บทที่ 1

บทนำ

Escherichia coli O157:H7 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งของ *Escherichia coli* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae จัดเป็นเชื้อพวกแกรมลบ เป็น aerobe หรือ facultative anaerobe เจริญได้ง่าย อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม *E. coli* สายพันธุ์ O157:H7 นี้มีความสำคัญเนื่องจากเป็นเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยจัดอยู่ในกลุ่ม Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) และพบว่าเมื่อมีการแพร่ระบาดก่อให้เกิดอาการท้องร่วง เลือดออกในลำไส้และอาจมีอาการไตวายเฉียบพลัน หากรุนแรงอาจถึงกับเสียชีวิตได้ ซึ่งเกิดจากวีโรทอกซิน (verotoxin) (ในอดีตเรียกว่า Shiga-like toxin เนื่องจากมีความเหมือนกับทอกซินที่สร้างมาจาก *Shigella dysenteriae* type 1) ที่สร้างมาจากยีนของ bacteriophage ที่อยู่บนโครโมโซมของเชื้อสายพันธุ์นี้ วีโรทอกซินที่ *E. coli* O157:H7 สร้างมี 2 ชนิด คือวีโรทอกซิน 1 (VT1) และ วีโรทอกซิน 2 (VT2) ซึ่งเชื้อนี้อาจสร้างทอกซินนี้เพียง 1 ชนิดหรืออาจสร้างทั้ง 2 ชนิด การระบาดของโรคที่เกิดจากอาหารพบว่ามีจำนวนมากที่มีสาเหตุส่วนใหญ่มาจาก *E. coli* O157:H7 และพบว่ามีการระบาดเป็นระยะๆ การระบาดของเชื้อนี้พบครั้งแรกเมื่อปีค.ศ.1982 และมีการระบาดอีกหลายครั้ง โดยมีสาเหตุมาจากการบริโภคอาหารประเภทเนื้อที่มีการปนเปื้อนทั้งในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดาและอังกฤษ ในปีค.ศ.1996 เกิดการระบาดมากที่สุดที่ได้รับการบันทึกไว้ คือที่เมืองซาไกในประเทศญี่ปุ่นพบประชากรที่มีอาการป่วยจำนวน6,000 ราย สาเหตุสำคัญที่พบบ่อยคือการบริโภคเนื้อวัวที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ เมื่อไม่นานมานี้พบว่ามีอาหารอื่นอีกหลายประเภทที่ตรวจพบ *E. coli* O157:H7 เช่นนมที่ไม่ผ่านการพาสเจอไรซ์ และ apple cider ซึ่งเป็นต้นเหตุของการแพร่ระบาดหลายครั้ง นอกจากนั้นยังสามารถติดต่อจากบุคคลหนึ่งไปสู่อีกบุคคลหนึ่งได้อีกด้วย โดยส่วนมากมักเกิดในโรงเรียนอนุบาล และศูนย์รับเลี้ยงเด็กระหว่างวัน *E. coli* O157:H7 มีคุณลักษณะแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นของ *E. coli* ในหลายๆด้าน คือเชื้อนี้สามารถหมัก sorbitol ได้ช้าหรือไม่ได้เลยและไม่สร้าง β-glucuronidase นอกจากนี้สายพันธุ์นี้ไม่สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 44-45°C ซึ่งต่างจาก *E. coli* สายพันธุ์อื่น จากลักษณะที่แตกต่างกันดังกล่าวจึงสามารถจำแนกเชื้อสายพันธุ์นี้ได้โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างคัดเลือก (Tortorello, 2000)

วิธีการมาตรฐานสำหรับการตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 ในอาหารนั้นจะใช้วิธีการแบบมาตรฐานทั่วไป ซึ่งใช้การตรวจโดยบ่มเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงชนิดเชื้อต่างๆที่มีการปรับสูตรอาหารโดยอาศัยคุณลักษณะบางประการที่สำคัญของ *E. coli* O157:H7 ที่แตกต่างไปจาก

E. coli สายพันธุ์ทั่วไปดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น เช่น Cefixime and Tellurite Sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC) หรือ Chrom agar O157 สำหรับการตรวจนับในเชิงปริมาณนั้นใช้วิธี Most Probable Number (MPN) โดยระบุจำนวนที่แน่นอนได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ วิธี MPN เป็นวิธีที่ดีสำหรับการนับจำนวนเซลล์ของ *E. coli* O157:H7 ที่มีปริมาณน้อย แม้จะมีปริมาณของเชื้อปนเปื้อนอื่นๆเป็นจำนวนมาก (Tortorella, 2000)

ถึงแม้วิธีมาตรฐานดังกล่าวจะเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป แต่ผลที่ได้ยังอาจมีข้อผิดพลาดได้ เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้อาศัยพื้นฐานจากสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเป้าหมาย ซึ่งให้ผลที่ไม่แน่นอนในภาวะการตรวจที่แตกต่างกันและเสียเวลาในการดำเนินการมาก เนื่องจากต้องเตรียมอาหารจำนวนมากสำหรับบ่มเพาะและแยกเชื้อ แล้วยังต้องทำการตรวจยืนยันอีกหลายขั้นตอนด้วย นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในแง่ของความไวและความจำเพาะของการตรวจด้วยหากมีเชื้อปนเปื้อนอื่นๆในตัวอย่างเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆหลายวิธีโดยมีจุดมุ่งหมายในการตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 อย่างรวดเร็ว แม่นยำ มีความจำเพาะและความไวในการตรวจสูง ต่อมาได้ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสวีโรทอกซินทั้ง 2 ชนิด (vt_1 และ vt_2) (Calderwood และคณะ, 1987) จึงได้มีการนำวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้ตรวจวินิจฉัย *E. coli* ที่สร้างวีโรทอกซิน (Verotoxigenic *E. coli*, VTEC) เริ่มจากในปี ค.ศ. 1989 Karch และ Meyer ได้ออกแบบไพร์เมอร์ 1 คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* ทั้ง 2 ชนิดสำหรับตรวจเชื้อกลุ่ม VTEC ต่อมา Pollard และคณะ (1990) ได้ทำการตรวจโดยใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* แต่ละชนิด จากนั้นได้มีการนำวิธี PCR ไปใช้ในการตรวจ *E. coli* ที่สร้างวีโรทอกซินจากเนื้อดิบโดยใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* แต่ละชนิด ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัย *E. coli* ที่สร้างวีโรทอกซินในตัวอย่างอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Gannon และคณะ,1992) ต่อมาได้มีการออกแบบไพร์เมอร์ 1 คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* ทั้ง 2 ชนิดสำหรับการตรวจ *E. coli* ที่สร้างวีโรทอกซินจากอุจจาระของผู้ป่วยจากการติดเชื้อโดยวิธี PCR (Paton และคณะ,1993) แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น *E. coli* O157:H7 เนื่องจากว่ายังมี *E. coli* อีกหลายสายพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสวีโรทอกซินได้ เช่น *E. coli* สายพันธุ์ O26 O111 และ O113 เป็นต้น (Goldwater และ Betteiheim, 1994)

นอกจากการใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* ในการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี PCR แล้วยังได้มีการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนประมวลรหัส virulence factor อื่นๆที่พบในเชื้อกลุ่ม VTEC เช่น *eaeA* และ EHEC-*hlyA* สำหรับการตรวจด้วยวิธี PCR (Gannon และคณะ, 1993; Schmidt และคณะ, 1995) ต่อมาเมื่อได้ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rfb_{O157} ที่ประมวลรหัสการสร้าง O-antigen ของ *E. coli* O157 (Bilge และคณะ, 1996) จึงได้มีการตรวจ *E. coli* O157 ในน้ำนมดิบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157} ซึ่งผลที่ได้พบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ว่ามีประสิทธิภาพดี (Maurer และคณะ, 1999) และมีรายงานจากผู้วิจัยหลายคณะได้ใช้ไพร์เมอร์หลายคู่ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายต่างๆที่มีความสำคัญ ในการตรวจพร้อมกันเพียงครั้งเดียว (Multiplex PCR) เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการตรวจ ในขณะเดียวกันก็ลดปริมารงานและเวลาที่ใช้ลง เช่น Fratamico และคณะ (1995) ได้ทำ Multiplex PCR เพื่อตรวจ *E. coli* O157 โดยใช้ไพร์เมอร์ 4 คู่ ที่จำเพาะกับยีนต่างๆดังนี้ vt_1 vt_2 *eaeA* และ EHEC-*hlyA* Cebula และคณะ (1995) ทำ Multiplex PCR โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีนต่างๆดังนี้ *vt* *eaeA* และไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับ *uidA* บริเวณที่เกิดการผ่าเหล่า โดยยีนประมวลรหัส β-glucuronidase แต่ใน *E. coli* O157:H7 ยีนนี้จะผิดปรกติไป ส่งผลให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวนี้ได้ Paton และ Paton (1998) ได้ทำ Multiplex PCR เพื่อตรวจเชื้อกลุ่ม VTEC ในอุจจาระของผู้ป่วยโดยใช้ไพร์เมอร์ 4 คู่ที่จำเพาะกับยีนต่างๆดังนี้ vt_1 vt_2 *eaeA* และ EHEC-*hlyA* แต่พบว่ายังมีข้อด้อยบางประการในงานวิจัยที่ได้มีรายงานมาซึ่งใช้ไพร์เมอร์ตั้งแต่หรือมากกว่า 3 คู่ในการตรวจเช่น ผลที่ได้ยังไม่สามารถระบุผลบวกที่ได้ว่าเป็น *E. coli* O157:H7 อย่างชัดเจน อีกทั้งยังมีขั้นตอนในการดำเนินงานมากและยุ่งยากในการปรับภาวะสำหรับทำปฏิกิริยาเพื่อให้แยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ PCR ของแต่ละยีนได้อย่างชัดเจนและในการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อให้มีความบริสุทธิ์สูง

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารของไทยได้มีการขยายตัวอย่างมากและรวดเร็วจึงควรตระหนักให้มีระบบการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตได้ เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นเกี่ยวกับความปลอดภัยและคุณภาพของอาหารที่ส่งออกหรือนำเข้าและที่บริโภคภายในประเทศ จึงจำเป็นต้องมีกระบวนการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี PCR นั้นนับว่าเป็นวิธีที่มีศักยภาพและสามารถสนองต่อความจำเป็นดังกล่าวได้ โดยมีความไวและความจำเพาะสูงและใช้เวลาในการดำเนินการน้อย ทำให้สามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกตรวจ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ ที่จำเพาะกับ *vt* และ rfb_{O157} เพื่อเพิ่มความจำเพาะและสามารถระบุได้ชัดเจนมากขึ้นว่าเป็น *E. coli* O157:H7 โดยใช้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบอย่างง่ายและรวดเร็ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดย Multiplex PCR
2. เพื่อศึกษาถึงความไวและความจำเพาะของวิธี Multiplex PCR ในการตรวจ *E. coli* O157
3. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *E. coli* O157 ในเนื้อดิบโดย Multiplex PCR

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบภาวะที่เหมาะสมของวิธี Multiplex PCR สำหรับตรวจ *E. coli* O157 ที่ปนเปื้อนเนื้อดิบ และทราบข้อมูลเบื้องต้นในแง่ความจำเพาะและความไวของการตรวจ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการตรวจนี้ให้มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงขึ้น จนนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อสายพันธุ์นี้ในเนื้อดิบแทนวิธีดั้งเดิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย