รายการอ้างอิง

Ackman, D., Marks, S., Mack, P., Caldwell, M., Root, T., and Birkhead, G. 1997. Swimming associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. Epidemiol. Infect. 119: 1–8.

Bell, B.P., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Bartleson, C.A., Lewis, J.H., Barrett, T.J., Wells, J.G., Baron, R., and Kobayashi, J., 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. J. Americ. Med. Ass. 272: 1349–1352.

Beutin, L., Montenegro, M. A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., and Stephan, R. 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 27: 2559–2564.

Bettelheim, K. A. 1998. Reliability of CHROMagar O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. J. Appl. Microbiol. 85:425–428.

Bettelheim, K.A. 1998. Studies of *Escherichia coli* cultured on Rainbow agar O157 with particular reference to enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Microbiol. Immunol. 42: 265–269.

Bilge, S. S., Vary, J. C., Jr., Dowell, S. F., and Tarr, P. I. 1996. Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. Infect. Immun. 64: 4795–4801.

Brunder, W., Schmidt, H., and Karch, H. 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. Mol. Microbiol. 24:767–778.

Calderwood, S. B., Acheson, D. W. K., Keusch, G. T., Barrett, T. J., Griffin, P. M., Strockbine, N. A., Swaminathan, B., Kaper, J. B., Levine, M. M., Kaplan, B. S., Karch, H., O'Brien, A. D., Obrig, T. G., Takeda, Y., Tarr, P. I., and Wachsmuth, I. K. 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. ASM News 62: 118–119.

Calderwood, S. B., Auclair, F., Donohue-Rolfe, A., Keusch, G. T., and Mekalanos, J. J. 1987. Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 4364–4368.

Cebula, T. A., Payne, W. L., and Feng, P. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 33: 248–250. (Erratum, 33:1048.)

Chart, H. 2002. *Escherichia*. In Greenwood, D., Slack, R. C. B., and Peutherer, J. F. (ed), Medical Microbiology A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. 16th ed. pp. 265-264. London: Churchill Livingstone.

Chapman, P.A., Siddons, CA., Zadik, P. M., and Jewel, L. 1991. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol. 35: 107-110.

Chen, J., Johnson, R., and Griffiths, M. 1998. Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* by magnetic capture-hybridization PCR. Appl. Environ. Microbiol. 64: 147– 152.

Chiueh, LC., Chen, FR., and Shih, D. YC. 2001. Evaluation of commercially available kits for detection of *Escherichia coli* O157. J. Food Drug Anal. 9: 207-214.

Clavero, M. R. S., and L. R. Beuchat. 1995. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3268–3273.

De Boer, E. 1999. Methods for shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Appl. Microbiol. 87: 19 (Supplement).

DeGrandis, S., Ginsberg, J., Toone, M., Climie, S., Friesen, J., and Brun- ton, J. 1987. Nucleotide sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. J. Bacteriol. 169: 4313– 4319.

Doyle, M.P., and Schoeni, J.L. 1984. Survival and growth characteristic of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Appl. Environ. Microbiol. 48: 855– 856.

Donnenberg, M. S., Kaper, J. B., and Finlay, B. B. 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. Trends Microbiol. 5: 109–114.

Frankel, G., Candy, D. C. A., Fabiani, E., Adu-Bobie, J., Gil S., Novakova, M., Phillips, A. D., and Dougan, G. 1995. Molecular characterization of a carboxy- terminal cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli.* Infect. Immun. 63: 4323–4328.

Fratamico, P. M., Bhaduri, S., and Buchanan, R. L. 1993. Studies on *Escherichia coli* serotype O157:H7 strains containing a 60-MDa plasmid and on 60-MDa plasmid-cured derivatives. J. Med. Microbiol. 39: 371–381.

Fratamico, P. M., Sackitey, S. K., Wiedmann, M., and Deng, M. Y. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 33: 2188–2191.

Fukushima, H., Hashizume, T., and Kitani, T. 1997. The massive outbreak of enterohemorrhagic *E. coli* O157 infections by food poisoning among the elementary school children in Sakai, Japan, in 1996, abstr. V6/VII, p. 111. *In* 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Inc., Melville, NY.

Gannon, V. P. J., King, R. K., Kim, J. Y., and Thomas, E. J. 1992. Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3809–3815.

Gannon, V. P. J., Rashed, M., King, R. K., and Thomas E. J. G. 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31: 1268–1274.

Goldwater, P. N., and Bettelheim K. A. 1994. The role of enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes other than O157:H7 as causes of disease, *In* M. A. Karmali and A. G. Goglio (ed.), Recent advances in verocytotoxin producing *Escherichia coli* infections. pp. 57–60. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

Gooding, P. M., Choudary, P. V. 1997. Rapid and sensitive immunomagnetic separation-polymerase chain reaction method for the detction of *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk and ice-crem. J. Dairy. Res. 64: 87-93.

Gorden, J., and Small, P. L. C. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. Infect. Immun. 61: 364–367. 114.

Griffin, P. M., Bell, B. P., Cieslak, P. R., Tuttle, J., Barrett, T. J., Doyle, M. P., McNamara, A. M., Shefer, A. M., and Wells, J. G. 1994. Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in the Western United States: the big picture. *In* M. A. Karmali and A. G. Goglio (ed.), Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. pp. 7–12. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

Gunzer, F., Bohm, H., Russmann, H., Bitzan, M., Aleksic, S., and Karch, H. 1992. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 30: 1807–1810.

Habib, N. F., and Jackson M. P. 1993. Roles of a ribosome-binding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga toxin genes. J. Bacteriol. 175: 597–603.

Hitchins, A. D., Feng, P., Watkins, W. D., Rippey, S. R., and Chandler, L. A. 1998. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Chapter 4 In FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. pp. 4.01-4.29. Gaithersburg: AOAC International.

Jackson, M. P., Neill R. J., O'Brien A. D., Holmes R. K., and Newland J. W. 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. FEMS Microbiol. Lett. 44: 109–114.

Jay, M. J., 2000. Foodborne gastroenteritis caused by *Escherichia coli*. In Modern Food Microbiology, 6th ed. NY: An Aspen Publication.

Karch, H., and Meyer, T. 1989a. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 27: 1180–1186.

Karch, H., and Meyer, T. 1989b. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27: 2751–2757.

Karmali, M. A., Steele, B. T., Petric, M., and Lim, C. 1983. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxinproducing *Escherichia coli*. Lancet i: 619–620.

Kleanthous, H., Smith, H. R., Scotland, S. M., Gross, R. J., Rowe, B., Taylor, C. M., and Milford, D. V. 1990. Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles, 1985–8: association with verocytotoxin producing *Escherichia coli*. 2. Microbiological aspects. Arch. Dis. Child. 65: 722–727.

Konowalchuk, J., Speirs, J. I., and Stavric, S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 18: 775–779.

Lekowska-Kochaniak, A., Czajkowska, D., and Popowski, J. 2002. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in raw meat by immunomagnetic separation and multiplex PCR. Acta Microbiol Pol. 51: 327-37.

Louie, M., De-Azavedo, J., Clarke, R., Borczyk, A., Lior, H., Richter, M., and Brunton, J. 1994. Sequence heterogeneity of the *eae* gene and detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. Epidemiol. Infect. 112: 449–461.

Louie, M., De-Azavedo, J. C. S., Handelsman, M. Y. C., Clark, C. G., Ally B., Dytoc, M., Sherman, P., and Brunton, J. 1993. Expression and characterization of the *eaeA* gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. Infect. Immun. 61: 4085–4092.

Makino, K., Yokoyama, K., Kubota, Y., Yutsudo, C.H., Kimura, S., Kurokawa, K., Ishii, K., Hattori, M., Tatsuno, I., Abe, H., Iida, T., Yamamoto, K., Onishi, M., Hayashi, T., Yasunaga, T., Honda, T., Sasakawa, C., and Shinagawa, H. 1999. Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying theverotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7derived from the Sakai outbreak. Genes Genet. Syst. 74: 227-239.

March, S. B., and S. Ratnam. 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. 23: 869–872.

Maurer, J. J., Schmid, D., Peterosko, P., Sanchez, S., Bolton, L., and Lee, M. D. 1999. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2954–2960.

Marques, L. R. M., Peiris, J. S. M., Cryz, S. J., and O'Brien, A. D. 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs produce a variant of Shiga-like toxin II. FEMS Microbiol. Lett. 44: 33–38.

Neill, M. A., Tarr, P. I., and Taylor, D. V. 1994. *Escherichia coli* In Y.H. Hui, J.R. Gorham, K.D. Murrell, et al (ed), Foodborne Disease Handbook: Diseases Caused by Bacteria, pp. 169-213. NY: Marcel Dekker.

Newland, J. W., and Neill, R. J. 1988. DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin-converting bacteriophages. J. Clin. Microbiol. 26: 1292– 1297.

O'Brien, A. D., and La Veck, G. D. 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. Infect. Immun. 40: 675–683.

Oelschlaeger, T. A., Barrett, T. J., and Kopecko, D. J. 1994. Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. Infect. Immun. 62: 5142–5150.

Okrend, A. J. G., Rose B. E., and Lattuada C. P., 1990. Use of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. J. Food Prot. 53: 941–943.

Paton, A. W., and Paton, J. C. 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*1, *stx*2, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*O111, and *rfb*O157. J. Clin. Microbiol. 36: 598–602.

Paton, J. C., and Paton, A. W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11: 450–479

Paton, A. W., Paton, J. C., Goldwater, P. N., and Manning, P. A. 1993. Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31: 3063–3067.

Paton, A. W., Ratcliff, R., Doyle, R. M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J. A., and Paton, J. C. 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 34: 1622–1627.

Perry, M. B., and Bundle, D. R. 1990. Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermanii* strains with those of *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. Infect. Immun. 58: 1391–1395.

Pollard, D. R., Johnson W. M., Lior H., Tyler S. D., and Rozee K. R. 1990. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 28: 540–545.

Powell, H. A., Gooding C. M., Garrett S. D., Lund B. M., and McKee R. A. 1994. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. Lett. Appl. Microbiol. 18: 59–61.

Radu, S., Mutalib, S. A., Rusul, G., Ahmad, Z., Morigaki, T., Asai, N., Kim, Y. B., Okuda, J., and Nishibuchi, M. 1998. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in the beef marketed in Malaysia. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1153–1156.

Reida, P., Wolff, M., Pohls, H. W., Kuhlmann, W., Lehmacher, A., Aleksic, S., Karch, H., and Bockemuhl, J. 1994. An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis. 281: 534–543.

Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., and Cohen, M. L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308: 681–685.

Sandhu, K. S., Clarke, R. C., McFadden, K., Brouwer, A., Louie, M., Wilson, J., Lior, H., and Gyles, C. L. 1996. Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. Epidemiol. Infect. 116: 1–7.

Sata, S., Osawa R., Asahi Y., and Yamai S. 1999. Growth of starved *Escherichia coli* O157 cells in selective and non-selective media. Microbiol. Immunol.43: 217–227.

Savarino, S. J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M. K., Levine, M. M., and Fasano, A. 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. J. Infect. Dis. 173:1019–1022.

Schmidt, H., Beutin, L., and Karch, H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. 63: 1055–1061.

Sharar, A. K. ,and Rose, B.E. 1998. Detection, isolation, and identification of *Escherichia coli* O157:H7 AND O157:NM (nonmotile) from meat products. Chapter 5 In The Microbiology Laboratory Guidebook, 3rd ed. USDA Food Safety Inspection Service.

Stephens, P. J., and Johnson, J. A. 1998. Direct inoculation into media containing bile salts and antibiotics is unsuitable for the detection of acid/salt stressed *Escherichia coli* O157:H7. Lett. Appl. Microbiol. 27: 147–151.

Strockbine, N. A., Jackson, M. P., Sung, L. M., Holmes, R. K., and O'Brien, A. D. 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. J. Bacteriol. 170: 1116–1122.

Strockbine, N. A., Marques, L. R. M., Newland, J. W., Smith, H. W., Holmes, R. K., and O'Brien, A. D. 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. Infect. Immun. 53: 135–140.

Suthienkul, O., Brown J. E., Seriwatana J., Tienthongdee, S., Sastravaha, S., and Echeverria, P. 1990. Shiga-Like-Toxin-Producing *Escherichia coli* in Retail Meats and Cattle in Thailand. Appl. Environ. Microbiol. 56:1135-1139.

Szabo, R. A., Todd E. C. D., and Jean A. 1980. Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food. J. Food Prot. 49: 768–772.

Thomas, A., Smith, H. R., Willshaw, G. A., and Rowe, B. 1991. Non-radioactively labelled polynucleotide and oligonucleotide DNA probes, for selectively detecting *Escherichia coli* strains producing Vero cytotoxins VT1, VT2, and VT2 variant. Mol. Cell. Probes 5: 129–135.

Thompson, J. S., Hodge, D. S., and Borczyk, A. A. 1990. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. J. Clin. Microbiol. 28: 2165–2168.

Tortorello, M. L. 2000. *Escherichia coli* O157. In R. K. Robinson, C. A. Batt, and P. D. Patel (ed.), Encyclopedia of food microbiology, 1 vol. pp. 646–652. London: Academic Press.

Ueda, S., Mineno, J., and Kuwabara, Y. 1999. Evaluation of the PCR Method for the Detection of Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Foods and Other Materials. J. Antibact. Antifung. Agents. 27: 441-446.

Vuddhakul, V. , Patararungrong, N., Pungrasamee, P.,Jitsurong, S., Morigaki, T., Asai, N., and Nishibuchi, M. 2000. Isolation and characterization of Escherichia coli O157 from retail beef and bovine feces in Thailand. FEMS Microbiol. Lett. 182: 343–347.

Wang, L., and Reeves, P.R. 1998. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. Infect. Immun. 66: 3545-3551.

Weagant, S.D., Bryant, J.L., and Jinneman, K.G. 1995. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. J. Food Prot. 58: 7–12.

Willshaw, G. A., Scotland, S. M., Smith, H. R., Cheasty, T., Thomas, A., and Rowe, B. 1994. Hybridization of strains of *Escherichia coli* O157 with probes derived from the *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* and the *eaeA* homolog from a Vero cytotoxin-producing strain of *E. coli* O157. J. Clin. Microbiol. 32: 897–902.

Willshaw, G. A., Smith, H. R., Scotland, S. M., Field, A. M., and Rowe, B. 1987. Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding Vero cytotoxins: comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. J. Gen. Microbiol. 133: 1309–1317.

Wilson, I. G. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63:3741-3751.

Wilson, I. G., and Heaney, J. C. N. 1999. Surveillance for *Escherichia coli* and other pathogens in retail premises. Dairy Food Environ. Sanit. 19:170-179.

Wright, D.J., Chapman, P.A., Siddons, C.A. 1994. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. Epidemiol Infect. 113: 31– 39.

Yokoyama, K., Makino, K., Kubota, Y., Watanabe, M., Kimura, S., Yutsudo, C.H., Kurokawa, K., Ishii, K., Hattori, M., Tatsuno, I., Abe, H., Yoh, M., Iida, T., Ohnishi, M., Hayashi, T., Yasunaga, T., Honda, T., Sasakawa, C., and Shinagawa, H. 2000. Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. Gene. 258: 127-139.

Zadik, P.M., Chapman, P.A., and Siddons, C.A., 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol. 39: 155–158.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** Tryptic soy broth (TSB broth) (Difco Lab., USA)

เคซีน ที่ถูกย่อยด้วย แพนคลีเอติก (pancreatic digest of casein)	10.0	กรัม
ซอยบีน มิล ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic digest of soybean meal)	3.0	กรัม
เดกซ์โทส (dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2PO_4)	2.5	กรัม

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้น้ำหนัก 30.0 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง** Sorbitol MacConkey **ที่มีการเติม** Potassium Tellurite **และ** Cefixime (CT-SMAC agar) (Oxoid, England)

เปปโตน (peptone)	20.0	กรัม
ซอร์บิทอล (sobitol)	10.0	กรัม
เกลือน้ำดี (bile salt No 3)	1.50	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
นิวทัล เรด (neutral red)	0.03	กรัม
คริสตัล ไวโอเลต (crystral vioret)	0.001	กรัม
วุ้น (agar)	15.0	กรัม

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้น้ำหนัก 51.0 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50 ^{o}ซ จึงเติมสารละลาย Cefixime Tellurite ซึ่งละลายในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง** Cellobiose-Lactose-Indole-β-D-Glucuronidase (CLIG agar) (Kyokuto, Japan)

เคซีน เปปโตน (casien peptone)	7.5	กรัม
มีท เปปโตน (meat peptone)	2.5	กรัม
แลคโตส (lactose)	1.0	กรัม
เซลโลไบโอส (cellobiose)	10.0	กรัม
ทริบโตเฟน (tryptophane)	0.1	กรัม
4-เมทิวอัมเบริเฟริว เบต้า ดี กลูคูโลไนด์ (MUG)	0.02	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ฟีนอล เรด (phenol red)	0.025	กรัม
วุ้น (agar)	14.9	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้น้ำหนัก 41 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. นำไปหล่อมละลาย แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดล่ะประมาณ 2.5-3.0 มิลลิลิตร จึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 115 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที

5. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว** modified *E. coli* broth **ที่เติม ยาปฏิชีวนะ** novobiocin (mEC+n) (Kyokuto, Japan)

ทริปโตน (tryptone)	20.0	กรัม
เกลือน้ำดี (bile salt No 3)	1.12	กรัม
แลคโตส (lactose)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	4.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮไดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ยาปฏิชีวนะ novobiocin	0.025	กรัม

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้น้ำหนัก 36.6 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. **กลีเซอรอล**

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบหนึ่ง

2. **ชุดทดสอบสำเร็จ** O157 (Verocytotoxin Genes) PCR Typing Set (Takara, Japan)

ประกอบด้วย

Takara ExTaq™ (Takara, Japan)

10X *ExTaq*™ buffer

dNTP mixture

EVT-1 primer

EVT-2 primer

EVS-1 primer

EVS-2 primer

Control template EC2

Control template EC3

ดำเนินปฏิกิริยาตามกรรมวิธีที่ให้โดยบริษัทผู้ผลิต

3. **ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล** QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer QG

Buffer PF

Buffer PB

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Collection tube

QIAquick Spin colum

ทำการสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธีที่ให้โดยบริษัทผู้ผลิต

4. **สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0**

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1	กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42	มล.

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

5. **สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0**

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \bullet 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

6. **บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0**

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำ

ปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

7. **บัฟเฟอร์** 5X Tris-acetate (TBE)

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	242	กรัม
กรดบอริกเข้มข้น	27.5	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	20	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

8. **สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์** TBE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TBE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยโปรแกรม BlastN version 2.2.7

Query หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ในงานวิจัยนี้

Sbjct หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปรียบเทียบใน GenBank

1. ผลจากการเทียบความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ของ vt_1

```
gi|11875068|dbj|AP000400.1| (AP000400) Escherichia coli O157:H7 genomic DNA,
prophage (Sakai-VT1) inserted region, substrain:RIMD 0509952 Length = 56480

 Score =  186 bits (94), Expect = 2e-44
 Identities = 148/172 (86%), Gaps = 1/172 (0%)
 Strand = Plus / Plus


Query: 23    attantgcttccaaaagaaattntttctacacgnacagagtcttgnccatgataatcagg 82
              |||| |||||||||||||||| || ||||||| |||||||||| |||||||||||||
Sbjct: 37106 attaatgcttccaaaagaaattcttcctacacgaacagagtcttgtccatgataatcagg 37165


Query: 83    cnggacncgtnctcaaccttccccagttcantgtnagatcaacatnttcagnagtnntta 142
              | |||| | | ||||||||||||||||||| ||| |||||||||| ||||| |||  |||
Sbjct: 37166 caggacac-tactcaaccttccccagttcaatgtaagatcaacatcttcagcagtcatta 37224


Query: 143   cataagancgcccnctgagatnatncagtgntgnncgaaatccnctntgtat 194
              ||||||| ||||| ||||||| || ||||| ||  |||||||| || |||||
Sbjct: 37225 cataagaacgcccactgagatcatccagtgttgtacgaaatcccctctgtat 37276
```

2. ผลจากการเทียบความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ของ vt_2

```
gi|7649819|dbj|AP000422.1| (AP000422) Escherichia coli O157:H7 genomic DNA,
Sakai-VT2 prophage inserted region Length = 65510

 Score =  206 bits (104), Expect = 1e-50
 Identities = 146/163 (89%), Gaps = 1/163 (0%)
 Strand = Plus / Plus


Query: 30    cgangacgccgggganacgtggaccncactcnnaactgggggcnaatcaacaangtgcttc 89
              ||| |||||||||| ||||||||| |||||  |||||||||| ||||| ||| |||||||
Sbjct: 22137 cgatgacgccgggagacgtggacctcactctgaactgggggcgaatcagcaatgtgcttc 22196


Query: 90    cggantatcggggganaggatggtgtcanantggngagaatatccttnattaatatatcaa 149
              |||| ||||||||| |||||||||||| | ||| |||||||||||| | ||||||||||
Sbjct: 22197 cggagtatcggggagaggatggtgtcagagtggggagaatatcctttaataatatatcag 22256
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
Query: 150    cgatactggggactgtggccgtta-actgaattgccatcatca 191
              ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct: 22257 cgatactggggactgtggccgttatactgaattgccatcatca 22299
```

3. ผลจากการเทียบความเหมือนของผลิตภัณฑ์ PCR ของ rfb_{O157}

```
gi|3435170|gb|AF061251.1|AF061251 (AAD15752) Eschericia coli serotype
O157:H7 O antigen gene cluster  complete cds  Length = 14002

 Score =  712 bits (359), Expect = 0.0
 Identities = 382/391 (97%), Gaps = 1/391 (0%)
 Strand = Plus / Plus


Query: 5     cgtactcgggatgaattgaacttgttggatagtagcgctgttttggannnnnnnncttca 64
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct: 7692 cgtactcgggatgaattgaacttgttggatagtagcgctgttttggatttttttcttca 7751


Query: 65    cagaaaatcgaccaggtttatttggcagcagcaaaagtcggagagtattttagctaacag 124
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct: 7752 cagaaaatcgaccaggtttatttggcagcagcaaaagtcggag-gtattttagctaacag 7810


Query: 125   ttcttatcctgccgattttatatatgagaatataatgatagaggcgaatgtcattcatgc 184
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 7811 ttcttatcctgccgattttatatatgagaatataatgatagaggcgaatgtcattcatgc 7870


Query: 185   tgcccacaaaaataatgtaaataaactgcttttcctcggttcgtcgtgtatttatcctaa 244
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 7871 tgcccacaaaaataatgtaaataaactgcttttcctcggttcgtcgtgtatttatcctaa 7930


Query: 245   gttagcacaccaaccgattatggaagacgaattattacaagggaaacttgagccaacaaa 304
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 7931 gttagcacaccaaccgattatggaagacgaattattacaagggaaacttgagccaacaaa 7990


Query: 305   tgaaccttatgctatcgcaaaaattgcaggtattaaattatgtgaatcttataaccgtca 364
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 7991 tgaaccttatgctatcgcaaaaattgcaggtattaaattatgtgaatcttataaccgtca 8050


Query: 365   gtttgggcgtgattaccgttcagtaatgcca 395
              |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 8051 gtttgggcgtgattaccgttcagtaatgcca 8081
```

การเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนโดยโปรแกรม BlastX version 2.2.7

Query หมายถึง ลำดับกรดอะมิโนในงานวิจัยนี้

Sbjct หมายถึง ลำดับกรดอะมิโนที่เปรียบเทียบใน GenBank

\+ หมายถึง กรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกัน

1. ผลจากการเทียบความเหมือนของ vt_1

```
gi|11875111|dbj|BAB19590.1| (BAB19590)  shiga toxin 1 subunit A [Escherichia
coli O157:H7]  Length = 315

Score = 47.4 bits (111), Expect(2) = 2e-11
 Identities = 23/38 (60%), Positives = 24/38 (63%)
 Frame = -2

Query: 203 FVGIXXGFRXXLXXLXGRSYVXTXEXVDLTXNWGRLXT 90
           F  I  GFR  L  L GRSYV T E VDLT NWGRL +
Sbjct: 193 FRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSS 230
```

2. ผลจากการเทียบความเหมือนของ vt_2

```
gi|7649862|dbj|BAA94140.1| (BAA94140)  shiga toxin 2 subunit A [Escherichia
coli O157:H7]  Length = 319

 Score = 63.9 bits (154), Expect = 7e-10
 Identities = 32/46 (69%), Positives = 33/46 (71%)
 Frame = +3

Query: 39  TPGXVDXTXNWGXINXVLPXYRGXDGVXXXRISXINISTILGTVAV 176
           TPG VD T NWG I+ VLP YRG DGV   RIS  NIS ILGTVAV
Sbjct: 214 TPGDVDLTLNWGRISNVLPEYRGEDGVRVGRISFNNISAILGTVAV 259
```

3. ผลจากการเทียบความเหมือนของ rfb_{O157}

```
gi|4321415|gb|AAD15752.1| (AAD15752)  RfbB [Escherichia coli]  Length = 208

 Score =  198 bits (504), Expect = 1e-50
 Identities = 99/114 (86%), Positives = 101/114 (88%)
 Frame = +3

Query: 54  FFLHRKSTRFIWQQQKSESILANSSYPADFIYENIMIEANVIHAAHKNNVNKLLFLGSSC 233
           FF  +K  +      K   ILANSSYPADFIYENIMIEANVIHAAHKNNVNKLLFLGSSC
Sbjct: 50  FFSSQKIDQVYLAAAKVGGILANSSYPADFIYENIMIEANVIHAAHKNNVNKLLFLGSSC 109

Query: 234 IYPKLAHQPIMEDELLQGKLEPTNEPYAIAKIAGIKLCESYNRQFGRDYRSVMP 395
           IYPKLAHQPIMEDELLQGKLEPTNEPYAIAKIAGIKLCESYNRQFGRDYRSVMP
Sbjct: 110 IYPKLAHQPIMEDELLQGKLEPTNEPYAIAKIAGIKLCESYNRQFGRDYRSVMP 163
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายอภิรักษ์ วิเศษศรีพงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 17 กรกฎาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย