การจำแนกชนิดของยีนสร้างสารพิษของ *Clostridium perfringens* ที่แยกได้จากสมุนไพรด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

MULTIPLEX PCR ASSAY FOR TOXINOTYPING *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLATES OBTAINED FROM HERBS

ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์[1] *ชุติมา จิตตประสาทศีล*[1] *ธนิตชัย คำแถลง*[1] *นัฐพงษ์ ชื่นบาน*[1] *สมชาย แสงกิจพร*[1] *ทายาท ศรียาภัย*[2]

Piyada Wangroongsarb[1]*, Chutima Jittaprasatsin*[1]*, Thanitchai Kamthalang*[1]*, Nattapong Cheunban*[1]*, Somchai Sangkitporn*[1]*, Thayat Sriyapai*[2]***

[1]*สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*

[1]*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health.*

[2]*สาขาสิ่งแวดล้อม คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*

[2]*Major in Environment, Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University.*

**Corresponding author, e-mail: Thayat@g.swu.ac.th*

Received: *5 March 2021;* ***Revised:*** *27 May 2021;* ***Accepted:*** *16 September 2021*

บทคัดย่อ

ตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 240 ตัวอย่าง ถูกเก็บรวบรวมโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2555-2562 เพื่อตรวจหา *Clostridium perfringens* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและจำแนกชนิดทางชีววิทยาระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยตรวจสอบยีนหลักที่ควบคุมการสร้างสารพิษจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *cpa, cpb, etx* และ *iA* และยีนสร้างสารพิษ enterotoxin (*cpe*) ในการศึกษานี้ตรวจพบ *C. perfringens* จากตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 112 ตัวอย่าง (ร้อยละ 46.67) ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อทั้งหมดจำแนกด้วยยีนเป็น *C. perfringens* type A อย่างไรก็ตามมี *C. perfringens* type A ที่ตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง enterotoxin (*cpe* gene) จำนวน 6 สายพันธุ์ ซึ่ง enterotoxin-producing *C. perfringens* เหล่านี้ตรวจพบจากตัวอย่างสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ ยากษัยเส้น (2 ตัวอย่าง) เพชรสังฆาต (1 ตัวอย่าง) ผักหวานป่า (2 ตัวอย่าง) และขมิ้นชัน (1 ตัวอย่าง) ดังนั้นการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของ *C. perfringens* ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่สามารถระบุสายพันธุ์และการสร้างสารพิษจึงเป็นประโยชน์สำหรับข้อมูลทางระบาดวิทยาและควบคุมการผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้ได้มาตรฐานตามที่กฎหมายกำหนด

คำสำคัญ: คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ เอนเทอโรทอกซิน สมุนไพร

Abstract

Two hundred and forty samples of herbs were collected by the Department of Medical Sciences from 2012-2019 to detect *Clostridium perfringens* by conventional culture method and molecular typing by multiplex PCR. Four major toxin genes (*cpa, cpb, etx* and *iA*) and an enterotoxin gene (*cpe*) from *C. perfringens* isolates were detected. In this study, *C. perfringens* isolates were detected in 112 (46.67 %) herb samples by culture method, all of which were genotyped as *C. perfringens* type A. However, 6 of all type A isolates were positive for the enterotoxin-encoding gene (*cpe* gene). Enterotoxin-producing *C. perfringens* were found in 4 types of herbs including wasting disease drug (2 samples), veld grape (1 sample), sweet leaf (2 samples) and turmeric (1 sample). The monitoring of *C. perfringens* strains by molecular techniques for typing and identifying toxin-producing isolates is useful for the epidemiology data and control the quality of herbal products to meet the standards legal requirements.

Keywords: *Clostridium perfringens*, Multiplex PCR, Enterotoxin, Herbs

บทนำ

Clostridium perfringens เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง เจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจน เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สร้างสปอร์ซึ่งทนความแห้งแล้งได้ดี พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ดิน น้ำ ทางเดินอาหารของคนและสัตว์ การติดเชื้อ *C. perfringens* อาจเกิดได้จากเชื้อที่อยู่ในทางเดินอาหารของผู้ป่วยเองหรือได้รับจากสิ่งแวดล้อม [1] *C. perfringens* ถูกแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ *C. perfringens* type A, B, C, D และ E ตามความสามารถในการสร้างสารพิษ enterotoxin กลุ่มสำคัญชนิดต่าง ๆ ได้แก่ alpha, beta, epsilon และ iota ส่วนใหญ่ทุกสายพันธุ์ก่อโรคในสัตว์มีเพียง type A และ C ที่ก่อโรคในคน [2] โดยเชื้อทุกกลุ่มสามารถผลิต *C. perfringens* enterotoxin (CPE) ร่วมกับสร้างสารพิษกลุ่มหลักและกลุ่มรองที่แตกต่างกัน ดังนี้ เชื้อ type A ผลิต alpha-toxin ร่วมกับ theta-toxin เชื้อ type B ผลิต alpha-toxin, beta -toxin และ epsilon-toxin เชื้อ type C ผลิต alpha-toxin และ beta-toxin เชื้อ type D ผลิต alpha-toxin และ epsilon-toxin และ เชื้อ type E ผลิต iota-toxin โดยสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นช่วยให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ [2]

วิธีการจำแนกชนิดสารพิษที่สร้างโดย *C. perfringens* ด้วยวิธีการดั้งเดิมใช้วิธี sero-neutralization [3] โดยการทดสอบกับหนูทดลองหรือทดสอบกับผิวหนูตะเภาซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน ต้องการทักษะและแรงงาน ต้องใช้ปริมาณสารพิษมากและต้องใช้ antiserum สำหรับ neutralization ที่จำเพาะเจาะจงซึ่งมีราคาแพง ทั้งยังต้องขออนุมัติการดำเนินการจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของหน่วยงานผู้ทำการทดสอบ ปัจจุบันจึงได้มีการนำวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลซึ่งเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำมาใช้ตรวจยืนยันและจำแนกสายพันธุ์ *C. perfringens* เพื่อทดแทนการทดสอบแทนวิธีการดั้งเดิม เช่น การใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อจำแนกสายพันธุ์และชนิดของสารพิษ โดยการตรวจหายีน *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* และ *cpe* ที่ถอดรหัสเป็นสารพิษชนิด alpha (α), beta (β), epsilon (ε), iota (ι) และ enterotoxin ตามลำดับ การจำแนกสายพันธุ์ตรวจสอบได้จากการตรวจพบยีนกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้ type A ตรวจพบยีน *cpa*, type B ตรวจพบยีน *cpa* ร่วมกับ *cpb* และ *etx*, type C ตรวจพบยีน *cpa* ร่วมกับ *cpb*, type D ตรวจพบยีน *cpa* ร่วมกับ *etx*, type E ตรวจพบยีน *cpa* ร่วมกับ *iA* และ type A สายพันธุ์ที่ผลิต enterotoxin ตรวจพบยีน *cpa* ร่วมกับ *cpe* [4-6] นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธี microarray และ real-time multiplex PCR สำหรับการตรวจหายีนควบคุมการสร้างสารพิษได้แก่ *iA* (iota toxin), *cpa* (alpha toxin), *cpe* (enterotoxin E), *etx* (epsilon toxin) และ *cpb* (beta toxin) ใน *C. perfringens* [7-8]

ปัจจุบันประชาชนนิยมบริโภคสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากมีสรรพคุณทางยา โดยการควบคุมคุณภาพยาสมุนไพรตามเกณฑ์มาตรฐานตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย [9] ระบุไว้ว่าไม่ควรพบ *Clostridium* spp. และเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอื่น ๆ ปนเปื้อนในตัวอย่างสมุนไพร เนื่องจาก *C. perfringens* บางสายพันธุ์เมื่อเจริญเติบโตจะสร้างสารพิษที่ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค สำหรับประเทศไทยการรายงานข้อมูลผู้ป่วยเนื่องจากการติดเชื้อ *C. perfringens* ยังมีข้อมูลน้อยอาจเนื่องจากขาดห้องปฏิบัติการที่ได้รับมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ หรืออาจเกิดจากขาดระบบสำหรับการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาและการศึกษาอาการทางคลินิกที่ไม่ชัดเจนเพียงพอ จากรายงานการตรวจเฝ้าระวังตัวอย่างยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติที่ใช้ในโรงพยาบาลของภาครัฐโดยสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าตัวอย่างยาสมุนไพรกลุ่มยาแผนไทยมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเฉพาะกลุ่ม Bile-tolerant gram-negative bacteria และ *Clostridium* spp. ซึ่งสาเหตุการปนเปื้อนอาจมาจากสิ่งแวดล้อมและระหว่างกระบวนการผลิตทำให้ผู้บริโภคอาจได้รับอันตรายจากการได้รับเชื้อก่อโรคกลุ่มนี้ [10] และการก่อโรคอาจมีความรุนแรงมากขึ้นถ้าหากพบการปนเปื้อนจาก *C. perfringens* ซึ่งอาจเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ ดังนั้นการศึกษานี้ทำการตรวจหาและจำแนกยีนสร้างสารพิษของ *C. perfringens* ที่คัดแยกจากตัวอย่างสมุนไพรเพื่อเฝ้าระวังและตรวจสอบคุณภาพของสมุนไพรที่บริโภคภายในประเทศ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาและยืนยันการปนเปื้อน *C. perfringens* ในตัวอย่างสมุนไพร
2. เพื่อจำแนกชนิดของยีนสร้างสารพิษของ *C. perfringens* ที่คัดแยกจากตัวอย่างสมุนไพรด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างตรวจและการเพาะแยกเชื้อ *Clostridium perfringens*

เก็บตัวอย่างสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่ส่งตรวจ ณ สถาบันวิจัยสมุนไพรและสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556-2562 จำนวน 240 ตัวอย่าง เพื่อตรวจหาเชื้อ *Clostridium* spp. และการตรวจยืนยัน *C. perfringens* ตามวิธีของ Dowell and Hawkins [11] และ Holdeman และคณะ [12] โดยนำตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 25 กรัม เพาะเลี้ยงเชื้อใน cooked meat medium บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37±2°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเชื้อโดยถ่ายตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Wilkins-Chalgren anaerobe blood agar : WCBL (CM 619B;Oxoid, England) และคัดแยกเชื้อด้วยเทคนิค cross streak plate ให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยว โดยนำ WCBL plate ไปบ่มในสภาวะไร้อากาศโดยบรรจุลงใน anaerobic jar ที่มี gas generating kit และ anaerobic Indicator (Mitsubishi Gas Chemical Company) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37±2°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีของ *C. perfringens* ที่เจริญบน WCBL มีลักษณะโคโลนี กลม มันวาว สีเทาด้าน มี double-zone beta hemolysis (ภาพที่ 1) และเชื้อแบคทีเรียไร้อากาศไม่สามารถทนต่อสภาวะอากาศปกติได้นาน

การพิสูจน์ยืนยันทางชีวเคมี

นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *C. perfringens* อย่างน้อย 3 โคโลนี ไปย้อมสีแกรม โดย *C. perfringens* จะพบเป็นเซลล์รูปร่าง large boxcar shape ติดสีแกรมบวก ไม่พบสปอร์ และให้ผลการทดสอบ catalase test เป็นลบ หลังจากแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีส่วนของสารตั้งต้นดังต่อไปนี้ ได้แก่ starch, arabinose, dextrose, fructose, lactose, maltose, mannose, mannitol, salicin, sucrose, xylose, esculin, SIM, nitrate, litmus milk, gelatin และ egg yolk อ่านผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ตามวิธี

มาตรฐานของ Anaerobic analytical manual [11] ตรวจสอบลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *C. perfringens* ที่เพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *C. perfringens* ATCC 13124 ดังแสดงผลการทดสอบในตารางที่ 1

การสกัดดีเอ็นเอจาก *C. perfringens*

นำสายพันธุ์ของ *C. perfringens* ที่แยกได้จากตัวอย่างสมุนไพรมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Wilkins-Chalgren broth บ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37±2ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากที่เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูดส่วนใสทิ้ง แขวนลอยตะกอนด้วย Normal saline ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้ตะกอนแขวนลอยดีแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งนำตะกอนที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol-Chloroform โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook และคณะ [13] จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้นำไปทดสอบยืนยันและและจำแนกยีนสร้างสารพิษต่อไป

การทดสอบยืนยันและจำแนกยีนสร้างสารพิษด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

การทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อจำแนก *C. perfringens* type A, B, C, D, E และ enterotoxin-producing *C. perfringens* ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของยีน *cpa, cpb*, *etx*, *iA* และ *cpe* ตามวิธีของ Heikinheimo and Korkeala [14] และ Meer and Songer [15] ซึ่งมีลำดับเบสของไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยใช้ PCR reaction mix (GoTaq DNA polymerase, Promega, USA) ปริมาณรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร โดยปรับความเข้มข้นของส่วนผสมต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย 1X GoTaq reaction buffer, $MgCl_2$ (3 mM), dNTPs (0.2 mM), each primer (0.2 µM), DNA template (10 ng) และปรับปริมาตรด้วย sterile deionized water จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีนตามโปรแกรมดังนี้ ขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94ºC เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94ºC เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละคู่ของไพรเมอร์ เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72ºC เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย final extension ที่อุณหภูมิ 72ºC เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (2% agarose gel/0.5X TBE) ที่กระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบผลผลิต PCR product ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transilluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบ PCR product ที่ได้กับ DNA marker ชนิด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder (Sibenzyme, Russia)

การแปลผลการตรวจเปรียบเทียบจาก PCR product จากดีเอ็นเอของ *C. perfringens* type A, B, C, D, E และ enterotoxin-producing *C. perfringens* type A ที่เป็นชุดควบคุมผลบวก (positive control) การยืนยันผลการตรวจพบเชื้อตรวจสอบได้จากขนาดของ PCR product โดยทุกสายพันธุ์ของ *C. perfringens* แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* ขนาด 400 bp และการจำแนก *C. perfringens* type ต่าง ๆ ตรวจสอบได้จากขนาดและรูปแบบของ PCR product ดังนี้ *C. perfringens* ATCC 13124 type A แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* ขนาด 400 bp, *C. perfringens* NTCT 4914 type B แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa*, *cpb* และ *etx* ขนาด 400 bp, 196 bp และ 655 bp ตามลำดับ, *C. perfringens* NTCT 10719 type C แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* และ *cpb* ขนาด 400 bp และ 196 bp ตามลำดับ, *C. perfringens* NTCT 8346 type D แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* และ *etx* ขนาด 400 bp และ 655 bp ตามลำดับ, *C. perfringens* NTCT 8084 type E แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* และ *iA* ขนาด 400 bp และ 446 bp ตามลำดับ และ *C. perfringens* DMST 51427 type A+enterotoxin แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* และ *cpe* ขนาด 400 bp และ 233 bp ตามลำดับ สำหรับกลุ่มควบคุมผลลบ (no template control) ใช้ sterile deionized water แทน genomic DNA (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *C. perfringens* ATCC 13124 [11]

สารตั้งต้นและอาหารที่ใช้ทดสอบ	ปฏิกิริยาทางชีวเคมี
Starch	+
Arabinose	-
Dextrose	+
Fructose	+
Lactose	+
Maltose	+
Mannose	+
Mannitol	-
Salicin	-
Sucrose	+
Xylose	-
Esculin	+/-
Nitrate	+/-
Litmus milk	+
Gelatin	-
Egg yolk agar (EY)	ผลิตเอนไซม์ lecithinase
SIM medium (Sulfide, Indole, and Motility)	ผลิต H_2S/ไม่ผลิต Indole/ไม่เคลื่อนที่

ผล+ คือ เชื้อสามารถย่อยสลายสารตั้งต้น
ผล - คือ เชื้อไม่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้น
ผล +/- คือ เชื้อสามารถย่อย หรือ ไม่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้น

(ก) (ข)

ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของ *C. perfringens* ที่เจริญบนอาหาร WCBL (ก) และลักษณะการเกิด double-zone beta hemolysis ของ *C. perfringens* บนอาหาร WCBL (ข)

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์สำหรับการจำแนกชนิดของ *C. perfringens* ด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลิโอไทด์ (5'-3')	ขนาดผลผลิต (bp)	ยีน	อ้างอิง
CPA-F	TGC ATG AGC TTC AAT TAG GT	400	*cpa*	Heikinheimo and Korkeala (2005)
CPA-R	TTA GTT TTG CAA CCT GCT GT			
CPB-F	GCG AAT ATG CTG AAT CAT CTA	196	*cpb*	Meer and Songer (1997)
CPB-R	GCA GGA ACA TTA GTA TAT CTT C			
ETX-F	GCG GTG ATA TCC ATC TAT TC	655	*etx*	Meer and Songer (1997)
ETX-R	CCA CTT ACT TGT CCT ACT AAC			
IA-F	ACT ACT CTC AGA CAA GAC AG	446	*iA*	Meer and Songer (1997)
IA-R	CTT TCC TTC TAT TAC TAT ACG			
CPE-F	GGA GAT GGT TGG ATA TTA ACG	233	*cpe*	Meer and Songer (1997)
CPE-R	GGA CCA GCA GTT GTA GAT A			

ผลการวิจัย

การตรวจหาและทดสอบยืนยัน *C. perfringens* จากตัวอย่างสมุนไพร

จากการตรวจหา *C. perfringens* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรในปี 2555-2562 จำนวนรวมทั้งสิ้น 240 ตัวอย่าง พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อและให้ผลทดสอบยืนยันการปนเปื้อน *C. perfringens* จำนวน 112 สายพันธุ์ จากตัวอย่างสมุนไพร 112 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 46.67 ซึ่งแสดงผลการตรวจและทดสอบยืนยันทางชีวเคมีตามปีที่เก็บตัวอย่างและชนิดของตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3

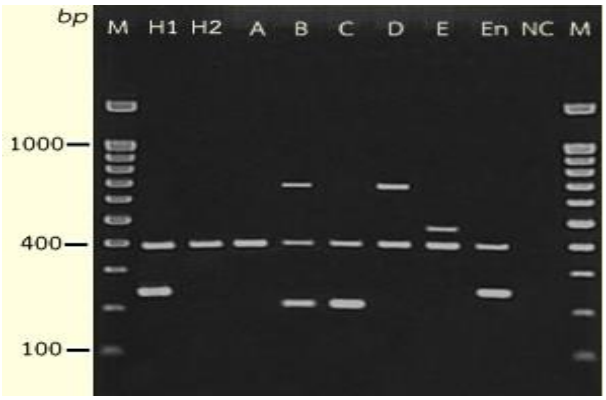
โดยปี 2555-2557 พบการปนเปื้อน *C. perfringens* ในตัวอย่างที่ส่งตรวจ ณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คิดเป็นร้อยละ 37.29, 34.78 และ 33.33 ตามลำดับ ซึ่งในปี 2555 คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 59 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ *C. perfringens* จำนวน 22 ตัวอย่าง ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร (9 ตัวอย่าง) เพชรสังฆาต (3 ตัวอย่าง) รางจืด (3 ตัวอย่าง) หม่อน (2 ตัวอย่าง) มะรุม (2 ตัวอย่าง) ผงพอกหน้า (1 ตัวอย่าง) ปัญจขันธ์ (1 ตัวอย่าง) และยาหอม (1 ตัวอย่าง) ต่อมาในปี 2556 คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 69 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ *C. perfringens* จำนวน 24 ตัวอย่าง ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร (4 ตัวอย่าง) รางจืด (4 ตัวอย่าง) ยาลม (3 ตัวอย่าง) เพชรสังฆาต (2 ตัวอย่าง) ยาหอม (2 ตัวอย่าง) ยาแคปซูลสมุนไพร (2 ตัวอย่าง) ยาบรรเทาริดสีดวงจมูก (2 ตัวอย่าง) บอระเพ็ด (1 ตัวอย่าง) เหงือกปลาหมอ (1 ตัวอย่าง) ยาสตรี (1 ตัวอย่าง) ยาบำรุงไต (1 ตัวอย่าง) และยาโรคกระเพาะ (1 ตัวอย่าง) และในปี 2557 คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 24 ตัวอย่าง พบผลบวกของเชื้อ *C. perfringens* จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ยากษัยเส้น (5 ตัวอย่าง) ฟ้าทะลายโจร (2 ตัวอย่าง) และยานวสุวรรณ (1 ตัวอย่าง)

อย่างไรก็ตาม ในปี 2558-2562 พบการปนเปื้อน *C. perfringens* ในตัวอย่างสูงขึ้นตามสัดส่วนของตัวอย่างที่ส่งตรวจในแต่ละปี คิดเป็นร้อยละ 57.89, 52.64, 55.56, 100 และ 94.12 ตามลำดับ โดยในปี 2555 คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 38 ตัวอย่าง พบผลบวกของ *C. perfringens* จำนวน 22 ตัวอย่าง ได้แก่ ถั่วเขียว (4 ตัวอย่าง) ยาแคปซูลสมุนไพร (2 ตัวอย่าง) ลูกประคบ (2 ตัวอย่าง) ยาสตรี (2 ตัวอย่าง) ยาฟอกเลือด (2 ตัวอย่าง) ยาบำรุงโลหิต (2 ตัวอย่าง) ดีบัว (2 ตัวอย่าง) ยาหอม (2 ตัวอย่าง) ขมิ้นชัน (1 ตัวอย่าง) หม่อน (1 ตัวอย่าง) แป้งสมุนไพร (1 ตัวอย่าง) และไพล (1 ตัวอย่าง) ต่อมาในปี 2559 คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างสมุนไพร

จำนวน 19 ตัวอย่าง พบผลบวกของ *C. perfringens* จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ หม่อน (2 ตัวอย่าง) ไพล (2 ตัวอย่าง) ฟ้าทะลายโจร (2 ตัวอย่าง) เพชรสังฆาต (2 ตัวอย่าง) และยาโบราณลดเบาหวาน (2 ตัวอย่าง) ในปี 2560 คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 9 ตัวอย่าง พบผลบวกของ *C. perfringens* จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพล (3 ตัวอย่าง) และ ปัญจขันธ์ (2 ตัวอย่าง) ในปี 2561 คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 5 ตัวอย่าง พบผลบวกของ *C. perfringens* จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ผักหวานป่า (2 ตัวอย่าง) ฟ้าทะลายโจร (2 ตัวอย่าง) และผงสมุนไพร (1 ตัวอย่าง) และในปี 2562 คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 17 ตัวอย่าง พบผลบวกของ *C. perfringens* จำนวน 16 ตัวอย่าง ได้แก่ ไพล (4 ตัวอย่าง) ขมิ้นชัน (3 ตัวอย่าง) ฟ้าทะลายโจร (2 ตัวอย่าง) ใบบัวบก (1 ตัวอย่าง) เถาวัลย์เปรียง (1 ตัวอย่าง) มะระขี้นก (1 ตัวอย่าง) ผลกระเม็ง (1 ตัวอย่าง) ยาหอม (1 ตัวอย่าง) ว่านชักมดลูก (1 ตัวอย่าง) และยากระษัยเส้น (1 ตัวอย่าง)

การจำแนกชนิดของ *C. perfringens* จากเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ผลการจำแนกชนิดของยีนสร้างสารพิษของ *C. perfringens* จำนวน 112 สายพันธุ์ ที่คัดแยกจากตัวอย่างสมุนไพรด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ พบว่าเป็น type A ทุกสายพันธุ์ โดยแสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* ขนาด 400 bp และตรวจพบว่ามีตัวอย่างสมุนไพรที่ให้ผลบวกยีน *cpe* ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนเทอโรทอกซินร่วมด้วยจำนวน 6 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 2.5 ของสมุนไพรที่ตรวจพบเชื้อทั้งหมด โดยแสดงแถบ PCR product ร่วมกันของยีน *cpa* และ *cpe* ขนาด 400 bp และ 233 bp ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างสมุนไพรที่ให้ผลบวกของยีน *cpa* ร่วมกับ *cpe* ได้แก่ เชื้อที่คัดแยกได้ในปี 2557 จากตัวอย่างยากษัยเส้นจำนวน 2 สายพันธุ์ ในปี 2559 จากตัวอย่างยากษัยเส้นจำนวน 1 สายพันธุ์ ในปี 2561 ที่แยกได้จากผักหวานป่า 2 สายพันธุ์ และในปี 2562 แยกได้จากขมิ้นชัน 1 สายพันธุ์



ภาพที่ 2 ผลการตรวจยืนยันและจำแนกชนิดของ *C. perfringens* ที่แยกได้จากตัวอย่างสมุนไพรด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์ พีซีอาร์ประกอบด้วย Lane M : แสดงแถบ DNA marker (100bp DNA ladder), Lane H1 : PCR product ขนาด 400 bp และ 233 bp ของ *C. perfringens* typeA+enterotoxin ที่คัดแยกจากตัวอย่างสมุนไพร, Lane H2 : PCR product ขนาด 400 bp ของ *C. perfringens* type A ที่คัดแยกจากตัวอย่างสมุนไพร ชุดควบคุมผลบวกประกอบด้วย Lane A *:* PCR product ขนาด 400 bp ของ *C. perfringens* type A ATCC 13124, Lane B : PCR product ขนาด 400 bp, 196 bp และ 655 bp ของ *C. perfringens* type B NTCT 4914, Lane C : PCR product ขนาด 400 bp และ 196 bp ของ *C. perfringens* type C NTCT 10719, Lane D : PCR product ขนาด 400 bp และ 655 bp ของ *C. perfringens* type D NTCT 8346, Lane E : PCR product ขนาด 400 bp และ 446 bp ของ *C. perfringens* type E NTCT 8084, Lane En : PCR product ขนาด 400 bp และ 233 bp ของ *C. perfringens* Type A+enterotoxin DMST 51427 และชุดควบคุมผลลบ ได้แก่ Lane NC

ตารางที่ 3 ผลการตรวจยืนยันและจำแนกชนิดของ *C. perfringens* จากตัวอย่างสมุนไพร

ปีที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อน (ร้อยละ)		
			ผลตรวจยืนยันทางชีวเคมี	***cpa gene***	***cpa+cpe gene***
2555	เพชรสังฆาต	12	3 (5.10)	3 (5.10)	0(0.00)
	รางจืด	12	3 (5.10)	3 (5.10)	0(0.00)
	ฟ้าทะลายโจร	13	9 (15.25)	9 (15.25)	0(0.00)
	ผงพอกหน้า	1	1 (1.69)	1 (1.69)	0(0.00)
	ยาจันทน์ลีลา	1	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ปัญจขันธ์	2	1 (1.69)	1 (1.69)	0(0.00)
	ยาบรรเทาริดสีดวงทวาร	1	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	หม่อน	7	2 (3.39)	2 (3.39)	0(0.00)
	ไพล	1	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	หญ้าหนวดแมว	3	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ยาหอม	2	1 (1.69)	1 (1.69)	0(0.00)
	มะระขี้นก	2	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	มะรุม	2	2 (3.39)	2 (3.39)	0(0.00)
	รวม	59	22 (37.29)	22 (37.29)	0(0.00)
2556	รางจืด	10	4 (5.79)	4 (5.79)	0(0.00)
	ฟ้าทะลายโจร	8	4 (5.79)	4 (5.79)	0(0.00)
	เพชรสังฆาต	4	2 (2.90)	2 (2.90)	0(0.00)
	บอระเพ็ด	1	1 (1.45)	1 (1.45)	0(0.00)
	เหงือกปลาหมอ	1	1 (1.45)	1 (1.45)	0(0.00)
	ยาแก้กองลม	1	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ยาหอม	5	2 (2.90)	2 (2.90)	0(0.00)
	ยาธาตุ	1	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ยาสตรี	4	1 (1.45)	1 (1.45)	0(0.00)
	ยาลม	5	3 (4.35)	3 (4.35)	0(0.00)
	ยาแคปซูลสมุนไพร	12	2 (2.90)	2 (2.90)	0(0.00)
	ปัญจขันธ์	2	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ชาชงสมุนไพร	2	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	กวาวเครือแดง	1	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ยาบำรุงไต	2	1 (1.45)	1 (1.45)	0(0.00)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจยืนยันและจำแนกชนิดของ *C. perfringens* จากตัวอย่างสมุนไพร (ต่อ)

ปีที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อน (ร้อยละ)		
			ผลตรวจยืนยันทางชีวเคมี	***cpa gene***	***cpa+cpe gene***
	ยาโรคกระเพาะ	2	1 (1.45)	1 (1.45)	0(0.00)
	ยาบรรเทาริดสีดวงจมูก	2	2 (2.90)	2 (2.90)	0(0.00)
	ขมิ้นชัน	2	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ไพล	3	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	มะข้ามป้อม	1	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	รวม	69	24 (34.78)	24 (34.78)	0(0.00)
2557	ยากษัยเส้น	5	5 (20.83)	5 (20.83)	2 (8.33)
	ยานวสุวรรณ	1	1 (4.17)	1 (4.17)	0(0.00)
	สบู่สมุนไพร	2	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ยาแคปซูลสมุนไพร	1	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	สมุนไพรขัดผิว	2	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	มะหาด	2	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	มะรุม	1	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ชาชงสมุนไพร	7	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ฟ้าทะลายโจร	3	2 (8.33)	2 (8.33)	0(0.00)
	รวม	24	8 (33.33)	8 (33.33)	2 (8.33)
2558	ขมิ้นชัน	1	1 (2.63)	1 (2.63)	0(0.00)
	ไพล	1	1 (2.63)	1 (2.63)	0(0.00)
	ถั่วเขียว	4	4 (10.53)	4 (10.53)	0(0.00)
	ยาแคปซูลสมุนไพร	4	2 (5.26)	2 (5.26)	0(0.00)
	หม่อน	3	1 (2.63)	1 (2.63)	0(0.00)
	ลูกประคบ	6	2 (5.26)	2 (5.26)	0(0.00)
	ยาบรรเทาริดสีดวงทวาร	2	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ยากวน	2	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ยาฟอกเลือด	3	2 (5.26)	2 (5.26)	0(0.00)
	ยาสตรี	2	2 (5.26)	2 (5.26)	0(0.00)
	ยาพอกหน้า	2	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)
	ยาบำรุงโลหิต	2	2 (5.26)	2 (5.26)	0(0.00)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจยืนยันและจำแนกชนิดของ *C. perfringens* จากตัวอย่างสมุนไพร (ต่อ)

ปีที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อน (ร้อยละ)		
			ผลตรวจยืนยันทางชีวเคมี	*cpa gene*	*cpa+cpe gene*
	แป้งสมุนไพร	2	1 (2.63)	1 (2.63)	0(0.00)
	ยาหอม	2	2 (5.26)	2 (5.26)	0(0.00)
	ดีบัว	2	2 (5.26)	2 (5.26)	0(0.00)
	รวม	38	22 (57.89)	22 (57.89)	0(0.00)
2559	หม่อน	2	2 (10.53)	2 (10.53)	0(0.00)
	ไพล	11	2 (10.53)	2 (10.53)	0(0.00)
	ฟ้าทะลายโจร	2	2 (10.53)	2 (10.53)	0(0.00)
	เพชรสังฆาต	2	2 (10.53)	2 (10.53)	1 (5.26)
	ยาโบราณลดเบาหวาน	2	2 (10.53)	2 (10.53)	0(0.00)
	รวม	19	10 (52.63)	10 (52.63)	1 (5.26)
2560	ไพล	7	3 (33.33)	3 (33.33)	0(0.00)
	ปัญจขันธ์	2	2 (22.22)	2 (22.22)	0(0.00)
	รวม	9	5 (55.55)	5 (55.55)	0(0.00)
2561	ผักหวานป่า	2	2 (40.00)	2 (40.00)	2 (40.00)
	ผงสมุนไพร	1	1 (20.00)	1 (20.00)	0(0.00)
	ฟ้าทะลายโจร	2	2 (40.00)	2 (40.00)	0(0.00)
	รวม	5	5 (100.00)	5 (100.00)	2 (40.00)
2562	ฟ้าทะลายโจร	2	2 (11.76)	2 (11.76)	0(0.00)
	ขมิ้นชัน	4	3 (17.65)	3 (17.65)	1 (5.88)
	ไพล	4	4 (23.53)	4 (23.53)	0(0.00)
	ใบบัวบก	1	1 (5.88)	1 (5.88)	0(0.00)
	เถาวัลย์เปรียง	1	1 (5.88)	1 (5.88)	0(0.00)
	มะระขี้นก	1	1 (5.88)	1 (5.88)	0(0.00)
	ผลกระเม็ง	1	1 (5.88)	1 (5.88)	0(0.00)
	ยาหอม	1	1 (5.88)	1 (5.88)	0(0.00)
	ว่านชักมดลูก	1	1 (5.88)	1 (5.88)	0(0.00)
	ยากษัยเส้น	1	1 (5.88)	1 (5.88)	0(0.00)
	รวม	17	16 (94.12)	16 (94.12)	1 (5.88)
	รวมทั้งหมด	240	112 (46.67)	112 (46.67)	6 (2.50)

สรุปและอภิปรายผล

จากรายงานประจำปี 2554 ของสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาแผนโบราณที่ขอขึ้นทะเบียนตำรับยาจำนวน 281 ตัวอย่าง พบผิดมาตรฐาน 64 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.8) และตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาแผนโบราณนำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 34 ตัวอย่าง โดยพบผิดมาตรฐานจากการตรวจพบ *Clostridium* spp. จำนวน 1 ตัวอย่าง [16] และจากรายงานของสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปีงบประมาณ 2555-2556 ได้ศึกษาความปลอดภัยเพื่อการประกันคุณภาพยาจากสมุนไพรในด้านการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ในยาจากสมุนไพรที่ใช้ในโรงพยาบาลของภาครัฐ จำนวน 116 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบ *Clostridium* spp.จำนวน 13 ตัวอย่าง จากยาสมุนไพรไทย 4 ตำรับ ได้แก่ ยาจันทน์ลีลา ยาหอมนวโกฐ ยาหอมบำรุงหัวใจ และยาประสะไพล [10] อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *C. perfringens* ในตัวอย่างสมุนไพรค่อนข้างสูงกว่ารายงานก่อนหน้านี้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยพบการปนเปื้อนของ *C. perfringens* ในตัวอย่างสูงถึงร้อยละ 46.67 ซึ่งสาเหตุของการพบการปนเปื้อนอาจเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการผลิตสมุนไพร ได้แก่ ขั้นตอนการปลูก การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาวัตถุดิบ ความสะอาดของสถานที่ สุขลักษณะของบุคลากร และวิธีการล้างทำความสะอาดสมุนไพรที่แตกต่างกันไปในตัวอย่างสมุนไพรแต่ละชนิด ความเสี่ยงของการปนเปื้อนจะมีสูงถ้าพืชสมุนไพรมาจากส่วนที่เป็นราก หรือลำต้นใต้ดินที่สัมผัสกับดิน [10] ในการศึกษานี้เมื่อนำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาใช้ตรวจยืนยันสายพันธุ์ร่วมกับการตรวจสอบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษพบว่า *C. perfringens* ทั้งหมดที่คัดแยกได้จากตัวอย่างสมุนไพรเป็น *C. perfringens* type A ซึ่งตรวจพบยีน *cpa* ที่ควบคุมการสร้างสารพิษชนิด alpha toxin หรือ เอนไซม์ phospholipase C โดยจะแสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ lecithinases ย่อยสลาย lecithin บนอาหาร egg yolk agar [17] และยังพบว่ามี *C. perfringens* type A ที่ให้ผลบวกยีน *cpa* ร่วมกับ*cpe* จำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.5 จากตัวอย่างทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างสมุนไพร โดยชนิดของตัวอย่างสมุนไพรที่ตรวจพบสายพันธุ์สร้างสารพิษ ได้แก่ ยากษัยเส้น เพชรสังฆาต ขมิ้นชัน และผักหวานป่า ทั้งนี้สารพิษ enterotoxin ที่พบใน *C. perfringens* พบได้ทั้งใน type A, B, C และ D และพบได้มากที่สุดใน type A ถ้าพบว่ามีสารพิษ enterotoxin ร่วมด้วยจะมีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้นด้วยคุณสมบัติของ enterotoxin ที่เป็น superantigen ซึ่งสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง cytokine ปริมาณมากและทำให้การตอบสนองของการอักเสบมากขึ้น [18] นอกจากนี้ *C. perfringens* type A ที่ปนเปื้อนในสมุนไพรได้มีรายงานว่าเป็นสายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในสิ่งแวดล้อมทั้งยังสร้างสารพิษส่งผลต่อการก่อโรคที่รุนแรงในคน [19] ในการศึกษานี้การนำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาใช้เพื่อยืนยันชนิดและจำแนกสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษมีข้อดีกว่าการใช้วิธีดั้งเดิมเนื่องจากเป็นวิธีที่มีค่าความไวและความจำเพาะสำหรับการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษบนโครโมโซมและบนพลาสมิดของ *C. perfringens* ดังรายงานการศึกษาก่อนหน้าที่นำเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น วิธี PCR, amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ pulsed field gel electrophoresis (PFGE) มาใช้เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของ *C. perfringens* ที่คัดแยกจากตัวอย่างที่หลากหลาย เช่น ผู้ป่วย อาหาร เนื้อสัตว์ และสิ่งแวดล้อม [20, 21] ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความเหมาะสมจะนำมาใช้เพื่อตรวจคัดกรองและจำแนกชนิด *C. perfringens* ที่สร้างสารพิษทดแทนวิธีการตรวจหาสารพิษ (toxicity assay) วิธีอื่น ๆ

จากการตรวจหาและจำแนกชนิดของ *C. perfringens* จากตัวอย่างสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรพบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อถึงร้อยละ 46.67 และจำแนกได้เป็น *C. perfringens* type A ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ซึ่งจากเชื้อ type A ที่คัดแยกได้ทั้งหมดให้ผลบวกของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterotoxin คิดเป็นร้อยละ 2.5 ดังนั้นจากผลการศึกษานี้ที่ได้นำเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมาใช้เพื่อระบุสายพันธุ์และการสร้างสารพิษของเชื้อที่ปนเปื้อนในสมุนไพรจะช่วยให้สามารถเฝ้าระวังการปนเปื้อนของ *C. perfringens* สายพันธุ์ที่อาจก่อโรคได้รุนแรงใน

ตัวอย่างสมุนไพรที่จำหน่ายภายในประเทศและยังเป็นประโยชน์สำหรับเป็นข้อมูลเพื่อให้ผู้ผลิตควบคุมคุณภาพการผลิตสมุนไพรให้ได้มาตรฐานตามที่กฎหมายกำหนด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนการวิจัยส่วนหนึ่งจากงบประมาณเงินรายได้คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ ประจำปีงบประมาณ 2562 และงบประมาณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

[1] Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology*, 33(6), 537-549.

[2] Petit, L., Gibert, M., Pofoff, M.R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiology*, 7, 104-110.

[3]. Gokce, H.I., Genc, O., Sozmen, M., Gokce, G. (2007). Determination of *Clostridium perfringens* toxin-types in sheep with suspected enterotoxemia in Kars Province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31(5), 355-360.

[4] Songer, J.G, Meer R.R. (1996). Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobe*, 2, 197-203.

[5] Garmory, H.S, Chanter, N., French, N.P., Bueschel, D., Songer, J.G., Titball, R. W. (2000). Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiology and Infection*, 124, 61-67.

[6] Miki, Y., Miyamoto, K., Kaneko-Hirano, I., Fujiuchi, K., Akimoto S. (2008). Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5366-5372.

[7] Al Khaldi, S.F, Myers, K.M., Rasooly, A., Chizhikov, V. (2004). Genotyping of *Clostridium perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 359–367.

[8] Albini, S., Brodard, I., Jaussi, A., Wollschlaeger, N., Frey, J., Miserez, R., Abril, C. (2008). Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Veterinary Microbiology*, 127, 179–185.

[9] Department of Medical Sciences. (2009). Thai herbal pharmacopoeia Vol. III. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, 2009

[10] Chaiyawat, C., Jamtaweekul, J., Wongpentak, S., Prachyaporn, I. (2014). Safety of herbal medicines in the National List. *Bulletin of the Department of Medical Sciences*, 56(3), 123-134.

[11] Dowell, V.R. Jr, Hawkins, T.M. (1987). Laboratory methods in anaerobic bacteriology CDC Laboratory Manual. Atlanta: DHEW Publication, 8272.

[12] Holdeman, L.V., Cato, E.P. & Moore, W.E.C. (1977). *Anaerobe Laboratory Manual*. 4th ed. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University, 156.

[13] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[14] Heikinheimo, A., Korkeala, H. 2005. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Letters in Applied Microbiology*, 40(6), 407-11.

[15] Meer, R.R., Songer, J.G. (1997). Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *American Journal of Veterinary Research*, 58(7), 702-705.

[16] Bureau of Drug and Narcotics, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Annual report in 2011. Nonthaburi: Ministry of Public Health, 2011.

[17] Jepson, M., Titball, R.W. (2000). Structure and function of clostridial phospholipase C. *Microbes and Infection*, 2, 1277-1284.

[18] Krakauer, T., Fleischer, B., Stevens, D.L., McClane, B.A., Stiles, B.G. (1997). *Clostridium perfringens* enterotoxin lacks superantigenic activity but induces an interleukin-6 response from human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*, 65(8), 3485–3488.

[19] McClane, B.A. (1996). An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon*, 34(11-12), 1335-1343.

[20] Engström, B.E., Fermér, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Båverud, V., Gunnarsson, A. (2003). Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Veterinary Microbiology*, 94, 225-235.

[21] Deguchi, A., Miyamoto, K., Kuwahara, T., Miki, Y., Kaneko, I. & Li, J., McClane B.A., Akimoto, S. (2009). Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PLoS ONE*. 4(5), e5598.