ว กรมวิทย พ 2559; 58 (2) : 80-92

การเฝ้าระวัง *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ในเนื้อปูต้มแกะ

ศศิธร ฐิติเพชรกุล[*] กนกพรรณ สมยูรทรัพย์[**] และศรีวรรณา หัทยานานนท์[***]

[*]สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร [**]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การวิจัยเชิงสำรวจนี้ได้ดำเนินการเฝ้าระวังการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ในเนื้อปูต้มแกะที่จำหน่ายในตลาดสดและตลาดนัด 10 แห่ง ในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2557- มิถุนายน 2558 จากการเก็บตัวอย่างเนื้อปูต้มแกะส่วนต่าง ๆ ที่นิยมบริโภค ได้แก่ เนื้อปูก้อน เนื้อปูขาว เนื้อปูส่วนก้าม และเนื้อปูส่วนขา จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* 29 ตัวอย่าง ปริมาณ 15-1,100,000 MPN/g (1.18-6.04 log MPN/g) หรือปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 3.72 ± 0.91 log MPN/g พบ *S. aureus* 27 ตัวอย่าง ปริมาณ 20-11,000 cfu/g (1.30-4.04 log cfu/g) หรือปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 230 ± 0.51 cfu/g ในขณะที่พบ *Salmonella* spp. 7 ตัวอย่าง จำแนกได้ 6 serovars คิดเป็นร้อยละ 58, 54 และ 14 ตามลำดับ โดยจำนวนนี้พบตัวอย่างที่ *S. aureus* ไม่เข้ามาตรฐานเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 2 (2553) ของอาหารพร้อมบริโภค ที่ระบุให้พบได้ไม่เกิน 100 cfu/g คิดเป็นร้อยละ 32 และต้องไม่พบทั้ง *V. parahaemolyticus* และ *Salmonella* spp. สำหรับ *Vibrio* spp. ชนิดอื่นที่ตรวจพบประกอบด้วย *V. parahaemolyticus* (58%), *V. cholerae* non O1(18%), *V. vulnificus* (16%), *V. mimicus* (12%), *V. alginolyticus* (10%) และ *V. fluvialis* (4%) จำแนกซีโรไทป์ของ *V. parahaemolyticus* ด้วยชุดสำเร็จรูป Denka Seiken, Tokyo พบ O3: KUT มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 20.70 และตรวจไม่พบ ยีนสร้างสารพิษทั้ง *tdh* และ *trh (tdh-, trh-)* ในทุกซีโรไทป์

Accepted for publication, 31 May 2016

บทนำ

สถานการณ์โรคที่สำคัญและเป็นปัญหาสาธารณสุขของทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นโรคระบบทางเดินอาหารและน้ำเป็นสื่อ ได้แก่ โรคอาหารเป็นพิษซึ่งพบการระบาดบ่อยที่สุดและพบได้ตลอดทั้งปี จากการสอบสวนโรค พบว่าสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียร้อยละ 73 พิษจากพืชร้อยละ 23 และพิษจากสัตว์ร้อยละ 2 ผลการตรวจชนิดเชื้อก่อโรคที่ได้รับรายงานในระบบเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาของผู้ป่วยอาหารเป็นพิษทั้งหมดตั้งแต่ปี 2555 จนถึงปัจจุบัน พบผู้ป่วยจาก *Vibrio parahaemolyticus* มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ *Salmonella* spp. ตามด้วย *Staphylococcus aureus* และมีแนวโน้มเช่นนี้ตลอด 3-4 ปี ที่ผ่านมา สาเหตุเกิดจากรับประทานอาหารที่ปรุงไม่สุก รวมทั้งอาหารทะเล โดยเฉพาะอาหารทะเลและข้าวผัดโรยเนื้อปูติดอันดับหนึ่งในสิบเมนูอาหารที่เป็นสาเหตุการระบาดของโรคทางเดินอาหารเสมอ[1, 2]

ในช่วงปลายปี 2557 ถึงต้นปี 2558 กรมควบคุมโรคได้รับรายงานผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษที่สามารถระบุเชื้อก่อโรค ได้แก่ *V. parahaemolyticus* ซึ่งพบมากที่สุดที่จังหวัดเชียงใหม่ และหลายจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยแหล่งโรคครั้งนั้นมีความเกี่ยวข้องกับอาหารประเภทข้าวมันไก่ โดยพบแหล่งโรคร่วมที่มาจากแหล่งผลิตไก่และรถขนส่งของโรงงานอีกหลายแห่งซึ่งในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุสาเหตุของการปนเปื้อนได้แน่ชัด[3]

V. parahaemolyticus หรืออหิวาต์เทียมอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ซึ่งประกอบด้วย 5 จีนัส ได้แก่ *Aeromonas, Plesiomonas, Enhydrobacter, Photobacterium* และ *Vibrio*[4] สำหรับจีนัส *Vibrio* มีมากกว่า 30 สปีชีส์ และที่สามารถก่อโรคในมนุษย์ 12 สปีชีส์ ได้แก่ *V. cholerae, V. furnisii, V. mimicus, V. fluvialis, V. vulnificus, V. alginolyticus, V. damsela, V. hollisae, V. metschnikovil, V. cincinnateinsis, V. carchaiae* และ *V. parahaemolyticus*[5, 6, 7]

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรงหรือโค้งงอ พบได้ทั่วโลก ในสัตว์ทะเลและสัตว์น้ำกร่อยทุกชนิดทั้ง ปลา หอย กุ้ง กั้ง หมึก ปู จึงได้ชื่อว่าเป็น “Seafood-borne pathogen”[8] ซึ่งเจริญได้ดีในภาวะที่มีความเค็ม เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่พบบ่อยและมากที่สุด ระยะฟักตัวของเชื้อระหว่าง 4-96 ชั่วโมง ผู้ได้รับเชื้อจะมีอาการท้องเสีย เป็นตะคริวที่ท้อง อ่อนเพลีย คลื่นไส้ หนาว ปวดหัว และอาเจียน ความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ได้รับ[9, 10, 11] สามารถจำแนกสายพันธุ์หรือซีโรไทป์ (serotyping) ตามชนิด O และ K antigen ได้ 13 O และ 71 K antigen[6]

การศึกษาด้านระบาดวิทยา ค้นหาแหล่งแพร่กระจาย การควบคุมเฝ้าระวัง และป้องกันการระบาดของโรคอาจมีข้อจำกัดบางประการ กล่าวคือ สามารถจำแนกความหลากหลายได้ไม่มากนัก หรืออีกนัยหนึ่งถึงแม้จะเป็นซีโรไทป์เดียวกันแต่ก็อาจจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน[12, 13] มีคณะวิจัยหลายคณะ[14, 15, 16] ทำการศึกษาปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง คือ ยีนที่เป็นปัจจัยการก่อโรค ได้แก่ ยีน *tdh* ที่ควบคุมการสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin (TDH) ที่มีผลทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ และยีน *trh* เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH) แต่ไม่ทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถนำมาร่วมอธิบายถึงแหล่งกำเนิดสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมหรือผู้ป่วยได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล มี flagella อยู่รอบตัว เพื่อใช้ประโยชน์ในการเคลื่อนที่ สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน พบในลำไส้ของมนุษย์ และสัตว์เลี้ยงชนิดต่าง ๆ[17, 18, 19] *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษขึ้นได้บ่อยครั้งโดยผู้ป่วยอาจมีอาการไข้ หนาวสั่น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสียแบบมีเลือดปน หรือไม่มีก็ได้ ผู้ป่วยอาจติดเชื้อในกระแสเลือดและเสียชีวิตได้

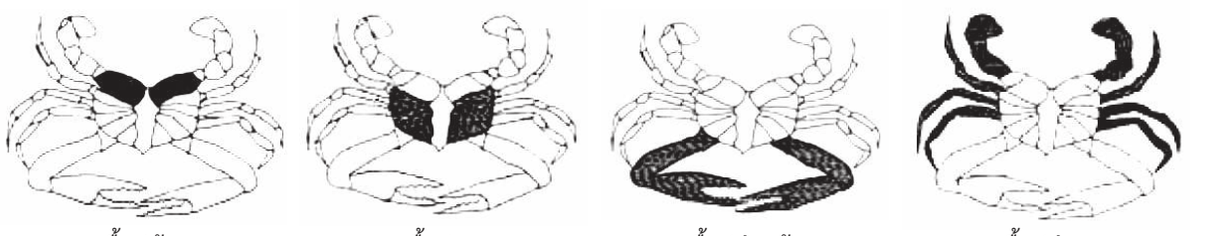
Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก รูปร่างเป็นทรงกลม (cocci) เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35–37 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปมักตามผิวหนัง หรือเยื่อเมือกของร่างกายคนและสัตว์ ในอากาศ ฝุ่นละออง สามารถผลิตสารพิษ (enterotoxin) ที่ทนความร้อนสูง การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อน *S. aureus* ในช่วง 100,000 เซลล์ต่อกรัม สามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษ เนื่องจากสามารถสร้างสารพิษถึงระดับก่อโรคได้[20]

การศึกษานี้จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อให้ทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ในเนื้อปูต้มแกะ และจำแนกสายพันธุ์หรือซีโรไทป์ ตลอดจนศึกษาปัจจัยก่อความรุนแรงโรค เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการอธิบาย และประเมินความปลอดภัยของอาหารทางจุลชีววิทยา กำหนดมาตรการเฝ้าระวังควบคุม และป้องกันการปนเปื้อน รวมทั้งเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันการระบาดของโรคอุจจาระร่วง ซึ่งยังคงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญของไทย

วัสดุและวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างเนื้อปูต้มแกะส่วนต่าง ๆ ที่นิยมบริโภค ได้แก่ เนื้อปูก้อน (lump meat) เนื้อปูขาว (special meat) เนื้อปูส่วนก้าม (claw meat) และเนื้อปูส่วนขา (leg meat) (ภาพที่ 1) ที่จำหน่ายในตลาดสดและตลาดนัด 10 แห่ง ในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 50 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2557– มิถุนายน 2558 (ภาพที่ 1)



เนื้อปูก้อน เนื้อปูขาว เนื้อปูส่วนก้าม เนื้อปูส่วนขา

ภาพที่ 1 เนื้อปูส่วนต่าง ๆ ที่นิยมบริโภค
ที่มา : มกษ. 7004–2548 ปูม้า

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. ***V. parahaemolyticus***

1.1 Phosphate buffered saline (PBS)
1.2 Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar (TCBS)
1.3 CHROMagar™ vibrio (CV)
1.4 Tryptic (trypticase) Soy Agar + 2% NaCl (TSA 2% NaCl)
1.5 Arginine glucose slants (AGS)
1.6 T_1N_0, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8, T_1N_{10}broths
1.7 Oxidase reagent
1.8 Rapid Diagnostic Kits API 20 E (R 21)

2. ***S. aureus***

2.1 Butterfield's phosphate-buffered dilution water

2.2 Trypticase soy broth (10% NaCl & 1% Sodium pyruvate)

2.3 Baird-parker medium (with Egg Yolk telluritesuspension)

2.4 Brain heart infunion (BHI) broth

2.5 Coagulase plasma (rabbit) with EDTA

3. ***Salmonella* spp.**

3.1 Bacto peptone water (BPW)

3.2 Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTTn)

3.3 Rappaport-Vassiliadis broth (RV)

3.4 Xylose lysine desoxycholateagar (XLD)

3.5 Hektoen enteric agar (HE)

3.6 Triple sugar iron agar (TSI)

3.7 Lysine iron agar (LIA)

3.8 Urea broth

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ, ตู้บ่มเชื้อ, เครื่องนับโคโลนี, กล้องจุลทรรศน์, เครื่องตีผสมอาหาร, เครื่องชั่ง, ตะเกียงแก๊ส, ขวดแก้ว, หลอดแก้ว, จานเพาะเชื้อ, ปิเปต, เข็มเขี่ยเชื้อ, แอลกอฮอล์ (70% v/v)

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR MJ Research รุ่น PTC-200, Microcentrifuge, Autopipette, Mixer, PCR tube

วิธีการ

การวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีมาตรฐาน BAM 2004[6]

ดำเนินการโดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม โดยใช้ phosphate buffered saline (PBS) เป็น enrichment medium และเลือกหลอดที่ขุ่นมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar และ Chrome Vibrio agar ซึ่งเป็น selective media จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ทดสอบ Oxidase ย้อมแกรม และทดสอบยืนยันเชื้อโดย Rapid Diagnostic Kits API 20E และการเจริญในน้ำเกลือ 0%, 3%, 6%, 8% และ 10% (ปริมาตร/น้ำหนัก) รายงานผลเป็น MPN/g

การวิเคราะห์ *S. aureus* โดยวิธีมาตรฐาน BAM 2001[21]

ดำเนินการโดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจางมา 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BP 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นเกลี่ยให้เชื้อกระจายโดยใช้แท่งแก้วทิ้งให้สารละลายของเชื้อซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่ 35 ± 1°C นาน 48 ± 2 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่มีลักษณะ กลม ผิวเรียบ โค้งนูน ขนาดโคโลนี 2-3 มิลลิเมตร สีเทาจนถึงดำมีขอบสีจาง ๆ ล้อมรอบด้วยบริเวณทึบตามด้วยขอบใสรอบโคโลนี ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* และนำเชื้อไปทดสอบ coagulase test และรายงานผลเป็น cfu/g

การวิเคราะห์ *Salmonella* spp. โดยวิธีมาตรฐาน ISO 6579: 2002/Cor.1: 2004[22]

ดำเนินการโดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ *Salmonella* spp. เติม bactopeptone water เป็น pre-enrichment medium และถ่ายเชื้อลงใน MkTTn และ RV เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วจึง streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น selective agar ได้แก่ HE agar และ XLD agar จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และจำแนกสายพันธุ์ หรือซีโรไทป์ *Salmonella* spp. โดยฝ่ายทดสอบยืนยันเชื้อซาลโมเนลลาและชิเกลลา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

จำแนกสายพันธุ์หรือซีโรไทป์ และศึกษาปัจจัยก่อความรุนแรงโรคของ *V. parahaemolyticus*

การจำแนกสายพันธุ์ หรือซีโรไทป์ *V. parahaemolyticus* ด้วย O และ K antiserakit (Denka Seiken, Tokyo) ด้วยเทคนิค slide agglutination โดยนำ *V. parahaemolyticus* เพาะบน Heart Infusion agar ที่มี 3% NaCl โดย streak เชื้อถี่ ๆ ให้เชื้อขึ้นหนาแน่น บ่มที่ 35-37˚C 18-24 ชั่วโมง ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ กวาดเชื้อ ½ ของจานเพาะลงในหลอดทดลองที่มี 3% NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เชื้อกระจายต้มในน้ำเดือด นาน 1 ชั่วโมง เพื่อทำลาย K antigen ปั่นให้เชื้อตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentifuge) ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทน้ำใสทิ้ง แล้วนำตะกอนมาทดสอบกับ O-antisera ส่วนทดสอบ K antisera ไม่ต้องต้มในน้ำเดือด

การวิเคราะห์ยีนเป้าหมายที่เป็นปัจจัยก่อความรุนแรงโรค ได้แก่ *tdh* และ *trh* gene ด้วย Duplex Polymerase Chain Reaction (ตารางที่ 1) ดำเนินการดังนี้

ตารางที่ 1 Primer ลำดับเบส และขนาด

primer	ลำดับเบส (5'——> 3')	ขนาด (bp)
tdh-4F	GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC	270
tdh-4R	TGG AAT AGA ACC TTC ATC TC ACC	270
trh-3F	TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT	500
trh-3R	CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCCG	500

1. เตรียม DNA template

บ่มจานเพาะเชื้อบน Luria-Bertani agar ที่อุณหภูมิ 37 ± 2 ˚C นาน 18-24 ชั่วโมง แตะเชื้อติดปลายลวดเพียงเล็กน้อย นำเชื้อมากระจายในน้ำ Milli Q ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดน้ำใสซึ่งมี DNA template ใส่ในหลอดแก้วใหม่ หากยังไม่นำ DNA template ไปใช้ในทันทีให้เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20˚C

2. เตรียม PCR mixture

PCR mixture ปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย 2 µl DNA template, 0.1 µM tdh primer, 0.15 µM trh primer, 0.25 mMdNTPs, 1X PCR buffer และ 1 unit i-StarTaq DNA polymerase

3. เพิ่มปริมาณ DNA โดยเข้าเครื่อง PCR machine โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

- pre-PCR ที่อุณหภูมิ 94˚C 3 นาที เพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 25 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย
- denaturation step ที่อุณหภูมิ 94˚C 45 วินาที
- annealing step ที่อุณหภูมิ 60˚C 45 วินาที

- chain elongation step ที่อุณหภูมิ 72 ˚C 1 นาที 30 วินาที เมื่อครบ 25 รอบ แล้วตามด้วย post-PCR ที่อุณหภูมิ 72˚C 3 นาที

4. แยกขนาด DNA ด้วย gel electrophoresis โดยแผ่นเจลมีความเข้มข้น 2% agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 หรือ 100 โวลต์ 50-60 นาที ย้อม gel ด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 µg/ml 10 นาที ล้างแผ่น gel ด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ถ่ายภาพ gel ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับมาตรฐานเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 2 (2553) ของอาหารพร้อมบริโภค[23] และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistic) ได้แก่ ร้อยละ (percentage) และวัดค่าการกระจายด้วยค่าเฉลี่ย (mean ± SD)

ผล

จากการเก็บตัวอย่างเนื้อปูต้มแกะส่วนต่างๆ ที่นิยมบริโภค ได้แก่ เนื้อปูก้อน เนื้อปูขาว เนื้อปูส่วนก้าม และเนื้อปูส่วนขา รวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์ พบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* 29 ตัวอย่าง ในปริมาณ ตั้งแต่ 1.18-6.04 log MPN/g หรือปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 3.72 ± 0.91 log MPN/g พบ *S. aureus* 27 ตัวอย่าง ในปริมาณ 1.30-3.04 log cfu/g หรือปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 230 ± 0.51 cfu/g ในขณะที่พบ *Salmonella* spp. 7 ตัวอย่าง (6 serovar) คิดเป็นร้อยละ 58, 54 และ 14 ตามลำดับ โดยจำนวนนี้มีตัวอย่างที่มี *S. aureus* ไม่เข้ามาตรฐานเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร และภาชนะสัมผัสอาหารตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 2 (2553) ของอาหารพร้อมบริโภคที่ระบุให้พบได้ไม่เกิน 100 cfu/g คิดเป็นร้อยละ 32 และต้องไม่พบทั้ง *V. parahaemolyticus* และ *Salmonella* spp. (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ในเนื้อปูต้มแกะ

รายการวิเคราะห์	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ ร้อยละ	ปริมาณ			ร้อยละที่เกินมาตรฐาน	หมายเหตุ
		ต่ำสุด-สูงสุด	เฉลี่ย ± SD	เกณฑ์มาตรฐาน		
V. parahaemolyticus	29(58)	15-1,100,000 MPN/g (1.18-6.04 log MPN/g)	3.72 ± 0.91 log MPN/g	ไม่พบ	58	
S. aureus	27(54)	20-11,000 cfu/g (1.30-4.04 log cfu/g)	230 ± 0.51	<100 cfu/g	32	
Salmonella spp.	7(14)			ไม่พบ	14	ซีโรวาร์ (จำนวน) Stanley (2) Corvallis (1) Bareilly(1) Panama (1) Weltevreden(1) Rissen (1)

นอกจากพบการปนเปื้อนแบคทีเรียแต่ละชนิดดังกล่าวแล้ว บางตัวอย่างสามารถพบการปนเปื้อนร่วมของแบคทีเรียชนิดอื่นด้วย โดยสามารถจำแนกชนิดของการปนเปื้อนดังนี้ พบเฉพาะ *V. parahaemolyticus* 11 ตัวอย่าง *S. aureus* 9 ตัวอย่าง และ *Salmonella* spp. 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 22, 18 และ 2 ตามลำดับ ขณะที่พบการปนเปื้อนร่วมของ *V. parahaemolyticus* และ *S. aureus* 13 ตัวอย่าง *V. parahaemolyticus* และ *Salmonella* spp. 1 ตัวอย่าง *S. aureus* และ *Salmonella* spp. 1 ตัวอย่าง และพบทั้ง *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* และ *Salmonella* spp. 4 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 26, 2, 2 และ 8 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จำแนกชนิดของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อปูต้มแกะ

จุลินทรีย์	*Vp*	*S. aureus*	*Salmonella* spp.	*Vp* + *S. aureus*	*Vp* + *Salmonella* spp.	*S. aureus*+ *Salmonella* spp.	*Vp* + *S. aureus* + *Salmonella* spp.
จำนวน (ร้อยละ)	11(22)	9(18)	1(2)	13(26)	1(2)	1(2)	4(8)
Vp	11+13+1+4 = 29 (58)						
S. aureus	9+13+1+4 = 27 (54)						
Salmonella spp.	1+1+1+4 =7 (14)						

การศึกษานี้นอกจากจะพบ *V. parahaemolyticus* แล้วยังพบ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคอีกหลายชนิด ได้แก่ *V. cholerae* non O1, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus* และ *V. fluvialis* คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 18, 16, 12, 10 และ 4 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณการแพร่กระจายของ *Vibrio* spp. ในเนื้อปูต้มแกะและลักษณะการก่อโรคทางคลินิก*

สปีชีส์	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)	ลำไส้อักเสบ	ติดเชื้อทางบาดแผล	ติดเชื้อในหู	ติดเชื้อในกระแสเลือด
V. parahaemolyticus	29 (58)	+++	+	+	+
V. cholerae non O1	9 (18)	+++	++	+	+
V. vulnificus	8 (16)	+	++	++	++
V. mimicus	6 (12)	++	–	+	–
V. alginolyticus	5 (10)	(+)	++	++	+
V. fluvialis	2 (4)	++	–	–	–

+++ = พบการรายงานบ่อยครั้ง, ++ = พบการรายงานน้อยครั้ง (6–100 รายงาน), + = พบการรายงานน้อยมาก (1–5 รายงาน), (+) = พบอาการทางคลินิกไม่ชัดเจน และ – ไม่พบการรายงาน

*ที่มา: http://Seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt20.htm

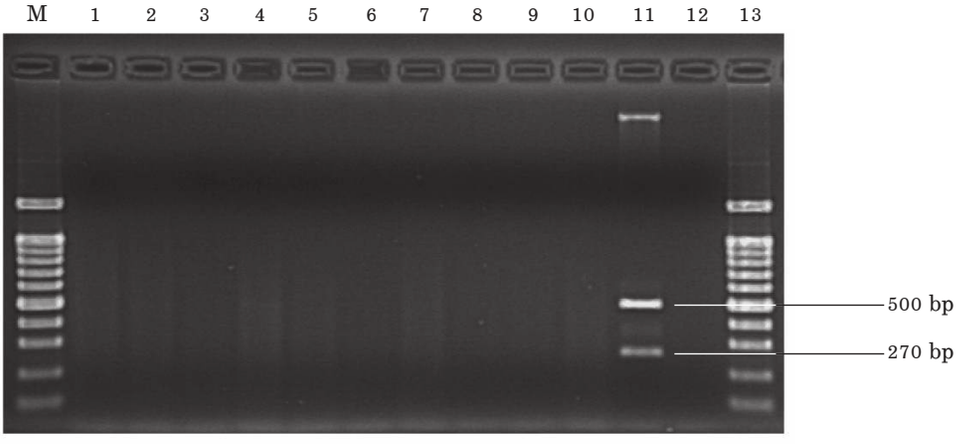
จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียหรือซีโรไทป์ และปัจจัยก่อความรุนแรงโรคของ *V. parahaemolyticus* ที่ได้รับการยืนยันทางชีวเคมีร่วมกับ API 20 E Denka Seiken Tokyo Kit ซึ่งปัจจุบันสามารถจำแนกได้ 71 ซีโรไทป์ พบว่า 12 ซีโรไทป์ ประกอบด้วย 9 O antigen: untypeable K antigen และ 3 O antigen: 3 typeable

K antigen โดยพบ O3:KUT มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 20.70 รองลงมาพบ O10:KUT, O2:KUT, O5:KUT, O1:KUT, O6:KUT, O8:KUT, O11:KUT, O4:KUT, O1:K1, O3:K57 และ O4:K8 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และจากการวิเคราะห์ยีนซึ่งเป็นปัจจัยก่อความรุนแรงโรคด้วย Duplex Polymerase Chain Reaction ไม่พบยีน *tdh* และ *trh* ในทุกซีโรไทป์ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 5 จำแนกสายพันธุ์หรือซีโรไทป์ และยีนปัจจัยก่อความรุนแรงโรคของ *V. parahaemolyticus*

จำนวนไอโซเลท *V. parahaemolyticus* (ร้อยละ)	ซีโรไทป์	ปัจจัยก่อความรุนแรงโรค	
		tdh	*trh*
6 (20.70)	O3:KUT	-	-
5 (17.24)	O10:KUT	-	-
3 (10.35)	O2:KUT	-	-
3 (10.35)	O5:KUT	-	-
2 (6.90)	O1:KUT	-	-
2 (6.90)	O6:KUT	-	-
2 (6.90)	O8:KUT	-	-
2 (6.90)	O11:KUT	-	-
1 (3.44)	O4:KUT	-	-
1 (3.44)	O1:K1	-	-
1 (3.44)	O3:K57	-	-
1 (3.44)	O4:K8	-	-
รวม 29 (100)			

หมายเหตุ: UT = Untypeable



ภาพที่ 2 ผลตรวจยีนปัจจัยก่อความรุนแรงโรค (*tdh*⁻and *trh*⁻) ของ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปูต้มแกะ Lane M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส; lane 1-10: *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่าง (*tdh*⁻ and *trh*⁻); lane 11: positive control; lane 12: negative control

วิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อปูต้มแกะ จากตลาดสดและตลาดนัดในกรุงเทพมหานคร 50 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค อาทิ *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* และ *salmonella* spp. สาเหตุน่าจะเกิดจากการปนเปื้อนข้ามจากวัตถุดิบ ผู้ปฏิบัติงาน อุปกรณ์ เครื่องมือเครื่องใช้ และอื่นๆ ในการทำเนื้อปูแกะ เนื่องจากเชื้อเหล่านี้ไม่ทนต่อความร้อน และไม่สร้างสปอร์ ดังนั้นการต้มสุกจึงสามารถทำให้เชื้อดังกล่าวตายได้ การตรวจพบจึงเกิดจากการปนเปื้อนภายหลังการต้มสุก และถึงแม้จะพบการปนเปื้อนในปริมาณไม่มากนักในช่วงระหว่าง 10^2–10^4 cfu/กรัม ซึ่งการเก็บที่อุณหภูมิห้องโดยไม่รับประทานทันที เชื้อก็จะเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว ทำให้มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคเพิ่มขึ้นและรุนแรงมากขึ้น

เมื่อนำ *V. parahaemolyticus* ที่พบทั้งหมด 29 ตัวอย่าง มาจำแนกสายพันธุ์หรือซีโรไทป์ เพื่อนำมาเป็นเครื่องมือในการศึกษาด้านระบาดวิทยา เพื่อค้นหาแหล่งแพร่กระจายของเชื้อ ซึ่งนำไปสู่การเฝ้าระวัง ควบคุม และป้องกันการระบาดของโรค พบทั้งหมด 12 ซีโรไทป์ โดยพบ O3:KUT มากที่สุดร้อยละ 20.70 และรองลงมา ได้แก่ O10:KUT, O2:KUT, O5:KUT, O1:KUT, O6:KUT, O8:KUT, O11:KUT, O4:KUT, O1:K1, O3:K57 และ O4:K8 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) จะเห็นว่าซีโรไทป์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็น KUT (untypeable) แสดงว่าสภาพแวดล้อมยังคงมีการเปลี่ยนแปลงสูง ทำให้แอนติเจนบริเวณแคปซูลมีการเปลี่ยนแปลง หรือปรับตัวเพื่อความอยู่รอดกับสภาพแวดล้อมนั้นๆ [24]

มีรายงานว่า *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O1:KUT เป็นสายพันธุ์ที่เคยระบาดร่วมกับ O3:K6 และ O4:K68 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคระบาดรุนแรงทั่วโลก (Pandemic) ในปี 1998[25, 26] เนื่องจากการจำแนกสายพันธุ์หรือซีโรไทป์มีข้อจำกัด เพราะครอบคลุมเพียง 71 ซีโรไทป์ กล่าวคือ ได้ความหลากหลาย และรายละเอียดทางระบาดวิทยาไม่มากนัก[24] ทำให้ต้องเพิ่มการศึกษายีนที่ควบคุมการก่อโรคด้วยเทคนิค duplex PCR ในการตรวจหายีน *tdh* ที่ควบคุมการสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin (TDH) ที่มีผลทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ และยีน *trh* ที่ควบคุมการสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH) แต่ไม่ทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ โดยยีนดังกล่าวเป็นปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ตรวจไม่พบยีนสร้างสารพิษทั้ง *tdh* และ *trh* (tdh^-, trh^-) ในทุกซีโรไทป์ ซึ่งเป็นไปได้ว่า ยีนทั้งสองชนิดมักตรวจพบได้ใน *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคในคนมากกว่า *V. parahaemolyticus* ที่จะแยกได้จากสิ่งแวดล้อมซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายฉบับ[10, 12, 27] ที่ได้ศึกษาสมบัติของ *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดพยาธิสภาพในลำไส้และพบว่า *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ มีเพียงร้อยละ 1 ที่ทำให้เกิดโรคในคน[28, 29, 30, 31]

อย่างไรก็ตาม แม้การศึกษานี้ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่มียีน *tdh* และ *trh* ที่สร้างสารพิษ ซึ่งเป็นปัจจัยก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค แต่ผู้บริโภคยังควรระมัดระวังในการบริโภค เนื่องจากการก่อโรคไม่ได้เกิดจากปัจจัยของ hemolysin ยีนเท่านั้น ยังมีปัจจัยอื่น ได้แก่ ยีน *toxR* ซึ่งจะสร้างโปรตีน *ToxR* ไปกระตุ้นการถอดรหัสของยีนก่อความรุนแรงโรค[29] ปัจจัยพยาธิสภาพ ซึ่งขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคล และปริมาณเชื้อที่ได้รับ เพราะถ้าบริโภคเนื้อปูที่ปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในปริมาณ 10^5– 10^7 เซลล์[11] ก็สามารถแสดงอาการอุจจาระร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ไม่ก่อโรคก็ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการลำไส้อักเสบได้[9]

การปนเปื้อนของ *S. aureus* 27 ตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่ระบุให้ว่าสามารถพบ *S. aureus* ได้ไม่เกิน 100 cfu/g ร้อยละ 32 โดยมีปริมาณเฉลี่ย 230 ± 0.51 cfu/g เนื่องจากตัวอย่างเนื้อปูต้องผ่านการแกะด้วยมือทำให้มีโอกาสปนเปื้อนสูง โดยเฉพาะถ้าผู้แกะไม่มีสุขอนามัยที่ดี ทั้งนี้จะส่งผลให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขได้ เนื่องจาก *S. aureus* สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Staphylococus food poisioning) ได้อย่างเฉียบพลันหลังรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษ (enterotoxin) โดยผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วงภายหลังได้รับสารพิษชนิดนี้เข้าสู่ร่างกาย 1–6 ชั่วโมง ที่สำคัญสารพิษนี้สามารถทนความร้อนสูง และจะมีปริมาณสูงพอในการก่อโรคเมื่อ *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ในอาหารอย่างน้อย 100,000 เซลล์ต่อกรัม

การปนเปื้อน *Salmonella* spp. ใน 7 ตัวอย่าง ซึ่งจำแนกได้ 6 ซีโรวาร์ ได้แก่ Stanley, Corvallis, Bareilly, Panama ,Weltevreden และ Rissen นั้น จากรายงานประจำปีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2557) พบว่า ซีโรวาร์ Stanley,Weltevreden และ Rissen มักพบเป็น 5 อันดับแรกของการปนเปื้อนในอาหาร น้ำ ดิน และสิ่งแวดล้อม และเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค *Salmonellosis* ซึ่งส่วนใหญ่จะทำให้เกิดความผิดปกติของลำไส้[17] *Salmonella* spp. มีความสำคัญ ที่ต้องควบคุมผ่านกิจกรรมการจัดการสุขาภิบาลอาหารที่ดี พบการปนเปื้อนได้บ่อยในอาหารที่ปรุงสุก ๆ ดิบ ๆ หรือทำไว้ล่วงหน้านาน ๆ แล้วไม่ได้เก็บแช่เย็น ในส่วนของผู้ประกอบการต้องใช้ภาชนะอุปกรณ์ที่สะอาด ลดการสัมผัสกับอาหารโดยตรง ควรสวมถุงมือ และต้องมีสุขภาพสมบูรณ์ ปราศจากโรคติดต่อรวมถึงมีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ดี

นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนร่วมกันไม่ว่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* ร่วมกับ *S. aureus* หรือ *Salmonella* spp. หรือแม้กระทั่งพบร่วมกันของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 3) ในบางตัวอย่าง ซึ่งทำให้เพิ่มโอกาสหรือมีความเสี่ยงต่อการเจ็บป่วยมากขึ้นในผู้บริโภค

การศึกษานี้นอกจากจะพบแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ เช่น *V. parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ในเนื้อปูต้มแกะแล้ว ยังพบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. อื่น ๆ ที่อาจก่อโรคทางเดินอาหารได้เช่นกัน (ตารางที่ 4) ตามทฤษฎี *V. parahaemolyticus* และ *Salmonella* spp. ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60 ˚C 15 นาที และ *S. aureus* ถูกทำลายได้ด้วยอุณหภูมิ 66 ˚C 12 นาที[20] แต่ยังพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียดังกล่าวในเนื้อปูแกะที่ต้มจนสุกก่อนนำมาจำหน่าย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเกิดการปนเปื้อนข้ามระหว่างอาหารทะเลดิบและสุกซึ่งมักวางจำหน่ายในร้านเดียวกัน อาจมีการใช้อุปกรณ์ร่วมกัน ตลอดจนปัญหาจากสุขลักษณะส่วนบุคคลที่หยิบจำหน่ายเนื้อปู ดังนั้น ผู้บริโภคที่มีพฤติกรรมการบริโภคอาหารไม่เหมาะสม เช่น รับประทานอาหารสุก ๆ ดิบ ๆ ไม่รับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ ๆ ต้องได้รับความรู้และเข้าใจให้ถูกต้อง เพื่อลดความเสี่ยงจากเชื้อโรคอาหารเป็นพิษเหล่านี้ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคอาหารโดยเฉพาะอาหารที่ปรุงจากร้านค้า อย่างไรก็ตามความปลอดภัยในการบริโภคอาหารจากร้านค้า ต้องอาศัยความร่วมมือจากหลายฝ่ายทั้งผู้ประกอบการและผู้ขนส่ง โดยต้องดูแลเอาใจใส่เรื่องความสะอาดของพาหนะที่ใช้เพื่อไม่ให้เป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรคก่อนมาถึงร้านจำหน่าย ส่วนผู้ประกอบการต้องเคร่งครัดเกี่ยวกับอนามัยส่วนบุคคลรวมถึงจัดการสถานที่จำหน่ายให้สะอาดถูกสุขลักษณะอยู่เสมอ สำหรับผู้บริโภคนั้นก่อนบริโภคควรอุ่นอาหารโดยให้ความร้อนอย่างเพียงพอและทั่วถึง เพื่อลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคอาหารเป็นพิษหรือเกิดความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคมากขึ้น

คณะผู้วิจัยเห็นว่ายังมีความจำเป็นที่จะต้องติดตามเฝ้าระวังจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในอาหารทะเลชนิดอื่น ๆ ให้หลากหลายยิ่งขึ้น (matrices integration) เพื่อเป็นข้อมูลในการประเมินความปลอดภัยของอาหารทางจุลชีววิทยา สามารถกำหนดมาตรการเฝ้าระวังควบคุมและป้องกันการปนเปื้อน เพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันการระบาดของโรคอุจจาระร่วง ซึ่งยังคงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญของไทย นอกจากนี้ควรตรวจหาสารปนเปื้อนชนิดอื่น ๆ ที่อาจเป็นปัญหาสาธารณสุขที่มาจากมลภาวะจากภาคอุตสาหกรรมของประเทศ อาทิ โลหะหนักชนิดต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล เพื่อเป็นข้อมูลในการประเมินความปลอดภัยของอาหารทะเลในประเทศต่อไป

สรุป

เนื้อปูต้มแกะเป็นอาหารที่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อโรคอาหารเป็นพิษหลากหลายชนิด จึงมักเป็นหนึ่งในสิบเมนูอาหารที่เป็นสาเหตุการระบาดของโรคทางเดินอาหาร ผู้บริโภคสามารถป้องกันและรักษาสุขภาพ โดยการเลือกซื้อเนื้อปูต้มแกะที่วางจำหน่ายในบรรจุภาชนะปิดสนิท และเก็บรักษาในอุณหภูมิแช่เย็นตลอดอายุผลิตภัณฑ์ และที่สำคัญในการประกอบอาหารให้นำเนื้อปูต้มแกะมาผ่านความร้อนให้ทั่วถึงก่อนบริโภค เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ อีกทั้งรับประทานอาหารที่ถูกสุขลักษณะด้วยการ “กินร้อนช้อนกลางล้างมือ” หรือกินอาหารที่สุกสะอาดขณะที่ยังร้อนยังเป็นค่านิยมของการกินเพื่อสุขภาพ ทำให้ปลอดจากโรคอาหารเป็นพิษได้เป็นอย่างดีในทุกยุคทุกสมัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ นางสาวจารุวรรณ ลิ้มสัจจะสกุล ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร สำหรับคำปรึกษาตลอดจนข้อแนะนำทุกประการ และขอขอบคุณ นางสาวศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และทีมงานฝ่ายทดสอบยืนยันเชื้อซาลโมเนลลาและชิเกลลา กลุ่มแบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทำให้การดำเนินการศึกษาสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. อาทิชา วงศ์คำมา. โรคอาหารเป็นพิษ. ใน : สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2555. กรุงเทพฯ : สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2555. หน้า 119-121.
2. อาทิชา วงศ์คำมา, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์. โรคอาหารเป็นพิษ. ใน : สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2556. กรุงเทพฯ : สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2556. หน้า 115-117.
3. อรทัย สุวรรณไชยรบ, สุทธนันธ์ สุทธชนะ, นริศ บุญธนภัทร, ปณิธี ธัมมวิจยะ, กนิน ธีระตันติกานนท์, กมลทิพย์ วิจิตรสุนทรกุล. สถานการณ์โรคและภัยที่น่าสนใจในรอบสัปดาห์ที่ 1 ปี พ.ศ. 2558. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2558; 46(1): 6-7.
4. Holt JG, Editor. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
5. Pinto AD, Ciccarese G, Fontanarosa M, Terio V, Tantillo G. Detection of *Vibrio alginolyticus and Vibrio parahaemolyticus* in shellfish samples using collagenase-targeted multiplex PCR. J Food Safety 2006; 26(2): 150-9.
6. Kaysner CA, Depaola A. Chapter 9: Vibrio. In: Bacteriological analytical manual online. Washington, DC: Food and Drug Administration; 2004.
7. Kong RY, Lee SK, Law TW, Law SH, Wu RS. Rapid detection of six types of bacterial pathogens marine waters by multiplex PCR. Water Res 2002; 36(11): 2802-12.
8. Farmer JJ. The family vibrionaceae. In: Balow A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, editors. The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 1992. p. 2938-2951.
9. Ottaviani D, Leoni F, Serra R, Serracca L, Decastelli L, Rocchegiani E, et al. Nontoxigenic *Vibrio parahaemolyticus* strains causing acute gastroenteritis. J Clin Microbiol 2012; 50(12): 4141-3.
10. Sakazaki R, Iwanami S, Fukumi H. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. Jpn J Med Sci Biol 1963; 16(4): 161-88.
11. Sanyal SC, Sen PC. Human volunteer study on the pathogenicity of Vibrio parahaemolyticus. In: Fujino T, Sakaguchi G, Sakazaki R, Takeda Y, editors. International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. Tokyo: Saikon Publishing; 1974. p. 227-30.
12. Kaufman GE, Myers ML, Pass CL, Bej AK, Kaysner CA. Molecular analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during US Pacific north-west outbreaks. Lett Appl Microbiol 2002; 34(3): 155-61.
13. Wong CH. Detecting and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus*. J Food Drug Analysis 2003; 11(2): 100-7.
14. อรษา สุตเธียรกุล, ศุภรวิทย์ พึ่งจิตต์ตน, คล้ายอัปสร พงศ์รพีพร, เนตรนภิส ธีระวัลย์ชัย. การตรวจเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และยีนฮีโมไลซินอย่างรวดเร็วในตัวอย่างกุ้งแช่แข็งโดยวิธี Nested PCR. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช); 2544.

15. Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. Rev Med Microbiol 1993; 4(2): 106-13.
16. Nhung PH, Ohkusu K, Miyasaka J, Sun XS, Ezaki T. Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to dnaJ gene. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59(3): 271-5.
17. Jay JM. Chapter 23: Foodborne gastroenteritis caused by *Salmonella* and *Shigella*. In: Modern food microbiology. 5th ed. New York: Chapman & Hall; 1996. p. 507-526.
18. Asiam M, Hogan J, Smith KL. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli, Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk. Food Microbiol 2003; 20(3): 345-50.
19. Schwartz KJ. Salmonellosis. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. Diseases of swine. 8th ed. Ames, IW: Iowa State University Press; 1999. p. 535-551.
20. ศิวาพร ศิวเวช. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 5. นครปฐม : ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2542.
21. Bacteriological Analytical Manual Online (BAM). Chapter 12: *Staphylococcus aureus*. Washington, DC: Food and Drug Administration; 2001.
22. ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2002.
23. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2553.
24. Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Rammamurthy T, et al. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidences by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. J Clin Microgiol 2000; 38(2): 578-85.
25. Okura M, Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Terajima J, Watanabe H, et al. Genotyping analysis of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. J Clin Microbiol 2003; 41(10): 4676-82.
26. Serichantalergs O, Bhuiyan NA, Nair GB, Chivaratanond O, Srijan A, Bodhidatta L, et al. The dominance of pandemic serovars of *Vibrio parahaemolyticus* in expatriates and sporadic cases of diarrhea in Thailand, and a new emergent serovar (O3:K46) with pandemic traits. J Med Microbiol 2007; 56(5): 608-13.
27. Osawa R, Okitsu T, Morozumi H, Yamai S. Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes. Appl Environ Microbiol 1996; 62(2): 725-7.
28. Cook DW, Oleary P, Hunsucker JC, Sloan EM, Bowers JC, Blodgett RJ, et al. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. retail shell oysters: a national survey June 1998 to July 1999. J Food Prot 2002; 65: 79-87.
29. Lin Z, Kumagai K, Baba K, Mekalanos JJ, Nishibuchi M. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. J Bacteriol 1993; 175(12): 3844-55.
30. Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, Akiyama S, Takizawa K, Yamai S. In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. J Bacteriol 1969; 100(2): 1147-9.
31. Vuddhakul V, Chowdhury A, Laohaprertthisan V, Pungrasamee P, Patararungrong N, Thianmontri P, et al. Isolation of pandemic O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. Appl Environ Microbiol 2000; 66(6): 2685-9.

Surveillance of *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in Boiled Crab Meat

Sasithorn Thitipetchrakul[*] Kanokpan Somyoonsup[**] and Sriwanna Hatayananont[***]

[*]*Bureau of Quality and Safety of Food,* [**]*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000, Thailand.*

ABSTRACT This survey research is to monitor the contamination of *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcusaureus* and *Salmonella* spp. in boiled crab meats sold in 10 areas of fresh and fair markets of Bangkok district. From the favorite parts for consumption such as lump meat, special meat, claws meat and legs meat, a total of 50 samples during November 2014 till June 2015 were collected for this study. It was found that 29 out of 50 samples were contaminated (58%) with the amount of 15-1,100,000 MPN/g (1.18-6.04 log MPN/g) or the average of 3.72 ± 0.91 log MPN/g of *V. parahaemolyticus* and 27 out of 50 *samples* (54%) were contaminated with the amount of 20-11,000 cfu/g (1.30-4.04 log cfu/g) or the average of 230 ± 0.51 cfu/g of *S. aureus*. Moreover, *Salmonella* spp. with 6 serovars was detected in 7 samples (14%). From these results, only the amount of *S. aureus* (32%) was over the specified criteria, stated Microbiological Qualification Standard of Foods and Container notified by Department of Medical Science No. 2 (2553) under the category of ready to eat food, which is less than 100 cfu/g and *V. parahaemolyticus as* well as *Salmonella* spp. shall be non-detectable. Various *Vibrio* spp. of *V. parahaemolyticus* (58%), *V. cholerae* non O1 (18%), *V. vulnificus* (16%),*V. mimicus* (12%), *V. alginolyticus* (10%) and *V. fluvialis* (4%) were found and identified. Concurrently, serotypes of *V. parahaemolyticus* were classified by using Denka Seikenkit, Tokyo. The most of O3: KUT serotype was found (20.70%),whereas the genes of *tdh* and *trh (tdh$^-$,trh$^-$)* were not detected in all serotypes.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonell*a spp., Boiled Crab Meat