บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany.
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของบริษัท Kottermann, Germany.
4. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200
   ของบริษัท Kubota, Japan.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920
   ของบริษัท Kubota, Japan.
   - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
   - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
9. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. H1 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lambda 25
    ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70 ^{o}ซ
    ของบริษัท Forma Scientific , USA.
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ
    ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
14. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)
    - Gel Mate 2000 ของบริษัท Toyobo, Japan.
    - Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

15. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
16. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
17. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ ของบริษัท Polariod, USA.
    - แผ่นกรองแสงสีแดง
    - ฟิล์มโพลารอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3000 (ISO 3000)
    - Gel Documentation และ โปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.

3.2 เคมีภัณฑ์ อาหารเลี้ยงเชื้อและชุดทดสอบสำเร็จ

1. กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท Sigma, Japan.
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemical, AUS.
3. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.
4. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
5. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany.
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
8. สารละลาย Cefixime และ Potassium Tellurite (CT) ของบริษัท Oxoid, England.
9. สารละลาย Phosphate Buffered Saline with Tween 20, PBS-Tween ของบริษัท Sigma, USA.
10. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
11. แอนติซีรัมทดสอบทางซีโรวิทยา (Serological test) *Escherichia coli* O157 และ *E. coli* H7 ของบริษัท S&A Reagents Lab, Thailand.
12. 100 bp DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, USA.
13. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท Promega, USA.
14. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \bullet 2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
15. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA.

16. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$)
    ของบริษัท Sigma, USA.
17. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เหลว modified EC broth with novobiocin (mEC+n)
    ของบริษัท Kyokuto, Japan.
18. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ของบริษัท Difco Lab., USA.
19. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แข็ง Cellobiose-Lactose-Indole-β-D-glucuronidase agar (CLIG) ของบริษัท Kyokuto, Japan.
20. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แข็ง Sorbitol Mac-Conkey agar (SMAC)
    ของบริษัท Oxoid, England.
21. ชุดตรวจ *E. coli* O157 ด้วยวิธี Immuno magnetic Seperation (IMS), Dynabeads anti-*E. coli* O157 ของบริษัท Dynal, Norway.
22. ชุดทดสอบสำเร็จ O157 (Verocytotoxin Genes) PCR Typing Set
    ของบริษัท Takara, Japan.
23. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIA quick Gel Extraction Kit
    ของบริษัท Qiagen, Germany.

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3 แบคทีเรีย

Escherichia coli O157:H7 สายพันธุ์ NF 1709 NF 14577 NF 22895 และ NF 23379 มีจีโนไทป์เป็น verotoxin ชนิดที่1 (vt_1) สายพันธุ์ NF 9492 และ NF 23380 มีจีโนไทป์เป็น verotoxin ชนิดที่2 (vt_2) สายพันธุ์ NF 7777 และ NF 9879 มีจีโนไทป์เป็น verocytotoxin ชนิดที่1 และชนิดที่2 ($vt_{1\text{-}2}$) รวมทั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆดังต่อไปนี้ *Aeromonas sorbia* *Campylobactor jejuni* *Enterobacter aerogenes* *Klebsiella pneumoniae* *Salmonella enteritidis* *Salmonella typhimurium* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Escherichia coli *Listeria monocytogenes* *Proteus vulgaris* *Pseudomonas aeruginosa* *Serratia marcescens* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Citrobacter freundii DMST 1959 *Shigella dysenteriae* DMST 15110 (Type I) *Shigella dysenteriae* DMST 15111 (Type II) *Vibrio cholerae* DMST 2873 *Yersinia enterocoloitica* DMST 8012 ได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	ยีนเป้าหมาย	เอกสารอ้างอิง
VT-F	5'- ATACAGAG(GA)G(GA)ATTTCGT -3' (50° ซ)	*vt*$_1$ และ *vt*$_2$	Paton และ
VT-R	5'- TGATGATG(AG)CAATTCAGTTA -3' (54° ซ)		คณะ,1993
PF-8	5'- CGTGATGATGTTGAGTTG -3' (52° ซ)	*rfb*$_{O157}$	Maurer และ
PR-8	5'- AGATTGGTTGGCATTACTG -3' (54° ซ)		คณะ, 1999

3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1 เลี้ยง *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์ และแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก 1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37° ซ เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.2 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* ทุกสายพันธุ์ และแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข 1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 1 ปี

3.6 ตรวจสอบ จีโนไทป์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ โดยชุดทดสอบสำเร็จสำหรับยีนประมวลรหัส verotoxin (*vt*)

ตรวจสอบยืนยัน จีโนไทป์ของ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง โดยชุดทดสอบสำเร็จ O157 (Verocytotoxin Genes) PCR Typing Set (Takara, Japan) (ภาคผนวก ข 2) ซึ่งสามารถตรวจจีโนไทป์ของ *E. coli* O157:H7 ได้ว่ามี *vt* เป็นชนิดที่ 1 (vt_1) ชนิดที่ 2 (vt_2) หรือ มีทั้ง 2 ชนิด ตามวิธีที่ระบุ โดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดังกล่าว 10 ไมโครลิตร แขวนลอยในบัฟเฟอร์ Tris-EDTA, TE (ภาคผนวก ข 6) 90 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 95 °ซ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำส่วนน้ำใสไปใช้เป็น ดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาตามที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 2.0% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1X TBE (ภาคผนวก ข 7) เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัว วางอะกาโรสเจลในแบบพิมพ์ที่ได้ลงในแชมเบอร์เทบัฟเฟอร์ 1X TBE ให้ท่วมอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาณที่เหมาะสมกับสีติดตามความเข้มข้น 1 เท่า หยอดสารละลายผสมลงในช่องวิ่งและใช้ 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสด้วยชุดทำอีเลคโทรโฟเรซิส Mini Sub-Cell GT หรือชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Gel Mate 2000 ใช้ความต่างศักย์ 50-100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของสีติดตามเคลื่อนที่ลงมาจนเกือบสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 8) นาน 5-10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอและถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ (Polaroid, USA) หรือด้วยเครื่อง Gel Documentation และ โปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 (Bio-Rad, USA)

3.7 หาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.7.1 เตรียมจีโนมิกดีเอ็นเอของ *E. coli* O157:H7 สำหรับการทำ PCR

3.7.1.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *E. coli* O157:H7

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Chen และคณะ (1995) โดยการเขี่ยโคโลนีเดียวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ ด้วยการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) จากนั้นถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดังกล่าว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้โดยการกระจายเซลล์ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นกระจายตะกอนเซลล์ที่ได้ในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอของเชื้อใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.7.1.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} x 50 x dilution factor

3.7.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การทำ PCR ในงานวิจัยนี้ ใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ ในการตรวจ *E. coli* O157:H7 คือ ไพร์เมอร์คู่แรก VT-F และ VT-R ที่มีความจำเพาะกับ *vt* (Paton และคณะ,1993) และ ไพร์เมอร์คู่ที่สอง PF-8 และ PR-8 มีความจำเพาะกับ rfb_{O157} (Maurer และคณะ, 1999) ทั้งแบบคู่เดียวหรือใช้ทั้ง 2 คู่ร่วมกัน (Multiplex PCR) การหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดย PCR นั้นจะแปรผันปัจจัยที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา คืออุณหภูมิ annealing ตั้งแต่ 47 49 51 53 55 และ 57 ^{o}ซ ตามลำดับ และแปรผันความเข้มข้นของสารละลาย $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาตั้งแต่ 0.5 1.0 2.0 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

3.7.2.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* หรือ ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157}

สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวในปริมาตรปฏิกิริยาสุทธิ 50 มิลลิลิตร เป็นดังนี้

1x *Taq* DNA polymerase buffer (Promega, USA)	
dNTP (Promega, USA)	ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
ไพร์เมอร์ VT-F และไพร์เมอร์ VT-R ที่จำเพาะกับ *vt*	ชนิดละ 50 พิโคโมล
หรือ ไพร์เมอร์ PF-8 และไพร์เมอร์ PR-8 ที่จำเพาะกับ rfb_{O157}	ชนิดละ 50 พิโคโมล
Taq DNA polymerase (Promega, USA)	ปริมาณ 1 หน่วย
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.7.1	ปริมาณ 1 พิโคกรัม – 1 ไมโครกรัม

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* ตามวิธีของ Paton และคณะ (1993) ดังต่อไปนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 94 ^{o}ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 ^{o}ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ แปรผัน	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}ซ	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157} ตามวิธีของ Maurer และคณะ (1999) ดังต่อไปนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา 0 วินาที	30 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ แปรผัน	เป็นเวลา 0 วินาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา 15 วินาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามที่ระบุในข้อ 3.6 โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เมื่อใช้ไพร์เมอร์ คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* จะมีขนาด 215 bp และผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เมื่อใช้ไพร์เมอร์ คู่ที่มีความจำเพาะกับ rbf_{O157} จะมีขนาด 420 bp

3.7.2.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* และไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157} ร่วมกัน (Multiplex PCR)

สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวในปริมาตรปฏิกิริยาสุทธิ 50 มิลลิลิตร เป็นดังนี้

1x *Taq* DNA polymerase buffer (Promega, USA)	
dNTP (Promega, USA)	ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
ไพร์เมอร์ VT-F และไพร์เมอร์ VT-R ที่จำเพาะกับ *vt*	ชนิดละ 50 พิโคโมล
ไพร์เมอร์ PF-8 และไพร์เมอร์ PR-8 ที่จำเพาะกับ rfb_{O157}	ชนิดละ 50 พิโคโมล
Taq DNA polymerase (Promega, USA)	ปริมาณ 1 หน่วย
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.7.1	ปริมาณ 1 พิโคกรัม – 1 ไมโครกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังต่อไปนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 °ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ แปรผัน	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามที่ระบุในข้อ 3.6

3.8 ตรวจ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ต่างๆ ด้วย Multiplex PCR

3.8.1 เตรียมจีโนมิกดีเอ็นเอของ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ สำหรับการทำ Multiplex PCR

ทำการสกัดดีเอ็นเอของ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ในข้อ 3.3 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอของ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ ตามวิธีในข้อ 3.7.1.1 และ 3.7.1.2 ตามลำดับ

3.8.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแบบมัลติเพลกซ์ (Multiplex PCR)

การตรวจ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 8 สายพันธุ์ ดังกล่าวด้วย Multiplex PCR นั้นใช้ข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.7.2.2 โดยใช้ส่วนผสมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในปริมาตรปฏิกิริยาสุทธิ 50 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

1x *Taq* DNA polymerase buffer (Promega, USA)	
dNTP (Promega, USA)	ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
$MgCl_2$ (Promega, USA)	ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์
ไพร์เมอร์ VT-F และไพร์เมอร์ VT-R ที่จำเพาะกับ *vt*	ชนิดละ 50 พิโคโมล
ไพร์เมอร์ PF-8 และไพร์เมอร์ PR-8 ที่จำเพาะกับ rfb_{O157}	ชนิดละ 50 พิโคโมล
Taq DNA polymerase (Promega, USA)	ปริมาณ 1 หน่วย
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.8.1	ปริมาณ 1 พิโคกรัม – 1 ไมโครกรัม

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพลกซ์ ดังต่อไปนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 94 ^{o}ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 ^{o}ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 55 ^{o}ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}ซ	เป็นเวลา 10 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามที่ระบุในข้อ 3.6

3.9 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *vt* และผลิตภัณฑ์ PCR ของ rfb_{O157} จาก *E. coli* O157:H7 กับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank

เลือก *E. coli* สายพันธุ์ NF-1709 ซึ่งมีจีโนไทป์คือ vt_1 เป็นตัวแทนสำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *vt* ชนิดที่ 1

เลือก *E. coli* สายพันธุ์ NF-9492 ซึ่งมีจีโนไทป์คือ vt_2 เป็นตัวแทนสำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *vt* ชนิดที่ 2

เลือก *E. coli* สายพันธุ์ NF-7777 ซึ่งมีจีโนไทป์คือ $vt_{1\text{-}2}$ เป็นตัวแทนสำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ rfb_{O157}

ทำการสกัดดีเอ็นเอของ *E. coli* O157:H7 ทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าว ตามวิธีในข้อ 3.7.1.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ *vt* หรือ ไพร์เมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับ rfb_{O157} โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.7.2.1 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาสกัดแยกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุด QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการแล้วถ่ายลงในหลอดไมโครฟิวจ์ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลดังกล่าว เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด เติม Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรส ผสมให้เข้ากัน (ในกรณีที่ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดน้อยกว่า 500 bp และมากกว่า 4 kb) ถ่ายสารละลายผสมลงใน QI quick spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนล่างของคอลัมน์ทิ้งโดยดีเอ็นเอที่ต้องการจะติดอยู่ที่แผ่นกรองของคอลัมน์ส่วนบน จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในส่วนบนของคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัดอะกาโรสเจลที่ยังตกค้างอยู่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ PE ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์ส่วนบนไปใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 50 – 100 ไมโครลิตร บริเวณกลางของแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้ดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หาลำดับดีเอ็นเอโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนทั้ง 3 ข้างต้นที่ได้ มาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม BlastN version 2.2.7 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนั้นยังทำการเปรียบเทียบข้อมูลด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.7 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วจึงนำข้อมูลส่วนที่เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ได้ เข้าไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เป็นลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank

3.10 ศึกษาความจำเพาะและความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 ด้วย Multiplex PCR

3.10.1 ศึกษาความจำเพาะของการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดย Multiplex PCR

ทำการสกัดดีเอ็นเอของ *E. coli* สายพันธุ์ NF-7777 (ใช้เป็นตัวแทนของ *E. coli* O157:H7) สำหรับเป็นตัวควบคุมผลบวก (Positive control) และแบคทีเรียชนิดต่างๆตามที่ระบุในข้อ 3.3 ตามวิธีในข้อ 3.7.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำ Multiplex PCR โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.2.2 ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามที่ระบุในข้อ 3.6

3.10.2 ศึกษาความไวของการตรวจ *E. coli* O157:H7 โดย Multiplex PCR

เลือก *E. coli* สายพันธุ์ NF-7777 มาเป็นตัวแทนสำหรับดำเนินการทดลอง โดยเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ ด้วยการเขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลาข้ามคืน (16 – 18 ชั่วโมง) แล้วนำมาเจือจางระดับ 10 เท่าตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-9} ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆข้างต้นมาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีในข้อ 3.7.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำ Multiplex PCR โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.2.2 ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามที่ระบุในข้อ 3.6

3.11 หาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *E.coli* O157:H7 จากเนื้อดิบด้วย Multiplex PCR

3.11.1 การเตรียมเนื้อดิบ

ซื้อตัวอย่างเนื้อดิบจากซุปเปอร์มาร์เกตที่สะอาด นำมาตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แบ่งเนื้อดิบ 25 กรัมใส่ถุง stomacher ที่ปราศจากเชื้อ แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่มโดยกลุ่มแรกใช้เป็นกลุ่มทดลอง โดยเลือกใช้ *E.coli* สายพันธุ์ NF-7777 เป็นตัวแทน และกลุ่มที่ 2 ใช้เป็นกลุ่มควบคุมผลลบ (Negative control) คือไม่มีการเติมเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.11.2 ผลการเติม Bovine serum albumin (BSA)

เลี้ยง *E.coli* สายพันธุ์ NF-7777 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ ด้วยการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อโดยประมาณเป็น 1 10 10^2 และ 10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นถ่ายเชื้อที่ทำการเจือจางแล้วข้างต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในเนื้อดิบ 25 กรัมที่เตรียมไว้ตามวิธีในข้อ 3.11.1 ที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth ,TSB (Difco Lab., USA) (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ ด้วยการเขย่า 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.7.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำ Multiplex PCR โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเติมสารละลาย Bovine serum albumin, BSA (Promega, USA) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 100 ไมโครกรัม และกลุ่มที่สอง ไม่เติมสารละลาย BSA โดยใช้ส่วนผสมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในปริมาตรปฏิกิริยาสุทธิ 50 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

1x *Taq* DNA polymerase buffer (Promega, USA)	
dNTP (Promega, USA)	ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
$MgCl_2$ (Promega, USA)	ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์
ไพร์เมอร์ VT-F และไพร์เมอร์ VT-R ที่จำเพาะกับ *vt*	ชนิดละ 50 พิโคโมล
ไพร์เมอร์ PF-8 และไพร์เมอร์ PR-8 ที่จำเพาะกับ rfb_{O157}	ชนิดละ 50 พิโคโมล
Taq DNA polymerase (Promega, USA)	ปริมาณ 1 หน่วย
ดีเอ็นเอแม่แบบ	ปริมตร 25 ไมโครลิตร

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพลกซ์ ดังต่อไปนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 94 ^{o}ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 ^{o}ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 55 ^{o}ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}ซ	เป็นเวลา 10 นาที	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามที่ระบุในข้อ 3.6

3.11.3 เวลาที่เหมาะสมในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ สำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR

นำ *E. coli* O157:H7 ที่ทำการเจือจางด้วยภาวะและบ่มเชื้อในเนื้อดิบด้วยภาวะเช่นเดียวกับในข้อ 3.11.2 แต่แปรผันเวลาในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 6 8 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.7.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำ Multiplex PCR โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.2 ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

นอกจากนั้นยังทำการตรวจนับจำนวน *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบหลังการบ่มในเวลาที่แปรผันดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง (Direct plating) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Sorbitol MacConkey agar ที่มีการเติม Potassium Tellurite และ Cefixime, CT-SMAC (Oxoid, England) (ภาคผนวก ข 3) ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ นำไปบ่มที่ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยลักษณะโคโลนีของ *E. coli* O157:H7 จะไม่มีสีเนื่องจากไม่สามารถใช้น้ำตาล sorbitol ได้ แต่ลักษณะโคโลนีของเชื้ออื่นๆ จะมีสีชมพู แล้วคัดเลือกโคโลนีที่ไม่มีสี บางโคโลนีไปตรวจยืนยันด้วยวิธีทางชีวเคมีโดยใช้หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Cellobiose-Lactose-Indole-β-D-Glucuronidase agar, CLIG (Kyokuto, Japan) (ภาคผนวก ข 4) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับใช้สังเกตผลทางชีวเคมีได้ โดย *E. coli* O157:H7 จะมีสีแดงบริเวณส่วนเอียง (slant) และมีสีเหลืองบริเวณก้นหลอด (butt) และไม่เรืองแสงภายใต้แสง อุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร และตรวจยืนยันด้วยวิธี serological test กับ แอนติซีรัม O157 และ H7 (S&A Reagents Lab, Thailand) โดยมีวิธีทดสอบดังนี้

หยดแอนติซีรัม *E. coli* O157 แอนติซีรัม *E. coli* H7 และน้ำเกลือ (เป็นตัวควบคุมผลลบ) อย่างละ 1 หยด ลงบน slide ที่ใสสะอาด จากนั้นเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CLIG จำนวนเล็กน้อยที่ให้ผลบวก (ในกรณีทดสอบ *E. coli* H7 ให้เขี่ยเชื้อจากบริเวณด้านล่างส่วน

slant ของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CLIG ซึ่งมีน้ำปนอยู่เพื่อให้เชื้อยังมี H antigen) นำมาผสมกับ antiserum และน้ำเกลือข้างต้น เอียง slide กลับไปมาช้าๆ ประมาณ 1 นาที อ่านผลการเกิด agglutination ถ้าให้ผลบวก (positive) จะพบปฏิกิริยาที่เป็น granular แต่น้ำเกลือให้ผลลบ (negative)

นอกจากการตรวจนับด้วยวิธี Direct plating แล้วยังทำการตรวจด้วยวิธี Immuno magnetic Separation, IMS ด้วยชุดตรวจ Dynabeads anti-*E. coli* O157 (Dynal, Norway) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเริ่มจากแยกแท่งแม่เหล็ก Magnetic Particle Concentration (Dynal MPC) และใส่หลอดไมโครฟิวจ์ในแท่น Dynal MPC-S ทำการกระจาย Dynabeads anti-*E. coli* O157 ให้ทั่ว ไม่ให้มีตะกอนที่ก้นขวด ถ่าย Dynabeads anti - *E. coli* O157 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สู่หลอดไมโครฟิวจ์แต่ละหลอด ถ่ายน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร สู่หลอดไมโครฟิวจ์ ปิดฝากลับหลอดไปมาอย่างเบา เพื่อให้เม็ด bead และน้ำเลี้ยงเชื้อผสมเข้ากัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที โดยเม็ด bead จะจับกับเซลล์เชื้อเป็น bead-bacteria complex จากนั้นใส่แท่งแม่เหล็กในแท่น Dynal MPC-S ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เพื่อให้เม็ด bead ดูดติดกับผนังของหลอดไมโครฟิวจ์ แล้วเปิดฝาหลอดดูดส่วนน้ำใสทิ้งอย่างระวัง รวมทั้งบริเวณฝาหลอด แยกแท่งแม่เหล็กออก เติมบัฟเฟอร์ PBS-Tween เพื่อล้างเม็ด bead ระวังอย่าให้ปิเปตต์สัมผัสกับหลอด เพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนสู่บัฟเฟอร์ได้ ปิดฝาหลอด กลับหลอดไปมา 2-3 นาทีให้เม็ด bead กระจายตัว โดยทำการล้างซ้ำทั้งสิ้น 3 ครั้ง หลังการล้างครั้งที่ 3 เมื่อดูดส่วนน้ำใสทิ้งแล้ว ทำการแขวนลอยเม็ด bead ที่เกาะติดกับเซลล์ *E. coli* O157:H7 ด้วย บัฟเฟอร์ PBS-Tween ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CT-SMAC เพื่อตรวจนับจำนวน *E. coli* O157:H7 ที่แยกได้ แล้วตรวจยืนยัน เช่นเดียวกับ การเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง นำผลการตรวจนับที่ได้ด้วยวิธี direct plating และ วิธี IMS มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับการตรวจด้วยวิธี Multiplex PCR

3.11.4 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบ สำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR

ทำการทดลองโดยใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.11.3 แต่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว modified *E. coli* broth ที่เติมยาปฏิชีวนะ novobiocin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร, mEC+n (ภาคผนวก ข 5) เพื่อเปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ในการบ่ม *E. coli* O157:H7 ในเนื้อดิบสำหรับการตรวจโดย Multiplex PCR