การตรวจวิเคราะห์ยีนก่อโรคใน *Campylobacter jejuni*

Detection of Virulence Genes in *Campylobacter jejuni*

ณฐนนท์ ตราชู (Nathanon Trachoo)[1]*
ศศิณี กันยาบุญ (Sasinee Kunyaboon)[2]

บทคัดย่อ

เชื้อ *Campylobacter jejuni* เป็นเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในหลายประเทศ พบมากในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่มาจากสัตว์ปีก งานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากเนื้อไก่ มูลไก่ เนื้อนกป่า เนื้อหมู จำนวนทั้งหมด 162 ตัวอย่าง ทำการยืนยันเชื้อ *C. jejuni* และคัดเลือกตามแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน จำนวน 22 สายพันธุ์ เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ยีนก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่ *cad*F, *cdt*A, *cdt*B และ *cdt*C โดยวิธี Polymerase Chain Reaction จากผลการทดลองสามารถตรวจพบยีน *cad*F ในเชื้อ *C. jejuni* 21 สายพันธุ์ (96%), ยีน *cdt*A 15 สายพันธุ์ (69%), ยีน *cdt*B 19 สายพันธุ์ (87%) และยีน *cdt*C 21 สายพันธุ์ (96%) โดยพบว่ามี 16 สายพันธุ์ที่พบยีนครบทั้ง 4 ชนิด และสายพันธ์ที่มาจากเนื้อหมูไม่พบว่ามียีน *cdt*A, *cdt*B และ *cdt*C

Abstract

Campylobacter jejuni is a major cause of bacterial diarrhea in many countries. It was reported to be the most commonly found in poultry and poultry products. This research studied the prevalence of major virulence genes including *cad*F, *cdt*A, *cdt*B and *cdt*C in 22 *C. jejuni* strains isolated from 162 samples of chicken feces, chicken sample, wild bird carcasses and pork by polymerase chain reaction technique. The 22 strains were selected from *C. jejuni* positive samples based on location. *cad*F, *cdt*A, *cdt*B and *cdt*C were found in 21 (96%), 15 (69%), 19 (87%) and 21 (96%) isolates, respectively. 16 strains had all of the 4 virulence genes. *C. jejuni* isolated from poultry had all of the virulence genes while none of the toxin encoding genes *cdt*A, *cdt*B and *cdt*C were found in the pork isolate.

คำสำคัญ: *Campylobacter jejuni* *cad*F ยีนก่อโรค
Keywords: *Campylobacter jejuni*, *cad*F, virulence gene

[1]*ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*
[2]*วท.ม. (เทคโนโลยีการอาหาร) ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*
**corresponding author, e-mail: nathanon.t@msu.ac.th*

บทนำ

เชื้อ *Campylobacter jejuni* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารในคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ปีกซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อในห่วงโซ่อาหาร เมื่อร่างกายได้รับเชื้อ *C. jejuni* เชื้อโรคจะเจริญและแบ่งตัวในระบบทางเดินอาหาร หรืออาจแพร่กระจายเข้าไปในอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเอาชนะระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยแต่ละราย *C. jejuni* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง (Gram negative bacilli) ที่สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella กระบวนการก่อโรคขั้นแรก เชื้อ *C. jejuni* จะต้องเคลื่อนที่ผ่านชั้นเมือก (mucous) ในลำไส้ใหญ่ให้ได้ จากนั้นโปรตีนที่ผิวเซลล์ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 37 kDa ที่มีชื่อว่า CadF (Campylobacter adhesion to fibronectin) ซึ่งถูกกำหนดด้วยยีนก่อโรค *cad*F ขนาด 400 bp จะจับกับ fibronectin (Konkel et al., 1997) แล้วจึงสังเคราะห์และขับโปรตีน Cia (*Campylobacter* invasion antigen) เหนี่ยวนำให้เซลล์เจ้าบ้าน (host cells) หลั่งสาร IL-8 (Interleukin 8) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบของร่างกาย (inflammatory response) เช่น เกิดอาการไข้ อ่อนเพลีย คลื่นไส้ อาเจียน เป็นต้น ออกมา นอกจากยีนก่อโรค *cad*F แล้วยังมีรายงานการค้นพบยีน *cdt*A, *cdt*B และ *cdt*C ซึ่งกำหนดโปรตีน CdtA (30 kDa), CdtB (29 kDa) และ CdtC (21 kDa) ตามลำดับ โปรตีนทั้ง 3 ข้างต้นเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนสารพิษ CDT (Cytolethal distending toxins) ของเชื้อ *C. jejuni* ที่สามารถทำลายเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่นได้ (Snelling et al., 2005)

ในปี พ.ศ. 2547-2548 ห้องปฏิบัติการวิจัยเชื้อโรคทางอาหารและแผ่นชีวะ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ได้ทำการแยกเชื้อ *C. jejuni* 46 สายพันธุ์ จากเนื้อไก่ มูลไก่ เนื้อนกป่า และเนื้อหมู จำนวน 162 ตัวอย่าง จึงประสงค์ที่จะนำมาศึกษาว่าสายพันธุ์ใดสามารถก่อโรคได้ งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *C. jejuni* จำนวน 22 สายพันธุ์ จาก 46 สายพันธุ์ ที่มีอยู่ตามแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน แล้วตรวจหายีนก่อโรค (virulence factor) ที่สำคัญ ได้แก่ *cad*F, *cdt*A, *cdt*B และ *cdt*C ในเชื้อ *C. jejuni* เหล่านี้ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อก่อโรคอ้างอิง *C. jejuni* ATCC 29428 ได้รับจาก New Zealand Reference Culture Collection, Institute of Environmental Science and Research Limited, New Zealand ซึ่งแยกได้จากอุจจาระเด็กที่ป่วยด้วยอาการอุจจาระร่วง และเชื้อ *C. jejuni* อีก 22 สายพันธุ์ แยกได้จากเนื้อนก เนื้อหมู เนื้อไก่ มูลไก่ พื้น และภาชนะใส่น้ำในโรงเรือน ในจังหวัดมหาสารคามและขอนแก่น ทำการแยกเชื้อใน modified brucella agar (Trachoo and Brooks, 2005) และทดสอบเพื่อยันยันเชื้อ *C. jejuni* ด้วยวิธีย้อมสีแกรม ทดสอบกับ 3% KOH (Powers, 1995) ทดสอบการเคลื่อนที่ ทดสอบเอ็นไซม์ catalase ทดสอบเอ็นไซม์ oxidase และวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ตามวิธีของ Linton โดยทดสอบหายีน *hip*O (Linton et al., 1997) ซึ่งเป็นยีนที่พบได้เฉพาะใน *C. jejuni* และไม่พบใน *Campylobacter* สายพันธุ์อื่น เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์โดยการทำแห้งแบบเยือกแข็งใน 15% glycerol-brucella broth ที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารพันธุกรรมต้นแบบ

เตรียมสารพันธุกรรมโดยใช้วิธีการย่อยด้วย proteinase-*K* digestion และทำให้บริสุทธิ์ด้วย phenol-chloroform โดยเลี้ยงเชื้อ *C. jejuni* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ brucella agar (Criterion, U.S.A.) ที่เติม ferrous sulfate 0.5 กรัม/ลิตร, sodium bisulfate 0.2 กรัม/ลิตร, pyruvic acid 0.5 กรัม/ลิตร (FBP) (Sigma, St. Louis) เตรียม FBP โดยกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร แล้วเติมลงใน brucella agar (ภายหลังจากฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เป็นเวลา 15 นาที) บ่มเชื้อ *C. jejuni* ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะบรรยากาศ microaerobic ซึ่งประกอบด้วย ออกซิเจน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ 10% และไนโตรเจน 85% (Campy*Gen*™, Oxoid) แล้วเติม 0.1% peptone water จะได้สารแขวนลอยของเชื้อ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง แล้วล้าง pellet ด้วย TE buffer, pH 8 จำนวน 2 ครั้ง แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ lysozyme (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ทำการบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำการบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 25:24:1 phenol:chloroform:isomyl alcohol (Peirce, U.S.A.) ปริมาตร 705 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม absolute ethanol ในปริมาตรที่เท่ากัน และเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของปริมาตรทั้งหมด นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนบนทิ้งแล้วล้างส่วนที่เหลือด้วย 70% ethanol แล้วบ่มอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม TE buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

ใช้ไพรเมอร์ (primers) ที่จำเพาะสำหรับตรวจหายีน *cad*F, *cdt*A, *cdt*B และ *cdt*C ดังตารางที่ 1 โดยขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจหายีน *cad*F (Konkel et al., 1999) คือ ใส่ 200 ไมโครโมลาร์ ของ $MgCl_2$ ลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วเติม 1X ของ 10X buffer, 200 ไมโครโมลาร์ ของ each dNTP, 0.3 ไมโครโมลาร์ ของ Primer cadF-F2B, 0.3 ไมโครโมลาร์ ของ Primer cadF-R1B, 1 U ของ Taq polymerase, DNA template (1 นาโนกรัม - 2 ไมโครกรัม) 3.0 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น (sterile distilled water) ให้ครบ 25 ไมโครลิตร จึงนำไปทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Thermocycler, Crocodile III, France) ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจหายีน *cdt*A, *cdt*B และ *cdt*C (Bang et al., 2003) มีรายละเอียดดังนี้ ใส่ 90 ไมโครโมลาร์ ของ $MgCl_2$ ลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วเติม 1X ของ 10X buffer, 1.6 ไมโครโมลาร์ each dNTP, 0.032 ไมโครโมลาร์ ของ Forward Primer, 0.0032 ไมโครโมลาร์ Reverse Primer, 0.8 U ของ Taq polymerase, DNA template (1 นาโนกรัม - 2 ไมโครกรัม) 3.0 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น (sterile distilled water) ให้ครบ 25 ไมโครลิตร จึงนำไปทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยตั้งอุณหภูมิในแต่ละขั้นตามตารางที่ 1 จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR products) ไปวิเคราะห์ผลการเพิ่มจำนวนโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gels ใน 1% Tris-Borate-EDTA (TBE) ให้กระแสไฟฟ้าจากเครื่องจ่ายกำลังไฟ (40014P, GibcoBRL, U.S.A.) ที่ 75-80 โวลท์ เป็นเวลา 60-75 นาที โดยเปรียบเทียบกับชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) (100 bp DNA ladder, Invitrogen, U.S.A.) ย้อมด้วยสี ethidium bromide (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยเครื่องฉายแสงยูวี (UVP, Upland, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 300-360 นาโนเมตร และบันทึกภาพแบบดิจิตัลด้วยกล้องโกดัก (DC290, Eastman Kodak, U.S.A.) และโปรแกรม Kodak 1D (Eastman, Kodak)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์หายีนก่อโรคจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *cad*F, *cdt*A,3 *cdt*B และ *cdt*C ในเชื้อ *C. jejuni* จำนวน 22 สายพันธุ์ ที่แยกได้ก่อนหน้านี้ในห้องปฏิบัติการเชื้อโรคทางอาหารและแผ่นชีวะ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม โดยแยกได้จากเนื้อนกป่า 3 สายพันธุ์ เนื้อหมู 1 สายพันธุ์ เนื้อไก่ และโรงเรือนเลี้ยงไก่ 18 สายพันธุ์ในจังหวัดมหาสารคามและขอนแก่น และเชื้อ *C. jejuni* ATCC 29428 ซึ่งเป็นเชื้ออ้างอิงที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยที่ติดเชื้อด้วยเชื้อโรค *C. jejuni* เมื่อนำมาตรวจหายีนก่อโรค 4 ชนิด ผลปรากฏว่าสามารถตรวจพบยีน *cad*F ในเชื้อ *C. jejuni* จำนวน 21 สายพันธุ์ (96%) ยีน *cdt*A จำนวน 15 สายพันธุ์ (69%) ยีน *cdt*B จำนวน 19 สายพันธุ์ (87%) และยีน *cdt*C จำนวน 21 สายพันธุ์ (96%) แสดงดังตารางที่ 2 ในสายพันธุ์ที่พบในคนและสัตว์ปีกพบว่ามียีนก่อโรคดังกล่าวมากกว่าสายพันธุ์ที่นำมาจากหมู ซึ่งอาจเป็นเหตุผลว่าสัตว์ปีกเป็นแหล่งของเชื้อ *C. jejuni* ที่มีความเป็นเชื้อโรคสูง อย่างไรก็ดีงานวิจัยนี้สามารถนำ *C. jejuni* จากเนื้อหมูมาทำการทดลองได้เพียง 1 สายพันธุ์ เนื่องจากว่าเชื้อ *C. jejuni* จัดเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยในสัตว์ปีกมากกว่าสุกร (Nachamkin et al., 1992) สำหรับสายพันธุ์ที่มีการตรวจพบยีนดังกล่าวครบทั้ง 4 ชนิด มีอยู่ 16 สายพันธุ์ คือ *C. jejuni* ATCC 29428 และสายพันธุ์ FBRL-S10, FBRL-S11, FBRL-S14, FBRL-S15, FBRL-S17, FBRL-S18, FBRL-S19, FBRL-S20, FBRL-S21, FBRL-S23, FBRL-S25, FBRL-S26, FBRL-S28, FBRL-S29 และ FBRL-S34 (รูปที่ 1 และ 2) การตรวจพบยีนก่อโรคดังกล่าวแสดงถึงความเป็นเชื้อโรคที่สมบูรณ์ โดยเฉพาะยีน *cad*F เป็นยีนที่สามารถตรวจพบได้ในเชื้อ *C. jejuni* (highly conserved) ช่วยกำหนดการผลิตโปรตีน CadF ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 37 kDa ทำหน้าที่เกาะติดกับ fibronectin บนผนังลำไส้ (Konkel et al., 1999) โดยพบว่า เชื้อ *C. jejuni* ที่กลายพันธุ์และไม่มียีน *cad*F จะไม่สามารถเกาะติดกับผนังลำไส้ใหญ่ของลูกไก่ได้ (Ziprin et al., 1999) การตรวจพบยีน *cad*F นี้ จึงถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ เพราะถ้าเชื้อไม่มียีนชนิดนี้เพื่อผลิตโปรตีนที่ใช้เกาะติด (adhevence) กับเซลล์เจ้าบ้าน เชื้อจะไม่สามารถเกาะติด เจริญเติบโตเพิ่มจำนวน (Colonize) และสังเคราะห์สารพิษ CDT ในภายหลังได้

การผลิตสารพิษ CDT (Cytolethal distending toxins) ของเชื้อ *C. jejuni* มีรายงานการค้นพบครั้งแรกเมื่อปี 1988 (Johnson and Lior, 1988) สารพิษ CDT ประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อย (subunits) และถูกกำหนดด้วยยีน *cdt*A, *cdt*B และ *cdt*C โปรตีนหน่วยย่อยเหล่านี้ ได้แก่ CdtA (30 kDa), CdtB (29 kDa) และ CdtC (21 kDa) ตามลำดับ โดยโปรตีนเหล่านี้มีความเป็นสารพิษสามารถทำลายเซลล์ (cell lines) CHO, vero, HeLa, Hep-2, Caco-2 และ INT 407 ในห้องทดลองได้ โดย cell lines แต่ละชนิดจะมีความไวต่อ CDT แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ surface receptor ของ cell lines นั้น (Pickett and Whitehouse, 1999) CdtA และ CdtC จะทำหน้าที่จับกับ cell lines ในขณะที่ CdtB จะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่เหมือนเอนไซม์ deoxyribonuclease I ทำให้ดีเอ็นเอเสียหายหรือเกิดการเพิ่มจำนวนที่ไม่สมบูรณ์ เป็นสาเหตุให้ G2 และ M phase ใน cell cycle หยุดชะงัก เซลล์จะเกิดการบวมและยืดยาว (swelling and elongation) เพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 5 เท่า จากนั้นเซลล์ก็จะตาย (Whitehouse et al., 1998) นอกจากนี้ยังพบว่า CDT สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เจ้าบ้านผลิต IL-8 เช่นเดียวกับ CadF ด้วย (Snelling et al., 2005) สำหรับความสำคัญของโปรตีน CdtA, CdtB และ CdtC ที่ถูกกำหนดโดยยีน *cdt*A, *cdt*B และ *cdt*C ยังเป็นข้อถกเถียงกันในกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ โดย Lara-Tejero และ Galan (Lara-Tejero and Galan, 2000) ได้ทำการแยกโปรตีน C*dt*A, C*dt*B และ C*dt*C แล้วให้โปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งแก่เซลล์ COS-1 พบว่ามีเพียงโปรตีน C*dt*B เท่านั้นที่ทำให้เซลล์บวมและตายในที่สุด ต่อมาในปี 2001 นักวิจัยกลุ่มเดียวกันได้แยกโปรตีน C*dt*A, C*dt*B และ C*dt*C ให้บริสุทธิ์มากขึ้น พบว่าการให้โปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงลำพัง ไม่สามารถทำให้เซลล์เกิดความผิดปกติ แต่เซลล์จะตายเมื่อได้รับยีนครบทั้ง 3 ชนิด (Lara-Tejero and Galan, 2001) เช่นเดียวกับ

รายงานของ Lee และคณะ (Lee et al., 2003) นอกจากนี้ Lee และคณะ ยังพบว่า เมื่อให้โปรตีน C*dt*B ร่วมกับ C*dt*C จะทำให้เซลล์ตายได้ ในขณะที่เมื่อให้โปรตีน C*dt*A ร่วมกับ C*dt*B เซลล์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แม้ว่าเชื้อ *C. jejuni* จะมียีนอื่นที่จัดเป็นยีนก่อโรคได้อีก การตรวจยีนก่อโรค *cad*F, *cdt*A, *cdt*B และ *cdt*C พร้อมกันจึงเป็นเครื่องหมายบ่งบอกถึงการก่อโรคของเชื้อ *C. jejuni* ได้ดีกว่าชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงลำพัง

สรุปผลการวิจัย

ในจำนวนเชื้อ *C. jejuni* ที่มาจากเนื้อสัตว์ปีก เนื้อหมู โรงเรือนเลี้ยงไก่ จำนวน 22 สายพันธุ์ มีจำนวน 15 สายพันธุ์ที่พบว่ามียีนก่อโรค *cad*F, *cdt*A, *cdt*B และ *cdt*C ครบทั้ง 4 ชนิด คือ สายพันธุ์ FBRL-S10, FBRL-S11, FBRL-S14, FBRL-S15, FBRL-S17, FBRL-S18, FBRL-S19, FBRL-S20, FBRL-S21, FBRL-S23, FBRL-S25, FBRL-S26, FBRL-S28, FBRL-S29 และ FBRL-S34 ส่วน *C. jejuni* ATCC 29428 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิงก็พบยีนทั้ง 4 เช่นเดียวกัน การตรวจพบยีนทั้ง 4 ชนิด ในเชื้อ *C. jejuni* เป็นเครื่องหมายบ่งบอกถึงการเป็นเชื้อโรคของเชื้อ *C. jejuni* ได้ดีกว่าการตรวจหายีนชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงลำพัง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้และงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2549 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง

Bang, D.D., Nielsen, E.M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K. and Madsen, M. 2003. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **J Appl Microbiol** 94: 1003-1014.

Johnson, W.M. and Lior, H. 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. **Microb Pathog** 4: 115-126.

Konkel, M.E., Garvis, S.G., Tipton, S.L., Anderson, Jr., D.E. and Cieplak, Jr., W. 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. **Mol Microbiol** 24: 953-963.

Konkel, M.E., Gray, S.A., Kim, B.J., Garvis, S.G. and Yoon, J. 1999. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and C*ampylobacter coli* based on the cadF virulence gene and its product. **J Clin Microbiol** 37: 510-517.

Lara-Tejero, M. and Galan, J.E. 2000. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. **Science** 290: 354-357.

Lara-Tejero, M. and Galan, J.E. 2001. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infect Immun** 69: 4358-4365.

Lee, R.B., Hassane, D.C., Cottle, D.L. and Pickett, C.L. 2003. Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. **Infect Immun** 71: 4883-4890.

Linton, D., Lawson, A.J., Owen, R.J. and Stanley, J. 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.

Nachamkin, I., Blaser, M.J. and Tomskins, L.S. 1992. ***Campylobacter jejuni* – current status and future trends**. Washington, D.C.: ASM.

Pickett, C.L. and Whitehouse, C.A. 1999. The cytolethal distending toxin family. **Trends Microbiol** 7: 292-297.

Powers, E.M. 1995. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reaction of food-borne and waterborne bateria and yeasts. **Appl Environ Microbiol** 61: 3756-3758.

Snelling, W.J., Matsuda, M., Moore, J.E. and Dooley, J.S.G. 2005. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. **Lett Appl Microbiol** 41: 297-302.

Trachoo, N. and Brooks, J.D. 2005. Attachment and heat resistance of *Campylobacter jejuni* on *Enterococcus faecium* biofilm. **Pak J Biol Sci** 8: 599-605.

Whitehouse, C.A., Balbo, P.B., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Mirabito, P.M. and Pickett, C.L. 1998. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. **Infect Immun** 66: 1934-1940.

Ziprin, R.L., Young, C.R., Stanker, L.H., Hume, M.E. and Konkel, M.E. 1999. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. **Avian Dis** 43: 586-589.

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์และสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่

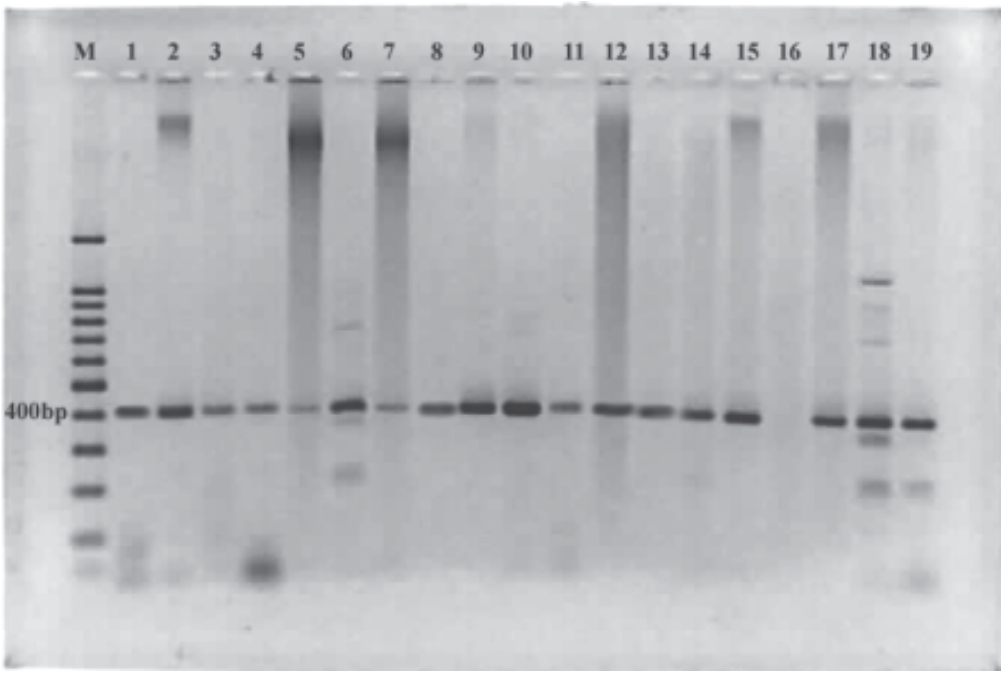
ไพรเมอร์	ลำดับเบส	สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่	Reference
*cad*F gene	F2B : 5′-TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG-3′	94°C 1 min (30 cycles)	
	R1B : 5′-CTA ATA CCT AAA GTT GAA AC-3′	45°C 1 min (Ta[1])	(Konkel et al., 1999)
		72°C 3 min	
*cdt*A gene	GNW : 5′-GGA AAT TGG ATT TGG GGC TAT ACT-3′		
	IVH : 5′-ATC ACA AGG ATA ATG GAC AAT-3′	94°C 1 min (30 cycles)	
*cdt*B gene	VAT2 : 5′-GTT AAA ATC CCC TGC TAT CAA CCA-3′	42°C 1 min (Ta)	(Bang et al., 2003)
	WMI-R : 5′-GTT GGC ACT TGG AAT TTG CAA GGC-3′	72°C 3 min	
*cdt*C gene	WMI-F : 5′-TGG ATG ATA GCA GGG GAT TTT AAC-3′		
	LPF-X : 5′-TTG CAC ATA ACC AAA AGG AAG-3′		

[1]Ta คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับตัว (annealing temperature)

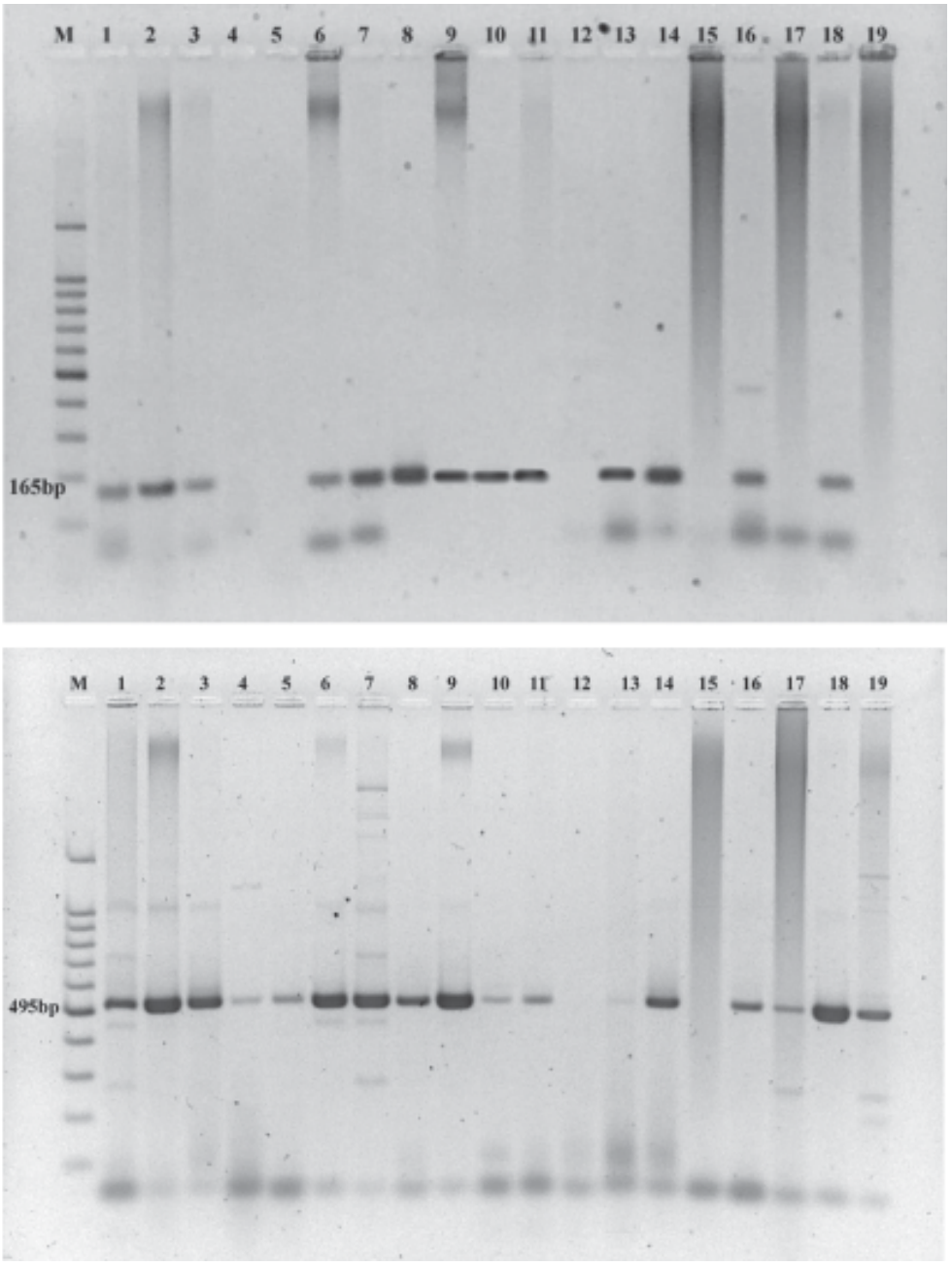
ตารางที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์ยีนก่อโรคใน *Campylobacter jejuni* จำนวน 23 สายพันธุ์

Source (n)	No. detected			
	***cad*F**	***cdt*A**	***cdt*B**	***cdt*C**
Human (1)	1	1	1	1
C. jejuni ATCC29428	+[1]	+	+	+
Wild bird (3)	3	2	2	3
FBRL-S27	+	-	-	+
FBRL-S28	+	+	+	+
FBRL-S29	+	+	+	+
Pork (1)	1	0	0	0
FBRL-S04	+	-	-	-
Chicken and chicken feces (18)	17	13	17	18
FBRL-S10	+	+	+	+
FBRL-S11	+	+	+	+
FBRL-S14	+	+	+	+
FBRL-S15	+	+	+	+
FBRL-S16	+	-	+	+
FBRL-S17	+	+	+	+
FBRL-S18	+	+	+	+
FBRL-S19	+	+	+	+
FBRL-S20	+	+	+	+
FBRL-S21	+	+	+	+
FBRL-S22	+	-	+	+
FBRL-S23	+	+	+	+
FBRL-S25	+	+	+	+
FBRL-S26	+	+	+	+
FBRL-S30	+	-	+	+
FBRL-S31	+	-	-	+
FBRL-S32	-	-	+	+
FBRL-S34	+	+	+	+
Total (22)	21	15	19	21

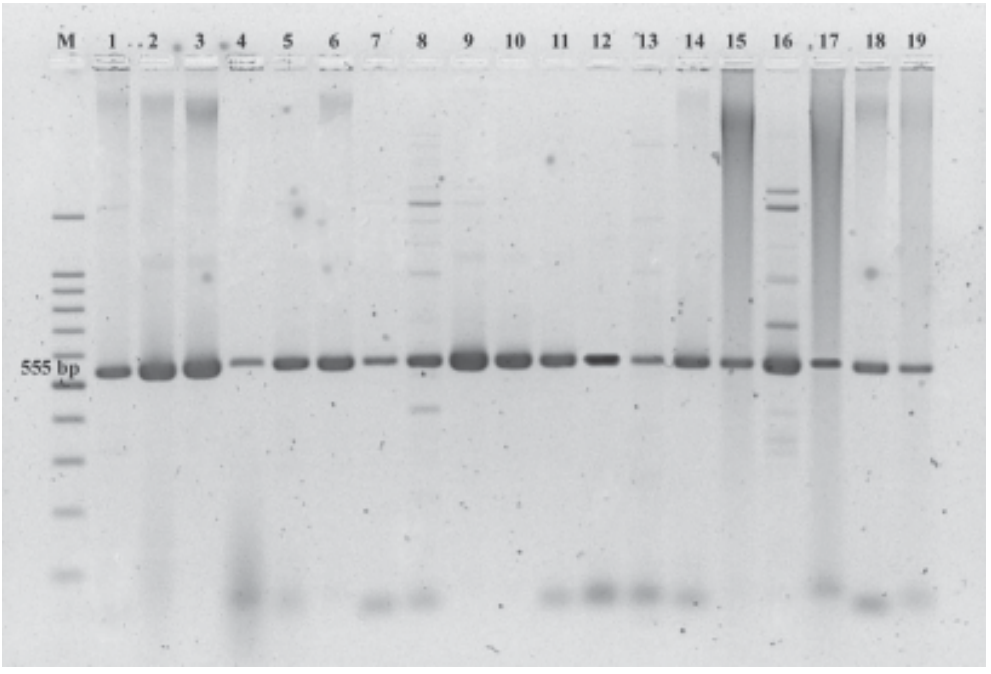
[1] + ตรวจพบ - ตรวจไม่พบ



รูปที่ 1 ผลการตรวจหายีนก่อโรค *cad*F-PCR products ขนาด 400 bp ใน *C. jejuni* โดยวิธี Gel Electrophoresis โดย Lane M: DNA ladder 100-1000 bp, Lane 1: FBRL-S04, Lane 2: *C. jejuni* ATCC 29428, Lane 3: FBRL-S28, Lane 4: FBRL-S29, Lane 5: FBRL-S27, Lane 6: FBRL-S20, Lane 7: FBRL-S22, Lane 8: FBRL-S23, Lane 9: FBRL-S11, Lane 10: FBRL-S23, Lane 11: FBRL-S31, Lane 12: FBRL-S21, Lane 13: FBRL-S17, Lane 14: FBRL-S14, Lane 15: FBRL-S15, Lane 16: FBRL-S16, Lane 17: FBRL-S34, Lane 18: FBRL-S10, Lane 19: FBRL-S26



รูปที่ 2 ตัวอย่างผลการตรวจหายีนก่อโรคใน *C. jejuni* บน agarose gel *cdt*A-PCR products (165 bp) และ *cdt*B-PCR products (495 bp) โดย Lane M: DNA ladder 100-1000 bp, Lane 1: FBRL-S14, Lane 2: FBRL-S15, Lane 3: FBRL-S25, Lane 4: FBRL-S32, Lane 5: FBRL-S30, Lane 6: *C. jejuni* ATCC 29428, Lane 7: FBRL-S10, Lane 8: FBRL-S18, Lane 9: FBRL-S19, Lane 10: FBRL-S23, Lane 11: FBRL-S26, Lane 12: FBRL-S31, Lane 13: FBRL-S28, Lane 14: FBRL-S29, Lane 15: FBRL-S27, Lane 16: FBRL-S20, Lane 17: FBRL-S22, Lane 18: FBRL-S11, Lane 19: FBRL-S21



รูปที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างผลการตรวจหายีนก่อโรคใน *C. jejuni* บน agarose gel *cdt*C-PCR products (555 bp) โดย Lane M: DNA ladder 100-1000 bp, Lane 1: FBRL-S14, Lane 2: FBRL-S15, Lane 3: FBRL-S25, Lane 4: FBRL-S32, Lane 5: FBRL-S30, Lane 6: *C. jejuni* ATCC 29428, Lane 7: FBRL-S10, Lane 8: FBRL-S18, Lane 9: FBRL-S19, Lane 10: FBRL-S23, Lane 11: FBRL-S26, Lane 12: FBRL-S31, Lane 13: FBRL-S28, Lane 14: FBRL-S29, Lane 15: FBRL-S27, Lane 16: FBRL-S20, Lane 17: FBRL-S22, Lane 18: FBRL-S11, Lane 19: FBRL-S21