การตรวจหา *Escherichia coli* O157:H7 ในเนื้อดิบโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นาย อภิรักษ์ วิเศษศรีพงษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4759-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF *Escherichia coli* O157:H7 IN RAW MEAT BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Mr. Apirak Visetsripong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-4759-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหา *Escherichia coli* O157:H7 ในเนื้อดิบโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
โดย	นายอภิรักษ์ วิเศษศรีพงษ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. อรษา สุตเธียรกุล
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร. อรษา สุตเธียรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิรักษ์ วิเศษศรีพงษ์ : การตรวจหา *Escherichia coli* O157:H7 ในเนื้อดิบโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (DETECTION OF *Escherichia coli* O157:H7 IN RAW MEAT BY POLYMERASE CHAIN REACTION) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. ดร. อรษา สุตเธียรกุล, ผศ. ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ 86 หน้า. ISBN 974-17-4759-4

การพัฒนาวิธีที่รวดเร็วสำหรับการตรวจหา *Escherichia coli* O157:H7 โดยวิธี Multiplex PCR การตรวจหาปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญของสายพันธุ์นี้คือ *vt* ซึ่งประมวลรหัสวีโรทอกซิน และ rfb_{O157} ซึ่งประมวลรหัสการสร้าง O-แอนติเจนด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์สองคู่ Multiplex PCR แสดงผลิตภัณฑ์ 2 ขนาดคือ 215 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ *vt* และ 420 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ rfb_{O157} ตามลำดับ ภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสายพันธุ์บริสุทธิ์ โดย Multiplex PCR คือใช้ อุณหภูมิ annealing 55 ^{o}ซ และ $MgCl_2$ 3.0 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ วิธีนี้สามารถตรวจหาสายพันธุ์ O157:H7 ด้วยความไวที่มีเชื้อประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร และไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR จากแบคทีเรียก่อโรคอื่น 15 ชนิด นอกจาก *Shigella dysenteriae* type 1 Multiplex PCR ยังสามารถใช้เพื่อตรวจหา *E. coli* O157:H7 ที่เติมในเนื้อดิบ หลังการบ่มเนื้อดิบ 25 กรัมใน tryptic soy broth ที่ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง Multiplex PCR ที่มีการเติม 100 ไมโครกรัม bovine serum albumin สามารถแสดงผลิตภัณฑ์ PCR 2 ขนาดที่จำเพาะสำหรับ *E. coli* O157:H7 Multiplex PCR ที่ได้รับการดัดแปลงนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วและใช้สำหรับคัดกรองในการตรวจ *E. coli* O157:H7 ที่มีความไวและจำเพาะและสามารถใช้เป็นทางเลือกเพื่อการบ่งชี้สายพันธุ์ O157 ในตัวอย่างเนื้อดิบแทนวิธีที่ใช้กันทั่วไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2546 ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4372478623 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Escherichia coli* O157:H7 / POLYMERASE CHAIN REACTION / Multiplex PCR

APIRAK VISETSRIPONG : DETECTION OF *Escherichia coli* O157:H7 IN RAW MEAT BY POLYMERASE CHAIN REACTION. THESIS ADVISER : ASSIST. PROF. JIRAPORN THANIYAVARN, THESIS COADVISOR : PROF. ORASA SUTHEINKUL, ASSIST. PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, 86 pp. ISBN: 974-17-4759-4

A rapid method for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using Multiplex PCR was developed. Two oligonucleotide primer pairs were used for detection of genes *vt* encoding verotoxin an important virulence factor of this strain and rfb_{O157} encoding the O-antigen of *E. coli* O157:H7. The Multiplex PCR revealed two PCR products of 215 bp and 420 bp for *vt* and rfb_{O157}, respectively. Optimum condition for Multiplex PCR detection of pure culture strain was annealing temperature at 55 ^{O}C and 3.0 mM of $MgCl_2$. The present method could detect the strain O157:H7 with sensitivity down to 10^5 CFU per ml. No PCR products were obtained from 15 other pathogenic bacteria except *Shigella dysenteriae* type 1. Multiplex PCR was also applicable for the detection of *E. coli* O157:H7 in raw meat. After incubation of 25 gram raw meat in tryptic soy broth at 37 ^{O}C for of 8 h, Multiplex PCR with additional 100 μg bovine serum albumin gave two PCR products specific for *E. coli* O157:H7. This modified Multiplex PCR is a potential rapid for sensitive and specific for the detection and screening *E. coli* O157:H7 and can be used for the detection of strain O157:H7 in raw meat in alternative to the conventional methods.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology Student's signature Ap. Visetsripong

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature Jiraporn Thaniyavarn

Academic year 2003 Co-advisor's signature K. Pattaragulwanit

Co-advisor's signature Orasa Sutheinkul

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ศาสตราจารย์ ดร.อรษา สุตเธียรกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ในการช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดีเสมอมา

ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัววิเศษศรีพงษ์ ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูป.....ญ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. ปริทัศน์วรรณกรรม.....5
2.1 คุณลักษณะของ *Escherichai coli* O157:H7.....7
2.2 พยาธิกำเนิด.....7
2.3 ระบาดวิทยา.....11
2.4 ลักษณะอาการจากการติดเชื้อ.....12
2.5 การตรวจวินิจฉัย *E. coli* O157:H7.....13
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....24
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....24
3.2 เคมีภัณฑ์ อาหารเลี้ยงเชื้อและชุดทดสอบสำเร็จ.....25
3.3 แบคทีเรีย.....26
3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์.....27
3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย.....27
3.6 ตรวจสอบ จีโนไทป์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ โดยชุดทดสอบสำเร็จ สำหรับยีนประมวลรหัส verotoxin (*vt*).....28
3.7 หาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....29
3.8 ตรวจ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ต่างๆ ด้วย Multiplex PCR.....32
3.9 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *vt* และผลิตภัณฑ์ PCR ของ rfb_{O157} จาก *E. coli* O157:H7 กับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank.....33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.10 ศึกษาความจำเพาะและความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR.....35
3.11 หาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E.coli* O157:H7 จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR.....35
4. ผลการทดลอง.....39
4.1 การตรวจสอบจีโนไทป์ของ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ต่างๆโดยชุดทดสอบสำเร็จสำหรับยีนประมวลรหัส verotoxin.....39
4.2 หาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....40
4.3 การตรวจ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ต่างๆด้วย Multiplex PCR โดยใช้ ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* และ ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157}.....44
4.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *vt* และ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ rfb_{O157} จาก *E. coli* O157:H7.....45
4.5 ความจำเพาะและความไวของการตรวจ *E. coli* o157:H7 ด้วย Multiplex PCR.....47
4.6 หาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR.....49
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....57
รายการอ้างอิง.....66
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก. สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....77
ภาคผนวก ข. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....80
ภาคผนวก ค. การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม BlastN version 2.2.7 และ การเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนโดยโปรแกรม BlastX version 2.2.7.....83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....86

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 แสดงซีโรไทป์ที่สำคัญของ diarrheagenic *E. coli* (Chart, 2002).....6
2.2 แสดงลักษณะที่แตกต่างกันของวีโรทอกซินที่สร้างจาก VTEC (Chart, 2002).....10
2.3 แสดงการเรียก verotoxin ที่นำเสนอโดย Calderwood และคณะ (1996) (Paton และ Paton, 1998).....11
2.4 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยก *E. coli* O157:H7.....15
2.5 แสดงสมบัติทางชีวเคมีของ *E. coli* O157:H7 (Tortorello, 2000).....18
2.6 แสดงตัวอย่างโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อกลุ่ม VTEC หรือ *E. coli* O157 โดยวิธี PCR หรือ Multiplex PCR.....22
3.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์.....27
4.1 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank.....46
4.2 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank.....46
4.3 จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง หลังการบ่มในเนื้อดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB จากช่วงเวลาต่างๆ.....53
4.4 จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับด้วยวิธี Immuno magnetic Seperation, IMS หลังการบ่มในเนื้อดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB จากช่วงเวลาต่างๆ.....52
4.5 จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง หลังการบ่มในเนื้อดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mEC+n จากช่วงเวลาต่างๆ.....56
4.6 จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่ตรวจนับด้วยวิธี Immuno magnetic Seperation, IMS หลังการบ่มในเนื้อดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mEC+n จากช่วงเวลาต่างๆ.....56
5.1 สรุปภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจ *E. coli* O157:H7 โดย PCR และ Multiplex PCR.....59
5.2 แสดงภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบโดย Multiplex PCR.....62

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค IMS สำหรับแยก *E. coli* O157:H7 จากตัวอย่างอาหาร (Tortorello, 2000).....17

4.1 ภาพอะกาโรสเจลแสดงการตรวจสอบ *E. coli* O157:H7 โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จ O157 (Verocytotoxin genes) PCR Typing Set (Takara, Japan).....40

4.2 ภาพอะกาโรสเจลแสดงการแปรผันปัจจัยในการทำ PCR ด้วยไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* (VT-F และ VT-R).....42

4.3 ภาพอะกาโรสเจลแสดงการแปรผันปัจจัยในการทำ PCR ด้วยไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157} (PF-8 และ PR-8).....42

4.4 ภาพอะกาโรสเจลแสดงการแปรผันปัจจัยในการทำ Multiplex PCR ด้วยไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* และไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157}.....44

4.5 ภาพอะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์ Multiplex PCR ของ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8สายพันธุ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้.....45

4.6 ภาพอะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ใช้สำหรับการศึกษาความจำเพาะของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR.....48

4.7 ภาพอะกาโรสเจลแสดงการศึกษาความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR.....49

4.8 ภาพอะกาโรสเจลแสดงผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR.....51

4.9 ภาพอะกาโรสเจลแสดงผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ สำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR.....53

4.10 ภาพอะกาโรสเจลแสดงผลการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mEC+n สำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR.....55