175652

อภิรักษ์ วิเศษศรีพงษ์ : การตรวจหา *Escherichia coli* O157:H7 ในเนื้อดิบโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (DETECTION OF *Escherichia coli* O157:H7 IN RAW MEAT BY POLYMERASE CHAIN REACTION) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. ดร. อรษา สุตเธียรกุล, ผศ. ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ 86 หน้า. ISBN 974-17-4759-4

การพัฒนาวิธีที่รวดเร็วสำหรับการตรวจหา *Escherichia coli* O157:H7 โดยวิธี Multiplex PCR การตรวจหาปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญของสายพันธุ์นี้คือ *vt* ซึ่งประมวลรหัสวีโรทอกซิน และ rfb_{O157} ซึ่งประมวลรหัสการสร้าง O-แอนติเจนด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์สองคู่ Multiplex PCR แสดงผลิตภัณฑ์ 2 ขนาดคือ 215 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ *vt* และ 420 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ rfb_{O157} ตามลำดับ ภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสายพันธุ์บริสุทธิ์ โดย Multiplex PCR คือใช้ อุณหภูมิ annealing 55 ^{o}ซ และ $MgCl_2$ 3.0 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ วิธีนี้สามารถตรวจหาสายพันธุ์ O157:H7 ด้วยความไวที่มีเชื้อประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร และไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR จากแบคทีเรียก่อโรคอื่น 15 ชนิด นอกจาก *Shigella dysenteriae* type 1 Multiplex PCR ยังสามารถใช้เพื่อตรวจหา *E. coli* O157:H7 ที่เติมในเนื้อดิบ หลังการบ่มเนื้อดิบ 25 กรัมใน tryptic soy broth ที่ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง Multiplex PCR ที่มีการเติม 100 ไมโครกรัม bovine serum albumin สามารถแสดงผลิตภัณฑ์ PCR 2 ขนาดที่จำเพาะสำหรับ *E. coli* O157:H7 Multiplex PCR ที่ได้รับการดัดแปลงนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วและใช้สำหรับคัดกรองในการตรวจ *E. coli* O157:H7 ที่มีความไวและจำเพาะและสามารถใช้เป็นทางเลือกเพื่อการบ่งชี้สายพันธุ์ O157 ในตัวอย่างเนื้อดิบแทนวิธีที่ใช้กันทั่วไป

4372478623 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY **175652**

KEY WORD: *Escherichia coli* O157:H7 / POLYMERASE CHAIN REACTION / Multiplex PCR

APIRAK VISETSRIPONG : DETECTION OF *Escherichia coli* O157:H7 IN RAW MEAT BY POLYMERASE CHAIN REACTION. THESIS ADVISER : ASSIST. PROF. JIRAPORN THANIYAVARN, THESIS COADVISOR : PROF. ORASA SUTHEINKUL, ASSIST. PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, 86 pp. ISBN: 974-17-4759-4

A rapid method for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using Multiplex PCR was developed. Two oligonucleotide primer pairs were used for detection of genes *vt* encoding verotoxin an important virulence factor of this strain and rfb_{O157} encoding the O-antigen of *E. coli* O157:H7. The Multiplex PCR revealed two PCR products of 215 bp and 420 bp for *vt* and rfb_{O157}, respectively. Optimum condition for Multiplex PCR detection of pure culture strain was annealing temperature at 55 ^{o}C and 3.0 mM of $MgCl_2$. The present method could detect the strain O157:H7 with sensitivity down to 10^5 CFU per ml. No PCR products were obtained from 15 other pathogenic bacteria except *Shigella dysenteriae* type 1. Multiplex PCR was also applicable for the detection of *E. coli* O157:H7 in raw meat. After incubation of 25 gram raw meat in tryptic soy broth at 37 ^{o}C for of 8 h, Multiplex PCR with additional 100 μg bovine serum albumin gave two PCR products specific for *E. coli* O157:H7. This modified Multiplex PCR is a potential rapid for sensitive and specific for the detection and screening *E. coli* O157:H7 and can be used for the detection of strain O157:H7 in raw meat in alternative to the conventional methods.