



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภค
จากซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร โดยใช้เทคนิค *cdt* gene-based
multiplex PCR เพื่อตรวจหาพื้นที่สร้างสารพิษของเชื้อ”

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรดา สโมสรรสุข และคณะ

มกราคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคจาก
ซูเปอร์มาเก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร โดยใช้เทคนิค *cdt* gene-based multiplex PCR เพื่อ
ตรวจหาเชื้อที่สร้างสารพิษของเชื้อ”

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|------------------------------|---|
| 1. ผศ. ดร. วรดา สโมสรสุข | มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต |
| 2. ดร. อภิตา บุญศิริ | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน |
| 3. ผศ. ดร. เสกสรรค์ สโมสรสุข | มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

เชื้อ *Campylobacter* เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงทั้งในมนุษย์ และ สัตว์ ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานคนไข้ที่ได้รับเชื้อ *Campylobacter* จำนวน 2.4-2.5 ล้านคน/ปี (Bhaduri and Cottrell, 2004) สำหรับประเทศทางแถบยุโรปพบคนไข้ติดเชื้อ *Campylobacter* จำนวน 47.6 ราย/ประชากร 100,000 คน สำหรับประเทศไทยมีรายงานในปี 1998-2000 ว่า เชื้อ *Campylobacter* ก่อให้เกิดอุจจาระร่วงถึง 28% ขณะที่เชื้อ *Salmonella*, *Shigella* และ ETEC ก่อให้เกิด อุจจาระร่วง 18%, 9% และ 6% ตามลำดับ (Bodhidatta *et al.*, 2002) ผู้ป่วยติดเชื้อ *Campylobacter* ใน ประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเด็ก อายุต่ำกว่า 12 ปี และมักพบเป็นเชื้อที่ติดต่อสารต้านจุลชีพที่ใช้ใน การรักษาผู้ป่วยอุจจาระร่วง เช่น erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline เป็นต้น (Bodhidatta *et al.*, 2002, Padungtod *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานในต่างประเทศพบว่าเชื้อ *Campylobacter* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค Guillain-Barre Syndrome (GBS) ซึ่งพบว่า 25-45% ของผู้ป่วยโรค GBS เกิดจากการติดเชื้อ *Campylobacter* (Nachamkin *et al.*, 1999 ; Mishu *et al.*, 1997 ; Hughes and Rees, 1997) และพบว่าผู้ป่วยกลุ่มอาการดังกล่าวมีอัตราการเสียชีวิตถึง 2 - 3 % (Briscoe *et al.*, 1987) เชื้อ ดังกล่าวยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการของโรค reactive arthritis, urticaria, erythema nodosum ด้วย (Moore *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า *Campylobacter* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมีความสำคัญเป็นอย่าง มากทางด้านสาธารณสุข

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *Campylobacter* เกิดขึ้นจากการบริโภคและ/หรือการ จัดการอาหารที่ไม่ผ่านการทำให้สุก เช่น สัตว์ปีก เนื้อสัตว์อื่น ๆ นมดิบ และน้ำดื่ม การปนเปื้อนข้ามของ อาหารพร้อมบริโภค ระหว่างการเตรียมอาหารรวมทั้งการสัมผัสเนื้อสัตว์โดยตรง (Anonymous, 1995 ; Tompkin, 1994 ; Adak *et al.*, 1995 ; Fitch *et al.*, 2005) สำหรับการปนเปื้อนในพืชมีรายงานไม่มากนัก ในอดีต แต่ในปี 2007 พบการปนเปื้อนในสลัดผักและผลไม้สูงถึง 40.9% ในประเทศปากีสถาน โดยพบ เชื้อส่วนใหญ่ 2 ชนิดคือ *C. jejuni* 70.6% และ *C. coli* 29.4% (Hussain *et al.*, 2007) ในประเทศมาเลเซีย ซึ่งเป็นประเทศเพื่อนบ้านติดชายแดนตอนใต้ของประเทศไทย (Chai *et al.*, 2007) ตรวจพบ *Campylobacter* ในสลัดผักจำนวน 309 ตัวอย่าง ซึ่งสุ่มมาจากตลาดสดและในซูเปอร์มาร์เก็ต 2 แห่ง ใน Selangor พบว่า สลัดผักจากซูเปอร์มาร์เก็ตแห่งที่ 1 มี *Campylobacter* spp. ปนเปื้อน 51.9% *C. jejuni* 40.7% *C. coli* 35.2% และ *C. fetus* 1% สำหรับซูเปอร์มาร์เก็ตแห่งที่ 2 มี *Campylobacter* spp.

ปนเปื้อน 67.7% *C. jejuni* 67.7% และ *C. coli* 65.7% และตลาดสดพบการปนเปื้อนของ *Campylobacter* spp. 29.4% *C. jejuni* 25.5% และ *C. coli* 22.6% จำนวนสูงสุดของ *Campylobacter* ที่ตรวจสอบพบในผักดิบ ณ ตลาดสดมีมากกว่า 460 MPN/g และจากซูปเปอร์มาร์เก็ตมากกว่า 2,400 MPN/g ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่เชื่อดังกล่าวจะมีการปนเปื้อนในผักและผลไม้สดแต่งพร้อมบริโภคของไทย

ปัจจุบันการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหารพร้อมบริโภคมีการนำเทคนิค polymerase chain reaction มาใช้มากขึ้น เนื่องจากสามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็วภายใน 1-2 วัน ขณะที่วิธีการเพาะเชื้อในงานเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลา 4-6 วันจึงจะทราบผล อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวเป็นการตรวจหาเชื้อสาเหตุ แต่ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์นั้นคือ สารพิษ (toxin) นั้นหมายความว่าแม้เชื้อจะถูกทำลายไปแล้ว ตรวจสอบไม่พบ แต่ยังคงมีสารพิษซึ่งก่ออันตรายให้กับมนุษย์ตกค้างอยู่ ดังนั้นการตรวจสอบหาชิ้นที่สร้างสารพิษจึงน่าจะเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ และศักยภาพมากกว่า และน่าจะเป็นวิธีการที่สามารถนำไปใช้ได้อย่างกว้างขวางในอนาคตเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* ในผลิตภัณฑ์เกษตร ทั้งนี้ยังไม่มีมีการนำวิธีการดังกล่าวมาใช้ในผักและผลไม้ แต่มีรายงานว่าการใช้เทคนิค *cdt* gene-based multiplex PCR สามารถวิเคราะห์หาชิ้นที่ก่อให้เกิดสารพิษจาก stool ของคนไข้และจากเนื้อไก่จากเชื้อ *C. jejuni*, *C. fetus* และ *C. coli* (Asakura *et al.*, 2008; Asakura *et al.*, 2007; Samosornsuk *et al.*, 2007) สำหรับแนวทางที่จะป้องกันและแก้ปัญหาการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในผักและผลไม้สดแต่งพร้อมบริโภค สามารถทำได้โดยการปรับปรุงกระบวนการผลิตโดยใช้มีดคมที่สะอาดตัดแต่งผักและผลไม้ ร่วมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ เช่น สารละลายคลอรีน และ อุณหภูมิต่ำ

สำหรับประเทศไทยในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในผักและผลไม้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทำการสุ่มซื้อผักสดตัดแต่งพร้อมบริโภคจากตลาดนัด และซูปเปอร์มาร์เก็ตในเขตจังหวัดปทุมธานี มาตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* spp. และได้พบการปนเปื้อนของเชื่อดังกล่าวในผักสดตัดแต่งพร้อมบริโภคอุบัตินี้ขึ้นเช่นกัน

ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาเทคนิค *16S rRNA* gene-based PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* พร้อมทั้งตรวจแยกชนิดของเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. fetus* ด้วยวิธี *cdt* gene-based multiplex PCR ในผักสดตัดแต่ง ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ 10 โคโลนี/มล และเมื่อนำเทคนิคนี้มาทำการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในผักสดตัดแต่งพร้อมบริโภคทั้งหมด 210 ตัวอย่าง จากตลาดสดและ

ซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ซึ่งประกอบด้วย กะหล่ำปลี 58 ตัวอย่าง แครอท 49 ตัวอย่าง แตงกวา 57 ตัวอย่างและผักกาดหอม 46 ตัวอย่าง ขณะเดียวกันได้ใช้วิธีตรวจเพาะเชื้อและนับปริมาณของเชื้อ *Campylobacter* (MPN method) ซึ่งผลการใช้เทคนิค PCR มาช่วยในการตรวจทำให้ทราบผลเร็วขึ้น 2-4 วัน และสามารถตรวจพบเชื้อนี้ได้ในขณะที่ ไม่พบจากการเพาะเชื้อ นั้นแสดงให้เห็นว่า การตรวจด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อในปริมาณน้อย ๆ ได้ ซึ่งจากผลการตรวจตัวอย่าง 210 ตัวอย่าง พบ การปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 2.4% โดยพบกะหล่ำปลีปนเปื้อนเชื้อ *C. jejuni* และ *C. coli* 1 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างนี้ ได้รับการรับรองคุณภาพแล้วจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (GAP) แครอท 2 ตัวอย่าง ปนเปื้อนเชื้อ *C. coli* และ *Arcobacter butzleri* อย่างละ 1 ตัวอย่าง และผักกาดหอม 2 ตัวอย่าง ปนเปื้อนเชื้อ *Arcobacter butzleri* ทั้ง 2 ตัวอย่าง เมื่อทำการทดสอบผักทั้ง 3 ชนิดโดยผ่านขั้นตอนการจัดการของงานวิจัยพืชผลหลังเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งใช้วิธี peroxyacetic acid treatment พบว่า สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* และ *Salmonella* ได้ จากผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่า ในผักทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ กะหล่ำปลี แครอท แตงกวา และผักกาดหอม ซึ่งคนไทยนิยมบริโภคดิบนั้น ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* ได้ แม้จะพบในปริมาณน้อย แต่ตัวอย่างที่ผ่านการรับรองคุณภาพการผลิตจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (GAP) ยังสามารถพบการปนเปื้อนเชื้อนี้ได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิค *cdt* gene-based multiplex PCR สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาชนิดที่สร้างสารพิษของเชื้อ *Campylobacter* และการใช้วิธี peroxyacetic acid treatment เพื่อทำความสะอาดผักก่อน package สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* และ *Salmonella* ได้

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ต ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลโดยใช้เทคนิค *cdt* gene-based multiplex PCR เพื่อตรวจหาเชื้อที่สร้างสารพิษของเชื้อ

วรดา สโมสรสุข¹, เสกสรรค์ สโมสรสุข¹, อภิตา บุญศิริ²

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จ. ปทุมธานี 12120

²ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

บทคัดย่อ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในผักสด 4 ชนิด ได้แก่ กะหล่ำปลี แครอท ผักกาดหอม และแตงกวา ซึ่งเก็บจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ระหว่างเดือนมีนาคมและสิงหาคม 2552 โดยทำการตรวจนับปริมาณของเชื้อ *Campylobacter* (MPN) และตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ด้วยวิธี *16S rRNA* และ วิธี *cdt* gene-based multiplex PCR ผลการตรวจตัวอย่างผัก 210 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* 2 ตัวอย่าง (0.95%) ปริมาณการปนเปื้อนเชื้อ <3 MPN/g โดยพบในกะหล่ำปลีที่ได้รับการรับรองคุณภาพผลิต (GAP) ปนเปื้อนเชื้อ *C. jejuni* และ *C. coli* 1 ตัวอย่าง แครอท 1 ตัวอย่าง ปนเปื้อนเชื้อ *C. coli* นอกจากนี้ยังตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Arcobacter butzleri* 3 อย่าง (1.43%) โดยพบในแครอท 1 ตัวอย่าง และผักกาดหอม 2 ตัวอย่าง เมื่อใช้วิธี peroxyacetic acid treatment ในการล้างผักก่อนทำการ package พบว่า สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* ได้ จากผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่า การปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* ในผักสด พบได้ในปริมาณน้อย อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างที่ผ่านการรับรองคุณภาพการผลิต (GAP) ยังสามารถพบการปนเปื้อนเชื้อนี้ได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิค *cdt* gene-based multiplex PCR สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อที่สร้างสารพิษของเชื้อ *Campylobacter* และการใช้วิธี peroxyacetic acid treatment เพื่อทำความสะอาดผักก่อน package สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* ได้

Utilization of *cdt* gene-based multiplex PCR technique to investigate toxin gene of *Campylobacter* spp. in ready-to-eat salad vegetables from open markets and supermarkets in Bangkok and nearby area

Worada Samosornsuk¹, Seksun Samosornsuk¹, Apita Bunsiri²

¹Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand

²Postharvest Technology Center, RDI-KPS, Kasetsart University Kamphaensaen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate *Campylobacter* contamination by conventional culture method and PCR in 210 samples of four types of raw vegetables including cabbage, carrot, lettuce and cucumber. These samples were collected from one wet market and 4 supermarkets in Bangkok and 1 open market and 2 supermarkets nearby Bangkok, Thailand during March to August 2009. The prevalences of *Campylobacter* were found in 2 samples (0.95%) included 1 cabbage from a supermarket in local area and 1 carrot from a wet market in Bangkok. However, in this study *Arcobacter butzleri* which is similar to *Campylobacter* were detected in other 3 samples included 1 carrot and 2 lettuces. The wet market exhibited higher contamination of these bacteria than the supermarkets. The presence of this organism was difficult to isolate by conventional method but it could be identified using PCR assay. Phenotypic differences in population recovered before and after chlorine and peroxyacetic acid treated lettuce cabbage and carrot were observed. This study revealed that raw or minimally processed vegetables can be contaminated with *Campylobacter*, leading to direct infection of consumers or cross contamination of other foodstuffs. These contaminated vegetables can represent a severe health risk for the Thai consumer. The efficacy of chlorine and peroxyacetic treatment can reduce foodborne pathogen in salad vegetables.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. สนิท มกรแก้วเกยูร ที่ได้สละเวลาอ่านและแก้ไข manuscript ก่อนส่งตีพิมพ์ในวารสาร ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ จากศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้ความสะดวกในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จไปด้วยดี ขอขอบคุณผู้ประสานงานโครงการวิจัยทุกท่านที่ช่วยประสานโครงการจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

<i>aggR</i>	aggregative adherence fimbriae I e
<i>bfpA</i>	bundle-forming pilus A
BEBB	bolton enrichment broth base
BPW	buffer peptone water
<i>cdtB</i>	cytolethal distending toxin B
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attachment and effacing (intimin)
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EHEC	enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxigenic <i>E. coli</i>
<i>invA</i>	invasive gene A
LT	heat-labile toxin
MAC	MacConkey agar
mCCDA	modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar
MIL	motility indole lysine
MPN	most probable number
MSRV	modified semisolid Rappaport-Vassiliadis
PCR	polymerase chain reaction
PSS	peptone saline solution
RV	Rappaport-Vassiliadis
ST	heat-stable toxin
S.S. agar	Salmonella Shigella agar
<i>stn</i>	Salmonella enterotoxin gene
<i>stx</i>	shiga toxin gene

TT broth	tetrathionate broth
TSI	triple sugar iron agar
VRBA	violet red bile agar
VT	verotoxin
XLD	xylose lysine deoxycholate

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	จ
บทที่ 1	1
- บทนำ	1
- วัตถุประสงค์	4
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	10
3.1 ตัวอย่างผักจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ต	10
3.2 การพัฒนาเทคนิคซึ่งสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Campylobacter</i> ในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภค โดยทำการศึกษาการเจริญของเชื้อ <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , และ <i>C. fetus</i> ในการบ่มที่ 0, 6, 12, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง และการตรวจสอบยีนที่สร้างสารพิษที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงกับผู้ป่วยโดยตรง	11
3.3 การเพาะเชื้อและตรวจนับปริมาณเชื้อ <i>Campylobacter</i>	12
3.4 การแยกเชื้อ <i>Campylobacter</i> ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล	15
3.5 การพัฒนากระบวนการผลิตผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภค เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Campylobacter</i>	17

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการวิจารณ์ผลการวิจัย	18
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	25
บทที่ 6 บรรณานุกรม	26
ภาคผนวก	31
- บทความสำหรับการเผยแพร่	32
- กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์	35
- ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการ มา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	37

สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1. ชนิดของผักที่เก็บจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครและ ปริมณฑล	11
Table 2. For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram.	14
Table 3. PCR primers and conditions used in this study.	16
Table 4. Incubation time required to detect growth of <i>Campylobacter</i> and positive by PCR from bolton broth at 37 °C.	21
Table 5. Most probable numbers (MPN/g), number and percent of raw vegetables samples obtained from 2 retail outlets that were positive for <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i> and <i>Arcobacter butzleri</i>	22
Table 6. Effect of peroxyacetic acid treatment on <i>Campylobacter</i> contamination in raw vegetables.	24

สารบัญภาพ

	หน้า
Fig. 1. Wet market.	10
Fig. 2. Supermarket.	10
Fig. 3. ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ <i>Campylobacter</i> ในผัก	13
Fig. 4. Representative amplification of the <i>16S rRNA</i> for the identification of <i>Campylobacter</i> spp.	15
Fig. 5. Representative amplification of the <i>cdtB</i> for the identification of <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. fetus</i> .	17

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ (food-borne disease) ซึ่งเป็นโรคที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา หากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม หรือ ได้รับการรักษาที่ช้าเกินไป อาจทำให้ผู้ป่วยพิการหรือเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ ยังก่อให้เกิดความสูญเสียต่อเศรษฐกิจทั้งต่อผู้ป่วยและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ ด้วย เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญและพบได้บ่อยได้แก่ เชื้อ *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Vibrio* และ *Campylobacter*

เชื้อ *Campylobacter* เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงทั้งในมนุษย์ และ สัตว์ จากการรายงานของโครงการเฝ้าระวังโรค campylobacteriosis ในประเทศที่พัฒนาแล้ว พบอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อ *Campylobacter* ประมาณ 5 – 20 % (Tauxe *et al.*, 1992) ซึ่งเชื่อดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในลำดับต้น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงชนิดอื่นๆ (Hughes and Rees, 1997; Varavithya *et al.*, 1990) สามารถก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ทั้งแบบ sporadic case และแบบ outbreaks (Alterkruse *et al.*, 1999; de Wit *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2001; Oberhelman and Taylor, 2000; Effler *et al.*, 2001) มีรายงานในประเทศที่พัฒนาแล้วเช่น สหรัฐอเมริกา มีคนไข้ป่วยจากการติดเชื้อ *Campylobacter* มีถึง 2.4-2.5 ล้านคนต่อปี (Bhaduri and Cottrell, 2004; Zhao *et al.*, 2001) ในประเทศอังกฤษและเวลส์พบคนไข้ติดเชื้อ 58,059 ราย (CDSC, 1998) และเร็ว ๆ นี้เองในปี 2547 มีการยืนยันอัตราการติดเชื้อ *Campylobacter* จากสมาชิกในกลุ่ม EU 25 ประเทศ คิดเป็น 47.6 คนต่อ 100,000 คน (EFSA, 2006) จากการประมาณการจำนวนผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงในประเทศที่กำลังพัฒนา พบว่าในแต่ละปีมีผู้ป่วยเด็กที่อายุน้อยกว่า 5 ปี ติดเชื่อดังกล่าวถึง 40,000-60,000 คน จาก 100,000 คน (Oberhelman and Taylor, 2000; Rao *et al.*, 2001) และพบว่าเชื้อ *Campylobacter jejuni* และ *C. coli* เป็นสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุสำคัญโดยเฉพาะในเด็กเล็ก ผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้จะมีอาการปวดท้อง มีไข้ ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำเหลว หรือมีมูกเลือดปน บางครั้งพบว่ามีการอักเสบของลำไส้ใหญ่ร่วมด้วย (Alterkruse *et al.*, 1999; Reina *et al.*, 1995) สำหรับประเทศกำลังพัฒนา เช่น ในประเทศไทย มีรายงานในปี 1989 และ 1994 ผู้ป่วยอุจจาระร่วงที่เกิดจากการติดเชื้อ *Campylobacter* ประมาณ 10-15% ซึ่งใกล้เคียงกับการติดเชื้อ ETEC, *Shigella* และ rotavirus (Echeverria 1989,

Echeverria 1994) และมีรายงานในปี 1998-2000 ว่า เชื้อ *Campylobacter* ก่อให้เกิดอุจจาระร่วงถึง 28% ขณะที่เชื้อ *Salmonella*, *Shigella* และ ETEC ก่อให้เกิดอุจจาระร่วง 18%, 9% และ 6% ตามลำดับ (Bodhidatta *et al.* 2002) ผู้ป่วยติดเชื้อ *Campylobacter* ในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 12 ปี และมักพบเป็นเชื้อที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยอุจจาระร่วง เช่น erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline เป็นต้น (Bodhidatta *et al.* 2002, Padungtod *et al.* 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานในต่างประเทศพบว่าเชื้อ *Campylobacter* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค Guillain Barre Syndrome (GBS) ซึ่งพบว่า 25-45% ของผู้ป่วยโรค GBS เกิดจากการติดเชื้อ *Campylobacter* (Nachamkin *et al.*, 1999; Nachamkin *et al.*, 1998; Mishu, 1997; Hughes and Rees, 1997) และพบว่าผู้ป่วยกลุ่มอาการดังกล่าวมีอัตราการเสียชีวิตถึง 2 - 3 % (Briscoe *et al.*, 1987) เชื้อดังกล่าวยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการของโรค reactive arthritis, urticaria, erythema nodosum ด้วย (Moore *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า เชื้อ *Campylobacter* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมีความสำคัญเป็นอย่างมากทางด้านสาธารณสุข

นอกจากรายงานการพบเชื้อ *Campylobacter* ในมนุษย์และสัตว์ แล้ว ยังมีรายงานการพบเชื้อนี้ในผักและผลไม้ซึ่งเป็นอาหารของมนุษย์ เมื่อผู้บริโภค บริโภคผัก หรือ ผลไม้ที่ปนเปื้อนเชื้อนี้ จะทำให้เกิดการติดเชื้อและเกิดอาการอุจจาระร่วง และสามารถนำไปสู่โรคต่างๆที่เกี่ยวข้องต่อไป ปัจจุบันผู้บริโภคนิยมซื้อผัก หรือผลไม้พร้อมรับประทาน ที่ผ่านการตัดแต่งและบรรจุในภาชนะสำเร็จรูป กระบวนการผลิตผักหรือผลไม้ดังกล่าว จึงเป็นส่วนที่สำคัญอย่างยิ่งในการผลิตผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ที่มีคุณภาพ มีความสะอาด และปลอดภัย ซึ่งปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *Campylobacter* เกิดขึ้นจากการบริโภคและ/หรือการจัดการอาหารที่ไม่ผ่านการทำให้สุก เช่น สัตว์ปีก เนื้อสัตว์อื่น ๆ นมดิบ และน้ำดื่ม การปนเปื้อนข้ามของอาหารพร้อมบริโภคระหว่างการเตรียมอาหารรวมทั้งการสัมผัสเนื้อสัตว์โดยตรง (Anonymous, 1995 ; Tompkin, 1994 ; Adak *et al.*, 1995) สำหรับการปนเปื้อนในพืชมีรายงานไม่มากนักในอดีต แต่ในปี 2007 พบการปนเปื้อนในสลัดผักและผลไม้สูงถึง 40.9% ในประเทศปากีสถาน โดยพบเชื้อส่วนใหญ่ 2 ชนิดคือ *C. jejuni* 70.6% และ *C. coli* 29.4% (Hussain *et al.*, 2007) ในประเทศมาเลเซียซึ่งเป็นประเทศเพื่อนบ้านติดชายแดนตอนใต้ของประเทศไทย (Chai *et al.*, 2007) ตรวจพบ *Campylobacter* ในสลัดผักจำนวน 309 ตัวอย่าง ซึ่งสุ่มมาจากตลาดสดและในซูเปอร์มาร์เก็ต 2 แห่ง ใน Selangor พบว่า สลัดผักจากซูเปอร์มาร์เก็ตแห่งที่ 1 มี *Campylobacter* spp. ปนเปื้อน 51.9% *C. jejuni* 40.7% *C. coli* 35.2% และ *C. fetus* 1% สำหรับซูเปอร์มาร์เก็ตแห่งที่ 2 มี

Campylobacter spp. ปนเปื้อน 67.7% *C. jejuni* 67.7% และ *C. coli* 65.7% และตลาดสดพบการปนเปื้อนของ *Campylobacter* spp. 29.4% *C. jejuni* 25.5% และ *C. coli* 22.6% จำนวนสูงสุดของ *Campylobacter* ที่ตรวจสอบพบในผักดิบ ณ ตลาดสดมีมากกว่า 460 MPN/g และจากซูปเปอร์มาร์เก็ตมากกว่า 2,400 MPN/g นอกจากนี้ในประเทศปากีสถานยังพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* ในสลัดผักและผลไม้สูงถึง 40.9% (Hussain *et al.*, 2007) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่เชื่อดังกล่าวจะมีการปนเปื้อนในผักและผลไม้สดแต่งพร้อมบริโภคของไทย

ปัจจุบันการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหารพร้อมบริโภคมีการนำเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) มาใช้มากขึ้น เช่น การใช้เทคนิค *ceuE*-based multiplex PCR เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อ *C. jejuni* และ *C. coli* ใน stool ของคนไข้ในประเทศไทย (Houng *et al.*, 2001) การใช้เทคนิค PCR ตรวจหา *C. jejuni* *C. lari* และ *C. coli* ในเนื้อหมูและเนื้อไก่ (Perelle *et al.*, 2004) และสลัดผักในมาเลเซีย (Chai *et al.*, 2007) เนื่องจากสามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็วภายใน 1-2 วัน ขณะที่วิธีการเพาะเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลานาน 4-6 วันจึงจะทราบผล อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวเป็นการตรวจหาเชื้อสาเหตุ แต่ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์นั้นคือ สารพิษ (toxin) นั้นหมายความว่าแม้เชื้อจะถูกทำลายไปแล้ว ตรวจสอบไม่พบ แต่ยังคงมีสารพิษซึ่งก่ออันตรายให้กับมนุษย์ตกค้างอยู่ ดังนั้นการตรวจสอบหาชิ้นที่สร้างสารพิษจึงน่าจะเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ และศักยภาพมากกว่า และน่าจะเป็นวิธีการที่สามารถนำไปใช้ได้อย่างกว้างขวางในอนาคตเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* ในผลิตผลเกษตร ทั้งนี้ยังไม่มีมีการนำวิธีการดังกล่าวมาใช้ในผักและผลไม้ แต่มีรายงานว่าการใช้เทคนิค *cdt* gene-based multiplex PCR สามารถวิเคราะห์หาชิ้นที่ก่อให้เกิดสารพิษจาก stool ของคนไข้และจากเนื้อไก่จากเชื้อ *C. jejuni*, *C. fetus* และ *C. coli* (Asakura *et al.*, 2008; Asakura *et al.*, 2007; Samosornsuk *et al.*, 2007) สำหรับแนวทางที่จะป้องกันและแก้ปัญหการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในผักและผลไม้สดแต่งพร้อมบริโภค สามารถทำได้โดยการปรับปรุงกระบวนการผลิตโดยการใช้มีดคมที่สะอาดตัดแต่งผักและผลไม้ ร่วมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ เช่น สารละลายคลอรีน การบรรจุในสภาพบรรยากาศตัดแปลง และอุณหภูมิต่ำ

ดังนั้น งานวิจัยนี้ ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคที่เก็บตัวอย่างได้มาจากซูปเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล โดยวิธีการเพาะแยกเชื้อ และแยกชนิดเชื้อ *Campylobacter* ด้วยเทคนิค *cdt* gene-based multiplex PCR ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อชิ้นที่สร้างสารพิษของเชื้อ *Campylobacter* ชนิดต่าง ๆ และยังสามารถบอกทั้งชนิดและสายพันธุ์

ของเชื้อ *Campylobacter* นอกจากนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบผลการตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อในตัวอย่างผักก่อนและหลังนำมาผ่านขั้นตอนการจัดการของศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยและพัฒนากำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งพบว่าวิธีการจัดการของงานวิจัยพืชผลหลังเก็บเกี่ยวนั้นสามารถลดการปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* ลงได้ คณะผู้วิจัยฯ คาดว่ากระบวนการผลิตนี้ก็จะสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย ซึ่งจะทำให้สามารถนำกระบวนการผลิตวิธีนี้ไปใช้ในการผลิตผักและผลไม้ตัดแต่งพร้อมบริโภคจริง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค รวมทั้งผู้ผลิตผักและผลไม้พร้อมบริโภคอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ที่ปนเปื้อนในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร
2. เพื่อพัฒนาเทคนิคซึ่งสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* ในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคโดยการตรวจสอบยีนที่สร้างสารพิษที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงกับผู้ป่วยโดยตรง
3. เพื่อจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ *Campylobacter* ด้วยเทคนิค *cdt* gene-based multiplex PCR ที่ปนเปื้อนในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร
4. เพื่อให้ทราบกระบวนการที่เหมาะสมในการจัดการผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter*

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ (food-borne disease) ซึ่งเป็นโรคที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา หากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม หรือ ได้รับการรักษาที่ช้าเกินไป อาจทำให้ผู้ป่วยพิการหรือเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความสูญเสียต่อเศรษฐกิจทั้งต่อผู้ป่วยและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศด้วยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญและพบได้บ่อยในประเทศไทย ได้แก่ เชื้อ *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, และ *Vibrio* สูงขึ้น จากรายงานของกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข พบว่า ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา โรคทางเดินอาหาร โดยเฉพาะ โรคอุจจาระร่วง (Acute diarrhoea) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมาตลอด ซึ่งจากข้อมูลสรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขในปี พ.ศ.2549 มีอัตราผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงสูงถึง 1,988.11 ต่อประชากรแสนคน และมีอัตราการเสียชีวิตถึง 0.14 ต่อประชากรแสนคน เชื้อจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าเป็นเชื้อสาเหตุหลักของโรคอุจจาระร่วง ได้แก่ เชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *Salmonella*

เชื้อ *E. coli* โดยทั่วไป เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) อยู่ในลำไส้และมักจะไม่ง่อให้เกิดโรค ในอดีตจึงไม่ได้ให้ความสนใจกับเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบในอุจจาระของผู้ป่วย และเนื่องจากลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* มีลักษณะเฉพาะ จัดจำได้ง่ายจึงถูกละเลยที่จะนำมา identify ต่อ หรือ เมื่อมีการ identify ได้เป็นเชื้อ *E. coli* ก็จะไม่มีการรายงานผล ดังนั้นจะพบว่าในคนไข้บางรายมีรายงานว่าเป็นโรคอุจจาระร่วงโดยไม่ทราบสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *E. coli* ได้ จากการศึกษาวิจัยย้อนหลังจากเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กไทยอายุต่ำกว่า 12 ปี ที่มีอาการอุจจาระร่วงรุนแรง จำนวน 2,100 ราย ในระหว่างปี 1996-2000 ผลการวิจัยพบว่าเป็นเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง (diarrheagenic *E. coli*; DEC) ถึง 16.9% (Ratchtrachenchai *et al.*, 2004) เชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคสามารถแบ่งออกเป็นชนิดต่าง ๆ ตามลักษณะของอาการการเกิดโรค และการเกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วย หรือในเซลล์เพาะเลี้ยงที่นำมาทดสอบได้ถึง 6 ชนิด ได้แก่ enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ diffusely adherent *E. coli* (DAEC) (Nataro and Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004)

เชื้อ *Salmonella* เป็นเชื้อที่พบโดยทั่วไป ได้แก่ ในสัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมทั้งมนุษย์ เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วง โดยเฉพาะในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ หรือผู้สูงอายุ สาเหตุของการติดเชื้อจากการบริโภคอาหาร หรือ ผลิตภัณฑ์สัตว์ เช่น ไข่ หรือเนื้อ ผู้ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการของโรคได้ 3 แบบ คือ 1) โรคไขไทฟอยด์ และ พาราไทฟอยด์ (Enteric fever) ผู้ป่วยจะมีอาการปวดเมื่อยตามตัว ปวดศีรษะ เบื่ออาหาร และเป็นไข้ เนื่องจากเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิต เชื้อจะกระจายสู่วัยวะภายในรวมทั้งไต ไชกระดูก ลำไส้ ถุงน้ำดี เชื้อจะถูกขับถ่ายออกทางอุจจาระ และปัสสาวะ 2) การติดเชื้อในกระแสโลหิต (Septicemia) เชื้อที่เป็นสาเหตุ ได้แก่ เชื้อ *Salmonella Choleraesuis* ผู้ป่วยมีอาการเป็นไข้สูงเป็นระยะ ตับและม้ามโต อาจก่อให้เกิดอาการปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบได้ 3) โรคอุจจาระร่วง (Gastroenteritis) เชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่สามารถทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ มีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระเหลว บางครั้งอาจมีมูกเลือดปน

เชื้อ *Campylobacter* เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงทั้งในมนุษย์ และสัตว์ จากการรายงานของโครงการเฝ้าระวังโรค campylobacteriosis ในประเทศที่พัฒนาแล้ว พบอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อ *Campylobacter* ประมาณ 5 – 20 % (Tauxe *et al.*, 1992) ซึ่งเชื่อดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในลำดับต้น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงชนิดอื่นๆ (Hughes and Rees, 1997 ; Varavithya *et al.*, 1990) จากการประมาณการจำนวนผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงในประเทศที่กำลังพัฒนา พบว่าในแต่ละปีมีผู้ป่วยเด็กที่อายุน้อยกว่า 5 ปี ติดเชื่อดังกล่าวถึง 40,000-60,000 คน จาก 100,000 คน (Oberhelman *et al.*, 2000 ; Rao *et al.*, 2001) และพบว่าเชื้อ *Campylobacter jejuni* และ *C. coli* เป็นสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุสำคัญโดยเฉพาะในเด็กเล็ก ผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้จะมีอาการปวดท้อง มีไข้ ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำเหลว หรือมีมูกเลือดปน บางครั้งพบว่ามีอาการอักเสบของลำไส้ใหญ่ร่วมด้วย (Altekruse *et al.*, 1999 ; Reina *et al.*, 1995) สำหรับประเทศกำลังพัฒนา เช่น ในประเทศไทย มีรายงานในปี 1989 และ 1994 ผู้ป่วยอุจจาระร่วงที่เกิดจากการติดเชื้อ *Campylobacter* ประมาณ 10-15% ซึ่งใกล้เคียงกับการติดเชื้อ ETEC, *Shigella* และ rotavirus (Echeverria 1989, Echeverria 1994) และมีรายงานในปี 1998-2000 ว่า เชื้อ *Campylobacter* ก่อให้เกิดอุจจาระร่วงถึง 28% ขณะที่เชื้อ *Salmonella*, *Shigella* และ ETEC ก่อให้เกิดอุจจาระร่วง 18%, 9% และ 6% ตามลำดับ (Bodhidatta *et al.* 2002) ผู้ป่วยติดเชื้อ *Campylobacter* ในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเด็ก อายุน้อยกว่า 12 ปี และมักพบเป็นเชื้อที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษา

ผู้ป่วยอุจจาระร่วง เช่น erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline เป็นต้น (Bodhidatta *et al.* 2002, Padungtod *et al.* 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานในต่างประเทศพบว่าเชื้อ *Campylobacter* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค Guillain-Barre Syndrome (GBS) ซึ่งพบว่า 25-45% ของผู้ป่วยโรค GBS เกิดจากการติดเชื้อ *Campylobacter* (Nachamkin *et al.*, 1999 ; Mishu, 1997 ; Hughes and Rees, 1997) และพบว่าผู้ป่วยกลุ่มอาการดังกล่าวมีอัตราการเสียชีวิตถึง 2 - 3 % (Briscoe *et al.*, 1987) เชื้อดังกล่าวยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการของโรค reactive arthritis, urticaria, erythema nodosum ด้วย (Moore *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า เชื้อ *Campylobacter* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากทางด้านสาธารณสุข

นอกจากรายงานการพบเชื้อ *Salmonella*, *E. coli* และ *Campylobacter* ในมนุษย์และสัตว์แล้ว ยังมีรายงานการพบเชื้อนี้ในผักและผลไม้ซึ่งเป็นอาหารของมนุษย์ เมื่อผู้บริโภค บริโภคผัก หรือผลไม้ที่ปนเปื้อนเชื้อนี้ จะทำให้เกิดการติดเชื้อและเกิดอาการอุจจาระร่วง และสามารถนำไปสู่โรคต่างๆที่เกี่ยวข้องต่อไป การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลไม้ อาจมีการปนเปื้อนตั้งแต่แหล่งเพาะปลูก และหลังเก็บเกี่ยว จนกระทั่งถึงผู้บริโภค โดยทั่วไปผลไม้มีรับประทานสด ซึ่งไม่ผ่านขั้นตอนของการฆ่าเชื้อ จึงมีโอกาที่จะเกิดการเจ็บป่วยเนื่องจากรับประทานผลไม้ที่ปนเปื้อนเชื้อก่อโรค เชื้อก่อโรคเหล่านี้หลายตัวแพร่กระจายผ่านมนุษย์หรือสัตว์ไปสู่อาหารแล้วแพร่กลับมาสู่มนุษย์ โดยการจับต้องสัมผัสกับผักและผลไม้โดยคนงานในส่วนหรือผู้บริโภคที่ติดเชื้อ การปนเปื้อนข้าม การใช้น้ำที่ปนเปื้อน การไม่ระมัดระวังความสะอาดหรือการสัมผัสกับดินที่ปนเปื้อนเชื้อ ปัจจุบันผู้บริโภคนิยมซื้อผัก หรือผลไม้พร้อมรับประทาน ที่ผ่านการตัดแต่งและบรรจุในภาชนะสำเร็จรูป กระบวนการผลิตผักหรือผลไม้ดังกล่าว จึงเป็นส่วนที่สำคัญอย่างยิ่งในการผลิตผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ที่มีคุณภาพ มีความสะอาด และปลอดภัย มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการบริโภคผักและผลไม้ที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ทำให้มีผู้ป่วยจำนวนมากและมีผู้เสียชีวิต เช่น ในเดือนกันยายน ปี 2006 ที่สหรัฐอเมริกาพบว่าการระบาดของ *E.coli* O157:H7 จากผักโขมสด ทำให้มีผู้ป่วย 250 ราย เสียชีวิต 3 ราย ในปี 1998 เกิดการระบาดของอุจจาระร่วงจากเชื้อ enterotoxigenic *E. coli* ในสหรัฐอเมริกา ซึ่งจากการตรวจสอบปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องพบว่า การบริโภคมันสำปะหลัง แดงโม สลัดไข่ และสลัดผักกะโรนี (Beatty *et al.* 1998) สำหรับเชื้อ *Salmonella* นั้น มีรายงานการระบาดของเชื้อ *Salmonella* ที่มีสาเหตุจากการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในผักและผลไม้ โดยเฉพาะ melon, cantaloupe, cilantro และ alfalfa sprout (Backer *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001; Long *et al.*, 2002; Mead *et al.* ,1999; Mohle-Boetani *et al.*, 1999; Wells and

Butterfield, 1997) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอีกหลายชนิด เช่น เชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *Campylobacter* ในผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้ อีกด้วย (Abadias *et al.* 2008) ในปี 2007 พบการปนเปื้อนในสลัดผักและผลไม้สูงถึง 40.9% ในประเทศปากีสถาน โดยพบเชื้อส่วนใหญ่ 2 ชนิดคือ *C. jejuni* 70.6% และ *C. coli* 29.4% (Hussain *et al.*, 2007) ในสหภาพยุโรปพบการระบาดของแบคทีเรียและไวรัส ซึ่งทำให้เกิดอาหารเป็นพิษจากข้าวโพดอ่อน ผักกาดหอมและราสเบอร์รี่ที่นำเข้าในสหภาพยุโรป การตรวจพบเชื้อ *Campylobacter jejuni* ปนเปื้อนในแคนตาลูปและสตอเบอรี่ (Karenlampi และ Hanninen, 2004) เชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *Salmonella* สามารถอยู่รอดได้ในสัปดาห์พร้อมบริโภค ได้นานถึง 180 วัน (Strawn and Danyluk, 2010) ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* และ *Campylobacter* ในอาหาร และผัก (Chomvarin *et al.*, 2005; Dhiraputra *et al.*, 2005; Rasrinual *et al.*, 1988) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อดังกล่าวจะมีการปนเปื้อนในผลไม้สดแต่งพร้อมบริโภคของไทย

ปัจจุบันการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคอุจจาระร่วงที่ปนเปื้อนมากับอาหารพร้อมบริโภค ได้มีการนำเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) มาใช้มากขึ้น เช่น *invA*- gene based PCR ตรวจหา *Salmonella* ในอาหาร (Kumar *et al.*, 2008), *stx* gene-based PCR ตรวจหา *E. coli* ในเนื้อ และผัก (Mora *et al.*, 2007) , การการใช้เทคนิค PCR ตรวจหา *C. jejuni*, *C. lari* และ *C. coli* ในเนื้อหมูและเนื้อไก่ (Perelle *et al.*, 2004) และสลัดผักในมาเลเซีย (Chai *et al.*, 2007) เนื่องจากสามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็วภายใน 1-2 วัน และน่าจะเป็นวิธีการที่สามารถนำไปใช้ได้อย่างกว้างขวางในอนาคต ในการศึกษาได้ใช้เทคนิคทาง PCR ทำการตรวจหาอัตราการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella*, *E. coli*, และ *Campylobacter* ในผลไม้สดแต่งพร้อมบริโภคที่เก็บตัวอย่างได้มาจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล จำนวน 201 ตัวอย่าง โดยทำการตรวจหาชิ้นที่สร้างสารพิษของตัวเชื้อ ได้แก่ *Salmonella* (*stn*), *Campylobacter* (*cdtB*), และ *E. coli* (ETEC: LT and ST, EHEC: *stx*) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ ได้เพิ่มการตรวจหาเชื้อ *E. coli* ก่อโรคลักษณะอื่น ๆ ด้วยโดยการตรวจหาชิ้นก่อโรค (virulent gene) ที่จำเพาะต่อเชื้อ มีรายงานว่า การใช้เทคนิค PCR ต่อยีนที่สร้างสารพิษที่ เชื้อเหล่านี้สร้างขึ้น สามารถวิเคราะห์หาชิ้นที่ก่อให้เกิดสารพิษจาก stool ของคนไข้และจากเนื้อสัตว์ อาหาร และผัก (Asakura *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2007; Makino *et al.*, 1999)

สำหรับแนวทางที่จะป้องกันและแก้ปัญหาการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในผลไม้สดแต่งพร้อมบริโภค สามารถทำได้โดยการปรับปรุงกระบวนการผลิตโดยการใช้มีดคมที่สะอาดตัด

แต่งผลไม้ ร่วมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ เช่น สารละลายคลอรีน การบรรจุในสภาพบรรยากาศ
 ดัดแปลง และอุณหภูมิต่ำ ซึ่งในการศึกษานี้ ได้ทำการศึกษาวิธีการลดการปนเปื้อนเชื้อเหล่านี้ใน
 ผลไม้ตัดแต่งพร้อมบริโภค โดยการเลือกตัวอย่างผลไม้ตัดแต่งพร้อมบริโภคชนิดเดียวกันที่ตรวจพบการ
 ปนเปื้อนของเชื้อเหล่านี้มากที่สุด มาผ่านขั้นตอนการจัดการของงานวิจัยพืชผลหลังเก็บเกี่ยว
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 2 วิธี ได้แก่ วิธี Total chlorine treatment และ วิธี
 chlorine-peroxyacetic acid และนำมาเปรียบเทียบผลการปนเปื้อนเชื้อโดยวิธีการเพาะแยกเชื้อ และแยก
 ชนิดเชื้อ *Salmonella*, *E. coli*, และ *Campylobacter* ด้วยเทคนิค toxin gene-based PCR และ virulent gene
 base PCR คณะผู้วิจัยพบว่า การใช้เทคนิคทาง toxin gene-based PCR และ virulent gene base PCR
 สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella*, *E. coli*, และ *Campylobacter* ในผลไม้ และ
 กระบวนการจัดการผลไม้ด้วยวิธี Total chlorine treatment สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค
 เหล่านี้ ซึ่งสามารถนำกระบวนการผลิตวิธีนี้ไปใช้ในการผลิตผักและผลไม้ตัดแต่งพร้อมบริโภคจริง
 เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค รวมทั้งผู้ผลิตผักและผลไม้พร้อมบริโภคอีกด้วย

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1. ตัวอย่างผักจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ต

ผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคทั้งหมด 210 ตัวอย่าง ถูกเก็บจากตลาดสด (Figure 1) และซูเปอร์มาร์เก็ต (Figure 2) ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล (Table 1) ซึ่งประกอบด้วย กะหล่ำปลี 58 ตัวอย่าง แคโรท 49 ตัวอย่าง แตงกวา 57 ตัวอย่างและผักกาดหอม 46 ตัวอย่าง นำมาทำการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ณ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตั้งแต่เดือนธันวาคม 2551 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2552



Figure 1. Wet market.

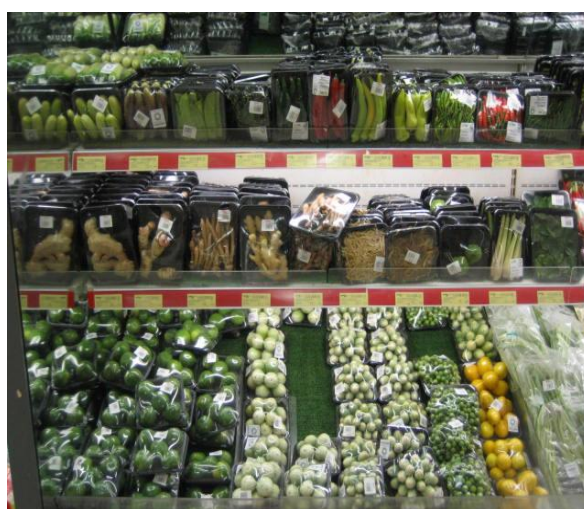


Figure 2. Supermarket.

Table 1 ชนิดของผักที่เก็บจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

ผัก	กรุงเทพมหานคร					ปริมณฑล			สรุป
	ตลาดสด	ซูเปอร์มาร์เก็ต				ตลาดสด	ซูเปอร์มาร์เก็ต		
		d*	b*	e*	f*		j*	p*	
กะหล่ำปลี	8	11	10	8	6	6	4	5	58
แครอท	8	6	8	8	7	5	5	2	49
แตงกวา	8	8	8	8	10	5	6	4	57
ผักกาดหอม	8	6	7	5	6	5	5	4	46
รวม	32	31	33	29	29	21	20	15	210

*d = BigC มินบุรี; b = ตลาดสด อดก; e = TOPS เซ็นทรัลลาดพร้าว; f = TOPS พรานนก; j = LOTUS บางแค; p = ตลาดสด นครปฐม; g = LOTUS นครปฐม; n = LOTUS นวนคร

3.2. การพัฒนาเทคนิคซึ่งสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* ในผักสดตัดแต่งพร้อมบริโภค โดยทำการศึกษาการเจริญของเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli*, และ *C. fetus* ในการบ่มที่ 0, 6, 12, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง และการตรวจสอบยีนที่สร้างสารพิษที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงกับผู้ป่วยโดยตรง

ทำการปรับเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. fetus* ให้ได้ปริมาณ 10^2 , 10^1 และ 10^0 โคโลนี/มล หลังจากนั้น inoculate เชื้อ ลงในผักกะหล่ำปลีที่ไม่มีเชื้อ *Campylobacter* ปนเปื้อนจำนวน 25 กรัม ใน Bolton enrichment broth base supplemented (BEBB)+Bolton supplement 225 มล. นำไปตีบดด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาทำการเจือจาง 10 เท่า โดยทำการปิเปต suspension จาก stomacher bag 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่มี 9 มล. ของอาหาร BEBB+Bolton supplement ซึ่งจะได้อาหารของเชื้อ เท่ากับ 10^1 , 10^0 และ 10^{-1} โคโลนี/มล. นำหลอดอาหาร ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0, 6, 12, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง ในบรรยากาศ microaerophilic นำ suspension จากแต่ละหลอดในแต่ละช่วงเวลา ไปทำการตรวจสอบการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* ด้วยวิธีการเพาะเชื้อลงอาหาร mCCDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในบรรยากาศ microaerophilic และ ในขณะเดียวกัน นำหลอดอาหารที่บ่มในแต่ละช่วงเวลามาเตรียม boiled template เพื่อตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PCR โดยทำการดูดอาหารมา 1 มล ปั่นด้วยความเร็ว $12,800 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนมาปั่นล้าง 1 ครั้งใน 1 มล ของ 1XTE buffer หลังจากนั้น resuspend ด้วย 500 มลล ของ 1XTE buffer นำไปต้มที่ 95°C เป็นเวลา 10 นาที นำมาแช่น้ำแข็ง 2 นาที ปั่นตะกอนทิ้งด้วยความเร็ว $12,800 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ที่ -20°C เพื่อใช้เป็น boiled template ในการตรวจด้วยเทคนิค *16S rRNA* gene-based PCR และ *cdtB* gene-based multiplex PCR

3.3. การเพาะเชื้อและตรวจนับปริมาณเชื้อ *Campylobacter*

ทำการเพาะเชื้อโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Chai (2007) เพื่อ ดู การเจริญของเชื้อ นับปริมาณของเชื้อ ดังขั้นตอนต่อไปนี้ หั่นตัวอย่างผักเป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำตัวอย่างผัก 25 กรัม ใส่ใน Bolton enrichment broth base supplemented (BEBB)+Bolton supplement 225 มิลลิลิตร (มล.) นำไปตีบดด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาทำการเจือจาง 10 เท่า และ 100 เท่า สำหรับการตรวจนับปริมาณของเชื้อด้วยวิธี MPN นั้น ทำการปิเปต suspension จาก stomacher bag, suspensionที่เจือจางไว้ 10 เท่า และ 100 เท่า อย่างละ 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่มี 9 มล. ของอาหาร BEBB+Bolton supplement แต่ละ dilution ถูกทำ 3 ซ้ำ นำหลอดอาหารทั้งหมด พร้อมกับ stomacher bag ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในบรรยากาศ microaerophilic ตรวจสอบหลอดที่ขุ่นและบันทึกผลไว้ นำ suspension จาก bag และหลอดที่ขุ่นไปทำการตรวจสอบเชื้อ *Campylobacter* ด้วยวิธี PCR นำตัวอย่างที่ให้ผล PCR บวก มาทำการเพาะหาเชื้อ *Campylobacter* โดยหยด PCR positive suspension 200 ไมโครลิตร (มคล.) ลงบนอาหารชนิด *Campylobacter* modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate blood free selective agar (mCCDA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในบรรยากาศ microaerophilic แต่ละ PCR positive suspension จะถูกทำการทดสอบทั้งหมด 2 ซ้ำ ทำการบันทึกผลของหลอดที่ให้ผลบวกด้วยการตรวจวิธี PCR อ่านค่า MPN (Table 2)

และเชื้อที่ย้อมแกรม เป็นแกรมลบ มีลักษณะเป็นหยักเกลียวเหมือนปีกนก และให้ผลบวกต่อ oxidase และ catalase จะถูกตรวจยืนยันด้วยเทคนิคทาง PCR

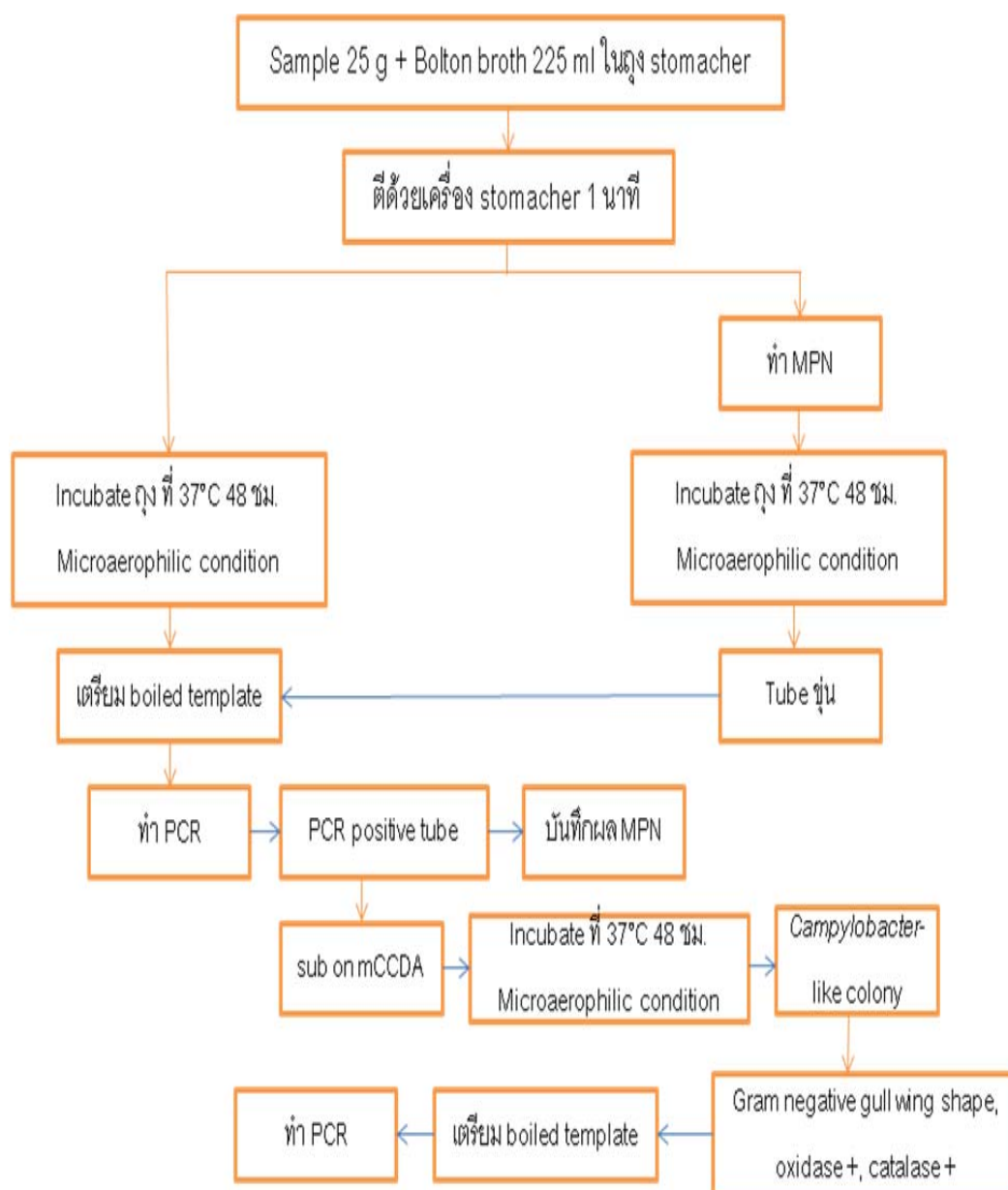


Figure 3 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในผัก

Table 2. For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram.

Positive tubes			MPN/g	Positive tubes			MPN/g
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
0	0	0	<3.0	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6.1	2	3	0	29
0	2	0	6.2	2	3	1	36
0	3	0	9.4	3	0	0	23
1	0	0	3.6	3	0	1	38
1	0	1	7.2	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7.4	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	9.2	3	2	2	210
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

3.4. การแยกเชื้อ *Campylobacter* ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

การสกัด boiled DNA template

นำ Bolton broth 1 มล. หรือโคโลนีที่สงสัย *Campylobacter* จำนวน 1-3 โคโลนี มาละลายใน 1xTE ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 500 μ l และต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที และ on ice เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นจึงทำการตกตะกอน DNA ของเชื้อ ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 12,800 x g เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งจะได้ DNA ที่อยู่ในส่วนใส (supernatant) และใช้ 2 μ l เป็น PCR template

การแยกเชื้อ *Campylobacter* ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene-based PCR และ *cdtB* gene-based multiplex PCR

ผู้วิจัยได้แยกพิสูจน์เชื้อ *Campylobacter* โดยการใช้ primers และ conditions (Table 2) ซึ่ง primers 1 คู่ คือ C412F และ C1288R สำหรับการตรวจสอบยืนยันว่าเป็นเชื้อ *Campylobacter* spp. มาจากยีน 16S rRNA gene (Linton et al., 1996) และ primers 3 คู่ ซึ่งเป็นส่วนของ cytolethal distending toxin gene คือ *cdtB* gene ออกแบบโดย Asakura และคณะในปี 2008 ซึ่งได้รับการประเมินการตรวจเชื้อ *Campylobacter* สายพันธุ์ในประเทศไทยแล้ว ได้ผลการตรวจถูกต้อง 100% (Samosornsuk et al., 2007) โดย primers คู่แรกสำหรับตรวจ *C. jejuni* คือ Cj-CdtBU5 และ Cj-CdtBR6 คู่ที่ 2 สำหรับตรวจ *C. coli* คือ Cc-CdtBU5 และ Cc-CdtBR5 และ คู่ที่ 3 สำหรับตรวจ *C. fetus* คือ Cf-CdtBU6 และ Cf-CdtBR3 PCR reaction ประกอบด้วย Primers, MgCl₂ และ Taq DNA polymerase ความเข้มข้นดังแสดงในตารางที่ 3, 0.2 mM ของ dNTPs mix, 1 x Taq polymerase buffer, และปรับปริมาตรด้วย sterilized distilled water ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 50 μ l Amplification ถูกทำในเครื่อง G-Storm GS482 Thermal Cycler (Gene Technology Co., UK) PCR product และวิเคราะห์โดยใช้ 1% และ 1.5% agarose gel electrophoresis ตามลำดับ และย้อมด้วย ethidium bromide 1.0 μ g/ml เป็นเวลา 10 นาที และล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น 10 นาที ถ่ายภาพด้วย Bio-Rad Gel Doc system (Fig.1และ Fig. 2)

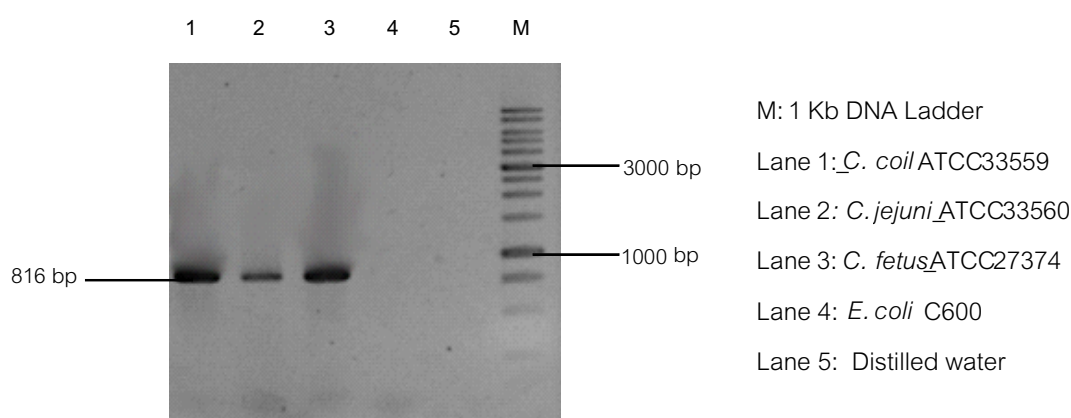


Figure 4 Representative amplification of the 16S rRNA for the identification of *Campylobacter* spp.

[illegible]

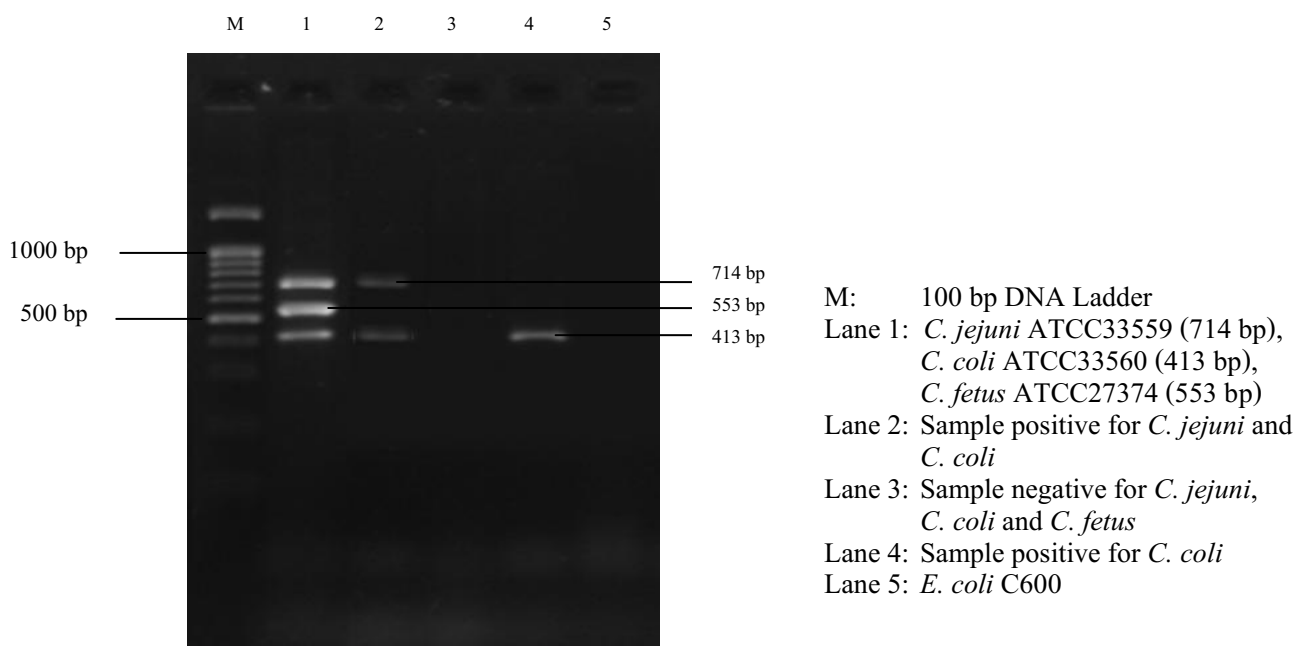


Figure 5 Representative amplification *cdtB* gene-based multiplex PCR for the identification
Campylobacter jejuni, *C. coli* and *C. fetus*

3.5. การพัฒนากระบวนการผลิตผักสดตัดแต่งพร้อมบริโภค เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter*

นำผักสดจากสถานที่ที่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* ได้แก่ ผักกาดหอม และแครอท จากตลาดสด อตก และผักกะหล่ำปลี จากฟาร์มเกษตรสวนบัว จากนั้นแบ่งผักออกเป็นสองส่วน โดยส่วนที่ 1 จะทำการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ก่อนผ่านขั้นตอนการจัดการของศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และส่วนที่ 2 นำไปผ่านขั้นตอนการจัดการของศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ด้วยวิธี chlorine peroxyacetic acid treatment ดังต่อไปนี้ ทำการล้างผักใน NaOCl 100 ppm ย้ายเข้าห้องเย็น 5 °ซ อุณหภูมิทำความสะอาดด้วย 70% ethyl alcohol หั่นผักล้างใน peroxyacetic acid 80 ppm เป็นเวลา 2 นาที ล้างน้ำกรอง (drinking water) เย็น เป็นเวลา 1 นาที เติมน้ำ และทำการบรรจุผัก ทั้งนี้จะทำการเลียนแบบการบรรจุเช่นเดียวกับบริษัทที่ทำการผลิตผักตัดแต่งพร้อมบริโภค และนำตัวอย่างมาทำการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* เปรียบเทียบผลการตรวจก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการจัดการของศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งตัวอย่างแต่ละชนิดจะทำการตรวจทั้งหมด 3 ซ้ำ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการพัฒนาเทคนิคซึ่งสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบการปนเปื้อน ของเชื้อ *Campylobacter* ในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภค โดยทำการศึกษาการเจริญของเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli*, และ *C. fetus* ในการ บ่มที่ 0, 6, 12, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง และการตรวจสอบยีนที่สร้างสารพิษที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคอุจจาระ ร่วงกับผู้ป่วยโดยตรง

ผลการวิจัย จากการตรวจผลการตรวจเพาะเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli*, และ *C. fetus* ในปริมาณ 10^1 , 10^0 และ 10^{-1} โคโลนี/มล และบ่มเพาะในช่วงเวลาต่าง ๆ พบว่า เชื้อที่มีปริมาณ 10^1 โคโลนี/มล. เชื้อสามารถเจริญได้ ทุก ช่วงเวลา และ การตรวจด้วยวิธี *16S rRNA* gene-based PCR และ *cdtB* gene-based multiplex PCR ให้ ผลบวกกับเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. fetus* ทุกช่วงเวลาเช่นกัน ขณะที่เชื้อปริมาณ 10^0 โคโลนี/มล. สามารถตรวจเชื้อได้จากการเพาะเชื้อและการตรวจด้วยเทคนิคทาง PCR เมื่อบ่มเพาะเชื้อตั้งแต่ 6 ชม. ส่วน การตรวจเพาะเชื้อปริมาณ 10^{-1} โคโลนี/มล. สามารถตรวจเชื้อได้จากการเพาะเชื้อและการตรวจด้วยเทคนิค ทาง PCR เมื่อบ่มเพาะเชื้อตั้งแต่ 12 ชม. (Table 4)

วิจารณ์ผลการวิจัย เชื้อ *Campylobacter* สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 30-47 °ซ อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 37 °ซ สามารถตรวจ *Campylobacter* ได้ทุกสายพันธุ์ และเป็นอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญและ ความสามารถในการก่อโรคมกกว่าอุณหภูมิที่ 42 °ซ (Khanna et al, 2006) การตรวจดูการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* ด้วยวิธีการเพาะเชื้อและด้วยเทคนิคทาง PCR ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยสามารถตรวจการ เจริญของเชื้อได้หลังจากบ่มอาหาร Bolton broth ที่มีเชื้อปนเปื้อนในผักเพียง 1 โคโลนี/มล ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ตั้งแต่เวลา 12 ชม แต่การตรวจด้วยเทคนิคทาง PCR โดยตรงจาก broth ไม่ต้องรออ่านผลจาก mCCDA plate จะให้ผลการตรวจได้เร็วกว่าการเพาะเชื้อถึง 2 วัน นอกจากนั้นการอ่านผลการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* ในอาหารเพาะเชื้อนั้นต้องใช้ความชำนาญในการอ่านผล เนื่องจากเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ใช่เชื้อ *Campylobacter* ก็ สามารถเจริญในอาหาร mCCDA ได้เช่นกัน ดังนั้น การนำเทคนิคทาง PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* เป็นวิธีที่ง่ายและให้ผลการตรวจรวดเร็วว่าการตรวจด้วยวิธีเพาะเชื้อ อย่างไรก็ตาม ในการ วิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการบ่มเพาะอาหาร Bolton broth จนถึงเวลา 48 ชม ก่อนทำการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* เนื่องจากผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดสอบการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* ทุกสายพันธุ์ แต่ทำ การทดสอบเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. fetus* เท่านั้น ดังนั้นผู้วิจัยขอแนะนำให้ทำการบ่มเพาะเชื้อจนถึง

เวลา 48 ชม เพราะจะทำให้เชื้อ *Campylobacter* สายพันธุ์อื่น ๆ สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ เนื่องจากเชื้อเจริญเติบโตได้ช้า

ผลการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ที่ปนเปื้อนในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในตลาดสด และชุปเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

ผลการวิจัย ผลการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* ในผัก 4 ชนิด ได้แก่ กะหล่ำปลี แครอท ผักกาดหอม และแตงกวา จำนวน 210 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการเพาะเชื้อจากหลอดที่ชุน เพื่อแยกชนิดของเชื้อนั้น ไม่สามารถที่จะแยกได้จากการเพาะเชื้อ อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบด้วย *16S rRNA* gene-based PCR ตรวจพบเชื้อที่สงสัยเป็น *Campylobacter* ในตัวอย่างผักทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ผักกะหล่ำปลี 1 ตัวอย่าง แครอท 2 ตัวอย่าง และผักกาดหอม 2 ตัวอย่าง (Table 5) แต่ไม่ตรวจพบในแตงกวา (เนื่องจากไม่ให้ผลบวกจึงไม่ได้รายงานในตาราง) โดยผักที่ตรวจพบนี้ประกอบด้วย กะหล่ำปลีที่เก็บจากชุปเปอร์มาร์เก็ตในเขตปริมณฑล จากการเก็บกะหล่ำปลีจากสถานที่นี้มา 5 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Campylobacter* 1 ตัวอย่าง เป็นเชื้อ *Campylobacter* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. jejuni* และ *C. coli* ส่วน แครอท และ ผักกาดหอมที่ตรวจพบเชื้อ เก็บจาก ตลาดสด ในแครอท 8 ตัวอย่างที่เก็บจากสถานที่นี้ ตรวจพบ *C. coli* 1 ตัวอย่าง และ ไม่สามารถแยกสายพันธุ์ได้ 1 ตัวอย่าง สำหรับผักกาดหอมที่เก็บจากสถานที่นี้ 8 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อที่ไม่สามารถแยกสายพันธุ์ได้ 2 ตัวอย่าง เมื่อนำเชื้อที่ไม่สามารถแยกสายพันธุ์ได้ 3 ตัวอย่างมาทำการตรวจแยกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค *16S rRNA* gene sequencing พบว่าเชื้อ 3 ตัวอย่างนี้ คือ *Arcobacter butzleri* และปริมาณของเชื้อที่แยกได้นั้น สูงที่สุดคือ 3.6 MPN/g ในแครอท จากตลาดสด ในการดู MPN นั้นจะทำการเทียบกับ Table 2 หน้า 14 ซึ่งปริมาณเชื้อนี้ จะตรงกับหลอดที่ให้ผลบวก 1 หลอดในหลอดที่มีความเข้มข้น 0.1 กรัม รองลงมาคือ 3.0 MPN/g (เทียบกับ Table 2 หน้า 14 หลอดที่ให้ผลบวก 1 หลอด เป็นหลอดที่มีความเข้มข้น 0.01 กรัม) ในผักกาดหอมจากตลาดสด 1 ตัวอย่าง และ ต่ำที่สุดคือ <3 MPN/g (เทียบกับ Table 2 หน้า 14 ไม่มีหลอดใดให้ผลบวก แต่หลอดที่ให้ผลบวกเป็นหลอดที่มีความเข้มข้น 1 กรัม) ได้แก่ กะหล่ำปลี 1 ตัวอย่าง จากชุปเปอร์มาร์เก็ต, ผักกาดหอม และ แครอทจากตลาดสดอย่างละ 1 ตัวอย่าง

วิจารณ์ผลการวิจัย การตรวจหา *Campylobacter*-like strain สามารถใช้เทคนิค *16S rRNA* gene-based PCR ผลการตรวจด้วยเทคนิคนี้ ต้องทำการตรวจยืนยันชนิดของเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli* และ *C. fetus* ด้วยเทคนิค *cdtB* gene-based multiplex PCR ก่อน ถ้าการตรวจให้ผลลบต่อวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR ผู้วิจัยไม่ควรรายงานผลว่าเป็น *Campylobacter* spp. ควรทำการตรวจยืนยันด้วย *16S rRNA* gene sequencing จากผล

การตรวจพบว่าเชื้อที่ให้ผลลบต่อวิธี *16S rRNA* gene-based PCR แต่ให้ผลลบต่อวิธี *cdtB* gene-based multiplex PCR เป็นเชื้อ *Arcobacter butzleri* ซึ่งเชื่อนี้เป็นเชื้อที่จัดอยู่ใน Family *Campylobacteraceae* เช่นเดียวกับเชื้อ *Campylobacter* และมียีน *16S rRNA* ที่คล้ายคลึงกับยีน *16S rRNA* ของ *C. coli* 86.2% และ *C. fetus* 85.6% (Prouzet-Mauléon et al 2006) จากงานวิจัยของ Chai 2007 ได้ทำการตรวจหา *Campylobacter* spp. ด้วยวิธี *16S rRNA* gene-based PCR โดยใช้ primer ชุดเดียวกันนี้ได้รายงานว่าเป็น *Campylobacter* spp. 51.9% (Chai et al, 2007) ซึ่งเชื้อเหล่านี้ อาจเป็น *Arcobacter butzleri* ก็ได้ ดังนั้นการรายงานการตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* ในผักที่มาเลเซีย นั้น อาจสูงเกินความเป็นจริง ในทางกลับกัน การรายงานการตรวจพบเชื้อ *C. fetus* 85.6% (Prouzet-Mauléon et al 2006) จากงานวิจัยของ Chai 2007 ได้ทำการตรวจหา *Campylobacter* spp. ด้วยวิธี *16S rRNA* gene-based PCR โดยใช้ primer ชุดเดียวกันนี้ได้รายงานว่าเป็น *Campylobacter* spp. 51.9% (Chai et al, 2007) ซึ่งเชื้อเหล่านี้ อาจเป็น *Arcobacter butzleri* ก็ได้ ดังนั้นการรายงานการตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* ในผักที่มาเลเซีย นั้น อาจสูงเกินความเป็นจริง ในทางกลับกัน การรายงานการตรวจพบเชื้อ *Arcobacter butzleri* ก็จะต่ำกว่าความเป็นจริง ซึ่งในรายงานการตรวจแยกพิสูจน์ชนิดของเชื้อ *Campylobacter*-like organisms 2,855 สายพันธุ์ จากผู้ติดเชื้อ *Campylobacter* ในฝรั่งเศส พบเป็นเชื้อ *Arcobacter butzleri* (1.0%) ซึ่งเป็นอันดับที่ 4 รองจากเชื้อ *C. jejuni* (78.9%), *C. coli* (18.1%) และ *C. fetus* (1.3%) (Prouzet-Mauléon et al, 2006) เชื้อ *Arcobacter butzleri* เป็นเชื้อที่พบก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง มีรายงานการตรวจพบเชื่อนี้ในเด็กไทยที่มีอาการอุจจาระร่วง (Taylor et al 1991) นอกจากนี้ เชื้อนี้ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Yan et al 2000, Lau et al 2002) การเลือกใช้ยีนที่สร้างสารพิษ cytolethal distending toxin (*cdt*) ซึ่งตรวจได้ต่ำสุด 1 โคโลนี ในการเลือกผัก 4 ชนิดประกอบด้วย แตงกวา กะหล่ำปลี แครอท และ ผักกาดหอม การตรวจพบเชื้อพบในตลาดสดมากกว่าในซูเปอร์มาร์เก็ต อาจเนื่องจากส่วนใหญ่ ผักที่ขายในซูเปอร์มาร์เก็ต เป็นผักสดสะอาด บางส่วนได้รับการรับรองคุณภาพจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ผักจากตลาดสดจะถูกรดน้ำให้เปียกอยู่เสมอ เพื่อไม่ให้ผักเหี่ยว จากการตรวจผัก 4 ชนิด ไม่พบแตงกวามีการปนเปื้อนเชื้อ พบการปนเปื้อนในผักกาดหอมมากที่สุด รองลงมาเป็นผักกะหล่ำปลี และ แครอท ตามลำดับ การตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* และ เชื้อ *Arcobacter* ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ ทำให้เกิดอันตรายต่อ ผู้บริโภคได้ ในการศึกษาที่สามารถตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* ในผักสดในอัตราที่ต่ำเช่นเดียวกับการตรวจหาเชื่อนี้ในผัก ประเทศอินเดีย ซึ่งพบเพียง 2 ตัวอย่าง จาก 56 ตัวอย่างเท่านั้น (Kumar et al, 2001) โดยปกติ เชื้อ *Campylobacter* อาศัยอยู่ใน ลำไส้ของสัตว์เลื้อยคลานและนก ซึ่งการปนเปื้อนเชื่อนี้ในสิ่งแวดล้อมนั้น เกิดจากมูลของสัตว์เหล่านี้ (Franco, 1998; Khanna et al, 1996) ดังนั้น การตรวจพบเชื่อนี้ในผัก แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนมูลสัตว์เหล่านี้ ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ที่ขั้นตอนใด

Table 4 Incubation time required to detect growth of *Campylobacter* and positive by PCR from bolton broth at 37 °C

Organism	Incubation time (hrs.)	Culture growth			16S gene based PCR			<i>cdtB</i> gene-based multiplex PCR		
		10 ⁻¹ colony	10 ⁰ colony	10 ⁻¹ colony	10 ⁻¹ colony	10 ⁰ colony	10 ⁻¹ colony	10 ⁻¹ colony	10 ⁰ colony	10 ⁻¹ colony
<i>C. jejuni</i>	0	growth	no growth	no growth	+	-	-	+	-	-
	6	growth	growth	no growth	+	+	-	+	+	-
	12	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
	24	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
	30	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
	48	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
<i>C. coli</i>	0	growth	no growth	no growth	+	-	-	+	-	-
	6	growth	growth	no growth	+	+	-	+	+	-
	12	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
	24	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
	30	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
	48	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
<i>C. fetus</i>	0	growth	no growth	no growth	+	-	-	+	-	-
	6	growth	growth	no growth	+	+	-	+	+	-
	12	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
	24	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
	30	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+
	48	growth	growth	growth	+	+	+	+	+	+

Table 5 Most probable numbers (MPN/g), number and percent of raw vegetables samples obtained from 2 retail outlets that were **positive** for *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *Arcobacter butzleri*

Location	Vegetables	<i>Campylobacter jejuni</i>			<i>Campylobacter coli</i>			<i>Arcobacter butzleri</i>		
		No.	%	MPN/g	No.	%	MPN/g	No.	%	MPN/g
Supermarket ^a	Cabbage ^c	1 ^d /5	20.0	< 3.0	1 ^d /5	20	< 3.0	0	0	0.0
Wet market ^b	Carrot	0/8	0.0	0.0	1/8	12.5	3.6	1/8	12.5	< 3.0
	Lettuce	0/8	0.0	0.0	0/8	0/8	0.0	2/8	25.0	<3.0-3

^aTesco Lotus-Navanakorn, ^bThe Marketing Organization for Farmers, ^cAccredited (GAP), ^dDetected from the same sample

ขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการผลิต มีรายงานของ Butzler และ Oosterman (1991) ที่อธิบายถึงผักปนเปื้อนเชื้อจากปุ๋ยธรรมชาติหรือน้ำ หรือการปนเปื้อนจากเครื่องมือเครื่องใช้ในครัวที่มีการปนเปื้อนในระหว่างการเตรียมเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะเนื้อไก่ ก่อนนำมาใช้เตรียมผักเพื่อบริโภค (De-Boer and Hahne, 1990)

ผลการพัฒนากระบวนการผลิตผักสดตัดแต่งพร้อมบริโภค เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter*

ผลการวิจัย ผลการตรวจพบ *Campylobacter* ในแครอท ผักกาดหอม และกะหล่ำปลี ก่อนผ่านขั้นตอนการจัดการของศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว พบตัวอย่างให้ผลบวกต่อ *Campylobacter* ในผักกาดหอม 1 ตัวอย่าง ซึ่งแยกพิสูจน์เชื้อได้เป็น *C. fetus* ด้วยเทคนิค *cdtB* gene-based multiplex PCR นอกจากนี้ในตัวอย่างกะหล่ำปลี 1 ตัวอย่าง ยังตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ด้วยเทคนิค *stn* (salmonella enterotoxin) gene-based PCR และไม่พบเชื้อ *Campylobacter* และ *Salmonella* หลังผ่านขั้นตอนการจัดการของศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว (Table 6)

วิจารณ์ผลการวิจัย ในการศึกษาที่ตรวจพบเชื้อ *Campylobacter* และ *Salmonella* ได้ในกะหล่ำปลีที่ผ่านการรับรองคุณภาพจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (GAP) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุจากตรา GAP ไม่ได้ครอบคลุมการตรวจถึงเชื้อ *Campylobacter* และการตรวจพบ *Salmonella* นั้น เป็นการตรวจพบยีนที่สร้างสารพิษ (*stn* gene) ของเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี PCR ซึ่งมีความไวในการตรวจมากกว่าวิธีการเพาะเชื้อ ซึ่งหน่วยรับรองมาตรฐานอาจใช้วิธีการเพาะเชื้อในการตรวจการปนเปื้อน อย่างไรก็ตาม การใช้วิธี chlorine-

peroxyacetic acid treatment ซึ่งเป็นกระบวนการจัดการผักก่อนทำบรรจุภัณฑ์ ของศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* และเชื้อ *Salmonella* ได้

ไฮโปคลอไรต์ เป็นสารประกอบคลอรีนที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ฆ่าเชื้อในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และนิยมใช้กันมาก เนื่องจากมีประสิทธิภาพที่ดีในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ และมีราคาถูก คลอรีนเหลวเป็นสารละลายของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ในน้ำ ฟิเอชมีอิทธิพลอย่างมากต่อความสมดุลของปฏิกิริยาที่ฟิเอชมากกว่า 5 จะเกิดไฮโปคลอไรต์ไฮออนเพิ่มขึ้น กรดไฮโปคลอรัสมีประสิทธิภาพในการเป็นสารฆ่าเชื้อมากกว่าไฮโปคลอไรต์ไฮออน 80 เท่าที่ความเข้มข้นเท่ากัน ในการปฏิบัติงานโดยทั่วไปนิยมใช้ค่าฟิเอชเท่ากับ 6.5 - 7.0 กรดไฮโปคลอรัสจะมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการฆ่าเซลล์ของจุลินทรีย์โดยยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสด้วยหมู่ Chlorine-oxidizing sulfhydryl ของเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เซลล์ของแบคทีเรียจะรับคลอรีนในรูปคลอรีนอิสระไม่ใช่ Combined chlorine ซึ่งทำลายความสามารถในการซึมผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (cell membrane injury) ทำให้เซลล์แตกตายในที่สุด โดยทั่วไปปริมาณการใช้คลอรีนในสารละลายฆ่าเชื้อ เท่ากับ 100 ถึง 200 พีพีเอ็ม การศึกษาของ ฉัญญรัตน์ รัตนเสถียร ปี 2546 การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 100-150 ppm สามารถลดปริมาณจุลชีพ (Total plate count) ลงได้ อย่างไรก็ตาม จากรายงานของ มณฑกานต์ บุญการ และ วราภา มหากาญจนกุล ปี พ.ศ. 2545 ได้ศึกษาการลดโอกาสเสี่ยงในการปนเปื้อนข้ามของ *Salmonella* Typhimurium ในการเตรียมผักพร้อมบริโภค ผลการศึกษาพบว่า การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 25-200 ppm ไม่สามารถทำลายเชื้อเหล่านี้ได้หมดในเวลา 30 นาที ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ จึงได้นำโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 100 ppm มาทำการล้างผักเบื้องต้นเพื่อทำการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ส่วนหนึ่งออกไปก่อน หลังจากนั้นจึงทำการล้างผักที่เตรียมพร้อมบริโภค ด้วย peroxyacetic acid ผลการวิจัยพบว่าสามารถกำจัดเชื้อก่อโรคได้

กรด peroxyacetic acid ซึ่งผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างกรดน้ำส้มสายชูและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นั้น ปัจจุบันใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ สำหรับอุตสาหกรรมนม เครื่องดื่ม และเครื่องมือผลิตอาหารเนื่องจากให้ผลรวดเร็วและฆ่าเชื้อได้หลายชนิดด้วยการออกซิไดส์องค์ประกอบผนังเซลล์ มีการกักกร่อนน้อยกว่าคลอรีน และไอโอดีนจึงไม่ทำให้เกิดเป็นรูพรุนที่เครื่องมือ มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อยีสต์ เช่น *Candida*, *Saccharomyces*, *Hasenula* และเชื้อราเช่น *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* และ *Geotrichum* ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีการใช้งานเพิ่มมากขึ้นในอุตสาหกรรมนมและการแปรรูปอาหารเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อ *Listeria* และ *Salmonella* กรด peroxyacetic acid มีประสิทธิภาพที่ดีเมื่อ pH ต่ำกว่า 8

(Block 1991) เมื่อแช่อยู่ในน้ำยาเป็นเวลา 2 นาที สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค *E. coli* O157:H7 ที่ผิวแอปเปิ้ลได้ (Wright et al., 2000)

Table 6 Effect of chlorine-peroxyacetic acid treatment on *Campylobacter* contamination in raw vegetables.

Location	Vegetables	<i>Campylobacter</i> positive	
		Before treatment	After treatment
Wet market ^b	Carrot	0/3	0/3
	Lettuce	1 ^d /3	0/3
Supermarket ^a	Cabbage ^c	0/6 ^c	0/6

^aTesco Lotus-Navanakorn, ^bThe Marketing Organization for Farmers, ^cAccredited (GAP), ^didentified as *Campylobacter fetus*, ^eOne sample is *Salmonella* positive.

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า วิธีการตรวจหา *Campylobacter* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (conventional method) และการใช้เทคนิค PCR นั้น ไม่ได้แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การนำเทคนิคทาง PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* จะทำให้ได้ผลการตรวจรวดเร็วกว่าการตรวจด้วยวิธีเพาะเชื้อ 2 วัน และการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* และ/หรือ *Arcobacter* ในผักที่มีการจำหน่ายทั้งในตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร และซูเปอร์มาร์เก็ต ในเขตปริมณฑล และยังตรวจพบได้ในผักที่ได้รับการรับรองมาตรฐานการผลิต (GAP) แม้จะตรวจพบในปริมาณที่ต่ำ แต่ก็ไม่ควรจะมองข้ามความเสี่ยงต่อการบริโภคผักสดที่มีจำหน่ายอยู่ในตลาดและซูเปอร์มาร์เก็ตในประเทศไทย เนื่องจาก ปัจจุบัน คนไทยนิยมบริโภคผักเหล่านี้แบบดิบ ๆ หรือเตรียมเป็นสลัด การใช้ chlorine-peroxyacetic acid ในการทำความสะอาดผัก ช่วยเสริมการทำลายเชื้อก่อโรค *Campylobacter* และ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในผักได้ ซึ่งสารเหล่านี้ เป็นสารที่หาซื้อได้ง่าย ราคาถูก ปริมาณความเข้มข้นของสารที่ใช้ ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้นวิธีนี้เป็นการทำความสะอาดผักที่ผู้บริโภคสามารถนำไปใช้ได้ ในบ้าน อีกทั้งบริษัทผู้ผลิตสามารถนำไปใช้ก่อนบรรจุเพื่อจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภคต่อไป

บทที่ 6

บรรณานุกรม

1. ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, วราภา มหากาญจนกุล และจิตศิริ ทองสอน. 2544. การลด *Salmonella* Typhimurium ในมะเขือเทศเชอร์รี่และจิงด้วยสารประกอบคลอรีนและกรดอินทรีย์. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร 5-7 กุมภาพันธ์ 2544. กรุงเทพฯ, หน้า 317-322 (589 หน้า).
2. ณัฏฐรัตน์ รัตนเสถียร. 2546. การศึกษาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้แปรรูปพร้อมบริโภคและการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. (107 หน้า).
3. Adak, G. K., J. M. Cowden, S. Nicholas, and H. S. Evans. 1995. The Public Health Laboratory Service national case-control study of primary indigenous sporadic cases of *Campylobacter* infection. *Epidemiol. Infect.* **115**:15–22.
4. Alterkruse, S. F., N. J. Stern, P. I. Fields, and D. L. Swerdlow. 1999. *Campylobacter jejuni*-An emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:28-35.
5. Anonymous. 1995. Pathogen Reduction; Hazard Analysis, Critical Control Point (HACCP) Systems; proposed rule. *Fed. Regist.* **60**:6774–6789.
6. Asakura, M., W. Samosornsuk, M. Taguchi, K. Kobayashi, N. Misawa, M. Kusumoto, K. Nishimura, A. Matsuhisa, and S. Yamasaki. 2007. Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb. Pathog.* **42**:174-183.
7. Asakura, M., W. Samosornsuk, A. Hinenoya, N. Misawa, K. Nishimura, A. Matsuhisa, and S. Yamasaki. 2008. Development of cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**:260-6.
8. Bhaduri, S., and B. J. Cottrell. 2004. Survival of cold-stressed *Campylobacter jejuni* on ground chicken and chicken skin during frozen storage. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:7103–7109.
9. Block, S. S. 1991. Peroxygen compounds. In: Block S.S.: Disinfection, sterilization and preservation. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 172-180.
10. Bodhidatta, L., N. Vithayasai, B. Eimpokalarp, C. Pitarangsi, O. Serichantalergs, and D. W. Isenbarger. 2002. Bacterial enteric pathogens in children with acute dysentery in Thailand:

- increasing importance of quinolone-resistant *Campylobacter*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. **33**:752-757.
11. Briscoe, D. M., J. B. McMenamin, and N. V. O'Donohoe. 1987. Prognosis in Guillain-Barré syndrome. Arch. Dis. Child. **62**:733-735.
 12. Butzler, J.P. and J. Oosterman. 1991. *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. Int. J. Food Microbiol. **12**:1-8.
 13. CDSC. 1998. Common gastrointestinal infections, England and Wales. Communicable Disease Surveillance and Response. **8**:14.
 14. Chai, L. C., T. Robin, U. M. Ragavan, J. W. Gunsalam, F. A. Bakar, F. M. Ghazali, S. Radu and M. P. Kumar. 2007. Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia. Int. J. Food Microbiol. **117**:106-111.
 15. De-Boer, E. and Hahne, M., 1990. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. J. Food Prot. **53**:1063-1068.
 16. de Wit, M. A. S., M. P. G. Koopmans, L. M. Kortbeek, N. J. van Leeuwen, A. I. M. Bartelds, and Y. T. H. P. van Duynhoven. 2001. Gastroenteritis in sentinel general practices, the Netherlands. Emerg. Infect. Dis. **7**:82-91.
 17. Franco, D.A., 1998. *Campylobacter* species: considerations for controlling a foodborne pathogen. J. Food Prot. **51**:145-153.
 18. Echeverria, P., C. W. Hoge, L. Bodhidatta, C. Tungtaem, J. Herrmann, S. Imlarp, and K. Tamura. 1994. Etiology of diarrhea in a rural community in western Thailand: importance of enteric viruses and enterovirulent *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. **169**:916-918.
 19. Echeverria, P., D. N. Taylor, U. Leksomboon, M. Bhaibulaya, N. R. Blacklow, K. Tamura, and R. Sakazaki. 1989. Case-control study of endemic diarrheal disease in Thai children. J. Infect. Dis. **159**:543-548.
 20. Effler, P., M. C. Jeong, A. Kimura, M. Nakata, R. Burr, E. Cremer, and L. Slutsker. 2001. Sporadic *Campylobacter jejuni* infections in Hawaii: Associations with prior antibiotic use and commercially prepared chicken. J. Infect. Dis. **183**:1152-1155.
 21. EFSA. 2006. Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. European Food Safety Authority, pp. 96-116.
 22. Fitch, B. R., K. L. Satchell, S. R. Wilder, M. A. Burg, D. W. Lacher, W. T. Khalife, T. S. Whittam, and V. B. Young. 2005. Genetic diversity of *Campylobacter* sp. isolates from retail

- chicken products and humans with gastroenteritis in central Michigan. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4221-4224.
23. Friedman, C. R, J. Neimann, H. C. Wegener, and R. V. Tauxe. 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, p. 121-138. In I. Nachamkin, and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C.
 24. Frost, J. A. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. 2001. *J. Appl. Microbiol.* **90(Suppl)**:85S-95S.
 25. Houn, H. S., O. Sethabutr, W. Nirdnoy, D. E. Katz, and L. W. Pang. 2001. Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **40**:11–19.
 26. Hughes, R. A. and J. H. Rees. 1997. Clinical and epidemiologic features of Guillain-Barre' Syndrome. *J. Infect. Dis.* **176(S.2)**:S92–98.
 27. Hussain, I., M. Shahid Mahmood, M. Akhtar, and A. Khan. 2007. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiol.* **24**:219-222.
 28. Khanna, P. N., A. Kumar, A. K. Singh, and I.A. Khan. 1996. Thermophilic *Campylobacter*: public health importance and observations. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* **17**:32–40.
 29. Kumar, A., R. K. Agarwal, K. N. Bhilegaonkar, B. R. Shome, and V. N. Bachil. 2001. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. *Inter. J. Food Microbiol.* **67**:153-155.
 30. Lau, S. K. P., P. C. Y. Woo, J. L. L. Teng, K. W. Leung, and K. Y. Yuen. 2002. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Mol. Pathol.* **55**:182–185.
 31. Linton, D., A. J. Lawson, R. J. Owen, and J. Stanley. 1996. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Res. Microbiol.* **147**:707–718.
 32. Mishu, A. B. 1997. Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barre' Syndrome. *J Infect. Dis.* **176(S.2)**:S125–128.

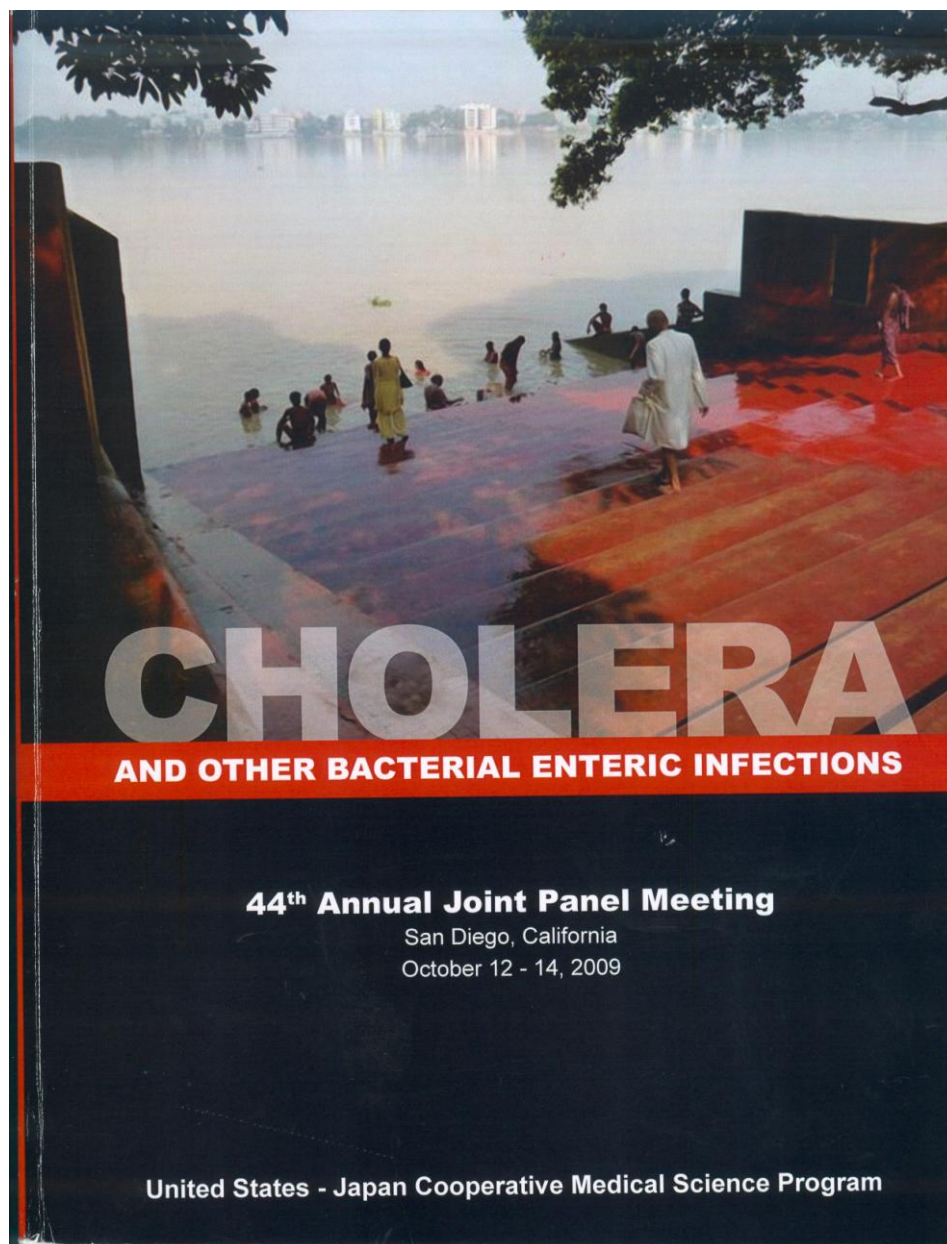
33. Moore, J. E., D. Corcoran, J. S. Dooley, S. Fanning, B. Lucey, M. Matsuda, D. A. McDowell, F. Mégraud, B. C. Miller, R. O'Mahony, L. O'Riordan, M. O'Rourke, P. J. Rooney, A. Sails, and P. Whyte. 2005. *Campylobacter*. Vet. Res. **36**:351-382.
34. Nachamkin, I., A. B. Mishu, and T. Ho. 1998. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. Clin. Microbiol. Rev. **11**:555-567.
35. Nachamkin, I., H. Ung, A. P. Moran, D. Yoo, M. M. Prendergast, M. A. Nicholson, K. Sheikh, T. W. Ho, A. K. Asbury, G. M. McKhann, and J. W. Griffin. 1999. Ganglioside GM1 mimicry in *Campylobacter* strains from sporadic infections in the United States. J. Infect. Dis. **179**:1183-9.
36. Oberhelman, R. A., and D. N. Taylor. 2000. *Campylobacter* infections in developing countries, p. 139-153. In I. Nachamkin, and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C.
37. Prouzet-Mauléon, V., L. Labadi, N. Bouges, A. Menard, and F. Megraud. 2006. *Arcobacter butzleri*: Underestimated Enteropathogen. Emerg. Infect. Dis. **12**:307-309.
38. Padungtod, P., J. B. Kaneene, R. Hanson, Y. Morita, and S. Boonmar. 2006. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food animals and humans in northern Thailand. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **47**:217-225.
39. Perelle, S., M. Josefsen, J. Hoorfar, F. Dilasser, J. Grout, and P. Fach. 2004. A lightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*. Mol Cell Probes **18**:321-327.
40. Rao, M. R., A. B. Naficy, S. J. Savarino, R. Abu-Elyazeed, T. F. Wierzbza, L. F. Peruski, I. Abdel-Messih, R. Frenck, and J. D. Clemens. 2001. Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. Am. J. Epidemiol. **154**:166-173.
41. Reina, J., M. J. Ros, and A. Serra. 1995. Evaluation of the API-campy system in the biochemical identification of hippurate negative *campylobacter* strains isolated from faeces. J. Clin. Pathol. **48**:683-685.
42. Samosornsuk, W., M. Asakura, E. Yoshida, T. Taguchi, K. Nishimura, B. Eampokalap, V. Phongsisay, W. Chaicumpa, and S. Yamasaki. 2007. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. Microbiol. Immunol. **51**:909-917.

43. Tauxe, R. V. 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, p.9-12. In I. Nachamkin, M. J. Blaser, and L. S. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni: Current and future trends*. ASM Press, Washington, D. C.
44. Taylor, D. N., J. A. Kiehlbauch, W. Tee, C. Pitarangsi, P. Echeverria. 1991. Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea. *J Infect Dis.* **163**:1062–7.
45. Tompkin, R. B., 1994. HACCP in the meat and poultry industry. *Food Control* **5**:153–160.
46. Varavithya, W., K. Vathanophas, L. Bodhidatta, P. Punyaratabandhu, R. Sangchai, S. Athipanyakom, C. Wasi, and P. Echeverria. 1990. Importance of *Salmonellae* and *Campylobacter jejuni* in the etiology of diarrheal disease among children less than 5 years of age in a community in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2507-2510.
47. Wright, J. R., S. S. Summer, C. R. Hackney, M. D. Pierson, and B. w. Zoecklein. 2000. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 on apples using wash and chemical sanitizer treatments. *Dairy Food Environ. Sanit.* 20:120-126.
48. Yan, J. J., W. C. Ko, A. H. Huang, H. M. Chen, Y. T. Jin, J. J. Wu. 2000. *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *J. Formos Med. Assoc.* 99:166–169.
49. Zhao, C., B. Ge, J. De Villena, R. Sudler, E. Yeh, S. Zhao, D. G. White, D. Wagner, and J. Meng. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5431–5436.

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่

ได้นำเสนอส่วนหนึ่งของงานวิจัยด้วยโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการ 44th Conference cholera and other Bacterial enteric infections US - Japan cooperative medical science program ณ San Diego, California วันที่ 12 – 14 ตุลาคม 2552



Salmonella and *Campylobacter* detection in vegetables in Thailand

Worada Samosornsuk¹, Seksun Samosornsuk¹, Apita Bunsiri²

¹Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand

²Postharvest Technology Center, RDI-KPS, Kasetsart University Kamphaensaen
Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

The main of this study was to detect *Salmonella* and *Campylobacter* by conventional method and PCR in 154 samples of four types of raw vegetables included cabbage, carrot, lettuce and cucumber. These samples were collected from one wet market and 4 supermarkets in Bangkok, Thailand during March and May 2009. The prevalences of *Salmonella* and *Campylobacter* in raw vegetables were 9.1% (14/154) and 5.8% (9/154), respectively. The wet market exhibited higher contamination of these bacteria than the supermarkets. For wet market, *Salmonella* contamination was found in lettuces (37.5%) and cabbages (25%) and *Campylobacter* contamination was found in lettuces (25%), carrots (25%) and cabbages (12.5%). For supermarkets, the highest *Salmonella* contamination was found in cabbages (8.6%), followed by lettuces (8.3%), carrots (6.8%) and cucumbers (5.9%) whereas the highest *Campylobacter* contamination was found in carrots (6.8%). The presence of these two human pathogens, which were difficult to isolate by conventional method, could be identified using PCR assay. This study revealed that raw or minimally processed vegetables can be contaminated with *Salmonella* and *Campylobacter*, leading to direct infection of consumers or cross contamination of other foodstuffs. These contaminated vegetables can represent a severe health risk for the Thai consumer. The further study of an appropriate method will be implemented to decontaminate these pathogens.



Salmonella and Campylobacter detection in vegetables in Thailand



Worada Samosornsuk¹, Seksun Samosornsuk¹, Apita Bunsiri²

¹Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand

²Postharvest Technology Center, RDI -KPS, Kasetsart University Kamphaensaen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

SUMMARY

The main of this study was to detect *Salmonella* and *Campylobacter* by conventional method and PCR in 154 samples of four types of raw vegetables included cabbage, carrot, lettuce and cucumber. These samples were collected from one wet market and 4 supermarkets in Bangkok, Thailand during March and May 2009. The prevalences of *Salmonella* and *Campylobacter* in raw vegetables were 9.1% (14/154) and 5.8% (9/154), respectively. The wet market exhibited higher contamination of these bacteria than the supermarkets did. For wet market, *Salmonella* contamination was found in lettuces (37.5%) and cabbages (25%) and *Campylobacter* contamination was found in lettuces (25%), carrots (25%) and cabbages (12.5%). For supermarkets, the highest *Salmonella* contamination was found in cabbages (8.6%), followed by lettuces (8.3%), carrots (6.8%) and cucumbers (5.9%) whereas the highest *Campylobacter* contamination was found in carrots (6.8%). The presence of these two human pathogens, which were difficult to isolate by conventional method, could be identified using PCR assay. This study revealed that raw or minimally processed vegetables can be contaminated with *Salmonella* and *Campylobacter*, leading to direct infection of consumers or cross contamination of other foodstuffs. These contaminated vegetables can represent a severe health risk for the Thai consumer. The further study of an appropriate method will be implemented to decontaminate these pathogens.

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Salmonella and *Campylobacter* can spread to salads and vegetables. The contamination in animals or vegetables may influence the acquisition of these isolates by humans. Ready-to-eat vegetables are served as the main food in most of the Thai people. The products, therefore, have to go through a production process that ensures they are clean and safe for consumption. Presently, GAP (Good Agricultural Practice) is applied to the industrial production from the beginning stage to the end - that is from a planting process to finished products ready to be on sales. Therefore, we investigated *Salmonella* and *Campylobacter* in ready-to-eat vegetables with and without GAP certification which were collected from wet market and supermarkets in Bangkok.



Figure 1. Wet market.



Figure 2. Supermarket

MATERIALS AND METHODS

VEGETABLES AND SAMPLING

A total of 154 vegetables was purchased from one wet market and 4 supermarkets in Bangkok, Thailand during March to May 2009 (Table 1).

LABORATORY PROCEDURES

Preparation of samples: Twenty-five grams of each sample were diluted in 225 ml of buffered peptone water for the enumeration of *Salmonella* and homogenized for 1 min at normal speed in stomacher. The sample is first cultured by direct plating. The enrichment broth was incubated at 37°C for 24h and then subcultured onto MSRV and incubate at 37°C for 24h (4). Homogenise another 25 g of sample in 225 ml of Bolton broth by stomaching. The enrichment broth was incubated at 37°C for 48h and then subcultured onto mCCDA and incubate at 37°C microaerobically for 48h.

Salmonella and Campylobacter Identification: Enriched broths were used as boiled templates for PCR assay. Incubated plates are examined and suspected colonies are identified. Identification of *Salmonella* was done using biochemical method and PCR for *iroB* (glycosyl transferase) (2) and *stn* (salmonella enterotoxin) (5) gene and *Campylobacter* species was confirmed by Gram stain and suspected colony was identified by *16S rRNA* gene based PCR for *Campylobacter* spp. (3) and multiplex *cdtB* gene based multiplex PCR for *C. jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* (6).

REFERENCES

- Baumler, A. J., R. Tsolis, A. W. M. van der Velden, I. Stojiljkovic, S. Anic, and F. Heffron. 1996. Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. Gene 183:207-213.
- Baumler, A.J., F. Heffron, R. Reissbrodt. 1997. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. J Clin Microbiol 35: 1224-1230.
- Chai, L. C., T. Robin, U. M. Ragavan, J. W. Gunsalam, F. A. Bakar, F. M. Ghazali, S. Radu and M. P. Kumar. 2007. Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia. Int J Food Microbiol 117:106-111.
- Kanki, M., J. Sakata, M. Taguchi, Y. Kumeda, M. Ishibashi, T. Kawai, K. Kawatsu, W. Yamasaki, K. Inoue, M. Miyahara. 2009. Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of preenrichment broths. Food Microbiol 26: 1-3.
- Makino, S., H. Kurazono, M. Chongsanguam, H. Hayashi, H. Cheun, S. Suzuki, T. Shirahata. 1999. Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. J Vet Med Sci 61: 1245-1247.
- Samosornsuk W., M. Asakura, E. Yoshida, T. Taguchi, K. Nishimura, B. Eampokalap, V. Phongsisay, W. Chaicumpa, and S. Yamasaki. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. Microbiol Immunol 51:909-17.
- Shanmugasundaram, M., M. Radhika, H. S. Murali, and H. V. Batra. 2009. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by selective amplification of *fliC*, *fliB*, *irxB*, *invA*, *rfaB*, STM2755, STM4497 genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format. World J Microbiol Biotechnol 25:1385-1394.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by research grants from Thailand Research Fund and Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University. We would like to thank Prof. Mitsuki Nishibuchi and Prof. Shinji Yamasaki for good advice and all their helps. We are very grateful to Chairman Dr. John D. Clemens and all members of the U.S. Cooperative Medical Science Program Panel on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections for travel support to present in poster at the 44th Joint Meeting and Conference of the United States-Japan Panel on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, to be held in San Diego, California from October 12-14, 2009.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 Results of *Salmonella* and *Campylobacter* in the samples analyzed.

Source	Vegetables (N)	<i>Salmonella</i>			<i>Campylobacter</i>		
		MSRV positive	PCR for <i>iroB</i>	Total (%)	PCR for <i>16S rRNA</i>	PCR for <i>cdtB</i>	Total (%)
Wet market (n = 32)	Lettuce (8)	-	3	3 (37.5)	2	1 (<i>C. coli</i>)	2 (25.0)
	Cucumber (8)	-	-	-	-	-	-
	Cabbage (8)	-	2	2 (25.0)	1	-	1 (12.5)
	Carrot (8)	-	-	-	2	1 (<i>C. coli</i>)	2 (25.0)
Supermarket (n = 122)	Lettuce (24)	1	2	2 (8.3)	-	-	-
	Cucumber (34)	-	2	2 (5.9)	2	-	2 (5.9)
	Cabbage (35)	1	3	3 (8.6)	-	-	-
	Carrot (29)	-	2	2 (6.8)	2	-	2 (6.8)

Table 2 *Salmonella* and *Campylobacter* positive isolates.

Positive Vegetables	Sample No.	<i>Salmonella</i> (n)			<i>Campylobacter</i> (n)	
		MSRV positive	PCR for <i>stn</i>	PCR for <i>iroB</i>	PCR for <i>16S rRNA</i>	PCR for <i>cdtB</i>
Lettuce	166	1	1	1	-	-
	179	-	-	1	-	-
Cucumber	161	-	-	1	1	-
	177	-	-	1	-	-
	79	-	-	-	1	-
Cabbage	173	1	1	1	-	-
	174	-	-	1	-	-
	159	-	-	1	-	-
Carrot	172	-	-	1	-	-
	158	-	-	1	-	-
	20	-	-	-	1	-
	21	-	-	-	1	-

This study, *Salmonella* and *Campylobacter* were detected more in wet market than in supermarket. The products sold in supermarket have to go through a production process that ensures they are clean and safe for consumption. Mostly, ready-to-eat vegetables received GAP (Good Agricultural Practice) certification. *Salmonella* detected by PCR from enriched broths were positive only for *iroB* but not for *stn* gene. Two samples included lettuce 166 and cabbage 173 were isolated *Salmonella* from MSRV agar and detected by PCR for *iroB* and *stn* gene. The gene *iroB* was *S. enterica* group-specific and this codes for glycosyltransferase which were amplified in all the 58 *Salmonella* standard serovars tested and also in all the 7 *Salmonella* isolates (6). This gene isolated from serotype *S. Typhi*, was shown to be located in a large DNA region which is absent from the *E. coli* chromosome (1). Prager et al. (1995) reported that *stn* gene is prevalent among strains of *S. enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other *Enterobacteriaceae*. This study, *Salmonella* detection from enriched broth for *iroB* based PCR is more sensitive than *stn* gene based PCR. This may be due to the capability of *iroB* for detection of more *Salmonella* strains. *Campylobacter* spp. not *C. jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* were detected in vegetables. However, this strain will be further confirmed by *16S rRNA* gene sequencing. Although the number of positive samples was small, however, this study provides the opportunity of these bacterial contamination in ready-to-eat vegetables in Thailand. Good hygiene practice should be implemented by producers and processors in order to prevent contamination and bacterial growth.

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

ระดับชาติ

1. การถ่ายทอดเทคโนโลยีซึ่งงานวิจัยพืชผลหลังเก็บเกี่ยวมีการจัดอบรมวิทยากรหลังการเก็บเกี่ยวให้กับบริษัทส่งออก ผู้สนใจทั่วไป ข้าราชการ อาจารย์ และ ผู้ประกอบการ รุ่นที่ 30 เรื่อง อันตรายจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนกับการเกิดโรคของมนุษย์ และ การใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเชื้อ (ภาคสาธิต) ณ ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน ระหว่างวันที่ 19-22 พฤษภาคม 2552
2. การถ่ายทอดเทคโนโลยีซึ่งงานวิจัยพืชผลหลังเก็บเกี่ยวมีการจัดอบรมวิทยากรหลังการเก็บเกี่ยวให้กับบริษัทส่งออก ผู้สนใจทั่วไป ข้าราชการ อาจารย์ และ ผู้ประกอบการ รุ่นที่ 33 เรื่อง อันตรายจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนกับการเกิดโรคของมนุษย์ และ การใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเชื้อ (ภาคสาธิต) ณ ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน ระหว่างวันที่ 24-27 พฤษภาคม 2553

ระดับนานาชาติ

1. ได้นำเสนอส่วนหนึ่งของงานวิจัยด้วยโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการ 44th Conference cholera and other bacterial enteric infections US - Japan cooperative medical science program ณ San Diego, California วันที่ 12 – 14 ตุลาคม 2552
2. การถ่ายทอดเทคโนโลยีซึ่งสำนักเสริมและฝึกอบรม กำแพงแสน ร่วมกับสำนักงานความร่วมมือระหว่างประเทศ (TICA) และ องค์การความร่วมมือระหว่างประเทศญี่ปุ่น (JICA) จัดฝึกอบรมนานาชาติหลักสูตร “post-harvest Technology of perishable crops” งานวิจัยพืชผลหลังเก็บเกี่ยวมีการจัดอบรมวิทยากรหลังการเก็บเกี่ยวให้กับบริษัทส่งออก ผู้สนใจทั่วไป ข้าราชการ อาจารย์ และ ผู้ประกอบการ รุ่นที่ 30 เรื่อง อันตรายจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนกับการเกิดโรคของมนุษย์ และ การใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเชื้อ (ภาคสาธิต) ณ ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน ระหว่างวันที่ 11 มกราคม -19 กุมภาพันธ์ 2553

3. จัดทำ manuscript เพื่อตีพิมพ์ผลงานวิชาการ ในวารสารต่างประเทศ ในหัวข้อเรื่อง Survey of *Campylobacter* contamination of vegetables in wet markets and supermarkets in Bangkok (อยู่ระหว่างการรอตอบรับ)

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมา	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
1. เพื่อตรวจหาเชื้อ <i>Campylobacter</i> ที่ปนเปื้อนในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพฯ	สุ่มตัวอย่างผักสลัดตัดแต่งเสร็จในภาชนะบรรจุพร้อมบริโภคจากซูเปอร์มาร์เก็ต และตรวจหาเชื้อ <i>Campylobacter</i>	สุ่มผักกะหล่ำปลี แครอท แตงกวา ผักกาดหอม ทั้งในตลาดสด และ ซูเปอร์มาร์เก็ต จำนวน 210 ตัวอย่าง ตรวจหาเชื้อ <i>Campylobacter</i> ด้วยวิธีเพาะเชื้อ และวิธี <i>16S rRNA</i> -based PCR และ <i>cdtB</i> gene-based multiplex PCR ไม่สามารถแยกได้จากการเพาะเชื้อ แต่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี <i>16S rRNA</i> -based PCR และ <i>cdtB</i> gene-based multiplex PCR	ไม่สามารถแยกได้จากการเพาะเชื้อ แต่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี <i>16S rRNA</i> -based PCR และ <i>cdtB</i> gene-based multiplex PCR จำนวน 5 ตัวอย่าง การใช้วิธีการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจหาเชื้อ <i>Campylobacter</i> ได้ดีกว่าการใช้วิธีการเพาะเชื้อ
2. เพื่อพัฒนาเทคนิคซึ่งสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Campylobacter</i> ในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคโดยการตรวจสอบยีนที่สร้างสารพิษที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงกับผู้ป่วยโดยตรง	พัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Campylobacter</i> ในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภค โดยการตรวจสอบยีนที่สร้างสารพิษที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงกับผู้ป่วยโดยตรง	ทำการเพาะเชื้อ <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. fetus</i> ในผักให้ได้ปริมาณก่อนนับมเพาะเชื้อ เท่ากับ 10^1 , 10^0 และ 10^{-1} โคโลนี ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 30 และ 48 ชม. และตรวจหา <i>Campylobacter</i> ด้วยการเพาะเชื้อและเทคนิค <i>16S rRNA</i> -based PCR for และตรวจหา <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. fetus</i> ด้วยวิธี <i>cdtB</i> gene-based multiplex PCR	การใช้เทคนิค PCR ง่ายและรวดเร็วกว่าการเพาะเชื้อ 2 วัน
3. เพื่อจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ <i>Campylobacter</i> ด้วยเทคนิค <i>cdt</i> gene-based multiplex PCR ที่ปนเปื้อนในผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร	นำเชื้อ <i>Campylobacter</i> มาตรวจแยกสายพันธุ์	แยกชนิดของเชื้อที่ให้ผลบวกต่อ <i>16S rRNA</i> -based PCR ด้วยวิธี <i>cdtB</i> gene-based multiplex PCR เพื่อแยก <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> และ <i>C. fetus</i> เชื้อที่ให้ผลลบ จะนำไปตรวจยืนยันด้วย <i>16S rRNA</i> gene sequencing	เชื้อที่ตรวจได้ ประกอบด้วย <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. fetus</i> และ <i>Arcobacter butzleri</i>
4. เพื่อให้ทราบกระบวนการที่เหมาะสมในการจัดการผักสลัดตัดแต่งพร้อมบริโภคเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Campylobacter</i>	4.1 ทำการสุ่มตัวอย่างจากไร่หรือบริษัทที่ตรวจพบเชื้อ <i>Campylobacter</i> นำมาทำการตรวจหาเชื้อ <i>Campylobacter</i> 4.2 นำตัวอย่างจากข้อ 4.1 มาผ่านกระบวนการผลิตจากงานวิจัยพืชผลหลังเก็บเกี่ยวมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และนำมาทำการตรวจหาเชื้อ <i>Campylobacter</i> ซ้ำอีกครั้ง	พัฒนากระบวนการผลิตและผลิตผักสลัดตัดแต่งเสร็จในภาชนะบรรจุพร้อมบริโภค	วิธีการจัดการที่เรียกว่า chlorine peroxyacetic acid treatment ของศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวสามารถลดการปนเปื้อนเชื้อ <i>Campylobacter</i> ได้

Survey of *Campylobacter* contamination of vegetables in wet markets and supermarkets in Bangkok

Worada Samosornsuk^{*1}, Seksun Samosornsuk¹, Apita Bunsiri², Shinji Yamasaki³, Shiramaru Sachi³, Masahiro Asakura³

¹Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Pathumthani, 12121, Thailand,

*Email: sworada@hotmail.com

²Postharvest Technology Center, RDI-KPS, Kasetsart University Kamphaensaen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan

Abstract

The aim of this study was to investigate *Campylobacter* contamination by conventional culture method and PCR in 210 samples of four types of raw vegetables including cabbage, carrot, lettuce and cucumber. These samples were collected from 1 wet market and 4 supermarkets in Bangkok and 1 wet market and 2 supermarkets nearby Bangkok, Thailand during March to August 2009. *Campylobacter* was found in 2 samples (0.95%) from a cabbage in a supermarket and a carrot in a wet market. This study was also able to identify 3 samples as *Arcobacter butzleri* from one carrot and 2 lettuces. The wet market exhibited higher contamination of these bacteria than the supermarkets. The presence of these organisms was difficult to isolate by conventional method, however, it could be isolated and identified by our cultural and PCR assay. This study revealed that raw vegetables can be contaminated with *Campylobacter* and may be the source of cross contamination of other foodstuffs which will lead to the infection of consumers. These contaminated vegetables can represent a severe health risk for the Thai consumer.

Keywords: *Campylobacter*, vegetables, Bangkok

Introduction

Foodborne gastroenteritis caused by *Campylobacter* spp. is a major public health concern in many countries. *Campylobacter*s are the most common registered bacterial causes of diarrhea in young adult in developed

countries and in children age less than 5 years in developing countries (Varavithya et al., 1990; Oberhelman and Taylor, 2000; Coker et al., 2002; Padungtod et al., 2006). *Campylobacter* infection of major public health importance is due to *C. jejuni* and *C. coli* (Jacobs-Reitsma, 2000). Food-borne

outbreaks caused by *Campylobacter* spp. have been reported infrequently (Centers for Disease Control, 2000). The common risk factor of *Campylobacter* infection is believed to be travel abroad, contaminated drinking water, contact with pet animals, food of animal origin such as raw milk and poultry meat (Schorr et al., 1994; Solomon and Hoover, 1999; Osano and Arimi, 1999; Kalman et al., 2000; Rautelin and Hanninen, 2000; Hanninen et al., 2003). The study of Samosornsuk's group in 2009 (Samosornsuk et al., unpublished) revealed that risk factor of consuming meat including chicken, pork, and beef was not significantly related to *Campylobacter* infection whereas consuming fresh vegetables was the risk factor related to *Campylobacter* infection in children aged less than 5 years. The use of raw manure as a fertilizer gives rise to a high risk of bacterial contamination of fresh produce, and has resulted in several outbreaks of food-borne disease (Nelson, 1997; Guan and Holley, 2003). Outbreak of *Campylobacter* illness associated with contaminated fruits, vegetables, or other produce-related products are quite rare (Beuchat, 1996; Jacobs-Reitsma, 2000). However, the Center for Disease Control (2000) has recorded 18 outbreaks of *Campylobacter* enteritis associated with produce worldwide from 1990 to 2001. *Campylobacter* is a notoriously difficult organism to culture and maintain in the laboratory (Solomon and Hoover, 1999). Currently, *campylobacter* is identified using

selective culture media and a confirmatory series of biochemical tests. These methods are expensive and time-consuming (Todor, 2004). Recently Polymerase Chain Reaction (PCR) based methods for *campylobacter* detection have become popular. Continuing research on PCR based methods has improved the accuracy and sensitivity of these tests (Englen and Fedorka-Cray, 2002 and Wang et al., 2002). In this study, we developed a most probable number (MPN) enumeration protocol for thermophilic *Campylobacter* spp., along with the identification of campylobacters by using a species-specific PCR technique. The rapid PCR identification step combined with the most probable number (MPN) method.

Ready-to-eat vegetables are served as the common food in most of Thai people. In Thailand, several types of vegetables are consumed in salad recipes and popular dish like green papaya salad named Som Tum as well. The vegetables are purchased from either wet markets or supermarkets. Supermarkets or hypermarkets generally offer foods under conditions that appear more hygienic than those in wet markets as foodstuffs and are packed before display. The products, therefore, have to go through a production process that ensures they are clean and safe for consumption. Presently, GAP (Good Agricultural Practice) is applied to the industrial production from the beginning stage to the end - that is from a planting process to finished products ready to be on sales. However, the hygienic condition and foodstuff

handling methods in the packing facilities may be poor. Therefore, the prevalences and number of campylobacters in raw vegetables with and without GAP certification from supermarkets and wet markets in Bangkok and nearby area of Thailand were determined.

1. Materials and methods

Vegetable samples and bacterial strains

A total of 210 vegetables was purchased from 8 locations in Bangkok and nearby area; one wet market and 4 supermarkets and 3 locations in nearby area consisting one wet market and 2 supermarkets during March to August 2009 (Table 1). *E. coli* C600 was grown on LB agar plate was used as negative control for PCR. Three reference strains including *C. jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC 33559, and *C. fetus* ATCC 27374 were used as positive control for culture and PCR.

Laboratory procedure

Culture procedures for isolation and enumeration of *Campylobacter* spp.

Determination of *Campylobacter* was performed by the following method (Chai et al, 2007). Twenty-five grams of chopped sample were put in 225 ml of *Campylobacter* enrichment broth with supplement (Bolton formula, Oxoid) in a stomacher bag. After stomaching for 60 s, 10 fold and 100 fold dilutions of the stomacher fluid were prepared and a 1 mL portion of the undiluted and each dilution of the fluid were inoculated into three tubes, each containing 9 mL of *Campylobacter* enrichment broth with supplement. For MPN

analysis, the tubes were incubated at 37°C for 48 h under microaerophilic condition (10% CO₂, 5% O₂ and 85% N₂). Tubes were observed for positive or negative by turbidity. Portions (0.2 ml) of the turbid and *Campylobacter* spp. PCR-positive tubes were used as boiled templates for PCR assay and also plated on *Campylobacter* modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate blood-free selective agar (mCCDA; Oxoid) in duplicate. The plates were incubated under microaerophilic condition at 37°C for 48 h.

Conventional methods for identification of *Campylobacter* spp.

Incubated plates are examined and suspected colonies are identified. For initial identification from mCCDA agar plate, Gram staining and oxidase test were performed. Oxidase-positive colonies exhibiting Gram-negative curved to S-shaped rod on selective media at 42°C under microaerobic condition can be reliably reported as *Campylobacter*-like organisms. The *16S rRNA* gene-based PCR and *cdtB* gene-based multiplex PCR were used for confirmation and species identification of *Campylobacter*.

PCR. *RBC Taq* polymerase was purchased from RBC Bioscience corp., Taiwan. All primers were obtained from Bio Basic Inc. (Ontario, Canada). *16S rRNA* gene-based PCR for detection of *Campylobacter* spp. (Linton et al, 1996) and *cdtB* gene-based multiplex PCR (Asakura et al, 2008) for detection of *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* was performed by PCR primers and conditions

summarized in Table 2. Template DNA was prepared by the boiling method. Briefly, bacterial precipitation from 1 ml of enriched broth or a loopful of bacteria collected from agar plate was suspended in 500 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA [pH 8.0]) followed by boiling of the suspension for 10 min, centrifugation at 12,800 X g for 5 min and 2 µl of supernatant was used as a PCR template. All reactions contained appropriate concentration of the primer sets (Table 2), 0.2 mM each of dNTPs, 1 X *Taq* DNA polymerase buffer, and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase in 50 µl reaction volume. PCR was carried out in a final volume of 50 µl containing 1X *RBC Taq* polymerase buffer with MgCl₂ as described in Table 2, Amplification was performed on a G-Storm GS482 Thermal Cycler (Gene Technology Co., UK) and PCR products were analyzed by 1% agarose gel (for *16S rRNA* gene-based PCR) and 2% agarose gel electrophoresis (for *cdtB* gene-based multiplex PCR) in 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate [pH 8.5], 1 mM EDTA) at voltages of 100V for 30 min and bands were visualized with UV light after staining with 1.0 µg/ml of ethidium bromide (Sigma) for 10 min and destaining with DW for 10 min. Images

were captured on a Bio-Rad Gel Doc system (Bio-Rad).

3. Results

A total of 210 samples of raw vegetables were examined for the prevalence and number of *Campylobacter* spp. using 2 sets of specific PCR were run in the study. Fig. 1 shows a representative gel electrophoresis of the PCR amplification of *16S rRNA* gene and Fig. 2 shows a representative gel electrophoresis of the multiplex PCR of *cdtB* gene. The prevalences of *Campylobacter*-like strains are summarized in Table 3. All *Campylobacter*-like strains were recovered from only 5 of 210 (2.4%) samples positive for *Campylobacter* spp. by PCR. The average prevalence of *Campylobacter*-like strains in raw vegetables from these 8 locations was detected in 2 locations included one wet market in Bangkok area and one supermarket in nearby area (Table 3). Among the four types of vegetable sampling from each positive retailed outlets, lettuce, carrot and cabbage were detected *Campylobacter*-like strains as 25%, 25%, and 20% respectively while cucumber was not detected these contaminants in all samples.

Table 1. Types and numbers of vegetable tested for the prevalence and numbers of *Campylobacter*

English name	Local name	Scientific name	Number of samples (n)
Cabbage	Kalumlee	<i>Brassica oleracea</i> <i>L.var.capitata</i>	58
Carrot	Carrot	<i>Daucus Carota</i>	49
Cucumber	Tangkua	<i>Cucumis sativus</i>	57
Lettuce	Pakkadhom	<i>Lactuca sativa</i>	46

TABLE 2. PCR primers and conditions used for the detection of *Campylobacter* species.

Target gene and Primer Sequence Target	MgCl ₂ conc. (mM)	Amount of <i>Taq</i> (U)	Primer conc. (μM)	PCR conditions			No. of cycles	Amplicon size (bp)	Reference
				Denaturing	Annealing	Extension			
<i>16S rRNA</i> gene for <i>Campylobacter</i> spp.									
C412F: 5'-GGA TGA CAC TTT TCG GAG C-3'	2.5	0.625	0.4	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 30 s	25	816	Linton et al, 1996
C1288R: 5'-CAT TGT AGC ACG TGT GTC-3'									
<i>C. jejuni cdtB</i> gene									
Cj-CdtBU5: 5'-ATC TTT TAA CCT TGC TTT GC-3'	2.5	1.25	0.125	94°C, 30 s	56°C, 30 s	72°C, 30 s	30	714	Asakura et al,2008
Cj-CdtBR6: 5'-GCA AGC ATT AAA ATC GCA GC-3'									
<i>C. coli cdtB</i> gene									
CcCdtBU5: 5'-TTT AAT GTA TTA TTT GCC GC-3'	(same as <i>C. jejuni</i>)		0.15		(same as <i>C. jejuni</i>)			413	
CcCdtBR5: 5'-TCA TTG CCT ATG CGT ATG-3'									
<i>C. fetus cdtB</i> gene									
CfCdtBU6: 5'-GGC TTT GCA AAA CCA GAA G-3'	(same as <i>C. jejuni</i>)		0.25		(same as <i>C. jejuni</i>)			553	
CfCdtBR3: 5'-CAA GAG TTC CTC TTA AAC TC-3'									

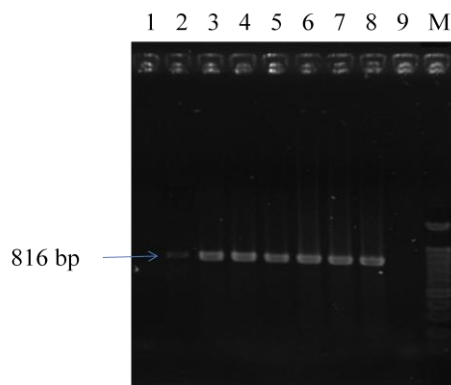


Fig. 1. Representative amplification of the *16S rRNA* for the identification of *Campylobacter* spp. Lanes 2 to 8 show the PCR amplicons specific for *Campylobacter* spp. at 816 bp. Lane M shows the 100 bp DNA ladder, Lane 1 DNA from a MPN broth (negative for *Campylobacter* spp.), Lanes 2 to 5 DNA from a MPN broth (positive for *Campylobacter* spp.), Lane 6 *C. jejuni* ATCC 33560, Lane 7 *C. fetus* ATCC27374, Lane 8 *C. coli* ATCC33559 and Lane 9 *E. coli* C600 (negative control).

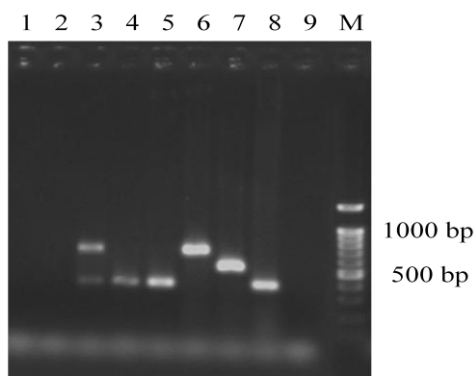


Fig. 2. Representative amplification of the *cdtB* for the identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*. Lane M shows the 100-bp DNA ladder, lanes 1 and 2 DNA from a MPN broth (negative for *C. jejuni*, *C. coli* and *C. fetus*), Lane 3 DNA from a MPN broth

positive for *C. jejuni* (714 bp) and *C. coli* (413 bp), Lanes 4 and 5 DNA from a MPN broth positive for *C. coli* (413 bp), Lane 6 *C. jejuni* ATCC 33560 (714 bp), Lane 7 *C. fetus* ATCC27374 (553 bp), Lane 8 *C. coli* ATCC33559 (413 bp) and Lane 9 *E. coli* C600 (negative control).

Among the individual species, *C. coli* were detected in cabbage from a supermarket nearby Bangkok and a carrot from wet market in Bangkok with MPN 3.6 while *C. jejuni* was detected in a cabbage from supermarket nearby Bangkok with the MPN <3.0 (Table 4). One positive cabbage sample was found to carry both *C. jejuni* and *C. coli*. *Campylobacter* spp. neither *C. jejuni*, *C. coli*, nor *C. fetus* were detected in 3 vegetable samples included 2 lettuces and 1 carrot from wet market in Bangkok with the MPN <3.0, <3.0, and 3, respectively. These strains were identified as *Arcobacter butzleri* after confirming by *16S rRNA* gene sequencing. *C. jejuni* and *C. coli* were usually present together in the *Campylobacter* spp. positive samples. The number of *C. jejuni* in cabbage from supermarket NBSII was < 3.0. The numbers of *C. coli* in cabbage from supermarket NBSII and carrot from wet market BWI were < 3.0 and 3.6, respectively.

4. Discussion

The prevalence of campylobacters in vegetables from supermarkets and wet markets in Bangkok or nearby areas were found only in low rate. This data was similar to other studies of campylobacters in raw vegetables which

were found only low incidences or no *Campylobacter* (Park and Sanders, 1992; Odumeru et al., 1997; Kumar et al, 2001; Moore et al, 2005). For example, Park and Sanders (1992) detected only 1.7% prevalence of *Campylobacter* spp. in fresh produce from farmers' outdoor market and no *Campylobacter* spp. was detected in samples from supermarket. The high incidence of *Campylobacter* spp. in the fresh produce was unexpected because *Campylobacter* spp. are thought to survive poorly and cannot grow well on these commodities (Kumar et al, 2001). All *Campylobacter*-like strains including *Campylobacter* and *Arcobacter* in this study were recovered from only 5 out of 210 (2.4%) samples positive for *Campylobacter* spp. by PCR. The lack of appropriate methods for recovery of *Campylobacter* from produce samples may explain some of the reported low incidence of campylobacters in vegetables. The MPN-PCR method used in this study was evidently more effective for detecting campylobacters than was plating after enrichment. According to Hazeleger et al. (1994), *Campylobacter* spp. may not be isolated from PCR-positive samples by conventional culture methods because the organisms are present in a non-cultivable coccoidal form. There was no investigation in this study of the possible presence of the coccoidal form of *Campylobacter* spp. in the samples. Nonetheless, the conventional culturing method was evidently unsuitable for determining the prevalence and number of *Campylobacter* spp. in the samples. The

contamination of *Arcobacter butzleri* was found in vegetables samples in this study. *Campylobacter* and *Arcobacter* are classified in the Family *Campylobacteraceae*. *A. butzleri* is found in environmental samples, and untreated water appears to be a potential source of infection. The French surveillance network of *Campylobacter* infections identified 29 *A. butzleri* infections from 2,855 strains of *Campylobacter*-like organisms (Prouzet-Mauléon et al, 2006). This species ranks fourth for *Campylobacteraceae* isolation. Taylor et al (1991) identified *A. butzleri* in 2.4% of diarrheal stool samples collected from Thai children. The *Arcobacter* 16S *rRNA* gene sequences differed considerably from those of *Campylobacter* spp., with only 86.2% identity with *C. coli* and 85.6% identity with *C. fetus* (Prouzet-Mauléon et al, 2006). With the same 16S *rRNA* gene primer (Linton et al, 1996) for doing PCR as in this study, Chai et al (2007) reported the high prevalence of *Campylobacter* spp. (51.9%) in vegetables of Malaysia. This report may be overestimated because some strain may be *A. butzleri* as evidence from our study. Therefore, the designation of 16S *rRNA* gene primer should be careful for selecting a part of consensus sequence of these *Campylobacter* - like organisms. *Campylobacter* and *Arcobacter* mainly reside in intestinal tract of warm-blooded animals and birds and the excreta may contaminate the environment with the organisms (Franco, 1998; Khanna et al, 1996). The isolation of *Campylobacter* and *Arcobacter* from vegetables in our study indicates the contamination with faecal

Table 3. Number and positive of *Campylobacter* spp. from raw vegetables in wet markets and supermarkets in Bangkok or nearby areas.

Vegetable	Positive samples													
	Bangkok							Nearby Bangkok						
	Wet market			Supermarket				Wet market			Supermarket			
	BWI	%	No.	BSI	%	No.	%	BSII	%	No.	BSIII	%	No.	%
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	BSIV	%	No.	%
Cabbage	(0/8)	0.0	(0/11)	0.0	(0/10)	0.0	(0/8)	0.0	(0/6)	0.0	(0/6)	0.0	(0/4)	0.0
Carrot	(2/8)	25.0	(0/6)	0.0	(0/8)	0.0	(0/8)	0.0	(0/8)	0.0	(0/7)	0.0	(0/5)	0.0
Cucumber	(0/8)	0.0	(0/8)	0.0	(0/8)	0.0	(0/8)	0.0	(0/8)	0.0	(0/10)	0.0	(0/6)	0.0
Lettuce	(2/8)	25.0	(0/6)	0.0	(0/7)	0.0	(0/5)	0.0	(0/6)	0.0	(0/6)	0.0	(0/5)	0.0
Average	(4/32)	25.0	(0/31)	0.0	(0/33)	0.0	(0/29)	0.0	(0/29)	0.0	(0/21)	0.0	(0/20)	0.0
													(1/15)	6.7

(), number of positive samples/number of samples plated; BWI, Bangkok wet market I; BSI, Bangkok supermarket I; BSII, Bangkok supermarket II; BSIII, Bangkok supermarket III; BSIV, Bangkok supermarket IV; NBWI; Nearby Bangkok wet market I; NBSI, Nearby Bangkok supermarket I; NBSII, Nearby Bangkok supermarket II.

Table 4. Most probable numbers (MPN/g), number and percent positive of *C. jejuni*, *C. coli* and *Campylobacter* spp. from raw vegetables of wet market and supermarket in Bangkok or nearby area.

Location	Vegetables	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>				<i>Campylobacter</i> spp. ^b			
		No.	%	MPN/g	No.	%	MPN/g	No.	%	No.	%	MPN/g	No.
NBSII	Cabbage ^a	1/5	20.0	< 3.0	1/5	20	< 3.0	0	0	0	0.0		
BWI	Carrot	0/8	0.0	0.0	1/8	12.5	3.6	1/8	12.5	< 3.0			
	Lettuce	0/8	0.0	0.0	0/8	0/8	0.0	2/8	25.0	<3.0-3			

^a Accredited (GAP), ^b These strains were identified as *Arcobacter butzleri* by 16S *rRNA* gene sequencing methods.

material of these commodities at any stage from point of production to sale. The finding of *Campylobacter* contamination was able to detect in ready-to-eat vegetables with GAP certification from supermarkets suggests that cross-contamination might occur at the holding and packaging stage in the supermarkets or the sale representative company before sending to supermarkets. Butzler and Oosterman (1991) have also reported that vegetables might become contaminated if they came in contact with natural fertilizers or contaminated waters. In some instances, *C. jejuni* has been isolated from raw vegetables which were in contact with the utensils used to keep the raw chicken, the main reservoir of *C. jejuni* (De-Boer and Hahne, 1990).

5. Conclusion

Although *Campylobacter* spp. were detected only in low rate in products from some locations, it indicates that raw vegetables from both wet market and supermarket with or without GAP certification in Thailand might possibly be contaminated with campylobacters and becomes a health risk to consumers. Therefore, monitoring of product at the retail level would be desirable. However, further investigation is needed to identify possible contamination source of *Campylobacter* spp. on vegetables.

6. Acknowledgements

This study was supported by funds from Thai Research Fund, Thailand. We wish

to thank Prof. Dr. Sanit Makonkawkeyoon for critical reading of the manuscript.

7. References

1. Asakura, M., W. Samosornsuk, A. Hinenoya, N. Misawa, K. Nishimura, A. Matsuhisa, and S. Yamasaki. 2008. Development of cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 52:260-6.
2. Beuchat, L. R. 1996 Pathogenic microorganisms associated with fresh produce, J. Food Prot. 59:204–216.
3. Butzler, J. P. and J. Oosterman. 1991. *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. Int. J. Food Microbiol. 12:1–8.
4. Centers for Disease Control. 2000. Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Foodborne Disease Outbreak Line Listing, 1990–1999. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/outbreak/us_outb.htm.
5. Chai, L. C., T. Robin, U. M. Ragavan, J. W. Gunsalam, F. A. Bakar, F. M. Ghazali, S. Radu, and M. P. Kumar. 2007. Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia. Int. J. Food Microbiol. 117:106-111.
6. Coker A. O., R. D. Isokpehi, B. N. Thomas, K. O. Amisu, and C. L. Obi. 2002. Human campylobacteriosis in developing countries. Emerg. Infect. Dis. 8:237-243.

7. De-Boer, E. and M. Hahne. 1990. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. J. Food Prot. **53**:1063–1068.
8. Englen, M. D. and P. J. Fedorka-Cray. 2002. Evaluation of a commercial diagnostic PCR for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, Lett. Appl. Microbiol. **35**:353–356.
9. Franco, D. A., 1998. *Campylobacter* species: considerations for controlling a foodborne pathogen. J. Food Prot. **51**:145–153.
10. Guan, T. Y. and R. A. Holley. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness: a review, Journal of Environmental Quality. **32**:383–392.
11. Hanninen, M. L., H. Haajanen, T. Pummi, K. Wermundsen, M. L. Katila, H. Sarkkinen, I. Miettinen, and H. Rautelin. 2003. Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. Appl. Environ. Microbiol. **69**. 1391-1396.
12. Hazeleger, W., C. Arkesteijin, A. Toorop-Bouma and R. Beumer. 1994. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. Inter. J. Food Microbiol. **24**:273–281.
13. Jacobs-Reitsma, W. 2000. *Campylobacter* in the food supply. In I. Nachamkin and M. J. Blaser, Editors, *Campylobacter*, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. pp. 467–481.
14. Kalman, M., E. Szollosi, B. Czermann, M. Zimanyi, and S. Szekeres. 2000. Milkborne *Campylobacter* infection in Hungary. J. Food Prot. **63**:1426-1429.
15. Khanna, P. N., A. Kumar, A. K. Singh, and I. A. Khan. 1996. Thermophilic *Campylobacter*: public health importance and observations. Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis. **17**:32–40.
16. Kumar, A., R. K. Agarwal, K. N. Bhilegaonkar, B. R. Shome, and V. N. Bachil. 2001. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. Inter. J. Food Microbiol. **67**:153-155.
17. Linton, D., A. J. Lawson, R. J. Owen and J. Stanley. 1996. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. Res. Microbiol. **147**:707–718.
18. Moore, J. E., D. Corcoran, J. S. Dooley, S. Fanning, B. Lucey, M. Matsuda, D. A. McDowell, F. Mégraud, B. C. Miller, R. O'Mahony, L. O'Riordan, M. O'Rourke, P. J. Rooney, A. Sails, and P. Whyte. 2005. *Campylobacter*. Vet. Res. **36**:351-382.
19. Nelson, H. 1997. The Contamination of Organic Produce by Human Pathogens in Animal Manures. Available at: http://www.eap.mcgill.ca/SFMC_1.htm
20. Oberhelman, R. A., and D. N. Taylor. 2000. *Campylobacter* infections in developing countries, In I. Nachamkin,

- and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C. pp. 139-153.
21. Odumeru, J. A., S. J. Mitchell, D. M. Alves, J. A. Lynch, A. J. Yee, S. L. Wang, S. Styliadis, and J. M. Farber. 1997. Assessment of microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. *J. Food Prot.* 60: 954–960.
 22. Osano, O., and S. Arimi. 1999. Retail poultry and beef as sources of *Campylobacter jejuni*. *East Afr. Med. J.* 76:141-143.
 23. Padungtod, P., J. B. Kaneene, R. Hanson, Y. Morita, and S. Boonmar. 2006. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food animals and humans in northern Thailand. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47:217-225.
 24. Park, C. E. and G. W. Sanders. 1992. Occurrence of thermotolerant *campylobacters* in fresh vegetables sold at farmers' outdoor markets and supermarkets, *Can. J. Microbiol.* 38:313–316.
 25. Prouzet-Mauléon, V., L. Labadi, N. Bouges, A. Menard, and F. Megraud. 2006. *Arcobacter butzleri*: Underestimated Enteropathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 12:307-309.
 26. Rautelin, H. and M. L. Hanninen. 2000. *Campylobacters*: the most common bacterial enteropathogens in Nordic countries. *Ann. Med.* 32:440–445.
 27. Schorr, D., H. Schmid, H. L. Rieder, A. Baumgartner, H. Vorkauf and A. Burnens. 1994. Risk factors for *Campylobacter* enteritis in Switzerland, *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 196:327–337.
 28. Solomon, E. B. and D. G. Hoover. 1999. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox, *J. Food Safety* 19:121–136.
 29. Taylor, D. N., J. A. Kiehlbauch, W. Tee, C. Pitarangsi, and P. Echeverria. 1991. Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea. *J Infect Dis.* 163:1062–7.
 30. Todor, T. S. 2004. Detection of *Campylobacter* using standard culture and PCR of *16S rRNA* gene in freshly chilled poultry and poultry products in a slaughterhouse, *Trakia J. Sci.* 2:59–64.
 31. Varavithya, W., K. Vathanophas, L. Bodhidatta, P. Punyaratabandhu, R. Sangchai, S. Athipanyakom, C. Wasi, and P. Echeverria. 1990. Importance of *Salmonellae* and *Campylobacter jejuni* in the etiology of diarrheal disease among children less than 5 years of age in a community in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 28:2507-2510.
 32. Wang, G., C. G. Clark, T. M. Taylor, C. Pucknell, C. Barton, L. Price, D. L. Woodward, and F. G. Rodgers, 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus subsp. fetus*, *J. Clin. Microbiol.* 40:4744–4747.