

## การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Escherichia coli* อย่างรวดเร็ว Development of *Escherichia coli* Rapid Detection

ชลธิชา จินาพร<sup>1</sup> จารุวัลย์ รักษ์มณี<sup>1</sup> ศุภชัย มั่งคินดำ<sup>1</sup>

E-mail: chontichar.jin@lru.ac.th, charuwan.rak@lru.ac.th and supachaimangdindam8387@gmail.com

### บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่การวัด  $\beta$ -glucuronidase (GUD) activity ของเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* อย่างรวดเร็ว โดย GUD activity เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase (GUD) ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *E. coli* ซึ่งจะสามารถย่อยสารประกอบฟลูออเรสเซนต์ 4-methylumbiferyl-  $\beta$ -D-glucuronide (MUG) ได้เป็น fluorescent 4-methylumbelliferone โดยจะเกิดการเรืองแสงภายใต้คลื่นแสง Ultraviolet (UV) ที่ช่วงความยาวคลื่น 306-360 nm การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงได้มีการนำสารละลาย MUG มาเจือจางที่ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL และ 150 mg/mL มาเติมลงในอาหารเหลว NB และบ่มร่วมกับ *E. coli* 3 isolates, *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ที่อุณหภูมิ 37°C, 16 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าสารละลาย MUG ทุกความเข้มข้นในอาหารเหลว NB ที่บ่มร่วมกับ *E. coli* 3 isolates ให้ผล GUD activity เป็นบวกและสามารถสังเกตปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจน ส่วนการบ่มร่วมกับเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ให้ผล GUD activity เป็นลบ อย่างไรก็ตาม แม้ความเข้มข้นของสารละลาย MUG ต่ำที่สุดที่สามารถสังเกต GUD activity ได้อย่างชัดเจนคือที่ความเข้มข้น 25 mg/mL แต่การปิเปตสารในปริมาณน้อยจำเป็นต้องฝึกฝนและใช้ความชำนาญ ซึ่งอาจเกิดความผิดพลาดจนเกิดผลลบปลอม (false negative) ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงแนะนำให้ใช้สารละลาย MUG ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL เพื่อความแม่นยำและลดการเกิดผลลบปลอมในการทดสอบ การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* โดยใช้ สารละลาย MUG ในปริมาณน้อย และสามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมากในการทำงาน 1 ครั้ง จึงเป็นวิธีการตรวจที่มีค่าใช้จ่ายถูกลงและตรวจตัวอย่างได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว

**คำสำคัญ:** *Escherichia coli*,  $\beta$ -glucuronidase (GUD), 4-methylumbiferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG), การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบบรวดเร็ว

### Abstract

The GUD activity was used in this study for rapid assays for *Escherichia coli* detection, by observing the activity between  $\beta$ -glucuronidase (GUD) produce from *E. coli* and the substrates 4-methylumbiferyl-  $\beta$ -D-glucuronide (MUG), that hydrolyzed and yield to fluorogenic product. In this study aim to develop the way to use minimal concentration of MUG with nutrient broth (NB) to presumptive test for *E. coli* by performed in 96 wells microplate. The MUG was prepared in solution form and diluted into 4 concentrations; 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL and 150 mg/mL, after added into NB broth and incubated with 3 isolates of *E. coli*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in 96 wells at 37°C, 16 h. All of concentrations of NB-MUG *E. coli* with give positive of GUD activity, resulting in a fluorescent end-product. While *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* give Negative of GUD activity. Although, the minimal concentration of MUG that give positive of GUD activity is 25 mg/mL, but the MUG concentration at 50 mg/mL is suitable for perform to accurate dilution and pipette. The way to use minimal concentration of MUG with nutrient broth (NB) in this study, can use for detect *E. coli* in many samples in one time with low price for each sample.

**Keywords:** *Escherichia coli*,  $\beta$ -glucuronidase (GUD), 4-methylumbiferyl-  $\beta$ -D-glucuronide (MUG), Rapid Detection

## ความเป็นมาของปัญหา

เชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ดำรงชีวิตในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ (Facultative anaerobe) จึงสามารถอาศัยในบริเวณลำไส้ของคนและสัตว์เลื้อยคลานได้ โดยเชื้อ *E. coli* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ Fecal coliform bacteria จึงถูกนำมาใช้เป็น ดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารและน้ำดื่ม [5, 15] แม้จะพบว่า *E. coli* ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ในกลุ่มสายพันธุ์ของ *E. coli* ที่ก่อโรคนั้นถือเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขเป็นอย่างมาก โดยนอกจากเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารและน้ำดื่มแล้ว ยังเป็นสาเหตุสำคัญของโรคท้องร่วงหรืออาหารเป็นพิษอีกด้วย ซึ่งความรุนแรงของโรคจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสารพิษที่เชื้อ *E. coli* สร้างขึ้นรวมถึงความแข็งแรงของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ [3]

ในปี 2558 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้จัดทำคู่มือมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในกลุ่ม Coliform, Fecal coliform bacteria และ *E. coli* ในอาหารและน้ำดื่ม โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Most probable number (MPN) [1] ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่มีการใช้งานอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามวิธี MPN จำเป็นต้องใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ไม่น้อยกว่า 2 วัน จึงมีความพยายามในการพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อช่วยลดขั้นตอนหรือแทนที่วิธีการดังกล่าว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์ เช่นการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ยีนส์ต่างๆ หรือการตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunological assays) ซึ่งเป็นการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่าง เชื้อและ antiserum ต่อเชื้อนั้นๆ แม้วิธีการดังกล่าวสามารถช่วยระบุเชื้อ *E. coli* ได้อย่างแม่นยำในเวลาอันรวดเร็ว แต่เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงและจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์โดยผู้ที่มีความรู้ความเชี่ยวชาญ จึงยังถูกจำกัดอยู่ในห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมทางด้านเครื่องมือและแหล่งทุนเท่านั้น [8, 11]

การใช้เอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นมาช่วยในการวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยากับซับสเตรต (substrate) โดยตรง แล้ววัดผลโดยดูการเกิดผลผลิต (product) จากปฏิกิริยานั้น เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความแม่นยำและรวดเร็วในการนำมาตรวจวิเคราะห์เชื้อ โดยพบว่า 97% ของเชื้อ *E. coli* จะผลิตเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase (GUD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ไม่สามารถสร้างได้ [9] โดยพบว่า เอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase จะมีความสามารถในการย่อยสารประกอบฟลูออเรสเซนต์ 4-methylumbiferyl-  $\beta$ -D-glucuronide (MUG) ได้เป็น fluorescent 4-methylumbelliferone [5, 7, 14, 10, 12] ซึ่งสารดังกล่าวจัดเป็น fluorogenic โดยจะตรวจสอบได้ภายใต้คลื่นแสง Ultraviolet (UV) ในช่วงความยาวคลื่น 306-360 nm เรียกว่าวิธีการดังกล่าวว่า GUD activities ในปัจจุบันมีการนำวิธีการนี้มาใช้ในหลากหลายรูปแบบเช่นการเทปับผิวหน้าอาหารที่มีการเลี้ยง *E. coli* ไว้ก่อนหน้า หรือการผสมลงในอาหารเหลวโดยตรงเพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ควบคู่ไปกับการสังเกตผลการทดลอง อย่างไรก็ตามสารประกอบฟลูออเรสเซนต์ 4-methylumbiferyl-  $\beta$ -D-glucuronide (MUG) เป็นสารที่มีราคาสูงและควรใช้ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากอาจจะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายของผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการใช้งาน MUG ในรูปแบบที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบตัวอย่างที่อาจปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ต่อครั้งได้ในปริมาณมากขึ้น ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการทำงาน ประหยัดสารเคมี ลดการสัมผัสสารเคมีของผู้ปฏิบัติงานได้ ดังนั้นวิธีการตรวจเชื้อ *E. coli* ที่พัฒนาขึ้นจากการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นวิธีการตรวจที่มีค่าใช้จ่ายถูกลงและตรวจตัวอย่างได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว เมื่อเทียบกับวิธีการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR และ Immunological assays

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Escherichia coli* อย่างรวดเร็ว ในปริมาณมาก โดยใช้สารละลาย 4-methylumbiferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) ในการตรวจสอบ

## วิธีการทดลอง

### 1. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

นำเชื้อ *E. coli* จำนวน 3 isolates ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เชื้อ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* (Negative control) มาเพิ่มจำนวนบนอาหาร MacConkey agar (Himedia™, India) ด้วยวิธีการ cross streak เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวและตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้ออีกครั้ง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละ isolates มาทำ simple streak บนอาหาร nutrient agar (NA) เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบในขั้นถัดไป

## 2. การเตรียมสารทดสอบ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) (Himedia™, India) ให้ปลอดเชื้อและเก็บรักษา NB ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ จากนั้นนำ 4-methylumbelliferyl-,  $\beta$ -D-glucuronide (MUG) (SIGMA, USA) มาเตรียมให้อยู่ในรูปสารละลาย โดยเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g/mL}$  [13] เก็บรักษาสารละลาย MUG ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอการทดสอบในขั้นถัดไป

## 3. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ในอาหาร NB-MUG

### 3.1 เตรียมเชื้อทดสอบ

นำเชื้อที่เก็บได้จากข้อ 1. มา re-streak อีกครั้งบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละ isolates มาเลี้ยงในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 1 ที่ค่าความยาวคลื่น 600 nm (ได้เซลล์แบคทีเรียประมาณ  $10^9$  cfu/mL [8, 11])

### 3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ MUG ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli*

แบ่งการทดสอบออกเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เติมน้ำอาหาร NB ปริมาตร 136.25  $\mu\text{L}$  ลงในแต่ละช่องของไมโครเพลท 96 หลุม (96 wells microplate) จากนั้นเติมน้ำสารละลาย MUG 3.75  $\mu\text{L}$  เพื่อให้ได้สารละลาย MUG ที่มีความเข้มข้น 25 mg/mL (แถว C) กลุ่มที่ 2 เติมน้ำอาหาร NB ปริมาตร 142.5  $\mu\text{L}$  ลงในแต่ละช่องของไมโครเพลท 96 หลุม (96 wells microplate) จากนั้นเติมน้ำสารละลาย MUG 7.5  $\mu\text{L}$  เพื่อให้ได้สารละลาย MUG ที่มีความเข้มข้น 50 mg/mL (แถว D) กลุ่มที่ 3 เติมน้ำอาหาร NB ปริมาตร 135  $\mu\text{L}$  ลงในแต่ละช่องของไมโครเพลท 96 หลุม จากนั้นเติมน้ำสารละลาย MUG 15  $\mu\text{L}$  เพื่อให้ได้สารละลาย MUG ที่มีความเข้มข้น 100 mg/mL (แถว E) และกลุ่มที่ 4 เติมน้ำอาหาร NB ปริมาตร 127.5  $\mu\text{L}$  ลงในแต่ละช่องของไมโครเพลท 96 หลุม จากนั้นเติมน้ำสารละลาย MUG 22.5  $\mu\text{L}$  เพื่อให้ได้สารละลาย MUG ที่มีความเข้มข้น 150 mg/mL (แถว F) (ดังตารางที่ 1) จากนั้นทำการเติมเชื้อทดสอบ isolates ละ 10  $\mu\text{L}$  โดย

เติมเชื้อ *E. coli* isolates ที่ 1 ลงใน คอลัมน์ที่ 2 และ 3

เติมเชื้อ *E. coli* isolates ที่ 2 ลงใน คอลัมน์ที่ 4 และ 5

เติมเชื้อ *E. coli* isolates ที่ 3 ลงใน คอลัมน์ที่ 8, 9 และ 10

เติมเชื้อ *Salmonella* spp. ลงใน คอลัมน์ที่ 6 และ 7

เติมเชื้อ *Staphylococcus aureus* ลงใน คอลัมน์ที่ 11 และ 12 (ดังตารางที่ 1)

แต่ละหลุมจะมีปริมาตรของสารละลายรวม 150  $\mu\text{L}$  จากนั้นนำ ไมโครเพลท 96 หลุม ไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำมาตรวจวัดการเรืองแสงของปฏิกิริยา ภายใต้แสง Ultraviolet (UV) ด้วยเครื่อง Gel Documentary ที่ความยาวคลื่น 306 nm

ตารางที่ 1 การเติมเชื้อทดสอบและสารละลาย MUG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในไมโครเพลท 96 หลุม

Roll	Concentration of MUG	Column										
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	25 mg/mL	<i>E. coli</i> isolates ที่ 1	<i>E. coli</i> isolates ที่ 2	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>S. aureus</i>
D	50 mg/mL	<i>E. coli</i> isolates ที่ 1	<i>E. coli</i> isolates ที่ 2	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>S. aureus</i>
E	100 mg/mL	<i>E. coli</i> isolates ที่ 1	<i>E. coli</i> isolates ที่ 2	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>S. aureus</i>
F	150 mg/mL	<i>E. coli</i> isolates ที่ 1	<i>E. coli</i> isolates ที่ 2	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> isolates ที่ 3	<i>S. aureus</i>

## ผลการศึกษา

หลังจากนำ *E. coli* จำนวน 3 isolates, *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่อยู่ในวงศ์เดียวกันกับ *E. coli* และมีลักษณะทางพันธุกรรมรวมถึงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่ใกล้เคียงกัน และ *Staphylococcus aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่มีการเติมน้ำสารละลาย MUG ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL และ 150 mg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจวัดการเรืองแสงของปฏิกิริยา ภายใต้แสง Ultraviolet (UV) ด้วยเครื่อง Gel Documentary ที่ความยาวคลื่น 306 nm พบว่าเชื้อ *E. coli* ทั้ง 3 isolates สามารถเจริญได้ใน

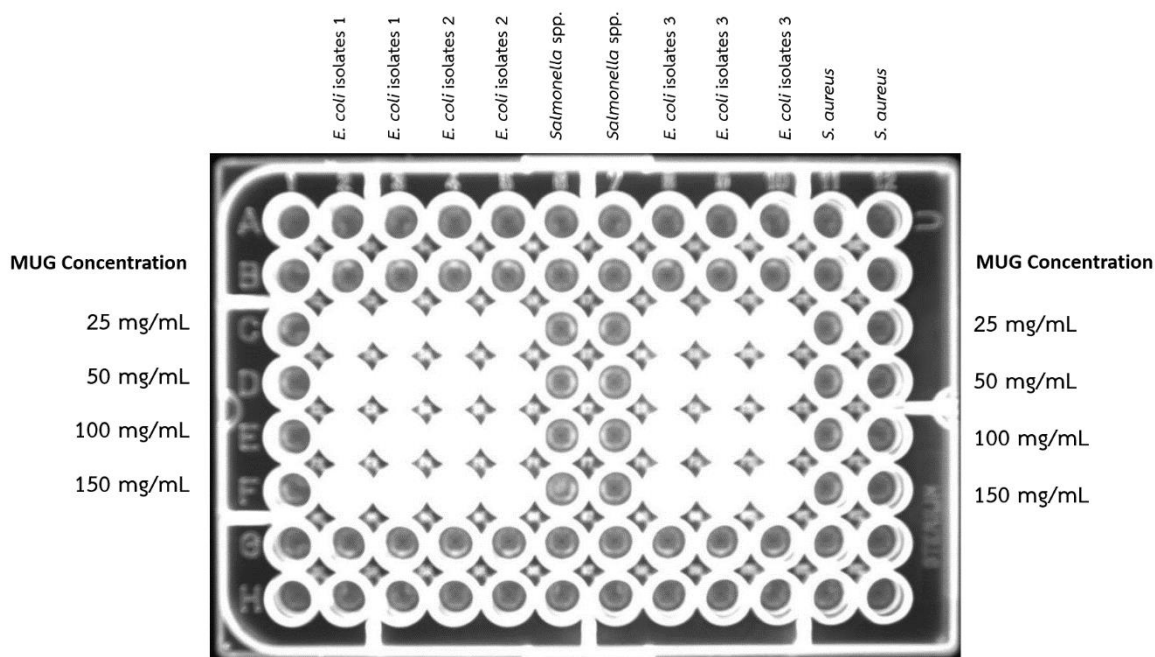
อาหารเหลว NB ที่มีการเติมสารละลาย MUG ได้ทุกช่วงความเข้มข้น (ภาพที่ 1) โดยที่ความเข้มข้นของสารละลาย MUG 25 mg/mL สังเกตเห็นการเรืองแสงในหลุม C 2-5 และ 8-10, ที่ความเข้มข้นของสารละลาย MUG 50 mg/mL สังเกตเห็นการเรืองแสงในหลุม D 2-5 และ 8-10, ที่ความเข้มข้นของสารละลาย MUG 100 mg/mL สังเกตเห็นการเรืองแสงในหลุม E 2-5 และ 8-10 และ ที่ความเข้มข้นของสารละลาย MUG 150 mg/mL สังเกตเห็นการเรืองแสงในหลุม F 2-5 และ 8-10 โดยไม่พบว่า *E. coli* ถูกสารดังกล่าวยับยั้งการเจริญ และยังสามารถสังเกตการเรืองแสงได้อย่างชัดเจน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase ที่เชื้อ *E. coli* สร้างขึ้นและหลัออกนอกเซลล์ ซึ่งจะย่อยสารประกอบฟลูออเรสเซนต์ 4-methylumbelliferyl-,  $\beta$ -D-glucuronide (MUG) ทำให้เกิดเป็นผลผลิตสาร fluorescent 4-methylumbelliferone โดยจะพบการเรืองแสงภายใต้แสง Ultraviolet (UV) ซึ่งในการทดลองนี้ทำการสังเกตผลการทดลองดังกล่าวด้วยเครื่อง Gel Documentary ที่ความยาวคลื่น 306 nm อย่างไรก็ตามเชื้อทดสอบอีก 2 ชนิดคือ *Salmonella* spp. ไม่พบการเรืองแสงในหลุมทดสอบในทุกช่วงความเข้มข้นของสารละลาย MUG ดังภาพที่ 1 ในหลุมที่ C 6-7, D 6-7, E 6-7 และ F 6-7 เช่นเดียวกันกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหลุมที่ C 11-12, D 11-12, E 11-12 และ F 11-12 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ในอาหาร NB-MUG ภายใต้แสง Ultraviolet (UV) ที่ความยาวคลื่น 306 nm

Bacterial isolates	Roll in 96 well plates	Present fluorescence at 306 nm after incubated with each concentration of NB-MUG			
		25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	150 mg/mL
<i>E. coli</i> isolates 1	C	+	+	+	+
	D	+	+	+	+
	E	+	+	+	+
	F	+	+	+	+
<i>E. coli</i> isolates 2	C	+	+	+	+
	D	+	+	+	+
	E	+	+	+	+
	F	+	+	+	+
<i>E. coli</i> isolates 3	C	+	+	+	+
	D	+	+	+	+
	E	+	+	+	+
	F	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> spp.	C	-	-	-	-
	D	-	-	-	-
	E	-	-	-	-
	F	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	C	-	-	-	-
	D	-	-	-	-
	E	-	-	-	-
	F	-	-	-	-

Note : (+) = Positive GUD activity resulting in a fluorescent end-product. , (-) = Negative GUD activity





ภาพที่ 1 ผลตรวจวัดการเรืองแสงของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase ที่เชื้อ *E. coli* สร้างขึ้น ซึ่งจะย่อยสารประกอบฟลูออเรสเซนต์ 4-methylumbelliferyl-,  $\beta$ -D-glucuronide (MUG) ทำให้เกิดเป็นผลผลิตสาร fluorescent 4-methylumbelliferone สังเกตได้ภายใต้แสง Ultraviolet (UV) ด้วยเครื่อง Gel Documentary ที่ความยาวคลื่น 306 nm

## อภิปรายผล

การใช้ประโยชน์จาก GUD activity ของเชื้อ *E. coli* ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างต่างๆ มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายและถูกใช้เป็นมาระยะเวลานานแล้ว โดยองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาและในประเทศไทยเอง ได้กำหนดให้วิธีการดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างน้ำดื่มอาหาร และ สิ่งแวดล้อม [2] อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง *E. coli* จะรบกวนปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าวและไม่เหมาะกับการผสมกับ MUG จึงนิยมเลี้ยง *E. coli* ให้เจริญเป็นโคโลนีและหลังเอนไซม์ออกมานอกเซลล์บนผิวหน้าของอาหารต่างๆ แล้วจึงเตรียมสารละลาย MUG เททับผิวหน้าอาหารในภายหลัง และทำการสังเกตการเรืองแสง fluorescence ซึ่งเป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้สารละลาย MUG ในปริมาณมาก และยังพบปัญหาในเรื่องการสังเกตการเรืองแสง fluorescence ที่ต้องมีความชำนาญในการสังเกต ต่อมา Feng and Hartman ได้ศึกษาพบว่า MUG สามารถนำมาผสมลงในอาหาร EC medium เกิดเป็นอาหาร EC MUG โดยไม่พบการรบกวนปฏิกิริยาของเอนไซม์เอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase ที่เชื้อ *E. coli* สร้างขึ้น [6] โดยต่อมามีการนำมาผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปและจัดจำหน่ายทางการค้า เช่น EC broth with MUG ของบริษัท Thermo Fisher Scientific หรือ บริษัท Sigma-Aldrich เป็นต้น เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวก ใช้เวลาน้อย จึงเหมาะสมในการใช้ตรวจในขั้นตอน presumptive test อย่างไรก็ตามอาหารดังกล่าวยังมีราคาที่ค่อนข้างแพงเนื่องจาก MUG มีราคาต้นทุนสูง จึงทำให้หากหน่วยงานมีงบประมาณที่จำกัดจะทำให้ตรวจตัวอย่างได้จำนวนน้อย ในงานวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีการตรวจที่ช่วยให้ใช้สารละลาย MUG ในปริมาณน้อย แต่สามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมาก โดยในการตรวจ 1 ครั้ง จะสามารถตรวจตัวอย่างพร้อมกันได้มากกว่า 90 ตัวอย่างใน ไมโครเพลท 96 หลุม และอ่านผลหลังจากเพิ่มปริมาณเชื้อในตัวอย่างด้วยอาหาร selective-Enrichment ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (หลังจากเติมสารละลาย MUG แล้วบ่ม 16 ชม. จึงนำไปวัดผล) ซึ่งจากผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่าสารละลาย MUG ในทุกความเข้มข้นคือ 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL และ 150 mg/mL สามารถใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase ที่เชื้อ *E. coli* สร้างขึ้นกับสารละลาย MUG ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามแม้ความเข้มข้นของสารละลาย MUG ค่าที่สุดที่สามารถสังเกตปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจนคือที่ความเข้มข้น 25 mg/mL แต่การปิเปตสารในปริมาณน้อยจำเป็นต้องฝึกฝนและใช้ความชำนาญ ซึ่งอาจเกิดความผิดพลาดจนเกิดผลลบปลอม (false negative) ขึ้นได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงแนะนำให้ใช้สารละลาย MUG ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL เพื่อความแม่นยำและลดการเกิดผลลบปลอมในการทดสอบ

## สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจที่ช่วยให้ใช้สารละลาย MUG ได้ในปริมาณน้อย แต่สามารถตรวจตัวอย่างที่อาจปนเปื้อน *E. coli* ได้จำนวนมาก โดยในการตรวจ 1 ครั้ง จะสามารถตรวจตัวอย่างพร้อมกันได้มากกว่า 90 ตัวอย่างใน ไมโครเพลท 96 หลุม และอ่านผลหลังจากเพิ่มปริมาณเชื้อในตัวอย่างด้วยอาหาร selective-Enrichment ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (หลังจากเติมสารละลาย MUG แล้วบ่ม 16 ชม. จึงนำไปวัดผล) ซึ่งจากผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่าสารละลาย MUG ในทุกความเข้มข้นคือ 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL และ 150 mg/mL สามารถใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase ที่เชื้อ *E. coli* สร้างขึ้นกับสารละลาย MUG ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามแม้ความเข้มข้นของสารละลาย MUG ต่ำที่สุดที่สามารถสังเกตปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจนคือที่ความเข้มข้น 25 mg/mL แต่การปิเปตสารในปริมาตรน้อยจำเป็นต้องฝึกฝนและใช้ความชำนาญ ซึ่งอาจเกิดความผิดพลาดจนเกิดผลลบปลอม (false negative) ขึ้นได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงแนะนำให้ใช้สารละลาย MUG ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL เพื่อความแม่นยำและลดการเกิดผลลบปลอมในการทดสอบ

## ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มชนิดของเชื้อทดสอบให้มากขึ้นเพื่อผลการทดลองที่มีความแม่นยำมากขึ้น
2. ควรเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้น กับวิธีการตรวจแบบอื่นๆ

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนวิจัยจาก โครงการการสร้างสรรค่นวัตกรรมทางจุลชีววิทยา งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย

## เอกสารอ้างอิง

- [1] วิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, กรม. (2558). วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliform, Fecal coliform bacteria และ *E. coli* ในอาหารและน้ำดื่ม โดยวิธี Most probable number (MPN), วิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์อาหาร เล่ม 3. กรุงเทพฯ.
- [2] Association of Official Analytical Chemists" F.D.A. (1995). **Bacteriological Analytical Manual 8th Edition AOAC**, Arlington Va.
- [3] Beneduce, L., Spano, G. and Massa S. (2003). *Escherichia coli* O157:H7 general characteristics, isolation and identification techniques. **Annals of Microbiology**. 53, 511-527.
- [4] C. H'oller, G. Havemeister, and K. O. Gundermann. (1995). Comparison of BGB-MUG and LSTB-MUG in microbiological surveillance of recreational waters. **Zentralblatt fur Hygiene und Umweltmedizin**, vol. 198, (2), 138-151.
- [5] Farnleitner AH, Kreuzinger N, Kavka GG, Grillenberger S, Rath J, Mach RL. (2000) Simultaneous detection and differentiation of *Escherichia coli* populations from environmental freshwaters by means of sequence variations in a fragment of the b-d-glucuronidase gene. **Appl Environ Microbiol**;66(4), 1340-6.
- [6] Feng, P. C. S., and P. A. Hartman. (1982). Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 43, 1320-1329.
- [7] J. A. Koburger and M. L. Miller. (1985). Evaluation of a fluorogenic MPN procedure for determining *Escherichia coli* in oysters. **Journal of Food Protection**. vol. 48, (3), 244-245.
- [8] Jinapon, C., Wangman, P., Pengsuk, P., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, P. & Longyant S. (2020). Development of monoclonal antibodies for the rapid detection and identification of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in food sample using dot-blot assays. **J of Food Safety**, 40 (5). <https://doi.org/10.1111/jfs.12841>
- [9] Kilian, M., and P. Bulow. (1976). Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B** 84, 245-251.

- [10] L. Fiksdal, M. Pommepuy, M.-P. Caprais, and I. Midttun. (1994). Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 60, (5), 1581–1584.
- [11] Pengsuk, C., Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., & Sithigorngul, P. (2013). Development and evaluation of a highly sensitive immunochromatographic strip test using gold nanoparticle for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 in seafood samples. **Biosensors & Bioelectronics**, 42, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.10.011>
- [12] P. Villari, M. Iannuzzo, and I. Torre. (1997). An evaluation of the use of 4-methylumbelliferyl-  $\beta$ -D-glucuronide (MUG) in different solid media for the detection and enumeration of *Escherichia coli* in foods. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 24, (4), 286–290.
- [13] Richards G.P. & Watson M.A. (2010). Fluorogenic Membrane Overlays to Enumerate Total and Fecal *Escherichia coli* and Total Vibrionaceae in Shellfish and Seawater. **International Journal of Microbiology**. doi:10.1155/2010/910486
- [14] S.M. Holt, P. A. Hartman, and C.W. Kaspar, (1989). Enzyme-capture assay for rapid detection of *Escherichia coli* In oysters, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.55, (1), 229–232.
- [15] Van Poucke SO, Nelis HJ. (2000) A 210-min solid phase cytometry test for the enumeration of *Escherichia coli* in drinking water. **J Appl Microbiol**; 89, 390–6.