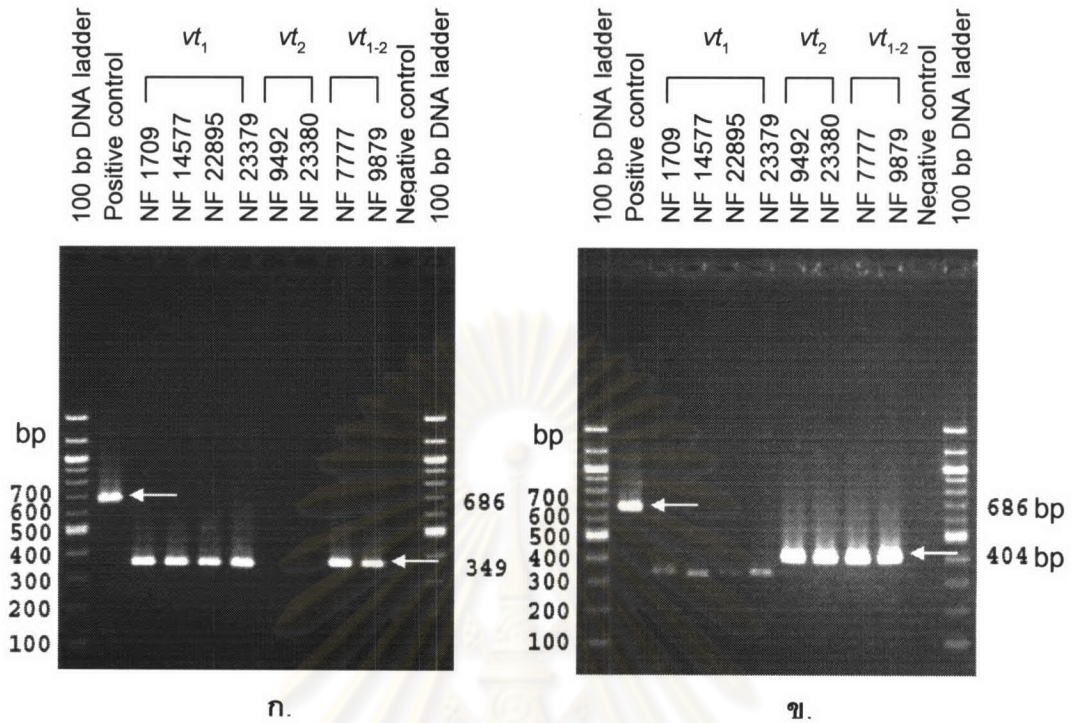
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบจีโนไทป์ของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ต่าง ๆโดยชุดทดสอบสำเร็จสำหรับยีนประมวลรหัส verotoxin

ตรวจสอบยีนยันจีโนไทป์ของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ต่างๆได้แก่ NF 1709 NF 14577 NF 22895 NF 23379 NF 9492 NF 23380 NF 7777 และ NF 9879 ว่ามี *vt* เป็นชนิดที่ 1 ชนิดที่ 2 หรือ มีทั้ง 2 ชนิด โดยชุดทดสอบสำเร็จ O157 (Verocytotoxin Genes) PCR Typing Set (Takara, Japan) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6 ซึ่งสามารถตรวจจีโนไทป์ของ *E. coli* O157:H7 ได้ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหมายของ *vt* ชนิดที่ 1 (vt_1) มีขนาด 349 bp ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *vt* ชนิดที่ 2 (vt_2) มีขนาด 404 bp และผลิตภัณฑ์ PCR ของตัวควบคุมผลบวก (Positive control) ของ *vt* ทั้ง 2 ชนิด มีขนาด 686 bp ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ มีขนาดตรงตามที่คาดหมาย ในรูปที่ 4.1 ก. แสดงการตรวจ *vt* ชนิดที่ 1 (vt_1) พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของ vt_1 มีขนาด 349 bp ในช่องวิ่งที่ 3 ถึง 6 และ 9 ถึง 10 ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์เป็น vt_1 และ $vt_{1\text{-}2}$ ดังที่แสดงไว้ข้างต้นเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยา ในขณะที่ในช่องวิ่งที่ 7 ถึง 8 ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR และในรูปที่ 4.1 ข.แสดงการตรวจ *vt* ชนิดที่ 2 (vt_2) พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของ vt_2 มีขนาด 404 bp ในช่องวิ่งที่ 7 ถึง 10 ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์เป็น vt_2 และ $vt_{1\text{-}2}$ ดังที่แสดงไว้ข้างต้นเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ในช่องวิ่งที่ 3 ถึง 6 ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์เป็น vt_1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยา สามารถเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 350 bp ได้แม้จะใช้ไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับ vt_2 ก็ตาม อาจเป็นเพราะลำดับนิวคลีโอไทด์ของ vt_1 และ vt_2 มีความเหมือนกันประมาณร้อยละ 55 (Jackson และคณะ, 1987) ไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับ vt_2 จึงอาจเกิดการจับกับดีเอ็นเอแม่แบบของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์เป็น vt_1 ได้ แต่การจับกันของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบดังกล่าวนั้นยังไม่สมบูรณ์พอ จึงเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความเข้มน้อยกว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจากดีเอ็นเอแม่แบบที่มีจีโนไทป์ vt_2 มากและมีขนาดไม่ตรงตามที่คาดหมาย ดังนั้นจะเห็นได้ว่า *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์มีจีโนไทป์ตรงตามที่ระบุไว้จริง จึงได้ใช้สำหรับดำเนินการวิจัยในขั้นต่อๆไป



รูปที่ 4.1 **ภาพอะกาโรสเจลแสดงการตรวจสอบ** *E. coli* O157:H7 **โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จ** O157 (Verocytotoxin genes) PCR Typing Set (Takara, Japan)
ก.) การตรวจสอบ *vt* **ชนิดที่**1 (vt_1) **ข.) การตรวจสอบ** *vt* **ชนิดที่**2 (vt_2)

4.2 หาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

4.2.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* หรือ ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157}

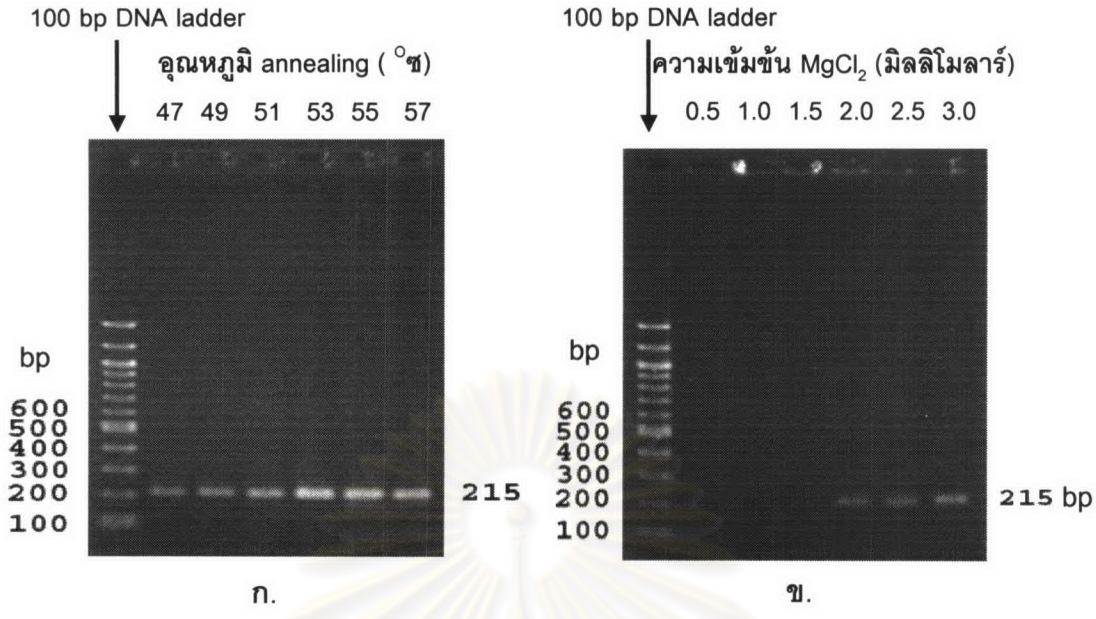
จากผลการทดลองในข้อ 4.1 พบว่า *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์มีจีโนไทป์ตรงตามที่ระบุไว้จริง จึงเลือก *E. coli* สายพันธุ์ NF 7777 เป็นตัวแทนสำหรับหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดย PCR ซึ่งใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ในการทดลองโดยไพร์เมอร์คู่แรก VT-F และ VT-R มีความจำเพาะกับ *vt* (Paton และคณะ,1993) และไพร์เมอร์คู่ที่สอง PF-8 และ PR-8 มีความจำเพาะกับ rfb_{O157} (Maurer และคณะ, 1999) เนื่องจากเมื่อใช้ภาวะสำหรับทำ PCR ด้วยไพร์เมอร์คู่ VT-F และ VT-R ที่ระบุไว้โดย Paton และคณะ (1993) ซึ่งใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 47 ^{o}ซ พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นมีความเข้มน้อย ดังนั้นจึงทำการแปรผันอุณหภูมิ annealing

ตั้งแต่ 47 49 51 53 55 และ 57 ^{o}ซ ตามลำดับ นอกจากนั้นยังแปรผันความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ด้วยตั้งแต่ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR เนื่องจากในงานวิจัยขั้นต่อไปต้องทำ Multiplex PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่ดังกล่าวข้างต้นร่วมกัน จึงแปรผันปัจจัยทั้ง 2 ดังกล่าวในการทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ rfb_{O157} ด้วยเพื่อเก็บข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการทำ Multiplex PCR

จากการทำ PCR ด้วยไพร์เมอร์คู่ VT-F และ VT-R โดยทำการแปรผัน อุณหภูมิ annealing และ ความเข้มข้นของสารละลาย $MgCl_2$ ตามวิธีที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.2.1 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 โดยในรูป 4.2 ก. แสดงการแปรผันอุณหภูมิ annealing พบว่า ในช่องวิ่งที่ 6 ซึ่งใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 55 ^{o}ซ นั้นให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 215 bp ตรงตามที่คาดหมายและมีความเข้มที่เหมาะสม และในรูป 4.2 ข. แสดงการแปรผันความเข้มข้นของ $MgCl_2$ พบว่าในช่องวิ่งที่ 7 ซึ่งใช้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาของ $MgCl_2$ คือ 3.0 มิลลิโมลาร์ นั้นให้แถบดีเอ็นเอมีความเข้มมากที่สุด

และจากการทำ PCR ด้วยไพร์เมอร์คู่ PF-8 และ PR-8 ซึ่งได้แปรผันปัจจัยทั้ง 2 ดังกล่าว ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.3. โดยในรูป 4.3 ก. แสดงการแปรผันอุณหภูมิ annealing พบว่า ในช่องวิ่งที่ 2 ถึง 7 ซึ่งใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 47 ถึง 57 ^{o}ซ ตามลำดับนั้น ให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 420 bp ตรงตามที่คาดหมายและมีความเข้มไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และในรูป 4.3 ข. แสดงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $MgCl_2$ พบว่าในช่องวิ่งที่ 3 ถึง 7 ซึ่งใช้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาของ $MgCl_2$ คือ 1.0 ถึง 3.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นั้นให้ แถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ดังนั้นอุณหภูมิ annealing และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม สำหรับการทำ PCR ของไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่ คือที่ 55 ^{o}ซ และ 3.0 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ

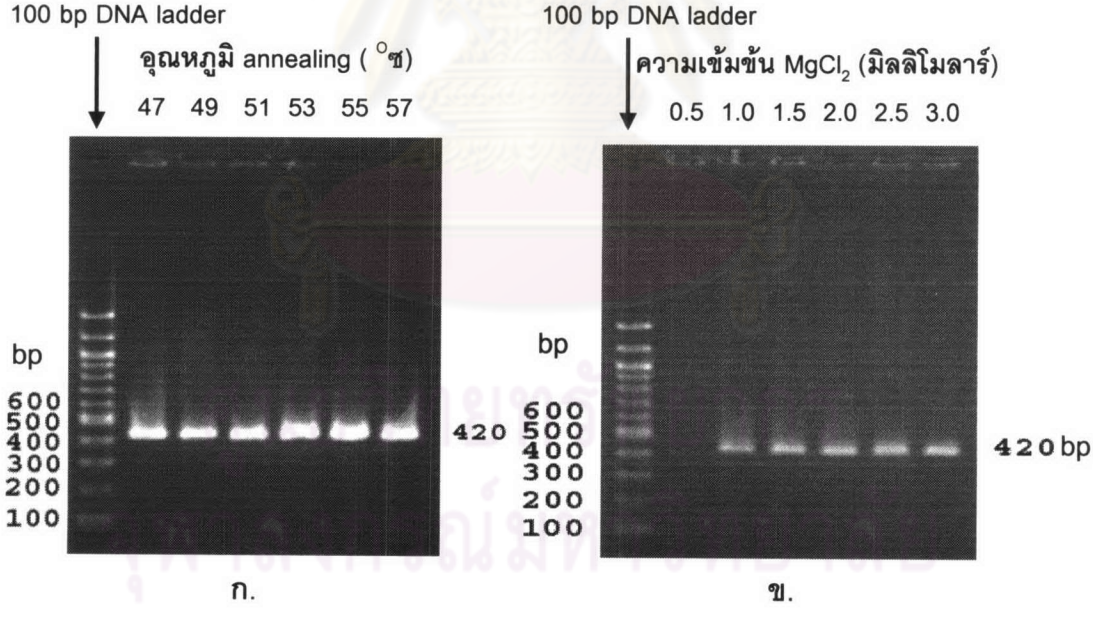
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก. ข.

รูปที่ 4.2 **ภาพอะกาโรสเจลแสดงการแปรผันปัจจัยในการทำ** PCR **ด้วยไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ** *vt* (VT-F **และ** VT-R)

ก.) **การแปรผันอุณหภูมิ** annealing ข.) **การแปรผันความเข้มข้น** $MgCl_2$



ก. ข.

รูปที่ 4.3 **ภาพอะกาโรสเจลแสดงการแปรผันปัจจัยในการทำ** PCR **ด้วยไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ** rfb_{O157} (PF-8 **และ** PR-8)

ก.) **การแปรผันอุณหภูมิ** annealing ข.) **การแปรผันความเข้มข้น** $MgCl_2$

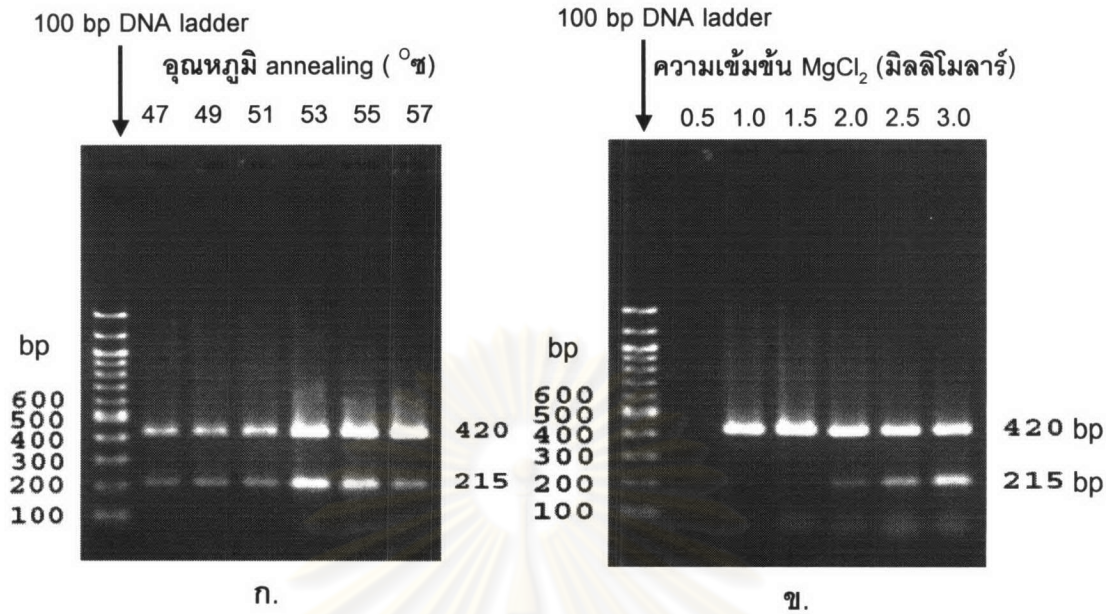
4.2.2 Multiplex PCR โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* และ ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157}

เมื่อทราบภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดย PCR ซึ่งใช้ไพร์เมอร์สำหรับ *vt* หรือไพร์เมอร์สำหรับ rfb_{O157} แล้ว จึงหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำ Multiplex PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่ดังกล่าวร่วมกัน เพื่อนำภาวะดังกล่าวไปใช้ในการตรวจ *E. coli* O157:H7 เนื่องจาก Multiplex PCR มีข้อดีคือสามารถทราบผลได้ในการทำปฏิกิริยาเดียว โดยทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.2.2 ซึ่งใช้ *E. coli* สายพันธุ์ NF 7777 เป็นตัวแทนสำหรับดำเนินการวิจัยและแปรผันปัจจัย 2 ปัจจัยคือ อุณหภูมิ annealing ตั้งแต่ 47 49 51 53 55 และ 57 ^{o}ซ ตามลำดับ และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ตั้งแต่ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ

ในการหาภาวะที่เหมาะสมในการทำ Multiplex PCR โดยทำการแปรผันอุณหภูมิ annealing และ ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ พบว่าทุกอุณหภูมิ annealing ที่ทดสอบเกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหมายคือ 215 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ *vt* และ 420 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ rfb_{O157} โดยที่อุณภูมิ 53 และ 55 ^{o}ซ ให้ผลิตภัณฑ์ชัดเจนที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ก. นอกจากนี้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ทดสอบ 3.0 มิลลิโมลาร์ ให้ผลิตภัณฑ์ของยีนทั้ง 2 ตรงตามที่คาดหมายและชัดเจนที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ข.

ดังนั้นอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมสำหรับการทำ Multiplex PCR คือที่ 55 ^{o}ซ และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมสำหรับการทำ Multiplex PCR คือ 3.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

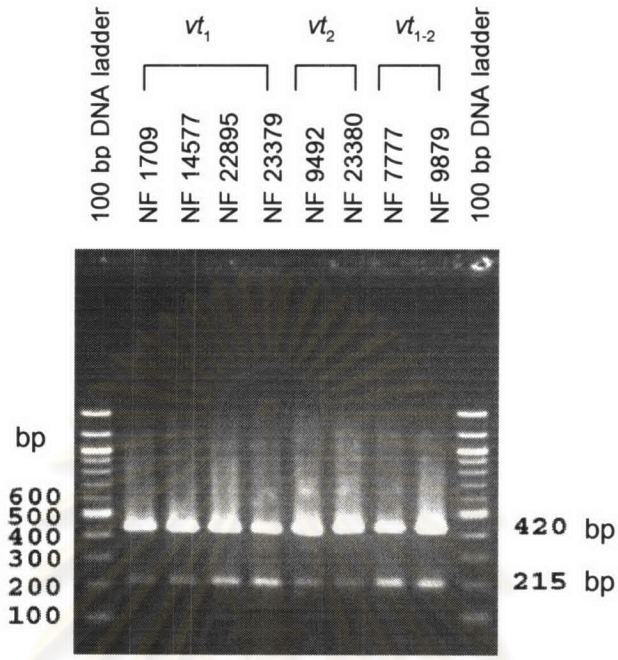
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 **ภาพอะกาโรสเจลแสดงการแปรผันปัจจัยในการทำ** Multiplex PCR **ด้วยไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ** *vt* **และไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ** rfb_{O157}
ก.) การแปรผันอุณหภูมิ annealing **ข.) การแปรผันความเข้มข้น** $MgCl_2$

4.3 การตรวจ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ต่างๆด้วย Multiplex PCR โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* และ ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157}

เมื่อทราบภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดย Multiplex PCR จากข้อ 4.2.2 แล้ว จึงใช้ภาวะดังกล่าวสำหรับการตรวจ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ เพื่อยืนยันว่าภาวะดังกล่าวสามารถใช้ในการตรวจ *E. coli* O157:H7 เหล่านี้ ซึ่งมีจีโนไทป์แตกต่างกัน 3 แบบ คือ VT 1 VT 2 และ VT 1-2 ได้จริง คือเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขึ้นตรงตามที่คาดหมายทั้ง 2 ขนาด คือ 215 และ 420 bp จาก *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดย Multiplex PCR จากข้อ 4.2.2 ดังกล่าวสามารถตรวจ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ได้จริง



รูปที่ 4.5 **ภาพอะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์** Multiplex PCR **ของ** *E. coli* O157:H7 **ทั้ง** 8 **สายพันธุ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้**

4.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *vt* และ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ rfb_{O157} จาก *E. coli* O157:H7

จากข้อ 4.3 แสดงว่าภาวะในการทำ Multiplex PCR สามารถตรวจ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้จริง จึงหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนทั้ง 2 คือ *vt* และ rfb_{O157} โดยผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. coli* O157:H7 จากข้อ 4.2.1 ซึ่งมีขนาด 215 และ 420 bp ได้นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN version 2.2.7 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank (ภาคผนวก ค)

ผลิตภัณฑ์ PCR	% ความเหมือน (Homology)	เอกสารอ้างอิง
vt_1	86% ต่อ vt_1 ของ *E. coli* O157:H7 RIMD 0509952	Yokoyama และคณะ, 2000
vt_2	89% ต่อ vt_2 ของ *E. coli* O157:H7 RIMD 0509952	Makino และคณะ, 1999
rfb_{O157}	97% ต่อ *rfbB* ของ *E. coli* O157:H7 C664-1992	Wang และ Reeves, 1998

นอกจากนั้นยังได้เทียบหาความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.7 ซึ่งจะทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำเข้าไปเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank (ภาคผนวก ค)

ผลิตภัณฑ์ PCR	% ความเหมือน (Homology)	เอกสารอ้างอิง
vt_1	60% ต่อ verotoxin 1 หน่วยย่อย A จาก *vt*1A ของ *E. coli* O157:H7 RIMD 0509952	Yokoyama และคณะ, 2000
vt_2	69% ต่อ verotoxin 2 หน่วยย่อย A จาก *vt*2A ของ *E. coli* O157:H7 RIMD 0509952	Makino และคณะ, 1999
rfb_{O157}	86% ต่อ O-antigen จาก *rfbB* ของ *E. coli* O157:H7 ATCC35150	Maurer และคณะ, 1999

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. coli* O157:H7 ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วยภาวะที่เหมาะสม จากข้อ 4.2.1 โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* หรือ ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157} นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับยีนทั้ง 3 แบบที่ต้องการจริง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

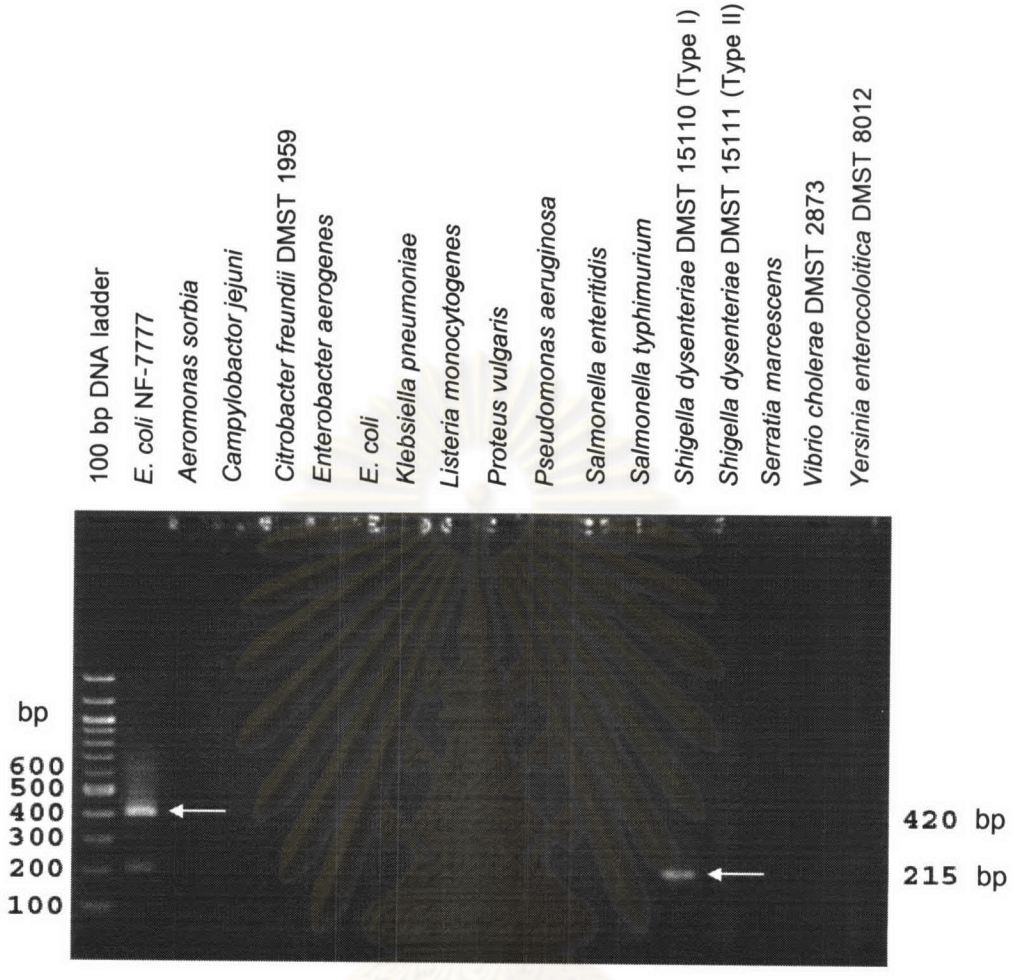
4.5 ความจำเพาะและความไวของการตรวจ *E. coli* o157:H7 ด้วย Multiplex PCR

จากข้อ 4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการ Multiplex PCR มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับ *vt* ทั้งชนิดที่ 1 ชนิดที่ 2 และ rfb_{O157} จริง ดังนั้นแสดงว่า Multiplex PCR ในภาวะที่เหมาะสมสามารถนำไปตรวจ *E. coli* O157:H7 ได้ จึงทำการทดลองขั้นต่อไปคือการศึกษาความจำเพาะและความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR

4.5.1 ความจำเพาะของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR

ศึกษาความจำเพาะของ Multiplex PCR เพื่อการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดยนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียต่างๆ ตามข้อ 3.3 เป็นแม่แบบในการทำ Multiplex PCR ผลการทดลองในรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์จาก Multiplex PCR (215 และ 420 bp) เกิดเฉพาะที่ใช้ *E. coli* สายพันธุ์ NF-7777 (ใช้เป็นตัวแทนของ *E. coli* O157:H7) สำหรับเป็นตัวควบคุมผลบวก (Positive control) ทำปฏิกิริยาตามข้อ 3.10.1 ในขณะที่เชื้ออื่นๆ ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ใดๆ ยกเว้นในช่องวิ่งที่ 15 ซึ่งใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *Shigella dysenteriae* type 1 นั้นเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 215 bp เท่านั้น เนื่องจาก *Shigella dysenteriae* type 1 มียีนประมวลรหัส Shiga toxin (*stx*) ซึ่งมีความเหมือนกับ *vt* ของ *E. coli* O157:H7 (Calderwood และคณะ, 1987; Strockbine และคณะ, 1988) ดังนั้นจึงเกิดผลิตภัณฑ์ PCR กับ ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* แต่ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 420 bp ซึ่งเกิดจากไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157} ในขณะที่ *E. coli* O157:H7 จะเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขึ้นทั้ง 2 ขนาด ดังที่ปรากฏในช่องวิ่งที่ 2 ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า การทำ Multiplex PCR มีความจำเพาะสำหรับการตรวจ *E. coli* O157:H7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

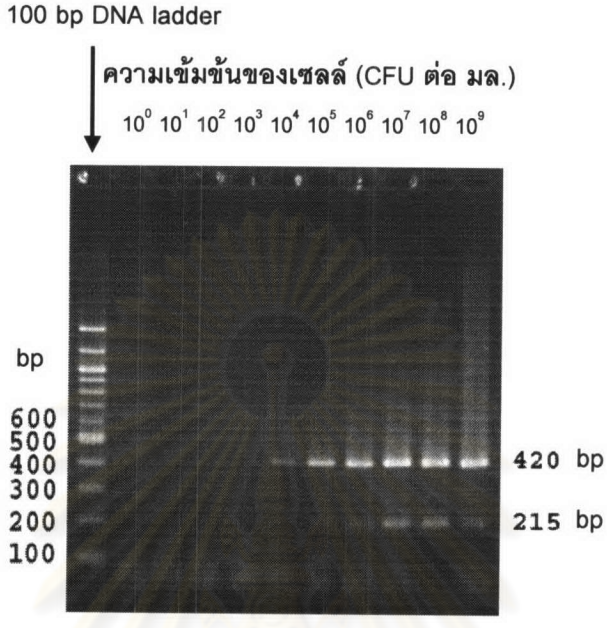


รูปที่ 4.6 **ภาพอะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์** PCR **ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ใช้สำหรับการศึกษาความจำเพาะของการตรวจ** *E. coli* O157:H7 **ด้วย** Multiplex PCR

4.5.2 ความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR

ทำการตรวจ *E. coli* สายพันธุ์ NF-7777 ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^9 ถึง 10^0 CFU ต่อ มิลลิลิตร โดย Multiplex PCR ด้วยภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.7 คือ พบว่าในช่องวิ่งที่ 6 เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 420 bp เพียงขนาดเดียวที่การเจือจาง 10^{-5} หรือ มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^4 CFU ต่อ มิลลิลิตร และในช่องวิ่งที่ 7 ถึง 11 นั้นเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 2 ขนาด คือ 215 และ 420 bp คือที่ทำการเจือจาง 10^{-4} จนถึงไม่ได้ทำการเจือจาง หรือที่ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^5 ถึง 10^9 CFU ต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ โดยความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ PCR จะมากขึ้นตามลำดับ ตามความเข้มข้นของเซลล์

เช่นกัน ดังนั้น *E. coli* O157:H7 ที่มีความเข้มข้นของเซลล์น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้ Multiplex PCR คือ ประมาณ 10^5 CFU ต่อ มิลลิลิตร



รูปที่ 4.7 **ภาพอะกาโรสเจลแสดงการศึกษาความไวของการตรวจ** *E. coli* O157:H7 **ด้วย** Multiplex PCR

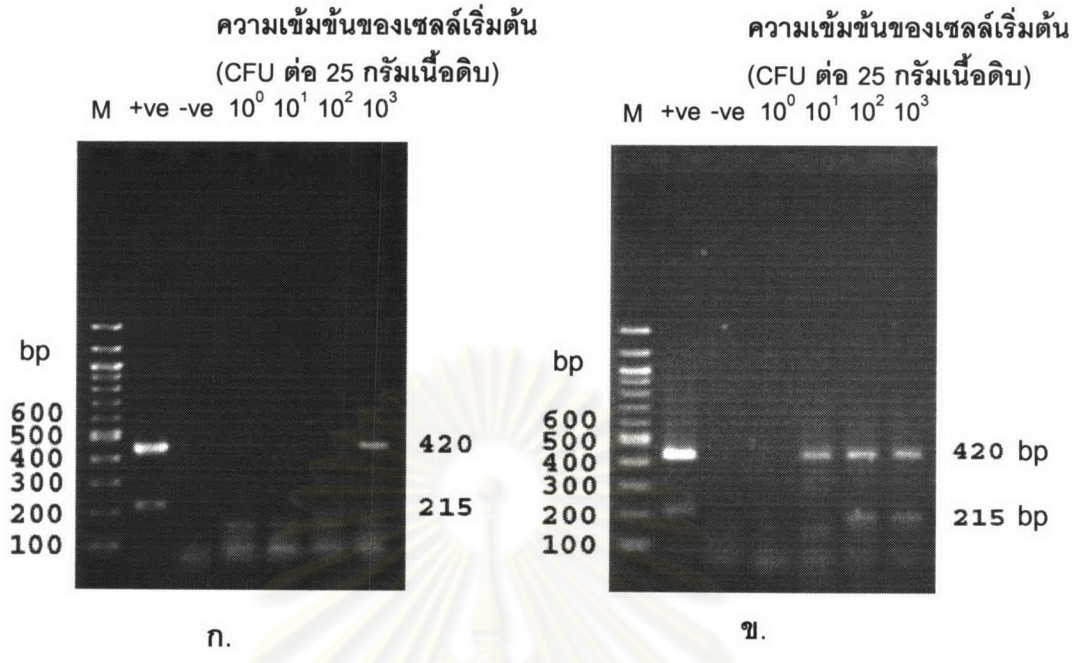
4.6 หาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR

เมื่อได้ทราบถึงภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR และข้อมูลเบื้องต้นในแง่ความจำเพาะและความไวแล้ว จึงนำวิธีการตรวจดังกล่าวไปประยุกต์เพื่อใช้ตรวจ *E. coli* O157:H7 จากเนื้อดิบ โดยในเบื้องต้นได้ทำการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *E. coli* O157:H7 จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR ดังที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.11 ซึ่งได้แบ่งเป็น 3 ปัจจัย คือ การเติม Bovine serum albumin (BSA) เวลาที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ และ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ

4.6.1 การเติม Bovine serum albumin (BSA)

ทำ Multiplex PCR โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก *E. coli* สายพันธุ์ NF-7777 ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^0 ถึง 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ ซึ่งบ่มในเนื้อดิบและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก เติมสารละลาย BSA และกลุ่มที่สอง ไม่เติมสารละลาย BSA ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.11.2 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.8 ก และ 4.8 ข นั่นคือ จากรูปที่ 4.8 ก ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่มีการเติมสารละลาย BSA ลงไปในปฏิกิริยา พบว่าในช่องวิ่งที่ 7 คือที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ นั้นเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 420 bp เท่านั้น ในขณะที่จากรูปที่ 4.8 ข ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้เติมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 100 ไมโครกรัมนั้น พบว่าในช่องวิ่งที่ 5 คือที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^1 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบนั้นเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 420 bp เท่านั้น และในช่องวิ่งที่ 6 และ 7 คือที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^2 และ 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ นั้นเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 215 bp และ 420 bp ตรงตามที่คาดหมายไว้ และมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เหมาะสม นั่นแสดงว่าสารละลาย BSA ที่เติมลงไปนั้นมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยา โดย BSA อาจไปช่วยลดการรบกวนจากตัวขัดขวางปฏิกิริยาที่ปนเปื้อนจากเนื้อดิบหรือน้ำเลี้ยงเชื้อ (Willson, 1997) ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR จึงจำเป็นต้องเติมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 100 ไมโครกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 **ภาพอะกาโรสเจลแสดงผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ** *E. coli* O157:H7 **จากเนื้อดิบด้วย** Multiplex PCR
ก.) กลุ่มที่ไม่มีการเติมสารละลาย BSA **ลงไปในปฏิกิริยา ข.) กลุ่มที่เติมสารละลาย** BSA **ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น** 100 **ไมโครกรัม**

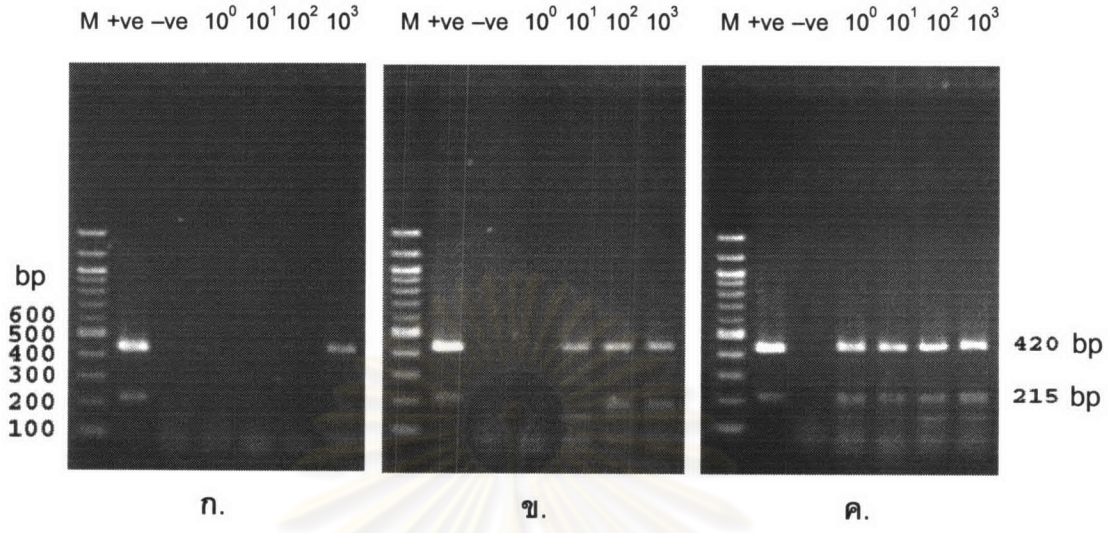
หมายเหตุ M **หมายถึง** 100 bp DNA ladder
+ve **หมายถึง ตัวควบคุมผลบวก** (Positive control) **ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ***E. coli* **สายพันธุ์** NF-7777
-ve **หมายถึง ตัวควบคุมผลลบ** (Negative control) **คือการบ่มเนื้อดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยไม่มีการเติม** *E. coli* O157:H7

จากผลการทดลองในข้อ 4.6.1 ทำให้ทราบถึงภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *E. coli* O157:H7 จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR จึงได้ทำการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ สำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR โดยได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลในการบ่ม 2 ปัจจัย คือ เวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่ม และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยอาจลดเวลาในการบ่มลงได้เพื่อลดเวลารวมทั้งหมดที่ใช้ในการตรวจและอาจทำให้การตรวจโดย Multiplex PCR มีความชัดเจนมากขึ้น จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมยาปฏิชีวนะเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆในเนื้อดิบที่อาจมีผลกระทบในการทำปฏิกิริยา นอกจากนั้นยังทำการตรวจนับจำนวน *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง

(Direct plating) และวิธี Immuno Magnetic Seperation, IMS โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มเช่นเดียวกับที่ใช้สำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจของทั้ง 3 วิธี

4.6.2 เวลาที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ สำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR

จากการทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.11.3 โดยบ่ม *E. coli* O157:H7 ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^0 ถึง 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบซึ่งได้แปรผันเวลาในการบ่มในเนื้อดิบตั้งแต่ 6 8 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ไปตรวจโดย Multiplex PCR และตรวจนับจำนวนด้วยวิธี Direct plating และ IMS ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.1 ก. และ ข. ในรูปที่ 4.9 ก. ซึ่งใช้เวลาในการบ่ม 6 ชั่วโมงจะเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 420 bp เพียงขนาดเดียวที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ (ช่องวิ่งที่ 7) ในขณะที่เมื่อเพิ่มเวลาในการบ่มเป็น 8 ชั่วโมง (รูปที่ 4.9 ข.) จะเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 420 bp เพียงชนิดเดียว ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^1 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ (ช่องวิ่งที่ 5) และเกิดทั้ง 2 ขนาด คือ 215 และ 420 bp ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^2 และ 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ (ช่องวิ่งที่ 6 และ 7) ตามลำดับ และเมื่อบ่ม 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.9 ค.) จะเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 2 ขนาดที่ทุกลำดับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น คือที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^0 ถึง 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ (ช่องวิ่งที่ 4 ถึง 7) ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการตรวจนับจำนวน *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี Direct plating และ IMS ดังที่แสดงตามตารางที่ 4.1 แล้วจะเห็นว่าผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปตามคาดหมาย คือมีความสอดคล้องกับข้อมูล เรื่องการศึกษาความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR ในข้อ 4.5.2 คือในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยตรงจะเริ่มเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ขนาด 420 bp เมื่อมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^4 CFU มิลลิลิตร และเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งขนาด 215 และ 420 bp เมื่อมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อตรวจจากการบ่มในเนื้อดิบจะเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 2 ขนาด เมื่อมีจำนวนเซลล์อย่างน้อย 10^6 CFU ต่อ 25 กรัมของเนื้อดิบ (ประมาณ 10^5 CFU ต่อ มิลลิลิตร) ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบสำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR คือ 8 ชั่วโมง โดยมีจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นอย่างน้อยประมาณ 10^2 CFU ต่อ 25 กรัมของเนื้อดิบ



รูปที่ 4.9 **ภาพอะกาโรสเจลแสดงผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม** *E. coli* O157:H7 **ในเนื้อดิบ สำหรับการตรวจโดย** Multiplex PCR
ก.) เวลาบ่ม 6 ชั่วโมง ข.) เวลาบ่ม 8 ชั่วโมง ค.) เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ M **หมายถึง** 100 bp DNA ladder
+ve **หมายถึง ตัวควบคุมผลบวก** (Positive control) **ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ***E. coli* **สายพันธุ์** NF-7777
-ve **หมายถึง ตัวควบคุมผลลบ** (Negative control) **คือการบ่มเนื้อดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยไม่มีการเติม** *E. coli* O157:H7

ตารางที่ 4.3. **จำนวน** *E. coli* O157:H7 **ที่ตรวจนับด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง** (Direct plating) **หลังการบ่มในเนื้อดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** TSB **จากช่วงเวลาต่าง ๆ**

ความเข้มข้นเริ่มต้นของ *E. coli* O157:H7 โดยประมาณ (CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ)	จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับได้หลังการบ่มในเนื้อดิบ (CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ) จากช่วงเวลาต่างๆ (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)		
	6 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
10^0	2.8×10^2	3.8×10^4	มากกว่า 10^9
10^1	2.1×10^3	4.1×10^5	มากกว่า 10^9
10^2	8.2×10^3	1.7×10^6	มากกว่า 10^9
10^3	2.7×10^5	8.6×10^6	มากกว่า 10^9

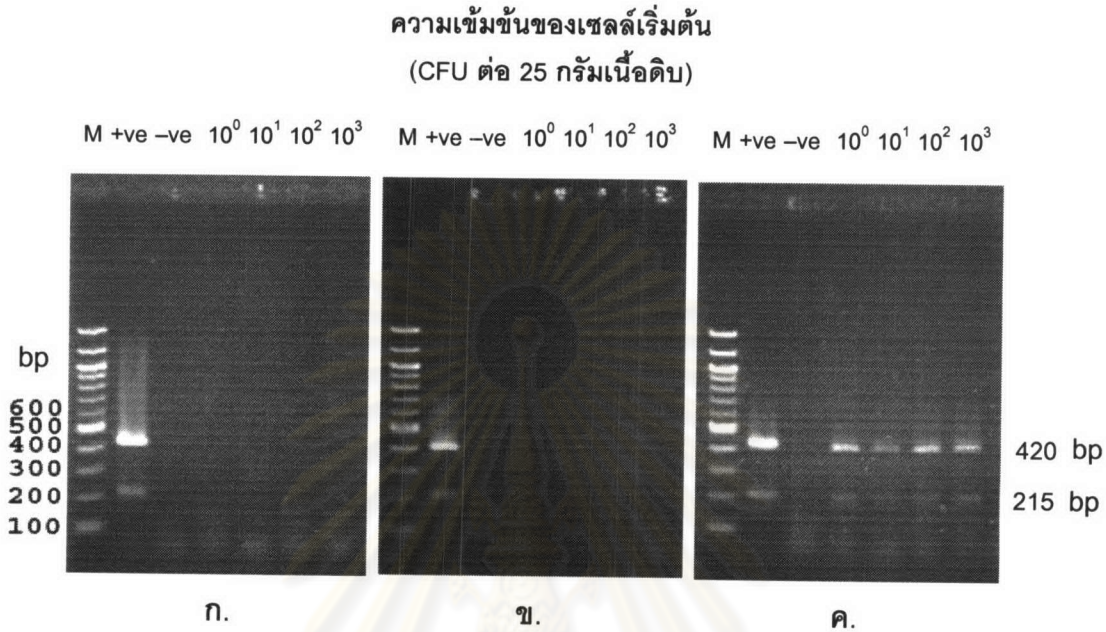
ตารางที่ 4.4. จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับด้วยวิธี Immuno magnetic Seperation, IMS หลังการบ่มในเนื้อดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB จากช่วงเวลาต่าง ๆ

ความเข้มข้นเริ่มต้นของ *E. coli* O157:H7 โดยประมาณ (CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ)	จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับได้หลังการบ่มในเนื้อดิบ (CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ) จากช่วงเวลาต่างๆ (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)		
	6 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
10^0	3.1×10^2	4.3×10^4	มากกว่า 10^9
10^1	4.3×10^3	5.2×10^5	มากกว่า 10^9
10^2	2.4×10^4	2.3×10^6	มากกว่า 10^9
10^3	4.6×10^5	1.3×10^7	มากกว่า 10^9

4.6.3 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ สำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR

จากการทดลองตามวิธีที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.11.4 ซึ่งได้เปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ โดยใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ ในข้อ 3.11.3 แต่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB เป็น อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mEC+n ซึ่งมีการเติม bile salt เพื่อยับยั้งเชื้อกลุ่มแกรมบวก และเติม novobiocin เพื่อยับยั้งเชื้อกลุ่มแกรมลบอื่นๆ (Okrend และคณะ, 1990) ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.2 คือ ในรูปที่ 4.10 ก. และ ข. ซึ่งใช้เวลาในการบ่ม 6 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับนั้น ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้น ที่ทุกลำดับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น คือที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^0 ถึง 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ (ช่องวิ่งที่ 4 ถึง 7) แต่ในรูปที่ 4.10 ค. ซึ่งใช้เวลาในการบ่ม 24 ชั่วโมง พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขึ้นที่ทุกลำดับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น และเมื่อพิจารณาเทียบผลการตรวจนับจำนวน *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี Direct plating และ IMS ในการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mEC+n กับการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ดังที่แสดงตามตารางที่ 4.2 และ 4.1 พบว่าในระยะเวลาการบ่มที่ 6 และ 8 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากันนั้น การบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mEC+n มีจำนวน *E. coli* O157:H7 น้อยกว่าการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ซึ่งอาจเป็นเพราะผลกระทบของ bile salt และ novobiocin ที่ผสมลงไปเพื่อลดปริมาณเชื้อปนเปื้อนอื่นๆที่ติดมากับ เนื้อดิบ เนื่องจาก bile salt และ novobiocin มีผลไปชะลอการเจริญของ *E. coli* O157:H7 (Stephens

และ Johnson, 1998) ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ สำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB



รูปที่ 4.10 **ภาพอะกาโรสเจลแสดงผลการบ่ม** *E. coli* O157:H7 **ในเนื้อดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** mEC+n **สำหรับการตรวจโดย** Multiplex PCR
ก.) **เวลาบ่ม** 6 **ชั่วโมง** ข.) **เวลาบ่ม** 8 **ชั่วโมง** ค.) **เวลาบ่ม** 24 **ชั่วโมง**

หมายเหตุ M **หมายถึง** 100 bp DNA ladder
+ve **หมายถึง ตัวควบคุมผลบวก** (Positive control) **ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ***E. coli* **สายพันธุ์** NF-7777
-ve **หมายถึง ตัวควบคุมผลลบ** (Negative control) **คือการบ่มเนื้อดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยไม่มีการเติม** *E. coli* O157:H7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง (Direct plating) หลังการบ่มในเนื้อดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mEC+n จากช่วงเวลาต่างๆ

ความเข้มข้นเริ่มต้นของ *E. coli* O157:H7 โดยประมาณ (CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ)	จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับได้หลังการบ่มในเนื้อดิบ (CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ) จากช่วงเวลาต่างๆ (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)		
	6 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
10^0	น้อยกว่า 10	น้อยกว่า 10	มากกว่า 10^9
10^1	น้อยกว่า 10	6.3×10^2	มากกว่า 10^9
10^2	2.2×10^3	6.7×10^3	มากกว่า 10^9
10^3	7.5×10^3	1.2×10^4	มากกว่า 10^9

ตารางที่ 4.6 จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับด้วยวิธี Immuno magnetic Seperation, IMS หลังการบ่มในเนื้อดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mEC+n จากช่วงเวลาต่างๆ

ความเข้มข้นเริ่มต้นของ *E. coli* O157:H7 โดยประมาณ (CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ)	จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับได้หลังการบ่มในเนื้อดิบ (CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ) จากช่วงเวลาต่างๆ (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)		
	6 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
10^0	น้อยกว่า 10	1.3×10^2	มากกว่า 10^9
10^1	1.6×10^2	8.4×10^2	มากกว่า 10^9
10^2	2.7×10^3	7.8×10^3	มากกว่า 10^9
10^3	8.3×10^3	2.5×10^4	มากกว่า 10^9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย