บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การหายีนเป้าหมายและออกแบบไพรเมอร์

ผลการวิจัยพบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายดี โดยสามารถครอบคลุมทั้งสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (environmentl strains) และสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (clinical strains) และไม่มีปฏิกิริยาข้ามพวก (cross reaction) กับเชื้ออื่น โดยได้ทดสอบกับเชื้อทั้งใน Family *Enterobacteriaceae* และ *Vibrionaceae* (ตารางที่ 4.1) โดยเชื้อ *Shigella* ใช้ไพรเมอร์จากที่ตีพิมพ์แล้ว แต่ได้มีการทดสอบความจำเพาะยืนยันอีกครั้งหนึ่งด้วย

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ชื่อเชื้อจุลินทรีย์	สายพันธุ์	PCR				
		SA *(nuc)*	VC *(ompW)*	VP *(tl)*	SM *(invA)*	SG *(ipaH)*
Staphylococcus aureus	ATCC 13565	+	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	ATCC 14458	+	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	ATCC 19095	+	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	ATCC 23235	+	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	ATCC 33586	+	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	+	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	Clinical strain	+	-	-	-	-
Vibrio cholerae	Clinical strain	-	+	-	-	-
Vibrio cholerae	environment strains	-	+	-	-	-
Vibrio parahaemolyticus	ATCC 17802	-	-	+	-	-
Vibrio parahaemolyticus	Clinical strain	-	-	+	-	-
Shigella dysenteriae Serogroup *A*	DMST 15111	-	-	-	-	+
Shigella flexneri Serogroup *B*	DMST4423	-	-	-	-	+
Shigella boydii Serogroup *C*	DMST 28180	-	-	-	-	+
Shigella sonnei Serogroup *D*	ATCC 11060	-	-	-	-	+

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชื่อเชื้อจุลินทรีย์	สายพันธุ์	PCR				
		SA *(nuc)*	VC *(ompW)*	VP *(tl)*	SM *(invA)*	SG *(ipaH)*
Vibrio alginolyticus	DMST 14800	-	-	-	-	-
Vibrio vulnificus	ATCC 27562	-	-	-	-	-
Vibrio mimicus	ATCC 33653	-	-	-	-	-
Vibrio fluvialis	DMST 19347	-	-	-	-	-
Vibrio parahaemolyticus	ATCC 17802	-	-	-	-	-
Escherichia coli (EIEC)	DMST 30545	-	-	-	-	-
Escherichia coli	ATCC 25922	-	-	-	-	-
Salmonella spp.	Clinical strain	-	-	-	+	-
Salmonella spp.	environment strains	-	-	-	+	-
Shigella spp.	Clinical strain	-	-	-	-	+
Staphylococcus epidermidis	Clinical strain	-	-	-	-	-
Streptococcus pyogenes	Clinical strain	-	-	-	-	-
Micrococcus	Lab strain	-	-	-	-	-
Bacillus sp.	Lab strain	-	-	-	-	-
Enterobacter	Lab strain	-	-	-	-	-
Proteus vulgaris	Lab strain	-	-	-	-	-
Plesiomonas shigelloides	Lab strain	-	-	-	-	-
Aeromonas hydrophila	Lab strain	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	Lab strain	-	-	-	-	-

SA= *S. aureus*, SM = *Salmonella* spp., SG = *Shigella* spp., VC = *V. cholerae*, VP = *V. parahaemolyticus*

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

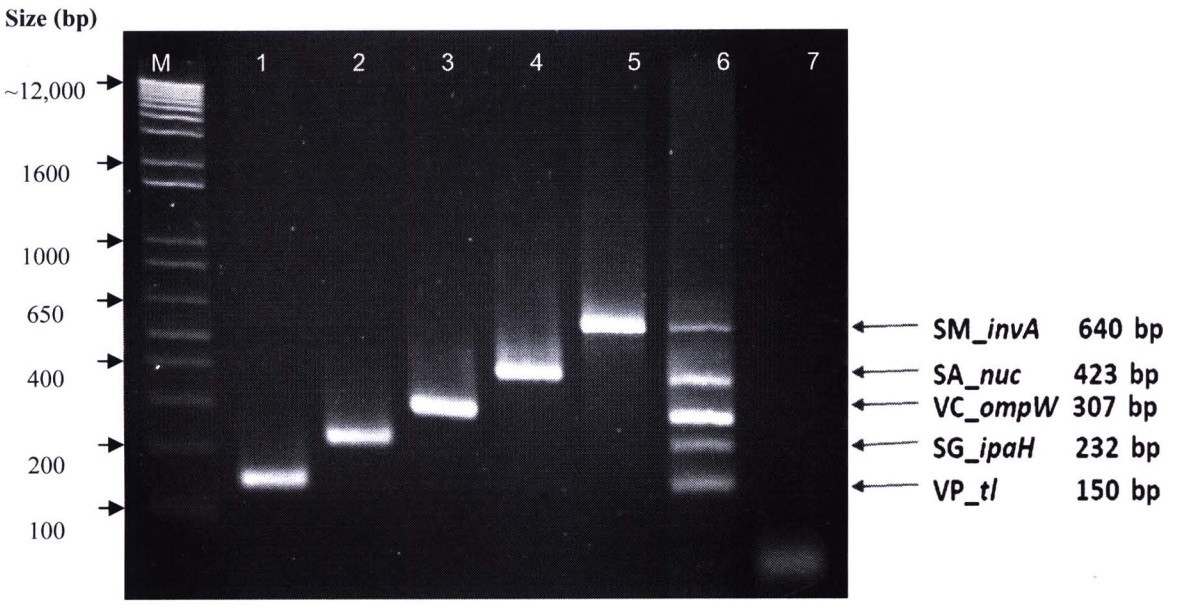
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อโดยวิธี multiplex PCR

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนเป้าหมายแบ่งออกเป็น 3 ชุด ได้แก่

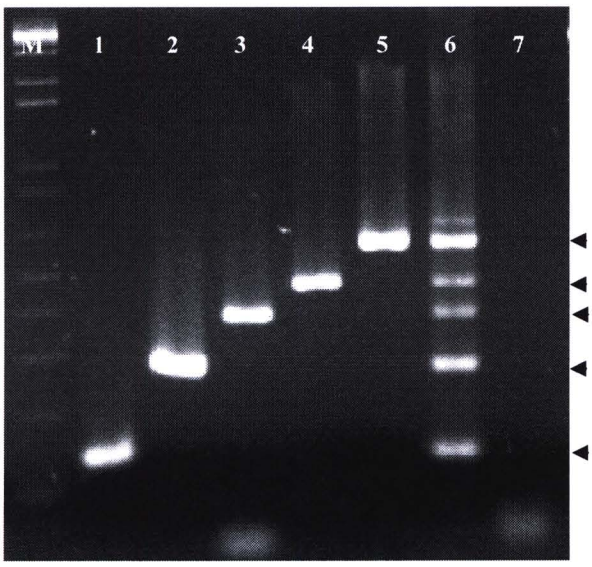
ชุดที่ 1 สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง จำนวน 5 ชนิด (รูปที่ 4.1)

ชุดที่ 2 สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจน จำนวน 5 ชนิด ของเชื้อ *S. aureus* (รูปที่ 4.2)

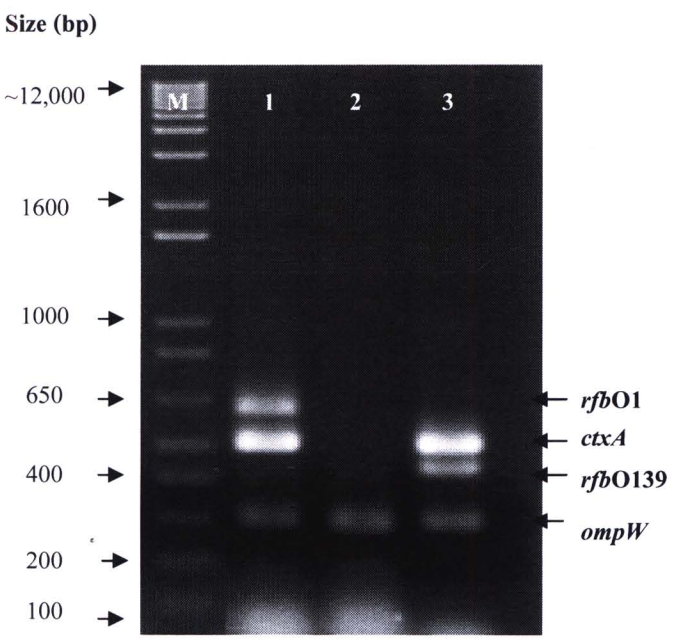
ชุดที่ 3 สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนสร้างสารพิษและยีนแยกความแตกต่างระหว่าง serogroup ของเชื้อ *V. cholerae* (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.1 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง จำนวน 5 ชนิด โดยแถบ M คือ ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb plus DNA marker), แถบที่ 1-5 คือ การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (150 bp), *Shigella* spp. (232 bp), *Vibrio cholerae* (307 bp), *Staphylococcus aureus* (423 bp) และ *Salmonella* spp.(640 bp) ตามลำดับ โดยวิธี uniplex PCR, แถบที่ 6 คือ multiplex PCR สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคอุจจาระจำนวน 5 ชนิด ในคราวเดียวกันและแถบที่ 7 คือ Negative control (SA= *S. aureus*, SM = *Salmonella* spp., SG = *Shigella* spp., VC = *V. cholerae*, VP = *V. parahaemolyticus*)



รูปที่ 4.2 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจน จำนวน 5 ชนิดของเชื้อ *S. aureus*, โดยแถบ M คือ ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb plus DNA marker), แถบที่ 1-5 คือ uniplex PCR สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีนสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจน *sea* (135 bp), *seb* (263 bp), *tst-1* (371 bp), *sec* (454 bp) และ *sed* (592 bp) ตามลำดับ แถบที่ 6 คือ multiplex PCR สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของสารพิษจำนวน 5 ชนิด ในคราวเดียวกันและแถบที่ 7 คือ Negative control



รูปที่ 4.3 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนสร้างสารพิษและยีนแยกความแตกต่างระหว่าง serogroup ของเชื้อ *V. cholerae* โดยวิธี multiplex PCR ซึ่งประกอบด้วยยีนเป้าหมาย *ompW* (307 bp), *rfb*O139 (449 bp), *ctxA* (517 bp) และ *rfb*O1 (639 bp), แถบ M คือ ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb plus DNA marker), แถบที่ 1-3 คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *V. choleare* O1, *V. choleare* non-O1 และ *V. choleare* O139

4.2 การทดสอบความไวของวิธี Uniplex PCR และ Multiplex PCR

4.2.1 ความไวของการตรวจเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง 5 ชนิด (Pure culture)

พบว่า ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจมีความไวในการตรวจหาเชื้อบริสุทธิ์ของ *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี uniplex PCR ที่ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1-10 cfu/PCR reaction และวิธี multiplex PCR มีความไวในการตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้น 10^2 CFU/ PCR reaction

4.2.2 ความไวของการตรวจสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจนของเชื้อ *S. aureus* (Pure culture)

พบว่า ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจมีความไวในการตรวจหายีนสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจนจากเชื้อบริสุทธิ์ของ *S. aureus* โดยวิธี uniplex PCR ที่ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 2-16 cfu/ml และวิธี multiplex PCR มีความไวเท่ากับ 22 CFU/PCR reaction

4.3 การหาความไวของการตรวจเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง 5 ชนิดในตัวอย่างอาหารที่เติมเชื้อลงไป (Artificially inoculated food)

เมื่อเติมเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10^0, 10^1, 10^2, 10^3 cfu/ 25g ลงไปในตัวอย่างอาหาร (ส้มตำ) ก่อนนำไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อใน enrichment media ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด ผลของความไวในการตรวจพบเชื้อโดยวิธี PCR (uniplex PCR และ multiplex PCR) เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ แสดงดังตารางที่ 4.2 โดยพบว่า วิธี uniplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีเชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้น 1 cfu, เชื้อ *V. cholerae* และ *Shigella* spp. ที่ความเข้มข้น 10^2 cfu และเชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ที่มีความเข้มข้น 10^3 cfu หลังจาก enrichment เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และสามารถตรวจพบเชื้อทุกชนิดที่ความเข้มข้นต่ำ (1 cfu) หลังจาก enrichment 24 ชั่วโมง

ส่วนวิธี multiplex PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคทั้ง 5 ชนิดในคราวเดียวกันที่ความเข้มข้นที่ 10^3 cfu หลังจาก enrichment เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้นที่ 10^1 cfu หลังจาก enrichment เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เช่นกัน อย่างไรก็ตามวิธี multiplex PCR ยังสามารถตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ที่ความเข้มข้น10^0 cfu หลังจาก enrichment เพียง 6 ชั่วโมง ในขณะที่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าว

ตารางที่ 4.2 ความไวของวิธี Multiplex PCR และวิธีเพาะเชื้อในการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง 5 ชนิด ในตัวอย่างอาหารที่เติมเชื้อลงไป

Food sample/ inoculum (cfu/25 g)		Detection method														
		Phenotypic method culture (BAM)					Genotypic method PCR									
							Uniplex					multiplex				
		0	3	6	12	24	0	3	6	12	24	0	3	6	12	24
Enrichment condition with inocula combination																
Papaya salad																
SA	10^0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	10^1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	10^2	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
	10^3	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
VP	10^0	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	10^1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	10^2	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	10^3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
SM	10^0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	10^1	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	10^2	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
	10^3	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
VC	10^0	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
	10^1	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
	10^2	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	10^3	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
SG	10^0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	10^1	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	10^2	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	10^3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

SA= *S. aureus*, SM = *Salmonella* spp., SG = *Shigella* spp., VC = *V. cholerae*, VP = *V. parahaemolyticus*

4.4 การตรวจพบเชื้อในอาหาร (Food samples)

ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร 3 ประเภท ได้แก่ อาหารพื้นเมือง อาหารที่ผ่านความร้อนไม่สมบูรณ์ เช่น ยำต่างๆ และเครื่องดื่ม ได้แก่ กาแฟเย็น โอเลี้ยง น้ำผลไม้ จำนวน 65 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างอาหารร้อยละ 81.5 (53/65) ไม่ได้มาตรฐานตามที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กำหนด โดยประเภทของอาหารที่ไม่ได้มาตรฐานส่วนใหญ่เป็นอาหารพื้นเมือง 88.5% (23/26) รองลงมาคือ อาหารที่ผ่านความร้อนไม่สมบูรณ์ เช่น ยำต่างๆ (ช่วงนอกอุบัติการณ์การระบาด) 81.8% (9/11) และเครื่องดื่ม 58.8% (10/17) (ตารางที่ 4.3) ในตัวอย่างอาหารพื้นเมืองจำนวนร้อยละ 4 (2/50) ตรวจพบว่าปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* จำนวนมากกว่า 10^2 cfu/g เมื่อตรวจโดยวิธี Most probable number (MPN) นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค 20.8% (10/48) มีจุลินทรีย์รวมเกินกว่ามาตรฐานกำหนด คือ มีปริมาณเชื้อมากกว่า 1×10^6cfu/g

เมื่อตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐานเปรียบเทียบกับวิธี unimultiplex PCR พบว่า วิธีเพาะเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อก่อโรค ร้อยละ 64.6 (42/65) ในขณะที่วิธี PCR ตรวจพบตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อได้ ร้อยละ 84.6% (55/65) โดยวิธีเพาะเชื้อตรวจพบเชื้อจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *Salmonella* spp., และ *V. cholerae* จำนวนร้อยละ 35.4 (23/65), 27.7 (18/65) และ 9.2 (6/65) ตามลำดับ แต่ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Shigella* spp. และ *V. parahaemolyticus* (ร้อยละ 0) แต่เมื่อตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธี PCR สามารถตรวจพบเชื้อจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* และ *Shigella* spp. จำนวนร้อยละ 35.4, 27.7, 26.1, 21.5 และ 1.5 ตามลำดับ โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *Shigella* spp. ตรวจพบได้โดยวิธี PCR แต่ตรวจไม่พบโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 4.4-4.6)

ตารางที่ 4.3 คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคและเครื่องดื่มในเขตเทศบาลเมืองขอนแก่นตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Type of food	No. of samples	Microbiology quality	
		Unacceptable	Acceptable
Local food	26	23 (88.5)	3 (11.5)
Sea food	22	20 (90.9)	2 (9.1)
- *Cholera outbreak*	11	11 (100)	0 (0)
- *Non-cholera outbreak*	11	9 (81.8)	2 (18.2)
Fruit juice and Beverage	17	10 (58.8)	7 (41.2)
Total	**65**	**53 (81.5)**	**12 (18.5)**

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

การตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 5 ชนิดนี้ แบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงที่มีอุบัติการการระบาดของอหิวาตกโรคและช่วงนอกอุบัติการการระบาด โดยช่วงระบาดประมาณเดือนกันยายน-พฤศจิกายน 2553 ตรวจพบเชื้อต่างๆ ในตัวอย่างอาหาร ดังนี้ เชื้อ *V. cholerae* ตรวจพบเชื้อในตัวอย่างกุ้งฝอยหรืออาหารทะเลจำนวน 10/11 ตัวอย่าง (91%) โดยพบเป็น *V. cholerae* O1 50% (5/10) และ *V. cholerae* non-O1 50% (5/10), *Salmonella* spp. และ *V. parahaemolyticus* 91% (3/11) และ *S. aureus* 9.1% (1/11) แต่ไม่พบเชื้อ *Shigella* spp. ส่วนช่วงนอกอุบัติการการระบาดตรวจพบเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด 40.7% (22/54) รองลงมาคือ เชื้อ *Salmonella* spp. 27.7% (15/54), *V. parahaemolyticus* 25.9% (14/54), *V. cholerae* 7.4% (4/54) โดยพบเป็น *V. cholerae* non-O1 ทั้งหมด (100%) และเชื้อ *Shigella* spp. 1.9% (1/54) ตามลำดับ (รูปที่ 4.4)

เมื่อกระตุ้นการเจริญของเชื้อ (enrichment) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าวิธี uniplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหาร 56.9% (37/65) ส่วนวิธี multiplex PCR ตรวจพบเชื้อ 38.5% (25/65) แต่หลังจากกระตุ้นการเจริญของเชื้อ (enrichment) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทั้งสองวิธีสามารถตรวจพบเชื้อเพิ่มขึ้น โดยวิธี uniplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อ 84.6% (55/65) ส่วนวิธี multiplex PCR ตรวจพบเชื้อ 81.5% (53/65) ในขณะที่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ หลังจากกระตุ้นการเจริญของเชื้อ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหาร 35.4% (23/65) และ 64.6% (42/65) ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่า มีตัวอย่างอาหารร้อยละ 20 (13/65) ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อที่ปนเปื้อนได้โดยวิธี PCR แต่ตรวจไม่พบโดยวิธีเพาะเชื้อ

4.5 การตรวจพบเชื้อจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง (Rectal swab)

ผลการตรวจเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง จำนวน 65 ตัวอย่าง จากงานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐานเปรียบเทียบกับวิธี multiplex PCR พบตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงมีเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคร้อยละ 33.8 (22/65) โดยเมื่อตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีเพาะเชื้อ พบเชื้อจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *V. parahaemolyticus, V. cholerae*, *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *Shigella* spp. จำนวนร้อยละ 9.2, 6.2, 7.7, 1.5 และ 1.5 ตามลำดับ เมื่อตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธี PCR สามารถตรวจพบเชื้อทั้ง 5 ชนิด จำนวนร้อยละ 13.8, 12.3, 7.7, 7.7 และ 3.1 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

การตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 5 ชนิดนี้ แบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงที่มีอุบัติการการระบาดและช่วงนอกอุบัติการการระบาดของอหิวาตกโรค โดยช่วงที่มีอุบัติการการระบาดประมาณเดือนกันยายน-ตุลาคม 2553 ตรวจพบเชื้อต่างๆ ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง ดังนี้ เชื้อ *V. cholerae* 20% (3/15) โดยพบเป็น *V. cholerae* O1 33.3% (1/3) และ *V. cholerae* non-O1 66.7% (2/5), *V. parahaemolyticus* 20% (3/15), *S. aureus* 13% (2/15) และ *Salmonella* spp. 6.7% (1/15) แต่ไม่พบเชื้อ

Shigella spp. ส่วนช่วงนอกอุบัติการการระบาดตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด 12% (6/50) รองลงมาคือ *V. cholerae* 10% (5/50) โดยพบเป็น *V. cholerae* O1 20% (1/5) และ *V. cholerae* non-O1 80% (4/15), *Salmonella* spp. 8% (4/50), *S. aureus* 6% (3/50) และ *Shigella* spp. 4% (2/50) ตามลำดับ (รูปที่ 4.5)

วิธี uniplex PCR, multiplex PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงร้อยละ 32.3 (21/65), 29.2 (19/65) และ 21.5 (14/65) ตามลำดับ หลังจากกระตุ้นการเจริญของเชื้อ (enrichment) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่า มีตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงร้อยละ 12.3 (8/65) ที่ตรวจพบเชื้อได้โดยวิธี PCR แต่ตรวจไม่พบโดยวิธีเพาะเชื้อ

ตารางที่ 4.4 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหาร โดยการตรวจวิธีใดวิธีหนึ่ง

Type of food	**Total No. of food samples**	**No. (%) of positive samples [a]**				
		SA	**SM**	**SG**	**VC**	**VP**
Local food	26	10 (38.5)	14 (53.8)	1 (3.8)	1 (3.8)	9 (34.6)
Sea food	22	4 (18.2)	3 (13.6)	0 (0)	13 (59.1)	8 (36.4)
Fruit juice and beverage	17	9 (52.9)	1 (5.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	65	23 (35.4)	18 (27.7)	1 (1.5)	14 (21.5)	17 (26.1)

SA= *S. aureus*, SM = *Salmonella* spp., SG = *Shigella* spp., VC = *V. cholerae*, VP = *V. parahaemolyticus*

[a] ตรวจพบเชื้อโดยวิธี PCR

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 5 ชนิด ในตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง

Samples	Bacterial pathogen	Detection method / No. of positive samples (%)											
		Phenotypic method				Genotypic method							
		culture (BAM)				PCR							
						Uniplex				Pentaplex (Multiplex)			
		0	6	12	24	0	6	12	24	0	6	12	24
Food (*n*=65)	SA	3 (4.6)	5 (7.7)	ND	23 (35.4)	3 (4.6)	5 (7.7)	20 (30.8)	23 (35.4)	1 (1.5)	4 (6.2)	7 (10.8)	22 (33.8)
	SM	5 (7.7)	12 (18.5)	ND	18 (27.7)	5 (7.7)	12 (18.5)	17 (26.1)	18 (27.7)	3 (4.6)	8 (12.3)	10 (15.4)	18 (27.7)
	SG	0 (0)	0 (0)	ND	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)
	VC	3 (4.6)	6 (9.2)	ND	6 (9.2)	9 (13.8)	14 (21.5)	14 (21.5)	14 (21.5)	5 (7.7)	9 (13.8)	13 (20.0)	14 (21.5)
	VP	0 (0)	0 (0)	ND	0 (0)	2 (3.1)	15 (23.1)	17 (26.1)	17 (26.1)	1 (1.5)	14 (21.5)	15 (23.1)	16 (24.6)
Rectal Swab (*n*=65)	SA	0 (0)	1 (1.5)	ND	ND	0 (0)	5 (7.7)	ND	ND	0 (0)	5 (7.7)	ND	ND
	SM	0 (0)	5 (7.7)	ND	ND	1 (1.5)	5 (7.7)	ND	ND	0 (0)	5 (7.7)	ND	ND
	SG	0 (0)	1 (1.5)	ND	ND	0 (0)	2 (3.1)	ND	ND	0 (0)	2 (3.1)	ND	ND
	VC	0 (0)	4 (6.2)	ND	ND	0 (0)	8 (12.3)	ND	ND	0 (0)	6 (9.2)	ND	ND
	VP	0 (0)	6 (9.2)	ND	ND	1 (1.5)	9 (13.8)	ND	ND	1 (1.5)	8 (12.3)	ND	ND

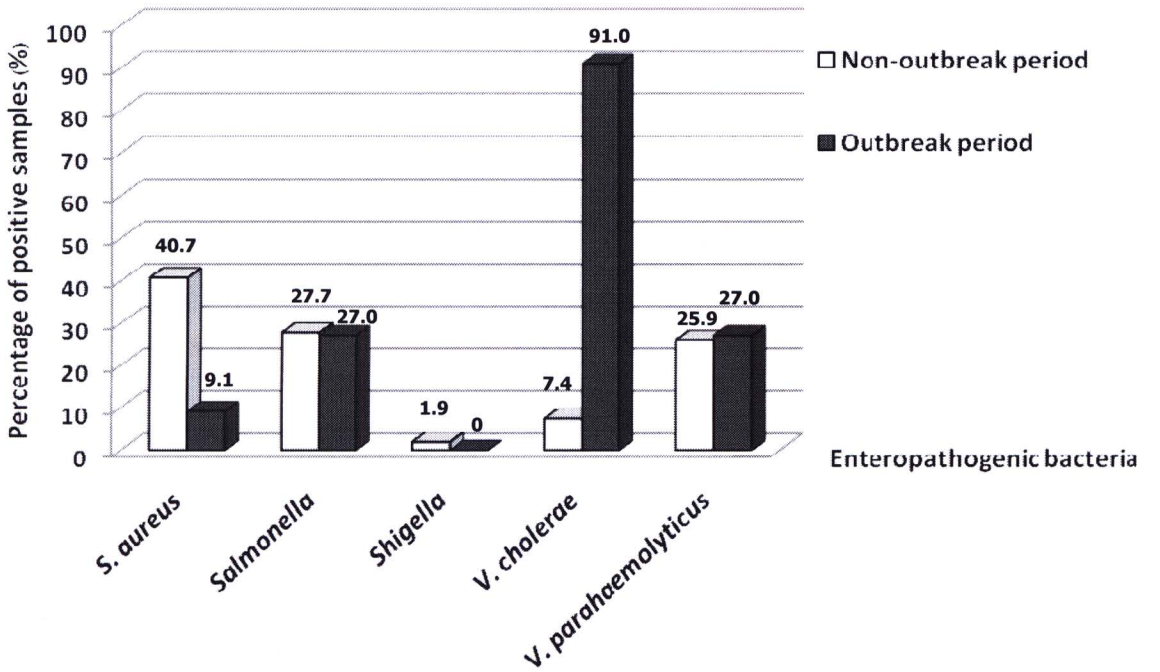
SA= *S. aureus*, SM = *Salmonella* spp., SG = *Shigella* spp., VC = *V. cholerae*, VP = *V. parahaemolyticus*

ND = Not done คือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์

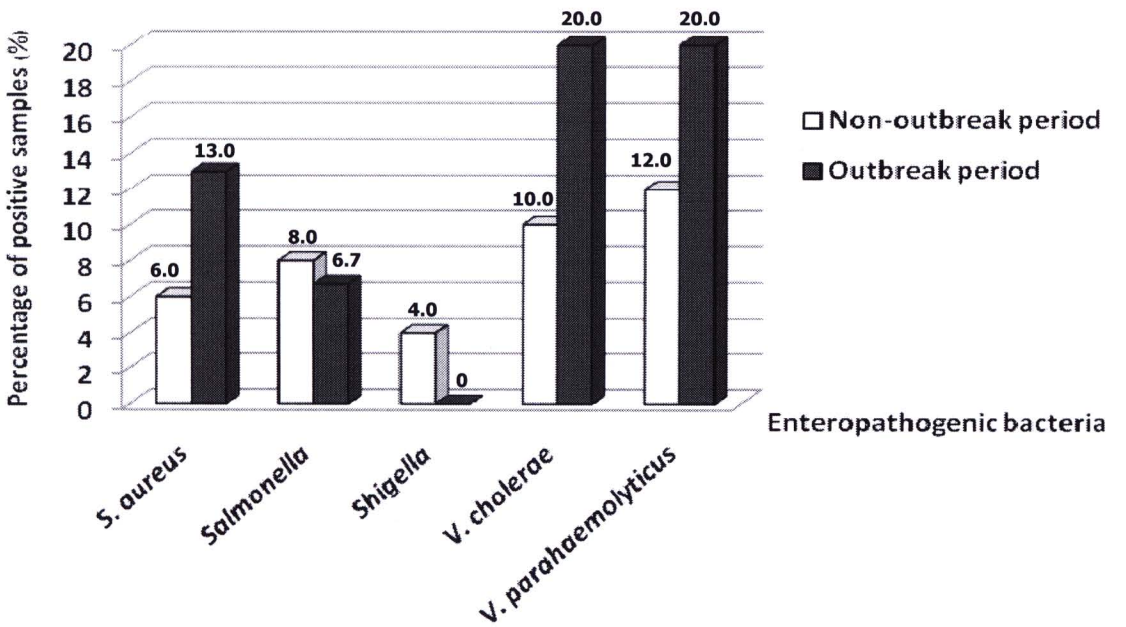
ตารางที่ 4.6 ความชุกของการตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 5 ชนิดในตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง

Source of samples	Total plate count cfu/25g (mean)	No. of positive samples (%)									
		S. aureus		*Salmonella* spp.		*Shigella* spp.		*V. cholerae*		*V. parahaemolyticus*	
		culture	PCR	culture	PCR	culture	PCR	culture	PCR	culture	PCR
1. Food (n=65)											
1.1 Local food (n=26)	1.05×10^{8}	10 (38.5)	10 (38.5)	14 (53.8)	14 (53.8)	0 (0)	1 (3.8)	0 (0)	1 (33.8)	0 (0)	9 (34.6)
1.2 Sea food (n=22)	8.4×10^{7}	4 (18.2)	4 (18.2)	3 (13.6)	3 (13.6)	0 (0)	0 (0)	6 (27.3)	13 (59.1)	0 (0)	8 (36.4)
1.3 Beverage (n=17)	8.0×10^{3} cfu/ml	9 (52.9)	9 (52.9)	1 (5.9)	1 (5.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total (n=65)	-	**23 (35.4)**	**23 (35.4)**	**18 (27.7)**	**18 (27.7)**	**0 (0)**	**1 (1.5)**	**6 (9.2)**	**14 (21.5)**	**0 (0)**	**17 (26.1)**
2. Rectal swab (n=65)	**ND[a]**	**1 (1.5)**	**5 (7.7)**	**5 (7.7)**	**5 (7.7)**	**1 (1.5)**	**2 (3.1)**	**4 (6.2)**	**8 (12.3)**	**6 (9.2)**	**9 (13.8)**

[a] ND (Not done) คือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์



ภาพที่ 4.4 ความชุกของการตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงใน**ตัวอย่างอาหาร** ตามช่วงที่มีอุบัติการการระบาดของอหิวาตกโรค (ระหว่างเดือนกันยายน-พฤศจิกายน 2553)



ภาพที่ 4.5 ความชุกของการตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง ใน**ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง** ตามช่วงที่มีอุบัติการการระบาดของอหิวาตกโรค (ระหว่างเดือนกันยายน-ตุลาคม 2553)

4.6 การตรวจหาสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจนของเชื้อ *S. aureus*

จากการเก็บตัวอย่างอาหารจำนวน 65 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* จำนวน 24 isolates ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร 23 ชนิด อาหารที่ปนเปื้อนเชื้อนี้คิดเป็นร้อยละ 35.4 (23/65) เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาตรวจหาสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจน โดยวิธี multiplex PCR พบยีนสร้างสารพิษร้อยละ 54.2 (13/24) ในขณะที่เมื่อตรวจหาสารพิษที่เชื้อผลิตขึ้นโดยวิธี RPLA พบสารพิษที่เชื้อผลิตขึ้นร้อยละ 41.7% (10/24) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ *S. aureus* ร้อยละ 12.5 (3/24) ตรวจพบเฉพาะยีนสร้างสารพิษโดยวิธี PCR แต่ไม่พบการสร้างสารพิษโดยวิธี RPLA (ตารางที่ 4.7) โดยชนิดของยีนสร้างสารพิษที่ตรวจพบมากที่สุดคือ *sea* 25.0% (6/24), *seb* 12.5% (3/24), *sec* 4.2% (1/24) และพบยีน combination 12.5% (3/23) โดยพบเป็นยีน *seb* ร่วมกับ *sed* 8.3% (2/24) (ตารางที่ 4.8)

จากการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงจำนวน 65 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ร้อยละ 1.5 (1/65) โดยเชื้อ *S. aureus* จำนวน 1 isolates ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยนี้ไม่พบยีนสร้างสารพิษเมื่อตรวจโดยวิธี PCR และไม่สร้างสารพิษดังกล่าวเมื่อทดสอบโดยวิธี RPLA (ตารางที่ 4.5)

เมื่อพิจารณาความสอดคล้องของการตรวจหาสารพิษโดยใช้2วิธีดังกล่าวข้างต้น จะได้ว่าผลการตรวจยีนสร้างสารพิษโดยวิธี multiplex PCR คิดเป็น 100% ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้พบว่า การตรวจยีนสร้างสารพิษโดยวิธี PCR มีความสอดคล้องกับการตรวจหาสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นโดยวิธี RPLA ร้อยละ 76.9

ตารางที่ 4.7 การตรวจสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจนของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย

Sources	**Number of *S. aureus* isolates (%)**	**Number of toxin positive isolates (%)**	
		m-PCR (gene)	**RPLA (protein)**
Food (*n*=65)	24 (37.0)	13 (54.2)	10 (41.7)
Patients (*n*=65)	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)
Total (*n*=130)	25 (19.2)	13 (10)	10 (7.7)

ตารางที่ 4.8 ชนิดของยีนสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจนที่ตรวจพบและสารพิษซึ่งผลิตโดยเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย

Sources	Total No. of food samples	Number of *S. aureus* isolates (%)	No. of toxin positive isolates (%) and types of toxin							
			Gene					Protein		
			sea	*seb*	*sec*	*sec*+ *tst*-1	*seb*+ *sed*	SEA	SEB	SEB+ SED
Food										
Local food	26	10 (38.5)	3	1	1	1	2	2	1	2
Sea food	22	5 (22.7)	0	1	0	0	0	0	1	0
Fruit juice and beverage	17	9 (52.9)	3	1	0	0	0	3	1	0
Total	65	24 (37.0)	6 (25.0)	3 (12.5)	1 (4.2)	1 (4.2)	2 (8.3)	5 (20.8)	3 (12.5)	2 (8.3)
Patients		1 (1.5)	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	65	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

4.7 การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ

ผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *S. aureus* จำนวน 24 isolates (37.0%), *Salmonella* spp. 24 isolates (37.0%), และ *V. cholerae* 6 isolates (9.2%) ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร และเชื้อ *S. aureus* จำนวน 1 isolates (1.5%), *Salmonella* spp. 5 isolates (7.8%), *Shigella* 1 isolates (1.5%), *V. cholerae* 4 isolates (6.2%) และ *V. parahaemolyticus* 7 isolates (10.8%) ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง แสดงดังตารางที่ 4.9-4.11

จากผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *S. aureus* จำนวน 24 isolates ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร พบว่าเชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่ดื้อต่อยา ampicillin 95.8% (23/24) รองลงมาคือ clindamycin 8.3% (2/24) และ erythromycin 4.2% (1/24) ขณะที่เชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงนั้น พบว่า ดื้อต่อยา ampicillin, clindamycin, erythromycin และ teicoplanin 100% (1/1) (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 คุณสมบัติความไวต่อยาของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง

Antimicrobial agents	Food isolates (*n*=24)			Rectal swab isolates (*n*=1)		
	R[a] (%)	I[b] (%)	S[c] (%)	R (%)	I (%)	S (%)
1. Cefoxitin (FOX), 30 µg	0 (0)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
2. Gentamicin (CN), 10 µg	0 (0)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
3. Cephalotin (KF), 30 µg	0 (0)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
4. Erythromycin (E), 15 µg	1 (4.2)	2 (8.3)	21 (87.5)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
5. Clindamycin (DA), 2 µg	2 (8.3)	0 (0)	22 (91.7)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
6. Fosfomycin (FOS), 50 µg	0 (0)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
7. Vancomycin (VA), 30 µg	0 (0)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
8. Teicoplanin (TEC), 30 µg	0 (0)	1 (4.2)	23 (95.8)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
9. Cotrimoxazole (SXT), 25 µg	0 (0)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
10. Ciprofloxacin (CIP), 5 µg	0 (0)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
11. Ampicillin (AMP), 10 µg	23 (95.8)	0 (0)	1 (4.2)	1 (100)	0 (0)	0 (0)

[a] R= Resistant, [b] I= Intermediate , [c] S = Susceptible

เชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร พบว่า 70.8% (17/24) ดื้อต่อยา ampicillin รองลงมาคือ tetracycline และ nalidixic acid 8.3% (2/24) ในขณะที่เชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง พบว่ามีการดื้อยามากกว่าเชื้อที่แยกได้จากอาหารคือ ดื้อต่อยา ampicillin 100% (5/5) รองลงมาคือ choramphenicol, tetracycline และ nalidixic acid 20% (1/5) (ตารางที่ 4.10-4.11)

ส่วนเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร พบว่า 16.7% (1/6) ดื้อต่อยา ampicillin และ tetracycline ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง 50% (2/4) ดื้อต่อยา Cotrimoxazole และ nalidixic acid นอกจากนี้พบว่าเชื้ออื่นๆ ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง ได้แก่ เชื้อ *Shigella* spp. ทุก isolates (100%) ดื้อต่อยา cotrimoxazole, tetracycline และ nalidixic acid และ *V. parahaemolyticus* 42.9% (3/7) ดื้อต่อยา ampicillin (ตารางที่ 4.10-4.11)

ตารางที่ 4.10 คุณสมบัติความไวต่อยาของเชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร

Antimicrobial agents	No. of positive isolates (%)					
	Salmonella spp. (*n*=24)			*V. cholerae* (*n*=6)		
	R[a] (%)	I[b] (%)	S[c] (%)	R (%)	I (%)	S (%)
1. Cotrimoxazole (SXT), 25 µg	0 (0)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)
2. Amplicillin (AMP), 10 µg	17 (70.8)	1 (4.2)	6 (25.0)	1 (16.7)	0 (0)	5 (83.3)
3. Choramphenicol (C), 30 µg	1 (4.2)	0 (0)	23 (95.8)	0 (0)	0 (0)	6 (100)
4. Norfloxacin (NOR), 10 µg	1 (4.2)	1 (4.2)	22 (91.7)	0 (0)	0 (0)	6 (100)
5. Ofloxacin (OFX), 5 µg	0 (0)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)
6. Tetracycline (TE), 30 µg	2 (8.3)	0 (0)	22 (91.7)	1 (16.7)	0 (0)	5 (83.3)
7. Cefotaxime (CTX), 30 µg	1 (4.2)	0 (0)	23 (95.8)	0 (0)	0 (0)	6 (100)
8. Gentamicin (CN), 10 µg	1 (4.2)	0 (0)	23 (95.8)	0 (0)	0 (0)	6 (100)
9. Nalidixic acid (NA), 30 µg	2 (8.3)	0 (0)	22 (91.7)	0 (0)	0 (0)	6 (100)
10. Ciprofloxacin (CIP), 5 µg	0 (0)	1 (4.2)	23 (95.8)	0 (0)	0 (0)	6 (100)

[a] R= Resistant, [b] I= Intermediate , [c] S = Susceptible

[d] ND = Not done

ตารางที่ 4.11 คุณสมบัติความไวต่อยาของเชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง

Antimicrobial agents	No. of positive isolates (%)											
	***Salmonella* spp. (*n*=5)**			***Shigella* spp. (*n*=1)**			***V. cholerae* (*n*=4)**			***V. parahaemolyticus* (*n*=7)**		
	R[a] (%)	**I[b] (%)**	**S[c] (%)**	**R (%)**	**I (%)**	**S (%)**	**R (%)**	**I (%)**	**S (%)**	**R (%)**	**I (%)**	**S (%)**
1. Cotrimoxazole (SXT), 25 µg	0 (0)	0 (0)	5 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	7 (100)
2. Amplicillin (AMP), 10 µg	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	3 (42.9)	3 (42.9)	1 (14.3)
3. Choramphenicol (C), 30 µg	1 (20)	0 (0)	4 (80)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	7 (100)
4. Norfloxacin (NOR), 10 µg	0 (0)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	7 (100)
5. Ofloxacin (OFX), 5 µg	0 (0)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	7 (100)
6. Tetracycline (TE), 30 µg	1 (20)	0 (0)	4 (80)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	1 (14.3)	0 (0)	6 (85.7)
7. Cefotaxime (CTX), 30 µg	0 (0)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	7 (100)
8. Gentamicin (CN), 10 µg	0 (0)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	1 (14.3)	0 (0)	6 (85.7)
9. Nalidixic acid (NA), 30 µg	1 (20)	0 (0)	4 (80)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	1 (14.3)	6 (85.7)
10. Ciprofloxacin (CIP), 5 µg	0 (0)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	7 (100)

[a] R= Resistant, [b] I= Intermediate resistant, [c] S = Susceptible