

ความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR ในตัวอย่างเนื้อไก่ผักกาดหอม และน้ำดื่ม จากกรุงเทพมหานคร และ ปริมณฑล

มนต์จันทร์ พรสวัสดิพงษ์^{1, 2}, เสกสรรค์ สโมสรสุข³, ณัฐมน นิยมเดชา³, วรดา สโมสรสุข^{3*}

Received: March 14, 2015

Revised & Accepted: April 17, 2015

บทคัดย่อ

Campylobacter เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคอุจจาระร่วง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตในมนุษย์ อีกทั้งยังสามารถบ่งชี้ถึงปัญหาทางสาธารณสุขและสุขอนามัยที่ไม่ดีพอ การศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในตัวอย่างจำนวน 180 ตัวอย่าง จากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล ประกอบด้วย เนื้อไก่ ผักกาดหอม และน้ำดื่ม อย่างละ 60 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างเนื้อไก่ 25 กรัม ผักกาดหอม 50 กรัม และน้ำดื่ม 2 ลิตร ที่กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน มาเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหาร Bolton broth ที่ 37 °C ในบรรยากาศที่มีแก๊สผสม (5% O₂, 10% CO₂ และ 85% N₂) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ suspension นี้เตรียมสกัด DNA และเพาะเลี้ยงบนอาหาร modified cefoperazone charcoal deoxycholate agar (mCCDA) และบ่มเพาะที่ 37 °C ในบรรยากาศที่มีแก๊สผสม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กวาดโคโลนีจากระนาบที่ 1 และ 2 มาสกัด DNA หลังจากนั้น นำ DNA ที่สกัดได้จาก Bolton broth และโคโลนี มาทำการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ด้วยวิธี cytolethal distending toxin B (*cdtB*) gene-based multiplex PCR จากการศึกษา พบว่าการตรวจโดยตรงจาก Bolton broth พบเชื้อ *Campylobacter* spp. 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเนื้อไก่ 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8.3) ผักกาดหอม 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) และน้ำดื่ม 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) แยกตามสปีชีส์พบ *C. coli* 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) และ *C. jejuni* 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.7) ผลการตรวจจาก โคโลนี พบเชื้อ *Campylobacter* 18 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเนื้อไก่ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 13.3) ผักกาดหอม 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 13.3) และน้ำดื่ม 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) แยกตามสปีชีส์พบ *C. coli* 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6.1) *C. jejuni* 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) และ *C. fetus* 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.6) จากผลการศึกษา พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* ในตัวอย่างเนื้อไก่ ผักกาดหอม และ น้ำดื่ม และการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ด้วยวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR จากโคโลนี สามารถตรวจพบเชื้อ ได้มากกว่าการตรวจโดยตรงจาก Bolton broth ถึงร้อยละ 50 แสดงให้เห็นว่า การปนเปื้อนของเชื้ออยู่ในอาหารและน้ำและทำให้มีโอกาสเกิดการติดเชื้อชนิดนี้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ และวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR สามารถใช้ตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในอาหาร และน้ำดื่ม พร้อมทั้งแยกสปีชีส์ของเชื้อ *Campylobacter* ที่เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคได้

คำสำคัญ: *Campylobacter*, *cdtB* gene-based multiplex PCR, ความชุก

¹นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี

²แผนกโลหิตวิทยา กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า กรุงเทพฯ

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Prevalence of *Campylobacter* spp. by *cdtB* gene-based multiplex PCR in chicken meat, lettuce and drinking water from Bangkok and suburb area

Monjan Phonworachittaphong^{1,2}, Seksun Samosornsuk³, Nattamon Niyomdecha³, Worada Samosornsuk^{3*}

Abstract

Campylobacter is a bacterium mainly causing diarrhea illness and leading to fatal in humans. It is indicated as the health problems and poor hygienic practice. The aim of this study was to determine the prevalence of *Campylobacter* spp. contamination in a total of 180 samples, consisting of chicken meat, lettuce and drinking water, 60 samples for each. The samples from 25 g of chicken, 50g of lettuce and 2 L of drinking water filtrated with a membrane size of 0.45 micron were inoculated into Bolton broth at 37°C in an atmosphere with a gas mixture (5% O₂, 10% CO₂ and 85% N₂) for 24 hours. Then bacterial suspensions were prepared for DNA extraction and inoculated on modified cefoperazone charcoal deoxycholate agar (mCCDA) agar plates. The plates were incubated at 37° C in the same atmosphere with the gas mixture for 48 hours. Colonies grown on plates were swept from the first and second streak planes for DNA extraction. The DNAs extracted from Bolton broth and colonies were used for detecting *Campylobacter* by *cdtB* gene-based multiplex PCR. Using the direct Bolton broth, *Campylobacter* spp. were detected in 9 samples, 5 samples from chicken (8.3%), 2 samples from lettuce (3.3%), and 2 samples from drinking water (3.3%). Of the 9 samples, 6 samples (3.3 %) were identified as *C. coli* and 3 samples (1.7%) were *C. jejuni*. The results from colonies revealed that *Campylobacter* spp. were detected in 18 samples comprising 8 samples of chicken (13.33%), 8 samples of lettuce (13.3%) and 2 samples of drinking water (3.3%). Of the 18 samples, 11 samples (6.1%) were identified as *C. coli*, 6 samples (3.3%) were *C. jejuni* and 1 sample (0.6 %) was *C. fetus*. Our study revealed the contamination of *Campylobacter* in chicken meat, lettuce and drinking water. With *cdtB* gene-based multiplex PCR method, 50% of *Campylobacter* could be detected from colony, more than those detected from the Bolton broth directly. This result demonstrates that *Campylobacter* spp. is contaminated in food and water, and thus the risks of these infections in both humans and animals. In addition, *cdtB* gene-based multiplex PCR method can be used to detect this bacterium in food and drinking water, and simultaneously identify the species level of *Campylobacter* which is the main cause of pathogen.

Keywords: *Campylobacter*, *cdtB* gene-based multiplex PCR, Prevalence

¹Graduate School, Thammasat University (Rangsit Campus), Pathumthani

²Hematology Division, Clinical Pathology Department, Phramongkutklao Hospital, Bangkok

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

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

บทนำ

เชื้อ *Campylobacter* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของโรคระบบทางเดินอาหารอักเสบทั่วโลก รวมทั้งสาเหตุของอาการอุจจาระร่วงในกลุ่มนักท่องเที่ยว สปีชีส์ที่พบมากเป็นสาเหตุสำคัญคือ *C. jejuni* พบได้สูงถึงร้อยละ 80 ถึง 85 และ *C. coli* ร้อยละ 10 ถึง 15 ⁽¹⁾ มีรายงานการปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* ในเนื้อไก่ดิบที่ขายตามท้องตลาดจากการมีสุขอนามัยที่ไม่ดีพอในประเทศไทยร้อยละ 40 และในประเทศเคนย่าร้อยละ 77^(2,3) และนอกจากเนื้อไก่ดิบแล้วยังมีรายงานการพบเชื้อในเนื้อไก่ปรุงสุกพร้อมรับประทานในประเทศแม็กซิโกอีกด้วย⁽⁴⁾ จากการทดสอบทาง serotypes พบว่าเชื้อที่แยกได้จากเนื้อไก่ที่ตรวจพบในประเทศไทยให้ผลการทดสอบเหมือนกันเชื้อที่แยกได้จากคน⁽⁵⁾ ยังพบการสำรวจในประเทศอังกฤษที่พบการติดเชื้อ *Campylobacter* จากการปนเปื้อนในอาหาร ได้แก่ การบริโภคเนื้อไก่ (ร้อยละ 31) การรับประทานผักสด (ร้อยละ 21) และจากน้ำดื่ม (ร้อยละ 12)⁽⁶⁾ และในประเทศไอร์แลนด์ยังพบว่าปัจจัยสำคัญที่เป็นความเสี่ยงสูงในการติดเชื้อ *Campylobacter* ในไอร์แลนด์ ได้แก่ การบริโภคไก่ ผักกาดหอม ไก่วง การรับประทานอาหารนอกบ้าน การสัมผัสแกะ การติดเชื้อจากบาดแผล ภาวะ Hiatus Hernia และจากภาชนะที่ใช้ปรุง หรือบรรจุอาหาร⁽⁷⁾

จากปัญหาย่างยากหลายประการในการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างเช่น เชื้อเจริญช้าและต้องการสภาวะและอาหารที่จำเพาะ ต้องอาศัยเทคนิคพิเศษช่วยในการแยกเชื้อ ผู้ปฏิบัติงานต้องมีทักษะและประสบการณ์ ไม่สามารถใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีวินิจฉัยเชื้อได้ รวมทั้งใช้เวลานาน⁽⁸⁾ ดังนั้น จึงต้องหาวิธีการทดสอบอื่นที่มีประสิทธิภาพมากกว่ามาใช้ เพราะนอกจากการขึ้นบรูสปีชีส์ของเชื้อจะมีความสำคัญในเชิงระบาดแล้ว ยังมีผลต่อการรักษาผู้ป่วย⁽⁹⁾ ปัจจุบันมีการทดสอบ multiplex PCR ที่ตรวจหาพิษ cytolethal distending toxin (*cdt*) ของเชื้อได้พร้อมกัน คือ *cdt* gene based multiplex PCR โดยคณะของ Asakura ได้พัฒนาการตรวจหาพิษ *cdtA*, *cdtB* และ *cdtC* ในเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. fetus* และมีความจำเพาะในแต่ละสปีชีส์⁽¹⁰⁾ พบว่าสามารถแยกชนิดของเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์จากตัวอย่างของผู้ป่วย หรือจากสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ^(11,12) ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR สำหรับตรวจหาพิษ *cdtB*⁽¹¹⁻¹⁴⁾ มาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับตรวจ และแยกสปีชีส์ของเชื้อ

Campylobacter spp. จากตัวอย่างตรวจเนื้อไก่ ผักกาดหอม และน้ำดื่ม เพื่อให้ได้ผลการวินิจฉัยที่มีความถูกต้อง มีความรวดเร็วในการรายงานผล และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานด้านสาธารณสุข

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (เลขที่ 008/2558) ตัวอย่างเนื้อไก่ ผักกาดหอม และน้ำดื่ม ที่มีจำหน่ายในตลาดสด และร้านสะดวกซื้อในเขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล ได้แก่ จังหวัดสิงห์บุรี อ่างทอง ลพบุรี สระบุรี และนนทบุรี จำนวนตัวอย่าง อย่างละ 60 ตัวอย่าง คือ เนื้อไก่ 100 กรัม, ผักกาดหอม 100 กรัม และน้ำดื่ม 2 ลิตร ซึ่งเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 ระหว่างการเก็บตัวอย่างจากสถานที่จำหน่าย เพื่อนำส่งห้องปฏิบัติการตัวอย่างเนื้อไก่ และผักกาดหอม จัดเก็บในกล่องโฟมที่มีแผ่นให้ความเย็น (ice pack) เพื่อรักษาความสดของตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์

2. การเตรียมตัวอย่าง และการเพาะเลี้ยงเชื้อ⁽¹⁵⁾

ซึ่งตัวอย่างแต่ละประเภทดังนี้ เนื้อไก่ 25 กรัม, ผักกาดหอม 50 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ Bolton broth (Lab M Limited, UK) ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ Cefoperazone 20 มิลลิกรัมต่อลิตร, Vancomycin 20 มิลลิกรัมต่อลิตร, Trimethoprim 20 มิลลิกรัมต่อลิตร, Natamycin 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (C.V.T.N. Lab M Limited, UK) ในเนื้อไก่ 225 มิลลิลิตร ผักกาดหอม 100 มิลลิลิตร ตีบดด้วยเครื่อง BagMixer (Interscience, France) เป็นเวลา 2 นาที ส่วนตัวอย่างน้ำใช้น้ำ 2 ลิตร กรองผ่านแผ่นกรอง nitrocellulose membrane (Pall Corporation, USA) ขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นจึงนำกระดาษกรองใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อแล้วเติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร และบ่มเพาะโดยใช้แก๊สผสมที่มีอัตราส่วน 5% O₂, 10% CO₂ และ 85% N₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างจาก Bolton broth 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ ในขณะเดียวกัน นำ 1 loopful ของตัวอย่างใน Bolton broth มาเพาะเชื้อ *Campylobacter* บนอาหาร modified cefoperazone charcoal deoxycholate agar (mCCDA) ซึ่ง

ประกอบด้วย *Campylobacter* blood-free selective agar base (Oxoid, Basingstoke, UK) และ *Campylobacter* selective supplements (Oxoid, SR1055, Basingstoke, UK) และบ่มเพาะโดยใช้แก๊สผสม (5% O₂, 10% CO₂ และ 85% N₂) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นกวาดโคลน 1 loopful จากกระนาบที่ 1 และ 2 ใส่ลงใน 1XTE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 200 ไมโครลิตร เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ

3. การสกัดดีเอ็นเอจากโคลน และ Bolton broth

นำโคลนใน 1X TE buffer 200 ไมโครลิตร และตัวอย่าง Bolton broth ที่ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นที่ 13,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนที่ได้เติม 1X TE buffer 200 ไมโครลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 20 นาที จากนั้นแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที ปั่นที่ 13,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนที่มีดีเอ็นเอ ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บใส่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะทำการทดสอบด้วยวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR

4. การทำ *cdtB* gene-based multiplex PCR

การตรวจ PCR 1 ปฏิกริยา ในปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยส่วนผสม 10x reaction buffer (RBC Bioscience, Taiwan), 2.5 mM dNTP (Invitrogen, USA), PCR primer 3 คู่⁽¹⁰⁾, 1.25 U *Taq* DNA polymerase (RBC Bioscience, Taiwan), และ boiled template 2 µl ที่สกัดจาก Bolton broth หรือ โคลน จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง thermal cycler (G-Storm, England) การทำปฏิกริยามีขั้นตอน ดังนี้ initial denatura-

tion ที่ 94°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกริยา 30 รอบ ของ (94°C 30 วินาที - 62°C 30 วินาที - 72°C 30 วินาที) และต่อด้วย 72°C 5 นาที ตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยวิธี gel electrophoresis บน 2% agarose gel ที่มีสี red safe เป็นส่วนประกอบโดยใช้ 100 bp DNA ladder (RBC Bioscience, Taiwan) เป็น marker เชื่อที่ใช้ควบคุมคุณภาพของการทดสอบ ได้แก่ *C. jejuni* ATCC 43422, *C. coli* ATCC 43478 และ *C. fetus* ATCC 27374

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่างตรวจที่ใช้ดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากโคลน พบเชื้อ *Campylobacter* 18 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเนื้อไก่ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 13.3) ผักกาดหอม 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 13.3) และน้ำดื่ม 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) แยกตามสปีชีส์พบ *C. coli* 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6.1) *C. jejuni* 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) และ *C. fetus* 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.6) และจากตัวอย่างตรวจที่ใช้ดีเอ็นเอซึ่งสกัดจาก Bolton broth พบเชื้อ *Campylobacter* ในเนื้อไก่ 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8.3) ผักกาดหอม 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) และน้ำดื่ม 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) แยกตามสปีชีส์พบ *C. coli* 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) และ *C. jejuni* 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.7) ตัวอย่างตรวจจากโคลนพบเชื้อ *Campylobacter* มากกว่า ตัวอย่างตรวจจาก Bolton broth ถึงร้อยละ 50 และตัวอย่างตรวจจาก Bolton broth ที่ตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* แต่ละสปีชีส์ เป็นตัวอย่างเดียวกันกับตัวอย่างตรวจจากโคลน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวินิจฉัย *Campylobacter* ด้วยวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR จากการใช้ DNA ที่สกัดจากโคโลนี และ Bolton broth

DNA template	ชนิดของตัวอย่าง (จำนวน)	ตัวอย่างที่ให้ผลบวก (ร้อยละ)			รวม
		<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. jejuni</i>	
Colony	เนื้อไก่ (60)	7 (11.7)	-	1 (1.7)	8 (13.3)
	ผักกาดหอม (60)	4 (6.7)	1 (1.7)	3 (5.0)	8 (13.3)
	น้ำดื่ม (60)	-	-	2 (3.3)	2 (3.3)
	รวม (180)	11 (6.1)	1 (0.6)	6 (3.3)	18 (10.0)
Bolton broth	เนื้อไก่ (60)	4 (6.7)	-	1 (1.7)	5 (8.3)
	ผักกาดหอม (60)	2 (3.3)	-	-	2 (3.3)
	น้ำดื่ม (60)	-	-	2 (3.3)	2 (3.3)
	รวม (180)	6 (3.3)	-	3 (1.7)	9 (5.0)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การตรวจเชื้อ *Campylobacter* spp. ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR สกัดดีเอ็นเอจาก Bolton broth และจากโคโลนี จากผลที่ได้พบว่าในตัวอย่างการสกัดของทั้งสองวิธีการตัวอย่างที่ให้ผลบวกเป็นตัวอย่างเดียวกัน แต่ตัวอย่างตรวจจากโคโลนีให้จำนวนผลบวกที่พบมากกว่าตัวอย่างตรวจโดยตรงจาก Bolton broth ซึ่งเป็นไปได้ว่า DNA จากโคโลนีมีปริมาณเชื้อมากกว่า เพราะบ่มเพาะเชื้อต่ออีก 48 ชั่วโมง ซึ่งแม้จะให้ผลบวกที่มากกว่าตัวอย่างตรวจโดยตรงจาก Bolton broth แต่ต้องใช้เวลาดูผลเพิ่มขึ้น 48 ชั่วโมง ส่วน DNA ที่สกัดจาก Bolton broth อาจมีค่า detection limit ต่ำกว่าที่วิธี multiplex PCR จะตรวจได้ ในการศึกษาของ Asakura และคณะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับยีน *cdt* เพื่อใช้ในการตรวจ และวินิจฉัยแยกสปีชีส์ของ *Campylobacter* spp. ด้วยวิธี multiplex PCR พบว่ามีค่า detection limit อยู่ในช่วง 10 -100 CFU⁻¹ และมีความไวรวมทั้งความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยแยกสปีชีส์ของ *C. coli*, *C. fetus* และ *C. jejuni* ได้ ร้อยละ 100⁽⁹⁾ การศึกษาของ Shiramaru และคณะพบว่าวิธี multiplex PCR โดยการใช้ *cdtB* ในการตรวจหา *Campylobacter* spp. โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงมีความไวร้อยละ 84⁽¹²⁾ ซึ่งต่ำกว่าการตรวจจากโคโลนีที่แยกได้จากการเพาะเชื้อ หรือการที่ตรวจพบผลลบปลอมจากการตรวจด้วยวิธี PCR จาก Bolton broth

อาจเกิดได้จากมีสารบางอย่างในตัวอย่างที่มีผลยับยั้งกระบวนการทำ PCR ทำให้ได้ดีเอ็นเอต้นแบบน้อยลง เช่นในอาหารอาจมีสารพวก ไขมัน glycogen polysaccharides เกลื้อแร่ และเอ็นไซม์บางอย่างในอาหารเอง หรือแม้แต่แป้งในถุงมือที่ปนเปื้อนในตัวอย่างตรวจก็สามารถยับยั้งกระบวนการทำ PCR ได้เช่นกัน⁽¹⁶⁾ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาส่วนใหญ่พบว่า วิธี multiplex PCR มักตรวจพบ *Campylobacter* ได้มากกว่าวิธีการเพาะเชื้อ ซึ่งอาจเนื่องมาจาก *Campylobacter* เป็นแบคทีเรียประเภท microaerophilic ซึ่งตายง่าย และการเพาะเชื้อมีความยาก⁽¹⁷⁾ ในตัวอย่างบางรายจึงไม่สามารถเพาะแยกเชื้อได้ ส่วนวิธี multiplex PCR แม้ตัวอย่างมีเชื้อจำนวนน้อย แต่ก็สามารถขยายเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ ซึ่งในการทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR นี้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกไม่ได้ทำการตรวจยืนยันสปีชีส์ด้วยวิธี sequencing เพราะวิธี multiplex PCR มีข้อควบคุมการทดสอบที่เป็นเชื้อมาตรฐาน 3 สปีชีส์ และวิธีนี้ได้รับการประเมินแล้วว่าสามารถใช้แยกพิสูจน์สปีชีส์ได้

ผลการศึกษายังพบการปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* spp. ในเนื้อไก่ เป็น *C. coli* (ร้อยละ 11.7) มากกว่า *C. jejuni* (ร้อยละ 1.7) โดยทั่วไปแล้วในเนื้อไก่มักพบเชื้อ *C. jejuni* ได้มากกว่า แต่ก็อาจเป็นไปได้ที่จะพบ *C. coli* มากกว่าเช่นเดียวกัน ดังการศึกษาในประเทศอียิปต์ได้ทำการศึกษา molecular identification ของเชื้อ *C. jejuni* และ

C. coli ในเนื้อไก่ พบ *C. jejuni* ร้อยละ 3.7 และ *C. coli* ร้อยละ 7.4⁽¹⁸⁾ พบการปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* ในตัวอย่างเนื้อไก่ ผักกาดหอม และ น้ำดื่ม และการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ด้วยวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR จากโคลนี สามารถตรวจพบเชื้อ ได้มากกว่าการตรวจโดยตรงจาก Bolton broth แสดงให้เห็นถึงเชื้อนี้มีการปนเปื้อนอยู่ในอาหาร และน้ำ จึงมีโอกาสเกิดการติดเชื้อชนิดนี้ทั้งในมนุษย์ และสัตว์ และวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อชนิดนี้ในอาหาร และน้ำดื่ม และในขณะที่เดียวกันใช้แยกสปีชีส์ของเชื้อ *Campylobacter* ชนิดที่เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Fagbenro-Beyioku AF, Omilabu SA. Zoonotic infections in Nigeria: overview from a medical perspective. *Acta Trop* 2000;76:59-63.
2. Rasrinaul L, Suthienkul O, Echeverria PD, Taylor DN, Seriwatana J, Bangtrakulnonth A, et al. Foods as a source of enteropathogens causing childhood diarrhea in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1988;39:97-102.
3. Osano O, Arimi SM. Retail poultry and beef as sources of *Campylobacter jejuni*. *East Afr Med J* 1999;76:141-3.
4. Quinones-Ramirez EI, Vazquez-Salinas C, Rodas-Suarez OR, Ramos-Flores, Rodriguez-Montano R. Frequency of isolation of *Campylobacter* from roasted chicken samples from Mexico City. *J Food Prot* 2000;63:117-9.
5. Taylor DN, Echeverria P, Seriwatana J, Bodhidatta L, Blaser MJ. Influence of strain characteristics and immunity on the epidemiology of *Campylobacter* infections in Thailand. *J Clin Microbiol* 1988; 26:863-68.
6. Meirion R, Evans C, Ribeiro D, Salmon RL. Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for *Campylobacter* infection. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1219-25.
7. Danis K, Di Renzi M, O'Neill W, Smyth B, Mckeown P, Foley B, et al. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection: An all-Ireland case-control study. *Euro Surveill* 2009;14:pii 19123.
8. Engberg J, On SL, Harrington CS, Gerner-Smidt P. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. *J Clin Microbiol* 2000;38:286-91.
9. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* 2001;7:24-34.
10. 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 detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:260-6.
11. 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.
12. 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;74:857-62.
13. Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, et al. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. J Clin Microbiol 2002;40:4744-7.
 14. Boonmar S, Yingsakmongkon S, Songserm T, Hanhaboon P, Passadurak W. Detection of *Campylobacter* in duck using standard culture method and multiplex polymerase chain reaction. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2007;38:728-31.
 15. Hunt JM, Abeyta C, Tran T. Isolation of *Campylobacter* species from food and water. In: US Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual. 8th, ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, 2001.
 16. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol 2012;113:1014-26.
 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. Awadallah MAI, Ahmed HA, El-Gedawy AA, Saad AM. Molecular identification of *C. jejuni* and *C. coli* in chicken and humans, at Zagazig, Egypt, with reference to the survival of *C. jejuni* in chicken meat at refrigeration and freezing temperatures. IFRJ 2014;21:1801-12.