บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อาหารเป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีวิตและอาหารที่ถือว่าปลอดภัยต่อการบริโภค ต้องไม่มีสิ่งปนเปื้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ จุลินทรีย์ก่อโรค หรือในอาหารบางประเภทอาจอนุญาตให้พบเชื้อบางชนิดได้แต่ต้องอยู่ในระดับมาตรฐานที่ยอมรับได้ ปัจจุบันโรคอาหารเป็นพิษมีแนวโน้มสูงขึ้นโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษสูงสุด [14] จึงถือเป็นพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อ การเกิดโรคอุจจาระร่วง ทั้งนี้เนื่องจากประชาชนมีพฤติกรรมการเตรียมและการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ แต่เนื่องจากการตรวจปัจจุบันที่ใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลานานกว่าจะทราบผลว่ามีเชื้อก่อโรคอยู่ (อย่างน้อย 3 วัน) ทำให้เชื้อแพร่กระจายและก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ การใช้วิธีทางโมเลกุลาร์เช่น วิธี PCR สามารถจะรู้ผลได้รวดเร็วและมีความถูกต้อง และหากสามารถตรวจเชื้อหลายชนิดในหลอดเดียวกันหรือที่เรียกว่า วิธี multiplex PCR จะช่วยประหยัดเวลาและสารเคมี และควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อได้ดียิ่งขึ้น เชื้อก่อโรคที่สำคัญมีทั้งเชื้อที่สร้างสารพิษในอาหารที่พบได้บ่อย เช่น เชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อที่ทำให้เกิดอุจจาระร่วงเนื่องจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป ที่สำคัญ ได้แก่ *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella* spp. ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้หาแนวทางพัฒนาวิธี multiplex PCR เพื่อตรวจสอบคุณภาพอาหารในเขตจังหวัดขอนแก่น ซึ่งมีอาหารที่เสี่ยงต่อการทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทำให้ไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะอาหารพื้นเมืองที่ผ่านการปรุงสุกน้อยหรืออาหารที่มีการสัมผัสจากผู้ปรุงอาหาร เพื่อหาแหล่งที่มาของเชื้อและหาทางป้องกันก่อนที่เชื้อจะแพร่ต่อไป

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงจะทำการตรวจหายีนของเชื้อดังกล่าว อีกทั้งตรวจหาสารพิษของเชื้อ *S. aureus* ด้วย ในการวิจัยนี้นอกจากจะตรวจเชื้อจากอาหารแล้วยังได้พัฒนาการตรวจเชื้อจากอุจจาระของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษด้วย ซึ่งผลสำเร็จที่ได้จะนำไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อที่สำคัญในอาหารและในผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ซึ่งจะมีประโยชน์ในการควบคุมและเฝ้าระวังการแพร่กระจายของโรคอาหารเป็นพิษ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบการดื้อยาของเชื้อแต่ละชนิด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการรักษาที่มีประสิทธิภาพและยังเป็นการเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้ออีกทางหนึ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ (Food-borne pathogen) 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่เป็นโรคอาหารเป็นพิษโดยวิธี Multiplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม (การเพาะเลี้ยงเชื้อ)

2. ตรวจหายีน Staphylococcal enterotoxin (*sea-sed*) และ Toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*-1) ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยตรงจากตัวอย่างอาหาร เปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้โดยวิธีเพาะเลี้ยง และนำไปทดสอบการสร้างสารพิษโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

3. ศึกษาคุณสมบัติการดื้อยาของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยเปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

<u>ส่วนที่ 1</u>

1.3.1 ตัวอย่างอาหารที่นำมาศึกษา แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามชนิดของอาหาร ดังนี้

- อาหารพื้นเมือง เช่น ส้มตำ แหนม
- อาหารผ่านความร้อนไม่สมบูรณ์ เช่น ยำต่างๆ
- เครื่องดื่ม เช่น โอเลี้ยง กาแฟ น้ำผลไม้

1.3.2 ตัวอย่างอาหารที่นำมาศึกษาได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่าง ตามแหล่งต่างๆ ในจังหวัดขอนแก่น ดังนี้

- ร้านอาหารในเทศบาลเมืองขอนแก่น (Food shops in Khon Kaen municipality)
- ผู้ขายเร่ (Food vendors) หรือหาบเร่แผงลอย

<u>ส่วนที่ 2</u>

1.3.3 ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่เป็นโรคอาหารเป็นพิษและอุจจาระร่วง คือ Rectal swab หรือ Stool specimen

1.3.4 เก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เป็นโรคอาหารเป็นพิษและอุจจาระร่วง จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น

1.3.5 ตรวจหาเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* โดยวิธี multiplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม

1.3.6 ตรวจหา Staphylococcal enterotoxin (SE) gene (type A, B, C, และ D) และ toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร โดยวิธี multiplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีทางอิมมูโนวิทยา (Reverse passive latex agglutination ; RPLA)

1.3.7 ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดทั้งจากอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยต่อยาปฏิชีวนะ (antimicrobial susceptibility) โดยวิธี Disk agar diffusion

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

1. วิธี multiplex PCR สามารถตรวจหาเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ Staphylococcal enterotoxin พร้อมทั้ง toxic shock syndrome toxin-1 ได้โดยตรงจากตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจโดยให้ผลที่ถูกต้องและรวดเร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน
2. การตรวจพบยีนสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจนของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง โดยวิธี multiplex PCR มีความสอดคล้องกับการตรวจโดยวิธี RPLA assay
3. เชื้อที่แยกจากอาหารมีการดื้อยาน้อยกว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. พัฒนาการใช้เทคนิค multiplex PCR ซึ่งมีความจำเพาะและความไวสูง มาใช้ในการตรวจสอบ ทำให้สามารถตรวจสอบอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อปริมาณน้อยได้และสามารถตรวจเชื้อหรือสารพิษจากอาหารได้โดยตรง ถือเป็นประโยชน์ในการช่วยประหยัดเวลา
2. ทราบอุบัติการณ์การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ (food-borne disease) ซึ่งเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญ
3. อาหารมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค
4. ช่วยป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ
5. ทราบภาวะการดื้อยาของเชื้อแต่ละชนิด ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยหรือการรักษาโรคต่อไป
6. พัฒนาการเรียนการสอนบัณฑิตศึกษา ในระดับปริญญาเอก
7. ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ
8. สามารถนำไปถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. กองควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
2. กองวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
3. โรงพยาบาลในสังกัดมหาวิทยาลัย
4. หน่วยงานวิจัยของสถาบันการศึกษา ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางการแพทย์
5. ฝ่ายควบคุมคุณภาพ โรงงานอุตสาหกรรมอาหาร
6. หน่วยควบคุมโรคติดเชื้อ โรงพยาบาลศรีนครินทร์
7. ศูนย์วิจัยโรคติดเชื้อระบาดใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

1. นำผลการวิจัยที่ได้ลงตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ
2. นำเสนอในสัมมนาทางวิชาการระดับชาติ

   ได้นำเสนอในการประชุมกรมควบคุมโรค เรื่อง การพัฒนาวิธี Multiplex PCR และ SYBR Green real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหารจำนวน 5 ชนิด จากตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (Development of multiplex PCR and SYBR Green real-time PCR for detection of five enteropathogenic bacteria in foods and patients) เมื่อวันที่ 23 กุมภาพันธ์ 2554
3. อบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง
4. บริการความรู้แก่ประชาชนและผู้ประกอบการเกี่ยวกับการป้องกันและควบคุมโรคอาหารเป็นพิษร่วมกับหน่วยงานอื่น

1.6 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

สถานที่ทำการวิจัย : ห้องปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สถานที่เก็บข้อมูล : ร้านอาหารในเทศบาลเมืองขอนแก่น (Food shops in Khon Kaen municipality) และร้านค้าขายเร่ (Food vendors)

: หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก ห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น