

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonellae* อย่างรวดเร็ว
ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี
immunomagnetic enrichment และ enzyme
immunoassay

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ยุวดี มหาคุณกิจเจริญ
และคณะ

30 มิถุนายน 2544

Scan S



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonellae* อย่างรวดเร็ว
ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี
immunomagnetic enrichment และ enzyme
immunoassay

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ยุวดี มหาคุณกิจเจริญ
และคณะ

30 มิถุนายน 2544

Seam S

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonellae* อย่างรวดเร็ว
ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี
immunomagnetic enrichment และ enzyme
immunoassay

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ยุวดี	มหาคุณกิจเจริญ
รองศาสตราจารย์ประมวญ	เทพชัยศรี
รองศาสตราจารย์มนัส	จงสงวน
นางยุวพร	สากลวารี
ศาสตราจารย์วันเพ็ญ	ชัยคำภา

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการดำเนินการจากโครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอกของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณผู้อำนวยการสกว. ผู้อำนวยการฝ่ายสนับสนุนการวิจัยเชิงวิชาการและเจ้าหน้าที่ของสกว. ที่ได้ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงานด้วยดีตลอดระยะเวลาดำเนินโครงการ

ผู้วิจัยกราบขอบคุณศาสตราจารย์วันเพ็ญ ชัยคำภา ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาโครงการและให้การสนับสนุนการวิจัยโดยให้ความอนุเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์ รวมถึงเป็นกำลังใจในการแก้ปัญหาต่างๆ ที่ผู้วิจัยประสบตลอดช่วงเวลาที่ดำเนินโครงการ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ประมวญ เทพชัยศรี หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล และที่ปรึกษาโครงการวิจัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาในด้านต่างๆ และอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์มนัส จงสงวน ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดลผู้ร่วมโครงการวิจัยที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัยในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณคุณอุษวพร สากุลวารี และดร. ธาธิรรัตน์ กะลัมพะเหติ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล และอาจารย์พรพรรณ ศิริพัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการจัดหาตัวอย่างอาหาร การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจนการจัดทำรายงานการวิจัยและให้กำลังใจในการดำเนินโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณคุณจิตติมา วงศาโรจน์ และคุณลักขณาภรณ์ คงเจริญพร กองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข คุณอรุณ บ้างตระกูลวงศ์ และคุณศรียรัตน์ พรเรืองวงศ์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความร่วมมือในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonellae* ในตัวอย่างอาหาร โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ในท้ายที่สุดขอขอบคุณดร. จักรกริช หิรัญเพชรรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้ให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์ผลการวิจัยและเป็นกำลังใจในการดำเนินการวิจัยและการแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินงาน

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonellae* อย่างรวดเร็วในตัวอย่างอาหารโดยวิธี

immunomagnetic enrichment และ enzyme immunoassay

ยุวดี มหาคุณกิจเจริญ ประมวญ เทพชัยศรี มนัส จงสงวน ยุวพร สากลวารี

และ วันเพ็ญ ชัยคำภา

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ *Salmonellae* ในตัวอย่างอาหารผู้วิจัยใช้ Ab-reacted beads (goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads ที่ react กับ *Salmonella*-specific rabbit Igs) จับเชื้อ *Salmonellae* และ/หรือ antigens ของเชื้อในตัวอย่างอาหาร จากนั้นจึงแยก antigen captured beads ออกจากส่วนน้ำของตัวอย่างตรวจด้วยอำนาจแม่เหล็ก เมื่อ resuspend beads ใน medium ปริมาณน้อยๆ จึงทำให้ความเข้มข้น (concentration) ของเชื้อหรือ antigens ที่จับอยู่กับ beads เพิ่มขึ้น (การแยกเชื้อโดยวิธีนี้เรียกว่า immunomagnetic enrichment [IME]) จากนั้นจึงนำ beads มาตรวจหาเชื้อต่อด้วยวิธี monoclonal antibody (MAb)-based dot-blot ELISA ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ BioMag beads ซึ่งมีข้อดีกว่า beads ชนิดอื่นๆ ที่มีจำหน่ายในขณะนี้เพราะสามารถเกาะติดกับแผ่น nitrocellulose membrane ได้ดีกว่า ไม่ร่อนหลุดง่ายเหมือน beads อื่น และพบว่าการเพิ่มขั้นตอนการแยกเชื้อด้วย Ab-reacted beads ก่อนนำไปตรวจด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA ให้ผลดี (sensitive) กว่าตรวจด้วย MAb-based dot-blot ELISA เพียงอย่างเดียว เนื่องจากสามารถอ่านผลจากปฏิกิริยากับเชื้อในระดับ 10^5 cfu/ml ได้ชัดเจนขึ้น นอกจากนี้ยังเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเดิม วิธีใหม่นี้มีความไวและความถูกต้องแม่นยำประมาณ 72.81-96.55% และ 58.33-68.29% ตามลำดับ และไม่พบผลบวกปลอม วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจได้ทั้งเชื้อที่ยังมีชีวิต เชื้อที่ตายแล้ว รวมถึงชิ้นส่วนของเชื้อด้วย ซึ่งวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจะตรวจได้แต่เพียงเชื้อที่ค่อนข้างสมบูรณ์และสามารถ resuscitate ได้โดย enrichment culture media เท่านั้น แม้ว่าตัวอย่างอาหารที่จะตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีใหม่นี้จะต้องนำมาบ่มเชื้อใน tryptic soy broth (TSB) อย่างน้อย 18 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกเชื้อด้วย beads รวมเวลาการตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดประมาณ 20-24 ชั่วโมง แต่ก็ยังเร็วกว่าเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมาก ช่วยลดระยะเวลาในการเก็บผลิตภัณฑ์เพื่อรอผลการตรวจก่อนการส่งออก ซึ่งนอกจากเป็นการลดค่าใช้จ่ายแล้วยังเป็นการช่วยรักษาคุณภาพอาหารด้วย และไม่มีของเสียที่ติดเชื้อเหลือจากการเพาะเลี้ยงเชื้ออันเป็นปัญหาสำคัญทั้งทางเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม

Abstract

Project Code: PDF/17/2541

Rapid detection of *Salmonellae* in contaminated foods by immunomagnetic enrichment and enzyme immunoassay

Yuvadee Mahakunkijcharoen, Pramuan Tapchaisri, Manas Chongsa-nguan, Yuwaporn Sakolvaree and Wanpen Chaicumpa

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine,
Mahidol University

E-mail address: tmymh@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years (July 1998 to June 2001)

We established a method for rapid detection of *Salmonellae* in contaminated food by immunomagnetic enrichment (IME) in combination with enzyme immunoassay. Ab-reacted beads (goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads [BioMag] binding to *Salmonella*-specific rabbit immunoglobulins [RIg]) were used to capture the bacteria and/or their antigens in food samples. The antigen-capturing beads were collected using a magnetic power and resuspended in a small volume of medium. MAb-based dot-blot ELISA was then proceeded to detect the bacteria bound to the beads by using *Salmonella*-specific monoclonal antibody (MAb 102 B₂). The BioMag superparamagnetic beads were suitable for this study because of their superior ability to adsorb onto nitrocellulose membrane (NC). Our results showed that IME combining MAb-based dot-blot ELISA (IME/MAb-based dot-blot ELISA) was able to detect as less as 10⁵ cfu/ml of *Salmonellae* in culture suspension. It should be noted that food samples should be cultured in tryptic soy broth (TSB) for at least 18 hours before the test. Although the sensitivity of the IME/MAb-based dot-blot ELISA was not significantly higher than that of the MAb-based dot-blot ELISA alone, the reaction of the former test observed on the NC was stronger. In comparison with conventional culture method, the sensitivity and accuracy of IME/MAb-based dot-blot ELISA were about 72.81-96.55% and 58.33-68.29%, respectively, with no false positive results. The test was able to detect both lived- and dead- bacteria or even antigens of the bacteria. Moreover, it took totally 20-24 hours for the whole process with much less amount of waste products. This method is thus useful for detection of the bacteria in food products before

exportation. The less time consuming in detection process is more advantage not only in reducing cost for food preservation but also in maintaining the food quality.

Keywords: immunomagnetic enrichment, superparamagnetic beads, Salmonellae

Executive Summary

1. ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย): การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae อย่างรวดเร็วในตัวอย่างอาหารโดยวิธี immunomagnetic enrichment และ enzyme immunoassay

(ภาษาอังกฤษ): Rapid detection of Salmonellae in contaminated foods by immunomagnetic enrichment and enzyme immunoassay

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ

ยุวดี มหาคุณกิจเจริญ

Yuvadee Mahakunkijcharoen

ตำแหน่ง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 7

คุณวุฒิ

วท. บ. (เทคนิคการแพทย์)

M. Sc. (Tropical Medicine)

Ph. D (Pathology, Microbiology and Immunology)

สถานที่ทำงาน

ภาควิชาจุลชีววิทยา และอิมมูโนโลยี

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน, มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)

246-0312, 246-9000 ต่อ 1595, 1592

โทรศัพท์ (ที่บ้าน)

653-9890

โทรสาร

643-5583

E-mail

tmymh@mahidol.ac.th

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพ (การพัฒนาวิธีการแยกและตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยวิธีทาง immunology)

4. งบประมาณทั้งโครงการ 400,000 บาท

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 3 ปี

6. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อที่ปนเปื้อนในอาหาร ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน มีขั้นตอนซับซ้อนและใช้เวลามากคือ เริ่มจากการสุมเพาะเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอาหารใน pre-enrichment media จากนั้นใช้ selective enrichment media เพื่อเลือกเฉพาะเชื้อที่เป็น pathogens หรือเชื้อที่ต้องการตรวจหาให้เจริญเติบโตขณะที่เชื้ออื่นๆจะตายไป จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อใน selective/ differential media เมื่อได้เชื้อในลักษณะ pure culture แล้วจึงสามารถนำไปตรวจยืนยัน

ชนิดของเชื้อต่อไปโดยวิธีทาง biochemistry และ/หรือ immunology ซึ่งขั้นตอนการตรวจยืนยันนี้ ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการต่างๆ ที่ทำได้รวดเร็วและได้ผลแม่นยำ แต่กระนั้นก็ตาม การตรวจวิเคราะห์โดยรวมแล้วยังคงใช้เวลาอย่างน้อย 4-5 วัน ทั้งนี้ เนื่องจากต้องเสียเวลาในการแยกเชื้อและเตรียม pure culture หรือ อย่างน้อยต้อง enrich เชื้อให้มีจำนวนมากพอสำหรับการตรวจขั้นต่อไป

7. วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาวิธี enrich เชื้อจากตัวอย่างอาหารด้วย วิธี immunomagnetic enrichment (IME) โดยใช้ Ab-reacted beads (goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads ที่ทำปฏิกิริยากับ *Salmonella*-specific rabbit immunoglobulins [RIGs]) ในการติดตามจับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ใน culture ของตัวอย่างอาหาร จากนั้นแยก beads ออกจาก culture ของตัวอย่างอาหาร ด้วยอำนาจแม่เหล็กและทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อที่เกาะกับ beads ด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA (เรียกวิธีการนี้ว่า IME/MAb-based dot-blot ELISA) ด้วยวิธีนี้ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถลดเวลาที่ใช้ในขั้นตอน pre-enrichment และ selection ลงได้ ทำให้ตรวจวิเคราะห์เชื้อได้รวดเร็วขึ้น เชื้อ bacteria ที่จะใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Salmonellae*

8. ระเบียบวิธีวิจัย

8.1 เตรียมการตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA

โดยการผลิต MAb 102 B₂ ให้ได้ปริมาณมากๆ MAb 102 B₂ เป็น monoclonal antibodies ที่ผลิตจาก hybrid ของ cells จากม้ามของหนูที่ immunized ด้วย Barber antigen ของเชื้อ *S. Typhi* strain O901 และ Sp2/0 myeloma cells จากการศึกษาของศาสตราจารย์วันเพ็ญ ชัยคำภาและคณะพบว่า MAbs นี้ทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อ core polysaccharide ของเชื้อใน genus *Salmonella* แต่ไม่มีปฏิกิริยากับเชื้อ bacteria อื่น

8.2 เลือก superparamagnetic beads ที่เหมาะสม

ผู้วิจัยใช้ goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads (BioMag, Cambridge) ซึ่งทดสอบแล้วว่าไม่มี non-specific reaction กับ MAb 102 B₂ ที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยวิธี dot-blot ELISA นอกจากนี้ยังสามารถเกาะติดแผ่น nitrocellulose membrane ได้ไม่หลุดง่ายเมื่อผ่านขั้นตอนการล้างหลายๆ ครั้งในขั้นตอนการของ MAb-based dot-blot ELISA ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีกว่า superparamagnetic beads ชนิดอื่นๆ

8.3 หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Salmonella*-specific rabbit immunoglobulins (RIGs)

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Salmonella*-specific RIGs ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ superparamagnetic beads แล้วได้ Ab-reacted beads ที่สามารถจับเชื้อ *Salmonellae* จาก

pure culture ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด เท่ากับ 100 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นกับชนิดของ rabbit anti-sera

8.4 เลือก diluent ที่เหมาะสมในการเตรียม Ab-reacted beads

ผู้วิจัยทดลองแล้วพบว่าการใช้ physiological saline (NSS) เป็น diluent ให้ปฏิกิริยาเท่ากับ การใช้ diluent อื่นๆ เช่น phosphate buffered saline (PBS) หรือ Tris-HCl แต่ NSS มีราคาถูก และเตรียมง่ายที่สุด ผู้วิจัยจึงเลือก NSS เป็น diluent ในการเตรียม Ab-reacted beads

8.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม Ab-reacted beads

จากผลการทดลองพบว่า การทำปฏิกิริยาระหว่าง superparamagnetic beads และ *Salmonella*-specific RIGs ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมงให้ Ab-reacted beads ที่มีประสิทธิภาพในการจับเชื้อ *Salmonellae* เท่ากับ เมื่อเตรียม Ab-reacted beads ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่ 4°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

8.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการ enrich เชื้อ bacteria ด้วย Ab-reacted beads (IME) จากตัวอย่างจำลองที่เป็น pure culture

ผู้วิจัยพบว่าการใช้ tryptic soy broth (TSB) เป็น medium สำหรับการเพาะเชื้อจากตัวอย่างอาหารก่อนนำมา enrich ด้วย Ab-reacted beads และตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วย MAb-based dot-blot ELISA (IME/MAb-based dot-blot ELISA) ให้ผลดีกว่าการใช้ medium อื่นๆ เช่น buffered peptone water, selenite cystine, tetrathionate broth และ NSS ที่มี และไม่มี CaCl_2

8.7 ประเมินประสิทธิภาพของ IME/MAb-based dot-blot ELISA โดย

8.7.1 ศึกษาความไวและความจำเพาะของวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA โดยทดลอง enrich เชื้อ *Salmonellae* ที่ผสมอยู่กับ pure culture ของเชื้ออื่นๆ และตัวอย่างอาหารที่ seeded เชื้อ *Salmonellae* ที่ทราบจำนวนลงไป

ผู้วิจัยพบว่า วิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA ตรวจเชื้อได้ในความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ 10^1 cfu/ml ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธีการตรวจด้วย MAb-based dot-blot ELISA อย่างเดียว แต่การตรวจโดยวิธีใหม่นี้ให้ปฏิกิริยาที่ strong ขึ้น โดยดูจากสีที่เข้มกว่าการตรวจด้วย MAb-based dot-blot ELISA โดยไม่ผ่านการ enrich ด้วย Ab-reacted beads และการตรวจหาเชื้อ *Salmonellae* โดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA นี้จะไม่ถูกรบกวนด้วยเชื้อ bacteria อื่นๆ เช่น *E. coli* แม้จะมีความหนาแน่นมากถึง 10^7 cfu/ml

8.7.2 นำวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA มาใช้ enrich เชื้อจากอาหารสดหรืออาหารแช่แข็งที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด เช่น เนื้อไก่สด เนื้อไก่แช่แข็ง เนื้อหมู เป็นต้น

ผู้วิจัยได้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonellae* ในตัวอย่างอาหารต่างๆ เช่น เนื้อไก่สด เนื้อหมูสด อาหารแปรรูป (ลูกชิ้น แหนม หมูยอ) อาหารปรุงสำเร็จ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ วิธี IME/MAb-based

dot-blot ELISA พบว่ามี sensitivity ประมาณ 72.81-96.55% และมี specificity ประมาณ 22.58-55.56% และ accuracy ของ test ประมาณ 58.33-68.29% และเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจวิเคราะห์ ด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA โดยไม่ผ่านการแยกเชื้อด้วย Ab-reacted beads วิธี MAb-based dot-blot ELISA จะมีค่า sensitivity ประมาณ 75.86-95.24% และมี specificity ประมาณ 28.57-73.68% และ accuracy ของ test ประมาณ 48.33-76.67% โดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA ไม่ให้ผลบวกปลอมเลย

9. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

วิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจตัวอย่างอาหารหรือตัวอย่างตรวจจากคนไข้ ซึ่งจะได้ผลรวดเร็วกว่าวิธีการตรวจโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเดิมและลดปัญหาการต้องกำจัดของเสียที่เกิดจากการเพาะเชื้อ

10. ผลงานตีพิมพ์

กำลังเตรียม manuscript เพื่อตีพิมพ์

สารบัญเนื้อหา

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
Executive summary	v
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	7
ผลการทดลอง	14
บทวิจารณ์	30
เอกสารอ้างอิง	52

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae	35

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 1	แสดงวิธีการตรวจหา pathogenic bacteria ในอาหาร โดยวิธีต่างๆ	36
แผนภูมิที่ 2	แสดงวิธี MAb-based dot blot ELISA	37
แผนภูมิที่ 3	แสดงวิธี Immunomagnetic enrichment (IME)	38

สารบัญรูป (Figures)

หน้า

Figure 1	Determination of optimal concentration of rabbit Igs specific to <i>Salmonella</i> -specific rabbit Igs to produce Ab-reacted beads	39
Figure 2	Determination of optimal concentration of to <i>Salmonella</i> -specific rabbit Igs	40
Figure 3	The results of experiments performed to determine the appropriate amount of superparamagnetic beads used for immunomagenetic enrichment (IME)	41
Figure 4	Results of experiments performed to increase the sensitivity of immunomagnetic enrichment (IME)	42
Figure 5	The results of experiments performed to determine the appropriate time of immunomagenetic enrichment (IME)	43
Figure 6	Study of specificity of immunomagnetic enrichment (IME)	44
Figure 7	Study of specificity of immunomagnetic enrichment (IME)	45
Figure 8	Study of specificity of immunomagnetic enrichment (IME)	46
Figure 9	Study of the interference effect of other bacteria on immunomagnetic enrichment (IME)	47
Figure 10	Comparative study of binding efficiency of BioMag beads and other superparamagnetic beads to <i>S. Weltevreden</i>	48

Figure 11	Detection of seeded bacteria in food culture by immuno- magnetic enrichment (IME) and MAb-based dot-blot ELISA	49
Figure 12	Agarose gel electrophoresis pattern of PCR products from Various bacterial genomic DNA amplified by PDU6 PDU7 Primers	50
Figure 13	Study of sensitivity of PCR technique for detection of Salmonellae in bacterial suspension	51

บทนำ

การปนเปื้อนของจุลชีพ (microorganisms) ในผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นปัญหาสำคัญยิ่งของอุตสาหกรรมอาหาร การจัดจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่มี microorganisms ปนเปื้อน นับเป็นการแพร่กระจายโรค และอาจรุนแรงถึงขั้นก่อให้เกิดโรคระบาดที่ขยายวงกว้างไปทั่วโลก ดังนั้นประเทศที่นำเข้าผลิตภัณฑ์อาหารจึงมักเข้มงวดในคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ ประเทศผู้ส่งออกจึงต้องพิถีพิถันในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับของประเทศผู้รับซื้อ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม การส่งออกผลิตภัณฑ์ทางเกษตรกรรม โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์อาหารจัดได้ว่าเป็นรายได้สำคัญอันดับต้นๆ ของประเทศ ด้วยเหตุที่ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน มีโรคอุจจาระร่วงและโรคติดเชื้อทางลำไส้เป็นปัญหาใหญ่ ซึ่งเป็นผลให้อาหารที่ส่งออกจากประเทศมักถูกระงับว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดโรคนี้นั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อที่ก่อโรคเหล่านี้ในผลิตภัณฑ์อาหารก่อนการส่งออก ในระหว่างการตรวจวิเคราะห์นี้ ผู้ผลิตหรือผู้ส่งออกจำเป็นต้องเก็บรักษาอาหารในห้องเย็น ซึ่งถ้าใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์นาน ก็จะยิ่งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาอาหารในห้องเย็นมากขึ้น ค่าใช้จ่ายในส่วนนี้นับเป็นส่วนหนึ่งของต้นทุนการผลิต ยังผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้อาหารจะสูญเสียความสด ทำให้ด้อยคุณภาพลงไป ท้ายที่สุดก็จะเป็นปัญหาในการแข่งขันการส่งออก ดังนั้นหากสามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ให้สั้นลงได้ ก็จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตและรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เพิ่มโอกาสให้บริษัทผู้ส่งออก สามารถแข่งขันกับประเทศคู่แข่งอื่นๆ ได้

เชื้อ *Salmonellae* เป็นเชื้อ bacteria ที่พบปนเปื้อนในอาหารได้บ่อย และพบได้ทั่วโลกทั้งในเขตอบอุ่น และเขตร้อน เชื้อนี้ก่อให้เกิดโรค salmonellosis ซึ่งความรุนแรงของโรค มีหลายระดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและภาวะภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ พยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อสามารถแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะใหญ่ๆ (Falkow *et al.*, 1990) ดังนี้

1. Enterocolitis (เดิมเรียก gastroenteritis) เป็นอาการทั่วไปของการติดเชื้อ *Salmonellae* โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *S. Typhimurium* ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ มีไข้ต่ำและ/หรืออุจจาระร่วงซึ่งอาการอาจเล็กน้อยจนถึงรุนแรงมาก

2. Enteric fever (typhoid fever) เชื้อที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพนี้ ได้แก่ *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* เป็นต้น ผู้ป่วยจะมีอาการครั่นเนื้อครั่นตัว เบื่ออาหาร ปวดศีรษะ และมีไข้ ซึ่งอุณหภูมิร่างกายจะสูงขึ้นตามลำดับ หัวใจเต้นเร็ว ปวดเมื่อยและขาอ่อนกำลัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัปดาห์แรก ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่มีอาการอุจจาระร่วง แต่อาจจะมีไข้และมีอาการหลอดเลือดอักเสบ อาจมีผื่นขึ้นตามตัวที่เรียกว่า “rose spot” ม้ามโต และเม็ดเลือดขาวน้อย ในรายที่เป็นมากอาจจะสมองอักเสบ มี

ความวิตกกังวลและประสาทหลอน ในสัปดาห์ที่สามอาการจะลดลง ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง อาจมีแผล (ulcer) ที่ Peyer's patches เป็นสาเหตุให้เลือดออกในลำไส้และลำไส้ทะลุถึงตาย ต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกายและม้ามขยายใหญ่

3. Septicaemia พยาธิสภาพนี้พบมากในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. Cholerae-suis* จะพบเชื้อในกระแสโลหิต และอวัยวะอื่น ๆ เช่น ปอด กระดูก เยื่อหุ้มสมอง แต่มักไม่พบเชื้อในลำไส้ ผู้ป่วยจะมีไข้สูงและมีเชื้อในกระแสเลือด แต่มักจะไม่มีอาการที่ทางเดินอาหาร เชื้ออาจก่อให้เกิดฝี (abscess) ที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายได้ เช่น ในท่อน้ำดี ไต หัวใจ ม้าม เยื่อหุ้มสมอง ข้อต่อกระดูกและปอด เป็นต้น

ความรู้เกี่ยวกับเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค

Bacteria ใน genus *Salmonella* มีลักษณะเป็นรูปแท่ง ติดสีแกรมลบ อยู่ใน Family Enterobacteriaceae แบ่งเป็น 2 species คือ *S. enterica* และ *S. bongori*

S. enterica มี 6 subspecies :

<i>S. enterica</i> subspecies enterica (subsp I)	>1435 serovars
<i>S. enterica</i> subspecies salamae (subsp II)	>485 serovars
<i>S. enterica</i> subspecies arizonae (subsp IIIa)	>94 serovars
<i>S. enterica</i> subspecies diarizonae (subsp IIIb)	>321 serovars
<i>S. enterica</i> subspecies houtenae (subsp IV)	>69 serovars
<i>S. enterica</i> subspecies indica (subsp V)	>11 serovars

S. bongori 20 serovars

เชื้อใน genus นี้ส่วนมากจะเคลื่อนไหวได้ โดยอาศัย peritrichous flagella ยกเว้น *Salmonella Pullorum* และ *S. Gallinarum* เชื้อพวกนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยง bacteria ธรรมดา แต่ส่วนใหญ่จะไม่ ferment lactose หรือ sucrose เชื้อ Salmonellae ผลิตกรดและก๊าซจาก glucose และ mannose และมักจะผลิต H_2S เชื้อ Salmonellae สามารถอยู่ในน้ำที่เย็นจนแข็งได้เป็นเวลานาน และสามารถทนสารเคมีบางอย่างได้ค่อนข้างดี เมื่อเทียบกับ enteric bacteria อื่นๆ เช่น ทนต่อ brilliant green, sodium tetrathionate, sodium deoxycholate ซึ่งสารเหล่านี้จะยับยั้ง การเจริญเติบโตของ enteric bacteria ตัวอื่นๆ ดังนั้นสารเคมีเหล่านี้จึงมักถูกเติมลงไปในการอาหารสำหรับการแยกเชื้อ Salmonellae จากอุจจาระซึ่งโดยปกติจะมี enteric bacteria รวมกันอยู่หลายชนิดและเป็นจำนวนมาก

วิธีตรวจหาเชื้อ Salmonellae ในปัจจุบัน ทำได้ดังนี้ (แผนภูมิที่ 1)

I. วิธีเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ เชื้อ Salmonellae

โดยทั่วไปอาหารที่เตรียมเพื่อการจำหน่าย ผู้ผลิตมักเติม preservative ลงไปหรือแช่เย็น (จนแข็ง) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อต่างๆ เชื้อ Salmonellae จึงมักจะไม่ได้อยู่ในสภาพสมบูรณ์เหมือนที่พบในสิ่งส่งตรวจจากคนไข้ (clinical specimens) การแยกเชื้อจากตัวอย่างอาหารจึงต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถฟื้นฟูเชื้อ (resuscitate) ให้อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ขึ้น และพร้อมจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนต่อไปได้ เรียกขั้นตอนนี้ว่า pre-enrichment อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด pre-enrichment ที่ใช้ได้ดี ได้แก่ buffered peptone water (BPW) หรือ tryptic soy broth (TSB) เป็นต้น ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง (Fricker *et. al.*, 1987)

เชื้อที่ผ่านขั้นตอน pre-enrichment จะถูกนำไป ใส่ใน selective enrichment media เช่น selenite cystine หรือ tetrathionate broth ซึ่ง media ทั้งสองชนิดนี้จะยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ bacteria อื่นๆ แต่จะช่วยให้ Salmonellae เจริญเติบโตได้ค่อนข้างดีแม้ว่าส่วนหนึ่งที่ไม่แข็งแรงพออาจตายไปก็ตาม หลังจาก incubate ในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้แล้ว 1-2 วัน จึงนำไป plate ลงบน differential หรือ selective media เช่น MacConkey, Salmonellae-Shigella (SS) agar, Hektoen enteric agar หรือ deoxycholate citrate agar ซึ่งเชื้อ Salmonella และ Shigella จะเจริญเติบโตได้ดี ดังนั้นเชื้อที่ได้จากขั้นตอนนี้จะ เป็น pure culture พร้อมทั้งจะใช้ในการตรวจขั้นต่อไป

การยืนยันชนิดของเชื้อขั้นต่อไป ทำได้หลายวิธีดังนี้

1. Biochemical reaction(s) เมื่อได้ผลตรงตามปฏิกิริยาว่าเป็น Salmonellae (ดังแสดงในตารางที่ 1) แล้วจึงนำเชื้อไปทำ slide agglutination test คือ polyvalent และ group specific anti-sera ต่อไป วิธีเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ เชื้อนี้ เป็นวิธีวินิจฉัยเชื้อ Salmonellae ที่เฉพาะ (specific) ที่สุด แต่มีข้อเสียหลายประการ เช่น ต้องมีห้องปฏิบัติการและบุคลากรทางจุลชีววิทยาที่พร้อม ใช้เวลานานหลายวัน ผลที่ได้รับมักใช้สำหรับ retrospective study หรือเป็นข้อมูลด้านวิทยาการระบาดเท่านั้น นอกจากนี้วิธีเพาะเชื้อยังไม่ค่อย sensitive อาจต้องทำซ้ำหลายๆ ครั้งเพื่อความมั่นใจ

2. Miniaturized biochemical assays ซึ่งคือ test kits ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจ biochemical reactions ของเชื้อให้รวดเร็วขึ้น ตัวอย่าง miniaturized biochemical test kits ที่มีจำหน่ายอย่างแพร่หลาย เช่น API 20E ของ bioMerieux Vittek, Enterotube II และ Enterobacteriaceae II ของ Becton Dickinson, Micro-ID ของ Organon Teknika สำหรับ identify เชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae แต่ทั้งนี้เชื้อที่จะตรวจต้องอยู่ในลักษณะของ pure culture เสียก่อน ซึ่งดังได้กล่าวแล้วว่า ขั้นตอนนี้ต้องใช้ เวลา 1-2 วัน

3. Physico-chemical assays วิธีการนี้อาศัยหลักการคือ วัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อ bacteria มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน เช่น

- เมื่อ bacteria มี metabolic activities ทำให้ส่วนประกอบของอาหารเปลี่ยนไป ตัวอย่างเช่น Bactometer ของ bioMérieux Vittek ซึ่งนำมาใช้นับจำนวน coliform bacteria ในเนื้อสัตว์ นับ yeast cells ในน้ำผลไม้ ตรวจหา Salmonellae ในอาหารและนํ้านม เป็นต้น

- การใช้ fluorescence เพื่อนับจำนวน viable bacteria โดยใช้หลักการที่ acridine orange (AO) ซึ่งเป็น fluorochrome ชนิดหนึ่ง เมื่อ AO จับกับ double stranded DNA monomeric form แล้วจะปล่อยแสง green fluorescence ออกมา แต่เมื่อจับกับ single stranded RNA polymeric form ใน actively dividing cells จะปล่อย orange fluorescence ออกมา

- การใช้ gas chromatography เพื่อ analyse fatty acid

- ตรวจการใช้ carbon sources ต่างๆ ในขบวนการ respiration ของ bacteria โดยใช้ colorimetry

แต่วิธีที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นนี้ มีข้อจำกัดคือจะต้องเตรียมเชื้อในสภาพ pure culture เสียก่อนและต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ยุ่งยากและ/หรือราคาแพง

ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยไม่ต้องใช้ pure culture แต่ก็ต้อง enrich เชื้อให้มีปริมาณมากพอซึ่งจะใช้เวลาอย่างน้อย 1 วัน รายละเอียดของวิธีการตรวจวิเคราะห์ดังจะได้นำกล่าวต่อไป

II. การตรวจหา เชื้อโดยใช้ specific antibodies (antibody-based tests)

หลักการคือใช้ specific antibodies จับกับ target antigens บน bacteria แล้วตรวจหา immune complexes ซึ่งมีวิธีทำได้หลายวิธี เช่น

- Latex particle agglutination มีการพัฒนาวิธีการนี้เพื่อตรวจหา antigens ต่างๆ เช่น flagella, lipopolysaccharide surface antigens ของ Salmonellae

- Immunofluorescent assays วิธีนี้ไม่ค่อยนิยมนัก เพราะการอ่านผลผันแปรได้ตามประสบการณ์ของคนอ่านแต่ละคน และต้องใช้เครื่องมือราคาแพง คือ fluorescence microscope

- Flow cytometry เป็นการวัด cellular DNA content และ ขนาดของ cells โดยใช้ conventional fluorescent staining และ propidium iodide staining วิธีนี้ใช้ตรวจหา *Listeria monocytogenes* ในนํ้านมดิบ แต่เนื่องจากวิธีการซับซ้อน ประกอบกับเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพงมาก วิธีนี้จึงไม่ได้รับความนิยม

- Enzyme immunoassay (EIA) มีการพัฒนาวิธีการนี้เพื่อใช้ในการตรวจหา antibodies หรือ antigens เฉพาะต่างๆ อย่างแพร่หลาย กระทั่งทำเป็น test kits จำหน่าย

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน โดย ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภาและคณะ ได้ผลิต specific monoclonal antibodies (MAbs) ต่อ core polysaccharide

ของ bacteria ใน genus *Salmonella* ชื่อ MAb 102 B₂ และต่อ antigen 9 ของ Salmonellae group D ชื่อ MAb 204 และได้พัฒนา dot blot enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยการใช้ MAbs เหล่านี้ในการตรวจหา antigens ของ Salmonellae (ใช้ MAb 102 B₂) และ antigen 9 ของ Salmonellae group D (ใช้ MAb 204) วิธีนี้ สามารถตรวจหา antigens ของเชื้อ Salmonellae ได้ทั้งในอาหารและในปัสสาวะของผู้ป่วยเพื่อวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็วและพบว่ามี sensitivity และ specificity มากกว่า 95% เมื่อเทียบกับการเพาะเชื้อจากเลือดและมีความสอดคล้องดีเยี่ยมกับวิธีการตรวจสอบพันธุกรรมโดย polymerase chain reaction (PCR)

III. การตรวจวินิจฉัยโดยวิธีทางอณูชีววิทยา (nucleic acid-based tests)

ปัจจุบันนี้ ได้มีการพัฒนาทาง molecular biology โดยใช้ DNA probe อย่างเดียว หรือใช้ PCR ร่วมกับ DNA probe เพิ่ม sensitivity ในการตรวจ gene ของ Salmonellae จนเป็นผลสำเร็จเช่นเดียวกับการวินิจฉัยเชื้ออื่นๆ ซึ่งเมื่อตรวจพบ gene ของ Salmonellae ก็จะเป็นการยืนยันการวินิจฉัย Salmonellae ที่ค่อนข้างเฉพาะ เพราะการตรวจหา gene จำเป็นต้องมี specific DNA probe(s) และ/หรือ DNA primer(s)

Salmonellae enterotoxin gene (*stx*) และ invasion gene (*invA*) เป็น genes ของ Salmonellae ที่มีการศึกษา และนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้ออย่างกว้างขวาง *stx* gene มีขนาด 260 bp (Chopra *et al.*, 1994a) และ *invA* gene มีขนาด 378 bp (Galan *et al.*, 1992)

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ ด้วยวิธีต่างๆ ที่กล่าวมา จำเป็นจะต้องใช้ pure culture หรืออย่างน้อยต้องเป็นเชื้อที่ enrich แล้ว ซึ่งการเตรียม pure culture หรือ การ enrich เชื้อจากตัวอย่างอาหาร นอกจากใช้เวลาอย่างน้อย 1-2 วัน บางครั้งก็ไม่ประสบความสำเร็จ เพราะเชื้ออยู่ในสภาพอ่อนแอเกินกว่าจะสามารถทนสภาพที่ไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโตใน selective media ได้ นอกจากนี้เชื้อที่เพาะไว้เจริญเติบโตเกินความต้องการจะเป็นปัญหาในการกำจัด contaminated materials ซึ่งนอกจากทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงานแล้ว ยังเป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นหากสามารถแยกเชื้อตัวอย่างอาหารได้โดยตรง และได้เชื้อในปริมาณที่พอจะทำการตรวจวิเคราะห์ต่อไปได้ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอน pre-enrichment และ selective enrichment แล้ว ก็จะเป็นข้อได้เปรียบหลายประการ

ในปี 1991 Widjoatmodjo และคณะได้พัฒนาวิธี magnetic immuno PCR assay (MIPA) เพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในอาหาร โดยหลักการคือใช้ magnetic beads coated ด้วย anti-Salmonellae MAb แยกเชื้อออกจากตัวอย่างอาหาร แล้วจึงตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วย PCR ของ *oriC* gene พบว่าวิธีนี้มี sensitivity และ specificity สูง สามารถตรวจพบเชื้อได้ถึงระดับ 100 cfu แม้ว่าจะมีเชื้ออื่นเช่น *Escherichia coli* ปนอยู่มากถึง 10⁷ cells ก็ตาม

การแยกเชื้อด้วย immunomagnetic enrichment (IME) สามารถแยกเชื้อจากตัวอย่างอาหารได้โดยตรง ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเพาะเลี้ยง จึงทำให้การตรวจวิเคราะห์ทำได้รวดเร็วขึ้น สามารถทราบผลได้ภายในเวลาสั้นกว่า 1 วัน ปัจจุบันมีการพัฒนาเป็น test kits จำหน่ายแล้ว แต่เป็น test kits ที่ผลิตในต่างประเทศจึงมีราคาแพง และ test kits ที่มีจำหน่ายแล้วนั้น มักจะใช้วิธีการเพาะเชื้อหรือ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อที่ผ่านการแยกด้วย immunomagnetic beads ซึ่งแม้จะมีความไวมากแต่ทั้งสองวิธีต่างก็มีข้อเสีย คือวิธีการเพาะเชื้อใช้เวลานาน มีข้อเสียที่เกิดจากการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นการระงับการกำจัด ส่วนวิธี PCR มีค่าใช้จ่ายสูงและต้องใช้เครื่องมือเฉพาะซึ่งมีราคาแพง

ดังได้กล่าวแล้วว่า ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโกลีคณเวทศาสตร์เขตร้อน ได้ผลิต MAb 102 B₂ ที่ specific ต่อ core polysaccharide ของ *Salmonellae* และได้พัฒนา dot-blot ELISA โดยการใช้ MAb นี้ในการตรวจหา antigens ของ *Salmonellae* ใน ปัสสาวะของคนไข้ และตัวอย่างอาหาร เช่น เนื้อไก่ เนื้อหมู (Chaicumpa *et al.*, 1995; Quang *et al.*, 1997; Tapchaisri *et al.*, 1999) ซึ่งแม้วิธีการตรวจวิเคราะห์นี้จะมี sensitivity สูง แต่ถ้าสามารถเพิ่มความหนาแน่นของเชื้อในตัวอย่างตรวจให้มากขึ้น ก็จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจให้ถูกต้อง แม่นยำขึ้น กลุ่มผู้วิจัยจึงต้องการพัฒนา วิธี IME โดย coat magnetic beads ด้วย specific antibodies เพื่อ rapid enrichment เชื้อในอาหารสำหรับนำมาตรวจต่อไป โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนของ pre-enrichment และ selective enrich ซึ่งน่าจะทำให้ราคาค่าตรวจถูกลงกว่า test kits ที่ผลิตจากต่างประเทศซึ่ง efficacy และ efficiency ของ test kits ยังไม่ได้นำมาตรวจจริงในประเทศไทย ด้วยหวังว่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ และการตรวจวิเคราะห์ที่สามารถทราบผลได้รวดเร็วขึ้นจะช่วยลดต้นทุนในการเก็บรักษาอาหารเพื่อรอการส่งออก เป็นการส่งเสริมการส่งออกเพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศทางหนึ่ง

วิธีการทดลอง

Bacterial Strains

เชื้อ *Salmonellae* ที่ใช้ฉีดกระต่ายเพื่อให้สร้าง antibody ที่จำเพาะต่อ *Salmonellae* (specific polyclonal antibody) ได้รับความอนุเคราะห์จากกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งเป็นเชื้อที่มีรายงานว่าตรวจพบและแยกได้จริงจากตัวอย่างอาหารและน้ำดื่มในจังหวัดอยุธยา เชื้อที่ใช้มี 3 serovars คือ *S. Weltevreden*, *S. Lexington* และ *S. Rissen*

เชื้ออื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษา specificity ของ test เป็นเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ และ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล อาทิเช่น

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Citrobacter diver</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Salmonella</i> spp. Serovars ต่างๆ เช่น	
<i>Salmonella</i> Agona	<i>Salmonella</i> Albany
<i>Salmonella</i> Amsterdam	<i>Salmonella</i> Anatum
<i>Salmonella</i> Chester	<i>Salmonella</i> Cholerae-suis
<i>Salmonella</i> Emex	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>Salmonella</i> Derby	<i>Salmonella</i> Give
<i>Salmonella</i> Hadar	<i>Salmonella</i> Kentucky
<i>Salmonella</i> Krefeld	<i>Salmonella</i> Lexington
<i>Salmonella</i> Mbandaka	<i>Salmonella</i> Panama
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	<i>Salmonella</i> Paratyphi B biovar JAVA
<i>Salmonella</i> Rissen	<i>Salmonella</i> Sandiego
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	<i>Salmonella</i> Senftenberg
<i>Salmonella</i> Stanley	<i>Salmonella</i> Typhi
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Salmonella</i> Virchow
<i>Salmonella</i> Weltevreden	<i>Salmonella</i> Worthington

การเตรียม whole cell lysate (Lysate)

การเตรียม whole cell lysate ทำโดยนำเชื้อ *Salmonellae* ที่เลี้ยงใน tryptic soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง มาเลี้ยงต่อใน tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 50 ml ใน shaking incubator ที่ 37°C ประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเชื้อมาปั่นล้างด้วย normal saline solution (NSS) ด้วยความเร็วที่ $10,000 \times g$ ที่ 4°C นาน 20 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายนำตะกอนไป suspend ในน้ำกลั่น 3 ml และนำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonicator ที่ 20 kHz ที่ 4°C นาน 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง จนแน่ใจว่า bacterial cells แตกหมด (เห็น suspension เป็นน้ำใส)

ในการหาน้ำหนักของ lysate ทำโดยชั่ง lysate ที่รู้ปริมาตรแน่นอนหลังจากทำให้แห้งสนิทด้วยการอบใต้ infrared lamp ในกระถาง aluminium foil ที่ทราบน้ำหนักอยู่ก่อนแล้ว น้ำหนักของ lysate คำนวณจาก ค่าน้ำหนักของกระถางที่มี lysate ลบด้วยค่าน้ำหนักของกระถางเปล่า

การเตรียม monoclonal antibody (MAb) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonellae*

ในปี 1988 ศาสตราจารย์วันเพ็ญ ชัยคำภาและคณะได้ประสบความสำเร็จในการผลิต monoclonal 102 B₂ ด้วยวิธี hybridoma technology โดยใช้ cells จากม้ามของหนูที่ฉีดด้วย Barber antigen ของเชื้อ *S. Typhi* strain O901 และ Sp2/0 myeloma cells เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติของ MAb ที่สร้างและหลังจาก monoclonal 102 B₂ พบว่า MAb นี้สามารถทำปฏิกิริยากับ core polysaccharides ของเชื้อ *Salmonellae* ได้

การเตรียม MAb จาก monoclonal นี้ทำโดยการเลี้ยง monoclonal ใน RPMI-1640 medium (Gibco) ที่ผสมด้วย 10% bovine serum (Flow) ในตู้บอดอุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี CO₂ อยู่ 5% จนอาหารเลี้ยง cells มีสีออกส้มอมเหลือง จึงนำ cell suspension ไปปั่นแยกส่วนน้ำ ที่ความเร็ว $500 \times g$ นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำที่มี MAb ไว้ทดสอบ Ab titre ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA (ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2)

วิธี MAb-based dot-blot ELISA มีขั้นตอนดังนี้

หยดตัวอย่างที่ต้องการตรวจปริมาตร 5 μ l ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane (NC) บน NC แผ่นเดียวกันนี้ควรมี *Salmonellae* antigens (Ag) และ non-*Salmonellae* Ag หรือสารละลาย (diluent) ที่ใช้ละลาย Ag ในปริมาตรเท่ากันหยดอยู่ด้วย เพื่อเป็น positive และ negative control ตามลำดับ ต้องเตรียมแผ่น NC ที่มีตัวอย่างตรวจและ controls หยดเหมือนกัน 2 แผ่น เมื่อหยดของตัวอย่างตรวจ และ controls แห้งสนิทจึงนำ แผ่น NC ไปแช่ใน blocking solution (PBS pH 7.4 +5% skim milk + 0.05% Tween 20) incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หลังจากล้าง แผ่น ด้วย

washing solution (PBS pH 7.4 + 0.05% Tween 20) 3 ครั้ง นำแผ่น NC แผ่นที่ 1 ไปแช่ใน working MAb 102 B₂ ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 80 indirect ELISA units/ml (MAb-reacted หรือ tested piece) และแผ่น NC แผ่นที่ 2 นำไปแช่ใน washing solution (control piece) incubate ที่ อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หลังจากล้างแผ่น NC ด้วย washing solution นำแผ่น NC ไปแช่ใน rabbit anti-mouse immunoglobulins-alkaline phosphatase conjugate ความเข้มข้น 1:2,000 โดย dilute ใน washing solution ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หลังจากล้างแผ่น NC ด้วย washing solution นำแผ่น NC แช่ใน NBT/BCIP substrate solution ประมาณ 5 นาที ในที่มืด ล้างแผ่น NC ด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา ปล่อยให้ แผ่น NC แห้งสนิทจึงอ่านผล

การแปลผล positive reaction จะปรากฏสีน้ำเงิน-ม่วง (purplish-blue color) ในขณะที่ negative reaction จะไม่ปรากฏสี positive และ negative controls ต้องให้สีถูกต้อง และต้องไม่มีสีปรากฏบน dot ใดๆ ในแผ่น control piece จึงจะอ่านผลของตัวอย่างตรวจอื่นๆ ได้

การเตรียม Salmonella-specific rabbit immunoglobulins (RIGs)

ในการศึกษาผู้วิจัยใช้ rabbit anti-Salmonella antibody จาก 2 แหล่ง คือ

1. Rabbit anti-Salmonella antibody ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ
2. Rabbit anti-Salmonella antibody ที่เตรียมจาก Salmonella polyvalent O and H specific antiserum (S & A Reagent Lab, Thailand)

การกระตุ้นกระต่ายให้สร้าง anti-Salmonella antibody

กระตุ้นกระต่ายให้สร้าง anti-Salmonella antibody (Ab) โดยการฉีดเชื้อ lived-Salmonellae ผสม 3 serovars (*S. Weltevreden*, *S. Lexington* และ *S. Rissen*) จำนวน 10^4 cfu ใน ปริมาตร 1 ml ทางเส้นเลือดดำที่ใบหูของกระต่าย และฉีดซ้ำทุก 3-4 วัน โดยแต่ละครั้งที่ฉีดจะเพิ่มจำนวนเชื้อขึ้น 10 เท่า จนจำนวนเชื้อที่ฉีดเท่ากับ 10^8 cfu/ml จึงพักการฉีด 2 สัปดาห์ แล้วจึงเจาะเลือดตรวจหาระดับ Ab ด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อ serum กระต่ายมี ระดับ Ab สูงเป็นที่พอใจ จึงเจาะเลือดประมาณ 50 ml จากหัวใจกระต่าย เพื่อนำมาแยก RIGs ต่อไป

การแยก RIGs จาก serum ของกระต่าย

Immunoglobulins (Igs) ถูกแยกจาก immunized rabbit serum โดยการตกตะกอน ด้วย วิธี saturated ammonium sulfate วิธีทำโดยสังเขปคือ ค่อยๆ เติม saturated ammonium sulfate ลงใน rabbit serum ที่แช่ไว้ในถาดน้ำแข็งที่ตั้งบน magnetic stirrer เพื่อกวนส่วนผสมตลอดเวลา จนความเข้มข้นของ ammonium sulfate เท่ากับ 50% จะเห็นตะกอนสีขาวของ RIGs เกิดขึ้น ปั่น แยกตะกอนออก แล้วนำไป dialyse กับ NSS ก่อนเก็บ RIGs ต้องปั่นแยก contaminant ต่างๆ ทิ้งไป

เก็บแต่ส่วน supernatant จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของ proteins (Rlgs) โดยใช้ Bio-Rad Protein Assay และ Ab titre ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ whole cell lysate เป็น Ag

การตรวจหาระดับ Ab ด้วยวิธี Indirect ELISA

ในการตรวจวัดระดับ Ab (Ab titre) ต่อเชื้อ Salmonellae ทั้งของ MAbs 102 B₂, immunized rabbit serum และ rabbit immunoglobulins (Rlgs) ใช้วิธี indirect ELISA ซึ่งมีวิธีการดังนี้

เคลือบหลุมของ 96 well microtitre plate (Nunc, Denmark) ด้วย Salmonellae Lysate ที่เจือจางใน carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 ความเข้มข้น 10 µg/ml ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม แล้ว incubate plate ที่ 40° C ข้ามคืน จน Ag แห้งติด plate เพื่อให้ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็น Ag เป้าหมายของ MAbs 102 B₂ เกาะติดกับ plate ได้ดี ล้าง Ag-coated wells 3 ครั้ง ด้วย Washing solution (phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 + 0.05 % Tween 20) เติม 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS ปริมาตร 200 µl ต่อหลุม incubate ในกล่องที่มีความชื้น ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้งด้วย Washing solution จากนั้นเติม MAbs 102 B₂ หรือ immunized rabbit serum หรือ rabbit immunoglobulins (Rlgs) ที่เจือจางไว้ในความเข้มข้นต่างๆ (serial two-fold dilutions) ด้วย diluent (PBS pH 7.4 + 0.2% BSA + 0.2% gelatin) โดยให้มี ปริมาตรเท่ากับ 100 µl ต่อหลุม และ ใช้ diluent ในปริมาตรเท่ากันเป็น negative control แล้ว incubate plate ในกล่องที่มีความชื้น ที่ 37°C 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้งด้วย Washing solution แล้วเติม peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1,000 dilution) หลุมละ 100 µl นำใส่ในกล่องที่มีความชื้น อบที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง

ชนิดของ peroxidase-conjugated secondary antibody ที่ใช้ขึ้นกับชนิดของ immunoglobulins ที่ต้องการตรวจ คือถ้าต้องการวัด Ab titre ของ MAbs 102 B₂, ซึ่งเป็น mouse IgG conjugate ที่ใช้คือ rabbit anti-mouse immunoglobulins-peroxidase conjugate (Dakopatt, Denmark) แต่ถ้าต้องการหา Ab titre ของ immunized rabbit serum และ Rlgs จะใช้ conjugate ที่เป็น goat anti-rabbit immunoglobulins-peroxidase conjugate (Dakopatt, Denmark) ล้าง 3 ครั้ง ด้วย Washing solution จากนั้นเติม substrate solution (*p*-phenylenediamine ใน citrate buffer pH 5.5) หลุมละ 50 µl เก็บ plate ในที่มืด 30 นาที ก่อนหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 N NaOH ลงไปหลุมละ 100 µl อ่านความเข้มของสีที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ wavelength 405 nm (OD₄₀₅)

Dilution สุดท้ายที่มีค่า OD₄₀₅ สูงกว่า OD₄₀₅ ของ negative control คือ Ab-titre

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ด้วยวิธี IME-MAb-based dot blot ELISA (แสดงในแผนภูมิที่ 3)

นำเชื้อจากตัวอย่างตรวจที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (TSB culture) ไว้แล้วอย่างน้อย 18-24 ชั่วโมง ปริมาตร 1 ml มาผสมกับ Ab-reacted beads (superparamagnetic beads ที่มี Salmonella-specific Rigs จับอยู่ที่ผิว) เพื่อให้ Ab-reacted beads จับเชื้อ Salmonellae และ/หรือ แอนติเจนของเชื้อ ใน TSB culture เมื่อแยก beads จากส่วนน้ำด้วยอำนาจแม่เหล็ก และ resuspend beads ในปริมาณน้อยๆ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 20 นาที เมื่อเย็นลง ทำให้ส่วนผสมเข้ากันดี ปั่นเบาๆ เพื่อแยกตะกอนหยาบออกไป หยดส่วนใส 5 μ l ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อด้วยวิธี MAb-based dot blot ELISA ต่อไป

สำหรับการทดสอบชนิดของ superparamagnetic beads ที่เหมาะสม ความเข้มข้นของ Salmonella-specific Rigs ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ beads และสภาวะในการทำปฏิกิริยาแต่ละขั้นตอนจะได้กล่าวโดยละเอียดในส่วนของการทดลองต่อไป

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae โดยการเพาะเชื้อ

หั่นเนื้อสดเป็นชิ้นเล็กๆ โดยสุ่มจากบริเวณต่างๆทั่วก้อนเนื้อ ชั่งให้ได้น้ำหนัก 10 กรัม ใส่ใน flask ที่มี sterilized TSB 90 ml นำไป incubate ใน shaking incubator ที่ 37°C ประมาณ 18-24 ชั่วโมง จะได้ TSB culture ของอาหารนั้น (ซึ่งจะแบ่งไปตรวจวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี IME และ PCR ต่อไป)

เมื่อครบเวลา incubate แบ่ง TSB culture ใส่ในหลอดที่มี selenite cystine (Sc) [9 ml/tube] และ tetrathionate broth (Tet) [9 ml/tube] หลอดละ 1 ml นำไป incubate ใน 37°C incubator ประมาณ 18-24 ชั่วโมง หรือค้างคืน จะได้ Sc และ Tet culture ของอาหารนั้น

นำ Sc และ Tet culture ไป streak บน MacConkey และ Salmonella-Shigella (SS) plates นำไป incubate ใน 37°C incubator ประมาณ 18-24 ชั่วโมง เลือก colony เดี่ยวๆ ที่ผลิต H₂S ซึ่งจะเห็นเป็นสีดำ หรือ colony ที่มีลักษณะ colony ของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae มา culture ต่อใน TSI tube และ biochemical tests อื่นๆ เช่น Lysine Iron Agar (LIA), Motility Indole Ornithine (MIO), urease และ citrate (อ่านผลเปรียบเทียบกับผลอ้างอิงในตารางที่ 1)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดลองใช้ modified semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV) ซึ่งเป็น semi-solid agar ในการ select เชื้อ Salmonellae เนื่องจากเชื้อ Salmonellae สามารถ motile บน MSRV agar plate ที่อุณหภูมิ 42°C (ข้อมูลจากคุณอรุณ บำรุงภูณนัท)

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ โดย *polymerase chain reaction (PCR)*

การเตรียม genomic DNA จาก bacteria

ในการแยก genomic DNA จาก bacteria นำเชื้อจาก purified TSB culture ปริมาตรประมาณ 1 ml ใส่ใน microcentrifuge tube นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง mix pellet ด้วย vortex จน pellet หลุดจากก้น tube เติม TE (Tris-EDTA pH 7.5) buffer 567 μ l vortex ให้เข้ากันดี จากนั้นเติม 10% SDS 30 μ l, Proteinase K (20 mg/ml) 3 μ l, และ Rnase (10 mg/ml) 5 μ l, ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าด้วย vortex แล้วนำไปอุ่นที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เติม 5 M NaCl 100 μ l และ CTAB 80 μ l, นำไปอุ่นต่อที่ 65 °C, 10 นาที แยก DNA ด้วย phenol/chloroform extraction และตกตะกอน DNA ด้วย absolute ethanol ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ปั่นล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol แล้วผึ่งให้ tube แห้ง เติม TE buffer 20 μ l และทิ้งให้ DNA ละลายที่ 4 °C ประมาณ 18-24 ชั่วโมง สุดท้ายตรวจสอบว่ามี DNA หรือไม่โดยวิธี agarose gel electrophoresis

การเตรียมตัวอย่างตรวจใช้วิธีของ Cano *et al.* (1993)

ผสม 100 μ l ของตัวอย่างตรวจ กับ 200 μ l ของ 5% Chelex/TE แล้วเขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex ก่อนนำไปอุ่นที่ 55 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาเขย่าด้วย vortex อีก 10 วินาที นำไปปั่นที่ 13,000 rpm นาน 4 นาที ดูดส่วนน้ำ 125 μ l ใส่ tube ใหม่ แล้วเติม 10% ของ 3M Sodium acetate และ 2 volume ของ absolute ethanol แล้ว mix โดย invert tube ไปมาหลายๆ ครั้ง ปล่อยให้ DNA ตกตะกอนที่ -20 °C ประมาณ 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงปั่นแยกตะกอน DNA ที่ 13,000 rpm นาน 25 นาที ที่ 4 °C ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol และปล่อยให้ ethanol ระเหยหมด จึงละลายตะกอนด้วย TE 20 μ l เก็บไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะใช้

Primers

ผู้วิจัยทดลองใช้ primers ที่ specific กับ gene หลายชนิด เช่น enterotoxin gene (primers *stn*-101; 5'-CTT TGG TCG TAA AAT AAG GCG-3' & *Stn*-111; 5'-TGC CCA AAG CAG AGA GAT TC-3'), *viaB* gene (primers P-7; 5'-GAC ACC ATC GCC GCC AGG-3' & p-8; 5'-GCG GCA ACG GTA AGG ACT-3'), gene ที่ encode enzyme flippase ของ *Salmonellae* (Sa-001; 5'-GCA GTC ATT GTA ACG GCA TT-3' & Sa-002; 5'-CAA ATG CTC AGG GAA CAA CC-3'), primers ที่ specific กับ *rfc* gene (Sa-003; 5'-AGG TAT GCT CGG CTT GCT AT-3' & Sa-004; 5'-CAA GCC AAG CAG CAC TCC-3'), PDU primers (unknown sequence)

PCR condition

ในการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR ใช้ DNA ที่ extract จากตัวอย่างอาหาร 5 µl ลงใน PCR mixture ปริมาตร 20 µl ซึ่งประกอบด้วย buffer, 0.1 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) *Taq* DNA polymerase (Amsham Pharmasia Biotech Inc.) 50 u, 12.5 pmol specific primers (synthesized by BSU) เพิ่มจำนวน DNA ด้วยเครื่อง thermocycler (Model 9700, Perkin Elmer Applied Biosystems) โดยมี thermocycling condition ดังนี้ คือ pre-heat ที่ 94°C 2 นาที denature double strands DNA ที่ 94 °C 45 วินาที anneal ที่ 50 °C 1 นาที extension ที่ 72 °C 1 นาที และ prolong extension ที่ 72 °C อีก 7 นาที แล้วตรวจสอบ PCR product (ซึ่ง product จาก PDU6/PDU7 primers จะมีขนาดประมาณ 463 bp) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ ความเข้มข้นของ agarose เท่ากับ 0.8% gel ใน Tris acetate buffer, pH 8.0

ตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี IME ในงานวิจัยนี้ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1. เนื้อไก่สด จำนวน 48 ตัวอย่าง
2. อาหารแปรรูปและอาหารสดจากโครงการวิจัยที่ทำร่วมกับสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 60 ตัวอย่าง
3. อาหารปรุงสำเร็จ ซึ่งผ่านการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการเพาะเชื้อ โดยกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 9 ตัวอย่าง
4. เนื้อไก่สดซึ่งทำการตรวจด้วยวิธี culture method โดยกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 123 ตัวอย่าง

ผลการทดลอง

ผลการเตรียม whole cell lysate (Lysate)

Whole cell lysate ที่ได้จาก *S. Weltevreden* มีความเข้มข้นเท่ากับ 18 mg/ml และมีปริมาตรทั้งหมด 1.5 ml รวมทั้งสิ้นได้ lysate antigen ของ *S. Weltevreden* เท่ากับ 27 mg, lysate ของ *S. Lexington* มีความเข้มข้นเท่ากับ 25 mg/ml และมีปริมาตรทั้งหมด 2 ml ดังนั้น lysate ของ *S. Lexington* รวมทั้งสิ้น 30 mg และ lysate ของ *S. Rissen* มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 mg/ml ในปริมาตรทั้งหมด 2 ml จึงมี lysate ของ *S. Rissen* รวมทั้งสิ้น 40 mg

ผลการตรวจหา Ab titre ของ MAb 102 B₂

ด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ whole cell lysate ของเชื้อ *Salmonellae* เป็น antigens เมื่อทดสอบหาระดับ Ab titre ของ supernatant จาก culture ของ monoclonal 102 B₂ พบว่ามี Ab titre เท่ากับ 1:1,024 ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงใช้ความเข้มข้นของ MAb 102 B₂ supernatant เท่ากับ 80 ELISA unit/ml

ผลการเตรียม Salmonella-specific rabbit immunoglobulins (RIGs)

เตรียม RIGs จาก *Salmonella*-immunized rabbit serum 12 ml ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย saturated ammonium sulfate ได้ RIGs ความเข้มข้น 18.91 mg/ml ในปริมาตรทั้งหมด 15 ml และมี Ab titre ต่อ *S. Weltevreden*, *S. Lexington* และ *S. Rissen* เท่ากับ 1:204,800, 1:102,400 และ 1:102,400 ตามลำดับ

RIGs ที่เตรียมจาก *Salmonellae* polyvalent O and H antiserum (S & A Reagent Lab) มีความเข้มข้น 2.78 mg/ml และมี Ab titre ต่อเชื้อ *Salmonellae* ดังนี้ คือ

Ab titre เท่ากับ 1:4,000 กับ *S. Rissen*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi A*, *S. Blockley*, และ *S. Albany*;

Ab titre เท่ากับ 1:8,000 กับ *S. Paratyphi B* biovar Java, และ *S. Typhi*;

Ab titre เท่ากับ 1:16,000 กับ *S. Cholerae-suis*;

Ab titre เท่ากับ 1:32,000 กับ *S. Lexington*

ผลการทดสอบคุณสมบัติของ *goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads*

ผู้วิจัยทดลองใช้ *goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) coated superparamagnetic beads* ของบริษัท BioMag (Advanced Magnetics, Inc., Cambridge, Mass) ซึ่งมี ขนาด 1 μm ด้วย เหตุผลที่มีราคาถูกกว่า *superparamagnetic beads* ของบริษัท Dynal มาก และใช้ *Salmonella*-specific RIg ทำปฏิกิริยากับ *superparamagnetic beads* ดังกล่าวได้เป็น Ab-reacted beads ก่อนนำ beads นี้มาใช้ติดตามจับเชื้อ *Salmonellae* ใน pure culture หรือตัวอย่างตรวจและตรวจวิเคราะห์เชื้อ ที่จับกับ Ab-reacted beads ด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA

เพื่อทดสอบความเหมาะสมของ *goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads* นี้ ในการนำมาใช้แยกเชื้อ *Salmonellae* และตรวจเชื้อโดยวิธี Ab-reacted beads ผู้วิจัยได้ทดสอบ

1. *Goat anti-rabbit IgG coated BioMag beads* นี้ให้ผล false positive ใน MAb-based dot blot ELISA หรือไม่ โดยนำ beads ที่ไม่ได้ react กับ *Salmonella*-specific RIgs และ *Salmonellae* ตามลำดับ มาหยดบน แผ่น NC ก่อนนำไปทดสอบตามวิธี MAb-based dot blot ELISA ผลการทดลองพบว่า *goat anti-rabbit IgG coated beads* ดังกล่าวไม่แสดงผล false positive แต่อย่างใด

2. *Goat anti-rabbit IgG coated BioMag beads* จับกับเชื้อ bacteria แบบ non-specific binding หรือไม่ โดย *goat anti-rabbit IgG coated beads* ผสมกับเชื้อ *Salmonellae* โดยตรง (ไม่ผ่านการ react กับ *Salmonella*-specific RIgs) ก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอน MAb-based dot blot ELISA ผลการทดลองพบว่า beads ไม่จับกับเชื้อ *Salmonellae* โดยตรง ดังนั้นการตรวจพบเชื้อบน beads จึงเป็นผลของการจับระหว่าง เชื้อ *Salmonellae* กับ specific RIgs ที่ จับอยู่กับ *goat anti-rabbit IgG* บน beads เท่านั้น

ผลการทดสอบ *diluent* ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเชื้อ *Salmonellae* กับ *Ab-reacted beads*

ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเปรียบเทียบความเหมาะสมของ *diluents* 3 ชนิด คือ physiological saline (NSS), phosphate buffered saline (PBS) และ Tris-HCl, pH 7.5 ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง *goat anti-rabbit IgG coated beads* กับ *Salmonella*-specific RIgs เพื่อให้เป็น Ab-reacted beads ก่อนนำไปจับกับ *Salmonellae* และทดสอบโดยวิธี MAb-based dot blot ELISA ผลการทดลองพบว่า การปฏิกิริยาระหว่าง *goat anti-rabbit IgG coated beads* กับ *Salmonella*-specific RIgs ใน *diluents* ทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกัน ผู้วิจัยได้พยายามเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยาระหว่าง *Salmonella*-specific RIgs กับ beads และระหว่าง Ab-reacted beads กับเชื้อ *Salmonellae* โดยใช้ *diluents* ที่มี bovine serum albumin ผสมอยู่ ตั้งแต่ 0.5-1.0% ผลปรากฏว่า bovine serum albumin

ทำให้ปฏิกิริยาการจับของเชื้อกับ RIg ต่ำลง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ NSS เป็น diluent และ washing solution เพราะมีราคาถูกที่สุดและเตรียมได้ง่ายที่สุด

ผลการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Salmonella*-specific RIgs ที่ใช้เตรียม Ab-reacted beads

เพื่อให้สามารถเตรียม Ab-reacted beads ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการจับเชื้อ *Salmonellae* ผู้วิจัย ทดลองผสม *Salmonella*-specific RIgs ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 10 µg/ml ถึง 1,000 µg/ml กับ goat anti-rabbit coated beads ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยให้หลอดทดลองที่บรรจุ beads และ RIgs หมุนไปรอบๆ ตลอดเวลาด้วย rolling shaker จากนั้น แยก excess Ab ออกไป และนำ Ab-reacted beads ไปจับกับเชื้อ *Salmonellae* ที่ความเข้มข้น ประมาณ 10^6 cfu/ml และตรวจปริมาณเชื้อที่ beads จับได้ด้วย MAb-based dot blot ELISA ผลการ ทดลองพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ rabbit anti-*S. Weltevreden*, *S. Rissen* และ *S. Lexington* Igs ที่สามารถจับกับเชื้อ *S. Weltevreden* ได้ดีที่สุดคือ 100 µg/ml (Figure 1)

สำหรับ RIgs ที่แยกจาก *Salmonellae* polyvalent O and H antiserum (S & A Reagent Lab, Thailand) ต้องใช้ความเข้มข้น 1 mg/ml จึงสามารถจับเชื้อ 10^6 cfu/ml ได้ดีที่สุด (Figure 2)

ผลการทดสอบปริมาณ goat anti-rabbit IgG coated beads ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่าง

เพื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ goat anti-rabbit IgG coated beads สำหรับใช้ตรวจจับ เชื้อ *Salmonellae* ใน pure culture หรือตัวอย่างตรวจปริมาณ 1 ml ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ beads ปริมาตร 10, 20 และ 40 µl ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า beads ในปริมาตร 20 และ 40 µl สามารถจับ เชื้อในสภาวะเดียวกันได้ใกล้เคียงกัน (Figure 3) ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดผู้วิจัยจึงใช้ beads ปริมาตร 20 µl ในการทดสอบต่อไป

ผลการทดสอบอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง goat anti-rabbit IgG coated beads กับ specific RIgs

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการ ทำปฏิกิริยาระหว่าง goat anti-rabbit IgG coated beads กับ *Salmonella*-specific RIgs ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบความสามารถในการจับเชื้อของ Ab-reacted beads ที่เตรียมโดยให้ beads ทำปฏิกิริยากับ specific RIgs ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กับ Ab-reacted beads ที่เตรียมโดยให้ beads ทำปฏิกิริยากับ specific RIgs ที่อุณหภูมิห้อง เป็น

เวลา 1 ชั่วโมงเท่ากัน ผลการทดลองพบว่าอนุภาคนิวเคลียสที่ต่างกันนี้ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของ Ab-reacted beads ในการจับกับเชื้อ

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจับเชื้อของ Ab-reacted beads ที่เตรียมจากการทำปฏิกิริยา ระหว่าง beads กับ specific RIGs ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4°C กับการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า Ab-reacted beads ที่เตรียมได้จากทั้งสองวิธี มีประสิทธิภาพในการจับกับเชื้อใกล้เคียงกัน

ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงานจริง จึงสามารถเตรียม Ab-reacted beads โดยทำปฏิกิริยากับ Salmonella-specific RIGs ไว้ข้ามคืน ที่ อุณหภูมิ 4°C หรือทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ด้วย rolling shaker ก็ได้

ผลการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการ *enrich* เชื้อใน *pure culture*

เนื่องจากในการทดสอบเพื่อเลือก diluent ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาระหว่าง goat anti-rabbit coated beads กับ Salmonella-specific RIGs ผู้วิจัยเลือกใช้ NSS เป็น diluent และ washing solution ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้ NSS เป็น diluent ในการเจือจางเชื้อ bacteria จาก pure culture ด้วย ผลการทดลองพบว่า sensitivity ของ test อยู่ที่ประมาณ 10^6 cfu/ml เพื่อเป็นการเพิ่ม sensitivity ของ test และทดสอบหา selective enrichment media ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อนี้ในการตรวจจากตัวอย่างอาหารจริง ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ NSS, tryptic soy broth (TSB), tryptic soy broth + yeast extract (TSBY), tetrathionate broth (TET) และ selenite cystine broth (SC) ทั้งที่มีและไม่มี CaCl_2 ผสม ผลการทดลองพบว่า TSB เหมาะสมที่สุดสำหรับการแยกเชื้อด้วย Ab-reacted beads (Figure 4)

ผลการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ab-reacted beads กับ bacteria

เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง bacteria กับ Ab-reacted beads ผู้วิจัยใช้ Ab-reacted beads ที่เตรียมจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง goat anti-rabbit IgG coated beads กับ Salmonella-specific RIGs ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับ bacterial suspension ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 และ 60 นาที ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า Ab-reacted beads ที่ทำปฏิกิริยากับ bacteria เป็นเวลา 60 นาที จับเชื้อได้มากกว่า Ab-reacted beads ที่ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที ในการทดสอบต่อไปจึงใช้ ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 60 นาที (Figure 5)

ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของ Ab-reacted beads

การทดสอบความจำเพาะของ Ab-reacted beads ที่เตรียมจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง goat anti-rabbit IgG coated beads กับ *Salmonella*-specific RIGs และนำไปทำปฏิกิริยากับเชื้อ bacteria ต่างๆ ดังต่อไปนี้

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter divers</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella</i> Cholerae-suis
<i>Salmonella</i> Lexington	<i>Salmonella</i> Paratyphi A
<i>Salmonella</i> Rissen	<i>Salmonella</i> Typhi
<i>Salmonella</i> Weltevreden	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio cholerae</i> O1

ผลการทดลองพบว่าเมื่อผู้วิจัยใช้ *Salmonella*-specific RIGs ที่เตรียมได้จากการ immunized กระจายด้วยเชื้อ *S. Weltevreden*, *S. Lexington* และ *S. Rissen* (ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น) Ab-reacted beads ที่เตรียมได้จะจับเฉพาะ เชื้อ *S. Weltevreden*, *S. Lexington* และ *S. Rissen* เท่านั้น แต่ไม่จับกับ bacteria อื่นๆ รวมถึงเชื้อ *Salmonellae* บาง serovars ด้วย จึงมี specificity ค่อนข้างสูง (Figures 6 & 7) ในขณะที่เมื่อใช้ RIGs ที่เตรียมได้จาก *Salmonellae* polyvalent O and H antiserum coated superparamagnetic beads, Ab-reacted beads ชนิดนี้สามารถจับ *Salmonellae* ทุก serovars ที่ทดสอบได้ (Figure 8)

ผลการทดสอบ interference binding จากเชื้ออื่นๆ

เนื่องจากโดยธรรมชาติในเนื้อสดๆ มักจะมีการปนเปื้อนของเชื้อ bacteria ต่างๆอยู่มาก ดังนั้นเพื่อศึกษาว่า เชื้ออื่นๆที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างตรวจสอบสามารถรบกวนการจับระหว่างเชื้อที่ต้องการตรวจกับ Ab-reacted beads หรือไม่ ผู้วิจัยได้ทดลองใช้เชื้อ *Escherichia coli* ในปริมาณต่างๆ ผสมกับ pure culture ของ *S. Weltevreden* (ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^6 cfu/ml) ผลการทดลองพบว่า แม้จะมี *E. coli* ปนอยู่ถึง 10^7 cfu/ml ก็ไม่รบกวนการจับระหว่าง *S. Weltevreden* กับ Ab-reacted beads (Figure 9)

ผลการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจับเชื้อของ BioMag superparamagnetic beads กับ beads ชนิดอื่นๆ

เพื่อทดสอบว่า BioMag superparamagnetic beads ที่นำมาเตรียม Ab-reacted beads มีประสิทธิภาพเหมาะสมที่สุดในการใช้แยกเชื้อจากตัวอย่างตรวจ ผู้วิจัยได้ทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ beads ดังกล่าวกับ superparamagnetic beads ชนิดอื่นๆ ได้แก่ sheep anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads (Dynalbead), anti-Salmonella IgG coated Dynabeads และ YATORON beads (superparamagnetic beads ที่ coated ด้วย anti-Salmonella flagella)

ผลการทดลองพบว่า anti-Salmonella IgG coated Dynabeads และ YATORON beads ไม่สามารถจับเชื้อใน suspension ที่มีความหนาแน่นของเชื้อ ประมาณ 10^6 cfu/ml ได้ ในขณะที่ sheep anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads (Dynalbead) มีประสิทธิภาพในการจับเชื้อใกล้เคียงกับ BioMag superparamagnetic beads แต่มี non-specific reaction เกิดขึ้น (Figure 10)

นอกจากนี้ superparamagnetic beads ทั้ง 3 ชนิด จับ nitrocellulose membrane ไม่แน่น และหลุดหายไป เมื่อผ่านการล้าง membrane หลายๆ ครั้งในขั้นตอน MAb-based dot-blot ELISA และ beads ทั้ง 3 ชนิดมีราคาแพงกว่า BioMag superparamagnetic beads มาก

ผลการตรวจตัวอย่างเนื้อไก่สด ที่ seeded เชื้อ Salmonellae ด้วยวิธีการ IME/MAb-based dot-blot ELISA

เนื่องจาก culture ของตัวอย่างอาหารมักมีจุลชีพอื่น และเศษเนื้อหลุดออกมาทำให้มีความขุ่น ซึ่งต่างกับ bacterial pure culture ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง เพื่อศึกษาถึงผลกระทบต่อความไวและความจำเพาะของ IME ที่อาจจะเกิดขึ้นจากความขุ่นและสิ่งปนเปื้อนอยู่ใน culture ของตัวอย่างอาหาร ผู้วิจัยจึงทดลองเติมเชื้อ Salmonellae ในปริมาณต่างๆ ตั้งแต่ ประมาณ 10^6 cfu/ml ถึง ประมาณ 10^3 cfu/ml ลงใน TSB culture ของตัวอย่างอาหาร และใช้ Ab-reacted beads แยกเชื้อและ/หรือแอนติเจนออกจาก culture ของตัวอย่างอาหารนั้น เมื่อทำการตรวจหาเชื้อและ/หรือแอนติเจนที่เกาะอยู่บน Ab-reacted beads ด้วย MAb-based dot-blot ELISA พบว่า ความขุ่นและสิ่งปนเปื้อนอยู่ใน culture ไม่รบกวนการจับเชื้อและ/หรือแอนติเจนที่จำเพาะกับ specific Ab บน beads เพราะ Ab-reacted beads ยังสามารถตรวจพบเชื้อที่ระดับ 10^6 cfu/ml (Figure 11)

ผลการประเมินประสิทธิภาพของ IME ในการตรวจเชื้อ *Salmonellae* ในตัวอย่างอาหารจริง

ผู้วิจัยได้ทดสอบการแยกเชื้อ *Salmonellae* ด้วยวิธี IME ในตัวอย่างอาหาร 4 กลุ่ม ดังนี้

ผลการทดลองตรวจตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 1 : เนื้อไก่สด จำนวน 48 ตัวอย่าง

เนื้อไก่สดที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จากตลาดสดในเขตคลองสานและวงเวียนใหญ่ กรุงเทพมหานคร ผู้วิจัยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไปพร้อมๆ กับการตรวจด้วย IME/MAb-based dot-blot ELISA

ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกและลบโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA เท่ากับ 27 และ 21 ตัวอย่างตามลำดับ ซึ่งในจำนวนนี้เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกและลบตรงกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อเพียง 11 และ 20 ตัวอย่างตามลำดับ (ดังแสดงผลในตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ การตรวจด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA มีค่า specificity, sensitivity และ accuracy เท่ากับ 55.56%, 91.67% และ 64.58% ตามลำดับ

ตารางที่ 2: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonellae* ในตัวอย่างที่เป็นเนื้อไก่สดโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธี การเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method)

IME/DB	Culture method		Total
	+	-	
+	11	16	27
-	1	20	21
Total	12	36	48

และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA กับวิธี MAb-based dot-blot ELISA พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกและลบตรงกันเท่ากับ 22 และ 14 ตัวอย่างตามลำดับ ทำให้วิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA มีค่า specificity, sensitivity และ accuracy เท่ากับ 73.68%, 75.86% และ 75% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างที่เป็นเนื้อไก่สดโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธี MAb-based dot-blot ELISA

IME/DB	MAb-based dot-blot ELISA		Total
	+	-	
+	22	5	27
-	7	14	21
Total	29	19	48

ผลการทดลองตรวจตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 2 : อาหารแปรรูปและอาหารสด จำนวน 60 ตัวอย่าง

อาหารแปรรูปและอาหารสดจากโครงการวิจัยที่ทำร่วมกับสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 60 ตัวอย่าง

ผู้วิจัยได้ร่วมมือกับสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข ในการตรวจวิเคราะห์ อาหารแปรรูปและอาหารสด เช่น หมูยอ แหนม ลูกชิ้นต่างๆ และ เนื้อหมูสด จำนวนรวมทั้งสิ้น 60 รายการ ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และผู้วิจัยนำ TSB culture ที่ incubate ไว้ประมาณ 18-24 ชั่วโมงมาตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยวิธี IME/MAb-based dot blot ELISA

ผลการทดลองพบว่าจากตัวอย่างจำนวน 60 ตัวอย่าง เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกเท่ากับ 52 ตัวอย่างและให้ผลลบ 8 ตัวอย่าง ในขณะที่ตรวจโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลบวก 29 ตัวอย่างและผลลบ 31 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลบวกและลบตรงกันทั้งสองวิธีเท่ากับ 28 และ 7 ตัวอย่างตามลำดับและมีตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันโดยการตรวจทั้ง 2 วิธีเท่ากับ 25 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4)

การตรวจวิเคราะห์เชื้อการตรวจด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีค่า specificity, sensitivity และ accuracy เท่ากับ 22.58%, 96.55% และ 58.33% ตามลำดับ

ตารางที่ 4: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างอาหารแปรรูปและอาหารสดโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข

IME/DB	Culture method		Total
	+	-	
+	28	24	52
-	1	7	8
Total	29	31	60

เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกเท่ากับ 46 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบเท่ากับ 14 ตัวอย่าง ดังนั้นค่า specificity, sensitivity และ accuracy ของ วิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี MAb-based dot-blot ELISA จึงเท่ากับ 28.57%, 91.3% และ 76.67% ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างอาหารแปรรูปและอาหารสดโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธี MAb-based dot-blot ELISA

IME/DB	MAb-based dot-blot ELISA		Total
	+	-	
+	42	10	52
-	4	4	8
Total	46	14	60

ในการทดลองครั้งนี้ทางสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขได้ใช้วิธีการตรวจหาเชื้อ Salmonellae โดยชุดตรวจสำเร็จรูปจากบริษัทและสถาบันต่างๆ อีก 5 วิธี คือ VIA และ Unique ของ TECRA, Oxoid, MAb-based dot-blot ELISA (TMWCC) และ PCR (primers: PDU6 and PDU7) ซึ่งพบว่าในตัวอย่างจำนวน 24 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA และให้ผลลบโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ให้ผลบวกโดยการตรวจด้วยวิธีอื่นๆ ที่กล่าวข้างต้นอย่างน้อยหนึ่งวิธี (ตารางที่ 6) จึงเห็นได้ว่าตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ อาจเป็นตัวอย่างที่มีเชื้อหรือ antigens ของเชื้ออยู่ด้วยก็ได้ แต่อย่างไรก็ตามมีตัวอย่างหนึ่งตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยการ

ตรวจด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA แต่ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ และ/หรือวิธีอื่นๆ อย่างน้อยหนึ่งวิธี ดังนั้นโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA เมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจึงมีผลที่เป็นผลลบปลอมเพียง 1 ใน 60 หรือเท่ากับ 1.67% และไม่มีผลบวกปลอมเลย

ตารางที่ 6: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างอาหารแปรรูปและอาหารสดโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและ/หรือวิธีอื่นๆ [VIA และ Unique ของ TECRA, Oxoid, MAb-based dot-blot ELISA (TMWCC) และ PCR (primers: PDU6 and PDU7)]

IME/DB culture		Other methods		Total
		+	-	
+	-	24	0	24
-	+	1	0	1
Total		25	0	25

มีตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA และให้ผลลบโดยวิธี MAb-based dot-blot ELISA และเมื่อตรวจโดยวิธีอื่นๆ ดังที่กล่าวมา ตัวอย่างทั้ง 10 ตัวอย่างให้ผลบวกด้วยวิธีการตรวจวิธีอื่นๆ อย่างน้อย 1 วิธี อย่างไรก็ตามมีตัวอย่างจำนวน 4 ตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยการตรวจด้วย IME/MAb-based dot-blot ELISA แต่ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA และเมื่อตรวจด้วยวิธีอื่น ตัวอย่าง 2 ใน 4 นี้ยังคงให้ผลลบ และตัวอย่างอีก 2 ใน 4 ให้ผลบวก ฉะนั้นโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA เมื่อเทียบกับวิธี MAb-based dot-blot ELISA จึงมีตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอมเพียง 2 ในตัวอย่างทั้งหมด 60 ตัวอย่าง หรือประมาณ 3.33% เท่านั้นและไม่มีผลบวกปลอมเลยเช่นกัน (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างอาหารแปรรูปและอาหารสดโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับ MAb-based dot-blot ELISA (DB) และ วิธีอื่นๆ [VIA และ Unique ของ TECRA, Oxoid, MAb-based dot-blot ELISA (TMWCC) และ PCR (primers: PDU6 and PDU7)]

IME/DB	DB	Other methods		Total
		+	-	
+	-	10	0	10
-	+	2	2	4
Total		12	2	14

ผลการทดลองตรวจตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 3: อาหารปรุงสำเร็จ จำนวน 9 ตัวอย่าง

อาหารปรุงสำเร็จซึ่งผ่านการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 9 ตัวอย่าง

ผู้วิจัยได้ขอความร่วมมือจากกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์อาหารปรุงสำเร็จที่จำหน่ายทั่วไป โดยขอ TSB culture ของอาหารที่ทำการตรวจวิเคราะห์อยู่มาทดสอบด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA

ผลการทดลองพบว่าตัวอย่าง TSB culture ของอาหาร ทั้ง 9 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกัน 100% ด้วยการตรวจโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA และการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทั้งผลบวกและผลลบ คือ ให้ผลบวก 2 ตัวอย่าง และผลลบ 7 ตัวอย่าง (ตารางที่ 8)

ในการทดลองนี้เมื่อเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์เชื้อกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ การตรวจด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA มีค่า specificity, sensitivity และ accuracy เท่ากับ 100.0%, 100.0% และ 100.0% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี MAb-based dot-blot ELISA วิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA มีค่า specificity, sensitivity และ accuracy เท่ากับ 100.0%, 100.0% และ 100.0% ตามลำดับเช่นกัน (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างอาหารปรุงสำเร็จ โดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธี การเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) กองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข

IME/DB	Culture method		Total
	+	-	
+	2	0	2
-	0	7	7
Total	2	7	9

ตารางที่ 9: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างอาหารปรุงสำเร็จ โดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธี MAb-based dot-blot ELISA

IME/DB	MAb-based dot-blot ELISA		Total
	+	-	
+	2	0	2
-	0	7	7
Total	2	7	9

ผลการทดลองตรวจตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 4: อาหารเนื้อไก่สด จำนวน 123 ตัวอย่าง

อาหารเนื้อไก่สดซึ่งผ่านการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 123 ตัวอย่าง

เนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี IME/MAb based dot-blot ELISA โดยใช้ตัวอย่างตรวจจากกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข ได้ผลดีเยี่ยม (ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 8 และ 9) ผู้วิจัยจึงได้ขอความร่วมมือจากหน่วยงานดังกล่าว ทำการตรวจวิเคราะห์อาหารเนื้อไก่สด โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและผู้วิจัยนำ TSB culture ของเนื้อไก่สดเหล่านั้นมาทดสอบด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA และ polymerase chain reaction (PCR)

ผู้วิจัยปรับปรุงประสิทธิภาพของวิธี IME/DB ให้ดีขึ้น โดย coat superparamagnetic beads ด้วย RIg ที่เตรียมจาก Salmonellae polyvalent O and H antiserum (S & A Reagent Lab, Thailand) ซึ่งควรจะจับเชื้อ Salmonellae ได้ครอบคลุมกว่า RIg ที่เตรียมจาก rabbit serum ที่ immunized เอง

ผลการทดลองคือ มีตัวอย่างจำนวน 83 ตัวอย่างจาก 123 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกตรงกันทั้งวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA และวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ และเพียง 1 ตัวอย่างที่ให้ผลลบตรงกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA มีค่า sensitivity และ accuracy เท่ากับ 71.68% และ 66.67% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างเนื้อไก่สด โดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture method) กองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข

IME/DB	Culture method		Total
	+	-	
+	83	8	91
-	31	1	32
Total	114	9	123

แต่เนื่องจากโดยการตรวจด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA และการเพาะเลี้ยงเชื้อมีตัวอย่างที่ให้ผลต่างกันถึง 39 ตัวอย่างจาก 123 ตัวอย่าง (ตารางที่ 10) ผู้วิจัยจึงต้องหาวิธีการตรวจวิเคราะห์อื่น เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการตรวจ วิธีที่เลือกคือ PCR เพราะเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย สะดวก รวดเร็วและทำการตรวจได้คราวละมากๆ

ผู้วิจัยทดลองใช้ primers ที่ specific กับ enterotoxin gene [*stx*] (Makino *et al.*, 1999) แต่พบว่า primers นี้ สามารถเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้ออื่นๆ เช่น *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitis* (data not shown) แต่เมื่อใช้ primers ที่ specific กับ gene อื่น เช่น *flippase*, *rfa* และ *viaB* พบว่า primers เหล่านี้เพิ่มจำนวน DNA ได้เฉพาะเชื้อ Salmonellae บาง groups เท่านั้น (data not shown) จึงไม่เหมาะสมจะใช้ในการตรวจหาเชื้อ Salmonellae ทั่วไป

โดยการติดต่อเป็นการส่วนตัวระหว่างรองศาสตราจารย์ประมวญ เทพชัยศรี หนึ่งในคณะผู้วิจัยกับรองศาสตราจารย์วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด ผู้วิจัยจึงได้รับ specific primers (PDU6 และ PDU7) ต่อเชื้อใน genus *Salmonella* มาใช้ในการทดลอง แต่เนื่องจากอยู่ในระหว่างการดำเนิน

การของคสทธิบัตร จึงไม่สามารถเปิดเผย sequence ของ primers นี้ได้ ผู้วิจัยทดลองใช้ primers คู่นี้ เพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อต่างๆ โดยวิธี PCR พบว่า primers สามารถเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อ Salmonellae ทุก serovars ที่ใช้ทดสอบ นอกจากนี้ยังสามารถ เพิ่มจำนวน DNA ของเชื้ออื่นได้เช่น *Yersinia enterocolitis* (Figure 13) แต่กระนั้นก็ตาม primers คู่นี้มีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไปด้วยเหตุผลที่มี specificity กับเชื้อ Salmonellae และมี non-specific annealing น้อยที่สุด

เมื่อทดลองใช้ primers คู่นี้ ในการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อ Salmonellae ใน pure culture ที่มีเชื้ออยู่ในปริมาณต่างๆ พบว่าโดยวิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อใน pure culture ได้ในระดับ 50 cfu (Figure 14) และเมื่อทดลองตรวจตัวอย่างอาหาร 123 ตัวอย่าง ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 11 คือ มีตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจเป็นบวกและลบตรงกับวิธี IME/MAB-based dot-blot ELISA จำนวน 50 และ 17 ตัวอย่างตามลำดับ และมีค่า sensitivity และ accuracy เท่ากับ 76.92% และ 54.47% ตามลำดับ

ตารางที่ 11: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างเนื้อไก่สด โดยวิธี IME/MAB-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธี PCR

IME/DB	PCR		Total
	+	-	
+	50	41	91
-	15	17	32
Total	65	58	123

จากตัวอย่างอาหารที่ให้ผลต่างกันในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี IME/MAB-based dot-blot ELISA และวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ 39 ตัวอย่าง มี 31 ตัวอย่างให้ผลลบโดยวิธี IME/MAB-based dot-blot ELISA แต่ให้ผลบวกโดยการตรวจด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และ 8 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดย IME/MAB-based dot-blot ELISA แต่ให้ผลลบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการตรวจด้วยวิธี PCR ผลที่ได้คือ มีตัวอย่าง 16 จาก 31 ตัวอย่างและ 4 ตัวอย่างจาก 8 ตัวอย่างให้ผลลบและผลบวกตรงกับผลการตรวจด้วยวิธี IME/MAB-based dot-blot ELISA (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างอาหารแปรรูปและอาหารสดโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและ PCR (primers: PDU6 and PDU7)

IME/DB culture		PCR		Total
		+	-	
+	-	4	4	8
-	+	15	16	31
Total		19	20	39

วิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี MAb-based dot-blot ELISA มีค่า sensitivity และ accuracy เท่ากับ 95.24% และ 48.33% ตามลำดับ (ตารางที่ 12) และมีตัวอย่างที่ให้ผลต่างกันถึง 34 ตัวอย่าง ซึ่ง 31 ตัวอย่างจากทั้งหมดนี้เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยการตรวจด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA แต่ให้ผลลบเมื่อตรวจด้วย MAb-based dot-blot ELISA และ 3 ตัวอย่างที่เหลือให้ผลลบโดยการตรวจด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA แต่ให้ผลบวกโดยการตรวจด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและ/หรือวิธี PCR มีตัวอย่าง 30 จาก 34 ตัวอย่างให้ผลตรงกับวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างเนื้อไก่สด โดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) เปรียบเทียบกับวิธี MAb-based dot-blot ELISA

IME/DB	MAb-based dot-blot ELISA		Total
	+	-	
+	60	31	91
-	3	29	32
Total	63	60	123

ตารางที่ 14: ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างอาหารแปรรูปและอาหารสดโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA (IME/DB) และ MAb-based dot-blot ELISA (DB) เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและ/หรือ PCR (primers: PDU6 and PDU7)

IME/DB	DB	Culture/PCR		Total
		+	-	
+	-	30	1	31
-	+	3	0	3
Total		33	1	34

บทวิจารณ์

วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonellae* ในตัวอย่างตรวจที่คณะผู้วิจัยต้องการพัฒนาขึ้นนี้มีหลักการ ดังนี้คือ ใช้ superparamagnetic beads (beads) ที่ coated ด้วย *Salmonella*-specific antibody (Ab-reacted beads) ไปตามจับเชื้อ *Salmonellae* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างตรวจซึ่งใส่ไว้ในหลอดทดลอง และเมื่อแนบหลอดทดลองกับแท่งแม่เหล็ก เพื่อให้แรงแม่เหล็กดูด beads มาเกาะที่ข้างหลอดทดลอง ด้านที่มีแม่เหล็กแนบอยู่ แยกส่วนน้ำทิ้งไป เมื่อ resuspend beads ใหม่ในปริมาณน้อยๆ จะได้ suspension ที่มีเชื้อหนาแน่นขึ้น เท่ากับเป็นการ enrich เชื้อ (แผนภูมิที่ 3) จากนั้นจึงนำ suspension นี้ไปต้มในน้ำเดือด นาน 20 นาที ก่อนนำมา dot บนแผ่น nitrocellulose membrane เพื่อตรวจหาเชื้อ *Salmonellae* ต่อไปด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA (แผนภูมิที่ 2)

จากการทดลองใช้ superparamagnetic beads ชนิดต่างๆ ที่มีจำหน่ายในขณะนี้ อาทิเช่น ว่า goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads (BioMag), sheep anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads (Dynalbead), anti-*Salmonella* IgG coated Dynabeads และ YATORON beads (superparamagnetic beads ที่ coated ด้วย anti-*Salmonella* flagella) มาเตรียมเป็น Ab-reacted beads ผู้วิจัยพบว่า goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads (BioMag) มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุด เนื่องจากไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ specific MAb จึงไม่ก่อปัญหาผลบวกปลอมในขั้นตอน MAb-based dot-blot ELISA และสามารถจับกับ nitrocellulose membrane ได้ดี ไม่เกิดปัญหาการล่อนหลุดของ beads จากการล้างแผ่น membrane ในขั้นตอน MAb-based dot-blot ELISA นอกจากนี้ยังมีราคาถูกกว่า superparamagnetic beads อื่นๆ ที่ทดลองใช้

ขั้นตอนการเตรียม Ab-reacted beads ผู้วิจัยใช้ goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads (BioMag) ทำปฏิกิริยากับ specific antibody ต่อเชื้อ *Salmonellae* ซึ่งเตรียมจาก serum ของกระต่าย (*Salmonella*-specific RIGs) ในความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 100 หรือ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ (ขึ้นกับ antiserum แต่ละชนิด) โดยทำปฏิกิริยาระหว่าง beads กับ *Salmonella*-specific RIGs ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

เมื่อผู้วิจัยใช้ Ab-reacted beads ในการแยกและ enrich เชื้อ *Salmonellae* ที่เพาะเลี้ยงใน TSB และนำมาตรวจวิเคราะห์ต่อด้วย MAb-based dot-blot ELISA (วิธีการตรวจวิเคราะห์นี้เรียกว่า IME/MAb-based dot-blot ELISA) พบว่า แม้ว่าประสิทธิภาพของวิธีการตรวจแบบใหม่จะตรวจเชื้อได้ในความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ 10^5 cfu/ml ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธีการตรวจด้วย MAb-based dot-blot ELISA อย่างเดียว (Chaicumpa *et.al.*, 1995) แต่การตรวจโดยวิธีใหม่นี้ให้ปฏิกิริยาที่ strong ขึ้น โดยดูจากสีที่เข้มกว่าการตรวจด้วย MAb-based dot-blot ELISA โดยไม่ผ่านการ enrich ด้วย Ab-reacted beads และการตรวจหาเชื้อ *Salmonellae* โดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA นี้จะไม่ถูกรบกวนด้วยเชื้อ bacteria อื่นๆ เช่น *E. coli* แม้จะมีความหนาแน่นมากถึง 10^7 cfu/ml

ในการทดสอบประสิทธิภาพการจับ *Salmonellae* ของ Ab-reacted beads ใน TSB culture ของเนื้อไก่สดที่ culture เป็นเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมง ก่อน seed เชื้อลงไป ซึ่งใน TSB culture นี้มีความขุ่นของเศษเนื้อ เชื้อ bacteria ต่างๆ และไขมันปะปนอยู่ ผลการศึกษาพบว่า แม้ในตัวอย่างตรวจจะมีความขุ่นมาก Ab-reacted beads ยังสามารถจับเชื้อ *Salmonellae* ได้เหมือนเดิม

ความไวของวิธีการตรวจวิเคราะห์ในระดับ 10^7 cfu/ml นี้ทำกับการทดลองของ Enroth และ Engstrand ที่ได้พัฒนาการแยกเชื้อ *Helicobacter pylori* จาก culture ด้วย superparamagnetic beads ที่ coated ด้วย sheep anti-rabbit IgG (Dynabead, Norway) ซึ่งก่อนนำมาใช้จะ react กับ rabbit anti-*helicobacter* IgG แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ ด้วยวิธี PCR กลุ่มผู้วิจัยยังรายงานว่าถ้าเก็บ culture ไว้นานขึ้น (10 วัน) เชื้อจะเปลี่ยนสภาพจาก rod shape เป็น coccoid form ความไวของการตรวจวิเคราะห์จะลดลงจากประมาณ 10^7 cfu/ml เหลือ 10^5 – 10^6 cfu/ml แต่ถ้า seeded เชื้อลงในตัวอย่างอุจจาระและน้ำ แล้วทำการตรวจด้วยวิธีการเดียวกัน ความไวของการตรวจวิเคราะห์จะอยู่ที่ 10^7 cfu/ml (Enroth & Engstrand, 1995)

ผู้วิจัยได้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA ในการตรวจตัวอย่างอาหารต่างๆ เช่น เนื้อไก่สด เนื้อหมูสด อาหารแปรรูป (ลูกชิ้น แหนม หมูยอ) อาหารปรุงสำเร็จ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ วิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA จะมี sensitivity ประมาณ 72.81-96.55% และมี specificity ประมาณ 22.58-55.56% และ accuracy ของ test ประมาณ 58.33-68.29% และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA โดยไม่ผ่านการแยกเชื้อด้วย Ab-reacted beads วิธี MAb-based dot-blot ELISA จะมีค่า sensitivity ประมาณ 75.86-95.24% และมี specificity ประมาณ 28.57-73.68% และ accuracy ของ test ประมาณ 48.33-76.67%

วิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA และ วิธี MAb-based dot-blot ELISA ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจากตัวอย่างอาหารมีความแตกต่างกันในการเพิ่มขั้นตอนการแยกเชื้อด้วย Ab-reacted beads เท่านั้น โดยที่วิธีการตรวจวิเคราะห์นั้นเหมือนกันทุกประการ แต่เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจ กลับมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าการตรวจเชื้อโดยตรงจาก TSB culture ของตัวอย่างอาหาร อาจมี interference เช่น โปรตีน ไขมัน เป็นต้น ที่แขวนลอยอยู่รอบกวนการจับของเชื้อ *Salmonellae* หรือ antigens กับแผ่น nitrocellulose membrane หรือรบกวนปฏิกิริยาในขบวนการ ELISA ได้ ซึ่งเมื่อใช้ Ab-reacted beads มาแยกเชื้อออกจากส่วนน้ำของตัวอย่างก่อนนำไปหยดบนแผ่น nitrocellulose membrane นอกจากจะทำให้เชื้อมีความเข้มข้นขึ้นแล้ว ยังช่วยกำจัดสิ่งที่เป็นเบื่อนอยู่ออกไปได้

ในการทดลองตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonellae* ในอาหารแปรรูปและอาหารสด ร่วมกับสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข (ตารางที่ 4) จะเห็นว่ามีตัวอย่างตรวจที่ให้ผลบวกโดยวิธี IME แต่ให้ผลลบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้ออยู่ถึง 24 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดนี้

ให้ผลบวกเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่นๆ เช่น VIA และ UNIQUE (TECRA), OXOID, PCR (primers; PDU6/PDU7) อย่างน้อย 1 วิธี (ตารางที่ 6) ทำให้เห็นว่าการที่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลบวกอาจไม่ใช่ผลบวกที่แท้จริง และวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA ไม่ได้ให้ผลบวกปลอม แต่ก็เป็นไปได้ว่าการตรวจโดยวิธีนี้จะตรวจได้ทั้งเชื้อที่ยังมีชีวิต เชื้อที่ตายแล้ว หรือแม้แต่ antigens ที่หลงเหลืออยู่ ซึ่งข้อสรุปที่ว่าวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA ไม่ได้ให้ผลบวกปลอมสามารถยืนยันได้จากผลการทดลองการตรวจวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี MAb-based dot-blot ELISA (ตารางที่ 5) ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่ตรงกับอยู่ 14 ตัวอย่าง ในตัวอย่างจำนวนนี้มี 10 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA แต่ให้ผลลบโดยวิธี MAb-based dot-blot ELISA ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่นๆ ดังที่กล่าวในตอนต้น ตัวอย่างทั้งหมดจะให้ผลบวกจากวิธีการต่างๆ น้อยอย่างน้อยหนึ่งวิธี ฉะนั้นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์จึงควรมีการทดสอบโดยวิธีอื่นที่เป็นที่ยอมรับร่วมด้วย

ในการทดลองศึกษาประสิทธิภาพของวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA ด้วยตัวอย่างกลุ่มที่ 4 (เนื้อไก่สด) เมื่อผู้วิจัยพบว่า มีตัวอย่างที่ให้ผลต่างกันโดยการตรวจด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA และวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อถึง 39 ตัวอย่างจาก 123 ตัวอย่าง และตัวอย่างกลุ่มเดียวกันนี้เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจไม่สัมพันธ์กันถึง 34 ตัวอย่างจาก 123 ตัวอย่าง เพื่อยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์ ผู้วิจัยเลือกวิธี PCR เป็นวิธีตรวจยืนยัน ด้วยเหตุผลที่วิธี PCR เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย สะดวก รวดเร็วและทำการตรวจได้คราวละมากๆ

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR ดังได้กล่าวแล้วว่าทำกันอย่างแพร่หลาย จนกระทั่งพัฒนาเป็นชุดตรวจสำเร็จรูป gene ที่ถูกเลือกใช้กันมากเช่น *invA* gene (Bulte *et al.*, 1995) มีรายงานว่า MAb ที่ specific กับส่วน c-terminal ของ *invA* protein สามารถ recognize protein ของ *Y. enterocolitica* ได้ (Clark *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อ *S. Litchfield* และ *S. Senftenberg* ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้แม้จะใช้ primers specific กับ *invA* gene (Rahn *et al.*, 1992)

stm gene ซึ่ง encode enterotoxin ของเชื้อ *Salmonellae* เป็นอีก gene หนึ่งที่ใช้กันมากในการทำ PCR (Chopra *et al.*, 1994b & Makino *et al.*, 1999) มีรายงานเช่นกันว่า antibody ที่ specific กับ enterotoxin นี้ สามารถ react ได้ดีกับ proteins ของ Gram negative bacteria หลายชนิดเช่น *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. และ *Citrobacter* spp. (Chopra *et al.*, 1994) และผู้วิจัยได้ทดลองทำ PCR โดยใช้ primers specific กับ *stm* gene ซึ่งรายงานโดย Makino *et al.*, ในปี 1999 พบว่า primers นี้ anneal และเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อ *Vibrio* spp., *Bacillus cereus* และ *Y. enterocolitica* ได้ (data not shown)

เมื่อผู้วิจัยใช้ *Salmonella*-specific primers ที่ designed ขึ้นเองโดยข้อมูลจาก gene bank primers ที่ specific กับ gene ที่ encode flippase และ *rfc* gene เมื่อนำมาใช้ พบว่า specific primers

เหล่านี้เป็น group specific primers เพิ่มจำนวน DNA ได้เฉพาะ Salmonellae groups B และ D เท่านั้นจึงไม่สามารถใช้ ในการตรวจวิเคราะห์ทั่วไปได้

ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ *Salmonella*-specific primers (PDU6 & PDU7; unknown sequence) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์วัฒนาลัย ปานบ้านกรัด PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 463 bp และได้ทดสอบเองแล้วว่ามี specificity ต่อเชื้อ Salmonellae มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ primers อื่นๆ แต่ sensitivity อยู่ในระดับ 10^4 cfu/ml คือสามารถตรวจได้เมื่อมีเชื้อประมาณ 50 ตัวขึ้นไป เมื่อนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อจากตัวอย่างอาหารจริงกลับพบว่า มี specificity, sensitivity และ accuracy เท่ากับ 34.0%, 78.08% และ 60.16% ตามลำดับ

ผลที่ได้นี้ใกล้เคียงกับผลของ Li และคณะ (Li *et al.*, 1996) ซึ่งพัฒนาวิธี immunomagnetic PCR (IM-PCR) โดยนำ purified IgG₃ ซึ่งเป็น MAb ที่ specific กับ 27 kDa outer membrane protein ของ mycobacteria มา coated บน superparamagnetic beads ของ BioMag (Advanced Magnetics, Inc., Cambridge) แล้วนำ Ab-reacted beads ไปติดตามจับเชื้อในตัวอย่างอุจจาระที่ seeded เชื้อที่ทราบจำนวนลงไป การยืนยันว่าเป็นเชื้อ *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex ทำโดยการ amplify fragment ขนาด 390-bp ของ gene 16S-rRNA โดยวิธี PCR คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้รายงานว่าโดยวิธีดังที่กล่าวมา สามารถตรวจพบเชื้อในระดับ 1-10 cells/ml แต่เมื่อทดลองใช้ตรวจหาเชื้อจากอุจจาระของคนไข้โรคเอดส์ เปรียบเทียบกับวิธี culture method พบว่า IM-PCR มี sensitivity เท่ากับ 82% และมี specificity เท่ากับ 50%

ดังที่กล่าวไว้ว่าในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonellae ในตัวอย่างอาหารจำนวน 123 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่ให้ผลต่างกันโดยการตรวจด้วยวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA และวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อถึง 39 ตัวอย่างจาก 123 ตัวอย่าง เมื่อตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR พบว่า มีตัวอย่าง 20 จาก 39 ตัวอย่างให้ผลการตรวจสัมพันธ์กับวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA และตัวอย่างกลุ่มเดียวกันนี้เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจไม่สัมพันธ์กันกับวิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA ถึง 34 ตัวอย่างจาก 123 ตัวอย่าง แต่เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจยืนยันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี PCR พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจตรงกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและ/หรือวิธี PCR ถึง 30 ตัวอย่าง

จากการทดลองตรวจตัวอย่างเนื้อไก่สด จำนวน 123 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการตรวจ 4 วิธีคือ วิธี IME/MAb-based dot-blot ELISA, MAb-based dot-blot ELISA, การเพาะเชื้อ และ PCR มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธีทั้ง 3 เท่ากับ 91 (73.98%), 91 (73.98%), 114 (92.68)% และ 65 (52.85%) ตามลำดับ

จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าวิธีที่ให้ผลบวกมากที่สุดคือ วิธีการเพาะเชื้อ ซึ่งน่าจะเป็นผลที่ถูกต้อง เชื่อถือได้ แต่มีข้อเสียหลายประการ คือ เป็นวิธีที่มีขั้นตอนมาก ใช้เวลาตรวจหลายวัน (อย่าง

น้อย 5 วัน) ต้องอาศัยความชำนาญ และมีข้อเสียจากการเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้น ทำให้ต้องสิ้นเปลืองงบประมาณในการกำจัด

สำหรับวิธี PCR เป็นวิธีที่ให้ผลบวกน้อยที่สุดคือมี false negative เป็นจำนวนมาก ขั้นตอนการตรวจใช้เวลานาน คือต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 วัน เพราะต้องผ่านการ pre-enrichment culture ก่อนนำมา extract DNA และเมื่อเพิ่มจำนวน DNA แล้วยังต้องมาตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis และย้อม DNA ด้วย ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่งที่เป็นปัญหาในการกำจัดต่อไป

วิธี IME/MAB-based dot-blot ELISA ให้ผลบวกมากรองลงมาจากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและมีข้อดี คือ มีข้อเสียที่เกิดจากการ pre-enrichment ในตอนต้นเท่านั้น นอกจากนี้ยังสามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละมากๆ ในเวลาเพียง 2 วัน ค่าใช้จ่ายไม่แพงนักและสามารถเก็บผลไว้ยืนยันในภายหลังได้เพราะผลอยู่บนแผ่น nitrocellulose membrane

วิธีการแยกเชื้อที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะต่อเชื้อ Salmonellae เท่านั้น แม้จะมีเชื้ออื่นปนเปื้อนในจำนวนมากถึง 10^7 cfu/ml ก็ยังแยก เชื้อ Salmonellae ได้ จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของอาหาร เพราะในตัวอย่างอาหารมักมีจุลชีพต่างๆ ทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคปนเปื้อนอยู่เนื่องจากความอุดมสมบูรณ์ของตัวอย่างอาหารเอง ซึ่งจุลชีพเหล่านี้มักเป็นอุปสรรคต่อวิธีการตรวจวิเคราะห์ต่างๆ

	Citrobacter	Enterobacter	Enterichia	Klebsiella	Morganella	Proteus	Providencia	Salmonella	Serratia	Shigella
Arginine	±	±	-	-	-	-	-	±	-	-
Citrate	+	+	-	+	-	±	+	±	+	-
Dnase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Gas	+	+	+	±	±	±	±	±	±	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	±	-	-	-	-	+	-	±	-	-
Indole	±	-	+	±	+	±	+	-	-	±
Lysine	-	±	+	+	-	-	-	+	+	-
Motility	+	+	±	-	+	+	+	+	+	-
Ornithine	±	+	±	-	+	±	-	+	+	±
Phenylalanine	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Sucrose	±	+	±	+	-	±	±	-	+	-
Urease	-	-	-	±	+	+	±	-	-	-
Vp ¹	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
TSP slant	Alk(A)	A	A(Alk)	A	Alk	Alk	Alk	Alk	Alk	Alk
butt	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	A; G±	A	A

* Results for common clinical isolates ; + = variable; + = most (usually > 90%) of strains positive; - = few (usually < 10%) of strains positive;

A = acid (yellow); G = gas; Alk = alkaline; (Note: There are exceptions to nearly all of the result listed)

**VP = Voges-Proskauer reaction.

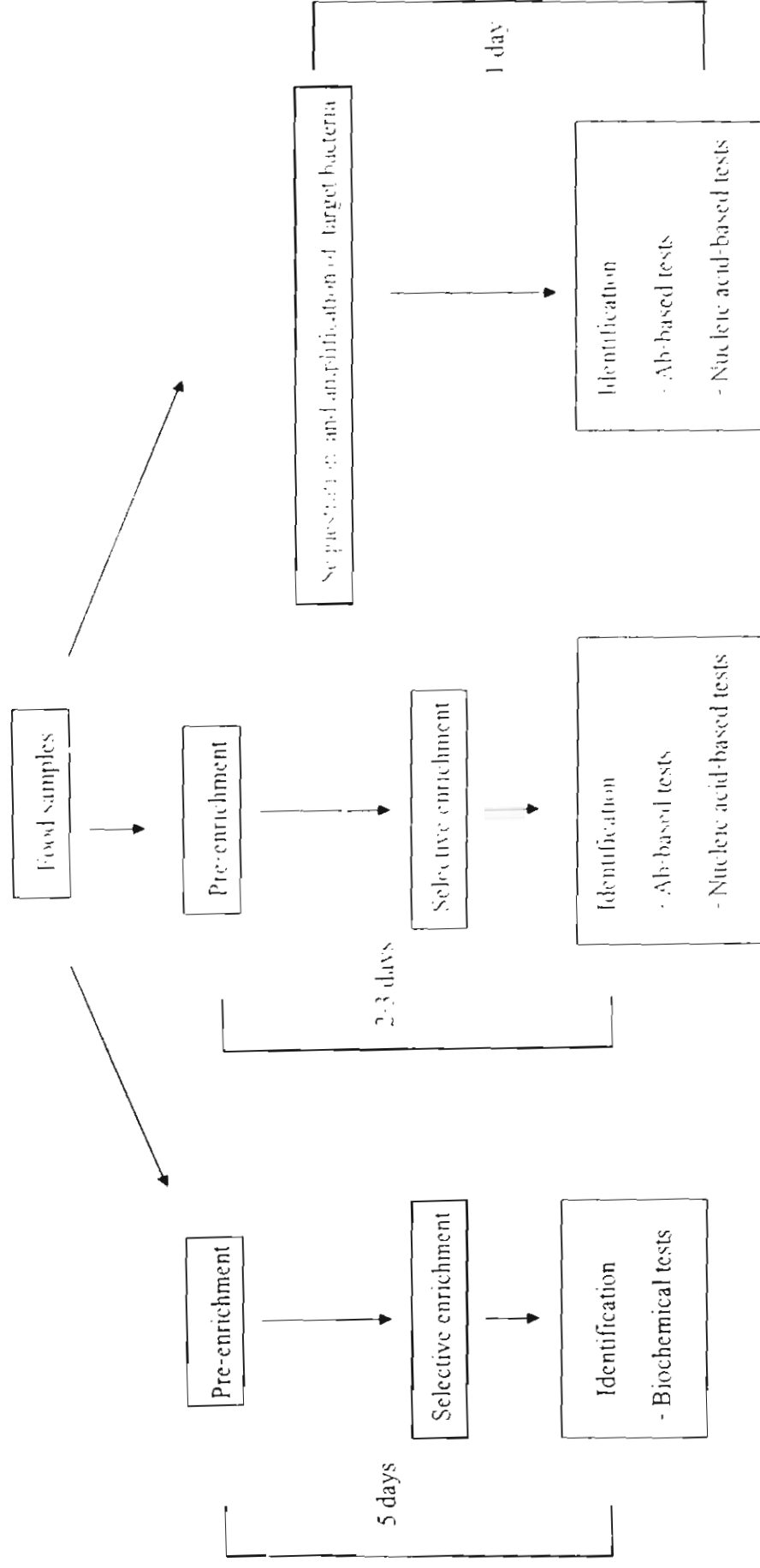
***TSI = Triple sugar iron agar.

ตารางที่ 1 : ปฏิกริยาทางชีวเคมีของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae

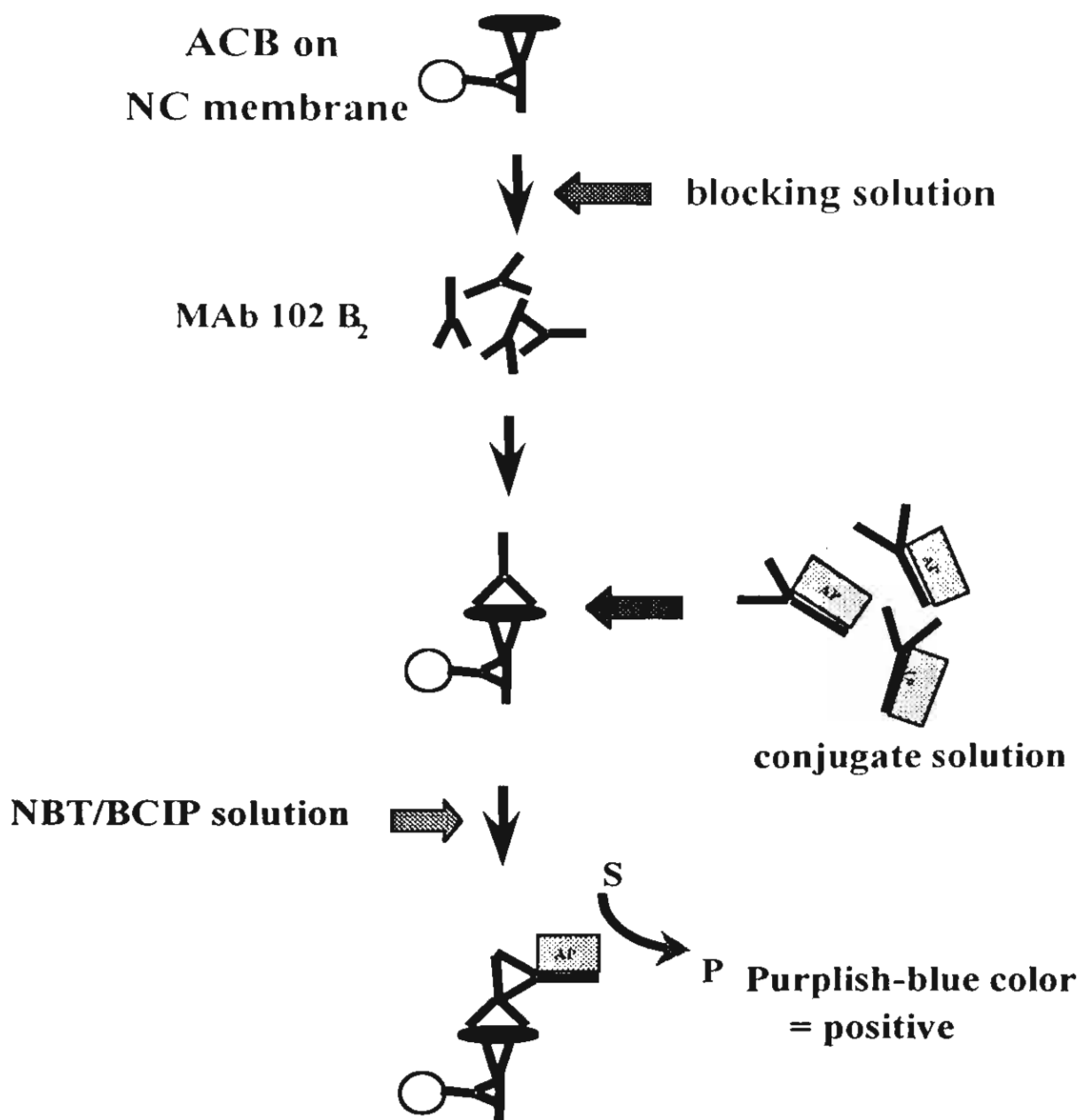
IMMUNOMAGNETIC SEPARATION

RAPID DETECTION

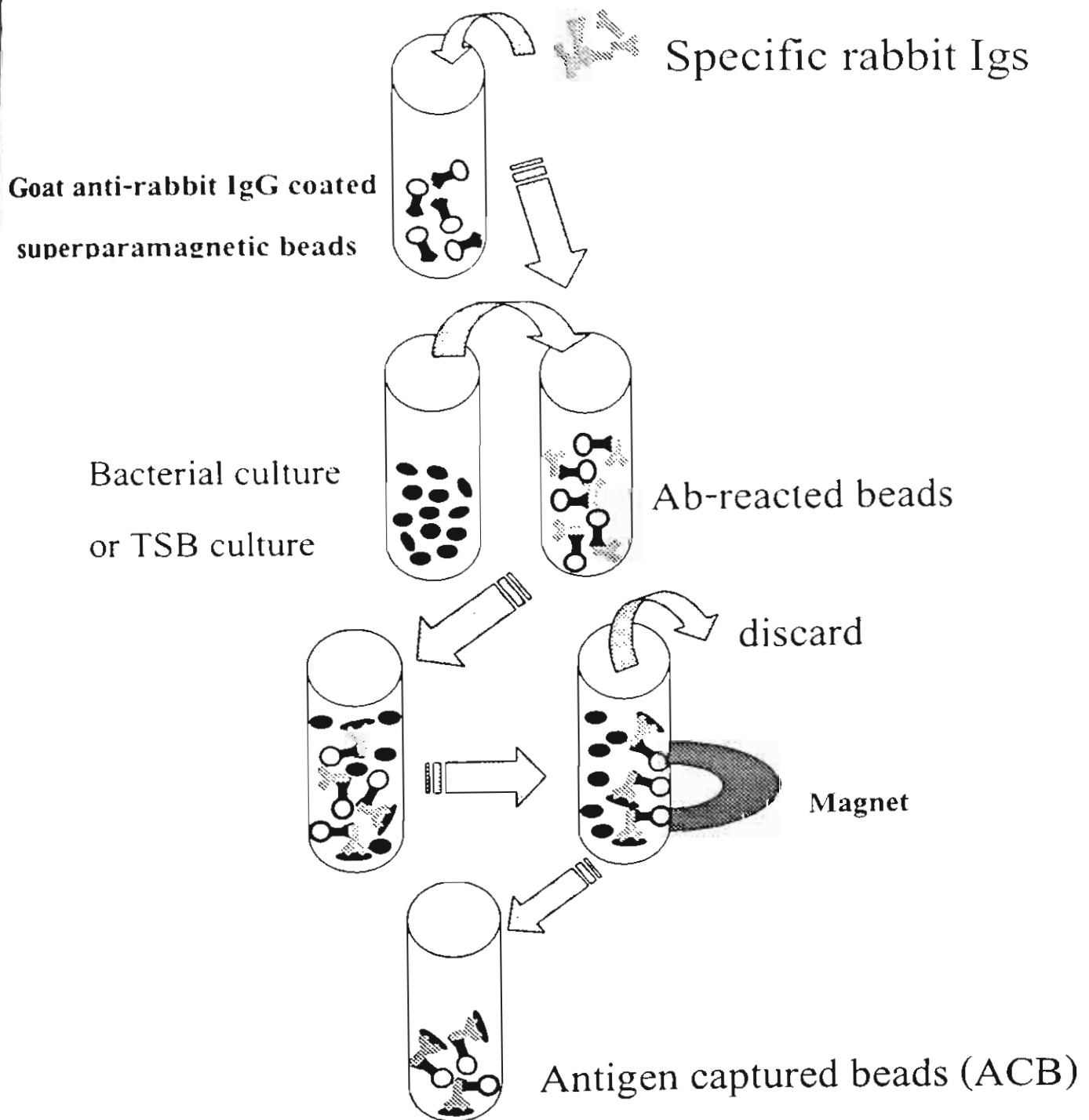
CONVENTIONAL CULTURE METHOD



แผนภูมิที่1: แสดงวิธีการตรวจหา pathogenic bacteria ในการโดยวิธีต่างๆ



แผนภูมิที่ 2: แสดงวิธี MAb-based dot-blot ELISA



แผนภูมิที่ 3:แสดงการเลือกจับเชื้อของ Ab-reacted beads ในวิธี IME

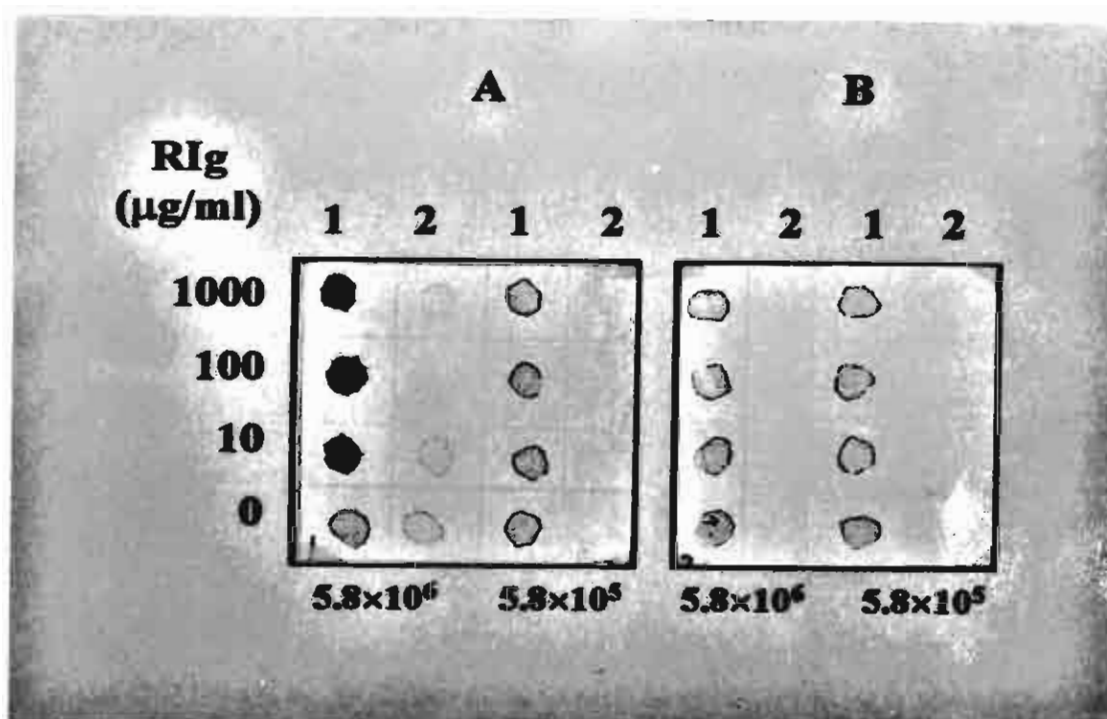


Figure 1: Determination of optimal concentration of *Salmonella*-specific rabbit IgG to produce Ab-reacted beads.

Twenty µl of BioMag beads reacted with equal volume of 2,000, 200 and 20 µg/ml of rabbit IgG. The individual Ab-reacted beads were then added to individual *S. Weltevreden* suspensions. The bacterial antigens on the beads were detected by MAb-based dot-blot ELISA. Membrane A was reacted with MAb 102 B₂, while membrane B was reacted with diluting buffer used as a negative control. Lanes 1 illustrate results of dot-blot ELISA of the Ag captured beads (ACB), whereas lanes 2 show the results of the supernatants after the ACB had been removed.

Salmonella-specific rabbit IgG; rabbit anti-*S. Weltevreden*, *S. Lexington* and *S. Rissen* immunoglobulins

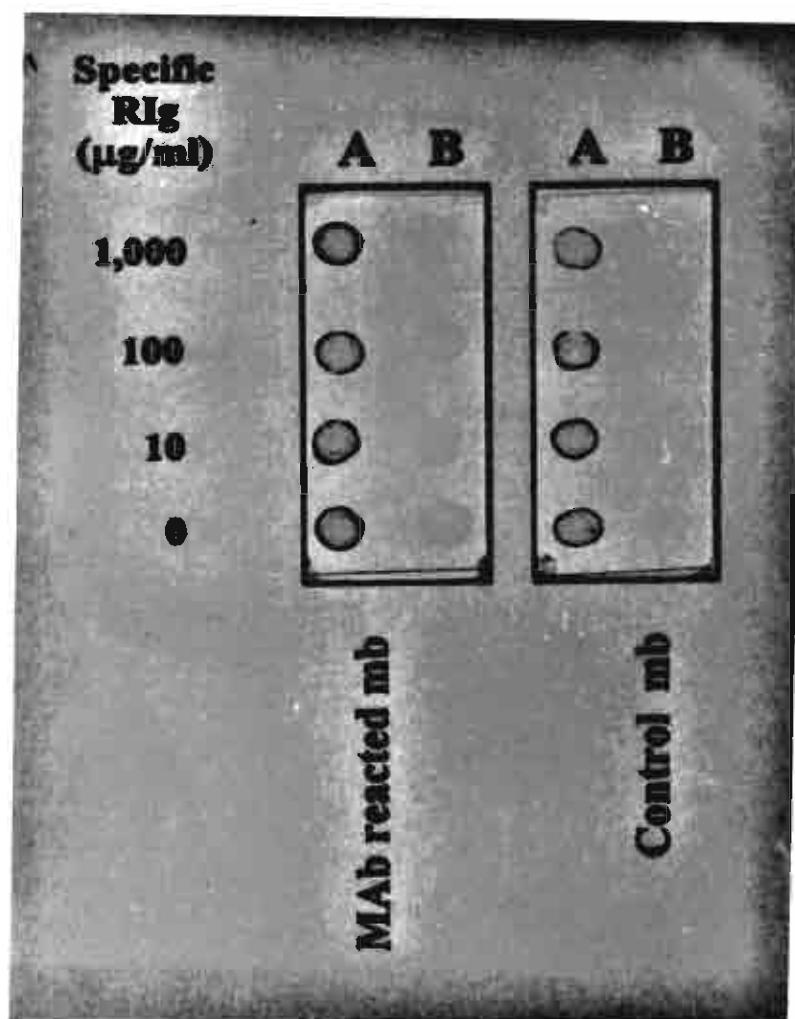


Figure 2: Determination of optimal concentration of *Salmonella*-specific rabbit Ig

Twenty µl of BioMag beads reacted with equal volume of 2,000, 200 and 20 µg/ml of *Salmonella* specific rabbit Igs. The individual Ab-reacted beads were then added to individual *S. Weltevreden* suspensions (2×10^6 cfu/ml). The bacterial antigens on the beads were detected by MAb-based dot-blot ELISA. Membrane **on the left** was reacted with MAb 102 B₂, while membrane **on the right** was reacted with diluting buffer used as a negative control. Lanes **A** illustrate results of dot-blot ELISA of the Ag captured beads (ACB), whereas lanes **B** show the results of the supernatants after the ACB had been removed.

Salmonella-specific rabbit Igs; rabbit Igs from *Salmonellae* polyvalent O and H antiserum (S & A Reagent Lab, Thailand)

mb; nitrocellulose membrane

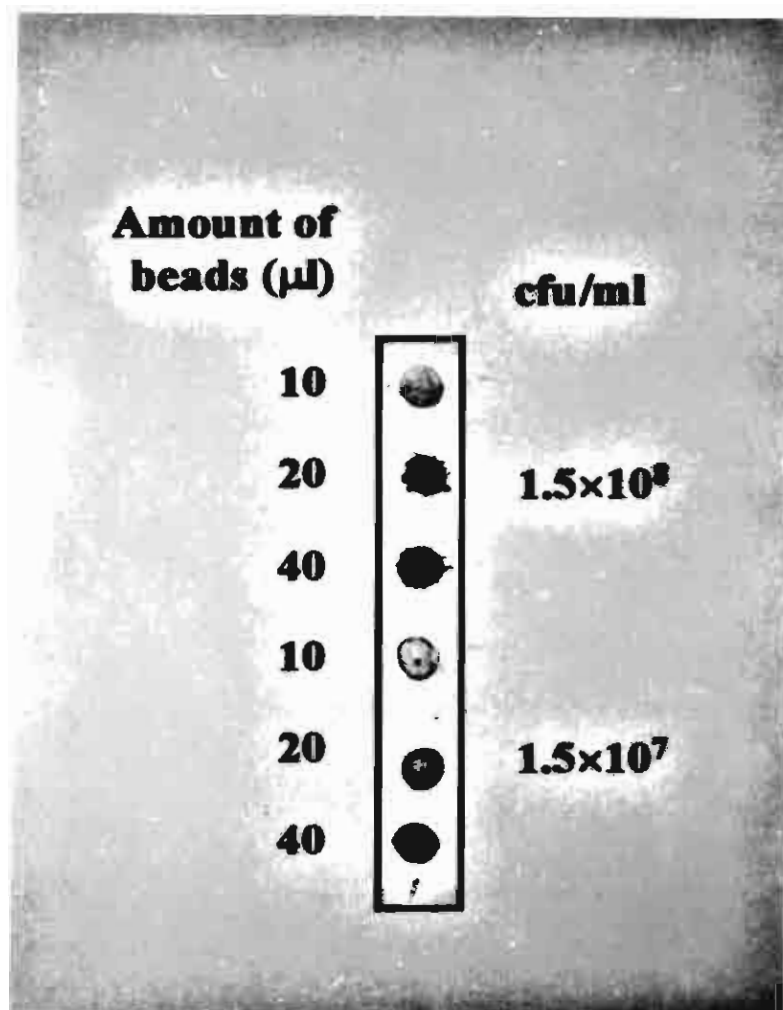


Figure 3: The results of experiments performed to determine the appropriate amount of superparamagnetic beads used for immunomagnetic enrichment (IME).

Various amount of goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads (BioMag) were reacted with a concentration of *Salmonella*-specific RIGs and tested for their ability to capture the bacteria in 1 ml TSB culture.

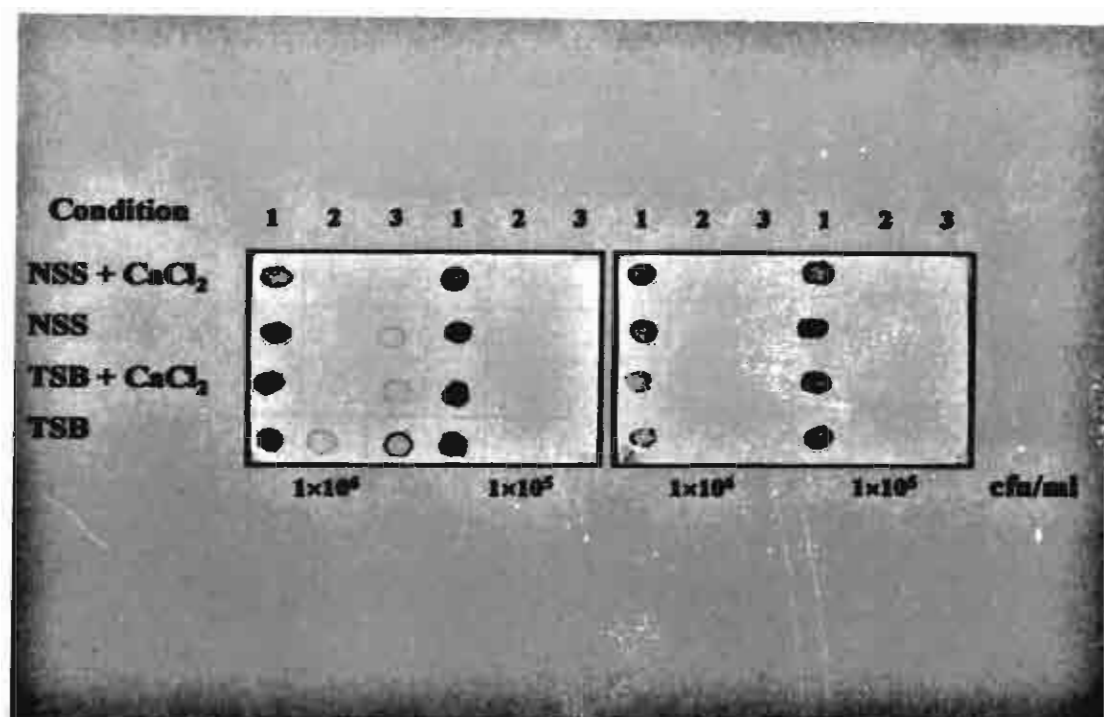


Figure 4: Results of experiments performed to increase the sensitivity of immunomagnetic enrichment (IME).

Specific Ab-reacted BioMag beads were reacted with *S. Weltevreden* suspended in either physiological saline (NSS) or triptic soy broth (TSB) with or without CaCl₂. The bacterial antigens were detected by MAb-based dot-blot ELISA. Membrane A was the tested membrane and membrane B was a negative control piece. Lanes 1 show ACB results, Lanes 2 illustrate the results of the supernatants after the beads had been removed and Lanes 3 are the results of bacterial suspension unexposed to the Ab-reacted beads.

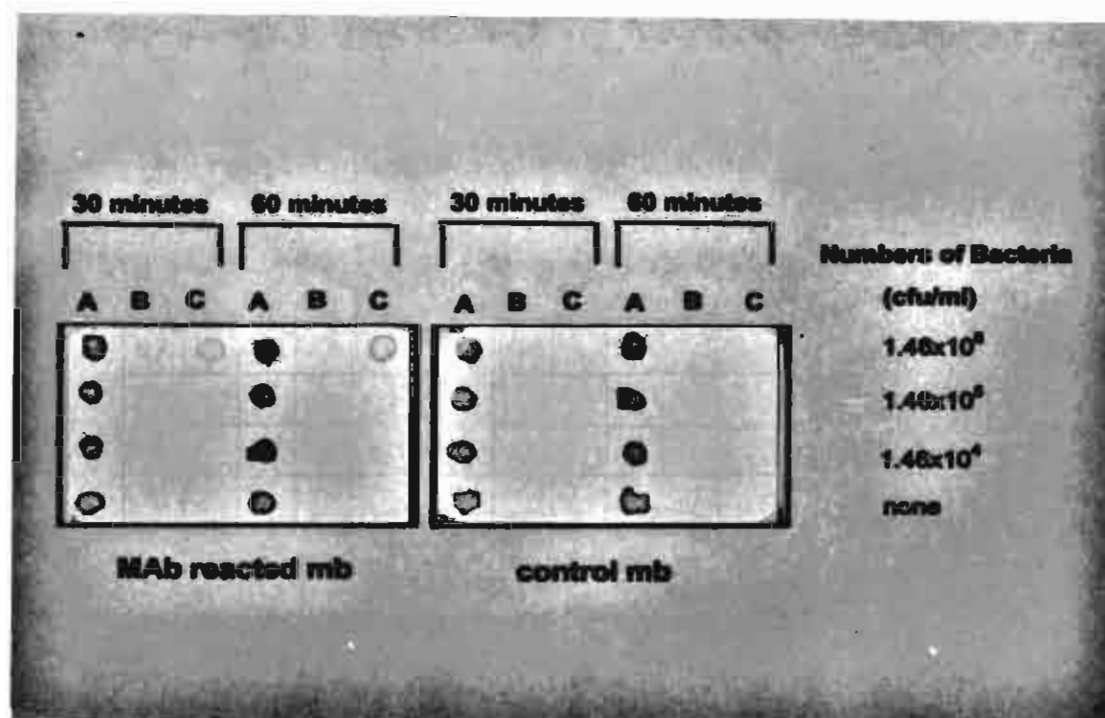


Figure 5: The results of experiments performed to determine the appropriate time of immunomagnetic enrichment (IME).

Specific Ab-reacted BioMag beads were allowed to react with *S. Weltevreden* suspended in tryptic soy broth (TSB) for 30 and 60 minutes, respectively. The bacterial antigens were detected by MAb-based dot-blot ELISA. Membrane on the left is the tested membrane and membrane on the right is a negative control piece. Lanes A are ACB, lanes B are the supernatants after the beads had been removed and lanes C are bacterial suspensions unexposed to the Ab-reacted beads.

MAb; monoclonal antibodies

mb; nitrocellulose membrane

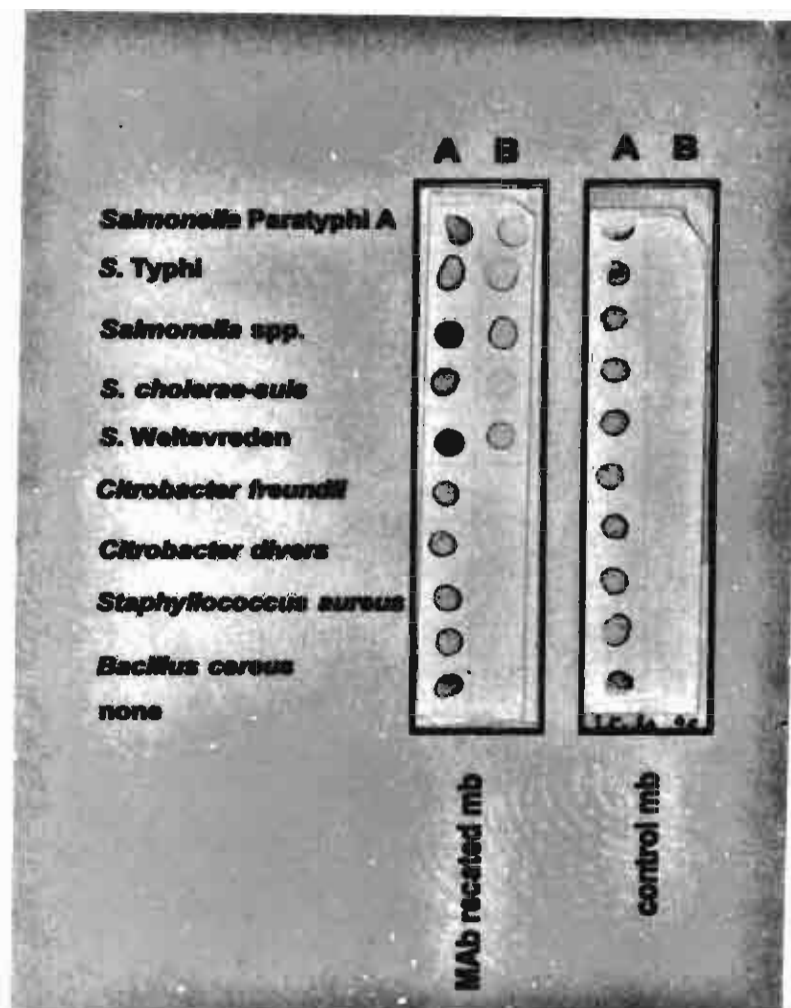


Figure 6: Study of specificity of immunomagnetic enrichment (IME).

Ab-reacted beads were allowed to react with various kinds of bacteria probably contaminated in fresh chicken to test for the specificity of the procedure. Membrane on the left was reacted with MAb 102 B₂, while membrane on the right was reacted with diluting buffer used as a negative control. Lanes A illustrate results of MAb-based dot-blot ELISA of the ACB, whereas lanes B show the results of the bacterial suspension unexposed to ACB.

MAb; monoclonal antibodies

mb; nitrocellulose membrane

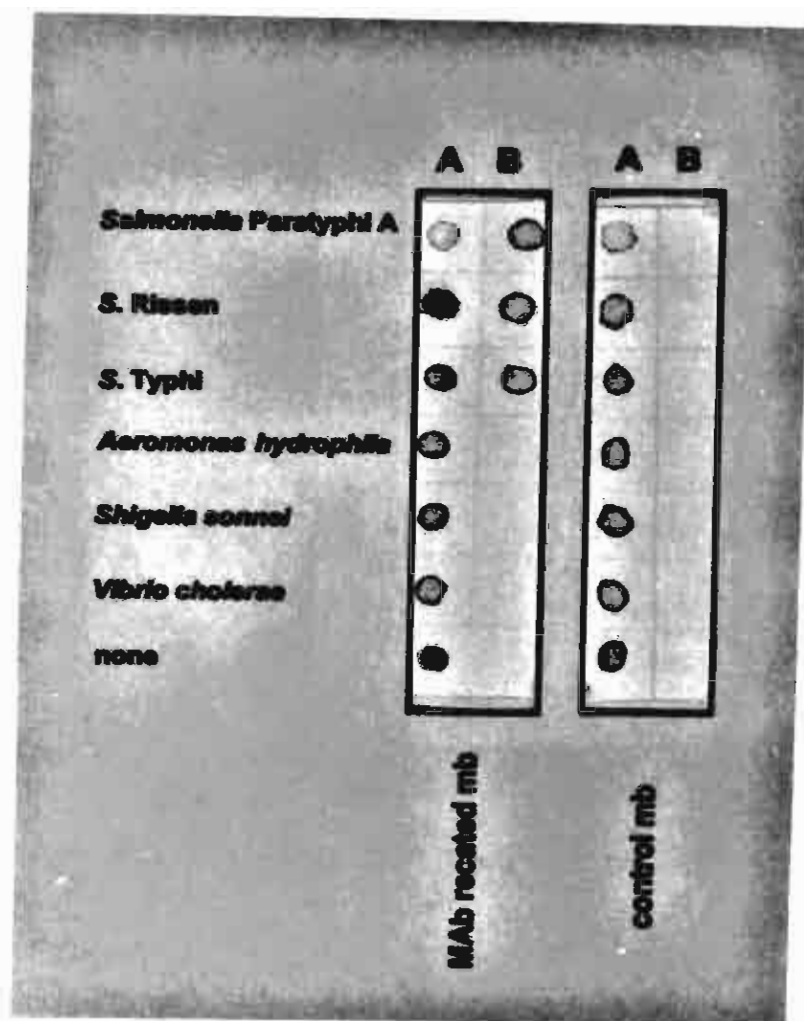


Figure 7: Study of specificity of immunomagnetic enrichment (IME).

Ab-reacted beads were allowed to react with various kinds of bacteria probably contaminated in fresh chicken to test for the specificity of the procedure. Membrane on the **left** was reacted with MAb 102 B₂, while membrane on the **right** was reacted with diluting buffer used as a negative control. Lanes **A** illustrate results of MAb-based dot-blot ELISA of the ACB, whereas lanes **B** show the results of the bacterial suspension unexposed to ACB.

MAB; monoclonal antibodies

mb; nitrocellulose membrane

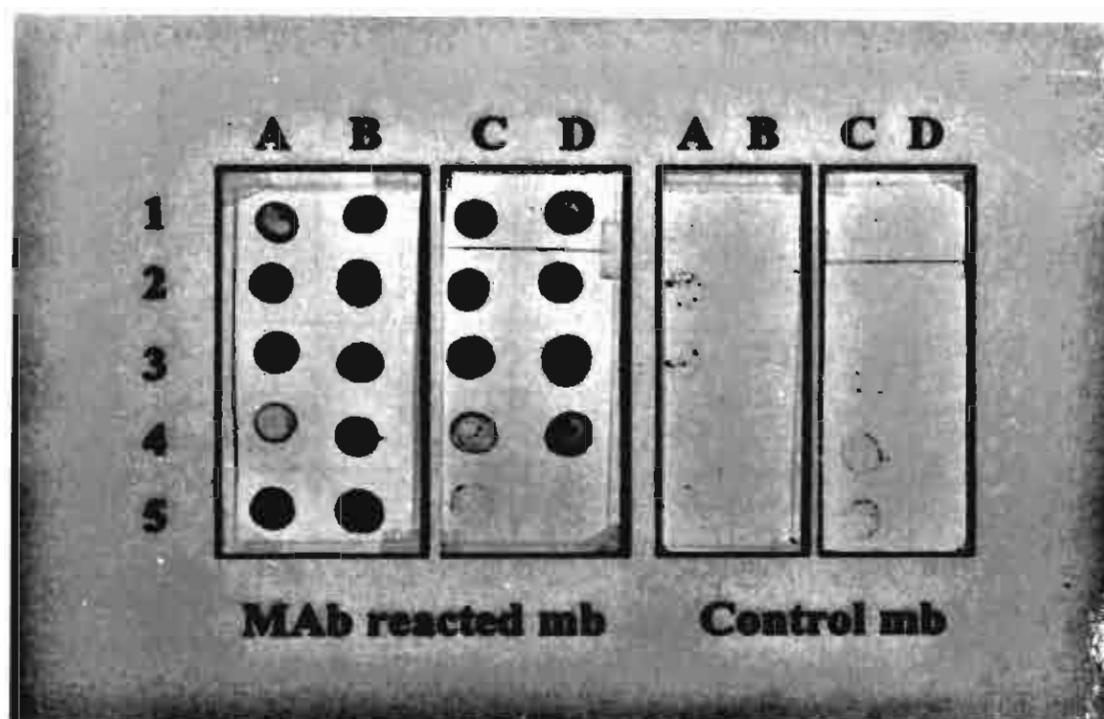


Figure 8: Study of specificity of immunomagnetic enrichment (IME).

Ab-reacted beads were allowed to react with various kinds of bacteria probably contaminated in fresh chicken to test for the specificity of the procedure. Membrane on the **left** was reacted with MAb 102 B₂, while membrane on the **right** was reacted with diluting buffer used as a negative control. Lanes **A** illustrate results of MAb-based dot-blot ELISA of the ACB, whereas lanes **B** show the results of the bacterial suspension unexposed to ACB.

1A= *S. Weltevreden*

1B= *S. Cholerae-suis*

2A= *S. Worthington*

2B= *S. Typhimurium*

3A= *S. Schawarzengrund*

3B= *S. Typhi*

4A= *S. Albany*

4B= *S. Paratyphi*

5A= *S. Lexington*

5B= *Vibrio cholerae*

MAB; monoclonal antibodies

mb; nitrocellulose membrane

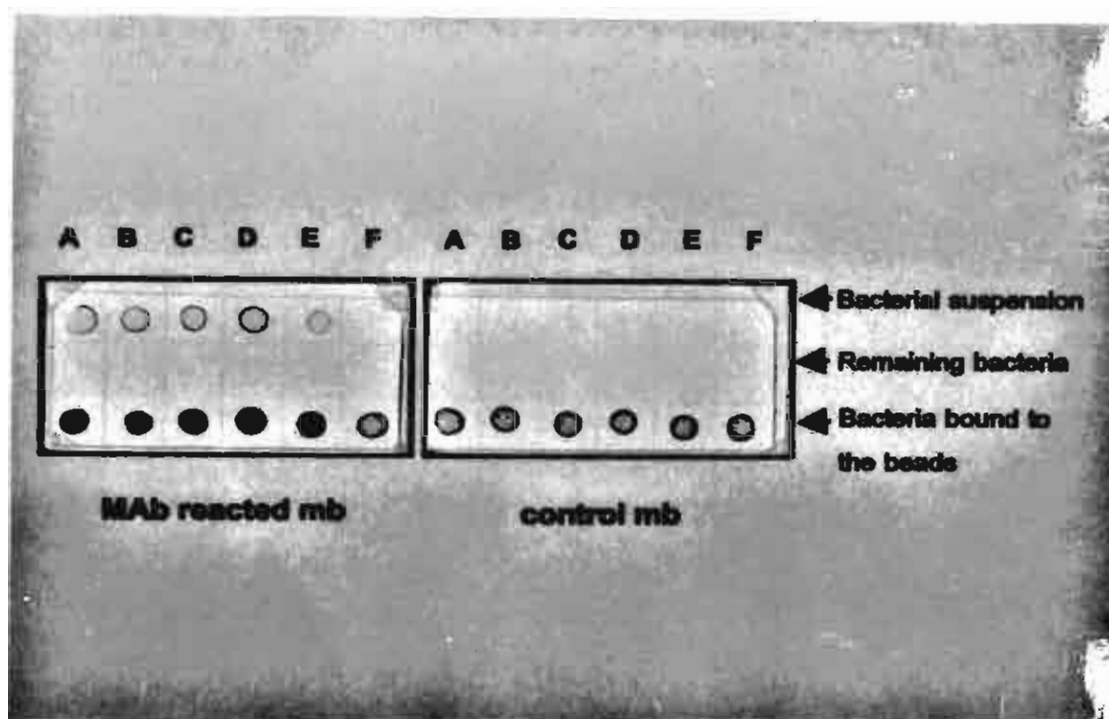


Figure 9: Study of the interference effect of other bacteria on immunomagnetic enrichment (IME).

The binding ability of Ab-reacted beads to *S. Weltevreden* in the presence of various concentrations of *Escherichia coli* was examined. Membrane on the left was reacted with MAb 102 B₂, while membrane on the right was reacted with diluting buffer used as a negative control. Spots of the top rows from A to E were dotted with the mixed suspensions of 10^6 cfu/ml of *S. Weltevreden* and 10-fold falling dilutions of *E. coli* (started from approximately 10^7 to 10^3 cfu/ml, respectively). Spots of the bottom rows were dotted with the ACB reacted with the similar mixed suspensions and those in the middle rows were the supernatants of the mixed suspensions after removal of the ACB. Lanes F; the top rows were dotted with TSB used as negative control, the bottom rows were the ACB reacted with TSB and the middle ones were TSB after the removal of the ACB.

MAb; monoclonal antibodies

mb; nitrocellulose membran

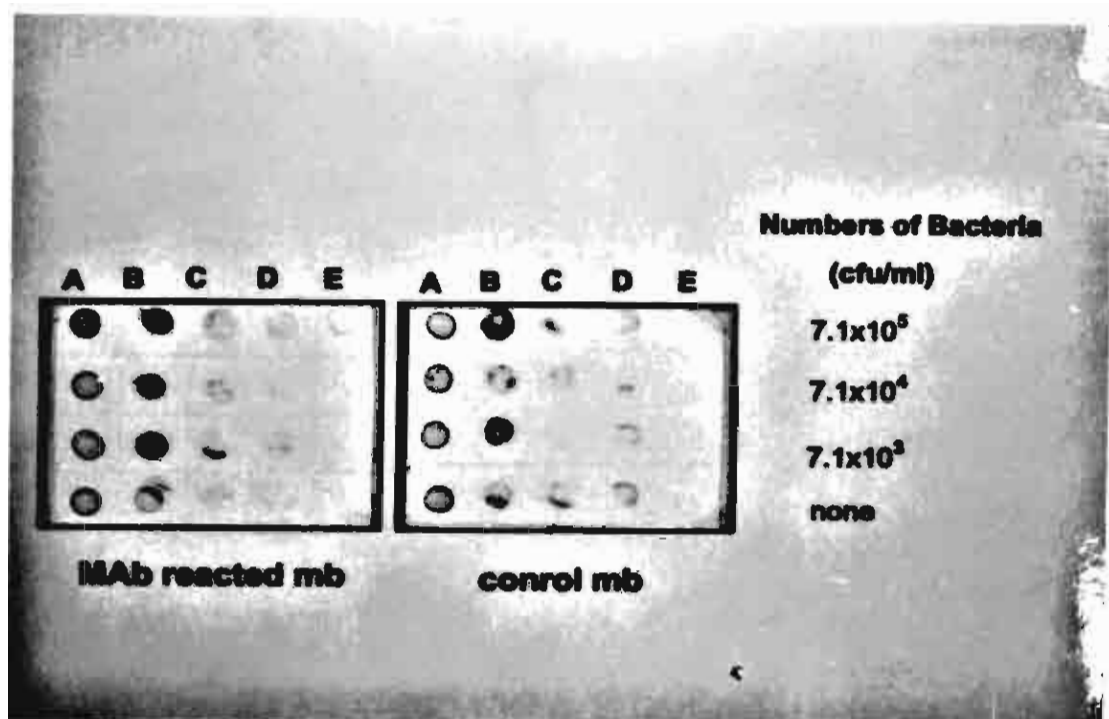


Figure 10: Comparative study of binding efficiency of BioMag beads and other superparamagnetic beads to *S. Weltevreden*.

BioMag beads coated with goat anti-rabbit IgG, Dynabeads M280 coated with sheep anti-rabbit IgG were reacted with 100 µg/ml of the specific rabbit Igs at 4° C for 18 hours. Then both kinds of reacted beads together with Dynabeads[®] coated with anti-*Salmonella* Ab and YATORON beads (beads coated with anti-*Salmonella* flagella Ab) were incubated individually with *S. Weltevreden* in physiological saline. The Ag captured beads (ACB) were detected by MAb-based dot-blot ELISA. Membrane on the **left** is the tested membrane and membrane on the **right** is a negative control piece. Lanes A reveal the results of MAb-based dot-blot ELISA of the ACB made from BioMag beads coated with goat anti-rabbit IgG and lanes B, C and D are ACB made from Dynabeads M280 coated with sheep anti-rabbit IgG, Dynabeads[®] coated with anti-*Salmonella* Ab and YATORON beads, respectively. Lanes E show the results of bacterial suspensions unexposed to Ab-reacted beads.

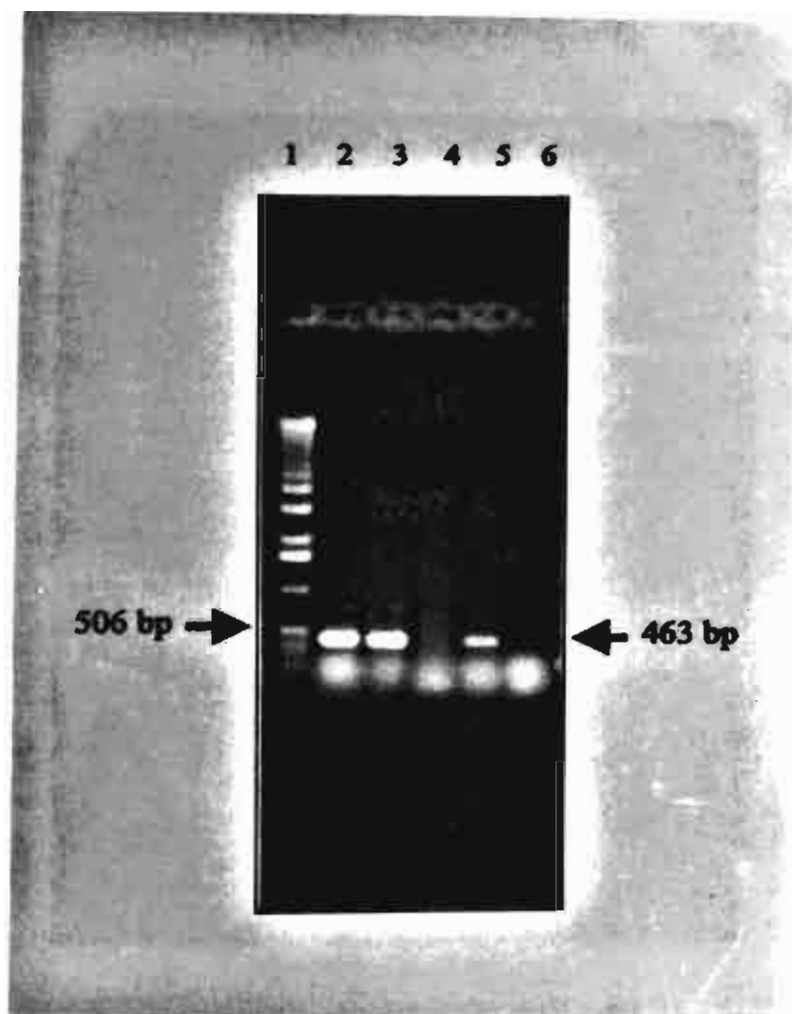


Figure 12: Agarose gel electrophoresis pattern of PCR products from various bacterial genomic DNA amplified by PDU6/PDU7 primers.

Lane 1 is 1kb λ DNA ladder as DNA marker

Lane 2 is PCR product of genomic DNA from *Salmonella* Rissen

Lane 3 is PCR product of genomic DNA from *Salmonella* Enteritidis

Lane 4 is negative PCR result when *Vibrio cholerae* DNA was used as a template

Lane 5 is PCR product of genomic DNA from *Yersinia enterocolitis*

Lane 6 is negative PCR result when *Citrobacter diver* DNA was used as a template

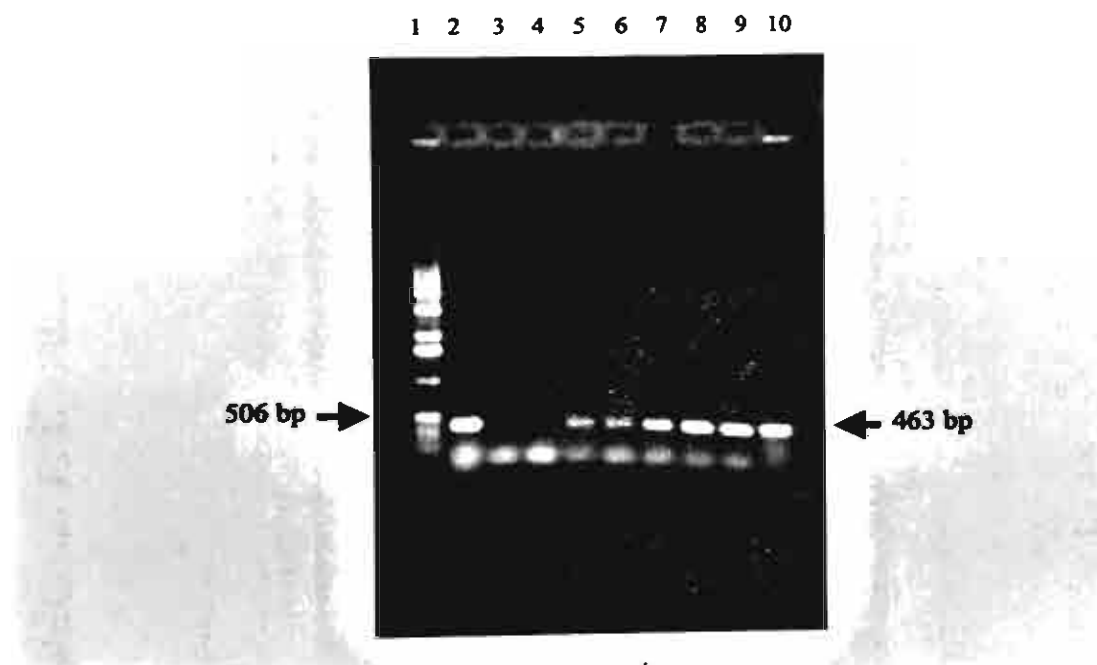


Figure 13: Study of sensitivity of PCR technique for detection of Salmonellae in bacterial suspension.

Agarose gel electrophoresis of PCR products (463 bp) from various concentrations of bacterial suspensions. The primers were PDU6 and PDU7.

Lane 1 is 1kb λ DNA ladder as DNA marker

Lane 2 is PCR products from Salmonellae extracted DNA.

Lane 3 to Lane 10 are PCR products from extracted DNA from Salmonellae suspensions of 10^2 to 10^9 cfu/ml.

เอกสารอ้างอิง

- Bulte, M. and Jakob, P. (1995) The use of a PCR-generated *invA* probe for the detection of *Salmonella* spp. in artificially and naturally contaminated foods. *Int. J. Food Microbiol.* 26 (3):335-344.
- Cano, R.J., Hendrik, N.P., Pieniazek, N.J., Acra, A. and Poinar, G.O. (1993) Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million year old weevil. *Nature* 363:536-538.
- Chaicumpa, W., Thim-mta, W., Khusmith, S., Tapchaisri, P., Kalambaheti, T., Chongsa-nguan, M. and Echeverria, P. (1988) Detection of *Salmonellae typhi* antigen 9 in clinical specimens with monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 26(9):1824-1830.
- Chaicumpa, W., Ngern-ngarmert, W., Kalambaheti, T., Ruangkunaporn, Y., Chongsa-nguan, M., Tapchaisri, P., Desakorn, V. and Sutheunkul, O. (1995) Monoclonal antibody based dot-blot enzyme linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonellae* in food. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 13:159-166.
- Chopra A.K., Peterson, J.W., Chary, P. and Prasad, R. (1994a) Molecular characterization of an enterotoxin from *S. typhimurium*. *Microbial Pathogenesis* 16:85-98.
- Chopra A.K., Xu, X.J. and Peterson, J.W. (1994b) *Salmonella typhimurium* enterotoxin epitopes shared among bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 118(3):237-242.
- Clark, C.G., MacDonald, L.A., Ginocchio, C.C., Galan, J.E. and Johnson, R.P. (1996) *Salmonella Typhimurium* *InvA* expression probed with a monoclonal antibody to the C-terminal peptide of *InvA*. *FEMS Microbiol. Lett.* 136(3):263-268.
- Enroth, H. and Engstrand, L. (1995) Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33:2162-2165.

Falkow, S. and Mekalanos, J. (1990) The enteric bacilli and vibrios. In: Davis, BD., Dulbecco, R., Eisen, HN. and Ginsberg, HS. Eds. Microbiology 4th edition. Harper and Row Publishers, Singapore, 576-579.

Fricker, CR. (1987) A review the isolation of *Salmonella* and *Campylobacter*. *J. Appl. Bacteriol.* 63:99-116.

Galan, JE., Ginocchio, C. and Costeas, P. (1992) Molecular and functional characterization of *Salmonella* invasion gene *invA*: Homology of *invA* to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174:4338 - 4339.

Hornes, E., Wasterson, Y. and Olsvik, O. (1991) Detection of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin genes in pig stool specimens by an immobilized, colorimetric nested polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29:2375-2379.

Li, Z., Bai, CH., von Reyn, CF., Marino, P., Brennan, MJ., Gine, N. and Morris, SL. (1996) Rapid detection of *Mycobacterium avium* in stool samples from AIDS patients by immunomagnetic PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34:1903-1907.

Lund, A., Hellemann, AL. and Vartdal, F. (1988) Rapid Isolation of K88+ *Escherichia coli* by using immunomagnetic particles. *J. Clin. Microbiol.* 26:2572-2575.

Makino, S., Kurazono, H., Chongsa-nguang, M., Hayashi, H., Cheun, H., Suzuki, S. and Shirahara, T. (1999) Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. *J. Vet. Med. Sci.* 61(11):1245-1247.

Quang, NN., Tapchaisri, P., Chongsa-nguan, M., Vien, C.V., Tra, DT., Sakolvaree, Y., Srimanote, P. and Chaicumpa, W. (1997) Diagnosis of enteric fever caused by *Salmonella* spp. in vietman by a monoclonal antibody-based dot-blot ELISA. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 15:205-212

Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A. Galan, J.E., Ginocchio, C. Curtiss, R. 3rd. and Gyles, C.L. (1992) Amplification of an *InvA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell Probes* 6(4):271-279.

Tapchaisri, P., Wangroongsarb, P., Panbangred, W., Kalambaheti, T., Chongsanguan, M., Srimanote, P., Kurazono, H., Hayashi, H. and Chaicumpa, W. (1999) Detection of *Salmonellae* contamination in food samples by dot-ELISA, DNA amplification and bacterial culture. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 17: 41-51.

Widjoatmodjo, M.N., Fluit, A.C., Torensma, R., Keller, B.H. and Verhoef, J. (1991) Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonellae* *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10:935-938.