บทที่ 1
บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อจุลินทรีย์ที่พบอยู่บนหรือในอวัยวะต่างๆ ในร่างกายของมนุษย์นั้น ส่วนใหญ่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ซึ่งมักจะเป็นประโยชน์ต่อคนในภาวะปกติ การอยู่ร่วมกันนี้อาจเป็นแบบต่างคนต่างอยู่หรืออาศัยประโยชน์ซึ่งกันและกันแต่ในบางกรณีที่ร่างกายมีความต้านทานลดลง เชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นก็อาจฉวยโอกาสทำให้เกิดโรคได้ (opportunistic infection) แต่ถ้ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการก่อโรคซึ่งเรียกว่า pathogen คือ เชื้อโรคที่เข้ามาอาศัยคนเป็นโฮสต์ (host) แบ่งตัวเพิ่มจำนวนและก่ออันตรายแก่คน (ธีรพร, 2546) ซึ่งเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษนั้นมีมากมายหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่จะมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย เช่น เชื้อ *Salmonella* เชื้อ *Escherichia coli* และเชื้อ *Vibrio* เป็นต้น ซึ่งจัดเป็นเชื้อก่อโรคที่ยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขระดับโลก สำหรับเชื้อ *Salmonella* ในประเทศไทย มีรายงานผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ คิดเป็นอัตราส่วน 247.38 ต่อประชากร 100,000 คน (กู้ศักดิ์, 2549) ผู้ที่มีอาการหนักต้องเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลโดยมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Salmonella* ปีละไม่ต่ำกว่า 4,000 คน และคาดว่ามีผู้ที่เป็นพาหะ อีกเป็นจำนวนมาก การจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella* มีความซับซ้อนมาก โดยสมบัติของแอนติเจนซึ่งเป็นหลักการของ Kauffmann และ White แบ่ง *Salmonella* ได้มากกว่า 2000 serotypes ส่วน Ewing และคณะ แบ่ง *Salmonella* เป็น 3 สปีชีส์ คือ *Salmonella cholerae – suls, Salmonella enteritidis* และ *Salmonella typhi* สปีชีส์อื่นๆ หรือ serotypes อื่นๆ จัดเป็น serotypes ของ *S. enteritidis* ดังนั้นตามหลักของ Kauffmann และ White *S. typhimurium* จึงกลายเป็น *S. enteritidis* serotype *typhimurium* หลักการแบ่ง *Salmonella* เป็น 3 สปีชีส์หลัก ใช้มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1972 ถึง ค.ศ. 1983 ต่อมามีการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์มีการพบว่า *Salmonella* ทั้งหมด รวมทั้งจีนัส *Arizona* จัดเป็นสปีชีส์เดียวกันเมื่อพิจารณาทางด้านพันธุศาสตร์และสายวิวัฒนาการ ส่วนความแตกต่างตามชนิดของแอนติเจน ปฏิกิริยาชีวเคมีและการกระจายตามภูมิศาสตร์ หรือ กระจายตามโฮสต์ต่างๆ เป็นผลมาจากความแตกต่างทางด้านภายในสปีชีส์เดียวกัน

เชื้อ *Salmonella* ที่ไม่เลือกโฮสต์ เป็นเชื้อ *Salmonella* สามารถแพร่จากคนและ สัตว์เป็นโรค รวมทั้งอาหาร น้ำ ดิน และสิ่งแวดล้อมได้แก่ เชื้อ*Salmonella* ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ นับเป็นเชื้อ *Salmonella* ที่มีความสำคัญ และจะต้องควบคุมผ่านกิจกรรมการจัดการ

สุขาภิบาลอาหารที่ดี เพื่อตัดวงจรการแพร่กระจายของโรค เชื้อในกลุ่มนี้เรียกว่า non typhoidal salmonellosis ทำให้เกิดโรค Salmonellosis ซึ่งส่วนใหญ่จะทำ ให้เกิดอาการทางลำไส้และบาง serovar เท่านั้นที่บุกรุกเข้ากระแสโลหิตและทำ ให้เกิดการติดเชื้อในระบบอื่นๆ Salmonellosis มิใช่โรคติดเชื้อร้ายแรงที่ส่วนใหญ่ต้องรับการรักษาโดยปัจจุบันทันด่วน ผู้ที่ได้รับเชื้ออาจมีอาการไม่มากแต่ก็มีผลกระทบต่อสุขภาพโดยทั่วไปและต่อประสิทธิภาพของการทำงาน ซึ่งมิสามารถคำนวณออกมาเป็นค่าของการสูญเสียที่ชัดเจน สถานการณ์ปัจจุบันในประเทศไทยที่ยังขาดการบริการทางห้องปฏิบัติการที่จะช่วยให้สามารถวินิจฉัยโรค Salmonellosis ได้ถูกต้องสวนทางกับการเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์ และอาหารสำเร็จรูปที่เห็นความสำคัญของการควบคุมคุณภาพด้านจุลลินทรีย์มากน้อยต่างกัน ตลอดจนการเคลื่อนตัวของประชากรเข้าสู่เมืองใหญ่ๆ และการเกิดธุรกิจการจำหน่ายอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะซึ่งปรากฏให้เห็นอยู่โดยทั่วไป เหล่านี้เป็นสิ่งที่ควรจะคาดคะเนได้ว่าหากยังไม่สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในเครื่องอุปโภคของคนแล้วการติดเชื้อจาก *Salmonella* จะมีแต่การเพิ่มขึ้นได้

เชื้อ *Salmonella* เป็นเชื้อจีนัสหนึ่งใน Enterobacteriaceae ดำรงชีวิต Facultative Anaerobes เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่สามารถเจริญในอาหารค่อนข้างธรรมดาได้ ถิ่นที่อยู่ของเชื้อชนิดนี่คือลำไส้ของคนและสัตว์ (นงลักษณ์, 2547) ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ และทำให้เกิดโรคในคน คือ ไข้ไทฟอยด์ ผู้ป่วยจะมีไข้สูง อาจสูงถึง 40 องศาเซลเซียส ท้องร่วง อ่อนเพลีย การติดต่อง่ายมาก เพียงได้รับเชื้อทางอาหาร จากการตรวจสอบของกลุ่มคุ้มครองผู้บริโภค ด้านอาหาร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์จังหวัดขอนแก่น คาดว่า ตัวอย่างเนื้อหมูและตัวอย่างเนื้อไก่ ประมาณร้อยละ 90 มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้อยู่ในปริมาณไม่ปลอดภัย

การทำลายเชื้อไม่ใช่เรื่องยาก การปรุงอาหารด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที หรือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4-5 นาที ก็สามารถทำลายเชื้อได้ และการล้างมือบ่อย ๆ ก็ทำให้ลดปริมาณการปนเปื้อน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสุขลักษณะของการทำอาหารตามร้านค้าในประเทศไทย ยังมีข้อบกพร่องอยู่มาก ทำให้เชื้อมีการแพร่กระจายของเชื้อ วัตถุดิบที่ใช้ทำอาหาร เช่น เนื้อสัตว์ที่มาจากโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งมีข้อกำหนดต้องไม่พบเชื้อ พบว่าการฆ่าและชำแหละไม่ถูกสุขลักษณะ ทำให้พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* สูง และอาหารที่ปรุงสุกแล้วก็ยังพบเชื้อในปริมาณสูง

การตรวจเชื้อในปัจจุบัน ใช้วิธีต่างๆ ดังต่อไปนี้

1.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อใน Pre-enrichment media เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมงจึงนำไป

streak บน plate เพื่อแยกเชื้อ selective medium เพื่อเป็นการแยกเชื้อ และเพิ่มปริมาณ เพื่อให้เชื้อที่แยกได้มาตรวจยืนยันโดยวิธีทางชีวเคมี (Biochemical test) และ น้ำเหลืองวิทยา (Serology) ซึ่งใช้เวลาไม่น้อยกว่า 4-7 วัน

1.2 วิธี PCR ซึ่งนำตัวอย่างมาสกัด DNA ของเชื้อ แล้วนำไปเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของเชื้อในเครื่อง Thermal cycler โดยใช้ primer ที่จำเพาะ วิธีนี้ ความแม่นยำและถูกต้องสูงมาก แต่มีวิธีการยุ่งยากมาก ใช้เครื่องมือราคาแพง ใช้สารเคมีราคาสูง และแน่นอนที่สุดคือใช้เวลานาน ห้องตรวจที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ก็ยังไม่มีการใช้วิธีนี้ จะได้เห็นว่า การตรวจตัวอย่างด้วยวิธีทั้งสองใช้เวลานาน ซึ่งผู้ค้าไม่สามารถรอผลตรวจได้ และจะนำผลิตภัณฑ์ของตนออกจำหน่ายเลย โดยไม่ทราบว่ามีเชื้ออยู่มากน้อยแค่ไหน ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อผู้บริโภค

ในปัจจุบันมีการพัฒนา strip หรือวิธีการตรวจเชื้อให้รวดเร็วเพื่อใช้ตรวจเชื้อต่าง ๆ และมีจำหน่ายอยู่แล้วในต่างประเทศ สามารถตรวจได้รวดเร็ว แต่มีราคาสูงมาก หากนำเข้า คาดว่าจะมีราคาไม่ต่ำกว่า 20,000 บาทต่อ 50 อัน หรือเฉลี่ยแล้วตรวจครั้งละ 400 บาทและ strip ที่มีจำหน่ายก็เป็นการพัฒนาให้จำเพาะกับเชื้อที่มีในต่างประเทศ ซึ่งสายพันธุ์แตกต่างไปจากเชื้อในท้องถิ่นของประเทศเรา

ดังนั้น ในการศึกษาในครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายการใช้เอนติซีรั่ม และ DNA probe เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่มีในประเทศไทย โดยทำการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อดังกล่าว แล้วตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี ELISA หรือ western immunoblotting และทำการศึกษาหา DNA probe ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อดังกล่าว นำแอนติบอดีและ DNA probe ที่ได้มาพัฒนาเป็น strip เพื่อใช้ในการตรวจวัดเชื้อในตัวอย่างต่าง ๆ ต่อไป ซึ่ง strip ที่ได้คาดว่าจะช่วยให้การตรวจเชื้อทำได้สะดวกรวดเร็วขึ้น ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์และมีความจำเพาะกับเชื้อในท้องถิ่นของเรา ทำให้สามารถป้องกันและเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อต่างๆ ได้ดีขึ้น ส่งผลดีต่อสุขอนามัยและสุขภาพของประชาชนทั่วไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อผลิตแอนติซีรั่ม ที่มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp.

2.2 เพื่อออกแบบ DNA probe ให้มีต่อเชื้อ *Salmonella* spp.

2.3 สามารถนำแอนติซีรั่ม และ DNA probe ไปตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ ทั้งที่เป็นวัตถุดิบ และที่ปรุงสุกแล้ว รวมทั้งผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น น้ำดื่ม เป็นต้น

3. ขอบเขตของการวิจัย

เพื่อให้เกิดความมั่นใจสูงสุด จะใช้วิธีต่อไปนี้ 2 วิธีร่วมกัน ในการตรวจแต่ละครั้ง เนื่องจากแต่ละวิธีมีข้อดีข้อด้อยแตกต่างกัน วิธีทั้งสอง ได้แก่

3.1 วิธีการใช้แอนติซีรั่มตรวจโปรตีนของเชื้อ *Salmonella* spp.

3.2 วิธีการใช้ DNA probe สำหรับตรวจจับ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp.

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับในเชิงความรู้พื้นฐานและการใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น เชิงนโยบาย เชิงสาธารณะ และการพัฒนาสู่เชิงพาณิชย์

4.1 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สามารถตรวจนำแอนติซีรั่มที่ผลิตขึ้นนำไปตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้รวดเร็วขึ้น

4.2 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ และสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด สามารถป้องกันและเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อต่างๆ ดังกล่าวได้ดีขึ้น

4.3 โรงฆ่าสัตว์สามารถตรวจสอบปริมาณเชื้อในเนื้อสัตว์ได้ก่อนส่งไปแปรรูป

4.4 ยกฐานะระดับสาธารณสุขของอาหารให้มีความปลอดภัยจากเชื้อต่างๆ ดังกล่าวได้สูงขึ้น อันจะส่งผลต่อสุขอนามัยของประชาชนทั่วไป