

การแยกเชื้อ Campylobacter species ในน้ำคลองเขตกรุงเทพมหานคร

นางสาวเกษแก้ว เพ็ญทวีชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2533

ISBN 974-576-984-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016594

ISOLATION OF CAMPYLOBACTER SPECIES FROM CANALS IN BANGKOK
METROPOLITAN AREA

MISS KESKAEW PIENTHAWEECHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
INTER-DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1990

ISBN 974-576-984-3

เกษแก้ว เพียรทวีชัย : การแยกเชื้อ CAMPYLOBACTER SPECIES ในน้ำคลองเขต
กรุงเทพมหานคร (ISOLATION OF CAMPYLOBACTER SPECIES FROM CANALS IN
BANGKOK METROPOLITAN AREA) อ. ที่ปรึกษา : รศ. นพ. นราทร ธรรมบุตร, 147 หน้า
ISBN 974-576-984-3

ตัวอย่างน้ำคลองประมาณ 100 มล. จากแต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างน้ำ จากคลอง 36 สาย ของ
กรุงเทพมหานคร ถูกนำมากรองด้วยแผ่นกรองจุลชีพที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของรู 0.2 ไมโครเมตร เพื่อเก็บ
จุลชีพ Campylobacter ไว้บนแผ่นกรองจุลชีพ และเพิ่มจำนวนโดยเพาะไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Doyle
อบในสภาวะที่มี O_2 ร้อยละ 5 CO_2 ร้อยละ 10 และ N_2 ร้อยละ 85 Campylobacter ถูกแยก
อีกครั้งด้วยแผ่นกรองจุลชีพที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของรู 0.45 ไมโครเมตร จุลินทรีย์ที่แยกจุลชีพใช้ 37° เซล-
เซียส

ช่วงเวลาที่ตรวจน้ำเริ่มตั้งแต่กรกฎาคม-กันยายน 2531, พฤศจิกายน 2531-มกราคม 2532,
และกุมภาพันธ์-เมษายน 2532 เก็บน้ำมาตรวจแต่ละช่วง ๆ ละ 52 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 156 ตัวอย่าง
แยกจุลชีพ Campylobacter species ได้ร้อยละ 74.36 (116 สายพันธุ์) ซึ่งจำแนกชนิดออกได้เป็น
C. cryaerophila ร้อยละ 47.44 (74 สายพันธุ์) และ C. cryaerophila-like organism
ร้อยละ 26.92 (42 สายพันธุ์) โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกันในการย่อยสลาย urea

C. cryaerophila ที่แยกได้ตามระยะเวลาดังกล่าวมีดังนี้ คือ ร้อยละ 44.23 (23 สาย-
พันธุ์) ร้อยละ 51.19 (27 สายพันธุ์) และร้อยละ 46.15 (24 สายพันธุ์) แยกจุลชีพ
C. cryaerophila-like organism ได้ตามช่วงระยะเวลาเดียวกันคือ ร้อยละ 28.85 (15 สาย-
พันธุ์) ร้อยละ 19.23 (10 สายพันธุ์) และร้อยละ 32.69 (17 สายพันธุ์)

เนื่องจาก C. cryaerophila และ C. cryaerophila-like organism เป็น
aerotolerant Campylobacter สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มี O_2 และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ
25°-36° เซลเซียส ซึ่งต่างจาก thermophilic Campylobacter เช่น C. jejuni, C. coli
และ C. laridis ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่พบบ่อย ๆ ที่ต้องการบรรยากาศ
ที่มี O_2 ร้อยละ 5 CO_2 ร้อยละ 10 และ N_2 ร้อยละ 85 และอุณหภูมิ 36°-42° เซลเซียสในการ
เจริญเติบโต ซึ่งสภาวะของน้ำคลองไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของจุลชีพดังกล่าว ความสำคัญทาง
การแพทย์ของจุลชีพ C. cryaerophila ในการก่อโรคนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด ยังต้องการการศึกษา
วิจัยต่อไปอีก การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า น้ำคลองสามารถที่จะเป็นแหล่งสำคัญของจุลชีพ
Campylobacter species ทั้งสองที่อาจจะพบว่าเป็นสาเหตุของอุจจาระร่วงต่อไปในอนาคต

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา 2532.....

ลายมือชื่อนิสิต น.น.ท. เพียรทวีชัย :

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รศ. นพ. นราทร ธรรมบุตร

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

KESKAEW PIENTHAWEECHAI : ISOLATION OF CAMPYLOBACTER SPECIES FROM CANALS IN BANGKOK METROPOLITAN AREA. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. NARATHORN DHAMABUTRA, M.D., 147 pp.

The 100 ml of canal water samples of 36 canals in Bangkok Metropolitan area were filtered through a 0.2 μ m-membrane filter to concentrate Campylobacter organism on the membrane. Then the filter was enriched in Doyle's medium. After 24 h, 37°C incubation in microaerophilic atmosphere containing 5% O₂, 10% CO₂ and 85% N₂, isolation of Campylobacter was performed by membrane filter technique and was incubated at 37°C.

The water was examined in three periods starting from July-September 1988, November 1988-January 1989 and February-April 1989. Each time the 52 water samples were checked. Of 156 water samples, 74.36% (116 strains) of Campylobacter species were isolated. They were 47.44% (74 strains) of C. cryaerophila and 26.92% (42 strains) of C. cryaerophila-like organism. The differentiation was determined by urease activity test.

C. cryaerophila was isolated from 44.23% (23 strains), 51.19% (27 strains) and 46.15% (24 strains) and also C. cryaerophila-like organism from 28.85% (15 strains), 19.23% (10 strains) and 32.69% (17 strains) of the 52 samples during each period respectively.

Since C. cryaerophila was aerotolerant Campylobacter, therefore, it could grow in aerobic condition and grew well at 25°-36°C. This was different from thermophilic Campylobacter such as C. jejuni, C. coli and C. laridis that frequently cause gastrointestinal tract infection. To grow they require atmosphere containing 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂ and temperature at 36°-42°C, so the environment in the canals was unfavorable for their growth. The etiological role of C. cryaerophila in pathogenesis in human is still unknown, and required further studies. This study show that canals can be an important source of these two Campylobacter species that might be considered as cause of diarrhea in the future.

ภาควิชา สหสาขาวิชาสัตววิทยาทางการแพทย์.....
สาขาวิชา จลชีววิทยาทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา 2532.....

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาพร้อม

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my gratitude to the following persons who have helped, supported and advised me in this thesis.

My deeply appreciation to :

My advisor, Associate Professor Dr. Narathorn Dhamabuttra, Division of Anaerobe, Department of Microbiology Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his valuable advices, strongly encouragement and constructive criticisms.

My co-advisor, Dr. David N. Taylor and Dr. Peter Echeverria, Department of Bacteriology, Armed Forces Research Institute of Medical Science (AFRIMS), Bangkok, Thailand, for their valuable advices, encouragement, constructive criticism and kindness for supply of some culture media, membrane filters and C. jejuni strains.

Mrs. Injira Niyomtoon and Miss Apinan Jaruchaiyakul, Technical Division Department of Drainage and Sewage, Bangkok Metropolitan Administration, for their guidance, valuable help in collecting water samples and supply of some equipments and glasswares.

Dr. Hermy Lior, Chief of National Laboratory for Enteric Pathogens, Bureau of Microbiology, Laboratory Center for Disease Control, Tunney's Pasture, Ottawa, Ontario, Canada, for his help in confirmation identification of Campylobacter species.

Assistant Professor Chatchai Sornchai, Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, for the guidance and supply of some chemicals and C. jejuni strains.

Associate Professor Pongpun Nunthapisud, Division of Bacteriology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her kindness and supply of some equipments.

My frineds, the staffs and personels in Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khonkaen University, for their co-operation and supply of the equipments needed for the laboratory work.

In addition, I am indebled to the Rajada-Pisake Sompoj Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for the sponsorship of this study and also to the committe of the Graduate school, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study.

Finally, I am deeply indebted to my family, especially my mother, for their help, encouragement and understanding.

CONTENT

	Page
THAI ABSTRACT.....	IV
ENGLISH ABSTRACT.....	V
ACKNOWLEDGEMENT.....	VI
LIST OF TABLES.....	XII
LIST OF FIGURES.....	XIII
ABBREVIATIONS.....	XV
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVIEW OF LITERATURE.....	5
Historical Background.....	5
Taxonomy of the Genus <u>Campylobacter</u>	7
Bacteriology of <u>Campylobacter species</u>	8
Pathogenesis	23
Epidemiology	28
A. Clinical Features	29
B. Prevalence and Incidence	31
C. Reservoirs	34
D. Transmission to Humans	37
Diagnosis of <u>Campylobacter</u> Infection	41
Isolation of <u>Campylobacter</u>	42
Biotyping	44
Serotyping	45
Treatment	46

III. MATERIALS AND METHODS

Materials	48
Methods	50
1. Comparison of Two Different Membrane Filters for Recovering <u>C. jejuni</u> from Inoculated Water	50
2. Methods of Sample Collection	52
3. Bacteriological Methods for Isolation of <u>Campylobacter spp</u> from Water Samples (Canals)	54
3.1 Culture for <u>Campylobacter spp.</u> from Water Samples	54
3.2 Isolation for <u>Campylobacter spp.</u> ..	55
3.3 Identification of <u>Campylobacter spp.</u>	56

IV. RESULTS

- Comparison of Two different Size Filters for Recovering <u>C. jejuni</u> from Inoculated Distilled Water.....	66
- Isolation Rate of <u>Campylobacter spp.</u> from Canals.....	67
- Phenotypic Biochemical Characteristic of the Isolated <u>C. cryaerophila</u> and <u>C. cryaerophila</u> -like organism.....	69

V. DISCUSSION..... 92

CONCLUSION..... 98

REFERENCES..... 101

APPENDIX..... 136

BIOGRAPHY..... 147

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Comparison of the Taxonomic Classification Synonyms of the Genus <u>Campylobacter</u>	70
2. Phenotypic characteristics of <u>Campylobacter</u> <u>species</u>	71
3. Biotyping Scheme for <u>C. jejuni</u> , <u>C. coli</u> and <u>C. laridis</u> according to Lior (Lior 1984)....	72
4. Comparison of Four Methods to Isolate <u>Campylobacter</u> species in 331 Specimens Obtained from 100 Children (Taylor et al. 1987)	72
5. List of Canals and Sites of Collection.....	73
6. Schedule of Canals monitoring.....	76
7. Comparison of Two Different Size Filters for Recovering <u>C. jejuni</u> from Inoculated Distilled Water.....	77
8. The Isolation rate of <u>Campylobacter species</u> from the Water Samples (Canals).....	78
9. Phenotypic Biochemical Characteristics of isolated <u>Campylobacters</u>	79

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Processing of water samples.....	81
2. Map of canals and sample sites in Bangkok Metropolitan Area.....	82
3. Microscopic Morphology of <u>Campylobacter</u> (1,000X).....	83
4. Electron Micrograph of <u>Campylobacter</u> (11,000 X) showing a single polar flagellum at both ends.....	83
5. Drops of Doyle's medium on surface of the filter on Brucella blood agar.....	84
6. <u>Campylobacter jejuni</u> colonies on Brucella blood agar.....	84
7. Sites of <u>Campylobacter</u> positive isolation in July to September (1988).....	85
8. Sites of <u>Campylobacter</u> positive isolation in November (1988) to January (1989).....	86
9. Sites of <u>Campylobacter</u> positive isolation in February to April (1989).....	87
10. Seasonal variation of <u>Campylobacter</u> isolates.....	88

Figure	Page
11. Colonial appearance of <u>C. jejuni</u> on Brucella blood agar.....	89
12. Colonial appearance of <u>C. cryaerophila</u> on Brucella blood agar.....	90
13. Colonial appearance of <u>C. cryaerophila</u> - like organism on Brucella blood agar.....	91

ABBREVIATION

AMP	=	Adenosine monophosphate
BHI	=	Brain heart infusion
BBA	=	Brucella blood agar
BMA	=	Bangkok Metropolitan Administration
C.	=	Campylobacter
oC	=	degree celsius
CO ₂	=	Carbondioxide gas
c.f.u.	=	colony forming unit
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
ed.	=	editor
et al.	=	et alli (Latin) and other
Fig.	=	Figure
g	=	gram
G + C	=	guanine plus cytosine
h	=	hour
H ₂	=	Hydrogen gas
H ₂ S	=	Hydrogen sulfide
I.U.	=	International unit
ug	=	microgram
um	=	micrometer
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
min	=	minute
NIH	=	Nationa Institute of Health
N ₂	=	Nitrogen gas

NO or no.	=	number
O ₂	=	Oxygen gas
Sec	=	second
spp.	=	species
TMAO	=	Trimethylamine N-oxide hydrochloride
TTC	=	Triphenyl tetrazolium chloride