

**ความแตกต่างทางอณูวิทยาของเชื้อ *Campylobacter jejuni* ในจังหวัด
มหาสารคาม ขอนแก่น ร้อยเอ็ด และนครพนม ด้วยเทคนิค PCR-RAPD**
**Molecular typing of *Campylobacter jejuni* isolated from
Mahasarakham, Khon-kaen, Roi-Ed and Nakhonphanom provinces
by PCR-RAPD**

เกษร ไพโรจน์วรการ (Kesorn Pairotwarakarn)²

ณฐนนท์ ตราชู (Nathanon Trachoo)^{1*}

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความแตกต่างทางอณูวิทยาของเชื้อ *C. jejuni* ที่แยกได้ในจังหวัดมหาสารคาม ขอนแก่น ร้อยเอ็ด และนครพนม ทั้งหมด 21 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR-RAPD โดยใช้ primer OPL-07: 5' -AGG CGG GAA C-3' พบว่าได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 11 patterns และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์สามารถแบ่งตัวอย่างเชื้อ *C. jejuni* ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Cluster A ประกอบด้วยเชื้อ จำนวน 14 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ Cluster A1 ประกอบด้วยเชื้อ จำนวน 9 สายพันธุ์ คือ FBRL-S14, FBRL-S15, FBRL-S22, FBRL-S26, FBRL-S29, FBRL-S35, FBRL-S41, FBRL-S57 และ FBRL-S58 Cluster A2 ประกอบด้วยเชื้อ จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ FBRL-S01, FBRL-S05, FBRL-S23, FBRL-S36 และ FBRL-S61 และ Cluster B ประกอบด้วยเชื้อ จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ FBRL-S20, FBRL-S25, FBRL-S37, FBRL-S70, FBRL-S71 และ FBRL-S73 และพบว่าเทคนิค PCR-RAPD สามารถบอกความแตกต่างของเชื้อที่แยกมาจากคนละแหล่งได้เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น

Abstract

The molecular typing of 21 isolates of *Campylobacter jejuni* from Mahasarakham, Khon-kaen, Roi-Ed and Nakhonphanom provinces, Thailand was studied using Random Amplified Polymorphic DNA (PCR-RAPD) technique with a random primer, OPL-07. The RAPD DNA profile showed eleven unique DNA band patterns. The *C. jejuni* isolates could be divided into two groups, Cluster A and Cluster B. There were 14 isolates identified as member of Cluster A. There were also two subgenotypes in Cluster A, A1 (FBRL-S14, FBRL-S15, FBRL-S22, FBRL-S26, FBRL-S29, FBRL-S35, FBRL-S41, FBRL-S57 and FBRL-S58) and A2 (FBRL-S01, FBRL-S05, FBRL-S23, FBRL-S36 and FBRL-S61). There were 6 isolates identified as Cluster B (FBRL-S20, FBRL-S25, FBRL-S37, FBRL-S70, FBRL-S71 and FBRL-S73). The results of this study demonstrated that PCR-RAPD could be used to differentiate origins of some strains of *C. jejuni*.

คำสำคัญ : *Campylobacter jejuni*, PCR-RAPD

Keyword : *Campylobacter jejuni*, PCR-RAPD

¹ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

²นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

*corresponding author, e-mail: nathanon.t@msu.ac.th

บทนำ

Campylobacter jejuni เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปเกลียวสั้น ขนาดเล็ก เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารในคนที่พบทั่วโลก ผู้ป่วยเริ่มจากมีอาการเป็นไข้ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วง บางรายร่างกายเสียน้ำมากอาจเสียชีวิตได้ จึงเป็นปัญหาสำคัญทางสุขภาพโภชนาการที่สำคัญในหลายประเทศ จากรายงานพบว่าผู้ป่วยโรคระบบทางเดินอาหารซึ่งเกิดจาก *Campylobacter* ในสหรัฐอเมริกา อังกฤษ เวลส์ สวิสเซอร์แลนด์ เพิ่มขึ้น (Fregiani et al., 2003) ในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *C. jejuni* ในจังหวัดเชียงใหม่ ในเด็กอายุต่ำกว่า 1-2 ขวบ (Poocharoen and Bruin, 1986) และพบการติดเชื้อในคนไทยเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Varavithya et al., 1990) *C. jejuni* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ (normal flora) ของสัตว์หลายชนิด เช่น ไก่ วัว หมู และ แกะ (Ishihara et al., 2006 ; Inglis et al., 2005 ; Varga and Fodor, 1990) มูลไก่ น้ำ เป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญ และยังสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ (Keener et al., 2004) ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะระบุแหล่งที่มาของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค วิธีการวิเคราะห์เชื้อแบบดั้งเดิมซึ่งอาศัยการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests) ไม่สามารถหาความแตกต่างของเชื้อได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้จุลินทรีย์ที่มีลักษณะทางชีวเคมีเหมือนกันทุกประการ อาจมาจากต่างแหล่งและมีความแตกต่างในระดับดีเอ็นเออย่างมากก็ได้ วิธีทางอณูวิทยาเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงในการตรวจหาความแตกต่างของเชื้อในระดับดีเอ็นเอ (Ertas et al., 2004 ; Zorman et al., 2006) และได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้ในการหาความแตกต่างของแบคทีเรีย ได้มีการประยุกต์เพื่อนำมาศึกษาความแตกต่างทางอณูวิทยาของ *Campylobacter* (Payne et al., 1999 ; Misawa et al., 2000) วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (PCR-RAPD) เป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย

โดยอาศัยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยอาศัยหลักการการทำงานของ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 เบส (random primer) ซึ่งไม่จำเพาะต่อยีนใด (Lam et al., 1995) ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความแตกต่างทางอณูวิทยาของเชื้อ *C. jejuni* ที่แยกได้จากตัวอย่างในแหล่งจังหวัดมหาสารคาม ขอนแก่น ร้อยเอ็ด และนครพนม ที่ได้สำรวจแยกเชื้อจากแหล่งที่สามารถปนเปื้อนไปสู่ผู้บริโภคได้ ระหว่างปี พ.ศ.2544-2549 เพื่อประเมินความสัมพันธ์กับการติดตามสืบหาแหล่งปนเปื้อน การทำเช่นนี้จะทำให้สามารถติดตามแหล่งปนเปื้อน ที่มาของจุลินทรีย์ซึ่งจะนำไปใช้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการป้องกัน และแก้ไขการปนเปื้อนได้อย่างถูกต้อง

วิธีการวิจัย

แหล่งที่มาและการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

แหล่งที่มาของเชื้อ 21 สายพันธุ์ ได้แก่ FBRL-S01, FBRL-S05, FBRL-S14 , FBRL-S15, FBRL-S14, FBRL-S20, FBRL-S22, FBRL-S23, FBRL-S25, FBRL-S26 , FBRL-S 29, FBRL-S35, FBRL-S36 , FBRL-S37, FBRL-S41, FBRL-S57, FBRL-S58, FBRL-S61, FBRL-S 70, FBRL-S71 และ FBRL-S73 ได้รับการอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยเชื้อโรคทางอาหารและแผนชีวะภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ซึ่งแยกเชื้อมาจากส่วนต่างๆของไก่ ได้แก่ ลำไส้ ปีก หัวใจ ผิวน้ำนม พื้นโรงเรือนเลี้ยงไก่ จากสุนัข ได้แก่ ลำไส้ ตับ ปอด ม้าม เนื้อ จากลำไส้ไก่ เนื้อปลาตุ๋น และบ่อน้ำ ในจังหวัดมหาสารคาม ขอนแก่น ร้อยเอ็ด และนครพนม ในระหว่างปี พ.ศ.2544-2549 (ตารางที่ 1) ทำการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ใน 15% glycerol – brucella broth ที่อุณหภูมิ -32 องศาเซลเซียส และทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dry)

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของเชื้อ *C. jejuni* ของสายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อ	ที่มา
FBRL-S01	หนังไก่จากร้านค้าแห่งหนึ่ง อ.เมือง จ.ขอนแก่น
FBRL-S05	ลำไส้ไก่จากร้านค้าแห่งหนึ่ง อ.โพนทอง จ.ร้อยเอ็ด
FBRL-S14	มูลไก่ จากร้านค้าแห่งหนึ่ง บ.โนนชัยศรี อ.โพนทอง จ.ร้อยเอ็ด
FBRL-S15	มูลไก่ จากโรงเรือนเลี้ยงไก่แห่งหนึ่ง บ.โนนชัยศรี อ.โพนทอง จ.ร้อยเอ็ด
FBRL-S17	พื้นโรงเรือนเลี้ยงไก่แห่งหนึ่ง บ้านโนนชัยศรี ต.มะอี อ.โพนทอง จ.ร้อยเอ็ด
FBRL-S20	มูลไก่จากโรงเรือนเลี้ยงไก่แห่งหนึ่ง บ.เซ่ง อ.เขียงยืน จ.มหาสารคาม
FBRL-S22	มูลไก่จากโรงเรือนเลี้ยงไก่แห่งหนึ่ง บ.เซ่ง อ.เขียงยืน จ.มหาสารคาม
FBRL-S23	บ่อน้ำแห่งหนึ่ง บ.เซ่ง อ.เขียงยืน จ. มหาสารคาม
FBRL-S25	ปีกไก่จากร้านค้าแห่งหนึ่ง อ.เมือง จ.มหาสารคาม
FBRL-S26	หัวใจไก่ จากร้านค้าแห่งหนึ่ง อ.เมือง จ.มหาสารคาม
FBRL-S29	ลำไส้ไก่จากร้านค้าแห่งหนึ่งในตลาดสดเทศบาล อ.เมือง จ.มหาสารคาม
FBRL-S35	มูลไก่ จากโรงเรือนเลี้ยงไก่แห่งหนึ่ง บ.ถ่าน จ.มหาสารคาม
FBRL-S36	มูลไก่จากโรงเรือนเลี้ยงไก่แห่งหนึ่ง บ.หนองโพน จ.มหาสารคาม
FBRL-S37	บ่อน้ำแห่งหนึ่ง บ.หนองโพน จ.มหาสารคาม
FBRL-S41	ปลาตุ๋นจากร้านค้าแห่งหนึ่งในตลาดสดเทศบาล อ.เมือง จ.มหาสารคาม
FBRL-S57	ลำไส้สุนัขจากร้านค้าแห่งหนึ่ง อ.เมือง จ.นครพนม
FBRL-S58	ลำไส้สุนัขจากร้านค้าแห่งหนึ่ง อ.เมือง จ.นครพนม
FBRL-S61	จากตับสุนัข จากร้านค้าแห่งหนึ่ง อ.เมือง จ.นครพนม
FBRL-S70	จากเนื้อสุนัขจากร้านค้าแห่งหนึ่ง อ.เมือง จ.นครพนม
FBRL-S71	ปอดสุนัขจากร้านค้าแห่งหนึ่ง อ.เมือง จ.นครพนม
FBRL-S73	ม้ามสุนัขจากร้านค้าแห่งหนึ่ง อ.เมือง จ.นครพนม

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทำตามวิธีของ Trachoo (Trachoo and Books, 2005) ตรวจสอบเพื่อยืนยันการเป็นเชื้อ *C. jejuni* ด้วยวิธีย้อมสีแกรม, ทดสอบกับ 3% KOH (Power et al., 1995), ทดสอบการเคลื่อนที่, ทดสอบเอนไซม์ catalase, ทดสอบเอนไซม์ oxidase และยืนยันว่าเป็นเชื้อ *C. jejuni* โดยการเพิ่มจำนวนยีน *hipO* ด้วยเทคนิค PCR (Linton et al., 1997)

การสกัด DNA และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RAPD

สกัด DNA โดยใช้วิธีการย่อยด้วย Proteinase-K และกำจัดโปรตีนด้วย phenol- chloroform มีวิธีดังนี้ นำสารแขวนลอยของเชื้อปริมาตร 1 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนบนทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วย TE buffer 2 รอบ เติม TE buffer ปริมาตร 500 ml และ lysozyme (10 mg/ml) (Promega, U.S.A.) ปริมาตร 100 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติม 2:24:1 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (Peirce, U.S.A.) ปริมาตร 700 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใส แล้วใส่หลอดใหม่ เติม absolute ethanol ในปริมาตรที่เท่ากัน และเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1/10 จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนบนออกไปแล้วล้าง pellet ด้วย 70% alcohol แล้วบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติม TE buffer ปริมาตร 200 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ *C. jejuni* ด้วยเทคนิค PCR (Miwa et al, 2003) โดยทำการคัดเลือก random primer ทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ M-13 : 5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3', R2 : 5' -AGT ACA GGT C-3', 1290 : 5' -GTG GAT GCG A-3', 1283 : 5' -CGA TCC CCA-3', 1247 :

5' -AAG AGC CCG T-3', OPA-02 : 5'-TGC CGA GCT G-3', OPA-13 : 5'-CAG CAC CCA C-3', OPA-18 : 5'-AGG TGA CCG T-3', OPL-07 : 5'-AGG CGG GAA C-3', OPL-16 : 5'-AGG TTG CAG G-3' และ OPM-05 : 5'-GGG AAC GTG T-3' (Sigma, Singapore) โดยทำการปรับเปลี่ยน $MgCl_2$, DNA polymerase (Vivastis) และหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจดูแถบ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis บน 1.5 % agarose gel ที่กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์

การวิเคราะห์ข้อมูล

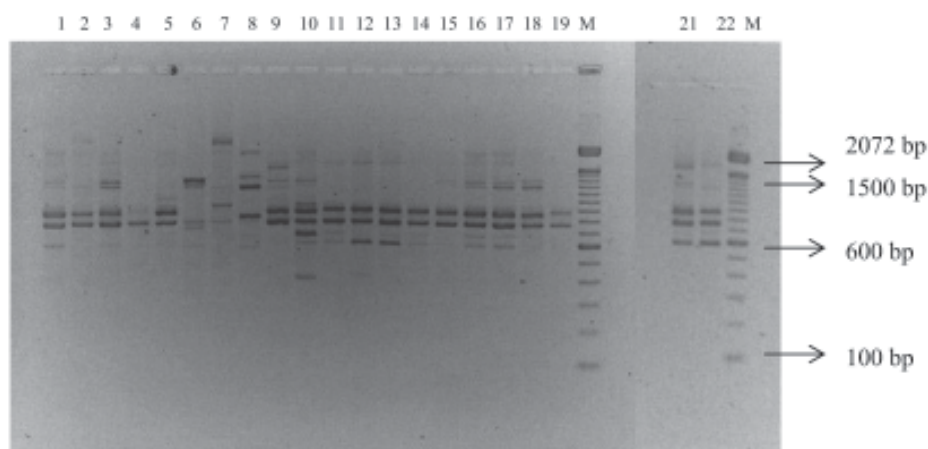
ข้อมูลถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ Program Phylip-3.63 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) โดยนำแถบ DNA ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาให้คะแนน (scored) ให้คะแนนจากการปรากฏ (present) ของแถบที่ตำแหน่งนั้นๆ ให้เท่ากับ 1 และการไม่ปรากฏแถบ (absent) ให้เท่ากับ 0 (วสันต์ และ วีระพงศ์, 2544)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

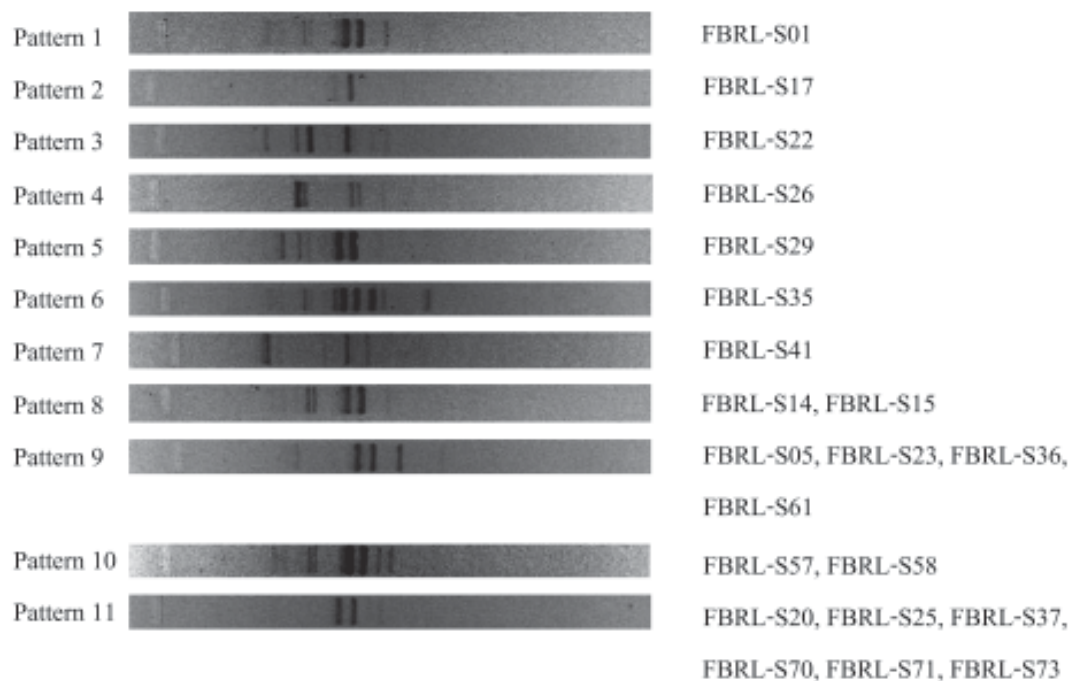
จากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้ง 11 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ OPL-07 สามารถสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากจีโนม ของ *C. jejuni* สายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR-RAPD ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับไพรเมอร์ ชนิดอื่น โดยมีส่วนประกอบหลัก (master mix) ในการเพิ่มจำนวนยีน ดังนี้ 1X PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 1 mM primer OPL-07, 1 unit DNA polymerase และมีขั้นตอนดังนี้ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 45 รอบ จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอพบว่าจะได้ขนาดและจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแตกต่างกัน (patterns) (รูปที่ 1)

ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Stern และคณะ ในปี 2004 ที่ใช้เทคนิค PCR-RAPD ศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *Campylobacter* ที่แยกจากสัตว์ปีกในพื้นที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อ *Campylobacter* จากพื้นที่ต่างกันให้แถบดีเอ็นเอต่างกันด้วย (Stern et al., 2004) โดยในงานวิจัยนี้พบว่า มี patterns ที่แตกต่างกันจำนวน 11 patterns (รูปที่ 2) ได้แก่ pattern 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S01 พบ 3 แถบ, pattern 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S17 พบ 1 แถบ, pattern 3 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S22 พบ 4 แถบ, pattern 4 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S26 พบ 4 แถบ, pattern 5 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S29 พบ 5 แถบ, pattern 6 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S35 พบ 7 แถบ, pattern 7 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S41 พบ 3 แถบ, pattern 8 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S14 และ FBRL-S15 พบ 4 แถบ, pattern 9 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S05, FBRL-S23, FBRL-S36 และ FBRL-S61 พบ 3 แถบ, pattern 10 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S57 และ FBRL-S58 พบ 6 แถบ ส่วน pattern 11 ประกอบด้วยสายพันธุ์ FBRL-S20, FBRL-S25, FBRL-S37, FBRL-S70, FBRL-S71 และ FBRL-S73 พบ 2 แถบ จากข้อมูลการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบ DNA ที่ตำแหน่งเดียวกัน สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. jejuni* ทั้ง 21 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม Phylip พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างเชื้อ *C. jejuni* ได้เป็น 2 Clusters (ภาพที่ 3) คือ Cluster A ประกอบด้วยเชื้อ 14 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ Cluster A1 ประกอบด้วยเชื้อ 9 สายพันธุ์ คือ FBRL-S14, FBRL-S15, FBRL-S22, FBRL-S26, FBRL-S29, FBRL-S35, FBRL-S41, FBRL-S57 และ FBRL-S58, Cluster A2 ประกอบด้วยเชื้อ 5 สายพันธุ์ คือ FBRL-S01, FBRL-S05, FBRL-S23, FBRL-S36 และ FBRL-S61 และ Cluster B ประกอบด้วยเชื้อ 6 สายพันธุ์ คือ FBRL-S20, FBRL-S25, FBRL-S37, FBRL-S70, FBRL-S71 และ FBRL-S73 เมื่อวิเคราะห์ Clusters

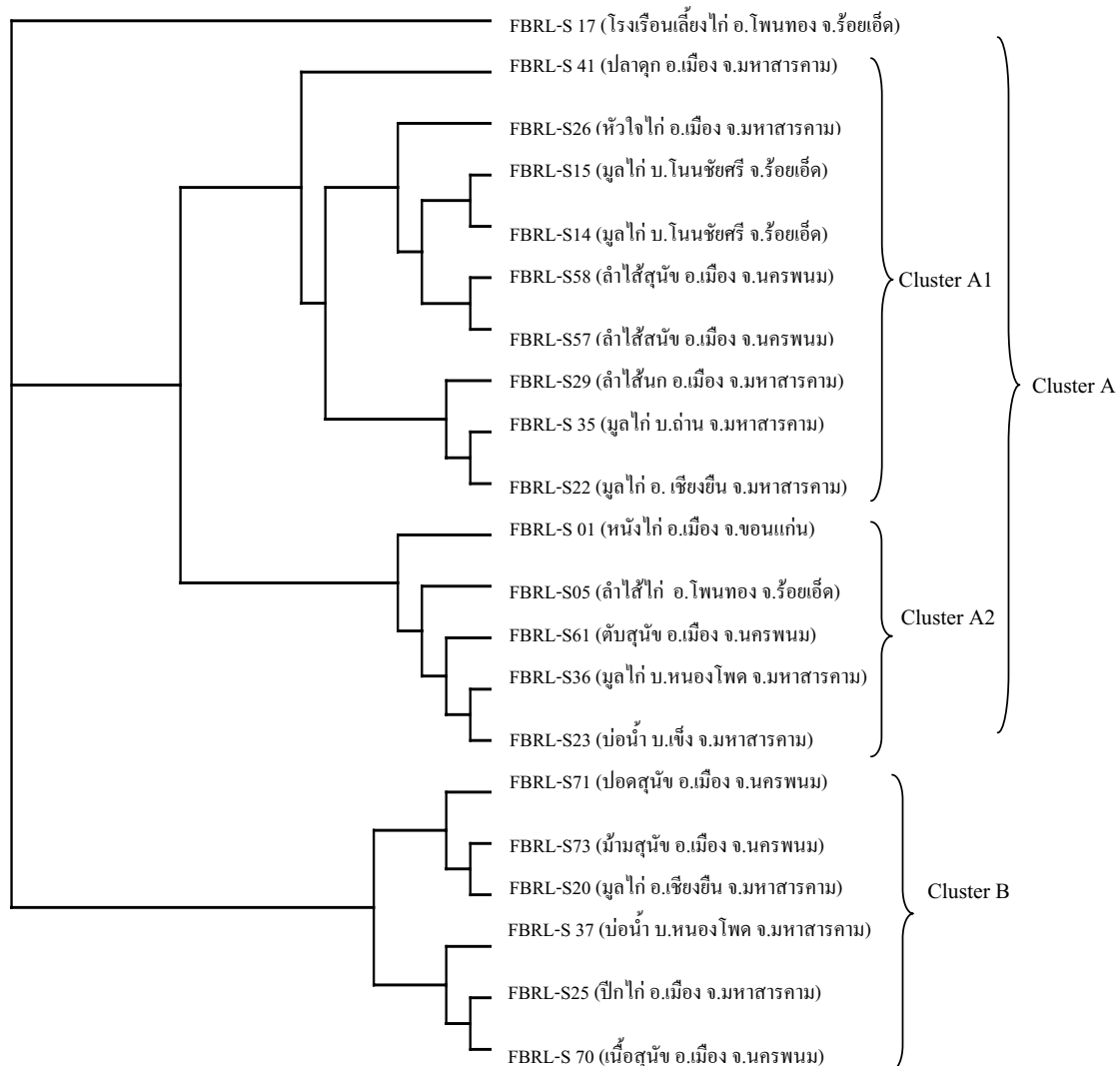
พบว่าสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งเดียวกัน และอยู่ใน Clusters เดียวกัน คือ FBRL-S14 และ FBRL-S15 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จาก มูลไก่ จังหวัดร้อยเอ็ด และ FBRL-S57, FBRL-S58 เป็นเชื้อที่แยกได้จาก ลำไส้สุนัข จังหวัดนครพนม ส่วนสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งต่างกันแต่อยู่ใน Cluster เดียวกัน คือ FBRL-S01, FBRL-S05, FBRL-S60, FBRL-S36 และ FBRL-S23 โดยทั้ง 5 สายพันธุ์จัดอยู่ใน Clusters A2 (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จาก จังหวัดมหาสารคาม ขอนแก่น ร้อยเอ็ด นครพนม และมหาสารคาม และสายพันธุ์ FBRL-S20, FBRL-S25, FBRL-S37, FBRL-S70, FBRL-S71 และ FBRL-S73 โดยทั้ง 6 สายพันธุ์จัดอยู่ใน clusters B ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จาก มหาสารคาม และนครพนม โดยมีเหตุผลที่สามารถอธิบายได้อยู่ 2 ประการคือ ประการแรก เชื้อสายพันธุ์เดียวกันแพร่กระจายไปแหล่งปนเปื้อนคนละแหล่งโดยการปนเปื้อนข้าม (Hook et al., 2005) หรือโดยอาศัยพาหะหลายชนิดเช่น แมลง สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า สัตว์กัดแทะ น้ำ และอาหารรวมทั้งการขนส่งสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ด้วย (Misawa et al., 2000 ; Namchamkin and Tornskins, 1992 ; Wassenaar and Newell, 1997) ประการที่สอง เชื้อ *C. jejuni* นี้เป็นเชื้อที่มีความหลากหลายสูงมาก (Zorman et al., 2006) อย่างไรก็ดีตามความแม่นยำของเทคนิค PCR-RAPD ยังขึ้นกับการเลือกใช้ primer อีกด้วย เช่นในปี 2005 Workman และคณะ ทำการศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนกันของเชื้อ *C. jejuni* ที่แยกจากแหล่งที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไก่ หมู สุนัข แมว และ นกป่า กับเชื้อ *C. jejuni* ที่แยกจากคน ด้วยเทคนิค PCR-RAPD โดยใช้ primer OPA-11 และ HLWL-85 พบว่าเชื้อ *C. jejuni* ที่แยกจากไก่และคนมีความเหมือนกัน จึงสรุปว่าเนื้อไก่อาจเป็นพาหะของเชื้อ *C. jejuni* ที่ทำให้คนติดเชื้อได้ (Workman et al., 2005) นอกจากนี้เทคนิค PCR-RAPD ยังมีข้อเสียอีกข้อคือจะเกิดแถบดีเอ็นเอบางแถบที่ไม่ชัดเจนและขนาดเล็ก ผู้วิจัยไม่แน่ใจว่าควรนับรวมให้เป็นแถบดีเอ็นเอหรือไม่ (Ertas et al., 2004 ; Lam et al., 1995)



รูปที่ 1 การเพิ่มปริมาณ DNA จากจีโนมเชื้อ *C. jejuni* สายพันธุ์ต่างๆด้วยเทคนิค PCR-RAPD โดยใช้ primer OPL-07 Lane M คือ DNA marker 100 bp, (1)FBRL S-01, (2)FBRL S-37, (3)FBRL S-15, (4)FBRL S-17, (5)FBRL S-20, (6)FBRL S-26, (7) FBRL S-41, (8)FBRL S-22, (9)FBRL S-29, (10)FBRL S-35, (11)FBRL S-70, (12)FBRL S-05, (13)FBRL S-36, (14)FBRL S-73, (15)FBRL S-25, (16)FBRL S-58, (17)FBRL S-57, (18)FBRL S-14, (19)FBRL S-71, (20)FBRL S-23 , (21)FBRL S-61



รูปที่ 2 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *C. jejuni* จำนวน 21 สายพันธุ์ที่เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR-RAPD โดยใช้ primer OPL-07



รูปที่ 3 การจัดกลุ่มของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *C. jejuni* จำนวน 21 สายพันธุ์ เมื่อตรวจด้วยเทคนิค PCR-RAPD โดยใช้ primer OPL-07 และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phylip 3.63

สรุป

การแยกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR-RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPL-07 เพื่อสืบย้อนหลังไปยังแหล่งที่มาของเชื้อ *C. jejuni* อาจทำได้ยาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่างหนึ่งตัวอย่างอาจปนเปื้อนด้วย *C. jejuni* หลายสายพันธุ์ และมีการปนเปื้อนข้าม นอกจากนี้ธรรมชาติของเชื้อ *C. jejuni* ยังมีความหลากหลายมาก (extreme heterogeneity) (Zorman et al., 2006)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินแผ่นดิน ประจำปี 2550 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง

- วิสุทธิ ไบไม้. 2535. พันธุศาสตร์ . พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ศิริพร ลิทธิประณีต. 2531. พันธุวิศวกรรม ปฏิบัติการเองต้น. กรุงเทพฯ : หน่วยปฏิบัติงานวิจัยพันธุวิศวกรรม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช.
- วสันต์ จันทราทิตย์ และวีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2544. ชีวสารสนเทศศาสตร์. สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย.
- Ertas, B.H., B. Cetinkaya, A. Muz and H. Ongor. 2004. Genotyping of broiler-originate *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using *fla* and random amplified polymorphic DNA methods. **Int. J. Food Microbiol.** 94: 203-209.
- Fregiani, V.W and R. Stephan. 2003. Resistance pattern of *Campylobacter* spp. strain isolate from poultry carcasses in a big swiss poultry slaughterhouse. **Int. J. Food Microbiol.** 89: 233-240.
- Hook, H.M., A.F. Ericsson, H. I. Vagsholm and M. Danielsson-Tham. 2005. Genotype dynamics of *Campylobacter jejuni* in a broiler flock. **Vet. Microbiol.** 106: 109-117.
- Ishihara, K., T. Yamamoto, S. Satake, S. Takayama, S. Kubota, H. Negishi and A. Kojima. 2006. Comparision of *Campylobacter* isolated from humans and food-producing animal in Japan. **J. Appl. Microbiol.** 100: 153-160.
- Inglis, G.D., D.K. Lisa, W.B. Hilma and P.K. John. 2005. Colonization of cattle intestines by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanenae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 7: 5145-5153.
- Keener, K.M., M.P. Bashor, P.A. Curtis, B.W. Sheldon and S. Kathariou. 2004. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. **J. Food Sci and Food safe Rev.** 105-116.
- Lam, K. M., R. Yamamoto and A. J. Damassa. 1995. DNA diversity among isolates of *Campylobacter jejuni* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. **Vet. Microbiol.** 45: 269-274.
- Linton D., A. J. Lawson, R. J. Owen and J. Stanley. 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. **J. Clin. Microbiol.** 35: 2568-2572.

- Misawa, N., S. Shinohara, H. Satoh, H. Itoh and K. Shinohara. 2000. Isolation of *Campylobacter* species from zoo animals and polymerase chain reaction-base random amplified polymorphism DNA analysis. **Vet. Microbiol.** 71: 59-68.
- Miwa, N., Y.Takegahara, K.Terai, H.Kato and T.Takeuchi. 2003. *Campylobacter jejuni* contamination on broiler carcasses of *C. jejuni*-negative flocks during processing in Japanese slaughterhouse. **Int. J. Food Microbiol.** 84: 105-109.
- Nakhamkin, I., M.J. Blaser and L.S. Tomskins. 1992. *Campylobacter jejuni*-current status and future trends. Unpaged. Washington, D.C.: ASM.
- Ono, K., and K.Yamamoto. 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. **Int. J. Food Microbiol.** 47: 211-219.
- Payne, R.E., D.L. Eargie, W.D. David and M.B. Harold. 1999. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in broiler flocks using randomly amplified polymorphic DNA-PCR and 23S rRNA-PCR and role of litter in its transmission. **J. Appli Environ Microbiol.** 65: 260-263.
- Poocharoen, L. and C.W. Bruri. 1986. *Campylobacter jejuni* in hospital children with diarrhoea in Chiang Mai, Thailand. **J. Trop Med and Pub Healt.** 17(1): 53-58.
- Power, E.M. 1995. Efficacy of the ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reaction of food-bone and waterborne and yeasts. **J. Appli Environ Microbiol.** 61: 3756-3758.
- Stern, N.J., V.A. Bannov, E.A. Svetoch, E.V. Mitsevich, I.P. Mitsevich, N.V. Volozhantsev, V. V. Gusev and V. V. Pereygin. 2004. Distribution and characterization of *Campylobacter* spp. from Russian poultry. **J. Food Protect.** 57: 239-245.
- Trachoo, N. and J.D. Brooks. 2005. Attachment and heat resistance of *Campylobacter jejuni* on *Enterococcus faecium* biofilm. **J. Biol. Sci.** 8: 599-605.
- Varavithya, W., K. Vathanophas, L. Bodhidatta, P. Punyaratabandhu, R. Sangchai, S. Athipanyakom, C. Wasi and P Echeverria. 1990. 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.** 28(11): 2507-2510.
- Varga, J., B. Mezes and L. Fodor. 1990. Serogroup of *Campylobacter jejuni* from man and animal. **J. Vet. Med.** 37: 407-41.
- Wassenaar, T.M. and D.G. Newell. 1997. Toxic production by *Campylobacter* spp.. **Clin. Microbiol. Rev.** 10: 466-476.
- Workman, S.N., G.E. Mathison and M.C. Lavoie. 2005. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. **J. Clin. Microbiol.** 43: 2642-2650.
- Zorman, T., M. Heyndrickx, S. Uzunovic-Kamberovic and S. Mozina. 2006. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. **Int. J. Food Microbiol.** 110: 24-33.