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] และ สุมาลี บุญมา[2]

Pensri Rodma[1], Pattama Daengchat[1], Nongluk Pisuttilap[1], and Sumalee Boonmar[2]

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของ technique (PATH-STIK) test kit โดยการเติมเชื้อ *E.coli* O157:H 7 ลงในตัวอย่างน้ำนมพลาสเจอร์ไรด์และกุ้งบดแช่แข็งพบว่าก่อนการอบเพาะเชื้อผลิตภัณฑ์นมที่มีปริมาณเชื้อปนเปื้อนตั้งแต่ 2.5×10^4 CFU/g ขึ้นไปของตัวอย่างทั้งสองชนิดสามารถตรวจพบได้โดยวิธี PATH-STIK แต่หลังการอบเพาะเชื้อที่ 42 C นาน 6h แล้ว ในตัวอย่างน้ำนมและกุ้งบดพบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2.5×10^1 และ 2.5×10^3 CFU/g ขึ้นไปให้ผลบวกตามลำดับ ขณะที่ 24h ให้ผลบวกทุกตัวอย่างทั้งสองผลิตภัณฑ์ สำหรับวิธีการเพาะเชื้อ Modified Bacteriological Analytical Manual (BAM) ที่ 42°C นาน 6 และ 24h ให้ผลบวกทุกตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี (BAM) พบว่าในตัวอย่างน้ำนมซึ่งมีปริมาณเชื้อประจำถิ่นน้อยให้ผล Sensitivity 87.50 %(6 h) และ 100 % (24 h) และในตัวอย่างกุ้งบดซึ่งมีปริมาณเชื้อประจำถิ่นสูงให้ผล Sensitivity 62.50 %(6 h) และ 100 % (24 h) การศึกษาปริมาณปนเปื้อนในอาหาร 50 ตัวอย่าง ไม่พบมีการปนเปื้อน คิดเป็น overall sensitivity 75.00 % (6h), 100% (24h) และ overall specificity 97.78 % (6h & 24h) ค่า overall Chi square ที่มีค่าสูงกว่า 3.84

เนื่องจากเชื้อ *E.coli* O 157:H 7 ซึ่งอยู่ในสภาวะที่เป็นเซลบาดเจ็บ (stress cells) และมีปริมาณปนเปื้อนจำนวนน้อยทำให้เกิดพยาธิสภาพได้ (Jan, M. 1996) จึงเป็นจุดอันตรายวิกฤตที่ต้องมีการประเมินความเสี่ยง และจำเป็นต้องวิเคราะห์หาเชื้อทั้งเซลปกติ และ บาดเจ็บในผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อประจำถิ่นในปริมาณน้อยและมาก ดังนั้น PATH-STIK test, *E.coli* O157:H7 immunochromatograghic technique สามารถใช้เป็น rapid screening method สำหรับตรวจหาเชื้อ *E.coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์อาหารและสายการผลิตตามระบบ HACCP ได้อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ให้ผลบวกต้องทำการตรวจสอบยืนยันโดยใช้ Serological test และ Biochemical test ต่อไป

1 ฝ่ายวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา กองวิเคราะห์อาหารส่งออก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Microbiological Analysis Section, Division of Food for Export Analysis, Department of Medical Sciences

2 ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University.

ABSTRACT

Pasteurized milk and frozen shrimp meat which generally inoculated with strains of *E.coli* O157 H 7 were analyzed by the new immunochromatograghic technique (PATH-STIK) for the rapid detection of EHEC (*E.coli* O157: H 7) and the Modified Bacteriological Analytical Manual (BAM) culture method. Without enrichment, both spiked milk samples of less than 2.5×10^4 CFU/g (initial loaded) were negative by PATH-STIK. After 6 h incubation at 42°C less than 2.5×10^1 and 2.5×10^3 CFU/g were negative in spiked milk and shrimp, respectively. And 24 h incubation all of the spike samples were positive by PATH-STIK. While all spiked pasteurized milk and shrimp samples were positive by BAM after 6h and 24 h incubation. During this study fifty naturally contaminated of foods representative of a wide variety of food products were analyzed by both methods. The PATH-STIK test in correlation with BAM for low background of potentially healthy competing bacteria (pasteurized milk) resulted in a sensitivity of 87.50 %(6 h) and 100 % (24 h). The correlation for high background (minced shrimp) resulted in a sensitivity of 62.50 %(6 h) and 100 % (24 h). The overall sensitivity in this study were 75.00% (6h) and 100% (24h). The overall specificity in this study were 97.78% (6h & 24h) and overall Chi square > 3.84.

This is critical in the assessment of risk where stressed *E. coli* O157 may be present which, due to their very low infective dose and because cells this state have been reported to be virulent (Jan, M. 1996) are still considered a hazard. It is essential to be able to identify the stressed cells and healthy cells in the low and high background of potentially healthy competing bacteria . PATH-STIK technique can be used as a rapid screening tool for the detection of *E. coil* 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.

คำนำ

ประเทศไทยสามารถส่งผลิตภัณฑ์อาหารเป็นสินค้าออกไปจำหน่ายในปีหนึ่งนับเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาท และเนื่องจากมีการแข่งขันทางการตลาดระหว่างประเทศผู้ส่งออก เป็นสาเหตุให้ประเทศผู้นำเข้ามีข้อต่อรองสูง ประกอบกับเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคในประเทศ จึงได้เพิ่มข้อกำหนดในการนำเข้าสำหรับอาหารส่งออกด้านคุณภาพในรูปแบบต่างๆ เงื่อนไขที่เป็นมาตรการซึ่งตั้งขึ้นเพื่อให้ประเทศผู้ส่งออกถือปฏิบัติคือการกำหนดให้นำระบบวิเคราะห์จุดอันตรายวิกฤต (HACCP = Hazard Analytical Critical Control Point) มาใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิต ประเทศไทยได้รับผลกระทบโดยตรงกับข้อกำหนดดังกล่าว อย่างไรก็ตามเป็นความจำเป็นที่ประเทศไทยต้องปรับเปลี่ยนระบบการควบคุมจากการวิเคราะห์เพื่อประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ก่อนการส่งออกอย่างเดียวเป็นการนำระบบวิเคราะห์จุดวิกฤต (HACCP) ในกระบวนการผลิตมาใช้ ควบคู่กับการวิเคราะห์เพื่อประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ก่อนการส่งออก โดยเป็นหน้าที่

ของกลุ่มผู้รับผิดชอบกระบวนการผลิตที่จะต้องดำเนินการนำระบบดังกล่าวมาใช้ หน่วยงานของรัฐเพิ่มบทบาทจากการตรวจสอบประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์มาเป็นการให้แนะนำทางวิชาการและการตรวจสอบ (External audit) เพื่อให้มีการควบคุมกระบวนการผลิตโดยใช้ระบบวิเคราะห์จุดวิกฤต (HACCP) อย่างมีประสิทธิภาพดี สม่ำเสมอ และได้รับประสิทธิผลสูงสุด นอกจากนั้นข้อกำหนดของ CODEX Committee of Food Hygiene (CCFH) ระบุว่าการนำระบบวิเคราะห์จุดอันตรายวิกฤต (HACCP = Hazard Analytical Critical Control Point) มาใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิตเป็นการดำเนินการที่จะสามารถขจัด (Eliminate) หรือลด (Decrease) ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อโรคอาหารเป็นพิษให้อยู่ในปริมาณที่ยอมรับได้

สำหรับคุณภาพทางจุลชีววิทยาไม่แนะนำให้ใช้การตรวจวิเคราะห์โดยการเพาะเชื้อ (culture technique) เนื่องจากใช้เวลาในการตรวจสอบนานหลายวัน จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในการประเมิน แต่หากมีวิธีตรวจวิเคราะห์ที่สามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วสามารถอ่านผลได้ทันที และ มีประสิทธิภาพที่เป็นที่ยอมรับก็สามารถนำมาใช้ในการใช้ควบคุมกระบวนการผลิต สำหรับประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาในระบบนี้ได้ โดยเฉพาะขั้นตอน control measure monitoring) และ/หรือขั้นตอน verification การเลือกใช้วิธีที่รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และเชื่อถือได้ ในการประเมินผลการควบคุมคุณภาพเป็นสิ่งที่ต้องดำเนินการ ทั้งนี้เพื่อให้สามารถตรวจสอบได้ว่าระบบที่ใช้ควบคุมนั้นๆมีประสิทธิภาพนำไปสู่การปรับเปลี่ยนกระบวนการผลิตให้ได้ผลสมบูรณ์ครบถ้วนที่สุด

Escherichia coli O157:H7 เป็นเชื้อที่กำลังมีการระบาดในประเทศญี่ปุ่นและขณะนี้ยังไม่สามารถหยุดการระบาดได้ ประเทศญี่ปุ่นจึงมีการควบคุมผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตในประเทศและอาหารนำเข้าอย่างเข้มงวด (Infectiuos Agents Surveillance Report, 8, August. 1996)โดยเพิ่มมาตรการตรวจสอบ ณ จุดนำเข้าและมีการกำหนดให้ประเทศผู้ส่งออกเข้มงวดในการตรวจสอบก่อนการส่งออกด้วย ซึ่งเป็นความจำเป็นเร่งด่วนที่ผู้ผลิตเองจะต้องตรวจสอบการปนเปื้อนในวัตถุดิบ ระหว่างกระบวนการผลิตตลอดจนผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นเพื่อให้มั่นใจได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว การเลือกใช้วิธีที่สามารถบอกผลได้เร็วที่สุด ถูกต้องแม่นยำ จะสามารถป้องกันการถูกกักกันสินค้าและปฏิเสธการนำเข้าได้ เนื่องจากเชื้อนี้ไม่เคยมีการระบาดในประเทศไทย การศึกษาในเชิงเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์จึงมีน้อยหรือไม่มีเลย ดังนั้นเพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกใช้ วิธีเพาะเชื้อซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อ้างอิงใช้เวลาในการวิเคราะห์นานอย่างน้อยที่สุด 4 วันสำหรับการตรวจวิเคราะห์ขั้นต้น (Presumptive Identification) ขณะที่โรงงานผู้ผลิตมีความต้องการวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็วในการประเมินผล วิธีที่ถูกเลือกใช้คือ Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) (Johnson, R.P. 1995, Zhao, T.M.P. 1995) มีข้อที่ต้องปรับเปลี่ยนหลายขั้นตอน เช่น ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 2.5 ชั่วโมงทั้งนี้เนื่องจากมีขั้นตอนการอบเพาะเชื้อและการล้างหลายครั้ง ประกอบกับในการวิเคราะห์ในครั้งหนึ่งต้องวิเคราะห์พร้อมกันหลายตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากการออกแบบของ microtitre plate ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นต้น

คณะวิจัยจึงได้ดำเนินการศึกษาวิธี ซึ่งเป็น Rapid techniques (Johnson, J.L. 1995, Okrend, J.A. 1990, Niroomand, F. 1994.) 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 หลังจากการอบเพาะเชื้อในขั้นตอนแรกและไม่ต้องมีการล้างหรือการอบเพาะเชื้อในขั้นตอนการอ่านผล นำไปเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ Modified Bacteriological Analytical Manual (BAM) (BAM 1996, Japanese Official Method 1996) เพื่อนำไปเสนอแนะทางวิชาการแก่ผู้ผลิต และใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับบุคลากรผู้ควบคุม

กระบวนการผลิตในการเลือกวิธีวิเคราะห์เพื่อควบคุมการประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยา และนำไปประกอบในการจัดทำ Microbiological Generic Model เพื่อขจัดหรือลดปริมาณปนเปื้อนของเชื้อนี้ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้สำหรับระบบ HACCP ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การออกแบบการทดลอง

น้ำนมและกุ้งบดแช่แข็งซึ่งตรวจวิเคราะห์ก่อนว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 จำนวน 8 ตัวอย่าง แล้ว spike เชื้อลงในตัวอย่างที่เตรียมให้ได้ cell suspension ที่มีความเข้มข้น 2.5×10^7, 2.5×10^6, 2.5×10^5, 2.5×10^4, 2.5×10^3, 2.5×10^2, 2.5×10^1, 2.5×10^0 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

นำ *Escherichia coli* O157:H7 (The Tokyo Metropolitan Research Labolatory 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 5×10^8, เตรียม cell suspension โดยใช้ serial ten fold dilution ($1:10^1$, $1:10^2$, $1:10^2$, ... 1:107) ได้ cell suspension ที่มีความเข้มข้น 5×10^8, 5×10^7, 5×10^6, 5×10^5, ... 5×10^2, 5×10^1

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.

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

(ดำเนินการเช่นเดียวกันโดยใช้กุ้งบดแช่แข็ง)

3. วัสดุอุปกรณ์

1. Incubator (35 Cและ 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)
4. Fluorocult Sorbitol Mac-Conkey Agar (Merck)
6. Triple Sugar Iron (TSI)
7. Lysine Indole Motile Medium (LIM)
8. Methyl Red Medium (MR)
9. Voges-Proskauer Medium (VP)
10. Cellubiose

11. 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)
5. *Escherichia coli* O 157 H7 (The Tokyo Metropolitan Research Labolatory of Public Health, Japan)

6. การดำเนินการตรวจวิเคราะห์

การศึกษาวิธี Immunochromatographic Techniques เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ (Modified BAM culture technique) ดำเนินการตามวิธีที่ระบุใน เอกสารแนบ 1 , 2 และ 3 ตามลำดับ โดยแยกออกเป็น 2 การทดลองคือ

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

2. ศึกษาเปรียบเทียบในตัวอย่างอาหารแช่แข็ง นม หมู กุ้ง ปลา ปลาหมึก ชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวมเป็น 50 ตัวอย่าง โดยดำเนินการตรวจสอบตามวิธีที่ระบุในเอกสารแนบ 1

7. STATISTICAL ANALYSIS

1. ใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบแต่ละวิธีที่ใช้ตรวจสอบเชื้อ (a pair-wise statistical analysis) ซึ่งเป็นวิธีของ McNemar (Siegel,S.1956) 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

2. การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่า ความไวของการทดสอบ (SENSITIVITY) และ ความไวของการทดสอบ (SPECIFICITY) ตามวิธีของ McClure (1990) เมื่อ

SENSITIVITY หมายถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้องคือร้อยละของตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่และให้ผลบวก

SPECIFICITY หมายถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้อง คือร้อยละของตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่และให้ผลบวก

FALSE NEGATIVE RATE คือค่า **100 - SENSITIVITY RATE**

FALSE POSITIVE RATE คือค่า **100 - SPECIFICITY RATE**

ในการศึกษาครั้งนี้ค่า SENSITIVITY และ SPECIFICITY ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเพาะเชื้อคิดเป็น 100 % เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ระบุให้วิธีเพาะเชื้อเป็นวิธีที่ถูกต้อง (goal target) และค่า FALSE POSITIVE และ FALSE NEGATIVE สำหรับวิธีเพาะเชื้อจะเท่ากับ 0 ในการแปรผล

ผล

TABLE 1 แสดงผลการทดสอบความไวในการวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* O157:H7 โดยใช้วิธี Immunochromatographic Techniques (IMC-T) ใน spiked milk samples

TABLE 2 แสดงผลการทดสอบความไวในการวิเคราะห์เชื้อ

E. coli O157:H7 โดยใช้วิธีเพาะเชื้อ (culture technique=CUL-T) ใน spiked milk samples

TABLE 3 แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ Immunochromatographic Techniques(IMC-T) และวิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T) ในนม (Spike samples) หลังจากการอบเพาะเชื้อนาน 6h

TABLE 4 แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ Immunochromatographic Techniques(IMC-T) และวิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T) ในนม (Spike samples) หลังจากการอบเพาะเชื้อนาน 24h

TABLE 5 แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ Immunochromatographic Techniques (IMC-T) และวิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T) ในกุ้งบด (Spike samples) หลังจากการอบเพาะเชื้อนาน 6h

TABLE 6 แสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ Immunochromatographic Techniques(IMC-T) และวิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T) ในกุ้งบด (Spike samples) หลังจากการอบเพาะเชื้อนาน 24h

TABLE 7 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Escherichia coli* O157:H7 ในตัวอย่างอาหาร โดยวิธี Immunochromatographic Techniques(IMC-T) และวิธีเพาะเชื้อ (culture technique = CUL-T)

คิดเป็น overall sensitivity 75.00 % (6h), 100% (24h) และ overall specificity 97.78 % (6h & 24h) ค่า overall Chi square ที่มีค่าสูงกว่า 3.84 overall Chi square ในการแปรผล ค่า Chi square ที่มีค่าสูงกว่า 3.84 แสดงถึง significant difference ที่มีระดับ 5% probability

Table 1 The detection of *E. coli* O157:H7 by Immunochromatographic Techniques (IMC-T) (spiked milk)

TEST	incubation period (Hour)	LEVEL (CFU/g) (* S = SECONDS)								
		2.5×10^7	2.5×10^6	2.5×10^5	2.5×10^4	2.5×10^3	2.5×10^2	2.5×10^1	2.5×10^0	0
IMC-T	0	+25 s*	+25 s	+25 s	+45 s	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve
	6-8	+20 s	+25 s	+25 s	+25 s	+35 s	+ 45 s	+ 60 s	- ve	- ve
	20-24	+10 s	+11 s	+12 s	+12 s	+14 s	+14 s	+14	+15	- ve

Table 2 The detection of *E. coli* O157:H7 by culture technique (CUL-T) (spiked milk)

TEST	incubation period (Hour)	LEVEL (CFU/g)								
		2.5×10^7	2.5×10^6	2.5×10^5	2.5×10^4	2.5×10^3	2.5×10^2	2.5×10^1	2.5×10^0	0
CUL-T	0	++++	+++	++	++	+	+	+/-	+/-	- ve
	6-8	++++	++++	+++	+++	++	++	+	+	- ve
	20-24	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	- ve

Denotes ++++ = >80 CFU, +++ = >50 CFU, ++ = >20 CFU, + = > 5 CFU, +/- = 1 - 4 CFU, - = 0 CFU

Table 3 The correlative study of Immunochromatographic Techniques (IMC-T) and culture technique (CUL-T) in spiked milk samples) after 6h incubation

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

Sensitivity 87.50%

Table 4 The correlative study of Immunochromatographic Techniques(IMC-T) and culture technique (CUL-T) in spike milk samples after 24h incubation

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

Sensitivity 100%

Table 5 The correlative study of Immunochromatographic Techniques(IMC-T) and culture technique (CUL-T) in spiked shrimp samples after 6h incubation

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

Sensitivity 62.50 %

Table 6 The correlative study of Immunochromatographic Techniques(IMC-T) and culture technique (CUL-T) in spiked shrimp samples after 24h incubation

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

Sensitivity 100%

Table 7 The contamination of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples by Immunochromatographic Techniques (IMC-T) and by culture technique (CUL-T)

SAMPLE TYPE	TOTAL	IMC-T (6 h&24 h)	CUL-T (6 h&24 h)	% 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	-

Specificity 96.00% (6h & 24h)

OVERALL Sensitivity 75.00% (6h) 100% (24h) (TABLE ,3,4,5,6)

OVERALL Specificity 97.78% (6h & 24h) (TABLE 3,4,5,6,7)

OVERALL CHI SQUARE ที่มีค่าสูงกว่า 3.84

สรุป

1. *Escherichia coli* O157:H7 แตกต่างจาก *Escherichia coli* group คือ ไม่สร้าง enzyme glucuronidase และไม่ ferment น้ำตาล Sorbitol ดังนั้น ลักษณะ typical colonies บน Fluorocult Sorbitol Mac-Conkey Agar (Merck) มีสีเขียว กลม นูนกลางโคโลนี ขอบเรียบ และไม่เรืองแสงภายใต้ UV light ที่ long wavelength 355 nm ส่วนโคโลนีบน Sorbitol MacConkey Agar (Oxoid) มีสีใส กลม นูนกลางโคโลนี ขอบเรียบ (Dolye, 1967, Okrend, A, Rose, B. 1989, 1Okrend, L.A. 1990, BAM, 1995, Johnson, JL.1995)

2. ผลการทดลองพบว่าการอบเพาะเชื้อนาน 6h ให้ผลดีที่สุดสำหรับวิธี Modified BAM Technique ทั้งนี้ เนื่องจากเชื้อ *Escherichia coli* สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว และเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้ออื่นๆที่ให้ typical colonies บน Selective Agar เช่นเดียวกับ *Escherichia coli* O157:H7 เจริญเบียดบังได้ การเพาะเชื้อโดยวิธี Modified BAM Technique ให้ผล positive เมื่อปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 มีน้อยกว่า 2.5×10^{0} CFU/g การตรวจวิเคราะห์โดยวิธีเพาะเชื้อหลังจากการอบเพาะเชื้อแล้ว มีความจำเป็นต้องทำ dilution $1;10^{1}$ ..... $1:10^{7}$ แล้ว streak บน selective agar เนื่องจากกรณีที่เชื้อประจำถิ่นอื่นๆปนเปื้อนอยู่เป็นจำนวนมาก เชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 อาจถูกเจริญเบียดบังได้ และสามารถพบได้ใน dilution สูงขึ้น ซึ่งอาจใช้เทคนิคนี้กับวิธี PATH-STIK และถ้าตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์มีเชื้อประจำถิ่นอื่นๆปนเปื้อนอยู่น้อยก็ไม่มีความจำเป็นต้องทำ dilution (BAM, 1995, Riley, 1983, Tarr, P.I. 1994) อย่างไรก็ตามในกรณีที่มีเชื้อ *Escherichia coli* O157 H7 ปนเปื้อนอยู่น้อยและมีเชื้อประจำถิ่นอื่นๆอยู่เป็นจำนวนมาก การทำ dilution ก็ไม่สามารถแก้ปัญหาได้ จากข้อมูลที่ได้มีผู้ศึกษา (Jan, M.1996) โดยใช้การ capture ด้วย Dyna beads ซึ่ง coat ด้วย specific antibodies หลังจากการอบเพาะเชื้อแล้ว จึงนำไป spread หรือ streak บน selective agar จะทำให้เพิ่มโอกาสในการตรวจพบได้มากขึ้น (Okrend, A.J.G. 1992)

3. ข้อควรระวังสำหรับการถ่ายเชื้อลงบน selective agar ไม่ควรใช้วิธี pour plate (overlay) สรุปจากการ

ทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า 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 (Philip, T. 1996, Besser, R.E. 1993.)

4. 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

5. การตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 เพื่อศึกษาแนวโน้มสำหรับการเฝ้าระวังในอาหารชนิดต่างๆ แม้ว่าจะไม่พบมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้เลยก็ตาม เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคในประเทศและส่งเสริมการส่งออก บุคลากรที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐซึ่งมีหน้าที่ในการดูแลกำกับกระบวนการผลิต และ ภาคเอกชนผู้ทำการผลิตควรให้ความสำคัญในการตรวจสอบ ตลอดจนการคัดกรองวัตถุดิบก่อนการผลิต โดยเฉพาะการนำเข้าวัตถุดิบจากต่างประเทศ ต้องมีการเข้มงวดเป็นพิเศษเพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากข้อมูลการศึกษา เพื่อการเฝ้าระวังของต่างประเทศทั้งยุโรป อเมริกา และประเทศที่มีอากาศเย็น เช่น ญี่ปุ่น พบมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้อยู่และเคยมีการระบาดตลอดจนมีผู้เสียชีวิตจากเชื้อนี้ด้วย

6. ข้อควรสังเกตการตรวจยืนยันเชื้อ โดยวิธีเพาะเชื้อมีปัญหา จากการที่มีปริมาณ competitive flora สูง อาจทำให้ไม่มี typical colonies บน selective agar หลังจากการอบเพาะเชื้อ ขณะที่วิธี PATH-STIK ให้ผลบวก เนื่องจาก study design ทำให้การแปรผลวิเคราะห์โดยมีวิธี Modified BAM เป็น goal target ดังนั้นวิธีเพาะเชื้อจะไม่มี false negative หรือ false positive เลย

7. จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบพบว่า PATH-STIK 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 กับเชื้ออื่นๆได้เช่น *Salmonella* group N species, *Yersenia enterocolitica, Brucella* spp., *Hafnia* spp. และ *Citrobacter* spp. เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อป้องการรายงานผลที่เป็น false positive (Griffin, P.M. 1991, Martin, M.L. 1986, Lior, H. 1987.)

8. ในกรณีที่ผลิตภัณฑ์นั้นๆคาดว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อนี้ $\geq 10^4$ CFU/g ขึ้นไป สามารถใช้ PATH-STIK ตรวจสอบได้โดยไม่ต้องมีการอบเพาะเชื้อ เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้น

คำขอบคุณ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณ คุณ จันทร์ฉาย แจ้งสว่าง เจ้าหน้าที่ และ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ของฝ่ายวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา กองวิเคราะห์อาหารส่งออก ที่ให้การสนับสนุนทำให้งานวิจัยนี้สามารถดำเนินการสำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารแนบ 1

ชั่งตัวอย่างอาหาร 20 กรัม

↓

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

จำนวน 180 มล.

↓

Direct on selective agar

10^1 ..... 10^5 , 10^7 .

(Sorbitol MacConkey Agar &

Fluorocult Sorbitol Mac-Conkey Agar)

(เฉพาะ spiked milk samples)

LUMAC TEST

(เฉพาะ spiked milk samples)

↓

อบเพาะเชื้อนาน 6-8h ที่ 42°C

↓

ถ่ายเชื้อลงใน Sorbitol MacConkey Agar และ Fluorocult Sorbitol Mac-Conkey Agar

(10^1 ..... 10^5 , 10^7)

LUMAC TEST

↓

อบเพาะเชื้อที่ 42°C นาน 24h

↓

ตรวจสอบโคโลนีที่สงสัยโดยบน S-MAC โคโลนีจะไม่มีสีเนื่องจากไม่สามารถใช้น้ำตาล Sorbitol ได้ และโคโลนีบน F-MAC มีสีเขียวเนื่องจากไม่สามารถใช้น้ำตาล Sorbitol และไม่เรืองแสงเนื่องจากไม่สามารถสร้าง Glucuronidase ได้

↓

นำโคโลนีที่สงสัยไปทดสอบคุณสมบัติทาง Biochemical test (TSI, LIM, Citrate, MR-VPและ Cellobiose,

TSI				LIM			Citrate	MR	VP	Cellobiose
Butt	Slant	Gas	H2S	Lysine	Indole	Motile				
acid	acid	+	-	+	+	+	-	+	-	-

↓

นำโคโลนีที่สงสัยไปทดสอบ Serological test กับ antiserum O157, H7 และ Latex *E.coli* O157:H7 (EHEC)

NOTE : ก่อนอบเพาะเชื้อวิธี BAM Method ทำ dilution 1:10^1, 1:10^2,1:10^2, ... 1:107 สำหรับตัวอย่างที่มีเชื้อประจำถิ่นปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูง เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบให้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Besser, R.E., S.M. Lett, J.T. Weber, M.P. Doyle, T.J. Barrett, J.G. Wells, and P.M. Griffin. 1993 *J. Am. Med.Assoc.* 269: 2217-2220

Bacteriological Analytical Manual (BAM) 1995. 8th Ed, AOAC International.

Doyle, M.p., and J.L. Schoeni. 1987. *Appl. Environ, Microbiol.* 53: 2394-2396.

Riley, L.W., R.S. Remis, S.D. Helgerson, McGee, J.G. wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake, and M.L. Cohen. 1983. *N.Engl.J.Med.*308: 681-685

Griffin, P.M., and R.V. Tauxe.1991. *Epidemiologic Reviews* 13:60-98.

Infectious Agents Surveillance Report, 8 August, 1996. Outbreaks of Enterohaemorhagic *Escherichia coli* O157;H7 Infection , 1996 . JAPAN. Vol, 17 No.

Jan McCarthy, Roy Holbrook and Peter Stephens. 6-8 May. 1996. An Improved Direct Plate Method for the *Japanese Official Method*, 1996, Food Sanitation Division, Environmental Health Bereau, Ministry of Health and Welfare.

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-linkd immunosorbent assay. EHEC-Tek . Appl. Environ. Mocrobiol. 61:386-388

Johnson. J.L, B.E. Rose, A.K. Sharar, G.M. Ransom,C.P. Lattuada, and A, M. McNamara, 1995. Methods used for detection annd recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a food-borne disease outbreak, J. Food Prot.58:597-603

Lior, H., and A.A. Borczyk. 1987. *Lancet* I, 333

Martin, M.L., L.D. Shipman, J.G. Wells, M.E. Potter, K. Hedberg, I.K. Wachsmuth, R.V. Tauxe, J.P. Davis, J. Amolai, and J. Tillili. 1986. *Lancet* ii, 1043.

Martin, D., P.M. Uhler, A.J.G. Okrend, and J.Y.Chin. 1994. *J. Food Prot,* 57:70-72

McClure, F. 1990 *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73: 953-960

Niroomand, F., and C. Lord. 1994, *J. Rapid Meth. Autom. Microbial.* 3: 85-96.

Okrend, A.J.G.,B,E. Rose, and B , Bennett. 1990. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. J. Food Protect. 53: 249-252

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.

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.

Okrend, A.J.G., E, Rose, and R, Matner. 1990. An improved screening method for the detection annd isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from meat, incorporating the 3M Petrifilm7m test kit-HEC for hemorrhagic *Escherichia coli* O157 H7, J. Food Protect. 53:936-940

Okrend, A., E. Rose, and C.P. Lattuada. 1990. *Journal of Food Protection* 53: 941-943.

Okrend, A., B. Rose, P. Levine, C. Lattuada, M. Pratt, J. Green, and D. Martin. 1993, *Escherichia coli O157 H7 and Other Verotoxigenic E.coli in*

Foods, Polyscience Publication, Inc., Canada, 19-29.

Okrend, A., and B.E. Rose. 1989. USDA-FSIS Laboratory Communication No. 38, Revision # 3, U.S. Dept. of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Washington, D.C.

Padhye, N.V. and M.P. Doyle. 1992. *J. Food Prot.* 55: 555-565.

Tarr, P.I. 1994. *Journal of Food Protection* 57, 632-636.

Samadpour,M., J.E. Ongerth, J. Liston, H. Tran, D. Nguyen, T.S. Whittam, R.A. Wilson, and P.I. Tarr, 1994. *Applied and Environmental Micribiology,* 60: 1038-1040.

Samadpour,M., J. Liston, J.E. Ongerth, and P.I. Tarr. 1990. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1212-1215.

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.

Philip T. Feldsine, R.L.Forgey, M.T. Falbo-Nelson, and S. L. Brunelle. 1996. Assurance *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC) Comparative Validation Study . Annaul Meeting of International Stadard of Organization (ISO).Microbiological Guideline on Food Stuffs. 10-13 June 1996.

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