สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

5.1 การหายีนเป้าหมาย ออกแบบไพร์เมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี multiplex PCR

ในการศึกษานี้ได้ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายของเชื้อแต่ละชนิด เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อโดยวิธี multiplex PCR โดยมีไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่จำนวน 4 คู่ สำหรับตรวจหายีนเป้าหมายของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงจำนวน 4 ชนิด คือ 1) เชื้อ *S. aureus* โดยใช้ยีน *nuc* (thermonuclease) ซึ่งเป็น species-specific gene และสามารถใช้เป็น internal positive control ในการตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ได้ [22, 50] 2) เชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้ยีน *invA* แปลรหัสเป็น invasion protein A ซึ่งเป็นยีนจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. อีกทั้งยังเป็น virulence-associated gene เนื่องจากมีบทบาทในการช่วยเชื้อบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮสต์ [1, 35, 78] 3) เชื้อ *V. cholerae* ใช้ยีน *ompW* แปลรหัสเป็น outer membrane protein W ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ *V. cholerae* (species-specific gene) เป็นยีนเป้าหมาย [59, 73] และ 5) เชื้อ *V. parahaemolyticus* ใช้ยีน *tl* แปลรหัสเป็น thermolabile hemolysin เป็นยีนเป้าหมาย เนื่องจากสามารถตรวจพบได้ทั้งเชื้อทุกสายพันธุ์ ทั้ง clinical และ environmental strains [5, 47] ในขณะที่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *Shigella* spp. ใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากผลงานที่ตีพิมพ์แล้ว โดยใช้ยีนเป้าหมาย *ipaH* ซึ่งแปลรหัสเป็น invasion plasmid antigen H [46, 48, 85, 89] นอกจากยีนนี้สามารถตรวจพบได้ใน *Shigella* ทั้ง 4 สปีชีส์แล้ว ยังมีรายงานว่าสามารถตรวจพบใน enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) ได้ด้วย [85] แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาทดสอบความจำเพาะกับเชื้อ EIEC สายพันธุ์มาตรฐาน พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) เกิดขึ้นหรือไม่มี PCR product จากเชื้อนี้เกิดขึ้นในตำแหน่ง PCR product เป้าหมาย จึงได้นำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ทั้ง 4 คู่ไปทดสอบความจำเพาะทาง Bioinformatice โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) บนฐานข้อมูล NCBI database (http://blast.ncbi.nlm.nih. gov/Blast.cgi) พบว่ามีความจำเพาะ 100% ต่อยีนเป้าหมายแต่ละชนิด และนำมาทดสอบความจำเพาะโดยใช้ DNA ของเชื้อในจีนัส (Genus) เดียวกัน กับเชื้อต่างจีนัสในเชื้อกลุ่ม *Vibrionaceae* และ *Enterobacteriaceae* พบว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามเกิดขึ้น ก่อนนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนโดยวิธี uniplex PCR และ multiplex PCR ตามลำดับ

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายโดยวิธี uniplex PCR และ multiplex PCR มีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี multiplex PCR ต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากมีผลต่อความจำเพาะและความไวในการตรวจพบเชื้อในตัวอย่าง โดยต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ให้มีค่า annealing temperature ที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้

ความจำเพาะและความไวของวิธี multiplex PCR ขึ้นอยู่กับค่า parameter ต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของ primer, dNTPs และ Mg^{2+}, annealing temperature, extension time, ปริมาณและคุณภาพของ Taq DNA polymerase และความเข้มข้นของ DNA template [46] จากการวิจัยนี้พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primer อยู่ระหว่าง 0.1-1.0 μM, 0.3 mM dNTPs และ 2.0 mM Mg^{2+} และเมื่อเพิ่มจำนวนโดยใช้ PCR condition annealing temperature 60°C จะช่วยลด non-specific band และใช้ extension time 2 นาที จะทำให้ได้ high amplicon yields เมื่อเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายจำนวน 5 ยีนในคราวเดียวกัน โดยใช้เวลาใกล้เคียงกับผลการวิจัยของ Kong (2002) ซึ่งเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายจำนวน 6 ยีน โดยวิธี multiplex PCR โดยใช้ความเข้มข้นของ Mg^{2+} เท่ากับ 2.0 mM และใช้ extension time เป็นเวลา 2.5 นาที เพื่อให้ได้ high amplicon yields [46]

5.2 การทดสอบความไวของวิธี Uniplex PCR และ Multiplex PCR

การทดสอบความไวของวิธี uniplex PCR และ multiplex PCR ได้ทดสอบทั้งจากการใช้ 10-fold serial dilution ของดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 5 ชนิด และการเติมเชื้อก่อโรคทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^0, 10^1, 10^2, 10^3 cfu/25g ลงไปในตัวอย่างอาหาร (ส้มตำ) ก่อนนำไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อใน enrichment media ที่เหมาะสม

ดีเอ็นเอของเชื้อซึ่งได้จากการสกัดโดยใช้ Pure Gene DNA purification kit ถูกนำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ (100 ng - 1fg) และใช้เป็น DNA template ในการเพิ่มจำนวนและหาความไวในการตรวจโดยวิธี uniplex PCR และ Multiplex PCR พบว่าวิธี uniplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้นประมาณ 1-10 cfu/ml ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Agarwal (2002) ซึ่งตรวจพบเชื้อบริสุทธิ์ของ *Salmonella* spp. ที่ความเข้มข้น 1-3 cfu/ml โดยวิธี uniplex PCR [3] ในขณะที่การศึกษานี้พบว่า วิธี multiplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อ 5 ชนิดในคราวเดียวกันที่ความเข้มข้น 10^3 CFU/ml

การทดสอบความไวของวิธี PCR ในการตรวจหาเชื้อก่อโรค 5 ชนิด ที่เติมลงไปในตัวอย่างอาหาร พบว่าวิธี uniplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้น 10^0 cfu, เชื้อ *V. cholerae* และ *Shigella* spp. ที่ความเข้มข้น 10^2 cfu และเชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ที่ความเข้มข้น 10^3 cfu หลังจากกระตุ้นการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และสามารถตรวจพบเชื้อทุกชนิดที่ความเข้มข้นต่ำ (10^0cfu) หลังจาก enrichment 24 ชั่วโมง ส่วนวิธี multiplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคทั้ง 5 ชนิดในคราวเดียวกันที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^3 cfu หลังจาก enrichment เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^1 cfu หลังจาก enrichment เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ผลงานวิจัยอื่นพบว่าวิธี multiplex PCR มีความไวในการตรวจพบเชื้อ *Shigella* และ EIEC ในตัวอย่างผักกะหล่ำปลี (Lettuce) ที่ 10^4 CFU/ml [42] หรือมีความไวในการตรวจยีนเป้าหมาย 4 ชนิด ของเชื้อ *Yersinia enterocolitica, S. aureus, Aeromonas* และ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์เนื้อและนม ที่ความเข้มข้น 1–100 cfu/g หลังจาก enrichment 24 ชั่วโมง [6] ในผลการศึกษานี้พบว่า หลังจาก enrichment 24 ชั่วโมง วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมีความไวในการตรวจ

พบเชื้อใกล้เคียงกันกับวิธี multiplex PCR คือสามารถตรวจพบเชื้อทุกชนิดที่ความเข้มข้น 10^1 cfu เช่นเดียวกัน แต่แตกต่างกันที่วิธี multiplex PCR จะมีความไวในการตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้น 10^0 cfu หลังจาก enrichment เป็นเวลา 6 ชั่วโมงด้วย ในขณะที่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อยังตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าว

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าวิธี multiplex PCR อาจมีข้อจำกัดบางประการ คือ การตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งนี้เนื่องจากหลังการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ความเข้มข้น 10^3 cfu เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถตรวจพบเชื้อได้โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี uniplex PCR แต่ตรวจไม่พบโดยวิธี multiplex PCR ซึ่งอาจเนื่องมาจากปัจจัยที่มีผลต่อความไวในการตรวจโดยวิธี Multiplex PCR เช่น สารรบกวนปฏิกิริยา PCR (PCR inhibitor) ที่อาจพบได้ในตัวอย่างอาหารประเภทต่างๆ เช่น organic , phenolic compounds, glycogen, fats, และ Ca^{2+} ซึ่งการยับยั้งปฏิกิริยา PCR นี้ มีผลทำให้ความไวในการตรวจพบเชื้อลดลง [48] อย่างไรก็ตามกระบวนการกระตุ้นการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมหรือการเติม supplement เช่น 1% sodium pyruvate + 10% sodium chloride ที่จำเป็นสำหรับการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่อยู่ในสภาวะ stress จากสิ่งแวดล้อม เช่น การแช่เย็น หรือความร้อน สามารถช่วยเพิ่มความไวในการตรวจพบเชื้อได้ เนื่องจากช่วยเพิ่มจำนวนของเชื้อจากจำนวนน้อย ให้อยู่ในระดับที่สามารถตรวจพบได้ และช่วยเจือจางสารรบกวนปฏิกิริยา PCR (PCR inhibitor) ในตัวอย่างอาหาร [42] จะช่วยทำให้ความไวในการตรวจพบเชื้อเพิ่มขึ้น

จากผลการศึกษาข้างต้น จะเห็นได้ว่าถ้าต้องการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 5 ชนิด ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี multiplex PCR นั้นสามารถนำไปใช้ได้ แต่เวลาที่ใช้ในการกระตุ้นการเจริญของเชื้ออาจขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่คาดว่าปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารนั้นๆ คือ ในกรณีที่ตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อในปริมาณมาก อาจกระตุ้นการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยที่เวลา 6 ชั่วโมงจะมีข้อจำกัดคือ สามารถตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahemolyticus* ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^0 cfu/25g ส่วนเชื้อ *Shigella* spp., *Salmonella* spp. และ *S. aureus* จะตรวจพบที่ความเข้มข้น 10^2-10^3 cfu/25g แต่ในกรณีตัวอย่างอาหารที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนเชื้อในปริมาณต่ำ แนะนำให้กระตุ้นการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะสามารถตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahemolyticus* ที่ความเข้มข้น 10^0 cfu/25g และตรวจพบเชื้อ *Shigella* spp., *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 10^1 cfu/25g

แต่อย่างไรก็ตามความไวของวิธี multiplex PCR นี้ สามารถนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการระบาดของอหิวาตกโรค โรคอุจจาระร่วงหรือโรคอาหารเป็นพิษได้ เพื่อลดอัตราการเจ็บป่วยของประชาชนเนื่องจากโรคดังกล่าว แต่ยังไม่สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อตามมาตรฐานอาหารได้ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อบางชนิด เช่น เชื้อ *Salmonella* spp. ตามมาตรฐานต้องตรวจไม่พบในอาหาร 25 กรัม [39] นั่นคือวิธี multiplex PCR ที่จะสามารถนำไปใช้ตรวจมาตรฐานอาหารได้ต้องมีความไวในการตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้น 10^0 cfu/25g แต่วิธี multiplex PCR ในการศึกษานี้ มีความไวในการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ที่

ความเข้มข้น 10^1 cfu/25g ดังนั้นอาจจะต้องพัฒนาวิธีนี้หรือพัฒนาต่อยอดเพื่อให้การตรวจมีความไวมากยิ่งขึ้น

5.3 การตรวจพบเชื้อในตัวอย่างอาหาร (Food samples)

การวิจัยนี้พบว่าตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคและเครื่องดื่มร้อยละ 81.5 ที่สุ่มเก็บจากร้านอาหารหรือจากแม่ค้าหาบเร่แผงลอย ในเขตเทศบาลเมืองจังหวัดขอนแก่น ไม่ได้มาตรฐานทางจุลชีววิทยา (microbiological quality) ตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข [39] เนื่องจากตัวอย่างอาหารมีการปนเปื้อนเชื้อก่อโรค โดยประเภทของอาหารที่ไม่ได้มาตรฐานส่วนใหญ่เป็นอาหารพื้นเมือง (88.5%) อาหารที่ผ่านความร้อนไม่สมบูรณ์ เช่น ยำต่างๆ (ช่วงนอกอุบัติการณ์การระบาด) (81.8%) และเครื่องดื่ม (58.8%) ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจพบเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อกับวิธี PCR พบว่า วิธีเพาะเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อก่อโรค ร้อยละ 64.6 ในขณะที่วิธี PCR ตรวจพบตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อได้ ร้อยละ 84.6 โดยเมื่อตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารโดยวิธีเพาะเชื้อ จะพบเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด (35.4%) รองลงมาคือเชื้อ *Salmonella* spp. (27.7%), และ *V. cholerae* (9.2%) ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *V. parahaemolyticus* (26.1%) และเชื้อ *Shigella* spp. (1.5%) ถูกตรวจพบโดยใช้วิธี PCR แต่ไม่พบโดยการเพาะเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมีจำนวนน้อยทำให้ตรวจไม่พบเชื้อในตัวอย่าง [1, 24, 48, 89] หรือทั้งเชื้อ *Shigella* spp. และ *V. parahaemolyticus* อยู่ในสภาวะที่เรียกว่า viable but not culturable (VBNC) ซึ่งไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญเติบโตได้ไม่ดีเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากอาหารที่เชื้อปนเปื้อนอยู่อาจมีสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เช่น มีความเข้มของเกลืออยู่ในระดับต่ำหรือสูงกว่าระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ หรือตัวอย่างอาหารส่วนใหญ่มีสภาวะเป็นกรดจึงทำให้เชื้อเจริญได้ไม่ดี เพราะช่วง pH ที่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อคือ 7.8 - 8.6เชื้อจึงอาจปรับตัวเข้าสู่สภาวะ VBNC เพื่อให้อยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ได้ [61] จึงทำให้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมีโอกาสตรวจพบเชื้อได้น้อยกว่าวิธี PCR อย่างไรก็ตามพบว่า *S. aureus* ร้อยละ 1.5 (1/65) ตรวจพบโดยวิธีเพาะเชื้อแต่ไม่พบโดยวิธี multiplex PCR ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีเชื้อปนเปื้อนอยู่ในปริมาณน้อย หรือในตัวอย่างอาหาร (แหนมคลุก) นั้นมี PCR inhibitor อยู่มาก จึงทำให้ตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าว

จากการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหารโดยวิธี PCR และวิธีเพาะเชื้อ พบว่าหลังกระตุ้นการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิธี uniplex PCR, multiplex PCR และวิธีเพาะเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหารร้อยละ 56.9, 38.5 และ 35.4 ตามลำดับ และเมื่อกระตุ้นการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทั้ง 3 วิธีมีการตรวจพบเชื้อเพิ่มขึ้น โดยวิธี uniplex PCR, multiplex PCR และวิธีเพาะเชื้อ สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหารร้อยละ 84.6, 81.5 และ 64.4 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า มีตัวอย่างอาหารร้อยละ 20 ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อที่ปนเปื้อนได้โดยวิธี PCR แต่ตรวจไม่พบโดยวิธีเพาะเชื้อ การพบผลบวกใน PCR มากกว่า อาจเนื่องจากคุณสมบัติของเชื้อบางชนิด เช่น *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งสามารถเข้าสู่สภาวะ VBNC ดังกล่าวข้างต้นได้ จึงอาจทำให้วิธี PCR ซึ่งใช้สำหรับ

ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อตรวจพบเชื้อได้มากกว่าวิธีเพาะเชื้อ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจะทำการทดสอบยืนยันดีเอ็นเอของเชื้อเป้าหมายที่พบโดยวิธี southern blot เพื่อป้องกันผล false positive ที่อาจเกิดขึ้นได้ในภายหลัง

จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่าเชื้อที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารส่วนใหญ่ (ร้อยละ 81.5) จะถูกตรวจพบโดยวิธี multiplex PCR หลังจากกระตุ้นการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารส่วนใหญ่อาจมีปริมาณเริ่มต้นน้อย ดังนั้นถ้าต้องการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงในตัวอย่างอาหาร โดยวิธี multiplex PCR จึงแนะนำให้ตรวจเชื้อที่เวลาหลังกระตุ้นการเจริญ 24 ชั่วโมง จึงจะช่วยให้ตรวจพบเชื้อได้ครบทั้ง 5 ชนิด แต่ในกรณีช่วงที่มีอุบัติการณ์การระบาดของอหิวาตกโรค ซึ่งต้องการความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์และรายงานผล แนะนำให้ตรวจหาเชื้อ *V. cholerae* โดยวิธี uniplex PCR ที่เวลาหลังกระตุ้นการเจริญ 6 ชั่วโมง ซึ่งมีความไวในการตรวจพบเชื้อที่ 10^0 cfu/25g และยังสามารถตรวจพบเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็น VBNC ได้ ซึ่งจะช่วยให้การเฝ้าระวังการระบาดของอหิวาตกโรคโรคมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* แบ่งออกเป็น 2 ช่วง ตามการระบาดของเชื้อ คือ ช่วงที่มีการระบาดของอหิวาตกโรคและช่วงนอกการระบาดช่วงระบาดประมาณเดือนกันยายน-พฤศจิกายน 2553ตรวจพบเชื้อในตัวอย่างกุ้งฝอยดิบ/ก้อยกุ้ง หรืออาหารทะเล ร้อยละ 91 โดยพบเป็นเชื้อ *V. cholerae* O1 (50%) และ *V. cholerae* non-O1 (50%) ส่วนนอกช่วงระบาดพบว่าเป็นเชื้อ *V. cholerae* non-O1 ทั้งหมด (100%) โดยเชื้อ *V. cholerae* ส่วนใหญ่ตรวจพบได้โดยวิธี PCR มากถึง 91% ในขณะที่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อตรวจพบเชื้อเพียง 45.5% ทั้งนี้การที่มีการระบาดของเชื้อเกิดขึ้น อาจเนื่องมาจากช่วงเวลาดังกล่าวอยู่ในช่วงฤดูหนาวซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศบังกลาเทศ ที่พบว่าในช่วงระหว่างฤดูหนาว (spring) ถึงฤดูร้อน (late summer) อัตราการเกาะติด (colonize) ของเชื้อ *V. cholerae* กับ reservoirs ในแหล่งน้ำ เช่น กุ้ง ปลา ปู หรือแพลงค์ตอนต่างๆ จะสูงขึ้นถึง 10^4 cells และริ้นน้ำจืด (Chironomids) เป็น reservoirs ที่สำคัญชนิดหนึ่งของเชื้อ *V. cholerae* non-O1 ซึ่งสามารถทำให้เชื้อเกิดการแพร่กระจายไปสู่แหล่งอื่นๆ ได้ [83] นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ อาจเป็นผลทำให้เชื้อต้องปรับตัวเข้าสู่สภาวะ VBNC ซึ่งเป็นการตอบสนองของเชื้อต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ, pH หรือความเข้มข้นของเกลือที่เปลี่ยนแปลงไป เป็นต้น จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีเพาะเชื้อ [61] ซึ่งเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้การควบคุมการระบาดของโรคยากยิ่งขึ้น

จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่า แหล่งน้ำเขตเทศบาลเมืองขอนแก่นบางพื้นที่มีการปนเปื้อนของเชื้อและเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของ reservoirs เช่น กุ้ง ประกอบกับการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะของประชาชนบางกลุ่ม เช่น รับประทานอาหารสุกๆ ดิบๆ จึงทำให้เกิดการระบาดของอหิวาตกโรคขึ้น โดยวิธี uniplex PCR และ multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ถือเป็นวิธีทางเลือกอีกทางหนึ่ง นอกเหนือจากวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีมาตรฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งจะช่วยเฝ้าระวังการระบาดของโรคอุจจาระร่วงได้

5.4 การตรวจพบเชื้อในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง (Rectal swab)

จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงจำนวน 65 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อก่อโรคทั้ง 5 ชนิด โดยวิธี uniplex PCR, multiplex PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ร้อยละ 32.3, 29.2 และ 21.5 ตามลำดับ หลังจากกระตุ้นการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตามแนวทางที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทยในการตรวจวินิจฉัยโรคอุจจาระร่วงจากแบคทีเรีย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ [90] โดยผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อโดยวิธี PCR พบเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus, V. cholerae*, *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *Shigella* spp. ร้อยละ 13.8, 12.3, 7.7, 7.7 และ 3.1 ตามลำดับ ส่วนผลการเพาะเชื้อพบเป็นเชื้อดังกล่าวร้อยละ 9.2, 6.2, 7.7, 1.5 และ 1.5 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ามีตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงร้อยละ 10.8 ที่ตรวจพบเชื้อได้โดยวิธี PCR แต่ตรวจไม่พบโดยวิธีเพาะเลี้ยง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อก่อโรคบางชนิดอยู่ในสภาวะ viable but not culturable (VBNC) ทำให้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ [61] นอกจากนี้มีรายงานความไวในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ในสิ่งส่งตรวจอุจจาระผู้ป่วย (stool samples) โดยวิธี multiplex PCR ประมาณ 7×10^4 CFU/ml [78] จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า วิธี PCR มีความสามารถตรวจพบเชื้อได้สูงกว่าวิธีเพาะเชื้อ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจะทำการทดสอบยืนยันดีเอ็นเอของเชื้อเป้าหมายที่พบโดยวิธี southern blot เพื่อป้องกันผล false positive ที่อาจเกิดขึ้นได้ในภายหลัง

การตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 5 ชนิดนี้ ในช่วงที่มีอุบัติการการระบาดประมาณเดือนกันยายน-ตุลาคม 2553 ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง ตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด (ร้อยละ 20) โดยพบเป็น *V. cholerae* O1 ร้อยละ 33.3 และ *V. cholerae* non-O1 ร้อยละ 66.7 รองลงมาคือเชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. แต่ไม่พบเชื้อ *Shigella* spp. ส่วนช่วงนอกอุบัติการการระบาดตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด (ร้อยละ 12) รองลงมาคือ *V. cholerae* ร้อยละ 10 โดยพบเป็น *V. cholerae* O1 ร้อยละ 20 และ *V. cholerae* non-O1 ร้อยละ 80, *Salmonella* spp. ร้อยละ 8, *S. aureus* ร้อยละ 6 และ *Shigella* spp. ร้อยละ 4

จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่า serogroup ของเชื้อ *V. cholerae* ที่ตรวจพบในช่วงที่มีอุบัติการณ์การระบาดและช่วงนอกอุบัติการณ์การระบาดของอหิวาตกโรคไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน คือ ทั้งสองช่วงจะพบเชื้อ *V. cholerae* non-O1 สูงกว่ากลุ่ม *V. cholerae* O1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อ *V. cholerae* กลุ่ม non-O1 มีการกระจายตัวอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น แหล่งน้ำต่างๆ (aquatic environment) [73] จึงมีโอกาสที่จะสัมผัสหรือปนเปื้อนในน้ำหรืออาหารไปสู่ผู้บริโภคได้สูงกว่า จึงพบว่าเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่พบว่า ความชุกของเชื้อกลุ่ม non-O1 และ non-O139 ในการก่อโรคในผู้ป่วยมีแนวโน้มสูงขึ้นและพบมากกว่าเชื้อกลุ่ม O1 และ O139 ถึงแม้ว่าเชื้อจะมีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำกว่าเชื้อกลุ่ม O1 [16] แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าถึงแม้เชื้อกลุ่ม *V. cholerae* non-O1 ส่วนใหญ่จะไม่มียีนสร้างสารพิษคลอรีลา (ยีน *ctx*) ซึ่งเป็นสารพิษสำคัญที่ก่อให้เกิดอหิวาตกโรค แต่เชื้อก็สามารถสร้าง

สารพิษชนิดอื่นๆ ได้ เช่น cytotoxin, heat-labile haemolysin, haemagglutinin/protease and mannose-sensitive-haemagglutinin ซึ่งทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงคล้ายอหิวาตกโรค (cholera-like syndrome) ได้เช่นกัน [9] อย่างไรก็ตามควรมีการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้ออย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เนื่องจากยีนก่อโรคที่สำคัญ เช่น ยีน *ctx* สามารถถ่ายทอดจากสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคคือ *V. cholerae* O1 ไปสู่เชื้อตัวอื่นๆ ซึ่งมีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำกว่าได้โดยผ่าน bacteriophage ประกอบกับเชื้อสามารถปรับตัวเข้าสู่สภาวะ VBNC ได้ จึงอาจทำมีการระบาดของเชื้อเกิดขึ้นและควบคุมได้ยากยิ่งขึ้น โดยเรียกเชื้อกลุ่ม non-O1 และ non-O139 นี้ว่า enteropathogenic *V. cholerae* [16] ในประเทศบังกลาเทศจะแบ่งการพบ peak ของเชื้อกลุ่มนี้เป็น 2 ช่วงคือ ช่วงเดือนเมษายนและสิงหาคม-กันยายน [40] จากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าเชื้อ *V. cholerae* non-O1 เป็นเชื้อที่ควรมีการเฝ้าระวังร่วมกับเชื้อกลุ่ม *V. cholerae* O1 เพราะอาจกลายมาเป็นเชื้อสำคัญที่ทำให้อัตราการเจ็บป่วยเนื่องจากโรคอุจจาระร่วงสูงขึ้นได้ในอนาคต

เมื่อพิจารณาผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงและตัวอย่างอาหาร พบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยต่ำกว่าที่พบในตัวอย่างอาหาร ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยเกิดโรคอุจจาระร่วงเป็นเชื้ออื่นๆ นอกเหนือจากเชื้อ 5 ชนิดที่ทำการศึกษา เช่น เชื้อ *Aeromonas*, *Plesiomonas* เป็นต้น [86] นอกจากนั้นผลการศึกษาความชุกของการตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงในตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจ ตามช่วงที่มีอุบัติการการระบาดของอหิวาตกโรคดังรูปที่ 4.4-4.5 พบว่าไม่คล้อยตามกัน เนื่องจากกลุ่มประชากร (population) ไม่ใช่กลุ่มเดียวกัน หรือขึ้นอยู่กับภูมิต้านทานโรคของแต่ละคน โดยประชากรบางกลุ่มเมื่อเกิดการเจ็บป่วยจากโรคอุจจาระร่วงเนื่องจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อในปริมาณน้อย อาการของโรคสามารถหายได้เอง หรือบางคนมีอาการแต่ไม่มาพบแพทย์จึงทำให้จำนวนการตรวจพบเชื้อในสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยต่ำกว่าที่ตรวจพบในอาหาร

5.5 การตรวจพบสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจนของเชื้อ *S. aureus*

การตรวจหาสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจนของเชื้อ *S. aureus* ได้ทำการตรวจโดยใช้ 2 วิธี คือ การตรวจหายีนสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจน จำนวน 5 ยีน (*sea, seb, sec, sed* และ *tst-1*) โดยวิธี PCR และจากการทดสอบการสร้างสารพิษ (SEA, SEB, SEC, SED และ TSST-1) โดยวิธี RPLA

พบว่าวิธี uniplex PCR มีความไวในการตรวจหายีนสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์แอนติเจนจากเชื้อบริสุทธิ์ของ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 2-16 cfu/ml และวิธี multiplex PCR มีความไวในการตรวจพบยีนเป้าหมายที่ความเข้มข้นของเชื้อ 22 CFU/ml ซึ่งตามรายงานขององค์การอาหารและยา (FDA) ระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในอาหารที่ผลิตสารพิษในระดับที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ คือ มากกว่า 10^5 cells/g และระดับสารพิษที่ก่อโรคได้คือ น้อยกว่า 1 ng/g [56, 68] ดังนั้นวิธี multiplex PCR ซึ่งมีความไวสามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ประมาณน้อย อาจมีประโยชน์ในการช่วยเฝ้าระวังการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษได้

จากการทดสอบการสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์เอนติเจนจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ SEA, SEB, SEC SED และ TSST-1 ในเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารและที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารจำนวน ร้อยละ 41.7 สามารถสร้างสารพิษได้ ขณะที่อีกร้อยละ 12.5 ตรวจพบยีนสร้างสารพิษโดยวิธี PCR แต่ไม่พบการสร้างสารพิษโดยวิธี RPLA โดยยีนสร้างสารพิษที่ตรวจพบมากที่สุด คือ *sea* (ร้อยละ 29.2) รองลงมาคือ *seb, sec, sed* และ *tst*-1 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของผู้ป่วยอาหารเป็นพิษ ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากสารพิษ SEA และ SED [56, 68] นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบเป็นยีน combination (*sea+sec+ tst-1* และ *seb + sed*) ร้อยละ 12.5 จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่า เชื้อ *S. aureus* ประมาณร้อยละ 50 สามารถผลิตสารพิษออกมาปนเปื้อนในอาหารและอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

เมื่อพิจารณาถึงความสอดคล้องระหว่างวิธีการตรวจพบยีนสร้างสารพิษโดยวิธี PCR (genotypic method) กับการตรวจหาสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นโดยวิธี RPLA (phenotypic method) พบว่า มีความสอดคล้องกัน ร้อยละ 76.9 ทั้งนี้การตรวจพบยีนสร้างสารพิษแต่ไม่พบการสร้างสารพิษในสภาวะหลอดทดลองนี้ อาจเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ, pH, ความเข้มข้นของ Sodium chloride (NaCl) หรือ Atmospheric condition ทำให้เชื้อบางสายพันธุ์ไม่สามารถผลิตสารพิษได้ [26, 66, 82] หรืออาจเนื่องจากเชื้อผลิตสารพิษออกมาในปริมาณที่ต่ำกว่าที่ความไวของชุดตรวจจะสามารถตรวจพบได้ [19, 74] นอกจากนี้พบว่า การแสดงออกของ enterotoxin อาจเป็นผลมาจากการถูกควบคุมโดยยีน Accessory Gene Regulator (*agr*) โดยพบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มียีน *agr* (*agr*-) จะสามารถผลิตสารพิษชนิด SEA ได้ในปริมาณมาก ในขณะที่สามารถผลิต SEB, SEC และ SED ได้ในปริมาณน้อย ซึ่งจะเห็นได้ว่าการแสดงออกของยีน *sea* ถูกควบคุมต่างจากยีนอื่นๆ (*seb, sec* และ *sed*) [79] ดังนั้นในบางสภาวะจึงอาจทำให้มีการแสดงออกของสารพิษต่างกันได้

ส่วนเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (ร้อยละ 100) ไม่พบยีนสร้างสารพิษเมื่อตรวจโดยวิธี PCR และไม่สร้างสารพิษดังกล่าวเมื่อทดสอบโดยวิธี RPLA

5.6 การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ

ผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ พบว่าเชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่ดื้อต่อยา ampicillin, clindamycin และ erythromycin ร้อยละ 95.8, 8.3 และ 4.2 ตามลำดับ และเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงนั้นพบว่า ดื้อต่อยา ampicillin, clindamycin, erythromycin และ teicoplanin ร้อยละ 100 คล้ายกับเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร และสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจส่วนใหญ่จะดื้อต่อยา ampicillin, erythromycin, clindamycin [11, 45, 60] อย่างไรก็ตามโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *S. aurues* สามารถหายได้เอง อาจไม่จำเป็นต้องรักษาโดยใช้ยา แต่ในผู้ป่วยบางรายที่มีอาการรุนแรงหรือมีการติดเชื้อ methicillin-susceptible *S. aurues* (MSSA) ส่วนใหญ่จะรักษาโดยใช้ยากลุ่ม β-lactam เช่น oxacillin or cefoxitin, clindamycin [28, 53] ส่วนผู้ป่วยที่ติดเชื้อ methicliin resistant *S. aureus* (MRSA) จะรักษาโดยใช้ยา vancomycin และ cotrimoxazole or teicoplanin [53] ดังนั้นจากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า ยา cefoxitin ซึ่งใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MSSA ในปัจจุบันจึงยังคงใช้รักษาต่อไปได้ [53] ในขณะที่ยา clindamycin อาจไม่เหมาะในการใช้รักษา ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *S. aureus* ร้อยละ 100 ที่ทดสอบดื้อต่อยาชนิดนี้ซึ่งอาจทำให้การรักษาไม่ได้ผล ส่วนในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA ยาต้านจุลชีพ vancomycin และ cotrimoxazole ยังมีประสิทธิภาพในการรักษาต่อไปได้ เนื่องจากพบว่าเชื้อยังไม่มีการดื้อต่อยาดังกล่าว ทั้งเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล แต่อาจต้องมีการเฝ้าระวังการดื้อต่อยา teicoplanin ของเชื้อให้มากขึ้น

จากผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร พบว่า เชื้อดื้อต่อยา ampicillin, tetracycline และ nalidixic acid ร้อยละ 70.8, 8.3 และ 8.3 ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงดื้อต่อยา ampicillin ร้อยละ 100 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่พบว่าเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจส่วนใหญ่จะดื้อต่อยา ampicillin และ nalidixic acid [2] ทั้งนี้เนื่องจากยา ampicillin เป็นยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา (developing countries) จึงทำให้เชื้อมีการดื้อยามากขึ้น [2] ดังนั้นการรักษาผู้ป่วยปัจจุบันที่ใช้ยา ciprofloxacin, chloramphenicol หรือ cotrimoxazole [54, 58] จึงยังคงใช้รักษาต่อไปได้

ส่วนเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารพบว่ามีการดื้อต่อยา ampicillin และ tetracycline ร้อยละ 16.7 และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย ดื้อต่อยา tetracycline และ nalidixic acid ร้อยละ 50 ดังนั้นการรักษาผู้ป่วยปัจจุบันที่ใช้ยา tetracycline [18, 62, 63, 69] จึงใช้ได้กับผู้ป่วยบางกลุ่มซึ่งมีความไวต่อการรักษาด้วยยาดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยปี 2009 ซึ่งพบว่าเชื้อ *V. cholerae* O1 ที่แยกได้จากประเทศไทยส่วนใหญ่ยังไวต่อยา tetracycline ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยอหิวาตกโรค [76]

อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยรายที่ดื้อต่อยานี้ก็อาจเปลี่ยนไปใช้ยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ เช่น ยา norfloxacin, doxycycline, ciprofloxacin หรือ erythromycin [54, 55] จากการศึกษานี้พบว่ามีเชื้อ *V. cholerae* ในสิ่งแวดล้อมบางส่วนดื้อต่อยา tetracycline ดังนั้นการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อดื้อยาจึงมีความสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อดื้อยาอาจแพร่กระจายสู่ชุมชนได้ง่ายยิ่งขึ้น เพราะเชื้อที่ดื้อต่อยา tetracycline นี้จะมียีน *tet* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาอยู่ เช่นยีน *tet*K หรือ *tet*L เกี่ยวข้องกับกระบวนการ efflux pump โดยยีนเหล่านี้เป็นยีนที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (mobile genetic element) จึงมีโอกาสที่จะถ่ายทอดไปสู่เชื้อตัวอื่นๆ และทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้รวดเร็วขึ้น [51] จึงควรมีการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อดื้อยาทั้งในชุมชนและโรงพยาบาล เพื่อให้การรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

ส่วนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *Shigella* spp. ที่เชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย พบว่า *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 42.9 ดื้อต่อยา ampicillin ซึ่งให้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับในประเทศ US ที่พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากกว่าร้อยละ 90 จะดื้อต่อยา ampicillin [36] ดังนั้นการรักษาผู้ป่วยปัจจุบันที่ใช้ยา norfloxacin, doxycycline หรือ ciprofloxacin จึงยังคงใช้รักษาต่อไปได้ [17, 37] ส่วนผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *Shigella* spp. และมีอาการรุนแรง อาจจะสามารถใช้ยา cotrimoxazole รักษาต่อไปได้ ถึงแม้จากการศึกษาจะพบว่าเชื้อที่แยกได้ร้อยละ 100 ดื้อต่อยานี้ก็ตาม ทั้งนี้เพราะจำนวนเชื้อที่แยกได้และพบว่ามีการดื้อต่อยาชนิดนี้มีเพียง 1 isolates อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ควรมีการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาชนิดนี้และชนิดอื่นๆ (tetracycline และ nalidixic acid) ให้มากขึ้น นอกจากนี้อาจเลือกใช้ยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ เช่น ciprofloxacin, ampicillin, ceftriaxone quinolones [18, 54, 69] ในการรักษาผู้ป่วยได้

สรุปผลการวิจัย

1. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus*, *Salmonella*, *Shigella* spp., *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี uniplex PCR มีความไวในการตรวจพบเชื้อแตกต่างกัน โดยพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อที่ประมาณ 1-10 cfu/reaction และวิธี multiplex PCR มีความไวในการตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้น 10^2 cfu/reaction เมื่อใช้เชื้อบริสุทธิ์
2. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์ มีความไวในการตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้นประมาณ 2-16 cfu/reaction เมื่อตรวจโดยวิธี uniplex PCR และวิธี multiplex PCR มีความไวในการตรวจพบยีนเป้าหมายที่ความเข้มข้นของเชื้อ 22 CFU/reaction เมื่อใช้เชื้อบริสุทธิ์
3. วิธี uniplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้น 10^0-10^2 cfu/25g หลังจาก enrichment 3 ชั่วโมง ในขณะที่วิธี multiplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคทั้ง 5 ชนิดในคราวเดียวกันที่ความเข้มข้นของ 10^3 cfu หลังจาก enrichment เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
4. จากผลการตรวจเชื้อจากตัวอย่างอาหาร จำนวน 65 ตัวอย่าง โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี PCR พบตัวอย่างอาหารมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน 55 ตัวอย่าง (84.6%) โดยเชื้อที่พบมากที่สุดในช่วงที่มีอุบัติการการระบาดและช่วงนอกอุบัติการการระบาดของอหิวาตกโรค คือ เชื้อ *V. cholerae* (ร้อยละ 91) และเชื้อ *S. aureus* (ร้อยละ 40.7) ตามลำดับ
5. จากผลการตรวจเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง จำนวน 65 ตัวอย่าง โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี multiplex PCR พบตัวอย่างของสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงมีเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน 22 ตัวอย่าง (33.8%) โดยเชื้อที่พบมากที่สุดในช่วงที่มีอุบัติการการระบาดและช่วงนอกอุบัติการการระบาดของอหิวาตกโรค คือ เชื้อ *V. cholerae* (ร้อยละ 20) และเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ร้อยละ 12) ตามลำดับ
6. เชื้อ *S. aureus* ร้อยละ 41.7 สามารถสร้างสารพิษชนิดซุปเปอร์เอนติเจนได้ โดยเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารมีการสร้างสารพิษชนิด SEA มากที่สุด (ร้อยละ 20.8) ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบยีนสร้างสารพิษ *sea* มากที่สุด (ร้อยละ 25.0) เมื่อตรวจโดยวิธี multiplex PCR นอกจากนี้พบว่า การตรวจยีนสร้างสารพิษโดยวิธี PCR มีความสอดคล้องกับการตรวจหาสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นโดยวิธี RPLA ร้อยละ76.9
7. เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร พบว่าเชื้อ *S. aureus* (95.8%) และ *Salmonella* spp. (70.8%) มีการดื้อยามากที่สุด โดยดื้อต่อยา ampicillin ส่วนเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วงพบว่าเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. มีการดื้อยามากที่สุด โดยเชื้อ *Salmonella* spp. (100%) จะดื้อต่อยา ampicillin ในขณะที่เชื้อ *Shigella* spp. (100%) ดื้อต่อยา cotrimoxazole, tetracycline และ nalidixic acid