



การศึกษาลักษณะของ *Escherichia coli* O157 และ uropathogenic *Escherichia coli*
ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย

Characterization of *Escherichia coli* O157 and uropathogenic *Escherichia coli*
Isolated from clinical specimens

มนต์ชนก เต็มภาชนะ

Monchanok Themphachana

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements of the

Degree of Master of Science in Microbiology

Prince of Songkla University

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาลักษณะของ *Escherichia coli* O157 และ uropathogenic
Escherichia coli ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย

ผู้เขียน นางสาวมนต์ชนก เต็มภาชนะ

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณ์ชัย สุขุมังกูร)

(ดร.เสาวภา เขียนงาม)

.....กรรมการ

(ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาหาร)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณ์ชัย สุขุมังกูร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
 ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มี
ส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณ์ย สุธงษ์มังกูร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(นางสาวมนต์ชนก เต็มภาชนะ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาวมนต์ชนก เต็มภาชนะ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาลักษณะของ <i>Escherichia coli</i> O157 และ uropathogenic <i>Escherichia coli</i> ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย
ผู้เขียน	นางสาวมนต์ชนก เต็มภาชนะ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ ได้ทำการตรวจสอบหาเชื้อ EHEC และ STEC จากโรงพยาบาลหาดใหญ่และโรงพยาบาลปัตตานี จากผลการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างผู้ป่วยท้องร่วงจำนวน 1,022 ไอโซเลท ที่แยกมาได้จาก rectal swabs จำนวน 592 ตัวอย่าง เป็นระยะเวลา 18 เดือน ไม่พบ EHEC/STEC ในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ อย่างไรก็ตาม สามารถพบ *E. coli* O157 ได้จำนวน 1 ไอโซเลท (สายพันธุ์ PSU120) จากผู้ป่วยท้องร่วงเพศชายอายุ 48 ปี เชื้อ PSU120 นี้ ไม่มียีน *stx* และ *eae* แต่มียีน *escV* ที่เป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดท้องร่วงในผู้ป่วย ยืนยันผลการไม่มี *stx* phage โดยการตรวจสอบยีน *Q* ที่สำคัญของเชื้อ พบว่า PSU120 ไม่มียีน *Q₉₃₃* และ *Q₂₁* เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดและพบว่าเชื้อมีกิจกรรมการแทรกโดย prophages ชนิดอื่นๆ เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ของ PSU120 โดยวิธี pulsed-field gel electrophoresis เทียบกับเชื้ออีก 2 สายพันธุ์คือ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ PSU2 ที่แยกได้จากเนื้อวัวในอำเภอหาดใหญ่ และ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า PSU120 มีความคล้ายในส่วนของพันธุกรรมถึง 88.6% ทำให้คาดว่าเชื้อ PSU120 เป็นเชื้อที่มียีน *stx* มาก่อน และสูญเสีย *stx* ไประหว่างการติดเชื้อในมนุษย์ จากการไม่พบผู้ป่วยจาก EHEC/STEC จึงทำการตรวจหาปริมาณของเชื้อ EHEC/STEC ในเนื้อสัตว์ โดยวิธี MPN-PCR พบปริมาณ EHEC และ STEC ในเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ ในระดับต่ำ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ไม่สามารถพบเชื้อจากผู้ป่วยได้ นอกจากนี้ ทำการเก็บเชื้อ UPEC จากโรงพยาบาลวชิระภูเก็ตจำนวน 113 ตัวอย่าง เมื่อตรวจยีนก่อโรคพบผลบวกต่อยีน *pap*, *afa*, และ *hlyA* เป็น 12%, 7%, และ 14% ตามลำดับ ผลการดื้อยาปฏิชีวนะพบว่าเชื้อดื้อต่อ tetracycline มากที่สุดที่ 77% และดื้อต่อยา cotrimoxazole ที่ 68% เชื้อไวต่อยา nitrofurantoin โดยพบอัตราการดื้อยาเพียง 1% และเชื้อ UPEC 54% จัดเป็น ESBL producer อีกด้วย

คำสำคัญ: *Escherichia coli* O157, diarrhea, Shiga toxin, Retailed Meat, uropathogenic *Escherichia coli*, Thailand

Thesis Title Characterization of *Escherichia coli* O157 and uropathogenic
Escherichia coli Isolated from clinical specimens

Author Miss Monchanok Themphachana

Major Program Microbiology

Academic Year 2014

ABSTRACT

This study investigated the presence of EHEC/STEC from patients in Hat-Yai and Pattani Hospitals. A total of 1,022 bacterial isolates from 592 samples, collected in 18 months time interval, were examined for being of EHEC/STEC. The results revealed no EHEC/STEC detected. However, one *E. coli* O157 (designated PSU120) lacking *stx* and *eae*, was found in a 48 year-old male patient. PSU120 possessed *escV* that can play a pivotal role in causing diarrhea. PSU120 did not carry *Q₉₃₃* and *Q₂₁*. In addition, PSU120 was found to be a multi-drug resistant strain and active in horizontal gene transfer by phage integration. DNA fingerprint generated by pulsed-field gel electrophoresis of PSU120 compared to an *E. coli* O157:H7 strain PSU2 isolated from beef, and *E. coli* O157:H7 strain EDL933 from a patient in United States showed the high degrees of homology as 88.6%. We are tempted to speculate that PSU120 was originally *stx*⁺ and loss the gene after establishing infection. Quantification of EHEC/STEC in raw meat was performed by MPN-PCR technique. The results exhibited the low level of EHEC/STEC contamination in all meat types, explaining, in part, the lack of EHEC/STEC in patients. In addition, in this study, a total of 113 UPEC samples were collected from Vachira Phuket Hospital. Virulence genes, *pap*, *afa*, and *hlyA*, were detected in 12%, 7%, and 14%, respectively. UPEC strains in this study were found to be resistant to tetracycline the most (77%), followed by cotrimoxazole (68%). Nitrofurantoin effectively inhibited UPEC strains which showed only 1% resistance. Additionally, Fifty-four percent of UPEC in this study were ESBL producer.

Keywords: *Escherichia coli* O157, diarrhea, Shiga toxin, Retailed Meat, uropathogen, Thailand

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อไทย	(5)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(12)
รายการผลงานที่ตีพิมพ์	(14)
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย	1
ทฤษฎีและหลักการ	2
ลักษณะทั่วไป	2
แหล่งที่อยู่	3
ลักษณะของแอนติเจน	3
คุณสมบัติทางด้านชีวเคมีและการเจริญ	4
<i>E. coli</i> ก่อโรค	4
<i>E. coli</i> O157	6
ระบาดวิทยาของ <i>E. coli</i> O157	7
การติดต่อ	7
พยาธิกำเนิดและพยาธิสภาพ	8
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค	8
การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ	12

	หน้า
การรักษา	15
การป้องกันและควบคุม	16
ส่วนที่ 2 Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>	16
<i>E. coli</i> ที่ก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ Uropathogenic <i>E. coli</i> (UPEC)	16
ปัจจัยก่อโรคของ UPEC	17
การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ uropathogens	18
วัตถุประสงค์	20
ผลการทดลอง	21
การวิเคราะห์ผลการทดลอง	33
สรุปผลการทดลอง	37
บรรณานุกรม	38
ภาคผนวก	46
ประวัติผู้วิจัย	63

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ <i>E. coli</i>	5
ตารางที่ 2 จำนวน isolates ที่แยกได้จาก rectal swabs ของผู้ป่วยที่ได้รับมาจาก โรงพยาบาลหาดใหญ่และโรงพยาบาลปัตตานีในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2555 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2557	21
ตารางที่ 3 ลักษณะของ <i>E. coli</i> O157 สายพันธุ์ PSU120	24
ตารางที่ 4 ปริมาณ (MPN/กรัม) ของเชื้อ EHEC และ STEC ในเนื้อสัตว์ดิบ	26
ตารางที่ 5 ข้อมูลของ <i>E. coli</i> O157 จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อวัว ในช่วงปลายเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556	27
ตารางที่ 6 ข้อมูลสถิติประชากร (demographic data) ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ UPEC จาก โรงพยาบาลวชิระภูเก็ต ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2556	29
ตารางที่ 7 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อจากโรงพยาบาลวชิระภูเก็ต	30
ตารางที่ 8 แบบแผนการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ UPEC จากโรงพยาบาลวชิระภูเก็ต	30
ตารางที่ 9 ยีนก่อโรคและแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพของ UPEC จากโรงพยาบาลวชิระ ภูเก็ต	31
ตารางที่ S1 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในการศึกษา	48
ตารางที่ 10 ปริมาณ (MPN/กรัม) ของเชื้อ EHEC และ STEC ในเนื้อวัว, เนื้อหมู, เนื้อไก่	60

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะของเชื้อ <i>E. coli</i>	3
รูปที่ 2 กลไกการทำลายเซลล์โดย Shiga toxins	9
รูปที่ 3 การเปรียบเทียบความเหมือนของ Q จินของ <i>E. coli</i> O157:H7 สายพันธุ์ EDL93 และ Thai-12 เมื่อเทียบกับแบคทีเรียโอฟาจ 21	11
รูปที่ 4 ตำแหน่งจีโนมของ <i>stx</i> ₂ -phage ที่แทรกตัวอยู่ใน <i>E. coli</i> O157:H7 สายพันธุ์ Thai-12 ที่ primers ที่ใช้ในการทำ TNP-PCR สามารถเข้าจับได้	11
รูปที่ 5 เชื้อ <i>E. coli</i> O157:H7 บน sorbitol MacConkey Agar	13
รูปที่ 6 CHROM agar O157 สำหรับการคัดแยกความแตกต่างของเชื้อ <i>E. coli</i> O157	14
รูปที่ 7 ภาพประกอบการทดสอบของ RPLA	15
รูปที่ 8 Dendrogram ที่ได้จากลายพิมพ์ DNA โดยวิธี pulsed-field gel-electrophoresis ของ <i>E. coli</i> O157 สายพันธุ์ PSU120 เทียบกับสายพันธุ์ PSU2 ที่แยกได้จากเนื้อวัว และสายพันธุ์ EDL933 ที่แยกได้จากผู้ป่วยท้องร่วงแบบมีมูกเลือด	25
รูปที่ 9 สัดส่วนของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่สร้าง ESBL ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ จากโรงพยาบาลภูเก็ต	32

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย

ในปัจจุบัน การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ (food-borne diseases) เกิดขึ้นอย่างกว้างขวางซึ่งการระบาดนั้นเป็นผลมาจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีปัจจัยในการก่อโรคที่สำคัญ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่ม *enterobacteriaceae* โดยปกติแล้ว เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นหลายชนิด (Griffin et al., 1995) อย่างไรก็ตาม เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงจนถึงแก่ชีวิตได้ Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) คือเชื้อที่สามารถสร้างสารพิษที่เรียกว่า Shiga toxin (Stx) แบ่งย่อยได้เป็น 2 ชนิดคือ Shiga toxin 1 (Stx1) และ Shiga toxin 2 (Stx2) โดยเฉพาะ Stx2 นั้นมีความรุนแรงมากกว่า Stx1 ประมาณหนึ่งพันเท่า ก่อให้เกิดไตวายเฉียบพลันและเกิดอาการ hemolytic uremic syndrome (HUS) จนกระทั่งเสียชีวิตได้ STEC ที่มียีน *eae* ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการเกาะติดของเชื้อกับเซลล์เจ้าบ้านเรียกว่า enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ซึ่งเป็น *E. coli* กลุ่มที่สามารถก่อความรุนแรงได้มากที่สุดในกลุ่มของ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดอาการท้องร่วง (Nataro and Kaper, 1998) เป็นเชื้อสาเหตุที่ก่อการระบาดในหลายประเทศทั่วโลก (Dundas et al., 2001; Rangel et al., 2005) EHEC ซีโรทัยป์ O157:H7 เป็นซีโรทัยป์ที่มีความสำคัญมากที่สุด เพราะก่อให้เกิดการระบาดอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตาม กว่า 30 ปีที่ผ่านมาตั้งแต่มีการระบาดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกา ยังไม่มีการพบการติดเชื้อ *E. coli* O157 จากผู้ป่วยท้องร่วงในประเทศไทยเลยแม้แต่รายเดียว

ปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *E. coli* ก็คือการติดเชื้อ *E. coli* ในระบบอื่นๆ นอกเหนือจากการก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เรียกเชื้อเหล่านี้ว่า extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) เชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนจากลำไส้สู่ระบบทางเดินปัสสาวะและก่อโรคได้ เรียกว่า uropathogenic *E. coli* (UPEC) และจัดเป็นสมาชิกของเชื้อกลุ่ม ExPEC การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะนั้นเป็นโรคที่พบในผู้หญิงบ่อยกว่าในผู้ชาย เนื่องจากลักษณะทางกายวิภาคของผู้หญิงเอื้อให้เกิดการติดเชื้อได้ง่ายกว่า และจากรายงานหลายชิ้นระบุไว้ว่า ในช่วงชีวิตของผู้หญิงจะมีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะอย่างน้อย 1 ครั้ง ภาวะติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะเป็นภาวะที่พบได้บ่อยมากในโรงพยาบาลต่างๆ สามารถพบอุบัติการณ์ได้ในคนทุกช่วงอายุ โดยจะพบมากในผู้สูงอายุที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและได้รับการใส่สายสวนปัสสาวะ เชื้อ UPEC เหล่านี้มีปัจจัยก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดมากมาย ทำให้สามารถยึดติดกับอวัยวะต่างๆที่เป็นส่วนประกอบของระบบทางเดินปัสสาวะได้ดี ยิ่งไปกว่านั้น มีรายงานการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ UPEC เป็นจำนวนมากอีกด้วย

จากความสำคัญของเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้ การศึกษานี้จึงมุ่งตรวจหาเชื้อ STEC และ EHEC รวมถึง EHEC ซีโรทัยป์ O157 จากตัวอย่างผู้ป่วยท้องร่วงในโรงพยาบาลเขตภาคใต้ ศึกษาถึงปัจจัยการก่อโรคของเชื้อ รวมถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้กับเชื้อที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้า นอกจากนี้ยังทำการศึกษาปัจจัยก่อโรคและลักษณะแบบแผนการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ UPEC ที่แยกได้จากโรงพยาบาลในเขตภาคใต้ อันจะนำไปสู่การได้รับข้อมูลที่เป็ประโยชน์สำหรับประชากรในเขตนี้ต่อไป

ทฤษฎีและหลักการ

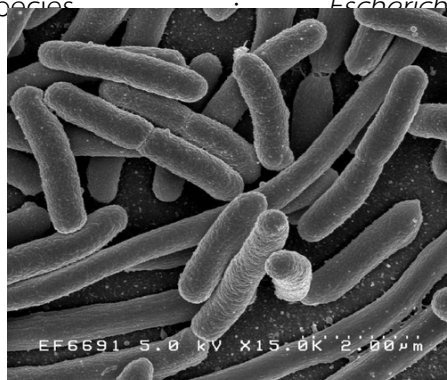
ส่วนที่ 1 Enterohemorrhagic และ Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

1.1 ลักษณะทั่วไป (general characteristics)

Escherichia coli จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง มีขนาด 1.1-1.5 x 2.0-6.0 μm จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยวๆหรือเชลล์คู่ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เคลื่อนที่โดย peritrichous flagella ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-40 $^{\circ}\text{C}$ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญคือ 35-37 $^{\circ}\text{C}$ ซึ่งเป็นอุณหภูมิของสัตว์เลือดอุ่นแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีทั้ง normal microbiota และ pathogen สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ ค่าความเป็นกรดต่างที่สามารถเจริญได้อยู่ที่ 7-7.5 mol% G+C ของDNA มีค่าระหว่าง 48 ถึง 52 (Tm) และเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม โคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform ซึ่งเป็นโคลิฟอร์มที่พบในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น จึงใช้เป็นดัชนีชี้สุขลักษณะของอาหาร และน้ำ

อนุกรมวิธานของเชื้อ

Domain	:	Bacteria
Kingdom	:	Eubacteria
Phylum	:	Proteobacteria
Class	:	Gammaproteobacteria
Order	:	Enterobacteriales
Family	:	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	:	<i>Escherichia</i>
Species	:	<i>Escherichia coli</i>



รูปที่ 1 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *E. coli* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH, date of image production is unknown)

1.2 แหล่งที่อยู่ (natural habitats)

E. coli เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ทั่วไปในลำไส้คนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและพบ *E. coli* หลายสายพันธุ์เป็น normal flora ในลำไส้ของคนและมีประโยชน์ในการผลิตวิตามิน K2 (Conly and Stein, 1992) นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคภายในลำไส้ได้ พบเชื้อ *E. coli* จำนวนมากในอุจจาระประมาณ 10^6 - 10^9 CFU/g ในทารกหลังคลอดพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อนี้หลังจาก 40 ชั่วโมงในลำไส้ของทารก ซึ่งส่วนใหญ่จะไม่ก่อโรคในคน อย่างไรก็ตามมีเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่มีความสามารถก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารและระบบอื่นของร่างกายได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยส่วนใหญ่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อลงในอาหารและน้ำดื่ม

1.3 ลักษณะของแอนติเจน (antigenic structure)

แอนติเจนของ *E. coli* มีอยู่หลายชนิด คือ somatic antigen (O-antigen) เป็นสารประกอบ lipopolysaccharide พบอยู่ในชั้นของผนังเซลล์ มีคุณสมบัติทนความร้อนถึง 121 องศาเซลเซียสทนกรดอ่อนและแอลกอฮอล์

Capsule antigen (K-antigen) เป็นสารประกอบ polysaccharide มักพบห่อหุ้มเซลล์ เช่น capsule, fimbriae ที่หุ้มตัวแบคทีเรีย

Flagella antigen (H-antigen) เป็นส่วนของ flagella ประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่า flagellin ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่จะไม่พบ H-antigen

O, K และ H antigens มีคุณสมบัติทางกายภาพและภูมิคุ้มกันวิทยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการจำแนก serotype ของเชื้อรวมถึงการตรวจสอบทางระบาดวิทยาสามารถใช้แอนติเจนเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ได้

1.4 คุณสมบัติทางด้านชีวเคมีและการเจริญ (biochemical features and growth)

E. coli มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่หลากหลาย จึงนิยมใช้คุณสมบัตินี้เป็นหลักในการจำแนกเชื้อ *E. coli* ออกจากเชื้อตัวอื่นๆในวงศ์ *enterobacteriaceae* ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้

ได้แก่ MacConkey agar (MCA) ลักษณะโคโลนีของ *E. coli* บน MacConkey agar (MCA) ซึ่งเป็น differential medium มีสีชมพู (lactose fermenter) และเมื่อเพาะเลี้ยงบน Eosin methylene blue agar (EMB) ซึ่งเป็น selective medium จะให้โคโลนีสีดำมีลักษณะสะท้อนแสงแวววาวที่เรียกว่า metallic sheen ผลการทดสอบ IMViC test เป็น ++-- หรือ --++ ซึ่งแตกต่างจาก *Enterobacter* และ *Klebsiella* ซึ่งให้ผลเป็น --++ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เบื้องต้นนั้นนิยมใช้คุณสมบัติการหมักน้ำตาลที่แตกต่างกันของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาล lactose นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาเชื้อ *E. coli* ได้ด้วยวิธีทางโมเลกุล ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเข้าไปจับดีเอ็นเอต้นแบบ (Jouini et al., 2007)

1.5 *E. coli* ก่อโรค (pathogenic *E. coli* strains)

E. coli ส่วนใหญ่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค แต่บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร แบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม (Giron et al., 1991) คือ

1. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) มีปัจจัยการติดเชือรุนแรงที่สำคัญคือการเกาะติดเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้โดยใช้พิลไล (pili) และอินทิมีน (intimin) ซึ่งเป็นการเกาะติดเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane adhesion) ทำให้เกิดการเกาะติดเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ด้วยเชื้อที่จับกลุ่มกันเป็นกระจุกจนเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า ไมโครโคโลนี (microcolony)

2. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) มีปัจจัยการติดเชือรุนแรงที่สำคัญคือการเกาะติดเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้โดยใช้พิมเบรีย (fimbriae) ทำให้เกิดการเกาะติดเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ด้วยเชื้อที่เรียงต่อกันจนเต็มพื้นผิวคล้ายกับการเรียงก้อนอิฐและอาจมีการสร้างสารพิษร่วมด้วย

3. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) มีปัจจัยการติดเชือรุนแรงที่สำคัญคือความสามารถในการเข้าเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้แล้วหลบหลีกจากฟาโกโซม (phagosome) จนสามารถแบ่งตัวขยายจำนวนและกระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงซึ่งกลไกนี้มีความคล้ายคลึงกับการก่อโรคของเชื้อ *Shigella* spp.

4. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) มีปัจจัยการติดเชือรุนแรงที่สำคัญคือการสร้างสารพิษและการมีพิมเบรีย (fimbriae) เป็นจำนวนมากสารพิษที่สร้างจากเชื้อก่อโรคนี้นี้มี 2 ชนิดได้แก่ สารพิษที่ไม่ทนต่อความร้อน (heat-labile enterotoxin) สารพิษนี้คล้ายกับสารพิษที่สร้างจากเชื้อ *Vibrio cholerae* ซึ่งเป็นสาเหตุของอหิวาตกโรคและสารพิษที่ทนต่อความร้อน (heat-stable enterotoxins)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* (Forbes et al., 2002)

การทดสอบ	ผล
----------	----

lactose fermentation	+
indole production	+
methyl red	+
Voges-Proskauer	-
citrate utilization	-
motility test	+
lysine decarboxylase test	+
TSI	A/A , G ⁺
H ₂ S	-
urea hydrolysis	-
acetate utilization	+
cetrimide	-
ONPG test	+
phenylalanine deaminase	-
sucrose fermentation	+
mannitol fermentation	+
glucose fermentation	+
dextrose fermentation	+ , G ⁺
nitrate reduction	+ , G ⁻

G⁺ = เกิด gas , G⁻ = ไม่เกิด gas

A/A = acid slant / acid butt

5. Diffusely adherent *E. coli* (DAEC) ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อกลุ่มนี้ ยังไม่เป็นที่แน่ชัด ผู้ป่วยมักมีอาการถ่ายเป็นน้ำ หรือเหลวแบบอาหารไม่ย่อย โดยส่วนใหญ่เชื้อกลุ่มนี้ พบในเด็กวัยก่อนเรียนมากกว่าในเด็กทารก การเพาะแยกเชื้อกลุ่มนี้ สามารถทำได้โดยนำเชื้อมา ทดสอบการเกาะติดแบบ diffusely adherence กับเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HEP-2 หรือ HeLa ซึ่งเป็น วิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยเชื้อ DAEC

6. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) มีปัจจัยการติดเชื้รุนแรงที่สำคัญคือ การ สร้างสารพิษที่สามารถทำลายเซลล์เวโร (vero cell) ซึ่งเรียกว่าเวโรทอกซิน (verotoxin) มีลักษณะโครงสร้างและการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับสารพิษที่สร้างจากเชื้อ *Shigella dysenteriae*

สารพิษชนิดนี้ภายหลังจึงเรียกว่า Shiga toxin ในการระบุว่าเป็น EHEC นั้นนอกจากจะพบยีน *stx* แล้ว ยังต้องพบยีน *eae* ซึ่งเป็นยีนสร้างโปรตีน intimin ที่ใช้ในการเกาะติดของแบคทีเรียกับเซลล์เจ้าบ้านอีกด้วย ส่วนเชื้อที่มีเพียงแค่อียีน *stx* จะถูกเรียกว่าเป็น Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) ปัจจุบันพบเชื้อ STEC มากกว่า 100 ซีโรทัยป์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมีอาการลำไส้ใหญ่อักเสบมีเลือดออก (hemorrhagic colitis) คือมีอาการปวดเกร็งอย่างรุนแรงในช่องท้องถ่ายเป็นเลือดสดไม่มีไข้หรือมีไข้ต่ำ ผู้ป่วยบางราย เช่น เด็กเล็กและผู้สูงอายุมีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดอาการ แทรกซ้อนที่เรียกว่า hemolytic uremic syndrome (HUS) สามารถสร้างสารพิษชนิดเอนเทอโรฮีโมไลซิน (enterohaemolysin) ซึ่งมีผลต่อภาวะเม็ดเลือดแดงแตกและไตวายทำให้เสียชีวิตได้ ผู้ติดเชื้อที่ไม่มีอาการแสดงของโรคสามารถถ่ายทอดเชื้อให้ผู้อื่นได้ เชื้อ STEC ที่มีรายงานว่า เป็นสาเหตุการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่พบบ่อย เช่น O26, O111 และ O145 เป็นต้น แต่เชื้อที่มีความสำคัญมากที่สุดคือเชื้อ *E. coli* ซีโรทัยป์ O157 ซึ่งสามารถพบได้ว่าจัดอยู่ในทั้งกลุ่มของ STEC และ EHEC

1.6 *E. coli* O157

E. coli O157 มีความสำคัญของการระบาดในหลายประเทศทั่วโลกรวมทั้งสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น *E. coli* O157 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะคล้ายกับ *E. coli* ทั่วไป แต่ลักษณะสำคัญที่ใช้แยกสายพันธุ์ *E. coli* O157 คือ ไม่มีการหมักน้ำตาล sorbitol ซึ่งใน *E. coli* O157 มีการหายไปของยีนที่ใช้หมักน้ำตาล sorbitol (Karmali et al., 1983) *E. coli* O157 ส่วนใหญ่มียีน *stx*₁ หรือ *stx*₂ หรืออาจพบทั้งคู่ก็ได้ ซึ่งใช้ในการผลิต Stx ดังนั้นเชื้อ EHEC ที่สร้าง Shiga toxin ได้นี้หรือเรียกว่า “Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)” หรือ “Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC)” ซึ่งเป็นปัจจัยความรุนแรงในสายพันธุ์ O157

E. coli O157 นั้นพบการก่อโรคครั้งแรกมีการระบาดของโรคท้องร่วงในปี ค.ศ. 1982 (Riley et al., 1983) ซึ่งการระบาดนั้นพบว่าการปนเปื้อนเชื้อในแฮมเบอร์เกอร์เนื้อวัวซึ่งปรุงกึ่งสุกกึ่งดิบ ในเวลาเดียวกัน Karmali และคณะ ก็ได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ *E. coli* O157 และการเกิดภาวะ HUS (Karmali et al., 1983)

1.7 ระบาดวิทยาของ *E. coli* O157 (epidemiology)

มีการรายงานพบการติดเชื้อ *E. coli* O157 ทั่วโลกซึ่งในสหรัฐอเมริกามีการระบาดรวม 350 คน จาก 49 รัฐที่เกิดจาก O157 ได้รับรายงานระหว่างปี 1982 และ 2002 (Rangel et al., 2005) ส่วนที่เกิดในรัฐ Minnesota พบว่าเกิดจากเนื้อดิบเป็นพาหะของโรค และมีการระบาดของ *E. coli* O157:H7 ใน Colorado พบว่าผู้ป่วยที่บริโภคเนื้อดิบ 7 วันก่อนเริ่มมีอาการ ในปี 2008 มีผู้ป่วยใน Colorado ที่รักษาในโรงพยาบาลพบว่าเกิดจากการกินเนื้อดิบที่มีการปนเปื้อนเชื้อซึ่งมี 5

ราย ต่อมาพัฒนาไปเป็น HUS นำไปสู่โรคไตวายฉับพลัน (Karmali et al., 1983) ในยุโรปกลาง สก็อตแลนด์มีคนจำนวนมากเสียชีวิตจากการติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 (Dundas et al., 2001) การระบาดของโรคนี้เกิดจากการปนเปื้อนของเนื้อที่นำมาทำอาหารซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้สูงอายุ และต่อมากการติดเชื้อมีการแพร่กระจายไปยังคนจำนวนมากทุกเพศทุกวัย

ในประเทศญี่ปุ่น มีการระบาดของ O157 ในปี ค.ศ. 1996 การระบาดใหญ่ของเชื้อ *E. coli* O157 เกิดขึ้นในเมือง Sakai จังหวัด Osaka เด็กประถมศึกษามากกว่า 6,000 คน มีสาเหตุมาจากการรับประทานถั่วงอกและหัวไชเท้า

1.8 การติดต่อ (routes of transmission)

ทางของการส่งผ่านการติดเชื้อมีหลายทาง เช่น อาหาร นม น้ำดื่ม การติดต่อจากคนสู่คน และติดต่อทางห้องปฏิบัติการ การปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์นี้ สามารถเกิดขึ้นได้ที่บ้าน จากการปรุงอาหารหรือการสัมผัสกับอาหาร จากผลิตภัณฑ์ เนื้อวัว ที่มีการระบาดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในนมและชีส ซึ่งอาจพบในน้ำผลไม้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในไส้กรอกที่ผสมเนื้อหมู ในเนื้อวัว ในเนื้อกวางป่า และนม (Feng, 2000; Kassenborg et al., 2004) การติดต่อจากคนสู่คนในครอบครัว ศูนย์ดูแลเด็ก การติดต่อจากคนสู่คนส่วนใหญ่จะเกิดการติดเชื้อจากการไม่ปฏิบัติตามสุขลักษณะที่เหมาะสมส่วนในสัตว์นั้นจะไม่ได้รับอันตรายจาก *E. coli* ที่สร้าง Stx หรือถ้าได้รับผลกระทบก็น้อยมากเนื่องจากในลำไส้ของสัตว์เหล่านั้นไม่สร้างตัวรับ (receptor) ต่อ Stx ดังนั้นสัตว์เหล่านี้จึงเป็นพาหะที่สำคัญของ EHEC

1.9 พยาธิกำเนิดและพยาธิสภาพ (pathogenesis and pathology)

E. coli O157 เป็นหนึ่งในเชื้อ diarrheagenic *E. coli* ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงซึ่งการติดเชื้อโดย *E. coli* O157 เกิดขึ้นโดยการบริโภคอาหารหรือน้ำ หรือการสัมผัสกับพื้นผิวที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157 มีความสามารถในการก่อโรคสูง ปริมาณการติดเชื้อต่ำสุดของเชื้อที่ทำให้เกิดอาการ ซึ่งเพียงแค่ 10^1 - 10^2 CFU

E. coli O157 สามารถคงอยู่ได้ในผลิตภัณฑ์เป็นเวลาอย่างน้อย 9 เดือนที่เก็บไว้ในช่องแช่แข็ง (ต่ำกว่า 20 °C) ทนต่อความแห้ง กรด และผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นกรด เช่น มายองเนส และไส้กรอก *E. coli* O157:H7 ที่มีอยู่ตามธรรมชาติสามารถอยู่รอดได้นาน 2 สัปดาห์ในน้ำจืด (CFSPH, 2009)

1.10 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (virulence factors)

1.10.1 Shiga toxins

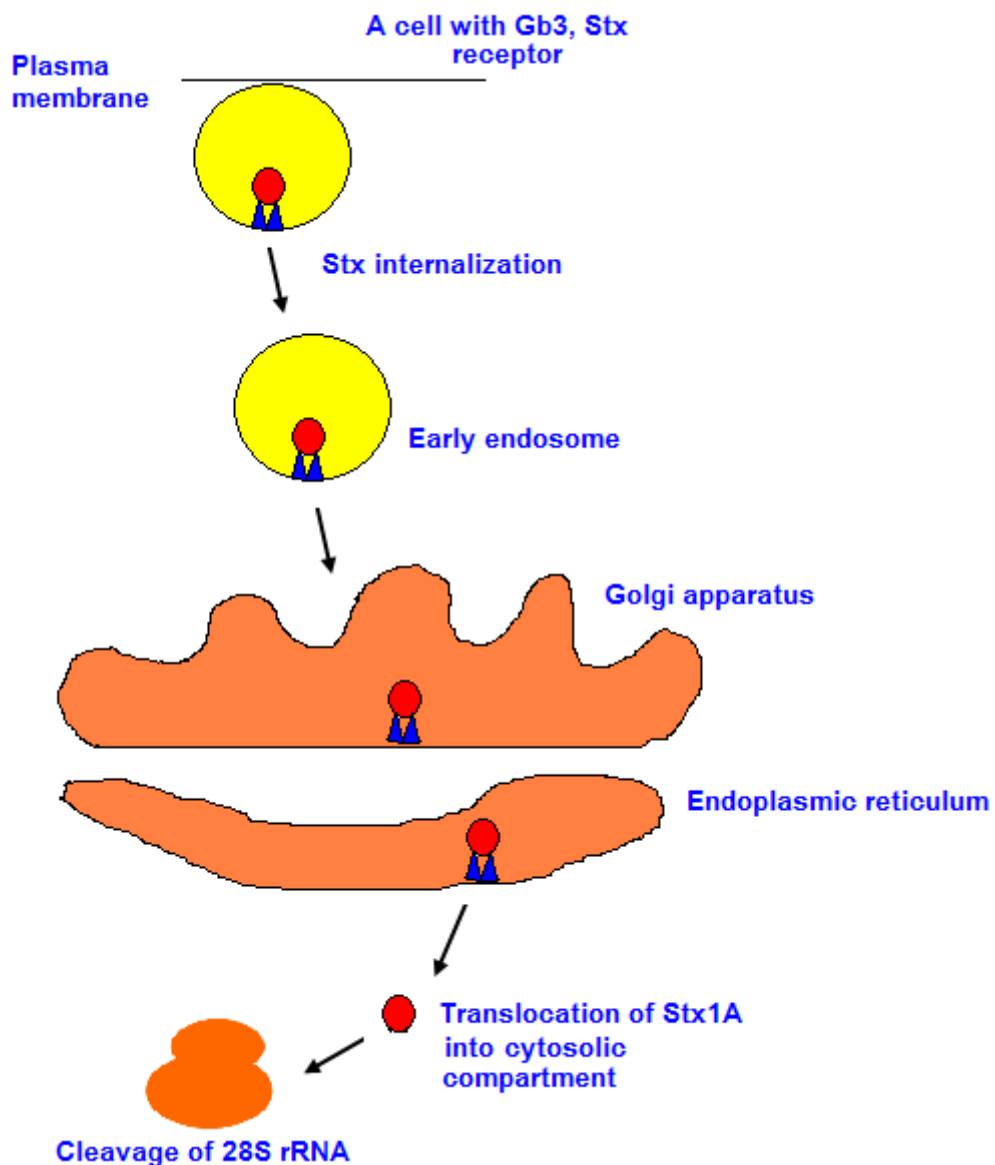
Shiga toxin (Stx) หรือ Verocytotoxin นั้นเป็นปัจจัยรุนแรงที่สำคัญของ *E. coli* ในการผลิตสารพิษ Shiga toxin มีรายงานครั้งแรกใน *Shigella dysenteriae* (Neisser and Shiga, 1903) ในปี 1903 และมีชื่ออย่างเป็นทางการว่า VT₁ สารพิษนี้ทำให้เกิดผลกระทบต่อ Vero cell ในปี 1977 Konowalchuk และคณะแสดงให้เห็นถึงการผลิต Stx จากสายพันธุ์หนึ่งของ *E. coli* ซึ่งสารพิษนี้ถูกเรียกก่อนหน้านี้ว่า Shiga-like toxin อย่างไรก็ตามการตั้งชื่อว่า Shiga-like toxin และ Verotoxin ถูกเปลี่ยนชื่อให้เป็น Shiga toxin เพื่อเลี่ยงความสับสน

Shiga toxins ประกอบด้วย 2 subunits คือ A subunit และ B subunit

A subunit มี 32KDa protein ซึ่งประกอบด้วย 28 KDa ของ A1 subunit และ 4 KDa ของ A2 subunit ซึ่ง A1 subunit มี N-glycosidase มีความสามารถในการดึง alanine จำนวน 1 หน่วยออกจาก 28s ribosomal RNA ส่งผลในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน แต่จะใช้ A2 subunit ซึ่งมีหน้าที่เป็นสะพานที่จะเชื่อมโยงของ subunit A1 กับ B subunit ด้วยกัน

B subunit มี 35KDa protein เป็น pentamer ประกอบด้วย 5 โปรตีนที่เหมือนกัน ซึ่งมีขนาด 7 KDa การจับกันระหว่าง Stx กับ globotriaosylceramide (Gb3) บน plasma membrane receptor สำหรับ Stx ช่วยในการนำเข้าของ Stx เข้าสู่ cytoplasm โดย endocytosis (รูปที่ 2) เดิมแล้ว Stx₁ และ Stx₂ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกันใน A และ B subunit (Jackson et al., 1987) ประมาณ 55 และ 57% ตามลำดับ

ความสามารถในการผลิต Stx1 และ Stx2 ของสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จะมีการตรวจสอบในการวินิจฉัยการติดเชื้อในกลุ่มของ EHEC ซึ่งความสามารถในการผลิต Stx1 และ Stx2 มักจะถูกตรวจสอบโดยวิธี PCR ในการตรวจสอบหายีน *stx*₁ และยีน *Stx*₂ หรือโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันในการตรวจสอบ Stx1 และ Stx2 ซึ่งสำหรับวิธีการตรวจหาภูมิคุ้มกันของ Stx1 และ Stx2 คือวิธี reversed passive latex agglutination (RPLA) (Karmali et al., 1983) ซึ่งการรายงานการตรวจหายีน *stx* จะถูกรายงานโดยใช้วิธีทาง PCR และในการตรวจสอบ Stx toxin จะถูกรายงานโดยใช้วิธี RPLA ในการตรวจสอบ Stx1 และ Stx2

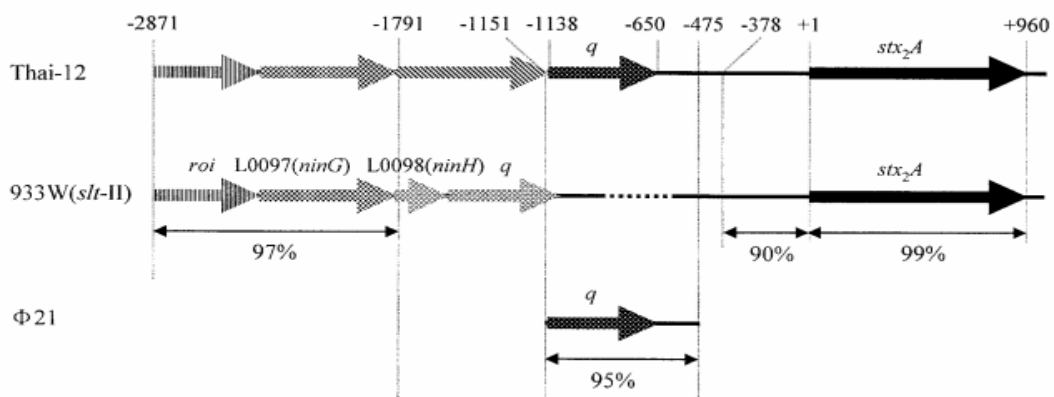


รูปที่ 2 กลไกการทำลายเซลล์โดย Shiga toxins (ดัดแปลงจาก Jackson et al., 1987)

ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย จากข้อมูลก่อนหน้านี้ (Sukhumungoon et al., 2011; Sukhumungoon et al., 2011) แสดงให้เห็นว่า เชื้อ STEC/EHEC ที่แยกได้จากเนื้อวัวนั้น มี ยีน *stx* อยู่ และยังสามารถสร้างสารพิษซิก้าที่ออกซินได้ในระดับสูงอีกด้วย (Sukhumungoon et al., 2011) อย่างไรก็ตาม สำหรับซีโรทัยป์ O157:H7 พบผลการทดลองที่ตรงกันข้ามคือ เชื้อ EHEC O157:H7 ที่พบทั้งหมด มียีน *stx* แต่ไม่สามารถสร้างสารพิษซิก้า ที่ออกซินได้เลย จึงเรียก *E. coli* O157 สายพันธุ์ดังกล่าวว่า Stx2-negative strain (Koitabashi et al., 2006) จากการทดลองของ Koitabashi และคณะ (2006) พบว่า *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเนื้อวัวและมูลวัวใน

ประเทศไทยมียีน *stx*₂ แต่สามารถสร้าง Stx2 ได้ในปริมาณน้อยมาก หรือไม่สามารถสร้างได้เลย จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Q ยีน รวมถึงโปรโมเตอร์ของ *stx* ยีนในเชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ Thai-12 ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเชื้อ O157:H7 ที่เป็น Stx2-negative strain พบว่า Q ยีนของ *stx*-phage ในสายพันธุ์ Thai-12 มีความเหมือนกับ Q ยีนของแบคทีริโอฟาจ 21 (*Q*₂₁) ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3) ในทางตรงข้าม Q ยีนของ *stx*-phage ในสายพันธุ์ Thai-12 นั้นมีความเหมือนกับ Q ยีนของ phage 933W (*Q*₉₃₃) ที่แทรกอยู่ใน *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 เพียง 52 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (รูปที่ 3) *Q*₉₃₃ พบว่าเป็นโปรตีนที่มี anti-termination activity สูงซึ่งจะช่วยนำพา RNA polymerase ผ่านจุดสิ้นสุดการสร้าง mRNA (terminator) ได้ดีทำให้มีการสร้าง Stx ได้มาก แต่ *Q*₂₁ พบว่ามี anti-termination activity ต่ำทำให้มีการสร้าง Stx ได้น้อย หรือไม่ได้เลย การศึกษาของ Koitabashi และคณะ (2006) สอดคล้องกับการศึกษาของ Lejeune และคณะ (2004) ที่พบว่า *Q*₉₃₃ และ *Q*₂₁ ถือเป็น markers สำหรับ *E. coli* O157:H7 ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค และไม่รุนแรงในการก่อโรคตามลำดับ

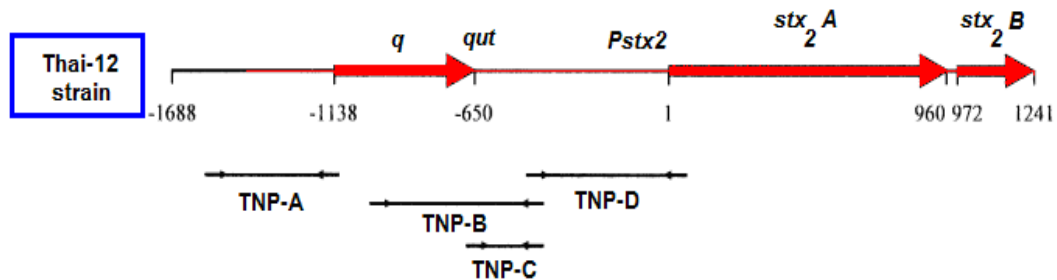
นอกจากนี้พบว่า โปรโมเตอร์ของ *stx*-phage ในสายพันธุ์ Thai-12 เมื่อนำมาเทียบกับโปรโมเตอร์ของแบคทีริโอฟาจ 933W แล้วพบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสในสายพันธุ์ Thai-12 ไป 2 นิวคลีโอไทด์ โดยตำแหน่งแรกเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง -35 มีการเปลี่ยนจากเบส C เป็น A ส่วนอีกตำแหน่ง เกิดการเปลี่ยนแปลงใกล้กับตำแหน่ง -10 โดยมีการเปลี่ยนจากเบส G เป็น A ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าเกิดการแทรกเข้ามาของ Thymine จำนวน 1 นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งระหว่าง ribosome binding site กับ start codon



รูปที่ 3 การเปรียบเทียบความเหมือนของ Q ยีนของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 และ Thai-12 เมื่อเทียบกับแบคทีเรียโอฟาจ 21 (ดัดแปลงจาก Koitabashi et al., 2006)

จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เชื่อได้ว่า การที่ *E. coli* O157:H7 ที่มียีน *stx*₂ แต่ไม่สามารถสร้าง Stx2 ได้ นั้น เป็นเพราะ Q ยีน มีความสามารถในการเกิด anti-terminator ต่ำ ประกอบกับโปรโมเตอร์ของ *stx*-phage นั้นไม่สามารถทำงานได้เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในตัวโปรโมเตอร์ และตำแหน่งใกล้กับ ribosome binding site

ดังนั้น จึงมีการทำ PCR เพื่อใช้ตรวจสอบการไม่สามารถสร้าง Stx เรียกว่า Toxin-non-producing (TNP) PCR โดยออกแบบ oligonucleotide primers ขึ้นโดยใช้นิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Q ยีนรวมถึงบริเวณโปรโมเตอร์ของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ Thai-12 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้าง Stx2 ได้มาเป็นต้นแบบ (รูปที่ 4) ปฏิกริยา PCR ที่ใช้ทดสอบมี 4 ปฏิกริยา คือ TNP-A, TNP-B, TNP-C และ TNP-D ถ้าผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 4 ปฏิกริยาถือว่าเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ที่ทดสอบไม่สามารถสร้าง Stx2 ได้



รูปที่ 4 ตำแหน่งจีโนมของ *stx*₂-phage ที่แทรกตัวอยู่ใน *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ Thai-12 ที่ primers ที่ใช้ในการทำ TNP-PCR สามารถเข้าจับได้ (ดัดแปลงจาก Koitabashi et al., 2006)

1.10.2 Intimin

Intimin คือ outer membrane protein ที่ได้จาก *eae* gene อยู่ใน pathogenicity island เรียกว่า locus of enterocyte effacement (LEE) ยีนนี้ได้รับการตรวจพบใน EPEC และ EHEC รวมทั้งใน *Citrobacter rodentium* และ *Hafnia alvei* (Nataro and Kaper, 1998) ในระยะแรกของการเกิดโรคนั้น Intimin ของแบคทีเรียจะช่วยให้เกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านโดยจะจับกับ 90 KDa ตรงตำแหน่งของ intimin receptor (Tir) (Hartland et al., 1999) ซึ่ง intimin จะจับกับ epithelial cells และจะทำลายโครงสร้างของ brush border microvilli เรียกว่า attaching และ effacing (A/E) lesion (Frankel et al., 1998) ปกติแล้วเซลล์

เจ้าบ้านจะไม่มี receptor สำหรับ intimin แต่ EHEC O157:H7 มีการแสดงให้เห็นว่ามันสามารถ insert Tir เข้าสู่ membrane ของเซลล์เจ้าบ้านได้

1.10.3 *escV*

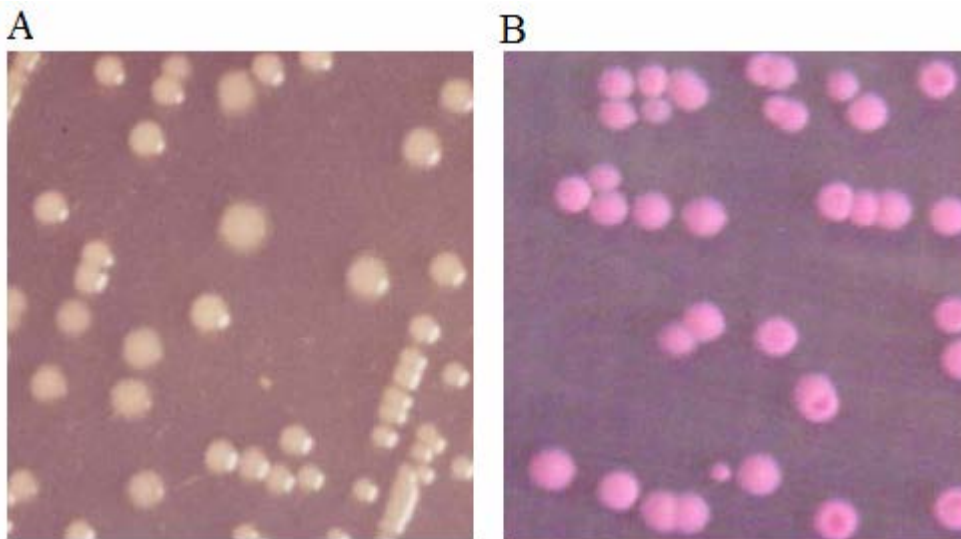
Type III secretion system จัดเป็น marker ของปัจจัยก่อความรุนแรงในแบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 16 ชนิด เช่น *escC* (outer membrane secretin), *escN* (cytoplasmic ATPase), *escV* (inner membrane protein) *escV* นั้นนอกจากเป็นยีนหนึ่งที่สำคัญที่ใช้ในการบ่งชี้การมี type III secretion system แล้ว ในเชื้อ EHEC พบว่า Type III secretion system ตั้งอยู่บน locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island ขนาดประมาณ 35 กิโลเบส (McDaniel and Kaper, 1997) ซึ่งเป็น กลุ่มยีนขนาดใหญ่ที่สามารถส่งผ่านไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยวิธี horizontal gene transfer ได้อีกด้วยมีรายงานการพบยีน *escV* นี้บ่อยครั้งในเชื้อกลุ่ม EPEC และ EHEC

1.11 การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ (laboratory diagnosis)

การวินิจฉัยโรคนั้นอาศัยอาการทางคลินิก นอกจากอาการที่ตรวจพบแล้วยังต้องอาศัยการตรวจสนับสนุนจากห้องปฏิบัติการด้วย ตัวอย่างส่งตรวจคือ อุจจาระซึ่งจะพบเชื้อจำนวนมากในอุจจาระที่มีมูกเลือด แต่เชื้อจะตายได้ง่ายเมื่ออยู่นอกร่างกาย ดังนั้นการเก็บอุจจาระส่งตรวจต้องใช้อุจจาระที่ถ่ายใหม่ๆ รีบส่งห้องปฏิบัติการเพื่อเพาะเชื้อโดยเร็วที่สุด แต่หากไม่สามารถส่งห้องปฏิบัติการได้จะต้องใส่เชื้อไว้ใน Transport medium เช่น buffered saline การแยกเชื้อที่สำคัญมีดังนี้

การแยกเชื้อจากอุจจาระควรเพาะลงอาหารเลี้ยงเชื้อทันที เพราะเชื้ออาจตายง่ายถ้าแห้งหรือทิ้งไว้นานเกินไป อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแยกเชื้อ *E. coli* จากสิ่งส่งตรวจหรือที่ได้จาก rectal swab ได้แก่ MacConkey agar (MCA) และ Eosin methylene blue agar (EMB) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MCA จะให้โคโลนีสีชมพูเนื่องจากการ ferment น้ำตาล lactose ขณะที่โคโลนีบนอาหาร EMB จะให้โคโลนีสีดำมีลักษณะสะท้อนแสงแวววาวเรียกว่า metallic sheen

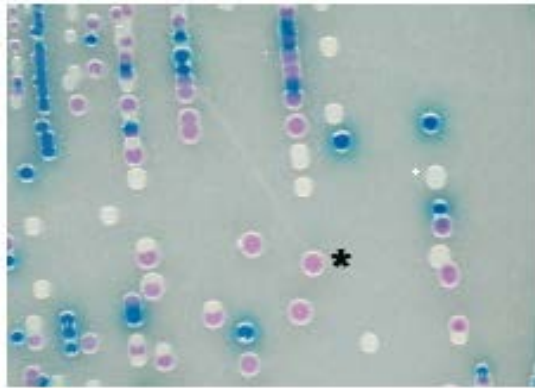
ในทศวรรษที่ผ่านมาความแตกต่างของ *E. coli* O157 กับ *E. coli* อื่นๆ ถูกกำหนดจากสีของโคโลนีบน sorbitol MacConkey agar (SMAC) เพราะ *E. coli* O157 ไม่สามารถใช้ sorbitol ได้ potassium tellurite และ cefixime สามารถเติมลงไปใน SMAC ซึ่งจะไปยังยั้งแบคทีเรียอื่นๆได้ เรียกว่าอาหาร cefixime tellurite (CT)-SMAC



รูปที่ 5 A, เชื้อ *E. coli* O157:H7 บนอาหาร sorbitol MacConkey agar โคลนสีครีม (ไม่หมักน้ำตาล sorbitol) ขอบเรียบ; B, เชื้อ *E. coli* non-O157 บน sorbitol MacConkey agar โคลนสีชมพู (หมักน้ำตาล sorbitol) ขอบเรียบ

โคลนของ *E. coli* O157 ที่ขึ้นบนอาหาร SMAC จะไม่มีสี โดยอาศัยหลักการที่เชื้อ O157:H7 ไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol) ได้ ซึ่งจะไม่ให้ผลผลิตเป็นกรด ทำให้ไม่มีการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ แต่เชื้อชนิดอื่นสามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอลได้ เมื่อเกิดกรดจากการใช้น้ำตาลขึ้น กรดนั้นจะไปเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ให้เป็นสีชมพู อาหารอีกชนิดคือ CHROMagarO157 ซึ่งมีการพัฒนาเพื่อแยกความแตกต่างของ *E. coli* O157 กับเชื้อ *E. coli* อื่นๆ โดยอาศัยหลักการที่ว่า เอนไซม์บางชนิดของเชื้อสามารถสลายสาร chromogens ที่มีอยู่ในอาหารแล้วให้ผลผลิตที่เป็นอนุภาคของสีที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งโคลนของ *E. coli* O157 จะให้สีม่วงอมชมพู (mauve colony) และมีขอบสีขาว (รูปที่ 6)

หลังจากที่แยกโคลนที่สงสัยได้แล้ว นำโคลนที่สงสัยมาทดสอบเพื่อตรวจยืนยันเชื้อ โดยใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) และหาซีโรทัยป์ โดยใช้การทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ O และ H antigen การตรวจหาสารพิษสามารถใช้วิธีทางอณูพันธุศาสตร์เช่น พีซีอาร์ (PCR) หรือวิธีทางอิมมูโนวิทยาเช่นอีไลซา (ELISA) หรือการทดสอบพิษในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell cytotoxic assay) โดยใช้เซลล์เวโร (Vero cell) หรือเซลล์ฮีลา (Hela cell) การตรวจเหล่านี้อาจให้ผลไม่สอดคล้องกันได้บ้าง โดยพบว่าเชื้อ O157 มียีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ Stx2 แต่ไม่สามารถสร้าง Stx2 ได้ (Koitabashi et al., 2006) นอกจากนี้เชื้อ EHEC สายพันธุ์ O157 ที่สามารถใช้น้ำตาล sorbitol แล้วให้โคลนสีชมพู ก็อาจพบได้เช่นกัน

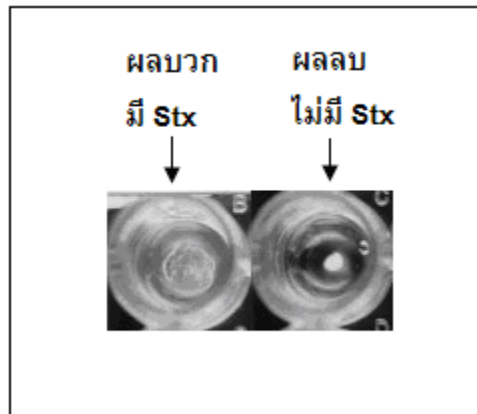


รูปที่ 6 CHROM agar O157 สำหรับการคัดแยกความแตกต่างของเชื้อ *E. coli* O157 ซึ่งให้โคโลนีสีม่วงอมสีชมพู (เครื่องหมายดอกจัน) ส่วนแบคทีเรียตัวอื่นๆจะให้โคโลนีสีที่แตกต่างออกไปหรือถูกยับยั้งให้ไม่เจริญ

การตรวจหา Shiga toxin จากตัวอย่างโดยตรงโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ปัจจุบันมีชุดน้ำยาที่ใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยาจำหน่ายในท้องตลาด เช่น enzyme immunoassay (EIA), latex agglutination, reversed passive latex agglutination เป็นต้นวิธี reverse passive latex agglutination (RPLA) มีหลักการโดยใช้ Stx antibody ที่เคลือบเม็ด latex ไว้ มาทำปฏิกิริยากับ Stx ในตัวอย่าง ถ้าในตัวอย่างที่ตรวจสอบมี Stx อยู่ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ จะเกิดการจับกันระหว่าง Stx antibody กับ Stx ที่อยู่ในตัวอย่าง เกิดการเกาะกลุ่มเป็นร่างแห (lattice structure) ขึ้น เมื่อปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง จะเห็นการเกาะกลุ่มของปฏิกิริยาที่เป็นร่างแหที่กั้นหลุม microtiter plate กั้นหลุมรูปตัววี (v) สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่ถ้าในตัวอย่างไม่มี Stx จะไม่เกิดปฏิกิริยา และเม็ด latex ที่เคลือบด้วย antibody ต่อ Stx จะตกลงไปกระจุกตัวกันที่ก้นหลุมที่ทดสอบ (รูปที่ 7)

1.12 การรักษา (treatment)

โรคที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ที่พบได้บ่อยที่สุดคือ โรคอุจจาระร่วง ดังนั้นการรักษาจึงต้องใช้น้ำที่ปลอดภัยต่อเชื้อ *E. coli* โดยตรง เช่น ampicillin และ kanamycin แต่พบว่าเด็กส่วนใหญ่จะมีเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา ampicillin และ kanamycin ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะทำหน้าที่เปรียบเสมือนแหล่งของยีนดื้อยาที่สามารถถ่ายทอดไปให้เชื้อก่อโรคตัวอื่นๆ เช่น *Shigella*, *Salmonella* รวมทั้ง *E. coli* ชนิดอื่นที่ก่อโรคด้วย (Tauxe et al., 1989)



รูปที่ 7 ภาพประกอบการทดสอบของ RPLA ผลบวก (Positive) สามารถเห็นการเกาะกลุ่มเป็น ร่วงแหและผลลบ (Negative) จะเห็นเม็ด latex ตกลงไปกระจุกตัวกันที่ก้นหลุม

อย่างไรก็ตาม การใช้ยาปฏิชีวนะบางชนิดในการรักษาอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ เช่นยาในกลุ่มที่มีผลต่อ DNA ของเชื้อ ยาในกลุ่มเหล่านี้ไปทำลาย DNA ของเชื้อ เมื่อเชื้อเกิดการซ่อมแซม DNA (DNA repair) ก็จะเป็นการกระตุ้นให้ stx phage ที่แทรกตัวอยู่ใน DNA ของเชื้อ เกิดการเพิ่มจำนวนมากขึ้น ส่งผลให้มีแม่พิมพ์ในการสร้าง Stx มากยิ่งขึ้น ผู้ป่วยจะมีอาการแยลงและมีอัตราการเสียชีวิตสูงขึ้นตามมา จากการศึกษาในหนูโดยใช้ยากลุ่ม quinolone พบว่ามีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้น (Zhang, 2000) โดยพบว่ามี การหลั่งของ Shiga toxin มากขึ้น และเป็นการเพิ่มอัตราเสี่ยงในการเกิด HUS จากการศึกษาพบว่าในผู้ป่วย HUS ในกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะเกิดอาการ HUS มากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะอย่างไรก็ตามพบว่าผู้ป่วยดังกล่าวมีอาการรุนแรงมาก่อน ได้รับการรักษาแล้ว (Carter et al., 1987) แต่ขัดแย้งกับการศึกษาของ Takeda และคณะ ซึ่งได้ศึกษาข้อมูลย้อนหลังในการระบาดใหญ่ที่เมือง Sakai ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี ค.ศ. 1996 พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับ การรักษาด้วย fosfomycin ภายใน 3 วันแรกของโรคเกิดภาวะแทรกซ้อนและเกิด HUS น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาที่ช้ากว่า (Tilden et al., 1996) จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นได้ว่า fosfomycin ไม่ได้เป็นยาที่มีผลต่อ DNA โดยตรง จึงอาจให้ผลที่ดีในการรักษา แต่ quinolone มีกลไกยับยั้งการคลายเกลียวและการจำลองตัวเองของ DNA ของเชื้อ ซึ่งเป็นผลโดยตรงต่อ DNA จึงให้ผลที่แยในการรักษา ดังนั้นในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะจึงจำเป็น และต้องเลือกยาที่ไม่ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอฟาจภายในเซลล์ของแบคทีเรีย จึงจะสามารถให้ผลการรักษาได้ดี

1.13 การป้องกันและควบคุม (prevention and control)

โรคติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ส่วนใหญ่แล้วเกิดจากการรับประทานเนื้อวัว หรือผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อวัวที่ปรุงไม่สุก โดยเฉพาะเนื้อบดหรือกินผลิตภัณฑ์นมโคที่ไม่ได้ผ่านการพาส

เจอร์โรสหรือผลิตภัณฑ์เนื้อของสัตว์เคี้ยวเอื้อง หรือสัตว์ฟันแทะบางชนิด ดังนั้น การรับประทานอาหารที่ทำจากเนื้อสัตว์ดังกล่าวต้องประกอบอาหารให้สุกเสียก่อน ควรเตรียมอาหารด้วยวิธีที่ปลอดภัย ไม่มีการปะปนกันระหว่างวัตถุดิบกับอาหารปรุงสุกแล้ว ล้างมือและอุปกรณ์ทำครัวทุกครั้ง และน้ำผลไม้ควรดื่มเฉพาะที่พาสเจอร์ไรซ์แล้ว ล้างมือทุกครั้งหลังจากสัมผัสตัวสัตว์จำพวกโค มีสุขอนามัยที่ดีในการใช้ห้องส้วม เป็นต้น

ส่วนที่ 2 Uropathogenic *Escherichia coli*

2.1 *E. coli* ที่ก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ Uropathogenic *E. coli* (UPEC)

การก่อโรคในคนนั้นนอกจากจะก่อโรคกับระบบทางเดินอาหารแล้วยังมี *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆที่ไม่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร แต่จะสามารถแสดงความสามารถในการก่อโรคได้เมื่ออยู่ในอวัยวะอื่นนอกกระบบทางเดินอาหาร *E. coli* เหล่านี้เรียกว่า extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) การก่อโรค เช่น ก่อให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กแรกเกิด (Neonatal meningitis *E. coli*; NMEC) หรือการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (UTI - Urinary Tract Infections) โดยแบคทีเรียนี้จะเกาะติดกับผนังของกระเพาะปัสสาวะซึ่งทำให้เกิด กระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) กรวยไตอักเสบ (pyelitis) และเชื้ออาจจะลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดเกิดเป็น septicemia อาจถึงแก่ชีวิตได้

Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) คือ เชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคนอกกระบบทางเดินอาหารและลำไส้ การติดเชื้อที่สำคัญโดย *E. coli* กลุ่มนี้ ได้แก่ uropathogenic *E. coli* (UPEC) การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะสามารถเกิดได้จากเชื้อหลายชนิด แต่พบว่าการติดเชื้อส่วนใหญ่กว่า 80% เกิดจาก *E. coli* กลไกการก่อโรคแสดงดังรูปที่ 2 คือ *E. coli* ส่วนใหญ่มักจะปนเปื้อนมาจากกระบบทางเดินอาหารเมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินปัสสาวะเชื้อจะเกาะติดที่เซลล์เยื่อบุทำให้เกิดการรวมตัวกันคล้าย biofilm เรียกว่า intracellular bacterial communities (IBCs) เมื่อแบคทีเรียใน IBC ออกมานอกเซลล์ก็จะสามารถเข้าสู่เซลล์ชั้นต่อไปของระบบทางเดินปัสสาวะและอาจมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อของไตถ้าไม่ได้รับการรักษา

2.2 ปัจจัยก่อโรคของ UPEC

2.2.1 P fimbriae (*pap*)

กระบวนการที่สำคัญที่สุดในการก่อโรคของ uropathogens คือขั้นตอนการเกาะติดกับเซลล์ uroepithelium ปัจจัยก่อการเกาะติดที่สำคัญคือ P fimbriae โดยมีบทบาทในการก่อโรคแบบ ascending UTI และ pyelonephritis ในมนุษย์ (Leffer and Svanborg-Eden, 1981; Plos et al., 1995; Vaisanen et al., 1981) จากการศึกษาพบว่า P fimbriae สามารถเพิ่มการ

colonization ในส่วน tubular epithelium ได้ (Bien et al., 2012) P fimbriae ยังแสดงบทบาทที่สำคัญที่สุดในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง มีการพบว่า acute allograft injury อันเกิดจาก UPEC ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน P fimbriae ในส่วนของ upper UTI

2.2.2 Afa adhesion (*afa*)

ปัจจัยการก่อการเกาะติดที่สำคัญอีกชนิดคือ Afa adhesion ซึ่งเป็นหนึ่งในสมาชิกของ Afa family Afa adhesion สร้างมาจาก *afa* gene จากการศึกษพบว่า UPEC ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน Afa adhesion มีความสามารถในการก่อการติดเชื้อแบบเรื้อรังหรือก่อการติดเชื้อซ้ำได้ (Le Bouguéneq, 2005) จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า UPEC สามารถบุกรุกเซลล์ uroepithelium ได้ โดยใช้ AfaD และ AfaE adhesins เพื่อหลีกเลี่ยงการตรวจจับของระบบภูมิคุ้มกันและยาปฏิชีวนะ ด้วยสาเหตุนี้อาจสามารถอธิบายการเกิดการติดเชื้อซ้ำและการก่อโรคแบบเรื้อรังของ UPEC ได้ (Dhakal et al., 2008)

2.2.3 α -haemolysin (*hlyA*)

ในส่วนของปัจจัยก่อโรคชนิด secreted virulence factor ของ uropathogens นั้น *hlyA* gene ซึ่งจะสร้างโปรตีน α -haemolysin มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เช่น pyelonephritis (Johnson, 1991) HlyA ทำหน้าที่เป็น pore-forming toxin ซึ่งจัดเป็นสมาชิกของ RTX toxin family โดยสารพิษชนิดนี้มีการพบได้อย่างแพร่หลายในแบคทีเรียแกรมลบ ที่สามารถก่อโรคได้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ความเข้มข้นของสารพิษต่างๆ สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ของ neutrophils, T lymphocyte และ เซลล์ไตได้ จึงทำให้เกิดการลอกหลุด (exfoliation) ของเซลล์ uroepithelium (Jonas et al., 1993; Russo et al., 2005; Chen et al., 2006) ยิ่งไปกว่านั้น สารพิษความเข้มข้นสูง ยังสามารถเป็นสาเหตุให้เกิดการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงได้อีกด้วย ส่งผลให้เชื้อสามารถเดินทางข้ามผนังเยื่อเมือกก่อการแตกสลายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ (Johnson, 1991) ประมาณ 50% ของการเกิดอาการซ้ำซ้อนของ pyelonephritis เกิดจาก HlyA (Bien et al., 2012) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *E. coli* ที่สามารถผลิต HlyA ได้ นั้นสามารถทำให้เกิดโรคไตที่ไต ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจาก complication (Jakobsson et al., 1994)

2.3 การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ uropathogens

เชื้อ uropathogens ที่พบจากการศึกษาในประเทศต่าง ๆ นั้น มีการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด แต่ชนิดของยาปฏิชีวนะที่พบได้บ่อยจากหลายการศึกษาว่า เชื้อมีการดื้อยา ได้แก่ tetracycline และ cotrimoxazole ในการศึกษาที่ Popular Diagnostic Centre ในประเทศบังคลาเทศในปี ค.ศ. 2006 พบว่า เชื้อ uropathogenic *E. coli* เชื้อจะดื้อต่อ tetracycline มากที่สุด

โดยมีอัตราการดื้อยาตั้งแต่ 74 ถึง 84% (Lina et al., 2007) ส่วนในประเทศแถบตะวันตก จากการศึกษาในประเทศเนเธอร์แลนด์ den Heijer และคณะ (2010) รายงานว่า uropathogenic *E. coli* มีการดื้อ cotrimoxazole ในสัดส่วน 16%

ขณะที่ชนิดของยาปฏิชีวนะที่มีการดื้อยาน้อยที่สุดคือ nitrofurantoin โดยจากการศึกษาในประเทศเนเธอร์แลนด์ในปี ค.ศ. 2009 พบว่าเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 489 ไอโซเลทที่นำมาตรวจสอบนั้น ไวต่อ nitrofurantoin ทั้งหมด (den Heijer et al., 2010) การศึกษาที่ให้ผลสอดคล้องกับงานของ den Heijer และคณะ (2010) มาจากการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของ Mohajeri และคณะ (2014) โดยทำการศึกษาเชื้อ extended spectrum-beta lactamase (ESBL)-producing *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยนอกของโรงพยาบาลในประเทศอิหร่าน ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ ค.ศ. 2012 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ ค.ศ. 2013 พบว่า เชื้อดื้อ nitrofurantoin เพียง 4.1% ยิ่งไปกว่านั้นจากรายงานของ Liu และคณะ (2011) ที่ศึกษา ESBL-producing *E. coli* ณ Taipei Medical University hospital ระหว่างเดือนกรกฎาคม ค.ศ. 2008 ถึงเดือนธันวาคม ค.ศ. 2009 ได้แสดงให้เห็นว่า 79.1% ของ ESBL-producing *E. coli* นั้นไวต่อ nitrofurantoin อีกด้วย กลไกการออกฤทธิ์ของ nitrofurantoin นั้นมีความซับซ้อน โดยเอนไซม์ nitroreductase จะเปลี่ยน nitrofurantoin เป็นสารออกฤทธิ์ที่เป็น electrophile สารนี้จะไปออกฤทธิ์กับ ribosomal protein รวมถึงสารโมเลกุลใหญ่อื่นๆเช่น DNA หรือ RNA แม้ว่าจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *E. coli* จะไวต่อ nitrofurantoin และยาปฏิชีวนะชนิดนี้เป็นยาที่ใช้ในการรักษา non-complicated cystitis อย่างได้ผล อย่างไรก็ตาม การใช้ nitrofurantoin ในการรักษาต้องให้ยาจำนวน 4 doses ต่อวัน และผลข้างเคียงของยาต่อผู้ป่วยก็มีให้เห็นเด่นชัดเช่นกัน (Amábile-Cueras and Arredondo-García, 2011)

ผลการทดลอง

ส่วนที่ 1 การตรวจสอบ EHEC/STEC ในผู้ป่วยท้องร่วง และการหาปริมาณ EHEC/STEC จากตัวอย่างเนื้อสัตว์

1.1 การแยกและจำแนกเชื้อ EHEC และ STEC จากผู้ป่วย

จากการแยกเชื้อ EHEC และ STEC จากผู้ป่วยท้องร่วงที่ได้รับมาจากโรงพยาบาลหาดใหญ่และโรงพยาบาลปัตตานี ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2555 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2557 รวมเวลา 18 เดือน โดยใช้อาหาร sorbitol MacConkey agar (SMAC) สามารถแยกเชื้อได้จำนวน 1,022 ไอโซเลท จาก 592 ตัวอย่าง ได้โคโลนีสีชมพูจำนวน 712 โคโลนี และได้โคโลนีไม่มีสี จำนวน 310 โคโลนี (ตารางที่ 2) โคโลนีที่ไม่มีสี (colorless colony) เป็นตัวแทนในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157 เนื่องจาก *E. coli* O157 ไม่สามารถหมักน้ำตาล sorbitol ได้ จึงให้โคโลนีที่ไม่มีสี ส่วนโคโลนีสีชมพู เป็นตัวแทนในการหาเชื้อ *E. coli* ซีโรทัยป์อื่นๆ

ตารางที่ 2 จำนวนไอโซเลทที่แยกได้จาก rectal swabs ของผู้ป่วยที่ได้รับมาจากโรงพยาบาลหาดใหญ่และโรงพยาบาลปัตตานีในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2555 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2557

โรงพยาบาล	จำนวนไอโซเลทโคโลนีสีชมพู บน SMAC	จำนวนไอโซเลทโคโลนีไม่มีสี บน SMAC
โรงพยาบาลหาดใหญ่	518	310
โรงพยาบาลปัตตานี	194	-
รวม	712	310

1.2 การตรวจสอบยีนก่อโรคของเชื้อโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ในการศึกษานี้ ทำการตรวจสอบยีน *stx*₁, *stx*₂ และ *eae* โดยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าว (ตาราง S1) จากผลการตรวจสอบ ไม่พบยีนดังกล่าว ในทุกๆ ไอโซเลท แสดงให้เห็นว่า ไม่มีผู้ป่วยท้องร่วงรายใดในช่วง 18 เดือนที่ตรวจสอบเกิดภาวะท้องร่วงจากเชื้อในกลุ่ม STEC และ EHEC

1.3 การตรวจสอบซีโรทัยป์ O157 ของเชื้อที่แยกได้โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

สำหรับการตรวจสอบซีโรทัยป์ O157 นั้น เชื้อทุกไอโซเลทถูกตรวจสอบซีโรทัยป์อย่างคร่าวๆ โดยวิธี PCR (Maurer et al., 1999) โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีน *rfbO157* ก่อน จากนั้นนำเชื้อที่ให้ผลบวกโดยวิธี PCR แล้ว ไปทำการยืนยันผลโดยวิธี agglutination โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อซีโรทัยป์ O157 จากผลการศึกษาพบว่า มีเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท ที่ให้ผลบวกต่อยีน *rfbO157* โดยวิธี PCR ให้ชื่อสายพันธุ์นี้ว่า PSU120

1.4 การตรวจสอบชนิดของ Q gene โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

จากผลการตรวจสอบยีน Q 2 ชนิด ที่มีรายงานว่าสามารถใช้เป็นยีนบ่งชี้ความรุนแรงของเชื้อ คือ Q_{933} ซึ่งเป็นยีน Q ที่มักพบในเชื้อที่มีความรุนแรงสูง และยีน Q_{21} ซึ่งเป็นยีนที่มักพบใน *E. coli* O157 สายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง พบว่า *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 ไม่มียีนทั้งสองชนิดอยู่ (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่า ไม่มีแบคทีเรียโอฟาจ *stx* ที่สำคัญแทรกอยู่ในจีโนมของ PSU120

1.5 การตรวจสอบตำแหน่งการแทรกของ prophage

ทำการตรวจสอบยีนที่มีรายงานว่า เป็นตำแหน่งที่แบคทีเรียโอฟาจใช้ในการแทรกจีโนมจำนวน 5 ตำแหน่ง ว่ายังมีความสมบูรณ์ดีอยู่หรือไม่ หรือมีการแทรกตัวของ prophage ชนิดอื่นๆอยู่หรือไม่ การตรวจสอบทำโดยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับยีนที่ต้องการตรวจสอบ (ตาราง S1) ในกรณีที่ยีนที่ตรวจสอบไม่มีแบคทีเรียโอฟาจแทรกอยู่ การดำเนินการไปของปฏิกิริยา PCR จะเกิดได้ตามปกติและให้ผลผลิต PCR ออกมาได้ แต่ถ้ายีนใดมีแบคทีเรียโอฟาจแทรกอยู่ จะไม่สามารถให้ผลผลิต PCR ออกมาได้เนื่องจากตำแหน่งที่ทำการเพิ่มจำนวน DNA นั้น มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่ปฏิกิริยา PCR จะดำเนินการสำเร็จ จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 นั้น มียีน *Z2577*, *yecE* และ *wrbA* ที่ยังคงมีสภาพปกติ ส่วนยีน *sbcB* และ *yehV* นั้น มี prophages ชนิดอื่นๆแทรกยีนโนมอยู่แล้ว (ตารางที่ 3)

1.6 การตรวจสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disk diffusion method

ทำการตรวจสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 โดยใช้ยาปฏิชีวนะตามมาตรฐานของ CLSI จำนวน 11 ชนิด ดังนี้ ampicillin (10 µg), ceftazidime (30 µg), cephalothin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), methicillin (5 µg), streptomycin (10 µg),

tetracycline (30 µg) และ vancomycin (30 µg) จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ PSU120 เป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิด (multi-drug resistant strain) เนื่องจากดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 กลุ่ม (ตารางที่ 3) โดยพบว่าเชื้อสามารถดื้อต่อยา cephalothin, erythromycin, methicillin และ vancomycin

ตารางที่ 3 ลักษณะของ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120

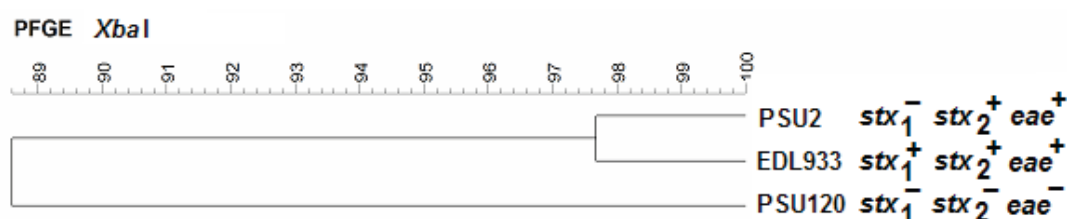
Strain	Source of sample	Virulence genes					O157/non-O157	<i>Q</i> ₉₃₃ / <i>Q</i> ₂₁	Insertion site occupied	^a Antibiogram pattern
		<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i>	<i>escV</i>	<i>hlyA</i>				
PSU120	48 year-old male	-	-	-	+	-	^b +/-	-/-	<i>sbcB, yehV</i>	E, KF, MET, Va

^aE, erythromycin; KF, cephalothin; MET, methicillin; Va, vancomycin.

^b+, ตรวจพบ; -, ตรวจไม่พบ

1.7 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อโดยวิธี pulsed-field gel electrophoresis

ในการทดลองนี้ ได้ทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 กับเชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ PSU2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีจีโนทัยป์เป็น stx_1^- , stx_2^+ และ eae^+ ซึ่งจีโนทัยป์แบบนี้ พบได้บ่อยที่สุดใน *E. coli* O157 ที่แยกได้จากเนื้อวัว ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา นอกจากนี้ยังใช้เชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1982 เพื่อเปรียบเทียบอีกด้วย เชื้อสายพันธุ์ EDL933 มีจีโนทัยป์เป็น stx_1^+ , stx_2^+ และ eae^+ จากการตรวจสอบโดยวิธี PFGE พบว่าสายพันธุ์ PSU120 มีความคล้ายทางพันธุกรรมกับกลุ่มของ PSU2 และ EDL933 ถึง 88.6% (รูปที่ 8) ซึ่งถือว่าเป็นความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในอัตราที่สูง แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 จะมีความเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ที่พบได้ทั่วไปในเนื้อวัวอย่าง PSU2 และแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ PSU120 อาจเป็นสายพันธุ์ที่มี stx มาก่อน แต่เกิดการสูญเสีย stx ไประหว่างการติดเชื้อในมนุษย์



รูปที่ 8 Dendrogram ที่ได้จากลายพิมพ์ DNA โดยวิธี pulsed-field gelelectrophoresis ของ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 เทียบกับสายพันธุ์ PSU2 ที่แยกได้จากเนื้อวัว และสายพันธุ์ EDL933 ที่แยกได้จากผู้ป่วยท้องร่วงแบบมีมูกเลือด

1.8 การตรวจหาปริมาณของ EHEC และ STEC จากเนื้อสัตว์ประเภทต่างๆ โดยวิธี most probable number-polymerase chain reaction (MPN-PCR)

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อวัวดิบ เนื้อไก่ดิบและเนื้อหมูดิบ ที่วางจำหน่ายในตลาดสด เขต อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2556 ถึงตุลาคม พ.ศ. 2556 จำนวน 30 ตัวอย่าง (เนื้อสัตว์ชนิดละ 10 ตัวอย่าง) มาตรวจหาปริมาณด้วยวิธี MPN-PCR พบว่า ปริมาณของ STEC ที่มี ยีน stx_1 และ stx_2 ในเนื้อวัวมีค่าเท่ากับ 16 และ 27 MPN/กรัม ตามลำดับ ส่วน EHEC นั้นไม่สามารถพบได้จากเนื้อวัว ในส่วนของเนื้อหมูและเนื้อไก่นั้น พบเชื้อ STEC และ EHEC ในปริมาณที่

น้อยกว่าเนื้อวัวดิบ อย่างไรก็ตาม พบ EHEC 1 ตัวอย่าง จากเนื้อไก่ในปริมาณ 3 MPN/กรัม (ตารางที่ 4) จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของ EHEC และ STEC ในเนื้อดิบในปริมาณน้อย

ตารางที่ 4 ปริมาณ (MPN/กรัม) ของเชื้อ EHEC และ STEC ในเนื้อสัตว์ดิบ

Type of meat	Pathotype	No. of positive sample	MPN/g	
			^a min	max
Beef	EHEC	0	<3	<3
	<i>stx</i> ₁ -habouring <i>E. coli</i>	7	<3	16
	<i>stx</i> ₂ -habouring <i>E. coli</i>	8	<3	27
Pork	EHEC	0	<3	<3
	<i>stx</i> ₁ -habouring <i>E. coli</i>	6	<3	11
	<i>stx</i> ₂ -habouring <i>E. coli</i>	3	<3	15
Chicken	EHEC	1	<3	3
	<i>stx</i> ₁ -habouring <i>E. coli</i>	3	3	9.3
	<i>stx</i> ₂ -habouring <i>E. coli</i>	1	<3	3

^amin, ค่า MPN ที่น้อยที่สุดที่พบในจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก; max, ค่า MPN ที่มากที่สุดที่พบในจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก

ในการตรวจหาปริมาณเชื้อจากเนื้อสัตว์ดิบจำนวน 30 ตัวอย่างข้างต้นนี้ ไม่พบเชื้อที่มีผลบวกต่อยีน O157 เลย (< 3 MPN/g) ทั้งๆที่จากรายงานก่อนหน้านี้สามารถพบ *E. coli* O157 ได้ในปริมาณที่ค่อนข้างมาก ดังนั้นเพื่อยืนยันผลในระดับหนึ่งว่าการทดสอบโดยวิธี MPN-PCR เป็นไปโดยถูกต้อง และเพื่อยืนยันว่า *E. coli* O157 ไม่มีการปนเปื้อนในเนื้อวัวที่ตรวจสอบในช่วงเวลาที่ผ่านมาเมื่อตรวจสอบโดยวิธี MPN-PCR จริง จึงทำการแยกเชื้อ *E. coli* O157 โดยวิธี immunomagnetic separation (IMS) ทันทีหลังเสร็จสิ้นการตรวจสอบเชิงปริมาณ โดยทำการตรวจสอบเนื้อวัวโดยวิธีนี้จำนวน 32 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่าใน 31 ตัวอย่างแรก ซึ่งใช้เวลาในการเก็บตัวอย่างเหล่านี้ในช่วงประมาณ 4 เดือนหลังจากการทำ MPN-PCR เสร็จสิ้นนั้น ไม่พบ *E. coli* O157 เลย แสดงให้เห็นว่า ผลการตรวจหา *E. coli* O157 เชิงปริมาณโดยวิธี MPN-PCR ที่ให้ผลเป็นลบนั้น น่าจะถูกต้องแล้ว อย่างไรก็ตาม ในช่วงปลายเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556 พบว่าสามารถเริ่มตรวจพบ *E. coli* O157 ได้ โดยสามารถแยก *E. coli* O157 ออกมาได้จากตัวอย่างเนื้อวัว

1 ตัวอย่างจำนวน 6 ไอโซเลทเชื้อทั้งหมดไวต่อยาปฏิชีวนะ ceftriaxone (30µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25+23.75 µg), norfloxacin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), ceftazidime (30 µg), imipenem (10 µg) (ตารางที่ 5) คาดว่าเชื้อทั้งหมดมีกำเนิดมาจากโคลนเดียวกัน

ตารางที่ 5 ข้อมูลของ *E. coli* O157 จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อวัวในช่วงปลายเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556

Strain	Origin	Date (month/yr)	Virulence gene			O157/non-O157
			<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i>	
TP-30-1	เนื้อวัว	ตุลาคม/2556	-	+	+	+/-
TP-30-2	เนื้อวัว	ตุลาคม/2556	-	+	+	+/-
TP-30-3	เนื้อวัว	ตุลาคม/2556	-	+	+	+/-
TP-30-4	เนื้อวัว	ตุลาคม/2556	-	+	+	+/-
TP-30-5	เนื้อวัว	ตุลาคม/2556	-	+	+	+/-
TP-30-6	เนื้อวัว	ตุลาคม/2556	-	+	+	+/-

+, ตรวจพบ; -, ตรวจไม่พบ

ส่วนที่ 2 Uropathogenic *Escherichia coli*

2.1 การแยกเชื้อ UPEC

เชื้อ UPEC ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับมาจากโรงพยาบาลวชิระภูเก็ต ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 ถึงเดือน กันยายน พ.ศ. 2559 รวม 8 เดือน จำนวนทั้งสิ้น 113 ไอโซเลท (จาก 113 ตัวอย่าง) ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกมาจาก midstream urine หรือจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อโดยมีความเกี่ยวข้องกับการใช้สายสวนท่อปัสสาวะ (catheter urine) ของผู้ป่วยตามวอร์ดต่างๆ เชื้อได้รับการบ่งชี้ว่าเป็น *E. coli* โดยวิธีทางชีวเคมี จำนวนและรายละเอียดของเชื้อที่แยกได้ ดังแสดงในตารางการศึกษาข้อมูลสถิติประชากร (ตารางที่ 6)

2.2 การตรวจสอบยีนก่อโรคต่างๆของเชื้อ

การตรวจสอบยีนต่างๆของเชื้อทำได้โดยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีนนั้นๆ ข้อมูลของชนิดของยีนที่ตรวจและ primers แสดงในตารางที่ S1 จากผลการตรวจสอบพบว่า สามารถพบยีน *pap* ได้จากเชื้อ UPEC จำนวน 14 ไอโซเลท (12%) พบยีน *afa* จำนวน 8 ไอโซเลท (7%) และพบยีน *hlyA* จำนวน 16 ไอโซเลท (14%) (ตารางที่ 7) เชื้อที่มียีนก่อโรคเหล่านี้มีทั้งหมด 27 ไอโซเลท โดยลักษณะต่างๆของเชื้อได้แสดงไว้ในตารางที่ 9

2.3 การตรวจสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disk diffusion method

ทำการตรวจหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในเชื้อที่แยกได้ทุกไอโซเลท โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 7 ชนิด ดังนี้ ceftaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), cotrimoxazole (25 µg), imipenem (10 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg) และ tetracycline (30 µg) ผลการตรวจสอบพบว่า เชื้อ UPEC ดื้อยา tetracycline มากที่สุดจำนวน 85 ไอโซเลท (77%) และดื้อ cotrimoxazole รองลงมาที่ 76 ไอโซเลท (68%) ส่วนยาด้านจุลชีพที่เชื้อไวมากที่สุด คือ nitrofurantoin โดยพบว่าเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท (1%) เท่านั้นที่ดื้อต่อยาชนิดนี้ ส่วน imipenem เชื้อดื้อเพียง 5 ไอโซเลท (5%) (ตารางที่ 8)

การตรวจสอบเชื้อที่สามารถสร้าง ESBL ทำโดยเปรียบเทียบการใช้ยาด้านจุลชีพ ชนิด amoxicillin กับ amoxicillin ผสมกับ clavulanic acid โดยวิธี disk diffusion โดยมีเกณฑ์ว่า ถ้ามี clear zone ของยา amoxicillin+clavulanic acid มากกว่า clear zone ของยา amoxicillin เพียงอย่างเดียว มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ถือว่าให้ผลบวกในการสร้าง ESBL ผลการตรวจสอบพบว่า เชื้อ UPEC จำนวน 52 ไอโซเลท (46%) สามารถสร้าง ESBL ได้ (รูปที่ 9)

ตารางที่ 6 ข้อมูลสถิติประชากร (demographic data) ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ UPEC จากโรงพยาบาล
วชิระภูเก็ต ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2556

Category	Number of isolates (%)
	<i>Escherichia coli</i> (n = 113)
Sex	
Male	32 (28)
Female	81 (72)
Age	
≤15	15 (13)
16-30	6 (5)
31-45	4 (4)
46-60	13 (12)
≥ 61	75 (66)
Hospital unit	
Outpatient	
OPD	6 (5)
ER	7 (6)
Inpatient	
Internal medicine	76 (67)
ICU	2 (2)
Surgery	9 (8)
Pediatric	13 (12)
Specimen	
Midstream urine	63 (56)
Catheter urine	50 (44)

ตารางที่ 7 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ *E. coli* จากโรงพยาบาลวชิระภูเก็ต

จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวกต่อยีนก่อโรค (%)			
ยีน	<i>pap</i>	<i>afa</i>	<i>hlyA</i>
	14 (12)	8 (7)	16 (14)

ตารางที่ 8 แบบแผนการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ UPEC จากโรงพยาบาลวชิระภูเก็ต

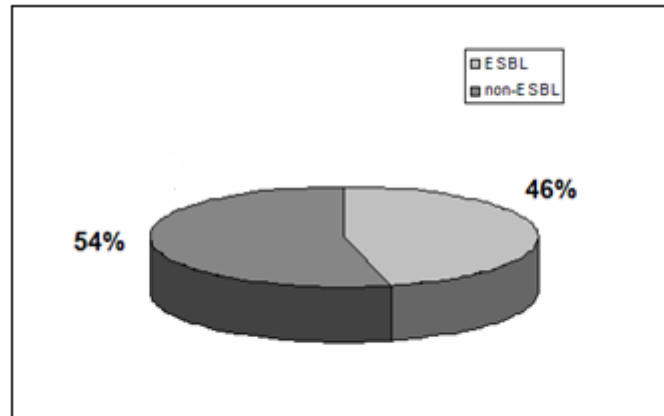
Bacterial species	Number of positive isolates/Total isolates (%)						
	CTX	CAZ	SXT	IPM	F	NOR	TE
<i>Escherichia coli</i>	57/110 (52)	54/110 (49)	76/111 (68)	5/111 (5)	1/113 (1)	65/113 (58)	85/110 (77)

CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; SXT, cotrimoxazole; IPM, imipenem; F, nitrofurantoin; NOR, norfloxacin; TE, tetracycline

ตารางที่ 9 ยีนก่อโรคและแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพของ UPEC จากโรงพยาบาลวชิระภูเก็ต

Strain	^a Source of sample	Ward	Virulence gene pattern			^b Antibiogram pattern
			<i>pap</i>	<i>afa</i>	<i>hlyA</i>	
PSU90	MU	OPD	+	-	+	TE
PSU91	CU	Medicine	-	+	-	CTX, CAZ, SXT, NOR, TE
PSU92	CU	Medicine	-	+	-	SXT, TE
PSU93	MU	Pediatrics	+	-	+	SXT, TE
PSU94	CU	OPD	+	-	+	^c S
PSU95	MU	Medicine	+	-	-	SXT, TE
PSU96	CU	Medicine	+	-	+	CTX, CAZ, NOR
PSU139	MU	Medicine	-	-	+	CTX, CAZ, NOR, TE
PSU140	CU	Medicine	+	-	+	NOR, TE
PSU141	CU	ER	-	-	+	CTX, CAZ, SXT, IPM, NOR, TE
PSU142	MU	Medicine	-	+	-	CTX, CAZ, SXT, TE
PSU143	CU	Medicine	-	-	+	CTX, CAZ, SXT, NOR, TE
PSU144	MU	Pediatrics	-	-	+	S
PSU145	CU	Pediatrics	-	-	+	SXT, TE
PSU146	CU	Pediatrics	-	+	-	CTX, SXT
PSU147	MU	Medicine	-	+	-	SXT
PSU148	MU	Medicine	+	-	+	CAZ, SXT, TE
PSU149	MU	Medicine	+	-	+	CTX, CAZ, SXT, NOR, TE
PSU150	MU	Pediatrics	+	-	-	SXT
PSU151	MU	Medicine	+	-	+	CTX, CAZ, NOR, TE
PSU152	CU	Surgery	-	+	-	CTX, CAZ, SXT, NOR, TE
PSU153	MU	Medicine	+	-	-	SXT, NOR, TE
PSU154	CU	Pediatrics	+	-	+	CTX, CAZ, TE
PSU155	MU	Medicine	+	-	+	SXT
PSU156	CU	Medicine	-	+	-	CTX, CAZ, SXT, NOR, TE
PSU157	MU	Medicine	-	+	-	SXT, TE
PSU158	MU	Pediatrics	+	-	+	SXT, TE

^aMU, midstream urine; CU, catheter urine. ^bCTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; SXT, cotrimoxazole; IPM, imipenem; F, nitrofurantoin; NOR, norfloxacin; TE, tetracycline. ^cS, ไรต์อียาต้านจุลชีพทั้งหมดที่ทำการทดสอบ



รูปที่ 9 สัดส่วนของเชื้อ UPEC ที่สร้าง ESBL ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ จากโรงพยาบาลภูเก็ต

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ผลการตรวจสอบหาเชื้อ EHEC/STEC จากตัวอย่าง rectal swabs จากผู้ป่วยท้องร่วงในโรงพยาบาลหาดใหญ่ และโรงพยาบาลปัตตานี แสดงให้เห็นว่า ไม่สามารถพบยีนก่อโรค *stx*₁, *stx*₂ และ *eae* ในทุกไอโซเลท และจากข้อมูลการไม่พบยีนก่อโรสดังกล่าว ประกอบกับระยะเวลาในการตรวจสอบเชื้อเป็นระยะเวลานาน 1 ปีครึ่ง แสดงให้เห็นว่า EHEC/STEC อาจไม่ได้เป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคในเขตอำเภอหาดใหญ่และอำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี จากรายงานการตรวจสอบการมีเชื้อ EHEC/STEC ในภูมิภาคอื่นของประเทศไทยนั้น พบว่า Leelaporn และคณะ (2000) ได้มีการตรวจสอบหาเชื้อ STEC ในช่วงปี พ.ศ. 2540 ถึง 2541 ในเขตกรุงเทพมหานคร โดยในการทดลองครั้งนั้น สามารถพบ STEC ซีโรทัยป์ที่ไม่ใช่กลุ่ม O157 ได้จำนวน 4 ไอโซเลท จากผู้ป่วย 2 ราย (มีซีโรทัยป์เป็น O26:H⁻, O111:H⁻, O125:H21 และ O128:H2) ที่น่าแปลกใจคือสามารถตรวจพบ *E. coli* O157 จากเด็กชายอายุ 2 ขวบ ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีอาการท้องร่วง อย่างไรก็ตามการตรวจพบ *E. coli* O157 จากรายงานของ Leelaporn และคณะนั้น ไม่ได้แยกเชื้อจากผู้ที่มีอาการท้องร่วง ดังนั้น ในการศึกษาที่ สามารถแยกเชื้อ *E. coli* O157 ได้จากผู้ป่วยท้องร่วง (PSU120) จึงถือได้ว่าเป็นรายงานครั้งแรก แม้จะไม่มียีน *stx* ก็ตาม

เชื้อ PSU120 นี้ ถึงแม้จะไม่มียีน *stx* และ *eae* แต่พบว่าเชื้อมียีน *escV* ซึ่งเป็นยีนที่เป็นองค์ประกอบของ Type III secretion system (T3SS) ซึ่งเป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญมากอย่างหนึ่ง โดย T3SS นี้ ตั้งอยู่ในส่วนของ Locus of Enterocyte Effacement (LEE) pathogenicity Island ซึ่งเป็นกลุ่มของยีนก่อโรคที่สำคัญที่มีรายงานการพบใน *E. coli* กลุ่ม EHEC และ EPEC อีกทั้งเชื้อสายพันธุ์นี้ เมื่อตรวจสอบข้อมูลกลับไป พบว่าแยกได้มาจากผู้ป่วยเพศชาย อายุ 48 ปี ที่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลหาดใหญ่ ในวันที่ 13 พฤษภาคม พ.ศ. 2556 และจากข้อมูลบ่งชี้ว่า ผู้ป่วยชายที่มีอาการท้องร่วงรายนี้ ตรวจไม่พบเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารชนิดอื่นๆเลย นอกจาก *E. coli* O157 สายพันธุ์นี้ ดังนั้น จึงเชื่อได้ว่า การเกิดภาวะท้องร่วงในผู้ป่วยรายนี้เกิดจาก *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 เป็นสาเหตุ และ *escV* น่าจะมีบทบาทบางส่วนในการก่อโรค

จากข้อมูลก่อนหน้าของ PSU120 ซึ่งไม่พบยีน *stx* จึงได้มีความพยายามตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มียีนชนิดนี้อยู่จริง เนื่องจาก *stx* เป็นยีนของแบคทีเรียโอฟาจที่แทรกเข้าไปในจีโนมของ *E. coli* และ ณ ส่วน upstream ของยีน *stx* จะมีส่วนที่เรียกว่ายีน Q ซึ่งมีกิจกรรมของ late antitermination activity ทำหน้าที่ส่งเสริมให้ RNA polymerase เคลื่อนที่ผ่านจุดสิ้นสุดของกระบวนการ transcription (terminator) ทำให้เกิดการสังเคราะห์ Stx ได้ในปริมาณมาก ดังนั้น

ในการทดลองนี้ ถ้าไม่พบยีน Q ของ stx phages ที่สำคัญ ก็อาจจะสามารถสรุปได้ว่า ไม่มี stx อยู่จริง จากผลการตรวจสอบการมี ยีน Q ไม่พบยีนดังกล่าวใน *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 ซึ่งผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการไม่พบ stx เนื่องจากยีน Q

ใน *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ สามารถมีแบคทีเรียโอฟาจหลายชนิดแทรกอยู่ และการแทรกของแบคทีเรียโอฟาจนั้น เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการวิวัฒนาการของเชื้อ *E. coli* รวมถึงการทวีความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้ออีกด้วย จากผลของการตรวจสอบยีนที่มีรายงานการแทรกของ stx₂ phage พบว่าที่ตำแหน่ง *sbcB* และ *yehV* มี prophage อื่นๆแทรกอยู่ ข้อมูลนี้การพบ prophages อื่นๆแทรกอยู่ในยีนของ *E. coli* PSU120 แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการได้รับ หรือสูญเสีย stx₂ phage ได้ และแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการได้รับแบคทีเรียโอฟาจอื่นๆที่อาจทำให้เชื้อมีความรุนแรงมากขึ้นในอนาคต

จากข้อมูลที่ว่าไม่สามารถตรวจพบ EHEC/STEC ได้เลยในการศึกษาครั้งนี้ มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Kalnauwakul และคณะ (2007) ที่ได้ตรวจสอบหาเชื้อจากผู้ป่วยท้องร่วงที่รับการตรวจในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2542 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2543 จำนวน 530 ตัวอย่าง พบว่า ไม่มีการพบ STEC และ EHEC O157 ในส่วนของการไม่พบ EHEC O157 ในการทดลองครั้งนั้น อาจมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจาก ผู้วิจัยได้มุ่งตรวจสอบโคโลนีที่ไม่มีสีที่ขึ้นบนผิวหน้าของอาหาร sorbitol MacConkey agar และโคโลนีสีม่วงอมชมพู (mauve colony) ที่ขึ้นบนผิวหน้าของอาหาร CHROMagar O157 เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 ที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีลักษณะที่แตกต่างจาก *E. coli* O157 ทั่วไป คือจะให้สีของโคโลนีบนอาหาร sorbitol MacConkey agar เป็นสีชมพู (สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอลได้) และให้สีของโคโลนีบนอาหาร CHROMagar O157 เป็นสีฟ้า ซึ่งผลการทดลองนี้ ตรงกับแนวความคิดของคณะผู้วิจัยที่คาดไว้ในตอนแรกว่า การที่ไม่มีการพบ *E. coli* O157 จากตัวอย่างผู้ป่วยท้องร่วงในประเทศไทยมาก่อนเลย นับตั้งแต่มีการระบาดของเชื้อซีโรทัยป์นี้ครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี พ.ศ. 2525 ส่วนหนึ่งมีความเป็นไปได้ว่า เชื้อ O157 นั้น อาจให้ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร sorbitol MacConkey agar เป็นสีชมพูก็เป็นได้ ซึ่งตลอดมา นักวิจัยจำนวนมากต่างพุ่งเป้าไปที่การตรวจสอบโคโลนีที่จำเพาะสำหรับซีโรทัยป์ O157 จึงทำให้โคโลนีสีชมพูถูกมองข้ามไป จึงเป็นที่มาถึงการศึกษานี้ที่มีการคัดเลือกเชื้อที่จะนำมาทดสอบในการศึกษานี้ครอบคลุมถึง 2 ส่วน คือคัดเลือกเชื้อทั้งในส่วนที่เป็นโคโลนีที่มีสีชมพูและโคโลนีไม่มีสีมาตรวจสอบ

จากรายงานของ Stackebrandt et al. (2002) กำหนดว่าความคล้ายของ DNA ที่ 70% นั้น เป็นที่ยอมรับในการจัดจำแนกระดับ species ในการศึกษานี้ ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 นั้น พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *E. coli* O157 ที่แยกได้จากเนื้อวัวมากถึง

88.6% ซึ่งจัดว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับสูงมาก อย่างไรก็ตาม เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 นั้นไม่มียีน *stx* และ *eae* เลย จากข้อมูลดังกล่าว มีความเป็นไปได้ว่า เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 อาจเคยมี *stx* และ *eae* มาก่อน แต่เมื่อเข้าไปในร่างกายของมนุษย์แล้ว มีปัจจัยบางอย่างทำให้สูญเสียยีนดังกล่าวไป จากการศึกษาของ Bielaszewska และคณะ (2007) ได้แสดงให้เห็นว่า EHEC O26 ที่แยกได้จากอุจจาระของเด็กในครั้งแรกหลังจากเกิดอาการท้องร่วงใหม่ๆ ยังสามารถพบยีน *stx* ได้อยู่ แต่หลังจากนั้นไม่นาน เมื่อเก็บเชื้อจากอุจจาระของเด็กคนเดิมมาตรวจอีกครั้ง กลับพบว่า EHEC O26 นั้น ได้สูญเสียยีน *stx* ไปแล้ว โดยผลของลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากวิธี PFGE แสดงให้เห็นลายพิมพ์ DNA ของเชื้อที่เก็บครั้งแรกและครั้งหลังนั้นมีลายพิมพ์เกือบเหมือนกันทุกประการ ยิ่งไปกว่านั้น จากงานวิจัยของ Mellmann และคณะ (2008) ก็ได้แสดงให้เห็นปรากฏการณ์ที่คล้ายกัน โดยพบปรากฏการณ์การได้รับ และสูญเสียยีน *stx*₂ ในเชื้อ *E. coli* O157:NM (non-motile)

จากข้อมูลก่อนหน้านี้มีรายงานที่แสดงให้เห็นว่า สามารถแยกเชื้อ STEC รวมถึง EHEC O157:H7 ได้เป็นจำนวนมากจากเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะเนื้อวัว (Sukhumungoon et al., 2011a; Sukhumungoon et al., 2011b; Sukhumungoon et al., 2013) และจากข้อมูลของ EHEC/STEC จากผู้ป่วยในสวนที่ 1.7 ที่แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แสดงออกผ่านทางลายพิมพ์ DNA คล้ายกับเชื้อ O157 ที่แยกได้จากเนื้อวัวถึง 88.6% (รูปที่ 8) จึงมีความเป็นไปได้สูงว่า เชื้อที่แยกได้จากมนุษย์นั้น เกิดจากการรับประทานเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไป อย่างไรก็ตาม ในระยะเวลากว่า 1 ปีครั้งที่ได้ตรวจสอบหา EHEC/STEC จากตัวอย่างที่ได้จากมนุษย์นั้น ไม่พบเชื้อที่เป็น EHEC/STEC เลย จึงได้มีความพยายามที่จะสำรวจกลับไปยังแหล่งของเชื้อที่สำคัญอีกครั้ง โดยทำการตรวจสอบในเชิงปริมาณของการปนเปื้อนของ EHEC/STEC ในเนื้อสัตว์ ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานเอาไว้ว่า ถ้ามีการปนเปื้อนของ STEC ในเนื้อสัตว์ในปริมาณที่สูงพอ ก็อาจจะเป็นสาเหตุที่จะเพิ่มโอกาสและปริมาณของเชื้อ เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้มากขึ้น จนสามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ จึงได้ทำการตรวจสอบ หาปริมาณ EHEC/STEC ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ โดยเป็นการตรวจสอบในเบื้องต้น จากผลการตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ EHEC/STEC ในเนื้อสัตว์แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อน EHEC และ STEC ในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายอยู่ในเขตอำเภอหาดใหญ่จริง อย่างไรก็ตาม ปริมาณ STEC ที่ตรวจพบนั้นมีปริมาณต่ำ โดยจากการทดลองพบว่า สามารถตรวจพบ EHEC ได้จากเนื้อไก่เพียง 1 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณเท่ากับ 3 MPN/g และไม่พบ EHEC ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆเลย (ตารางที่ 4) ในส่วนของ STEC นั้น พบมากที่สุดที่เนื้อวัว โดยให้ค่าเท่ากับ 27 MPN/g ส่วนค่าการปนเปื้อนของ STEC ที่พบน้อยที่สุดนั้น เป็นค่าของเนื้อไก่ โดยให้ค่าเท่ากับ 3 MPN/g (ตารางที่ 4) ดังนั้น จากปริมาณการปนเปื้อนของ EHEC/STEC ที่น้อยนี้

อาจสามารถอธิบายการไม่พบผู้ป่วยท้องร่วงที่เกิดจาก EHEC/STEC ได้บางส่วน ความเป็นไปได้อื่น ๆ ที่สามารถอธิบายการไม่พบผู้ป่วยที่เกิดจาก EHEC/STEC ได้มีการรายงานไว้เช่นกัน เช่น ในกรณีของ O157 นั้น ได้มีการตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อซีโรทัยป์นี้แล้วในกลุ่มประชากรไทยถึงประมาณร้อยละ 20 (Vuddhakul et al., 2000) การมีแอนติบอดีในร่างกายของมนุษย์สามารถปกป้องร่างกายจากการติดเชื้อได้

การไม่พบ O157 จากการตรวจตัวอย่างเนื้อสัตว์เป็นระยะเวลานานในการศึกษานี้ เป็นเรื่องที่น่าสนใจ เนื่องจาก *E. coli* O157 เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยและสามารถแยกเชื้อออกมาได้จากเนื้อสัตว์เป็นจำนวนมากจากเขตอำเภอหาดใหญ่ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา อย่างไรก็ตามมีรายงานที่บ่งชี้ถึงปัจจัยที่อาจมีผลต่อการตรวจพบ *E. coli* O157 เช่น จากงานวิจัยของ Kudva และคณะ (1996) นั้น แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อการพบ *E. coli* O157:H7 ในแกะ ยิ่งไปกว่านั้น การระบาดของ *E. coli* O157 ก็อาจมีความเกี่ยวข้องกับฤดูอีกด้วย นอกจากนี้ วิธีการฆ่าหั่นเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้มาตรฐานก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะส่งผลให้เจอเชื้อในเนื้อสัตว์ได้มาก เนื่องจากเชื้อ *E. coli* O157 เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ จำพวกโค กระบือ และสัตว์เคี้ยวเอื้องต่างๆ ดังนั้น ระหว่างการฆ่าหั่น เชื้อสามารถปนเปื้อนจากลำไส้ไปยังส่วนของเนื้อสัตว์ได้

สำหรับเชื้อ UPEC ในการศึกษานี้ พบว่าเชื้อคือตัวยา tetracycline ในอัตราที่มากที่สุดคือ 77% และเชื้อคือยา cotrimoxazole เป็นอันดับที่ 2 เท่ากับ 68% การศึกษานี้ พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาในกรุงดากา ประเทศบังกลาเทศ ที่พบว่ามีการคือ tetracycline ในอัตรา 74-84% (Lina et al., 2007) การอนุญาตให้มีการจ่ายยาปฏิชีวนะจำนวนมากในประเทศกำลังพัฒนาเหล่านี้ อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการคือยาของเชื้อ UPEC ในปริมาณที่สูง เนื่องจากในประเทศที่พัฒนาแล้วอย่างประเทศเนเธอร์แลนด์พบการคือยา cotrimoxazole เพียง 16% เท่านั้น

ยาปฏิชีวนะชนิด nitrofurantoin นั้นปัจจุบันพบว่ายังมีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อ UPEC ได้ดี ในประเทศเนเธอร์แลนด์จากการศึกษาของ den Heijer และคณะ (2010) พบว่าเชื้อที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบบ uncomplicated UTI ยิ่งไวต่อ nitrofurantoin ถึง 100% สอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบว่าเชื้อจากโรงพยาบาลวชิระภูเก็ตเพียงแค่ 1% (1 ไอโซเลท) เท่านั้นที่คือต่อ nitrofurantoin อย่างไรก็ตาม การใช้ nitrofurantoin ในการรักษามีข้อเสียคือมีผลข้างเคียงและต้องให้ยาจำนวน 4 ครั้งต่อวัน (Amabile-Cueras and Arredondo-Garcia, 2011)

สรุปผลการทดลอง

1. จากการตรวจหาเชื้อ EHEC/STEC จากผู้ป่วยท้องร่วงจากโรงพยาบาลหาดใหญ่และโรงพยาบาลปัตตานี เป็นเวลา 18 เดือน ไม่พบเชื้อ EHEC/STEC เลย แสดงให้เห็นว่าเชื้อ EHEC/STEC เป็นเชื้อที่ไม่มีบทบาทในการก่อโรคในเขตดังกล่าว
2. สามารถพบเชื้อ *E. coli* O157 จำนวน 1 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ PSU120 จากผู้ป่วยชายอายุ 48 ปี ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลหาดใหญ่ เชื้อ PSU120 ไม่มียีน *stx* และ *eae* แต่มียีน *escV* ซึ่งคาดว่าเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ก่อให้เกิดอาการท้องร่วงในผู้ป่วยรายนี้ และเชื้อ PSU120 นี้มีการดื้อยาต้านจุลชีพ 4 ชนิดคือ erythromycin, cephalothin, methicillin และ vancomycin
3. เชื้อ PSU120 เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี PFGE พบว่ามีความคล้ายกับกลุ่มของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ PSU2 ที่แยกได้จากเนื้อวัวทางภาคใต้ของไทย และ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศสหรัฐอเมริกา ถึง 88.6% รวมถึงการพบเชื้อสายพันธุ์ PSU120 สามารถเกิดกิจกรรมของการแทรกของแบคทีริโอฟาจได้ (active in phage integration) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อ PSU120 อาจเป็นเชื้อที่เคยมียีน *stx* มาก่อน แต่สูญเสีย *stx* ไปในระหว่างการติดเชื้อในมนุษย์
4. จากการไม่พบ ETEC/STEC จากผู้ป่วย จึงได้ตรวจสอบเชิงปริมาณจากแหล่งเก็บกักเชื้อ (reservoir) คือเนื้อสัตว์โดยเฉพาะเนื้อวัว โดยวิธี MPN-PCR พบว่า มีปริมาณเชื้อ EHEC/STEC ในเนื้อสัตว์ในปริมาณน้อย ซึ่งการพบเชื้อในเนื้อสัตว์ที่น้อยนี้ อาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่สามารถอธิบายการไม่พบ EHEC/STEC ในผู้ป่วยได้
5. เชื้อ UPEC ที่ได้มาจากโรงพยาบาลวชิระภูเก็ตมียีนก่อโรค *pap*, *afa*, และ *hlyA* ในอัตรา 12, 7, และ 14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ
6. เชื้อ UPEC ที่มียีน *pap*, *afa*, และ *hlyA* ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิด (multi-drug resistant strain) โดยมีการดื้อยาสูงสุด 6 ชนิด ยาปฏิชีวนะชนิด tetracycline เป็นชนิดที่เชื้อดื้อมากที่สุด ในอัตราเท่ากับ 77% ส่วน cotrimoxazole เชื้อดื้อรองลงมาเท่ากับ 68% และจากจำนวนเชื้อทั้งหมดในการศึกษานี้ พบว่าเป็น ESBL producer ถึง 54%

บรรณานุกรม

- Amábile-Cueras, C. F. and Arredondo-García, J. L. 2011. Antimicrobial activity data in support of nitrofurantoin three times per day. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 66:1652-1653.
- Bielaszewska M., Clarke I., Karmali M. A. and Petric M. 1997. Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. *Infection and immunity* 65:2509-2516.
- Bielaszewska, M., Prager, R., Kock, R., Mellmann, A., Zhang, W., Tschape, H., Tarr, P.I. and Karch, H. 2007. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 73:3144 –3150.
- Bien, J., Sokolova, O. and Bozko, P. 2012. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International journal of nephrology* 2012:1-15.
- Buchanan, L. B. and Doyle, M. P. 1997. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Science and Technology* 51:69-76.
- Carter, R. S., Siegel, R.J., Chai. A. U. and Fishbein, M. C. 1987. Immunohistochemical localization of apolipoproteins A I and B in human carotid arteries. *The Journal of Pathology and Bacteriolog* 153:31-36.
- Chen, M., Tofighi, R. and Bao, W. 2006. Carbon monoxide prevents apoptosis induced by uropathogenic *Escherichia coli* toxins. *Pediatric nephrology* 21:382-389.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology* 66:4555-4558.
- Conly, J. M. and Stein, K. 1992. The production of menaquinones (vitamin K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. *Progress in food and nutrition science* 16:307–343.

- den Heijer, C. D. J., Donker, G. A., Maes, J. and Stobberingh, E. E. 2010. Antibiotic susceptibility of unselected uropathogenic *Escherichia coli* from female Dutch general practice patients: a comparison of two surveys with a 5 year interval. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 2128-2133.
- Dhakal, B. K., Kulesus, R. R. and Mulvey, M. A. 2008. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *European journal of clinical investigation* 38: 2-11.
- Dundas, S., Andrew Todd, W. T., Stewart, A. I., Murdoch, P. S., Chaudhuri, A. K. R. and Hutchinson, S. J. 2001. The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: Risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases* 33:923-931.
- Feng, P. 2000. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerging Infectious Diseases* 1:1-9.
- Frankel, E. N., Bosanek, C. A., Meyer, A. S., Silliman, K. and Kirk, L. L. 1998. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:834-838.
- Fey, P. D., Wickert, R. S., Rupp, M. E., Safraneck, T. J. and Hinrichs, S. H. 2000. Prevalence of non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stool samples from Nebraska. *Emerging Infectious Diseases* 6:530-533.
- Forbes, A., While, A., Ullman, R., Lewis, S., Mathes, L. and Griffiths, P. 2002. A Multi-Method Review to Identify Components of Practice Which May Promote Continuity in the Transition from Child to Adult Care for Young People with Chronic Illness or Disability, Report for the National Coordinating Centre for NHS Service Delivery and Organisation R&D (NCCSDO), The Florence Nightingale School of Nursing and Midwifery, Kings College, London. from Web site: <http://www.sdo.lshtm.ac.uk/continuityofcare.htm> (accessed 3/3/15)
- Girón, J. A., Jones, T., Millán-Velasco, F., Castro-Muñoz, E., Zárate, L., Fry, J., Frankel, G., Moseley, S. L., Baudry, B., Kaper, J. B., Schoolnik, G. K. and Riley, L. W. 1991. Diffuse-Adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a Putative Cause of Diarrhea in Mayan Children in Mexico. *Journal of Infectious Diseases* 507-513.

- Griffin, P. M. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, In Blaser, M.J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., Greenberg, H. B. and Guerrant, R. L. (eds). Infections of the gastrointestinal tract, p. 739-761. New York: Raven Press, pp. 739-761.
- Hartland, E. L., Batchelor, M., Delahay, R. M., Hale, C., Matthews, S., Dougan, G., Knutton, S., Connerton, I. and Frankel, G. 1999. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 32:151-158.
- Heijer, C. D. J., Donker, G. A. and Maes, J. 2010. Stobberingh EE. Antibiotic susceptibility of unselected uropathogenic *Escherichia coli* from female Dutch general practice patients: a comparison of two surveys with a 5 year interval. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 65: 2128-2133.
- Hunter, S. B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M. A., Duyne, M. S. V., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T. and Ribot, E. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *Journal of Clinical Microbiology* 43:1045-1050.
- Jackson, M. P., Neill, R. J., O'Brien, A. D., Holmes, R. K., and Newland, J. W. 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiology Letters* 44:109-114.
- Jakobsson, B., Berg, U. and Svensson, L. 1994. Renal scarring after acute pyelonephritis. *Archives of disease in childhood* 70: 111-115.
- Johnson, J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical microbiology reviews* 4: 80-128.
- Jonas, D., Schultheis, B., Klas, C., Krammer, P. H. and Bhakdi, S. 1993. Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. *Infection and immunity* 61:1715-1721.
- Jouini, A., Vinué, L., BenSlama, K., Saenz, Y., Klibi, N., Hammami, S., Boudabous, A. and Torres, C. 2007. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum

- beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60:1137–1141.
- Kalnauwakul, S., Phengmak, M., Kongmuang, U., Nakaguchi, Y. and Nishibuchi, M. 2007. Examination of diarrheal stools in Hat yai city, southern Thailand, for *Escherichia coli* O157 and other diarrheagenic *Escherichia coli* using immunomagnetic separation and PCR method. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 38: 871-880.
- Karmali, M. A., Steele, B. T., Petric, M. and Lim, C. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1:619-620.
- Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K. and Eurwilaichitr, L. 2004. Diversity and abundance of Bacteria and Archaea in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand. *Journal of Basic Microbiology* 44:430–444.
- Kassenborg, H. D., Hedberg, C. W., Hoekstra, M., Evans, M. C., Chin, A. E. and Marcus, R., 2004. Farm visits and under-cooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 Foodnet sites. *Clinical Infectious Diseases* 38:271–278.
- Koch, C., Hertwig, S. and Apple, B. 2003. Nucleotide sequence of the integration site of the temperate bacteriophage 6220, which carries the Shiga toxin gene *stx*_{10x3}. *Journal of Bacteriology* 185:6463-6466.
- Koitabashi, T., Cui, S., Kamruzzaman, M. and Nishibuchi, M. 2008. Isolation and characterization of the Shiga toxin gene (*stx*)-bearing *Escherichia coli* O157 and non-O157 from retail meats in Shandong Province, China, and characterization of the O157-derived *stx*₂ phages. *Journal of food protection* 71:706-713.
- Koitabashi, T., Vuddhakul, V., Radu, S., Morigaki, T., Asai, N., Nakaguchi, Y. and Nishibuchi, M. 2006. Genetic characterization of *Escherichia coli* O157:H7/- strains carrying the *stx*₂ gene but not producing Shiga toxin 2. *Microbiology and Immunology* 50: 135-148.

- Kudva, I.T., Hatfield, P.G. and Hovde, C.J. 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 431–433.
- Le Bouguéneq, C., Adhesins and invasions of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 471-478.
- Le Bouguéneq, C., Archambaud, M. and Labigne, A. 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1189–1193.
- Leelaporn, A., Phengmak, M., Eampoklap, B., Manatsathit, S., Tritilanunt, S., Siritantikorn, S., Nagayama, K., Iida, T., Niyasom, C. and Komolpit, P. 2003. Shiga toxin-and enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from subjects with bloody and nonbloody diarrhea in Bangkok, Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 46: 173-180.
- Leffer, H. and Svanborg-Eden, C. 1981. Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. *Infection and immunity* 34: 920-929.
- LeJeune, J.T., Besser, T.E, and Rice, D.H. 2004. Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: predominance and persistence of specific clonal types despite massive cattle population turnover. *Applied and Environmental Microbiology* 70:377–384.
- Lejeune, J.T., Hancock, D., Wasteson, Y., Skjerve, E. and Urdahl, A.M. 2006. Comparison of *Escherichiacoli* O157 and Shiga toxin-encoding genes (*stx*) prevalence between Ohio, USA and Norwegian dairy cattle. *International Journal of Food Microbiology* 109:19–24.
- Lina, T.T., Rahman, S.R. and Gomes, D.J. 2007. Multiple-antibiotic resistance mediated by plasmids and integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Bangladesh Journal of Microbiology* 24: 19-23.
- Liu, H.Y., Lin, H.C., Lin, Y.C., Yu, S.H., Wu, W.H. and Lee, Y.J. 2011. Antimicrobial susceptibilities of urinary extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* to fosfomycin and nitrofurantoin in

- a teaching hospital in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 44:364-368.
- McDaniel, K.T. and Kaper, J.B. 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Molecular Microbiology* 23: 399–407.
- Maurer, J.J., Schmidt, D., Petrosko, P., Sanchez, S., Bolton, L. and Lee, M.D. 1999. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2954-2960.
- Mellmann, A., Lu, S., Karch, H., Xu, J.G., Harmsen, D., Schmidt, M.A. and Bielaszewska, M. 2008. Recycling of Shiga toxin 2 genes in sorbitol fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Applied and Environmental Microbiology* 74:67–72.
- Mohajeri, P., Darfarin, G. and Farahani, A. 2014. Genotyping of ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli* in west of Iran. *International journal of microbiology* 2014:1-6.
- Nataro, J.P. and Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review* 11:142-201.
- Neisser, M. and Shiga, K. 1903. Ueber freie receptoren von typhus- und dysenteriebazillen und über das dysenterietoxin. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 29:61–62.
- Ohnishi, Y., Seo, J.W. and Horinouchi, S. 2002. Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Letters* 216:1–7.
- Paton, J.C. and Paton, A.W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 11:450–479.
- Plos, K., Connell, H. and Jodal, U. 1995. Intestinal carriage of P fimbriated *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. *The Journal of infectious diseases* 171: 625-631.
- Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M. and Swerdlow, D.L. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases* 11: 603–609.

- Russo, T.A., Davidson, B.A. and Genagon, S.A. 2005. *E. coli* virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis in vitro and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 289: 207-216.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kampfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. 2002. Report on the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1043-1047.
- Sukhumungoon, P. and Nakaguchi, Y. 2013. Shiga toxin 2-converting bacteriophages occupy *sbcB* gene as a primary integration site in bovine-originated *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from Thailand. *Life Science Journal* 10: 2334-2340.
- Sukhumungoon, P., Nakaguchi, Y., Ingviya, N., Pradutkanchana, J., Iwade, Y., Seto, K., Son, R., Nishibuchi, M. and Vuddhakul, V. 2011. Investigation of *stx*₂⁺ *eae*⁺ *Escherichia coli* O157: H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. *International Food Research Journal* 18: 381-386.
- Sukhumungoon, P., Mittraparp-arthorn, P., Pomwised, R., Charenjiratrakul, W. and Vuddhakul, V. 2011. High concentration of Shiga toxin 1-producing *Escherichia coli* isolated from southern Thailand. *International Food Research Journal* 18: 683-688.
- Takeda, Y., Asou, H., Murakami, Y., Miura, M., Kobayashi, M. and Uyemura, K. 1996. A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue specific expression and functional analysis. *Journal of Neurochemistry* 66:2338 –2349.
- Tauxe, R.V., Cavanagh, T.R. and Cohen, M.L. 1989. Interspecies gene transfer in vivo producing an outbreak of multiply resistant shigellosis. *Journal of Infectious Diseases* 160:1067–1070.
- The Center for Food Security & Public Health. 2009. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. Retrieved November 15, 2010 from Web site: www.cfsph.iastate.edu. (accessed 10/3/15)

- Tilden, J., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J. and Morris, J.G. 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *American Journal of Public Health* 86:1142–1145.
- Vaisanen, V., Elo, J. and Tallgren, L.G. 1981. Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of *Escherichia coli* causing primary pyelonephritis. *The Lancet* 318:1366-1369.
- Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Laohaprerthisan, V., Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., Ishibashi, M., Matsumoto, C. and Nishibuchi, M. 2000. Isolation of pandemic O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* strain from environment and clinical sources in Thailand. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2685–2689.
- Zhang, X., McDaniel, A.D., Woy, L.E., Keusch, G.T., Waldor, M.K., and Acheson, D.W. 2000. Quinolone antibiotics induce shiga toxin encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 182: 664-70.

FIRST REPORT IN THAILAND OF A *STX*-NEGATIVE *ESCHERICHIA COLI* O157 STRAIN FROM A PATIENT WITH DIARRHEA

Monchanok Themphachana¹, Yoshitsugu Nakaguchi², Mitsuaki Nishibuchi², Kazuko Seto³, Pattamarat Rattanachuay⁴, Kamonnut Singkhamanan⁵ and Pharanai Sukhumungoon¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand; ²Center for Southeast Asian Studies, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan; ³Division of Bacteriology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka, Japan; ⁴Department of Pre-clinic, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani campus, Thailand; ⁵Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand

Abstract. *E. coli* serotype O157 is well known to cause serious illnesses in humans. However, there has been no case report to date of this serotype in Thailand. In this study, we report for the first time *E. coli* O157 (designated as PSU120) isolated from a stool sample among 228 diarrheal swab samples at Hat Yai Hospital, Songkhla Province, Thailand. This PSU120 was identified as being *stx*-negative and lacked *eae* but carried *escV*, a marker for the locus of enterocyte effacement. Of the five reported integration sites frequently occupied by *stx* phages, the *sbcB* and *yehV* loci were occupied, suggesting that PSU120 is active in horizontal genetic transfer. Antimicrobial susceptibility assay revealed that *E. coli* O157 strain PSU120 was resistant to cephalothin, erythromycin, methicillin and vancomycin. Using pulsed-field gel-electrophoresis to compare the genetic relatedness of *E. coli* O157 strain PSU120 to two other *E. coli* O157 strains, namely, the well-established EHEC strain EDL933 and PSU2, a surrogate of *E. coli* O157:H7 whose genotype *stx*₁⁻, *stx*₂⁺, *eae*⁺ is frequently obtained from the environment in this area during the last decade, revealed 88.6% in similarity. We suggest that PSU120 was originally *stx*⁺ but lost the gene after establishing infection.

Keywords: *Escherichia coli* O157, diarrhea, Shiga toxin, Thailand

INTRODUCTION

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is a food-borne pathogen, which is frequently associated with food poisoning

Correspondence: Pharanai Sukhumungoon, Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

Tel: +66 (0) 74 288322; Fax: +66 (0) 74 446661

E-mail: pharanai82@gmail.com

outbreaks in several countries around the world (Michino *et al*, 1999; Dundas *et al*, 2001; Rangel *et al*, 2005). More than 40 serotypes of STEC have been reported to be involved with severe forms of the disease in humans (Paton and Paton, 1996), including hemorrhagic colitis (HC) (Riley *et al*, 1983) and hemolytic uremic syndrome (HUS) (Karmali *et al*, 1983).

STEC is capable of producing Shiga toxin 1 (Stx1), Shiga toxin 2 (Stx2) or

both. Stx is the principal virulence factor in STEC. It is internalized into eukaryotic cells by binding to a cellular receptor globotriaosylceramide (Gb3) (de Sablet *et al*, 2008) and once Stx is present in the cytoplasm, it exerts the elimination of an adenine residue from 28S ribosomal RNA, resulting in inhibition of cytoplasmic proteins biosynthesis and cell death (Nataro and Kaper, 1998). The most important STEC serotype causing outbreaks worldwide is O157:H7. Typical EHEC O157:H7 carries one of the *stx* genes (*stx*₁ and *stx*₂) or both genes and *eae* (encoding intimin which influences the establishment of bacterial adherence to the intestinal epithelial cells) (Gannon *et al*, 1993). Besides the antigenic determinants in the bacterial cell wall, the somatic O-antigen, *E. coli* also possesses flagella which are associated with the bacterial movement. Flagella organelle is constituted by flagella proteins which carry the antigenic determinants for the H-antigens and are used to be one of *E. coli* epidemiological data. To date, at least 53 H-antigen types in *E. coli* have been documented (Wang *et al*, 2000) and with the epidemiological data of *E. coli* O157, H7 antigen was the most frequently observed to be accompanied with the somatic O157 antigen.

It has been demonstrated that the genes coding for Stxs are found in lysogenic lambdoid bacteriophages (Schmidt, 2001). In *stx*₂ phage genome, *stx*₂ gene is located downstream of *Q* gene which codes for *Q* protein responsible for the late antitermination activity. Strong antitermination activity is demonstrated by the possession of *Q*₉₃₃ type, contributing to the large amount of Stx production while the possession of *Q*₂₁ leads to the weak antitermination activity and low amount of Stx (LeJeune *et al*, 2004; Koitabashi *et al*, 2006). Thus, the presence of *Q*₉₃₃ type is

able to use as a virulence marker in *E. coli* O157:H7 (LeJeune *et al*, 2004).

Infection by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 was first reported in 1982 in the United States (Karmali *et al*, 1983; Riley *et al*, 1983). Many types of food have been described as being etiologic agents of *E. coli* O157:H7 infection, including ground beef, raw milk, unpasteurized apple cider, and salad, which lead to sporadic cases and outbreaks (Michino *et al*, 1999; Hilborn *et al*, 2000; Dundas *et al*, 2001; Jay *et al*, 2004; Guh *et al*, 2010; Xiong *et al*, 2012). However, infection by this pathogen has rarely been reported from developing countries.

We report, for the first time, the isolation of *E. coli* O157 strain from stool of a diarrheal patient in southern Thailand and the investigation of its principal virulence genes including other important characteristics, as well as its genomic properties by pulsed-field gel-electrophoresis.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

A total of 560 *E. coli* isolates from 228 diarrheal rectal swabs were collected from patients admitted to Hat Yai Hospital, Songkhla Province and Pattani Hospital, Pattani Province, Thailand from October 2012 to September 2013. Swabs were inoculated on Sorbitol MacConkey agar to obtain isolated colonies. Both sorbitol fermenters (SF) and sorbitol-non-fermenters (SNF) were selected and kept stock at -80°C for further investigations. Further characterization of the positive isolate on the extra differential medium, CHROMagar O157 (CHROMagar, Paris, France) was carried out. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Prince of Songkla

University, Thailand (EC code 56-225-19-2-3).

Detection of virulence genes

The principal virulence genes, *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *escV* [marker for type III secretion system (T3SS) located in the locus of enterocyte effacement, LEE], and *hlyA* were investigated by PCR using oligonucleotide primers (Table 1). In brief, PCR amplification was performed in a 25 µl reaction mixture consisting of 0.08 mM dNTPs, 0.4 µM each primer pair, 3.0 mM MgCl₂, 0.5 U GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI), 1X GoTaq green buffer and 2.0 µl of DNA template. Thermal cycling (conducted using T100™ Thermal cycler, Bio-Rad, Hercules, CA) consisted of a pre-heat step at 95°C for 3 minutes followed by 35 cycles of 94°C for 1 minute, annealing temperature for each primer pair (Table 1) for 1 minute, and 72°C for 1 minute. The amplicons were separated by 1.0% agarose gel-electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized using UV-transilluminator system (Syngene, Los Altos, LA).

Serotyping of *E. coli* O157 strain

E. coli O157 genotyping was performed by PCR using O157-F and O157-R oligonucleotide primers (Table 1) (Maurer *et al*, 1999). PCR amplification was performed in a 25 µl reaction mixture and analyzed as described above. This was confirmed by agglutination assay using anti-O157 antibody (Denka Seiken, Tokyo, Japan). The presence of *fliCH7* was investigated by PCR as described above using the oligonucleotide primers shown in Table 1.

Investigation of *Q*₉₃₃ and *Q*₂₁

PCR amplification of *Q*₉₃₃ and *Q*₂₁ were performed using oligonucleotide primer pair qEf-1/qEr-2, and qDf-1/qDr-2, respectively (Koitabashi *et al*, 2006). *E.*

coli O157:H7 strain EDL933 (O'Brien *et al*, 1983) and *E. coli* O157:H7 strain Thai-12 (Vuddhakul *et al*, 2000), were used as the positive controls for detecting *Q*₉₃₃ and *Q*₂₁, respectively. The amplification was carried out in a total volume of 20 µl, composed of 0.1 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 µM each primer pair, 1X GoTaq DNA polymerase buffer, and 0.5 U GoTaq DNA polymerase. Thermal cycling conditions were as follows: 95°C for 2 minutes; 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for *Q*₉₃₃ or 51°C for *Q*₂₁, for 30 seconds, and 72°C for 2 minutes; and a final step of 72°C for 5 minutes and standing at 10°C. Amplicons were analyzed as described above.

PCR amplification of insertion locus

PCR was performed for amplification of each insertion locus using specific primers (Table 1). In brief, a single colony of each strain was grown in 3 ml of Luria-Bertani (LB) broth (Difco, Sparks, MD) for 18 hours at 37°C with shaking. One ml aliquot of culture was boiled for 10 minutes and immediately immersed on ice for 5 minutes prior to centrifugation at 11,000g for 5 minutes. The supernatant was used as DNA template in subsequent PCR. This was performed using GoTaq Flexi system (Promega, Madison, WI). The amplicons were analyzed as described above. If the PCR exhibited no amplicon, it was attributed to an insertion of a prophage, resulting in a fragment too large to be amplified by PCR approach (Mellmann *et al*, 2008).

Antimicrobial susceptibility test

E. coli O157 was determined for antimicrobial susceptibility by a disk diffusion method (CLSI, 2013). Eleven antimicrobial agents (Oxoid, Hamshire, UK) were used: ampicillin (10 µg), ceftazidime (30 µg), cephalothin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), methicillin

Table 1
Oligonucleotides used in the study.

Primer	Sequence (5' to 3')	Gene	Annealing temperature	Amplicon size (bp)	Reference
EVT-1	CAAACTGGATGATCTCAG	<i>stx</i> ₁	55	350	Sukhumungoon <i>et al</i> , 2011
EVT-2	CCCCCTCAACTGCTAATA				
EVS-1	ATCAGTCGTCCTACTGGT	<i>stx</i> ₂	50	404	Sukhumungoon <i>et al</i> , 2011
EVS-2	CCAGTTATCTGACATTCTG				
AE-19	CAGGTCGTCGTCTGCTAAA	<i>eae</i>	55	1,087	Gannon <i>et al</i> , 1993
AE-20	TCAGCGTGGTTGGATCAACCT				
O157-F	CGTGATGATGTTGAGTTG	<i>rfbO157</i>	50	400	Maurer <i>et al</i> , 1999
O157-R	AGATTGGTTGGCATTACTG				
FlicH7-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	<i>fliCH7</i>	57	625	Gannon <i>et al</i> , 1997
FlicH7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC				
escV-F	GGCTCTCTTCTTTATGGCTG	<i>escV</i>	45	534	Müller <i>et al</i> , 2006
escV-R	CCTTTTACAAACTTCATCGCC				
hlyA-F	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	<i>hlyA</i>	55	1,177	Yamamoto <i>et al</i> , 1995
hlyA-R	ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA				
QEf-1	ATGCGGATCCACACTGGCGATAAAGAAGGG	<i>Q</i> ₉₃₃	55	567	Koitaishi <i>et al</i> , 2006
QEr-2	ATGCGGATCCTCGACTGCGTGGAATGTAA				
QDf-1	ATGCGGATCCAAATCTCACATTGATTGAGG	<i>Q</i> ₂₁	51	561	Koitaishi <i>et al</i> , 2006
QDr-2	ATGCGGATCCATAGTGTGCTCATTGCTC				
Z2577-F	AACCCCATTTGATGCTCAGGCTC	<i>Z2577</i>	53	909	Koch <i>et al</i> , 2003
Z2577-R	TTCCCATTTTACACTTCTCTCCG				
<i>sbcB1</i>	CATGATCTGTTGCCACTCG	<i>sbcB</i>	50	1,800	Ohnishi <i>et al</i> , 2002
<i>sbcB2</i>	AGGTCTGTCCGTTTCCACTC				
EC10	GCCAGCGCCGAGCAGCACAAATA	<i>yecE</i>	60	400	DeGreve <i>et al</i> , 2002
EC11	GGCAGGCAGTTGCAGCCAGTAT				
<i>wrbA1</i>	ATGGCTAAAGTCTGGTG	<i>wrbA</i>	47	600	Toth <i>et al</i> , 2003
<i>wrbA2</i>	CTCCTGTGAAGATTAGC				
Primer A	AAGTGGCGTTGCTTTGTGAT	<i>yehV</i>	50	340	Shaikh and Tarr, 2003
Primer B	AACAGATGTGTGGTGTGCTG				

(5 µg), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg), and vancomycin (30 µg). Vancomycin susceptibility was judged by the criterion of CLSI (2007). Clear zone was measured using a Vernier caliper. *E. coli* ATCC 25922 was used as a control microorganism.

Pulsed-field gel electrophoresis

E. coli O157 genome was digested with FastDigest *Xba*I restriction endonuclease (Thermo Scientific, Rockford, IL) at 37°C for 1 hour. The DNA fragments were

separated by 1.0% agarose gel-electrophoresis in 0.5X TBE buffer using CHEF DR III system (Bio-rad, Hercules, CA) at 14°C. Electrophoresis was performed at 6 V/cm, field angle 120°. The initial and final switch time was 2.2 and 54.2 seconds, respectively. Overall run time was 19 hours. After electrophoresis, the gel was stained with ethidium bromide and recorded. The 48.5 kb Lambda phage was used as a molecular size standard marker. Dendrogram was constructed using unweighted

Table 2
 Characteristics of *E. coli* O157 strain PSU120.

Source of sample	Virulence gene				O157/non-O157	Q ₉₃₃ /Q ₂₁	Insertion site occupied	Antibiogram pattern
	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i>	<i>escV</i> / <i>hlyA</i>				
48 year-old male	-	-	-	+ / -	+ / -	- / -	<i>sbcB</i> , <i>yehV</i>	E, KF, MET, Va

E, erythromycin; KF, cephalothin; MET, methicillin; Va, vancomycin.

pair-group method of arithmetic average (UPGMA) (BioNumerics software version 7.0, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

RESULTS

Five hundred sixty *E. coli* isolates were obtained including SF and SNF, from stool swabs of 228 diarrheal patients who visited Hat Yai Hospital, Songkhla Province, South Thailand. One isolate (designated PSU120) was found to be *E. coli* O157 and the investigation of *fliCH7* showed that PSU120 carried H-antigen other than H7 type. PSU120 was isolated from a 48 year-old man on 17 May 2013, and no other enteric pathogen was detected by standard examinations from the diarrheal sample of this patient, indicating the diarrhea resulted from infection solely by PSU120. PSU120 was a SF isolate and formed a blue colony on CHRO-MagarO157 which reflected an atypical characteristic. The isolate lacked *stx*₁, *stx*₂, *eae* and *hlyA* and was negative also for the presence of Q₉₃₃ and Q₂₁, antiterminators of *stx* phages, probably supporting the absence of the *stx* genes (Table 2). A marker for T3SS, *escV*, located in the LEE was determined and displayed the presence of this gene. Of the 11 antimicrobial agents tested, PSU120 strain was resistant to cephalothin, erythromycin, methicillin and vancomycin (Table 2). Five *E. coli* O157 genetic loci which have frequently been reported to be integrated by *stx*-phages, were examined for the observation of *stx*-phage occupancy. The results demonstrated that *sbcB* and *yehV* were found to be occupied by prophages while *yecE*, *wrbA*, and Z2577 were not (Table 2).

Comparison of genetic relatedness among clinical, *E. coli* O157:H7 strain EDL933 and PSU120, and environmental

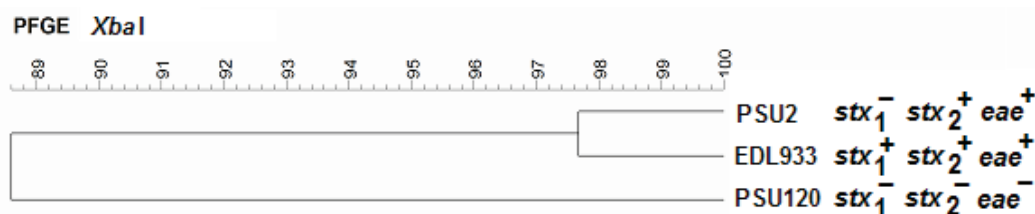


Fig 1—Pulsed-field gel-electrophoresis -based dendrogram of *E. coli* O157 isolated from clinical and environmental samples in southern Thailand. Genomes of *E. coli* O157 strains were digested with *Xba*I and separated as described in Materials and Methods. The hierarchical clustering was constructed using unweighted pair-group method of arithmetic average (UPGMA) and BioNumerics software version 7.0 (Applied Maths, Belgium).

O157:H7 strain PSU2 by pulsed-field gel-electrophoresis was performed. Dendrogram constructed based upon the unweighted pair-group method of arithmetic average using BioNumerics software version 7.0 revealed that the environmental *E. coli* O157:H7 strain PSU2 and EHEC strain EDL933 showed similar DNA fingerprints with their similarities being 97.6% by a pulsed-field gel-electrophoretic analysis (Fig 1). These strains and PSU120 relatively displayed the closely relatedness (88.6% similarity). Thus, it was suggested the high degree of similarity among these O157 strains.

DISCUSSION

Despite that *E. coli* O157:H7 strain PSU120 was the sole possible enteric pathogen of the diarrheal patient, the absence of the principal virulence determinants, *stx*₁ and *stx*₂, makes understanding of the role of PSU120 difficult. Prevalence of *stx*⁺ *E. coli* O157 in marketed beef in the study area (Vuddhakul *et al*, 2000; Sukhumungoon *et al*, 2011) and a similar example in the United States suggesting such strains may be descended from EHEC O157 by the loss of the *stx* gene during infection (Mellmann *et al*, 2008). *E. coli* O157:H7 strain PSU2 with *stx*₁⁻*stx*₂⁺*eae*⁺

genotype represents the most frequently found environmental *E. coli* O157 strains isolated in this area for a decade and the well-established EHEC strain EDL933 (*stx*₁⁺*stx*₂⁺*eae*⁺) showed 97.6% similarity in DNA profiles based on pulsed-field gel-electrophoresis. These strains and PSU120 displayed the closely relatedness (88.6% similarity) (Fig 1). In addition, in PSU120, *sbcB* and *yehV* were found to be occupied by prophages, while *yecE*, *wrbA*, and Z2577 were not, suggesting PSU120 is capable of horizontal genetic transfer. Thus, we are tempted to speculate PSU120 was originally *stx*⁺ but lost the gene after establishing infection.

Vancomycin resistance in *E. coli* has not been reported frequently. However, *E. coli* O157 isolates collected from 200 children in Baghdad, Iraq, were shown to be resistant to vancomycin as well as erythromycin and polymyxin B (Shebib *et al*, 2003). Osaili *et al* (2013) detected 40 O157:H7 isolates which were resistant to vancomycin from slaughtered cattle in Amman City, Jordan, with MIC more than 512 µg/ml. Dissemination of vancomycin resistance can be occurred through horizontal gene transfer. In enterococci, the most common resistance genotype is *vanA*, which is harbored by the transpos-

able element, Tn1546, allowing the spread of vancomycin resistance to other bacteria through integration of Tn1546-containing *vanA* into conjugative plasmid (Woodford, 2001).

The very infrequent infection by *E. coli* O157 is probably related to strong acquired immunity to the O157 antigen, for which cross-reacting antigen in other bacterial species in the environment are known (Vuddhakul *et al*, 2000; Voravuthikunchai *et al*, 2005). In one study carried out in the central part of Thailand in 1997 and 1998, an *E. coli* O157:H7 strain harboring *stx*₁ and *stx*_{2v} was isolated from a stool specimen obtained from a healthy two-year old child and exhibited no toxicity to Vero cells (Leelaporn *et al*, 2003). A large number of diarrheal specimens were investigated by standard method and by immunomagnetic beads specific to O157 antigen in southern Thailand, but EHEC O157 was not detected (Kalnauwakul *et al*, 2007). To further examine the hypothesis that there is no patient infected by EHEC O157 in Thailand, the study was carried out in southern Thailand. It is generally presumed that there is more possibility of isolating EHEC O157 from clinical specimens in northern than southern Thailand because people in northern Thailand consume traditional foods containing raw meat (beef or buffalo), whereas the people in southern Thailand are mostly Muslims who thoroughly cook meat (beef and goat). Nevertheless, *E. coli* O157 carrying *stx* and *eae* are present at high frequencies in beef sold in markets in southern Thailand (Vuddhakul *et al*, 2000; Sukhumungoon *et al*, 2011). It is not surprising that we reported here for the first time the isolation of an *E. coli* O157 strain from stool of a patient with diarrhea admitted to a hospital in Thailand. Although the isolate was *stx*-negative, it carried im-

portant pathogenicity marker gene, the *escV* gene, a marker for Type III secretion system. At any rate, we concluded that this is the first report on human infection by *E. coli* O157 in Thailand.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by a grant from Prince of Songkla University. MT is a recipient of Prince of Songkla University scholarship grant No. SCI560349S. We thank Prof Varaporn Vuddhakul for kindly providing *E. coli* O157:H7 strain Thai-12 and anti-O157 antibody.

REFERENCES

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement M100-S17. Wayne: CLSI, 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement M100-S23. Wayne: CLSI, 2013.
- DeGreve H, Qizhi C, Deboeck F, Hernalsteens JP. The Shiga toxin VT2-encoding bacteriophage varphi297 integrates at a distinct position in the *Escherichia coli* genome. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1579: 196-202.
- de Sablet T, Bertin Y, Vareille M, *et al*. Differential expression of *stx*₂ variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. *Microbiology* 2008; 154: 176-86.
- Dundas S, Andrew Todd WT, Steward AI, Murdoch PS, Chaudhuri AKR, Hutchinson SJ. The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 923-31.
- Gannon VPJ, Rashed M, King RK, Thomas EJJ. Detection and characterization of

- the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1268-74.
- Gannon VPJ, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagella H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 656-62.
- Guh A, Phan Q, Nelson R, *et al.* Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with raw milk, Connecticut, 2008. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 1411-7.
- Hilborn ED, Mshar PA, Fiorentino TR, *et al.* An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiol Infect* 2000; 124: 31-6.
- Jay MT, Garrett V, Mohle-Boetani JC, *et al.* A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of beef tacos at a fast-food restaurant chain. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1-7.
- Kalnauwakul S, Phengmak M, Kongmuang U, *et al.* Examination of diarrheal stools in Hat Yai city, south Thailand, for *Escherichia coli* O157 and other diarrheagenic *Escherichia coli* using immunomagnetic separation and PCR method. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38: 871-80.
- Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983; 1: 619-20.
- Koch C, Hertwig S, Appel B. Nucleotide sequence of the integration site of the temperate bacteriophage 6220, which carries the Shiga toxin gene *stx* (1ox3). *J Bacteriol* 2003; 185: 6463-6.
- Koitaishi T, Vuddhakul V, Radu S, *et al.* Genetic characterization of *Escherichia coli* O157:H7/- strains carrying the *stx*₂ gene but not producing Shiga toxin 2. *Microbiol Immunol* 2006; 50: 135-48.
- Leelaporn A, Phengmak M, Eampoklap B, *et al.* Shiga toxin-and enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from subjects with bloody and nonbloody diarrhea in Bangkok, Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 173-80.
- LeJeune JT, Abedon ST, Takemura K, Christie NP, Sreevatsan S. Human *Escherichia coli* O157:H7 genetic marker in isolates of bovine origin. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1482-5.
- Maurer JJ, Schmidt D, Petrosko P, Sanchez S, Bolton L, Lee MD. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 2954-60.
- Mellmann A, Lu S, Karch H, *et al.* Recycling of Shiga toxin 2 gene in sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 67-72.
- Michino H, Araki K, Minami S, *et al.* Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai city, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 787-96.
- Müller D, Hagedorn P, Brast S, *et al.* Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2626-9.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201.
- O'Brien AD, Lively TA, Chang TW, Gorbach SL. Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. *Lancet* 1983; ii: 573.
- Ohnishi M, Terajima J, Kurokawa K, *et al.* Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *PNAS* 2002; 99: 17043-8.
- Osaili TM, Alaboudi AR, Rahahlah M. Preva-

- lence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 on beef cattle slaughtered in Amman abattoir. *Meat Sci* 2013; 93: 463-8.
- Paton JC, Paton AW. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxinII-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 463-5.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 603-9.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983; 308: 681-5.
- Schmidt H. Shiga toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol* 2001; 152: 687-95.
- Shaikh N, Tarr PI. *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin- encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J Bacteriol* 2003; 185: 3596-605.
- Shebib ZA, Abdul Ghani ZG, Mahdi LKh. First report of *Escherichia coli* O157 among Iraqi children. *East Mediterr Health J* 2003; 9: 159-66.
- Sukhumungoon P, Nakaguchi Y, Ingviya N, et al. Investigation of *stx*₂⁺ *eae*⁺ *Escherichia coli* O157: H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. *Int Food Res J* 2011; 18: 381-6.
- Toth I, Schmidt H, Dow M, Malik A, Oswald E, Nagy B. Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 7242-7.
- Voravuthikunchai SP, Chaowana C, Perepat P, Iida T, Honda T. Antibodies among healthy population of developing countries against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Health Popul Nutr* 2005; 23: 305-10.
- Vuddhakul V, Patararungrong N, Pungrasamee P, et al. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157 from retail beef and bovine feces in Thailand. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 182: 343-7.
- Wang L, Rothmund D, Curd H, Reeves PR. Sequence diversity of the *Escherichia coli* H7 *fliC* genes: Implication for a DNA-based typing scheme for *E. coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1786-90.
- Woodford N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microb Drug Resist* 2001; 7: 229-36.
- Xiong Y, Wang P, Lan R, et al. A novel *Escherichia coli* O157:H7 clone causing a major hemolytic uremic syndrome outbreak in China. *PLoS ONE* 2012; 7: 1-10.
- Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 12: 85-90.

VIRULENCE CHARACTERISTICS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF UROPATHOGENS FROM PATIENTS ON PHUKET ISLAND, THAILAND

Monchanok Themphachana¹, Saowapak Kanobthammakul², Yoshitsugu Nakaguchi^{3,4}, Kamonnut Singkhamanan⁵, Patcharin Yadrak² and Pharanai Sukhumungoon¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Science, ⁵Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai; ²Department of Pathology, Microbiology Unit, Vachira Phuket Hospital, Phuket, Thailand; ³Department of Food Science, Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University, Nonoichi, Ishikawa; ⁴Center for Southeast Asian Studies, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

Abstract. Urinary tract infection (UTI) is among the most common infections in human. *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are common uropathogens found to cause UTI. In this study, 113 *E. coli* and 52 *K. pneumoniae* isolates were collected from three hospitals on Phuket Island, Thailand. The majority of *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates were from elderly females. Antimicrobial susceptibility testing demonstrated that most of *E. coli* isolates (77%) were resistant to tetracycline while cotrimoxazole was ranked second (65%) and nitrofurantoin was the least resistant (1%). *K. pneumoniae* isolates were also most resistant to tetracycline and cefotaxime (65%). The presence of extended spectrum-beta lactamase (ESBL) producers among *E. coli* isolates were 46% and 57% in *K. pneumoniae*. Twenty-seven *E. coli* isolates carried at least one of the common urovirulence genes (*pap*, *afa*, *hlyA*), the majority isolated from patients in the internal medicine ward. One rare *K. ozaenae* was isolated from a 45 year-old catheterized male patient from the orthopedics surgery ward. This isolate demonstrated resistance to all antimicrobial agents tested except imipenem. This study is the first of such kind conducted in southern Thailand and should be useful in treating UTI patients in this area of Thailand.

Keywords: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, ESBL, uropathogen

Correspondence: Pharanai Sukhumungoon, Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

Tel: +66 (0) 74 288322; Fax: +66 (0) 74 446661

E-mail: pharanai82@gmail.com

Patcharin Yadrak, Department of Pathology, Microbiology Unit, Vachira Phuket Hospital, Phuket 83000, Thailand.

Tel: (66) 76 361234; Fax: (66) 76 361233

E-mail: kavunsen@gmail.com

INTRODUCTION

Escherichia coli is a normal microbiota in the intestinal tract of humans and animals (Bien *et al*, 2012). Generally, *E. coli* forms a mutual beneficial relationship with its host, but certain strains of *E. coli* have the characteristics diverged from their mutual cohorts, becoming more pathogenic. Pathogenic *E. coli* is classified into pathotypes: enteropathogenic *E. coli*

(EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) (Nataro and Kaper, 1998). These pathotypes lead to diseases in the intestinal tract, but extra-intestinal *E. coli* (ExPEC), such as uropathogenic *E. coli* (UPEC), which also resides in the gut without causing symptoms, maintains an ability to disseminate and colonize other host organs (Wiles *et al*, 2008).

Urinary tract infection (UTI) caused by *E. coli* is among the most common human infections (Kunin, 1987) and at least 10% to 20% of women experience UTI once in their lives (Johnson and Stamm, 1989). UTI is classified into categories based on the organs infected: cystitis (infection at the bladder), pyelonephritis (infection at the kidney), and bacteriuria (infection in the urine) (Foxman, 2003). The most important process of bacterial pathogenesis is the adhesion of microorganisms to the uroepithelial cells. P fimbriae (P-blood group antigens-associated fimbriae) is one of the surface virulence factors of UPEC in humans, being involved in the pathogenesis of ascending UTI and pyelonephritis (Leffer and Svanborg-Eden, 1981; Vaisanen *et al*, 1981; Plos *et al*, 1995). P fimbriae is the major virulence factor (Yamamoto *et al*, 1995) enhancing early colonization of the tubular epithelium (Bien *et al*, 2012) and in renal transplant patients. In the upper UTI, acute allograft injury is due to P fimbriae-expressing UPEC (Rice *et al*, 2006).

Another surface virulence factor, Afa adhesin, belongs to the family of Afa proteins (Le Bouguéneq *et al*, 1992). UPEC expressing Afa adhesin (encoded by *afa*) has the potential to establish chronic or recurrent infection (Le Bouguéneq, 2005). UPEC invades uroepithelial cells by means of adhesins AfaD and AfaE,

avoiding host immunosurveillance and antibiotic treatment, thereby, is capable of initiating a new round of relapse (Dhakal *et al*, 2008).

The most important secreted virulence factor is α -hemolysin (HlyA, encoded by *hlyA*), which is associated with upper UTI such as pyelonephritis (Johnson, 1991). HlyA acts as a pore-forming toxin classified as a member of RTX (repeat in toxin) toxin family. This type of toxin is wide spread among gram-negative bacterial pathogens, and at low concentrations HlyA induces apoptosis of neutrophils, T lymphocytes and renal cells, resulting in exfoliation of uroepithelial cells (Jonas *et al*, 1993; Russo *et al*, 2005; Chen *et al*, 2006). Furthermore, at high concentrations the toxin causes lysis of erythrocytes and nucleated cells, promoting the pathogens to cross the mucosal barriers, leading to destruction of immune cells (Johnson, 1991). Approximately 50% of cases of pyelonephritis renal complication are caused by HlyA (Bien *et al*, 2012). In particular, HlyA-producing *E. coli* is able to cause permanent renal scarring, a common consequent complication (Jakobsson *et al*, 1994).

To the best of our knowledge, reports of the prevalence of uropathogenic bacteria, urovirulence factors and antimicrobial resistant pattern are lacking in Phuket Island, Thailand. Therefore, this study gathered data regarding the prevalence of uropathogenic bacteria, urovirulence factors and antibiogram pattern of uropathogens collected from patients in Phuket Island.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

A total of 166 uropathogenic bacteria were collected from wards throughout

Vachira Phuket Hospital and from Talang and Patong Hospitals in Phuket Province, Thailand, between February and September, 2013. The strains were identified using standard biochemical reactions, and all strains were kept at -80°C for further analysis. This study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Thailand (EC code: REC57-0136-19-2).

Antimicrobial susceptibility test

Antimicrobial susceptibilities of the uropathogenic bacteria were performed using the disk diffusion method (CLSI, 2012), employing seven antimicrobial agents, namely, cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), cotrimoxazole (25 µg), imipenem (10 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), tetracycline (30 µg) (Oxiod, Hampshire, UK). Production of extended-spectrum β-lactamases (ESBL) was also determined by the disk diffusion method. A result of ≥5 mm increase in a zone diameter for amoxicillin in combination with clavulanic acid versus amoxicillin alone was considered an ESBL-producer.

E. coli virulence genes determination

Bacteria were subcultured into 3 ml of LB broth at 37°C with shaking. One ml aliquot of culture broth was boiled for 10 minutes, placed on ice for 5 minutes and centrifuged at 11,000g for 10 minutes. DNA for PCR was from a 10-fold dilution of the supernatant. For virulence genes detection, two target genes for surface virulence factors (*pap* and *afa*) and one target gene for secreted virulence factor (*hlyA*) of UPEC, were determined using primers shown in Table 1. PCR was performed in a 25 µl reaction mixture consisting of 0.4 µM each primer pair, 0.1 mM dNTPs, 1X GoTaq DNA polymerase buffer, 0.5 U GoTaq DNA polymerase (Promega,

Madison, WI), and 2 µl of PCR template. Amplification reaction was performed as described previously (Le Bouguéneq *et al*, 1992; Yamamoto *et al*, 1995). In brief, for surface virulence factors investigation, *pap* and *afa*, the thermal cycler (T100™ Thermal Cycler, Bio-rad, Hercules, CA) conditions were as follows: 95°C for 3 minutes followed by 35 cycles of 94°C for 1 minute, 60°C for 40 seconds, and 72°C for 1 minute. The reactions were finalized at 72°C for 5 minutes. The condition for *hlyA* was the same as for *pap* and *afa* except the annealing temperature was 58°C and the time for extension was 1.20 minutes. Amplicons were analyzed by 1.0% agarose gel-electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

RESULTS

Bacterial strains

The 166 uropathogenic bacteria collected from three hospitals in Phuket Province, Thailand, between February and September, 2013, consisted of *E. coli* (113 isolates), *K. pneumoniae* (52 isolates), and *K. ozaenae* (1 isolate). Focusing on the two main uropathogenic species, *E. coli* and *K. pneumoniae*, the majority were obtained from elderly females at the Internal Medicine Department, Vachira Phuket Hospital (Table 2). The second most frequent was from patients aged ≤15 years old (13% *E. coli* and 11% *K. pneumoniae*). *E. coli* infection in pediatric wards was 12% while *K. pneumoniae* infection was 13% in surgery wards (Table 2).

Antimicrobial susceptibility

Employing disk diffusion test for 7 antimicrobial agents, the majority (77%) of *E. coli* isolates were resistant to tetracycline, followed by cotrimoxazole resistance (68%) (Table 3). As regards *K. pneumoniae* isolates, resistance to tetracycline

Table 1
Oligonucleotide primers used in this study.

Gene	Primer name	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)	Reference
<i>pap</i>	pap3	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	Yamamoto <i>et al</i> , 1995
	pap4	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		
<i>afa</i>	afa1	GCTGGGCAGCAAAGCTGATAACTCTC	750	Le Bouguéneç <i>et al</i> , 1992
	afa2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG		
<i>hlyA</i>	hly1	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1,177	Yamamoto <i>et al</i> , 1995
	hly2	ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA		

and cefotaxime were the top two (65%), with imipenem being the least resistant antimicrobial agent tested (12%) (Table 3). Disc diffusion assays revealed that 52 of 133 (46%) and 30 of 52 (57%) of *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates, respectively, were ESBL-producers (Fig 1).

Presence of *E. coli* virulence genes

Two surface virulence genes, P fimbriae-encoding gene (*pap*) and adhesin-encoding gene (*afa*), and one secreted virulence gene encoding α -hemolysin (*hlyA*), were investigated by PCR. Of the *E. coli* isolates, 27 of 113 carried at least one of these three virulence genes, with 11 (41%) isolates having both *pap* and *hlyA*, followed by isolates harboring only *afa* (Table 4). Neither *E. coli* isolates had the presence of all three virulence genes, nor the genotype *pap*⁻, *afa*⁺, *hlyA*⁺.

DISCUSSION

The development of UTI is depended upon factors such as the patient's anatomical features, the integrity of host defense mechanism, and the virulence of the infecting organism (Nicolle, 2002). In this present study, it was not surprising that elderly females constituted the group with the highest infection rate as

the female anatomy is more favorable for uropathogenic infection than male (Jung *et al*, 2012). Furthermore, the robustness of host defense mechanisms against microorganisms in elderly people is impaired owing to, for instance, the instability of cytokines production and/or the impairment of signaling pathways involved in neutrophil recruitment to the bladder (Bien *et al*, 2012). Although the majority of the patients in this study were female, about a quarter and one-third of *E. coli* and *K. pneumoniae* infection, respectively, were isolated from male. Based on considerations of the human anatomy, we hypothesized that the type of specimens collected from male patients would be from infected urine catheter rather than midstream urine. This notion was borne out by the presence of 32 of 50 isolates of both *E. coli* and *K. pneumoniae* from male patients being collected from urine catheterized patients (data not shown).

Among the three subspecies of *K. pneumoniae*, namely, subspecies *pneumoniae*, subspecies *rhinoscleromatis* and subspecies *ozaenae* (Farmer and Kelly, 1991), the latter causes a chronic inflammatory disease of the upper respiratory tract (Falkow and Mekalanos, 1990) and is a causative agent of ozena, an atrophic

Table 2
Demographic data of patients infected by uropathogens from Phuket Island, Thailand.

Category	Number of isolates (%)		
	<i>Escherichia coli</i> (n = 113)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 52)	<i>Klebsiella ozaenae</i> (n = 1)
Sex			
Male	32 (28)	18 (35)	1 (100)
Female	81 (72)	34 (65)	-
Age, years			
≤15	15 (13)	6 (11)	-
16-30	6 (5)	1 (2)	-
31-45	4 (4)	2 (4)	1 (100)
46-60	13 (12)	5 (10)	-
≥ 61	75 (66)	38 (73)	-
Hospital unit			
Outpatient			
OPD	6 (5)	5 (10)	-
ER	7 (6)	2 (4)	-
Inpatient			
Internal medicine	76 (67)	32 (61)	-
ICU	2 (2)	3 (6)	-
Surgery	9 (8)	7 (13)	1 (100)
Pediatric	13 (12)	3 (6)	-
Specimen			
Midstream urine	63 (56)	28 (54)	-
Catheter urine	50 (44)	24 (46)	1 (100)

Table 3
Antimicrobial resistance of uropathogenic bacteria.

Bacterial species	Number of positive isolates/Total isolates (%)						
	CTX	CAZ	SXT	IPM	F	NOR	TE
<i>Escherichia coli</i>	57/110 (52)	54/110 (49)	76/111 (68)	5/111 (5)	1/113 (1)	65/113 (58)	85/110 (77)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34/52 (65)	32/52 (62)	32/51 (63)	6/52 (12)	14/51 (27)	19/51 (37)	32/49 (65)
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)

CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; SXT, cotrimoxazole; IPM, imipenem; F, nitrofurantoin; NOR, norfloxacin; TE, tetracycline.

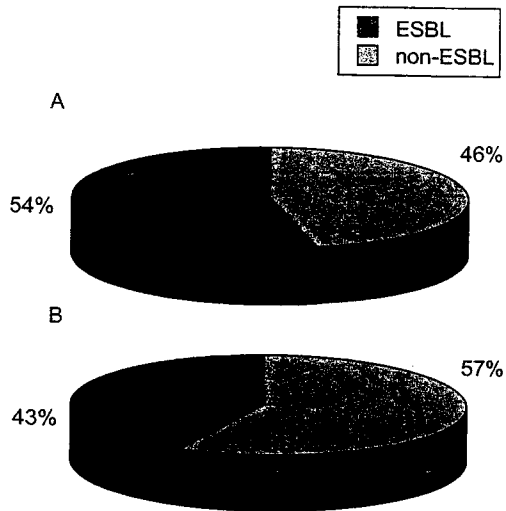


Fig 1—Proportion of ESBL-producing uropathogens among UTI patients, Phuket Island, Thailand. A, proportion of ESBL and non-ESBL *E. coli* isolates; B, proportion of ESBL and non-ESBL *K. pneumoniae* isolates.

rhinitis marked by a thick mucopurulent discharge, mucosal crusting and fetor (Malowany *et al*, 1972). Although this bacterial species is able to cause other symptoms such as meningitis, abscesses, otitis, and corneal ulcer, urinary tract infection are infrequent. Only twelve cases caused by *K. ozaenae* have been reported to date, most of which occurring in old male with immunocompromising conditions, such as the presence of cancer, leprosy, or diabetes mellitus (Kumar *et al*, 2013). In the present study, one isolate of *K. ozaenae* was obtained from a 45 year-old male hospitalized in the orthopedics surgery ward, obtained as the urine from catheter on June, 2013. This is the first report of UTI caused by *K. ozaenae* in southern Thailand.

The high rates of tetracycline and cotrimoxazole resistance obtained in this study have been reported in uropathogenic *E. coli* isolated from patients at Dhaka,

Bangladesh, with tetracycline resistance of 74%-84% (Lina *et al*, 2007). However, in the Netherlands, reported uropathogenic *E. coli* resistant to cotrimoxazole was 16% and resistance to norfloxacin was only 3%. The high antibiotic prescription rates in developing countries and the patient's former intensive antibiotic exposure background, may explain in part for this phenomenon.

E. coli isolates in this study were most sensitive to nitrofurantoin, similar to a previous report from The Netherlands where the susceptibility to nitrofurantoin is 100% in urine samples from female patients with uncomplicated UTI although the rate of prescriptions for nitrofurantoin in 2004 and 2009 were 58% and 66%, respectively (den Heijer *et al*, 2010). More importantly, Liu *et al* (2011) reported that 79.1% of ESBL-producing *E. coli* isolated from a hospital in Taipei, Taiwan, were susceptible to nitrofurantoin. However, even if nitrofurantoin is still an effective antimicrobial agent for non-complicated cystitis, its usage is hindered by side effects and frequency of usage doses per day (Amábile-Cueras and Arredondo-García, 2011).

Although this study observed high resistance of *K. pneumoniae* to tetracycline and cotrimoxazole, only 27% of the bacteria in Dhaka, Bangladesh are resistant to tetracycline, but completely sensitive to imipenem. Bacterial antibiotic resistant characteristics are frequently found to be conferred by plasmids and the presence of antibiotic resistant plasmids among isolates is varied and found to be transferred in certain rates (Lina *et al*, 2007). Thus, the number of resistant bacteria in different countries can be diverged. In addition, the low level of imipenem resistance is not surprising because it is shown to be very active against gram-negative bacteria (Franklin *et al*, 2002).

Table 4
Virulence genes and antibiogram patterns of uropathogenic *Escherichia coli*.

Strain	Source of sample	Ward	Virulence gene pattern			Antibiogram pattern
			<i>pap</i>	<i>afa</i>	<i>hlyA</i>	
PSU90	MU	OPD	+	-	+	TE
PSU91	CU	Medicine	-	+	-	CTX, CAZ, SXT, NOR, TE
PSU92	CU	Medicine	-	+	-	SXT, TE
PSU93	MU	Pediatrics	+	-	+	SXT, TE
PSU94	CU	OPD	+	-	+	S
PSU95	MU	Medicine	+	-	-	SXT, TE
PSU96	CU	Medicine	+	-	+	CTX, CAZ, NOR
PSU139	MU	Medicine	-	-	+	CTX, CAZ, NOR, TE
PSU140	CU	Medicine	+	-	+	NOR, TE
PSU141	CU	ER	-	-	+	CTX, CAZ, SXT, IPM, NOR, TE
PSU142	MU	Medicine	-	+	-	CTX, CAZ, SXT, TE
PSU143	CU	Medicine	-	-	+	CTX, CAZ, SXT, NOR, TE
PSU144	MU	Pediatrics	-	-	+	S
PSU145	CU	Pediatrics	-	-	+	SXT, TE
PSU146	CU	Pediatrics	-	+	-	CTX, SXT
PSU147	MU	Medicine	-	+	-	SXT
PSU148	MU	Medicine	+	-	+	CAZ, SXT, TE
PSU149	MU	Medicine	+	-	+	CTX, CAZ, SXT, NOR, TE
PSU150	MU	Pediatrics	+	-	-	SXT
PSU151	MU	Medicine	+	-	+	CTX, CAZ, NOR, TE
PSU152	CU	Surgery	-	+	-	CTX, CAZ, SXT, NOR, TE
PSU153	MU	Medicine	+	-	-	SXT, NOR, TE
PSU154	CU	Pediatrics	+	-	+	CTX, CAZ, TE
PSU155	MU	Medicine	+	-	+	SXT
PSU156	CU	Medicine	-	+	-	CTX, CAZ, SXT, NOR, TE
PSU157	MU	Medicine	-	+	-	SXT, TE
PSU158	MU	Pediatrics	+	-	+	SXT, TE

MU, midstream urine; CU, catheter urine. CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; SXT, cotrimoxazole; IPM, imipenem; F, nitrofurantoin; NOR, norfloxacin; TE, tetracycline. S, susceptible to all antimicrobial agents tested.

Owing to the scarcity of information regarding uropathogenic prevalence and its antibiogram pattern, the correct therapeutic approach and the choice of antimicrobial agents used tend to vary, resulting in slow recuperation. This study, thus, provided the antibiogram profile of uropathogenic *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from number of hospitals on

Phuket Island, and provides informations that would be useful for public health organizations in Thailand.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded in part by Prince of Songkla University. MT is a recipient of Prince of Songkla University grant, no. SCI560349S.

REFERENCES

- Amábile-Cueras CF, Arredondo-García JL. Antimicrobial activity data in support of nitrofurantoin three times per day. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1652-3.
- Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol* 2012; 2012: 681473.
- Chen M, Tofighi R, Bao W, et al. Carbon monoxide prevents apoptosis induced by uropathogenic *Escherichia coli* toxins. *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 382-9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement M100-S22. Wayne: CLSI, 2012.
- den Heijer CDJ, Donker GA, Maes J, Stoberingh EE. Antibiotic susceptibility of unselected uropathogenic *Escherichia coli* from female Dutch general practice patients: a comparison of two surveys with a 5 year interval. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2128-33.
- Dhakal BK, Kulesus RR, Mulvey MA. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 2-11.
- Falkow S, Mekalanos J. The enteric bacilli and vibrios. In: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, eds. *Microbiology*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1990: 561-87.
- Farmer JJ, Kelly MT. *Enterobacteriaceae*. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of clinical microbiology*. 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology 1991: 360-83.
- Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* 2002; 113 (supp 1A): S5-13.
- Franklin GA, Moore KB, Synder JW, Polk HC Jr, Cheadle WG. Emergence of resistant microbes in critical care units in transient, despite an unrestricted formulary and multiple antibiotic trials. *Surg Infect* 2002; 3: 135-44.
- Jakobsson B, Berg U, Svensson L. Renal scarring after acute pyelonephritis. *Arch Dis Child* 1994; 70: 111-5.
- Johnson JR, Stamm WE. Urinary tract infections in women: diagnosis and therapy. *Ann Intern Med* 1989; 111: 906-17.
- Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 80-128.
- Jonas D, Schultheis B, Klas C, Krammer PH, Bhakdi S. Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. *Infect Immun* 1993; 61: 1715-21.
- Jung J, Ahn HK, Huh Y. Clinical and functional anatomy of the urethral sphincter. *Int Neurourol* 2012; 16: 102-6.
- Kumar S, Alfaadhel T, AlBugami MM. *Klebsiella ozaenae* bacteremia in a kidney transplant recipient. *Case Rep Transplant* 2013; 2013: 493516.
- Kunin CM. An overview of urinary tract infections. In: Kunin CM, eds. *Detection, prevention and management of urinary tract infections*. 4th ed. Philadelphia: Lea Febiger, 1987: 3-4.
- Le Bouguéneq C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1189-93.
- Le Bouguéneq C. Adhesins and invasions of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 471-8.
- Leffer H, Svanborg-Eden C. Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. *Infect Immun* 1981; 34: 920-9.
- Lina TT, Rahman SR, Gomes DJ. Multiple-antibiotic resistance mediated by plasmids and integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Bangladesh J*

- Microbiol* 2007; 24: 19-23.
- Liu HY, Lin HC, Lin YC, Yu SH, Wu WH, Lee YJ. Antimicrobial susceptibilities of urinary extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to fosfomycin and nitrofurantoin in a teaching hospital in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2011; 44: 364-8.
- Malowany MS, Chester B, Allerhand J. Isolation and microbiologic differentiation of *Klebsiella rhinoscleromatis* and *Klebsiella ozaenae* in cases of chronic rhinitis. *Am J Clin Path* 1972; 58: 550-3.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201.
- Nicolle LE. Urinary tract infection in geriatric and institutionalized patients. *Curr Opin Urol* 2002; 12: 51-5.
- Plos K, Connell H, Jodal U, et al. Intestinal carriage of P fimbriated *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. *J Infect Dis* 1995; 171: 625-31.
- Rice JC, Peng T, Kuo YF, et al. Renal allograft injury is associated with urinary tract infection caused by *Escherichia coli* bearing adherence factors. *Am J Transplant* 2006; 6: 2375-83.
- Russo TA, Davidson BA, Genagon SA, et al. *E. coli* virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis in vitro and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: L207-16.
- Vaisanen V, Elo J, Tallgren LG. Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of *Escherichia coli* causing primary pyelonephritis. *Lancet* 1981; 2: 8260-1.
- Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 2008; 85: 11-9.
- Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immun Med Microbiol* 1995; 12: 85-90.

Quantification of Enterohemorrhagic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Retailed Meats

¹Thanaporn Pewleang, ²Pattamarat Rattanachuay,
¹Monchanok Themphachana and ¹Pharanai Sukhumungoon

¹Department of Microbiology, Faculty of Science,
Prince of Songkla University, Hat-Yai, 90112, Thailand
²Department of Pre-clinic, Faculty of Science and Technology,
Prince of Songkla University, Pattani campus, 94000, Thailand

Abstract: Meats are apparently found to be the crucial vehicle for the transfer of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) to human. The existence of STEC including the enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in meats was reported worldwide. However, the information in terms of quantity of STEC and EHEC were insufficient in Thailand. In this study, the preliminary investigation of STEC and EHEC quantity in meats was carried out by most probable number-polymerase chain reaction (MPN-PCR) method. In the screening process, a total of 30 (beef, pork and chicken) meat samples purchased from various fresh market in Hat-Yai city, were investigated. The highest amount of STEC was found in beef samples as 27 MPN/g while the lowest amount of STEC was found in chicken meat sample as 3 MPN/g. Only one chicken meat sample revealed the existence of EHEC as 3 MPN/g. No EHEC was found in beef and pork samples. The presence of *E. coli* O157 was also examined by the isolation method using immunomagnetic separation specific to O157 serotype and it displayed the consistent results to the MPN-PCR method. These results exhibited the baseline data on the STEC and EHEC quantity in meats sold in Southern Thai area and may suggest the high prevalence of pathogenic *E. coli* carrying virulence genes which may be resulted in pathogenesis to human.

Key words: EHEC • STEC • Retailed Meat • Thailand • Shiga Toxin

INTRODUCTION

Diarrheal disease plays a pivotal role as the public health concern. Diarrheal disease accounts for 11 % of child deaths worldwide. It kills more than malaria, measles or even AIDS [1]. Amongst six different *Escherichia coli* pathotypes, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) displays the most devastating effects to the host [2]. This resulted in part from the main virulence factors of this pathotype, Shiga toxins (Stx). Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) carries *stx*₁ and/or *stx*₂. EHEC is a subset of STEC [3] which carries an extra gene, *eae* coding for intimin responsible for bacterial attachment [4].

To date, several food-borne outbreaks caused by STEC have been recorded. In United States, as of

September 26, 2006, a total of 183 persons from 26 States which infected by an outbreak *E. coli* O157:H7 strain, were reported to Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Ninety-five persons (52%) were hospitalized and 29 (16%) displayed hemolytic uremic syndrome (HUS). One dead case was reported and the fresh Spinach was reported to be a source of outbreak [5]. One study from Ethelberg *et al.* [6] reported the outbreak of STEC O26:H11 isolated from organic fermented beef sausage in Denmark in 2007. The bacteria carried *stx*₁ and *eae* but not *stx*₂. No cases of HUS reported.

In the central part of Thailand in 2003, the presence of STEC infection was investigated at Bamrasnaradura Infectious Diseases hospital. In that period, 119 non-bloody and 92 bloody diarrheal patients were examined

Corresponding Author: Pharanai Sukhumungoon, Department of Microbiology, Faculty of Science,
Prince of Songkla University, Hat-yai, Songkhla, Thailand, 90112.
Tel: (+66) 74-288322, Fax: (+66) 74-446661.

for STEC. Five STEC were detected from three patients. They belonged to serotype O26:H-, O111:H-, O128:H2, O125:H21 including one O157:H7 isolates from normal control group [7].

Based upon our previous studies, that aimed to investigate *E. coli* O157:H7 from beef, few STEC were also observed [8,9]. However, the information in term of STEC quantity is still deficient. This encouraged us to quantify the amount of EHEC and STEC in retail meat samples in this area to gain the preliminary information that is useful for further investigation of EHEC and STEC in the future.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection: In order to obtain the baseline data on the EHEC and STEC quantity, a total of 62 samples comprising three types of meats, beef (Most probable number-polymerase chain reaction (MPN-PCR), *n*=10; Immunomagnetic separation (IMS), *n*= 32), pork (MPN-PCR; *n*= 10), chicken (MPN-PCR; *n*=10), were purchased from various local markets in Hat-Yai city, Songkhla, Thailand between April 2013 and October 2013. The samples were collected once a week to ensure that the meats were from different batches. All purchased samples were processed within 2 h.

Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction (MPN-PCR) Method: MPN-PCR was performed as described by Chang *et al.* [10] with slight modifications. Briefly, twenty five grams of meat were homogenized with 225 ml of tryptic soy broth (TSB). The liquid portion was used to perform the three-tube MPN, 100 fold and 1,000 fold dilutions from the prepared stomacher fluids.

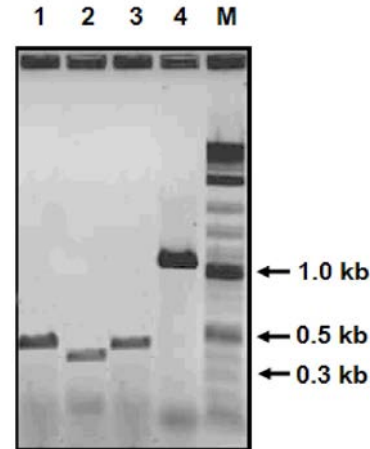


Fig. 1: PCR assay detecting 420 bp *rfbO157*, 350 bp *stx*₁, 404 bp *stx*₂ and 1,087 bp *eae* genes. Lane 1, 2, 3 and 4, *E. coli* O157:H7 strain EDL933; lane M, 2-log DNA ladder.

One milliliter from each dilution was transferred into triplicate MPN tubes and incubated at 37°C for 24 h. One milliliter of culture from the turbid tube was then subjected to PCR template prepared by boiling method [11]. The boiled bacterial culture were immersed on ice for 10 min prior to be centrifuged at 11,000 × *g* for 5 min. Decimal dilution of boiled supernatant was used as PCR template. Four genes, *stx*₁, *stx*₂, *eae* and *rfbO157*, were investigated for the detection of EHEC and STEC by simplex PCR (GoTaq Flexi system, Promega) (Figure 1). The oligonucleotide primers used in this study including the condition for PCR were described in Table 1 and Table 2. PCR amplification was carried out in 25 µl reaction mixture comprising 1X GoTaq Flexi green buffer, 3.0 mM MgCl₂,

Table 1: Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	Target gene	Amplicon size	Reference
EVT-1	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	<i>stx</i> ₁	350 bp	[8]
EVT-2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			
EVS-1	ATCAGTCGCTCACTCACTGGT	<i>stx</i> ₂	404 bp	[8]
EVS-2	CCAGTTATCTGACATTCTG			
AE-19	CAGGTCGTCGTGCTGCTAAA	<i>eae</i>	1,087 bp	[24]
AE-20	TCAGCGTGGTTGGATCAACCT			
O157-F	CGTGATGATGTTGAGTTG	<i>rfbO157</i>	420 bp	[25]
O157-R	AGATTGGTTGGCATTACTG			

Table 2: PCR profiles for virulence genes amplification.

Profile name	PCR conditions				
	Pre-heat	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
<i>stx</i> ₁	95°C, 3 min	94°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 50 sec	72°C, 5 min
<i>stx</i> ₂	95°C, 3 min	94°C, 1 min	50°C, 1 min	72°C, 50 sec	72°C, 5 min
<i>eae</i>	95°C, 3 min	94°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 1.15 min	72°C, 5 min
<i>rfbO157</i>	95°C, 3 min	94°C, 1 min	45°C, 1 min	72°C, 50 sec	72°C, 5 min

0.1 mM dNTPs, 0.4 μ M each primer pair, 0.5 unit of GoTaq DNA polymerase and 2 μ l of DNA template. After 35 amplification cycles, the amplicons were observed by 1% agarose gel electrophoresis and stained by ethidium bromide. For amplification of *stx*₁, *stx*₂, *eae* and *rfbO157* genes, *E. coli* O157:H7 strain EDL933 was used as a positive control strain.

Isolation of *E. coli* O157:H7 from Meat Samples by Immunomagnetic Separation (IMS) Technique: Fifty grams of beef were homogenized with 450 ml of TSB. The liquid portion was separated and incubated at 37°C for 6 h as a first enrichment step. Second enrichment process was performed by transferring 1 ml from first enrichment process into 10 ml of TSB and incubated at 42°C for 2 h [12]. One milliliter of culture was treated with 20 μ l of immunomagnetic beads coated with antibody specific to O157 antigen (Dynabeads, Oslo, Norway). After gentle mixing, the beads were recovered through washing steps using phosphate buffer saline pH 7.4 and spread on CHROMagar O157 (CHROMagar Microbiology, Paris, France). The plates were incubated at 37°C for 18 h. Mauve colonies were selected for virulence genes examination as described above.

Antimicrobial Susceptibility Test: All *E. coli* strains were determined for the antimicrobial susceptibility by disk diffusion method [13]. The six common antimicrobial agents used in this experiment were as followed: ceftriaxone (30 μ g), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25+23.75 μ g), norfloxacin (10 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), ceftazidime (30 μ g) and imipenem (10 μ g). Clear zone was measured by Vernier caliper. Antimicrobial disks were purchased from Oxoid (UK). *E. coli* ATCC 25922 was used as a control strain.

RESULTS AND DISCUSSION

The estimation of STEC in raw food samples especially meats is important for the public health. Several studies reported the virulence characteristics of STEC isolated from raw food materials in many areas throughout the world [14-17]. Moreover, certain reports described the infections and outbreaks resulted from the consumption of foods contaminated with many STEC serotypes including serotype O157:H7 [6,14,17].

In this study, in order to quantify the amount of EHEC and STEC in meat samples, MPN-PCR method was performed. Although the presence of *stx*₁ and/or *stx*₂ simultaneously with the presence of *eae* in the same turbid tube, could not be interpreted directly that there were any *E. coli* cells which carry these genes together, in this study, it was attributed that the samples which exhibited these genes pattern, were EHEC and the samples that exhibited only *stx*₁ and/or *stx*₂ gene only without *eae* gene were considered as STEC. In this investigation, the results revealed that the highest amount of EHEC in meats was 3 MPN/g, which appeared in one chicken meat sample. No EHEC was found in beef and pork samples. The highest quantity of STEC was found in beef samples as 27 MPN/g (*stx*₂-habouring *E. coli*) (Table 3). The lowest amount of STEC was found in chicken meat sample as 3 MPN/g (*stx*₂-habouring *E. coli*) (Table 3).

Poultry has been shown to be a potential reservoir for EHEC. In Turkey, 190 fresh chicken carcasses were examined for *E. coli* O157:H7 and showed that 2 of 190 (1.05%) carried O157:H7. Those two isolates were capable of producing Stx1 and Stx2 [18]. Additionally, one study from Dipineto *et al.* [19] revealed that 26 of 720 (3.61%) cloacal swab samples from layer hens farms in Italy, carried EHEC serotype O157:H7. In the present study,

Table 3: Quantity (MPN/g) of EHEC and STEC in retail meats.

Type of meat	Pathotype	No. of positive sample	MPN/g	
			*min	max
Beef	EHEC	0	<3	<3
	<i>stx</i> ₁ -habouring <i>E. coli</i>	7	<3	16
	<i>stx</i> ₂ -habouring <i>E. coli</i>	8	<3	27
Pork	EHEC	0	<3	<3
	<i>stx</i> ₁ -habouring <i>E. coli</i>	6	<3	11
	<i>stx</i> ₂ -habouring <i>E. coli</i>	3	<3	15
Chicken	EHEC	1	<3	3
	<i>stx</i> ₁ -habouring <i>E. coli</i>	3	3	9.3
	<i>stx</i> ₂ -habouring <i>E. coli</i>	1	<3	3

*Min, Minimum MPN value; Max, Maximum MPN value

EHEC was observed in only one chicken meat sample (3 MPN/g) which was considered very low. The low quantity of EHEC was also observed in Thailand in the past decade. There was only 1 out of 107 (0.93%) chicken samples, exhibited the possession of Stx [20]. Although poultry has been clearly shown to be the natural reservoir of EHEC in many areas of the world, poultry may not be the potential reservoir of EHEC in Thailand.

Beef and beef products have been known to be contaminated by STEC serotype O157:H7 and non-O157 with different contamination rates. Hussein [21] described the global assessment of STEC on beef throughout the past three decades. The prevalence rates of STEC non-O157 in ground beef, sausage, various retail cuts and whole carcasses were ranged from 2.4 to 30%, 17 to 49.2%, 11.4 to 49.6% and 1.7 to 58%, respectively. In addition, the corresponding prevalence rates of O157 serotype were 0.1 to 54.2%, 0.1 to 4.4%, 1.1 to 36.0% and 0.01 to 43.4%, respectively. In the current study, the beef retail cuts were examined as the surrogate reflecting the prevalence rate of STEC in beef in this area. Seven of 10 (70%) and 8 of 10 (80%) beef samples were shown to carry *stx*₁ and *stx*₂-habouring *E. coli*, respectively, by MPN-PCR (Table 3). The maximal amount of *stx*₁-habouring *E. coli* was 16 MPN/g and the maximal amount of *stx*₂-habouring *E. coli* was 27 MPN/g. The similar trend of the results was observed in porcine group as 11 MPN/g and 15 MPN/g for *stx*₁ and *stx*₂-habouring *E. coli*, respectively (Table 3).

In Thailand, early report from Suthienkul *et al.* [20] described the presence of STEC in vegetables, meats, cattle and farm animals. Beef samples also reflected the most prevalence of STEC as 9% (8 of 93 samples).

Based upon the quantification of STEC and EHEC by MPN-PCR in the current study, no *E. coli* O157:H7 was found. The lack of O157:H7 in early 30 meat samples was questioned whether there was no *E. coli* O157:H7 in those meat samples or the sensitivity of MPN-PCR approach was below the detection limit. Thus, additional 32 beef samples were further investigated for *E. coli* O157:H7 by IMS. Of 32 beef samples, *E. coli* O157:H7 was not found in early 31 samples but *E. coli* O157:H7 isolates were eventually found in the last sample (6 isolates) marketed on late October 2013. All isolates represented the same *stx* and *eae* genotypic pattern as shown in the former strains isolated in this area in last decade [8,9,11,22]. In addition, antimicrobial susceptibility test revealed that these six isolates were 100% susceptible to all antimicrobial agents tested. Estimation of the incidence of STEC carriage is complicated. Fecal shedding may be transient and is almost certainly affected by several factors including diet,

stress, population density, geographical region and season [23]. In 2008 and 2010, 24 *E. coli* O157:H7 were isolated from 14 beef samples [8,9]. Contrary, the attempt in 2012 and 2013 revealed that 13 *E. coli* O157:H7 were isolated from only three beef samples. In this study, a range of approximately six months was applied for isolation and quantification of STEC including *E. coli* O157. However, in this six months interval, only one isolate from one beef sample was obtained. Thus, in this study, we also observed the similar phenomenon as Kudva *et al.* [23] and both MPN-PCR and IMS approaches were considered to demonstrate the corresponding results.

CONCLUSION

Retailed meat represents a risky source for EHEC and STEC in Hat-Yai city, Songkhla, Thailand that threaten human health through the food chain. Low hygienic performance of the butchers and cookers may transfer these types of bacteria to the consumers. Thus, the campaign for good practice in cooking should be announced to the public. Meanwhile, the high surveillance frequency of EHEC and STEC in common fresh meat types is encouraged to be performed to prevent the outbreaks by these *E. coli* pathotypes in this area.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by Faculty of Science, Prince of Songkla University.

REFERENCES

1. Centers for Disease Control and Prevention, 2013. Global Diarrhea Burden. Downloaded from <http://www.cdc.gov/healthywater/global/diarrhea-burden.html> on 18/12/2013.
2. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., 11: 142-201.
3. Tarr, P.I., C.A. Gordon and W.L. Chandler, 2005. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet, 365: 1073-1086.
4. Jerse, A.E. and J.B. Kaper, 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. Infect. Immun., 59: 4302-4309.

5. Centers for Disease Control and Prevention, 2006. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach-United States, September, 2006. MMWR., 55: 1045-1046.
6. Ethelberg, S., B. Smith, M. Torpdahl, M. Lisby, J. Boel, T. Jensen, E.M. Nielsen and K. Mølbak, 2009. Outbreak of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. Clin. Infect. Dis., 48: e78-81.
7. Leelaporn, A., M. Phengmak, B. Eampoklap, S. Manatsathit, S. Tritilanunt, S. Siritantikorn, K. Nagayama, T. Iida, C. Niyasom and P. Komolpit, 2003. Shiga toxin-and enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from subjects with bloody and nonbloody diarrhea in Bangkok, Thailand. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 46: 173-180.
8. Sukhumungoon, P., Y. Nakaguchi, N. Ingviya, J. Pradutkanchana, Y. Iwade, K. Seto, R. Son, M. Nishibuchi and V. Vuddhakul, 2011a. Investigation of *stx*₂⁺ *eae*⁺ *Escherichia coli* O157:H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. IFRJ., 18: 381-386.
9. Sukhumungoon, P., P. Mittraparp-arthorn, R. Pomwised, W. Charernjiratragul and V. Vuddhakul, 2011b. High concentration of Shiga toxin 1-producing *Escherichia coli* isolated from Southern Thailand. IFRJ., 18: 683-688.
10. Chang, W.S., L. Afsah-Hejri, Y. Rukayadi, A. Khatib, Y.L. Lye, Y.Y. Loo, N. Mohd Shahril, S. Puspanadan, C.H. Kuan, S.G. Goh, Y.H.T. John, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi and R. Son, 2013. Quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in organic vegetables and chickens. IFRJ., 20: 1023-1029.
11. Sukhumungoon, P. and Y. Nakaguchi, 2013. Shiga toxin 2-converting bacteriophages occupy *sbcB* gene as a primary integration site in bovine-originated *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from Thailand. Life Sci. J., 10: 2334-2340.
12. Koitabashi, T., S. Cui, M. Kamruzzaman and M. Nishibuchi, 2008. Isolation and characterization of the Shiga toxin gene (*stx*)-bearing *Escherichia coli* O157 and non-O157 from retail meats in Shandong province, China and characterization of the O157-derived *stx*₂ phages. J. Food Prot., 71: 706-713.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 2013. Twenty-third informational supplement. Wayne (PA) (CLSI document no. M100-S23).
14. Hashimoto, H., K. Mizukoshi, M. Nishi, T. Kawakita, S. Hasui, Y. Kato, Y. Ueno, R. Takeya, N. Okuda and T. Takeda, 1999. Epidemic of gastrointestinal tract infection including hemorrhagic colitis attributable to Shiga toxin 1-producing *Escherichia coli* O118:H2 at a junior high school in Japan. Pediatrics, 103: E2.
15. Chomvarin, C., O.A. Ratchtrachenchai, Y. Chantarasuk, S. Srigulbutr, K. Chaicumpar, W. Namwat and D. Kotimanusvanij, 2005. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from food in Khon Kaen, Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 36: 931-939.
16. Guh, A., Q. Phan, R. Nelson, K. Purviance, E. Milardo, S. Kinney, P. Mshar, W. Kasacek and M. Cartter, 2010. Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with raw milk, Connecticut, 2008. Clin. Infect. Dis., 51: 1411-1417.
17. Slayton, R.B., G. Turabelidze, S.D. Bennett, C.A. Schwensohn, A.Q. Yaffee, F. Khan, C. Butler, E. Trees, T.L. Ayers, M.L. Davis, A.S. Laufer, S. Gladbach, I. Williams and L.B. Gieraltowski, 2013. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 associated with Romaine lettuce consumption, 2011. PloS One, 8: e55300.
18. Akkaya, L., H.I. Atabay, B. Kenar and M. Alisarli, 2006. Prevalence of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 on chicken carcasses sold in Turkey. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 50: 513-516.
19. Dipineto, L., A. Santaniello, M. Fontanella, K. Lagos, A. Fioretti and L.F. Menna, 2006. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. Lett. Appl. Microbiol., 43: 293-295.
20. Suthienkul, O., J.E. Brown, J. Seriwatana, S. Tienthongdee, S. Sastravaha and P. Echeverria, 1990. Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in retail meats and cattle in Thailand. Appl. Environ. Microbiol., 56: 1135-1139.
21. Hussein, H.S., 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. J. Anim. Sci., 85: E63-72.
22. Vuddhakul, V., N. Patararungrong, P. Pungrasamee, S. Jitsurong, T. Morigaki, N. Asai and M. Nishibuchi, 2000. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157 from retail beef and bovine feces in Thailand. FEMS Microbiol. Lett., 182: 343-347.
23. Kudva, I.T., P.G. Hatfield and C.J. Hovde, 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. J. Clin. Microbiol., 34: 431-433.

24. Gannon, V.P.J., M. Rashed, R.K. King and E.J.G. Thomas, 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 1268-1274.
25. Maurer, J.J., D. Schmidt, P. Petrosko, S. Sanchez, L. Bolton and M.D. Lee, 1999. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2954-2960.

Supplementary Data

ตารางที่ S1 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในการศึกษา

Gene	Primer's name	Sequences (5' → 3')	Amplicon size (bp)	References
<i>stx</i> ₁	EVT-1	CAACACTGGATGATCTCAG	349	Sukhumungoon et al., 2011
	EVT-2	CCCCCTCAACTGCTAATA		
<i>stx</i> ₂	EVS-1	ATCAGTCGTCACCTCACTGGT	404	Sukhumungoon et al., 2011
	EVS-2	CCAGTTATCTGACATTCTG		
<i>eae</i>	AE-19	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA	1,087	Sukhumungoon et al., 2011
	AE-20	TCAGCGTGGTTGGATCAACCT		
<i>rfbO157</i>	O157-F	CGTGATGATGTTGAGTTG	400	Maurer et al., 1999
	O157-R	AGATTGGTTGGCATTACTG		
<i>Q</i> ₉₃₃	qEf-1	ATGCGGATCCACACTGGCGATAAAGAAGGG	567	Koitabashi et al., 2006
	qEr-2	ATGCGGATCCTCGACTGCGTGGCAATGTAA		
<i>Q</i> ₂₁	qDf-1	ATGCGGATCCAAATCTCACATTGATTCAGG	561	Koitabashi et al., 2006
	qDr-2	ATGCGGATCCATAGTGTGCTCATTTGCTC		
<i>pap</i>	pap3	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	Yamamoto et al., 1995
	pap4	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		
<i>afa</i>	afa1	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	750	Le Bouguéneq et al., 1992
	afa2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG		
<i>hlyA</i>	hly1	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1,177	Yamamoto et al., 1995
	hly2	ACCATATAAGCGGTCATTCCTGCA		
<i>yja</i>	YjaA.1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211	Clermont et al., 2000
	YjaA.2	ATG GAGAATGCGTTTCTCAAC		
TspE4.C2	TSPE4.C2- F	AGTAATGTCGGGGCATTTCAG	152	Clermont et al., 2000
	TSPE4.C2-R	TCGCGCCAACAAAGTATTACG		
<i>chuA</i>	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	Clermont et al., 2000
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		

ตารางที่ S1 (ต่อ)

Gene	Primer's name	Sequences (5' → 3')	Amplicon size (bp)	References
<i>escV</i>	<i>escV</i> -F	GGCTCTCTTCTTCTTTATGGCTG	534	Müller <i>et al</i> , 2006
	<i>escV</i> -R	CCTTTTACAAACTTCATCGCC		
Z2577	Z2577-F	AACCCCATGATGCTCAGGCTC	909	Koch <i>et al</i> , 2003
	Z2577-R	TTCCCATTTTACTTCTCCG		
<i>sbcB</i>	<i>sbcB</i> 1	CATGATCTGTTGCCACTCG	1,800	Ohnishi <i>et al</i> , 2002
	<i>sbcB</i> 2	AGGTCTGTCCGTTTCCACTC		
<i>yecE</i>	EC10	GCCAGCGCCGAGCAGCACAATA	400	DeGreve <i>et al</i> , 2002
	EC11	GGCAGGCAGTTGCAGCCAGTAT		
<i>wrbA</i>	<i>wrbA</i> 1	ATGGCTAAAGTTCTGGTG	600	Toth <i>et al</i> , 2003
	<i>wrbA</i> 2	CTCCTGTTGAAGATTAGC		
<i>yehV</i>	Primer A	AAGTGGCGTTGCTTTGTGAT	340	Shaikh and Tarr, 2003
	Primer B	AACAGATGTGTGGTGAGTGTCTG		

วิธีการทดลองเพิ่มเติม

1. การตรวจหายีน *stx*₁ โดยวิธี PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTPs (2 mM)	1.0
EVT-1Primer (10 μM)	1.0
EVT-2Primer (10 μM)	1.0
GoTaq DNA polymerase (0.5 unit)	0.1
GoTaq buffer (5X)	5.0
Template DNA	2.0
Water	11.9
Total volume	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา(min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	3	1
Denature	94	1	35
Annealing	55	1	
Extension	72	1	
Final Extension	72	5	1

2. การตรวจหายีน *stx₂* โดยวิธี PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTPs (2 mM)	1.0
EVS-1Primer (10 μM)	1.0
EVS-2Primer (10 μM)	1.0
GoTaq DNA polymerase (0.5 unit)	0.1
GoTaq buffer (5X)	5.0
Template DNA	2.0
Water	11.9
Total volume	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา(min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	3	1
Denature	94	1	35
Annealing	50	1	
Extension	72	1	
Final Extension	72	5	1

3. การตรวจหายีน *eae* โดยวิธี PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTPs (2 mM)	1.0
AE-19Primer (10 μM)	1.0
AE-20Primer (10 μM)	1.0
GoTaq DNA polymerase (0.5 unit)	0.1
GoTaq buffer (5X)	5.0
Template DNA	2.0
Water	11.9
Total volume	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา(min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	3	1
Denature	94	1	35
Annealing	55	1	
Extension	72	1.15	
Final Extension	72	5	1

4. การตรวจหายีน *rfbO157* โดยวิธี PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTPs (2 mM)	1.0
O157-F Primer (10 μM)	1.0
O157-R Primer (10 μM)	1.0
GoTaq DNA polymerase (0.5 unit)	0.1
GoTaq buffer (5X)	5.0
Template DNA	2.0
Water	11.9
Total volume	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา(min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	3	1
Denature	94	40 sec	30
Annealing	50	30 sec	
Extension	72	30 sec	
Final Extension	72	5	1

5. การตรวจหายีน *escV* โดยวิธี PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTPs (2 mM)	1.0
<i>escV</i> -F Primer (10 μM)	1.0
μM <i>escV</i> -R Primer (10 μM)	1.0
GoTaq DNA polymerase (0.5 unit)	0.1
GoTaq buffer (5X)	5.0
Template DNA	2.0
Water	11.9
Total volume	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา(min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	3	1
Denature	94	1	35
Annealing	45	1	
Extension	72	1	
Final Extension	72	5	1

6. การตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธี PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTPs (2 mM)	1.0
<i>hlyA</i> -F Primer (10 μM)	1.0
<i>hlyA</i> -R Primer (10 μM)	1.0
GoTaq DNA polymerase (0.5 unit)	0.1
GoTaq buffer (5X)	5.0
Template DNA	2.0
Water	11.9
Total volume	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา(min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	3	1
Denature	94	1	35
Annealing	55	1	
Extension	72	1	
Final Extension	72	5	1

7. การตรวจหายีน Q_{933} โดยวิธี PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTPs (2 mM)	1.0
QEf-1 Primer (10 μM)	1.0
QEr-2 Primer (10 μM)	1.0
GoTaq DNA polymerase (0.5 unit)	0.1
GoTaq buffer (5X)	5.0
Template DNA	2.0
Water	11.9
Total volume	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา(min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	2	1
Denature	94	30 sec	30
Annealing	55	30 sec	
Extension	72	2	
Final Extension	72	5	1

8. การตรวจหายีน Q_{21} โดยวิธี PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTPs (2 mM)	1.0
QDf-1 Primer (10 μM)	1.0
QDr-2 Primer (10 μM)	1.0
GoTaq DNA polymerase (0.5 unit)	0.1
GoTaq buffer (5X)	5.0
Template DNA	2.0
Water	11.9
Total volume	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา(min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	2	1
Denature	94	30 sec	30
Annealing	51	30 sec	
Extension	72	2	
Final Extension	72	5	1

9. การตรวจหายีน *pap* โดยวิธี PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTPs (2 mM)	1.0
pap3Primer (10 μM)	1.0
pap4Primer (10 μM)	1.0
GoTaq DNA polymerase (0.5 unit)	0.1
GoTaq buffer (5X)	5.0
Template DNA	2.0
Water	11.9
Total volume	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา(min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	3	1
Denature	94	1	35
Annealing	60	40 sec	
Extension	72	1	
Final Extension	72	5	1

10. การตรวจหายีน *afa* โดยวิธี PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTPs (2 mM)	1.0
afa1Primer (10 μM)	1.0
afa2Primer (10 μM)	1.0
GoTaq DNA polymerase (0.5 unit)	0.1
GoTaq buffer (5X)	5.0
Template DNA	2.0
Water	11.9
Total volume	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา(min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	3	1
Denature	94	1	35
Annealing	60	40 sec	
Extension	72	1	
Final Extension	72	5	1

ตารางที่ 10 ปริมาณ (MPN/กรัม) ของเชื้อ EHEC และ STEC ในเนื้อวัว, เนื้อหมู, เนื้อไก่

วัน/เดือน/ปี	ตัวอย่างเนื้อวัว	<i>stx</i> ₁			MPN/g	<i>stx</i> ₂			MPN/g	O157			MPN/g	<i>eae</i>			MPN/g
		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
28-พ.ค.-56	1	1	1	0	7.4	0	1	2	9.2	0	0	0	<3	0	0	0	<3
15-มิ.ย.-56	2	0	0	0	<3	1	1	0	7.4	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	4	0	0	1	3	0	0	2	6	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	5	0	2	0	6.2	2	1	0	15	0	0	0	<3	0	0	0	<3
24-มิ.ย.-56	6	0	0	1	3	2	0	0	9.2	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	7	0	0	0	<3	0	0	1	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	8	1	0	0	3.6	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	9	0	0	1	3	0	0	1	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	10	1	3	0	16	2	1	2	27	0	0	0	<3	0	0	0	<3
วัน/เดือน/ปี	ตัวอย่างเนื้อหมู	<i>stx</i> ₁			MPN/g	<i>stx</i> ₂			MPN/g	O157			MPN/g	<i>eae</i>			MPN/g
		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
17-มิ.ย.-56	11	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	12	0	0	0	<3	0	1	0	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	13	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3

วัน/เดือน/ปี	ตัวอย่างเนื้อหมู	stx ₁			MPN/g	stx ₂			MPN/g	O157			MPN/g	eae			MPN/g
		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
15-ก.ค.-56	14	1	0	0	3.6	2	1	0	15	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	15	0	0	0	<3	0	1	0	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
5-ส.ค.-56	16	1	0	2	11	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	17	0	1	0	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	18	0	0	1	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	19	1	0	2	11	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	20	0	1	0	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
วัน/เดือน/ปี	ตัวอย่างเนื้อไก่	stx ₁			MPN/g	stx ₂			MPN/g	O157			MPN/g	eae			MPN/g
		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
15-ก.ค.-56	21	0	0	0	<3	0	0	1	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	22	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	24	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
3-ส.ค.-56	25	0	2	1	9.3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	26	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	27	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3

วัน/เดือน/ปี	ตัวอย่างเนื้อไก่	<i>stx₁</i>			MPN/g	<i>stx₂</i>				O157			MPN/g	<i>eae</i>			MPN/g
		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
	28	0	0	1	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	29	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	0	0	<3
	30	0	0	1	3	0	0	0	<3	0	0	0	<3	0	1	0	3