บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แม้ว่าจะได้มีผู้วิจัยหลายคณะได้ศึกษาและทำการตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างหลายประเภทเช่น อุจจาระของผู้ป่วยจากการติดเชื้อหรืออาหารที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของการแพร่ระบาด เช่น น้ำนมดิบหรือเนื้อสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นการทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์เพียงคู่เดียวที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายต่างๆ ที่เป็นลักษณะเฉพาะของ *E. coli* O157:H7 เช่น *vt eaeA* EHEC-*hlyA* หรือ *uidA* แต่ก็ยังไม่สามารถระบุได้ว่าผลบวกที่ได้เป็น *E. coli* O157:H7 เนื่องจากยังมีเชื้ออีกหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแกรมลบต่างๆหรือเชื้อกลุ่ม VTEC อื่นๆ ที่มักพบการปนเปื้อนในตัวอย่างที่ตรวจ มียีนเป้าหมายเช่นเดียวกับที่พบใน *E. coli* O157:H7 (Paton และ Paton, 1998) และแม้ว่าจะทำการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์หลายคู่ร่วมกัน หรือ Multiplex PCR เพื่อเพิ่มความจำเพาะมากขึ้น แต่ก็ยังไม่สามารถระบุผลบวกที่ได้ว่าเป็น *E. coli* O157:H7 อย่างชัดเจน อีกทั้งการใช้ไพร์เมอร์หลายคู่ (3 ถึง 4 คู่) ทำให้สิ้นเปลือง ต้องปรับภาวะในการทำปฏิกิริยามาก เพื่อให้แยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ PCR ของแต่ละยีนได้อย่างชัดเจน และในการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบนั้นยังต้องมีกระบวนการหลายขั้นตอนเพื่อทำให้ ดีเอ็นเอแม่แบบมีความบริสุทธิ์ ซึ่งใช้เวลาและสิ้นเปลืองมากขึ้น ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกตรวจ *E .coli* O157:H7 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 ได้จำเพาะมากขึ้น (Paton และ Paton, 1998) และไพร์เมอร์คู่ที่ 2 ที่จำเพาะกับ rfb_{O157} ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของเชื้อสายพันธุ์นี้ เพื่อเพิ่มความจำเพาะและสามารถระบุได้ว่าเป็น *E. coli* O157:H7 โดยใช้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบอย่างง่ายและรวดเร็ว

การวิจัยครั้งนี้เริ่มจากทำการตรวจสอบจีโนไทป์ของ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ซึ่งมีจีโนไทป์ต่างๆรวม 3 แบบคือ vt_1 vt_2 หรือมีทั้ง vt_1 และ vt_2 ที่ใช้สำหรับดำเนินการวิจัยโดยชุดทดสอบสำเร็จ O157 (Verocytotoxin Genes) PCR Typing Set (Takara, Japan) พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ มีจีโนไทป์ตรงตามที่ระบุไว้จริง ถึงแม้ว่าเมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบของ *E. coli* O157:H ที่มีจีโนไทป์เป็น vt_1 กับไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ vt_2 จะเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 350 bp ก็ตาม อาจเป็นเพราะลำดับนิวคลีโอไทด์ของ vt_1 และ vt_2 มีความเหมือนกันประมาณ 55% (Jackson และคณะ, 1987)

ไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับ vt_2 จึงอาจเกิดการจับกับดีเอ็นเอแม่แบบของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์เป็น vt_1 ได้ แต่การจับกันของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบดังกล่าวนั้นยังไม่จำเพาะ จึงเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความเข้มน้อยกว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจากดีเอ็นเอ แม่แบบที่มีจีโนไทป์ vt_2 มากและมีขนาดไม่ตรงตามที่คาดหมาย

จากนั้นจึงหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี PCR ซึ่งในการวิจัยนี้จะใช้ไพร์เมอร์ทั้งสิ้น 2 คู่ โดยไพร์เมอร์คู่แรก 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 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR เนื่องจากในงานวิจัยขั้นต่อไปต้องทำ Multiplex PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่ดังกล่าวข้างต้นร่วมกันในปฏิกิริยาเดียว จึงแปรผันปัจจัยทั้ง 2 ดังกล่าวในการทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ rfb_{O157} ด้วย จากการทำ PCR และ Multiplex PCR พบว่าอุณหภูมิ annealing และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมของไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่คือที่ 55 ^{o}ซ และ 3.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสามารถสรุปภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR และ Multiplex PCR สำหรับตรวจ *E. coli* O157:H7 ได้ดังตารางที่ 5.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 สรุปภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจ *E. coli* O157:H7 โดย PCR และ Multiplex PCR

ส่วนผสม PCR	*vt*	rfb_{O157}	Multiplex
10 x *Taq* DNA polymerase buffer (Promega, USA)	1 เท่า	1 เท่า	1 เท่า
dNTP (Promega, USA)	0.2 มิลลิโมลาร์	0.2 มิลลิโมลาร์	0.2 มิลลิโมลาร์
$MgCl_2$ (Promega, USA)	3.0 มิลลิโมลาร์	3.0 มิลลิโมลาร์	3.0 มิลลิโมลาร์
ไพร์เมอร์ VT-F และ VT-R	50 พิโคโมล	-	50 พิโคโมล
ไพร์เมอร์ PF-8 และ PR-8	-	50พิโคโมล	50พิโคโมล
Taq DNA polymerase (Promega, USA)	1 หน่วย	1 หน่วย	1 หน่วย
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 พิโคกรัม – 1 ไมโครกรัม	1 พิโคกรัม – 1 ไมโครกรัม	1 พิโคกรัม – 1 ไมโครกรัม
โปรแกรม PCR	94 °ซ : 5 นาที 94 °ซ : 1 นาที 55 °ซ : 1 นาที 72 °ซ : 1 นาที 72 °ซ : 10 นาที 35 รอบ	94 °ซ : 5 นาที 94 °ซ : 0 วินาที 55 °ซ : 0 วินาที 72 °ซ : 15 วินาที 72 °ซ : 10 นาที 30 รอบ	94 °ซ : 5 นาที 94 °ซ : 1 นาที 55 °ซ : 1 นาที 72 °ซ : 1 นาที 72 °ซ : 10 นาที 35 รอบ

จากนั้นจึงนำภาวะที่เหมาะสมในการทำ Multiplex PCR ดังกล่าวไปใช้ตรวจ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่าภาวะดังกล่าวสามารถตรวจ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ได้ถูกต้องตามจีโนไทป์ของแต่ละสายพันธุ์

ต่อจากนั้นได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนทั้ง 2 คือ *vt* และ rfb_{O157} ด้วยไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับ *vt* (VT-F และ VT-R) และไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับ rfb_{O157} (PF-8 และ PR-8) แล้วนำไปเทียบความเหมือนในระดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BlastN version 2.2.7 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ vt_1 และ vt_2 มีความเหมือนกับยีนประมวลรหัสการสร้างวีโรทอกซินชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 ของ *E. coli* O157:H7 RIMD 0509952 (Yokoyama และคณะ, 2000) และ *E. coli* O157:H7 RIMD 0509952 (Makino และคณะ, 1999) ที่ 86 และ 89% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *vt* ดังกล่าวไม่สูงมาก เนื่องจากไพร์เมอร์ VT-F และ VT-R ที่ใช้เป็น ดีเจเนอเรทเตทไพร์เมอร์ ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ vt_1 และ vt_2 ซึ่งมีความเหมือนกันประมาณ 55% (Jackson และคณะ, 1987) บริเวณที่มีความเหมือนกันมากที่สุด เพื่อให้สามารถใช้ได้กับ *E. coli* O157:H7 ที่ไม่ว่าจะมี *vt* เป็นชนิดที่ 1 หรือชนิดที่ 2 (Paton และคณะ, 1993) ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ rfb_{O157} มีความเหมือนกับยีนประมวลรหัส

การสร้าง O-antigen (*rfbB*) ของ *E. coli* O157:H7 C664-1992 ที่ 97% (Wang และ Reeves, 1998)

นอกจากนั้นยังได้เทียบหาความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.7 ซึ่งจะทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำเข้าไปเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 3 ดังกล่าวมีความเหมือนกับกรดอะมิโนตามลำดับดังนี้ วีโรทอกซิน หน่วยย่อย A ที่ถอดรหัสมาจาก *vt*1A ของ *E. coli* O157:H7 RIMD 0509952 (Yokoyama และคณะ, 2000) 60% วีโรทอกซิน หน่วยย่อย A ที่ถอดรหัสมาจาก *vt*2A ของ *E. coli* O157:H7 RIMD 0509952 (Makino และคณะ , 1999) 69% และ O-antigen ที่ถอดรหัสมาจาก *rfbB* ของ *E. coli* O157:H7 ATCC35150 (Maurer และคณะ, 1999) 86% ดังนั้นจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. coli* O157:H7 ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วยภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* หรือ ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157} นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับยีนทั้ง 3 แบบที่ต้องการจริง

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า Multiplex PCR ในภาวะที่เหมาะสมสามารถนำไปตรวจ *E. coli* O157:H7 ได้และให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกต้อง จึงทำการศึกษาความจำเพาะและความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR ซึ่งพบว่ามีความจำเพาะในการตรวจสูงคือเกิดผลิตภัณฑ์ Multiplex PCR (ขนาด 215 และ 420 bp) เฉพาะกับ *E. coli* O157:H7 ในขณะที่เชื้ออื่นๆรวม 15 ชนิดไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ใดๆ ยกเว้น *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} มีความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดยใช้ Multiplex PCR คือสามารถตรวจพบเชื้อน้อยที่สุดประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร

จากนั้นจึงนำวิธีการตรวจดังกล่าวไปประยุกต์เพื่อใช้ตรวจ *E. coli* O157:H7 จากเนื้อดิบ โดยในเบื้องต้นได้ทำการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *E. coli* O157:H7 จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR โดยได้ทำการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *E. coli* O157:H7 จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR ซึ่งได้แบ่งเป็น 3 ปัจจัยดังนี้

1. ผลการเติม Bovine serum albumin (BSA) เนื่องจากได้ลองตรวจ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมข้างต้นแล้ว ปรากฏว่าไม่สามารถตรวจได้ แม้ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ ซึ่งเมื่อทำการบ่มในเนื้อดิบและอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 ชั่วโมงแล้วจะมีจำนวนเซลล์ *E. coli* O157:H7 ประมาณ 10^7 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ (ประมาณ 10^6 CFU ต่อมิลิลิตร) แต่กลับเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 420 bp เท่านั้น ซึ่งขัดแย้งกับข้อมูลในเรื่องการศึกษาความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR โดยที่จำนวนเซลล์ประมาณ 10^6 CFU ต่อมิลิลิตรนั้นต้องเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 2 ขนาด และได้มีรายงานถึงตัวขัดขวางปฏิกิริยาที่มักพบในการตรวจเชื้อก่อโรคในอาหารชนิดต่างๆ ด้วยวิธี PCR ซึ่งสามารถลดผลกระทบจากตัวขัดขวางปฏิกิริยาดังกล่าวได้ โดยการเติม BSA ในส่วนผสม PCR (Willson, 1997) ดังนั้นในทดลองจึงได้ศึกษาผลการเติม BSA ในส่วนผสม PCR จากผลการทดลอง พบว่าการเติม BSA ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 100 ไมโครกรัมนั้น ทำให้สามารถตรวจ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR ได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เติม คือ สามารถตรวจได้ (เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 2 ขนาด) ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^2 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ เมื่อบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ในขณะที่กลุ่มที่ไม่เติม BSA ไม่สามารถตรวจได้ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากันหรือมากกว่า (10^2 และ 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ) แสดงให้เห็นว่า BSA ที่เติมลงไปนั้นมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยา โดย BSA อาจไปช่วยลดการรบกวนจากตัวยับยั้งปฏิกิริยาที่ปนเปื้อนจากเนื้อดิบหรือน้ำเลี้ยงเชื้อ (Willson, 1997) เนื่องจากในการวิจัยครั้งนี้ ได้ใช้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบโดยการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทำการล้าง 2 ครั้งด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ แล้วกระจายตะกอนเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE 100 µl นำไปต้มที่ 100 °ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนน้ำใสไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับทำ Multiplex PCR ซึ่งการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบวิธีนี้ถึงแม้ว่าจะง่ายและรวดเร็ว แต่จะมีความบริสุทธิ์ไม่มากคือจะมีสิ่งปนเปื้อนต่างๆจากเนื้อดิบหรือน้ำเลี้ยงเชื้อติดมาด้วย โดยผลที่ได้สอดคล้องกับที่ได้รายงานไว้โดย Powell และคณะ (1994) ซึ่งทำการตรวจ *Listeria monocytogenes* ในน้ำนมวัว พบว่าการเติม BSA ในส่วนผสม PCR ทำให้สามารถตรวจเชื้อดังกล่าวได้ โดย BSA ที่เติมลงไปอาจเป็นตัวยับยั้งโปรตีเนสซึ่งเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยา

เช่นเดียวกับที่ได้มีรายงานไว้โดย Willson (1997) ซึ่งได้รวบรวมและสรุปข้อมูลจากคณะผู้วิจัยหลายคณะพบว่า การตรวจเชื้อก่อโรคด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างอาหารนั้น มักถูกรบกวนจากตัวขัดขวางปฏิกิริยาต่างๆหลายชนิดเช่น โปรตีเนส สารอินทรีย์ สารประกอบฟีนอล ไกลโคเจน เส้นใยคอลลาเจน ไขมัน โปรตีน หรือแม้แต่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่น บัฟเฟอร์หรือยาปฏิชีวนะที่เติมลงไปเพื่อยับยั้งเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ ที่มักพบเป็นจำนวนมากในตัวอย่างอาหาร

เป็นต้น โดยตัวขัดขวางปฏิกิริยาดังกล่าวอาจจะไปจับกับ *Taq* polymerase ทำให้ประสิทธิภาพลดลงหรืออาจไปจับกับ $MgCl_2$ ซึ่งเป็น co-factor ของ *Taq* polymerase ทำให้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยาไม่เหมาะสม จึงได้มีการศึกษาเพื่อลดผลกระทบจากตัวขัดขวางปฏิกิริยาทั้งหลายดังกล่าวเช่นการเติม BSA ในปฏิกิริยา ซึ่งพบว่า BSA จะไปจับกับสารประกอบฟีนอลด้วยพันธะไฮโดรเจน หรือ BSA จะจับกับไขมันด้วยแรงไฮโดรโฟบิค นอกจากนั้น BSA ยังเป็นตัวยับยั้งโปรติเนสด้วย จากคุณสมบัติของ BSA ดังกล่าวจึงช่วยลดผลกระทบของตัวขัดขวางปฏิกิริยาทั้งหลายในการตรวจเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหารด้วยวิธี PCR ได้ ดังนั้นในการตรวจ *E. coli* O157:H จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR จึงจำเป็นต้องเติม BSA ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 100 ไมโครกรัม และการศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่กล่าวถึงผลการเติม BSA ในส่วนผสม PCR สำหรับตรวจ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ โดย Multiplex PCR ซึ่งสามารถสรุปภาวะที่เหมาะสมในการทำ Multiplex PCR สำหรับตรวจเชื้อสายพันธุ์นี้ในเนื้อดิบได้ดังตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 แสดงภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบโดย Multiplex PCR

ส่วนผสม PCR	Multiplex PCR	**โปรแกรม PCR**
10 x *Taq* DNA polymerase buffer (Promega, USA)	1 เท่า	
dNTP (Promega, USA)	0.2 มิลลิโมลาร์	94 °ซ : 5 นาที
$MgCl_2$ (Promega, USA)	3.0 มิลลิโมลาร์	94 °ซ : 1 นาที
BSA (Promega, USA)	100 ไมโครกรัม	55 °ซ : 1 นาที
ไพร์เมอร์ VT-F และ VT-R	50 พิโคโมล	72 °ซ : 1 นาที
ไพร์เมอร์ PF-8 และ PR-8	50 พิโคโมล	72 °ซ : 1 นาที
Taq DNA polymerase (Promega, USA)	1 หน่วย	35 รอบ
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 พิโคกรัม – 1 ไมโครกรัม	

2. เวลาที่เหมาะสมในการบ่มตัวอย่างที่ปนเปื้อนด้วย *E. coli* O157:H7 เมื่อทราบภาวะที่เหมาะสมในการทำ Multiplex PCR แล้ว จึงได้ทำการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ เนื่องจากมีรายงานพบว่าเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารมักอยู่ในสภาพบาดเจ็บ จากขบวนการเก็บรักษา การแปรรูป หรือการเตรียมอาหาร ที่ต้องผ่านการแช่แข็ง ความร้อน หรือส่วนผสมของอาหาร (Clavero และคณะ, 1995) นอกจากนั้น *E. coli* O157:H7 ซึ่งมีปริมาณเชื้อในการก่อโรคต่ำและมักจะพบจำนวนน้อยในสิ่งแวดล้อมหรือตัวอย่างอาหารเมื่อเทียบกับเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ (Bell และคณะ, 1994; Paton และคณะ, 1996) จึงทำให้ยากต่อการตรวจวินิจฉัย ดังนั้นจึงควรบ่มเพิ่มจำนวน *E. coli* O157:H7 ในตัวอย่างที่ต้องการตรวจก่อน

เพื่อให้มีจำนวนเชื้อมากพอที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ ซึ่งจะทำให้ผลการตรวจมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้นโดยได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลในการบ่ม 2 ปัจจัย คือ เวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยอาจลดเวลาในการบ่มลงได้เพื่อลดเวลารวมทั้งหมดที่ใช้ในการตรวจ และอาจทำให้การตรวจโดย Multiplex PCR มีความชัดเจนมากขึ้น

จากการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^0 ถึง 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ซึ่งได้แปรผัน ตั้งแต่ 6 8 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ไปตรวจโดย Multiplex PCR และตรวจนับจำนวนด้วยวิธี Direct plating และ Immuno Magnetic Seperation (IMS) ผลการทดลองที่ได้ พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบสำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR คือ 8 ชั่วโมง โดยมีจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นอย่างน้อยประมาณ 10^2 CFU ต่อ 25 กรัมของเนื้อดิบ และมีจำนวนเซลล์หลังการบ่มประมาณ 10^6 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ (ประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งที่เวลาและจำนวนเซลล์เริ่มต้นนี้เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งขนาด 215 และ 420 bp และผลการทดลองที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับข้อมูล เรื่องการศึกษาความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR ในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยตรงจะเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งขนาด 215 และ 420 bp เมื่อมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร และเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม 8 ชั่วโมงนั้น นับว่าน้อย ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาในการตรวจ *E .coli* O157:H7 ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธี PCR นั้นจะนิยมบ่มตัวอย่างเป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง (Paton และ Paton, 1998) และจากรายงานของ Lekowska-Kochaniak และคณะ (2002) ซึ่งทำการตรวจ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ 3 คู่ที่จำเพาะกับ *vt eaeA* และ 90 bp virulence plasmid พบว่ามีความไวของการตรวจที่ 1 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ แต่ใช้เวลาบ่มถึง 18 ชั่วโมง และจากรายงานของ Chiueh และคณะ (2001) ซึ่งทำการตรวจ *E. coli* O157:H7 จากตัวอย่างอาหารด้วย Multiplex PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ 3 คู่ที่จำเพาะกับ vt_1 vt_2 และ*eaeA* พบว่ามีความไวของการตรวจที่ 1 CFU ต่อกรัมตัวอย่างอาหาร แต่ใช้เวลาบ่มถึง 20 ชั่วโมง

3. เมื่อเปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB และ modified EC broth ที่เติม novobiocin (mEC+n) ในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^0 ถึง 10^3 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ โดยแปรผันเวลาในการบ่มตั้งแต่ 6 8 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่าการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ให้ผลที่ดีกว่าคือในระยะเวลาการบ่มและความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากัน การบ่มในอาหารเลี้ยงเหลว mEC+n ซึ่งมีการเติม bile salt เพื่อยับยั้งเชื้อกลุ่มแกรมบวก และเติม novobiocin เพื่อยับยั้งเชื้อกลุ่มแกรมลบอื่นๆ (Okrend และคณะ, 1990) เนื่องจาก bile salt และ novobiocin แม้จะไม่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli*

O157:H7 แต่อาจมีผลทำให้ชะลอการเจริญได้ ทำให้มีจำนวนเซลล์น้อยกว่าและไม่เพียงพอในการตรวจด้วย Multiplex PCR นั่นคือที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^3 CFU ต่อ 25 กรัม เนื้อดิบ เมื่อบ่ม 8 ชั่วโมงจะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^4 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ (ประมาณ 10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเมื่อเทียบกับข้อมูลในเรื่องการศึกษาความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR แล้วจะเห็นว่าจำนวนเซลล์ดังกล่าวไม่เพียงพอในการตรวจ ที่ต้องมีจำนวนเซลล์อย่างน้อยประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบสำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR คืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB และผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Ueda และคณะ (1999) ซึ่งทำการตรวจเชื้อกลุ่ม VTEC โดยชุดทดสอบสำเร็จ O157 (Verocytotoxin Genes) PCR Typing Set (Takara, Japan) และเปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB และ mEC+n พบว่าการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ให้ผลดีกว่า mEC+n โดยมีความไวของการตรวจที่ 10^6 CFU ต่อกรัมเนื้อดิบ เมื่อบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่ 36 ^{o}ซ ในขณะที่เมื่อบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mEC+n ที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นและเวลาบ่มเท่ากัน ไม่สามารถตรวจได้

ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ สำหรับตรวจโดย Multiplex PCR คือทำการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นอย่างน้อย 10^2 CFU ต่อ 25 กรัมเนื้อดิบ

การตรวจด้วยวิธีมาตรฐานทั่วไปนั้น ต้องใช้เวลาในการดำเนินการตั้งแต่ต้นจนทราบผลอย่างน้อย 48 ชั่วโมง และผลที่ได้ยังอาจมีข้อผิดพลาดได้เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้อาศัยพื้นฐานจากสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเป้าหมาย ซึ่งให้ผลที่ไม่แน่นอนในภาวะการตรวจที่แตกต่างกันและสมบัติทางชีวเคมีนั้นไม่ได้เป็นเอกลักษณ์ของเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น แต่ยังมีเชื้ออีกหลายชนิดที่ปนเปื้อนมากับตัวอย่างที่ต้องการตรวจแสดงสมบัติทางชีวเคมีเช่นเดียวกับเชื้อเป้าหมาย และหากต้องการความแม่นยำในการตรวจจะต้องทำการตรวจยืนยันอีกหลายขั้นตอนซึ่งทำให้เสียเวลาและยุ่งยากมากขึ้น จนอาจส่งผลเสียต่อการจำหน่ายหรือส่งออกสินค้า ดังนั้นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็วจึงมีความสำคัญ จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157 ที่ปนเปื้อนในเนื้อดิบโดยวิธี Multiplex PCR จากงานวิจัยนี้เป็นวิธีการตรวจที่มีประสิทธิภาพสูงในด้านความจำเพาะและความไว แต่ใช้เวลาในการดำเนินการน้อย ทำให้ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว โดยสามารถทราบผลการตรวจได้ใน 14 ชั่วโมง ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR นี้จึงมีศักยภาพและเหมาะสมที่จะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการนำมาใช้แทน วิธีดั้งเดิม

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

1. เนื่องจากในการวิจัยครั้งนี้ใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ที่จำเพาะกับ *vt* และ rfb_{O157} ซึ่งได้รับการออกแบบไว้โดย Paton และคณะ, 1993 และ Maurer และคณะ, 1999 ดังนั้นการจะพัฒนาให้สามารถผลิตเป็นชุดทดสอบสำเร็จเพื่อใช้ในเชิงการค้าอาจติดปัญหาทางด้านสิทธิบัตรทรัพย์สินทางปัญญา จึงอาจทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนทั้ง 2 ดังกล่าวใหม่ โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นพื้นฐานในกานพัฒนาให้สามารถผลิตเป็นชุดทดสอบสำเร็จเพื่อใช้ในเชิงการค้าได้จริง

2. เนื่องจากในการวิจัยนี้เป็นการศึกษาข้อมูลเบื้องต้น จึงไม่ได้ศึกษาข้อมูลบางประเด็นในเชิงลึกเช่น ปริมาณ *Taq* DNA polymerase ที่ใช้หรือเวลาในแต่ละช่วงในโปรแกรม PCR ซึ่งอาจลดปริมาณ *Taq* DNA polymerase ที่ใช้ลง เพื่อให้ประหยัดค่าใช้จ่ายลดเวลาในหรือแต่ละช่วงในโปรแกรม PCR ลงเพื่อให้เวลารวมที่ใช้ในปฏิกิริยาลดลง

3. อาจทำการวิจัยเพิ่มเติม โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายอื่นๆ ที่แสดงเอกลักษณ์ของ *E. coli* O157:H7 เช่นยีนประมวลรหัสการสร้าง H7-antigen เพื่อใช้ในการทำ Multiplex PCR เพื่อเพิ่มความจำเพาะของการตรวจและสามารถระบุได้อย่างชัดเจนมากขึ้นว่าผลบวกที่ได้เป็น *E. coli* O157:H7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย