รายงานการวิจัย

เรื่อง

การเฝ้าระวังเชื้อสกุลวิบริโอ ซัลโมเนลลา และชิเกลลาในหอยแครงส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว โดยวีธีโมเลกูลาร์เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

โดย

พญ. วราลักษณ์ ตังคณะกุล

รศ.ดร.จริยา ชมวารินทร์

ดร.วิเศษ นามวาท

นางสาวมยุรฉัตร เบี้ยกลาง

การเฝ้าระวังเชื้อสกุลวิบริโอ ซัลโมเนลลา และชิเกลลาในหอยแครงส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว โดยวิธีโมเลกูลาร์เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

วราลักษณ์ ตังคณะกุล[1] จริยา ชมวารินทร์[2] วิเศษ นามวาท[2] มยุรฉัตร เบี้ยกลาง[1]

[1] กลุ่มโรคติดต่อระหว่างประเทศ สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาความชุกของเชื้อ *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ในตัวอย่างหอยแครงทั้งหมด 161 ตัวอย่าง ที่เก็บในระหว่างเดือนมีนาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 โดยแบ่งเป็นหอยแครงที่ส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (68 ตัวอย่าง) หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย (56 ตัวอย่าง) อุดรธานี (7 ตัวอย่าง) และขอนแก่น (30 ตัวอย่าง) การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อดังกล่าวใช้วิธี duplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อมาตรฐาน เชื้อที่แยกได้นำมาทดสอบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิดโดยวิธี disk diffusion ผลการวิจัยพบความชุกของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงสุด คิดเป็นร้อยละ 86.3 เมื่อตรวจโดยวิธี duplex PCR และร้อยละ 65.2 เมื่อตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อ ในขณะที่ความชุกของเชื้อ *V.cholerae* คิดเป็นร้อยละ 71.4 เมื่อตรวจโดยวิธี uniplex PCR และร้อยละ 18.6 เมื่อตรวจโดยวิธี duplex PCR และร้อยละ 1.9 เมื่อตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อ สำหรับเชื้อ *Salmonella* spp. ตรวจโดยวิธี uniplex PCR ร้อยละ 1.2 ส่วน *Shigella* spp. ตรวจไม่พบเชื้อทั้งโดยวิธี PCR และวิธีเพาะเชื้อ เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากหอยแครง 97 ตัวอย่างพบว่า ดื้อต่อยา ampicillin คิดเป็นร้อยละ 93.8 แต่ไม่ดื้อกับยา chloramphenicol, norfloxacin, ofloxacin, cotrimoxazole และ tetracycline (ร้อยละ 0)

การวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ความชุกของการพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงหรืออาหารเป็นพิษในหอยแครงมีสูง โดยเฉพาะ *V. parahaemolyticus* ที่ตรวจพบจากทุกตัวอย่าง วิธี duplex PCR ให้ผลการตรวจที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธีเพาะเชื้อมาก รวมทั้งใช้เวลาในการตรวจที่รวดเร็ว จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์คุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยา เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

Surveillance of *V. cholerae, V. parahaemolyticus, Salmonella* spp.,and *Shigella* spp. in cockle exported to Lao People's Democratic Republic by molecular method compared to culture method and antimicrobial susceptibility testing

Waraluk Tangkanakul[1], Chariya Chomvarin[2], Wises Namwat[2], Mayurachat Biaklang[1]

[1] Bureau of General Communicable Diseases, Department of Disease Control, Ministry of Public Health

[2] Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Abstract

The objective of this study is to investigate the prevalence of *V. cholerae, V. parahaemolyticus, Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in 161 cockle samples that were collected between March and November 2010. The samples included the cockles that were exported to Lao People's Democratic Republic (68 samples), and were commercially available in Nong Khai (56 samples), Udon Thani (7 samples), and Khon Kaen (30 samples). The samples were detected those bacteria by duplex PCR and standard culture method. The organisms isolated from cockle were tested with 6 antimicrobial agents by disk diffusion method. The result showed that *V. parahaemolyticus* was the most frequently found in 86.3 % by duplex PCR and 65.2 % by culture method. *V. cholerae* was detected in 71.4% by uniplex PCR, 18.6% by duplex PCR and 1.9 % by culture and *Salmonella* spp., was detected in 1.2% by uniplex PCR whereas *Shigella* spp. were not detected by PCR and culture method. *V. parahaemolyticus* isolated from 97 cockle samples were resistant to ampicillin (93.8%) but sensitive to chloramphenicol, norfloxacin, ofloxacin, cotrimoxazole and tetracycline.

The results of this study demonstrate the high prevalence of *V. parahaemolyticus* in cockles and indicate that the duplex PCR is an alternative method because it has a highly sensitive, specific and rapid method compared to the culture method. Therefore, the duplex PCR can be applied for the assessment of microbiological food safety in order to increase the efficiency in the prevention of the diarrheal outbreak.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยการได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จึงขอขอบพระคุณหน่วยงานที่ให้ทุนสนับสนุนในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลงได้ด้วยความเรียบร้อย

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญเนื้อหา	iv
สารบัญตาราง	v
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่ได้จากโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ระบาดวิทยา	4
2.2 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงหรืออาหารเป็นพิษ	5
2.3 วิธีในการตรวจหาเชื้อก่อโรคโรคอุจจาระร่วงหรืออาหารเป็นพิษ	10
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	
3.1 รูปแบบการวิจัย	13
3.2 ขนาดตัวอย่าง	13
3.3 ขั้นตอนในห้องปฏิบัติการ	13
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยแครง	20
4.2 การพบเชื้อ *V. cholerae* ในตัวอย่างหอยแครง	21
4.3 การพบเชื้อ *Salmonella* spp *และ Shigella* spp ในตัวอย่างหอยแครง	21
4.4 การทดสอบการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะS	24
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล	25
เอกสารอ้างอิง	28

สารบัญตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 Primer sequence และ PCR conditions สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp 15

ตารางที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *V.cholerae* , *V. parahaemolyticus, Salmonella* spp. , และ *Shigella* spp. และการแปลผลจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone 19

ตารางที่ 3 ผลการตรวจนับจำนวนเชื้อทั้งหมด (Total plate count, mean) และจำนวนการตรวจพบเชื้อ *V.cholerae, V. parahaemolyticus, Salmonella* spp.และ *Shigella* spp. ในตัวอย่างหอยแครง 22

ตารางที่ 4 การตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีเพาะเชื้อและวิธี PCR ในสภาวะที่ไม่กระตุ้นการเจริญของเชื้อ และกระตุ้นการเจริญของเชื้อ ตัวอย่างหอยแครงก่อนตรวจวิเคราะห์ 23

ตารางที่ 5 การตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยแครง โดยวิธี uniplex PCR และวิธี duplex PCR 23

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบการดื้อของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด 24

บทที่ 1
บทนำ

1.1ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ในปี 2550 ระหว่างวันที่ 16 พฤศจิกายน ถึง 10 ตุลาคม มีการระบาดของอหิวาตกโรคในประเทศไทย มีการรายงานพบผู้ป่วยในพื้นที่ระบาดใหม่ 29 จังหวัด และเชื้อที่พบเป็น *Vibrio cholerae* El Tor Ogawa ทั้งหมด ยกเว้นจังหวัดลำปางพบการระบาดของเชื้อ *Vibrio cholere* El Tor Inaba โดยการระบาดดังกล่าวเกิดขึ้นในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 12 จังหวัด ซึ่งมีพื้นที่ติดต่อกันและเริ่มต้นการระบาดในเวลาใกล้เคียงกัน เมื่อศึกษาเพื่อหาแหล่งโรค พบว่าการรับประทานหอยแครงเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2-6 เท่า) นอกจากนี้ยังมีรายงานจากองค์การอนามัยโลกประจำประเทศลาวว่ามีผู้ป่วยอหิวาตกโรคในช่วงเวลาดังกล่าว ซึ่งการสอบสวนโรคพบว่าอาหารที่สงสัยที่ทำให้เกิดโรคเป็นหอยแครงลวกซึ่งเป็นหอยแครงที่นำเข้ามาจากประเทศไทย(ตังคณะกุล,2008)

ปัจจุบันโรคอาหารเป็นพิษมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีการระบาดโรคอาหารเป็นพิษสูงสุด อย่างไรก็ดีการสอบสวน ป้องกัน และการควบคุมโรคอาหารเป็นพิษมีข้อจำกัด เนื่องจากในปัจจุบันการตรวจหาเชื้อโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ต้องใช้เวลานานกว่าจะทราบผลว่ามีเชื้อก่อโรคปนเปื้อนในอาหารที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (อย่างน้อย 3 วัน) ซึ่งทำให้การป้องกันและควบคุมโรคไม่สามารถทำได้ทันที โดยเฉพาะอาหารที่มีผู้จำหน่ายหลายระดับ เช่น หอยแครง เชื้อก่อโรคในอาหารจึงสามารถแพร่กระจายและก่อให้เกิดการระบาดของโรคติดต่อทางอาหารและน้ำ ดังนั้นการพัฒนาวิธีทาง molecular เช่นวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งจะสามารถทราบผลว่าอาหารมีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง และหากสามารถตรวจเชื้อก่อโรคติดต่อทางอาหารและน้ำหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกันโดยวิธี duplex PCR จะช่วยประหยัดเวลาและสารเคมี รวมทั้งสามารถควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อได้ดียิ่งขึ้น

สิ่งที่สำคัญในการตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR คือสามารถตรวจหาเชื้ออหิวาต์ในสภาพมีชีวิต แต่ไม่เติบโต (dormant stage) ซึ่งตรวจพบว่ามี metabolic และมีการใช้อากาศแต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นถ้ามีเชื้อในสภาพจำศีลในหอยแครงส่งออกระหว่างที่ขนส่ง เชื้อก็สามารถเพิ่มจำนวนจนถึงระดับที่สามารถทำให้ผู้รับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ สามารถมีอาการได้ การใช้วิธีนี้ในการตรวจหาเชื้ออหิวาต์ในสภาพส่งออก จึงมีผลต่อการควบคุมโรคสูงมาก เพราะใช้ในการป้องกันล่วงหน้า ซึ่งเชื่อว่าเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมเชื้อจะสามารถเปลี่ยนจากสภาพจำศีลเป็นสภาพที่สามารถเพาะเชื้อ และสามารถเพิ่มจำนวนได้ การ

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเฝ้าระวังเชื้อที่ก่อโรคที่สำคัญในหอยแครง คือ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* รวมทั้งเชื้อ *Salmonella* spp.และ *Shigella* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่สำคัญในประเทศไทย โดยการพัฒนาวิธี duplex PCR เพื่อตรวจสอบหอยแครงที่ส่งออกไปประเทศลาว และเส้นทางที่หอยแครงส่งขายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อใช้เป็นข้อมูลทาง molecular สำหรับเป็นฐานข้อมูลของเชื้อที่สำคัญในหอยแครงที่ส่งออก เพื่อใช้ในการยืนยันเมื่อมีการระบาดจากอาหารส่งออกของประเทศไทย และทำให้มีข้อมูลแหล่งที่มาของเชื้อและหาทางป้องกันก่อนที่เชื้อจะแพร่ต่อไป ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจและภาพลักษณ์ของประเทศได้ นอกจากนี้ยังทราบถึงความชุกของเชื้อที่ตรวจพบในหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การศึกษาครั้งนี้จะช่วยทำให้มีความตระหนักในการพัฒนาการเลี้ยงหอยแครงให้ถูกต้องตามมาตรฐานของกรมประมงมากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้ยังได้ทดสอบการดื้อยาของเชื้อที่พบในหอยแครง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการรักษาที่มีประสิทธิภาพและยังเป็นการเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้ออีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาความชุกของเชื้อ *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ในหอยแครงที่ส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่น
2. พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ในหอยแครงที่ส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่นโดยวิธี duplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีมาตรฐาน
3. ศึกษาคุณสมบัติการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่แยกได้จากหอยแครง ที่ส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่น

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ตัวอย่างหอยแครงจำนวน 161 ตัวอย่าง เก็บในช่วงเดือนมีนาคม – พฤศจิกายน พ.ศ. 2553 โดยแบ่งกลุ่มหอยแครงเป็น 4 กลุ่มตัวอย่าง

1. ตัวอย่างหอยแครงจากฟาร์ม 3 ฟาร์มที่เลี้ยงหอยแครงทางภาคใต้ของไทย ที่ส่งออกไปยังประเทศลาว โดยเก็บตัวอย่างหอยแครงเมื่อรถที่บรรทุกหอยแครง ถึงที่จังหวัดขอนแก่น และหนองคายโดยเก็บ 12 ครั้งๆละ 3 ตัวอย่างต่อสถานที่(โดยครั้งที่ 12 เก็บได้ 2 ตัวอย่าง) รวม 68 ตัวอย่าง
2. ตัวอย่างหอยแครงที่จำหน่ายในตลาดจังหวัดหนองคาย 7 แห่งได้แก่ จุดผ่อนปรนบ้านหม้อ อ.ศรีเชียงใหม่, ตลาดโพธิ์ชัย, ตลาดวัดธาตุ, ร้านจำหน่ายอาหารทะเล 1,ร้านจำหน่ายอาหารทะเล2 ตลาดท่าอุดม และตลาดแจ้งสว่าง โดยเก็บตัวอย่าง 8 ครั้งๆ ละ 7 ตัวอย่าง รวม 56 ตัวอย่าง
3. ตัวอย่างหอยแครงที่จำหน่ายในตลาดเมืองทองจังหวัดอุดรธานี โดยเก็บตัวอย่าง 7 ครั้งๆละ 1 ตัวอย่างรวม 7 ตัวอย่าง
4. ตัวอย่างหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดขอนแก่น 3 แห่ง ได้แก่ ตลาด อ.จิระ, ตลาดบางลำพู, ห้างสรรพสินค้า โดยรวม 30 ตัวอย่าง

นำตัวอย่างหอยแครงที่ได้มาศึกษายังห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจหาเชื้อ *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานและวิธี PCR หลังจากนั้นศึกษาคุณสมบัติการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความชุกของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงและอาหารเป็นพิษที่สำคัญ ในหอยแครงที่ส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานให้หน่วยงานที่รับผิดชอบ เช่น กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข หรือกรมประมง ให้มีการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดังกล่าว
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานแก่ประชาชนให้ระมัดระวังการบริโภคหอยแครงที่ปรุงสุกๆ ดิบๆ ที่อาจเสี่ยงต่อโรคอาหารเป็นพิษหรืออุจจาระร่วง
3. เป็นแนวทางที่จะเสนอแนะแก่ผู้ที่ทำฟาร์มเลี้ยงหอยแครง ตลอดจนหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ในการปรับปรุงระบบการเลี้ยงหอยแครงให้เป็นไปตามมาตรฐาน เพื่อผลิตสินค้าที่มีคุณภาพถูกสุขอนามัยปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น เป็นที่ต้องการทั้งในและต่างประเทศ
4. สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคแก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบาดวิทยา

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ (Foodborne disease) เป็นอุบัติการณ์ที่มีแนวโน้มสูงขึ้นทั่วโลก (Garbutt, 1997) ทั้งในประเทศพัฒนาและกำลังพัฒนา รวมทั้งประเทศไทยด้วย โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อนี้แบ่งออกเป็น 5 ประเภท ตามสาเหตุการเกิด ได้แก่ 1) infections 2) intoxication 3) metabolic food disorder 4) allergies และ 5) idiosyncratic illnesses (cliver & Riemann, 2002) World Health Organization ได้ให้ความหมายของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ว่า เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ (infections) หรือเกิดจากสารพิษ (toxin) เนื่องจากบริโภคน้ำและอาหารที่ปนเปื้อน (WHO, 1998) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษและพบว่าสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษส่วนใหญ่เกิดจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย (ร้อยละ 54.7) สาเหตุอื่นๆ พบได้น้อย ได้แก่ การปนเปื้อนสารเคมี (ร้อยละ 12.1) พิษจากพืช (ร้อยละ 12.1) พิษจากสัตว์ (ร้อยละ 2.1) ไม่ทราบสาเหตุ (ร้อยละ 19.0) ถ้าโรคอาหารเป็นพิษนั้นเกิดจากการที่ร่างกายบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นและปล่อยออกมาในอาหารเข้าไป เรียกว่า bacterial food intoxication ส่วนโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการบริโภคอาหารซึ่งปนเปื้อนตัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเข้าไป แล้วทำให้เกิดอาการแสดงของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลัน เรียกว่า bacterial food infection (Garbutt, 1997) บางรายงานได้กล่าวถึงโรคอาหารเป็นพิษที่มีแบคทีเรียเป็นสาเหตุ ว่าเป็นภาวะที่กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลัน จะแสดงอาการครั้งแรกหลังจากบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นหรือปนเปื้อนตัวเชื้อจุลินทรีย์ภายใน 2-3 ชั่วโมง หรือ 2-3 วัน ทั้งนี้ขึ้นกับอัตราการเจริญของเชื้อก่อโรค (Eley, 1996)

โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลัน (gastroenteritis) เป็นโรคในระบบทางเดินอาหาร มีลักษณะอาการที่สำคัญคือ ท้องร่วง อาเจียน ปวดท้อง (Eley, 1996; Garbutt, 1997) และอาจมีอาการไข้ร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้ อาการท้องร่วง คือภาวะที่การดูดซึมน้ำและเกลือแร่ผิดปกติ ทำให้สูญเสียของเหลวออกจากร่างกายหรือถ่ายเป็นน้ำหรืออาจเกิดเนื่องจากการบุกรุกผนังลำไส้ทำให้ mucosal cell ถูกทำลายทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ (Eley, 1996) นอกจากนี้องค์การอนามัยโลก ได้กำหนดคำจำกัดความของ โรคอุจจาระร่วงว่า เป็นภาวะที่มีการถ่ายอุจจาระเป็นน้ำมากกว่า 3 ครั้งต่อวัน หรือถ่ายมูกหรือปนเลือด อย่างน้อย 1 ครั้งใน 24 ชั่วโมง

ในชวงทศวรรษที่ผานมาของประเทศไทย อุบัติการณของโรคอาหารเปนพิษและโรคอุจจาระร่วงสูงเป็นอันดับต้นๆ ของโรคที่มีการเฝ้าระวังและยังเป็นปัญหาที่รัฐบาลให้ความสำคัญ เมื่อพิจารณาจากข้อมูลการเฝ้าระวังโรคที่สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่า ตั้งแต่ปี 2537 เป็นต้นมาอุบัติการณของโรคอาหารเปนพิษมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี และในปี 2547 สำนักระบาดวิทยาได้รับ

2.2 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงหรืออาหารเป็นพิษ

Vibrio cholerae

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่สร้างสปอร์ มีเอนไซม์ oxidase (Eley, 1996) มีแหล่งอาศัยอยู่ในน้ำ (aquatic water) เป็นสาเหตุของอหิวาตกโรค (cholerae) ซึ่งส่วนใหญ่เป็น water-borne disease ติดต่อจากการสัมผัสน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อไปยังมือ (Garbutt, 1997) *V. cholerae* แบ่งออกเป็น 2 serogroups คือ *V. cholerae* O1 และ O139 (Chomvarin et al., 2007) โดย *V. cholerae* O1 จำแนกออกเป็น 2 biotype คือ classical และ El Tor และจำแนกเป็น2 serotypes คือ Inaba และ Ogawa ส่วน *V. cholerae* สายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่ทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (agglutination) กับ O group1 antiserum จัดว่าเป็น non-O1 หรือ non-agglutinating vibrios (NAGs) โดยส่วนใหญ่ non-O1 strains จะทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบและติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ในคน รายงานการระบาดของเชื้อ *V. cholerae* ในปี 1961 การระบาดทั่ว

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงตรวจหายีน *ompW* ซึ่ง encode เป็น outer membrane protein มีบทบาทช่วยในการเกาะติด (adhere) และช่วยส่งเสริมให้เชื้อเจริญได้ดีในโฮสต์และสภาวะแวดล้อม (Sharma & Chaturvedi, 2006) และเป็นยีนที่จำเพาะสำหรับเชื้อ *V. cholerae* และยีน *rfb* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ "O" antigen ที่ช่วยจำแนกว่าเป็น O1 หรือ non-O1 (Singh et al., 2002)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (พฤศจิกายน 2546) ได้กำหนดคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาเพื่อให้ปลอดภัยต่อการบริโภคว่า อาหารดิบ อาหารทะเลที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ เช่น ปลา กุ้ง ปลาหมึก หอยดิบ มีค่ามาตรฐานของ *V. cholerae* คือ ต้องไม่พบในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม

Vibrio parahaemolyticus

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่สร้างสปอร์ มีเอนไซม์ oxidase เช่นเดียวกับ *V. cholerae* จัดเป็น enteric bacteria ที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลันในคน เมื่อบริโภคเนื้อดิบหรืออาหารทะเลสุกๆดิบๆ (Asim K. Bej, 1999; DePaola et al., 1990) โดยเชื้อมีระยะเวลาการฟักตัวประมาณ 12-24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรค คือ 10^5-10^7 cells ส่วนใหญ่มีถิ่นอาศัยอยู่ในน้ำเค็ม จึงจัดเป็น halophilic bacteria โดยเชื้อมักปนเปื้อนในอาหารทะเล เช่น ปลา หอย หรืออาจเกิดจากการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) ไปยังอาหารอื่น เช่น ผัก ได้ (Garbutt, 1997) เนื่องจากเชื้อสามารถบุกรุก mucosal ได้โดยตรง อีกทั้งยังมีความสามารถ ในการผลิตสารพิษต่างๆ ได้แก่ thermolabile hemolysin (TLH) ซึ่งถูก encode โดยยีน *tl* และ thermostable direct hemolysin (TDH) มีขนาดประมาณ 46 kDa ถูก encode โดยยีน *tdh* ซึ่งอยู่บนโครโมโซม TDH มีคุณสมบัติสำคัญคือ สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ทำให้เกิดรูและเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ทนความร้อนได้ดี นอกจากนี้มีบางงานวิจัยรายงานว่า TDH จะทำลาย microtubule cytoskeleton และการนำไอออนเข้าสู่เซลล์ (ion influx) (Vongxay et al., 2008) *V. parahaemolyticus* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคส่วนใหญ่จะให้ผลการทดสอบ Kanagawa positive (K^+) และผลิตสารพิษ TDH ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่มีความรุนแรงในการก่อโรค จะให้ผลการทดสอบ Kanagawa negative (K^-) และผลิตสารพิษ TLH จากการรายงานพบว่า 1% ของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและ 100% ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบจะให้ผลเป็น K^+ (Jay, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vongxay ซึ่งศึกษาลักษณะการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจและตัวอย่างอาหารทะเลและพบว่า 84 % ของ clinical isolates ให้ผล *tdh* positive ขณะที่ seafood isolates ให้ผล *tdh* positive เพียง 1.57% (Vongxay et al., 2008) ส่วนยีน *tl* จะพบใน *V. parahaemolyticus* ทุก strains (ong-Kyung Lee, 2008) การตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยและตัวอย่างอาหารทะเลโดยใช้ยีนเป้าหมาย 3 ยีน ได้แก่ *tl* , *tdh* และ *trh* ซึ่งจะถูก encode เป็น thermolabile hemolysin, thermostable direct hemolysin และ thermostable direct hemolysin-related protein พบว่า ความไวใน การตรวจพบเชื้ออยู่ในช่วง 10^1- 10^2 cfu ต่อ 10 g ของตัวอย่างหอยนางรมที่ถูก enrichment ใน alkaline peptone water และในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 111 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบยีน *tl* ได้ในทุกตัวอย่าง และพบ *tdh และ trh* จำนวน 60 และ43 isolate ตามลำดับ

โดยในการศึกษานี้เลือกใช้ยีน *tl* เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างหอยแครง เนื่องจากพบใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (พฤศจิกายน 2546) ได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาเพื่อให้ปลอดภัยต่อการบริโภค โดยกำหนดว่า 1) อาหารดิบ 2) อาหารทะเลที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ เช่น ปลา กุ้ง ปลาหมึก หอยดิบ 3) อาหารปรุงสุกทั่วไป เช่น ก๋วยเตี๋ยว ขนมยีน ยำ 4) อาหารแช่เย็นและแช่แข็ง มีค่ามาตรฐานของ *V. parahaemolyticus* คือ ต้องไม่พบในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม

Salmonella

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่สร้างสปอร์ เป็นเชื้อสาเหตุของโรค Salmonellosis โดยปริมาณเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคประมาณ 10^6 cells หรือบางครั้งอาจสูงถึง 10^8 -10^9 cells ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อและความไวของแต่ละบุคคล มีระยะฟักตัวประมาณ 12 -36 ชั่วโมง (Garbutt, 1997) เมื่อแบ่งเชื้อตามคุณสมบัติของแอนติเจนต่างๆ ได้แก่ somatic (O) และ flagella (H) antigen สามารถแบ่งได้ถึง 2000 serotypes โดยมีรายงานว่าเชื้อที่พบปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารและทำให้เกิดการระบาดส่วนใหญ่ในประเทศอเมริกาและอังกฤษ คือ *S. enteritidis* และ *S. typhimurium* ตามลำดับ มีหลายงานวิจัยที่ใช้ยีน *ori*C (origin of DNA replication) เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจหา *Salmonella* spp. จากตัวอย่างอาหาร โดยวิธี PCR พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. (Aabo *et al.*, 1995; Elizaquivel & Aznar, 2008; Zyskind & Smith, 1980)

ในการวิจัยนี้ได้เลือกใช้ *ori*C gene เป็นยีนเป้าหมายเพื่อตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างหอยแครง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (พฤศจิกายน 2546) ได้กำหนดคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาเพื่อให้ปลอดภัยต่อการบริโภคว่า 1) อาหารดิบ 2) อาหารดิบที่เตรียมหรือปรุงในสภาพที่พร้อมบริโภคทันที เช่น สลัด ส้มตำ 3) อาหารทะเลที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ เช่น ปลา กุ้ง ปลาหมึก หอยดิบ 4) อาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น แหนม ปลาร้า ปลาจ่อม 5) อาหารปรุงสุกทั่วไป เช่น ขนมยีน ยำ ไส้กรอก ก๋วยเตี๋ยว ขนม 6) อาหารปรุงสุกและแช่เย็น เช่น ขนมจีบ ลูกชิ้น มีค่ามาตรฐานของ *Salmonella* spp. คือ ไม่พบในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ส่วนเครื่องดื่มหาบเร่แผงลอย ต้องไม่พบ *Salmonella* spp. ต่อ 50 มล. ของเครื่องดื่ม

Shigella

เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่สร้างสปอร์และไม่เคลื่อนที่ จำแนกออกเป็น 4 serogroups ตามโครงสร้างของแอนติเจนและปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ ได้แก่ *S. dysenteriae* (groupA), *S. flexneri* (group B) , *S. boydii* (group C) และ *S. sonnei* (group D) เป็นเชื้อสาเหตุของโรคบิดไม่มีตัว (Bacillary dysentery หรือ Shigellosis) สามารถเข้าสู่ร่างกายได้โดยการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อปนเปื้อน โรคบิดนี้จะมีระยะฟักตัวนาน 1-4 วัน หลังจากได้รับเชื้อและก่อให้เกิดการแสดงอาการทางคลินิก เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้อาเจียน อุจจาระเหลวเป็นน้ำและมีมูกเลือดปน (จริยา ชมวารินทร์ และคณะ., 2542) เนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการก่อโรคได้โดยอาศัยกลไกหลัก คือ การบุกรุกเนื้อเยื่อ (invasiveness) โดยเชื้อจะมีการแสดงออกของ invasion plasmid antigen ซึ่ง encode โดยยีน *ipa* (Schaechter et al., 1993) ทำให้เชื้อบุกรุกเข้าฝังตัวเจริญอยู่ในเซลล์เยื่อเมือกของลำไส้ใหญ่ แล้วบุกรุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นผลให้เกิดการอักเสบของลำไส้ใหญ่เฉียบพลัน นอกจากนั้นเชื้อ *S. dysenteriae* type 1 ยังสามารถสร้างเอกโซทอกซิน ที่เรียกว่า Shiga toxin ซึ่งมีฤทธิ์เป็นทั้ง enterotoxin neurotoxin และ cytolyxin จึงทำให้เกิดโรครุนแรงกว่าชนิดอื่นๆ (จริยา ชมวารินทร์ และคณะ, 2542) โดยปริมาณเชื้อ *S. dysenteriae* ที่สามารถทำให้เกิดโรคคือประมาณ 10 cells (Garbutt, 1997; Jay, 2000) ส่วน *S. flexneri* และ *S. sonnei* ประมาณ 10^2-10^4 cells รายงานอาหารที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อ *Shigella* ได้แก่ น้ำนมดิบ ผักสด ผลไม้ สลัด หอย เนื้อไก่ (Garbutt, 1997; Jay, 2000) และอาหารทะเล ซึ่งการปนเปื้อนส่วนใหญ่เกิดจากสุขอนามัยส่วนบุคคลไม่ดี (Uyttendaele et al., 2001) ปัจจุบันวิธีการที่น่าเชื่อถือสำหรับตรวจหา *Shigella* ในอาหารยังเป็นไปได้ยาก (Uyttendaele et al., 2001) อีกทั้ง *Shigella* spp. ยังสามารถรอดจากการตรวจหาด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม (culture method) ได้เนื่องจาก 1) ความไวในการตรวจด้วยวิธี culture ค่อนข้างต่ำ 2) เชื้อก่อโรคมีปริมาณน้อย หรือ 3) สภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ pH ไม่เหมาะสม (Vu et al., 2004) ดังนั้นจึงได้พัฒนามาใช้วิธี PCR เพื่อตรวจหายีนที่จำเพาะของเชื้อ โดยในรายงานส่วนใหญ่ซึ่งตรวจหาเชื้อทั้งในตัวอย่างอาหาร และในสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์จะใช้ยีนเป้าหมายคือ invasion plasmid antigen H (*ipaH*) (Kong et al., 2002; Vu et al., 2004; Y. Li, 2005) ซึ่งการตรวจพบยีนนี้จะใช้ในการวินิจฉัยการถ่ายเป็นมูกเลือด (dysentery) โดย *ipaH* gene จะพบใน *Shigella* ทั้ง 4 สปีชีส์ รวมทั้งสามารถตรวจพบใน enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) ได้ด้วย โดยมีรายงานว่าการพบเชื้อ EIEC ใน fecal specimen พบได้น้อย แต่ส่วนใหญ่จะเป็น *Shigella* เมื่อเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ (Vu et al., 2004) จากการตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157:H7, *S.* typhimurium และ *S. flexneri* ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อ (ready-to-eat meat products) ด้วยวิธี duplex PCR โดยใช้ *ipaH* เป็นยีนเป้าหมายสำหรับตรวจหา *S. flexneri* พบว่า ความไวในการตรวจพบเชื้อประมาณ 0.2 $\log_{10}$ CFU/g

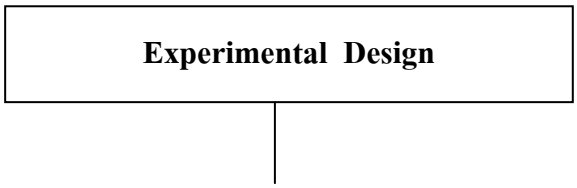
ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ใช้ยีนเป้าหมายคือ invasion plasmid antigen H (*ipaH*)

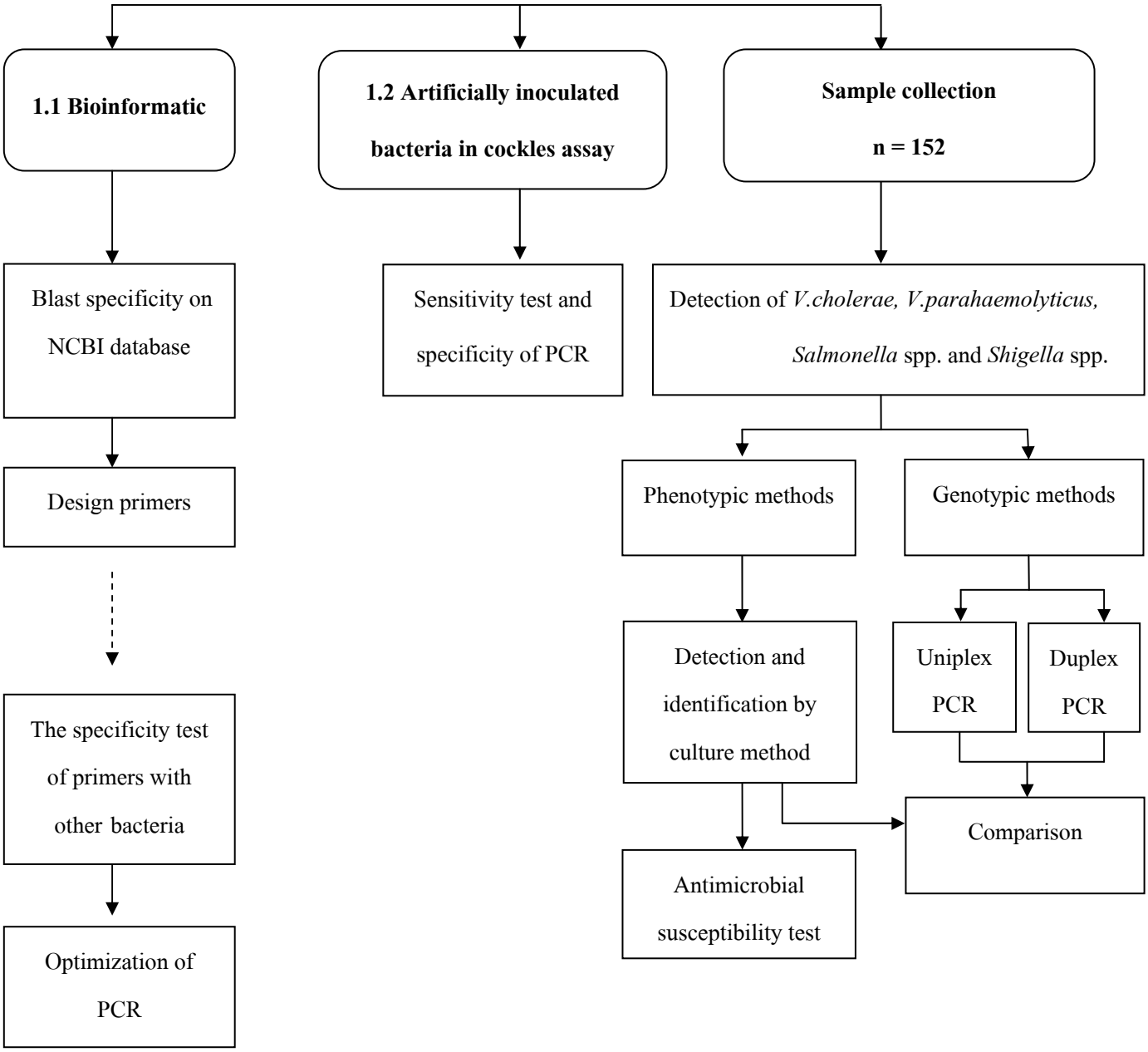
เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารซึ่งกำหนดโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (พฤศจิกายน 2546) สำหรับเชื้อ *Shigella* spp. ไม่ได้ระบุไว้แน่ชัดแต่อาจจะรวมอยู่ในเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งต้องไม่พบในตัวอย่างอาหารนั้น

2.3 วิธีในการตรวจหาเชื้อก่อโรคโรคอุจจาระร่วงหรืออาหารเป็นพิษ

วิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการตรวจหาและนับจำนวนแบคทีเรียก่อโรค อาศัยพื้นฐานของการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารคัดเลือกเชื้อที่ต้องการ (selective media) จากนั้นจึงระบุเชื้อโดยวิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical method) แต่เนื่องด้วยวิธีการเหล่านี้มีข้อด้อยหลายประการ (Kong et al., 2002) เช่น 1) เชื้อแบคทีเรียก่อโรคนั้นมีจำนวนน้อยทำให้ตรวจไม่พบเชื้อในตัวอย่าง ซึ่งทำให้เกิดการรายงานผลผิดพลาด 2) วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบวิธีมาตรฐานใช้เวลานาน (A. Jofre, 2005; Chomvarin et al., 2007; Y. Li, 2005) และสามารถตรวจเชื้อก่อโรคได้เพียงชนิดเดียว (monospecific) จึงจัดเป็น low throughput method และ 3) เชื้อก่อโรคหลายชนิดไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญเติบโตได้ไม่ดีเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแตกต่างจากเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมทั่วไป เรียกว่า viable but not culturable (VBNC) ดังนั้นปัจจุบันจึงได้พัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพและสามารถตรวจหาเชื้อก่อโรคได้รวดเร็ว โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันทั่วไป เนื่องจากเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือ รวดเร็ว มีความจำเพาะ มีความไว (A. Jofre, 2005) แต่อย่างไรก็ตามวิธี conventional PCR นี้ก็มีข้อจำกัด คือ สามารถตรวจหายีนของเชื้อได้เพียงหนึ่งยีนต่อหนึ่ง reaction ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนามาใช้วิธี duplex PCR ซึ่งสามารถตรวจหาหรือเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้มากกว่าหนึ่งยีนเป้าหมายใน PCR reaction เดียว ซึ่งจะช่วยให้ประหยัดเวลาและลดจำนวน reaction ที่ต้องใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหาร (A. Jofre, 2005; Elnifro, 2000)

รูปที่ 1 แผนผังในการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงหรืออาหารเป็นพิษในหอยแครง





บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย งานวิจัยประยุกต์ (Applied research)

3.2 ขนาดตัวอย่าง

ตัวอย่างหอยแครง จำนวน 161 ตัวอย่าง เก็บในช่วงเดือนมีนาคมถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 โดยแบ่งกลุ่มหอยแครงเป็น 4 กลุ่มตัวอย่าง

1. ตัวอย่างหอยแครงจากฟาร์ม 3 ฟาร์มที่เลี้ยงหอยแครงทางภาคใต้ของไทย ที่ส่งออกไปยังประเทศลาว โดยเก็บตัวอย่างหอยแครงเมื่อรถที่บรรทุกหอยแครง ถึงที่จังหวัดขอนแก่น และหนองคายโดยเก็บ 12 ครั้งๆละ 3 ตัวอย่างต่อสถานที่(โดยครั้งที่ 12 เก็บได้ 2 ตัวอย่าง) รวม 68 ตัวอย่าง
2. ตัวอย่างหอยแครงที่จำหน่ายในตลาดจังหวัดหนองคาย 7 แห่งได้แก่ จุดผ่อนปรนบ้านหม้อ อ.ศรีเชียงใหม่, ตลาดโพธิ์ชัย, ตลาดวัดธาตุ, ร้านจำหน่ายอาหารทะเล 1,ร้านจำหน่ายอาหารทะเล2 ตลาดท่าอุดม และตลาดแจ้งสว่าง โดยเก็บตัวอย่าง 8 ครั้งๆ ละ 7 ตัวอย่าง รวม 56 ตัวอย่าง
3. ตัวอย่างหอยแครงที่จำหน่ายในตลาดเมืองทองจังหวัดอุดรธานี โดยเก็บตัวอย่าง 7 ครั้งๆละ 1 ตัวอย่างรวม 7 ตัวอย่าง
4. ตัวอย่างหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดขอนแก่น 3 แห่ง ได้แก่ ตลาด อ.จิระ, ตลาดบางลำพู, ห้างสรรพสินค้า โดยรวม 30 ตัวอย่าง

เก็บหอยแครงตัวอย่างละประมาณ 1 กิโลกรัมใส่ในถุงพลาสติกนำมาศึกษายังห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.3 ขั้นตอนในห้องปฏิบัติการ

1. การหายีนเป้าหมายและออกแบบ Primer

การหายีนเป้าหมายที่มีความจำเพาะต่อเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษแต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำมาออกแบบ primer สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 1 การออกแบบ primer ในการศึกษานี้มีทั้งที่ได้จากการตีพิมพ์แล้วและถูกออกแบบใหม่โดยใช้โปรแกรม Primer3 (http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm) โดย Primer sequence ที่ถูกเลือกนำมาใช้เหล่านี้ได้ผ่านการตรวจสอบความจำเพาะโดยใช้โปรแกรม Blast ของ NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และวิเคราะห์ค่า Temperature Melting (Tm) อีกทั้งยังตรวจสอบโอกาสการเกิด hairpin,self-dimer,hetero-dimerโดยใช้โปรแกรม Integrated DNA technologies (http://idtdna.com/analyzer/Application/OligoAnalyzer)

2. การตรวจหายีนโดยวิธี Duplex PCR

2.1 การสกัด DNA

2.1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวเชื้อ

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ของเชื้อที่ใช้เป็น control ได้ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป โดยการเตรียมตัวอย่างเชื้ออย่างละ 1 โคโลนี ที่นำมาตรวจสอบต้องทำการเพาะเลี้ยงใน Brain heart infusion (BHI) broth 10 ml. และนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า (Shaking incubator) ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C , 18 – 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งมีขั้นตอนการทำโดยย่อคือ ใช้ Suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่น 14,000g เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ตัวเซลล์ตกตะกอน จากนั้นจึงเติม Cell lysis solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 5 นาที และเติม RNase a Solution(25 mg/µl) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นบนน้ำแข็ง จากนั้นเติม Protein precipitation solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000g เป็นเวลา 20 วินาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน แล้วดูดเอาส่วนน้ำใสส่วนบนซึ่งมีดีเอ็นเออยู่ใส่ในหลอด Centrifuge หลอดใหม่ที่บรรจุ 100% Isopropanal (2-proponol) ปริมาตร 300 µl จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 14,000g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 14,000g เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง แล้วคว่ำหลอด ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งประมาณ 5-10 นาที จากนั้นจึงเติม DNA Hydration Solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้ในการทำ PCR amplification

2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยการเติมเชื้อในหอยแครง

เพื่อเป็นการทดลองว่า การใช้วิธี PCR ตรวจเชื้อในอาหารสามารถทำได้จริง จึงได้ทดสอบคือ เตรียมเชื้อความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/ml. ใส่ลงในอาหาร 250 กรัม แล้วนำไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ จากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอเหมือนวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น

2.1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างหอยแครง

ชั่งตัวอย่างหอยแครง(เอาเปลือกออกแล้ว) มา 250 กรัม แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นเติมสารละลาย phosphate buffer 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว แล้วแบ่งสารละลายแขวนลอยเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก ดูดสารละลายแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อสกัดดีเอ็นเอในสภาวะที่ไม่ enrichment ส่วนที่ 2 ดูดสารละลายแขวนลอยปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ใน enrichment media โดย *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ใช้ alkaline peptone water (APW 10X), *Salmonella* spp. ใช้ Buffer peptone water (BPW) ส่วน *Shigella* spp. ใช้ Shigella broth (SG broth) แล้วนำ BPW และ APW ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ส่วน SG brothบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างอาหารที่ผ่านการ enrichment แล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอเหมือนวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น

<u>การทำ DNA amplification</u>

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ duplex PCR ใช้ primer sequence และ PCR conditions ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Primer sequence และ PCR conditions สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp.

Organisms	**Target gene**	**Primer sequence (bp)**	**Amplicon size (bp)**	**Reference**
V. cholerae	*ompW* (outer membrane protein W)	F-5'-GTACTTGCAGCCCTAAGCTC-3' (20) R-5'-GGACCATAAAGGTAGGTGGC-3' (20)	307	Warawan
V.parahaemolyticus	*tl* (thermolabile hemolysin)	F-5'-CCACATTAGATTTGGCGAACGA -3' (22) R-5'-CAGACAAGCTGTCACCGAGT-3' (20)	150	Warawan
Salmonella spp.	*oriC* (replication origin sequence)	F-5'-TTA TTA GGA TCG CGC CAG GC-3' (20) R-5'-GGA CCA CGA TCA CCG ATC A-3' (19)	100	Patricia Elizaquıvel, (2008)
Shigella spp.	*ipaH* (Invasion plasmid antigen H)	F-5'-AGTGCCTCTGCGGAGCTTCG-3' (20) R-5'-GGAGAGTTCTGACTTTATCCCG-3' (22)	232	Modified of Jin D. (2008)
V. cholerae	*ctxA* (cholerae toxin A subunit)	F -5'-TGGTCTTATGCCAAGAGGACA-3' (21) R -5'-ATCTTGGAGCATTCCCACAAC-3'(21)	517	Bunnapa
V. cholerae O1	*rfbO1*	F-5'- TCTATGTGCTGCGATTGGTG -3'(20) R-5'- ACCCCGAAAACCTAATGTGAG-3' (21)	639	Modified from Goel , A. K. (2007)
V. cholerae O139	*rfbO139*	F-5'- AGCCTCTTTATTACGGGTGG-3' (20) R-5'- GTCAAACCCGATCGTAAAGG-3'(20)	449	Alam, M. (2006)

จากตารางที่ 1 องค์ประกอบของ Reaction mixture สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้ง 4 ชนิด (ปริมาตรรวม 50 µl) ความเข้มข้นโดยประมาณประกอบด้วย

- 1X PCR buffer
- 1.5 mM $MgCl_2$
- 200 µM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)
- 0.2 – 0.5 µM ของ Primer แต่ละสาย
- 2.0 – 2.5 U Taq DNA polymerase
- 100 – 200 ng ของ DNA template
- Sterile water (ใช้ในการปรับปริมาตรและใช้เป็น negative control)

<u>การตรวจหา PCR product</u>

โดยนำ amplified product ที่ได้ไปแยกด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วยethidium bromide จากนั้นจึงนำไปดูภายใต้กล้องซึ่งใช้แสง Ultraviolet(UV) (Imagemaster VDS , Pharmacia Biotech USA) จะปรากฏแถบ (Band) ดีเอ็นเอให้เห็น ซึ่งตรงกับขนาดของ PCR product ที่ต้องการเมื่อเทียบกับ Standard marker

2.1.4 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) และความไว (Sensitivity) ของวิธี Duplex PCR

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ทดสอบความจำเพาะของ Primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายของเชื้อแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยการใช้ดีเอ็นเอของเชื้อในจีนัส และสปีชีส์เดียวกัน แต่หลายสายพันธุ์ นอกจากนั้นยังทดสอบความจำเพาะกับเชื้อต่างจีนัสและต่างสปีชีส์ด้วย เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ โดยใช้เชื้อ *V.cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139, *V. parahaemolyticus, Salmonella* spp., *Shigella* spp. *S.aureus, Aeromonas spp., Plesiomonas spp., Klebsiella spp., Campylobacter jejuni* 1410, 1810, 1809, *V. alginolytius, V. vulnificus, V. mimicus*

การทดสอบความไว (Sensitivity) คือ การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอหรือยีนเป้าหมายน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี PCR สามารถตรวจทดสอบได้โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น ก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วคำนวณความเข้มข้นต่ำสุดของจำนวนเชื้อที่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อได้

3. การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหาร โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแบบวิธีมาตรฐาน

การตรวจหาและระบุเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* (Chomvarin *et al.*, 2006)

มีวิธีทำโดยย่อคือ ชั่งตัวอย่างหอยแครงที่แกะเปลือกแล้วมา 250 กรัม ใส่ในสารละลาย phosphate buffer saline solution 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายแขวนลอย 20 ml. ใส่ใน APW (10X) pH 8.4 ปริมาตร 80 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมงจากนั้น นำมาเพาะเลี้ยง(Subculture) ลงในอาหาร Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS, Eiken) ซึ่งเป็น selective media สำหรับ *Vibrio* spp. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี (typical colony) ของ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งมีลักษณะดังนี้ คือ โคโลนีสีเหลืองเรียบ และโคโลนีขนาดใหญ่สีเขียวแกมน้ำเงิน ตามลำดับ จากนั้นจึงนำโคโลนีที่ให้ผลบวกมาทดสอบคุณสมบัตาทางชีวเคมี(biochemical test) ได้แก่ oxidase test และใช้อาหารทดสอบได้แก่ Triple Sugar Iron (TSI), Motile-Indole(MI) , Lysine (L) และความสามารถในการเจริญในความเข้มข้นต่าง ของเกลือ (0, 3, 6, 8, 10 % NaCl)

การตรวจหาและระบุเชื้อ *Salmonella* spp. (Chomvarin *et al*., 2006)

วิธีการทำโดยย่อคือ ชั่งตัวอย่างหอยแครงที่แกะเปลือกแล้วมา 250 กรัม ใส่ในสารละลาย phosphate buffer saline solution 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายแขวนลอย 20 มิลลิลิตร ใส่ใน BPW ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำ BPW ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นสารแขวนลอยจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำมาเพาะเลี้ยง(Subculture) ลงในอาหาร Salmonella-Shigella (SS) agar และ Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี (typical colony) ของ *Salmonella* spp. บน SS agar และ XLD agar ซึ่งมีลักษณะดังนี้คือ โคโลนีสีดำและมีลักษณะคล้าย Clear zone รอบๆ โคโลนี และโคโลนีสีแดง ขนาด 3-5 มิลลิเมตร อาจมีหรือไม่มีสีดำตรงกลางโคโลนี ส่วนที่สอง ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSRV โดยใช้ pasture pipette ดูดสารแขวนลอยขึ้นมาและหยดลงบนผิวหน้าอาหาร MSRV เป็น 4 มุม ในแนวตั้งฉาก จุดละ 1 หยด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะการเคลื่อนที่ของ *Salmonella* spp. บนอาหาร MSRV ซึ่งมีลักษณะคล้าย Precipitin band จากนั้นจึงนำโคโลนีที่ให้ผลบวกไปเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร SS agar และ XLD agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวข้างต้น ซึ่งถือว่าเป็น Positive colony และนำมาทดสอบคุณสมบัติด้านต่างๆ และคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test) โดยใช้อาหารทดสอบได้แก่ Triple Sugar Iron(TSI) , Motile-Indole(MI) , Lysine (L) , Urea agar และ Citrate(C)

การตรวจหาและระบุเชื้อ *Shigella* spp. (Uyttendaele et al., 2001)

วิธีการทำโดยย่อคือ ชั่งตัวอย่างหอยแครงที่แกะเปลือกแล้วมา 250 กรัม ใส่ในสารละลาย phosphate buffer saline solution 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายแขวนลอย 20 มิลลิลิตร ใส่ใน *Shigella* broth (SB) ที่มียาปฏิชีวนะ novobiocin ความเข้มข้น 3.0 μg/ml ปริมาตร 80 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาเพาะเลี้ยง (subculture) ลงในอาหาร Salmonella-Shigella (SS) agar และ Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี (typical colony) ของ *Shigella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar (โคโลนีขนาดเล็ก สีใส ขอบเรียบ ผิวหน้านูน) และ XLD agar (โคโลนีสีแดง ขนาด 2-4 มม. ขอบเรียบ ผิวหน้านูน) จากนั้นจึงนำโคโลนีที่ให้ผลบวก (Positive colony) มาทดสอบคุณสมบัติด้านต่างๆ และคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) โดยใช้อาหารทดสอบได้แก่ Triple Sugar Iron (TSI), Motile-Indole (MI), Lysine (L), Urea agar และ Citrate (C)

4. การทดสอบการดื้อของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ

ใช้วิธี Disk agar diffusion เพื่อดูผลของยาปฏิชีวนะในการฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อแพทย์จะได้เลือกใช้ยาให้ถูกต้องในการรักษาโรค

<u>การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์</u> มีวิธีการดังนี้คือ นำโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิดของเชื้อซึ่งเจริญในอาหาร Blood agar plate จำนวน 3-4 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในหลอดซึ่งบรรจุอาหาร trypticase soy broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง จากนั้นปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland No.0.5

<u>การทดสอบ</u> ใช้ Swab ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยของเชื้อที่เจือจางแล้วนำมาป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (หนา 4 มิลลิเมตร) เป็น 3 ระนาบ ทิ้งให้ Plate แห้งแล้วจึงวาง Disk ที่มีตัวยาชนิดต่างๆ ลงผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ปากคีบ (Forcep) ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง

<u>การอ่านผลการทดสอบ</u> วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone แล้วนำค่าวัดได้ไปเปรียบเทียบกับค่าในตารางมาตรฐานและรายงานผล โดยรายงานเป็น Sensitivity (S) , Intermediate sensitive (I) และ Resistant (R) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *V.cholerae* , *V. parahaemolyticus, Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. และการแปลผลจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น	เส้นผ่านศูนย์กลาง(Zone diameter)(มม.) และการแปลผล		
		Resistant	Intermediate	Sensitivity
1.Ampicillin (AMP)	10 µg	≤ 13	14-16	≥17
2.Chloramphenicol (C)	30 µg	≤ 12	13-17	≥18
3.Norfloxacin (NOR)	10 µg	≤ 12	13-16	≥17
4.Ofloxacin (OFX)	5 µg	≤ 12	13-15	≥16
5. Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)	1.25/23.75 µg	≤ 10	11-15	≥16
6.Tetracycline (TE)	30 µg	≤ 11	12-14	≥15

ที่มา : CLSI , 2007 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. หาเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *V.cholerae* ,*V. parahaemolyticus, Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. โดยวิธี PCR
2. หาเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *V.cholerae* ,*V. parahaemolyticus, Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. โดยวิธีเพาะเชื้อ
3. เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *V.cholerae* ,*V. parahaemolyticus, Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. โดยวิธี PCR และวิธีเพาะเชื้อ
4. หาเปอร์เซ็นต์การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อดังกล่าวในหอยแครงเปรียบเทียบกับในผู้ป่วย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการตรวจหาเชื้อ *V.cholerae, V. parahaemolyticus, Salmonella* spp. และ*Shigella* spp. ในตัวอย่างหอยแครงจากฟาร์มเลี้ยงหอยแครงทางภาคใต้ของไทยที่ส่งออกไปยังสาธารณรัฐประชาธิป-ไตยประชาชนลาว และหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่นโดยวิธี duplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีมาตรฐาน จากจำนวนตัวอย่างหอยแครงทั้งหมด 161 ตัวอย่าง (ระหว่างเดือนมีนาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน) ให้ผลการพบเชื้อดังนี้

4.1 การพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยแครง

จากการตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีเพาะเชื้อและวิธี PCR ตัวอย่างหอยแครงทั้งหมด 161 ตัวอย่างพบว่า ตรวจพบเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อร้อยละ 65.2 (105/161) ในขณะที่ตรวจด้วยวิธี PCR พบเชื้อร้อยละ 86.3 (139/161) (ตารางที่ 3)

เมื่อพิจารณาถึงสถานที่ในการเก็บตัวอย่าง 4 แห่งพบว่า หอยแครงจากทั้ง 3 ฟาร์มที่ส่งออกไปยังสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่น ตรวจพบเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อร้อยละ 66.2 (45/68), 89.3 (50/56), 71.4(5/7) และ 20(6/30) ตามลำดับ ในขณะที่ตรวจด้วยวิธี PCR พบเชื้อ ร้อยละ 75 ในตัวอย่างหอยแครงจากฟาร์มที่ส่งออกไปประเทศลาว และร้อยละ 100 จากหอยแครงในจังหวัดอุดรธานี และร้อยละ 86.3 จากหอยแครงในจังหวัดขอนแก่น (ตารางที่ 3)

การพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยแครงจากทั้ง 3 ฟาร์มที่ส่งออกไปยังสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว เมื่อเก็บตัวอย่างที่ขอนแก่นและหนองคาย พบว่า เก็บตัวอย่างที่ขอนแก่น ตรวจพบเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อร้อยละ 64.7 (22/34) ส่วนที่หนองคายตรวจพบเชื้อร้อยละ 67.6 (23/34) และเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR เก็บที่ขอนแก่นและหนองคายพบเชื้อ ร้อยละ 82.4 (28/34) และร้อยละ 79.4 (27/34) ตามลำดับ

จากการตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีเพาะเชื้อและวิธี PCR ในตัวอย่างที่เก็บมาจากสภาวะที่ไม่ได้กระตุ้นการเจริญของเชื้อ และ สภาวะที่ใส่อาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (enrichment) พบว่า ตรวจพบเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อในสภาวะที่ไม่กระตุ้นการเจริญของเชื้อ ร้อยละ

หลังจากที่ตรวจไม่พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี duplex PCR จากหอยแครง 4 ตัวอย่าง ได้นำตัวอย่างดังกล่าวมาตรวจด้วยวิธี uniplex PCR ซึ่งมีความไวกว่าวิธี duplex PCR พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อจากตัวอย่างหอยแครงทั้ง 4 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 5

4.2 การพบเชื้อ *V. cholerae* ในตัวอย่างหอยแครง

จากการตรวจหาเชื้อ *V. cholerae* โดยวิธีเพาะเชื้อและวิธี PCR ในตัวอย่างหอยแครงทั้งหมด 161 ตัวอย่างพบว่า ตรวจพบเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อร้อยละ 2.0 (3/161)โดยพบว่าเป็น *V. cholerae* O1 Ogawa จาก 1 ตัวอย่างและ *V. cholerae* non O1 จาก 2 ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวอย่างหอยแครงจากฟาร์มที่จะส่งออกประเทศลาว ในขณะที่ตรวจด้วยวิธี PCR พบเชื้อ *V. cholerae* ร้อยละ 72.0 (111/161) โดยพบเชื้อในหอยแครงจากฟาร์มที่ส่งออกไปประเทศลาว ร้อยละ 76.5 (52/68) จากตัวอย่างหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย พบเชื้อร้อยละ 66.1 (37/56) หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดอุดรธานี พบเชื้อร้อยละ 57.1 (4/7) และหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดขอนแก่น พบเชื้อร้อยละ 73.3 (22/30) (ตารางที่ 3) โดยพบว่าเป็น *V.cholerae* O1 ร้อยละ 52.4 (11/21)

4.3 การพบเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างหอยแครง

จาการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างหอยแครงโดยวิธีเพาะเชื้อและวิธี PCR ในตัวอย่างหอยแครงทั้งหมด 161 ตัวอย่างพบว่า ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธีเพาะเชื้อ ในขณะที่ตรวจพบเชื้อ 1.3% เมื่อตรวจด้วยวิธี PCR (ตารางที่ 3)

4.4 การพบเชื้อ *Shigella* spp. ในตัวอย่างหอยแครง

จาการตรวจหา *Shigella* spp. ในตัวอย่างหอยแครงโดยวิธีเพาะเชื้อและวิธี PCR ในตัวอย่างหอยแครงทั้งหมด 161 ตัวอย่างพบว่า ตรวจไม่พบเชื้อจากทั้ง 161 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจนับจำนวนเชื้อทั้งหมด (Total plate count, mean) และจำนวนการตรวจพบเชื้อ *V.cholerae, V. parahaemolyticus, Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ในตัวอย่างหอยแครง

Source of cockles	No.	Total plate count (mean)	จำนวน (ร้อยละ) การพบเชื้อ							
			V.cholerae		*V. parahaemolyticus*		*Salmonella* spp.		*Shigella* spp.	
			culture	PCR	culture	PCR	culture	PCR	culture	PCR
1. หอยแครงจากฟาร์มส่งออกประเทศลาว										
1.1 ฟาร์มที่ 1 เก็บที่ ขอนแก่น	11	3.2×10^2	1(9.1)	8(72.7)	6(54.5)	9(81.8)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
1.2 ฟาร์มที่ 1 เก็บที่ หนองคาย	11	6.3×10^2	1(9.1)	10(90.9)	8(72.7)	10(90.9)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
1.3 ฟาร์มที่ 2 เก็บที่ ขอนแก่น	11	3.9×10^2	1(9.1)	8(72.7)	9(81.8)	10(90.9)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
1.4 ฟาร์มที่ 2 เก็บที่ หนองคาย	11	4.7×10^2	0(0)	9(81.8)	7(63.6)	8(72.7)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
1.5 ฟาร์มที่ 3 เก็บที่ ขอนแก่น	12	1.3×10^3	0(0)	9 (75)	7(58.3)	9 (75)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
1.6 ฟาร์มที่ 3 เก็บที่ หนองคาย	12	2.7×10^3	0(0)	8 (66.7)	8 (66.7)	9 (75)	0(0)	1(8.3)	0(0)	0(0)
รวม	68	9.8×10^2*	3(4.4)	52(76.5)	51(66.2)	51(75)	0(0)	1(1.5)	0(0)	0(0)
2. หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย										
2.1 จุดผ่อนปรนบ้านหม้อ อ. ศรีเชียงใหม่	8	4.5×10^2	0(0)	7(87.5)	7(87.5)	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2.2 ตลาดโพธิ์ชัย	8	7.7×10^4	0(0)	6(75)	7(87.5)	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2.3 ตลาดวัดธาตุ	8	1.7×10^6	0(0)	6(75)	7(87.5)	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2.4 ร้านจำหน่ายอาหารทะเล 1	8	1.2×10^3	0(0)	5(62.5)	8(100)	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2.5 ร้านจำหน่ายอาหารทะเล 2	8	1.2×10^3	0(0)	7(87.5)	7(87.5)	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2.6 ตลาดคิวรถไฟ	8	5.5×10^5	0(0)	6(75)	6(75)	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2.7 ตลาดแจ้งสว่าง	8	7.6×10^4	0(0)	4(50)	8(100)	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
รวม	56	3.5×10^5*	0(0)	37(66.1)	50(89.3)	56(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
3. หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดอุดรธานี ตลาดเมืองทอง	7	1.6×10^5	0(0)	4(57.1)	4(57.1)	4(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
4. หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดขอนแก่น										
4.1 ตลาด อ. จิระ	6	4.6×10^7	0(0)	3(50)	2(100)	1(100)	0(0)	1(16.7)	0(0)	0(0)
4.2 ตลาดบางลำพู	11	3.2×10^3	0(0)	9(81.8)	1(9.1)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
4.3 ห้างสรรพสินค้า	13	2.9×10^6	0(0)	10(76.9)	3(23.1)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
รวม	30	1.6×10^7*	0(0)	22(73.3)	6(20)	3(100)	0(0)	1(3.3)	0(0)	0(0)
รวมตัวอย่างหอยแครงทั้งหมด	161	1.3×10^6*	3(1.9)	115(71.4)	105(65.2)	139(86.3)	0(0)	2(1.2)	0(0)	0(0)

*ค่าเฉลี่ยของเชื้อ

ตารางที่ 4 การตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีเพาะเชื้อและวิธี PCR ในสภาวะที่ไม่กระตุ้นการเจริญของเชื้อ และกระตุ้นการเจริญของเชื้อ ตัวอย่างหอยแครงก่อนตรวจวิเคราะห์

แหล่งตัวอย่างหอยแครง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวน (ร้อยละ) การพบเชื้อ *V. parahaemolyticus*			
		เพาะเชื้อ		PCR	
		ไม่กระตุ้นการเจริญของเชื้อ	กระตุ้นการเจริญของเชื้อ	ไม่กระตุ้นการเจริญของเชื้อ	กระตุ้นการเจริญของเชื้อ
1. หอยแครงจากฟาร์มส่งออกประเทศลาว	68	22 (32.4)	45 (66.2)	40 (58.8)	55 (80.9)
2. หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย	56	36 (64.2)	50 (89.3)	56 (100)	56 (100)
3. หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดอุดรธานี	7	4 (57.1)	4 (57.1)	5 (71.4)	7 (100)
4. หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดขอนแก่น	30	3 (10)	5 (16.7)	19 (63.3)	22 (73.3)
รวม	161	64 (40.4)	104 (64.6)	120 (74.5)	140 (87)

ตารางที่ 5 การตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยแครง โดยวิธี uniplex PCR และวิธี duplex PCR

		จำนวน (ร้อยละ) การพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี duplex PCR		รวม
		พบเชื้อ	ไม่พบเชื้อ	
จำนวน (ร้อยละ) การพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี uniplex PCR	พบเชื้อ	74 (94.9)	4 (5.1)	78 (100)
	ไม่พบเชื้อ	0 (0)	0 (0)	0 (0)
รวม		74 (94.9)	4 (5.1)	78

4.4 การทดสอบการดื้อของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ

จากผลการเพาะเชื้อที่พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างหอยแครง 61 ตัวอย่างเมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบการดื้อของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด ได้แก่ ampicillin (AMP), chloramphenicol (C), norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFX), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) และ tetracycline (TE) พบว่าเชื้อดื้อกับยา ampicillin ร้อยละ 93.8(91/97) ในขณะที่เชื้อไม่ดื้อกับยา chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline และยาในกลุ่ม fluoroquinolones ซึ่งได้แก่ norfloxacin, ofloxacin (ร้อยละ0 (0/97) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบการดื้อของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด

แหล่งที่เก็บหอยแครง	จำนวนเชื้อที่แยกได้	จำนวน (ร้อยละ) เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ดื้อกับยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด					
		AMP	C	NOR	OFX	SXT	TE
1. หอยแครงจากฟาร์มส่งออกประเทศลาว	38	35(92.1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2. หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย	50	47(94)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
3. หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดขอนแก่น	6	6(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
4. หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดอุดรธานี	3	3(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
รวม	97	91(93.8)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

AMP: ampicillin; C: chloramphenicol; NOR: norfloxacin; OFX: ofloxacin;
SXT;trimethoprim-sulfamethoxazole; TE: tetracycline

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

จากการตรวจหาเชื้อ *V.cholerae, V. parahaemolyticus, Salmonella* spp. และ*Shigella* spp. ในตัวอย่างหอยแครงจากฟาร์มเลี้ยงหอยแครงทางภาคใต้ของไทยที่ส่งออกไปยังสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่นโดยวิธี duplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีมาตรฐานนั้นสรุปได้ดังนี้

ความชุกในการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยแครง สูงถึงร้อยละ 65.2 (105/161) เมื่อตรวจด้วยวิธีเพาะเชื้อและร้อยละ 86.3 (139/161) เมื่อตรวจด้วยวิธี PCR ซึ่งเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Thararat Chitov และคณะ (2009) ที่ศึกษาหาเชื้อ *Vibiro* spp. ในอาหารทะเลสด ที่จำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่โดยโดยวิธีเพาะเชื้อ ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 43.6 จาก 118 ตัวอย่าง (Chitov, 2009) และมีความชุกสูงกว่าการศึกษาของ Jean-Philippe-Rosec และคณะ (2008) ได้ศึกษาตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ใน Shellfish ที่พบเพียงร้อยละ 5.2 (3/57) โดยวิธีเพาะเชื้อ และร้อยละ 43.9 ด้วยวิธี PCR (Rosec *et al.*, 2009) ซึ่งแสดงถึงหอยแครงที่จำหน่ายในเขตจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่น มีความชุกในการพบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงและอาหารเป็นพิษสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหอยแครงจากฟาร์มที่ส่งออกไปยังประเทศลาว มีความชุกของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงถึงร้อยละ 66.2 (45/68) โดยวิธีเพาะเชื้อ และ ร้อยละ 80.9 (55/68) โดยวิธี PCR รวมทั้งหอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย ซึ่งเป็นจังหวัดชายแดนที่อยู่ติดประเทศลาว มีความชุกของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงถึงร้อยละ 89.3 (50/56) โดยวิธีเพาะเชื้อ และ ร้อยละ 100 (56/56) โดยวิธี PCR ดังนั้นในการบริโภคหอยแครงควรปรุงให้สุกก่อนรับประทานเพื่อความปลอดภัยในการบริโภค

ความชุกในการพบเชื้อ *V. cholerae* ในตัวอย่างหอยแครง ร้อยละ 71.4 (111/161) เมื่อตรวจด้วยวิธี PCR และตรวจพบโดยวิธีเพาะเชื้อเพียง ร้อยละ 1.9 (3/161) ทั้งนี้อาจเกิดจากเชื้ออยู่ในระยะพัก (resting state) หรือระยะ viable but non-culturable (VBNC) state ซึ่งจะไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีเพาะเชื้อ แต่ตรวจพบได้ด้วยวิธี PCR โดยเชื้อในระยะดังกล่าวนี้ยังมีชีวิตอยู่และอาจก่อโรคได้เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมหากมียีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (Chomvarin *et al.*, 2007) โดยหอยแครง 21 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* นั้นพบว่าเป็น *V. cholerae* O1สูงถึงร้อยละ 52.4 (11/21)โดยการตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* ในการศึกษานี้มีอัตราการพบที่สูงเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Gitika Panicker และคณะ (2004) ที่ตรวจไม่พบเชื้อ *V. cholerae* ในหอยนางรมด้วยวิธี Duplex PCR (ยีน *omp*U, *tox*R, *tcp*I และ *hly*A) ขณะที่การศึกษาของ

จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp., เพียงร้อยละ 1.2% โดยวิธี PCR และไม่พบเชื้อ *Shigella* spp. ในตัวอย่างหอยแครง 161 ตัวอย่าง ทั้งโดยวิธีเพาะเชื้อและวิธี PCR ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Vantarakis และคณะ(2000) ที่ศึกษาตรวจหาเชื้อ *Shigella* spp ในหอยแมลงภู่ในประเทศกรีซ ซึ่งตรวจไม่พบเชื้อ *Shigella* spp. (Vantarakis *et al.*, 2000) และจากการศึกษาของ Martinez-Urtaza และคณะ (2003) ที่ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ใน อาหารทะเล ซึ่งตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. เพียงร้อยละ 1.8 จาก 2,980 ตัวอย่าง โดยเฉพาะในหอยแครงซึ่งพบว่าตรวจพบเชื้อได้น้อยกว่าอาหารทะเลชนิดอื่น เนื่องจากลักษณะการเจริญเติบโต (growing habitat) ของหอยแครงที่ต่างจากสัตว์ทะเลชนิดอื่น (Martinez-Urtaza *et al.*, 2003)

จากผลการพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *V.cholerae, V. parahaemolyticus, Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ในหอยแครงด้วยวิธี duplex PCR ระหว่างยีน *omp*W ของเชื้อ *V.cholerae* และยีน *tl* ของเชื้อ *V.parahaemolyticus* และ วิธี duplex PCR ระหว่างยีน *ori* C ของเชื้อ *Salmonella* spp. และยีน *ipa*H ของเชื้อ *Shigella* spp. เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อนั้นจะเห็นว่า วิธี duplex PCR มีความไวในการตรวจพบเชื้อ *V.cholerae* และ *V. parahaemolyticus* มากกว่า คือร้อยละ 18.6 (30/161) และร้อยละ 142 (142/134) ตามลำดับ ในขณะที่วิธีเพาะเชื้อมีความไวในการตรวจพบเชื้อร้อยละ 1.9 (3/161) และ 65.2(105/161) ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่กระตุ้นการเจริญของเชื้อ(enrichment)และไม่กระตุ้นการเจริญของเชื้อก่อนทำการตรวจนั้นจะเห็นว่า ในสภาวะที่กระตุ้นการเจริญของเชื้อ จะมีโอกาสตรวจพบเชื้อได้มากกว่าสภาวะที่ไม่ได้กระตุ้นการเจริญของเชื้อ ทั้งจากวิธีเพาะเชื้อ (จากร้อยละ 40.4 เป็น 64.6) และวิธี PCR (จากร้อยละ 74.5 เป็น 87) อย่างไรก็ตาม การตรวจ PCR ในสภาวะที่ยังไม่กระตุ้นการเจริญของเชื้อ ยังจำเป็นอยู่มาก เนื่องจากผลการตรวจพบเชื้อ *V.cholerae* ในสภาวะที่ไม่ได้กระตุ้นการเจริญของเชื้อ พบร้อยละ 17.9 (24/134) ในขณะที่สภาวะกระตุ้นการเจริญของเชื้อตรวจพบเชื้อร้อยละ 0.8 (1/134) กล่าวคือ ที่สภาวะยังไม่กระตุ้นการเจริญของเชื้อ ตรวจพบทั้ง *V.cholerae* และ *V. parahaemolyticus* แต่เมื่อ กระตุ้นการเจริญของเชื้อ แล้ว ตรวจพบเพียง *V. parahaemolyticus* ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าเกิดจากการมีเชื้อหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกัน เมื่อเชื้อชนิดหนึ่งเพิ่มจำนวนมากกว่าเชื้ออีกชนิดหนึ่งมาก จะทำให้มีโอกาสน้อยในการตรวจพบเชื้อที่มีปริมาณน้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Patricia Elizaquivel (2008) ที่ตรวจหาเชื้อ *E.coli* 0157:H7, *Salmonella* spp และ *S.aureus* ในผักสด โดยวิธี Duplex real time PCR ซึ่ง Inoculate เชื้อในปริมาณที่ต่างกันคือ 10 และ 10^4 cell/reaction พบว่าตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ (Elizaquivel & Aznar, 2008)

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากการเพาะเชื้อมีการดื้อต่อยา ampicillin ร้อยละ 93.8 (91/97) ในขณะที่ไม่ดื้อต่อ chloramphenicol, norfloxacin, ofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole และ

เอกสารอ้างอิง

A. JOFRE, B. M., M. GARRIGA, M. HUGAS, M. PLA,D. RODRIGUEZ-LAZARO, T. AYMERICH (2005). Simultaneous detection of Listeria monocytogenes and Salmonella by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiology,* 22**,** 109-115.

AABO, S., ANDERSEN, J. K. and OLSEN, J. E. (1995). Research note: detection of Salmonella in minced meat by the polymerase chain reaction method. *Lett Appl Microbiol,* 21**,** 180-182.

ALAM, M., SADIQUE, A., NUR, A. H., BHUIYAN, N. A., NAIR, G. B., SIDDIQUE, A. K., SACK, D. A., AHSAN, S., HUQ, A., SACK, R. B. and COLWELL, R. R. (2006). Effect of transport at ambient temperature on detection and isolation of Vibrio cholerae from environmental samples. *Appl Environ Microbiol,* 72**,** 2185-2190.

ASIM K. BEJ, D. P. P., CYNTHIA W. BRASHER,MICHAEL C.L. VICKERY,DANIEL D. JONES,CHARLES A. KAYSNER (1999). Detection of total and hemolysin-producing Vibrio parahaemolyticus in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh and trh. *Journal of Microbiological Methods,* 36**,** 215-225.

BUREAU OF EPIDEMIOLOGY, D. O. D. C., MINISTRY OF PUBLIC HEALTH (2006). Food Poisoning. *Weekly Epidemiological Surveillance Report,* 37**,** 7.

CHITOV, T. (2009). Occurrence of potentially pathogenic Vibrio species in raw, processed, and ready-to-eat seafood and seafood products. *Maejo International Journal of Science and Technology,* 3(01)**,** 88-98.

CHOMVARIN, C., CHANTARASUK, Y., SRIGULBUTR, S., CHAREONSUDJAI, S. and CHAICUMPAR, K. (2006). Enteropathogenic bacteria and enterotoxin-producing Staphylococcus aureus isolated from ready-to-eat foods in Khon Kaen, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health,* 37**,** 983-990.

CHOMVARIN, C., NAMWAT, W., WONGWAJANA, S., ALAM, M., THAEW-NONNGIEW, K., SINCHATURUS, A. and ENGCHANIL, C. (2007). Application of duplex-PCR in rapid and reliable detection of toxigenic Vibrio cholerae in water samples in Thailand. *J Gen Appl Microbiol,* 53**,** 229-237.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2007). *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement* Villanova,Pa.

CLIVER, D. O. and RIEMANN, H. P. (2002). *Foodborne Diseases,* second edn. Academic Press, San Diego, California

DEPAOLA, A., HOPKINS, L. H., PEELER, J. T., WENTZ, B. and MCPHEARSON, R. M. (1990). Incidence of Vibrio parahaemolyticus in U.S. coastal waters and oysters. *Appl Environ Microbiol,* 56**,** 2299-2302.

ELEY, A. R. (1996). *Microbial Food Poisoning,* Second edn. Chapman & Hall, London,UK.

ELIZAQUIVEL, P. and AZNAR, R. (2008). A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp. and Staphylococcus aureus on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiol,* 25**,** 705-713.

ELNIFRO, E. M., ASHSHI, A.M, COOPER, R.J., KLAPPER, P.E. (2000). Multiple PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.,* 13**,** 559-570.

GARBUTT, J. (1997). *Essentials of Food Microbiology,* first edn. Arnold, London,UK.

GOEL, A. K., PONMARIAPPAN, S., KAMBOJ, D. V. and SINGH, L. (2007). Single multiplex polymerase chain reaction for environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and non-O1 Vibrio cholerae. *Folia Microbiol (Praha),* 52**,** 81-85.

HAN, F., WALKER, R. D., JANES, M. E., PRINYAWIWATKUL, W. and GE, B. (2007). Antimicrobial susceptibilities of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. *Appl Environ Microbiol,* 73**,** 7096-7098.

JAY, J. M. (2000). *Modern food Microbiology,* Sixth edn. Aspen Gaithersburg, Maryland.

KONG, R. Y., LEE, S. K., LAW, T. W., LAW, S. H. and WU, R. S. (2002). Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Res,* 36**,** 2802-2812.

MARTINEZ-URTAZA, J., SACO, M., HERNANDEZ-CORDOVA, G., LOZANO, A., GARCIA-MARTIN, O. and ESPINOSA, J. (2003). Identification of Salmonella serovars isolated from live molluscan shellfish and their significance in the marine environment. *J Food Prot,* 66**,** 226-232.

ONG-KYUNG LEE, D.-W. J., SO-YOUN EOM,SE-WOOK OH,YUNJI KIM,HYO-SUN KWAK,YOUNG-HO KIM (2008). Occurrence of Vibrio parahaemolyticus in oysters from Korean retail outlets. *Food Control,* 19**,** 990-994.

ROSEC, J. P., SIMON, M., CAUSSE, V. and BOUDJEMAA, M. (2009). Detection of total and pathogenic Vibrio parahaemolyticus in shellfish: comparison of PCR protocols using pR72H or toxR targets with a culture method. *Int J Food Microbiol,* 129**,** 136-145.

SARAVANAN, V., SANATH KUMAR, H., KARUNASAGAR, I. and KARUNASAGAR, I. (2007). Putative virulence genes of Vibrio cholerae from seafoods and the coastal environment of Southwest India. *Int J Food Microbiol,* 119**,** 329-333.

SCHAECHTER, M., MEDOFF, G. and EISENSTEIN, B. I. (1993). *Mechanisms of microbial disease* second edn. Baltimore : Williams & Wilkins, Maryland,USA.

SHARMA, A. and CHATURVEDI, A. N. (2006). Prevalence of virulence genes (ctxA, stn, OmpW and tcpA) among non-O1 Vibrio cholerae isolated from fresh water environment. *Int J Hyg Environ Health,* 209**,** 521-526.

SINGH, D. V., ISAC, S. R. and COLWELL, R. R. (2002). Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in Vibrio cholerae and Vibrio mimicus. *J Clin Microbiol,* 40**,** 4321-4324.

UYTTENDAELE, M., BAGAMBOULA, C. F., DE SMET, E., VAN WILDER, S. and DEBEVERE, J. (2001). Evaluation of culture media for enrichment and isolation of Shigella sonnei and S. flexneri. *Int J Food Microbiol,* 70**,** 255-265.

VANTARAKIS, A., KOMNINOU, G., VENIERI, D. and PAPAPETROPOULOU, M. (2000). Development of a multiplex PCR detection of Salmonella spp. and Shigella spp. in mussels. *Lett Appl Microbiol,* 31**,** 105-109.

VONGXAY, K., WANG, S., ZHANG, X., WU, B., HU, H., PAN, Z., CHEN, S. and FANG, W. (2008). Pathogenetic characterization of Vibrio parahaemolyticus isolates from clinical and seafood sources. *Int J Food Microbiol,* 126**,** 71-75.

VU, D. T., SETHABUTR, O., VON SEIDLEIN, L., TRAN, V. T., DO, G. C., BUI, T. C., LE, H. T., LEE, H., HOUNG, H. S., HALE, T. L., CLEMENS, J. D., MASON, C. and DANG, D. T. (2004). Detection of Shigella by a PCR assay targeting the ipaH gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *J Clin Microbiol,* 42**,** 2031-2035.

WHO, W. H. O. (1998). Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. In *Newsletter* Copenhagen: WHO.

Y. LI, S. Z., A. MUSTAPHA (2005). Application of a multiplex PCR for the simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella and Shigella in raw and ready-to-eat meat products*Meat Science,* 71 402-406.

ZYSKIND, J. W. and SMITH, D. W. (1980). Nucleotide sequence of the Salmonella typhimurium origin of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 77**,** 2460-2464.

กุดวงษา, ว. (2010). การสอบสวนการระบาดของโรคอหิวาตกโรค อำเภอเชียงยืน จังหวัดมหาสารคาม. เอกสารประกอบสัมมนาวิชาการเครือข่ายระบาดวิทยา ในพื้นที่รับผิดชอบสำนักงานป้องกันควบคุมโ.

จริยา ชมวารินทร์, กิตติพันธ์ เสมอพิทักษ์ and นเรศ วโรภาสตระกูล (2542). แบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์ (*Medical Bacteriology),* 2 edn. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

ตังคณะกุล, ว. (2008). การระบาดของอหิวาตกโรคปี 2550. รายงานการเฝ้าระวังระบาดวิทยา ประจำสัปดาห์ , 39(20) 345-348.

โรงพยาบาลศรีนครินทร์ (2008). Antimicrobial susceptibility.

อารยางกูร, ก. (2010). รายงานการสอบสวนโรคเฉพาะรายกรณีโรคอหิวาตกโรค นักศึกษามหาวิทยาลัยขอนแก่น. เอกสารประกอบสัมมนาวิชาการเครือข่ายระบาดวิทยา ในพื้นที่รับผิดชอบสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่น.