รายงานการวิจัย

เรื่อง

ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อซัลโมเนลล่าที่ตรวจพบในแหนมที่วางขายในตลาดและซุปเปอร์มาร์เก็ต จังหวัดเชียงใหม่

Antimicrobial Susceptibility Testing of *Salmonella spp.* In Nam (Fermented mince meat pork) at the markets and supermarkets in Chiang Mai province.

โดย

อ.สพ.ญ.ดวงพร พิชผล
สาขาวิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

งานนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะสัตวแพทย์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คำนำ

รายงานฉบับนี้เป็นการศึกษาภาวะการดื้อยาของเชื้อซัลโมเนลล่าที่พบในอาหาร ซึ่งเชื้อมักจะดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาในผู้ป่วยโดยเฉพาะในกลุ่มเสี่ยง คือ เด็ก ผู้สูงอายุ คนที่ตั้งครรภ์ และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ปัญหาสำคัญของเชื้อนี้คือผู้ป่วยที่หายจากอาการป่วยแล้วมักเป็นพาหะของโรคโดยไม่รู้ตัว รายงานฉบับนี้น่าจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการใช้ยารักษาและให้ตระหนักถึงการใช้ยาต้านจุลชีพที่ถูกต้องเพื่อป้องกันการดื้อยาของเชื้อซัลโมเนลล่า

ดวงพร พิชผล

หัวหน้าโครงการวิจัยฯ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ให้การสนับสนุนดังรายนามต่อไปนี้ คือ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุนและสถานที่ในการทำวิจัย Prof.Dr. Goetz Hildebrandt Dr.Josef Kleer และเพื่อนเจ้าหน้าที่ใน Institute for Food Hygiene,Free University of Berlin, Germany ที่ช่วยฝึกอบรมในเรื่องวิธีการตรวจ ครอบครัว Hildebrandt ที่ช่วยเหลือเรื่องที่อยู่อาศัย และดูแลตลอดการอยู่ที่ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี คุณชัยวัฒน์ พูลศรีกาญน์ WHO National Salmonella and Shigella Center (NSSC) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อนุเคราะห์การตรวจยืนยันผลและแยกชนิดของเชื้อซัลโมเนลล่า รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ คณะสัตว์แพทยศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและ รองศาสตราจารย์ ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยให้คำแนะนำและข้อมูลในการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่า รองศาสตราจารย์ ดร.สัญชัย จุตรสิทธา ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์เครื่องวัดความเป็นกรดด่างในเนื้อสัตว์ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการกลาง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยในการอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำการทดลอง ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในสาขาวิชาสัตวแพทย์สาธารณสุขทุกท่าน

บทคัดย่อ

ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อซัลโมเนลล่าที่ตรวจพบในแหนมที่วางขายในตลาดและซุปเปอร์มาร์เก็ต จังหวัดเชียงใหม่

ดวงพร พิชผล ภาวิน ผดุงทศ ทองกร มีแย้ม ชุลีพร ศักดิ์สง่าวงษ์ สหเทพ จันทรวิมล นิตยา ชะนะญาติ

สาขาวิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เชื้อซัลโมเนลล่าจำนวนทั้งหมด 178 ตัวที่แยกได้จากแหนม 61 ตัวอย่าง ถูกส่งไปแยกซีโรวาร์ที่j WHO National Salmonella and Shigella center. กรุงเทพมหานคร พบทั้งหมด 18 ซีโรวาร์ ได้แก่ *S*.Anatum, *S*.Corvallis, *S*.Derby, *S*.Havana, *S*.Krefeld, *S*.Lexington, *S*.Montevideo, *S*.Muenster, *S*.Orion, *S*.Oslo, *S*.Panama, *S*.Rissen, S.enterica subsp. enterica ser.3,10:-:Z6, S.enterica subsp. enterica ser.9,12:-:1,5, *S*.Senftenberg, *S*.Stanley,and *S*.Worthington. *S*.Anatum พบมากที่สุด ร้อยละ 37.6 (67/178) อันดับที่ 2 คือ *S*.Rissen ร้อยละ15.7 (28/178) และอันดับที่ 3 คือ *S*.Stanley ร้อยละ 12.4 (22/478) การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยใช้วิธี Disk diffusion method และใช้ยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด คือ tetracyclin erythromycin ciprofloxacin และ amoxycillin/clavulonic acid การดื้อยาของเชื้อซัลโมเนลล่าที่แยกได้ต่อ erythromycin ร้อยละ 98.88 tetracyclin ร้อยละ 68.54 amoxycillin/clavulonic acid ร้อยละ 5.06 และ ciprofloxacin ร้อยละ 0.56 ยังพบอีกว่าเชื้อชนิดเดียวกันดื้อยามากกว่า 1 ชนิดพบร้อยละ 69.1 โดยแบ่งออกเป็น ดื้อต่อยา 2 ชนิด คือ tetracyclin และ erythromycin ร้อยละ 65.7 ดื้อต่อยา 3 ชนิด คือ tetracyclin erythromycin และ amoxycillin/clavulonic acid ร้อยละ 2.8 และ *S*.Rissen เพียงหนึ่งตัวที่ดื้อต่อยาทุกตัวที่ใช้ทดสอบ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีการดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1 ชนิดของเชื้อซัลโมเนลล่าในแหนม นั่นหมายถึงการไม่ปลอดภัยในการบริโภคแหนมที่ไม่ทำให้สุก ซึ่งมีโอกาสจะติดเชื้อซัลโมเนลล่าที่ดื้อยาได้ และผู้ที่ใช้ยาต้านจุลชีพควรต้องระมัดระวังในการใช้ยาให้มากขึ้น

Abstract

Antimicrobial Susceptibility Testing of *Salmonella spp.* In Nam (Fermented mince meat pork) at the markets and supermarkets in Chiang Mai province.

Duangporn Pichpol, Pawin Padungtod, ThongKorn Maeyam,Chuleeporn Saksangawong, Sahathep Chantharawimol, Nitaya Chanayad

Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University.

Total of 178 Salmonella isolates from 61 samples of Nam were send to identify serovars at WHO National Salmonella and Shigella Center (NSSC), Bangkok, Thailand. The 18 serovars of Salmonella were *S*.Anatum, *S*.Corvallis, *S*.Derby, *S*.Havana, *S*.Krefeld, *S*.Lexington, *S*.Montevideo, *S*.Muenster, *S*.Orion, *S*.Oslo, *S*.Panama, *S*.Rissen, S.enterica subsp. enterica ser.3,10:-:Z6, S.enterica subsp. enterica ser.9,12:-:1,5, *S*.Senftenberg, *S*.Stanley,and *S*.Worthington. *S*.Anatum (67/178) were found the highest serovars in this study. The second and third serovars were *S*.Rissen (28/178) and *S*.Stanley(22/178). The antimicrobial susceptibilities characteristic of these salmonella were discussed based on the results ascertained by the disk diffusion method and used 4 antimicrobial agents as tetracyclin erythromycin ciprofloxacin and amoxycillin/clavulonic acid. The percent of antimicrobial resistance of Salmonella isolates were erythromycin 98.88 % tetracyclin 68.54% amoxycillin/clavulonic acid 5.06% and ciprfloxacin 0.56%. Multidrugs resistance(resistance more than one antimicrobial agents)could detected 69.1% . 65.7% of Salmonella isolation resisted to two antimicrobial agents ; tetracyclin and erythromycin. Three antimicrobial agents ; were resisted 2.8%.*S*.Rissen had only one isolate that resist to all of drugs (0.56%). This study presents high multidrugs resistance of salmonella in Nam. It means no-safety to consume uncooked Nam because you may be infected bt the multidrugs resistance salmonella and Antimicrobial user (Human doctor, animal doctor or farmer use antimicrobial agents as growth promotor.) must be aware the antimicrobial usage.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
ระเบียบและวิธีวิจัย	4
ลักษณะประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	4
วิธีการทดลอง	4
ผลการวิเคราะห์	7
สรุปและวิจารณ์	12
บรรณานุกรม	14
ภาคผนวก	19

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตารางแสดงผลของการการตรวจยืนยันเชื้อซัลโมเนลล่าด้วยวิธีทางชีวเคมี	6
ตารางที่ 2 ตารางแสดงผลการตรวจแยกซีโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลล่า	8
ตารางที่ 3 ร้อยละของการดื้อยาต้านจุลชีพ	9
ตารางที่ 4 จำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่ดื้อต่อ Erythromycin	9
ตารางที่ 5 จำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่ดื้อต่อ Tetracyclines	10
ตารางที่ 6 จำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่ดื้อต่อ Tetracyclines	10
ตารางที่ 7 จำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่ดื้อต่อ Ciprofloxacin	11
ตารางที่ 8 จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากกว่าหนึ่งชนิด (Multidrugs resistance)	11

บทนำ

แหนมเป็นอาหารพื้นเมืองของทางภาคเหนือที่มีชื่อเสียงไปทั่วประเทศ โดยเฉพาะในจังหวัดเชียงใหม่ซึ่งเป็นแหล่งท่องเที่ยวสำคัญของประเทศ แหนมเป็นอาหารที่คนส่วนใหญ่นิยมรับประทานดิบ (26) และขบวนการผลิตปัจจุบันมีทั้งรายใหญ่ ซึ่งอาจจะใช้เครื่องอำนวยความสะดวกทำให้ผลิตเร็วขึ้นและใช้จำนวนคนน้อยลง หรือ ขนาดกลางและขนาดเล็ก ยังคงต้องพึ่งขบวนการผลิตที่ใช้จำนวนคนมากกว่า ซึ่งนั่นหมายถึงโอกาสที่จะรับเชื้อจากผู้ที่ทำงานอยู่ในกระบวนการผลิตมาสู่อาหารก็มากขึ้นตามด้วย การผลิตแหนมจะใช้ส่วนประกอบหลักคือ เนื้อหมู หนังหมู หูหมูและนำมาใส่เครื่องปรุงต่าง ๆ เช่น พริก กระเทียม ข้าวหรือข้าวเหนียวนึ่งสุก เกลือ น้ำตาล โซเดียมไนไตรท์ เป็นต้น ทำการผสมกันด้วยคนหรือเครื่องจากนั้นบรรจุโดยใช้ใบตองห่อหรือพลาสติก จากนั้นจะนำไปหมักที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 องศาเซลเซียส โดยอาศัยการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติพวกที่สามารถสร้างกรดแล็คติกได้ (Lactic acid bacteria)จากการสำรวจแหนมที่วางขายโดยทั่วไปแล้วค่า pH อยู่ระหว่าง 5.6 – 4.2 จากการหมักประมาณ 3 – 4วัน(20) การวิเคราะห์อันตรายที่อาจจะพบในแหนม คือ อันตรายทางกายภาพ ได้แก่ คลิปโลหะที่ใช้ในการมัดหัวท้ายของแหนม อันตรายทางเคมี ได้แก่ สารไนไตรท์ ซึ่งใส่ส่วนแหนมเพื่อทำให้เกิดสีแดงของเนื้อแหนมและช่วยลดการเจริญของเชื้อ *Clostridium botulism* ซึ่งจากการสำรวจแหนมโดยทั่วไปมีน้อยกว่า 125 ส่วนในล้านส่วน (ppm.) ปริมาณ 100 ส่วนในล้านส่วนสามารถยับยั้งเชื้อ *Clostridium botulism* ได้ และอันตรายที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ การสำรวจแหนมขาย 60 ตัวอย่างพบว่ามีการปนเปื้อน *Salmonella spp.* 16% *Staphylococcus aureus* 15% และ *Listeria monocytogenes* 12%(20) การสำรวจเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากอาหารที่ยังไม่ปรุงให้สุกในประเทศไทยจาก 820 ตัวอย่างสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมดร้อยละ 12 (7)

เชื้อซัลโมเนลล่าเป็นแบคทีเรียใน Family Enterobacteraceae Genus Salmonella ลักษณะติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น(26) สามารถมีเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่าที่อยู่รอบตัวยกเว้น *S.gallinarum* และ *S.pullorum* เจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจน แต่ในที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยก็สามารถเจริญได้ ประกอบด้วยกว่า 2,000 ซีโรไทป์ ตามการแบ่งแบบ Kauffmen – White Schema ซึ่งใช้หลักความแตกต่างของ O antigen (somatic), H antigen (flagella) และบางกรณีอาจต้องใช้ Vi antigen (capsullar) ด้วย เชื้อซัลโมเนลล่าทำให้เกิดโรคซัลโมเนลโลซิส การติดโรคเกิดจากการกินอาหารและน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อนี้เข้าไป(26) และอาจเกิดการติดเชื้อผ่านทางเยื่อเมือกต่าง ๆ รวมทั้งบาดแผล (23) โดยกินเชื้อประมาณ 10^4 – 10^6 เซลล์ เชื้อจะผ่านกระเพาะอาหารไปยังลำไส้เล็กแล้วเพิ่มจำนวนและเข้าไปเจริญเติบโตใน M-cells จากนั้นเชื้อจะทำลาย M-cells แล้วเข้าไปอยู่ในต่อมต่าง ๆ ในลำไส้เล็กและใน Polymorphus phagocytic cells(26) เชื้อซัลโมเนลล่าทุกสายพันธุ์ล้วนก่อให้เกิด

โรคซัลโมเนลโลซิสได้ทั้งสิ้น ยกเว้น *Salmonella* Typhi *Salmonella* Paratyphi A,B และ C ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ แหล่งของเชื้อพบในสุกรและไก่ร้อยละ 2 – 25 จากตัวอย่างจากอุจจาระ (12) Subgroup I พบในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่นทั่ว ๆ ไป Subgroup II, III ส่วนใหญ่พบในสัตว์เลือดเย็น IV, V ส่วนใหญ่แล้วพบได้จากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ และทำให้เกิดโรคในคนได้น้อยมาก ก่อโรคในคนอยู่ใน Subgroup I ที่พบมากคือ *S.* Paratyphi A อยู่ใน Subgroup A *S.* Typhi อยู่ใน serogroup D_1 *S.* Typhimurium อยู่ใน serogroup D *S.* Enteritidis อยู่ใน serogroup D_2 (23) แหล่งของเชื้อซัลโมเนลล่า พบจากตัวสัตว์เช่น ไก่และสุกรด้วยการทำ Rectal swab ในช่วง ร้อยละ 2-25(12) สุกรที่อยู่ในฟาร์มร้อยละ 50-83.3 และเพิ่มขึ้นเมื่อสุกรถูกขนส่งไปอยู่ที่โรงฆ่าพบร้อยละ 82.5 ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการปนเปื้อนข้ามมาจากการขนส่งและบริเวณที่พักสัตว์ในโรงฆ่า(19) พบเชื้อซัลโมเนลล่าในโรงฆ่าสัตว์ร้อยละ 12 จากคนงานภายในฟาร์มร้อยละ 9 และจากฟาร์มร้อยละ 2 การทดสอบความไวของเชื้อซัลโมเนลล่าต่อยาต้านจุลชีพ คือ Tetracyclin (84.7%) Nalidixic acid (27.1%) Florfennicol (18.6%) Amplicillin (13.6%) Ceftiofur (3.4%) เชื้อสามารถดื้อได้กับยาทุกตัวที่กล่าวมา ซึ่งตัวอย่างได้มาจาก ฟาร์ม ตัวสัตว์ (ไก่และสุกร) โรงฆ่าสัตว์ คนงานที่ทำงานอยู่ในฟาร์ม (12) Nalidixic acid เป็น original quinolone drug ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแกรมลบที่ก่อโรคในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ (22) (12) การพบ *Salmonella* Blockley ปนเปื้อนในอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ และอีกไม่กี่ปีต่อมาได้ตรวจพบเชื้อนี้ในผู้ป่วย ในเนื้อไก่แช่แข็ง และการดื้อยาสูงกับ Streptomycin Tetracyclin Kanamycin Chloramphenicol Ampicillin Cotrimixazole(2) การปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ที่จะนำไปบริโภค เช่น เนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อหนู (35) และพบว่าเชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1 ชนิดและเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 5-6 ชนิด มาจาก เนื้อสุกร หนู และเนื้อวัว (30) ในผลิตภัณฑ์เนื้อชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ลูกชิ้นเนื้อ ลูกชิ้นกุ้ง ปูอัด ไส้กรอกหมู ลูกชิ้นหมู ลูกชิ้นไก่ หมูยอ และลูกชิ้นปลา จำนวนทั้งสิ้น 223 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายในตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานครและนนทบุรี พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลล่า 42 ตัวอย่าง (18.82%) ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้ผ่านกระบวนผลิตที่มีขั้นตอนการฆ่าเชื้อแล้วทั้งสิ้น (34) พบการปนเปื้อนในอาหารหมักพื้นบ้านที่ไม่ผ่านความร้อน เช่น กุ้งจ่อม (2.94%) ปลาจ่อม (4.54%) ซึ่งพบเชื้อดื้อต่อ Nalidixic acid และ Tetracyclin (32) และแหนมไก่ แหนมหมู (29) อาหารที่ยังไม่ปรุงสุกในตลาดในเมืองไทยพบการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลล่าเช่นกัน (7) รวมทั้งคนก็สามารถเป็นพาหะนำโรคได้เหมือนกัน มีการศึกษาผู้ที่เป็นพาหะของเชื้อซัลโมเนลล่าในโรงผลิตอาหารแช่แข็ง 18 แห่ง ปรากฏว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละ 2 – 8.8 และจำแนกซีโรวาร์ได้มากกว่า 70 ซีโรวาร์ ได้แก่ *S.*Anatum *S.*Rissen *S.*Panama *S.*Stanley และมีความไวต่อNorfloxacin มากที่สุด (33)

เชื้อซัลโมเนลล่าเป็นเชื้อที่อยู่ในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ซึ่งสามารถปนเปื้อนมาจากกระบวนการฆ่าสุกร โดยเนื้อสุกรอาจเปื้อนมูลหรือปนเปื้อนระหว่างขั้นตอนการผลิต

การก่อโรคของเชื้อ salmonella ในคนและสัตว์แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนั้น

1. Typhoidal Salmonella ประกอบด้วยเชื้อ *S.* Typhi และ *S.* Paratyphi ก่อให้เกิดโรคไข้รากสาดน้อย (typhoid) และไข้รากสาดเทียม (paratyphoid) ในคน ซึ่งคนที่ติดเชื้ออาจจะมีเชื้อนี้อยู่ในทางเดินอาหารได้นานเป็นเวลาหลายเดือน โดยไม่มีอาการ แต่แพร่เชื้อได้ เชื้อกลุ่มนี้ก่อการติดเชื้อเฉพาะในคนเท่านั้น ปัจจุบันประเทศไทยมีปัญหาจากการติดเชื้อกลุ่มนี้น้อยมาก
2. Non-typhoihal Salmonella (NTS) ประกอบด้วยเชื้อซัลโมเนลลาอื่น ๆ นอกเหนือไปจากกลุ่มแรก แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ
   2.1 กลุ่มเชื้อที่ก่อการติดเชื้อและการเป็นพาหะทั้งในคนและสัตว์ เช่น *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium เชื้อกลุ่มนี้เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงในคนและสัตว์ และยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงในคน โดยเฉพาะในเด็กเล็ก และผู้ที่มีภูมิต้านทานต่ำ คนและสัตว์ที่ติดเชื้อนี้มักเป็นพาหะของเชื้ออยู่เป็นเวลานาน มีการแพร่ระบาดของเชื้อระหว่างคน สัตว์ และอาหารที่ผลิตจากสัตว์ เชื้อกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีปัญหามากที่สุด
   2.2 กลุ่มเชื้อที่ก่อการติดเชื้อและการเป็นพาหะในสัตว์ ไม่ก่อโรคหรือการเป็นพาหะในคน กลุ่มนี้ไม่ก่อปัญหาต่อคนโดยตรง แต่จะมีผลกระทบเมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะรักษาการติดเชื้อในสัตว์ ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาการติดเชื้อดื้อยาในคนด้วย

โรคซัลโมเนลโลซิสแบ่งอาการออกได้ 3 กลุ่ม คือ ท้องเสีย (Diarrhea) การติดเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิต (Bacteremia) และ ไข้ (Enteric fever) (26) กลุ่มอาการที่ติดเชื้อในทางเดินอาหารเป็นลักษณะการติดเชื้อเกือบทั้งหมดของการติดเชื้อกลุ่ม NTS ซึ่งมักก่อความรุนแรงในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น โรคเอดส์ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคติดเชื้อทุติยภูมิ (Secondary Infection) ผู้ป่วยประมาณครึ่งหนึ่งมักมีไข้ร่วมด้วย และร้อยละ 80 มีการถ่ายอุจจาระน้อยกว่า 10 ครั้งต่อวัน ลักษณะอุจจาระส่วนใหญ่เหลวมีน้ำและมูกปนครั้งละมาก ๆ การเป็นพาหะของเชื้อ NTS หลังการติดเชื้อผู้ป่วยสามารถเป็นพาหะของเชื้อในลำไส้อยู่ได้เป็นเวลานาน และสามารถแพร่เชื้อให้ผู้อื่นหรือสิ่งแวดล้อมได้ การติดเชื้ออีกแบบหนึ่ง คือ การติดเชื้อนอกทางเดินอาหารพบได้น้อยประมาณร้อยละ 5 การติดเชื้อนอกทางเดินอาหารนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ด้าน คือ Invasiveness ของตัวเชื้อ และภูมิต้านทานของคน เชื้อที่เป็นสาเหตุต่อการติดเชื้อเข้ากระแสโลหิตในเด็กมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในทางเดินอาหาร มีรายงานในเด็กเล็กที่ติดเชื้อเอดส์ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย โดยก่อโรคมีทั้งแบบที่มีเชื้อในอุจจาระ (gastroenteritis) และ/หรือมีเชื้อในเลือด (septicemia) ซึ่งพบในเด็กอายุน้อยกว่า 1 ปี และการติด

เชื้อกลุ่ม NTS ยังก่อให้เกิด เยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อของกระดูกและข้อการติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ ปอดอักเสบ เป็นต้น การศึกษาในผู้ป่วยผู้ใหญ่ในโรงพยาบาลพบว่าเอดส์และการใช้ยา Corticosteroid เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการติดเชื้อ NTS (17)

ข้อมูลจาก WHO National Salmonella and Shigella Center กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข รายงานว่าประเทศไทยมีการป่วยเนื่องจาก *Salmonella* Enteritidis ตั้งแต่ปี ค.ศ.1990-1995 จำนวน 51 105 307 471 659 877 ตามลำดับ (3) จะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี

ระเบียบวิธีการวิจัย

การตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่าจากตัวอย่างแหนมที่พร้อมบริโภคซึ่งได้จากการเก็บตัวอย่างจากสถานที่จำหน่ายในตลาดสดและซุปเปอ์มาร์เก็ตในจังหวัดเชียงใหม่ เมื่อได้เชื้อซัลโมเลล่าแล้วจะทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส โดยใช้ Glass Beads (15) เพื่อจะทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Disk susceptibility tests (10) กับยาต้านจุลชีพ 4 ตัว คือ ซิโปรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin) 5 ไมโครกรัมต่อแผ่น อิริโทรมัยซิน(Erythromycin) 15 ไมโครกรัมต่อแผ่น แอมม็อกซีซิลิน/กรดคลาวูโลนิก (Amoxycillin/Clavulonic acid) 20/10 ไมโครกรัมต่อแผ่น และเตตร้าไซคลิน (Tetracycline) 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น ทำการอ่านและแปรผลตามตารางมาตรฐานแปรผล (9)

ลักษณะประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

แหนมที่นำมาตรวจหาเชื้อได้จากการสุ่มเลือกตลาดและซุปเปอร์มาร์เก็ตโดยการจับสลากแล้วเก็บตัวอย่างจากทุกร้านที่ขาย และทุกแหล่งผลิตที่วางขายในร้านนั้น ทำการเก็บตัวอย่างเพียงครั้งเดียวในแต่ละแห่ง นำเชื้อที่ตรวจพบมาทำการตรวจหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้การศึกษาแบบพรรณนา ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ โดยคิดเป็นร้อยละของเชื้อซัลโมเนลล่าที่ดื้อต่อยาที่ทำการทดสอบ 4 ชนิด

วิธีการทดลอง

<u>ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่าในตัวอย่างแหนม</u>

ตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่าที่วางขายในตลาดสด 5 แห่งและซุปเปอรมาร์เก็ต 6 แห่ง ในจังหวัดเชียงใหม่ทั้งหมด 61 ตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์โดยประยุกต์จาก ISO 6579 (14)

ก. ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลล่า (ทุกขั้นตอนทำด้วยวิธีปลอดเชื้อ)

1. การสุ่มตัวอย่าง

ตัดตัวอย่างจากหลายตำแหน่งน้ำหนัก 25 กรัม ใส่ลงใน Stomacher bag

2. การเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Pre-enrichment in non selective liquid medium)

เติม peptone water (Buffered) ปริมาณ 225 มิลลิลิตร แล้วนำไปตีย่อยด้วยเครื่อง Stomacher นาน 2 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 20 ชั่วโมง

3. การเลือกเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว(Selective-enrichment in selective liquid medium)

3.1 ดูดสารละลายจากขั้นตอน Pre-enrichment in non selective liquid medium 0.1มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport-Vassiliadis(RV broth 10 ml.) 10 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate (TT broth 10 ml.) ทำจากทุกภาชนะในขั้นตอน Pre-enrichment in non selective liquid medium

3.2 บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ RV broth และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TT broth

4. การแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Isolation for suspected colonies/Plate out and identification)

1.1 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อจุ่มใน RV broth และ TT broth 1 ลูป(ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร) เขี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lactose Desoxycholate (XLD agar) และBrilliant green Phenol red Lactose Sucrose (BPLS agar)

1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. การยืนยันเชื้อ (Confirmation)

คัดเลือก 5 โคโลนีที่มีลักษณะจำเพาะ(Typical colonies)ของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด คือ บน XLD agar มีลักษณะโคโลนีใส สร้างก๊าซไข่เน่าเห็นเป็นสีดำตรงกลางโคโลนี และอาหารเลี้ยงเชื้อรอบ ๆ โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีแดง และบน BPLS agar มีลักษณะโคโลนีเป็นสีชมพู สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง(23)

5.1 การยืนยันเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี (Biochemical confirmation) (14)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงผลของการการตรวจยืนยันเชื้อซัลโมเนลล่าด้วยวิธีทางชีวเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ/Medium	ทดสอบ /Test	ผล/ Results
Triple sugars iron agar	Glucose	+
	Lactose	-
	Sucrose	-
	Gas formation from glucose	+
	Formation of hydrogen sulfide	+ (90% of the cases)
Urea agar	Urea splitting	-
Motility Indol Lysine decarboxylation medium (MIL)	Motility	+
	Indol reaction	-
	Lysine decarboxylation	+

5.2 การยืนยันเชื้อด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา (Serological confirmation)

โดยใช้วิธี Slide agglutination with Polyvalent OH antigens(14) (21) (23)

<u>ขั้นตอนการทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Disk susceptibility tests</u>

การทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Disk susceptibility tests (10) กับยาต้านจุลชีพ 4 ตัว คือ ซิโปรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin) 5 ไมโครกรัมต่อแผ่น อิริโทรมัยซิน(Erythromycin) 15 ไมโครกรัมต่อแผ่น แอมม็อกซีซิลิน/กรดคลาวูโลนิก (Amoxycillin/Clavulonic acid) 20/10 ไมโครกรัมต่อแผ่น และเตตร้าไซคลิน (Tetracycline) 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น เชื้อซัลโมเนลล่าทั้งหมด 178 จากตัวอย่างแหนมทั้งหมด 61 ตัวอย่างนำมาทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมเชื้อซัลโมเนลล่าที่เก็บโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส เขี่ยเชื้อลงใน Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 –20 ชั่วโมง
2. เตรียมเพลทเพื่อทำการทดสอบ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ คือ Mueller-Hinton agar(MHA) โดยใช้เพลทขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร และเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุ่นที่ 45 – 50 องศาเซลเซียส ปริมาณ 25-30 มิลลิลิตร (สามารถเตรียมเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ก่อนได้โดยเก็บไว้ในอุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส ได้นาน 7 วัน แต่ก่อนใช้เพลทต้องนำออกมาวางไว้จนกว่าอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องและผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งไม่มีหยดน้ำเกาะ
3. เตรียมแผ่นยาที่เก็บอยู่ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส หรือ ต่ำกว่า หรือที่เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ – 14 องศาเซลเซียส หรือ ต่ำกว่า นำแผ่นยาที่ใส่ในภาชนะปลอดจากเชื้อโรคและปราศจากความชื้น วางไว้จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

4. การทดสอบ

4.1 เตรียมเชื้อที่ต้องการตรวจจากเชื้อที่ขึ้นอยู่ใน Nutrient agar ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.5 McFarland โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) หรือใช้สารมาตรฐาน 0.5 McFarland

4.2 ใช้ก้านสำลีจุ่มลงในเชื้อที่เตรียมได้ความขุ่นเป็น 0.5 McFarland (ทำภายใน 15 นาที หลังจากเตรียม)บิดหมาดกับข้างหลอด และป้ายลงบน MHA ที่เตรียมไว้ ป้ายมากกว่า 2 ทิศทางโดยทำมุมประมาณ 60 องศา และป้ายที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

4.3 ทิ้งไว้ประมาณ 3 ถึง 5 นาที แต่ไม่เกิน 15 นาที และวางแผ่นยาลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่เชื้อแล้ว

4.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง

5. การอ่านและแปรผล (9) (25)

5.1 วัดส่วนที่เกิดการยับยั้งของเชื้อหรือส่วนที่ไม่พบเชื้อขึ้น (Zone of inhibition) ที่แคบที่สุดโดยใช้หน่วยเป็นมิลลิเมตร

5.2 แปรผลตามขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางที่วัดได้แล้วเทียบผลกับตารางมาตรฐาน มี 3 ค่า คือ ไว (Susceptible) ปานกลาง(Intermidiate) และ ดื้อยา (Resistant)ต่อยาต้านจุลชีพที่นำมาทดสอบ

ผลการวิเคราะห์

เชื้อซัลโมเนลล่าทั้งหมด 178 ตัว ส่งทดสอบยืนยันและทำการแยกซีโรวาร์โดย WHO National Salmonella and Shigella Center (NSSC) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เชื้อซัลโมเนลล่าที่พบมากที่สุด 4 อันดับแรก คือ *Salmonella* Anatum(67/178) *Salmonella* Rissen (28/178) *Salmonella* Stanley(22/178) และ *Salmonella* Montevideo (19/178) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางแสดงผลการตรวจแยกซีโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลล่า

Salmonella serovar	Amount
Agona	2
Anatum	67
Corvallis	6
Derby	5
Havana	2
Krefeld	7
Lexington	1
Montevideo	19
Muenster	1
Orion	2
Oslo	1
Panama	7
Rissen	28
S.enterica subsp. enterica ser.3,10:-:Z6	1
S.enterica subsp. enterica ser.9,12:-:1,5	1
Senftenberg	4
Stanley	22
Worthington	2
Grand Total	178

2. การดื้อยาของเชื้อซัลโมเนลล่าต่อยาต้านจุลชีพ 4 ตัว สูงสุดคือ อิริโทรมัยซิน(Erythromycin) เชื้อดื้อยาร้อยละ 98.88 รองลงมา คือ เตตร้าไซคลิน (Tetracycline) ร้อยละ 68.54 แอมม็อกซีซิลิน/กรดคลาวูโลนิก (Amoxycillin/Clavulonic acid) ร้อยละ 5.06 และน้อยที่สุด คือ ซิโปรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin) ร้อยละ 0.56 ดังแสดงในตารางที่ 3 – 7

ตารางที่ 3 ร้อยละของการดื้อยาต้านจุลชีพ

Test/report Group	Antimicrobial agent	Percent of antimicrobial resistance
Macrolides	Erythromycin	98.88
Tetracyclines	Tetracycline	68.54
β-Lactamase Inhibitor combinations	Amoxicillin/clavulonic acid	5.06
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	0.56

ตารางที่ 4 จำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่ดื้อต่อ Erythromycin

Salmonella serovar	Amount
Agona	2
Anatum	67
Corvallis	5
Derby	5
Havana	2
Krefeld	7
Lexington	1
Montevideo	19
Muenster	1
Orion	2
Oslo	1
Panama	7
Rissen	28
S.enterica subsp. enterica ser.3,10:-:Z6	1
S.enterica subsp. enterica ser.9,12:-:1,5	1
Senftenberg	4
Stanley	21
Worthington	2
Grand Total	176

ตารางที่ 5 จำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่ดื้อต่อ Tetracyclin

Salmonella serovar	Amount
Agona	2
Anatum	44
Corvallis	5
Derby	5
Havana	1
Krefeld	6
Lexington	1
Montevideo	1
Muenster	1
Orion	2
Panama	6
Rissen	28
S.enterica subsp. enterica ser.3,10:-:Z6	1
Senftenberg	2
Stanley	15
Worthington	2
Grand Total	122

ตารางที่ 6 จำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่ดื้อต่อ Tetracyclin

Salmonella serovar	Amount
Anatum	4
Derby	2
Rissen	1
Senftenberg	1
Stanley	1
Grand Total	9

ตารางที่ 7 จำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่ดื้อต่อ Ciprofloxacin

Salmonella serovar	Amount
Rissen	1
Grand Total	1

3. พบว่าหนึ่งตัวมีการดื้อยามากกว่าหนึ่งชนิด(Multidrugs resistance) คิดเป็นร้อยละ 69.1 ได้แก่ ดื้อต่อ Tetracyclin และ Erythromycin ร้อยละ 65.7 Amoxycillin/clavulonic acid Tetracycline และ Erythromycin ร้อยละ 2.8 และดื้อยาทั้ง 4 ชนิด ร้อยละ 0.6 (S.Rissen) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากกว่าหนึ่งชนิด (Multidrugs resistance)

Salmonella serovar	Amount of antimicromial resistance			
	ATE	ATEC	E	TE
Agona				2
Anatum	1		23	43
Corvallis			1	5
Derby	2			3
Havana			1	1
Krefeld			1	6
Lexington				1
Montevideo			18	1
Muenster				1
Orion				2
Oslo			1	
Panama			1	6
Rissen		1		27
S.enterica subsp. enterica ser.3,10:-:Z6				1
S.enterica subsp. enterica ser.9,12:-:1,5			1	
Senftenberg	1		2	1
Stanley	1		6	15
Worthington				2
Grand Total	5	1	55	117
Percent	2.8	0.6	30.9	65.7

หมายเหตุ A : Amoxycillin/clavulonic acid

T : Tetracycline

E : Erythromycin

C : Ciprofloxacin

สรุปและวิจารณ์

เชื้อซัลโมเนลล่าจำนวน 178 โคโลนีที่พบจากตัวอย่างแหนม ได้แก่ *S*.Agona *S*.Anatum *S*.Corvallis *S*.Derby *S*.Havana *S*.Krefeld *S*.Lexington *S*.Montevideo *S*.Muenster *S*.Orion *S*.Oslo *S*.Panama *S*.Rissen S.enterica subsp. enterica ser.3,10:-:Z6 S.enterica subsp. enterica ser.9,12:-:1,5 *S*.Senftenberg *S*.Stanley และ *S*.Worthington เชื้อซัลโมเนลล่าที่พบมากที่สุด 4 อันดับแรก คือ *S*. Anatum(37.6%) *S*.Rissen (15.7%) *S*.Stanley(12.4%) *S*. Anatum มีแหล่งที่มาจากอาหาร น้ำ และจากเนื้อสัตว์ พบในคน 7.4% (1) และพบจากการตรวจแหนม 37.6% *S*.Rissen พบในคน 5.3% (1) แหล่งที่มาของเชื้ออาจมาจากน้ำที่ใช้ไม่สะอาดพอ ซึ่งในแหนมพบ 15.7% และ *S*.Stanley พบในคน 3.8% และมีแนวโน้มจะสูงขึ้นในไทย อีกทั้งยังเป็นเชื้อที่สำคัญ ในอีก 12 ประเทศจาก 104 ประเทศทั่วโลก (1) ซึ่งตรวจพบในแหนมถึง 12.4 % แนวโน้มของการพบเชื้อซัลโมเนลล่า ซีโรวาร์ที่แยกได้ในแหนมที่ตรวจในจังหวัดเชียงใหม่กับเชื้อที่พบในคนและอาหารที่ตรวจพบในประเทศไทยในช่วง ค.ศ.1993-2002 เป็นไปในแนวทางเดียวกัน นั่นหมายถึงการมีโอกาสติดเชื้อที่เท่า ๆ กัน เชื้อที่ตรวจพบในแหนมมีการดื้อยากลุ่ม Fluoroquinolone คือ Ciprofloxacin (0.56%) ซึ่งเป็นกลุ่มสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อซัลโมเนลล่า (28) ถ้าเกิดการระบาดของเชื้อที่ดื้อยากลุ่มนี้จะทำให้เกิดการสูญเสียมากมาย การป่วยเนื่องจากการติดเชื้อจากการบริโภคอาหารในมนุษย์ทำให้เกิดการสูญเสียเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 7.7-8.7 พันล้านเหรียญ(8) พบการติดเชื้อซัลโมเนลล่าในนักท่องเที่ยวที่เข้าไปใช้สนามบินโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่นในปีค.ศ. 1992-1994 ร้อยละ 13.9 (262/1,882) ซึ่งส่วนใหญ่เดินทางกลับมาจากแถบเอเชียและประเทศไทย และเชื้อซัลโมเนลล่าที่แยกได้ร้อยละ 37.6 ดื้อต่อยา Tetracyclin ofloxacin Nalidixic acid Kanamycin Streptomycin(27) และในปี ค.ศ.1995-1999ได้มีการเก็บเชื้อซัลโมเนลล่าที่แยกได้มาจากนักท่องเที่ยวชาวฟินแลนด์พบว่านักท่องเที่ยวที่กลับมาจากแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทยพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการดื้อยากลุ่ม Fluoroquinolone จากร้อยละ 5.6 ไปเป็น ร้อยละ 50 ($p<0.01$) ภายในเวลาเพียง 5 ปี และเป็นการดื้อยาแบบ Multidrug resistance และพบ *gyrA* เชื้อที่ดื้อยาที่แยกได้ทั้งหมด บ่งบอกถึงการดื้อยาสามารถแพร่กระจายไปได้อย่างรวดเร็ว (11) ในปี ค.ศ.1994-1996 พบ *Salmonella* Group B ที่แยกได้จากเด็กที่ป่วยด้วย NTS พบว่าส่วนใหญ่เชื้อที่แยกได้เป็นชนิดที่ดื้อยามากกว่าหนึ่งชนิด (17) การดื้อยาแบบ Multidrugs resistant มีแนวโน้มที่สูงขึ้นในประเทศไทย การสำรวจการดื้อยาของเชื้อ Non

Typhoidal *Salmonella* ปี ค.ศ.2000-2003 พบว่าเชื้อมีความไวต่อยากลุ่ม Fluoroquinolone (Norfloxacin, Ciprofloxacin) ร้อยละ 99.5 (31) เชื้อซัลโมเนลล่าทั้งกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคไทฟอยด์ และ NTS มีการดื้อต่อยากลุ่มนี้ทำให้ไม่สามารถใช้รักษาผู้ป่วยได้ (4) (13) กลุ่มยาที่มีการดื้อมากที่สุด คือ Erythromycin (Macrolide group) ซึ่งยากลุ่มนี้มีโอกาสที่จะดื้อต่อเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบอยู่แล้วเนื่องจากเชื้อสามารถรบกวนการจับของยากับไรโบโซม (22) และมีการทดลองใช้ยากลุ่มนี้ คือ Azithromycin ในการรักษาโรคไข้ไทฟอยด์ที่มีอาการไม่รุนแรงซึ่งเกิดจากเชื้อ *S.*Typhi กับเด็กซึ่งสามารถรักษาผู้ป่วยโดยตรงไม่พบเชื้อในกระแสเลือดและในอุจจาระ และอีกกลุ่มที่ดื้อยารองลงมาคือ Tetracycline ซึ่งพบร้อยละ 68 ในเนื้อที่วางขายในสหรัฐอเมริกา(5) และยากลุ่ม Tetracycline มีแนวโน้มในการดื้อยาสูงในทั่วโลก จากการตรวจพบเชื้อจาหลายแหล่ง(18) (12)

การตรวจการดื้อยาของเชื้อในแหนมพบว่าดื้อยาต่อยามากกว่าหนึ่งชนิด (Multidrugs resistance) มีสูงถึงร้อยละ 69.1 และเช่นเดียวกับที่พบในสหรัฐอเมริกา (5) บราซิล(18) เนเธอร์แลนด์ (6) แคนาดา(16) ไต้หวัน (13) และอีกหลายประเทศในโลก และในประเทศไทยมีการศึกษาเชื้อดื้อยาที่พบในคนและในเนื้อไก่มีแนวโน้มในการดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากกว่าหนึ่งชนิดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) ของ *S.*Enteritidis และ *S.*Anatum

โอกาสที่จะพบเชื้อซัลโมเนลล่าในสุกร(15 %)สูงกว่าในไก่ (1%) (12) และจะพบเชื้อที่โรงฆ่าสัตว์มากกว่าฟาร์ม (19) (12) การที่ใช้เนื้อสุกรดิบมาผลิตเป็นแหนมนั้นจึงค่อนข้างมีความเสี่ยงสูงในการจะมีเชื้อในแหนมที่พร้อมบริโภค เพราะแหนมไม่มีขั้นตอนใดเลยที่สามารถจะกำจัดเชื้อให้หมดไปได้ การปนปื้อนเชื้อซัลโมเนลล่ามาได้จากหลายแหล่งดังนั้นควรป้องกันการติดเชื้อดีกว่าการรักษาโดยการควบคุมการเกิดโรคซัลโมเนลโลซิส ดังนี้(24)

1. ปรุงอาหารให้สุกโดยใช้อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส
2. ป้องกันการปนเปื้อนซ้ำและปนเปื้อนข้ามโดยการทำความสะอาดอุปกรณ์ในการประกอบอาหาร โดยเฉพาะที่สัมผัสอาหารรวมทั้งสุขลักษณะที่ดีของผู้ปรุงอาหาร
3. ไม่ควรเก็บอาหารโดยไม่แช่เย็นหรือแช่แข็ง ซึ่งขนาดของอาหารควรมีความหนาไม่เกิน 4 นิ้ว
4. อุ่นอาหารที่แช่เย็นไว้อย่างน้อย 75 องศาเซลเซียส ก่อนรับประทาน

อาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลล่าจะไม่มีลักษณะของอาหารเสียแสดงให้เห็น เช่น การเปลี่ยนแปลงสีและกลิ่น(24)ฉะนั้นเป็นการยากที่จะสังเกตอาหารด้วยประสาทสัมผัส

บรรณานุกรม

1. Bangtrakulnonth, A., S. Pornreongwong, C. Pulsrikarn, P. Sawanpanyalert, R. S. Hendriksen, and D. M. A. Lo Fo Wong. 2004. *Salmonella* Serovars from Humans and Other Sources in Thailand, 1993-2002. Emerging Infectious Diseases 10 (1):131-135.
2. Bangtrakulnonth, A., O. Suthienkul, A. Kitjakara, S. Pornfuangwong, and K. Siripanichgon. 1994. First isolation of Salmonella blockley in Thailand. Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health 25(4):688-692.
3. Boriraj, V., A. Bangtrakulnonth, S. Pornruengwong, and K. Saitanu. 1997. Demographic data on Salmonella enteritidis infection in Thailand,1995. Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health 28(4):774-780.
4. Butt, T., R. N. Ahmad, A. Mahmood, and S. Zaidi. 2003. Ciprofloxacin Treatment Failurein Typhoid Fever Case,Pakistan. Emerging Infectious Disease 9(12):1621-1622.
5. Chen, S., S. Zhao, D. G. White, C. M. Schroeder, R. Lu, H. Yang, P. F. McDermott, S. Ayer, and J. Meng. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant salmonella seravars isolated from retial meats. Applied and Environmental Microbiology 70(1):1-7.
6. Duijkeren, E. V., W. J. Wannet, D. J. Houwers, and W. V. Pelt. 2003. Antimicrobial Susceptibilities of *Salmonella* Strains isolated from Humans, Cattle, Pigs, Chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. Journal of Clinical Microbiology 41(8):3574-3578.
7. Echeverria, P., S. Piyaphong, L. Bodhidatta, C. Hoge, and C. Tungsen. 1994. Bacterial Enteric Pathogens in Uncooked Foods in Thai Markets. Journal of Travel Medicine Jun 1;1(2):63-67.
8. Fedorka-Cray, P., J. D. McKean, and G. W. Berran. Prevalence of Salmonella in Swine and Pork : A Farm to Consumer Study.

9. Ferraro, M. J., W. A. Craig, M. N. Dudley, G. M. Eliopoulos, D. W. Hecht, J. Hindler, B. Reller, A. T. Sheldon, J. M. Swenson, F. C. Tenover, R. T. Testa, M. P. Weinstein, and M. A. Wikler. 2000. Disk Diffusion Supplemental Tables, 7 ed, vol. 20. The National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Pennsylvania.

10. Ferraro, M. J., W. A. Craig, M. N. Dudley, G. M. Eliopoulos, D. W. Hecht, J. Hindler, B. Reller, A. T. Sheldon, J. M. Swenson, F. C. Tenover, R. T. Testa, M. P. Weinstein, and M. A. Wikler. 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk SusceptibilityTests; Approved Standard-Seventh Edition, Seventh ed, vol. 20. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Pennsylvania.

11. Hakanen, A., P. Kotilainen, P. Huovinen, H. Helenius, and A. Siitonen. 2001. Reduced Fluoroquinolone Susceptibility in *Salmonella* enterica Serotypes in Travelers Returning from Southeast Asia. Emerging Infectious Disease 7(6):996-1003.

12. Hanson, R., J. Kaneene, P. Padungtod, K. Hirokawa, and C. Zeno. 2002. Prevalence of *Salmonella* and *E.coli*, and their resistance to antimicrobial agents, in farming communities in Northern Thailand. Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health 33(Suppl 3):120-126.

13. Hsueh, P. R., L. J. Teng, S. P. Tseng, C. F. Chang, J. H. Wan, J. J. Yan, C. M. Lee, Y. C. Chuang, W. K. Huang, D. Yang, J. M. Shyr, K. W. Yu, L. S. Wang, J. J. Lu, W. C. Ko, J. J. Wu, F. Y. Chang, Y. C. Yang, Y. J. Lau, Y. C. Liu, S. W. Ho, and K. T. Luh. 2004. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium and cholrelaesuis from Pigs to Humans, Taiwan. Emerging Infectious Disease 10 (1):60-68.

14. ISO. 1993. Microbiology-General guidance on methods for the detection of *Salmonella*, p. 1-16, INTERNATIONAL STANDARD, Third ed, vol. ISO 6579. International Oraganization for Standardization, Geneve.

15. Jones, D., P. A. Pell, and P. H. A. Sneath. 1984. Maintenance of Bacteria on Glass Beads at -60 C to -76 C, p. 35-40. *In* B. E. Kirsop and J. J. S. Snell (ed.), Maintenance of Microorganisms A Manual of Labolatory Methods, London.

16. Larkin, C., C. Poppe, B. McNab, B. McEwen, A. Mahdi, and J. Odumeru. 2004. Antibiotic resistance of Salmonella isolated from Hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. J Food Prot. 67(3):448-455.

17. Moolasart, P., J. Sangsujja, B. Eampokalap, M. Ratnasrithong, and S. Likanonsonkul. 1997. Nontyphoidal Salmonella diarrhea in Thai children: a study at Bamrasnaradura Hospital,Nonthaburi,Thailand. Journal of Medical Associated Thai 80(10):613-8.

18. Oliveira, C.J., L. F. Carvalho, S. A. Fernandes, A. T. Tavevhio, C. C. Menezes, and F. T. Dominigues. 2002. Anticrobial resistance of Salmonella serotypes isolated from slaughter-age pigs and environmental samples. Microb Drug Resist. 8(4):407-411.

19. Patchanee, P., K. Zessin, C. Staak, L. Srikijkarn, P. Taravijitkul, and T. Tesaprateep. 2002. Pre-slaughter infection of *Salmonella spp.* and consideration of using the danish mix-ELISA for monitoring *Salmonella* in pigs. Chiang Mai Veterinary Journal. 1:33-38.

20. Paukatong, K., and S. Kunawasen. 2001. The Hazard Analysis and Critical Control Points(HACCP) Generic Model for the Production of Thai Fermented Pork Sausage (Nham). Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 114(9-10):327-330.

21. Popoff, M. Y., J. Bockemuhl, and F. W. Brenner. 2000. Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme. Research in Microbiology 151(1):63-65.

22. Prescott, J., and J. Baggot. 1993. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Second ed. Iowa State University Press, Iowa State.

23. Quinn, P. J., M. E. Carter, MarkeyB.K., and CartarG.R. 1999. Enterobacteriaceae, p. 209-234, Clinical Veterinary Microbiology. Mosby, London.

24. Reed, H. G. 1993. Foodborne Illness (Part 2) Salmonellosis. Dairy,Food and Environmental Sanitation 14(3):706.

25. Shryock, T. R., M. Apley, R. N. Jones, D. H. Lein, C. Thornsberry, R. D. Walker, J. L. Watts, D. G. White, and C. C. Wu. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Suseptibility Tests for Bacteria Isolation from Animals; Approved Standard, second ed, vol. 22. NCCLS, Pennsylvania.

26. Tuitemwong, P., S. Osiriphun, A. Pongpullponsak, and K. Tuitemwong. 2003. Presented at the Symposium Abstract 1st International symposium and Workshop on Insight into the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Delelopment and Food Safety, Davi Yanasughonda Room Basic Science Building,Kasetsart Unuversity, Bangkok, Thailand, August 13-15.

27. Ueda, Y., N. Suzuki, K. Mori, K. Noda, H. Hirose, Y. Takegaki, S. Hashimoto, Y. Oosumi, Y. Miyata, M. taguchi, M. Ishibashi, and T. Honda. 1996. [Bacteriological studies of travellers' diarrhoea.5) Analysis of enteropathogenic bacteria at Osaka Airport Ouarantine Station from January 1992 through September 3rd,1994. Kansenshogaku Zasshi 70(1):29-41.

28. **ธงชัย เฉลิมชัยกิจ**. 2547. การประชุมเชิงปฏิบัติการหลักสูตรการพัฒนาศักยภาพและเครือข่ายเฝ้าระวังโรค Salmonellosis . 17 –18 มิถุนายน 2547.หน้า 4.

29. **สุมาลี บุญมา นพรัตน์ หมานริม ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์**. 2540. การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่และเนื้อหมู. วารสารวิทยาสารเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ ปีที่ 31 เล่มที่ 4 หน้า 413-418.

30. **สุมาลี บุญมา อรุณ บ่างตระกูลนนท์ วิทยา โคสิตานนท์ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ ภักดี วัฒนาไตรภพ วิชัย ศุภสินธุ์**. 2542. ความไวของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อซัลโมเนลล่าที่แยกได้จากเนื้อวัว เนื้อสุกร เนื้อไก่ และหนูในประเทศไทย. การประชุมวิชาการสัตวแพทย์สมาคม ครั้งที่ 25 วันที่ 26 –28 ตุลาคม 2542.

31. **อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์**. 2547. การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella spp.*กลุ่ม Non Typhoidal *Salmonella* ค.ศ. 2000 – 2003 ในประเทศไทย. การประชุมเชิงปฏิบัติการหลักสูตรการพัฒนาศักยภาพและเครือข่ายเฝ้าระวังโรค Salmonellosis . ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่. 17 –18 มิถุนายน 2547.

32. **อรุณ บ่างตระกูลนนท์ นพรัตน์ หมานริม ชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์ และปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ**. 2546. การประชุมวิชาการครั้งที่ 1 พันธมิตรร่วมใจ เพื่อสร้างสุขภาพยุคใหม่. 1 – 2 พ.ค. 2546. หน้า 75.

33. **อรุณ บ่างตระกูลนนท์ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ นพรัตน์ หมานริม วรชาติ เทียนชัยทัศน์ ชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์ สุมณฑา วัฒนสินธุ์**. 2545. การสำรวจโรคอาหารเป็นพิษในอุจจาระของพนักงานในโรงงานผลิตอาหารแช่แข็ง. วารสารผลงานวิชาการโรคติดต่อ ประจำปี 2545 หน้า 78.

34. **อรุณ บ่างตระกูลนนท์ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ สุมาลี บุญมา**. 2542. การสำรวจ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์เนื้อชนิดที่จำหน่ายในตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ต. วารสารการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 หน้า 412-419.

35. **อรุณ บ่างตระกูลนนท์ สุมาลี บุญมา และนพรัตน์ หมานริม**. 2537.Preceeding of the 13th International Pig Veterinary Society Congress,June 26-30.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาคผนวก

ก. การเตรียมสารมาตรฐาน 0.5 McFarland (Turbidity Standard for Inoculum Preparation) (10)

1. $BaCl_2$ 0.048 mol/L (1.175 % w/v $BaCl_2$. $2H_2O$) **ปริมาตร** 0.5 ml. เติมลงใน 99.5 ml. ของ 0.18 mol/L H_2SO_4 (1% w/v) ผสมให้เข้ากัน
2. **ทำการวัดความขุ่นโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง** (Spectrophotometer) **ใช้ความยาวคลื่น** 625 นาโนเมตร จะอ่านค่าได้ 0.08 ถึง 0.10 ซึ่งจะเท่ากับ 0.5 McFarland Standard
3. **ดูดถ่ายสารแขวนลอยแบเรียมซัลเฟต** 4 ถึง 6 ml. ลงในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียวขนาดเท่ากับหลอดที่ใช้ในใส่เชื้อแบคทีเรียเพื่อเทียบความขุ่น
4. **ปิดให้แน่น เก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิห้อง**
5. ก่อนนำมาใช้ต้องเขย่าเบาเพื่อให้ความขุ่นเสมอกันทั้งหลอด ถ้าพบว่ามีตะกอนขนาดใหญ่ให้เปลี่ยน
6. **ควรตรวจสอบความขุ่นทุกเดือน**

ข. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

BRILLIANT GREEN MODIFIED AGAR (Scharlau®)

Ref. 1-309

Specification

Solid culture medium for selective isolation of salmonellae in foods (except *S. typhi*)

Formula (in g/L)	
Peptone	10.000
Meat extract	5.000
Yeast extract	10.000
Sucrose	10.000
Disodium phosphate	1.000
Sodium phosphate	0.000
Phenol red	0.090
Brilliant green	0.005

Agar	15.000

Final pH 6.9 (±0.2 approx.)

Directions

Suspend 54.5 g of powder in 1 L of distilled water. Let it soak and heat up to boiling point, constantly stirring. Distribute in plates. Do not autoclave.

Description

In this modification of the classical medium for salmonellae, the concentration of brilliant green has been decreased to achieve a lesser inhibitor medium. At the same time, the nutrient basis has been enriched to enhance the recuperation of those microorganisms that are weak due to food reduction process.

This formulation was subsequently adopted in the ISO and DIN official method for detecting salmonellae in meat.

Technique

A previous enrichment in Tetrathionate Base Broth (Ref. 2-033) is recommended, inoculating with this medium the surface of the plates, in order to get separate colonies. Incubate at 35-37 °C for a 18-24 hours period.

Salmonella colonies (except *S. typhi*) are red, pinkish or white, but they are always surrounded by a red halo, which shows the inactivity of lactose or sucrose. Colonies of lactose and/or sucrose fermenting bacteria provide yellow-green colonies surrounded by a yellow halo. Sometimes, *Proteus* or *Pseudomonas* may appear, and they produce red pointed colonies.

In very polluted samples, it is recommended to include 1g/L of sodium sulfacetomide and 250 mg/L of sodium mandellate.

BUFFERED PEPTONE WATER acc. To EUR. PHAR. (Scharlau®)

Ref. 2-494

Specification

Filuent for the homoganization of food samples to the European Pharmacopeia.

Formula (in g/L)	
Peptone	1.00
Sodium chloride	4.30
Disodium phosphate	7.23
Potassium phosphate	3.56

Final pH 7.0 (±0.2 approx.)

Directions

Dissolve 16 g of powder in 1 L of distilled water, heating up if necessary. Add 1 to 10 mL of Polysorbate 80 (Ref. 6-088) of Polysorbate 20 depending on the kind of food to be diluted. Homogenized into containers. Sterilize by autoclaving at 121 °C for 15 minutes.

Description

This id the European Pharmacopeia recommended solution to dilute foods for microbiological examination. Depending on the amount of fat in the sample to examine it is the technician's decision regarding the kind and quantity of emulsifying agent to be used.

PEPTONE WATER (BUFFERED) (Merck®)

For the preliminary, non-selective enrichment of bacteria, particularly pathogenic Enterobacteriaceae, from foodstuffs and other materials.

This culture media complies with the recommendations of the International Standard Organization ISO (1993) and the German DIN Norms 10181 and 10160 for the examination of milk ad meat/meat products respectively.

Mode of action

The broth is rich in nutrients and produces high resuscitation rates for subletally injured bacteria and intense growth. The phosphate buffer system prevents bacterial damage due to changes in the pH of the medium.

Typical Composition (g./litre)

Peptone	10.0
Sodium chloride	5.0
Disodium hydrogen phosphate Dodecahydrate	9.0
Potassium dihydrogen phosphate	1.5

Preparation

Suspend 25.5 g/l, if desired, dispense into suirable containers, autoclave (15 min at 121°C) pH 7.2 ±0.2 at 25°C. The prepared broth is clear and yellowish.

Experimental precedure and Evaluation

Inoculate the culture medium with the sample material. Inocubation : approximately 24 hours at 35°C aerobically.

Transfer material from the resulting culture to a selective enrichment culture medium recommended by the appropriate standard.

MUELLER HINTON AGAR (Scharlau®)

Ref. 1-136

Specification

Widely recommended medium for antibiotic and sulfamides susceptibility testing, according to the Kirby-Bauer and the Ericsson methods.

Formula (in g/L)	
Peptone	17.5
Beef infusion solids	4.0
Starch	1.5

Agar	15.0

Final pH 7.4 (±0.2 approx.)

Directions

Add 38 g of powder to 1 L of distilled water and let it soak for 10 minutes. Bring to the boil to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 121 °C for 15 minutes.

Description

The Mueller Hinton Agar was originally designed for the primary isolation of meningococci and gonococci. With the addition of blood it becomes an optimal medium for the growth of *Neisseria*. Still, it is more effective if reheated and turned into a Chocolate Agar. It should never be remelted once blood has been added to it.

Technique

For the culture of *Neisseria* the best results are obtained if incubation takes place in a humid chamber with a CO_2 enriched atmosphere. This environment can be attained by placing the plates in a hermetically sealed container, a disecator for instance, together with a cotton swab soaked in a water and a lighted candle end. Once the container is full the flame will consume oxygen and by the time it goes out, the atmosphere will have gained 5 to 8% CO_2.

The Mueller-Hinton medium has proved to be one of the most efficient in the anti-bacterial susceptibility testing. Without adding blood it can even be used for sulfonamide sensitivity testing since it is free from most of its antagonists (nucleotides, etc.). If this type of assay is conducted, the zones of inhibition should be examined just after 12-18 hours, before the usual overgrowth occurs, since after 24 hours it tends to interfere with the examination of sulfonamides sensitivity.

For this purpose, a small inoculum will help the early formation of zones of inhibition. It should amount to a 100 to 300 times smaller inoculum than that corresponding to an antibiotic atrain.

In 1970 the WHO proposed this medium for antibacterial sensitivity testing, and it has been widely used since.

Sensitivity testing can be conducted through a variety of techniques, both on solid and liquid media. The most commonly used method in routine work is that derived from Kirby-Bauer and recoomended by the USA Association of Clinical Pathologists. It provides information on growth only, around a disk impregnated with antibacterial.

The Kirby-Bauer method itself is more precise and must be classified among the semiquantitative. It uses the Mueller-Hinton Agar and disks with high antibiotic concentration. The inoculum is first standardized with a Mac-Farland nephelometer. Then the plate is inoculated with a swab humidified in the standardized suspension, and finally the disks are arranged and incubated.

NUTRIENT MEDIA acc. To BRITISH PHARMACOPEIA (Scharlau®)

Ref. 1-140

Specification

Solid culture medium for general purposes and less fastidious organisms.

Formula (in g/L)	
Meat extract	1.0
Yeast extract	2.0
Peptone	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0

Final pH 7.4 (±0.2 approx.)

Directions

Suspend 28 g in 1 L of distilled water and bring to the boil to dissolve completely. Sterilize by autoclaving at 121 °C for 15 minutes.

Description

The Nutrient Agar is a simple medium in the range of meat infusions, complemented by a formulation which reinforces its nutrient qualities as well as its growth factors by adding yeast extract.

It is most adequate for general routine work and can sand the growth of common organisms, even those considered mildly fastidious with regard to nutrient elements. Besides, by incorporating sodium chloride it allows the addition of blood, even though it is not an optimal medium for it.

RAPPAPORT VASSILIADIS BROTH (Scharlau®)

Ref. 2-379

Specification

Liquid medium for the selective enrichment of *Salmonella* in foodstuffs and other materials.

Formula (in g/L)	
Soy peptone	4.500
Sodium chloride	7.200
Monopotassium phosphate	1.260
Dipotassium phosphate	0.180
Magnesium chloride	13.580
Malachite green	0.036

Final pH 5.2 (±0.2 approx.)

Directions

Dissolve 26.8 g in 1 L of distilled water, heating if necessary to help dissolve. Dispense into test tubes or flasks and sterilize by autoclaving at 121 °C for 15 minutes.

Description

The rappaport Vassiliadis medium complies with the recommendations of the APHA for the examination of foods.

This culture medium is a modification of the Salmonella enrichment Broth acc. To Rappaport and was proposed by Vassiliadis *et al.*(1976) who called it R 10 medium and later on RV broth. It displays a higher selectivity towards *Salmonella* and produces better yields than other comparable media, especially after preliminary enrichment and at an incubation temperature of 43 °C.

Malachite green and magnesium chloride inhibit the growth of the microorganisms normally found in the intestine but do not affect the proliferation of most salmonellae. Malachite green inhibits the growth of *Shigella*. Peptone soymeal improve the growth of *Salmonella*. The low pH increases the selectivity.

Technique

Inoculate the culture medium with the sample or material from a pre-enriched culture in Buffered Peptone Water (Ref. 2-277) and incubate for up to 18-24 hours at 43 °C. Streak material from the resulting cultures onto selective culture media.

THREE SUGAR IRON AGAR (TSI AGAR) (Scharlau®)

Ref. 1-192

Specification

Differential medium for identification of enterobacteria, based on the fermentation of three sugars (lactose, sucrose and glucose) and production of sulfhydric acid.

Formula (in g/L)	
Peptone	15.000
Meat extract	3.000
Yeast extract	3.000
Lactose	10.000
Sucrose	10.000
Dextrose	1.000
Sodium chloride	5.000
Ferric ammonium sulfate	0.300
Sodium thiosulfate	0.420
Phenol red	0.025
Agar	12.000

Final pH 7.4 (±0.2 approx.)

Directions

Dissolve 59.7 g of powder in 1 L of distilled water and bring to boiling. Dispense in tubes and sterilize at 121 °C for 15 minutes. Leave to solidity with short slant and good depth.

Description

TSI Agar is a modification of the classical Kliger's TSI agar. It has been add 1% of sucrose to differentiate *Proteus* and *Hafnia* (sucrose positive) from *Salmonella* and *Shigella* (sucrose negative)

Sugar degradation with acid formation is detected by the turning of an indicator to yellow, whereas if there is alkalinization, it turns to purple. When there is only glucose degradation, acid production is weak and is evaporated on the surface, so indicator may be reoxidated producing and alkaline surface (red) and an acid depth (yellow). If lactose of sucrose are degradated, acid production is intense and then all of the medium (surface and depth) go yellow. Gas production is detected by the formation of bubbles and occasionally agar streaking.

Sulfhydric acid production, from thiosulfate of sulfured amino acids of peptones, is detected by the formation of black SFe settles when medium reacts with iron salts.

Use the medium in slanted tubes with good depth and short slant. Sow by streaking on surface and stabbing deeply. It is advisable to use tubes with cotton swabs, in order to allow a reoxidation of the indicator. If screw caps are used, they must be loose.

XYLOSE LYSINE DEOXYCHOLATE AGAR (XLD AGAR) (Scharlau®)

Ref. 1-211

Specification

Medium for isolation of enteropathogen species, especially *Shigella*.

Formula (in g/L)	
Xylose	3.50
L-Lysine	5.00
Lactose	7.50
Sucrose	7.50
Sodium chloride	5.00
Yeast extract	3.00
Phenol red	0.08
Sodium Deoxycholate	2.50
Sodium thiosulfate	6.80
Ammonium ferric citrate	0.80
Agar	15.00

Final pH 7.4 (±0.2 approx.)

Directions

Suspend 56.68 g of powder in 1 L of distilled water. Heat up constantly stirring until boiling. Pour it immediately into plates. Do not sterilize and avoid remelting.

Description

Xylose Lysine Deoxycholate Agar is a differential medium, slightly selective, very suitable for the detection of pathogen enterocacteria, especially *Shigella.*

Gram negative flora is inhibited by the low amount of deoxycholate, but *Shigella* grows easier than in other selective media.

Xylose, lactose or sucrose fermentation produce medium acidification, and this is shown by an indicator turning to yellow, surrounding the colonies. This color disappears after 24 hours, so readings must be carried out between 18 to 20 hours.

Sulfhydric production from thiosulfate is easily detected because colonies become darker, due to the ferric sulfure precipitate. Lysine decarboxylation to cadaverine may also be observed in the medium, since it produces alkalinization and consequently the indicator turns to red.

All these reactions allow a good differentiation of *Shigella*, which besides *Edwarsiella* and *Proteus inconstans* are the single enterobacteria that do not ferment xylose and therefore show negative fermentation reaction. *Salmonella* type members do ferment xylose, but it is consumed quickly and the medium alkalinization, due to lysine decarboxylation, may hide the reaction. The difference between *Shigella* and *Salmonella* is that with the latter colonies become darker due to ferrous sulfure precipitates, and this is a common property with *Edwarsiella.* The other types of enterobacteria do not suffer this phenomenon, since acid acumulation due to lactose and sucrose fermentation is so big that it avoids pH reversion by decarboxylation and even ferrous sulfure precipitate in the first 24 hours.