

การศึกษายีนก่อความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *Campylobacter jejuni* ที่แยกได้จากมนุษย์และสัตว์ปีก

วรดา สโมสรสุข¹, นริศรา มังกรแก้ว², เสกสรรค์ สโมสรสุข^{1*}

Received: January 7, 2017

Revised: April 26, 2017

Accepted: April 29, 2017

บทคัดย่อ

Campylobacter jejuni เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคท้องร่วงที่พบได้ทั่วโลก สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ โดยมีแหล่งรังโรคที่สำคัญคือสัตว์ปีก การศึกษาการเกิดโรคเกี่ยวกับยีนก่อความรุนแรงของเชื้อดังกล่าวในประเทศไทยมีน้อยมาก อีกทั้งยังพบแนวโน้มการดื้อสารต้านจุลชีพกลุ่ม fluoroquinolones ที่สูงขึ้น การวิจัยนี้เพื่อศึกษาหาความรุนแรงในการก่อโรคและเปรียบเทียบความถี่ของยีนที่พบใน *C. jejuni* ที่แยกได้จากมนุษย์และสัตว์ปีก พร้อมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของยีนเหล่านี้กับอัตราการดื้อยาของเชื้อต่อ ciprofloxacin และ doxycycline จากเชื้อทั้งหมดจำนวน 52 ตัวอย่างซึ่งแยกได้จากมนุษย์และสัตว์ปีก โดยตรวจหายีนก่อความรุนแรงในการก่อโรคจำนวน 15 ยีน คือ cgtB, CjcdtA, CjcdtB, CjcdtC, ciaB, pldA, fucP, virB11, flaA, racR, dnaJ, ceuE, cadF, ggt และ ansB ด้วยวิธี Single based PCR จากการศึกษายีน CjcdtA, CjcdtB, CjcdtC, ciaB, flaA, racR, dnaJ และ ceuE คิดเป็นร้อยละ 100 ในทั้งสองแหล่งตัวอย่าง การทดสอบ Minimal Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี Epsilonometer test กับสารต้านจุลชีพ 2 ชนิด คือ ciprofloxacin และ doxycycline พบว่าเชื้อมีความไวต่อ ciprofloxacin ร้อยละ 87 และ doxycycline ร้อยละ 40 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่มียีน cgtB มีความสัมพันธ์ต่อการดื้อยาแบบปานกลางของ doxycycline อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

คำสำคัญ: *Campylobacter jejuni*, Virulence genes, มนุษย์, สัตว์ปีก

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี

²หน่วยจุลชีววิทยา โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Genes coding for virulence determinants of *Campylobacter jejuni* isolates from human and poultry

Worada Samosornsuk¹, Narissara Mungkornkaew², Seksun Samosornsuk^{1*}

Abstract

Campylobacter jejuni is the leading cause of bacterial food-borne diarrhoeal disease throughout the world. Campylobacteriosis is a zoonosis that transmitted to humans from poultry or meat contaminated by *Campylobacter* spp. Despite of its high incidence in Thailand, there have been regarding the pathogenicity mechanisms and virulence genes of *C. jejuni* from Thailand. It has evolved increasing resistance to fluoroquinolones in Thailand. The aim of this study was to determine the prevalence of different pathogenic genes and compare the frequency of genes detection between human and poultry isolates of *C. jejuni* from stool samples in Thailand. Moreover, the correlation of these genes and the resistance of ciprofloxacin and/or doxycycline was investigated. A total of 52 samples from human and poultry were screened for the presence of 15 pathogenic genes namely *cgtB*, *CjcdtA*, *CjcdtB*, *CjcdtC*, *ciaB*, *pldA*, *fucP*, *virB11*, *flaA*, *racR*, *dnaJ*, *ceuE*, *cadF*, *ggt* and *ansB*. All isolates carried *CjcdtA*, *CjcdtB*, *CjcdtC*, *ciaB*, *flaA*, *racR*, *dnaJ* and *ceuE*. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of ciprofloxacin and doxycycline by Epsilometer test (E-test) revealed that 87% and 40% of them were resistance to ciprofloxacin and doxycycline respectively. In addition, the pearson's chi-square test analysis showed association between *cgtB* gene and doxycycline intermediate resistance (p-value <0.05).

Keywords: *Campylobacter jejuni*, Virulence genes, Human, Poultry

¹Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathumthani province, Thailand

²Microbiological Laboratory Unit, Thammasat University Hospital, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathumthani province, Thailand

*Corresponding Author: (e-mail: seksun@hotmail.com)

บทนำ

เชื้อ *Campylobacter jejuni* เป็นเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน มีรายงานว่าเชื้อ *Campylobacter* พบมากที่สุดในตัวอย่างอุจจาระที่ได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง รองลงมาคือ *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* และ *Escherichia coli* ตามลำดับ โดยเฉพาะ *Campylobacter jejuni* พบมากถึงร้อยละ 80 ในขณะที่ *Campylobacter coli* พบเพียงร้อยละ 20⁽¹⁾ การติดเชื้อ *Campylobacter spp.* เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก ไม่ว่าจะเป็นประเทศกำลังพัฒนา หรือประเทศที่พัฒนาแล้ว⁽²⁾ และในประเทศไทยพบว่าเป็นสาเหตุหลักของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงโดยเฉพาะในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี⁽³⁾ สาเหตุของการติดเชื้อเกิดจากการติดต่อกับสัตว์สู่คน (zoonosis) โดยการสัมผัสหรือบริโภคอาหารสุกๆดิบๆ โดยเฉพาะอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ปีกที่ปรุงไม่สุกจะมีเชื้อปนเปื้อนมากกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ⁽⁴⁾ หรือการดื่มนมที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ หรือการดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนเชื้อ เนื่องจาก *C. jejuni* พบได้ในสิ่งแวดล้อม สัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า รวมไปถึงแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ปัจจัยที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคของ *Campylobacter spp.* มีหลายปัจจัยเช่น เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ ความสามารถในการเกาะติด เพิ่มจำนวนและบุกรุกเข้าเซลล์ รวมทั้งมีการสร้างสารพิษเพื่อทำลายเซลล์โฮสต์ได้ อาการหลังจากติดเชื้อคือ มีไข้ คลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายเป็นน้ำ บางรายหากมีอาการรุนแรงอาจต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล นอกจากนี้ยังสามารถก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนหลังการติดเชื้อในผู้ป่วยบางราย ได้แก่ Guillain-Barré Syndrome (GBS) อันเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำลายเส้นประสาทส่วนปลายของตนเอง เนื่องจาก lipo-oligosaccharide (LOS) บริเวณผนังเซลล์ของ *C. jejuni* มีโครงสร้างคล้ายกับส่วนของ ganglioside (GM1) ในเซลล์ประสาทของมนุษย์ ดังนั้นเมื่อผู้ป่วยติดเชื้อร่างกายจะสร้าง antibody ทำลาย LOS ของตัวเชื้อและ ganglioside ของผู้ป่วยเอง ทำให้เส้นประสาทส่วนปลายของอวัยวะเหล่านั้นสูญเสียหน้าที่การทำงาน เกิด

อาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง ชา เดินเซ ซึ่งอาจพบอัตราการเสียชีวิตถึงร้อยละ 2-3 แต่บางรายก็สามารถหายเองได้ มีรายงานการพบการดื้อยาในกลุ่ม Quinolone ซึ่งเป็นยาหลักในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Campylobacter spp.* ในหลาย ๆ ประเทศ ทำให้การรักษาผู้ป่วยมีข้อจำกัดและมีความยุ่งยากมากขึ้น⁽²⁾ ปัจจุบันมีผู้ทำการศึกษาขึ้นที่ก่อความรุนแรงของโรค ได้แก่ *flaA*, *cadF*, *racR*, *dnaJ*, *virB11*, *ciaB*, *Cj0486*, *pldA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *wlaN*, *cgtB* และ *cstII* นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ Gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) ที่ทำให้เชื้อเกาะผนังลำไส้ของสัตว์ปีกได้⁽⁵⁾ อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีข้อมูลน้อยมากที่เกี่ยวกับความสัมพันธ์ของยีนเหล่านี้กับการเกิดโรค และความแตกต่างของการตรวจพบยีนก่อโรคของเชื้อที่แยกได้จากมนุษย์และสัตว์ โดยเฉพาะในประเทศไทยยังไม่มีผู้ทำการศึกษา ดังนั้นในการศึกษานี้ ผู้วิจัยสนใจศึกษายีนก่อความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อที่แยกได้จากมนุษย์และสัตว์ เพื่อเป็นประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยาและความเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในมนุษย์

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. แบบที่เรียที่ใช้ในการศึกษา

1.1 *Campylobacter* สายพันธุ์อ้างอิง (*C. jejuni* ATCC33560, *C. coli* ATCC 33559, *C. fetus* ATCC 27374, *C. jejuni* 81-176, *C. jejuni* ATCC 43432)

1.2 *Campylobacter jejuni* ที่เพาะแยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยโรคท้องร่วงอายุต่ำกว่า 5 ปีจำนวน 26 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ และ โรงพยาบาลบาราศณราดรุ ในช่วงปี พ.ศ. 2551 – 2552

1.3 *Campylobacter jejuni* ที่เพาะแยกได้จากไก่ที่ไม่เป็นโรคจำนวน 26 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างมาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณเขตกรุงเทพมหานคร

เชื้อตัวอย่างจาก stock ที่เก็บอยู่ในอาหาร tryptic soy broth ที่ -80°C ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood Agar และบ่มเพาะเชื้อภายใต้ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศที่มีออกซิเจนน้อย ($10\% \text{CO}_2$, $5\% \text{O}_2$ and $85\% \text{N}_2$) โดยใช้ Oxoid™ CampyGen™

2. การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ ciprofloxacin และ doxycycline ด้วยวิธี E-test

ปรับความขุ่นของเชื้อใน Normal Saline Solution (NSS) ให้เท่ากับ 0.5 McFarland ใช้ไม้พันสำลีจุ่มใน NSS ที่ปรับความขุ่นแล้ว บิดให้หมาดๆ ป้ายลงบน Mueller Hinton sheep blood agar ให้ทั่ว วาง E-test strip ของ ciprofloxacin หรือ doxycycline (© Liofilchem® MIC Test Strip Technical Sheet) วางบนอาหารที่ป้ายเชื้อแล้ว บ่มเพาะที่ 42°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลเป็น MIC โดยแปลค่าความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพของ ciprofloxacin ($S<1$; $I = 2$; $R>4 \mu\text{g/ml}$) และ doxycycline ($S<2$; $I = 4$; $R>8 \mu\text{g/ml}$) ตามเกณฑ์ ของ CLSI, M45-A2, 2010(6) ทั้งนี้มีการควบคุมการทดสอบ E test ด้วย *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 โดยค่าที่ยอมรับได้ สำหรับ ciprofloxacin เท่ากับ 0.06 – 0.25 และ doxycycline เท่ากับ 0.12 – 0.5

3. การเตรียม DNA Template

เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ จากอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ลงใน microtube ที่มี 1XTE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 20 นาที และวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำ DNA ที่อยู่บริเวณส่วนใส (supernatant) ใช้เป็น DNA template ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป

4. การตรวจหาชิ้นก่อนความรุนแรงของโรคด้วยวิธี single PCR

นำ DNA template ของ *C. jejuni* มาศึกษาชนิดของชิ้นก่อนความรุนแรงของโรค ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) โดย PCR mixture (50 μl) ประกอบด้วย 2 μl ของ DNA template และ forward และ reverse primers ความเข้มข้น 10 $\mu\text{mol/l}$ อย่างละ 1 μl ปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นด้วย predenature ที่ 94°C 3 นาที จากนั้นทำ PCR ต่ออีก 25 รอบ โดย denaturation ที่ 94°C 30 วินาที, annealing ที่ $45-60^{\circ}\text{C}$ 40 วินาที, extension ที่ 72°C 40 วินาที และ final extension ที่ 72°C 1 นาที ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการแยกในกระแสไฟฟ้าใน agarose gel เข้มข้นร้อยละ 2

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

	Primer name	Nucleotide sequence (5’----3’)	Target	Annealing Temp. (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและการเจริญแบ่งตัวของเชื้อ	<i>racR230F</i>	CATCGGCTAGAGGTGACTT	<i>racR</i>	49	365	This study
	<i>racR595R</i>	CCCTTAAGCGACCGATGAT				
	<i>dnaJ-299F</i>	AAGGCTTTGGCTCATC	<i>dnaJ</i>	45	720	Datta <i>et al</i> , 2003 ⁽⁹⁾
	<i>dnaJ-1003R</i>	CTTTTTGTTCATCGTT				
	<i>ceuE405F</i>	GATAAAGTCGTTGGCGTTCC	<i>ceuE</i>	60	405	Feodoroff <i>et al</i> , 2010 ⁽⁷⁾
	<i>ceuE405R</i>	GCGAGATTGGAGGACCAAAGG				
	<i>cadF-F2B</i>	TTGAAGGTAATTTAGATATG	<i>cadF</i>	45	400	Datta <i>et al</i> , 2003 ⁽⁹⁾
	<i>cadF-R1B</i>	CTAATACCTAAAGTTGAAAC				
	<i>ansB - F</i>	GGGGAATGGTAACTCCACAA	<i>ansB</i>	55	195,236 ^a	De Haan <i>et al</i> , 2012 ⁽¹⁰⁾
	<i>ansB – 2R</i>	CCTGCTATCCTTCCACCTGT				
	<i>ggt-IF50</i>	GGGTAAATAAGAAGTTAGAATTC	<i>ggtIF</i>	55	1715	Barnes <i>et al</i> , 2007 ⁽¹¹⁾
	<i>ggt-IF100</i>	CTTGATAAAGGCGGAAATGCC				
	<i>Cjggt_F1</i>	TTTTAGCCATATCCGCTGCT	<i>ggtF1</i>	55	339	Gonzalez <i>et al</i> , 2009 ⁽¹²⁾
	<i>Cjggt_R1</i>	AGCTGGAGTACCAGGAA				
	<i>Cjggt_F2</i>	AAATAGCTTGGTATTGTGCT	<i>ggtF2</i>	55	373	Gripp <i>et al</i> , 2011 ⁽¹³⁾
	<i>Cjggt_R1</i>	AGCTGGAGTACCAGGAA				
	<i>fucP - F</i>	GATAGAGCATTAAATTGGGATG	<i>fucP</i>	55	1263	De Haan <i>et al</i> , 2012 ⁽¹⁰⁾
	<i>fucP - R</i>	CCTATAAAGCCATACCAAGCC				
	<i>pldA - 84F</i>	AAGCTTATGCGTTTTT	<i>pldA</i>	45	913	Feodoroff <i>et al</i> , 2010 ⁽⁷⁾
	<i>pldA - 981R</i>	TATAAGGCTTTCTCCA				
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด GBS	<i>wlaN – DL39</i>	TTAAGAGCAAGATATGAAGGTG	<i>cgtB</i>	55	563	Feodoroff <i>et al</i> , 2010 ⁽⁷⁾
	<i>cgtB - R</i>	GCACATAGAGAACGCTACAA				
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง cytotoxin	<i>CjcdtAU2</i>	AGGACTTGAACCTACTTTTC	<i>cdtA</i>	55	631	Samosornsuk <i>et al</i> , 2007 ⁽⁸⁾
	<i>CjcdtAR2</i>	AGGTGGAGTAGTTAAAAACC				
	<i>CjcdtBU5</i>	ATCTTTTAACCTTGCTTTTGC	<i>cdtB</i>	55	714	
	<i>CjcdtBR6</i>	GCAAGCATTAAATCGCAGC				
	<i>CjcdtCU1</i>	TTTAGCCTTTGCAACTCCTA	<i>cdtC</i>	55	524	
	<i>CjcdtCR2</i>	AAGGGGTAGCAGCTGTAA				

ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

	Primer name	Nucleotide sequence (5'----3')	Target	Annealing Temp. (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการบุกรุกเซลล์โฮสต์	<i>ciaB</i> 355F	CAGAAGGAGAAATTTGTG	<i>ciaB</i>	55	355	Feodoroff <i>et al</i> , 2010 ⁽⁷⁾
	<i>ciaB</i> 355R	ATATCCCATTCTAATGCCACC				
	<i>virB11-232</i>	TCTTGTGAGTTGCCTTACCCCTTTT	<i>virB</i>	55	494	Feodoroff <i>et al</i> , 2010 ⁽⁷⁾
	<i>virB11-701</i>	CCTGCGTGTCTGTGTTATTTACCC				
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่	<i>flaA</i> 664F	AATAAAATGCTGATAAACAGGTG	<i>flaA</i>	55	855	Datta <i>et al</i> , 2003 ⁽⁹⁾

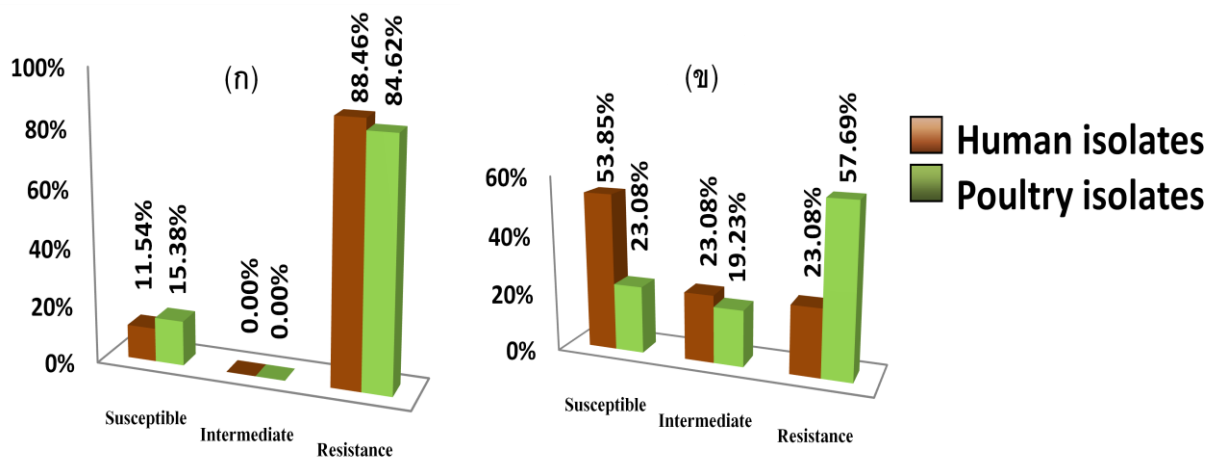
^a ยีน *ansB* ตรวจพบ 2 แบบ คือ แบบที่มียีน secretion signal (40 bp) และแบบที่ไม่มียีน secretion signal ทำให้พบ 2 ขนาด คือ 195 bp และ 236 bp

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อ ciprofloxacin และ doxycycline ด้วยวิธี E-Test

ผลการการทดสอบความไวของเชื้อต่อ ciprofloxacin และ doxycycline ด้วย E-Test (รูปที่ 1) พบว่า เชื้อที่ดื้อต่อ ciprofloxacin และ doxycycline เท่ากับ 45 ตัวอย่าง จาก 52 ตัวอย่าง (ร้อยละ 86.54) และ 26 ตัวอย่าง จาก 52 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40.38) ตามลำดับ เชื้อที่ดื้อต่อ ciprofloxacin พบในสัตว์ปีก 22 ตัวอย่าง จาก 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 84.62) และพบในมนุษย์ 23 ตัวอย่าง

จาก 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 88.46) เชื้อที่ดื้อต่อ doxycycline พบในสัตว์ปีก 15 ตัวอย่าง จาก 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 57.69) และพบในมนุษย์ 6 ตัวอย่าง จาก 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 23.08) โดยเชื้อที่ดื้อต่อ ciprofloxacin จะให้ค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 32 µg/ml และเชื้อที่ดื้อต่อ doxycycline จะให้ค่า MIC ระหว่าง 16 – 256 µg/ml เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Chi-square พบว่า การดื้อต่อยา doxycycline เกี่ยวข้องกับแหล่งที่มาของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.028$)



รูปที่ 1 ร้อยละของผลการทดสอบความไวต่อ (ก) ciprofloxacin และ (ข) doxycycline

2. ผลการตรวจหา virulence Genes ด้วยวิธี single PCR จากการศึกษาพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ (ยีน *flaA*) ร้อยละ 100 ของเชื้อที่แยกได้จากคนและจากสัตว์ปีก การศึกษายีนก่อความรุนแรงที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. jejuni* พบในอัตราที่สูงมากทั้งเชื้อที่แยกได้จากคนและสัตว์ปีก ได้แก่ *racR*, *dnaJ*, *ceuE*, *cadF*, *ansB* และ *pldA* ส่วน *fucP* พบร้อยละ 42.3 และ 61.5 ในคนและสัตว์ปีก ขณะที่ *ggt* พบเพียงร้อยละ 7.7 และ 3.9 ในคนและสัตว์ปีก ตามลำดับ สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการบุกรุกของเซลล์ พบยีน *ciaB* ร้อยละ 100

ใน *C. jejuni* ที่แยกได้จากคนไทยและสัตว์ปีก ในขณะที่ตรวจไม่พบยีน *virB11* เลย

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง cytotoxin หรือ cytolethal descending toxin (*cdt*) คือ *cdtA*, *cdtB* และ *cdtC* พบร้อยละ 100 ของเชื้อจากทั้งสองแหล่ง ส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด GBS พบความถี่ของยีน *cgtB* ร้อยละ 19 ในคนและร้อยละ 7.7 ในสัตว์ปีก (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่ตรวจพบยีน *cgtB* มีความสัมพันธ์กับการดื้อต่อ doxycycline แบบ intermediate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.028$)

ตารางที่ 2 ร้อยละของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคใน *C. jejuni* ที่ได้จากคนและสัตว์ปีก

Virulence gene	<i>Campylobacter jejuni</i>	
	Human (%)	Poultry (%)
<i>flaA</i>	100	100
<i>racR</i>	100	100
<i>dnaJ</i>	100	100
<i>cadF</i>	100	96.2
<i>pldA</i>	88.6	62.3
<i>ceuE</i>	100	100
<i>ggt</i>	7.7	3.9
<i>ansB</i>	100	92
<i>fucP</i>	42.3	61.5
<i>ciaB</i>	100	100
<i>virB</i>	0	0
<i>cdt</i>	100	100
<i>cgtB</i>	19.2	7.7

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากผลการทดสอบความไวต่อ ciprofloxacin ของ *C. jejuni* (รูปที่ 1-ก) พบการดื้อต่อยาชนิดนี้สูงมากในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันจากเชื้อทั้งสองแหล่ง (ร้อยละ 88.46 จากคน และร้อยละ 84.62 จากสัตว์) ซึ่งการดื้อต่อ

ciprofloxacin ในประเทศไทยมีรายงานการดื้อยาในอัตราที่สูงมานานแล้ว⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากมีการใช้ยา ciprofloxacin รักษาโรคท้องร่วงที่เกิดจากการติดเชื้อ *C. jejuni* มากขึ้น และมีรายงานการดื้อต่อ ciprofloxacin ของเชืวดังกล่าวในอัตราที่สูงมากในหลายๆ ประเทศทั้งใน

ประเทศจีน⁽¹⁷⁾ มาเลเซีย⁽¹⁸⁾ โปรตุเกส⁽¹⁹⁾ ซึ่งพบในอัตราที่สูงมากกว่าร้อยละ 90 ในประเทศ เกาหลีใต้⁽²⁰⁾ อิหร่าน⁽²¹⁾ อิตาลี⁽²²⁾ และสโลวาเนีย⁽²³⁾ มีอัตราการดื้อมากกว่าร้อยละ 80 จากการศึกษา⁽⁹⁾ จะเห็นได้ว่าอัตราการดื้อ ciprofloxacin ของ *C. jejuni* ในประเทศไทยก็มีอัตราสูงเช่นเดียวกับในหลายๆประเทศ ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่า ปัจจุบันไม่สามารถใช้ยา ciprofloxacin ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *C. jejuni* ได้ สำหรับ

จากผลการทดสอบความไวต่อ doxycycline (รูปที่ 1-ข) พบการดื้อต่อยาสูงในสัตว์ปีก (ร้อยละ 57.7) อาจเกิดจากการใช้ยาชนิดนี้ในการรักษาโรคท้องร่วงในสัตว์ปีกมากขึ้น ในขณะที่คน พบการดื้อต่อยาชนิดนี้เพียงร้อยละ 23.1 อาจเป็นผลมาจากยาชนิดนี้ไม่ได้ใช้เป็นยาหลักในการรักษาโรคท้องร่วงที่เกิดจากการติดเชื้อ *C. jejuni* จากการเปรียบเทียบการดื้อยา doxycycline ของแต่ละประเทศ จะเห็นว่า *C. jejuni* ที่แยกได้จากคนนั้นมีอัตราการดื้อต่อยาชนิดนี้ในสัดส่วนที่ต่ำใกล้เคียงกับการศึกษาของประเทศเอธิโอเปีย ซึ่งพบร้อยละ 23.7⁽²⁴⁾ อย่างไรก็ตาม ยังมีรายงานการดื้อยา doxycycline สูงในประเทศฟินแลนด์ซึ่งพบร้อยละ 58⁽⁷⁾

การพบยีนก่อความรุนแรงที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและเพิ่มจำนวนของเชื้อ *C. jejuni* ที่แยกได้จากคนและสัตว์ปีก ในอัตราที่สูงได้แก่ racR, dnaJ, ceuE, cadF, ansB และ pldA ส่วน fucP พบในอัตราปานกลาง ในขณะที่ ggt พบในอัตราที่น้อยมากทั้งในคนและสัตว์ปีก เมื่อเปรียบเทียบยีนที่พบในเชื้อที่แยกได้จากคนและสัตว์ปีกพบว่าอัตราที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นเฉพาะ fucP ที่พบในสัตว์ปีกมากกว่าในคนถึงร้อยละ 20 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษา *C. jejuni* ที่แยกได้จากคนและสัตว์ ในประเทศญี่ปุ่น พบยีน racR และ dnaJ มากกว่าร้อยละ 90 ขณะที่ยีน cadF พบร้อยละ 100 และ ยีน pldA พบร้อยละ 91.1 และ 100 ตามลำดับ⁽⁹⁾ อย่างไรก็ตาม ยีน ggt, fucP และ ansB ในการวิจัยครั้งนี้ มีอัตราที่แตกต่างจากการศึกษาในต่างประเทศ⁽¹⁰⁾ ยีน ggt เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง

gamma glutamyltranspeptidase (GGT) มีผลทำให้ *C. jejuni* สามารถเกาะและเพิ่มจำนวนอยู่ในทางเดินอาหารของไก่ได้นานขึ้น⁽⁵⁾ ในการศึกษารังนี้พบว่า *C. jejuni* ที่แยกได้จากคนพบร้อยละ 7 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานในประเทศเยอรมัน ที่พบยีนนี้ใน *C. jejuni* ร้อยละ 5 ที่พบจากสัตว์ปีกในงานวิจัยนี้มีอัตราที่น้อยกว่ามากคือร้อยละ 3 ขณะที่รายงานของประเทศเยอรมัน พบมากถึงร้อยละ 30 จึงอาจเป็นตัวบ่งชี้ว่า *C. jejuni* มีความสามารถในการเกาะติดและคงอยู่ที่ลำไส้ของไก่ได้น้อยกว่าสายพันธุ์จากต่างประเทศ⁽¹³⁾ สำหรับ ansB และ fucP เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารชีวโมเลกุลของตัวเชื้อ ซึ่ง ansB เกี่ยวข้องกับการใช้ L-asparagine ในขณะที่ fucP เกี่ยวข้องกับการใช้ L-fucose ซึ่งทั้ง L-asparagines และ L-fucose นี้อยู่บริเวณ mucus ของทางเดินอาหาร ซึ่งการที่เชื้อสามารถใช้สารสองชนิดนี้ได้จะทำให้เชื้อมีความสามารถในการเกาะติดและเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น ซึ่งอาจเป็นตัวบ่งชี้ว่า *C. jejuni* ที่แยกได้ในประเทศไทย มีความสามารถในการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ดี^(25,26) นอกจากนี้ *C. jejuni* จากงานวิจัยนี้ พบทั้ง ansB และ fucP ในอัตราที่สูงกว่าการศึกษาของประเทศฟินแลนด์ ซึ่งตรวจพบ ansB ของเชื้อ *C. jejuni* ในคนและสัตว์ ร้อยละ 51.8 และ 60.6 ตามลำดับ ขณะที่ยีน fucP พบร้อยละ 28.5 และ 18.3 ตามลำดับ⁽¹⁰⁾ ในงานวิจัยนี้ การตรวจพบยีน fucP ในคนสูงถึงร้อยละ 42.3 และในสัตว์สูงถึงร้อยละ 61.5 อาจบ่งชี้ว่าเชื้อ *C. jejuni* ในคนไทย ก็สามารถเป็นโฮสต์ เก็บกักเชื้อ *C. jejuni* ได้เช่นเดียวกับสัตว์ปีก นอกจากนี้ *C. jejuni* น่าจะมีความสามารถในการยึดเกาะติดในทางเดินอาหารไก่ได้น้อยกว่า *C. jejuni* จากประเทศอื่นในการศึกษาก่อนหน้า⁽¹³⁾ แต่กลับมีความสามารถในการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ดี ทำให้เชื้อ *C. jejuni* ในไทย อาจจะก่อโรคได้ดีกว่าในต่างประเทศดังมีรายงานว่าคนที่เดินทางเข้ามายังประเทศไทยแล้วเกิดอาการอุจจาระร่วงเกิดจากการติดเชื้อ *C. jejuni* เป็นอันดับสี่ แต่ *C. jejuni* กลับทำให้เกิดอาการต่างๆได้มากที่สุด ในเชื้อทั้งหมดที่เกี่ยวข้อง

กับอาการท้องร่วง⁽¹²⁾ สำหรับการตรวจยีนที่เกี่ยวข้องกับการบุกรุกเซลล์ ได้แก่ ยีน *ciaB* และ *virB* พบร้อยละ 100 และ 0 ตามลำดับ ทั้งในคนและสัตว์ อาจแสดงว่าเชื้อ *C. jejuni* ในไทย อาจไม่ต้องการยีน *virB11* ในการก่อโรคก็ได้ แต่ทั้งนี้พบว่ารายงานส่วนใหญ่พบ *virB11* ประมาณร้อยละ 10^(9,27,28) ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าโดยทั่วไป *C. jejuni* ก็ไม่มียีนตัวนี้อยู่แล้ว เพียงแต่สายพันธุ์ที่มียีนนี้จะสามารถก่อโรคได้รุนแรงมากยิ่งขึ้นกว่าเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีนนี้ เนื่องจาก *virB11* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการบุกรุกเข้าเซลล์โฮสต์ ซึ่งมีการศึกษาเปรียบเทียบเชื้อที่มี *virB* กับเชื้อที่ *virB* mutant พบว่า เชื้อที่ *virB* mutant มีความสามารถในการเกาะติดและบุกรุกเซลล์ลดลงถึง 11 เท่า⁽²⁹⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ พบว่ายีน *ciaB* ในการศึกษาที่มีอัตราสูงเช่นเดียวกับการศึกษาของประเทศญี่ปุ่น⁽⁹⁾ เยอรมันนี⁽¹³⁾ และฟินแลนด์⁽⁷⁾ ซึ่งตรวจพบ ร้อยละ 99-100 ขณะที่รายงานการพบยีน *virB11* ของเชื้อในประเทศญี่ปุ่น⁽⁹⁾ จีน⁽²⁷⁾ และสหรัฐอเมริกา⁽²⁸⁾ มีความถี่ของยีนชนิดนี้น้อยมากเพียงร้อยละ 9-10 ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง cytotoxin หรือ cytolethal descending toxin (*cdt*) ได้แก่ *cdtA* *cdtB* และ *cdtC* พบร้อยละ 100 ของ *C. jejuni* ที่แยกได้จากทั้งคนและสัตว์ปีกในประเทศไทย ซึ่งสารพิษชนิดนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ในทางเดินอาหารของโฮสต์ ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้ ซึ่งการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น พบยีนนี้ใน *C. jejuni* ร้อยละ 100⁽⁹⁾ ข้อมูลดังกล่าวนี้อาจเป็นตัวบ่งชี้ว่า *C. jejuni* ที่แยกได้จากการศึกษานี้มีความสามารถในการทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้ใกล้เคียงกับประเทศอื่น การศึกษายีน *cgtB* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิด GBS ในประเทศฟินแลนด์ *C. jejuni* ที่แยกได้จากคนและสัตว์ พบ *cgtB* ร้อยละ 19.2 และ 7.7 ตามลำดับ⁽⁷⁾ ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้

นอกจากนี้พบว่า *C. jejuni* ที่พบยีน *cgtB* ที่ให้ผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพแบบ intermediate ต่อยา doxycycline เท่านั้น ซึ่งยีน *cgtB* เป็นส่วนหนึ่งของ

ยีนบน LOS class A และ class B ของเชื้อ *C. jejuni*⁽²⁹⁾ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Ellström และคณะ ในปี 2013⁽³⁰⁾ พบความสัมพันธ์ของเชื้อ *C. jejuni* ที่มี LOS class B กับการดื้อต่อยา doxycycline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามยังไม่รายงานที่เกี่ยวข้องที่แสดงกลไกที่แน่ชัดระหว่างการดื้อต่อยา doxycycline กับลักษณะโครงสร้างของ LOS classBของเชื้อดังกล่าว

สรุปผลงานวิจัย

จากการศึกษานี้พบว่า *C. jejuni* ที่แยกได้ทั้งจากมนุษย์และสัตว์มีอัตราการดื้อต่อยา ciprofloxacin ในอัตราที่สูงถึงร้อยละ 88 และ 84 ตามลำดับ ในขณะที่แยกได้จากสัตว์ มีแนวโน้มดื้อต่อยา doxycycline (ร้อยละ 57) มากกว่าที่แยกได้จากคน (ร้อยละ 23) อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.028$) ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ยา doxycycline ในการรักษาไก่ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย ในการศึกษาที่พบว่ามียีนก่อความรุนแรงบางยีน ได้แก่ *ansB* และ *fucP* พบในอัตราที่สูงกว่ารายงานในบางประเทศ ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและการเพิ่มจำนวน (adhesion and colonization) ข้อมูลนี้อาจเป็นตัวบ่งชี้ว่า *C. jejuni* ในประเทศไทยมีความสามารถในการเกาะติดและเพิ่มจำนวนได้ดีกว่า *C. jejuni* ที่พบในต่างประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2556 ประเภททุนวิจัยทั่วไป

เอกสารอ้างอิง

1. Bodhidatta L, Vithayasai N, Eimpokalarp B, Pitarangsi C, Serichantalergs O, Isenbarger DW, Bacterial enteric pathogens in children with acute dysentery in Thailand: increasing importance of

- quinolone-resistant *Campylobacter*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; 33: 752-7.
2. Jorgensen JH, Hindler JF. New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. *Clin Infect Dis: Public Infect Dis Soc America* 2007; 44: 280-6.
 3. NuttaTragulsoontornchai, Samosornsuk S, Samosornsuk W. *cdtB* gene-based multiplex PCR for detection of *Campylobacter* spp. isolated from rectal swab culture of diarrheal children in Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute. *J Med Tech PhyTher* 2012; 24: 155-63.
 4. Zhao C, Ge B, De Villena JD, Sudler R, Yeh E, Zhao S, et al. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 5431-6.
 5. Barnes IH, Bagnall MC, Browning DD, Thompson SA, Manning G, Newell DG. Gamma-glutamyltranspeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. *MicrobPathog* 2007; 43: 198-207.
 6. CLSI (2010) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline 2nd edition, M45-A2: Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, pp. 16
 7. Feodoroff B, Ellstrom P, Hyytiainen H, Sarna S, Hänninen ML, Rautelin H. *Campylobacter jejuni* isolates in Finnish patients differ according to the origin of infection. *Gut Pathog.* 2010; 2: 22.
 8. Samosornsuk W, Asakura M, Yoshida E, Tagushi 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.
 9. Datta S, Niwa H, Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J Med Microbiol* 2003; 52: 345-8.
 10. de Haan CP, Llarena AK, Revez J, Hänninen ML. Association of *Campylobacter jejuni* metabolic traits with multilocus sequence types. *App Environ Microbiol* 2012; 78: 5550-4.
 11. Barnes IH, Bagnall MC, Browning DD, Thompson SA, Manning G, Newell DG. Gamma-glutamyltranspeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. *MicrobPathog* 2007; 43: 198-207.
 12. Gonzalez M, Hakkinen M, Rautelin H, Hänninen ML. Bovine *Campylobacter jejuni* strains differ from human and chicken strains in an analysis of certain molecular genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 1208-10.
 13. Gripp E, Hlahla D, Didelot X, Kops F, Maurischat S, Tedin K, et al. Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. *BMC Genom* 2011; 12: 584.

14. Serichantalergs O, Pootong P, Dalsgaard A, Bodhidatta L, Guerry P, David R, et al. PFGE, Lior serotype, and antimicrobial resistance patterns among *Campylobacter jejuni* isolated from travelers and US military personnel with acute diarrhea in Thailand, 1998-2003. *Gut Pathog* 2010; 2: 15.
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 Immun* 2007; 51: 531-7.
16. 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.
17. Ma L, Wang Y, Shen J, Zhang Q, Wu C. Tracking *Campylobacter* contamination along a broiler chicken production chain from the farm level to retail in China. *Int J Food Microbiol* 2014; 181: 77-84.
18. Wiecek K, Dykes GA, Osek J, Duffy LL. Antimicrobial resistance and genetic characterization of *Campylobacter* spp. from three countries. *Food Control* 2013; 34: 84-91.
19. Duarte A, Santos A, Manageiro V, Martins A, Fraqueza MJ, Caniça M, et al. Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: high genetic diversity and antibiotic resistance rates. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44: 306-13.
20. Wei B, Cha SY, Kang M, Roh JH, Seo HS, Yoon RH, et al. Antimicrobial Susceptibility Profiles and Molecular Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates from Ducks in South Korea. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80: 7604-10.
21. Zendehbad B, Arian AA, Alipour A. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from poultry meat in Khorasan province, Iran. *Food Control* 2013; 32: 724-7.
22. Nobile CGA, Costantino R, Bianco A, Pileggi C and Pavia M Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in Southern Italy. *Food Control* 2013 ; 32: 715-8.
23. Kovac J, Cadez N, Lusicky M, Nielsen EM, Ocepek M, Raspor P, et al. The evidence for clonal spreading of quinolone resistance with a particular clonal complex of *Campylobacter jejuni*. *Epidemiol Infect* 2014; 142: 2595-603.
24. Belay Tafa TS, HaimanotTassew, and Daniel Asrat. Isolation and Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Campylobacter* Species among Diarrheic Children at Jimma, Ethiopia. *Int J Bacteriol* 2013; 2014: 7.
25. Hofreuter D, Tsai J, Watson RO, Novik V, Altman B, Benitez M, et al. Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infect Immun* 2006; 74: 4694-707.
26. Hofreuter D, Novik V, Galan JE. Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell Host Microbe* 2008; 4: 425-33.

27. Zhang MJ, Gu YX, Ran L. Multi-PCR identification and virulence genes detection of *Campylobacter jejuni* isolated from China. *ZhonghuaLiuxingbingxueZazhi* 2007; 28: 377-80.
28. Hanning I, Biswas D, Herrera P, Roesler M, Ricke SC. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from pasture flock poultry. *J Food Sci* 2010; 75: 496-502.
29. Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP et al. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun* 2000; 68: 4384-90.
30. Ellström P, Feodoroff B, Hänninen ML, Rautelin H. Characterization of clinical *C. jejuni* isolates with special emphasis on lipooligosaccharide locus class, putative virulence factors and host response. *Int J Med Microbiol* 2013; 303:134- 9.