

groups such as cattle breeders and beef handlers. For detection of anti-VT1/VT2, the most reliable method (cell cultured method) was introduced.

### **Materials & Methods**

**Samples** were collected from three populations. **1) Diarrhea patients**; in all ages (< 5 years to elderly); serum and stool samples from patients with diarrhea for less than 48 hr who had not received antibiotics and were admitted to the hospitals in the period of November 1998 to April 1999. **2) Control group**; 200 to 300 healthy donors who attend to the hospital without diarrheal disease were obtained from the same source of patients during the same period. **3) High risk-group**; healthy donors who have high risk to contaminate with cattle feces, for example people who are working in the cattle farm, dairy farm and slaughter-house or beef-handler in several places.

**Determination of anti-VTs/VT-2**; sera from the healthy donors and diarrhea patients were collected for determination of anti-VT1/VT-2 antibody titers by the cell culture (Vero-cell) method. Briefly, after heat treatment at 56°C 30 min serum samples were incubated with verotoxins (VT-1 or VT-2) at 37°C for 30 min. Optimal concentration of verotoxins was predetermined. Vero-cell is then cultured with the serum-VTs mixture for 4 days. Not-neutralized VTs inactivate Vero-cell ribosome thereby disrupting protein synthesis and causing cell death. Serum dilution neutralizing 50% of VTs is determined. Verotoxin-1 (VT-1) lot No. 7-60904 and Verotoxin-2 (VT-2) lot No. 7-70803 prepared by "DENKA SEIKEN" were used in this study at the concentration of 10 to 20 CD<sub>50</sub> per 25ul. Anti-Verotoxin (anti-VT1 and anti-VT2) rabbit serum lot No.2 from National

Institute of Infectious Diseases , Japan , was used as positive control. Guinea pig serum is used as negative control.

**Determination of bacterial strain** ; stool samples were collected from patients with diarrhea of more than 24 hr in duration consisting of at least three diarrhea per day wheather or not they had blood in their stools. Patients were excluded if they were reported to have received antibiotic therapy in the previous month . Specimens were processed within 12 hr of collection. Stool is screened for E. coli on sorbitol-MacConkey agar. After inoculation at 37° C for 18 hr , five sorbitol-negative E coli strain isolated from each specimen collected from patients during diarrhea were examined for O and H serotyping.

**Serotyping** ; all colonies of E. coli isolated from stool specimen were O serotyped by using " DENKA SEIKEN " E. Coli antisera kit (I) covering from O1 to O169. In addition , all strains were H serotyped by using " DENKA SEIKEN " E. Coli antisera kit (II) covering from H2 to H51. The kits were produced for the VTEC-RPLA ( Verotoxin producing E.coli- Reversed Passive Latex Agglutination) method. The kits were used for the screening by the slide agglutination method. When the kits are mixed with homologous E. coli organisms antigen-antibody reaction occurs to produce agglutination of cells visible for the naked eye .

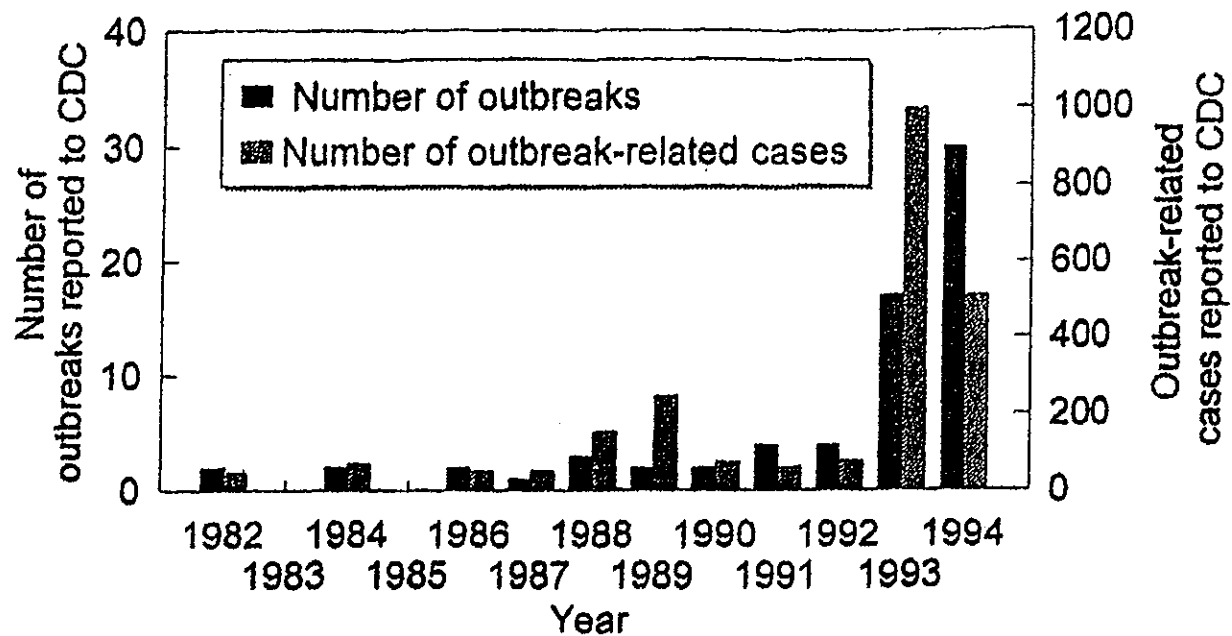
## Reference

1. กฤษณ์ พงศ์พิรุฬห์. นิพนธ์ต้นฉบับ : โรคอุจจาระร่วงจากการติดเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาลบุรีรัมย์ 2540. วารสารการแพทย์ศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ 2541;13(1):31-44.
2. จรัส วิวัฒน์คุณูปการ. เชื้อที่เป็นสาเหตุโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันในผู้ป่วยเด็กแรกเกิดถึงอายุ 5 ปี ในหอผู้ป่วยกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลพังงา. วารสารวิชาการแพทย์เขต 11. 2540;10(4) :103-107.
3. ธวัชชัย เนียรวิฑูรย์, วรางคณา สังสิทธิสวัสดิ์, ถิรพงษ์ ถิรมนัส, พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์. การตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ในอาหารพร้อมบริโภคในเขตเทศบาลนครขอนแก่น. Thailand Journal of Health Promotion and Enviromental Health ; july - sep. 1997. p. 20-31.
4. สีสม แจ่มอุลิตรัตน์, สมศักดิ์ พรหมปลูก, พงพิศ วรินทร์เสถียร. การคือยของเชื้อ Escherichia coli ในอุจจาระของคนในชนบท. วารสารโรคติดเชื้อและยาด้านจุลชีพ 2531 ;5 (1):6-8.
5. American Gastroenterological Association. Consensus Conference Statement : Escherichia coli O157:H7 Infections-An Emerging National Health Crisis, July 11-13, 1994. Gastroenterology. 1995;108(6):1923-1934.
6. Anne E Hull, David W.K. Acheson, Peter Echeverria, et al. Mitomycin Immunoblot Colony Assay for Detection of Shiga-Like Toxin-Producing Escherichia coli in Fecal Sample: Comparison with DNA Probes. Journal of Clinical Microbiology 1993 ;31(5) :1167-1172.
7. Bielaszewska M., Clarke I., Karmali M. A. and Petric M.. Localization of Intravenously Administered Verocytotoxins (Shiga-Like Toxins) 1 and 2 in Rabbits Immunized with Homologous and Heterologous Toxoids and Toxin Subunits. Infection and Immunity. July 1997; p. 2509-2516.
8. Bielaszewska M., Janda J., Blahova K., et al. Human Escherichia coli O157 : H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat ' milk. Epidemiol Infect. 1997;119:299-305.
9. Chapman P. A., Siddons C. A., Cerdan Malo A. T. and Harkin M. A. A 1- Year stusy of Escherichia coli O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. Epidemiol Infect. 1997;119: 245-250.
10. David L Swerdlow, Patricia M Griffin. Duration of faecal shedding of Escherichia coli O157:H7 among chidren in day -care centres. The Lancet 1997;349(3):745-746.

11. Dawn L. Martin, Kristine L. Macdonald, Karen E. White, et al. The Epidemiology and Clinical aspects of the Hemolytic Uremic Syndrome in Minnesota. *The New England Journal of Medicine*. Oct. 25 ,1990;323 (17):1160-1166.
12. Edward J. Brown, Peter Echeverria, David N. Taylor, Jitvimol Seriwatana, et al. Determination by DNA Hybridization of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* in Children with Diarrhea in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* 1989 ;27(2):291-294.
13. Garber L, Well S, Hancock D. et al. *Escherichia coli* O157 : H7 in dairy heifers: results of a case-control study. *J Am Vet Med Assoc* (in press).
14. Gregory L. Armstrong, Jill Hollingsworth and J. Glenn Morris. Emerging Foodborne Pathogenes: *Escherichia coli* O157 : H7 as a Model of Entry of a New Pathogen into the Food Supply of the Developed World. *Epidemiol Rev.* 1996;18(1):29-50.
15. Griffin P, Tauxe R. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157 : H7, other enterohemorrhagic *E. Coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev.* 1992;13:60-98.
16. Hancock D. D., Besser T. E., Kinsel M.L., et al. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington state. *Epidemiol Infect.* 1994;113:199-207.
17. Hancock D. D., Besser T. E., Rice D. H., et al. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect.* 1997;118:193-195.
18. Harman J.W. Meat safety. Inspector's ability to detect harmful bacteria is limited. U.S. General Accounting Office, GAO/T-RCED-94-22B, 1-13.
19. Hidemasa Izumiya, Jun Terajima, Akihito Wada, et al. Molecular Typing of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 Isolates in Japan by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 1997;35(7):1675-1680.
20. Hussam Qadri S. M., Sherrin Kayali. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* A dangerous food- borne pathogen. *Postgraduate Medicine* 1998;103(2):179-187.
21. Jane S. Greatorex and Grace M. Thorne. Humoral Immune Responses to Shiga-Like Toxins and *Escherichia coli* O157 Lipopolysaccharide in Hemolytic-Uremic Syndrome Patients and Healthy Subjects. *Journal of Clinical Microbiology* 1994;32(5):1172-1178.

22. John R. Waters, John C. M. Sharp, and Vikram J. Dev. Infection Cause by *Escherichia coli* O157:H7 in Alberta, Canada, and in Scotland : A Five-Year Review, 1987-1991. *Clinical Infectious Disease Articles* 1994;19(11):834-843.
23. Karl A. Bettelheim, J. Edward Brown, Somsak Lolekha and Peter Echeverria. Serotypes of *Escherichia coli* That Hybridized with DNA Probes for Genes Encoding Shiga- Like Toxin I, Shiga- Like Toxin II, and Serogroup O157 Enterohemorrhagic *E. coli* Fimbriae Isolated from Adults with Diarrhea in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* 1990;28(2):293-295.
24. Mechie S. C., Chapman P. A. and Siddons C. A.. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157 in a dairy herd. *Epidemiol Infect.* 1997;118. p. 17-25.
25. Mohamed A. Karnall, Martin Petric, Monica Winkler, et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Immunoglobulin G Antibodies to *Escherichia coli* Vero Cytotoxin I. *Journal of Clinical Microbiology* 1997;32(6):1457-1463.
26. Patricia M. Griffin and Robert V. Tauxe. The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157:H7, Other Enterohemorrhagic *E. Coli.* and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiologic Reviews* 1991;13:60-98.
27. Peter C Rowe, Elaine Orrbine, George A. Wells, et al. Epidemiology of hemolytic-uremic syndrome in Canadian children from 1986 to 1988. *The Journal of Pediatrics* . August 1991;119(2):218-224.
28. Phillip I. Tarr, Marguerite A. Neill, Carla R. Clausen , et al. *Escherichia coli* O157:H7 and the Hemolytic Uremic Syndrome : Importance of Early Cultures in Establishing the Etiology. *The Journal of Infectious Diseases* 1990;162:553-556.
29. Rahn K., Renwick S. A., Johnson R. P, Wilson J. B., et al. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiol Infect.* 1997;119: 251-259.
30. Report of the food Sanitation project JICA in Thailand. (1997).
31. Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *E. Coli* serotype. *New Engl J Med* 1982;308:681-685.
32. Roger P. Johnson, William C. Cray, JR. and Shelley T. Johnson. Serum Antibody Responses of Cattle following Experimental Infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity* 1996;64(5) :1879-1883.

33. Sumio Yamada, Shigeru Matsushita, Akemi Kai, et al. Detection of Verocytotoxin from Stool and Serological Testing of Patients with Diarrhea Caused by Escherichia coli O157 : H7. *Microbiol. Immunol* 1993;37(2):11-118.
34. Susan E. Richardson, Tamara A. Rotman, Venita Jay, et al. Eperimental Verocyto toxemia in Rabbits. *Infection and Immunity* 1992;60(10):4154-4167.
35. Suwana Trakulsombon, Nalinee Aswapokee, Somwang Danchaivijitr. Serum Bactericidal Effects on Common Clinical Bacterial Isolates in Thais. *J. Infect Dis Antimicrob Agents*. 1989;6(1):12-21.
36. Tadashi Fukuda, Takako Kimiya, Motohide Takahashi, et al. Induction of Protection against Oral Infection with Cytotoxin-Producing Escherichia coli O157 : H7 in Mice by Shiga-like Toxin-Liposome Conjugate. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;116:313-317.



**FIGURE 1.** Number of outbreaks and outbreak-related cases of *Escherichia coli* O157:H7 reported to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (Source: CDC surveillance data).

## แบบการซักประวัติ

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ชื่อ  นาย  นางสาว  นาง  ค.ช.  ค.ญ. ....นามสกุล.....อายุ.....ปี  
ที่อยู่ปัจจุบัน.....

### ประวัติการศึกษาและการทำงาน

วุฒิการศึกษา  ประถม ต่ำกว่า ป.ตรี  ป.ตรี  สูงกว่า ป.ตรี  อื่นๆ .....  
ประกอบอาชีพ  รับราชการ  รัฐวิสาหกิจ  เกษตรกร  ค้าขาย  อื่นๆ.....  
รายได้ครอบครัว  < 10,000  10,000 - 30,000  30,000 - 50,000  > 50,000 บาท/เดือน

### ประวัติทางการแพทย์

โรคประจำตัว  เบาหวาน  กระเพาะ  ความดันโลหิตสูง  หัวใจ  อื่นๆ .....

มีการรับประทานยาปฏิชีวนะหรือไม่  ไม่มี  มี ระบุ .....

สาเหตุที่คิดว่าทำให้ท้องเสีย .....

2 อาทิตย์ที่ผ่านมา รับประทานอาหารเหล่านี้หรือไม่  เนื้อวัว  แสมเบอร์เกอร์  บาร์บีคิว

หมกของเนส  นมพาสเจอร์ไรส์  สลัดผักสด  สักคอง  ส้มตำ

อาหารไม่ผ่านการปรุง (เช่น ปลาดิบ กุ้งแม่น้ำปลา) ระบุ.....

น้ำดื่ม  ต้ม  กรอง  ผ่าน UV  อื่นๆ .....

ทำงาน หรือมีโอกาสสัมผัสสัตว์เหล่านี้หรือไม่  วัว  ควาย  แพะ  แกะ  น้า  หมู

เป็ด  ไก่  สุนัข  อื่นๆ .....

ระยะเวลาที่ทำงานหรือสัมผัสกับสัตว์  < 1 ปี  1-5 ปี  5-10 ปี  10-20 ปี  20-30 ปี  > 30 ปี

ลักษณะงานที่สัมผัสสัตว์  ทำงานสัมผัสกับสัตว์โดยตรง (การเลี้ยง การให้อาหาร ฯลฯ)

เป็นเจ้าของกิจการ  อื่นๆ .....

เกิดอาการท้องเสีย  .....ครั้ง/เดือน หรือ .....ครั้ง/ปี

ระยะเวลาที่เกิดมีอาการท้องเสียครั้งสุดท้าย  < 3 เดือน  3-6 เดือน  > 6 เดือน

จำนวนครั้งที่มีการถ่ายต่อ 1 วัน  1-3 ครั้ง  3-6 ครั้ง  > 6 ครั้ง

อุจจาระที่ปรากฏ  เหลว  เป็นน้ำ  มูกเลือด  เลือด  อื่นๆ .....

อาการอื่น  ไข้  ปวดท้อง  อาเจียน  อื่นๆ .....

รับประทานยาแก้ท้องเสียมีอาการท้องเสีย  ไม่มี  มี ระบุ .....

หมายเหตุ.....

QSMI.....ผู้บันทึก



1998/99 EHEC Project

Queen Saovabha Memorial Institute

Director General : Prof. Dr. Visith Sitprija

Study Director : Prof. Dr. Narongsak Chaiyabutr

Consultants : Prof. Dr. Henry Wilde

Prof. Dr. Tomotsu Satoh

Research Staffs : Mrs. Pakamat Khawplod

Miss Orawan Khaw

Miss Nualnong Wongtongkom

Miss Sukunya Limusanno

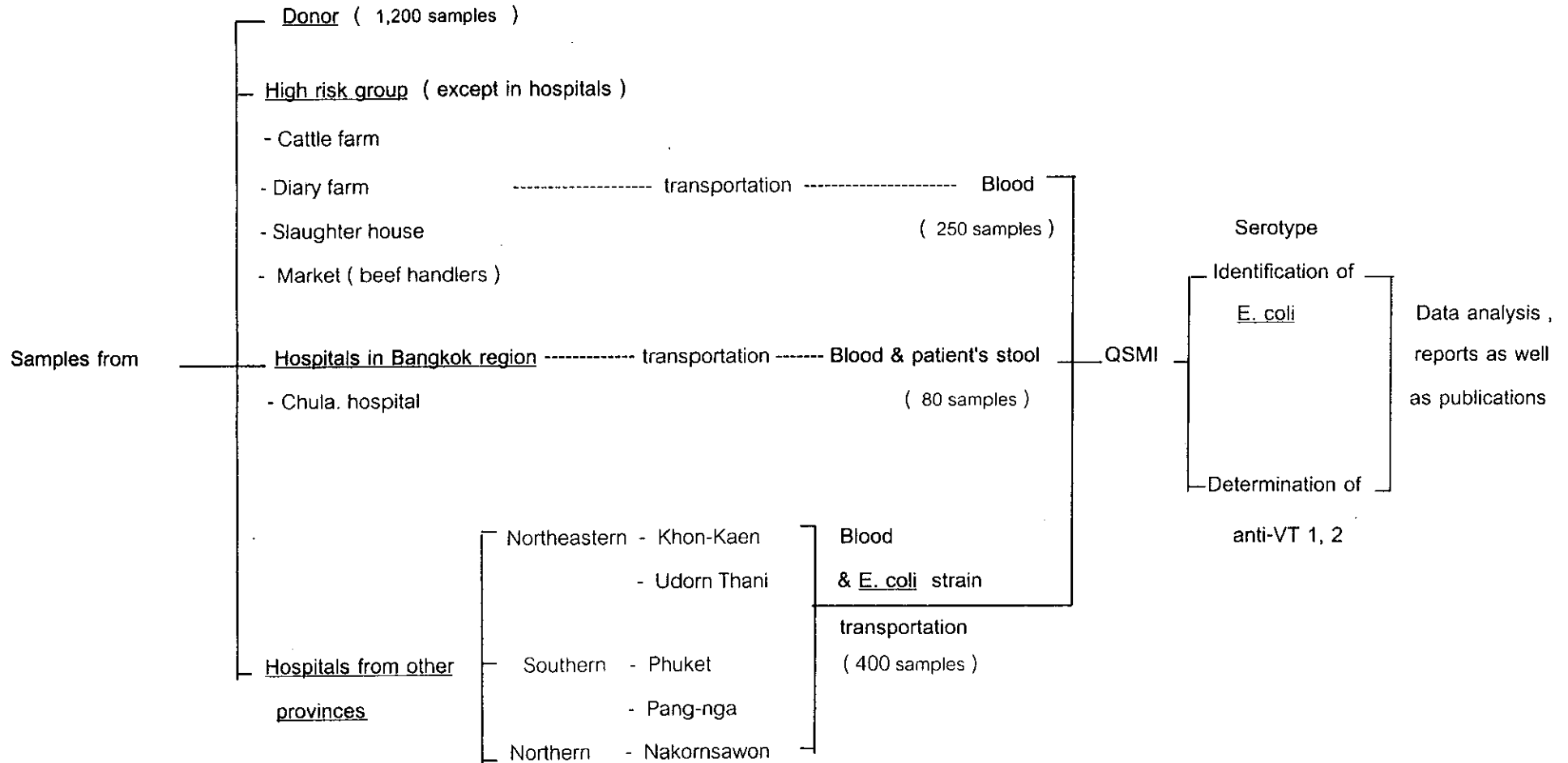
Miss Wachiraporn Saengseesom

Miss Suchitra Thaithumnas

Miss Jureeporn Noiphrom

1998/99 EHEC Project

( November,2 1998 - June,30 1999 )



Study director : Dr. Narongsak Chaiyabutr  
 Project consultants : Dr. Henry Wilde , Dr. Tomotsu Satoh

Research Associate : Dr. Motohede Takahashi  
 ( NIID , Japan. )

Determination of anti-VERO toxin titer  
by the cell culture method ( CCM )

Reference laboratory : Laboratory of bacterial products III  
Department of bacterial and blood products  
National Institute of Infectious Disease , Japan.

Reference reagent : Vero-toxin 1 lot. 7-60904  
Vero-toxin 2 lot. 7-70803  
Anti-VT 1 , Anti VT 2 lot. 2 ( rabbit serum )  
( prepared by " DENKA SEIKEN co." )

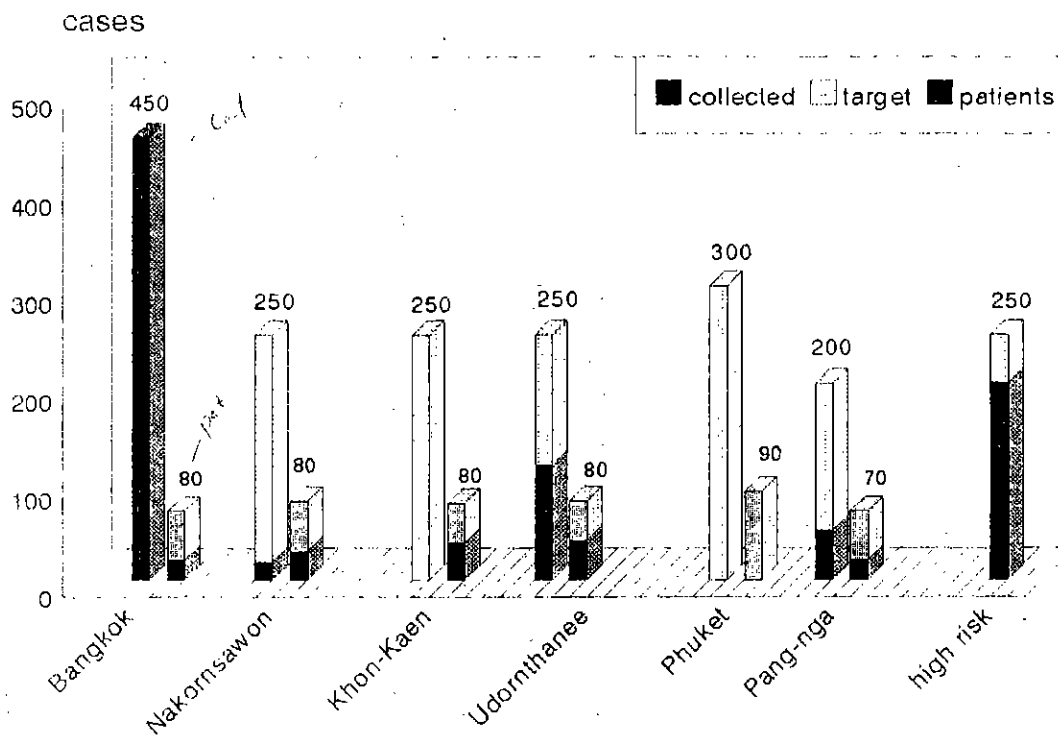
Principle : CCM is a biological neutralization test. When dilutions of serum to be test are mixed with Vero-toxin ( 10-20  $CD_{50}$  ) for 30 mins. Vero-cell is then cultured with the serum-VTs mixture for 4-5 days. Non-neutralized VTs inactivate Vero-cell ribosome thereby disrupting protein synthesis and causing cell death. Serum dilution neutralizing 50% of VTs is determined.

Toxins	Conc.	$CD_{50}$	Anti-VTs	50% dilution
VT-1 ( lot. 7-60904 )	1 : 10,000	8 -16 $CD_{50}$ ( mean 14 $CD_{50}$ )	1:100	1600 - 2300 ( mean 1918 )
VT-2 ( lot. 7-70803 )	1 : 550,000	11 -32 $CD_{50}$ ( mean 19 $CD_{50}$ )	1:900	5090-10200 ( mean 9084 )

# Blood collection

First report

( November - January )



1998/99

## Patient

(Chulalongkorn hospital)

Date	Subject No.	Name	M/F	Age	Previously Diarrhea	a-VT1 Titers	a-VT2 Titers	Serum Toxicity	Remark
3/12/41	P 1001	น.สวรณูช กุประมาณ	F	23	<3 mth	-	x8	-	
23/12/41	P 1002	นาย คำผาด มีเต็มไทร	M	52	<3 *	x3, x3	x6	-	VT-1 16 CD <sub>50</sub> VT-2 16 CD <sub>50</sub>
23/12/41	P 1003	นาง ปราณี มณีโชติ	F	78	<3	-	x6	-	
23/12/41	P 1004	นาง กุ้ยฮวย แซ่ลิม	F	86	<3	-	x6	-	
23/12/41	P 1005	นาย ตฤณ ศรีเรือง	M	16	<3	-	x11	-	
23/12/41	P 1006	นาง ฮูเตียง แซ่ลิม	F	88	<3	-	x8	-	
16/12/41	P 1007	นาง จงกกล รุ่งเรืองวิรัชกิจ	F	46	<3	-	x8	-	
16/12/41	P 1008	นาย คำนึ่ง ตาประโคน	M	38	<3	-	x8	-	
28/12/41	P 1009	นาย ทูล สอนพรม	M	35	<3	-	x11	-	
5/1/42	P 1010	นาง สุปราณี คูหาวิชานนท์	F	43	3-6	-	x8	-	
7/1/42	P 1011	นาย ธนภัทร ศรีสุวรรณ	M	35	<3	-	x11	-	
11/1/42	P 1012	นาง อรพรรณ เป็ญจานุวัตร	F	49	<3	-	x4	-	
14/1/42	P 1013	น.ส ดวงกมล ส่งศิริ	F	22	3-6	-	x1	-	} VT-2 90 CD <sub>50</sub>
18/1/42	P 1014	นาง สุภาพร รุ่งสว่าง	F	31	>6	-	x3	-	

\*3-4 times/mth.

Anti- VT-1 & VT-2 Determination

First Report

Period : November 2, 1998 - January, 31 1999.

( February, 12 1999 )

Subjects	Places	Number of serum		
		Total	a-VT 1	a-VT 2
I. First year	I. Healthy	30	0	
	II. Diarrhea Patients	30	0	
II. Donors ( 2 <sup>nd</sup> year )	I. Queen Saovabha Memorial Institute	94	0	
	II. National Blood bank	97	2/67	
	III. Chulalongkorn University	158	0	
	IV. Mahanakorn University	102	0	
	V. Sawonprachaluk Hospital	18	-	
	VI. Khon-Kaen Center Hospital	0	-	
	VII. Kaiprachuk Hospital	117	-	
III. High risk ( 2 <sup>nd</sup> year )	I. Patumtanee	36	4/36	
	II. Saraburi	112	1/112	
	III. Chachengsao	43	-	-
	IV. Others	14	-	-
IV. Diarrhea Patients ( 2 <sup>nd</sup> year )	I. Chulalongkorn Hospital	20	1/12	-
	II. Sawonprachaluk Hospital	29 ( 92 )	-	-
	III. Khon-Kaen Center Hospital	42 ( 54 )	-	-
	IV. Kaiprachuk Hospital	67*	-	-
	V. Wachira Hospital	0	-	-
	VI. Pangnga Hospital	0	-	-

Blood & stool collection

First Report

Period : November 2, 1998 - January, 31 1999.

( February, 12 1999 )

Subjects	Places	Number of		
		Serum	E. coli	
			Growth	Non-growth
I. Donors	I. Queen Saovabha Memorial Institute	94	-	-
	II. National Blood bank	97	-	-
	III. Chulalongkorn University	158	-	-
	IV. Mahanakorn University	102	-	-
	V. Sawonprachaluk Hospital	18	-	-
	VI. Khon-Kaen Center Hospital	0	-	-
	VII. Kaiprachuk Hospital	117	-	-
II. High risk	I. Patumtanee	36	-	-
	II. Saraburi	112	-	-
	III. Chachengsao	43	-	-
	IV. Others	14	-	-
III. Diarrhea Patients	I. Chulalongkorn Hospital	20	15	5
	II. Sawonprachaluk Hospital	29 ( 92 )	29	*
	III. Khon-Kaen Center Hospital	42 ( 54 )	* 22	* 14
	IV. Kaiprachuk Hospital	67	*	*
	V. Wachira Hospital	0	0	0
	VI. Pangnga Hospital	0	0	0

