691	15 (2.2)	1 (0.1)	16 (2.3)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจเชื้อชนิดอื่นซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงร่วมกับ *C. jejuni*

เชื้ออื่นที่พบร่วมกับ <i>C. jejuni</i>	จำนวนเชื้อ <i>C. jejuni</i> ที่ตรวจพบ (ราย)	
	วิธีเพาะเชื้อ	วิธี multiplex PCR
<i>Aeromonas sobria</i>	1	1
<i>Aeromonas trota</i>	1	1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1	1
<i>Aeromonas caviae</i>	-	1
<i>Salmonella</i> group C	-	1
รวม	3	5

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ในการศึกษาค้นคว้าพบว่าผลการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ทั้ง 2 วิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกล่าวคือ ผลการเพาะเชื้อ แยกเชื้อ *Campylobacter* ได้ 16 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี multiplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* ได้เพิ่มขึ้นอีกถึง 12 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดเป็น 28 ตัวอย่าง Asakura และคณะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับยีน *cdt* และนำมาใช้ในการตรวจหาและวินิจฉัยแยกสปีชีส์ของ *Campylobacter* spp. ด้วยวิธี multiplex PCR พบว่ามีค่า detection limit อยู่ในช่วง $10-100 \text{ CFU}^{-1}$ และมีความไวรวมทั้งความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยแยกสปีชีส์ของ *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. fetus* ได้ ร้อยละ 100⁽¹³⁾ นอกจากนี้ Samosornsuk และคณะได้ใช้วิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR มาใช้ในการตรวจแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. fetus* พบว่าสามารถตรวจหาและวินิจฉัยสปีชีส์ของ *Campylobacter* spp. ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมได้⁽¹⁴⁾ การใช้วิธี multiplex PCR ตรวจหา *Campylobacter* spp. จาก rectal swab โดยตรงจะมีสารรบกวนใน rectal swab ที่อาจถูกกำจัดไม่หมด ไปยับยั้งปฏิกิริยาของ PCR⁽²¹⁾ การศึกษาของ Shiramaru และคณะพบว่าวิธี multiple PCR โดยใช้ยีน *cdtB* เป็นยีนเป้าหมายตรวจหา *Campylobacter* spp. โดยตรงจากอุจจาระของผู้ป่วยพบมีความไวร้อยละ 84⁽²²⁾ ต่ำกว่าการตรวจจากโคลโลนี่ที่แยกได้จากการเพาะเชื้อในการศึกษาของ Asakura และคณะ⁽¹³⁾ ในการศึกษาของ Persson และคณะพบว่าวิธี multiplex PCR ยีนเป้าหมายได้แก่ ยีน *hipO* และยีน *asp* สำหรับตรวจหา *C. jejuni* และ *C. coli* ตามลำดับ มีค่าความสอดคล้องกับวิธีทดสอบทางชีวเคมีในการแยกสปีชีส์ของ *C. jejuni* และ *C. coli* ได้เกือบร้อยละ 100⁽¹⁵⁾ ซึ่งให้ผลดีเช่นเดียวกับการใช้ยีน *cdtB* แต่ตรวจหา *C. fetus* ไม่ได้และการศึกษาค้นคว้าวิธี multiplex PCR ตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* ได้มากกว่าวิธีเพาะเชื้อ เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Amri และคณะที่พบว่าวิธี multiplex PCR ตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* จากตัวอย่างที่ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* ได้โดยใช้ยีนเป้าหมายได้แก่ยีน *CadF*, ยีน *hipO* และ ยีน *asp* ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *Campylobacter* spp., *C. jejuni* และ *C. coli* ตามลำดับ⁽¹⁶⁾ ผลการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าวิธี multiplex PCR มักตรวจพบ *Campylobacter* ได้มากกว่าวิธีเพาะ

แยกเชื้อซึ่งอาจเนื่องมาจาก *Campylobacter* เป็นแบคทีเรียประเภท microaerophilic ซึ่งตายง่ายและการเพาะเชื้อมีความยาก⁽¹⁷⁾ ในตัวอย่างบางรายจึงไม่สามารถเพาะแยกเชื้อได้ ส่วนวิธี multiplex PCR แม้ตัวอย่างมีเชื้อจำนวนน้อย แต่ก็สามารถขยายเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ทำให้ตรวจพบได้ง่ายกว่า rectal swab 12 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกเฉพาะวิธี multiplex PCR ไม่ได้ทำการทดสอบตรวจยืนยันสปีชีส์ด้วยวิธี sequencing เพราะวิธี multiplex PCR มีเชื้อควบคุมการทดสอบที่เป็นเชื้อมาตรฐาน 3 สปีชีส์ และวิธีนี้ได้รับการประเมินแล้วว่าสามารถนำมาแยกพิสูจน์สปีชีส์ได้^(13,14) การศึกษาค้นคว้านี้สามารถเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* ได้ 16 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 2.3 ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาของ Bodhidatta และคณะที่รายงานความชุกของเชื้อ *Campylobacter* ถึงร้อยละ 22 ในเด็กที่มีอาการอุจจาระร่วง⁽¹⁸⁾ ซึ่งอาจเป็นเพราะกลุ่มศึกษาเป็นเด็กที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ชนบทและอาจมีสุขนิสัยและสุขภาพแตกต่างจากกลุ่มของเด็กในการศึกษาค้นคว้านี้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ของ Echeverria และคณะรายงานความชุกของเชื้อ *Campylobacter* ในเด็กที่ไม่มีอาการอุจจาระร่วงถึงร้อยละ 11⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้ rectal swab ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ยังผ่านขบวนการเพาะเชื้อในงานประจำวันแล้ว จึงอาจทำให้ปริมาณของเชื้อลดลงในบางตัวอย่างจนไม่สามารถตรวจพบได้ ผู้ป่วยเด็กโรคอุจจาระร่วงที่เข้ารับการรักษาที่สถาบันบำราศนราดูรส่วนใหญ่เป็นชนิดเฉียบพลันโดยอาจเกิดจากการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียชนิดอื่น เนื่องจากอาการของโรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Campylobacter* มักจะไม่รุนแรง เด็กที่ติดเชื้อนี้อาจหายเองได้โดยไม่ต้องเข้ารับการรักษา ทำให้โอกาสการตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* ลดลง จากงานวิจัยครั้งนี้พบผู้ป่วยเด็กที่มีช่วงอายุตั้งแต่แรกเกิดถึง 1 ปี มีอัตราการติดเชื้อ *Campylobacter* มากที่สุด การสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ยังไม่สมบูรณ์ ทำให้มีการติดเชื้อได้มากกว่าช่วงอายุอื่น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Taylor และคณะ⁽³⁾ ในงานวิจัยนี้พบการติดเชื้อ *C. jejuni* ร่วมกับเชื้อ *Salmonella* group C ในเด็กอายุ 6 เดือน จำนวน 1 ตัวอย่าง เชื้อ *Salmonella* ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงในเด็กเล็กได้⁽²⁰⁾ ดังนั้นอาการที่พบในผู้ป่วยที่พบเชื้อก่อโรคมกกว่าหนึ่งชนิดอาจเป็นสาเหตุมาจากเชื้อเพียงชนิดเดียว หรือเกิดจากเชื้อทั้งสองชนิดก็ได้

จากการศึกษาครั้งนี้แสดง่วาวิธี multiplex PCR สามารถใช้เป็นวิธีตรวจหาและวินิจฉัยแยกสปีชีส์ของ *Campylobacter* spp. ได้พร้อมกัน เป็นการลดระยะเวลาการรายงานผลจากการเพาะเชื้อ 3-5 วันเหลือเพียง 2 วันซึ่งสามารถทราบถึงสปีชีส์ของ *Campylobacter* ได้ทันที ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสม

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ พ.ญ. จริยา แสงสัจจา ผู้อำนวยการสถาบันบำราศนราดูรที่อนุญาตให้เก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อศึกษาขอขอบคุณ คุณอัญญา ถาวรวัน หัวหน้างานจุลชีววิทยาและเจ้าหน้าที่งานจุลชีววิทยา สถาบันบำราศนราดูรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ รศ.ดร. มนัส จงสงวน ที่ตรวจสอบแก้ไขงานวิจัยนี้ งานวิจัยนี้ได้รับทุนมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และ Grant-in-Aid (B) of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan

เอกสารอ้างอิง

- Penner JL. The Genus *Campylobacter*: a decade of progress. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 157-72.
- Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. *Campylobacter* as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol 2007; 117: 237-57.
- Taylor DN, Perlman DM, Echeverria PD, Lecomboon U, Blaser MJ. *Campylobacter* immunity and quantitative excretion rates in Thai children. J Infect Dis 1993; 168: 754-8.
- Pruksananonda P, Athirakul K, Worawattanakul M, Varavithya W, Pisithpun A, Kitiyaporn 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; 39: 434-42.
- Varavithya W, Vathanophas K, Bodhidatta L, Punyaratabandhu P, Sangchai R, Athipanyakorn S, et al. Importance of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in the etiology of diarrheal disease among children less than 5 years of age in a community in Bangkok, Thailand. J Clin Microbiol 1990; 28: 2507-10.
- Johnson WM, Lior H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. Microb Pathol 1988; 4: 115-26.
- Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* spp. *cdtB* genes. Infect Immun 1996; 64: 2070-8.
- Talukder KA, Aslam M, Islam Z, Azmi IJ, Dutta DK, Hossain S, et al. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. J Clin Microbiol 2008; 46: 1485-8.
- Bang DD, Scheutz F, Ahrens P, Pedersen K, Blom J, Madsen M. Prevalence of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. J Med Microbiol 2001; 50: 1087-94.
- Eygior A, Dawson KA, Langlois BE, Pickett CL. Cytolethal distending toxin genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates: detection and analysis by PCR. J Clin Microbiol 1999; 37: 1646-50.
- Martinez I, Mateo E, Churrua E, Girbau C, Alonso R, Fernandez-Astorga A. Detection of *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. Int J Med Microbiol 2006; 296: 45-8.
- Kabir SM, Kikuchi K, Asakura M, Shiramaru S, Tsuruoka N, Goto A, et al. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. Jpn J Infect Dis 2011; 64: 19-27.

13. Asakura M, Samosornsuk W, Hinenoya A, Misawa N, Nishimura K, Mutsuhisa A, et al. Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. FEMS Immunol Med Microbiol 2008; 52: 260-6.
14. Samosornsuk W, Asakura M, Yoshida E, Taguchi T, Nishimura K, Eampokalap B, et al. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. Microbiol Immunol 2007; 51: 909-17.
15. Persson S, Olsen KE. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. J Med Microbiol 2005; 54: 1043-7.
16. Al Amri A, Senok AC, Ismaeel AY, Al-Mahmeed AE, Botta GA. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. J Med Microbiol 2007; 56: 1350-5.
17. Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 3435-47.
18. Bodhidatta L, Mcdaniel P, Sornsakrin S, Srijan A, Serichantalergs O, Mason CJ. Case-control study of diarrheal disease etiology in a remote rural area in Western Thailand. Am J Trop Med Hyg 2010; 83: 1106-9.
19. Echeverria P, Taylor DN, Lexsomboon U, Bhaibulaya M, Blacklow NR, Tamura K, et al. Case-control study of endemic diarrheal in Thai children. J Infect Dis 1989; 159: 543-8.
20. Patrick M, Schlundt J, Braam HP. Salmonellosis. In: Heymann DL, ed. Control of communicable disease manual. 19th ed. Washington: American Public Health Association; 2008: 535-40.
21. Messmer TO, Skelton SK, Moroney JF, Daugharty H, Fields BS. Application of a nested multiplex PCR to psittacosis outbreaks. J Clin Microbiol 1997; 35: 2043-46.
22. Shiramaru S, Asakura M, Inoue H, Nagita A, Matsuhisa A, Yamasaki S. A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for detection of *Campylobacter* spp. in stool specimens and comparison with culture method. J Vet Med Sci 2012 (in press).
23. Goossens H, Butzler JP. Isolation and identification of *Campylobacter* species. In: Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS, ed. *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. Washington: ASM Press; 1992: 93-109.