วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

การจำแนก lipooligosaccharide biosynthesis loci และ heat-stable serotypes ของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงในเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี ในโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ประเทศไทย

จินตภา เสือสวย[1,2], เสกสรรค์ สโมสรสุข[3], วรดา สโมสรสุข[3] *

Received: *April 2, 2012*
Revised & Accepted: *June 6, 2012*

บทคัดย่อ

เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน ที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปีที่มีอาการอุจจาระร่วงของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จำนวน 26 ตัวอย่าง ถูกจำแนก class ด้วย lipooligosaccharide (LOS) biosynthesis loci โดยเทคนิค PCR และจำแนก heat-stable (HS) ซีโรทัยป์ ด้วยเทคนิค passive hemagglutination พบว่าเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน 23 ตัวอย่าง สามารถจำแนก LOS ได้ 4 class ได้แก่ B2 (10 ตัวอย่าง), H (10 ตัวอย่าง), B1 (2 ตัวอย่าง) และ C (1 ตัวอย่าง) และไม่สามารถจำแนกได้ 3 ตัวอย่างส่วนการจำแนก HS ซีโรทัยป์ พบว่า 20 ตัวอย่างสามารถจำแนกได้ 8 ซีโรทัยป์ ในขณะที่ 6 ตัวอย่างไม่สามารถจำแนกได้ ซีโรทัยป์ HS: 1,44 และ HS: 5 พบได้ใน LOS class B2 จากการศึกษาพบว่าการจำแนก LOS class และ HS ซีโรทัยป์ อาจจะช่วยพยากรณ์โรคในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. jejuni* ได้ และ HS ซีโรทัยป์น่าจะมีความจำเพาะต่อ class ของ LOS

คำสำคัญ: Lipooligosaccharide (LOS) biosynthesis loci, Heat-stable (HS) ซีโรทัยป์, แคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน

[1]นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต
[2] ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
[3]ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
*ผู้รับผิดชอบบทความ

วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

Classification of lipooligosaccharide biosynthesis loci and heat-stable serotypes of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal children less than 5 years of age in Thammasat Chalermprakiet Hospital Thailand

Jintapa Suaesuay [1,2], Seksun Samosornsuk[3], Worada Samosornsuk [3] *

Abstract

A total of 26 *C. jejuni* isolates from diarrheal children under 5 years in Thammasat Chalermprakiet Hospital were classified into different groups by lipooligosaccharide (LOS) loci using PCR assay and heat-stable (HS) serotypes using passive hemagglutination technique. Based on LOS loci, 23 isolates were classified into 4 classes, B2 (10 isolates), H (10 isolates), B1 (2 isolates) and C (1 isolate). However, 3 isolates could not be classified by LOS loci. For HS serotypes, 20 isolates were classified as 8 serotypes, whereas 6 isolates were nontypeable. Serotypes HS: 1,44 and HS: 5 were found in LOS class B2. It was found that classification of LOS loci and HS serotypes may provide a prognosis of patients infected with *C. jejuni* and HS serotypes were probably specific to LOS classes.

Keywords: Lipooligosaccharide (LOS) biosynthesis loci, Heat-stable (HS) serotypes, *Campylobacter jejuni*

[1]The Master of Medical Technology Program, Graduate School, Thammasat University
Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University
Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Rangsit Campus
*Corresponding author: (e-mail: sworada@hotmail.com)

บทนำ

แคมไพโลแบคเตอร์ (*Campylobacter*) เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันที่พบบ่อยในมนุษย์[1] โดยเฉพาะเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน (*C. jejuni*)[2] ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในกลุ่มเด็กอายุ 1 ถึง 5 ปี การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคเนื้อสัตว์ปีกดิบๆ สุก ๆ หรือดื่มนมที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ หรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อน เชื้อจะสร้างสารพิษ Cytolethal distending toxins (CDT) ซึ่งสามารถทำลายเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น[3] สารพิษชนิดนี้ถูกกำหนดโดยยีน *cdtA*, *cdtB* และ *cdtC* หลังจากติดเชื้อ *C. jejuni* ผู้ป่วยบางรายอาจเกิดภาวะแทรกซ้อนที่เกี่ยวข้องกับภาวะภูมิคุ้มกันต่อตนเองหรือเกิดโรค Guilain-Barré syndrome (GBS) จากรายงานในประเทศญี่ปุ่นพบเชื้อ *C. jejuni* ในผู้ป่วยโรค GBS เป็นจำนวนมากถึงร้อยละ 30.4[4] GBS เป็นโรคที่มีความผิดปกติของเส้นประสาทส่วนปลายโดยสาเหตุเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำลายเส้นประสาทส่วนปลายของตนเอง เนื่องจาก lipooligosaccharide (LOS) ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อ *C. jejuni* มีโครงสร้างคล้ายกับส่วนของ ganglioside (GM1) ในเซลล์ประสาทของมนุษย์ เมื่อผู้ป่วยติดเชื้อ *Campylobacter* ร่างกายสร้าง antibody เข้าทำลาย LOS ของตัวเชื้อ และ ganglioside ของมนุษย์ ทำให้เส้นประสาทส่วนปลายของอวัยวะเหล่านั้นสูญเสียหน้าที่การทำงาน เกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง ชา เดินเซ เป็นต้น[5] LOS ของเชื้อ นอกจากจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค GBS แล้ว ยังใช้ในการจำแนกความหลากหลายของสายพันธุ์ได้อีกด้วย โดย Parker และ คณะ ได้จำแนกกลุ่ม LOS ซึ่งกำหนดความแตกต่างของแต่ละกลุ่มจากความหลากหลายของกลุ่มยีน[6] โดยจำแนก LOS ออกเป็น 6 class ได้แก่ A, B, C, D, E และ F class E สามารถแยกย่อยออกได้อีก 2 class คือ H และ G ซึ่งใน class H ไม่มียีน *26e* หรือ *28e* ส่วน class G พบเฉพาะยีน *3e* เท่านั้น การจัด LOS class จากเชื้อทั้งหมด 123 ตัวอย่าง สามารถจัด LOS ได้ 80% ของเชื้อ[6] ในขณะที่ Yu และคณะรายงานว่ามีเพียง 3 class เท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค GBS ได้แก่ class A, B และ C[7]

การตรวจหาเชื้อและพิสูจน์แยกชนิดของ *Campylobacter* สามารถทดสอบด้วยวิธี *cdtB* gene–based multiplex PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง[8] นอกจากนี้วิธีที่ช่วยในการประเมินฟีโนไทป์ของ *C. jejuni* ที่ยอมรับกันโดยทั่วไปคือวิธีการตรวจ Penner serotyping โดยใช้หลักการ passive hemagglutination ซึ่งอาศัยความแตกต่างของ soluble heat-stable (HS) antigens ของเชื้อ [9] ซึ่งพบได้ในส่วนของ LOS[10, 11] ของ *C. jejuni* แต่ละสายพันธุ์

ในประเทศไทย *Campylobacter* เป็นแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงในเด็กสูงเป็นอันดับสองรองจาก *Salmonella* [2, 12, 13] แต่ยังไม่มีข้อมูลการจำแนกกลุ่มของยีนที่สังเคราะห์ LOS ของ *Campylobacter* และข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่าง HS ซีโรทัยป์ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาจำแนกกลุ่มของยีนที่สังเคราะห์ LOS และศึกษา HS serotype ของ *C. jejuni* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี ที่มีอาการอุจจาระร่วง เพื่อเป็นข้อมูลในการประเมินความรุนแรงในการก่อโรคในผู้ป่วย และการป้องกันและรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ *C. jejuni* ต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

เป็น *C. jejuni* จำนวน 26 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี ที่มีอาการอุจจาระร่วงและเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2551 จนถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2552 ซึ่งไม่มีผู้ป่วยซ้ำราย รวมถึงเชื้ออ้างอิงอีก 4 ตัวอย่าง ได้แก่ *C. jejuni* ATCC 33560, *C. fetus* ATCC 27374, *C. coli* ATCC 33559 และ *C. jejuni* ATCC 43432 เชื้อทั้งหมดเก็บรักษาใน 15% Glycerol brain heart infusion 200 µL ที่ -80 °C ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (isolated colony) โดยบ่มเพาะเชื้อที่ 42 °C ภายใต้บรรยากาศที่มีออกซิเจนน้อย (10% CO_2, 5% O_2 และ 85% N_2)

2. การทดสอบยืนยันเชื้อ C. jejuni โดยวิธี species specific gene – based multiplex PCR

สกัดแยกดีเอ็นเอของ *C. jejuni* ด้วย Genomic DNA extraction kits (RBC Bioscience, Taiwan) แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 °C เพื่อใช้ในการทดสอบครั้งต่อไป

นำดีเอ็นเอมาตรวจยืนยันเชื้อ *C. jejuni* โดยใช้เทคนิค multiplex PCR ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Asakura และคณะ[8] โดยใช้ไพรเมอร์ ที่จำเพาะสำหรับตรวจหายีน

cdtB (**ตารางที่ 1**) ส่วนผสมต่างๆ ในปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรสุทธิ 50 μL ประกอบด้วย forward และ reverse ของไพรเมอร์ CjSPBU5, CjSPBR6 ความเข้มข้น 0.125 μM, ไพรเมอร์ CcSPBU5, CcSPBR5 ความเข้มข้น 0.15 μM และ ไพรเมอร์ CfSPBU6, CfSPBR3 ความเข้มข้น 0.25 μM, dNTPs 0.2 mM, 1X PCR buffer, 2.0 mM $MgCl_2$, *Taq* DNA polymerase (RBC Bioscience, Taiwan) 1.0 Unit และตัวอย่างดีเอ็นเอ 50 ng ทำ PCR โดยใช้เครื่อง thermal cycler (KAPA Biosystems, UK) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ คือ initial denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย PCR 30 รอบ ของ denaturation ที่ 94 °C 30 วินาที annealing ที่ 56 °C 30 วินาที และ extension ที่ 72 °C 30 วินาที และ final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที ในการทำ PCR แต่ละครั้งมีหลอดควบคุมซึ่งเติมน้ำกลั่นแทนตัวอย่างดีเอ็นเอและมีเชื้อควบคุมผลบวก ได้แก่ *C. jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC 3359 และ *C. fetus* ATCC 27374 ตรวจวิเคราะห์ผลของแถบดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gels โดยใช้ 100 bp DNA ladder (Invitrogen, USA) เป็น marker และบันทึกถ่ายภาพของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel documentation system (UVItec, Cambridge, UK)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ species specific gene-based multiplex PCR[8]

Primers	Sequences (5' - 3')	Target	Amplicon (bp)
CjSPBU5	ATCTTTTAACCTTGCTTTTGC	*C. jejuni cdtB*	714
CjSPBR6	GCAAGCATTAAAATCGCAGC		
CcSPBU5	TTTAATGTATTATTTGCCGC		
CcSPBR5	TCATTGCCTATGCGTATG	*C. coli cdtB*	413
CfSPBU6	GGCTTTGCAAAAACCAGAAG		
CfSPBR3	CAAGAGTTCCTCTTAAACTC	*C. fetus cdtB*	553

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้จำแนก LOS class ของเชื้อ *C. jejuni* [6]

No.	ORF	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	No.	ORF	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
1	orf2	CAAATCTGTTTCCCT-CAATACACTCA TTTAATCTTACGCTT-TCGTTTTCTAC	452	23	orf14c	GCTAGAACACCCTAAAGT-GACTAA TGGCACTAAATTG-TAATAAATGGC	761
2	orf3bf	ACAAAGAAGTGAATTAT-CAAATGGGAGC TTGCCCAAAGGCTTGAG-TAGTGCTG	842	24	orf15c	AAACCGTAGGTGTAG-TAATCCCC CATGATAATTTTCTA-CAAATCGCACT	981

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้จำแนก LOS class ของเชื้อ *C. jejuni* [6] (ต่อ)

No.	ORF	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	No.	ORF	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
3	orf3ac2	AAGATAATATCATCG-CACTTAGTCGTAAA ACAAACTCACTATCTTC-CCTACCCC	1073	25	orf16c	AGGTATTGGTTTAAT-GGAGCTTTT GGTCCTATAACACCCCAC-GAGAT	474
4	orf3e	AATAGATAGCGGAAG-CACAGATGA CTATGATAAAAAC-CTCTTTTGCCTTCTA	566	26	orf16df	GAAATTCTTACGAT-TAAATCTTGGC GT-GAAGTTGTGAT-TCTAGCTTTGC	345
5	orf4ab	GAATCAAACT-TATACTAACTTAGAAATC CATTTGCTTTTGTAATCT-TCTT	782	27	orf17d	TTGAACAACCTGCTTAT-GAGCTTTAT TTTCTTTAGTGAATCTTC-CCACGC	438
6	orf4c	AAAATGGTGGTTTAAG-TAGTGCTAG GTTTGGATAAAAGGTT-TAATTATAGGT	901	28	orf18df	GCAGCAAGAAATAATGGT-GTTAAAC AAATAATCATCC AAACAT-TCCTGAA	467
7	orf5/10c	AGTATGTTACCTGCCAT-ACAAAGAGG GGTATGCAATACAACCT-TATCACTAG	978	29	orf19df	AAAATTTCCGTCAT-AATCC CAATCT TATCAGGTAAATCTT-GAATGATAAAGTCA	430
8	orf5ab1	TTCATCCCTTTTA-GAAAAATTAGAC AAGCAAGCAATCTCCT-GGTTC	681	30	orf20df	GTCTTTTAAGAGCTAGA-TATGAAGGAG ATTAATGCATCTTCT-GCCATAATTA	384
9	orf5ab2	TTCATCCCTTTTA-GAAAAATTAGAC TGCTAAACAATCTCCAG-GAGC	680	31	orf21e	TATTAAATAGGAGT-GCAACAATGAAAGG GCACAAACGAACTAGCT-TCTATAAGACT	738
10	orf5bII	CTGTGATGATGGGAGT-GAAGAGC GGTAATCGTTTCGGCG-GTATT	539	32	orf22e	TATTTTAGTTACTGGCG-GAGCTGG GAATAAGGGGAATTT-GGAGCATAA	483

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้จำแนก LOS class ของเชื้อ *C. jejuni* [6] (ต่อ)

No.	ORF	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	No.	ORF	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
11	orf6ab1	C A A G G G C A A T A - GAAAGCTGTATCA ACAAGCACTTCATTCT-TAGTATTACAAAT	631	33	orf25e	TATATGGCAATTTTGCG-TAGTTTTA GCAATAATAAGTTGTATT-GGCTGCA	370
12	orf6ab2	TCATCTTGCCAACT-TATAATGTGGA TCTAGCGATATTAAAC-CAACAGCCT	519	34	orf26e	ATATTGCCGTTAATTCAT-TACAGTT TTTGAGCGATAATTT-TAAATCCATC	771
13	orf6c	GTAGTAGATGATTGTGG-TAATGATAAA ATAGAATTGCTATTTA-CATGCTGG	558	35	or27e	GTAGATGATTGTTCAAAT-GATAATAGCACA GTTTTCAGATTCTAAG-GCCATTATTCC	717
14	orf7ab	ACTACACTTTAAAA-CATTTAATCCAAAATCA CCATAAGCCTCACTA-GAAGGTATGAGTATA	580	36	orf28e	CAAATATACTATTGATTCT-GGATAAGTGA TAACTATAAAATCATAG-GAGGCATAT	542
15	orf7c	TTGAAGATAGATATTTT-GTGGGTAAA CTTTAAGTAGTGTTTTAT-GTCACTTGG	746	37	orf29e	ATGGGCTTGATGCTTTAA-GATTGAT TTGGCGATATGGGTAAT-GACAAAA	855
16	orf8ab	ATTATAGCCATTTGCT-CACTTTG AAAGCACCCTTAGTCG-TACCTG	755	38	orf30e	TTTAGTTATGGTGTAAGT-GGGCATTG TACCATATTTTCAAGTCTT-TCATTCGC	924
17	orf8c	CCTTTGATAATCC CT-GAAATAGGT TCCTTTGCACTTATAC-CACCTT	911	39	orf31e	TTTATACCAGTAAAATAC-CCTTATGAAG TTTTTCTTTAGTTACCAT-ATCAGGTG	537
18	orf9ab	AGCAGCAGCTATTGTT-GGAGCAT TTCATTGCCAAGTCTTC-CATTT	619	40	orf32e	CAAGCTGTTGATGGAAAA-GAGTTG TGGGCTCCAAATATCT-CATCAGTAG	548

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้จำแนก LOS class ของเชื้อ *C. jejuni* [6] (ต่อ)

No.	ORF	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	No.	ORF	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
19	orf9c	TTTTGTTAGCGGAACTAGAGCTG TTATTTCGGTTGTAATTGGATGA	614	41	orf33e	GATTTATTAAGAGTTTCTTTGCTCAA ATTTTATCTATCATGGAATGTTTTCTAA	518
20	orf10ab	TGCTCGTGGTGGCTCAAAGGGTA CCTGCTAAATCGCCATAATCATTACAAACAA	429	42	orf34e	ATGATCGATAATGAAATTACGATAGTAAC CGTCATCAATTATTCCAAATGAGGTA	691
21	orf11ab	GAAATGGGTTCATTTTCTTTTAGCG TCTTCTAGTAGGTCAAGATATTGGTTTA	518	43	LOSXL	AAGCGTCCTATTATCTTCACAACTGCACACTATGG ATGCCACAACTTTCTATCATAATCCCGCTT	6953
22	orf12	GCCACAACTTTCTATCATAATCC CGC C G C C G T A A C T CAAACGCTCATCTATT	545				

3. การจำแนก class ด้วย lipooligosaccharide (LOS) biosynthesis loci

ในการจำแนกกลุ่มของ LOS ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 43 คู่ ด้วยเทคนิค single PCR (**ตารางที่ 2**) ตามวิธีและหลักเกณฑ์การจำแนกของ Parker และ คณะ[6] ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรสุทธิ 25 μL สำหรับไพรเมอร์ 42 คู่ (ยกเว้นไพรเมอร์ LOSXL) ประกอบด้วย forward และ reverse primers ความเข้มข้น 0.2 μM, dNTPs 0.2 mM, 1X PCR buffer, 2.0 mM $MgCl_2$, *Taq* DNA polymerase 0.2 Unit และตัวอย่างดีเอ็นเอ 50 ng สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย PCR 30 รอบ ของ denaturation ที่ 94 °C 25 วินาที annealing ที่ 52 °C 25 วินาที และ extension ที่ 72 °C 1 นาที และ final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที สำหรับส่วนผสมสำหรับไพรเมอร์ LOSXL ประกอบด้วย forward และ reverse primers ความเข้มข้น 0.2 μM, dNTPs 0.2 mM, 1X ของ Long PCR buffer, 15 mM $MgCl_2$, Long PCR Enzyme mix (Thermo Scientific, Germany) 2.5 Unit และตัวอย่างดีเอ็นเอ 250 ng สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย PCR 25 รอบ ของ denaturation ที่ 94 °C 30 วินาที annealing ที่ 52 °C 45 วินาที และ extension ที่ 68 °C 15 นาที และ final extension ที่ 68 °C เป็นเวลา 15 นาที ในการทำ PCR แต่ละครั้ง มีหลอดควบคุมซึ่งเติมน้ำกลั่นแทนตัวอย่างดีเอ็นเอ และมีเชื้อควบคุมผลบวกได้แก่ *C. jejuni* ATCC 33560 และ *C. jejuni* ATCC 43432 ตรวจวิเคราะห์ผลของแถบดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gels โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker สำหรับไพรเมอร์ 42 คู่ ส่วนไพรเมอร์ LOSXL ใช้ 1 Kb DNA ladder (Invitrogen, USA) เป็น marker จำแนก LOS class ตามวิธีของ Parker และ คณะ[6] ดังแสดงใน **ตารางที่ 3**

ตารางที่ 3 เกณฑ์ในการจัดจำแนก LOS classes ของ Parker และคณะ[6]

LOS locus class	Amplification with primers specific to the following ORF:																																									
	orf2 : *waaM*	**orf12: *waaV***	**orf3bf**	**orf4ab**	**orf5ab1: *cgtA*-1**	**orf5ab2: *cgtA*-2**	**orf6ab1: *cgtB*-1**	**orf6ab2: *cgtB*-2**	**orf7ab: *cstII***	**orf8ab: *neuB*-a**	**orf9ab: *neuC*-a**	**orf10ab: *neuA***	**orf11ab**	**orf5bII: cgtA2**	**orf3ac2: Cj1135**	**orf4c: Cj1136**	**orf14c: Cj1137c**	**orf15c: Cj1138**	**orf6c: Cj1139c**	**orf7c: *cstIII***	**orf8c: *neuB* 1-c**	**orf9c: *neuC* 1-c**	**orf5/10c: Cj1143**	**orf16c: Cj1144**	**orf17d**	**orf18df**	**orf19df**	**orf20df**	**orf16df**	**orf3e**	**orf22e**	**orf25e**	**orf26e**	**orf27e**	**orf28e**	**orf29e**	**orf30e**	**orf31e**	**orf32e**	**orf33e**	**orf34e**
A1	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

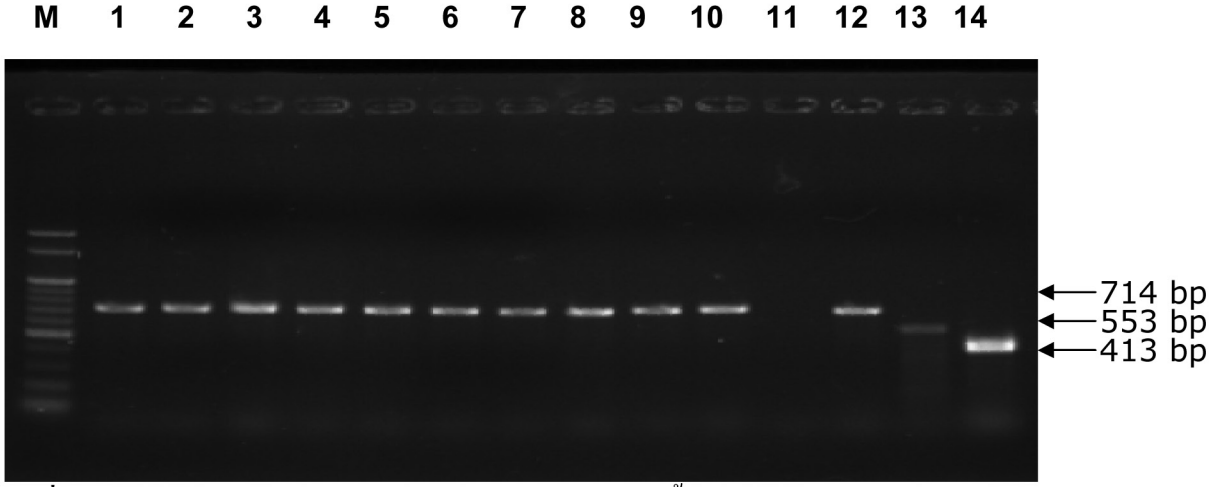
4. การจำแนก HS ซีโรทัยป์ โดยวิธี passive hemagglutination (PHA)

จำแนก HS ซีโรทัยป์ของ *C. jejuni* โดยเทคนิค PHA [9] ด้วย antisera Seiken Set (Denka Seiken, Tokyo Japan) โดยสกัด HS antigens ของเชื้อด้วยสารไนเตรท จากนั้นผสม HS antigens ของเชื้อกับเซลล์เม็ดเลือดแดงไก่ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ได้ sensitized red blood cells สำหรับใช้ทดสอบปฏิกิริยาการตกตะกอน กับ antisera Seiken Set ใน microtiter plate อ่านผลปฏิกิริยาการตกตะกอนหลังจากบ่มใน moisture box เป็นเวลา 30 นาที จำแนก HS ซีโรทัยป์ตามวิธีของ Penner และคณะ[9]ซึ่งแบ่งออกเป็น 25 groups ดัง **ตารางที่ 4** ในการทดสอบใช้เชื้ออ้างอิงเป็นเชื้อควบคุมเช่นเดียวกับการจำแนก LOS class

ผลการศึกษา

ผลการตรวจวินิจฉัยยืนยันเชื้อ *C. jejuni* จำนวน 26 ตัวอย่างโดยวิธี multiplex PCR พบว่าเป็น *C. jejuni* ทั้งหมด (**รูปที่ 1**) ผลการจำแนกชนิด LOS class โดยวิธี PCR และ HS ซีโรทัยป์โดยวิธี PHA ในเชื้อมาตรฐาน *C. jejuni* ATCC 33560 และ ATCC 43432 (**ตารางที่ 3** และ **4**) พบว่าให้ผลตรงกันกับงานวิจัยของ Parker และ คณะ [6] (**ตารางที่ 5**) แสดงว่าผลการจำแนก HS ซีโรทัยป์และ LOS class ในงานวิจัยครั้งนี้เชื่อถือได้

จากการจำแนก LOS class และ HS ซีโรทัยป์ ของ *C. jejuni* จำนวน 26 ราย พบว่าสามารถจำแนก LOS class ได้ 23 ตัวอย่าง (ร้อยละ 88.4) ซึ่งจำแนก LOS ได้ 4 class ได้แก่ B2 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 38.46) , H 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 38.46), B1 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.69) และ C 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.84) และไม่สามารถจำแนกได้ 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.6) ส่วนการจำแนก HS ซีโรทัยป์ สามารถจำแนกได้ 20 ตัวอย่าง (ร้อยละ76.9) แบ่งเป็น 8 ซีโรทัยป์ ในขณะที่ 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 23.1) ไม่สามารถจำแนกได้ (**ตารางที่ 5**)



รูปที่ 1 Species specific gene – based multiplex PCR ของเชื้อ *Campylobacter* spp. Lane M, 100 bp ladder; 1-10, *C. jejuni* ที่แยกได้จากตัวอย่างของผู้ป่วย; 11, Distilled water (Negative control); 12, *C. jejuni* ATCC 33560; 13, *C. fetus* ATCC 27374; 14, *C. coli* ATCC 33559.

ตารางที่ 4 รายละเอียดของ heat-stable (HS) antigens ของเชื้อ *C. jejuni* ใน antisera Seiken Set

Serum groups: heat-stable (HS) antigens		
Group A: 1, 44	Group K: 12	Group Y: 37
Group B: 2	Group L: 15	Group Z: 38
Group C: 3	Group N: 18	Group Z_2: 41
Group D: 4, 13, 16, 43, 50	Group O: 19	Group Z_4: 45
Group E: 5	Group P: 21	Group Z_5: 52
Group F: 6,7	Group R: 23, 36, 53	Group Z_6: 55
Group G: 8	Group S: 27	Group Z_7: 57
Group I: 10	Group U: 31	
Group J: 11	Group V: 32	

ตารางที่ 5 ผลการจำแนก LOS class และ HS ซีโรทัยป์ ของเชื้อ *C. jejuni* 26 ตัวอย่าง และเชื้ออ้างอิง

LOS class	Penner		No. of isolates tested (n = 26)
	Serogroup	Serotype (s)	
B2	A	1, 44	4
B2	E	5	3
B2	-	-	3
H	C	3	5
H	Y	37	2
H	G	8	1
H	K	12	1
H	-	-	1
B1	D	4, 13, 16, 43, 50	2
C	-	-	1
-	D	4, 13, 16, 43, 50	1
-	F	6, 7	1
-	-	-	1
A1	D	4, 13, 16, 43, 50	ATCC 43432
B2	R	23, 36, 53	ATCC 33560

-, non typeable

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากผลการวิจัยพบว่าเชื้อ *Campylobacter* ที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยเด็กจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ สามารถจำแนก LOS class ได้ร้อยละ 88.4 (23/26) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Parker และคณะ[6] ซึ่งจำแนก LOS class ได้ร้อยละ 80 ของเชื้อ *Campylobacter* ทั้งหมดที่ทำการทดสอบ และจากรายงานของ Boonmar และคณะ[14] ปี พ.ศ. 2548 พบว่าในไก่มักพบ group A (HS: 1,44) และ group L (HS: 15) ปี พ.ศ. 2550 ของ Boonmar และคณะ[15] จำแนก HS ซีโรทัยป์จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่างๆ ที่ส่งมาตรวจยืนยันการติดเชื้อ *C. jejuni* กับ the National Institute of Health (NIH)ได้ร้อยละ 51 (36/70) แบ่งเป็น 10 ซีโรทัยป์คือ HS:2 HS:3 HS: 23,36,53 HS:5 HS: 8 HS:1,44 HS:12 HS: 4, 13, 16, 43, 50 HS: 10 และ HS: 15 ในขณะที่ผู้ป่วยเด็กสามารถจำแนกได้ ร้อยละ 76.9 (20/26) แบ่งเป็น 8 ซีโรทัยป์ คือ HS: 1, 44 HS: 3 HS: 4, 13, 16, 43, 50 HS: 5 HS: 6, 7 HS: 8 HS: 12 HS: 23, 36, 53 และ HS: 37 เห็นได้ว่ามีผลไม่แตกต่างกัน และจากรายงานของ Bongkot และ คณะ[16] ปี 2554 พบว่าจากเนื้อไก่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2547 จนถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548 มักพบ group L (HS: 15) และ group A (HS: 1, 44) ในขณะที่ผู้ป่วยเด็กมักพบว่ามีการติดเชื้อในกลุ่ม HS: 3 และ HS: 1, 44 ส่วนการจำแนก class ด้วย LOS biosynthesis loci ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการติดเชื้อ HS: 1, 44 และ HS: 5 อยู่ใน LOS class B2 HS: 4, 13, 16, 43, 50 อยู่ใน LOS class B1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ HS ซีโรทัยป์พบว่า HS:1 HS:2 HS:4 HS:4/50 HS:5 HS:10 HS:13/65 HS:16 HS:19 HS:23 HS:35 HS:37 HS:41 HS:44 และ HS:64 เกี่ยวข้องกับการก่อโรค GBS [17-19] นอกจากนี้ Aspinall และคณะ[20, 21] พบว่า HS:1 HS:2 HS:4 HS: 23 และ HS: 36 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อโรค GBS ด้วยเช่นกัน และจากศึกษาของ Yu และคณะ[7] พบว่า class A, B และ C มีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อโรค GBS และมีรายงานว่า *C. jejuni* จากผู้ป่วยโรค GBS ส่วนใหญ่เป็น class A หรือ class B [22, 23] แสดงว่า LOS class B2 HS: 1,44 4 ราย HS:5 3 ราย และclass B1 HS:4,13,16,43,50 2 ราย จากการศึกษาน่าจะมีโอกาสก่อโรค GBS ได้ด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาน้อย อาจจะพบ LOS class หรือ HS serotype อื่นๆนอกเหนือจากนี้

สาเหตุที่ไม่สามารถจำแนก HS ซีโรทัยป์ได้ อาจจะเป็น HS ซีโรทัยป์ชนิดอื่นนอกเหนือจากชุด antisera Seiken Set ส่วน LOS class ที่จำแนกไม่ได้เนื่องจากไพรเมอร์ สำหรับจำแนกมีข้อจำกัดแค่ 8 class เท่านั้น ถ้าต้องการจำแนก class ได้มากกว่านี้ต้องเพิ่มไพรเมอร์เข้าไป ทำให้สิ้นเปลืองมากขึ้น และการศึกษานี้เป็นการเบื้องต้นว่าสามารถจำแนก class ด้วย LOS biosynthesis loci โดยเทคนิค PCR ในกลุ่มที่เราศึกษาออกเป็น 8 class ได้จริง จากการศึกษาพบว่าการใช้ LOS class สามารถจำแนกเชื้อ *C. jejuni* ได้มากกว่าการใช้ HS ซีโรทัยป์ และยังพบว่า antiserum ที่ใช้สำหรับทดสอบ HS ซีโรทัยป์ นั้นมีราคาแพงด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม HS serotype มีอำนาจในการจำแนกสายพันธุ์ (discriminatory power) ของเชื้อ *C .jejuni* มากกว่า LOS class นอกจากนี้การจำแนก LOS class ต้องทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ถึง 43 คู่ จึงยังไม่เหมาะสำหรับงานประจำ

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการจำแนก LOS class และ HS ซีโรทัยป์ สามารถช่วยแยกกลุ่มของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. jejuni* ได้หรือการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อได้ นอกจากนี้ยังสามารถบอกได้ว่าผู้ป่วย มีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรค GBS ได้ด้วยเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และทุนมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni*: An emerging foodborne pathogen. Emerg Infect Dis 1999; 5: 28-35.
2. Varavithya W, Vathanophas K, Bodhidatta L, Punyaratabandhu P, Sangchai R, Athipanyakom S, et al. Importance of *Salmonellae* 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.

3. ณัฐนนท์ ตราชู, ศศิณี กันยาบุญ. การตรวจวิเคราะห์ยีนก่อโรคใน *Campylobacter jejuni*. วารสารวิจัย มข 2551; 13: 23-32.
4. Kuroki S, T. Saida MN, T. Hauta, M. Yoshioka, Y. Kobayashi, and H. Nakanishi. *Campylobacter jejuni* strains from patients with guillain-barré syndrome belong mostly to Penner serogroup 19 and contain β-*N*-acetylglucosamine residues. Ann Neurol 1993; 33: 243-7.
5. Yuki N. Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barre and Fisher syndromes. Lancet Infect Dis 2001; 1: 29-37.
6. Parker CT, Horn ST, Gilbert M, Miller WG, Woodward DL, Mandrell RE. Comparison of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide biosynthesis loci from a variety of sources. J Clin Microbiol 2005; 43: 2771-81.
7. Yu RK, Usuki S, Ariga T. Ganglioside molecular mimicry and its pathological roles in Guillain-Barre syndrome and related diseases. Infect Immun 2006; 74: 6517-27.
8. Asakura M, Samosornsuk W, Hinenoya A, Misawa N, Nishimura K, Matsuhisa 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.
9. Penner JL, Hennessy JN. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. J Clin Microbiol 1980; 12: 732-7.
10. Moran AP, Penner JL. Serotyping of *Campylobacter jejuni* based on heat-stable antigens: relevance, molecular basis and implications in pathogenesis. J Appl Microbiol 1999; 86: 361-77.
11. Preston MA, Penner JL. Structural and antigenic properties of lipopolysaccharides from serotype reference strains of *Campylobacter jejuni*. Infect Immun 1987; 55: 1806-12.
12. Taylor DN, Echeverria P, Pitarangsi C, Seriwatana J, Bodhidatta L, Blaser MJ. Influence of strain characteristics and immunity on the epidemiology of *Campylobacter* infections in Thailand. J Clin Microbiol 1988; 26: 863-8.
13. 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.
14. Boonmar S, Sangsuk L, Suthivarakom K, Padungtod P, Morita Y. Serotypes and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and animals in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005; 36: 130-4.
15. Boonmar S, Morita Y, Fujita M, Sangsuk L, Suthivarakom K, Padungtod P, et al. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and gyr A gene mutation of *Campylobacter jejuni* isolates from humans and chickens in Thailand. Microbiol Immunol 2007; 51: 531-7.
16. Bongkot N., Tetsuo A., Yasushi K., Takuo S. Serotypes, molecular and antimicrobial characteristics of *Campylobacter jejuni* isolated from chicken meats in Northeastern Thailand during December, 2007 to June, 2008. Songklanakarin J Sci Technol 2011; 33: 493-8.
17. Endtz HP, Ang CW, van Den Braak N, Duim B, Rigter A, Price LJ, et al. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes. J Clin Microbiol 2000; 38: 2297-301.
18. Nachamkin I, Engberg J, Gutacker M, Meinersman RJ, Li CY, Arzate P, et al. Molecular population genetic analysis of *Campylobacter jejuni* HS:19 associated with Guillain-Barre syndrome and gastroenteritis. J Infect Dis 2001; 184: 221-6.

19. Nachamkin I, Allos BM, Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 555-67.
20. Aspinall GO, McDonald AG, Raju TS, Pang H, Kurjanczyk LA, Penner JL, et al. Chemical structure of the core region of *Campylobacter jejuni* serotype O:2 lipopolysaccharide. Eur J Biochem 1993; 213: 1029-37.
21. Aspinall GO, McDonald AG, Raju TS, Pang H, Moran AP, Penner JL. Chemical structures of the core regions of *Campylobacter jejuni* serotypes O:1, O:4, O:23, and O:36 lipopolysaccharides. Eur J Biochem 1993; 213: 1017-27.
22. Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Koike S, Hirata K, et al. Comprehensive analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barre syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. J Infect Dis 2006; 193: 547-55.
23. Taboada EN, van Belkum A, Yuki N, Acedillo RR, Godschalk PC, Koga M, et al. Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes: neuropathogenic and enteritis-associated isolates can share high levels of genomic similarity. BMC Genomics 2007; 8: 359.