บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ระบาดวิทยา

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ (Foodborne disease) เป็นอุบัติการณ์ที่มีแนวโน้มสูงขึ้นทั่วโลก [33] ทั้งในประเทศพัฒนาและกำลังพัฒนา รวมทั้งประเทศไทยด้วย โรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อนี้แบ่งออกเป็น 5 ประเภท ตามสาเหตุการเกิด ได้แก่ 1) infections 2) intoxication 3) metabolic food disorder 4) allergies และ 5) idiosyncratic illnesses [26] World Health Organization ได้ให้ความหมายของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ว่า เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ (infections) หรือเกิดจากสารพิษ (toxin) เนื่องจากบริโภคน้ำและอาหารที่ปนเปื้อน [88] แต่ในที่นี้จะกล่าวถึงอาหารเป็นพิษที่มีแบคทีเรียเป็นสาเหตุเท่านั้น เนื่องจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษและพบว่าสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษส่วนใหญ่เกิดจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย (ร้อยละ 54.7) สาเหตุอื่นๆพบได้น้อย ได้แก่ การปนเปื้อนสารเคมี (ร้อยละ 12.1) พิษจากพืช (ร้อยละ 12.1) พิษจากสัตว์ (ร้อยละ 2.1) ไม่ทราบสาเหตุ (ร้อยละ 19.0) ถ้าโรคอาหารเป็นพิษนั้นเกิดจากการที่ร่างกายบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นและปล่อยออกมาในอาหารเข้าไป เรียกว่า bacterial food intoxication ส่วนโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการบริโภคอาหารซึ่งปนเปื้อนตัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเข้าไปแล้วทำให้เกิดอาการแสดงของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลัน เรียกว่า bacterial food infection [33] บางรายงานได้กล่าวถึงโรคอาหารเป็นพิษที่มีแบคทีเรียเป็นสาเหตุว่าเป็นภาวะที่กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลัน จะแสดงอาการครั้งแรกหลังจากบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นหรือปนเปื้อนตัวเชื้อจุลินทรีย์ภายใน 2-3 ชั่วโมง หรือ 2-3 วัน ทั้งนี้ขึ้นกับอัตราการเจริญของเชื้อก่อโรค [31]

โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลัน (gastroenteritis) เป็นโรคในระบบทางเดินอาหาร มีลักษณะอาการที่สำคัญคือ ท้องร่วง อาเจียน ปวดท้อง [31, 33] และอาจมีอาการไข้ร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้ อาการท้องร่วง คือภาวะที่การดูดซึมน้ำและเกลือแร่ผิดปกติ ทำให้สูญเสียของเหลวออกจากร่างกายหรือถ่ายเป็นน้ำหรืออาจเกิดเนื่องจากการบุกรุกผนังลำไส้ทำให้ mucosal cell ถูกทำลายทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ [31] นอกจากนี้องค์การอนามัยโลก ได้กำหนดคำจำกัดความของ โรคอุจจาระร่วงว่าเป็นภาวะที่มีการถ่ายอุจจาระเป็นน้ำมากกว่า 3 ครั้งต่อวัน หรือถ่ายมูกหรือปนเลือด อย่างน้อย 1 ครั้ง ใน 24 ชั่วโมง

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาของประเทศไทย อุบัติการณ์ของโรคอาหารเป็นพิษและโรคอุจจาระร่วงสูงเป็นอันดับต้นๆ ของโรคที่มีการเฝ้าระวังและยังเป็นปัญหาที่รัฐบาลให้ความสำคัญ เมื่อพิจารณา

จากข้อมูลการเฝ้าระวังโรคที่สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่า ตั้งแต่ปี 2537 เป็นต้นมาอุบัติการณ์ของโรคอาหารเป็นพิษมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี และในปี 2547 สำนักระบาดวิทยาได้รับรายงานผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ จำนวน 154,678 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 247.3 ต่อประชากรแสนคน เสียชีวิต 12 ราย อัตราตาย 0.02 ต่อประชากรแสนคน อัตราป่วยตายร้อยละ 0.01 ในระยะ 5 ที่ผ่านมาพบว่าจำนวนผู้ป่วยสูงขึ้นเล็กน้อยในช่วงเดือนมีนาคม-มิถุนายนของทุกปี ซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อนทำให้เชื้อโรคมีการเจริญเติบโตที่ดีประกอบกับพฤติกรรมการเตรียมและการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เช่น การกินอาหารสุกๆ ดิบๆ อาหารที่เก็บไว้ค้างคืน เชื้อที่ตรวจพบส่วนใหญ่จะเป็น *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งจะพบในอาหารทะเล นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *E. coli* และสารพิษ อื่นๆ โดยภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีรายงานอัตราป่วยต่อแสนประชากรสูงสุด รองลงมาคือภาคเหนือ ภาคกลางและภาคใต้ตามลำดับ เมื่อพิจารณาร่วมกับช่วงเวลาที่เกิดโรคสูงในช่วงฤดูร้อน นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มอายุที่มีอัตราการป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษสูงที่สุด คือ ช่วงอายุ 0-4, 5-9 และมากกว่า 35 ปี ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีความทนทานต่อโรคน้อยกว่า [14] ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษที่สำคัญ ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งอาจปนเปื้อนในอาหาร นับแต่วัตถุดิบ กระบวนการผลิต การเก็บรักษาหรือการจำหน่าย

ในเดือนมิถุนายน (2009) มีรายงานการเกิดอาหารเป็นพิษซึ่งมีสาเหตุจากการรับประทานผลิตภัณฑ์จากไข่ ประมาณ 51.1%[14] และในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม (2010) มีรายงานผู้ป่วยอหิวาตกโรคและ salmonellosis จำนวน 45 และ 36 ราย ตามลำดับ เนื่องจากบริโภคปลาและเนื้อดิบ [92] นอกจากนั้นช่วงต้นปี 2011 ที่ผ่านมา กลุ่มระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทยรายงานผู้ป่วยโรคบิด (dysentery) จำนวน175 ราย [15]

2.2 คุณสมบัติทั่วไปและการก่อโรคของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่สร้างสปอร์ สามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้ และส่วนใหญ่มีเอนไซม์ coagulase และ deoxyribonuclease (DNase) [31] เชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิด food intoxication syndrome เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตสารพิษ ที่เรียกว่า staphylococcal enterotoxin (SE) ออกมาในอาหาร และสามารถผลิตสารพิษ toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) ซึ่งทำให้เกิด toxic shock syndrome (TST) ในคน [38] นอกจากนั้นยังสามารถอยู่รอดได้ในหลายสภาวะ [57] และยังมีความสามารถในการสร้าง biofilm ทำให้ทนต่อสิ่งแวดล้อมและยาปฏิชีวนะได้ดี [67] ดังนั้นจึงถูกพิจารณาว่าเป็นเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษที่มีความสำคัญเป็นอันดับที่สามของโลก [57, 77]

SE เป็น peptides ขนาดเล็กประมาณ 26 ถึง 29 kDa [52] มีด้วยกัน 5 ชนิด คือ SEA - SEE ถูก encode โดยยีน *sea* ถึง *see* ซึ่งอยู่บนโครโมโซม สารพิษเหล่านี้มีคุณสมบัติทนทานต่อเอนไซม์ proteolytic และทนความร้อนได้สูง (heat stable) [20, 31] SE และ TSST จัดอยู่ใน pyrogenic toxin superantigen (PTSAg) family superantigens [30, 38] โดย SE จะกระตุ้น helper T cells ให้ผลิต cytokine ชนิดต่างๆ เช่น interleukins (IL) 2, interferon (INF) gamma และ tumor necrosis factor (TNF) ซึ่งทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ [41] ส่วน TSST-1 ซึ่งถูก encode โดยยีน *tst* อยู่บนโครโมโซม [44] จะกระตุ้นให้มีการหลั่ง cytokine ชนิดต่างๆ เช่น TNF-α และ IL-1 ทำให้เกิดไข้ ช็อคและอวัยวะล้มเหลวในที่สุด [13] SE ประกอบด้วย SE 7 ชนิดคือ A , B, C1, C2, C3, D และ E เป็นสารพิษชนิดสำคัญที่ทำให้เกิด staphylococcal food poisoning การศึกษาพบว่าประมาณ 75% ของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ เกิดจาก SEA รองลงมาคือ SED [31] และประมาณ 5% ที่ตรวจพบในผู้ป่วยเป็น enterotoxin อื่น [7] รายงานวิจัยที่ประเทศเกาหลีพบว่า ประมาณ 90% ของอาหารเป็นพิษที่แยกได้ตรวจพบว่าเป็นยีน *sea* [38]

ในการศึกษานี้ได้ตรวจหายีน *sea* ถึง *sed* ของ SE จากอาหารโดยตรงและอุจจาระของผู้ป่วย นอกจากการตรวจหาสารพิษ SE และ TSST-1 จากเชื้อที่แยกได้แล้ว การวิจัยนี้ยังตรวจหายีน *nuc* ซึ่ง encode เป็น thermonuclease ที่จำเพาะของเชื้อ *S. aureus* โดยจะถูกใช้เป็น internal positive control [50] ในการตรวจพบเชื้อ *S. aureus* เนื่องจากมีรายงานว่าการตรวจพบ thermostable nuclease gene (*nuc)* แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์กันอย่างมากกับการผลิต enterotoxin จึงนิยมใช้เป็น marker ของอาหารที่ปนเปื้อนด้วย enterotoxigenic *S. aureus* [8, 27] เนื่องจากมีรายงานว่าเมื่อเชื้อ *S. aureus* เจริญเพิ่มจำนวนในอาหารมากกว่าหรือเท่ากับ 10^6 cells ถือว่าอาหารนั้นอยู่ในระดับอันตรายไม่ปลอดภัยต่อการนำมาบริโภค เนื่องจากจำนวนครึ่งหนึ่งของ *S. aureus* จะผลิต SE ออกมาเมื่อพบเชื้อในระดับนี้ [10, 68] อีกทั้งยังมีรายงานว่า ปริมาณสารพิษน้อยกว่า 1 μg ต่อ 100 กรัมอาหาร [68] หรือ 1 ng ต่อ 1 กรัมอาหาร [33] สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ โดยผู้ป่วยมักมีอาการภายใน 2-6 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อนี้เข้าไป [68] หรือ 30 นาที ถึง 6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ได้รับเข้าไปหรือความไวของแต่ละบุคคล [33] โดยอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม, เนื้อหมู ,ผลิตภัณฑ์ bakery, ไข่ และเนื้อวัว [31, 57] และจากการตรวจหา *S. aureus* ร่วมกับ *Yersinia enterocolitica* ในตัวอย่างนมโดยวิธี multiplex PCR โดยใช้ยีน *nuc* ของ *S. aureus* พบว่า มีความไวในการตรวจพบเชื้อทั้งสองที่จำนวน 10^4 CFU/ml ของตัวอย่างนม โดยไม่ได้ผ่านขั้นตอนการ enrichment [64] นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบยีนของ SE ต่างๆ และ TSST-1 ใน *S. aureus* ซึ่งแยกเชื้อได้จากแทงค์บรรจุน้ำนมดิบ [72] และพบ TSST-1 มีการกระจายตัวอยู่ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารด้วย [21, 49] นอกจากการตรวจเชื้อในตัวอย่างอาหารแล้วยังมีการตรวจหา SE และ TSST จากเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ ได้แก่ อุจจาระและอาเจียนของผู้ป่วยที่เป็น

โรคอาหารเป็นพิษระบาดในประเทศไต้หวัน โดยพบว่า *tsst-1* เป็นยีนหลักที่ตรวจพบในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย (59.7%) ส่วนยีน *sea* พบประมาณ 29.2% [21]

เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (พฤศจิกายน 2546) ได้กำหนดว่า อาหารทะเลที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ เช่น ปลา กุ้ง ปลาหมึก หอยดิบ อาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น แหนม ปลาร้า ปลาจ่อม และอาหารปรุงสุกทั่วไป เช่น ขนมยีน ยำ ไส้กรอก มีค่ามาตรฐานคือ *S. aureus* ต้องพบน้อยกว่า 100 cells ต่อกรัมอาหาร ส่วนเครื่องดื่มหาบเร่แผงลอยต้องไม่พบ *S. aureus* ต่อ 1 มล. ของเครื่องดื่ม [39]

2.3 คุณสมบัติทั่วไปและการก่อโรคของเชื้อ *Salmonella*

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่สร้างสปอร์ เป็นเชื้อสาเหตุของโรค Salmonellosis โดยปริมาณเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคประมาณ 10^6 cells หรือบางครั้งอาจสูงถึง 10^8 -10^9 cells ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อและความไวของแต่ละบุคคล มีระยะฟักตัวประมาณ 12 -36 ชั่วโมง [33] *Salmonella* มีแอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ somatic (O), flagella (H) antigen และ capsular Vi antigens นอกจากนี้ Kauffmann and White scheme ได้แบ่ง *Salmonella* ออกเป็น 2 species คือ *S. enterica* และ *S. bongori* โดยอาศัยคุณสมบัติของ O-Ag and H-Ag [65]

เชื้อที่มักพบปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารและทำให้เกิดการระบาดส่วนใหญ่ในประเทศอเมริกาและอังกฤษ คือ *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* typhimurium ตามลำดับ [31] virulence gene ที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ช่วยให้เชื้อสามารถก่อโรคได้ดีคือ *invA* gene ซึ่งถอดรหัสเป็น invasion protein A ช่วยในการบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮสต์ นอกจากนั้นยีนนี้ยังถือเป็นยีนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* จึงนิยมใช้เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย [1, 35, 87] ในปี 2006 Trafny และคณะได้พัฒนาวิธี multiplex PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ในตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วย [78] นอกจากนี้ในปี 2010 Prasad Upadhyay และคณะได้พัฒนาวิธี PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* (*invA* gene) ในตัวอย่างกุ้ง พบว่ามีความไวในการตรวจพบเชื้อที่ 10^4 cfu/ml [80] ในการวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ *invA* gene เป็นยีนเป้าหมายเพื่อตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารและอุจจาระผู้ป่วย ซึ่งคาดว่าจะครอบคลุมทั้งสายพันธุ์ที่เป็น clinical และ environment strains

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 นอกจากนี้บางงานวิจัยได้ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะและพบว่า *Salmonella* ที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลันส่วนใหญ่จะดื้อยา ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, doxycycline และ nalidixic acid [2]

2.4 คุณสมบัติทั่วไปและการก่อโรคของเชื้อ *Shigella*

Shigella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่สร้างสปอร์และไม่เคลื่อนที่ จำแนกออกเป็น 4 serogroup 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 [91] เนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการก่อโรคได้โดยอาศัยกลไกหลัก คือ การบุกรุกเยื่อเยื่อ (invasiveness) โดยเชื้อจะมีการแสดงออกของ invasion plasmid antigen ซึ่ง encode โดยยีน *ipa* [71] ทำให้เชื้อบุกรุกเข้าฝังตัวเจริญอยู่ในเซลล์เยื่อเมือกของลำไส้ใหญ่ แล้วบุกรุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นผลให้เกิดการอักเสบของลำไส้ใหญ่เฉียบพลัน นอกจากนั้น เชื้อ *S. dysenteriae* type 1 ยังสามารถสร้างเอกโซทอกซินที่เรียกว่า Shiga toxin ซึ่งมีฤทธิ์เป็นทั้ง enterotoxin neurotoxin และ cytolyxin จึงทำให้เกิดโรครุนแรงกว่าชนิดอื่นๆ [91] โดยปริมาณเชื้อ *S. dysenteriae* ที่สามารถทำให้เกิดโรคคือประมาณ 10 cells [33, 41] ส่วน *S. flexneri* และ *S. sonnei* ประมาณ 10^2-10^4 cells รายงานอาหารที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อ *Shigella* ได้แก่ น้ำนมดิบ ผักสด ผลไม้ สลัด หอย เนื้อไก่ [33, 41] และอาหารทะเล ซึ่งการปนเปื้อนส่วนใหญ่เกิดจากสุขอนามัยส่วนบุคคลไม่ดี [81]

ปัจจุบันวิธีการที่น่าเชื่อถือสำหรับตรวจหา *Shigella* ในอาหารยังเป็นไปได้ยาก [81] อีกทั้ง *Shigella* spp. ยังสามารถรอดจากการตรวจหาด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม (culture method) ได้ เนื่องจาก 1) ความไวในการตรวจด้วยวิธี culture ค่อนข้างต่ำ 2) เชื้อก่อโรคมีปริมาณน้อย หรือ 3) สภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ pH ไม่เหมาะสม [85] ดังนั้นจึงได้พัฒนามาใช้วิธี PCR เพื่อตรวจหายีนที่จำเพาะของเชื้อ โดยในรายงานส่วนใหญ่ซึ่งตรวจหาเชื้อทั้งในตัวอย่างอาหารและในสิ่งส่ง

ตรวจทางการแพทย์จะใช้ยีนเป้าหมายคือ invasion plasmid antigen H (*ipaH*) [46, 48, 85, 89] 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 [85] จากการตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium และ *S. flexneri* ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อ (ready-to-eat meat products) ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ *ipaH* เป็นยีนเป้าหมายสำหรับตรวจหา *S. flexneri* พบว่า ความไวในการตรวจพบเชื้อประมาณ 0.2 $\log_{10}$ CFU/g (ประมาณ 2 CFU/g) และนักวิจัยแนะนำว่า สารประกอบต่างๆ ในอาหาร เช่น สารอินทรีย์ (organic) สารประกอบ phenolic , glycogen, fats, และ Ca^{2+} อาจมีผลไปรบกวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR อีกทั้งยังแนะนำว่าการใช้ selective media ในการ enrichment เชื้อจะช่วยลดการแข่งขันของเชื้อที่ต้องการกับเชื้ออื่นๆ และอาจทำให้ความไวในการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR เพิ่มขึ้น [48] ส่วนการตรวจหาเชื้อ *Shigella* spp. ในตัวอย่างน้ำ (marine water) โดยใช้ยีนเดียวกันนี้พบว่า วิธี multiplex PCR มีความไวในการตรวจพบเชื้อประมาณ 10^0–10^2 cfu และใช้เวลาในการตรวจสอบน้อยกว่า 12 ชั่วโมง อีกทั้งยังไม่เกิด cross reaction กับเชื้ออื่นๆ [46] นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยที่ตรวจหา *Shigella* spp. ในสิ่งส่งตรวจ rectal swab ของผู้ป่วยอุจจาระร่วงในประเทศเวียดนาม โดยใช้ยีนเป้าหมายเดียวกันนี้ด้วยวิธี PCR พบว่าสามารถตรวจพบยีน *ipaH* ได้ประมาณ 93% ของ *Shigella* culture-positive specimens และ 36% culture-negative patients [85] และอีกรายงานได้ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงใน stool specimen ของเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ในประเทศ Palestine ที่เป็นโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลันด้วยวิธี PCR โดยใช้ยีนเป้าหมายเดียวกันในการตรวจหา *Shigella* spp. พบว่า เชื้อส่วนใหญ่ที่ตรวจพบคือ *Shigella* spp. (6%) นอกจากนั้นยังมีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและพบว่า *Shigella* ที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลันส่วนใหญ่จะดื้อยา trimethoprim/sulfamethoxazole doxycycline และ ampicillin [2]

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารซึ่งกำหนดโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (พฤศจิกายน 2546) สำหรับเชื้อ *Shigella* spp. ไม่ได้ระบุไว้แน่ชัดแต่อาจจะรวมอยู่ในเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งต้องไม่พบในตัวอย่างอาหารนั้น [39]

2.5 คุณสมบัติทั่วไปและการก่อโรคของเชื้อ *Vibrio cholerae*

V. cholerae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่สร้างสปอร์ มีเอนไซม์ oxidase [31] มีแหล่งอาศัยอยู่ในน้ำ (aquatic water) เป็นสาเหตุของอหิวาตกโรค (cholera) ซึ่งส่วนใหญ่เป็น water-borne disease ติดต่อจากการสัมผัส

น้ำที่ปนเปื้อนเชื้อไปยังมือ [33] *V. cholerae* แบ่งออกเป็น 2 serogroup คือ *V. cholerae* O1 และ O139 [24] โดย *V. cholerae* O1 จำแนกออกเป็น 2 biotyppe คือ classical และ El Tor และจำแนกเป็น 2 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 การระบาดทั่วโลก (pandemic) ครั้งที่ 7 เกิดจากเชื้อ *V. cholerae* O1 biotype El Tor ต่อมาในปี 1979 เกิดการระบาดของ non-O1 *V. cholerae* เนื่องจากรับประทานหอยนางรมดิบและแสดงอาการของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ ภายใน 72 ชั่วโมง หนึ่งในเชื้อที่แยกได้มีการผลิต heat-labile toxin นอกจากนั้นก็เกิดการระบาดครั้งที่ 3 ขึ้นในประเทศซูดาน ซึ่งมีสาเหตุมาจากน้ำบ่อ โดยการระบาดในครั้งนี้เชื้อมีระยะการฟักตัวประมาณ 5 ชั่วโมง ถึง 4 วัน จากรายงานแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการปรับตัวอยู่ในสภาวะแวดล้อมได้ดีขึ้น นอกจากนั้นพบว่า toxigenic *V. cholerae* serovars O1 และ O139 สามารถอยู่รอดได้ในน้ำโดยเชื้อจะเข้าสู่ระยะพัก (resting state) หรือเรียกในระยะนี้ว่า viable but non-culturable (VBNC) state โดยเซลล์ที่อยู่ในระยะนี้ยังมีชีวิตอยู่และสามารถก่อโรคได้ในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากยังมี gene ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคอยู่ [24] virulence factor ที่สำคัญในการก่อโรคของ *V. cholerae* ได้แก่ 1) toxin-coregulated pilli (TCP) encode โดยยีน *tcp* มีความจำเป็นในการเกาะติดและเพิ่มจำนวนในลำไส้ และ 2) chola toxin (CT) เป็น enterotoxin ถูก encode โดยยีน *ctxAB* ซึ่งถูกนำมาโดย bacteriophage [41] โดย CT นี้จะทำให้ cyclic AMP (cAMP) เพิ่มมากขึ้น การเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP จะไปเปลี่ยนสมดุลของ Na+ และ Cl- ไอออน เป็นผลทำให้มีการหลั่งของสารน้ำออกจากร่างกาย ที่เรียกว่า ท้องร่วง [31]

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจหา *V. cholerae* ในน้ำและในอาหารทะเลส่วนใหญ่จะตรวจหายีนที่สำคัญของ *V. cholerae* เช่น *ctxA , ompW, rbf, tcpA* [4, 24, 34, 73] จากการวิจัยของ Saravanan ซึ่งได้ตรวจหา *V. cholerae* ในตัวอย่างอาหารทะเล ได้แก่ กุ้ง หอบกาบและหอยนางรม โดยวิธี multiplex PCR พบว่าส่วนใหญ่เป็น *V. cholerae* non-O1 ซึ่งใน seafood-borne non-O1 *V. cholerae* นี้จะตรวจไม่พบยีน *ctx* ทำให้ความรุนแรงในการก่อโรคน้อยกว่า [70] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงตรวจหายีน *OmpW* ซึ่ง encode เป็น outer membrane protein มีบทบาทช่วยในการเกาะติดและช่วยส่งเสริมให้เชื้อเจริญได้ดีในโฮสต์และสภาวะแวดล้อม [73] และเป็นยีนที่จำเพาะสำหรับเชื้อ *V. cholerae* และยีน *rfb* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ "O" antigen ที่ช่วยจำแนกว่าเป็น O1 หรือ non-O1 [75] กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (พฤศจิกายน 2546) ได้กำหนดคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาเพื่อให้ปลอดภัยต่อการบริโภคว่า อาหารดิบ อาหารทะเลที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ เช่น ปลา กุ้ง ปลาหมึก หอยดิบ มีค่ามาตรฐานของ *V. cholerae* คือ ต้องไม่พบในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม [39]

2.6 คุณสมบัติทั่วไปและการก่อโรคของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) ไม่สร้างสปอร์ มีเอนไซม์ oxidase เช่นเดียวกับ *V. choleraee* จัดเป็น enteric bacteria ที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลันในคน เมื่อบริโภคเนื้อดิบหรืออาหารทะเลสุกๆดิบๆ [5, 29] 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 [33] เนื่องจากเชื้อสามารถบุกรุก mucosal ได้โดยตรง อีกทั้งยังมีความสามารถในการผลิตสารพิษต่างๆ 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) [84] *V. parahaemolyticus* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคส่วนใหญ่จะให้ผลการทดสอบ Kanagawa positive (K^+) และผลิตสารพิษ TDH ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่มีความรุนแรงในการก่อโรค จะให้ผลการทดสอบ Kanagawa negative (K^-) และผลิตสารพิษ TLH จากการรายงานพบว่า 1% ของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและ 100% ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบจะให้ผลเป็น K^+ [41] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vongxay ซึ่งศึกษาลักษณะการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจและตัวอย่างอาหารทะเลและพบว่า 84 % ของ clinical isolates ให้ผล *tdh* positive ขณะที่ seafood isolates ให้ผล *tdh* positive เพียง 1.57% [84] ส่วนยีน *tl* จะพบใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ [47]

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 ความไวในการตรวจพบเชื้ออยู่ในช่วง 10^1- 10^2 cfu ต่อ 10 g ของตัวอย่างหอยนางรมที่ถูก enrichment ใน alkaline peptone water และในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 111 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบยีน *tl* ได้ในทุกตัวอย่าง [5] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ยีน *tl* เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจหาเชื้อในอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและใช้เป็น internal positive control ในการยืนยันการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* เนื่องจากพบใน *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (พฤศจิกายน 2546) ได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาเพื่อให้ปลอดภัยต่อการบริโภค โดยกำหนดว่า 1) อาหารดิบ 2) อาหารทะเลที่เตรียมเพื่อบริโภคดิบ เช่น ปลา กุ้ง ปลาหมึก หอยดิบ 3) อาหารปรุงสุก

ทั่วไป เช่น ก๋วยเตี๋ยว ขนมจีน ยำ 4) อาหารแช่เย็นและแช่แข็ง มีค่ามาตรฐานของ *V. parahaemolyticus* คือ ต้องไม่พบในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม [39]

2.7 การตรวจหาเชื้อโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture) และ Multiplex- PCR

วิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการตรวจหาและนับจำนวนแบคทีเรียก่อโรค อาศัยพื้นฐานของการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารคัดเลือกเชื้อที่ต้องการ (selective media) จากนั้นจึงระบุเชื้อโดยวิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical method) แต่เนื่องด้วยวิธีการเหล่านี้มีข้อด้อยหลายประการ [46] เช่น 1) เชื้อแบคทีเรียก่อโรคนั้นมีจำนวนน้อยทำให้ตรวจไม่พบเชื้อในตัวอย่าง ซึ่งทำให้เกิดการรายงานผลผิดพลาด 2) วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบวิธีมาตรฐานใช้เวลานาน [1, 24, 48, 89] และสามารถตรวจเชื้อก่อโรคได้เพียงชนิดเดียว (monospecific) จึงจัดเป็น low throughput method และ 3) เชื้อก่อโรคหลายชนิดไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญเติบโตได้ไม่ดีเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแตกต่างจากเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมทั่วไป เรียกว่า viable but not culturable (VBNC) เช่น *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* [61]

นอกจากนั้นการตรวจพบเชื้อ *S. aureus* จำนวน 10^5 cells/g ในตัวอย่างอาหาร ถือว่าเป็นระดับที่ไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค เนื่องจากเชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่สามารถสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจน เช่น สารพิษเอนเทอโรทอกซินในระดับที่ทำให้เกิดโรคได้ (<1 ng/g หรือ 10^{-9}g) การตรวจหาสารพิษดังกล่าวที่ผลิตโดยเชื้อ *S. aureus* หรือสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นในตัวอย่างอาหารโดยทั่วไปใช้วิธี Reverse passive latex agglutination (RPLA) แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ใช้เวลาในการแปลผล 20-24 ชั่วโมง และสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามขึ้นได้

ดังนั้นปัจจุบันจึงได้พัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพและสามารถตรวจหาเชื้อก่อโรคได้รวดเร็ว โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันทั่วไป เนื่องจากเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือ รวดเร็ว มีความจำเพาะและมีความไวสูง [1] แต่อย่างไรก็ตามวิธี conventional PCR นี้ก็มีข้อจำกัด คือ สามารถตรวจหายีนของเชื้อได้เพียงหนึ่งยีนต่อหนึ่ง reaction ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนามาใช้วิธี multiplex PCR ซึ่งสามารถตรวจหาหรือเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้มากกว่าหนึ่งยีนเป้าหมายใน PCR reaction เดียว ซึ่งจะช่วยให้ประหยัดเวลาและลดจำนวน reaction ที่ต้องใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารและสามารถตรวจหาสารพิษเอนเทอโรทอกซินหลายชนิดได้ในคราวเดียวกัน [1, 32]

การตรวจมีทั้งตรวจโดยตรงจากอาหารหรือมีการกระตุ้นการเจริญของเชื้อก่อน [3, 42, 48, 89] เช่น ในปี 2002 Agarwal และคณะได้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหาร (ผักสด, นม, ผลิตภัณฑ์จากไก่) โดยวิธี uniplex PCR พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้ที่จำนวน 1 cfu/g หลังจาก enrichment เป็นเวลา 6 ชั่วโมง [3] ต่อมาในปี 2005, Li และคณะได้พัฒนาวิธี multiplex PCR ใน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 22 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 246171
เลขเรียกหนังสือ

การตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* และ *Shigella* ในเนื้อดิบและผลิตภัณฑ์จากเนื้อ พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้ที่จำนวน 0.2 log10 CFU/g หลังจาก enrichment เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ในปี 2010 วิธี multiplex PCR ยังถูกพัฒนาสำหรับตรวจหาเชื้อ *Shigella* และ enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) ในตัวอย่างผักกะหล่ำปลี (Lettuce) โดยสามารถตรวจพบเชื้อที่ 10^4 CFU/ml [42]

การตรวจหาเชื้อจาก rectal swab จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง ในปี 2006, Trafny และคณะได้พัฒนาวิธี multiplex PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis และยีนก่อโรคของเชื้อในสิ่งส่งตรวจอุจจาระผู้ป่วย (stool samples) และพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อที่ 7×10^4 CFU/ml [78]