

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจหาเชื้อ ระบาดวิทยาของ enterohemorrhagic และ Shiga toxin-producing *Escherichia coli* ในผู้ป่วยท้องร่วงและการหาปริมาณเชื้อจากเนื้อสัตว์ทางภาคใต้ของประเทศไทย

Investigation and epidemiology of enterohemorrhagic and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from diarrheal patients and the quantification of EHEC and STEC from raw meats, Southern Thailand

คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร.ภรณ์ย สุกุมังกูร

ดร.ปฐมรัตน์ รัตนช่วย

น.ส.มนต์ชนก เต็มภาชนะ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ SCI560349S

การตรวจหาเชื้อ ระบาดวิทยาของ enterohemorrhagic และ Shiga toxin-producing *Escherichia coli* ในผู้ป่วยท้องร่วงและการหาปริมาณเชื้อจากเนื้อสัตว์ทางภาคใต้ของประเทศไทย

Investigation and epidemiology of enterohemorrhagic and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from diarrheal patients and the quantification of EHEC and STEC from raw meats, Southern Thailand

นักวิจัยหัวหน้าโครงการ : ผศ.ดร.ภรณ์ัย สุขมังกูร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

นักวิจัยผู้ร่วมโครงการ : ดร.ปฐมรัตน์ รัตนช่วย ภาควิชาพรีคลินิก คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาผู้ร่วมทำวิจัย : น.ส.มนต์ชนก เต็มภาชนะ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
บทที่ 1 บทนำ	4
วัตถุประสงค์	6
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	7
บทที่ 3 เชื้อแบคทีเรีย วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	18
บทที่ 4 วิธีการทดลอง	22
บทที่ 5 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	29
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	43

รายการตาราง

หัวข้อ	หน้า
ตารางที่ 1 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในการศึกษา	20
ตารางที่ 2 ลักษณะของ <i>E. coli</i> O157 สายพันธุ์ PSU120	34
ตารางที่ 3 ปริมาณการปนเปื้อน (MPN/g) ของ EHEC และ STEC ในเนื้อสัตว์ที่กำหนดในเขตอำเภอหาดใหญ่ในช่วงเดือนเมษายน ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2556	35
ตารางที่ 4 ข้อมูลของ <i>E. coli</i> O157 จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อวัว	36

รายการภาพประกอบ

หัวข้อ	หน้า
รูปที่ 1 โคโลนีไม่มีสีของเชื้อ <i>E. coli</i> O157 บนอาหาร SMAC และ โคโลนีสีม่วงอมชมพูของเชื้อ <i>E. coli</i> O157 บนอาหาร CHROMagar O157	12
รูปที่ 2 การเปรียบเทียบความเหมือนของ Q จีนของ <i>E. coli</i> O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 และ Thai-12 เมื่อเทียบกับแบคทีเรียโอฬาง 21	14
รูปที่ 3 ตำแหน่งจีโนมของ <i>stx</i> ₂ -phage ที่แทรกตัวอยู่ใน <i>E. coli</i> O157:H7 สายพันธุ์ Thai-12 ที่ primers ที่ใช้ในการทำ TNP-PCR สามารถเข้าจับได้	15
รูปที่ 4 เคนโตรแกรมแสดงค่าความคล้ายกัน (% similarity) ของเชื้อ <i>E. coli</i> O157 สายพันธุ์ PSU2, PSU933 และ PSU120	34
รูปที่ 5 ตัวอย่างของ amplicons ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้เชื้อ <i>E. coli</i> O157:H7 สายพันธุ์ EDL933	35

กิตติกรรมประกาศ

ในการนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ให้ทุน คือ ทุนเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้ความกรุณาจัดสรรทุนการวิจัยในครั้งนี้มาให้ ทำให้สามารถดำเนินการวิจัยได้อย่างราบรื่นคล่องตัวตลอดจนขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รวมถึงเจ้าหน้าที่ในหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำในการดำเนินการด้านต่างๆด้วยดีมาตลอด

ขอบพระคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านการวิจัย ไม่ว่าจะเป็นด้านการเงิน รวมถึงเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการวิจัย

ขอบพระคุณ ศ.ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล ที่ได้ให้คำแนะนำ และเป็นเสมือนผู้วางรากฐานให้ข้าพเจ้าเดินได้อย่างมั่นคงยิ่งขึ้น

ขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้กรุณาอ่านข้อเสนอโครงการวิจัย รวมถึงท่านผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้กรุณาอ่านรายงานการวิจัยฉบับร่าง พร้อมข้อเสนอที่เป็นประโยชน์ เพื่อการทำวิจัยที่ดีขึ้นต่อไปในอนาคต ขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่ให้กำลังใจเสมอมา และขอขอบคุณผู้ที่มีพระคุณท่านอื่นๆทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้

ภารนัย สุขุมังกูร
ตุลาคม 2557

บทคัดย่อ

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) และ Shiga toxin-producing *E. coli* เป็นแบคทีเรียชนิดที่มีความสำคัญในการก่อโรคในระบบทางเดินอาหารเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะ EHEC O157:H7 อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการพบเชื้อชนิดนี้ในผู้ป่วยอุจจาระร่วงในประเทศไทย ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทำการตรวจสอบความชุกของ EHEC และ STEC ในตัวอย่างอุจจาระของผู้ที่ป่วยด้วยอาการท้องร่วงในโรงพยาบาลขนาดใหญ่และโรงพยาบาลปัตตานี ผลการทดลองพบว่า ในเชื้อที่แยกได้จำนวน 1,021 ไอโซเลท จาก 359 ตัวอย่าง ที่เก็บได้ในช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2556 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2557 ไม่พบ EHEC และ STEC เลย อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ พบเชื้อ *E. coli* ซีโรทัยป์ O157 จำนวน 1 ไอโซเลท (สายพันธุ์ PSU120) เชื้อ PSU120 นี้ ไม่มีจีโนม *stx* และ *eae* แต่มีจีโนม *escV* ซึ่งเป็นจีโนมที่ประกอบใน Type III secretion system (T3SS) ซึ่งจีโนมนี้อยู่บน Locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity Island ซึ่งพบบ่อยในกลุ่มของแบคทีเรียจำพวก EHEC และ enteropathogenic *E. coli* (EPEC) อีกทั้งไม่พบเชื้ออื่นๆในตัวอย่างตรวจนอกจากเชื้อ PSU120 จึงเชื่อได้ว่าเชื้อ PSU120 เป็นต้นตอของการเกิดท้องร่วงในผู้ป่วยรายนี้ การตรวจสอบลักษณะต่างๆของเชื้อ PSU120 เพิ่มเติมพบว่า เชื้อ PSU120 ไม่มีทั้งจีโนม Q_{933} และ Q_{21} การไม่มีจีโนม 2 ชนิดนี้ สอดคล้องกับการไม่พบจีโนม *stx* เนื่องจากจีโนม Q เป็นจีโนมของ *stx*-phage เมื่อทำการตรวจหาคำแหน่งที่พบบ่อยว่า *stx*₂-phage มักจะเข้าไปแทรกตัวอยู่ พบว่าตำแหน่ง *sbcB* และ *yehV* มี prophages อื่นไปแทรกตัวอยู่แล้ว แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 นี้ มีความสามารถในการรับสารพันธุกรรมจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆได้ และสามารถพัฒนาจนก่อโรคได้ในอนาคต เมื่อตรวจแบบแผนการดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ PSU120 พบว่า เชื้อดื้อต่อยา penicillinG, streptomycin, methicillin และ vancomycin จากข้อมูลความคล้ายกันในส่วนของสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 กับเชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 และ PSU2 รวมถึงความสามารถในการได้รับและสูญเสียสารพันธุกรรมของเชื้อ จึงอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 เดิมทีอาจมีจีโนม *stx* แต่สูญเสีย *stx* ระหว่างการติดเชื้อในมนุษย์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงผลการพบ EHEC/STEC อย่างประปราย ทำให้คาดว่าน่าจะพบ EHEC/STEC ในตัวอย่างผู้ป่วยที่เกิดอาการท้องร่วงได้บ้าง แต่ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับการไม่พบ EHEC/STEC เลยในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทำการทดสอบหา EHEC/STEC ในเชิงปริมาณในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่วางขายในเขตอำเภอหาดใหญ่ เนื่องจากพบว่าเนื้อสัตว์ดิบโดยเฉพาะเนื้อวัวเป็นพาหะที่สำคัญที่สุดที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ EHEC/STEC ในมนุษย์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของ EHEC/STEC ในเนื้อสัตว์ในปริมาณน้อย โดยพบ EHEC ในเนื้อไก่เพียง 1/30 ตัวอย่าง (3.3 %) โดยให้ค่า การปนเปื้อนเท่ากับ 3 MPN/g สำหรับ STEC พบค่าการปนเปื้อนมากที่สุดในเนื้อวัวเพียง 27 MPN/g ในขณะที่พบค่าการปนเปื้อนน้อยที่สุดในเนื้อไก่เท่ากับ 3 MPN/g ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่า ความชุกของ EHEC/STEC ในตัวอย่างเนื้อดิบที่เป็นพาหะที่สำคัญของเชื่อนั้นมีการปนเปื้อนของเชื่อน้อย จึงเป็นสาเหตุหนึ่งของการไม่พบ EHEC/STEC ในตัวอย่างจากผู้ป่วยท้องร่วงในเขตนี้

Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* play crucial role in human gastroenteritis, especially serotype O157:H7. Due to the lack of reports about EHEC and STEC infections in Thailand, in this study, prevalence of EHEC/STEC was conducted in Hat-Yai and Pattani Hospitals using rectal swabs from diarrheal patients. A total of 1,021 suspected isolates from 359 samples collected during May, 2013 to April, 2014, were investigated and showed no positive isolate for EHEC/STEC. However, only one *E. coli* O157 (designated PSU120) was isolated from a 48 year-old man. This isolate lacked *stx* and *eae* but possessed *escV*, the gene component in Type III secretion system located on Locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity Island. Moreover, no other pathogen was found in the sample that PSU120 was collected. Thus, it is believed that *E. coli* O157 strain PSU120 is an etiologic agent for diarrhea. Further characterization of PSU120 was performed and found that PSU120 did not possess Q_{933} and Q_{21} . This result is corresponded to the lack of *stx* since Q gene is a gene of *stx*₂-phage responsible for antitermination activity. Intactness of integration sites for *stx*₂-phages was examined and showed that *sbcB* and *yehV* may have already occupied by prophages. This suggested that PSU120 was active in horizontal gene transfer. Antimicrobial susceptibility test exhibited that PSU120 was resistant to penicillinG, streptomycin, methicillin and vancomycin. DNA fingerprint revealed that PSU120 showed 88.6% similarity with *E. coli* O157:H7 strain EDL933 and PSU2. We tempted to speculate that PSU120 was originally possessed *stx* but lost the gene after establishing infection. Our previous studies showed the sporadic detections of STEC serotype other than O157. This made the possibility of STEC occurrence in diarrheal patients in this area but from the data above they showed the inconsistent results. Thus, the investigation of EHEC/STEC in the aspect of quantity was carried out because beef was shown to be an important vehicle for EHEC/STEC. The results showed the natural contamination of EHEC/STEC from raw meat in low amounts. It was found that EHEC was found in only one chicken sample (3.3%) as 3 MPN/g. For STEC, the highest contamination value was found in beef as 27 MPN/g and the lowest in chicken meat as 3 MPN/g. Therefore, there was a possibility that because of low EHEC/STEC contamination in raw meats, an important EHEC/STEC vehicles, no EHEC/STEC detection in diarrheal patients in this area.

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบัน การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ (food-borne diseases) เกิดขึ้นอย่างกว้างขวาง ซึ่งการระบาดนั้นส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ทำให้เกิดอาการท้องร่วง จากข้อมูลของกรมควบคุมโรค ประเทศสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) ระบุว่า โรคท้องร่วงนั้น ก่อให้เกิดการเสียชีวิตในเด็กทั่วโลกในอัตราประมาณร้อยละ 10 (CDC, 2005) เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคท้องร่วงเหล่านั้นส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่จัดอยู่ในตระกูล *Enterobacteriaceae*

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นสมาชิกหนึ่งในตระกูล *Enterobacteriaceae* ที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยแบ่งชนิดตามคุณสมบัติที่ทำให้เกิดโรคได้เป็น 6 ชนิด คือ enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) และ diffusely adherent *E. coli* (DAEC) (Nataro and Kaper, 1998) จากข้อมูลการระบาด บัจจัยก่อโรคของตัวเชื้ออาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ รวมไปถึงจำนวนของผู้เสียชีวิตที่เกิดจากเชื้อ EHEC ชี้ให้เห็นว่า EHEC เป็น *E. coli* ชนิดที่มีความรุนแรงที่สุด และเป็นเชื้อสาเหตุที่ก่อการระบาดในหลายประเทศทั่วโลก (Dundas et al., 2001; Rangel et al., 2005)

EHEC ซีโรทัยป์ O157:H7 เป็น ซีโรทัยป์ ที่มีความสำคัญมากที่สุด เพราะก่อให้เกิดการระบาดอย่างกว้างขวางทั่วโลก EHEC ซีโรทัยป์ O157:H7 เป็น normal microbiota อยู่ในลำไส้ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค กระบือ กวาง ฯลฯ ดังนั้นเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์เหล่านี้ อาจมีการปนเปื้อนเชื้อและเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ผ่านทางอาหารได้ อีกทั้งเชื้อเหล่านี้มี infectious dose ต่ำ ประมาณ 10^2 cells เท่านั้น และสามารถทนสภาวะในระบบทางเดินอาหารได้เป็นอย่างดี จึงสามารถที่จะเหลือรอดไปก่อโรคที่ลำไส้ได้

สำหรับในประเทศไทยนั้น จากงานวิจัยก่อนหน้าซึ่งเป็นการตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157 ในตัวอย่างเนื้อวัว สามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้เป็นจำนวนมาก (Suthienkul et al., 1990; Vuddhakul et al., 2000; Sukhumungoon et al., 2011a) และพบมาตลอดในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา อีกทั้งสามารถพบแอนติบอดีต่อ O157 ได้สูงในประชากรไทยอีกด้วย (Vuddhakul et al., 2000) นั้นแสดงให้เห็นว่า ประชากรไทยมีการได้รับเชื้อที่มี O157 antigen แล้ว ยิ่งไปกว่านั้น ประชากรไทยในแถบภาคใต้เป็นประชากรที่มีการนับถือมุสลิมเป็นจำนวนมาก จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะเกิดการปนเปื้อนเชื้อจากเนื้อวัวดิบ เนื้อแพะดิบ ไปยังเครื่องมือเครื่องใช้และอาหารได้ อย่างไรก็ตาม ตลอดเวลาเกือบ 30 ปีที่ผ่านมาตั้งแต่มีการระบาดของ O157 ครั้งแรก ยังไม่มีรายงานการก่อโรคโดยเชื้อ O157 ในประเทศไทยเลย ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ จึงมุ่งหวังเพื่อตรวจหา EHEC รวมถึง Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) ซีโรทัยป์ต่างๆจากตัวอย่างอุจจาระของผู้ที่เกิดอาการอุจจาระร่วง รวมถึง ซี

โรทัยป์ O157 อย่างละเอียดเป็นเวลานานเพียงพอที่จะสรุปได้ว่าการก่อโรคโดยเชื้อ STEC ในประชากร
ในเขตภาคใต้หรือไม่ ยิ่งไปกว่านั้นยังมุ่งศึกษา virulent factors ของ EHEC/STEC ที่แยกได้ เพื่อใช้เป็น
แนวทางในการป้องกันและควบคุมการระบาดของเชื้อชนิดนี้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเชื้อ EHEC/STEC จากผู้มีอาการอุจจาระร่วงในเขตอำเภอหาดใหญ่
2. เพื่อตรวจสอบจีโนม *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *rfbO157* ของ EHEC/STEC ที่แยกได้โดยเทคนิค polymerase chain reaction
3. ตรวจสอบเครื่องหมายความรุนแรงในการก่อโรค ของ EHEC/STEC โดยวิธีการตรวจชนิดของจีน Q (*Q*₉₃₃ หรือ *Q*₂₁)
4. ตรวจสอบซีโรทัยป์ของเชื้อโดยวิธี polymerase chain reaction และวิธี agglutination assay
5. สร้าง antibiogram pattern ของเชื้อที่แยกได้
6. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ระหว่างสายพันธุ์ EHEC/STEC ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) แล้วเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA
7. เพื่อตรวจหาเชื้อ EHEC/STEC รวมถึงเชื้อซีโรทัยป์ O157 ในเชิงปริมาณ จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายในเขตอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
8. เพื่อแยกเชื้อ EHEC/STEC O157 จากตัวอย่างเนื้อสัตว์โดยวิธี immunomagnetic separation

บทที่ 2

บทตรวจเอกสาร

2.1 การค้นพบ *E. coli* O157:H7

E. coli O157:H7 นั้น พบการระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 โดยสามารถแยกเชื้อได้จากผู้ป่วย ลำไส้อักเสบที่มีอาการท้องเสียแบบเป็นมูกเลือด จากการรับประทานแฮมเบอร์เกอร์เนื้อวัวที่สุกๆดิบๆ (Riley et al., 1983) นับตั้งแต่การพบการติดเชื้อ EHEC O157:H7 ครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อปี 1982 เป็นต้นมา ก็พบการระบาดของเชื้อเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆทุกปี จากการสำรวจการติดเชื้อ EHEC O157:H7 ในประเทศสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี 1982 จนถึงปี 2002 พบว่าในแต่ละปีมีผู้ที่ติดเชื้อ EHEC O157:H7 เฉลี่ย 73,000 ราย เข้ารับการรักษาตัวที่โรงพยาบาล 2,168 ราย และเสียชีวิตจำนวน 61 ราย (Rangel et al., 2005) นอกจากนี้ ยังพบการระบาดในทวีปยุโรป (Dundas et al., 2001) รวมถึงประเทศ ญี่ปุ่นอีกด้วย (Watanabe et al., 1999)

นอกจาก *E. coli* O157:H7 ที่มีความสำคัญมากในการก่อให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรงในมนุษย์ แล้ว เชื้อ EHEC/STEC ซีโรทัยป์อื่นๆ ก็สามารถมีบทบาทสูงในการก่อโรคเช่นกัน เช่น ซีโรทัยป์ O26, O111, O145 เป็นต้น

2.2 การระบาดของเชื้อ O157:H7 ในประเทศไทย

นับเป็นเวลากว่า 30 ปี ตั้งแต่มีการรายงานของการติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ครั้งแรกในประเทศ สหรัฐอเมริกา แต่ยังไม่มีการพบการติดเชื้อชนิดนี้ในผู้ป่วยท้องร่วงในประเทศไทยเลยแม้แต่รายเดียว ในช่วงกว่า 30 ปีที่ผ่านมา มีความพยายามจากนักวิจัยหลายกลุ่มในประเทศไทย Seriwatana et al. (1988) ใช้วิธี colony hybridization ที่จำเพาะกับจีน *stx*₁ และ *stx*₂ ในการตรวจสอบเชื้อจากลำไส้จากผู้ป่วยท้องร่วงทั้งแบบที่มี และไม่มีมูกเลือดในช่วงปี ค.ศ. 1980-1987 พบว่าให้ผลลบต่อจีน *stx* ทั้งหมด ยกเว้น 1 ไอโซเลทที่พบว่าเป็น *S. dysenteriae* ในปีถัดมา Brown et al. (1989) ใช้ probe ที่จำเพาะต่อ *stx*₁ และ *stx*₂ ในการตรวจหา STEC ในเด็กอายุน้อยกว่า 5 ขวบที่มีอุจจาระร่วงเป็นมูกเลือด รวมถึงทารก (อายุไม่เกิน 6 เดือน) ที่มีอุจจาระร่วง ผู้ป่วยเหล่านี้เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า และโรงพยาบาลเด็ก กรุงเทพมหานคร จากผลการตรวจหา STEC จากเด็กจำนวน 4 ราย จาก 54 ราย ที่มีอุจจาระแบบมีมูกเลือด และพบ STEC จากเด็ก 3 ราย จาก 50 ราย จากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม จากกลุ่มเด็กทารกจำนวน 115 ราย รวมถึงกลุ่มควบคุมอีก 119 รายนั้น ไม่พบ STEC

ในปี ค.ศ. 2003 Leelapom et al. ตรวจหา diarrheagenic *E. coli* จากผู้ป่วยท้องร่วงจำนวน 314 ราย ที่ได้จากผู้ป่วยท้องร่วงแบบมีมูกเลือด แบบไม่มีมูกเลือด และจากกลุ่มควบคุม โดยวิธี multiplex-PCR พบ STEC จำนวน 2 ไอโซเลทที่มี *stx*₁ จากเด็กที่ท้องร่วงแบบไม่มีมูกเลือด เชื้อทั้งสอง

ไอโซเลทที่มีผลการทดสอบซีโรทัยป์เป็น O26:H- และ O111:H- อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสนใจว่า สามารถพบ *E. coli* O157:H7 จากเด็กในกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี และมีจีน *stx*₁ และ *stx*_{2v}

ในปี ค.ศ. 2004 Ratchtrachanchai et al. รายงานการตรวจสอบตัวอย่างอุจจาระจากเด็กไทยจำนวน 2100 รายจากทั่วประเทศ ที่ทำการตรวจสอบระหว่างปี ค.ศ. 1996-2000 พบ STEC เพียง 1 ไอโซเลทจากจำนวนทั้งสิ้น 2,629 ไอโซเลท และเชื้อมีจีน *stx*₁ *stx*₂ และ *eae*

ดังนั้น พอที่จะสรุปได้ว่า การพบ *E. coli* O157:H7 ในประเทศไทยนั้นไม่สามารถที่จะพบได้ และการพบ STEC จากตัวอย่างผู้ป่วยท้องร่วงในประเทศไทยก็มีรายงานน้อยมาก การพบ antibody ที่จำเพาะต่อ O157 ในคนไทยในปริมาณสูง (Vuddhakul et al., 2000) อาจสามารถอธิบายการพบการติดเชื้อ O157 ในอัตราที่ต่ำในประเทศไทย

2.3 ปัจจัยก่อโรคของเชื้อ

ในการจัดจำแนกว่าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ใดเป็น EHEC นั้น ทำได้โดยตรวจหาจีนก่อโรค 2 ชนิดคือ *stx* (ไม่ว่าจะมีเพียง *stx*₁ หรือ *stx*₂ หรือมีทั้งคู่) และมีจีน *eae* ส่วนการจัดจำแนกว่าเป็น STEC นั้นสามารถตรวจสอบโดยการพบเพียงจีน *stx* เท่านั้น

Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) คือ *E. coli* ที่สามารถสร้าง Shiga toxin โดยสร้างจากจีน *stx* แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ *stx*₁ และ *stx*₂ โดยแบ่งตามลักษณะความแตกต่างทาง DNA sequences ของจีน และการไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกันทางอิมมิวโนวิทยา Shiga toxin ประกอบด้วย 2 subunits คือ subunit A ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยอีก 2 หน่วยคือ A1 ขนาด 28 กิโลดาลตัน และ A2 ขนาด 4 กิโลดาลตัน และ subunit B ขนาด 35 กิโลดาลตัน (B subunit เป็น pentamer ประกอบด้วยหน่วยย่อย 5 หน่วยขนาด 7 กิโลดาลตันที่เหมือนกัน)

A1 subunit มีกิจกรรมของเอนไซม์ *N*-glycosidase ทำหน้าที่ดึงกรดอะมิโน alanine 1 โมเลกุลออกจาก 28s ribosomal RNA ยังผลให้เกิดการหยุดการสร้างโปรตีน นำไปสู่การตายของเซลล์ A2 subunit ทำหน้าที่เป็นส่วนเชื่อมต่อระหว่าง A1 subunit และ B subunit โปรตีนในส่วน A subunit สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดย Shiga toxin ใช้ส่วน B subunit ในการเกาะกับ receptor บนผิวเซลล์ที่ชื่อว่า globotriaosylceramide (Gb3)

EHEC คือ STEC ที่มีจีน *eae* ซึ่งเป็นจีนที่ใช้เป็นแม่แบบสร้างโปรตีน intimin ซึ่งเป็นปัจจัยก่อให้เกิดการเกาะติดที่ผนังลำไส้ของเชื้อกับโฮสต์ เป็น outer membrane โปรตีน ที่ถูกสร้างมาจากจีน *eae* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ในส่วนของ Locus of enterocyte effacement (LEE) จีน *eae* นี้พบได้ทั้ง EPEC และ EHEC รวมไปถึง *Citrobacter rodentium* และ *Hafnia alvei* (Nataro and Kaper, 1998) ในช่วงระยะเริ่มแรกของการเกิดพยาธิสภาพนั้น intimin จะช่วยในการเกาะติดระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับเซลล์เจ้าบ้าน โดยแบคทีเรียจะแทรกโปรตีนที่มีขนาด 90 กิโลดาลตันที่ชื่อว่า Translocation of intimin receptor (Tir) เข้าไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านก่อน จากนั้น จึงใช้โปรตีน intimin จับกับโปรตีน Tir ที่แทรกเข้าไปก่อนหน้านี้ ทำให้เกิดการเกาะติดของแบคทีเรียอย่างแนบแน่นกับเซลล์เจ้าบ้าน หลังจาก

นั่นจึงเกิดการส่งสัญญาณทำให้เกิดการรวมตัวกันของ โปรตีน actin ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ การรวมตัวของ actin ส่งผลให้เกิดการนูนขึ้นของเยื่อหุ้มเซลล์ เรียกว่า pedestal ยกตัวเซลล์ของแบคทีเรียขึ้นเกิดลักษณะตามมาด้วยการเกิดการทำลายเซลล์ microvilli ลักษณะพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นเรียกว่า attaching and effacing (A/E) lesion เมื่อเกิดการทำลายเซลล์ลำไส้ทำให้เกิดการถ่ายอุจจาระแบบเป็นมูกเลือด และ Stx ที่เชื้อสร้างบางส่วนอาจผ่านเข้าไปในระบบไหลเวียนโลหิตเกิดพยาธิสภาพอื่นๆได้ หลังจากการติดเชื้อผู้ป่วยจะมีอาการทางพยาธิวิทยา คือ อุจจาระร่วงเป็นมูกเลือด (Haemorrhagic colitis; HC) ซึ่งจะสามารถตรวจพบเชื้อจากอุจจาระนั้นได้ นอกจากนี้ อาจจะมีอาการที่รุนแรงตามมา เนื่องจาก Shiga toxin เข้าสู่กระแสโลหิต สารพิษทำลาย endothelial cells ที่บุภายในหลอดเลือด ทำให้เกร็ดเลือดเกิดการเกาะกลุ่มส่งผลให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลายจากแรงดันที่เพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด ที่สำคัญ สารพิษจะถูกนำพาไปยังอวัยวะที่มีตัวรับ (receptor) สารพิษอยู่ เช่น สมอ (Ergonul et al., 2003) และไต ทำให้เกิดไตวาย (Hemolytic uremic syndrome; HUS) (Karmali et al., 1983) และเสียชีวิตได้ในที่สุด

E. coli O157 ที่มีจีน *stx* อาจสร้างสารพิษ Stx ได้น้อย หรือไม่สามารสร้างสารพิษ Stx ได้ เนื่องจากความบกพร่องของจีนในแบคทีเรียโอฟาจ 2 ประการคือ การมีกิจกรรมของ Q จีนต่ำซึ่งส่งผลให้มีการสร้าง messenger RNA (mRNA) ของจีน *stx* น้อยหรือไม่เลย อีกประการหนึ่งคือ ความบกพร่องของ promoter ของจีน *stx* เอง (Koitabashi et al., 2006) การทดสอบการสร้าง Stx ทำได้ 2 วิธีคือ การตรวจสอบกิจกรรมของ Q จีน โดยตรวจสอบการมีจีน Q ของแบคทีเรียโอฟาจ 21 ซึ่งเป็น จีน Q ชนิดที่มีกิจกรรม anti-termination ต่ำ โดยวิธี Toxin-non-producing PCR ซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้น ถ้าผล PCR ให้ผลบวกแสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีจีน Q ของแบคทีเรียโอฟาจ 21 ซึ่งจะสามารถอนุมานได้ว่าน่าจะมีการสร้าง Stx น้อย หรือไม่สร้างเลย อีกวิธีคือ การตรวจหา Stx โปรตีนโดยตรงโดยวิธี immunoassay เช่น Reverse passive latex agglutination (RPLA) assay เป็นต้น แม้ว่า *E. coli* O157:H7 จะเป็น ซีโรทัยป์ที่มีความสำคัญและมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค HUS แต่ *E. coli* ซีโรทัยป์อื่นที่ไม่ใช่ O157:H7 (non-O157) ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถสร้าง Stx และก่อโรคได้ในมนุษย์เช่นกัน (Bettelheim et al., 1990; Fey et al., 2000; Schmidt et al., 1999) จากรายงานของ Fey (2000) ซึ่งทำการศึกษา *E. coli* non-O157 ในสหรัฐอเมริกา แสดงให้เห็นว่า ความชุกของการเกิดโรคโดย *E. coli* non-O157 นั้นมีอัตราการเกิดใกล้เคียงกับ *E. coli* O157 ยิ่งไปกว่านั้น จากการศึกษาใน แคนาดา ยุโรป หรือออสเตรเลีย ก็พบว่า ความชุกของการเกิดโรคโดย *E. coli* non-O157 มีความใกล้เคียงหรืออาจจะจำนวนมากว่าการเกิดโรคโดย *E. coli* O157 ในการระบาดแต่ละครั้งของ *E. coli* non-O157 นั้น ซีโรทัยป์ที่มีบทบาทในการก่อโรคได้แก่ซีโรทัยป์ O111, O103, O26 และ O145 (Schmidt et al., 1999) ในปี 2006 มีการรายงานผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *E. coli* O104:H4 ที่ประเทศเกาหลี โดยผู้ป่วยมีอาการของ HUS (Bae et al., 2006) ยิ่งไปกว่านั้น ในปี 2011 ที่ผ่านมามีรายงานการระบาดของเชื้อ *E. coli* O104:H4 ซึ่งเป็น *E. coli* สายพันธุ์ใหม่ ระบาดทั่วทวีปยุโรป จากรายงานของ Robert Koch Institute พบว่า *E. coli* ที่พบเป็นสายพันธุ์ผสมระหว่าง enterohemorrhagic *E. coli* และ enteroaggregative *E. coli* (EAEC) โดยเชื้อสามารถสร้าง

Stx2 ได้ แต่ไม่สามารถสร้าง Stx1 และ intimin protein ได้ ส่วนปัจจัยการก่อโรคอื่นๆ เช่นปัจจัยก่อการเกาะติดนั้นเชื่อได้รับมาจาก EAEC

Hemorrhagic colitis

HC คืออาการของลำไส้ที่เกิดการอักเสบจนมีภาวะเลือดออกในลำไส้ HC ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *E. coli* O157 มีการรายงานในช่วงปี ค.ศ.1982 โดยพบในผู้ป่วยมีอาการท้องร่วงเป็นมูกเลือดที่รับประทานแฮมเบอร์เกอร์เนื้อวัวที่ปรุงสุกๆ (Riley *et al.*, 1983) ลักษณะสำคัญของการเกิด HC ก็คืออาการท้องร่วงแบบมีมูกเลือดปน (bloody diarrhea) การมีไข้ต่ำๆ (low-grade fever) ร่วมด้วยอาจพบได้ (Wells *et al.*, 1982) อาการท้องร่วงแบบมีมูกเลือดนั้น อาจเกิดตามหลังอาการท้องร่วงเป็นน้ำหลายวัน ปัจจัยที่สำคัญที่ก่อให้เกิด HC คือ Stx โดยพบรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นถึงผลของซิกาที่อกซิทต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของเหลวในลำไส้และการก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ในระบบลำไส้

ในส่วนของผลของซิกาที่อกซิทต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของของเหลวในลำไส้ นั้น พบว่าซิกาที่อกซิทสามารถทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้ที่อยู่ส่วนปลายของวิลลัส (absorptive villus tip epithelial cells) ที่ทำหน้าที่ดูดซึมสารอาหารและของเหลวเข้าสู่ร่างกาย แต่ซิกาที่อกซิทไม่ได้ทำลายเซลล์ส่วน crypt ของวิลลัสที่ทำหน้าที่ขับของเหลวออกเนื่องจากเซลล์ส่วนนี้มีตัวรับของซิกาที่อกซิทน้อย ดังนั้นจึงส่งผลให้มีผลต่างของการขับของเหลวออกมากกว่าการดูดซึมของเหลวกลับเข้าสู่ร่างกาย จึงเกิดภาวะมีของเหลวสะสมในช่องว่างของลำไส้ ส่งผลให้เกิดภาวะท้องร่วงได้ในที่สุด นอกจากนี้ยังพบอีกว่าซิกาที่อกซิทไม่ได้ทำให้เกิดอาการท้องเสียโดยใช้กลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดการขับไอออนของคลอไรด์ดังเช่นที่เกิดโดย heat labile-enterotoxin (LT) ที่เป็นปัจจัยก่อโรคใน ETEC

เมื่อเชื้อแบคทีเรียทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้ไปเป็นจำนวนมาก การทำลายเซลล์ลุกลามออกไปเป็นวงกว้าง และลึกลงไปในระดับของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) มีการทำลายเส้นเลือดฝอย (capillary vessel) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันนั้น ยังผลให้เกิดภาวะเลือดออกในลำไส้ได้ ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้เกิดภาวะถ่ายเป็นมูกเลือดตามมา

Hemolytic uremic syndrome

HUS เป็นสาเหตุหลักของการเกิดไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ในเด็กทั่วโลก การระบุว่าเป็นภาวะ HUS นั้น สามารถระบุได้โดยการตรวจพบ 3 อาการคือ

1. Microangiopathic hemolytic anemia
2. Thrombocytopenia
3. Acute renal failure (ARF)

HUS นั้น สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด โดยอาศัยความเกี่ยวข้องหรือไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการท้องเสีย

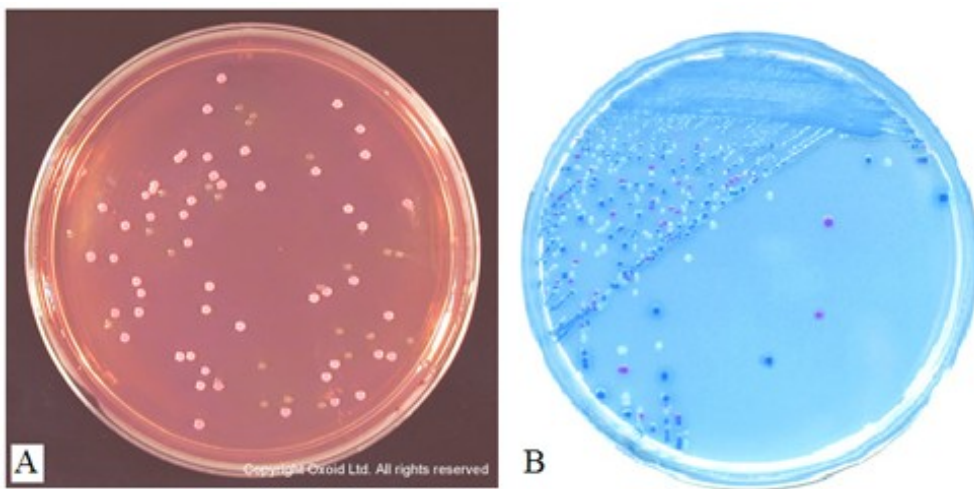
Typical HUS (tHUS) เป็นชนิดที่เกิดหลังจากมีอาการท้องเสียนำมาก่อน (prodrome of diarrhea) (D+HUS) การเกิด HUS ในเด็กส่วนใหญ่ นั้นพบว่าเป็น tHUS โดยสาเหตุของการเกิดภาวะ tHUS นี้ เกือบทั้งหมดเกิดจากการติดเชื้อ Shiga toxin-producing *E. coli* โดยเฉพาะอย่างยิ่งซีโรทัยป์ O157:H7 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 นั้น พบว่าผู้ป่วยร้อยละ 6-9 จะมีการพัฒนาของโรคต่อไปจนเกิดภาวะ tHUS ได้ภายในระยะเวลาประมาณ 5-10 วันหลังจากติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ภาวะไตวายเฉียบพลันนั้นมีความรุนแรงของการเกิดตั้งแต่มีการพบเลือดปนมากับปัสสาวะ (haematuria) มีการพบโปรตีนปนมากับปัสสาวะ (มากกว่า 150 มิลลิกรัมต่อวัน) (proteinuria) และการเกิดการขับปัสสาวะน้อยขั้นรุนแรง (severe oliguria) การเกิดไตวายเฉียบพลันโดยมีการปัสสาวะน้อยกว่า 100 มิลลิลิตรต่อวันหรือไม่มีการปัสสาวะเลย (anuria) นั้น สามารถพบได้ประมาณร้อยละ 40 และมีความจำเป็นต้องเข้ารับการรักษาโดยวิธีการฟอกไต (dialysis)

Atypical HUS (aHUS) เป็น HUS ชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดท้องเสีย (D-HUS) ภาวะ aHUS นี้สามารถพบได้ประมาณ 10% ของการเกิด HUS ทั้งหมดในเด็ก สาเหตุที่แน่นอนของการเกิด aHUS นั้นในบางรายยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเกิด aHUS นั้น เกิดในสภาวะที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* มาก่อน จากการศึกษาของ Nathanson and Deschenes (2001) ได้แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยเด็กจำนวน 9 ราย จากทั้งหมด 11 รายที่มีภาวะ HUS ที่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *S. pneumoniae* จะเกิดภาวะ ARF อย่างรุนแรง นอกจากนี้พบว่า จากผู้ป่วยทั้งหมด พบผู้ป่วย 5 รายที่มีการพัฒนาของโรคจนกลายเป็นภาวะที่ไตสูญเสียหน้าที่การทำงานไป (chronic renal failure) และ 3 รายที่มีการพัฒนาของโรคจนเข้าสู่ภาวะไตวาย (end-stage renal disease) ในระยะเวลา 4-11 ปีต่อมา ซึ่งเมื่อเข้าสู่ภาวะนี้แล้ว ผู้ป่วยต้องการการฟอกไตจนกว่าจะได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนไต (kidney transplantation) นอกจากนี้ความเกี่ยวข้องระหว่าง aHUS กับการติดเชื้อ *S. pneumoniae* แล้ว ปัจจัยอื่นที่พบ เช่น การติดเชื้อ Human immunodeficiency virus (HIV) ปัจจัยทางพันธุกรรมของตัวผู้ป่วยเองซึ่งมีการบกพร่องในส่วนของจีนสร้าง factor H (FH) (FH เป็นไกลโคโปรตีนที่อยู่ในพลาสมาในระบบไหลเวียนโลหิตของมนุษย์ ทำหน้าที่ควบคุมการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์), ความบกพร่องในปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับวิตามิน B12 เป็นต้น

การพบอาการเพียงแค่ 2 อาการจากทั้งหมด 3 อาการของการเกิด HUS ตามปกติ คือ มีการพบ ARF ร่วมกับ hemolytic anemia หรือ มีการพบ ARF ร่วมกับ thrombocytopenia เรียกภาวะนี้ว่า Incomplete HUS

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกเชื้อ *E. coli* O157

เนื่องจากเชื้อ *E. coli* O157:H7 เป็นเชื้อที่มีความสำคัญมากที่สุดในกลุ่ม EHEC/STEC ดังนั้นในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการแยกแยะความแตกต่างระหว่างเชื้อ *E. coli* O157 ออกจากเชื้อ non-O157 คือ sorbitol MacConkey agar (SMAC) (March and Ratnam, 1986) ซึ่งเป็นอาหารที่มีพื้นฐานมาจากอาหาร MacConkey agar แต่เปลี่ยนมาใช้น้ำตาล sorbitol แทนน้ำตาล lactose



<http://www.oxid.com/omd/library/fullsize/CM0813.jpg>

<http://www.jsunitech.com/product/culture/images/O157.jpg>

รูปที่ 1 โคลนที่ไม่มีสีของเชื้อ *E. coli* O157 บนอาหาร SMAC (A) และโคลนสีม่วงอมชมพูของเชื้อ *E. coli* O157 บนอาหาร CHROMagar O157 (B)

เนื่องจากมีรายงานว่า *E. coli* O157 ส่วนใหญ่ ไม่สามารถใช้น้ำตาล sorbitol ได้ ทำให้มีการแสดงโคลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสีออกมา ส่วน *E. coli* อื่นๆ สามารถใช้น้ำตาล sorbitol ได้ (Bielaszewska and Karch, 2001) โดยอาศัยการที่เชื้อ O157 ไม่สามารถใช้น้ำตาล sorbitol ได้นี้เองทำให้อาหาร SMAC เป็นอาหารที่มีประสิทธิภาพและเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อ *E. coli* อาหารอีกชนิดที่มีความสำคัญต่อการแยกเชื้อ *E. coli* O157 คือ CHROM O157 agar ซึ่งจะให้สีของโคลนของ O157 เป็นสีม่วงอมชมพู เนื่องจากเชื้อไม่มีเอนไซม์ เบต้ากลูโคโรนிடาส (รูปที่ 1)

สำหรับอาหาร CHROMagar นี้ ได้มีการคิดค้นพัฒนาสูตรอาหารที่มีความจำเพาะต่อการแยกเชื้อ STEC ซีโรทัยป์อื่นนอกเหนือจาก O157 อีกด้วย และพบว่าให้ประสิทธิภาพในการแยกเชื้อที่ดี

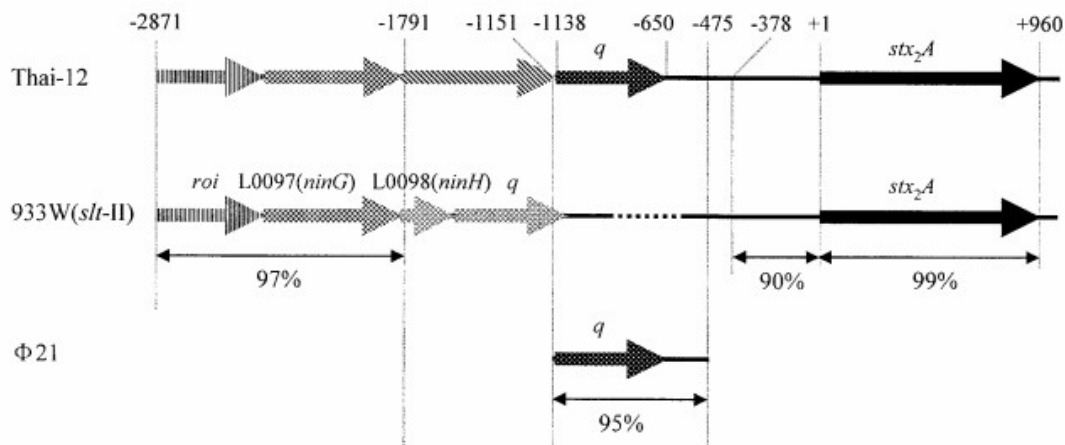
วิธี immunomagnetic separation (IMS) เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการแยกเชื้อต่างๆ เนื่องจากเป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มความเป็นไปได้ในการแยกเชื้อที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธี IMS นี้สามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ เพื่อช่วยในการแยกเชื้อที่ต้องการได้อย่างหลากหลาย เช่นการใช้วิธี IMS ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ หรือใช้ร่วมกับวิธี Flow Cytometry เป็นต้น หลักการของวิธีนี้คือ ใช้เม็ดแม่เหล็กเคลือบด้วยแอนติบอดีต่อ O157 antigen แล้วนำไปผสมกับเชื้อที่เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแล้ว ถ้าในตัวอย่างทดสอบ มีเชื้อ *E. coli* O157 เชื้อจะถูกจับโดยแอนติบอดีที่เคลือบบนเม็ดแม่เหล็ก หลังจากนั้นทำการดึงชุดเม็ดแม่เหล็กที่กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลับมาโดยใช้แท่งแม่เหล็กชุด จะทำให้ได้เชื้อ *E. coli* O157 ที่เกาะอยู่ที่เม็ดแม่เหล็กกลับมาด้วย เมื่อนำเม็ดแม่เหล็กที่มีเชื้อเหล่านั้นไปเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็จะทำให้สามารถแยกเชื้อ *E. coli* O157 ออกมาได้

2.5 Stx2-negative strains

ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย จากข้อมูลก่อนหน้านี้ (Sukhumungoon et al., 2011a; Sukhumungoon et al., 2011b) แสดงให้เห็นว่า เชื้อ STEC/EHEC ที่แยกได้จากเนื้อวัวนั้น มีจีน *stx* อยู่และยังสามารถสร้างสารพิษชิกาท็อกซินได้ในระดับสูงอีกด้วย (Sukhumungoon et al., 2011b) อย่างไรก็ตาม สำหรับซีโรทัยป์ O157:H7 พบผลการทดลองที่ตรงกันข้ามคือ เชื้อ EHEC O157:H7 ที่พบทั้งหมดมีจีน *stx* แต่ไม่สามารถสร้างสารพิษชิกาท็อกซินได้เลย จึงเรียก *E. coli* O157 สายพันธุ์ดังกล่าวว่า Stx2-negative strain (Koitabashi et al., 2006) จากการทดลองของ Koitabashi และคณะ (2006) พบว่า *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเนื้อวัวและมูลวัวในประเทศไทยมีจีน *stx*₂ แต่สามารถสร้าง Stx2 ได้ในปริมาณน้อยมาก หรือไม่สามารถสร้างได้เลย จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Q จีน รวมถึงโปรโมเตอร์ของ *stx* จีนในเชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ Thai-12 ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเชื้อ O157:H7 ที่เป็น Stx2-negative strain พบว่า Q จีนของ *stx*-phage ในสายพันธุ์ Thai-12 มีความเหมือนกับ Q จีนของแบคทีริโอเฟจ 21 (Q₂₁) ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ในทางตรงข้าม Q จีนของ *stx*-phage ในสายพันธุ์ Thai-12 นั้นมีความเหมือนกับ Q จีนของ phage 933W (Q₉₃₃) ที่แทรกอยู่ใน *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 เพียง 52 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (รูปที่ 2) Q₉₃₃ พบว่าเป็นโปรตีนที่มี anti-termination activity สูงซึ่งจะช่วยนำพา RNA polymerase ผ่านจุดสิ้นสุดการสร้าง mRNA (terminator) ได้ดี ทำให้มีการสร้าง Stx ได้มาก แต่ Q₂₁ พบว่ามี anti-termination activity ต่ำทำให้มีการสร้าง Stx ได้น้อย หรือไม่ได้เลย การศึกษาของ Koitabashi และคณะ (2006) สอดคล้องกับการศึกษาของ Lejeune และคณะ (2004) ที่พบว่า Q₉₃₃ และ Q₂₁ ถือเป็น markers สำหรับ *E. coli* O157:H7 ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค และไม่รุนแรงในการก่อโรคตามลำดับ

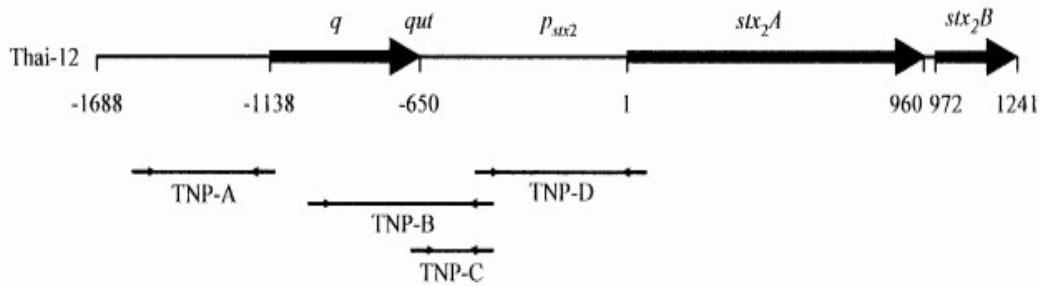
นอกจากนั้นพบว่า โปรโมเตอร์ของ *stx*-phage ในสายพันธุ์ Thai-12 เมื่อนำมาเทียบกับโปรโมเตอร์ของแบคทีริโอเฟจ 933W แล้วพบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสในสายพันธุ์ Thai-12 ไป 2 นิวคลีโอไทด์ โดยตำแหน่งแรกเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง -35 มีการเปลี่ยนจากเบส C เป็น A ส่วนอีกตำแหน่งเกิดการเปลี่ยนแปลงใกล้กับตำแหน่ง -10 โดยมีการเปลี่ยนจากเบส G เป็น A ยิ่งไปกว่านั้น

พบว่าเกิดการแทรกเข้ามาของ Thymine จำนวน 1 นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งระหว่าง ribosome binding site กับ start codon จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เชื่อได้ว่า การที่ *E. coli* O157:H7 ที่มีจีน *stx*₂ แต่ไม่สามารถสร้าง Stx2 ได้ นั้น เป็นเพราะ Q จีน มีความสามารถในการเกิด anti-terminator ต่ำ ประกอบกับโปรโมเตอร์ของ *stx*-phage นั้นไม่สามารถทำงานได้เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในตัวโปรโมเตอร์และตำแหน่งใกล้กับ ribosome binding site



รูปที่ 2 การเปรียบเทียบความเหมือนของ Q จีนของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 และ Thai-12 เมื่อเทียบกับแบคทีริโอเฟจ 21 (ดัดแปลงจาก Koitabashi et al., 2006)

ดังนั้น จึงมีการทำ PCR เพื่อใช้ตรวจสอบความสามารถในการไม่สามารถสร้าง Stx เรียกว่า Toxin-non-producing (TNP) PCR โดยออกแบบ oligonucleotide primers ขึ้นโดยใช้นิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Q จีน รวมถึงบริเวณโปรโมเตอร์ของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ Thai-12 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้าง Stx2 ได้มาเป็นต้นแบบ (รูปที่ 3) ปฏิบัติการ PCR ที่ใช้ทดสอบมี 4 ปฏิบัติการคือ TNP-A, TNP-B, TNP-C และ TNP-D ถ้าผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 4 ปฏิบัติการถือว่าเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ที่ทดสอบไม่สามารถสร้าง Stx2 ได้



รูปที่ 3 ตำแหน่งจีโนมของ *stx*₂-phage ที่แทรกตัวอยู่ใน *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ Thai-12 ที่ primers ที่ใช้ในการทำ TNP-PCR สามารถเข้าจับได้ (ดัดแปลงจาก Koitabashi et al., 2006)

2.6 *stx*₂ phage integration sites

เนื่องจากการปรากฏของจีน *stx*₂ ในเชื้อ EHEC/STEC นั้น เกิดจากการที่ *stx*₂ phage เข้าไปแทรกอยู่ร่วมกับจีโนมของแบคทีเรีย โดยในแบคทีเรียที่เรียก นั้น จีนที่เหมาะสมที่ *stx*₂ phage จะเข้าไปแทรกอยู่ มีการรายงานไว้จำนวน 5 ตำแหน่งด้วยกันคือ *wrbA* (สร้าง quinilone oxidoreductase) (Toth et al., 2003), *yecE* (unknown function) (DeGreve et al., 2002), *yehV* (transcriptional regulator) (Shaikh and Tarr, 2003), *sbcB* (exonuclease I) (Onishi et al., 2002), และ Z2577 (oxidoreductase) (Koch et al., 2003) จีนที่เป็นตำแหน่งในการแทรกของ *stx*₂ phage ส่วนใหญ่แล้วเป็น housekeeping genes การแทรกของ *stx*₂ phage นั้นทำให้เกิดการวิวัฒนาการของ EHEC/STEC โดยมีรายงานระบุว่า การแทรกของ phage นั้น จัดเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *E. coli* O157:H7 (Ooka et al., 2009) กระบวนการแทรกเข้าสู่จีโนมของแบคทีเรียโดย *stx*₂ phage นั้น เกิดผ่านกระบวนการ transposition หรือ site-specific recombination ในการบวนการแทรกตัวของ *stx*₂ phage นั้น เมื่อบุกรุกเข้าไปในแบคทีเรียแล้ว *stx*₂ phage จะแทรกเข้าไปในตำแหน่งที่เหมาะสมกับตัวมันที่สุดก่อน (primary site) ถ้าตำแหน่งที่เหมาะสมกับมันที่สุดมี phage ตัวอื่นแทรกอยู่ก่อนแล้ว phage ตัวที่เข้ามาภายหลังจะไปแทรกยังตำแหน่งที่เหมาะสมกับมันเป็นลำดับถัดไป (Serra-Moreno et al., 2007) รายงานจากประเทศสเปนระบุว่า จีนที่เป็น primary site สำหรับการแทรกตัวของ *stx* phage ใน *E. coli* O157:H7 คือ *yehV* อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาคูของ Sukhumungoon and Nakaguchi (2013) ซึ่งทำการตรวจสอบ integration site ของเชื้อ O157:H7 ที่แยกได้จากเนื้อสัตว์ในประเทศไทยในช่วงระหว่าง 1998-2012 จำนวน 41 สายพันธุ์ พบว่า primary integration site คือ *sbcB* นอกจากนี้ จากรายงานของ Mellmann et al. (2008) แสดงให้เห็นว่า *stx*₂ phage ชอบที่จะแทรกเข้าไปในจีน *yecE* ของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ที่สามารถหมักน้ำตาล sorbitol ได้ ดังนั้น จากข้อมูลทั้งหมดนี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ระบุว่า ในเซลล์เจ้าบ้านที่ต่างสายพันธุ์กัน *stx*₂ phage จะแทรกเข้าไปในจีนที่แตกต่างกันไปด้วย (Serra-Moreno et al., 2007) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า *stx* phage สามารถเกิดการสูญหายจากเซลล์แบคทีเรียได้ในระหว่างเกิดการติดเชื้อในมนุษย์ คาดว่าเกิดการบับคั้นโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

2.7 Molecular typing

2.7.1 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

RFLP เป็นเทคนิคที่ใช้หลักการที่ว่า จีโนมสายยาวของจุลินทรีย์โดนตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ กลายเป็น DNA สายที่สั้นลงจำนวนมาก โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกันเมื่อถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วหนึ่งๆ จะให้แบบแผนของ DNA ที่มีขนาดเท่าๆกัน เมื่อนำมาแยก DNA ที่ถูกตัดแล้วดังกล่าวโดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้แรงดันไฟฟ้าและเวลาที่เหมาะสมแล้ว จะทำให้ได้รูปแบบของ DNA ที่ถูกตัดใน agarose เป็นรูปแบบเดียวกัน ในทางตรงกันข้าม จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กันก็จะให้รูปแบบของ DNA ใน agarose gel ที่ต่างกัน ด้วยวิธีนี้ จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างและจัดลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ได้ ข้อเสียของวิธีนี้ก็คือ การสกัด DNA ออกมาจากเซลล์แบคทีเรีย นั้น มีความเสี่ยงต่อการฉีกขาดของ DNA ที่สกัดได้จากแรงกระทำทางกายภาพภายนอก ส่งผลให้ DNA เกิดแตกหักในบางตำแหน่งโดยที่ไม่สามารถควบคุมและทราบได้ ผลที่เกิดขึ้นก็คือ จะเกิดลักษณะแบบแผน DNA ที่ปรากฏใน agarose gel electrophoresis ที่แตกต่างออกไป ทั้งๆที่เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน

2.7.2 Arbitrarily-Prime Polymerase chain reaction (AP-PCR)

AP-PCR ใช้หลักการของการทำ PCR ทั่วไป แต่ primer ที่ใช้เป็น primer ที่มีขนาดสั้น ประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์เท่านั้น และใช้อุณหภูมิในส่วนของการ annealing temperature ที่ต่ำมาก เพื่อที่ว่า primer สายสั้นๆนั้น สามารถไปจับกับ DNA ต้นแบบได้หลายตำแหน่ง เมื่อเข้าสู่ขั้นตอน extension แล้ว จะทำให้ได้ amplicons ที่มีขนาดหลากหลาย ขึ้นกับตำแหน่งที่ primer สายสั้นๆนั้นไปเกาะ จุลินทรีย์ที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันก็จะถูกเกาะโดย primers ที่ตำแหน่งเดียวกัน ได้ amplicons ขนาดเท่าๆกัน เมื่อนำไปตรวจสอบ amplicons จะทำให้ได้รูปแบบ DNA ใน agarose gel ที่เป็นรูปแบบเดียวกัน จุลินทรีย์ที่เป็นคนละสายพันธุ์จะให้รูปแบบ DNA ใน agarose gel ต่างกัน จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างและจัดลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ได้ วิธีนี้มีข้อด้อยก็คือ การใช้ DNA แม่แบบที่ต้องสกัดออกมา DNA แม่แบบดังกล่าวก็อาจจะแตกหักได้ในขั้นตอนการสกัด อีกทั้ง การใช้ primer สายสั้นๆในปฏิกิริยา PCR ที่จำเพาะ การเปลี่ยนแปลงขั้นตอนและเวลาในการทำ PCR แต่ครั้งเพียงเล็กน้อย อาจส่งผลให้เกิดมีแถบ DNA ที่เปลี่ยนไปจากเดิมได้ ความน่าเชื่อถือของวิธีนี้จึงต่ำกว่าวิธีอื่นๆ

2.7.3 IS-printing

Insertion sequence คือกลุ่มของสารพันธุกรรมที่มีขนาดเล็ก และเคลื่อนที่ไปมาภายในจีโนมของแบคทีเรียได้ ขนาดของ insertion sequence นั้นหลากหลาย โดยมีขนาดตั้งแต่ร้อยถึงหลายพันคู่เบส และปกติมักจะมีการแสดงออกของจีโนมเป็นเอนไซม์ transposase ซึ่งช่วยในการเคลื่อนที่ไปมาของ insertion sequence

ใน *E. coli* O157 นั้น พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อขึ้นกับการที่มีแบคทีเรียโอฟาจและ insertion sequence ไปแทรกอยู่ตรงตำแหน่งต่างๆในจีโนมของแบคทีเรีย ดังนั้นในการหาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ สามารถทำได้โดยการหาตำแหน่งของ insertion sequence วิธี IS-printing อาศัยการที่แบคทีเรียมี insertion sequence 629 (IS629) อยู่ในจีโนมของมัน สามารถตรวจสอบ โดยใช้วิธี PCR ในการตรวจสอบจำนวนของ IS629 primers ที่ใช้ในการตรวจสอบ มีจำนวนทั้งสิ้น 32 คู่ แบ่งออกเป็น 2 เซ็ท เซ็ทละ 16 คู่ (Ooka et al., 2009) สามารถตรวจสอบ IS629 จำนวน 32 ตำแหน่ง ถ้าแบคทีเรียเป็นสายพันธุ์เดียวกันก็จะให้ amplicons ที่เพิ่มจำนวนจาก IS629 ขนาดและจำนวนเท่ากัน ถ้าเป็นคนละสายพันธุ์ก็จะให้จำนวน IS629 ที่ถูก amplify ออกมาไม่เท่ากัน เมื่อนำไปตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis จึงทำให้ได้รูปแบบ DNA ไม่เหมือนกันไปด้วย

2.7.4 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

ในการตรวจสอบลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprinting) โดยใช้วิธี RFLP นั้น จำเป็นที่จะต้องสกัด DNA ของจุลินทรีย์ออกมาให้อยู่ในหลอดทดลองก่อน โดยใช้สารเคมีหรือวิธีทางกายภาพ จากนั้นจึงค่อยนำมาตัดให้กลายเป็น DNA สายสั้นลงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ อย่างไรก็ตามการสกัด DNA ออกมาจากเซลล์ของจุลินทรีย์ ไม่อาจหลีกเลี่ยงการฉีกขาดของสาย DNA โดยปัจจัยทางกายภาพขณะสกัดได้ ทำให้รูปแบบลายพิมพ์ DNA ที่ออกมามีความผิดพลาดเกิดขึ้นได้ และไม่สะท้อนความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แท้จริงระหว่างจุลินทรีย์ที่ตรวจสอบ เพราะฉะนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการฉีกขาดของ DNA ที่สกัดออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ วิธี PFGE จึงถูกนำมาใช้

วิธี PFGE นั้น อาศัยการฝังเซลล์ของจุลินทรีย์ใน agarose ก่อน แล้วทำลายเซลล์ จุลินทรีย์ด้วยความร้อนประมาณ 50 – 55 องศาเซลเซียส และ proteinase K ทำให้เมื่อทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์แล้ว จีโนมของจุลินทรีย์จะถูกฝังอยู่ใน agarose gel โดยไม่ถูกแรงภายนอกมากกระทำให้เกิดการฉีกขาดเมื่อใส่ agarose gel ลงไปในหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะแทรกซึมผ่าน agarose gel เข้าไปตัดจีโนมของจุลินทรีย์ภายใน agarose gel นั้นเอง เมื่อนำไปผ่านกระแสไฟฟ้า จะทำให้ได้ลายพิมพ์ DNA ที่มีความน่าเชื่อถือ เพราะลายพิมพ์ DNA ที่เกิดขึ้น เกิดจากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะเท่านั้น มิได้เกิดจากการถูกทำให้ฉีกขาดโดยแรงกระทำภายนอก เพราะฉะนั้น วิธี PFGE จึงถือเป็นวิธีมาตรฐานที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด ณ ขณะนี้

บทที่ 3

เชื้อแบคทีเรีย วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1 แบคทีเรีย

ในการตรวจหาจีโนม *stx1*, *stx2*, *eae*, O157 ซีโรทัยป์ H7 ซีโรทัยป์ และ Q933 นั้น เชื้อที่ใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานคือ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร. มิตซึอากิ นิชิบุชิ จาก Center for Southeast Asian Studies มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น *E. coli* สายพันธุ์ Thai-12 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Luria Bertani broth (LB broth) (Novagen, Germany)
- Luria Bertani agar (LA) (Novagen, Germany)
- Tryptic soy broth (TSB) (Merck, Germany)
- Sorbitol MacConkey agar (SMAC) (Merck, Germany)
- CHROMagar O157 (CHROMagar, Paris, France)
- Mueller Hinton agar (MHA) (Difco, France)

3.3 สารเคมีและชุดทดสอบ

- Immunomagnetic separation kit (Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway)
- DNA purification kit (Geneaid, Taiwan)
- Suspension buffer [100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0]
- TE buffer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8.0]
- Lysis buffer [50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1% Sarcosyl]
- Agarose
- Proteinase K
- TBE buffer
- Xba I and Not I restriction endonuclease (New England Biolabs, USA)
- Oligonucleotide primers (ดังแสดงในตารางที่ 1)

3.4 อุปกรณ์

- Microbiological loop
- Autoclave machine
- Petri-dishes
- Microbiological safety carbinet class II
- Autopipette
- Test tube
- Incubator 37°C
- Water bath 42°C
- Thermal cycler
- UV-transilluminator
- Vernier caliper
- Gel electrophoresis set
- CHEF DRIII pulsed-field gel electrophoresis system (Bio-rad, USA)

ตารางที่ 1 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในการศึกษา

Primer's name	Sequences (5'to 3')	Gene	Annealing temperature	Amplicon size (bp)	Reference
EVT-1	CAACACTGGATGATCTCAG	<i>stx</i> ₁	55	350	Sukhumungoon <i>et al</i> , 2011
EVT-2	CCCCCTCAACTGCTAATA				
EVS-1	ATCAGTCGTCACTCACTGGT	<i>stx</i> ₂	50	404	Sukhumungoon <i>et al</i> , 2011
EVS-2	CCAGTTATCTGACATTCTG				
AE-19	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA	<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				
hlyA-F	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	<i>hlyA</i>	55	1,177	Yamamoto <i>et al</i> , 1995
hlyA-R	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA				
QEf-1	ATGCGGATCCACACTGGCGATAAAGAAGGG	<i>Q</i> ₉₃₃	55	567	Koitabashi <i>et al</i> , 2006
QEr-2	ATGCGGATCCTCGACTGCGTGGCAATGTAA				
QDf-1	ATGCGGATCCAAATCTCACATTGATTCAGG	<i>Q</i> ₂₁	51	561	Koitabashi <i>et al</i> , 2006
QDr-2	ATGCGGATCCATAGTGTGCTCATTGCTC				
escV-F	GGCTCTCTTCTTCTTTATGGCTG	<i>escV</i>	45	534	Müller <i>et al</i> , 2006
escV-R	CCTTTTACAACTTCATCGCC				

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Primer's name	Sequences (5'to 3')	Gene	Annealing temperature	Amplicon size (bp)	Reference
Z2577-F	AACCCATTGATGCTCAGGCTC	Z2577	53	909	Koch <i>et al</i> , 2003
Z2577-R	TTCCCATTTTACACTTCCTCCG				
<i>sbcB1</i>	CATGATCTGTTGCCACTCG	<i>sbcB</i>	50	1,800	Ohnishi <i>et al</i> ,
<i>sbcB2</i>	AGGTCTGTCCGTTTCCACTC				2002
<i>wrbA1</i>	ATGGCTAAAGTTCTGGTG	<i>wrbA</i>	47	600	Toth <i>et al</i> , 2003
<i>wrbA2</i>	CTCCTGTTGAAGATTAGC				
Primer A	AAGTGGCGTTGCTTTGTGAT	<i>yehV</i>	50	340	Shaikh and Tarr,
Primer B	AACAGATGTGTGGTGAGTGTCTG				2003
EC10	GCCAGCGCCGAGCAGCACAATA	<i>yecE</i>	60	400	DeGreve <i>et al</i> ,
EC11	GGCAGGCAGTTGCAGCCAGTAT				2002
<i>uidA-F</i>	ATCACCGTGGTGACGCATGTCGC	<i>uidA</i>	55	486	Heninger <i>et al</i> ,
<i>uidA-R</i>	CACCACGATGCCATGTTCATCTGC				1999

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 เก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากโรงพยาบาลขนาดใหญ่และโรงพยาบาลปัตตานี โดยเก็บจาก rectal swabs ที่ได้จากผู้มีอาการอุจจาระร่วง มาป้ายลงบนอาหารแข็งที่จำเพาะสำหรับการแยกเชื้อในขั้นต่อไป สำหรับขอบเขตการวิจัยและระยะเวลาในการแยกเชื้อนั้น ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2557 โดยทำการตรวจสอบไม่ต่ำกว่า 300 ตัวอย่าง

4.2 การแยกเชื้อ

นำ rectal swabs จากผู้ป่วย มาป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbital MacConkey agar (SMAC) แล้ว streak เชื้อเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยทำการบ่มเชื้อที่ streak แล้วไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชม. จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เป็นโคโลนีที่ไม่มีสี (colorless colony) จำนวน 3 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157 และทำการเลือกโคโลนีสีชมพู จำนวน 3 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนในการหาเชื้อ EHEC/STEC ซีโรทัยป์อื่นๆ ในส่วนของการเก็บเชื้อทั้งซีโรทัยป์ O157 และ non-O157 ทำได้โดย นำโคโลนีเดี่ยวๆที่แยกมาได้ มาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic Soy broth (TSB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชม. โดยมีรอบการเขย่าเพื่อให้อากาศเท่ากับ 150 รอบต่อนาที จากนั้น นำเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปผสมกับ 20% glycerol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของ glycerol เท่ากับ 10%) แล้วเก็บเป็น stock เชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบต่อไป

4.3 การตรวจสอบจีโนมต่าง ๆ ของเชื้อ

4.3.1 การเตรียม DNA template สำหรับปฏิกิริยา PCR

นำเชื้อโคโลนีเดี่ยว มาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชม. โดยมีรอบการเขย่าเพื่อให้อากาศเท่ากับ 150 รอบต่อนาที จากนั้น นำเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ไปต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที 5 นาที จากนั้น บั่นเหวี่ยงเศษเซลล์ให้ตกที่ 11,000 x g เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเศษเซลล์ตกแล้ว ดูดเฉพาะส่วน supernatant ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ deionized water ปราศจากเชื้อปริมาตร 90 ไมโครลิตร จะได้ DNA template สำหรับปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหาจีโนมต่าง ๆ ต่อไป

4.3.2 ทดสอบการมีจีโนม *stx* (Sukhumungoon et al., 2011a)

นำ template ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตรใส่ลงไปในองค์ประกอบ PCR ที่ประกอบด้วย 1X GoTaq reaction buffer, 0.4 μ M of each specific primer (EVT-1 และ EVT-2 หรือ EVS-1 และ EVS-2), 0.1 mM of dNTPs, 0.5 unit GoTaq DNA polymerase การทำ PCR นั้น ทำโดยมีปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ pre-heated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มวงจรการทำ PCR โดยทำ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที (สำหรับจีโนม *stx*₂ ใช้ annealing temperature ที่ 50 องศาเซลเซียส) และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ ปฏิกิริยาถูกดำเนินต่อที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที ตรวจหาสารพันธุกรรมหลังจากทำ PCR โดยการแยกชิ้นส่วนสารพันธุกรรมในกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 1% agarose ความดันไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วอ่านแถบสารพันธุกรรมโดยย้อมด้วย ethidium bromide ถ้าเชื้อที่ทดสอบมีจีโนม *stx*₁ จะให้แถบ DNA ขนาด 350 bp ส่วน *stx*₂ จะให้แถบ DNA ขนาด 404 bp เชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 ถูกใช้เป็นเชื้อควบคุมแสดงการมีจีโนม *stx*₁ และ *stx*₂

4.3.3 ทดสอบการมีจีโนม *eae* (Sukhumungoon et al., 2011a)

นำ template ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตรใส่ลงไปในองค์ประกอบ PCR ที่ประกอบด้วย 1X GoTaq reaction buffer, 0.4 μ M of each specific primer (AE-19 และ AE-20), 0.1 mM of dNTPs, 0.5 unit GoTaq DNA polymerase การทำ PCR นั้น ทำโดยมีปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ pre-heated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มวงจรการทำ PCR โดยทำ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ ปฏิกิริยาถูกดำเนินต่อที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที ตรวจหาสารพันธุกรรมหลังจากทำ PCR โดยการแยกชิ้นส่วนสารพันธุกรรมในการแสไฟฟ้าโดยใช้ 1% agarose ความดันไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วอ่านแถบสารพันธุกรรมโดยย้อมด้วย ethidium bromide ถ้าเชื้อที่ทดสอบมีจีโนม *eae* จะให้แถบ DNA ขนาด 1,087 bp เชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 ถูกใช้เป็นเชื้อควบคุมแสดงการมีจีโนม *eae*

4.3.4 การทดสอบการสร้างสารพิษทางอ้อมโดยวิธีการตรวจสอบชนิดของจีโนม Q (Koitabashi et al., 2006)

จีโนม Q₉₃₃ และ Q₂₁ ได้รับการตรวจสอบโดยวิธี PCR ในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 1X GoTaq reaction buffer, 0.4 μ M of each specific primer (qEf-1 และ qEr-2 สำหรับ Q₉₃₃; qDf-1 และ qDr-2 สำหรับ Q₂₁), 0.1 mM of dNTPs, 0.5 unit GoTaq DNA polymerase การทำ PCR นั้น ทำโดยมีปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ pre-heated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มวงจรการทำ PCR โดยทำ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 55 องศา

เซลล์เชื้อเป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ ปฏิบัติถูกดำเนินการที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบสารพันธุกรรมหลังจากทำ PCR โดยการแยกชั้นส่วนสารพันธุกรรมในการแอสไฟฟ้าโดยใช้ 1% agarose ความดันไฟฟ้า 90 โวลท์ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วอ่านแถบสารพันธุกรรมโดยย้อมด้วย ethidium bromide

4.3.5 การตรวจสอบซีโรทัยป์ของเชื้อ (Sukhumungoon et al., 2011a)

สำหรับการตรวจสอบซีโรทัยป์ O157 นั้น จะถูกตรวจสอบซีโรทัยป์อย่างคร่าวๆ โดยวิธี PCR (Maurer et al., 1999) ที่ใช้ primers ที่จำเพาะต่อ O157 antigen ก่อน (ตารางที่ 1) ถ้าเชื้อไอโซเลทใดที่ให้ผลลบต่อ O157 antigen โดยวิธี PCR ถือว่าเป็น non-O157 จากนั้น นำเชื้อที่ทดสอบคร่าวๆโดยวิธี PCR แล้ว ไปทำการยืนยันผลโดย agglutination assay โดยใช้ antibody ต่อซีโรทัยป์นั้นๆในการตรวจสอบ

สภาวะการทำ PCR และส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้มีดังนี้ นำ template ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตรใส่ลงในองค์ประกอบ PCR ที่ประกอบด้วย 1X GoTaq reaction buffer, 0.4 μ M of each specific primer, 0.1 mM of dNTPs, 0.5 unit GoTaq DNA polymerase การทำ PCR นั้น ทำโดยมีปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ pre-heated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มวงจรการทำ PCR โดยทำ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ ปฏิบัติถูกดำเนินการที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบสารพันธุกรรมหลังจากทำ PCR โดยการแยกชั้นส่วนสารพันธุกรรมในการแอสไฟฟ้าโดยใช้ 1% agarose ความดันไฟฟ้า 90 โวลท์ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วอ่านแถบสารพันธุกรรมโดยย้อมด้วย ethidium bromide เชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 ถูกใช้เป็นเชื้อควบคุมแสดงการมีแอนติเจน O157

สำหรับการเตรียมเชื้อเพื่อตรวจสอบซีโรทัยป์ agglutination assay นั้น ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชม. จากนั้น นำเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตัวเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g เป็นเวลา 5 นาที นำตัวเซลล์ที่ได้ไปล้างด้วย NSS 2 ครั้ง แล้วทำการ suspend เซลล์ใน NSS จากนั้นนำเซลล์ที่ล้างแล้วไปเข้าเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา นำเซลล์ออกมาแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. เพื่อให้เศษเซลล์ตกไปที่ก้นหลอด ดูดส่วนใสออก แล้วนำเฉพาะส่วนที่ยังขุ่นด้วยเศษเซลล์มาทำปฏิกิริยากับ specific antibody ต่อ somatic O- antigen ต่อไป

4.4 การตรวจสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disk diffusion method (CLSI, 2014)

ทำการตรวจหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะในเชื้อที่แยกได้ทุกไอโซเลท โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 11 ชนิด ดังนี้ erythromycin (15 μ g), gentamicin (10 μ g), chloramphenicol (30 μ g), cephalothin (30 μ g), ceftazidime (30 μ g), tetracycline (30 μ g), methicillin (5 μ g), ampicillinand (10 μ g), streptomycin (10

µg), kanamycin (30 µg) and vancomycin (30 µg) การทดสอบใช้เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุม ในการทดสอบ ทำการเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลทในอาหาร TSB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยให้รอบการเขย่าเพื่อให้อากาศกับเชื้อ ที่ 150 รอบต่อนาทีเพื่อใช้เป็น starter จากนั้นทำการ sub-culture ลงในอาหาร TSB ปริมาตร 3 มิลลิลิตรอีกครั้งแล้ว บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยให้รอบการเขย่าเพื่อให้อากาศกับเชื้อ ที่ 150 รอบต่อนาที แล้วนำเชื้อที่ได้มาปรับปริมาณของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland Turbidity Standards (ประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml) (McFarland Densitometer, Biosan, Latvia) แล้วใช้ไม้ปั่นสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อที่ปรับปริมาณแล้ว นำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) ให้ทั่วผิวหน้า จากนั้น นำแผ่นยาปฏิชีวนะมาวางลงบนผิวหน้า Mueller Hinton agar ที่ป้ายเชื้อแล้ว นำจานอาหารที่วางแผ่นยาแล้วไปบ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัด clear zone ที่เกิดขึ้นด้วย vernier caliper แล้วนำค่า clear zone ที่วัดได้ไปเทียบกับค่ามาตรฐาน การวัดความไวต่อยา vancomycin อ้างอิงจาก CLSI (2007)

4.5 การตรวจสอบ Insertion locus

ในการทดสอบหา integration site ของ *stx*₂-phages ในเชื้อ *E. coli* นั้น ทำการทดสอบโดยใช้วิธี PCR ในการเพิ่มจำนวนจีนที่เป็นเป้าหมายในการแทรกจีโนมของ โดยมีจีน *stx*₂-phages เป้าหมายดังนี้ *wrbA* gene (Patridge et al., 2006), *yecE* gene (Recktenwald et al., 2002), *yehV* gene (Yokoyama et al., 2000), Z2577 (Koch et al., 2003), and *sbcB* gene (Ohnishi et al., 2002). ในการแปลผลนั้น ถ้าจีนดังกล่าวมีจีโนมของ *stx*₂-phages แทรกอยู่ จะทำให้ขนาดของจีนนั้นใหญ่ขึ้นจนไม่สามารถเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ได้ แต่ถ้าไม่มี phage แทรกอยู่ จีนยังคงเป็นปกติ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนจีนดังกล่าวด้วยวิธี PCR ได้ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ PSU25 ที่แยกได้จากเนื้อวัวในการทดลองก่อนหน้านี้ ถูกใช้เป็น positive control สำหรับจีน *wrbA* และ *yehV* ส่วน *E. coli* สายพันธุ์ EDL933 ใช้เป็น positive control สำหรับจีน *yecE* *yehV* และ Z2577 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังแสดงในส่วนของ 4.3.2 การตรวจหา *stx* ทุกประการ ยกเว้น primers ที่ใช้ในแต่ละปฏิกิริยา (primers ดังแสดงในตารางที่ 1)

4.6 Pulsed-field gel electrophoresis (Sukhumungoon et al., 2011a)

ทำการเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ทดสอบในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมงโดยไม่มีการเขย่าเพื่อให้อากาศ นำเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตรมาใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไป resuspend ใน suspension buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วเติม 1% agarose ที่ต้มจนหลอมละลายด้วย TE buffer แล้วปล่อยให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียสแล้วปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงไป เมื่อผสมกันดีแล้ว ทำการหยอดสารผสมนั้นลงในเบ้า (plug mold) แล้วปล่อยให้ agarose แข็งตัว แล้วนำ agarose ที่แข็งตัวแล้วไปใส่ในหลอดทดลองที่มี Lysis buffer ที่ผสมกับ proteinase K (ความเข้มข้นสุดท้าย 20 mg/ml)

แล้ว นำหลอดทดลองไปปั่นที่ 50 องศาเซลเซียสข้ามคืนเพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแตกออกและโปรตีนสลายไป เมื่อครบเวลา นำชิ้น agarose gel (plug) มาล้าง 3 ครั้งด้วย TE buffer โดยล้างครั้งละ 30 นาที ขึ้นต่อไป นำ plug มาตัดให้ชิ้น plug มีขนาด 3x5 มิลลิเมตร นำชิ้น plug ที่ตัดแล้วไปแช่ไว้ใน restriction buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้ายชิ้น plug ไปใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ที่มี restriction buffer ใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตรที่เติม *Xba*I จำนวน 50 ยูนิต นำหลอดทดลองไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเข้าเครื่อง CHEF DRIII pulsed-field gel electrophoresis โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่องดังนี้

- แรงดันไฟฟ้า 6 volts/cm
- มุมการให้กระแสไฟฟ้า 120 องศา
- Pulse time 2.5-30.0 วินาที
- การรันเจลที่ 14 องศาเซลเซียส
- เวลาที่ใช้ทั้งหมด 19 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลา นำเจลที่ดำเนินการเสร็จแล้วไปย้อมเอซิดียมโบรไมด์ 5 นาที และล้างสีออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงถ่ายรูปผลการทดลอง

4.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อโดย *uidA* gene

ในการทดลองนี้ เมื่อแยกเชื้อจากผู้ป่วยได้แล้ว ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์การเป็น *E. coli* โดยตรวจสอบการมีจีน *uidA* ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* โดยวิธี PCR (ตารางที่ 1)

4.8 การรับรองจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์

การวิจัยในครั้งนี้ ได้มีการเสนอโครงการต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และโครงการได้รับการรับรองเรียบร้อยแล้วก่อนเริ่มทำการวิจัย หมายเลขใบรับรอง EC: 56-225-19-2-3

ส่วนที่ 2 การหาปริมาณ EHEC และ STEC ในเนื้อสัตว์โดยวิธี Most probable number (MPN)-polymerase chain reaction และการแยกเชื้อ EHEC/STEC จากเนื้อสัตว์โดยวิธี immunomagnetic separation

เนื้อสัตว์ที่ใช้ในการตรวจสอบนี้ ทำการเก็บตัวอย่างจากร้านขายเนื้อสัตว์ในเขตอำเภอหาดใหญ่ จำนวน 8 จุด โดยทำการเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนเมษายน จนถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556

4.9 MPN-PCR

นำเนื้อสัตว์ 25 กรัม มาบดผสมกับ TSB ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วนำเฉพาะส่วนของเหลว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดแก้วทดลอง ที่มี TSB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความเจือจางที่ 10^{-1} ทำการเจือจางต่อให้ได้ความเจือจางที่ 10^{-2} และ 10^{-3} โดยทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ (MPN แบบ 3 หลอด) นำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชม เมื่อครบกำหนดเวลา ดูดเชื้อที่บ่มแล้ว หลอดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำทุกหลอด แล้วนำหลอดทั้งหมดไปต้ม เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีในกระติกน้ำแข็ง นำหลอดทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยง ที่ $11,000 \times g$ เป็น เวลา 10 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์ออก นำเฉพาะส่วน supernatant ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น deionized water ที่ปราศจากเชื้ออีก 90 ไมโครลิตร จะได้ DNA แม่แบบสำหรับทำ PCR ตรวจหาจีน *stx*₁, *stx*₂, *eae*, และ *rfbO157* ต่อไป การตรวจพบ amplicons ในจีนต่างๆ จะถูกใช้ในการแปลผลร่วมกับวิธี MPN-PCR การหาค่า MPN/g ของเชื้อ ทำได้โดยการเปิดตาราง MPN แบบ 3 หลอด เนื้อสัตว์ทั้งหมดที่ใช้ ในการทดลองส่วนนี้คือ 30 ตัวอย่าง จากเนื้อสัตว์ 3 ชนิดที่นิยมบริโภค คือ เนื้อวัว เนื้อหมู และเนื้อไก่

ในตัวอย่างใดที่พบจีน *stx*₁, *stx*₂ หรือทั้ง *stx*₁ และ *stx*₂ แต่ไม่พบ *eae* ตัวอย่างนี้จัดว่ามี STEC ปนเปื้อน ส่วนตัวอย่างใดที่พบ *stx* ควบคู่กับ *eae* ตัวอย่างนั้นจัดว่ามีเชื้อ EHEC ปนเปื้อนอยู่

4.10 การแยกเชื้อ *E. coli* O157 จากตัวอย่างเนื้อสัตว์

ซังเนื้อสัตว์จำนวน 50 กรัม แล้วนำมาบดผสมกับ TSB ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ให้เข้ากันดีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้น นำเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชม เมื่อครบ กำหนดเวลา นำเชื้อที่บ่มปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปใส่ลงในหลอดทดลองที่มี TSB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้ว นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม เพื่อเพิ่มจำนวนของ *E. coli* O157 ให้มากขึ้น (กรณีที่มีเชื้อ O157 ปนเปื้อน การบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสนี้ จะทำให้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ มีการเพิ่มจำนวนที่ลดลง แต่จะไม่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาของ *E. coli* O157) เมื่อครบ 2 ชม นำเชื้อที่บ่ม แล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปผสมกับ magnetic beads ที่จำเพาะต่อ O157 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วบ่ม ไว้ในสภาวะที่มีการเขย่าเป็นครั้งคราว บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูด magnetic beads ด้วยแท่ง แม่เหล็ก แล้วเท อาหารเหลวส่วนเกินทิ้ง ทำการล้าง magnetic beads ด้วย Phosphate buffer saline

(PBS) pH 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วกระจาย magnetic beads ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วใช้ microbiological loop ทำการ streak สารแขวนลอย magnetic beads บนอาหารแข็ง sorbitol MacConkey agar นำจานอาหารแข็งไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชม แล้วคัดเลือกโคโลนีที่ไม่มีสี เพื่อนำไปทดสอบการเป็น *E. coli* O157 รวมถึงตรวจสอบจิ้นก่อโรคต่อไป

บทที่ 5

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ส่วนที่ 1

5.1.1 การตรวจหา EHEC/STEC จากผู้ป่วยท้องร่วงและลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

จากการตรวจสอบหาเชื้อ EHEC/STEC จากตัวอย่าง rectal swabs จากผู้ป่วยท้องร่วงในโรงพยาบาลหาดใหญ่ และโรงพยาบาลปัตตานี สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 1,021 ไอโซเลท (ไอโซเลทที่เป็นโคลิฟอร์มไม่มีสีจำนวน 310 ไอโซเลท และโคลิฟอร์มที่มีสีชมพูจำนวน 711 ไอโซเลท) จากจำนวน 359 ตัวอย่าง ทำการตรวจสอบจิ้นก่อโรคในทุกไอโซเลทเพื่อจัดจำแนกว่า เชื้อที่ได้นั้น จัดเป็น EHEC หรือ STEC ดังนี้คือ *stx*₁, *stx*₂, *eae* และ *rfbO157* ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ไม่สามารถพบจิ้นก่อโรค *stx*₁, *stx*₂ และ *eae* ในทุกไอโซเลท และจากข้อมูลการไม่พบจิ้นก่อโรสดังกล่าว ประกอบกับระยะเวลาในการตรวจสอบเชื้อเป็นระยะเวลานาน 1 ปี แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยจากโรคท้องร่วงที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลหาดใหญ่ ไม่ได้มีสาเหตุมาจากเชื้อใน pathotype EHEC และ/หรือ STEC ในส่วนของโรงพยาบาลปัตตานีนั้น ได้เก็บเชื้อมาเป็นระยะเวลา 3 เดือน จึงอาจจะยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าผู้ป่วยโรคท้องร่วงในเขตปัตตานี มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ EHEC หรือ STEC จริงหรือไม่ การเก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาลในเขตปัตตานีเป็นระยะเวลาที่ยาวนานกว่านี้ อาจสามารถทำให้ได้ข้อมูลที่สรุปได้ชัดเจนยิ่งขึ้นกว่านี้

ในการตรวจสอบการมีเชื้อ EHEC/STEC ในภูมิภาคอื่นของประเทศไทยนั้น พบว่า Leelaporn และคณะ (2000) ได้มีการตรวจสอบในช่วงปี พ.ศ. 2540 ถึง 2541 ในเขตกรุงเทพมหานคร โดยในการทดลองครั้งนั้น สามารถพบ STEC ซีโรทัยป์ที่ไม่ใช่ O157 ได้จำนวน 4 ไอโซเลท จากผู้ป่วย 2 ราย (มีซีโรทัยป์เป็น O26:H⁻, O111:H⁻, O125:H21 และ O128:H2) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถตรวจพบ *E. coli* จำนวน 1 ไอโซเลท ที่มีจิ้น *rfbO157* (PSU120) และเมื่อนำไปยืนยันผลการเป็น *E. coli* O157 โดยวิธี agglutination พบว่า *E. coli* สายพันธุ์ PSU120 นี้ ให้ผลบวกต่อ O157 ซีโรทัยป์ (ตารางที่ 2)

เชื้อ PSU120 นี้ พบว่า ถึงแม้จะไม่มีจิ้น *stx* และ *eae* แต่เชื้อมีจิ้น *escV* ซึ่งเป็นจิ้นองค์ประกอบของ Type III secretion system (T3SS) ซึ่งเป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญมากอย่างหนึ่ง (ตารางที่ 2) โดย T3SS นี้ ตั้งอยู่ในส่วนของ Locus of Enterocyte Effacement (LEE) pathogenicity Island ซึ่งเป็นกลุ่มของจิ้นก่อโรคที่สำคัญที่มีรายงานการพบใน *E. coli* กลุ่ม EHEC และ EPEC อีกทั้งในตัวอย่างตรวจนี้ ไม่พบแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น ๆ เลย นอกจาก *E. coli* O157 จึงอาจเชื่อได้ว่า การเกิดภาวะท้องร่วงในตัวอย่างนี้เกิดจาก *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 เป็นสาเหตุ

จากผลการตรวจสอบการมี จิ้น Q ไม่พบจิ้นดังกล่าวใน *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 ซึ่งผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการไม่พบ *stx* เนื่องจากจิ้น Q เป็นจิ้นของ *stx*₂ phage ทำหน้าที่สร้างโปรตีน Q ที่ทำ

หน้าที่เป็นปัจจัยต้านการหยุดสร้างสาย mRNA ของ *stx*₂ phage (Late anti-terminator) ดังนั้น เมื่อไม่พบ *stx* จึงไม่พบจิ้น Q นอกจากนี้ จากผลของการตรวจสอบจิ้นที่มีรายงานการแทรกของ *stx*₂ phage พบว่าที่ตำแหน่ง *sbcB* และ *yehV* มี prophage อื่นๆแทรกอยู่ ปรากฏการณ์นี้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการได้รับ หรือสูญเสีย *stx*₂ phage ได้ (ตารางที่ 2)

ข้อมูลที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ในส่วนของ EHEC/STEC นั้น พบว่ามีข้อมูลที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Kalnauwakul และคณะ (2007) ที่ในการศึกษานั้นได้ตรวจสอบความเกี่ยวข้องของ EHEC O157 และ STEC ในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่รับการตรวจในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ระหว่างเดือนกันยายน 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 และให้สีของโคโลนีบนอาหาร CHROMagar O157 เป็นสีฟ้า ซึ่งผลการทดลองนี้ ตรงกับแนวความคิดของคณะผู้วิจัยที่ตั้งสมมติฐานไว้ในตอนแรกว่า การที่ไม่มีการพบ *E. coli* O157 จากตัวอย่างผู้ป่วยท้องร่วงในประเทศไทยมาก่อนเลยนับตั้งแต่มีการระบาดของเชื้อซีโรทัยปีครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี พ.ศ. 2525 มีความเป็นไปได้ว่า เชื้อ O157 นั้น อาจให้ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร sorbitol MacConkey agar เป็นสีชมพูก็เป็นได้ ซึ่งในความเป็นจริงการตรวจสอบ *E. coli* O157 จะตรวจโคโลนีที่ไม่มีสี ทำให้ในการตรวจสอบเชื้อจากผู้ป่วย โคโลนีสีชมพูถูกมองข้ามไป จึงเป็นที่มาถึงการศึกษานี้ในครั้งนี้ ที่มีการคัดเลือกเชื้อที่จะนำมาทดสอบในการศึกษานี้ครอบคลุมถึง 2 ส่วน คือคัดเลือกเชื้อทั้งในส่วนที่เป็นโคโลนีที่มีสีชมพูและไม่มีสีมาตรวจสอบ

จากข้อมูลทั้งหมดเกี่ยวกับการตรวจพบ *E. coli* O157 จากตัวอย่างที่ได้จากมนุษย์ในประเทศไทย พบว่ามีรายงานจากการศึกษาของ Leelaporn และคณะ (2003) เท่านั้น และการตรวจพบครั้งนั้น เป็นการพบ *E. coli* O157:H7 จากเด็กชายอายุ 2 ขวบ ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีอาการท้องร่วง ดังนั้น จากการศึกษาของผู้วิจัยในรายงานฉบับนี้ ถือเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ที่มีการแยกเชื้อ *E. coli* O157 จากผู้ป่วยท้องร่วงได้

5.1.2 ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อ

ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 นั้น พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *E. coli* O157 ที่แยกได้จากเนื้อวัวมากถึง 88.6% (รูปที่ 4) อย่างไรก็ตาม เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 นั้นไม่มีจิ้น *stx* และ *eae* เลย จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้คิดได้ว่า เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 เคยมี *stx* และ *eae* มาก่อน แต่เมื่อเข้าไปในร่างกายของมนุษย์แล้ว มีปัจจัยบางอย่างทำให้สูญเสียจิ้นดังกล่าวไป

จากการศึกษาของ Bielaszewska และคณะ (2007) ได้แสดงให้เห็นว่า EHEC O26 ที่แยกได้จากอุจจาระของเด็กในครั้งแรกหลังจากเกิดอาการท้องร่วงใหม่ๆ ยังมีจีโนม *stx* อยู่ หลังจากนั้นไม่นาน เมื่อเก็บเชื้อจากอุจจาระของเด็กคนเดิมอีกครั้ง กลับพบว่า EHEC O26 นั้น ได้สูญเสียจีโนม *stx* ไปแล้ว โดยผลของลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากวิธี PFGE แสดงให้เห็นลายพิมพ์ DNA ของเชื้อที่เก็บครั้งแรกและครั้งหลังนั้นมีลายพิมพ์เกือบเหมือนกันทุกประการ ยิ่งไปกว่านั้น จากงานวิจัยของ Mellmann และคณะ (2008) ก็ได้แสดงให้เห็นปรากฏการณ์ที่คล้ายกัน โดยพบปรากฏการณ์ได้รับ และสูญเสียจีโนม *stx*₂ ในเชื้อ *E. coli* O157:NM (non-motile) จากข้อมูลความคล้ายกันในส่วนของสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 กับเชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 และ PSU2 รวมถึงความสามารถในการได้รับและสูญเสียสารพันธุกรรมของเชื้อ จึงอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 เดิมทีอาจมีจีโนม *stx* แต่สูญเสีย *stx* ระหว่างการติดเชื้อในมนุษย์

5.1.3 ความไวต่อยาของเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120

เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 พบว่าดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 4 ชนิดด้วยกันคือ erythromycin, cephalothin, methicillin และ vancomycin (ตารางที่ 2) ในการทดลองนี้ ได้ลองทดสอบความไวของเชื้อต่อยา ทั้งหมด 11 ชนิด รวมถึงยา methicillin และ vancomycin ที่ไม่ได้ใช้ในการทดสอบทั่วไปสำหรับ *E. coli* อีกด้วย อย่างไรก็ตามการพบการดื้อต่อยา methicillin และ vancomycin ในการศึกษาครั้งนี้ ทำให้ได้ประเด็นที่จะต้องพิจารณาต่อไปว่า เชื้อ *E. coli* O157 ทั้งหมดที่แยกได้นั้นมีปัจจัยภายในที่ดื้อต่อยา 2 ชนิดนี้ทั้งหมดหรือไม่ (intrinsic factor for methicillin and vancomycin resistance) เพราะในอนาคต หากมีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อเหล่านี้ในมนุษย์ แบบแผนการดื้อยาที่ได้ตรวจสอบไว้ในการศึกษาครั้งนี้ จะมีประโยชน์สำหรับการเลือกยารักษาที่เหมาะสมต่อไป

5.2 ส่วนที่ 2

5.2.1 การหาปริมาณ EHEC/STEC จากเนื้อสัตว์โดยวิธี MPN-PCR และการแยกเชื้อ *E. coli* O157 โดยวิธี immunomagnetic separation

จากข้อมูลก่อนหน้าที่มีรายงานที่แสดงให้เห็นว่า สามารถแยกเชื้อ STEC รวมถึง EHEC O157:H7 ได้เป็นจำนวนมากจากเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะเนื้อวัว (Sukhumungoon et al., 2011a; Sukhumungoon et al., 2011b; Sukhumungoon et al., 2013) และจากข้อมูลในส่วนที่ 5.1 ที่แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แสดงออกผ่านทางลายพิมพ์ DNA คล้ายกับเชื้อ O157 ที่แยกได้จากเนื้อวัวถึง 88.6% จึงมีความเป็นไปได้สูงว่า เชื้อที่แยกได้จากมนุษย์นั้น เกิดจากการรับประทานเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไป อย่างไรก็ตาม ในระยะเวลากว่า 1 ปีที่ได้ตรวจสอบหา EHEC/STEC จากตัวอย่างที่ได้จากมนุษย์นั้น ไม่พบเชื้อที่เป็น EHEC/STEC เลย จึงได้มีความพยายามที่จะสำรวจกลับไปยังแหล่งของเชื้อที่สำคัญอีกครั้ง โดยทำการตรวจสอบในเชิงปริมาณการปนเปื้อนของ EHEC/STEC ใน

เนื้อสัตว์ ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานเอาไว้ว่า ถ้ามีการปนเปื้อนของ STEC ในเนื้อสัตว์ในปริมาณที่สูงพอ ก็อาจจะ เป็นสาเหตุที่จะเพิ่มโอกาสและปริมาณของเชื้อ เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้มากขึ้น จนสามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ จึงได้ทำการตรวจสอบ หาปริมาณ EHEC/STEC ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ โดยเป็นการตรวจสอบใน เบื้องต้น จากการตรวจสอบหาการปนเปื้อนของ EHEC/STEC ในเนื้อสัตว์โดยแสดงผลในเชิงปริมาณ ผล การทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อน EHEC และ STEC ในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายอยู่ในเขตอำเภอ หาดใหญ่จริง อย่างไรก็ตาม ปริมาณ STEC ที่ตรวจพบนั้น มีปริมาณไม่สูงมากนัก โดยจากการทดลอง พบว่า สามารถตรวจพบ EHEC ได้จากเนื้อไก่เพียง 1 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณเท่ากับ 3 MPN/g และไม่พบ EHEC ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆเลย (ตารางที่ 3) ในส่วนของ STEC นั้น พบมากที่สุดเนื้อวัว โดยให้ ค่าเท่ากับ 27 MPN/g ส่วนค่าการปนเปื้อนของ STEC ที่พบได้น้อยที่สุดนั้น เป็นค่าของเนื้อไก่ โดยให้ค่า เท่ากับ 3 MPN/g (ตารางที่ 3) ดังนั้น จากปริมาณการปนเปื้อนของ EHEC/STEC ที่น้อยนี้ อาจสามารถ อธิบายการไม่พบผู้ป่วยท้องร่วงที่เกิดจาก EHEC/STEC เลยได้บางส่วน ความเป็นไปได้อื่นๆที่สามารถ อธิบายการไม่พบผู้ป่วยที่เกิดจาก EHEC/STEC ได้มีการรายงานไว้เช่นกัน เช่น ในกรณีของ O157 นั้น ได้ มีการตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อซีโรทัยป์นี้แล้วในกลุ่มคนที่ได้รับการตรวจถึงประมาณร้อยละ 20 (Vuddhakul et al., 2000) การมีแอนติบอดีในร่างกายของมนุษย์สามารถปกป้องร่างกายจากการติดเชื้อได้

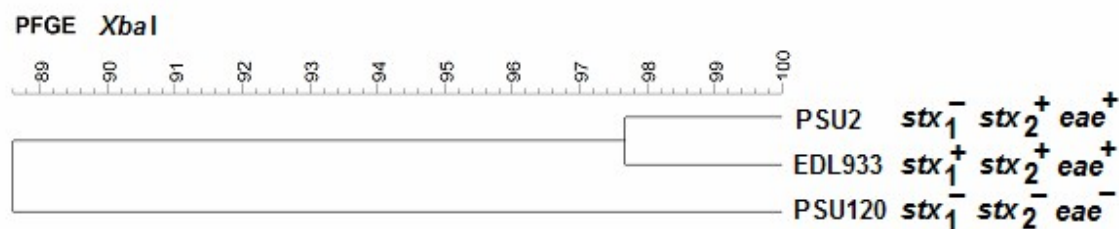
ในการตรวจสอบหาปริมาณของ EHEC/STEC ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์โดยวิธี MPN-PCR จำนวน 30 ตัวอย่างนี้ ไม่พบการปนเปื้อนของ *E. coli* O157 เลย อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีรายงานการพบ O157 ใน เนื้อสัตว์โดยเฉพาะเนื้อวัวอย่างสม่ำเสมอ การไม่พบ O157 ในการทำ MPN-PCR ครั้งนี้ เป็นเรื่องที่น่าแปลก ใจ จึงได้มีความพยายามในการตรวจหา *E. coli* O157 อย่างต่อเนื่อง โดยใช้วิธี immunomagnetic separation เพื่อแยกเชื้อ *E. coli* O157 จากตัวอย่างเนื้อวัวอีก 32 ตัวอย่างเพื่อยืนยันว่าผลของวิธี MPN-PCR มีความถูกต้อง จากผลการทดลองพบว่า ไม่สามารถแยกเชื้อได้เลยในช่วง 31 ตัวอย่างแรก แต่ สามารถแยกเชื้อ *E. coli* O157 ได้จำนวน 6 ไอโซเลท จากตัวอย่างเนื้อได้สำเร็จในตัวอย่างสุดท้าย (ต.ย.ที่ 32) ในช่วงปลายเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556 (ตารางที่ 4) เชื้อทั้ง 6 ไอโซเลท มีแบบแผนของการมีจิ้นก่อโรคที่ เหมือนกัน และแบบแผนของจิ้นก่อโรคนั้น พบว่าตรงกับที่เคยมีรายงานไว้ใน *E. coli* O157:H7 ส่วนใหญ่ที่ เคยแยกได้ในรายงานก่อนหน้านี้ (Vuddhakul et al., 2000; Sukhumungoon et al., 2011a, Sukhumungoon et al., 2011b) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การที่ไม่พบ *E. coli* O157 ในช่วงของ การทำ MPN-PCR นั้น น่าจะเป็นข้อมูลที่ถูกต้องแล้ว เนื่องจากเมื่อใช้วิธีการแยกเชื้อโดยเทคนิคที่จำเพาะก็ ให้ผลที่สอดคล้องกัน คือไม่สามารถแยกเชื้อได้ไปจนกระทั่งถึงปลายเดือนตุลาคม (ไม่พบเชื้อเลยจนกระทั่ง ถึงตัวอย่างที่ 32) จากการศึกษาหลายชิ้น ได้แสดงให้เห็นว่า การปรากฏของเชื้อ *E. coli* O157 นั้น เกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย เช่น จากงานวิจัยของ Kudva และคณะ (1996) นั้น แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผล ต่อการพบ *E. coli* O157:H7 ในแกะ ยิ่งไปกว่านั้น การระบาดของ *E. coli* O157 ก็มีความเกี่ยวข้องกับฤดูอีกด้วย น้ำฝนสามารถเป็นพาหะในการพา *E. coli* O157 ออกจากฟาร์มเลี้ยงกระจายไปเป็นวงกว้าง วิธีการ ชำแหละเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้มาตรฐานทางสุขลักษณะก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้สามารถเจอเชื้อได้มาก

เนื่องจากเชื้อ *E. coli* O157 เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ จำพวกโค กระบือ และสัตว์เคี้ยวเอื้องต่างๆ
ดังนั้น เชื้อสามารถปนเปื้อนจากลำไส้ไปยังส่วนของเนื้อสัตว์ได้

ตารางที่ 2 ลักษณะของ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120

Strain	Source of sample	Virulence genes					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>				
PSU120	48 year-old male	-	-	-	+	-	+/-	-/-	<i>sbcB</i> , <i>yehV</i>	E, KF, MET, Va

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

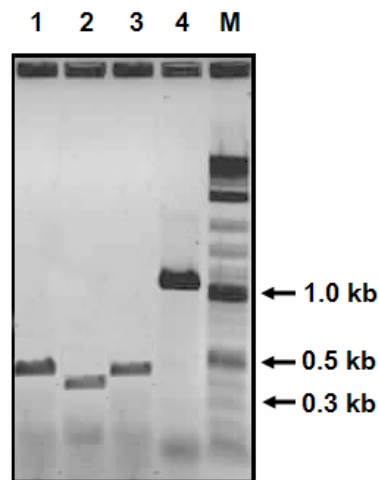


รูปที่ 4 เดนโดแกรมแสดงค่าความคล้ายกัน (% similarity) ของเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU2, PSU933 และ PSU120 ลายพิมพ์ DNA ได้มาโดยวิธี PFGE โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI เดนโดแกรมถูกสร้างโดยวิธี unweighted pair-group method of arithmetic average (UPGMA) โดยโปรแกรม BioNumerics software version 7.0 (Applied maths, Belgium).

ตารางที่ 3 ปริมาณการปนเปื้อน (MPN/g) ของ EHEC และ STEC ในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายในเขตอำเภอหาดใหญ่ในช่วงเดือนเมษายน ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2556

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, Minimum MPN value; Max, Maximum MPN value



รูปที่ 5 ตัวอย่างของ amplicons ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้เชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 ตรวจสอบ DNA โดยวิธี agarose gel electrophoresis (420 bp *rfb*O157, 350 bp *stx*₁, 404 bp *stx*₂, และ 1,087 bp *eae*). เลน M คือ 2-log DNA ladder.

ตารางที่ 4 ข้อมูลของ *E. coli* O157 จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อวัว

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	-	+	+	+/-

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

ข้อมูลเกี่ยวกับการมีอยู่และความเกี่ยวข้องของเชื้อ EHEC/STEC ในการก่อโรคท้องร่วง รวมถึงโรคแทรกซ้อนที่เกิดจากการติดเชื้อเหล่านี้เป็นสิ่งที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากเชื้อเหล่านี้สามารถก่อความรุนแรงในระดับที่ทำให้เสียชีวิตได้ ข้อมูลดังกล่าวในประเทศไทยมีอยู่น้อย โดยเฉพาะข้อมูลในเขตภาคใต้ของประเทศไทย การศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าในขณะนั้น ยังพบความเกี่ยวข้องของเชื้อ EHEC/STEC กับการก่อโรคท้องร่วงในประชากรในเขตจังหวัดสงขลาและจังหวัดปัตตานี การตรวจไม่พบเชื่อนั้นอาจเกิดจากเชื้อที่ปนเปื้อนมากับอาหารนั้นมีปริมาณน้อยมาก ยิ่งไปกว่านั้น วิธีการปรุงอาหาร รวมถึงสุขอนามัยในการประกอบอาหารยังสามารถลดการได้รับเชื้อเข้าไปในร่างกายได้ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษา นี้ ได้ตรวจพบเชื้อ *E. coli* O157 จากผู้ป่วยท้องร่วงได้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย เชื้อดังกล่าวมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับเชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 ซึ่งมีความรุนแรงถึง 88.6% แม้ว่าจะไม่เจอจีโนมก่อโรคที่สำคัญอย่าง *stx* และ *eae* ในเชื้อสายพันธุ์นี้ แต่จีโนมก่อโรคอื่นๆ เช่น *escV* ยังสามารถก่อให้เกิดโรคได้ ยิ่งไปกว่านั้น เชื้อยังดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิดอีกด้วย การพบการแทรกตัวของ prophages ในจีโนมต่างๆ ของ *E. coli* O157 รวมถึงการพบ LEE pathogenicity Island แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการได้รับจีโนมก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ ดังนั้น การตรวจสอบหาเชื้อ EHEC/STEC ในตัวอย่างอาหารและจากผู้ป่วย จึงควรทำอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญเพื่อจัดการกับการระบาดของเชื้อที่สามารถเกิดได้ในอนาคต

จากข้อมูลความคล้ายกันในส่วนของสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 กับเชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ EDL933 และ PSU2 รวมถึงความสามารถในการได้รับและสูญเสียสารพันธุกรรมของเชื้อ จึงอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อ *E. coli* O157 สายพันธุ์ PSU120 เดิมทีอาจมีจีโนม *stx* แต่สูญเสีย *stx* ระหว่างการติดเชื้อในมนุษย์

เอกสารอ้างอิง

- Bae, W. K., Lee, Y. K., Cho, M. S., *et al.* 2006. A case of hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O104:H4. *Yonsei Med J* 47 (3): 437.
- Bettelheim, K.A., Brown J. E., Lolekha S., and Echeverria, P. 1990. Serotypes of *Escherichia coli* that hybridized with DNA probes for genes encoding Shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II, and serogroup O157 enterohemorrhagic *E. coli* fimbriae isolated from adults with diarrhea in Thailand. *J Clin Microbiol* 28: 293.
- Bielaszewska, M. and Karch, H. 2001. Non-O157:H7 Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* strains: epidemiological significance and microbiological diagnosis. *World J. Microbiol Biotechnol* 16: 711-718.
- Bielaszewska M, Prager R, Köck R, *et al.* 2007. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol* 73: 3144-3150.
- Brown, J. E., Echeverria, P., Taylor, D. N., Seriwatana, J., Vanapruks, V., Lexomboon, U., Neill, R. N. & Newland, J. W. 1989. Determination by DNA hybridization of Shiga- like-toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Thailand. *J Clin Microbiol* 27: 291-294.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2005. Global Diarrhea Burden. Downloaded from <http://www.cdc.gov/healthywater/global/diarrhea-burden.html> on 18/12/2013.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement M100-S17. Wayne, PA, USA: CLSI, 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth informational supplement M100-S24. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.
- DeGreve, H., Qizhi, C., Deboeck, F., Hernalsteens, J.P. 2002. The Shiga toxin VT2-encoding bacteriophage varphi297 integrates at a distinct position in the *Escherichia coli* genome. *Biochem Biophys Acta* 1579: 196–202.
- Dundas, S., Andrew Todd, W. T., Steward, A. I., *et al.* 2001. The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 33: 923-931.

- Ergonul, Z., Hughes, A. K., and Kohan, D. E. 2003. Induction of apoptosis of human brain microvascular endothelial cells by shiga toxin 1. *J Infect Dis* 187: 154-158.
- Fey, P. D., Wickert, R. S., Rupp, M. E., Safranek, T. J., and Hinrichs, S. H. 2000. Prevalence of non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stool samples from Nebraska. *Emerg Infect Dis* 6: 530.
- Gannon, V. P. J., Rashed, M., King, R. K. and Thomas, E. J. G. 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.
- Gannon, V. P. J., D'Souza, S., Graham, T., King, R. K., Rahn, K. and Read, S. 1997. 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* 35: 656-662.
- Heninger A, Binder M, Schmidt S, Unartl K, Botzenhart K, Doring G. 1999. PCR and blood culture of *Escherichia coli* bacteremia in rats. *Antimicrob Ag Chem* 37: 2479-8242.
- Kalnauwakul, S., Phengmak, M., Kongmuang, U., Nakaguchi, Y. and Nishibuchi, M. 2007. 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* 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.
- Koch, C., Hertwig, S., Appel, B. 2003. Nucleotide sequence of the integration site of the temperate bacteriophage 6220, which carries the Shiga toxin gene *stx* (1ox3). *J Bacteriol* 185: 6463-6466.
- Koitaishi, T., Vuddhakul, V., Radu, S., *et al.* 2006. Genetic characterization of *Escherichia coli* O157:H7/- strains carrying the *stx*₂ gene but not producing Shiga toxin 2. *Microbiol Immunol* 50: 135.
- 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.
- Leelaporn A, Phengmak M, Eampoklap B, *et al.* 2003. Shiga toxin-and enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from subjects with bloody and nonbloody diarrhea in Bangkok, Thailand. *Diag Microbiol Infect Dis* 46: 173-180.
- LeJeune, J. T., Abedon, S. T., Takemura, K., Christie, N. P. and Sreevatsan, S. 2004. Human *Escherichia coli* O157:H7 genetic marker in isolates of bovine origin. *Emerg Infect Dis* 10: 1482-1485.

- March, S. B. and Ratnam, S. 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 23: 869-872.
- 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. *Appl Environ Microbiol* 65: 2954-2960.
- Mellmann, A., Lu, S., Karch, H., *et al.* 2008. Recycling of Shiga toxin 2 gene in sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Appl Environ Microbiol* 74: 67-72.
- Müller, D., Hagedorn, P., Brast, *et al.* 2006. 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* 44: 2626-2629.
- Nataro, J. P., and Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol Rev* 11: 142-201.
- Nathanson, S., Deschenes, G. 2001. Pneumoniae-induced hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 16: 362-365.
- Ohnishi, M., Terajima, J., Kurokawa, K., *et al.* 2002. Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *PNAS*. 99: 17043-17048.
- Ooka, T., Terajima, J., Kusumoto, M., *et al.* 2009. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J Clin Microbiol* 47: 2888-2894.
- Patridge, E. V., and Ferry, J. G. 2006. WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H: quinone oxidoreductase. *J Bacteriol* 188: 3498-3506.
- 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. *Emerg Infect Dis* 11: 603-609.
- Recktenwald, J., and Schmidt, H. 2002. The nucleotide sequence of Shiga toxin (*stx*) 2e-encoding phage phiP27 is not related to other *stx* phage genomes, but the modular genetic structure is conserved. *Infect Immun* 70: 1896-1908.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., *et al.* 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England J Med* 308: 681.
- Schmidt, H., Geitz, C., Tarr, P. I., Frosch, M., and Karch, H. 1999. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Phenotypic and genetics profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis* 179: 115.
- Seriwatana, J., Brown, J. E., Echeverria, P., Taylor, D. N., Suthienkul, O. & Newland, J. 1988. DNA probes to identify Shiga-like toxin I-and II-producing enteric bacterial pathogens isolated from patients with diarrhea in Thailand. *J Clin Microbiol* 26: 1614-1615.

- Serra-Moreno, R., Jofre, J., Muniesa, M. 2007. Insertion site occupancy by *stx*₂ bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *J Bacteriol* 189: 6645-54.
- Shaikh N, Tarr PI. *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin- encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J Bacteriol* 2003; 185: 3596–605.
- Sukhumungoon, P., Nakaguchi, Y., Ingviya, N., *et al.* 2011a. Investigation of *stx*₂⁺ *eae*⁺ *Escherichia coli* O157: H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. *Inter Food Res J* 18: 381.
- Sukhumungoon, P., Mittraparp-arhorn, P., Pomwised, R., Charernjiratrakul, W., and Vuddhakul, V. 2011b. High concentration of Shiga toxin 1-producing *Escherichiacoli* isolated from southern Thailand. *Inter Food Res J* 18: 667.
- 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 Sci J*, 10: 2334-2340.
- 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.
- Toth, I., Schmidt, H., Dow, M., Malik, A., Oswald, E., Nagy, B. 2003. 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*; 69: 7242-7247.
- Vuddhakul, V., Patararungrong, N., Pungrasamee, P., *et al.* 2000. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157 from retail beef and bovine feces in Thailand. *FEMS Microbiol Lett* 182: 343-347.
- Watanabe, Y., Ozasa, K., Mermin, J. H., *et al.* 1999. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Emerg Infect Dis* 5: 424-428.
- Wells, J.G., Davis, B. R., Wachsmuth, I. K., *et al.* 1982. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* 18: 512-520.
- Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immun Med Microbiol* 12: 85-90.
- Yokoyama, K., Makino, K., Kubota, Y., *et al.* 2000. Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene* 258: 127-139.

<http://www.oxid.com/omd/library/fullsize/CM0813.jpg>

<http://www.jsunitech.com/product/culture/images/O157.jpg>

ภาคผนวก

บทความวิจัยที่ตีพิมพ์แล้ว

1. Themphachana, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Seto, K., Rattanachuay, P., Singkhamanan, K., **Sukhumungoon, P.** 2014. First report in Thailand of a *stx*-negative *Escherichia coli* O157 from a patient with diarrhea, Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health; 45(4): 881-889. (Indexed in Web of Science with impact factor 2013 = 0.542).
2. Pewleang, T., Rattanachuay, P., Themphachana, M., **Sukhumungoon, P.** 2014. Quantification of enterohemorrhagic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from retained meats. Global Veterinaria; 12(2): 244-249. (Indexed in Scopus with SJR 2013 = 0.21)