# รายงานการวิจัย
# เรื่อง

# อุบัติการของการติดเชื้อ enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) ในภาคใต้ของประเทศไทย

# Incidence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection in southern Thailand.

โดย

ผศ. ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดินประเภททุนทั่วไป
ประจำปี 2543

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะตรวจหาอุบัติการของเชื้อ enterohaemorrhagic ***Escherichia coli*** O157 ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย โดยตรวจหาจากอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วง และจากอาหารจำพวกลาบเนื้อ น้ำตกเนื้อ ซึ่งคาดว่าน่าจะพบเชื้อนี้ การตรวจอุจจาระผู้ป่วยเบื้องต้นจำนวน 135 ตัวอย่างด้วยชุดทดสอบ lactoferrin and haemoglobin detection ที่พัฒนาขึ้น ตรวจไม่พบ ***Escherichia coli*** O157 ซึ่งเมื่อตรวจยืนยันด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อจำนวนทั้งสิ้น 580 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผู้ป่วยที่อุจจาระเหลวไม่มีเลือด 562 ราย และ อุจจาระมีเลือดปน 18 ราย ก็ไม่พบ ***Escherichia coli*** O157 อย่างไรก็ตามผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบ lactoferrin and haemoglobin detection เหมาะที่จะใช้จัดกลุ่มเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงเบื้องต้น เนื่องจากสะดวกและให้ผลรวดเร็ว การตรวจหาเชื้อ ***Escherichia coli*** O157 เบื้องต้น ในลาบเนื้อและน้ำตกเนื้อโดยใช้ enzyme-immunochromatographic membrane assay จำนวน 123 ตัวอย่าง และการตรวจโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างอาหารทั้งหมด 173 ตัวอย่าง พบ ***Escherichia coli*** O157: H7 จำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลการตรวจสอบยืนยันทางชีวเคมีและต่อ latex agglutination assay ต่อ ***Escherichia coli*** O157 ว่าเป็น ***Escherichia coli*** O157 ตรงกับตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี enzyme-immunochromatographic membrane assay เมื่อตรวจหา Verocytotoxin 1 และ Verocytotoxin 2 โดยใช้ reversed passive latex agglutination พบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียวที่ตรวจพบ Verocytotoxin ทั้ง 2 ชนิด ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีของคนไทยปกติจำนวน 108 ราย โดยใช้วิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assays พบว่าคนไทยมี immunoglobulin M และ immunoglobulin G ต่อเชื้อ ถึงร้อยละ 16.67 และ 18.52 ตามลำดับ

## Abstract

As a local surveillance study, the incidence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in southern Thailand was determined over a period of 20 months. A total of 580 diarrhoeal stools and 173 food samples (rare to medium-cooked from raw beef) were tested. An immunochromatographic membrane assay was developed to detect lactoferrin and haemoglobin in 135 faecal samples. The results showed no indication of *E. coli* O157: H7 infection. Five hundred and eighty stool samples were cultured on cefixime-potassium tellurite sorbitol MacConkey agar. The results confirmed no *E. coli* O157: H7 infection. However, lactoferrin and haemoglobin assay was shown to be a rapid presumptive diagnosis of human diarrhoea since it is a very simple, inexpensive and sensitive test. Preliminary detection of *E. coli* O157: H7 in 123 food samples was carried out by using an enzyme-immunochromatographic membrane essay. One hundred and seventy-three food samples were cultured. Presumptive colonies were picked and identified by biochemical tests, and a latex agglutination assay. The results were well-correlated with the six positive samples from the enzyme-immunochromatographic membrane assay. The *E. coli* O157 isolates were tested for Verocytotoxin production using a reversed passive latex agglutination test. Both Verocytotoxin 1 and Verocytotoxin 2 were detected in one sample. An enzyme-link immunosorbent assays to detect antibodies to *E. coli* O157 lipopolysaccharide were developed with sera from healthy Thais. The results illustrated that 16.67 and 18.52 per cent of 108 subjects developed immunoglobulin M and immunoglobulin G to the *E. coli* O157 lipopolysaccharide antigen, respectively.

(This paper was presented in part at the 100th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Los Angeles, California. 21 to 25 May 2000: Voravuthikunchai SP, Buapan N, Okada K, Iida T, Honda T. Abstr Annu Meeting Am Soc Microbiol 2000; C 229. p 183, and published: Voravuthikunchai SP, Buapan N. The use of lactoferrin and haemoglobin as markers to differentiate pathogens causing diarrhoea in patients. Songkla Med J 2000; 18: 15-21).

*Key words:* EHEC, O157: H7, enteroharmorrhagic *Escherichia coli*, Verocytotoxin, HUS, haemolytic uremic syndrome, sorbitol MacConkey

# สารบาญเรื่อง


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | i |
| บทคัดย่อ | ii |
| Abstract | iii |
| สารบาญเรื่อง | iv |
| สารบาญรูป | v |
| สารบาญแผนภูมิ | vi |
| สารบาญตาราง | vii |
| บทนำ | 1 |
| วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย | 5 |
| ผลการวิจัย | 19 |
| วิจารณ์ผลการวิจัย | 36 |
| บรรณานุกรม | 40 |

# สารบาญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ตำแหน่งต่าง ๆ บนชุดทดสอบ Lf/Hb | 5 |
| 2 | ภาพจำลองการจับ Lf/Hb ในตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยด้วยแอนติบอดีจำเพาะ | 6 |
| 3 | *E. coli* O157 LPS detection kit | 12 |

# สารบาญแผนภูมิ


| แผนภูมิที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง | 7 |
| 2 | การตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7 จากอาหาร | 10 |
| 3 | การตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7 ในอาหารโดยใช้ *E. coli* O157: H7 detection kit | 12 |
| 4 | การทดสอบการเกาะกลุ่ม (agglutination) | 13 |
| 5 | ขั้นตอนการเตรียม VT 1 และ VT 2 เพื่อใช้ในการทดลอง RPLA | 15 |
| 6 | ขั้นตอนการตรวจหา antibody titer โดยใช้ ELISA reader | 18 |

# สารบาญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ความสัมพันธ์ของผลการตรวจจับแล็กโทเฟอร์ริน (lactoferrin-Lf) และฮีโมโกลบิน (haemoglobin-Hb) กับตัวอย่างอุจจาระที่ทำการตรวจ จำนวน 135 ตัวอย่าง | 19 |
| 2 | ผลการตรวจเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระในกลุ่มที่ให้ผลการตรวจ Lf/Hb เป็น +/+ จำนวน 55 ตัวอย่าง | 20 |
| 3 | ผลการตรวจเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระในกลุ่มที่ให้ผลการตรวจจับ Lf/Hb เป็น -/- จำนวน 47 ตัวอย่าง | 21 |
| 4 | แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของผู้ป่วยและจำนวนตัวอย่างในกลุ่มที่ให้ Lf/Hb เป็น +/- ที่ความเข้มข้นของแถบสีต่างกัน จำนวนทั้งหมด 33 ตัวอย่าง | 22 |
| 5 | ผลการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CT-SMAC จากตัวอย่างจำนวน 580 ตัวอย่าง | 23 |
| 6 | ชนิดของเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บนอาหาร CT-SMAC ตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยจากโรงพยาบาลหาดใหญ่ จำนวน 166 โคโลนี | 24 |
| 7 | ชนิดของเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บน CT-SMAC และให้สีชมพูบน CHROM agar ตัวอย่างจากโรงพยาบาลสงขลา จำนวน 54 โคโลนี (คิดเป็นร้อยละ 43.55 ของจำนวนโคโลนี NSF ทั้งหมด 124 โคโลนี) | 25 |
| 8 | ชนิดของเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria- NSF) บน CT-SMAC และให้สีชมพูบน CHROM agar ตัวอย่างจากโรงพยาบาลในเขตจังหวัดสตูล จำนวน 130 โคโลนี (คิดเป็นร้อยละ 36.72 ของจำนวนโคโลนี NSF ทั้งหมด 354 โคโลนี) | 26 |
| 9 | ผลการตรวจตัวอย่างอาหารจากการใช้ *E. coli* O157 LPS detection kit | 27 |
| 10 | จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจากตัวอย่างลาบเนื้อ | 28 |

# สารบาญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 11 | เชื้อกลุ่มที่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol-fermenting bacteria-SF) และกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บนอาหาร CT-SMAC จากจำนวนตัวอย่างอาหาร รวม 173 ตัวอย่าง | 29 |
| 12 | ชนิดของเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บนอาหาร CT-SMAC จากจำนวนโคโลนีที่ทดสอบ 157 โคโลนี | 30 |
| 13 | ชนิดของเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บนอาหาร CT-SMAC ที่ให้สีชมพูบน CHROM agar ทดสอบจาก NSF ทั้งหมด 228 โคโลนี) | 31 |
| 14 | ผลการตอบสนองของ IgM ต่อ LPS ของเชื้อ EHEC O157: H 7 จำนวน 108 ตัวอย่าง | 33 |
| 15 | ผลการตอบสนองของ IgG ต่อ LPS ของเชื้อ EHEC O157: H 7 จำนวน 108 ตัวอย่าง | 34 |

## บทนำ

โรคอุจจาระร่วง (diarrhoea) จัดเป็นปัญหาพื้นฐานด้านสาธารณสุขของประเทศที่กำลังพัฒนามาตลอด ซึ่งสาเหตุสำคัญเกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้ร่างกายมีการถ่ายอุจจาระผิดปกติ เช่น ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ ถ่ายมากกว่าปกติ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการอ่อนเพลีย และถ้ารุนแรงอาจถึงขั้นเสียชีวิต แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงที่พบบ่อย ได้แก่ ***Salmonella*** spp., ***Shigella*** spp., ***Vibrio cholerae***, ***Vibrio parahaemolyticus***, diarrhoeagenic ***Escherichia coli*** และ ***Staphylococcus aureus***

ในปี พ.ศ. 2525 มีรายงานการเริ่มระบาดของเชื้อ enterohaemorrhagic ***Escherichia coli*** (EHEC) O157: H7 ที่เมืองโอเรกอน รัฐมิชิแกน ประเทศสหรัฐอเมริกา เกิดจากผู้ป่วยบริโภคแฮมเบอเกอร์เนื้อวัวบดที่ไม่สุกดี จึงเรียกโรคนี้ว่า 'hamburger disease' [1-3] นอกจากนี้เชื้อ EHEC O157: H7 อาจปนเปื้อนในน้ำดื่ม น้ำแอปเปิล ผัก และผลไม้ เช่นผักกาดหอม กะหล่ำปลี ถั่วงอก แคนตาลูบ [4] การระบาดพบได้ทั่วไปในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา อังกฤษ และ ญี่ปุ่น ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าแต่ละปีจะมีการระบาดของโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อนี้บ่อยครั้ง มีผู้ป่วยติดเชื้อนี้ประมาณปีละ 10,000 ถึง 20,000 ราย และมีผู้ป่วยเสียชีวิตประมาณปีละ 250 ราย ส่วนใหญ่เกิดในเด็ก [5-8]

EHEC O157: H7 เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปแท่ง (Gram-negative bacilli) จัดอยู่ใน family ***Enterobacteriaceae*** เจริญเติบโตได้ดีทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน EHEC serotype O157: H7 หมายความว่า ที่ผนังเซลล์ของเชื้อมีแอนติเจนชนิดที่ 157 และที่แฟลเจลลามีแอนติเจนชนิดที่ 7 [5-6, 8-9] EHEC O157: H7 ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีคล้ายกับเชื้อ ***E.coli*** กลุ่มอื่น ๆ ลักษณะพิเศษที่แตกต่างจาก ***E.coli*** กลุ่มอื่น กล่าวคือ EHEC O157: H7 ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอลภายใน 24 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) EHEC จึงให้โคโลนีสีเดิมคือใสและไม่มีสี (colourless) นอกจากนี้ EHEC O157: H7 ไม่สร้างเอนไซม์ β-D-glucuronidase จึงให้โคโลนีสีชมพูบนอาหาร Chromocult Agar (CHROM) [8, 10]

นอกจากเป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง เชื้อนี้อาจทำให้เกิดฮีโมราจิกโคลิทิส (haemorrhagic colitis) คือการอักเสบของลำไส้ที่มีภาวะเลือดออกร่วม มักพบร่วมกับฮีโมไลติกยูริมิคซินโดรม (haemolytic-uremic syndrome-HUS) ได้แก่ กลุ่มอาการไตบกพร่องเนื่องจากเม็ดเลือดแตก และทรอมโบไซโทพินิกเพอร์พูลา (thrombocytopenic purpura-TTP) ภาวะเกร็ดเลือดต่ำ อาจทำอันตรายกับสมองส่วนกลาง ทำให้มีอาการเกี่ยวกับระบบประสาทและสมองอักเสบที่เรียกว่า 'encephalopathy' ระยะฟักตัว (incubation period) 3 ถึง 9 วัน พบว่าบริโภค EHEC O157: H7 จำนวนน้อยกว่า 10 เซลล์ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้ [1, 5] มีรายงานว่าแฟกเตอร์ที่ก่อความรุนแรงของโรค (virulent factor) ที่สำคัญในการติดเชื้อได้แก่สารพิษที่เรียกว่า 'verotoxin' (VT) ได้แก่ VT 1 และ VT 2 [11-13]

ในประเทศไทยยังไม่มีการรายงานถึงการระบาดของเชื้อ EHEC O157: H7 อาจเนื่องมาจากวิธีการตรวจวินิจฉัย (diagnostic methods) ทางห้องปฏิบัติการตามโรงพยาบาลต่างๆซึ่งนิยมลงเชื้อบน อาหาร MacConkey Agar (Mac) และทำการทดสอบต่อเฉพาะกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลแล็กโทส (non-lactose fermenters-NLF) ได้แก่ ***Salmonella*** spp. ***Shigella*** spp., ***Proteus*** spp. ส่วนกลุ่มที่หมักน้ำตาลแล็กโทส (lactose fermenters-LF) มักถูกละเลยว่าเป็น ***E.coli*** จึงมักจะไม่ได้รับการวินิจฉัยต่อ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเกี่ยวกับอุบัติการของ EHEC O157: H7 ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย โดยแบ่งเป็นการตรวจหา EHEC O157: H7 จากผู้ป่วย (clinical specimens) และการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างอาหาร

จุลินทรีย์ที่ก่อโรคอุจจาระร่วงแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ตามลักษณะการเข้าทำลายร่างกาย ได้แก่ (i) กลุ่มที่บุกรุกผ่านผนังลำไส้ โดยร่างกายจะมีการตอบสนองในรูปภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (CMIR) โดยเซลล์ที่ใช้กำจัดเชื้อที่แปลกปลอมนี้คือ เซลล์กลุ่ม polymorphonuclear leukocytes (PMNs) ซึ่งจะมีสารแล็กโทเฟอร์ริน (lactoferrin-Lf) เป็นองค์ประกอบหลัก [14-17] เชื้อกลุ่มนี้สามารถรุกล้ำเซลล์เยื่อบุ (mucosal cells) ของลำไส้ ทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้และเกิดเลือดออก ซึ่งสามารถตรวจพบฮีโมโกลบิน (haemoglobin-Hb) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเลือด เชื้อกลุ่มนี้ที่พบบ่อยได้แก่ ***Salmonella*** spp., ***Shigella*** spp., ***Campylobacter jejuni***, ***Clostridium difficile*** ดังนั้นก็ควรจะตรวจพบทั้ง Lf และ Hb ปะปนอยู่ในอุจจาระ (ii) กลุ่มที่สร้างสารพิษซึ่งเกิดผลเสีย

ต่อระบบการดูดซึมน้ำและอาหารของผนังลำไส้ เกิดภาวะที่เรียกว่า 'hypersecretion' ของน้ำ และคลอไรด์ (chloride) ของลำไส้ และยับยั้งการดูดซึมโซเดียมอิออน (sodium ion) ซึ่งเป็นผลให้เสียน้ำ และอิเล็กโทรไลท์เป็นจำนวนมาก อาจเรียกโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อกลุ่มนี้ว่า 'watery diarrhoea' จึงพบอุจจาระมีลักษณะเหลวมาก แต่เนื่องจากเชื้อไม่ได้มีการบุกรุกและทำลายเซลล์โดยตรงจึงไม่พบการตอบสนองของเซลล์ ดังนั้นจะตรวจไม่พบทั้ง Lf และ Hb ในอุจจาระ เชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ ***V. cholerae***, ***V. parahaemolyticus***, ***Giardia*** และไวรัส [18] เป็นต้น (iii) กลุ่มที่ใช้ fimbriae เกาะผิวผนังลำไส้และทำลายผนังเส้นเลือดฝอยทำให้มีเลือดไหลออกมาและจะปะปนอยู่ในอุจจาระเป็นจำนวนมาก ผู้ป่วยอาจถ่ายเป็นเลือดสด ซึ่งควรจะตรวจพบ Hb ที่เป็นองค์ประกอบของเลือด ตัวอย่างของเชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ EHEC O157: H7 [19-21]

เนื่องจากการตรวจหา faecal leukocyte ที่นิยมใช้กันแพร่หลายในการตรวจวินิจฉัยแยกกลุ่มผู้ป่วยอุจจาระร่วงเนื่องจากกลุ่มเชื้อที่สามารถรุกล้ำเซลล์ของร่างกาย (invasive organism) ต้องอาศัยความชำนาญของเจ้าหน้าที่ และต้องรีบตรวจภายในระยะเวลาอันสั้น Guerrant และคณะ [22] จึงพัฒนาใช้ Lf ที่ตรวจพบในอุจจาระผู้ป่วยเป็นดัชนีของ faecal leukocyte พบว่าระดับของ Lf ค่อนข้างจะคงที่แม้ว่าอุจจาระจะถูกเก็บไว้นานหนึ่งสัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากที่กล่าวมาเบื้องต้น จะเห็นได้ว่าเราสามารถนำ Hb และ Lf ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ที่ร่างกายสร้างเนื่องจากการตอบสนองหลังจากถูกทำลายโดยการติดเชื้อมาพัฒนาเป็นดัชนี (markers) แยกสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงเบื้องต้น งานวิจัยนี้ได้พัฒนาชุดทดสอบเพื่อตรวจจับ Lf และ Hb ในอุจจาระผู้ป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วง เพื่อแยกกลุ่มเชื้อสาเหตุที่ก่ออุจจาระร่วง

การเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultural methods) ใช้อาหาร cefixime-potassium tellurite supplement-sorbitol-MacConkey agar (CT-SMAC) [23] ซึ่งเป็นอาหารที่มีความจำเพาะ (selective medium) ต่อ EHEC O157: H7 ในการตรวจแยกเชื้อจากผู้ป่วยอุจจาระร่วงโดย cefixime จะยับยั้งการเติบโตของเชื้อ ***Proteus*** spp. และ tellurite จะยับยั้งการเจริญของ ***E.coli*** สายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอลเช่นกัน นอกจากนี้ยังเติมยา novobiocin ลงไปใน EC broth ซึ่งเป็น enriched medium ก่อนเพาะเลี้ยงเชื้อบน CT-SMAC เพื่อยับยั้งเชื้อกลุ่ม ***Pseudomonas*** spp.

การตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7 จากอาหาร จะทำให้ทราบถึงโอกาสที่จะเกิดการระบาดในประเทศไทย ความรู้พื้นฐานเหล่านี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในแง่ของการเฝ้าระวังโรค (surveillance) ตลอดจนการป้องกันโรค (prevention) เราใช้ *E.coli* O157 LPS detection kit (Nitto Denko Co., Japan) ซึ่งเป็น enzyme-immunochromatographic membrane assay และการเพาะเลี้ยงเชื้อในการตรวจหา EHEC O157: H7 จากตัวอย่างอาหารประเภทใช้เนื้อวัวกึ่งสุกกึ่งดิบในการปรุง ได้แก่ลาบเนื้อและน้ำตกเนื้อ ซึ่งเป็นอาหารที่ได้รับความนิยมในกลุ่มคนไทย ที่อาจเป็นสาเหตุเสี่ยงต่อการติดเชื้อ EHEC O157: H7 จากตัวอย่างอาหารที่ให้ผลบวก ใช้วิธี reserved passive latax agglutination (RPLA) [13, 24] ตรวจหาระดับของสารพิษ ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งได้แก่ VT 1 และ VT2

สมมุติฐานอีกข้อหนึ่งที่ไม่พบอุบัติการของ EHEC O157: H7 ระบาดในประเทศไทยอาจเป็นเพราะคนไทยมีภูมิคุ้มกันชนิดไม่พึ่งเซลล์ (humoral immune response) ต่อเชื้อตัวนี้ ดังนั้นเราจึงทดสอบการตอบสนองของ immunoglobulin M (IgM) และ IgG ต่อลิโพโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccaride-LPS) ของ EHEC O157: H7 โดยใช้วิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) [25] การศึกษาครั้งนี้พบว่าคนไทยมีภูมิคุ้มกันต่อ EHEC O157: H7

## วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

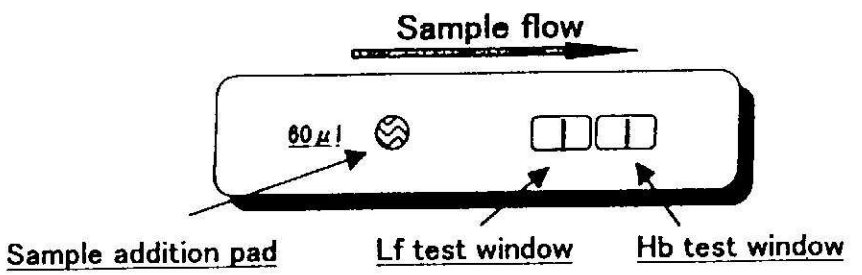
### 1. การเก็บตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วย

เก็บตัวอย่างอุจจาระ (faeces) ผู้ป่วยที่มีอาการถ่ายอุจจาระเหลว และบางราย อุจจาระมีเลือดปน จากโรงพยาบาลหาดใหญ่ โรงพยาบาลสงขลา และโรงพยาบาล ในเขตจังหวัดสตูล โดยเก็บตัวอย่างปริมาณประมาณ 0.5 ก ในขวดที่ปราศจากเชื้อ เพื่อนำมาตรวจหากลุ่มเชื้อที่คาดว่าจะเป็นสาเหตุ โดยใช้ชุดทดสอบ Lf/Hb (lactoferrin /haemoglobin detection kit) ซึ่งพัฒนาร่วมกับบริษัท Nitto Denko และสถาบัน BIKEN ประเทศญี่ปุ่น และนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับผลการตรวจโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultural methods) ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา แบคทีเรียกลุ่มที่ก่อโรคอุจจาระ-ร่วง (enteric pathogenic bacteria) ที่สำคัญอื่น ๆ ที่ตรวจหานอกจาก enterohaemorrhagic ***Escherichia coli*** (EHEC) ได้แก่ ***Salmonella*** spp., ***Shigella*** spp., ***Vibrio cholerae***, ***Vibrio parahaemolyticus***, และ diarrhoeagenic ***Escherichia coli***

### 2. การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อสาเหตุอุจจาระร่วง

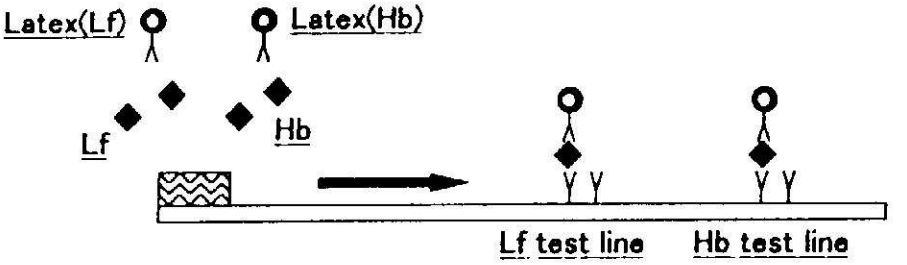
2.1 การตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อหาแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อโรคอุจจาระร่วง โดยอาศัย การตรวจจับสารแล็กโทเฟอร์ริน (lactoferrin-Lf)และฮีโมโกลบิน (haemoglobin-Hb) โดยใช้ชุดทดสอบ Lf/Hb **(รูปที่ 1)** ซึ่งเป็นชุดทดสอบอย่างง่ายและรวดเร็วใช้ตรวจจับ Lf และ Hb ซึ่งเป็นดัชนี (markers) ของการติดเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

**รูปที่ 1 ตำแหน่งต่าง ๆ บนชุดทดสอบ Lf/Hb**



ชุดทดสอบนี้อาศัยหลักการของ immunochromatographic membrane assay ถ้าในอุจจาระมีสารดังกล่าวอยู่จะเข้าจับเม็ดสีลาเท็กซ์ (latex beads) ซึ่งมีแอนติแล็กโทเฟอร์รินแอนติบอดีที่ผลิตจากแพะ (goat anti-lactoferrin antibodies) และแอนติฮีโมโกลบินแอนติบอดีที่ผลิตจากแกะ (sheep anti-haemoglobin antibodies) เคลือบอยู่บนเม็ดสีลาเท็กซ์ และจะปรากฏผลการตรวจจับโดยสังเกตจากแถบสี (band) ที่ปรากฏอยู่บนช่องแสดงผลของ Lf และช่องแสดงผลของ Hb **(รูปที่ 2)**

**รูปที่ 2 ภาพจำลองแสดงการจับ Lf/Hb ในตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยด้วยแอนติบอดีจำเพาะ**




ขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้

2.1.1 ชั่งตัวอย่างอุจจาระ 0.1 ก

2.1.2 เติม dilution buffer 4.9 มล ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจางเป็น 50 เท่าของตัวอย่างเริ่มต้น ดูดใส่ microtiter plate

2.1.3 เจือจางตัวอย่างเข้มข้นเป็น 100 200 400 800 เท่า ของตัวอย่างเริ่มต้น ปริมาตรรวมของแต่ละความเข้มข้นมีค่าเท่ากับ 100 µล

2.1.4 เติมเม็ดสีลาเท็กซ์ 2 µล ลงในตัวอย่างทุกความเข้มข้น โดยขั้นตอนนี้ต้องเปลี่ยนหลอด eppendorf ทุกครั้งเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

2.1.5 ผสมเม็ดสีลาเท็กซ์ให้เข้ากับตัวอย่าง ปล่อยให้ Lf และ/หรือ Hb จับกับแอนติแล็กโทเฟอร์รินแอนติบอดีและแอนติฮีโมโกลบินแอนติบอดี โดยตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

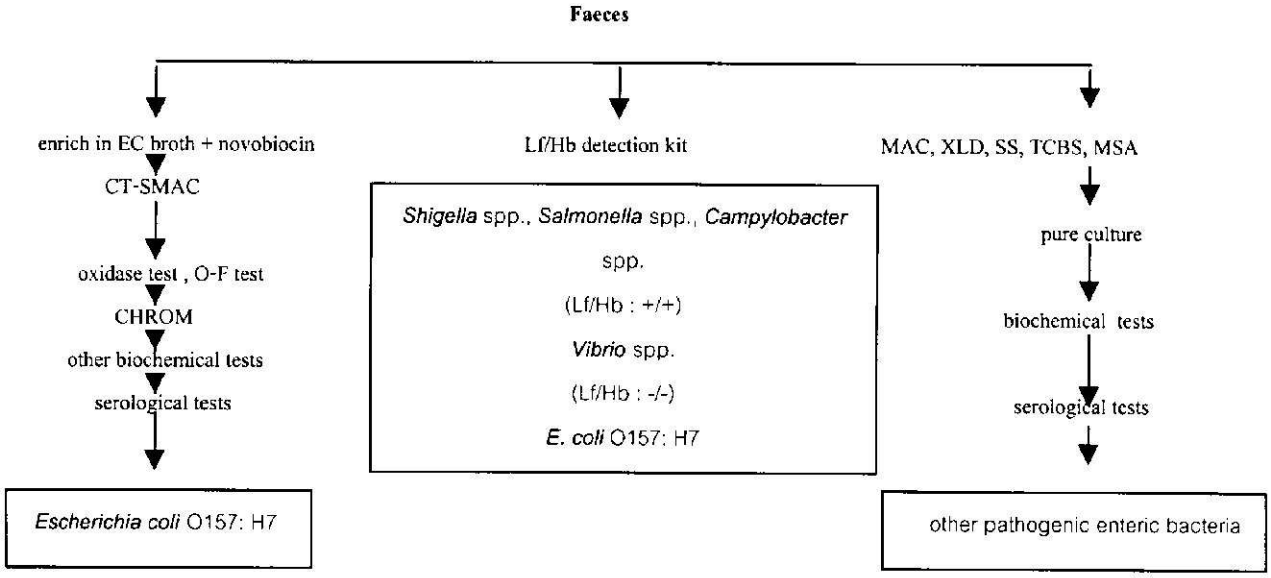
2.1.6 เตรียมชุดทดสอบไว้เพื่อพร้อมจะเติมตัวอย่างลงในช่องเติมตัวอย่างบริเวณด้านล่างสุดของชุดทดสอบ

2.1.7 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างข้อ 2.1.6 มาความเข้มข้นละ 60 μล เติมลงไปในช่องเติมตัวอย่างของชุดทดสอบ โดยแต่ละความเข้มข้นของชุดทดสอบ 1 อัน (5 ความเข้มข้น) และรอดูผลการเกิดแถบสี หลังจากเติมตัวอย่าง 10 ถึง 15 นาที

2.1.8 นำแถบสีที่เกิดขึ้นมาเทียบความเข้มข้นเพื่อแปลผล

2.2 การตรวจวิเคราะห์หาแบคทีเรียกลุ่มก่อโรคอุจจาระร่วงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ **(แผนภูมิที่ 1)**

**แผนภูมิที่ 1 การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง**



2.2.1 นำตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยท้องร่วงมาเขี่ย (streak) ลงบนอาหารต่อไปนี้ เพื่อให้ได้โคโลนีอิสระ (isolated colony) บน cefixime-potassium tellurite supplement-sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC) [23] (Difco) เพื่อตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7 บน MacConkey agar (Mac) (Difco) เพื่อตรวจหา ***Escherichia coli*** บน MacConkey agar (MAC), xylose lysine deoxycholate agar (XLD) (Merck) และ SS (Merck) เพื่อตรวจหาเชื้อกลุ่ม ***Shigella*** spp. และ ***Salmonella*** spp. บน thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) (Merck) เพื่อตรวจหา ***V. parahaemolyticus*** และ ***V. cholerae*** และบน mannitol salt agar (MSA) (Oxoid) เพื่อตรวจหา ***Staphylococcus aureus***

2.2.2 นำตัวอย่างจากข้อ 2.2.1 มาเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrich) ใน selenite cysteine broth และเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 37 °ซ นาน 18 ถึง 24 ชม ก่อนนำมาแยกหาเชื้อ ***Shigella*** spp. และ ***Salmonella*** spp. บนอาหาร SS และ XLD

2.2.3 นำตัวอย่างอุจจาระที่เหลือมาเติม alkaline peptone water (APW) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 และเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 37 ° ซ นาน 18 ถึง 24 ชม เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ หลังจากนั้นนำมาแยกหาเชื้อกลุ่ม ***Vibrio*** spp. บนอาหาร TCBS อีกครั้ง

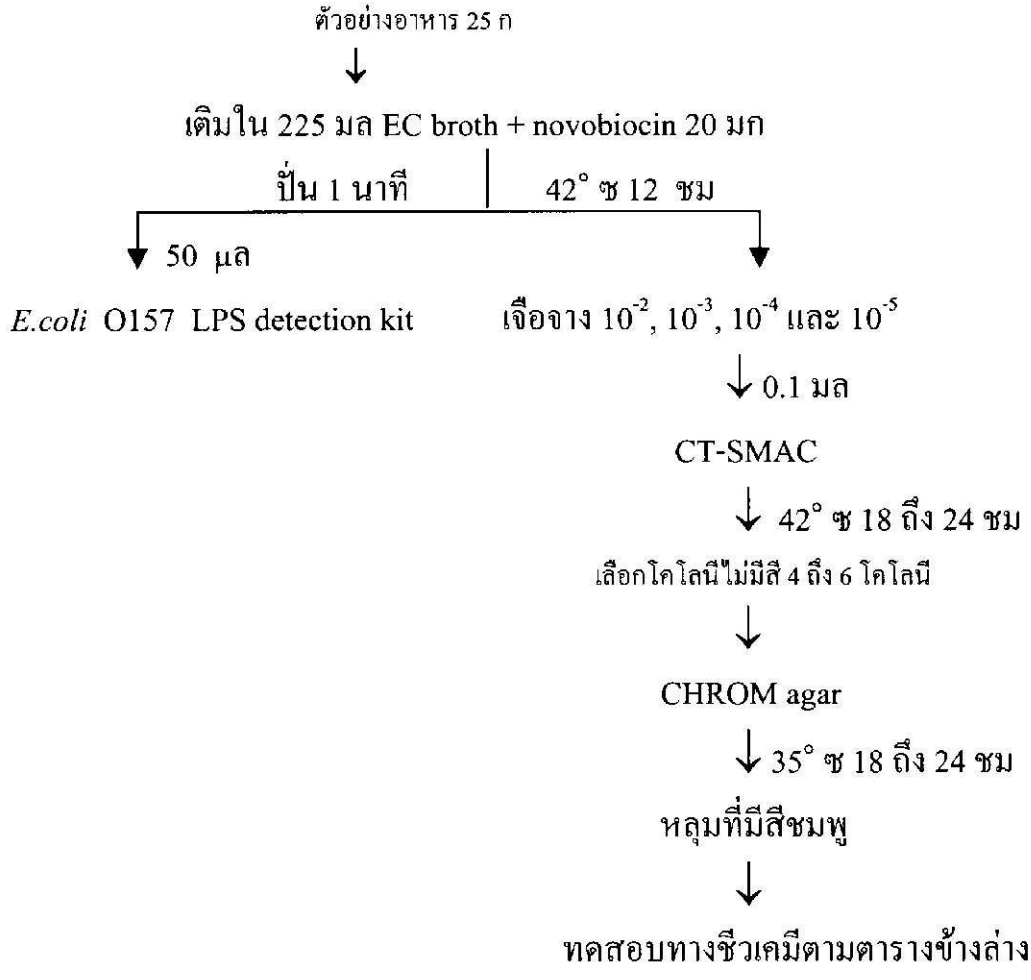
2.2.4 นำโคโลนีอิสระที่คาดว่าเป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงจากอาหารที่จำเพาะแต่ละชนิด มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical tests) ที่ใช้จำแนกเชื้อว่าเป็นเชื้อตัวใดในกลุ่ม โดยนำผลการทดสอบมาเทียบกับ key ในหนังสือ Bergey's manual of determinative bacteriology [26]

2.2.5 นำโคโลนีจากข้อ 2.2.4 มาตรวจสอบยืนยันทางน้ำเหลือง (serological tests) โดยทดสอบการจับกลุ่มกับแอนติซีรัม (antiserum) ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด

**3. การเก็บตัวอย่างอาหาร**

เก็บตัวอย่างลาบเนื้อ 123 ตัวอย่าง และน้ำตกเนื้อ 50 ตัวอย่าง จากร้านแผงลอยในเขตอำเภอหาดใหญ่ และอำเภอเทพา จังหวัดสงขลา นำตัวอย่างอาหารมาชั่งใส่ถุงที่ปราศจากเชื้อ โดยใช้ซ้อนจุ่มแอลกอฮอล์และลนไฟ ตักตัวอย่างอาหารตัวอย่างละ 25 ก เพื่อนำมาตรวจหา EHEC O157: H7 **(แผนภูมิที่ 2)**

**แผนภูมิที่ 2 การตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7**




| TSI (slant, butt, gas, $H_2S$) | | | | Lysine | indole | Motility |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A(K) | A | +(-) | - | +(-) | +(-) | +(-) |

| Citrate | MR | VP | Cellobiose | β-glucuronidase | Oxidase |
|---|---|---|---|---|---|
| - | + | - | - | - | - |

ทดสอบ serological test กับ *E.coli* O157 antisera

**4. การตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7 จากตัวอย่างอาหาร**

นำตัวอย่างลาบ 25 ก ใส่ใน EC broth ปริมาตร 225 มล ที่เติมยาปฏิชีวนะ novobiocin (20 มก/ล) นำไปปั่นโดยใช้เครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที และเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42 °ซ นาน 12 ชม ดูดเชื้อที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth 0.1 มล มาทำ dilution ด้วย normal saline 0.9 มล ให้มีความเข้มข้นที่ $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$ และ $10^{-5}$

4.1 ใช้ *E.coli* O157 LPS detection kit (Nitto Denko Co, Japan) **(แผนภูมิที่ 3)**

4.1.1 บริเวณช่วงทดสอบ test window จะมี anti–*E.coli* O157: H7 polyclonal antibody ยึดติดกับ membrane ถ้าตัวอย่างมี EHEC O157: H7 ก็จะจับกัน และมีเอนไซม์ horseradish-peroxidase (HRP) และ ที่ตรึงไว้กับ latex beads เมื่อเติม substrate solution จึงเกิดสี

4.1.2. reference window มี anti-goat IgG polyclonal antibody ซึ่งจำเพาะต่อ goat anti-*E.coli* O157: H7 ที่ตรึงบน latex beads พร้อมด้วยเอนไซม์เมื่อเติม substrate solution จึงเกิดสี

4.1.3 นำตัวอย่างอาหารที่มีความเข้มข้นที่ $10^{-1}$ ปริมาณ 50 µล หยดบนหลุมชุดทดสอบ หยด latex solution 1 หยด บนหลุมหยดตัวอย่าง และหยด substrate solution 2 หยด บนหลุมสำหรับหยด substrate ทิ้งไว้ 15 นาที ผลบวกจะเกิดแถบสีสีน้ำเงินหรือสีม่วงบริเวณช่องทดสอบ **(รูปที่ 3)**

**แผนภูมิที่ 3 การตรวจหาเชื้อ *E. coli* 0157 ในอาหารโดยใช้ *E.coli* O157 LPS detection kit**

ลาบ 25 ก + 225 มล EC broth + novobocin (20 มก/ล)

↓ ปั่นนาน 1 นาที

บ่มเชื้อที่ 42 °ซ นาน 12 ชม

↓ ทำ dilution $10^{-2}$ $10^{-3}$ $10^{-4}$ และ $10^{-5}$

นำ $10^{-1}$ มา 50 µล หยดบนหลุม S,1

หยด latex solution 1 หยด บนหลุมเดียวกับตัวอย่าง

↓

หยด substrate solution 2 หยด บนหลุม 2

↓15 นาที

ผลบวก: แถบสีสีน้ำเงินหรือสีม่วง ที่ T line

**รูปที่ 3 *E.coli* O157 LPS detection kit**

4.2 การตรวจนับจำนวนเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจหา EHEC O157: H7

นำตัวอย่างอาหารที่ความเข้มข้น $10^{-1}$ ,$10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$ และ $10^{-5}$ มา 0.1 มล เกลี่ย (spread) ลงบน CT-SMAC เพาะเลี้ยงเชื้อที่ 42 ° ซ นาน 18 ถึง 24 ชม นำโคโลนีที่ไม่มีสี ตัวอย่างละประมาณ 4 ถึง 6 โคโลนี เขี่ยลงบน CHROM agar เพาะเลี้ยงเชื้อที่ 42 ° ซ นาน 18 ถึง 24 ชม คัดเลือกหลุมที่ให้สีชมพูอ่อน มาทำการทดสอบชีวเคมี หากผลการทดสอบทางชีวเคมีได้ผลตรงกับของเชื้อ ***E. coli*** หลังจากนั้นก็นำมาลงบน DHL agar และ Blood agar เช็คลักษณะเฉพาะของโคโลนีและ haemolysis และนำไปทดสอบการเกาะกลุ่ม (agglutination) กับ anti–*E. coli* 0157 เพื่อยืนยันว่าเป็น EHEC O157 สังเกตการเกาะกลุ่มของตัวอย่างเทียบกับ positive control และ negative control **(แผนภูมิที่ 4)**

**แผนภูมิที่ 4 การทดสอบการเกาะกลุ่ม (agglutination)**

ตัวอย่างอาหาร biochemical tests ให้ผลว่าน่าจะเป็น EHEC O157

↓

2 ถึง 3 มล NSS

↓

ต้มที่ 100 °ซ ประมาณ 1 ชม

↓

ปั่นที่ 2500 rpm 15 นาที

↓

นำตะกอนมาทดสอบกับ anti–*E. coli* 0157

↓

agglutination

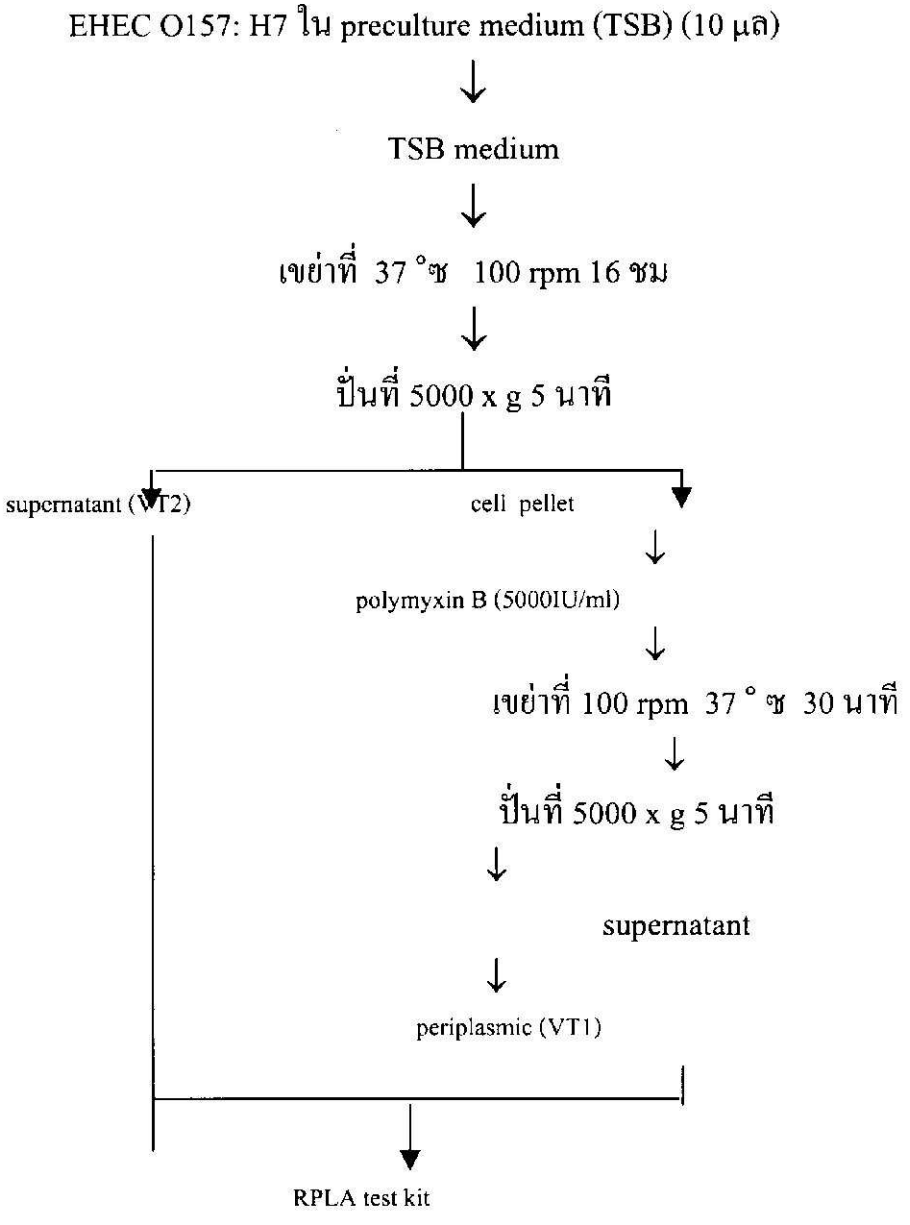
↓

EHEC 0157

**5. การทดสอบด้วย Reversed passive latex agglutination (RPLA) (แผนภูมิที่ 5)**

นำเชื้อ EHEC O157: H7 จาก NA 1 โคโลนี ถ่ายลงบนอาหาร TSB (1 มล) เพาะเลี้ยงเชื้อที่ 30 °ซ เขย่า 100 รอบ/นาที 18 ถึง 24 ชม ดูดเชื้อจาก TSB มา 10 µล ถ่ายเชื้อลงใน 1 มล ของ TSB ใหม่ โดยให้ได้เชื้อประมาณ $10^7$ เซลล์ /มล หลังจากนั้นนำมาเขย่าที่ 37 °ซ 100 รอบ/นาที เป็นเวลาประมาณ 16 ชม จึงนำอาหารมาปั่นที่ 5000 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาส่วนบน (supernatant) และส่วนตะกอน (cell pellet) เก็บส่วนบนไว้เพื่อทดสอบหา titer ของ VT 2 นำส่วนตะกอนมาเติม polymyxin B (5,000 IU/มล) เขย่า 100 รอบ/นาที ที่ 37 °ซ 30 นาที และปั่นที่ 5,000 g 5 นาที เพื่อแยกเอา VT 1 ออกจากส่วนตะกอน ทดสอบด้วย RPLA test kit เพื่อหาปริมาณของ VT 1และ VT 2 ที่สร้างโดย EHEC O157: H7 โดยทดสอบใน microtiter plate ก้นรูปตัวยู ( U-shape)

**แผนภูมิที่ 5 ขั้นตอนการเตรียม VT1 และ VT2 เพื่อใช้ในการทดลอง RPLA** [13, 24]



**6. การสกัด lipopolysaccharide (LPS)**

LPS เป็นแอนติเจนที่สำคัญของแบคทีเรียกรัมลบ รูปแท่ง นำ EHEC O157: H7 Sakai Strain ที่ได้รับจากการระบาดที่ประเทศญี่ปุ่น ในปี ค.ศ. 1996 และทำการทดสอบทางชีวเคมีแล้ว มาทำการสกัดเอาแอนติเจนคือส่วนของ LPS ของเชื้อตัวนี้โดยใช้น้ำร้อนและฟีนอล[27-29] การสกัด LPS ทำได้ดังนี้

6.1 ทำการเลี้ยงเชื้อ EHEC O175 : H7 มาลงบน Triptic Soy Broth (TSB) 200 มล ที่บรรจุอยู่ใน flask ขนาด 500 มล หลังจากนั้นนำไปเข้า shaker incubator ที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 18 ชม

6.2 นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ถ่ายใส่ใน centrifuge tube ขนาด 250 มล นำไปปั่นที่ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 10 °ซ นาน 30 นาที

6.3 นำเซลล์ที่ได้มาเติม Phosphate buffer saline (PBS) 200 มล เขย่าให้เข้ากัน เพื่อเป็นการล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออก นำไปปั่นที่ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 10 °ซ นาน 30 นาที

6.4 นำตะกอนที่ได้มาชั่งหาน้ำหนัก เติมน้ำร้อน (อุณหภูมิ 68°ซ) ในอัตราส่วนตะกอน 80 ก ต่อน้ำร้อน 350 มล แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 68 °ซ

6.5 นำสารละลายเซลล์มาเติมสารละลายฟีนอลในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันเพื่อทำให้เซลล์แตก

6.6 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปแช่น้ำแข็ง

6.7 นำสารละลายเซลล์ในน้ำร้อนและฟีนอล มาทำการ centrifuge ที่ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 10 °ซ นาน 15 นาที จะทำให้ได้ส่วนของตะกอนและสารละลายส่วนบน หลังจากนั้นนำสารละลายส่วนบนที่ได้มาทำการปั่น ที่ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 10 °ซ นาน 15 นาที เก็บสารละลายส่วนบนไป dialysis หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นที่ 10000 rpm นาน 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปปั่นด้วย Sorvall® Automatic superspeed refrigirated centrifuge รุ่น RC 5C, DuPont, USA ที่ 100,000 x g นาน 2 ชม จะได้ส่วนของตะกอนคือ LPS

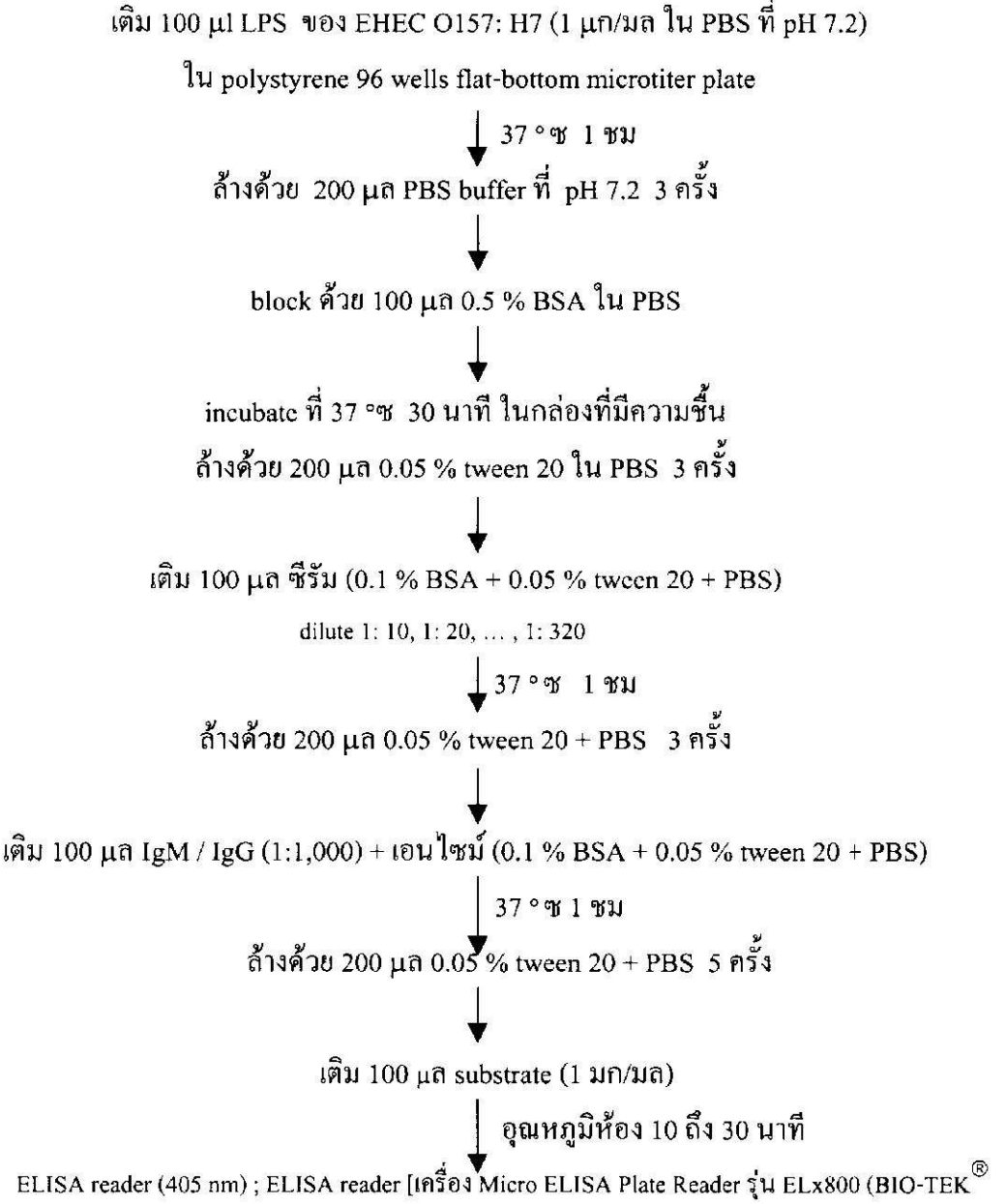
**7. การเก็บตัวอย่างซีรัมของคน**

เก็บตัวอย่างซีรัมจากคนปกติที่มาบริจาคเลือด หรือคนไข้ที่มาทำการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ด้วยสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่โรคอุจจาระร่วง ตัวอย่างละ 0.5 มล แบ่งตัวอย่างสำหรับตรวจหาระดับแอนติบอดีตามช่วงอายุ

**8. การทดสอบหาระดับแอนติบอดี ต่อเชื้อ EHEC O157: H7 โดยใช้ ELISA**

ใช้ indirect ELISA method [25] ซึ่งเป็นการตรวจหาแอนติบอดีโดยการเคลือบแอนติเจนที่ก้นถาด (plate) แล้วเติมซีรัมที่ต้องการทดสอบลงไป หลังจากนั้นเติม anti-human immunoglobulin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีนั้น ใส่ substrate ให้เอนไซม์ย่อย วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้ ELISA reader ขั้นตอนดังแสดงใน**แผนภูมิที่ 6**

**แผนภูมิที่ 6 ขั้นตอนการตรวจหา antibody titer โดยใช้ ELISA reader**



## ผลการวิจัย

### 1. EHEC O157: H7 จากตัวอย่างผู้ป่วยอุจจาระร่วง

จากการนำตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วงจำนวน 135 ตัวอย่างมาตรวจจับแล็กโทเฟอร์ริน (lactoferrin-Lf) และ ฮีโมโกลบิน (haemoglobin-Hb) โดยใช้ชุดทดสอบ Lf/Hb (lactoferrin/haemoglobin detection kit) ซึ่งเป็นการตรวจจัดกลุ่มผู้ป่วยอุจจาระร่วงเบื้องต้นที่ง่ายและรวดเร็ว ปรากฏผลการทดลองดังนี้คือ ผลการตรวจจับ Lf /Hb เป็น +/+ พบในตัวอย่างจำนวน 55 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40.74 ผลการตรวจจับ Lf/Hb เป็น -/- พบในตัวอย่าง 47 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 34.82 ผลการตรวจจับ Lf/ Hb เป็น -/+ ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) ไม่พบในตัวอย่างใด นอกจากนี้ยังพบผลการตรวจจับ Lf/Hb เป็น +/- จำนวน 33 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.44 ดังแสดงใน ตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ความสัมพันธ์ของผลการตรวจจับแล็กโทเฟอร์ริน (lactoferrin-Lf) และ ฮีโมโกลบิน (haemoglobin-Hb) กับตัวอย่างอุจจาระที่ทำการตรวจ จำนวน 135 ตัวอย่าง

| ผลการตรวจจับ Lf/Hb | จำนวนตัวอย่าง |
|---|---|
| +/- | 55 (40.74)* |
| -/- | 47 (34.82) |
| -/+ | 0 |
| +/- | 33 (24.44) |

* ร้อยละ

**Central Library**
**Prince of Songkla University**

เมื่อนำตัวอย่างอุจจาระในกลุ่มที่ให้ผลการตรวจจับ Lf/Hb เป็น +/+ จำนวน 55 ตัวอย่าง มาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคอุจจาระร่วงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม ได้พบเชื้อดังต่อไปนี้ ***Salmonella*** gr. B และ D จำนวนอย่างละ 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.64) ***Salmonella*** gr. C และ E จำนวนอย่างละ 12 ตัวอย่าง (ร้อยละ 21.82) ***Shigella*** gr. B จำนวน 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9.09) ***Shigella*** gr. D จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.27) ***Salmonella typhi*** จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ1.82) diarrhoeagenic ***Escherichia coli*** I จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.45) รวมตัวอย่าง Lf/Hb +/+ ที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุทั้งสิ้น 41 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 74.55 และตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดที่ทำการตรวจจำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.45 ดังแสดงผลใน **ตารางที่ 2**

**ตารางที่ 2** ผลการตรวจเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระ ในกลุ่มที่ให้ผลการตรวจ Lf/Hb เป็น +/+ จำนวน 55 ตัวอย่าง

| ชนิดของเชื้อสาเหตุ | จำนวนตัวอย่าง |
|---|---|
| ***Salmonella*** gr. B | 2 (3.64)* |
| ***Salmonella*** gr. C | 12 (21.82) |
| ***Salmonella*** gr. D | 2 (3.64) |
| ***Salmonella*** gr. E | 12 (21.82) |
| ***Shigella*** gr. B | 5 (9.09) |
| ***Shigella*** gr. D | 4 (7.27) |
| ***Samonella typhi*** | 1 (1.82) |
| Diarrhoeagenic ***Escherichia coli*** I | 3 (5.45) |
| Others | 14 (25.45) |

*ร้อยละ

เมื่อนำตัวอย่างอุจจาระในกลุ่มที่ให้ผลการตรวจจับ Lf/Hb เป็น -/- ตามลำดับ จำนวน 47 ตัวอย่าง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสม พบเชื้อดังนี้ ***V. cholerae*** จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10.64 ***V. parahaemolyticus*** จำนวน 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 42.55 และตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดที่ทำการตรวจ จำนวน 22 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 46.81 ดังแสดงใน **ตารางที่ 3**

**ตารางที่ 3** ผลการตรวจเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระ ในกลุ่มที่ให้ผลการตรวจจับ Lf/Hb เป็น -/- จำนวน 47 ตัวอย่าง

| ผลการตรวจ | จำนวนตัวอย่าง |
|---|---|
| ***Vibrio cholerae*** | 5 (10.64)* |
| ***Vibrio parahaemolyticus*** | 20 (42.55) |
| Non-pathogenic enteric bacteria | 22 (46.81) |

* ร้อยละ

เมื่อนำตัวอย่างอุจจาระกลุ่มที่ให้ผล Lf/Hb เป็น +/- ทั้งหมดมาหาความสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วยโดยใช้ความเข้มข้นของแถบสี (band) เป็นเกณฑ์ในการแบ่งได้ผลดังแสดงใน**ตารางที่ 4** พบตัวอย่างผู้ป่วยในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นเด็กเล็กที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี (ร้อยละ 57.58) และพบว่าผู้ป่วยกลุ่มเด็กอายุตั้งแต่ 1 วัน ถึง 11 เดือนมีความเข้มข้นของ Lf สูงสุดถึงร้อยละ 100

**ตารางที่ 4** แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของผู้ป่วยและจำนวนตัวอย่างในกลุ่มที่ให้ Lf/Hb เป็น +/- ที่ความเข้มข้นของแถบสีต่างกัน จำนวนทั้งหมด 33 ตัวอย่าง

| อายุ | ความเข้มข้นของ Lf (ร้อยละ) | จำนวนตัวอย่างที่ให้ผล Lf/Hb: +/- |
|---|---|---|
| 1 วัน-11 เดือน | 100 | 19 (57.58)* |
| 1 ปี-2 ปี | 50-100 | 6 (18.18) |
| 2 ปี-5 ปี | <50-50 | 5 (15.15) |
| > 5 ปี | <50 | 3 (9.09) |

* ร้อยละ

จากการนำตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยอุจจาระร่วงทั้งหมด 580 ตัวอย่าง (ไม่มีเลือดปน 562 ตัวอย่างและมีเลือดปน 18 ตัวอย่าง) มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร cefixime-potassium tellurite supplement-sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC) เพื่อตรวจหา EHEC O157: H7 ผลจากการสังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร ได้ผลดังนี้ พบเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) ซึ่งให้โคโลนีใส ไม่มีสีบนอาหาร CT-SMAC จำนวน 435 ตัวอย่าง พบเชื้อกลุ่มที่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol-fermenting bacteria-SF) จำนวน 551 ตัวอย่าง และ 4 ตัวอย่างไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อใด ๆ บนอาหาร ดังแสดงใน**ตารางที่ 5**

**ตารางที่ 5** ผลการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CT-SMAC จากตัวอย่างจำนวน 580 ตัวอย่าง

| ผลการตรวจ | จำนวนตัวอย่าง |
|---|---|
| Non-sorbitol fermenting bacteria | 435 (75.0)* |
| Sorbitol fermenting bacteria | 551 (95.0) |
| No growth | 4 (0.7) |

* ร้อยละ

จากตัวอย่างอุจจาระที่เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CT-SMAC แล้วพบเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล นำโคโลนีที่มีลักษณะใสไม่มีสี รวมทั้งหมด 166 โคโลนีมาตรวจวิเคราะห์หา EHEC O157: H7 ผลการตรวจไม่พบ EHEC O157: H7 ตรวจพบแต่เชื้อที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอลเช่นเดียวกับ EHEC O157: H7 บน CT-SMAC ดังต่อไปนี้ ***Pseudomonas alcaligenes*** จำนวน 60 โคโลนี (ร้อยละ 37) ***Burkholderia capesia*** 25 โคโลนี (ร้อยละ 15) ***Escherichia coli*** 20 โคโลนี (ร้อยละ 12) ***Pseudomonas pseusoalcaligenes*** 15 โคโลนี (ร้อยละ 9) ***Pseudomonas aeruginosa*** 15 โคโลนี (ร้อยละ 9) ***Vibio damsela*** 14 โคโลนี (ร้อยละ 8) ***Citrobacter freundii*** 12 โคโลนี (ร้อยละ 7) และ ***Aeromonas schubertii*** 5 โคโลนี (ร้อยละ 3) ดังแสดงใน**ตารางที่ 6**

**ตารางที่ 6** ชนิดของเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บนอาหาร CT-SMAC ตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยจากโรงพยาบาลหาดใหญ่ จำนวน 166 โคโลนี

| ชนิดของเชื้อที่พบ | จำนวนโคโลนี |
|---|---|
| ***Pseudomonas alcaligenes*** | 60 (37)* |
| ***Burkholderia capesia*** | 25 (15) |
| ***Escherichia coli*** | 20 (12) |
| ***Pseudomonas pseudoalcaligenes*** | 15 (9) |
| ***Pseudomonas aeruginosa*** | 15 (9) |
| ***Vibrio damsela*** | 14 (8) |
| ***Citrobacter freundii*** | 12 (7) |
| ***Aeromonas schubertii*** | 5 (3) |

* ร้อยละ

ชนิดของเชื้อที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอลบน CT-SMAC และให้สีชมพูบน CHROM agar จากการตรวจอุจจาระผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสงขลา (**ตารางที่ 7**) และโรงพยาบาลในเขตจังหวัดสตูล (**ตารางที่ 8**) พบ ***Hafnia alvei*** ในสัดส่วนที่สูงสุด คือร้อยละ 57.41 และ 53.85 ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ ***Enterobacter gergoviae*** ที่เหลือประมาณร้อยละ 5 หรือน้อยกว่า เป็นแบคทีเรียอื่นๆ ได้แก่ ***Leclercia adecarboxylata, Enterobacter agglomerans, Klebsiella ozaenae, Proteus mirabilis, Serratia rubidaea, Escherichia fergosonii*** และกลุ่ม NFS ***Escherichia coli*** ที่ไม่ใช่ EHEC O157: H7

**ตารางที่ 7** ชนิดของเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บน CT-SMAC และให้สีชมพูบน CHROM agar ตัวอย่างจากโรงพยาบาลสงขลา จำนวน 54 โคโลนี (คิดเป็นร้อยละ 43.55 ของจำนวนโคโลนี NSF ทั้งหมด 124 โคโลนี)

| NSF ที่ให้สีชมพูบน CHROM agar | จำนวนโคโลนี |
|---|---|
| ***Hafnia alvei*** | 31 (57.41)* |
| ***Enterobacter gergoviae*** | 17 (31.48) |
| ***Leclercia adecarboxylata*** | 3 (5.56) |
| ***Escherichia fergusonii*** | 1(1.85) |
| ***Serratia rubidaea*** | 1 (1.85) |
| Other NFS ***Escherichia coli*** | 1 (1.85) |

* ร้อยละ

**ตารางที่ 8** ชนิดของเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บน CT-SMAC และให้สีชมพูบน CHROM agar ตัวอย่างจากโรงพยาบาลในเขตจังหวัดสตูล จำนวน 130 โคโลนี (คิดเป็นร้อยละ 36.72 ของจำนวนโคโลนี NSF ทั้งหมด 354 โคโลนี)

| NSF ที่ให้สีชมพูบน CHROM agar | จำนวนโคโลนี |
|---|---|
| ***Hafnia alvei*** | 70 (53.85)* |
| ***Enterobacter gergoviae*** | 47 (36.15) |
| ***Enterobacter agglomerans*** | 3 (2.31) |
| ***Klebsiella ozaenae*** | 3(2.31) |
| ***Leclercia adecarboxylata*** | 3 (2.31) |
| Other NFS ***Escherichia coli*** | 2 (1.54) |
| ***Proteus mirabilis*** | 1 (0.77) |
| ***Serratia rubidaea*** | 1 (0.77) |

* ร้อยละ

**2. EHEC O157: H7 จากตัวอย่างอาหาร**

นำตัวอย่างลาบเนื้อและน้ำตกเนื้อจากร้านแผงลอยต่างๆ ในเขตอำเภอหาดใหญ่และอำเภอเทพารวม 123 ตัวอย่าง มาทำการตรวจหา EHEC O157: H7 เบื้องต้น โดยการใช้ *E.coli* O157 LPS detection kit พบตัวอย่าง 6 ตัวอย่างที่มีระดับความเข้มข้นของ test line กับ anti-*E.coli* O157: H7 สูงสุด(+++) และพบว่า 10 ตัวอย่างที่แสดงปฏิกิริยาในระดับความเข้มข้นรองลงมา ตัวอย่างที่เหลือส่วนใหญ่ (ร้อยละ 86.98) ไม่ให้ปฏิกิริยาในช่องของ test line (**ตารางที่ 9**)

**ตารางที่ 9** ผลการตรวจตัวอย่างอาหารจากการใช้ *E. coli* O157 LPS detection kit

| ระดับความเข้มข้นของ test line กับ anti- *E.coli* O157: H7 | จำนวนตัวอย่าง |
|---|---|
| +++ | 6 (4.88)* |
| ++ | 5 (4.07) |
| + | 5 (4.07) |
| ± | 6(4.87) |
| - | 101 (82.11) |

* ร้อยละ

การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างลาบเนื้อ พบว่ามีจำนวนประมาณ $10^8$ c.f.u.ต่อกรัม โดยมีเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอลในระดับที่น้อยกว่ากลุ่มที่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (**ตารางที่ 10**)

**ตารางที่ 10** จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจากตัวอย่างลาบเนื้อ

| ลักษณะโคโลนี | ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E. log10 จำนวนโคโลนี/กรัมของตัวอย่างลาบ |
|---|---|
| Non-sorbitol fermenting bacteria | 5.84 $\pm$ 0.56 |
| Sorbitol fermenting bacteria | 7.90 $\pm$ 0.16 |
| Total count | 7.96 $\pm$ 0.15 |

* ค่าเฉลี่ยจากลาบเนื้อ 20 ตัวอย่าง

การแยกหาเชื้อ EHEC O157: H7 โดยใช้วิธีเลี้ยงบนอาหาร CT-SMAC (**ตารางที่ 11**) ตรวจพบ NSF ในตัวอย่างอาหารถึงร้อยละ 67.05 ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้นอกจาก EHEC O157: H7 แล้ว อาจมีแบคทีเรียอื่นๆ ได้ดังแสดงใน**ตารางที่ 12**

**ตารางที่ 11** เชื้อกลุ่มที่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol-fermenting bacteria-SF) และกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บนอาหาร CT-SMAC จากจำนวนตัวอย่างอาหาร รวม 173 ตัวอย่าง

| ชนิดของอาหาร | จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ | | |
|---|---|---|---|
| | SF | NSF | No growth |
| ลาบเนื้อ (123 ตัวอย่าง) | 123 (100)* | 79 (64.22) | - |
| น้ำตกเนื้อ (50 ตัวอย่าง) | 40 (80) | 37 (74) | $10^{+}$(20) |
| รวม (173 ตัวอย่าง) | 163 (94.22) | 116 (67.05) | 10 (5.78) |

* ร้อยละ

\+ น้อยกว่า $10^2$ cfu/มล

**ตารางที่ 12** ชนิดของเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บนอาหาร CT-SMAC จากจำนวนโคโลนีที่ทดสอบ 157 โคโลนี

| NSF | จำนวนของโคโลนีที่ตรวจพบบนอาหาร CT-SMAC |
|---|---|
| ***Providencia alcalifaciens*** | 33 (21.02)* |
| ***Yersinia enterocolitica*** | 34 (21.66) |
| ***Morganella morganii*** | 24 (15.29) |
| ***Shigella sonnei*** | 18 (11.46) |
| Other NSF ***Escherichia coli*** | 14 (8.92) |
| EHEC O157: H7 | 11 (7.01) |
| ***Klebsiella ozaenae*** | 8 (5.09) |
| ***Serratia marcescens*** | 6 (3.82) |
| ***Citrobacter freundii*** | 6 (3.82) |
| ***Enterobacter aerogenes*** | 3 (1.91) |

* ร้อยละ

การคัดเลือกแยกโคโลนีของเชื้อ EHEC O157: H7 ออกจากเชื้อกลุ่มนี้ จึงต้องใช้คุณสมบัติการไม่สร้างเอนไซม์ β-D-glucoronidase ของเชื้อกลุ่ม EHEC O157: H7 มาใช้ร่วมในการตรวจวินิจฉัย ผลดังแสดงใน**ตารางที่ 13** อย่างไรก็ตามยังพบ NSF ที่ให้สีชมพูบนอาหาร CHROM ที่มีลักษณะคล้ายคลึง EHEC O157: H7 ถึงร้อยละ 33.77

**ตารางที่ 13** ชนิดของเชื้อกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล (non-sorbitol fermenting bacteria-NSF) บนอาหาร CT-SMAC ที่ให้สีชมพูบน CHROM agar (ทดสอบจาก NSF ทั้งหมด 228 โคโลนี)

| NSF organism ที่ให้สีชมพูบน CHROM | จำนวนของโคโลนี |
|---|---|
| ***Morganella marganii*** | 24 (10.53)* |
| ***Hafnia alvei*** | 11 (4.82) |
| ***Escherichia vulnerris*** | 2 (0.88) |
| EHEC O157: H7 | 18 (7.89) |
| Other NSF ***Escherichia coli*** | 9 (3.95) |
| ***Citrobacter freundii*** | 6 (2.63) |
| ***Leclercia adecarboxylata*** | 3 (1.31) |
| ***Budvicia aquatica*** | 2 (0.88) |
| ***Buttiauxella agrestis*** | 1 (0.44) |
| Total NSF ที่ให้สีชมพูบน CHROM | 77 (33.77) |
| NSF ที่ไม่ขึ้นบน CHROM และ/หรือให้โคโลนีสีอื่น | 151 (66.23) |

* ร้อยละ

นำโคโลนีของเชื้อกลุ่มนี้มาทดสอบโดยใช้ antiserum ต่อ ***E. coli*** O157 จากอาหารทั้งหมด 173 ตัวอย่าง พบ EHEC O157: H7 จำนวน 6 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 3.47 ของตัวอย่างอาหารที่ตรวจ)

**3. ระดับของ verotoxin 1 (VT 1) และ VT 2 ในตัวอย่างอาหารที่พบ EHEC O157: H7**

นำเชื้อจากตัวอย่างอาหารที่พบว่ามีการปนเปื้อนของ EHEC O157: H7 จำนวน 6 ตัวอย่างมาตรวจหาระดับของ VT 1 และ VT 2 โดยใช้วิธี reversed passive latex agglutination พบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียวที่ตรวจพบทั้ง verotoxin ทั้ง 2 ชนิด

**4.ระดับของแอนติบอดีในซีรัมของคนไทยปกติต่อเชื้อ EHEC O157: H7**

จากการทดลองหาระดับแอนติบอดีในซีรัมของคนไทยปกติซึ่งได้แบ่งเป็นช่วงอายุต่างๆ โดยดูการตอบสนองของ IgM และ IgG โดยใช้วิธี indirect ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนคือส่วนของ LPS ที่สกัดจากเชื้อ EHEC O157: H7 และใช้ conjugated enzyme-substrate แล้วใช้เครื่อง ELISA reader วัดค่าการดูดกลืนแสง การหาค่า cut off ใช้ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละช่วงอายุ + 2 SDs ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างใดมีค่ามากกว่าค่า cut off ให้ผลเป็นบวก ค่าใดที่ต่ำกว่าค่า cut off ให้เป็นผลลบ[14]

การตอบสนองของ IgM ต่อ LPS ของ EHEC O157: H7 แสดงในตารางที่ **14**

**ตารางที่ 14** ผลการตอบสนองของ IgM ต่อ LPS ของเชื้อ EHEC O157: H7 จำนวน 108 ตัวอย่าง

| ช่วงอายุ (ปี) | จำนวนตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก | ร้อยละ |
|---|---|---|---|
| < 1 | 10 | 2 | 20 |
| 1-5 | 6 | 1 | 16.66 |
| 6-10 | 20 | 4 | 20 |
| 11-20 | 27 | 3 | 11.11 |
| 21-50 | 25 | 2 | 8 |
| > 50 | 20 | 6 | 30 |
| รวม | 108 | 18 | 16.67 |

* ค่า cut off หาได้โดยใช้ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง (OD 405 nm) + 2 SDs.

+ ค่าผลบวกสูงกว่าค่า cut off.

การตอบสนองของ IgG ต่อ LPS ของเชื้อ EHEC แสดงในตารางที่ 15

**ตารางที่ 15** ผลการตอบสนองของ IgG ต่อ LPS ของเชื้อ EHEC O157: H7 จำนวน 108 ตัวอย่าง

| ช่วงอายุ (ปี) | จำนวนตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก[+] | ร้อยละ |
|---|---|---|---|
| < 1 | 10 | 6 | 60 |
| 1-5 | 6 | 0 | 0 |
| 6-10 | 20 | 3 | 15 |
| 11-20 | 27 | 4 | 14.81 |
| 21-50 | 25 | 3 | 12 |
| > 50 | 20 | 4 | 20 |
| รวม | 108 | 20 | 18.52 |

* ค่า cut off หาได้โดยใช้ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง (OD 405 nm) + 2 SDs.

[-] ค่าผลบวกสูงกว่าค่า cut off.

## วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการใช้ชุดทดสอบ Lf/Hb (lactoferrin and haemoglobin detection kit) ตรวจอุจจาระผู้ป่วยเบื้องต้นจำนวน 135 ตัวอย่าง ไม่พบ Lf/Hb ที่ให้ผลเป็น -/+ ชี้ให้เห็นว่าไม่มีการติดเชื้อ enterohaemorrhagic ***Escherichia coli*** (EHEC) O157: H7 และเมื่อตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7 จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ(cultural methods) จำนวน 580 ราย ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยอุจจาระร่วงแต่ไม่มีเลือด (non-bloody diarrhoea) 562 ราย และ ผู้ป่วยกลุ่มถ่ายอุจจาระเป็นเลือด (bloody diarrhoea) 18 ราย ก็ไม่พบ EHEC O157: H7 งานวิจัยของ March และ Ratnam [20] ซึ่งได้ตรวจเชื้อ EHEC O157: H7 จากผู้ป่วยกลุ่มอุจจาระร่วงแต่ไม่มีเลือดจำนวน 944 ตัวอย่าง ก็ไม่พบเชื้อในตัวอย่างใด แต่พบเชื้อ 18 ตัวอย่าง จาก 99 ตัวอย่างในกลุ่มผู้ป่วยอุจจาระเป็นเลือด

ในกลุ่มผู้ป่วยอุจจาระร่วงที่ให้ผลการตรวจจับ Lf/Hb เป็น +/+ ตรวจพบเชื้อ ***Salmonella*** gr. B, C, D, และ E ***Shigella*** gr. B และ D diarrhoeagenic ***E. coli*** I ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงลักษณะการตอบสนองของร่างกายหลังได้รับการติดเชื้อกลุ่มนี้ จะเห็นได้ว่าชนิดของเชื้อที่ตรวจพบกับผลการตรวจจับ Lf และ Hb มีความสอดคล้องกัน กล่าวคือเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่รุกล้ำเนื้อเยื่อบุของลำไส้ อาจเกิดการอักเสบที่ลำไส้ใหญ่ บางรายอาจมีการอักเสบถึงปลายลำไส้เล็กได้ โดยทำให้เกิดอาการบวมและมีเลือดคั่งที่ mucosa และ submucosa ทำให้มีมูกเลือดออกมาตลอดเวลา เซลล์บุผิวอาจหลุดออกทำให้เกิดแผลตื้นๆและมีเลือดออก ร่างกายมีการตอบสนองโดยการสร้างเซลล์ leukocytes หรือ polymorphonuclear leukocytes (PMNs) ซึ่งมี Lf เป็นองค์ประกอบที่สำคัญมาจับกินเชื้อ และถ้าไม่สามารถจับกินได้หมดก็จะเกิดอาการอักเสบ และเกิดกระบวนการอื่น ๆ ต่อไป ส่วนจำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ทำการตรวจหา แต่ผลการตรวจจับ Lf/Hb ให้ผล +/+ ทำให้สันนิษฐานได้ว่ากลไกการติดเชื้อในผู้ป่วยกลุ่มนี้มีการทำลายเนื้อเยื่อและมีปฏิกิริยาตอบสนองของร่างกายเกิดขึ้น เชื้อสาเหตุอาจเป็นเชื้อที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ใช้ในการวิจัย เช่น ***Campylobacter jejuni*** (ที่จำเป็นต้องเลี้ยงบนอาหาร selective media ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน ร้อยละ 5 คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 10 ไนโตรเจนร้อยละ 85), ***Clostridium difficile*** (ต้องเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน) ซึ่งต่างก็เป็นเชื้อที่เลี้ยงยาก (fastidious)

โดยต้องการอาหารและสภาวะที่จำเพาะ นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุอาจเป็นเชื้อกลุ่มอื่น ซึ่งมีลักษณะการเข้าทำลาย และส่งผลให้ร่างกายตอบสนองเช่นเดียวกับแบคทีเรีย โดยอาจเป็นเชื้อปรสิตบางชนิดที่สามารถก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง เช่น ***Trichuris*** spp., ***Entamoeba histolytica*** เป็นต้น ซึ่งเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการตรวจได้

ตัวอย่างกลุ่มที่ให้ผลจากการตรวจจับ Lf/Hb เป็น -/- โดยเชื้อที่ตรวจพบคือ ***Vibrio parahaemolyticus*** และ ***Vibrio cholerae*** ในกลุ่มที่ให้ผลการตรวจจับ Lf/Hb เป็น -/- และตรวจไม่พบเชื้อก่อโรคชนิดที่ทำการตรวจหา อาจเนื่องจากเชื้อสาเหตุในผู้ป่วยดังกล่าวเป็นเชื้อกลุ่มไวรัส เช่น Rotavirus, Norwalk-like viruses ซึ่งมักก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในกลุ่มเด็กเล็ก ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงโดยมีอาการคล้ายกับกลุ่มที่เกิดเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ หรืออาการอุจจาระร่วงในผู้ป่วยเหล่านี้ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ (non-infective diarrhoea) แต่เกิดจากความผิดปกติของระบบดูดซึมสารอาหารและน้ำของร่างกาย หรือการรับประทานอาหารมากเกินความสามารถในการดูดซึมและการย่อยของร่างกาย

ตัวอย่างในกลุ่มที่ให้ผลการตรวจจับ Lf และ Hb เป็น +/- และตรวจไม่พบเชื้อน่าจะมีสาเหตุของอุจจาระร่วงเหมือนกับกลุ่มให้ผล Lf/Hb เป็น -/- ปริมาณของ Lf จากผู้ป่วยกลุ่มนี้ซึ่งเป็นผู้ป่วยทารกเลี้ยงด้วยน้ำนมมารดาน่าจะมาจากน้ำนมมารดา เนื่องจากพบว่ามีระดับความเข้มข้นของ Lf สูงสุดในกลุ่มผู้ป่วยเด็กเล็กที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี มีรายงานว่าในคนปกติสามารถพบ Lf ใน น้ำนม ซีรัม และน้ำลาย [24]

การตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7 ในตัวอย่างลาบเนื้อและน้ำตกเนื้อรวมทั้งสิ้นจำนวน 123 ตัวอย่าง โดยใช้ enzyme-immunochromatographic membrane assay ซึ่งมีความไว (sensitivity) กับ EHEC O157: H7 จำนวน $2.8\times10^3$ c.f.u./มล ชุดทดสอบนี้อาศัยหลักการทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้วิธี coat กับ antibody ที่จำเพาะ ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบเบื้องต้นที่ง่าย สะดวกและมีความรวดเร็วในการตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7 ในอาหาร การตรวจหาเชื้อใช้เวลาเพียง 5 ถึง 10 นาที ผลการตรวจเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ *E. coli* O157: LPS detection kit พบว่าตัวอย่างอาหาร 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.88) ให้ระดับความเข้มข้นของแถบสี (test line) ที่ระดับสูงสุด อย่างไรก็ตามพบว่ามีแถบสีในระดับ ++ และ + ถึง 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8.14) ซึ่งจำเป็นต้องตรวจยืนยันความถูกต้องโดยการ

เพาะเลี้ยงเชื้อ การตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7 โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากตัวอย่างอาหารลาบเนื้อและน้ำตกเนื้อ จำนวนทั้งสิ้น 173 ตัวอย่าง ตรวจพบ EHEC O157: H7 จำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ *E. coli* O157 LPS detection kit เป็นบวก

การตรวจหาเชื้อ EHEC O157: H7 ทำได้โดยทำการเพิ่มจำนวน (enrichment) ของเชื้อ EHEC O157: H7 ที่คาดว่ามีในอาหารโดยการใช้ modified *E. coli* broth (mEC) ที่ผสมด้วย novobiocin 20 มก/มล novobiocin จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรัมลบรูปแท่งชนิดอื่น [12,24] เวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน 6 ชั่วโมงจะมีผลดีเพราะว่าสามารถป้องกันการเจริญของเชื้ออื่น ๆ ได้ การเพาะเลี้ยงเชื้อทำที่อุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เพราะว่า EHEC O157: H7 สามารถเจริญได้ดี [7, 20, 26] และขณะเดียวกันสามารถป้องกันเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม ***Enterobacteriaceae*** อื่น ๆ ที่ไม่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมินี้ได้ ในการแยกเชื้อ EHEC O157: H7 ใช้อาหาร cefixime-potassium tellulite supplement-Sorbitol MacConkey Agar (CT-SMAC) ซึ่งเป็น selective และ differential media เติมยา cefixime ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ ***Proteus*** spp. ร่วมกับ potassium tellulite ซึ่งยับยั้งการเติบโตของ ***E. coli*** บาง serogroup รวมทั้ง ***Escherichia hermanii***, ***Enterobacter*** spp. และ ***Hafnia alvei*** [23] ที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอลเช่นเดียวกับ EHEC O157: H7 โคโลนีเหล่านี้มักจะมีสีชมพูจาง ๆ คล้ายกับเชื้อในกลุ่ม EHEC ทำให้แยกโคโลนีได้ยาก ดังนั้นจึงใช้คุณสมบัติการไม่สร้างเอนไซม์ β-D-glucuronidase ของเชื้อในกลุ่ม EHEC มาใช้ในการแยก ***E. coli*** กลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลซอร์บิทอล [12, 22] โดยที่ ***E. coli*** ทั่วไปสามารถสร้างเอนไซม์ β-D-glucuronidase ได้ถึงร้อยละ 97 [18]

Polymerase chain reaction (PCR) และวิธี reversed passive latex agglutination (RPLA) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการยืนยัน EHEC O157: H7 ในการทดลองนี้ใช้วิธี RPLA เนื่องจากมีความจำเพาะและมีความรวดเร็วเหมือนกับวิธี PCR แต่สามารถตรวจได้หลายตัวอย่างในการทดลองแต่ละครั้ง [26] พบว่า EHEC O157 สายพันธุ์ F46 เป็นเชื้อ EHEC O157: H7 เพราะตรวจพบทั้ง verotoxin 1 (VT 1) และ VT 2

ข้อมูลที่ได้ทั้งจากการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารและอุจจาระผู้ป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วงทำให้สรุปได้ว่าพบ EHEC O157: H7 ในประเทศไทยน้อยมากเมื่อเทียบกับต่างประเทศ

จากผลการศึกษาถึงระดับแอนติบอดีของคนไทยต่อ EHEC O157: H7 ซึ่งได้นำซีรัมของคนปกติที่เก็บในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา มาทำการทดสอบการตอบสนองของ IgM และ IgG โดยใช้วิธี indirect ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนคือส่วนของ LPS ที่สกัดจากเชื้อ EHEC O157: H7 Sakai strain ที่พบว่าเคยมีการระบาดในประเทศญี่ปุ่นมาแล้ว[16] นำมาทดสอบ ELISA ดูการตอบสนองของ IgM และ IgG แล้วใช้ conjugated enzyme-substrate เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงสีของปฏิกริยาที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่อง ELISA reader เป็นตัววัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าการตอบสนองของ IgM ต่อ LPS ของ EHEC O157: H7 ต่ำกว่า IgG การที่คนไทยมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ EHEC O157: H7 อาจเป็นเพราะคนไทยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสุขอนามัยยังไม่ดีพอ การอุปโภคบริโภคต่างๆ ในแต่ละวันล้วนเป็นการได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนของเชื้อต่างๆ โดยเฉพาะกลุ่ม ***Enterobactericeae*** เช่นเชื้อกรัมลบ รูปแท่ง จึงทำให้เกิดปฏิกริยาข้ามกับเชื้อในกลุ่มเดียวกันนี้และมีผลทำให้ในคนไทยมีแอนติบอดีต่อเชื้อในกลุ่มกรัมลบ รูปแท่งรวมถึงเชื้อ EHEC O157: H7 ด้วย จากข้อมูลนี้อาจจะสรุปได้ว่า การที่คนไทยไม่ติดเชื้อ EHEC O157: H7 เหมือนคนญี่ปุ่นและชาวต่างประเทศอื่นๆ นั้น อาจเป็นเพราะคนไทยมีระดับแอนติบอดีซึ่งมาจากการได้รับการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ รูปแท่ง กลุ่ม ***Enterobacteriaceae*** ชนิดอื่น ๆ ที่มีลักษณะร่วมของแอนติเจน ทำให้สามารถคุ้มกันโรคได้

## บรรณานุกรม


1. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 450-79.
2. MacDonald KL ed. Annual summary of communicable diseases reported to the Minnesota Department of Health, 1988. MN Dept Health Disease Control Newsletter 1989; 17: 45-56.
3. Boyce TG, Swerdlow DL, Griffin, PM. *Escherichia coli* O157: H7 and the haemolytic uremic syndrome. N Eng J Med 1995; 333: 364-68.
4. Errol V, Raghubeer SK, Jim L, Campbell M, Mayer S, Meyer R. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. J Food Prot 1994; 58: 13-18.
5. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev1998; 11: 142-201.
6. Neill MA. *E. coli* O157: H7 time capsule: What do we know and when did we know it? Dairy Food Environ Sanit 1994; 14: 374-77.
7. Snydex OP. *Escherichia coli* O157: H7 and other pathogenic strains of *E. coli*. Hospitality of technology and management 1998; 1-4.
8. Sowers EG, Wells JG, Strockbine NA. 1996. Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H7 antigens of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 34: 1286-89.
9. Doyle MP, Schoeni JL. 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with haemorrhagic colitis. Appl Environ Microbiol 48: 855-56.
10. Reymond D, Johnson RP, Karmali MA, Petric M, Winkler M, Johnson S. Neutralizing antibody to *Escherichia coli* cytotoxin 1 and antibody to 0157 lipopolysaccharide in healthy farm family members and urban residents. J Clin Microbiol 1996; 34: 2053-57.

11. Mundell DH, Anselmo CR, Wishnow RM. Facters influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. Infect Immun 1976; 17:383-88.

12. Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe G. 1983. Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet.* ii; 216.

13. Yoh M, Frimpong EK, Honda T. Effect of antimicrobial agents, especially fosfomycin, on the production and release of Vero toxin by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. FEMS Immunol Med Microbiol 1997; 19: 54-64.

14. Grady GF, and Keuseh GT. Pathogenesis of bacterial diarrhoeas. N Engl J Med 1971; 285: 831-841.

15. Harris JC, Dupont HL, and Hornick BR. Faecal leucocytes in diarrhoeal illness. Ann Internal Med 1972; 76: 697-703.

16. Hetherington SV, Spitznagel JK, and Quie PG. An enzyme-linked immunoassay (ELISA) for measurement of lactoferrin. J Immunol Method 1983; 65: 183-90.

17. Korzeniowski OM, Barada FA, Rouse JD, and Guerrant RL. Value of examination for fecal leukocytes in the early diagnosis of shigellosis. Am J Trop Med Hyg 1979; 28: 1031-35.

18. Alvarado T. Faecal leucocytes in patients with infectious diarrhoea. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77: 316-20.

19. Honda T. Enteropathogenic *Escherichia coli* that cause food poisoning. Asian Med 1992; 35: 359-67.

20. March SB, and Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157: H7 associated with hemorrhagic colitis. J Clin Microbiol 1986; 23: 869-72.

21. Sandra BM, and Samuel R. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J Clin Microbiol 1986; 23: 869–72.

22. Guerrant RL, Shields DS, Thorson SM, Schorling JB, and Groschel DHM. Evaluation and diagnosis of acute infectious diarrhoea. Am J Med 1985; 78: 91-98.

23. Chapman PA, Siddons CA, Zadik PM, and Jewes L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. J Med Microbiol 1991; 35: 107-110.

24. Yoh M, Frimpong EK, Voravuthikunchai S, Honda T. Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production and release of Vero toxin by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. Can J Microbiol 1999; 45: 732-39.

25. Sower EG, Wells JG, Strockbine NA. Evaluation of commercial latex reagents for identification of 0157 and H7 antigens of *Escherichia coli.* J Clin Microbiol 1996; 34: 1286-89.

26. Holt, JG, editor-in-chief. Bergey' manual of systematic bacteriology. Baltimore, William & Wilkins, 1984, vol 1&2.

27. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol water and further application of the procedure. *In:* Whistler, RL, editor. Method in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, 1965; 83-91.

28. Dodds KL, Perry MB, Mcdonald IJ. Electrophoratic and immunochemical study of the lipopolysaccharide produced by chemostat grown *Escherichia coli* 0157. J Gen Microbiol 1987: 133: 2679-87.

29. Voravuthikunchai S, Suwalak S, Mitrrnun W. Ultrastructural changes of guinea pig liver incuced by *Burkholderia pseudomallei* endotoxin. J E M S T1999; 32: 1172-78.

30. Vuddhakul V, Patararungrong N, Pungrasamee P, Jitsurong S, Morigaki T Asai N, Nishibuchi M. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157 from retail beef and bovine feces in Thailand. Lett FEMS Microbiol 2000; 182: 343-47.