# บทที่ 2

# ปริทัศน์วรรณกรรม

ปัจจุบันภาวะการแข่งขันทางเศรษฐกิจระหว่างประเทศนับวันจะยิ่งรุนแรงขึ้น ภาคการส่งออกถือเป็นหัวใจหลักของภาคเศรษฐกิจ หากประเทศส่งออกได้มาก นำรายได้เข้าประเทศได้มากก็ย่อมส่งผลให้อัตราการเจริญทางเศรษฐกิจของประเทศอยู่ในระดับสูงเช่นกัน โดยเฉพาะสำหรับประเทศไทย อุตสาหกรรมการส่งออกอาหารและสินค้าเกษตรมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของชาติเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งอยู่ในอันดับต้นๆที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศ นับเป็นมูลค่ามหาศาลในแต่ละปีส่งผลให้ประเทศไทยได้รับการจัดให้อยู่ในอันดับต้นๆของประเทศผู้ส่งออกอาหารและสินค้าเกษตรของโลก นอกจากนั้นในปี พ.ศ. 2547 รัฐบาลได้ประกาศให้เป็น "ปีแห่งอาหารปลอดภัย (Food safety)" เพื่อเตรียมความพร้อมให้ยุทธศาสตร์ส่งเสริม "ประเทศไทยเป็นครัวของโลก" ประสบผลสำเร็จ แต่สิ่งที่ตามมาคือ เมื่อยิ่งเร่งส่งออกมากเท่าใดก็ต้องเผชิญกับการแข่งขันเพื่อแย่งชิงตลาดในการค้ามากเท่านั้น โดยการแข่งขันย่อมมาพร้อมกับอุปสรรคซึ่งอุปสรรคอาจเป็นในรูปแบบของกำแพงภาษีที่ในปัจจุบันอาจจะลดความสำคัญลง เนื่องจากมีการทำข้อตกลงเรื่องเขตการค้าเสรีระหว่างประเทศมากขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่อุปสรรคในรูปแบบมาตรการกีดกันทางการค้าที่มีสาระมุ่งเน้นและเข้มงวดในด้านมาตรฐานการผลิตและคุณภาพของสินค้าโดยเฉพาะในด้านความสะอาด ปลอดภัย ถูกสุขอนามัยจะยิ่งสูงขึ้น ดังนั้นมาตรฐานการควบคุมและตรวจสอบคุณภาพของวัตถุ กระบวนการผลิต และผลิตภัณฑ์ จึงมีความสำคัญยิ่งโดยเฉพาะมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ซึ่งหากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคแล้ว อาจทำให้ผู้บริโภคมีอาการเจ็บป่วย และอาจเกิดแพร่ระบาดได้ ทำให้ประเทศผู้นำเข้าเป็นจำนวนมากต้องการรับรองการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์อาหารและสินค้าเกษตรปราศจากจุลินทรีย์ที่ก่อโรค หรือมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด นอกจากคุณภาพของสินค้าแล้ว การส่งสินค้าให้ได้ทันตามที่ได้ระบุในหนังสือสัญญาซื้อขายก็เป็นสิ่งที่ผู้ส่งออกต้องคำนึงถึงมากเช่นกัน เพราะนอกจากมีผลกระทบต่อสินค้ารุ่นต่อไปแล้ว ยังอาจต้องชดเชยด้วยเงินเป็นจำนวนมาก หากไม่สามารถส่งสินค้าได้ทันตามกำหนด ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ ดังนั้นวิธีการตรวจสอบคุณภาพของสินค้า จึงต้องมีความเหมาะสม ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องน่าเชื่อถือและยอมรับได้

*Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ลักษณะรูปท่อน แกรมลบ เป็น aerobe หรือ facultative anaerobe มีขนาดกว้าง 0.4-0.6 ไมโครเมตร และยาว 2-4 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว ไม่มีสปอร์ มีฟริมบรี่ หรือพิไล บางชนิดมีแคปซูล เป็นแบคทีเรียที่มีถิ่นอาศัยอยู่บริเวณทางเดินอาหารส่วนปลาย คือบริเวณลำไส้เล็กตอนปลายและลำไส้ใหญ่ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม จัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นและใช้เป็นดัชนีสุขาภิบาลสำหรับแหล่งน้ำ น้ำดื่มและอาหารที่แสดงการปนเปื้อนจากอุจจาระของมนุษย์หรือสัตว์ ถึงแม้ว่าเชื้อนี้จัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นแต่ปัจจุบันพบว่าบางสายพันธุ์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่อาจทำให้เกิดท้องร่วงหรือเกิดอาการที่รุนแรงได้ ปัจจุบันได้แบ่ง *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคออกเป็น 5 กลุ่ม โดยอาศัย virulence factors คือ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) และ Enteroaggregative *E. coli* (EaggEC) (Tortorello, 2000) ซึ่งมีซีโรไทป์ที่สำคัญในแต่ละกลุ่มดังแสดงในตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1 แสดงซีโรไทป์ที่สำคัญของ diarrheagenic *E. coli* (Chart, 2002)**

| Pathogenic groups | Common serogroups |
|---|---|
| Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) | O26 O55 O86 O111 O114 O125 O126 O127 O128 O142 |
| Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) | O6 O8 O15 O25 O27 O63 O119 O125 O126 O127 O128 |
| Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) | O78 O115 O148 O153 O159 O167 |
| Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) | O26 O111 O113 O124 O136 O143 O144 O152 O157 O164 |
| Enteroaggregative *E. coli* (EaggEC) | > 50 O serogroups |

เมื่อพิจารณาตารางที่ 2.1 พบว่าในกลุ่ม EHEC มีซีโรไทป์ที่สำคัญในกลุ่มนี้คือ *E. coli* O157H:7 ซึ่งนับว่าเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดปัญหาการระบาดที่เกี่ยวข้องกับอาหารในประเทศพัฒนาแล้ว โดยเฉพาะเนื้อสัตว์และน้ำนมดิบที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่เพียงพอ แต่แบคทีเรียนี้สามารถถูกทำลายได้โดยการประกอบอาหารที่ถูกต้อง

## 2.1 ลักษณะของ *Escherichia coli* O157:H7

*Escherichia coli* O157:H7 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ของ *E. coli* โดยสายพันธุ์นี้มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร (food-borne pathogen) จัดอยู่ในกลุ่ม Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1977 โดย Konowalchuk และคณะ จากผู้ป่วยที่มีอาการถ่ายอุจจาระเป็นเลือดในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่ง *E. coli* สายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารพิษที่เป็นพิษต่อ vero cells (African green monkey kidney cells) เรียกว่าวีโรไซโตทอกซินหรือวีโรทอกซิน (verotoxin, VT) และเชื้อนี้มีเมตาบอลิซึมแตกต่างจาก *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ ในหลายๆด้าน คือ 1.) *E. coli* O157:H7 ไม่สามารถหมัก sorbital ได้ใน 24 ชั่วโมง ในขณะที่ *E. coli* ทั่วไปส่วนใหญ่สามารถหมัก sorbital ได้ 2.) *E. coli* O157:H7 ไม่สร้าง β-glucuronidase (GUD) จึงไม่สามารถไฮโดรไลซ์ 4-methylumbelliferyl β-D glucuronide (MUG) ได้ แต่ *E. coli* ทั่วไปสร้าง GUD ได้จึงไฮโดรไลซ์ MUG ได้ 3.) *E. coli* O157:H7 เจริญไม่ดีหรือไม่เจริญที่ช่วงอุณหภูมิ 44-45 $^{o}$ซ ซึ่งต่างจาก *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ ที่เจริญได้ดีและเป็นช่วงอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการตรวจหา *E. coli* ในตัวอย่างอาหาร (Tortorello, 2000)

ประเด็นสำคัญที่ทำให้ *E. coli* O157:H7 นั้นมีความสำคัญ เนื่องจากพบว่าเชื้อนี้เป็นสาเหตุของอาการป่วยที่เกิดจากอาหารเป็นจำนวนมากและมีการระบาดเป็นระยะๆ ซึ่งอาการป่วยที่เกิดขึ้น อาจจะมีได้ตั้งแต่อาการอย่างอ่อน คือเกิดท้องร่วงเป็นน้ำ หรืออาจมีการตกเลือดในลำไส้ทำให้ถ่ายอุจจาระเป็นเลือด (Haemorrhagic Colitis, HC) ไปจนถึงอาการรุนแรงที่อาจเสียชีวิตได้ เช่นอาการ Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) คือปัสสาวะเป็นเลือดและอาการไตล้มเหลวเฉียบพลัน และอาการ Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) ซึ่งมีอาการคล้าย HUS แต่อาการรุนแรงกว่าคือ มีไข้สูงและมีอาการทางประสาทร่วมด้วย เป็นต้น (Karmali และคณะ, 1983; Riley และคณะ, 1983)

## 2.2 พยาธิกำเนิด

พยาธิกำเนิดของโรคจากการติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 นั้นมีกระบวนการหลายขั้นตอน ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียและปัจจัยของเจ้าบ้าน เริ่มจากการได้รับเชื้อซึ่งส่วนมากจะเป็นทางปากซึ่งมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นน้อยและเชื้อนั้นยังต้องมีชีวิตได้ในอาหารที่ถูกย่อยในกระเพาะอาหาร จากนั้นต้องแข่งกับเชื้อในทางเดินอาหารอื่นๆ เพื่อยึดเกาะและเพิ่มจำนวนที่บริเวณลำไส้และสร้างวีโรทอกซินซึ่งจะถูกดูดซึมผ่านเยื่อบุผนังลำไส้ แล้วจึงเข้าสู่กระแสโลหิต

ไปยังตัวรับที่จำเพาะของผิวเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีผลทั้งบริเวณเฉพาะที่และทั้งระบบร่างกาย (Paton และ Paton, 1998) โดยรายละเอียดจะได้อธิบายในลำดับต่อไป

2.2.1 การยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของ *E. coli* O157:H7 บริเวณทางเดินอาหาร

เมื่อได้รับ *E. coli* O157:H7 ความสามารถที่เชื้อจะยึดเกาะกับเยื่อบุผิวของลำไส้และเจริญได้ นั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการติดเชื้อ โดย *E. coli* O157:H7 นั้นมีปริมาณเชื้อในการก่อโรคต่ำประมาณ 1-100 CFU (Paton และคณะ, 1996) และยังสามารถทนต่อค่า pH ต่ำได้ คือสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นผลมาจาก *rpoS* ที่ถอดรหัสได้ stationary-phase sigma factor โดยปัจจัยนี้ทำหน้าที่ควบคุมยีนที่ทำงานในช่วง stationary phase ของ *E. coli* เพื่อสามารถอยู่รอดได้ในค่า pH 2.5 (Gonden และคณะ ,1993) เมื่อเชื้อรอดผ่านกระเพาะอาหารมาแล้ว การยึดเกาะของ *E. coli* O157:H7-ต่อเซลล์เยื่อบุผิวผนังลำไส้นั้น ยังเกี่ยวข้องกับ fimbrial-adhesin ซึ่งถอดรหัสมาจากพลาสมิด pO157 หรือเรียกว่า "virulence plasmid" ซึ่งมีขนาด 60 MDa โดยเกิดการยึดเกาะกับ Hep-2 cells (Human laryngeal epithelioma) และ Henle 407 (Human colonic carcinoma) intestinal cells (Fratamico และคณะ, 1993) นอกจากนั้นยังสามารถแทรกผ่าน Hep-2 และ Henle 407 cells ได้ ซึ่งต่างจากแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารอื่นๆเช่น Salmonellae Shigellae และ EPEC เมื่อ *E. coli* O157:H7 ยึดเกาะและแทรกผ่านเซลล์เยื่อบุผิวผนังลำไส้จะส่งผลให้เซลล์เหล่านั้นเกิดรอยแผลแบบ attaching และ effacing (AE lesion) ซึ่งคล้ายกับที่เกิดจาก EPEC โดยกลุ่มยีนที่สำคัญกับการเกิดรอยแผลแบบ AE นั้นคือ locus for enterocyte effacement (LEE) หรือเรียกว่า "Pathogenicity island" ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของ *E . coli* O157 รอยแผลแบบ AE นั้นเป็นผลจาก Hep-2 cells ที่เกิดการเรียงตัวใหม่ของ actin ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างของเซลล์ โดยเกิดจาก intimin (outer membrane protein, 97 Kda) ที่ถอดรหัสมาจาก *eaeA* และพบว่าเป็นส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของอาการป่วยจากการติดเชื้อเช่น HC และ HUS (Sandhu และคณะ, 1996; Oelschlager และคณะ, 1997) นอกจากนั้นยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ intimin จาก *E. coli* O157:H7 มีความเหมือนกับ intimin จาก EPEC 83% โดยเฉพาะบริเวณส่วนปลาย C ซึ่งมีความยาวประมาณ 25% ของความยาวทั้งหมด นั้นมีความเหมือนกันประมาณ 50% ซึ่งส่วนปลาย C เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิว และจากความแตกต่างนี้ส่งผลให้ความรุนแรงของการติดเชื้อต่างกัน (Frankel และคณะ,1995)

2.2.2 ชนิด โครงสร้างและฤทธิ์ของวีโรทอกซิน

Konowalchuk และคณะ ค้นพบ *E. coli* O157:H7 ที่สามารถสร้างวีโรทอกซินในปี ค.ศ. 1977 ต่อมา O' Brien และคณะ (1982) ได้ทำบริสุทธิ์และจำแนกลักษณะของไซโตทอกซินที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้โดย Konowalchuk พบว่าทอกซินชนิดนี้มีความเหมือนทั้งด้านโครงสร้างและกิจกรรมทางชีวภาพกับ Shiga toxin (Stx) ที่สร้างจาก *Shigella dysenteriae* type 1 นอกจากนั้นทอกซินชนิดนี้ยัง neutralize ได้กับแอนติซีรัมต่อ Shiga toxin (anti-Stx) จึงเรียกทอกซินชนิดนี้ว่า Shiga-like toxin (SLT) โดยแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ SLT 1 (VT1) และ SLT 2 (VT2) ซึ่งแบ่งได้จากการที่แอนติบอดีที่เตรียมจาก SLT 1 สามารถ neutralize ได้เฉพาะกับ SLT 1 เท่านั้น ซึ่ง *E. coli* ที่สามารถสร้างวีโรทอกซิน (Verotoxigenic *E. coli*, VTEC) บางสายพันธุ์สร้างเฉพาะ VT1 หรือเฉพาะ VT2 และอาจสร้างทั้ง VT1 และ VT2 (Strockbine และคณะ, 1986) นอกจากนั้น Marques และคณะ (1987) ยังพบ VTEC ที่แยกได้จากลูกหมูที่เป็นโรค edema นั้นสร้าง SLT 2 ที่แตกต่างไปจาก SLT 2 ปรกติ (SLT 2e, VT 2e) แม้ว่าจะ neutralize ได้กับ anti-SLT 2 แต่ไม่เกิดความเป็นพิษต่อ HeLa cells ในขณะที่ VT1 และ VT2 เกิดความเป็นพิษต่อ HeLa cells

ในช่วงปี ค.ศ. 1986-1988 ได้มีคณะผู้วิจัยหลายคณะศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสวีโรทอกซิน (*vt*) พบว่า *vt* ทั้ง 2 ชนิดของ *E. coli* O157:H7 มีความเหมือนกับ *stx* ซึ่งประมวลรหัส Shiga toxin ที่สร้างจาก *S. dysenteriae* type 1 นอกจากนั้นยังพบว่า $vt_1$ และ $vt_2$ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันประมาณ 55% (Jackson และคณะ, 1987) โดยถูกสร้างมาจากยีนของ bacteriophage ที่อยู่บนโครโมโซม ในขณะที่ VT 2e นั้นไม่ได้สร้างมาจากยีนของ bacteriophage แต่สร้างมาจากยีนบนโครโมโซม เมื่อศึกษาถึงโครงสร้างโปรตีนของวีโรทอกซินพบว่าเป็น holotoxin ซึ่ง VT1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 KDa และ VT2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68 KDa โดยทอกซินทั้ง 2 ชนิดประกอบด้วยหน่วยย่อย A จำนวน 1และหน่วยย่อย B จำนวน 5 หน่วย ซึ่งหน่วยย่อย B ทำหน้าที่จับอย่างจำเพาะกับตัวรับบนผิวของเซลล์เจ้าบ้าน คือ globotriosylceramide ($Gb_3$) ซึ่งเป็นไกลโคลิปิดที่พบมากบนผิวเซลล์ในชั้น cortex ของไต เม็ดเลือดแดงและเยื่อบุหลอดโลหิตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ในขณะที่หน่วยย่อย A แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนคือ $A_1$ (28 KDa) และ $A_2$ (4 KDa) ซึ่งส่วน $A_1$ นั้นจะสอดแทรกผ่านเมมเบรนของเอนโดพลาสมิกเรติคูลั่ม และตัดพันธะเอ็น-ไกลโคซิดิกอย่างจำเพาะใน 28S rRNA ทำให้เซลล์หยุดการสังเคราะห์โปรตีนเป็นผลให้เซลล์ตาย จากที่กล่าวมาแล้วว่าวีโรทอกซินจะจับอย่างจำเพาะกับ $Gb_3$ ซึ่งพบมากบริเวณเซลล์ไต เม็ดเลือดแดงและเยื่อบุหลอดโลหิตของมนุษย์ ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพทั้งแบบเฉพาะที่และแบบทั่วร่างกาย ซึ่งหากเกิดพยาธิสภาพที่ปลายลำไส้ใหญ่จะเกิดอาการ

อุจจาระเป็นเลือด (HC) หากเกิดพยาธิสภาพภายในไตจะส่งผลให้เกิดอาการปัสสาวะเป็นเลือดและอาจถึงไตล้มเหลวเฉียบพลัน (HUS) และหากเกิดพยาธิสภาพทั่วร่างกายจะทำให้จำนวนเกล็ดเลือดลดลงและมีอาการทางประสาท เนื่องจากเกิดพยาธิสภาพบริเวณสมอง (TTP) โดยที่ระดับความรุนแรงของอาการจะแปรตามจำนวน $Gb_3$ ที่แตกต่างกันในอวัยวะต่างๆของมนุษย์แต่ละคน และสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (Paton และ Paton, 1998)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโน พบว่า VT1 และ VT2 มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกันประมาณ 56% นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบ VT 2e กับ VT 2 ยังพบว่าในส่วนหน่วยย่อย A ของ VT 2e มีกรดอะมิโนมากกว่า VT2 อยู่ 1 กรดอะมิโน และมีความเหมือนของการเรียงตัว 94% ในขณะที่หน่วยย่อย B มีกรดอะมิโนน้อยกว่าของ VT2 อยู่ 2 กรดอะมิโน และมีความเหมือนของการเรียงตัว 87% ส่งผลให้การจับอย่างจำเพาะของหน่วยย่อย A กับตัวรับบนผิวเซลล์เจ้าบ้านเปลี่ยนจาก $Gb_3$ เป็น globotetraosylceramide ($Gb_4$) และความแตกต่างในส่วนหน่วยย่อย B นั้นทำให้ไม่เกิด cytotoxicity ต่อ HeLa cells (Human cervical carcinoma) (Paton และ Paton, 1998) ดังนั้นจึงสามารถสรุปลักษณะที่แตกต่างกันของวีโรทอกซินทั้ง 3 แบบได้ดังแสดงในตารางที่ 2.2

**ตารางที่ 2.2 แสดงลักษณะที่แตกต่างกันของวีโรทอกซินที่สร้างจาก** VTEC (Chart, 2002)

| | VT 1 | VT 2 | VT 2e |
|---|---|---|---|
| Synonyms | SLT 1 | SLT 2 | SLT 2e |
| Cytotoxicity | | | |
| Vero cells | + | + | + |
| HeLa cells | + | + | - |
| Molecular weight (kDa) | | | |
| หน่วยย่อย A | 32 | 35 | 33 |
| หน่วยย่อย B | 7.7 | 10.7 | 7.5 |
| Genes phage-encoded | + | + | - |

เมื่อพิจารณา operon ของวีโรทอกซิน พบว่าประกอบด้วย 1 หน่วยประมวลรหัส ซึ่งควบคุมการสร้างหน่วยย่อย A และหน่วยย่อย B โดยยีนที่ควบคุมการสร้างหน่วยย่อย B นั้นมี ribosome binding site ที่แรงกว่าของหน่วยย่อย A ดังนั้นหน่วยย่อย B จึงเกิดการแปลรหัสมากกว่าหน่วยย่อย A ถึง 5 เท่า จึงได้ holotoxin ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย A จำนวน 1 หน่วยและ

หน่วยย่อย B จำนวน 5 หน่วย (Habib และ Jackson, 1993) นอกจากนั้นยังพบว่าบริเวณ –10 เหนือขึ้นไปของยีนประมวลรหัสทอกซินนี้มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมของธาตุเหล็กต่อการแสดงออกของวีโรทอกซิน โดยภายใต้ภาวะที่มีปริมาณธาตุเหล็กจำกัด จะทำให้การแสดงออกของวีโรทอกซินเพิ่มขึ้น ซึ่งการจำกัดปริมาณธาตุเหล็กนั้นถูกควบคุมโดยผลิตภัณฑ์ของ *fur* ที่ควบคุมการยึดจับธาตุเหล็กอีกครั้ง (DeGrandis และคณะ,1990) นอกจากนั้นยังพบว่า VTEC สายพันธุ์ที่สร้างเฉพาะ VT2 มีความเกี่ยวข้องอย่างมากกับอาการ HC และ HUS มากกว่าสายพันธุ์ที่สร้างเฉพาะ VT2 และสร้างทั้ง VT1 และ VT2 (Kleanthous และคณะ, 1990) อาจเป็นเพราะระดับการถอดรหัสของ $vt_2$ สูงกว่าของ $vt_1$ เนื่องจากการถอดรหัสของ $vt_1$ ถูกกดโดยผลิตภัณฑ์ของ *fur* ต่อมา Calderwood และคณะ (1996) ได้จัดกลุ่มและเรียกวีโรทอกซินใหม่ดังแสดงในตารางที่ 2.3

**ตารางที่** 2.3 **แสดงการเรียกวีโรทอกซินที่นำเสนอโดย** Calderwood **และคณะ** (Paton **และ** Paton, 1998)

| Previous nomenclature | Proposed new nomenclature | |
|---|---|---|
| | Gene | Protein |
| Shiga toxin (Stx) | *stx* | Stx |
| Shiga-like toxin 1 (SLT 1) or verotoxin 1 (VT 1) | $stx_1$ | Stx 1 |
| SLT 2 or VT 2 | $stx_2$ | Stx 2 |
| SLT 2e or VT 2e | $stx_{2e}$ | Stx 2e |

## 2.2 ระบาดวิทยา

การระบาดของ *E. coli* O157:H7 นั้นพบได้ทุกทวีปทั่วโลก ซึ่งมีรายงานผู้ป่วยจากประเทศต่างๆในทวีปอเมริกา ยุโรป แอฟริกา เอเชีย และออสเตรเลีย โดยพบการระบาดเป็นครั้งแรกที่รัฐโอรีกอนและมิชิแกน ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ.1982 ซึ่งมีผู้ป่วยด้วยอาการ HC คือเลือดออกในลำไส้ ถ่ายท้องเป็นเลือด และปวดท้องอย่างรุนแรง 43 ราย จากการทานแฮมเบอเกอร์เนื้อวัวบดที่ปรุงไม่สุก (Riley และคณะ, 1983) จากนั้นมาก็พบการระบาดอีกหลายครั้ง ซึ่งส่วนมากมีสาเหตุมาจากอาหารเป็นหลักและที่พบบ่อยที่สุด คือการบริโภคเนื้อวัวที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ โดยเฉพาะเนื้อวัวบดที่ใช้ทำแฮมเบอเกอร์และแซนวิช เช่นการระบาดที่พบบริเวณภาคตะวันตกของประเทศสหรัฐอเมริกา ในปลายปี ค.ศ. 1993 พบผู้ป่วย 700 รายโดยมากกว่า 50 รายมีอาการ HUS และเสียชีวิต 4 ราย (Griffin และคณะ, 1994) นอกจากนั้นยังพบอาหารอีกหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของการระบาด เช่นน้ำนมดิบหรือผลิตภัณฑ์จากน้ำนมที่ไม่ผ่านขบวนการฆ่าเชื้อ

ที่เพียงพอ ผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้ เช่นผักกาดแก้ว หัวไชเท้า และน้ำแอปเปิ้ลเป็นต้น (Paton และ Paton, 1998) การระบาดของ *E. coli* O157:H7 ครั้งใหญ่ที่สุด คือที่ประเทศญี่ปุ่น ในปี ค.ศ. 1996 พบผู้ป่วย 11,826 ราย เสียชีวิต 12 ราย โดยเฉพาะที่เมืองซาไกในโอซากา พบผู้ป่วยด้วยอาการ HUS 7,966 ราย มากกว่า 100 รายแสดงอาการ HUS และเสียชีวิต 3 ราย ซึ่งมีสาเหตุมาจากการทานหัวไชเท้าในอาหารกลางวันที่โรงเรียนจัดไว้ (Fukushima และคณะ, 1997) จากการสำรวจพบอัตราการติดเชื้อในประเทศอังกฤษและสหรัฐอเมริกา เมื่อปี ค.ศ. 1997 คือ 2.1 และ 2.3 ต่อแสนคน ตามลำดับ (Wilson และ Heaney, 1999)

สำหรับในประเทศไทยนั้น จากการศึกษาของ Suthienkul และคณะ ในปี ค.ศ. 1990 พบการปนเปื้อน *E. coli* O157:H7 9% จากเนื้อวัวที่วางขายในตลาดสดในกรุงเทพฯ 8% จากเนื้อวัวในโรงฆ่าสัตว์ และ 11 ถึง 84% จากมูลสัตว์ในฟาร์มปศุสัตว์ จากการศึกษาของ Vuddhakul และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 พบการปนเปื้อน *E. coli* O157 4 ตัวอย่างจากเนื้อวัวที่วางขายในตลาดสด 95 ตัวอย่าง และ 1 ตัวอย่างจากมูลวัว 55 ตัวอย่าง บริเวณภาคใต้ของประเทศไทย

การระบาดของ *E. coli* O157:H7 นอกจากการติดเชื้อจากอาหารซึ่งเป็นสาเหตุหลักแล้ว ยังพบการระบาดที่เกิดจากอีกหลายสาเหตุ เช่นจากแหล่งน้ำสาธารณะ โดยการดื่มหรือการว่ายน้ำ (Ackman และคณะ, 1997) ตัวอย่างเช่น ในปี ค.ศ. 1996 พบผู้ติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 จากแหล่งน้ำสาธารณะ 24 ราย ในประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นต้น (Jay, 2000) นอกจากนี้การระบาดจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่ง (person-to-person) ก็พบว่ามีความสำคัญเช่นกัน โดยส่วนมากมักเกิดในโรงเรียนอนุบาล และศูนย์รับเลี้ยงเด็กระหว่างวัน เนื่องจากเด็กอาจไม่ระวังเรื่องสุขอนามัย และเด็กมีภูมิต้านทานต่ำกว่าผู้ใหญ่ จึงมีความเสี่ยงสูงในการติดเชื้อ (Reida และคณะ, 1994) การติดเชื้อแบบหลังนี้มักเกิดจากการได้รับเชื้อจำนวนน้อย คือประมาณ 10-100 CFU ซึ่งคล้ายกับการติดเชื้อจาก *Shigella* คือ ประมาณ 100 CFU จึงเป็นการยืนยันถึง ปริมาณเชื้อในการก่อโรคที่ต่ำสำหรับ *E. coli* O157:H7 (Neill และคณะ, 1994)

## 2.3 ลักษณะอาการจากการติดเชื้อ

*E. coli* O157:H7 และซีโรไทป์อื่นๆ ในกลุ่ม EHEC มีลักษณะอาการจากการติดเชื้อที่สำคัญ คือมีการถ่ายอุจจาระเป็นเลือด เนื่องจากมีการตกเลือดในลำไส้ (Haemorrhagic colitis, HC) แต่ความรุนแรงของอาการที่แสดงออกอาจแตกต่างกันไปในแต่ละคน อาการจะเริ่มแสดงหลังได้รับเชื้อ ซึ่งมีปริมาณเชื้อในการก่อโรคต่ำประมาณ 100 CFU เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง โดยจะเริ่มจากการถ่ายท้องมีน้ำปริมาณมาก ต่อมาจะถ่ายอุจจาระเป็นเลือด มีอาการปวดท้องรุนแรง อาเจียน มักไม่มีไข้ และแสดงอาการป่วยติดต่อกัน 2-9 วัน หรือเฉลี่ย 4 วัน อาการนี้เกิดได้

กับคนทุกวัย ส่วนมากจะหายได้เองในรายที่ไม่มีอาการรุนแรง (Paton และ Paton, 1998; Tortorello, 2000)

อาการป่วยที่แสดงออกนั้น ในรายที่มีอาการรุนแรงนั้นมักพบอาการ Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) ซึ่งมีลักษณะอาการที่แสดงออกคือ มีอาการเม็ดเลือดแดงแตก (microangiopathic hemolytic anemia) จำนวนเกล็ดเลือดลดลง (thrombocytopenia) และอาการไตทำงานผิดปรกติ (nephropathy) หรือไตล้มเหลวเฉียบพลัน (acute renal failure) โดยผู้ที่เสี่ยงต่อการแสดงออกของอาการ HUS คือผู้ที่มีพัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันต่ำหรือบกพร่องไป เช่นทารกและเด็กเล็ก และพบว่าจำนวนผู้ป่วยที่มีการตกเลือดในลำไส้ ซึ่งแสดงอาการ HUS มีประมาณ 4-10% การบำบัดรักษาสามารถทำได้โดยการถ่ายเลือดและการฟอกไต แต่พบว่าประมาณ 30% ของผู้รอดชีวิตยังได้รับผลจากอาการ HUS ต่อด้วย เช่นไตเสื่อมสภาพเรื้อรัง ความดันโลหิตสูง และอาการประสาทเสื่อมหน้าที่ (Paton และ Paton, 1998; Tortorello, 2000)

นอกจากนั้นในขั้นรุนแรงมากอาจแสดงอาการ Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) ซึ่งมีลักษณะอาการที่แสดงออกทั่วไปคล้าย HUS แต่ที่ต่างกันคือ มีไข้สูง เลือดคลั่งในสมองทำให้มีอาการเกี่ยวกับระบบประสาทและเสียชีวิตได้ (Tortorello, 2000)

ระดับความรุนแรงของลักษณะอาการที่แสดงออกจากการติดเชื้อนั้น สัมพันธ์กับปัจจัยของเชื้อกับเจ้าบ้าน และในแง่ของการระบาดนั้นอายุของผู้ติดเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญต่อสัดส่วนของผู้ที่ติดเชื้อกับการเกิดอาการ HUS รวมถึงอัตราการเสียชีวิต ซึ่งมีประมาณ 3-5% (Tortorello, 2000)

## 2.4 การตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7

ถึงแม้ว่า *E. coli* O157:H7 จะมีลักษณะต่างๆเหมือน *E. coli* สายพันธุ์ทั่วไป แต่ก็มีลักษณะเฉพาะบางประการที่แตกต่างไปดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น จึงสามารถใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 ได้ โดยส่วนมากสามารถตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 ได้ด้วยวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา แต่อย่างไรก็ตาม ในขั้นการตรวจยืนยันต้องอาศัยวิธีทางซีโรวิทยา อิมมูโนวิทยา อณูชีววิทยา และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมด้วย

### 2.5.1 วิธีการตรวจวินิจฉัยมาตรฐานทั่วไป (Convention identification method)

การตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธีมาตรฐานประกอบด้วยขั้นตอนโดยทั่วไป 3 ขั้นตอน คือ 1. การบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อ 2. การแยกเชื้อ 3. การตรวจยืนยัน (Tortorello, 2000)

ขั้นที่ 1. <u>การบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อ</u>

จากรายงานพบว่าเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารมักอยู่ในสภาพบาดเจ็บ จากขบวนการเก็บรักษา การแปรรูป หรือการเตรียมอาหาร ที่ต้องผ่านการแช่แข็ง ความร้อน หรือส่วนผสมของอาหาร (Clavero และคณะ, 1995) นอกจากนั้น *E. coli* O157:H7 ซึ่งมีปริมาณเชื้อในการก่อโรคต่ำ มักจะพบเป็นจำนวนน้อยในสิ่งแวดล้อมหรือตัวอย่างอาหาร เมื่อเทียบกับเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ (Bell และคณะ, 1994; Paton และคณะ, 1996) จึงทำให้ยากต่อการตรวจวินิจฉัย ดังนั้นจึงควรเพิ่มจำนวน *E. coli* O157:H7 ในตัวอย่างที่ต้องการตรวจก่อน เพื่อให้มีจำนวนเชื้อมากพอที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ ซึ่งจะทำให้ผลการตรวจมีความถูกต้อง แม่นยำมากขึ้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อนั้นโดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพิ่มจำนวนเชื้อทั่วไป เช่น *E. coli* broth (EC) Trpticase Soy Broth (TSB) Lauryl Sulfate Tryptose broth (LST) หรือ Buffered Peptone Water (BPW) เป็นต้น (Tortorello,2000) และอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างคัดเลือกซึ่งมีการเติมสารเคมีบางประเภทหรือยาปฏิชีวนะ เพื่อลดจำนวนหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อปนเปื้อนอื่นๆดังนี้ modified *E. coli* broth ซึ่งมีการเติม bile salt เพื่อยับยั้งเชื้อกลุ่มแกรมบวก และเติม novobiocin เพื่อยับยั้งเชื้อกลุ่มแกรมลบอื่นๆ (mEC+n) (Okrend และคณะ, 1990) Enterohemorrhagic *E. coli* Broth (EEB) (Weagant และคณะ ,1995) modified Trypicase Soy Broth ที่เติม novobiocin (mTSB+n) (Weagant และคณะ, 1995) LST ที่เติม Cefixime-Tellurite (CT-LST) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเหมือน cephalosporine ซึ่งจะยับยั้งเชื้อที่ไม่หมัก sorbitol เช่น *Aeromonas* spp. *Proteus* spp. และ *E. coli* สายพันธุ์ทั่วไป (Zadik และคณะ, 1993) หรือ BPW ที่เติม sodium thioglycolate (STG-BPW) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม aerobe (Sata และคณะ, 2003) เป็นต้น

ภาวะในการบ่ม คือ 37 $^{o}$ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ *E. coli* O157:H7 เจริญได้ดีที่สุด (Doyle และ Schoeni, 1984) หรือ 42 $^{o}$ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้สำหรับการบ่ม เนื่องจาก *E. coli* O157:H7 เจริญได้ แต่เชื้อปนเปื้อนอื่นๆเจริญได้น้อยกว่า (De Boer, 1999 ) เวลาในการบ่ม 6-24 ชั่วโมง โดยอาจจะเขย่าหรือไม่ก็ได้

วิธีตรวจวินิจฉัยมาตรฐานที่ได้รับการรับรองโดยองค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. Food and Drug Administration, U.S. FDA) ที่ระบุไว้ใน Bacteriological Analytical Manual (BAM), 8$^{th}$ ed ทำการบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเหลว Enterohemorrhagic *E. coli* broth (EEB) ที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ โดยการเขย่า เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง (Hitchins และคณะ, 1998)

และวิธีตรวจวินิจฉัยมาตรฐานที่ได้รับการรับรองโดยกรมการเกษตร ประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. Department of Agriculture, USDA) ที่ระบุไว้ใน Microbiology Laboratory Guidebook 3rd ed ทำการบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว modified Trypicase Soy Broth ที่เติม novobiocin (mTSB+n) ที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง (Sharar และ Rose, 1998)

ขั้นที่ 2. การแยก *E. coli* O157:H7

จากที่ได้กล่าวมาแล้วในเบื้องต้นว่า *E. coli* O157:H7 มีลักษณะบางประการที่สำคัญและแตกต่างไปจาก *E. coli* สายพันธุ์ทั่วไป เช่นการไม่หมัก sorbitol และไม่สร้าง β-glucuronidase (GUD) จึงไม่สามารถไฮโดรไลซ์ 4-methylumbelliferyl β-D glucuronide (MUG) ได้ ในขณะที่ *E. coli* สายพันธุ์ทั่วไปสร้าง GUD ได้จึงไฮโดรไลซ์ MUG ได้เกิดเป็น Methylumbelliferone (MU) ซึ่งจะเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (UV) ความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร (Tortorello, 2000) จากความแตกต่างนี้เองจึงได้นำมาใช้ในการแยก *E. coli* O157:H7 โดยการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.3

**ตารางที่ 2.4 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยก *E. coli* O157:H7**

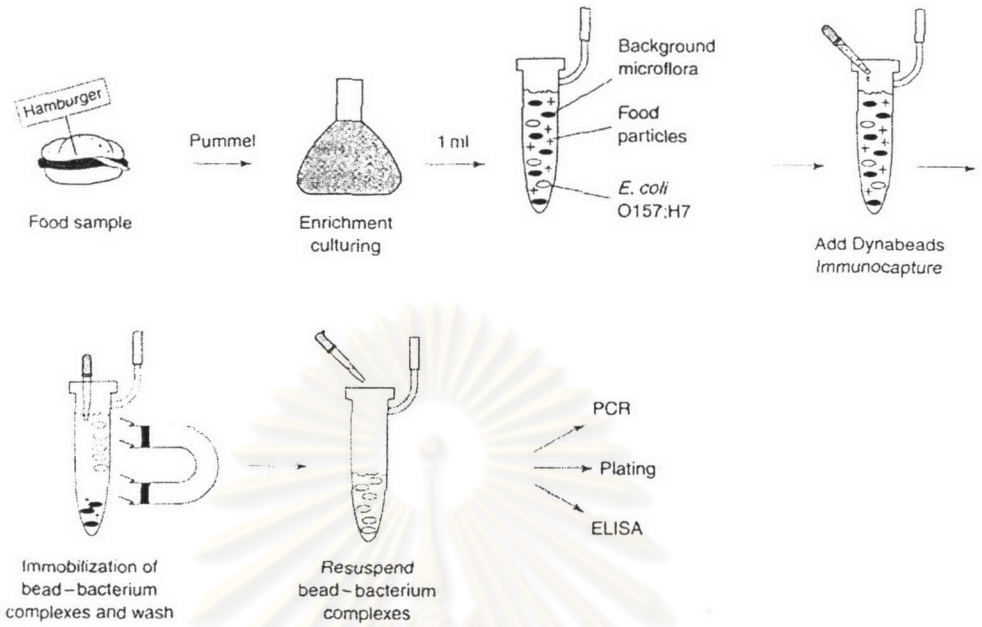
| อาหารเลี้ยงเชื้อ | สีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ | | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| | *E .coli* | *E. coli* O157:H7 | |
| Sorbitol MacConkey agar (SMAC agar) | แดง | ไม่มีสี | March และ Ratman, 1986 |
| Fluorocult *E. coli* O157 agar | เหลือง | ไม่มีสี ไม่เรืองแสง UV | Szabo และคณะ, 1986 |
| SMAC with BGIG (5-bromo-4 chloro-3 indoxyl β-D glucuronide) | ฟ้า เรืองแสง UV | ไม่มีสี ไม่เรืองแสง UV | Okrend และคณะ, 1990 |
| Cefixime rhamnose sorbitol MacConkey agar (CR-SMAC agar) | ไม่เจริญ | ไม่มีสี | Chapman และคณะ, 1991 |
| CT-SMAC agar | ไม่เจริญ | ไม่มีสี | Zadik และคณะ, 1993 |
| Rainbow agar O157 | ชมพู | ดำ | Bettelheim และคณะ, 1998 |
| CHROM agar O157 | ฟ้า | ชมพู | Bettelheim และคณะ, 1998 |

แยก *E. coli* O157:H7 โดยถ่ายน้ำเลี้ยงเชื้อหลังการบ่มเพิ่มจำนวนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ดังที่แสดงไว้ข้างต้น นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 หรือ 42 $^{o}$ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

นอกจากนั้นยังมีเชื้อกลุ่ม VTEC หรือ *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆเช่น *E. coli* O8 O124 หรือ O153 และเชื้ออื่นๆเช่น *Hafnia alvei* *Citrobacter freundii* *Enterobacter* หรือ *Proteus* ซึ่งไม่หมัก sorbitol และไม่สร้าง β-glucuronidase เช่นเดียวกับ *E. coli* O157:H7 (Paton และ Paton, 1998; Chiueh และคณะ, 2001) และยังพบ *E. coli* O157 บางสายพันธุ์สามารถหมัก sorbitol และสร้าง β-glucuronidase ได้ (Gunzer และคณะ, 1992) และ *E. coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมหรืออาหารมักจะมีจำนวนน้อย เมื่อเทียบกับเชื้อปนเปื้อนอื่นๆที่มีเป็นจำนวนมาก (Bell และคณะ, 1994; Paton และ Paton, 1996) ดังนั้นจึงยากต่อการตรวจวินิจฉัยและการแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงซึ่งอาจมีผลบวกเท็จสูง

จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการนำเทคนิค Immuno magnetic seperation (IMS) มาใช้แยก *E. coli* O157:H7 หลังการบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อ โดยใช้ Dynabeads anti-*E. coli* O157 (Dynal, Norway) ซึ่งเป็นเม็ดแม่เหล็กที่เคลือบด้วย affinitty purified *E. coli* O157 antibodies จะจับอย่างจำเพาะกับแอนติเจน O157 บนผิวเซลล์ของ *E. coli* O157 เกิดเป็น bead-bacteria complexs จึงสามารถแยก *E. coli* O157 ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อปนเปื้อนอื่นๆอยู่ได้โดยใช้แท่งแม่เหล็ก (Wright และคณะ, 1994) จากนั้นจึงนำ *E. coli* O157 ที่แยกได้ไปตรวจสอบต่อโดยอาจนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ดังที่ได้แสดงไว้ในตาราง 2.3 หรือนำไปตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Enzyme-link immunosorbent assay, ELISA หรือวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Tortorello, 2000) อาจสรุปการใช้เทคนิค IMS สำหรับแยก *E. coli* O157:H7 ได้ดังรูปที่ 2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่** 2.1 **แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค** IMS **สำหรับแยก** *E. coli* O157:H7 **จากตัวอย่างอาหาร** (Tortorello, 2000)

ซึ่งการใช้เทคนิค IMS ร่วมกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธี ELISA และวิธี PCR ทำให้ความไวและความจำเพาะของการตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้น คือประมาณ 2 CFU ต่อกรัมอาหารก่อนการบ่มเพิ่มจำนวน ประมาณ 1-2 CFU ต่อกรัมอาหารก่อนการบ่มเพิ่มจำนวน และประมาณน้อยกว่า 1 CFU ต่อกรัมอาหารก่อนการบ่มเพิ่มจำนวน ตามลำดับ (Wright และคณะ, 1994; Gooding และ Choudary, 1997; Tortorello, 1998)

ขั้นที่ 3. <u>การตรวจยืนยัน</u>

หลังการบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อและแยกเชื้อโดยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล้ว เพื่อให้การตรวจวินิจฉัยมีความถูกต้อง แม่นยำ จึงต้องทำการตรวจยืนยัน *E. coli* O157:H7 โดยนำโคโลนีที่สงสัยไปทดสอบต่อไป ซึ่งอาจทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) ดังแสดงในตารางที่ 2.4

**ตารางที่** 2.5 **แสดงสมบัติทางชีวเคมีของ** *E. coli* O157:H7 (Tortorello, 2000)

| Triple Sugar Ion (TSI) | | | | LIM | | | Citrate | MR | VP | Cellobiose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Butt | Slant | Gas | $H_2S$ | Lysine[1] | Indole | Motile | | | | |
| Acid | Acid | + | - | - | + | + | - | + | - | - |

Lysine[1] คือ lysine decarboxylase

นอกจากนั้นยังทดสอบทางซีโรวิทยา (serological typing) กับแอนติซีรัม O157 และ H7 หรือตรวจวีโรทอกซินโดยวิธี ELISA หรือด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture cytotoxicity assay) (Tortorello, 2000)

นอกจากการตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 ดังรายละเอียดที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น ซึ่งเป็นการตรวจในเชิงคุณภาพ แต่การตรวจนับจำนวนเซลล์ของ *E. coli* O157:H7 ซึ่งเป็นการตรวจในเชิงปริมาณนั้น จะใช้วิธี Most Probable Number (MPN) โดยสามารถระบุจำนวนเซลล์ได้อย่างแม่นยำแม้จะมีปริมาณของเชื้อปนเปื้อนอื่นๆเป็นจำนวนมาก ถึงแม้ว่าวิธีนี้ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป แต่วิธี MPN นี้เสียเวลามาก เนื่องจากต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวนมากสำหรับทุกหลอดทดลองของชุด MPN และยังมีข้อจำกัดในแง่ความไว ความจำเพาะและเวลาที่ใช้อีกด้วย (Tortorello, 2000)

### 2.5.2 วิธีการตรวจวินิจฉัยแบบรวดเร็ว (Rapid identification methods)

นอกจากการตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธีมาตรฐานดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ยังได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธีรวดเร็ว เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะ ในขณะเดียวกันก็ลดปริมาณงานและเวลาที่ใช้สำหรับการตรวจ โดยส่วนมากอาศัยหลักการทางอิมมูโนวิทยาและอณูชีววิทยา

#### 2.5.2.1 การตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 แบบรวดเร็วโดยใช้วิธีอิมมูโนวิทยา

การตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 โดยวิธีทางซีโรวิทยาหรือการตรวจวีโรทอกซินนั้นค่อนข้างยุ่งยากและอาจมีความไวและความจำเพาะต่ำ จึงได้มีการพัฒนาวิธีทางอิมมูโนวิทยาซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่ามาใช้ โดยมีการผลิตเป็นชุดน้ำยา (kit) ออกจำหน่าย ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Binax Now EH *E. coli* test (Binax Inc, USA)

C Quic Plus *E. coli* O157:H7 test (M-tech Diagnostics, UK)

The *E. coli* O157 Latex Test (Oxoid Diagnotic Reagents, UK)

*E. coli* ST EIA (Denka Seiken, Japan)

EZ Coli RapidDetection System (Difco, USA)

Organon Teknika EHEC-Tek Test (Organon Teknika, Netherland)

Premier EHEC and Premier *E. coli* O157 (Meridian Diagnotics, USA)

ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* (STEC) (ProSpect Phama, USA)

ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 plus (Meridian Diagnotics, USA)

RIM Immuno Shiga Toxin *E. coli* (STEC) (REMEL Inc, USA)

Reveal *E. coli* (Neogen Crop, USA)

Singlepath *E. coli* O157:H7 Rapid test (Merck, USA)

Vetox F Assay (Denka Seiken, Japan)

VET-RPLA (Reverse Passive Latex Agglutination assay) (Oxoid Ltd, USA)

2.5.2.2 การตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 แบบรวดเร็วโดยใช้วิธีอณูชีววิทยา

เมื่อได้ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสวีโรทอกซินทั้ง 2 ชนิด ($vt_1$ และ $vt_2$) (Calderwood และคณะ, 1987; Willshaw และคณะ, 1987) จึงได้มีการพัฒนาวิธีทางอณูชีววิทยา เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 เนื่องจากวิธีทางอณูชีววิทยามีความไวและความจำเพาะสูง อาจทำได้โดยใช้วิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization) หรือวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

<u>วิธีไฮบริไดเซชัน</u> (hybridization)

การตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 โดยวิธีโคโลนีไฮบริไดเซชัน นั้นทำได้โดยย้ายโคโลนีที่สงสัยไปยังเมมเบรน และทำให้เซลล์แตก ดีเอ็นเอที่เสียสภาพจะถูกปล่อยออกมาและติดบนเมมเบรน จากนั้นเติมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ลงไปจะเกิดการไฮบริไดเซชัน เนื่องจากลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กัน โดยเริ่มแรกดีเอ็นเอติดตามที่ใช้จะออกแบบมาจาก $vt_1$ และ $vt_2$ และติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีซึ่งเป็นอันตราย และดีเอ็นเอติดตามมีครึ่งชีวิตสั้นจึงไม่สะดวกในการทำงาน (Newland และ Neill, 1988; Karch และ Meyer, 1989a) ต่อมาจึงได้

ติดฉลากด้วยสารที่ไม่ใช่กัมมันตภาพรังสีเช่น dioxigenin และ biotin ซึ่งไม่ส่งผลให้ความไวและความจำเพาะในการตรวจลดลง (Thomas และคณะ, 1991) นอกจากดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับ *vt* แล้วยังได้มีการใช้ดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับ *eae* ด้วย ซึ่งพบว่าสามารถตรวจ *E. coli* O157 ที่ไม่มี *vt* ได้ (Willshaw และคณะ, 1994)

วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

เมื่อทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *vt* ทั้ง 2 ชนิด ($vt_1$ และ $vt_2$) ดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว จึงได้มีการพัฒนาวิธี PCR สำหรับตรวจ *E. coli* O157:H7 โดยการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อ *vt* โดยผู้วิจัยหลายคณะ ดังนี้ เริ่มจากในปี ค.ศ. 1989 Karch และ Meyer ได้ออกแบบไพร์เมอร์ 1 คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* ทั้ง 2 ชนิด เพื่อตรวจ *E. coli* บริสุทธิ์ที่สร้างวีโรทอกซินซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย ต่อมาในปี ค.ศ. 1990 Pollard และคณะ ได้ออกแบบไพร์เมอร์ 2 คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* แต่ละชนิดเพื่อตรวจ *E. coli* บริสุทธิ์ที่สร้างวีโรทอกซิน พบว่าสามารถตรวจเชื้อกลุ่มนี้จำนวน 40 สายพันธุ์ตัวอย่างได้ แต่ไม่สามารถตรวจเชื้อกลุ่มนี้ที่สร้าง VT 2e จากนั้นมาจึงได้มีการนำวิธี PCR ไปใช้ในการตรวจวินิจฉัย *E. coli* ที่สร้างวีโรทอกซินในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยจากการติดเชื้อพวก VTEC หรือตัวอย่างอาหารที่พบว่าเป็นสาเหตุของการแพร่ระบาด ดังนี้ Gannon และคณะ (1992) ใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* แต่ละชนิด ในการตรวจ VTEC ในเนื้อบดด้วยวิธี PCR ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีความไวและความจำเพาะสูง คือสามารถตรวจได้แม้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 1 CFU ต่อกรัมเนื้อบด หลังการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mTSB ที่อุณหภูมิ 42 $^{o}$ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และไม่พบผลบวกจาก *E. coli* สายพันธุ์ทั่วไปและแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นๆ Paton และคณะ (1993) ได้ใช้ไพร์เมอร์คู่ที่ได้รับการออกแบบไว้โดย Karch และ Meyer (1989b) ในการตรวจอุจจาระของผู้ป่วยด้วยวิธี PCR พบว่าเกิดผลบวกเท็จ จึงได้ทำการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ 1 คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* ทั้ง 2 ชนิด (รวมทั้ง $vt_{2e}$) ในการตรวจ VTEC ในอุจจาระของผู้ป่วยด้วยวิธี PCR พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง คือสามารถตรวจ VTEC จำนวนน้อยประมาณ 10 CFU ต่อมิลลิลิตร แม้จะมีเชื้อปนเปื้อนอื่นๆอยู่เป็นจำนวนมากประมาณ $10^9$ CFU ได้ แต่ในการ VTEC ตรวจโดยวิธี PCR จากผู้วิจัยหลายคณะที่ได้กล่าวไว้แล้วนั้นใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความบริสุทธิ์สูงที่ผ่านการสกัดโดยใช้ใช้วิธีที่ยุ่งยาก หลายขั้นตอนและใช้เวลานานในการสกัด

เนื่องจากว่ายังมี *E. coli* อีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถสร้างวีโรทอกซินได้ เช่นสายพันธุ์ O26 O111 และ O113 เป็นต้น (Goldwater และ Betteiheim, 1994) ดังนั้นการใช้ไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับ *vt* ในการทำ PCR จึง ไม่สามารถระบุได้ว่าเชื้อที่ให้ผลบวกนั้นเป็น *E. coli* O157:H7 ต่อมาเมื่อได้ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ $rfb_{O157}$ ที่ประมวลรหัสในการสร้าง O-antigen ของ

*E. coli* O157 ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของเชื้อสายพันธุ์นี้ (Bilge และคณะ, 1996) และพบว่าแอนติซีรัม O157 จะสามารถเกิดปฏิกิริยาไขว้ได้กับลิโพพอลิแซคคาไรด์ของเชื้ออื่นๆอีกหลายชนิดเช่น *Citrobacter freundii* *Yersinia enterocolitica* *Pseudomonas maltophilia* *Brucella abortus* *Brucella melitensis* *Escherichia hermanii* *Hafnia alvei* *Morganella morganii* และ *Salmonella* group N (Maurer และคณะ,1999) โดยเฉพาะ *E. hermanii* ซึ่งมีสมบัติทางชีวเคมีคล้ายกับ *E. coli* O157:H เช่นไม่หมัก sorbitol และไม่สร้าง β-glucuronidase (Perry และ Bundle, 1990) นอกจากนั้นยังมีรายงานพบ *E. coli* O157:H7 ที่มีลักษณะเหมือนกับ *E. coli* O157:H7 ทั่วไปทุกประการ แต่เมื่อทดสอบด้วย latex agglutination kit กลับให้ผลลบแสดงว่าเป็น *E. coli* O157 แต่ไม่สร้างแอนติเจน O157 ในขณะที่ยังมี $rfb_{O157}$ (Radu และคณะ, 1998) จึงเป็นปัญหาทำให้ยากในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีมาตรฐานทั่วไป แต่ในระดับยีนที่ประมวลรหัสการสร้างแอนติเจน O157 นั้นมีความเป็นเอกลักษณ์สูง ดังนั้นจึงได้มีการออกแบบไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ $rfb_{O157}$ สำหรับการตรวจ *E. coli* O157 ในน้ำนมดิบด้วยวิธี PCR เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งผลที่ได้พบว่ามีประสิทธิภาพดี คือมีความจำเพาะและความไวในการตรวจสูง โดยสามารถตรวจได้แม้มีเซลล์จำนวนน้อยประมาณ 10 CFU และไม่พบผลบวกจาก *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆและ *Citrobacter freudii* ซึ่งให้ผลบวกเมื่อทดสอบโดยใช้แอนติซีรัม O157 (Maurer และคณะ,1999)

นอกจากการทำ PCR โดยการใช้ไพร์เมอร์เพียงคู่เดียวแล้ว ยังได้มีการใช้ไพร์เมอร์หลายคู่ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายต่างๆที่มีความสำคัญ ในการตรวจพร้อมกันเพียงครั้งเดียว (Multiplex PCR) เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการตรวจ ในขณะเดียวกันก็ลดเวลาที่ใช้ เช่น Fratamico และคณะ (1995) ได้ทำ Multiplex PCR เพื่อตรวจ *E. coli* O157 โดยใช้ไพร์เมอร์ 3 คู่ที่จำเพาะกับยีนต่างๆ ดังนี้ *vt* *eaeA* และ EHEC-*hlyA* แต่เป็นการตรวจจากเชื้อบริสุทธิ์เท่านั้น นอกจากนั้นไพร์เมอร์ในแต่ละคู่ให้ค่าความไวที่แตกต่างกันและไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับ *vt* นั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ PCR ของ $vt_1$ และ $vt_2$ ได้เนื่องจากมีขนาดที่ใกล้เคียงกันมากจึงเป็นปัญหาในการนำไปใช้ Cebula และคณะ (1995) ทำ Multiplex PCR โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีนต่างๆดังนี้ $vt_1$ $vt_2$ และไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับ *uidA* บริเวณที่ผิดปรกติ โดยยีนนี้เมื่อปรกติจะประมวลรหัส β-glucuronidase แต่ใน *E. coli* O157:H7 ยีนนี้จะผิดปรกติไป ส่งผลให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวนี้ได้ จึงสามารถใช้ยีนนี้เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อสายพันธุ์นี้ได้ แต่ได้มีรายงานพบว่ามี *E. coli* O157:H7 ที่มี *uidA* ปรกติจึงสามารถสร้าง β-glucuronidase ได้ (Gunzer และคณะ, 1992) ดังนั้นผลบวกที่ได้จึงอาจเป็นผลบวกเท็จ และทำให้การตรวจเกิดความผิดพลาดได้ Paton และ Paton (1998) ทำ Multiplex PCR เพื่อตรวจเชื้อกลุ่ม VTEC ในอุจจาระของผู้ป่วยโดยใช้ไพร์เมอร์ 4 คู่ที่จำเพาะกับยีนต่างๆดังนี้ $vt_1$ $vt_2$ *eaeA* และ EHEC-*hlyA* ซึ่งผลที่ได้

มีความจำเพาะคือเกิดผลบวกทั้งหมดกับเชื้อ VTEC ที่ทำการทดสอบ และมีความไวคือสามารถตรวจได้เมื่อมีจำนวนเซลล์เชื้อบริสุทธิ์ประมาณ $10^3$ CFU แต่ในการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบนั้นยังต้องมีกระบวนการหลายขั้นตอน เพื่อทำให้ดีเอ็นเอแม่แบบมีความบริสุทธิ์ ซึ่งใช้เวลานานและไม่เหมาะสมสำหรับทำการตรวจปริมาณมาก และได้มีรายงานตัวอย่างโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อกลุ่ม VTEC หรือ *E. coli* O157 โดยวิธี PCR หรือ Multiplex PCR ดังตารางที่ 2.6

**ตารางที่ 2.6 แสดงตัวอย่างโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อกลุ่ม VTEC หรือ *E. coli* O157 โดยวิธี PCR หรือ Multiplex PCR**

| โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ ($T_m$) | ยีนเป้าหมาย | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| MK 1 | 5'- TTTACGATAGACTTCTCGAC -3' | $vt_1$ และ $vt_2$ | Karch และ Meyer, 1989 |
| MK 2 | 5'- CACATATAAATTATTTCGCTC -3' | | |
| VT 1a | 5'- GAAGAGTCCGTGGGATTACG -3' | $vt_1$ | Pollard และ คณะ, 1991 |
| VT 1b | 5'- AGCGATGCAGCTATTAATAA -3' | | |
| VT 2a | 5'- TTAACCACACCCACGGCAGT -3' | $vt_2$ | Pollard และ คณะ, 1991 |
| VT 2b | 5'- GCTCTGGATGCATCTCTGGT -3' | | |
| SLT 1-F | 5'- ACACTGGATGATCTCAGTGG -3' | $vt_1$ | Gannon และ คณะ, 1992 |
| SLT 1-R | 5'- CTGAATCCCCCTCCATTATG -3' | | |
| SLT 2-F | 5'- CCATGACAACGGACAGCAGTT -3' | $vt_2$ | Gannon และ คณะ, 1992 |
| SLT 2-R | 5'- CCTGTCAACTGAGCACTTTG -3' | | |
| VT-F | 5'- ATACAGAG(GA)G(GA)ATTTCGT -3' | $vt_1$ และ $vt_2$ | Paton และ คณะ,1993 |
| VT-R | 5'- TGATGATG(AG)CAATTCAGTTA -3' | | |
| AE 19 | 5'- CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA -3' | *eaeA* | Gannon และ คณะ, 1993 |
| AE 20 | 5'- TCAGCGTGGTTGGATCAACCT -3' | | |
| MFS 1F | 5'- ACGATGTGGTTTATTCTGGA -3' | EHEC-*hlyA* | Fratamico และ คณะ, 1995 |
| MFS 1R | 5'- CTTCACGTCACCATACATAT -3' | | |
| PT-2 | 5'- GCGAAAACTGTGGAATTGGG -3' | *uidA* | Cebula และ คณะ, 1995 |
| PT-3 | 5'- TGATGCTCCATAACTTCCTG -3' | | |
| PF-8 | 5'- CGTGATGATGTTGAGTTG -3' | $rfb_{O157}$ | Maurer และ คณะ, 1999 |
| PR-8 | 5'- AGATTGGTTGGCATTACTG -3' | | |

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า การตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง ในขณะที่ใช้เวลาในการดำเนินการน้อย แต่การนำการตรวจวิธีนี้มาใช้ต้องอาศัยผู้ปฏิบัติการที่มีทักษะสูง ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาให้สะดวกและง่ายต่อการปฏิบัติการมากขึ้นและราคาของเครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ก็มีราคาไม่สูงมาก หากทำการตรวจในปริมาณมาก เช่น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ สามารถสังเคราะห์ได้เองในห้องปฏิบัติการ ราคาไม่สูงและเก็บรักษาได้นาน นอกจากนั้นเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Thermal Cycle) ยังได้รับการพัฒนาให้ใช้งานได้สะดวกและสามารถทำปฏิกิริยาได้จำนวนมากขึ้นในขณะที่ราคาไม่สูงเมื่อเทียบกับเครื่อง ELISA plate readers และสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ได้อย่างรวดเร็วแบบกึ่งอัตโนมัติ เช่น การใช้ Q-PCR และ TaqMan (Perkin-Elmer, USA) และ PCR-ELISA (Boehringer, Germany) (Paton และ Paton, 1998)

แม้ว่าจะได้มีผู้วิจัยหลายคณะได้ศึกษาและทำการตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างหลายประเภทเช่น อุจจาระของผู้ป่วยจากการติดเชื้อหรืออาหารที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของการแพร่ระบาด เช่นน้ำนมดิบหรือเนื้อสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นการทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์เพียงคู่เดียวที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายต่างๆ ที่พบว่าเป็นเอกลักษณ์ของ *E. coli* O157:H7 แต่ก็ยังไม่สามารถระบุได้ว่าผลบวกที่ได้เป็น *E. coli* O157:H7 เนื่องจากยังมีเชื้ออีกหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแกรมลบต่างๆหรือเชื้อกลุ่ม VTEC อื่นๆ ที่มักพบการปนเปื้อนในตัวอย่างที่ต้องการตรวจมียีนเป้าหมายต่างๆเช่นเดียวกับที่พบใน *E. coli* O157:H7 และแม้ว่าจะทำการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ตั้งแต่ 3 ถึง 4 คู่ร่วมกัน หรือ Multiplex PCR เพื่อเพิ่มความจำเพาะมากขึ้นแต่ก็ยังไม่สามารถระบุผลบวกที่ได้ว่าเป็น *E. coli* O157:H7 อย่างชัดเจน อีกทั้งการใช้ไพร์เมอร์หลายคู่ทำให้สิ้นเปลือง ต้องปรับภาวะในการทำปฏิกิริยามากเพื่อให้แยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ PCR ของแต่ละยีนได้อย่างชัดเจนและในการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบนั้น ยังต้องมีกระบวนการหลายขั้นตอนเพื่อทำให้ดีเอ็นเอแม่แบบมีความบริสุทธิ์ซึ่งใช้เวลาและสิ้นเปลืองมากขึ้น

ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกตรวจ *E. coli* O157 ในเนื้อดิบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์เพียง 2 คู่ โดยคู่แรกจำเพาะกับ *vt* ที่สามารถใช้ตรวจได้ทั้ง $vt_1$ และ $vt_2$ (รวมทั้ง $vt_{2e}$) ซึ่งการใช้ไพร์เมอร์ที่สามารถตรวจ *vt* ทั้ง 2 ชนิดได้นั้นมีข้อดีคือสามารถตรวจ $vt_2$ ได้แม้จะมีความหลากหลายของยีนมากก็ตาม โดยไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะต่อ $vt_2$ อาจไม่จำเพาะต่อ $vt_{2e}$ ดังนั้นการใช้ไพร์เมอร์ลักษณะนี้จึงสามารถตรวจ *E. coli* O157:H7 ได้ดีขึ้น (Paton และ Paton, 1998) และไพร์เมอร์คู่ที่ 2 ที่จำเพาะกับ $rfb_{O157}$ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของเชื้อสายพันธุ์นี้ เพื่อเพิ่มความจำเพาะและสามารถระบุได้ว่าเป็น *E. coli* O157 โดยใช้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบอย่างง่ายและรวดเร็ว