ว. กรมวิทย. พ. 2541. 40 (2) : 133-143

การศึกษาประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ *Escherichia coli* O157: H7 (EHEC) ด้วยวิธี Immunochromatographic Techniques และ Modified BAM Method

Operative Validation Study of *Escherichia coli* O157: H7 (EHEC) by Immunochromatographic Techniques and Modified BAM Method

เพ็ญศรี รอดมา [1]
ปัทมา แดงชาติ [1]
นงลักษณ์ พิสุทธิลาภ [1]
สุมาลี บุญมา [2]
[1] กองอาหารส่งออก
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
[2] คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pensri Rodma[1]
Pattama Daengchat[1]
Nongluk Pisuttilap[1]
Sumalee Boonmar [2]
[1] Division of Food for Export
Department of Medical Sciences
[2] Faculty of Veterinary Medicine
Kasetsart University

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของ immunochromatograghic technique (PATH-STIK) เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ (Modified BAM Technique) โดยการเติมเชื้อ *E.coli* O157:H 7 ลงในตัวอย่างพบว่าวิธี PATH STIK และวิธีเพาะเชื้อ ให้ผลบวกที่ระดับการปนเปื้อน 2.5x10^4 CFU/g และ 2.5x10^0 CFU/g ขึ้นไปตามลำดับ แต่หลังการอบเพาะเชื้อที่ 42 C นาน 6h แล้ว ความไวของวิธี PATH STIK คือ 87.50% และ 62.50% ในผลิตภัณฑ์ที่มีเชื้อประจำถิ่นปนเปื้อนอยู่ในปริมาณต่ำ (น้ำนมพลาสเจอร์ไรด์) และสูง (กุ้งบด) ตามลำดับ ขณะที่ 24h มีความไวเพิ่มขึ้นเป็น 100% ในทั้งสองผลิตภัณฑ์ การศึกษาปริมาณปนเปื้อนในอาหารชนิดต่างๆ 50 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลลบโดย BAM Method ความจำเพาะของวิธี PATH STIX คือ 96.00% คิดเป็น overall sensitivity 75.00 % (6h) , 100% (24h) และ overall specificity 97.78% (6h & 24h) ค่า overall Chi square มีค่าสูงกว่า 3.84 (6h) วิธี PATH-STIK test (24h) สามารถใช้เป็น rapid screening method สำหรับตรวจหาเชื้อ *E.coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์อาหารและสายการผลิตตามระบบ HACCP ได้ อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ให้ผลบวกต้องใช้ Serological test และ Biochemical test เพื่อการตรวจสอบยืนยัน

ABSTRACT

Efficacy test for the rapid detection of EHEC (*E.coli* O157 H 7) by the new immunochromatograghic technique (PATH-STIK) and the Modified Bacteriological Analytical Manual (BAM) culture method were done on the spiked samples. PATH-STIX and BAM method were found to be positive on 2.5x10^4 and 2.5x10^0 CFU/g (initial loaded), respectively. After incubation at 42(C for 6h, 87.50% and 62.50% sensitivity of PATH-STIX were found on high background (minced shrimp) and low background (pasteurized milk), respectively. Where as 24h incubation showed 100% sensitivity on both type of spiked samples. Fifty naturally contaminated of foods representative of a wide variety of food products which negative by BAM method showed 96.00% specificity by PATH-STIX. The overall sensitivity were 75.00% (6h) and 100% (24h). The overall specificity were 97.78 % (6h & 24h) and overall Chi square > 3.84 (6h). PATH-STIK technique (24h) can be used as a rapid screening tool for the detection of *E. coli* O157:H7 in certain food products and food chains in the HACCP system. Nevertheless, serological and biochemical test must be done for the positive samples confirmation.

Keywords : *E. coli* O157: H7, Immunochromatographic Techniques

บทนำ

ประเทศไทยสามารถส่งผลิตภัณฑ์อาหารเป็นสินค้าออก ไปจำหน่ายในปีหนึ่ง นับเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาท และเนื่องจากมีการแข่งขันทางการตลาดระหว่างประเทศผู้ส่งออก เป็นสาเหตุให้ประเทศผู้นำเข้ามีข้อต่อรองสูง ประกอบกับเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคในประเทศจึงได้เพิ่มข้อกำหนดในการนำเข้าสำหรับอาหารส่งออกด้านคุณภาพในรูปแบบต่างๆ เงื่อนไขที่เป็นมาตรการซึ่งตั้งขึ้นเพื่อให้ประเทศผู้ส่งออกถือปฏิบัติ คือการกำหนดให้นำระบบวิเคราะห์อันตราย และ ควบคุมจุดวิกฤต (HACCP = Hazard Analytical Critical Control Point) มาใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิต ประเทศไทยได้รับผลกระทบโดยตรงกับข้อกำหนดดังกล่าว อย่างไรก็ตาม เป็นความจำเป็นที่ประเทศไทย ต้องปรับเปลี่ยนระบบการควบคุมจากการวิเคราะห์ เพื่อประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ก่อนการส่งออกอย่างเดียว เป็นการนำระบบวิเคราะห์อันตรายและควบคุมจุดวิกฤต (HACCP) ในกระบวนการผลิตมาใช้ ควบคู่กับการวิเคราะห์เพื่อประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ก่อนการส่งออก โดยเป็นหน้าที่ของกลุ่มผู้รับผิดชอบกระบวนการผลิตที่จะต้องดำเนินการนำระบบดังกล่าวมาใช้ หน่วยงานของรัฐเพิ่มบทบาท จากการตรวจสอบประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์มาเป็นการให้แนะนำทางวิชาการและการตรวจรับรอง (External audit) เพื่อให้มีการควบคุมกระบวนการผลิตโดยใช้ระบบวิเคราะห์จุดวิกฤต (HACCP) อย่างมีประสิทธิภาพดี สม่ำเสมอ และได้รับประสิทธิผลสูงสุด นอกจากนั้นข้อกำหนดของ CODEX Committee of Food Hygiene (CCFH) ระบุว่าการนำระบบวิเคราะห์อันตรายและควบคุมจุดวิกฤต (HACCP = Hazard Analytical Critical Control Point) มาใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิตเป็นการดำเนินการที่จะสามารถขจัด (Eliminate) หรือลด (Decrease) ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อโรคอาหารเป็นพิษให้อยู่ในปริมาณที่ ยอมรับได้

สำหรับคุณภาพทางจุลชีววิทยาไม่แนะนำให้ใช้การตรวจวิเคราะห์โดยการเพาะเชื้อ (culture technique) เนื่องจากใช้เวลาในการตรวจสอบนานหลายวัน จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในการประเมิน แต่หากมีวิธีตรวจวิเคราะห์ที่สามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว อ่านผลได้ทันที และ มีประสิทธิภาพที่เป็นที่ยอมรับก็สามารถนำมาใช้ในการใช้ ควบคุมกระบวนการผลิต สำหรับประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาในระบบนี้ได้ โดยเฉพาะขั้นตอน การควบคุม (control measure) การตรวจสอบ (monitoring) และ/หรือขั้นตอน การตรวจพิสูจน์ (verification) การเลือกใช้วิธีที่รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และเชื่อถือได้ ในการประเมินผลการควบคุมคุณภาพเป็นสิ่งที่ต้องดำเนินการ ทั้งนี้เพื่อให้สามารถตรวจสอบได้ว่าระบบที่ใช้ควบคุมนั้นมีประสิทธิภาพนำไปสู่การปรับเปลี่ยนกระบวนการผลิตให้ได้ผลสมบูรณ์ครบถ้วนที่สุด

Escherichia coli O157:H7 เป็นเชื้อที่กำลังมีการระบาดในประเทศญี่ปุ่นและขณะนี้ยังไม่สามารถหยุดการระบาดได้ ประเทศญี่ปุ่นจึงมีการควบคุมผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตในประเทศและอาหารนำเข้าอย่างเข้มงวด[1] โดยเพิ่มมาตรการตรวจสอบ ณ จุดนำเข้าและมีการกำหนดให้ประเทศผู้ส่งออกเข้มงวดในการตรวจสอบก่อนการส่งออกด้วย ซึ่งเป็นความจำเป็นเร่งด่วนที่ผู้ผลิตเองจะต้องตรวจสอบการปนเปื้อนในวัตถุดิบระหว่างกระบวนการผลิต ตลอดจนผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นเพื่อให้มั่นใจได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว การเลือกใช้วิธีที่สามารถบอกผลได้เร็วที่สุด ถูกต้องแม่นยำจะสามารถป้องกันการถูกกักกันสินค้าและปฏิเสธการนำเข้าได้ เนื่องจากเชื้อนี้ไม่เคยมีการระบาดในประเทศไทย การศึกษาในเชิงเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์จึงมีน้อยหรือไม่มีเลย ดังนั้นเพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกใช้ วิธีเพาะเชื้อซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง ที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานอย่างน้อยที่สุด 4 วันสำหรับการตรวจวิเคราะห์ขั้นต้น (Presumptive Identification) ขณะที่โรงงานผู้ผลิตมีความต้องการวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็วในการประเมินผล วิธี ถูกเลือกใช้คือ Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)[2,3] มีข้อที่ต้องปรับเปลี่ยนหลายขั้นตอน เช่น ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 2.5 ชั่วโมงทั้งนี้เนื่องจากมีขั้นตอนการ

อบเพาะเชื้อและการล้างหลายครั้ง ประกอบกับในการวิเคราะห์ในครั้งหนึ่งต้องวิเคราะห์พร้อมกันหลายตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากการออกแบบของ microtitre plate ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นต้น

คณะวิจัยจึงได้ดำเนินการศึกษาวิธี ซึ่งเป็น Rapid techniques[2,4,5] คือ Visible Immuno Precipitation (VIP) โดยใช้ Immunochromatographic Techniques ซึ่งเมื่อเติม Enrichment Broth ลงใน Path Stick แล้ว ถ้ามี *Escherichia coli* O157: H7 จะทำปฏิกิริยากับ Antibody Chromogen Complex จะเกิดเป็น Precipitation Line (pink line) ใน line แรก (T=Test Area) และ เกิด line ที่สอง (C=Control Area) เป็นการตรวจสอบว่าการทดลองถูกต้อง วิธีที่สามารถอ่านผล(presumptive results) ได้ในเวลา 10 นาที หลังจากการอบเพาะเชื้อในขั้นตอนแรก และไม่ต้องมีการล้างหรือการอบเพาะเชื้อในขั้นตอนการอ่านผล นำไปเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ Modified Bacteriological Analytical Manual (BAM) และวิธีมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่น[6,7] เพื่อนำไปเสนอแนะทางวิชาการแก่ผู้ผลิต และ ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับบุคลากรผู้ควบคุมกระบวนการผลิต ในการเลือกวิธีวิเคราะห์เพื่อควบคุมการประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยา และนำไปประกอบในการจัดทำ Microbiological Generic Model เพื่อขจัด หรือ ลดปริมาณปนเปื้อนของเชื้อนี้ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ สำหรับระบบ HACCP ต่อไป

วัตถุและวิธีการ

1. การออกแบบการทดลอง

น้ำนมและกุ้งบดแช่แข็งซึ่งตรวจวิเคราะห์ก่อนว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ Escherichia coli O157:H7 จำนวน 8 ตัวอย่าง แล้ว spike เชื้อลงในตัวอย่างที่เตรียมให้ได้ cell suspension ที่มีความเข้มข้น $2.5x10^7$, $2.5x10^6$, $2.5x10^5$, $2.5x10^4$, $2.5x10^3$, $2.5x10^2$, $2.5x10^1$, $2.5x10^0$ CFU/g ความเข้มข้นละ 10 ตัวอย่าง รวมเป็น 80 ตัวอย่าง ส่วน 1 ตัวอย่างที่เหลือซึ่งไม่มีการปนเปื้อนเป็นตัวอย่างควบคุม (Control) ทำการทดลองเช่นนี้ 10 trial จะมีตัวอย่างที่ spike เชื้อลงไปทั้งหมด 80 ตัวอย่าง และตัวอย่างควบคุม 10 ตัวอย่าง

ศึกษาการปนเปื้อน (Natural contamination) โดยใช้วิธี Rapid techniques คือ Immunochromatographic Techniques เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ (culture technique) อาหารถูกเลือกจากอาหารแช่แข็งที่มีการส่งออกมาก 5 ชนิด คือ นม หมู กุ้ง ปลาหมึก ปลา ชนิดละ 10 ตัวอย่าง จำนวนทั้งหมด 50 ตัวอย่าง

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์

2.1 นำ *Escherichia coli* O157:H7 (The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Japan) ไปเพาะเชื้อใน Brain Heart Infusion Broth (BHI) ที่ 35-37 C นาน 18-24 ชั่วโมง นับปริมาณเ cell suspension โดยใช้ Plate Count Technique บน TSA (Trypticase Soy Agar) ได้ cell suspension 5x108, เตรียม cell suspension โดยใช้ serial ten fold dilution ($1:10^1$, $1:10^2$,$1:10^2$, ...$1:10^7$) ได้ cell suspension ที่มีความเข้มข้น $5x10^8$, $5x10^7$, $5x10^6$, $5x10^5$, ... $5x10^2$, $5x10^1$

2.2 แบ่งนมพลาสเจอร์ไรด์ (ซึ่งตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 โดยวิธีเพาะเชื้อ) ออกเป็น 9 ตัวอย่างๆละ 20 มล. เติม m EC + n (modify Escherichia coli Broth + Novobiocin 20 mg/L) จำนวน 180 มล.

2.3 spike เชื้อแต่ละความเข้มข้น $5x10^8$ $5x10^1$ จำนวน 1.0 มล. ลงไปในตัวอย่างอาหาร 9 ส่วนที่เตรียมไว้เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อโดยประมาณ (approximate cell suspension) $2.5x10^7$, $2.5x10^6$, $2.5x10^5$, $2.5x10^4$, $2.5x10^3$, $2.5x10^2$, $2.5x10^1$, $2.5x10^0$, CFU/g ของกุ้ง สำหรับตัวอย่างอาหารส่วนที่เหลืออีก 1 ส่วนเป็นตัวอย่างควบคุม (control sample) โดยไม่ต้องเติมเชื้อลงไป ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง (trial)

2.4 ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 2.1-2.3 โดยใช้

กุ้งบดแช่แข็ง (ซึ่งตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 โดยวิธีเพาะเชื้อ)

3. วัสดุอุปกรณ์

1. Incubator (35 C และ 42 C)
2. Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml.
3. Petri disk, Test tubes, Pipette,
4. Path Stick Rapid E.coli O157 Test (LUMAC)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Modified EC Broth
2. Novobiocin (Oxoid Supplement SR 161E)
3. Sorbitol Mac-Conkey Agar (Oxoid) (เติม 50 (liter Potassium tellurite และ 50 (liter Cefixime ใน 1000 Liter)
4. Fluorocult Sorbitol Mac-Conkey Agar (Merck)
5. Triple Sugar Iron (TSI)
6. Lysine Indole Motile Medium (LIM)
7. Methyl Red Medium (MR)
8. Voges-Proskauer Medium (VP)
9. Cellobiose
10. Trypticase Soy Agar

5. เชื้อและสารอ้างอิง

1. O 157 antiserum (Siken Co.,Ltd. Japan)
2. H 7 antiserum (Siken Co.,Ltd. Japan)
3. E.coli O157:H7 test kit (Oxoid)
4. Wellcolex *E.coli* O157:H7 (Murex Diagnostic Limited) *Escherichia coli* O 157 : H7 (The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Japan)

6. การดำเนินการตรวจวิเคราะห์

การศึกษาวิธี Immunochromatographic Techniques เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ (Modified BAM culture technique) ดำเนินการตามวิธีที่ระบุใน เอกสารแนบ 1 โดยแยกออกเป็น 3 การทดลองคือ

6.1 ศึกษาประสิทธิภาพความไวของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่าง (spiked samples) ก่อนการอบเพาะเชื้อ โดยทดสอบด้วย PATH-STIX สำหรับวิธีเพาะเชื้อ เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการแยกเชื้อ ด้วย Fluorocult-SMAC Agar และ CT-SMAC Agar

6.2 ศึกษาเปรียบเทียบในตัวอย่าง spike samples จำนวน 8 ตัวอย่าง ซึ่งมีปริมาณเชื้อโดยประมาณ approximate cell suspension) $2.5x10^7$, $2.5x10^6$, $2.5x10^5$, $2.5x10^4$, $2.5x10^3$, $2.5x10^2$, $2.5x10^1$, $2.5x10^0$, CFU/g ความเข้มข้นละ 1 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างควบคุม (control samples) ที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่จำนวน 1 ตัวอย่าง ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง (trial) รวมทั้งสิ้น 80 ตัวอย่าง และตัวอย่างควบคุม 10 ตัวอย่าง

6.3 ศึกษาเปรียบเทียบในตัวอย่างอาหารแช่แข็ง นม หมู กุ้ง ปลา ปลาหมึก ชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวมเป็น 50 ตัวอย่าง

7. STATISTICAL ANALYSIS

7.1 ใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบแต่ละวิธีที่ใช้ตรวจสอบเชื้อ (a pair-wise statistical analysis) ซึ่งเป็นวิธีของ McNemar[8] โดยใช้ค่า Chi square ในการแปรผล ค่า Chi square ที่มีค่าสูงกว่า 3.84 แสดงถึง significant difference ที่มีระดับ 5% probability โดยใช้สูตร

$$\chi^2 = (|a - b| - 1)^2 / (a+b)$$

เมื่อ a = จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธีที่ต้องการทดสอบและให้ผลลบโดยวิธีเพาะเชื้อ

b = จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธีที่ต้องการทดสอบและให้ผลบวกโดยวิธีเพาะเชื้อ

7.2 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่า ความไวของการทดสอบ (SENSITIVITY) และความจำเพาะของการทดสอบ (SPECIFICITY) ตามวิธีของ McClure[9] เมื่อ

SENSITIVITY หมายถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้อง คือร้อยละของตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ และให้ผลบวก

SPECIFICITY หมายถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้อง คือร้อยละของตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่และให้ผลลบ

False Negative Rate คือค่า 100-Sensitivity Rate

False Positive Rate คือค่า 100-Specificity Rate

ในการศึกษาครั้งนี้ค่า Sensitivity และ Specificity ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเพาะเชื้อคิดเป็นร้อยละ 100 เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ระบุให้วิธีเพาะเชื้อเป็นวิธีที่ถูกต้อง (goal target) และค่า False Positive และ False Negative สำหรับวิธีเพาะเชื้อจะเท่ากับ 0 ในการแปลผล

เอกสารแนบ 1

ชั่งตัวอย่างอาหาร 20 กรัม

↓

เติม m EC + n (modify Escherichia coli Broth + Novobiocin 20 mg/L)
จำนวน 180 มล.

↙ ↘ LUMAC TEST

Direct on selective agar
(CT-Sorbitol MacConkey Agar &
Fluorocult Sorbitol Mac-Conkey Agar)

↓

อบเพาะเชื้อนาน 6h/24h ที่ 42 C → LUMAC TEST

↓

ถ่ายเชื้อลงใน Sorbitol MacConkey Agar และ Fluorocult Sorbitol Mac-Conkey Agar

↓

อบเพาะเชื้อที่ 42 C นาน 24h → LUMAC TEST

↓

ตรวจสอบโคโลนีที่สงสัยโดยบน CT-SMAC โคโลนีจะไม่มีสีเนื่องจากไม่สามารถใช้น้ำตาล Sorbitol ได้ และกลางโคโลนีทึบแสง และบน F-SMAC โคโลนีมีสีเขียวเนื่องจากไม่สามารถใช้น้ำตาล Sorbitol และไม่เรืองแสง
เนื่องจากไม่สามารถสร้าง Glucuronidase ได้

↓

นำโคโลนีที่สงสัยไปทดสอบคุณสมบัติทาง Biochemical test (TSI, LIM, Citrate, MR-VPและCellobiose/MUG

TSI				LIM			Citrate	MR	VP	Cellobiose/MUG
Butt	Slant	Gas	H_2S	Lysine	Indole	Motile				
A	A/K	+ve	-ve	+ve	+ve	+ve	-ve	+ve	+ve	-ve/-ve

↓

นำโคโลนีที่สงสัยไปทดสอบ Serological test กับ antiserum O157, H7 และ Latex E.coli O157:H7 (EHEC)
NOTE: ก่อนอบเพาะเชื้อวิธี BAM Method การทำ dilution $1:10^1$,$1:10^2$,$1:10^3$.....$1:10^6$, $1:10^7$ **สำหรับ** ตัวอย่างที่มีเชื้อประจำถิ่นในปริมาณสูงเพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบให้สูงขึ้น

ผล

การศึกษาประสิทธิภาพของ technique (PATH-STIK) test kit โดยทดสอบความไว (SENSITIVITY) ในตัวอย่างน้ำนมพลาสเจอร์ไรด์และกุ้งเนื้อแช่แข็ง ซึ่งการเติมเชื้อ *E.coli* O157:H 7 (Spiked samples) พบว่าก่อนการอบเพาะเชื้อผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณเชื้อปนเปื้อนตั้งแต่ $2.5x10^4$ CFU/g ขึ้นไปของตัวอย่างทั้งสองชนิดสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี PATH STIK ในขณะที่เมื่อนำตัวอย่าง (Spiked samples) ไปแยกเชื้อบน CT-SMAC และ Fluorocult SMAC Agar (Merck) สามารถแยกเชื้อได้ตั้งแต่ $2.5x10^0$ CFU/g ขึ้นไป

ผลการเปรียบเทียบ Immunochromatographic Techniques (IMC-T) และ วิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T) ในนม (Spike samples) หลังการอบเพาะเชื้อที่ 42 C นาน 6h วิธี IMC-T สามารถตรวจพบในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $2.5x10^1$ CFU/g ขึ้นไปได้ ส่วน CUL-T ตรวจพบได้ ตั้งแต่ $2.5x10^0$ CFU/g ขึ้นไป (ตารางที่ 1) และ ที่ 24 ชั่วโมง ทั้งสองวิธีให้ผลบวกในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ Immunochromatographic Techniques (IMC-T) และวิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T) ในนม (Spike samples) หลังจากการอบเพาะเชื้อนาน 6 ชั่วโมง

SAMPLE	LEVEL CFU/g	TOTAL	IMC-T	CUL-T	CHI SQUARE	SENSITIVITY (%)	FALSE NEGATIVE	SPECIFICITY (%)	FALSE POSITIVE
1	$2.5x10^7$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
2	$2.5x10^6$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
3	$2.5x10^5$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
4	$2.5x10^4$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
5	$2.5x10^3$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
6	$2.5x10^2$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
7	$2.5x10^1$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
8	$2.5x10^0$	10	10	10	>3.84	100	0	-	0
9	0	10	0	0	-	-	-	100	0

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ Immunochromatographic Techniques (IMC-T) และวิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T) ในนม (Spike samples) หลังจากการอบเพาะเชื้อนาน 24 ชั่วโมง

SAMPLE	LEVEL CFU/g	TOTAL	IMC-T	CUL-T	CHI SQUARE	SENSITIVITY (%)	FALSE NEGATIVE	SPECIFICITY (%)	FALSE POSITIVE
1	$2.5x10^7$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
2	$2.5x10^6$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
3	$2.5x10^5$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
4	$2.5x10^4$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
5	$2.5x10^3$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
6	$2.5x10^2$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
7	$2.5x10^1$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
8	$2.5x10^0$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
9	0	10	0	0	-	-	-	100	0

ผลการเปรียบเทียบ Immunochromatographic Techniques (IMC-T) และ วิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T) ในกุ้งบด (Spike samples) หลังการอบเพาะเชื้อที่ 42 C นาน 6h วิธี IMC-T สามารถตรวจพบในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $2.5x10^3$ CFU/g ขึ้นไปได้ ส่วน CUL-T ตรวจพบได้ ตั้งแต่ $2.5x10^0$ CFU/g ขึ้นไป (ตารางที่ 3) และ ที่ 24 ชั่วโมง ทั้งสองวิธีให้ผลบวกในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ Immunochromatographic Techniques (IMC-T) และวิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T) ในกุ้งบด (Spike samples) หลังจากการอบเพาะเชื้อนาน 6 ชั่วโมง

SAMPLE	LEVEL CFU/g	TOTAL	IMC-T	CUL-T	CHI SQUARE	SENSITIVITY (%)	FALSE NEGATIVE	SPECIFICITY (%)	FALSE POSITIVE
1	$2.5x10^7$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
2	$2.5x10^6$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
3	$2.5x10^5$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
4	$2.5x10^4$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
5	$2.5x10^3$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
6	$2.5x10^2$	10	0	10	>3.84	0	100	-	0
7	$2.5x10^1$	10	0	10	>3.84	0	100	-	0
8	$2.5x10^0$	10	0	10	>3.84	0	100	-	0
9	0	10	0	0	-	-	-	100	0

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ Immunochromatographic Techniques (IMC-T) และวิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T) ในกุ้งบด (Spike samples) หลังจากการอบเพาะเชื้อนาน 24 ชั่วโมง

SAMPLE	LEVEL CFU/g	TOTAL	IMC-T	CUL-T	CHI SQUARE	SENSITIVITY (%)	FALSE NEGATIVE	SPECIFICITY (%)	FALSE POSITIVE
1	$2.5x10^7$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
2	$2.5x10^6$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
3	$2.5x10^5$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
4	$2.5x10^4$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
5	$2.5x10^3$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
6	$2.5x10^2$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
7	$2.5x10^1$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
8	$2.5x10^0$	10	10	10	<3.84	100	0	-	0
9	0	10	0	0	-	-	-	100	0

เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี BAM พบว่าในตัวอย่างน้ำนมซึ่งมีปริมาณเชื้อประจำถิ่นน้อยให้ผล Sensitivity 87.50 %(6 h) และ 100% (24h) และในตัวอย่างกุ้งบดซึ่งมีปริมาณเชื้อประจำถิ่นสูงให้ผล Sensitivity 62.50% (6 h) และ 100 % (24 h) ตามลำดับ

การศึกษาปริมาณปนเปื้อนในอาหาร 50 ตัวอย่าง ไม่พบมีการปนเปื้อนโดย BAM Method คิดเป็น overall sensitivity 75.00% (6h) และ 100% (24h) และ overall specificity 97.78% (6h & 24h) ค่า overall Chi square มีค่าสูงกว่า 3.84 ในการแปรผล

ค่า Chi square ที่มีค่าสูงกว่า 3.84 แสดงถึง significant difference ที่มีระดับ 5% probability (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Escherichia coli* O157:H7 ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี Immunochromatographic Techniques (IMC-T) และวิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T)

SAMPLE	TOTAL	IMC-T (6h & 24h)	CUL-T (6h & 24h)	SPECIFICITY (%)	SENSITIVITY (%)
MINCED PORK	10	1	0	99	-
FISH	10	0	0	100	-
SHRIMP	10	0	0	100	-
CUTTLE-FISH	10	1	0	99	-
MILK	10	0	0	100	-

วิจารณ์และสรุป

Escherichia coli O157:H7 แตกต่างจาก *Escherichia coli group* คือ ไม่สร้าง enzyme glucuronidase และไม่ ferment น้ำตาล Sorbitol ดังนั้นลักษณะ typical colonies บน Fluorocult Sorbitol Mac-Conkey Agar (Merck) มีสีเขียว กลม นูนกลางโคโลนี ขอบเรียบ และไม่เรืองแสงภายใต้ UV light ที่ long wavelength 355 nm ส่วนโคโลนีบน CT-Sorbitol MacConkey Agar[8] มีสีไส กลม นูนกลางโคโลนี ขอบเรียบ และ ที่ควรสังเกตุคือ ตรงกลางโคโลนีจะมีลักษณะทึบแสง[2,6,9,10,11]

การเติม Cefixime ลงในอาหารที่ใช้แยกเชื้อเพื่อต้านการเจริญของ Proteus sp. สำหรับ Potassum tellurite เพื่อยับยั้ง *Escherichia coli* และโดยเฉพาะ *Escherichia coli* ที่ไม่สามารถใช้ Sucrose ซึ่งมีประมาณ 6%[6] ไม่ให้เจริญเบียดบังได้[6,12]

การทำ Biochemical test มีความจำเป็นต้องแยก *E. hermanii* ออกจาก *E. coli* O157 : H7 เนื่องจาก antigenic structure คล้ายกันมาก และสามารถแยกได้โดยการใช้ Cellobiose fermentation โดยที่ *E. coli* O157 : H7 ไม่สามารถใช้ Cellobiose ได้

ผลการทดลองพบว่าการอบเพาะเชื้อนาน 6h ให้ผลดีที่สุดสำหรับวิธี Modified BAM Technique ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Escherichia coli* สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว และเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้ออื่นๆ ที่ให้ typical colonies บน Selective Agar คล้ายกับ *Escherichia coli* O157:H7 เจริญเบียดบังได้ การเพาะเชื้อโดยวิธี Modified BAM Technique ให้ผล positive เมื่อปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 มีน้อยกว่า $2.5X10^0$ CFU/g การตรวจวิเคราะห์โดยวิธีเพาะเชื้อก่อนการอบเพาะเชื้อ มีความจำเป็นต้องทำ dilution 10^1 .....10^6, 10^7 แล้ว นำไปเพาะเชื้อ เนื่องจากกรณีที่เชื้อประจำถิ่นอื่นๆปนเปื้อนอยู่เป็นจำนวนมาก เชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 อาจถูกเจริญเบียดบังได้ โดยสามารถพบได้ใน dilution สูงขึ้น ซึ่งอาจใช้เทคนิคนี้กับวิธี PATH STIK แต่ถ้าตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ มีเชื้อประจำถิ่นอื่นๆปนเปื้อนอยู่น้อยก็ไม่มีความจำเป็นต้องทำ dilution[6,13,14] อย่างไรก็ตามในกรณีที่มีเชื้อ *Escherichia coli* O157 : H7 ปนเปื้อนอยู่น้อยและมีเชื้อประจำถิ่นอื่นๆอยู่เป็นจำนวนมาก การทำ dilution ก็ไม่สามารถแก้ปัญหาได้ จากข้อมูลที่ได้มีผู้ศึกษา[15] โดยใช้การ capture ด้วย Dyna beads (ซึ่งทำด้าย Uniform, superparamagnetic, polystyrene beads และ Absorded ด้วย Affinity purified *E.coli* O157antibodies โดยใช้ Covalently bound ที่ผิวของ Beads และอยู่ใน suspension ของ Phosphate

buffered saline ที่ pH 7.4 และ 0.1% Human serum albumin ใช้ 0.02% sodium azide เป็น Preservative หลังจากการอบเพาะเชื้อแล้ว โดยที่ Dynabeads anti *E.coli* O157 จะ capture target bacteria คือ *E.coli* O157 ด้วยวิธี Immunomagnetic separation (IMS) ภายใน 1 ชั่วโมง specific antibodies coated บน beads จะจับ target bacteria เกิดเป็น bead-bacteria complexes ซึ่งสามารถแยกโดยใช้แท่งแม่เหล็ก magnetic particle concentration (Dynal MPC) นาน 3 นาที เท supernatant ทิ้ง แล้ว ล้างด้วย buffer (Phosphate Buffer Saline -Tween) แล้ว resuspend ด้วย buffer 100 microliter และนำไป spread หรือ streak บน selective agar และสามารถนำไปหาเชื้อโดยวิธี Rapid technique อื่นๆได้ ทั้งนี้จะทำให้เพิ่มโอกาสในการตรวจพบได้[16]

ข้อควรระวังสำหรับการถ่ายเชื้อลงบน selective agar ไม่ควรใช้วิธี pour plate (overlay) สรุปจากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า เนื่องจากการที่มีปริมาณ oxygen ที่แตกต่างระหว่างบริเวณใต้ agar เมื่อเปรียบเทียบกับที่ผิวของ agar เป็นสาเหตุโคโลนีของ *Escherichia coli* O157:H7 ที่เห็นจะมีลักษณะเหมือน *Escherichia coli* ทั่วไปคือมีสีชมพูบน sorbitol MacConkey agar และมีสีเหลืองบน Fluorocult agar ทำให้ไม่สามารถแยก sorbitol positive ออกจาก sorbitol negative ได้[17,18] การตรวจโดยใช้ PATH-STIK ควรอบเพาะเชื้อนาน 24h จึงจะให้ผลดีที่สุดทั้งตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของ competitive flora มากและน้อย เนื่องจากพบว่า PATH-STIK ให้ผล positive ต้องมีปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ไม่น้อยกว่า 10^4 CFU/g การอบเพาะเชื้อนาน 24h สามารถเพิ่มปริมาณสูงขึ้นในระดับที่สามารถตรวจสอบได้

ข้อควรสังเกตุการตรวจยืนยันเชื้อจาก positive spike samples โดยวิธีเพาะเชื้อมีปัญหาจากการที่มีปริมาณ competitive flora สูง ทำให้ไม่มี typical colonies บน selective agar หลังจากการอบเพาะเชื้อ และเนื่องจาก study design ทำให้การแปรผลวิเคราะห์จากวิธี Modified BAM จะไม่มี false negative หรือ false positive เลย

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบ พบว่า PATH-STIK (24h) สามารถใช้เป็น rapid screening method (overall sensitivity 87.50% และ overall specificity 96%) สำหรับตรวจหาเชื้อ *E.coli* O157 : H 7 ในผลิตภัณฑ์อาหารและสายการผลิตตามระบบ HACCP ได้ แต่ยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำ Biochemical test เพื่อตรวจสอบยืนยันเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 เนื่องจาก Somatic antigen สามารถเกิด Cross-reaction กับเชื้ออื่นๆ ได้เช่น Salmonella group N species, *Yersenia enterocolitica, Brucella spp. ,Hafnia spp.* และ *Citrobacter spp.* เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อป้องการรายงานผลที่เป็น false positive[19,20,21] ในกรณีที่ผลิตภัณฑ์นั้นๆ คาดว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อนี้ >10^4 CFU/g ก็อาจสามารถทดลองใช้ PATH STIK ตรวจสอบได้โดยไม่ต้องมีการอบเพาะเชื้อ เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้น

เนื่องจากเชื้อ *E.coli* O 157:H 7 ที่ปนเปื้อนในสภาวะที่เป็นเซลบาดเจ็บ (stress cells) และมีปริมาณปนเปื้อนจำนวนน้อยก็ทำให้เกิดพยาธิสภาพได้ [1,6] จึงเป็นจุดอันตรายวิกฤตที่จำเป็นที่จะต้องวิเคราะห์ เพื่อประเมินความเสี่ยง และ PATH-STIK test, *E.coli* O157:H7 immunochromatograghic technique (24H) สามารถใช้เป็น rapid screening method สำหรับตรวจหาเชื้อ *E.coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์อาหารและสายการผลิตตามระบบ HACCP ได้ อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ให้ผลบวกต้องทำการตรวจสอบยืนยันโดยใช้ Serological test และ Biochemical test ต่อไป

การตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 เพื่อศึกษาแนวโน้มสำหรับการเฝ้าระวังในอาหารชนิดต่างๆ แม้ว่าจะไม่พบมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้เลยก็ตาม เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคใน

ประเทศและส่งเสริมการส่งออก บุคลากรที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐซึ่งมีหน้าที่ในการดูแลกำกับกระบวนการผลิตและภาคเอกชนผู้ทำการผลิตควรให้ความสำคัญในการตรวจสอบตลอดจนการคัดกรองวัตถุดิบก่อนการผลิต โดยเฉพาะการนำเข้าวัตถุดิบจากต่างประเทศ ต้องมีการเข้มงวดเป็นพิเศษเพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากข้อมูลการศึกษา เพื่อการเฝ้าระวังของต่างประเทศทั้งยุโรป อเมริกา และประเทศที่มีอากาศเย็น เช่น ญี่ปุ่น พบมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้อยู่และเคยมีการระบาดตลอดจนมีผู้เสียชีวิตจากเชื้อนี้ด้วย

คำขอบคุณ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณ คุณจันทร์ฉาย แจ้งสว่าง ผู้อำนวยการกองอาหารส่งออก เจ้าหน้าที่ และนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ของฝ่ายวิเคราะห์วิจัยทางจุลชีววิทยา กองอาหารส่งออก ที่ให้การสนับสนุนทำให้งานวิจัยนี้สามารถดำเนินการสำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Infectious Agents Surveillance Report, 8 August, 1996. Outbreaks of Enterohaemorhagic Escherichia coli O157;H7 Infection, 1996. JAPAN. Vol, 17 No.
2. Johnson, R. P., R.J. Durham. S T. Johnson, L.A. Macdonald, S. R Jeffrey. and B.T. Butman, 1995 Detection of Escherichia coli O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay. EHEC-Tek . Appl. Environ. Mocrobiol. 61:386-388
3. Zhao, T., M. P. Doyle, J. Shere, and L. Garbre.1995. Prevalence of Enterohemoghagic Escherichia coli O157:H7 in a survey of diary herds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1290-1293
4. Okrend, A.J.G.,B,E. Rose, and C.P. Lattuada. 1990. Use of %-bromo-4-chlomo-3-indoxyl-(-D-Glucuronide in MacConkey Sorbitol Agar to aid in the isolation of Escherichia coli O157:H7 from ground beef. J. Food Protect 53: 941-943.
5. Niroomand, F., and Lord,C., 1994, J. Rapid Meth. Autom. Microbial. 3, 85-96
6. Bacteriological Analytical Manual (BAM) 1995 8th Ed, Isolation and identification of Enterohaemorrhagic (EHEC), AOAC International. p 4.01-4.18
7. An Improved Direct Plate Method for the Japanese Official Method, 1996, Food Sanitation Division, Environmental Health Bereau, Ministry of Health and Welfare.
8. Siegel, S. 1956 Nonparametric Statistic for the Behavioral Sciences, McGraw-Hill Book Co., New York, NY.Enumeration of Stressed Escherichia coli O157:H7 In Food. Food Associated Pathogen, Uppsala, Sweden
9. McClure, F. 1990 Statistic for the Behavioral Sciences J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73, 953-9609.
10. Doyle, M.p., and Schoeni, J.L., (1987) Appl. Environ, Microbiol. 53, 2394-2396.
11. Okrend, A., Rose,B.E., 1989 USDA-FSIS Laboratory Communication No. 38, Revision # 3, U.S. Dept. of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Washington, D.C.
12. Okrend, LA., Rose, B.E., Lattuada, C.P., 1990 Journal of Food Protection 53, 941-943.
13. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, Wells, J.G.,Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett,N.T., Blake,P.A., and Cohen,M.L., 1983

N.Engl.J.Med.308, 681-685

14. Tarr, P.I. 1994 Journal of Food Protection 57, 632-636. Philip T. Feldsine, Robin L. Forgey, Maria T. Falbo-Nelson and Sharon L. Brunelle. 1996. Assurance Escherichia coli O157:H7 (EHEC) Comparative Validation Study. Annual Meeting of International Standard of Organization (ISO). Microbiological Guideline on Food Stuffs. 10-13 June 1996.
15. Jan MC Carthy, Roy Holbrook and Peter Stephens. 6-8 May. 1996.
16. Okrend, A.J.G.,B,E. Rose, and C.P. Lattuada. 1992 Isolation of Escherichia coli O157:H7 using O157 specific antibody coated magnetic beads. J. Food Protection. 55: 214-217.
17. Philip T. Feldsine, Robin L. Forgey, Maria T. Falbo-Nelson and Sharon L. Brunelle. 1996. Assurance Escherichia coli O157:H7 (EHEC) Comparative Validation Study. Annual Meeting of International Standard of Organization (ISO). Microbiological Guideline on Food Stuffs. 10-13 June 1996.
18. Besser, R.E., Lett, S.M., Weber, J.T., Doyle, M.P., Barrett, T.J., Wells, J.G., and Griffin, P.M. 1993 J. Am. Med.Assoc. 269, 2217-2220
19. Griffin, P.M., and Tauxe, R.V.1991 Epidemiological Reviews 13,60-98.
20. Martin, M.L, ShipmanL.D., wells, J.G., Potter, M.E., Hedberg, K., Wachsmuth, I.K., Tauxe, R.V., Davis, J.P., Amolai,J., and Tillili. J., 1986 Lancet ii, 1043.
21. Lior, H., Borczyk, A.A., 1987 Lancet I,33