การพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* O157 ด้วยเทคนิค Real-time PCR ในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล

Development of Detection of *Escherichia coli* O157 by Real-Time PCR Techniques in Halal Food

พจชนาถ พัทบุรี[1*] อภิญญา ศุกลรัตน์[1] และ อุทัย ไทยเจริญ[1]
Pojchanad Pathaburee[1*], Apinya Sukolrat[1] and Utai Thaicharoen[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli* O157 ในอาหารด้วยวิธี Real-time PCR และยืนยันผลด้วยวิธีมาตรฐานโดยใช้ชุดทดสอบทางการค้า Rapid test Single path® *E. coli* O157 (AOAC 010407) ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *E. coli* O157 โดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลจำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่า การตรวจหาด้วยเทคนิค Real-time PCR มีความจำเพาะกับเชื้อ *E. coli* O157 โดยให้ผลบวกเฉพาะเชื้อ *E. coli* O157 แต่ให้ผลลบในตัวอย่างที่ได้จากเชื้อชนิดอื่น ระยะเวลาในการตรวจสอบรวดเร็วกว่าเทคนิคตรวจสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบด้วยชุดทดสอบ เนื่องจากสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อหลังจากบ่มระยะเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อศึกษาความไวของปฏิกิริยาโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ *E. coli* O157 ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ เชื้อที่ไม่เจือจาง (100%) เชื้อที่เจือจางความเข้มข้น 10, 1, 0.1, และ 0.01% โดยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.01% เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157 ในผลิตภัณฑ์อาหารและวัตถุดิบที่ผลิตอาหารฮาลาลที่ใช้ในการผลิตด้วยเทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบผลกับการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่า ให้ผลเหมือนกันโดยทุกครั้งที่ทำการตรวจสอบจะมีตัวอย่างเชื้อควบคุมที่เป็นบวกทำปฏิกิริยาควบคู่เสมอ

คำสำคัญ: *E. coli* O157, Real-time PCR , AOAC010407

Abstract

This study aimed to detect *Escherichia coli* O157 in food by Real-time PCR and confirmed by standard methods using a test kit commercially Rapid test Single path® *E. coli* O157 (AOAC 010407), which is specific to *E. coli* O157. In this study, there were totally 20 samples. A specificity-species of Real-time PCR was positive only *E. coli* O157:H7 DNA. For another species showed negative result. The real-time PCR technique detect *E. coli* O157 faster than standard methods, after an incubation period of 16 hours. The sensitivity of real-time PCR gave the best result at ratio of 0.01%. The efficiency of real-time PCR to detect *E. coli* O157 in halal food and raw material was not diferent with immune technique and positive control reaction was also provided at anytime of testing.

คำสำคัญ: *E. coli* O157, Real-time PCR , AOAC010407

[1] ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110
[1] Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkla, 90110
*Corresponding author: e-mail: pojchanad.j@psu.ac.th

***Received:** 6 January 2019, **Revised:** 16 February 2019, **Accepted:** 26 March 2019, **Published:** 29 April 2019*

บทนำ

การแปรรูปผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์มีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก่อโรคได้ง่ายซึ่งการเตรียมผลิตภัณฑ์จะต้องระมัดระวัง ตัวอย่างเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่อาจปนเปื้อนมีหลายชนิดและเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญด้านความปลอดภัยอาหาร ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* O157 เป็นแบคทีเรียสาเหตุการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในหลายประเทศทั่วโลก จัดอยู่ในกลุ่ม EHEC ที่สร้างสารพิษ Verotoxin (VTEC) โดยมีหลาย serotype ที่มักก่อโรค ได้แก่ serotype O157:H7 แต่อาจพบ serotype อื่น เช่น O26, O111, O104 เป็นต้น® ผู้ติดเชื้อจะมีอาการท้องเสีย ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ หรืออาการลำไส้อักเสบ มีเลือดออก ถ่ายเป็นเลือดสด ผู้ป่วยที่ถ่ายเป็นเลือดสดโดยเฉพาะเด็กเล็กและผู้สูงอายุมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตได้ (Beneduce *et al*., 2003)การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี เช่น การเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างหรือวิธีการตรวจหา Shiga toxin (Stx) โดยการทดสอบ cytotoxin จากตัวอย่างโดยตรง (Mansour *et al*., 1993) การตรวจทางอิมมูโนวิทยาข้อดี คือ ตรวจง่าย รวดเร็ว ข้อเสีย คือ ชุดน้ำยามีราคาแพงและไม่สามารถเก็บตัวอย่างเชื้อไว้ศึกษาต่อได้ ระยะเวลาตั้งแต่เพาะเชื้อถึงการทดสอบกับ *E. coli* O157 antiserum ซึ่งระยะเวลาทราบผลประมาณ 9 วันและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญทางแบคทีเรียในการแยกเชื้อและการตรวจสอบเพื่อจำแนกชนิดเชื้อ โดยราคาในการตรวจสอบเชื้อแต่ละชนิดราคาค่อนข้างสูง การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้าง O157 และ Shiga toxin จากตัวอย่างโดยตรง ซึ่งทำได้หลายวิธีเช่น colony hybridization (Feng *et al*., 1998) โดยการ blot ตัวอย่างให้ติดบนเมมเบรนและให้ทำปฏิกิริยา hybridization กับ DNA probe โดยที่จำเพาะ แต่ Shiga toxin แบ่งเป็นกลุ่มย่อยจึงต้องทำการทดลองกับ DNA probe หลายตัว ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาเทคนิคต่างๆขึ้นมาใช้เพื่อวินิจฉัยเชื้อ เช่น การตรวจสอบระดับ DNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางเป็นการเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลองหรือ PCR (Oberst *et al*., 1998) แต่เทคนิค PCR ยังคงมีข้อจำกัด คือ หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการ PCR แล้ว ต้องนำผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR Product ไปตรวจสอบขนาดด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel (Holland *et al*., 2000) นอกจากนี้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *E. coli* O157 โดย Calderwood และคณะในปี 1987 (Calderwood *et al*., 1987) วิธีที่นิยมในปัจจุบันคือ การเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลองหรือ Polymerase chain reaction (PCR) (Oberst *et al*., 1998) ปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิค Real-time PCR เข้ามาใช้เพื่อลดขั้นตอนการตรวจสอบและเพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จาก PCR โดยลดขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า เพื่อสามารถตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษ (Sharma *et al*.,1999) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อดีเอ็นเอของเชื้อและมีความไวสูง สามารถตรวจสอบเชื้อที่ต้องการได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยและใช้เวลาในการตรวจสอบโดยประมาณ 45 นาทีหลังจากสกัดดีเอ็นเอ (Spano *et al*.,2005) สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารตามกระบวนการผลิตอาหารทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและลดการแพร่ระบาดของเชื้อสู่คน ต่อมาได้มีการศึกษาหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์

โดยงานวิจัยได้นำเทคนิค Real-time PCR ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อและเพื่อลดการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* O157 มาใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพการตรวจสอบ ได้เตรียม Positive control โดยฝากถ่ายยีนของเชื้อที่สนใจเข้าสู่ TA Topo cloning โดยไม่จำเป็นต้องนำเชื้อ *E. coli* O157 ที่สามารถก่อโรคได้ปนเปื้อนในระบบเหมือนวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อดังเดิม และประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157 จากตัวอย่างอาหารผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล ซึ่งได้ทำการตรวจหาเชื้อที่ปริมาณต่ำสุด (limit of detection) จากตัวอย่างอาหารที่จำลองการปนเปื้อน โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับวิธีตรวจหาเชื้อโดยเทคนิคทางอิมมูนซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในปัจจุบันเพื่อเป็นแนวทางในการตรวจสอบที่มีคุณภาพและประหยัดทั้งเวลารวมทั้งค่าใช้จ่ายในการตรวจหาเชื้อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157 โดยเทคนิค Real-time PCR และใช้ Recombinant DNA เพื่อตรวจสอบคุณภาพการวิเคราะห์
2. ศึกษาความไวของการตรวจสอบเชื้อ *E. coli* O157 ด้วยเทคนิค Real-time PCR
3. ศึกษาความคุ้มค่าในการนำเทคนิค Real-time PCR มาใช้ตรวจสอบหาเชื้อ *E. coli* O157 ในอาหารฮาลาลเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

ระเบียบวิธีวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

เชื้อ *E. Coli* O157 มาตรฐานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMST 30535)

ตัวอย่างอาหารที่ใช้ตรวจวิเคราะห์

ตัวอย่างอาหารฮาลาลที่ผ่านการแปรรูปจำนวน 20 ตัวอย่าง ได้แก่ กุ้งส้ม บูดู ทุเรียนกวน รังนกบรรจุขวด ข้าวเกรียบปลาทอด มินิค็อกเทลไก่ ไส้กรอกไทยอีสานไก่ น้ำพริกกุ้ง น้ำพริกมะขามกุ้งแห้ง น้ำพริกกุ้งเสียบทรงเครื่อง แกงไตปลาสำเร็จรูป วุ้นเส้นสำเร็จรูป ลูกชิ้นปลาญี่ปุ่น ไข่ปลา ลูกชิ้นปลา ปลาม้วน ปูอัด เต้าหู้ซีฟู้ด แซนด์วิชปลาและลูกชิ้นปลาแซลมอนโดยตัวอย่างก่อนทำการทดสอบเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำมาสกัด DNA

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E.coli*O157 ตามวิธีมาตรฐาน (AOAC 010407)

โดยวิธีเพาะเลี้ยง *E. coli* O157:H7 บ่มเชื้อในอาหาร mEC (Merck, Germany) ที่อุณหภูมิ35-37 องศาเซลเซียส 22±24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ Culture media มาทดสอบเชื้อตามวิธี Single path® *E. coli* O157 โดยนำ enrichment culture ปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร ทดสอบตามวิธี Single path® *E. coli* O157

การตรวจสอบเชื้อ *E.coli* O157 ด้วยเทคนิค Real-time PCR

1. Oligonucleotide primer ซึ่ง Primerที่ใช้ตรวจสอบเชื้อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วน *eae* gene โดยมี primer คือ E.coH F 5’TGGTACGGGTAATGAAAA 3’ และ E.coH R 5’AATAGCCTGGTAGTCTTGT3’ (Ellingson *et al*., 2005)

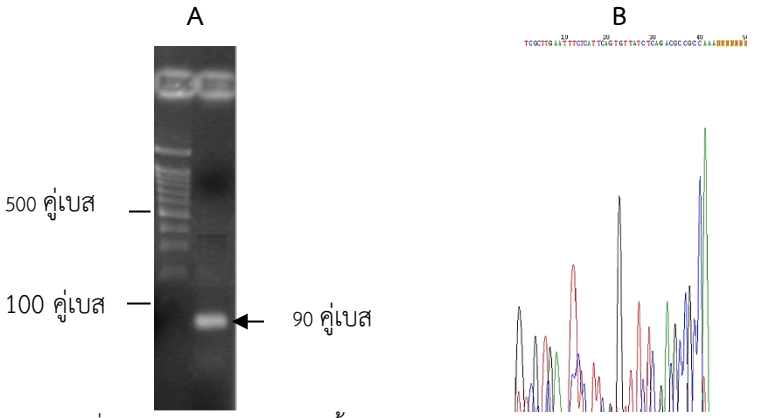
2. การเตรียม Positive control เพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ลดการใช้เชื้อก่อโรค *E.coli* O157สำหรับตรวจสอบคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ โดยฝากถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่ TA Cloning kit ได้นำเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ที่บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ mEC broth ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส 16±19 ชั่วโมง นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit(Vivantis, Malaysia.) เพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยเตรียมสารละลายในหลอดทดลองซึ่งประกอบด้วย Master Mix PCR (125 mMKCl, 75 mMTris-HCl, pH 8.3, 3.75 mM Mg(OAc), 500 μM dNTP), 50-100 นาโนกรัมของ DNA, 10 μM ของ primer E.coH F และ E.coH R ปริมาณสารละลายทั้งหมด 50 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง thermal cycle ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นโดยนำมาแยกบน 1.5% agarosegel ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel-Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA) หลังจากได้ชิ้น PCR แล้วนำมาหาลำดับดีเอ็นเอของ PCR product ที่ได้ โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง DNA Sequencer 377 ยืนยันชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นยีนของเชื้อโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ศึกษาลำดับดีเอ็นเอแล้ว นำมาฝากถ่ายยีนเข้าสู่ Topo TA CloningKit (Invitrogen,United States) เตรียม recombinant DNA เพื่อใช้เป็น positive control โดยเก็บโคโลนีที่ได้ใน 20% กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. ตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* O157 ด้วยเทคนิค Real-time PCR นำเชื้อ *Escherichia coli* O157*E* (DMST 30535) ที่บ่มใน mEC+n broth ปริมาณ 225 มิลลิลิตร 35-37 องศาเซลเซียส 14-16 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit(Vivantis, Malaysia) ตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ SYBR Green assay ซึ่งสาร SYBR Green excitation wavelength ในช่วงที่ 497 นาโนเมตร

ในการกระตุ้นสีย้อมให้เกิดปฏิกิริยาและเปล่งแสง emission wavelength ที่ 520 นาโนเมตร เตรียมสารละลายในหลอดทดลองปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของ forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล, 1X Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) DNA ที่สกัด 50-100 นาโนกรัม ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ทดสอบหรือควบคุมปฏิกิริยา 1 ไมโครลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผสมสารละลายต่างๆ เข้าเครื่อง Real-time PCR โดยตั้งรอบดังนี้ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ 95 องศาเซลเซียสเวลา 10 นาที 1 รอบต่อด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเวลา 15 วินาทีและอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาทีจำนวน 40 รอบ ตรวจสอบผลสัญญาณฟลูออเรสเซนต์โดยมี Positive control จาก Recombinant DNA สำหรับตรวจสอบคุณภาพการตรวจวิเคราะห์หาความไวของปฏิกิริยาและตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157 ในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิค Real-time PCR ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* O157 เจือจางที่ 100, 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001% ตามลำดับและผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล นำมาตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อด้วยเทคนิค Real-time PCR ยืนยันผลด้วยเทคนิคมาตรฐานโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบต่อด้วยวิธีอิมมูโนโดยการใช้ชุดทดสอบ Single path® *Escherichia coli* O157:H7 (Merck, Germany)

ผลการวิจัย

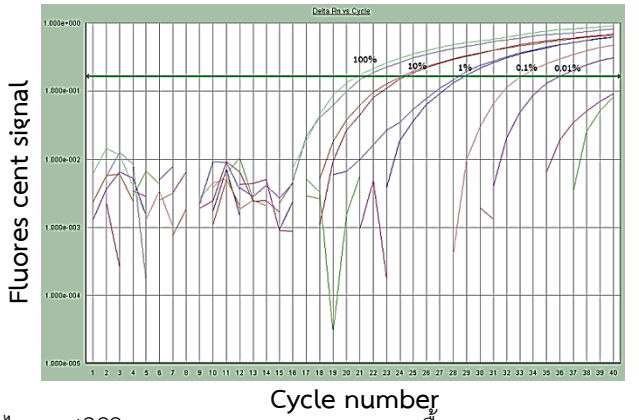
1. การตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157 โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR ได้เตรียม Recombinant DNA เพื่อใช้เป็น Positive control เมื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนยีนที่สนใจด้วยเทคนิค PCR ย้อมแถบ DNA ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV ปรากฏชิ้น PCR ขนาดประมาณ 90 คู่เบส (ภาพที่ 1 A) นำ PCR product ที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังภาพ chromatogram ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ(ภาพที่ 1 B) นำผลที่ได้ตรวจสอบกับลำดับ DNA ในฐานข้อมูล NCBI หาความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากลในโปรแกรมบน Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) โดยใช้เมนู blastn เพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่เพิ่มปริมาณได้ว่าเป็นชิ้น DNA ของเชื้อ *Escherichia coli* O157 ผล คือ มีความเหมือนคล้ายคลึงกับเชื้อ *E. coli* O157



ภาพที่ 1 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ*Escherichia coli* O157 ด้วยเทคนิค PCR (A) โดย lane 1: 100 bp marker, lane 2: *E. coli* O157, chromatogram ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *E .coli* O157(B)

2. หาความไวของปฏิกิริยาและตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157ในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล พบว่า หลังจากตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157 เจือจาง เชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 100%, 10%, 1%, 0.1% และ 0.01% และในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล โดยได้ยืนยันผลตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน (ภาพที่ 2) ผลการทดสอบพบว่า ทั้งสองวิธีสามารถตรวจพบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.01% (ตารางที่ 1) และให้ผลตรวจสอบไม่แตกต่างกันในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล โดยตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าวในทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ โดยผลลบ คือ ไม่พบเชื้อ (-) กรณีผลบวกที่พบเชื้อ (+) (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาความคุ้มค่าของวิธีที่ใช้สำหรับ

ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157 ด้วยเทคนิค Real-time PCR สามารถทราบผลการตรวจสอบได้เร็วกว่าโดยใช้เวลาในการตรวจสอบ19 ชั่วโมงนับตั้งแต่การ enrichment เชื้อซึ่งจะให้ผลที่รวดเร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานประมาณ 6 ชั่วโมงและราคาการตรวจสอบถูกกว่า นอกจากนี้ไม่ได้ใช้ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* O157 ที่ก่อโรคเพื่อตรวจสอบคุณภาพการวิเคราะห์ เพื่อลดค่าใช้จ่ายการทำลายเชื้อหลังจากทดสอบและป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อในระบบ ซึ่งเป็นการเพิ่มความมั่นใจและลดระยะเวลาการตรวจสอบการปนปื้อนของเชื้อให้ผู้บริโภคได้และสามารถสรุปเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงและเทคนิค Real-time PCR ได้ดังในตารางที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR ตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* O157:H

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบตัวอย่างอาหารด้วยเทคนิค Real-time PCR และวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่างที่	ชื่อ	ผลการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน	ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR
1	กุ้งส้ม	-	-
2	บูดู	-	-
3	ทุเรียนกวน	-	-
4	รังนกบรรจุขวด	-	-
5	ข้าวเกรียบปลาทอด	-	-
6	มินิค็อกเทลไก่	-	-
7	ไส้กรอกไทยอีสานไก่	-	-
8	น้ำพริกกุ้ง	-	-
9	น้ำพริกมะขามกุ้งแห้ง	-	-
10	น้ำพริกกุ้งเสียบทรงเครื่อง	-	-
11	แกงไตปลาสำเร็จรูป	-	-
12	วุ้นสำเร็จรูป	-	-
13	ลูกชิ้นปลาญี่ปุ่น	-	-
14	ไข่ปลา	-	-
15	ลูกชิ้นปลา	-	-
16	ปลาม้วน	-	-
17	ปูอัด	-	-
18	เต้าหู้ซีฟู้ด	-	-
19	แซนวิชด์ปลา	-	-
20	ลูกชิ้นปลาแซลมอน	-	-
21	*E. coli* O157 ไม่เจือจาง	+	+
22	*E. coli* O157 เจือจาง 10%	+	+
23	*E. coli* O157เจือจาง 1%	+	+
24	*E. coli* O157เจือจาง 0.1%	+	+
25	*E. coli* O157เจือจาง 0.01%	+	+

ตารางที่ 2 ประเมินความคุ้มค่าการตรวจสอบเชื้อเทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

หัวข้อ	เทคนิคเพาะเลี้ยงและทดสอบด้วย Rapid test	เทคนิค Real-time PCR
ระยะเวลา	25 ชั่วโมง	19 ชั่วโมง
ความไวในการตรวจสอบ	0.01%	0.01%
ต้นทุนการทดสอบ	ประมาณ 500 บาทต่อตัวอย่าง	ประมาณ 200 บาทต่อตัวอย่าง
วัสดุและสารเคมี	มีอายุการใช้งานไม่เกิน 1 ปี	มีอายุการใช้งานมากกว่า 1 ปี
เชื้อ Positive control	ใช้เชื้อที่มีชีวิตเป็น positive control จำเป็นต้องอบทำลายเชื้อก่อนทิ้ง	ใช้ชิ้นส่วนยีนที่ฝากถ่ายเป็น positive control ไม่ต้องอบทำลายเชื้อก่อนทิ้ง

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบเชื้อ *E. coli* O157 เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการระบาดของโรคทางเดินอาหารเป็นพิษในหลายประเทศซึ่งการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีมาตรฐาน โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบทางอิมมูโนวิทยาและทดสอบต่อด้วย Single path® *Escherichia coli* O157:H7 ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ปัจจุบันโดยจะเห็นผลบวก คือ ปรากฏแถบที่เส้น T line เป็นบริเวณที่มีโปรตีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* O157 ขึดอยู่ ถ้าในตัวอย่างมีเชื้อ *E. coli* O157:H7 โดยตัวอย่างหลังจากที่สกัดโปรตีนแล้วนำมาหยดบนชุดทดสอบแล้วจะเกิดการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีและเกิดเป็นแถบสีปรากฏให้เห็นได้ เนื่องจากแอนติบอดีที่ขีดที่เส้น T line ได้เชื่อมอยู่กับอนุภาคทองคำหรืออนุภาคที่ทำให้เกิดสีได้ กรณีที่เป็นผลลบจะปรากฏให้เห็นเฉพาะ Control line (C line) เพื่อบ่งชี้ประสิทธิภาพชุดทดสอบ แต่บริเวณ Test line (T line) ไม่ปรากฏแถบเนื่องจากไม่มีการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งปัจจุบันมีชุดน้ำยาจำหน่ายในท้องตลาด ข้อดี คือ ตรวจง่าย รวดเร็ว แต่ชุดน้ำยามีราคาแพงและไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ศึกษาต่อได้ เพื่อแก้ไขปัญหาการศึกษาครั้งนี้ ได้พัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อโดยใช้เทคนิค Real-timePCR ซึ่งเป็นวิธีที่ไวและเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับ นอกจากนี้ได้พัฒนาใช้ท่อนของยีนสำหรับตรวจสอบระบบ โดยฝากถ่ายยีนในระบบที่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคเข้าสู่ห้องปฏิบัติการ ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อ 16 ชั่วโมง นำมาสกัดดีเอ็นเอใช้เวลา 1 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้เวลา 2 ชั่วโมง (Lyons *et al*., 2000) โดยมีการศึกษาความไวของปฏิกิริยาสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.01% ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารหรือวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารที่ปนแเปื้อนของเชื้อก่อโรคในปริมาณน้อย ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ibekwe *et al*. (2002) ได้ใช้เทคนิค Multiplex Real-time PCR ตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ในน้ำเสียสามารถตรวจหาเชื้อระดับต่ำสุดที่ $7.9 \times 10^{(-5)}$ นอกจากนี้ Sharma ได้ใช้เทคนิค Multiplex Real-time PCR ตรวจหา *Escherichia coli* O157:H7:H7 ในเชื้อบริสุทธิ์ ในอุจจาระ และเนื้อเยื่อโดยใช้ Primer และ probe 3 ชุด โดยขนาด PCR product 160 bpในส่วนของ *eae* gene ในส่วนของ *stx1* gene 150 bpและ 200 bpในส่วนของ *stx2* gene โดยทำการทดลอง 67 ตัวอย่าง โดยช่วงความไวของปฏิกิริยาในตัวอย่างอุจจาระและเนื้อเยื่อ 10^4 และ 10^8 CFU/g ของตัวอย่างอุจจาระโดยไม่ต้องเลี้ยงในอาหาร ถ้าเลี้ยงในอาหาร non-selective broth ประมาณ 4 ชั่วโมงและ 16 ชั่วโมงสามารถตรวจสอบได้ในระดับ 10^0-10^3 CFU/g (Sharma *et al*., 2003) การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลและตรวจสอบวัตถุดิบที่ใช้พบว่า เมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารผลิตภัณฑ์แปรรูปด้วยเทคนิค Real-time PCR เมื่อยืนยันผลที่ได้ตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐานให้ผลสอดคล้องกัน เนื่องจากไม่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยทุกครั้งที่ทำการตรวจสอบมีตัวควบคุมที่เป็นบวกควบคู่ในการทดลองเสมอ ซึ่งผลสอดคล้องกันกับงานวิจัยของ Ellingson *et al*. (2005) การตรวจสอบ *E. coli* O157:H7 ในตัวอย่างที่เป็นเนื้อวัวดิบและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อวัว โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของ *eae* gene

สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 โดยวิธี Real-time PCR และวิธีมาตรฐาน ให้ผลไม่แตกต่างจากการตรวจสอบด้วยวิธี Real-time PCR การศึกษาครั้งนี้ตรวจหายีนของเชื้อในส่วน intimin (*eae*) gene ด้วย

เทคนิค Real-time PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ รวดเร็วและแม่นยำ โดยพบว่า ทั้งสองวิธีสามารถตรวจสอบได้ที่ความเจือจางที่ 0.01% ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารหรือวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารที่ปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในปริมาณน้อยเพื่อควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อที่ปนเปื้อนตัวอย่างอาหารอื่นและเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในภาพรวม นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมีแนวทางในการใช้เทคนิคดังกล่าว เพื่อการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างอาหารที่ให้ผลไม่ชัดเจนจากการตรวจสอบโดยวิธีอื่นเพื่อเพิ่มความมั่นใจต่อผู้บริโภค เนื่องจากเทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจสอบได้รวดเร็วกว่า และค่าใช้จ่ายในการทดสอบถูกกว่าวิธีแบบดั้งเดิม

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557 จากสถาบันฮาลาล มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และความร่วมมือจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

Beneduce, L., Spano, G. and Massa S. 2003. Escherichia coli O157:H7 general characteristics,isolation and identification techniques. Annals of Microbiology. 53: 511-527.

Calderwood, S. B., Auclair, F., Keusch G. T. and Mekalanos J.J. 1987. Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli.* Proc Natl Acad Sci U S A. 84:4364-4368.

Ellingson, J.K., Anderson, J.L., Carlson, S.A. and Sharma, V.K. 2005. Rapid PCR detection of enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) in bovine food products and feces.Molecular and Cellular Probes. 19:213-217.

Feng, P., Lampel, K.A., Karch, H. and Whittam, T.S. 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect. Dis. 177**:**1750-1753.

Holland, J., Louie, L., Simor, L.A. and Louie M. 2000. PCR Detection of Escherichia coli O157:H7 Directly from Stools:Evaluation of Commercial Extraction Methods for Purifying Fecal DNA. Journal of Clinical Microbiology. 38: 4108–4113.

Ibekwe, A.M., Pamela, M.W., Catherine M.G., Sharma, V.K. and Steven, R.L. 2002. Multiplex Fluorogenic Real-Time PCR for Detection and Quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy Wastewater Wetlands. American Society for Microbiology. 68:4853-4862.

Lyons, S.R., Griffen, A.L. and Leys, E.J. 2000. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonasgingivalis* and total bacteria. J. Clin. Microbiol. 38, 2362–2365.

Mansour, S., Linda M.G., Bindi D., Dalia A.O. and Phillip I.T., 1993. Molecular Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 Strains by Bacteriophage A Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: Application to a Multistate Foodborne Outbreak and a Day-Care Center Cluster. J. Clin. Microbiol. 31: 3179-3183.

Oberst, R.D., Hays, M.P., Bohra, L.K., Phebus, R.K., Yamashiro, C.T. and Paszko, K. C., 1998. PCR-based DNA amplification and presumptive detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5′ nuclease (Taq Man) assay. Applied and Environmental Microbiology. 64:3389–3396.

Sharma, V.K., Dean-Nystrom, E.A. and Casey, T.A. 1999. Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxigenic *Escherichia coli*. Molecular and Cellular Probes. 13: 291-302.

Sharma, V.K. and Dean-Nystrom, E.A. 2003. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. Veterinary microbiology. 93:247-260.

Spano, G., Beneduce, L., Terzi, V., Stanca, A.M. and Massa, S. 2005. Real-time PCR for the detection of Escherichia coli O157:H7 in dairy and cattle wastewater. Letters in Applied Microbiology.40: 164–171.