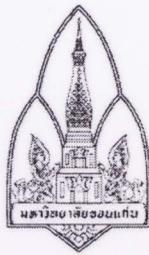




246171



รายงานวิจัย
เรื่อง

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงและเอนเทอโรทอกซิน
ของเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส จากอาหารและผู้ป่วย อุจจาระร่วง
และทดสอบความไวของเชื้อต่อยา

**Development of enteropathogenic bacterial detection and
enterotoxin of *Staphylococcus aureus* from food
and patients and antimicrobial susceptibility**

คณะผู้วิจัย จริญญา ชมวารินทร์
เสาวนิต ทองพิมพ์
วิเศษ นามวาท
ประจวบ ชัยมณี

ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2553
ชุดโครงการการพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วง
โดยเทคนิค multiplex PCR และการศึกษาคุณสมบัติสารพิษ
และเอนไซม์ของเชื้อไวรัสโอ กลอดีรี เพื่อเพิ่ม คุณภาพชีวิต

600251703

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



รายงานวิจัย
เรื่อง

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงและเอนเทอโรทอกซิน
ของเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส จากอาหารและผู้ป่วย อุจจาระร่วง
และทดสอบความไวของเชื้อต่อยา

Development of enteropathogenic bacterial detection and
enterotoxin of *Staphylococcus aureus* from food
and patients and antimicrobial susceptibility



คณะผู้วิจัย จริญญา ชมวารินทร์
เสาวนิต ทองพิมพ์
วิเศษ นามวาท
ประจวบ ชัยมณี

ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2553
ชุดโครงการการพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วง
โดยเทคนิค multiplex PCR และการศึกษาคุณสมบัติสารพิษ
และเอนไซม์ของเชื้อไวรัสโคโรนา เพื่อเพิ่ม คุณภาพชีวิต

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงและเอนเทอโรทอกซิน
ของเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส จากอาหารและผู้ป่วยอุจจาระร่วง
และทดสอบความไวของเชื้อต่อยา

จรรยา ชมวารินทร์¹, เสาวนิต ทองพิมพ์²,
วิเศษ นามวาท¹, ประจวบ ชัยมณี³

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์²
หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์³ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

246171

เชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงและอาหารเป็นพิษ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) พัฒนาวิธี multiplex PCR (ชุดที่ 1) ในการตรวจหาเชื้อดังกล่าวในตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อ 2) พัฒนาวิธี multiplex PCR (ชุดที่ 2) ในการตรวจหาชิ้นสร้างสารพิษชนิดซุเปอร์แอนติเจน จำนวน 5 ชนิด ของเชื้อ *S. aureus* (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *tst-1*) ในตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยเปรียบเทียบกับวิธี reverse passive latex agglutination assay (RPLA) 3) ศึกษาความชุกของเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย และ 4) ศึกษาความไวต่อยาของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่าง โดยวิธี disc diffusion ผลการวิจัยพบว่า วิธี multiplex PCR (ชุดที่ 1) สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคทั้ง 5 ชนิด ที่เติมลงไป ในตัวอย่างอาหารในคราวเดียวกันที่ความเข้มข้นของ 10^3 cfu/25g หลังจาก enrichment เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในขณะที่วิธี uniplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้น 10^0 - 10^2 cfu/25g หลังจาก enrichment 3 ชั่วโมง ส่วน multiplex PCR (ชุดที่ 2) และวิธี uniplex PCR มีความไวในการตรวจพบชิ้นสร้างสารพิษที่ความเข้มข้นของเชื้อ 22 cfu/reaction และ 2-16 cfu/reaction ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบการตรวจเชื้อโดยวิธี multiplex PCR กับการเพาะเชื้อจำนวนอย่างละ 65 ตัวอย่าง พบว่า ตรวจจากอาหารพบเชื้อก่อโรคโดยวิธี multiplex PCR ร้อยละ 81.5 (53/65) และจากการเพาะเชื้อร้อยละ 64.6 (42/65) ตามลำดับ และเมื่อตรวจจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงพบเชื้อก่อโรคโดยวิธีดังกล่าวร้อยละ 29.2 (19/65) และร้อยละ 21.5 (14/65) ตามลำดับ เมื่อศึกษาความชุกของเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหารพบเชื้อร้อยละ 84.6 และในสิ่งส่งตรวจพบเชื้อร้อยละ 33.8 โดยในตัวอย่างอาหารพบว่า *S. aureus* มีความชุกมากที่สุด (ร้อยละ 40.7) ในขณะที่ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจพบเป็น *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 12.0 และพบว่าร้อยละ 54.2 ของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารพบชิ้นสร้างสารพิษ โดยยีนที่พบมากที่สุดคือยีน *sea* (ร้อยละ 25.0) แต่ไม่พบยีนเหล่านี้ในเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ การตรวจพบชิ้นสร้างสารพิษโดยวิธี PCR มีความสอดคล้องกับการตรวจหาสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นโดยวิธี RPLA ร้อยละ 76.9 ตัวอย่างอาหารที่ตรวจพบร้อยละ 81.5 ไม่ได้มาตรฐานอาหาร ผลความไวของเชื้อต่อยาพบว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารพบเชื้อคือยาน้อยกว่า แต่มีแนวโน้มสอดคล้องกับการคือยาที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่ง

246171

ตรวจ สรุปว่า วิธี multiplex PCR เป็นทางเลือกอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงในอาหารและ
สิ่งส่งตรวจ รวมทั้งยีนที่สร้างสารพิษของเชื้อ *S. aureus* ได้เพราะมีความไวและมีความจำเพาะสูง จึงมีประโยชน์
ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคอุจจาระร่วงหรืออาหารเป็นพิษได้

คำสำคัญ : Multiplex-PCR, โรคอุจจาระร่วง, เชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหาร, ซุปเปอร์แอนติเจนิกทอกซิน,
อาหาร, ผู้ป่วย, ความไวต่อยา

**Development of enteropathogenic bacterial detection and enterotoxin
of *Staphylococcus aureus* from food and patients
and antimicrobial susceptibility**

**Chariya Chomvarin¹, Saowanit Tongpim²,
Wises Namwat¹, Prajuab Chaimanee³**

**Department of Microbiology, Faculty of Medicine¹, Department of Microbiology, Faculty of Science²,
Clinical Laboratory Section, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine³, Khon Kaen University**

ABSTRACT

246171

Salmonella spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* are the major causative agents of diarrheal disease and food poisoning. The objectives of this study were 1) To develop multiplex PCR (m-PCR, set 1) for detection of those enteropathogenic bacteria in food and clinical samples (rectal swab) compared to the culture method, 2) To develop m-PCR (set 2) for detection of superantigenic toxin genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *tst-1*) of *S. aureus* isolated from food and clinical samples, 3) To determine the prevalence of those five pathogens in those samples, and 4) To determine antimicrobial resistance of bacteria isolated from clinical and environmental sources. A total of 65 samples of each food and rectal swab sample were investigated specific genes of those five pathogens and superantigenic toxin genes of *S. aureus* by m-PCR compared with cultural method and with reverse passive latex agglutination assay (RPLA), respectively. Antimicrobial susceptibility was performed using the disc diffusion method. The results showed that the limit of detection in artificially inoculated sample (papaya salad) of m-PCR (set1) was 10^3 cfu/25 g after enrichment 6 h and uniplex PCR was 10^0 - 10^2 cfu/25 g after enrichment 3 h. The sensitivity of m-PCR (set 2) for simultaneous detection of five toxin genes was 22 cfu/reaction and as low as 2-16 cfu/reaction for the uniplex PCR. The prevalence of those pathogens in food and rectal swab samples were 84.6% (55/65) and 33.8% (22/65), respectively. *S. aureus* was the most frequently found in food samples (40.7%) and *V. parahaemolyticus* was the most frequently found in rectal swab samples (12.0%). The superantigenic toxin genes of *S. aureus* were detected in 54.2% (13/24). All isolates carried the superantigenic toxin genes were isolated from foods. The

246171

individual of *sea* gene showed the highest incidence in food samples (25.0%). The detection of superantigenic toxin genes corresponded with RPLA method in 76.9%. Of 65 food samples tested in Khon Kaen municipality, 81.5% were unacceptable microbiological standard. The antimicrobial resistance of those microorganisms isolated from the patients and foods seems to be corresponded. The results indicated that the m-PCR is the alternative method for detection of five pathogens and superantigenic toxins in food samples and diarrheal patients because of their high sensitivity and specificity. These data could be used for surveillance bacterial resistance in order to prevent the spreading of pathogen in the hospital and environment.

Keywords: Multiplex PCR, Diarrhea, Enteropathogenic bacteria, Superantigenic toxin, Foods, Patients, Antimicrobial susceptibility

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยการได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเภททุนอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบประมาณ 2553 จึงขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูงตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจอย่างดี และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการ จัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับการทำวิจัย จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้อีกครั้งหนึ่ง

สุดท้ายนี้ ขอขอบภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการ ดำเนินการวิจัยที่เป็นระบบและช่วยให้งานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

หัวหน้าผู้ดำเนินการวิจัย

30 พฤษภาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญเนื้อหา	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่ได้จากโครงการวิจัย	3
1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	4
1.7 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
2.1 ระบาดวิทยา	5
2.2 คุณสมบัติทั่วไปและการก่อโรคของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.3 คุณสมบัติทั่วไปและการก่อโรคของเชื้อ <i>Salmonella</i>	8
2.4 คุณสมบัติทั่วไปและการก่อโรคของเชื้อ <i>Shigella</i>	9
2.5 คุณสมบัติทั่วไปและการก่อโรคของเชื้อ <i>Vibrio cholerae</i>	10
2.6 คุณสมบัติทั่วไปและการก่อโรคของเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12
2.7 การตรวจหาเชื้อโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture) และ Multiplex- PCR	13
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	
3.1 แบบแผนการวิจัย	15
3.2 ขั้นตอนและวิธีการวิจัย	15
3.2.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง	15
3.2.2 การเก็บตัวอย่างอาหาร	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.3 การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง	16
3.2.4 ขั้นตอนในห้องปฏิบัติการ	16
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผล	30
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การหาขึ้นเป้าหมายและออกแบบไพรเมอร์	31
4.2 การทดสอบความไวของวิธี Uniplex PCR และ Multiplex PCR	35
4.3 การหาความไวของการตรวจเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง 5 ชนิดใน ตัวอย่างอาหารที่เติมเชื้อลงไป	35
4.4 การตรวจพบเชื้อในอาหาร	37
4.5 การตรวจพบเชื้อจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง	38
4.6 การตรวจหาสารพิษชนิดซูเปอร์แอนติเจนของเชื้อ <i>S. aureus</i>	43
4.7 การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ	44
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล	48
เอกสารอ้างอิง	59

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR mixture และ PCR condition สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายโดยวิธี Multiplex PCR	17
ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของ Reaction mixture สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายต่างๆ โดยวิธี multiplex PCR จำนวน 3 ชุด	20
ตารางที่ 3.3 Primer sequence และ PCR conditions สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้ง 5 ชนิด, ยีนสร้างสารพิษชนิดซูปเปอร์แอนติเจน, ยีนสร้างสารพิษและ virulent gene ของเชื้อ <i>V. cholerae</i>	22
ตารางที่ 3.4 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ <i>S. aureus</i>	29
ตารางที่ 3.5 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	29
ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	31
ตารางที่ 4.2 ความไวของวิธี Multiplex PCR และวิธีเพาะเชื้อในการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง 5 ชนิด ในตัวอย่างอาหารที่เติมเชื้อลงไป	36
ตารางที่ 4.3 คุณภาพทางจุลชีวะวิทยาของอาหารพร้อมบริโภครวมและเครื่องคั้นในเขตเทศบาลเมืองขอนแก่น ตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	37
ตารางที่ 4.4 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหาร	39
ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 5 ชนิด ในตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง	40
ตารางที่ 4.6 ความชุกของการตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 5 ชนิดในตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง	41
ตารางที่ 4.7 การตรวจสารพิษชนิดซูปเปอร์แอนติเจนของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย	43
ตารางที่ 4.8 ชนิดของยีนสร้างสารพิษชนิดซูปเปอร์แอนติเจนที่ตรวจพบและสารพิษซึ่งผลิตโดยเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย	44
ตารางที่ 4.9 คุณสมบัติความไวต่อยาของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารและสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยอุจจาระร่วง	45

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.10	คุณสมบัติความไวต่อยาของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>V. cholerae</i> และ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร	46
ตารางที่ 4.11	คุณสมบัติความไวต่อยาของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>V. cholerae</i> และ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย	47

สารบัญรูป

	หน้า	
รูปที่ 3.1	กระบวนการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงจำนวน 5 ชนิดในตัวอย่างอาหาร	27
รูปที่ 3.2	กระบวนการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงจำนวน 5 ชนิดในตัวอย่าง สิ่งส่งตรวจผู้ป่วย	28
รูปที่ 4.1	ผลการหาสถานะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ เชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง จำนวน 5 ชนิด โดยวิธี PCR	33
รูปที่ 4.2	ผลการหาสถานะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน สร้างสารพิษชนิดซูเปอร์แอนติเจน จำนวน 5 ชนิดของเชื้อ <i>S. aureus</i> โดยวิธี PCR	34
รูปที่ 4.3	ผลการหาสถานะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนสร้าง สารพิษและยีนแยกความแตกต่างระหว่าง serogroup ของเชื้อ <i>V. cholerae</i> โดยวิธี Multiplex PCR	34
รูปที่ 4.4	ความชุกของการตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงในตัวอย่างอาหาร ตามช่วงที่มีอุบัติการณ์การระบาดของอหิวาตกโรค	42
รูปที่ 4.5	ความชุกของการตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ผู้ป่วยอุจจาระร่วง ตามช่วงที่มีอุบัติการณ์การระบาดของอหิวาตกโรค	42