



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาวิธีรวดเร็วในการตรวจหา *Salmonella* ใน
เนื้อสัตว์โดยใช้เทคนิค Immunomagnetic Separation”

โดย ผศ. ดร. ฌรณี ต้อยเต็มวงศ์ และคณะ

ธันวาคม 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาวิธีรวดเร็วในการตรวจหา *Salmonella* ในเนื้อสัตว์ โดยใช้เทคนิค Immunomagnetic Separation”

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ.ดร. นรณี ตัญเฒ่าวงศ์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. ผศ.ดร. พัชรีย์ สุนทรนันท์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3. นางสาวกรรณา ธีรสมิทธิ์	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์นครราชสีมา
4. นางสาวพัชรีย์ แก้วดวง	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงคราม
5. นางอรุณ ปางตระกูลนนท์	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชุดโครงการผลผลิตจากสัตว์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

Salmonella spp. เป็นเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิดหนึ่งมีมากกว่า 3,000 ซีโรวาร์ อยู่ในสกุล Enterobacteriaceae ที่มีความสำคัญต่อความปลอดภัยของอาหารเป็นอย่างยิ่ง เพราะทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างแรง และสารพิษอาจผ่านเข้าสู่กระแสเลือดทำให้ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้ เชื้อนี้พบได้ในทุกแห่งและทั่วโลก *Salmonella* spp. แยกได้จาก คน อาหารคน อาหารสัตว์ น้ำ และสิ่งแวดล้อมต่างๆ

จากข้อมูลระบาดวิทยาของเชื้อนี้ จากผลการตรวจยืนยันของสิ่งส่งตรวจได้แก่ อุจจาระ Rectal swabเลือด ปัสสาวะ หนอง น้ำไขสันหลัง เป็นต้น จากผู้ป่วยที่เข้ามารักษาตัวตามโรงพยาบาลต่างๆ ทั้งในเขตกรุงเทพมหานครและต่างจังหวัดทั่วประเทศรวม 13 เขต จำนวนทั้งสิ้น 4,188 ราย ในปี พ.ศ. 2544 รายงานว่า พบเชื้อในกลุ่มซาลโมเนลลาที่ก่อให้เกิดโรค Salmonellosis รวม 4,155 ราย ซึ่งแยกเป็นซีโรวาร์ได้ถึง 73 ซีโรวาร์โดยที่ 5 อันดับแรกพบว่า *Salmonella* Weltevreden เป็นซีโรวาร์ที่ตรวจพบมากที่สุด(ร้อยละ 15.8) รองลงมาได้แก่ *S. Enteritidis* (ร้อยละ 8.6), *S. Anatum*(ร้อยละ 8.2), *S. Rissen* (ร้อยละ 6.2) และ *S. Stanley* (ร้อยละ 5.8) ตามลำดับ

เทคนิค Immunomagnetic separation (IMS) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ในอาหาร อาศัยหลักการแยก *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหาร โดยใช้ paramagnetic particles ที่เคลือบด้วย anti-*Salmonella* specific antibodies เพื่อให้จับเซลล์เป้าหมายจากตัวอย่าง โดยลดจำนวนและชนิดของ competing bacteria เป็นวิธีที่ทำให้เซลล์ *Salmonella* spp. ที่มีในตัวอย่างเข้มข้นขึ้นหลังจากขั้น pre-enrichment

ในการวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค Immunomagnetic separation (IMS) โดยการใช้ Dynalbead Tosylactivated เคลือบด้วย แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นเองในประเทศไทยเปรียบเทียบกับ Dynalbead anti *Salmonella* ชุดทดสอบ ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. สายพันธุ์ 5 อันดับแรกที่พบมากที่สุดในประเทศไทย เพื่อการลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์หลัง ซึ่งพบสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบ beads ด้วย IgG สำหรับนำไปใช้จับเชื้อ *Salmonella* ได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ Dynabeads® anti-*Salmonella* ในการทดลองได้พยายามเพิ่มความสามารถในการจับเชื้อเป้าหมายโดยเพิ่มเวลาจับให้นานขึ้น หากพัฒนาเม็ด IMS ให้มีคุณภาพมากกว่านี้อาจสามารถลดเวลาลงได้ นอกจากนี้ได้หา sensitivity, repeatability และ specificity ของเม็ด beads เคลือบแอนติบอดีที่ผลิตเอง กับ beads ของชุดทดสอบทางการค้า ซึ่งพบว่า beads ทั้งสองชนิดจับเชื้อ non-*Salmonella* ได้เช่นกันใน น่าจะเกิดจาก non-specific binding แสดงให้เห็นว่า beads ทั้งสองชนิดมีความจำเพาะไม่ถึง ในส่วนของระดับความไวในการจับเชื่อนั้นพบว่าทั้ง beads

ที่เคลือบแอนติบอดีเอง และ beads ทางการค้าสามารถจับเชื้อได้ตั้งแต่ไม่น้อยกว่า 10 เซลล์ถึง 99 เซลล์ อย่างไรก็ตามความสามารถในการจับเชื้อ *Salmonella* ที่ระดับดังกล่าวอาจจะลดลงเมื่อนำไปใช้ตรวจอาหาร เพราะอาหารโดยทั่วไปจะมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันสูงหรือมีอนุภาคอาหาร ทำให้ขัดขวางการจับเชื้อของ beads

ผลการตรวจเชื้อ *Salmonella* ของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ Dynabeads[®] anti-*Salmonella* พบว่ามีประสิทธิภาพเท่ากันเพราะมีความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องเท่ากัน คือ 96.15%, 100% และ 96.67% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ISO 6579 : 2002 ถึงแม้เวลาที่ใช้จับเชื้อของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจะนานกว่า Dynabeads[®] anti-*Salmonella* แต่ราคาของ beads ด้วย IgG ที่ผลิตเองก็ถูกกว่า Dynabeads[®] anti-*Salmonella*

จากการวิจัยโดยใช้วิธี IMS โดยใช้ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง หรือ Dynabeads[®] anti-*Salmonella* สามารถใช้แทนวิธี ISO 6579 : 2002 ได้เนื่องจากให้ผลการตรวจเร็วกว่า 2 วัน วิธีการตรวจง่าย ประหยัดแรงงาน ถึงแม้ค่าใช้จ่ายในการตรวจจะสูงกว่าวิธีมาตรฐานเพราะ beads ที่ใช้มีราคาแพงแต่ก็คุ้มค่างับโรงงานอาหารหรือห้องปฏิบัติการที่ต้องการความรวดเร็วในการตรวจอาหาร อย่างไรก็ตามจากการวิจัยพบว่าปัญหาที่พบเกิดจากคุณภาพของแอนติบอดี เพราะผลจากการกระตุ้นสัตว์ให้สร้างภูมิคุ้มกันออกมา จึงเกิด cross reaction ได้บ้างอาจมากหรือน้อย จากเอกสารงานวิจัยในปีหลังๆพบว่า การใช้ serum free medium ในการผลิตจะลดการเกิดปฏิกิริยาแบบจำเพาะได้ เพราะฉะนั้นในการวิจัยต่อไปอาจใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีผสมกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี หรือใช้แอนติซีรัมที่ผลิตจากโอแอนติเจน และ เอชแอนติเจนผสมกันเพื่อเพิ่มความจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella* มากขึ้น อีกทั้งอาจใช้แอนติซีรัมของกลุ่ม *Salmonella* ที่พบมากในอาหารมาทำการเคลือบ beads โดยไม่จำเป็นต้องใช้ทุกกลุ่มเพราะเชื้อ *Salmonella* จะมี antigenic determinant บางส่วนที่คล้ายกันทำให้ถูกจับโดย beads ได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจับเชื้อ *Salmonella* กลุ่มที่พบมากในอาหาร

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีรวดเร็วในการตรวจหา *Salmonella* ในเนื้อสัตว์โดยใช้เทคนิค Immunomagnetic Separation

ในการวิจัยนี้ได้ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากโอแอนติเจนของ *Salmonella* กลุ่ม OMA, OMB และ I มาทำให้เป็น IgG บริสุทธิ์ แล้วนำไปเคลือบ Dynabeads M-280 Tosylactivated จากการหาความจำเพาะของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง กับ Dynabeads[®] anti-Salmonella พบว่าไม่มีความจำเพาะ เพราะสามารถจับเชื้อ non-*Salmonella* ได้ด้วย สำหรับความไวหรือจำนวนเชื้อ *Salmonella* ระดับต่ำสุดที่ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง สามารถจับเชื้อได้เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* บริสุทธิ์ พบว่าที่จำนวนเชื้อต่ำกว่า 10 CFU/มิลลิลิตร ความสามารถในการจับเชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่ไม่สม่ำเสมอ และจากการตรวจเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติจำนวน 30 ตัวอย่าง โดยลดเวลาการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered peptone water เพื่อตรวจเชื้อ *Salmonella* ได้รวดเร็วขึ้นสำหรับเทคนิค Immunomagnetic separation (IMS) ผลการตรวจด้วยเทคนิค IMS โดยใช้ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ Dynabeads[®] anti-Salmonella พบเชื้อ *Salmonella* 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 83.3) เท่ากัน ส่วนวิธีมาตรฐาน ISO 6579 : 2002 พบเชื้อ *Salmonella* 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 86.7) จากการประเมินประสิทธิภาพของวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยเทคนิค IMS เมื่อใช้ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ Dynabeads[®] anti-Salmonella พบว่ามีค่าเท่ากัน คือ มีความไว ร้อยละ 96.15 ความจำเพาะ ร้อยละ 100 และ ความถูกต้อง ร้อยละ 96.67 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ISO 6579 : 2002 ดังนั้นเทคนิค IMS โดยใช้ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง หรือ Dynabeads[®] anti-Salmonella สามารถเป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจเชื้อ *Salmonella* เนื่องจากให้ผลการตรวจเร็วกว่า 2 วัน วิธีการตรวจง่าย ประหยัดแรงงาน แต่ค่าใช้จ่ายในการตรวจจะสูงกว่าวิธีมาตรฐาน

คำสำคัญ: *Salmonella* วิธีรวดเร็ว Immunomagnetic separation

Abstract

Development Rapid Method for *Salmonella* Detection in Meat Using Immunomagnetic Separation Technique

Dynabeads M-280 Tosylactivated was coated with purified somatic polyclonal antibodies against *Salmonella* polyvalent OMA, OMB and group I. The result shown that coated Dynabeads M-280 Tosylactivated and Dynabeads[®] anti-Salmonella lack specificity because non-*Salmonella* could bound to coated beads. At levels of *Salmonella* less than 10 CFU/ml, sensitivity or low detection limit of coated Dynabeads M-280 Tosylactivated sometimes failed to detect. From analysis 30 naturally contaminated samples by reducing incubation time of Buffered peptone water medium for rapid detection with Immunomagnetic separation technique (IMS). *Salmonellae* were detected 25 (83.3%) samples with IMS technique by using coated Dynabeads M-280 Tosylactivated and Dynabeads[®] anti-Salmonella compared with 26 (86.7%) samples by the conventional ISO 6579 : 2002 reference method. In evaluation efficiency method for detection *Salmonella* when using coated beads, coated Dynabeads M-280 Tosylactivated and Dynabeads[®] anti-Salmonella had sensitivity 96.15%, specificity 100% and accuracy 96.67% when comparison with the conventional ISO 6579 : 2002 reference method. In conclusion, IMS technique by using coated beads could be alternatively used for detection *Salmonella* because reduce the time detection 2 days, simple method and save labour but the cost more expensive than the conventional reference method.

Keywords : *Salmonella* , Immunomagnetic Separation, Rapid Method

สารบัญ

	หน้า
คำนำ.....	1
ตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	18
อุปกรณ์การทดลอง.....	19
วิธีการทดลอง.....	22
ผลและการวิจารณ์.....	28
สรุป.....	47
เอกสารอ้างอิง.....	49
ภาคผนวก.....	56
กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์.....	72
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้	
กิจกรรมที่ดำเนินมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ.....	73

คำนำ

ในโลกปัจจุบันเป็นยุคของการแข่งขันที่ต้องการความรวดเร็ว โดยเฉพาะทางด้านการค้า ประเทศไทยมีสินค้าส่งออกและนำเข้าหลายชนิด สินค้าส่งออกที่เป็นรายได้หลักของประเทศส่วนใหญ่จะเป็นสินค้าเกษตรกรรมที่เป็นพืชผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ และอาหารทะเลรวมทั้งอาหารที่แปรรูปแล้ว สินค้าเหล่านี้จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพให้เป็นไปตามข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้าสินค้า เชื้อแบคทีเรียที่สำคัญเชื้อหนึ่งและมีผลกระทบต่อการส่งออกอาหาร คือ เชื้อ *Salmonella*

เชื้อ *Salmonella* sp. เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารหลายโรค เช่น ไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever หรือ enteric fever) การติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคอาหารเป็นพิษหรือท้องร่วง (Salmonellosis) เป็นแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนตรง ขนาดเล็ก ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีและไม่มีอากาศ เคลื่อนที่ได้ ยกเว้น *S. Pullorum* และ *S. Gallinarum* การจำแนกเชื้อ *Salmonella* ใช้ระบบ Kauffman-White โดยอาศัยความแตกต่างทางแอนติเจน แอนติเจนที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ โอ แอนติเจน (O antigen) หรือเรียกว่า Somatic antigen, เอช แอนติเจน (H antigen) และวีไอ แอนติเจน (Vi antigen) สามารถจำแนกเชื้อ *Salmonella* ได้เป็น 2 สปีชีส์ คือ *S. enterica* และ *S. bongori* ใน *S. enterica* ยังแบ่งย่อยได้อีก 6 subspecies ได้แก่ *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* และ *indica* ปัจจุบันพบเชื้อ *Salmonella* มากกว่า 2,501 ซีโรวาร์ (serovar) (Popoff, 2001)

วิธีที่ใช้ตรวจในปัจจุบันและได้รับการยอมรับจะเป็นวิธีมาตรฐาน เช่น Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL(AOAC), FDA Bacteriological Analytical Manual(BAM), United States Department of Agriculture (USDA) และ International Organization for Standardization (ISO) เป็นต้น ซึ่งต้องใช้เวลาและมีความไวระดับหนึ่ง แต่ถ้ามีการใช้เทคนิคอื่นเข้าช่วยจะทำให้มีความไว และเวลาการตรวจเร็วขึ้น หลักการของวิธีนี้ ขั้นที่ 1 คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท enrichment medium เพื่อให้เซลล์ที่บาดเจ็บฟื้นตัวเจริญเพิ่มจำนวนได้ปริมาณมากๆ และปรับตัวได้ในสภาวะแวดล้อมใหม่ ขั้นที่ 2 คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท selective enrichment medium อาหารชนิดนี้เป็นอาหารเหลวจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แข่งขันอื่นๆ ขั้นที่ 3 คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เพื่อแยกเชื้อ *Salmonella* โดยดูจากลักษณะโคโลนีของเชื้อ ขั้นที่ 4 คือ การตรวจสอบเบื้องต้นทางชีวเคมี (Biochemical Screening) และขั้นสุดท้าย คือ การตรวจยืนยันทางซีรัมวิทยา นอกจากนี้ยังมีวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารอย่างรวดเร็ว (rapid methods) อีกหลายวิธี เช่น PCR, การตรวจสอบกรดนิวคลีอิก, การวัดความเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้า และวิธีทางอิมมูโนวิทยา เป็นต้น สำหรับ

วิธีทางอิมมูโนวิทยามีผู้นิยมใช้อยู่หลายวิธี เช่น Latex agglutination, Immunochromatography, Enzyme Linked Immunosorbent assay และ Immunomagnetic separation (IMS) ซึ่ง IMS เป็นเทคนิคที่น่าสนใจเพราะสามารถแยกเชื้อ *Salmonella* จากแบคทีเรียชนิดอื่นโดยเชื้อ *Salmonella* จะไปเกาะแอนติบอดีที่เคลือบบน beads และนำไปแยก beads ที่มีเชื้อโดยใช้สนามแม่เหล็กซึ่งทำให้สามารถแยกเชื้อ *Salmonella* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นได้ง่าย ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์มากขึ้นสำหรับการตรวจสอบต่อไป และสามารถนำไปใช้ร่วมกับวิธีตรวจอื่นๆ แล้วทำให้ประสิทธิภาพการตรวจเชื้อ *Salmonella* ของวิธี เหล่านั้นดีขึ้น การใช้ IMS ทำให้ใช้เวลาการตรวจน้อยกว่าการใช้เพียงวิธีเดียว (Liu and Li, 2002) ช่วยกำจัดสารที่ยับยั้งการเจริญ (Cudjoe et al., 1993) เศษต่างๆ และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย (Yu et al., 2001) ทำให้แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ง่าย เนื่องจากเชื้อเป้าหมายจะเกาะติดแอนติบอดีที่เคลือบ beads อย่างจำเพาะทำให้แยกออกจากตัวอย่างได้ เมื่อใช้ร่วมกับ PCR จะช่วยลดโปรตีนที่ปนเปื้อนและดีเอ็นเอแปลกปลอมได้ (Skjerve and Olsvik, 1991) การใช้ IMS ยังช่วยเพิ่มความไวของวิธีโดย Tutenel et al. (2003) ตรวจพบเชื้อ *E. coli* O157 ในอุจจาระวัวมากกว่าวิธีมาตรฐาน และ VIDAS ICE ส่วน Angen et al. (2001) แยกเชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 จากต่อมทอนซิลของหมูซึ่งวิธีมาตรฐาน และ PCR ตรวจไม่พบ สำหรับขั้นตอนการแยกเชื้อ *Salmonella* จากอาหารโดยใช้ IMS ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท enrichment medium ต่อด้วยการทำ IMS โดยการนำ beads ที่เคลือบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ไปลงไปเพื่อจับเซลล์ *Salmonella* ทำให้เชื้อเข้มข้นขึ้น แล้วทำการล้าง beads ที่จับเซลล์ไว้ สุดท้ายคือ การตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ที่เกาะติด โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ selective agar หรือย้อมสีอะคริดีน ออเรนจ์ หรือใช้ร่วมกับ ELISA, PCR, การวัดทางกระแสไฟฟ้า เป็นต้น

แต่วัสดุในการตรวจที่สำคัญ คือ beads เคลือบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้าสินค้าประเภทนี้ ตัวอย่างเช่น Dynabeads® anti- *Salmonella* ทำให้ประเทศไทยต้องเสียค่าการค้ากับต่างประเทศ และราคาค่าตรวจสูงขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองผลิต beads ที่เคลือบ IgG ต่อเชื้อ *Salmonella* เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการนำไปปรับปรุงและพัฒนาเป็นชุดทดสอบต่อไป

การตรวจเอกสาร

Salmonella

Salmonella เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทำให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารหลายโรค เช่น ไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever หรือ enteric fever) การติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคอาหารเป็นพิษ หรือ ท้องร่วง (Salmonellosis) พบได้ทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้ว และยังไม่พัฒนา ในประเทศที่พัฒนาแล้วมีการเก็บข้อมูลสถิติของโรคอาหารเป็นพิษพบว่าโรค Salmonellosis มีความสำคัญมากที่สุดของการเกิดโรคระบาดที่มาจากอาหาร แม้ว่าโรคลำไส้อักเสบที่เกิดจากเชื้อ *Campylobacter* จะมีอุบัติการณ์มากกว่าโรค Salmonellosis แต่เป็นการเกิดประปราย (sporadic) ไม่ได้เกิดการระบาดในคนจำนวนมาก (Bell and Kyriakides, 2002)

ประวัติการค้นพบ

ในปี ค.ศ. 1880 นักพยาธิวิทยาทางการแพทย์ ชื่อ Eberth ค้นพบเชื้อที่เป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์ แต่สามารถเลี้ยงเชื้อเป็นครั้งแรกได้โดย Gaffky ในปี ค.ศ. 1884 (Ziprin, 1994a) ปี ค.ศ. 1885 นักแบคทีเรียวิทยาชาวอเมริกัน ชื่อ T. Smith และ D.E. Salmon สามารถแยกเชื้อ *Salmonella* Choleraesuis จากหมูที่เป็นอหิวาตกโรค ปี ค.ศ. 1888 Gaertner แยกเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ชื่อเดิมคือ *Bacterium enteritidis* ได้จากเนื้อวัว และผู้ป่วยที่รับประทานเนื้อวัว สำหรับชื่อ Genus *Salmonella* ถูกตั้งขึ้นในปี ค.ศ. 1900 โดย Lignières (Bell and Kyriakides, 2002)

ลักษณะทั่วไป

Salmonella เป็นแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae ข้อมติคี่แกรมลบ รูปร่างท่อนตรงขนาดเล็ก (0.7-1.5x2.0-5.0 ไมโครเมตร) ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีและไม่มีอากาศ เคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ยกเว้น *S. Pullorum* และ *S. Gallinarum* ที่ไม่มีแฟลกเจลลา และสายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่เนื่องจากแฟลกเจลลาผิดปกติ ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส และยูรีเอส แต่สร้างอะซิเดส เมตาโบไลต์อาหารโดยขบวนการหายใจและการหมัก ย่อยสลายกลูโคสแล้วได้กรด หรือทั้งกรดและแก๊ส สามารถใช้ซิทเรตเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนใหญ่สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์

การจำแนกเชื้อ *Salmonella* ใช้ระบบ Kauffman-White โดยอาศัยความแตกต่างทางแอนติเจน ซึ่งเริ่มครั้งแรกโดย P.B. White ในปี ค.ศ. 1926 และต่อมาถูกพัฒนาโดย F. Kauffman ในช่วงต้นปี ค.ศ. 1930s (Bell and Kyriakides, 2002) แอนติเจนที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ โอ แอนติเจน (O antigen) หรือเรียกว่า Somatic antigen, เอช แอนติเจน (H antigen) และวีโอ แอนติเจน (Vi antigen) ต่อมาได้มีการนำเทคนิคทางยีนเข้ามาช่วยทำให้สามารถจำแนกเชื้อ *Salmonella* ได้เป็น 2 สปีชีส์ คือ *S. enterica* และ *S.*

bongori ใน *S. enterica* ยังแบ่งย่อยได้อีก 6 subspecies ได้แก่ *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houstenae* และ *indica*, *S. enterica* subsp. *enterica* พบมากที่สุด และพบได้ในคนและสัตว์เลือดอุ่น ส่วน subsp. *arizonae* พบในสัตว์เลือดเย็น (D'Aoust, 1989c) ปัจจุบันพบเชื้อ *Salmonella* มากกว่า 2,501 ซีโรวาร์ (serovar) (Popoff, 2001)

โครงสร้างทางแอนติเจน

1. โอ แอนติเจน (O antigen) หรือ Somatic antigen อยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เป็นสารพอลิโพรตีนแซคคาไรด์ ทนต่อความร้อน มีตั้งแต่กลุ่ม A ถึง 67 การให้ชื่อจะเป็นเลขอารบิก
2. แฟลกเจลลา หรือ เอช แอนติเจน (H antigen) เป็นสารประเภทโปรตีน ไม่ทนความร้อน แบ่งได้ 2 เฟส คือ เฟส 1 และ เฟส 2 *Salmonella* จะสร้างเพียง 1 หรือ 2 เฟสก็ได้ หรือบางชนิดไม่มีทั้ง 2 เฟส เฟส 1 และ เฟส 2 จะถูกควบคุมด้วยยีน H_1 และ H_2 ตามลำดับ การทรานสคริปชันจะถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน vh_2 (D'Aoust, 1997a) การให้ชื่อจะใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก เริ่มจาก a ถึง z
3. แคปซูลาร์ หรือ วีโอ แอนติเจน (Vi antigen) เป็นสารพอลิแซคคาไรด์คลุมอยู่รอบนอก โอ แอนติเจน ถูกทำลายเมื่อได้รับความร้อน เชื้อที่มีวีโอ แอนติเจนจะก่อโรครุนแรง ได้แก่ *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* และ *S. Dublin*

แหล่งที่พบ และการติดเชื้อ

เชื้อ *Salmonella* พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ และในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ จะถูกขับออกมาจากร่างกายพร้อมอุจจาระ สามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน คนได้รับเชื้อจากการบริโภคอาหารและน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ อาหารที่มาจากสัตว์ที่สำคัญ ได้แก่ เนื้อไก่ เนื้อวัว และเนื้อหมู หรือการติดเชื้อที่เกิดจากการสัมผัสอุจจาระของผู้ป่วยที่หายป่วยจากโรค Salmonellosis แล้วแต่ยังเป็นพาหะอยู่ การสัมผัสกับสัตว์ทั้งสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าซึ่งมีเชื้อ *Salmonella* หรือติดเชื้อทางการหายใจแต่การติดเชื้อวิธีนี้น้อยมาก (Doyle and Cliver, 1990)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ

1. อุณหภูมิ *Salmonella* เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 5-47 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35-37 องศาเซลเซียส สามารถปรับตัวได้เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสม เช่น สามารถเป็น psychrotrop เจริญในเนื้อไก่ เนื้อวัว และเปลือกไข่ที่เก็บที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส (D'Aoust, 1997a) นอกจากนี้ การเจริญที่อุณหภูมิต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อยังขึ้นกับซีโรวาร์ (Mossel *et al.*, 1981) อุณหภูมิต่ำสุดในการเจริญของเชื้อ *Salmonella* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะสูงกว่าในอาหารแข็ง และมีการแสดงว่าเชื้อที่ชอบ

อุณหภูมิปานกลางเมื่ออยู่ในสถานะเครียดอันเนื่องมาจากอุณหภูมิจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น *S. Typhimurium* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส (D'Aoust, 1997b)

2. ค่า water activity (a_w) การเติมเกลือ น้ำตาล และตัวถูกละลายอื่นๆ ทำให้ค่า a_w ของอาหารลดลง ยิ่งเติมมากค่า a_w ก็ยิ่งน้อยลง การเติมเกลือมีผลต่อการเกิดพลาสมาไลซิส ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ และการใช้พลังงานในเซลล์เพื่อรักษาสมดุลในที่มีความเข้มข้นเกลือสูง ทำให้อัตราการเจริญช้าลง (D'Aoust, 1989f) การมีความเข้มข้นของเกลือสูงสามารถยืดอายุอาหารโดยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร อาหารที่มีค่า $a_w \leq 0.93$ จะไม่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Salmonella* และจะถูกยับยั้งเมื่อมี NaCl 3-4 % ที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้เชื้อ *Salmonella* สามารถเจริญในที่ที่มีเกลือปริมาณสูง แต่ความเข้มข้นที่สูงของ NaCl จะทำให้ lag phase นานขึ้น และอัตราการเจริญลดลง (D'Aoust, 1989a) และอาหารที่บรรจุในภาชนะสุญญากาศหรือปรับปริมาณแก๊สจะทำให้เชื้อ *Salmonella* ทนเกลือสูงขึ้นซึ่งจะมีผลกับความปลอดภัยของอาหาร (D'Aoust, 1989e)

3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสม คือ 6.5-7.5 และสามารถเจริญได้ในช่วง 4.5-9.0 กรดอินทรีย์อาจสร้างขึ้นจากหัวเชื้อที่ใช้หมัก หรือการเติมกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ต่าง ๆ เพื่อให้อาหารเป็นกรด ใช้ถนอมอาหาร ความสามารถในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อของกรดนั้นจะต้องอยู่ในรูปไม่แตกตัวซึ่งขึ้นกับ pH อาหาร พบว่าความสามารถในการทำลายเชื้อ

S. Typhimurium ของกรดจะลดลงเมื่อมี long chain fatty acid เพิ่มขึ้น (D'Aoust, 1989b) และอุณหภูมิยังมีผลต่อ pH ต่ำสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ (D'Aoust, 1989c) แม้เชื้อ *Salmonella* จะถูกทำลายเมื่ออยู่ในอาหารที่มี pH ซึ่งเชื้อไม่สามารถเจริญได้แต่เชื้อไม่ถูกทำลายทันทีแต่จะตายอย่างช้าๆ และบางเซลล์อาจมีชีวิตอยู่ได้นานในอาหารที่เป็นกรดและทำให้เกิดโรคกับผู้บริโภคอาหารนั้น การเจริญของเชื้อ *Salmonella* ในสภาวะกรดจะเกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอาหารหมัก โดยเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนอยู่แล้วในอาหารจะเพิ่มความต้านทานกรดทำให้ผู้บริโภคเพิ่มความเสี่ยงต่อสุขภาพมากขึ้น เพราะเชื้อจะทนต่อการทำลายของกรดในกระเพาะอาหารและส่งเสริมการอยู่รอดภายในเซลล์ฟาโกไซท์ของคนซึ่งมีสภาพเป็นกรด (D'Aoust, 1991)

การทำให้เกิดโรค

โรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่เกิดจากการได้รับเชื้อจากอาหารและน้ำจึงทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ ปริมาณของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสายพันธุ์ อายุ ผู้ติดเชื้อ ภาวะภูมิคุ้มกัน และการสร้างกรดในกระเพาะอาหาร เนื่องจากกรดไฮโดร-คลอริกในกระเพาะอาหารจะทำลายเชื้อได้ (Doyle and Cliver, 1990) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับส่วนประกอบอาหาร ถ้ามีไขมันสูงเชื้อจะถูกปกคลุมด้วยไขมันทำให้ไม่ถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร โดยทั่วไปเชื้อ *Salmonella* ปริมาณ 10^5 - 10^6 เซลล์จะทำให้เกิดโรค แต่พบว่าเชื้อ *Salmonella* เพียง 1-10 เซลล์ก็สามารถ

ก่อโรคได้ (D'Aoust, 1997a) การติดเชื้อ *Salmonella* ขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อในการเกาะติดและบุกรุกเซลล์เยื่อลำไส้ ซึ่งยีนที่ควบคุม คือ กลุ่มยีน *inv* ประกอบด้วยยีนไม่ต่ำกว่า 15 ยีน *invA* ถึง *invO* ควบคุมการสร้างส่วนที่ก่อความรุนแรง หรือเอนไซม์ที่ทำให้เชื้อ *Salmonella* บุกรุกเข้าเยื่อลำไส้ และระบบ *pho P/pho Q* ช่วยให้เชื้อ *Salmonella* มีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมภายในฟาโกไซท์ที่มีความเป็นกรดสูง และสารดี-เฟนซิน (defensins) (D'Aoust, 1997a)

โรคที่เกิดในคนแบ่งเป็น 3 ประเภท คือ

1. ไข้ไทฟอยด์ (ไข้ไทฟอยด์, พาราไทฟอยด์) ไข้ไทฟอยด์เกิดจากเชื้อ *S. Typhi* ส่วน *S. Paratyphi A, B* และ *C* ทำให้เกิดโรคพาราไทฟอยด์ ไข้ไทฟอยด์เป็นโรคที่รุนแรงในคน เชื้อฟักตัวใช้เวลา 7-28 วัน อาการที่เกิดขึ้น ได้แก่ มีไข้ ปวดศีรษะ อาเจียน ท้องร่วง อาเจียน อ่อนเพลีย การติดเชื้อเริ่มจากเชื้อเข้าสู่ลำไส้เล็กแล้วผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์วิลไล (villi) เข้าสู่ลามินาโพรเพรีย (lamina propria) ในวิลไล และเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองที่นี้แมโครฟาจจะเข้ามาจับกิน แต่เชื้อสามารถทนต่อการทำลาย เชื้อจะเพิ่มจำนวนและออกจากแมโครฟาจเข้าสู่เลือดไปยังตับ ม้าม ท่อน้ำดี และอวัยวะอื่นๆ จนเกิดการติดเชื้อทั้งระบบ

2. โรคลำไส้อักเสบ (enterocolitis, gastroenteritis) เกิดจากเชื้อ *Salmonella* ซีโรไทป์อื่นที่ไม่ได้ทำให้เกิดไข้ไทฟอยด์ โรคนี้พบมากที่สุด ความรุนแรงของโรคมืดมน้อยถึงปานกลาง ระยะฟักโรค 8-72 ชั่วโมง สามารถหายเองได้ภายใน 4-6 วัน อาการ คือ ท้องร่วง ปวดท้อง อาเจียน มีไข้ อาการท้องร่วงเกิดจากเชื้อเข้าสู่ลำไส้เล็กและต่อมน้ำเหลืองพร้อมกับสร้างเอนโทโรทอกซิน แล้วเม็ดเลือดขาวเข้าสู่เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อเป็นผลให้มีการหลั่งของเมือกจากเซลล์ในลำไส้ เกิดการอักเสบของเยื่อเมือก โดยเม็ดเลือดขาวปลดปล่อยพรอสตาแกลนดิน (prostaglandins) เกิดการกระตุ้นอะดี-นิลไซเคเลส (adenyl cyclase) ในเซลล์เยื่อลำไส้ เป็นผลให้เกิดการหลั่งเพิ่มขึ้นของของเหลวไปยังช่องว่างลำไส้ ทำให้เกิดท้องร่วง (Finlay, 1994; Polotsky *et al.*, 1994) จะเป็นการติดเชื้อเฉพาะที่ในลำไส้เท่านั้น การรักษากรณีไม่รุนแรง คือ ให้เกลือแร่ การใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกต้องจะทำให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ถูกทำลายเกิดการติดเชื้อระบบอื่น และจะทำให้ผู้ป่วยเป็นพาหะหลังจากหายป่วยแล้วอีกนาน

3. การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) เป็นการติดเชื้อที่รุนแรง เกิดจากสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง เช่น *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis* และ *S. Paratyphi* เป็นต้น (Ziprin, 1994b) เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะเจริญในกระแสเลือดและเพิ่มจำนวน จะมีอาการไข้สูง หนาวสั่น เบื่ออาหาร แคลเทียเรียในเลือดจะกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ทำให้เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น (นงลักษณ์, 2544) บางครั้งอาจเสียชีวิต หรือถ้าหายป่วยก็จะมีเชื้ออยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน

ระบาดวิทยา

ในประเทศที่พัฒนาแล้วเชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่จะเป็นสาเหตุการระบาดของโรคในระบบทางเดินอาหาร และพบรายงานการเกิดโรคต่ำกว่าความเป็นจริง เนื่องจากโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อ *Salmonella* หายเองได้ผู้ป่วยจึงไม่ได้ไปโรงพยาบาล ดังนั้นจำนวนผู้ป่วยส่วนนี้จะขาดหายไป องค์การอนามัยโลกรายงานว่าในประเทศที่พัฒนาแล้วจำนวนผู้ป่วยอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* มีเพียง 1 ใน 10 เท่านั้นที่ได้รับรายงาน ในขณะที่ประเทศกำลังพัฒนาได้รับการรายงานไม่ถึง 1 % (เกรียงศักดิ์ และ อรุณ, 2541) นอกจากอุบัติการณ์การเกิดโรค Salmonellosis ที่มาจากระบบการรายงานแล้วยังขึ้นอยู่กับระบบสาธารณสุขในประเทศด้วย ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการติดเชื้อ *Salmonella* ในคนเพิ่มขึ้น (D'Aoust, 2001) อาหารที่เกี่ยวข้องกับการระบาดของโรคมีทุกชนิด รวมถึงเนื้อสัตว์ ไข่ นมและผลิตภัณฑ์นม ผักและผลไม้ ดังเช่นในปี ค.ศ. 1981 เกิดการระบาดของ *S. Typhimurium* ในสหรัฐอเมริกาผู้ป่วย 321 ราย เสียชีวิต 2 ราย สาเหตุมาจากการบริโภค Mozzarella cheese ที่ทำจากนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ไม่สมบูรณ์ เช่นเดียวกับการระบาดในปี ค.ศ. 1984 ที่ประเทศแคนาดาผู้ป่วย 2,700 ราย สาเหตุเกิดจาก *S. Typhimurium* PT 10 ใน Cheddar cheese ที่มีการปนเปื้อนนมดิบในนมพาสเจอร์ไรส์ (D'Aoust, 1997a) ปี ค.ศ. 1985 ในประเทศอังกฤษมีเด็กทารกเสียชีวิต 1 ราย เพราะมี *S. Ealing* ในนมผงสำหรับทารกเนื่องจากเครื่องทำแห้งมีการปนเปื้อน ปีเดียวกันเกิดการระบาดครั้งใหญ่ที่สุดในสหรัฐอเมริกามีผู้ป่วย 16,284 ราย เสียชีวิต 7 ราย สาเหตุเกิดจาก *S. Typhimurium* ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีการปนเปื้อนข้ามระหว่างนมดิบและนมพาสเจอร์ไรส์ ปี ค.ศ. 1994 ที่สหรัฐอเมริกามีการระบาดของ *S. Enteritidis* ในไอศกรีมมีผู้ป่วยโดยประมาณ 224,000 ราย สันนิษฐานว่าเกิดการปนเปื้อนส่วนผสมไอศกรีมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้วระหว่างขนส่งมาโรงงาน เนื่องจากใช้รถคันเดียวกับรถขนส่งไข่เหลว ปี ค.ศ. 1996 มีผู้ป่วย 52 ราย ในสหรัฐอเมริกาสาเหตุจาก *S. Thompson* ในเนื้อวัวย่างที่ใช้ความร้อนในการประกอบอาหารไม่เหมาะสม และการควบคุมอุณหภูมิอาหารหลังการประกอบอาหารไม่ดี ปี ค.ศ. 1999 เกิดการระบาดเนื่องจากการบริโภคน้ำส้มที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ในสหรัฐอเมริกาและออสเตรเลีย สำหรับประเทศไทยปี พ.ศ. 2547 พบผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษในจังหวัดน่านมีผู้ป่วย 14 ราย จากการสอบสวนโรคพบอาหารที่สงสัย คือ ลาบทูบปาดิบ ผลการตรวจอุจจาระผู้ป่วยพบเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม B (กรมควบคุมโรค, 2547)

ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค

1. พลาสมิด (plasmid) พลาสมิดเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค พบในเชื้อ *Salmonella* หลายซีโรไทป์ เช่น *S. Enteritidis*, *S. Paratyphi C*, *S. Typhimurium* และ *S. Dublin* เป็นต้น แต่พบว่าการมีพลาสมิดใน *S. Infantis*, *S. Panama* และ *S. Heidelberg* ไม่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค (Threlfall *et al.*, 1989) กลไกของการก่อความรุนแรง คือ พลาสมิดจะควบคุมการสร้างโปรตีนที่ผนังเซลล์ที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อในเนื้อเยื่อของโฮสต์ (Taira *et al.*, 1991; Valone and Chikami, 1991) และยังไปทำลายกลไกการต่อต้านของโฮสต์ (Hoertt *et al.*, 1989) *spv* เป็นกลุ่มยีนที่ควบคุมการ

สร้างสารสำหรับการเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อเรติคิวโลเอนโดทีเรียล (reticuloendothelial) มีขนาด 8 kb (Gulig *et al.*, 1993)

2. ซิเดอโรฟอร์ (siderophores) การสร้างซิเดอโรฟอร์ถูกควบคุมด้วยยีน *fur* ในการทำงานของเซลล์ต้องใช้เหล็ก เชื้อ *Salmonella* จึงต้องแย่งทรานสเฟอริน (transferrin) แลคโตเฟอริน (lactoferrin) และเฟอริตินลิแกนด์ (ferritin ligands) จากโฮสต์เพื่อให้ได้เหล็ก ซึ่งซิเดอโรฟอร์จะทำหน้าที่ส่วนนี้ (Crosa, 1989; D'Aoust, 1991)

3. สารพิษ มีอยู่ 2 ชนิด ที่เชื้อ *Salmonella* สร้างได้ คือ

3.1 เอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) เป็นโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน มีน้ำหนัก 90-110 kDa (D'Aoust, 1991) ถูกควบคุมด้วยยีน *stx* (Chopra *et al.*, 1987) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อความรุนแรงของโรค เพราะทำให้เกิดอาการในผู้ป่วย *Salmonellosis* คือ เมื่อเอนเทอโร-ท็อกซินเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อจะไปกระตุ้นอะดีนิลไซคลเอส (adenyl cyclase) ในเยื่อหุ้มเซลล์ และเพิ่ม cAMP ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ผู้ป่วย ทำให้เกิดการปล่อยของเหลวเข้าสู่ช่องว่างลำไส้ จึงเกิดอาการท้องร่วง

3.2 ไซโตท็อกซิน (cytotoxin) เป็นโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน มีน้ำหนัก 56-78 kDa อยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ความรุนแรงของไซโตท็อกซิน คือ ยับยั้งการสร้างโปรตีนของโฮสต์ และสามารถย่อยสลายเซลล์โฮสต์ทำให้เกิดการแพร่กระจายสู่เนื้อเยื่อโฮสต์

4. Vi antigen, LPS และ Porins

4.1 Vi antigen เป็นส่วนของแคปซูลซึ่งเป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ ป้องกันแมคโครฟาจจับกินโดยยับยั้งการ opsonization ของคอมพลีเมนต์ C3b กลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้าง วิโอแอนติเจนที่สำคัญ คือ *via B*

4.2 LPS (lipopolysaccharide) ความยาวของ LPS ที่ยื่นออกมาจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะป้องกันการแตกของเซลล์จากการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ของโฮสต์ โดยถ้า LPS ยาวจะช่วยป้องกันการสอดแทรกของคอมพลีเมนต์ C5b-9 เข้าในเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมด้านใน ซึ่งมีผลต่อการแตกของเซลล์ (D'Aoust, 1991) นอกจากนี้ส่วนประกอบคาร์โบไฮเดรตของ LPS ยังส่งผลต่อระดับการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ด้วย

4.3 Porins เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นรูที่ผนังเซลล์ ช่วยควบคุมการไหลเข้าของสาร เช่น อาหาร ยาปฏิชีวนะ ถูกควบคุมด้วยยีน *omp F*, *omp C*, *omp D* และ *pho E* (D'Aoust, 1997)

การตรวจวิเคราะห์

จากการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในอาหารที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการผลิต รวมทั้งระดับวิทยาที่เกิดขึ้นในแต่ละปีของแต่ละประเทศ เน้นให้เห็นความสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* ปัจจัยหลักที่จะช่วยลดปริมาณผู้ป่วยลง คือ การให้การศึกษาแก่ผู้บริโภค และการควบคุม

คุณภาพอาหารโดยการตรวจในห้องปฏิบัติการ (เพ็ญศรี, 2541) โดยเฉพาะในโรงงานผลิตอาหารการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธีที่รวดเร็วจะช่วยค้นหาสาเหตุและแก้ไขได้ทันที

วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* จำแนกได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีมาตรฐาน (conventional methods)
2. วิธีที่รวดเร็ว (rapid methods)

วิธีมาตรฐาน (conventional methods)

วิธีนี้มีความหลากหลายในการใช้ขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้ใช้ในด้านความไว ความจำเพาะของวิธี หรือชนิดอาหารที่ตรวจ แต่โดยทั่วไปประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท enrichment medium

ตัวอย่างส่งตรวจที่มีเชื้อ *Salmonella* ปริมาณมาก เช่น อุจจาระ ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนนี้ แต่สามารถแยกเชื้อโดยตรงโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้เลย แต่ตัวอย่างส่งตรวจที่มีเชื้อปริมาณน้อย เช่น อาหาร และน้ำ เป็นต้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนนี้เพื่อฟื้นฟูเซลล์ที่บาดเจ็บจากการผ่านกระบวนการให้ความร้อน การแช่เย็น การละลาย หรือการเก็บรักษาอาหาร และเพิ่มจำนวนเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนจนถึงระดับที่จะตรวจพบได้ แต่ในขั้นตอนนี้แบคทีเรียชนิดอื่นที่ติดมากับตัวอย่างอาหารก็เจริญเพิ่มจำนวนด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้มีหลายชนิด เช่น Tryptic soy broth, Buffered peptone water, Nutrient broth และ Lactose broth เป็นต้น การใช้ขึ้นอยู่กับประเภทอาหาร เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อก็เป็นเรื่องสำคัญเพราะจะต้องนานพอที่จะทำให้เซลล์ที่บาดเจ็บฟื้นตัว เจริญเพิ่มจำนวนได้ปริมาณมากๆ และปรับตัวได้ในสภาวะแวดล้อมใหม่ จึงไม่ควรใช้เวลาเพียง 6-8 ชั่วโมง เวลาที่เหมาะสม คือ 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท selective enrichment medium

อาหารชนิดนี้เป็นอาหารเหลว จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แข่งขันอื่นๆ แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* มีหลายชนิด ได้แก่ Tetrathionate broth ของ Hajna (TT), Muller-Kauffmann tetrathionate brilliant green (MKTBG) และ Muller's tetrathionate brilliant green (TBG) broth กลุ่ม Selenite broth ได้แก่ Selenite F (SelF), Selenite-Cystine (SC) และ Selenite brilliant green sulfa (SBGS) Rappaport-Vassiliadis (RV) broth พัฒนามาจาก Rappaport broth การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แข่งขันอื่นๆ เกิดจากสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิที่ใช้บ่ม สำหรับ TT broth สารยับยั้งคือ tetrathionate ion ($S_4O_6^{2-}$) ที่เกิดจาก S_2O_3 และ I_2 แต่เชื้อ *Salmonella* มี tetrathionate reductase ทำให้หันต่อ $S_4O_6^{2-}$ ซึ่งจะไปมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ หรือหมู่-SH ของเอนไซม์ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ TT broth คือ 41-43 องศาเซลเซียส การยับยั้งของกลุ่ม Selenite broth เกี่ยวข้องกับอัตราการใช้ selenite ซึ่งเป็นพิษเข้าสู่เซลล์ และการมี selenopolythionates เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อที่ไม่ใช่

Salmonella จะมีอัตราการรับ selenite เข้าสู่เซลล์เร็ว แล้วขัดขวางการเพิ่มจำนวนโดยสอดแทรก selenium ในเซลล์โปรตีนเนื่องจากมีโครงสร้างที่เหมือนซัลเฟอร์ อุณหภูมิที่ใช้บ่ม คือ 35 องศาเซลเซียส (D'Aoust, 1989d) RV broth จะมีมาลาไคท์ กรีน และแมกนีเซียมคลอไรด์เป็นตัวยับยั้ง อุณหภูมิที่ใช้บ่ม คือ 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากสายพันธุ์ *Salmonella* ที่ต่างกันจะมีความไวต่อสารยับยั้งและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน การตรวจจึงนิยมใช้อาหาร selective enrichment 2 ชนิด ชนิดหนึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 41-43 องศาเซลเซียส และอีกชนิดบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ที่สามารถตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ได้มากที่สุด (D'Aoust, 2001)

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (plating on selective and differential agar)

เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งเพื่อแยกเชื้อ *Salmonella* โดยดูจากลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* จากปฏิกิริยาทางชีวเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น Brilliant green agar (BGA), Xylose-lysine-desoxycholate (XLD), Hektoen enteric (HE) agar โดยดูกรดที่เกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วทำให้โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสี เนื่องจากอาหารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะใส่ pH indicator ลงไปด้วย เมื่อเกิดกรดสีของ pH indicator จะเปลี่ยนไป และโคโลนีของเชื้อที่ใช้น้ำตาลก็จะเปลี่ยนไปด้วย เชื้อกลุ่มที่ไม่ใช้น้ำตาลแลคโตสโคโลนีมักจะไม่มีสี เช่น เชื้อ *Salmonella* วิธีการนี้มักพบผลบวกปลอมสูง และยังไม่สามารถแยกเชื้อ *Salmonella* ที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสและซูโครสได้ อาหารเลี้ยงเชื้อ Bismuth sulfite (BSA) มีความจำเพาะสูงและไม่ได้ดูการใช้น้ำตาล แต่อาศัยการดูโคโลนีสีดำที่เกิดจากการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ อาจมีหรือไม่มีเงาโลหะ (metallic sheen) Rambach agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ (Rambach, 1990) ประกอบด้วยโพรไพลีน ไกลคอล (propylene glycol) เมื่อเชื้อ *Salmonella* ใช้โพรไพลีน ไกลคอลจะเกิดกรดโพรพิโอนิก และมีสารให้สี 5-bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-galactopyranoside เป็นตัวบ่งบอกการสร้างเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (α -galactosidase) อุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มโดยทั่วไป คือ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ยกเว้น BSA ใช้เวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อใดเชื้อถือได้ 100 % จึงควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 1 ชนิด (Ziprin, 1994b)

4. การตรวจสอบเบื้องต้นทางชีวเคมี (biochemical screening)

ใช้ตรวจสอบโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* อาจใช้ชุดทดสอบตรวจเพื่อความสะดวกรวดเร็ว ลักษณะทางชีวเคมีที่ใช้ตรวจ ได้แก่ การไม่ใช้น้ำตาลแลคโตสและซูโครสบนอาหาร Triple sugar iron (TSI) ความสามารถในการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส (lysine decarboxylase) ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) และอินโดล (indole)

5. การตรวจยืนยันทางซีรัมวิทยา

หลังการตรวจสอบทางชีวเคมีแล้วให้ผลตรงกับเชื้อ *Salmonella* จะต้องนำมาตรวจสอบโดยวิธี slide agglutination กับแอนติซีรั่มที่จำเพาะกับโอ แอนติเจนเพื่อหากลุ่ม และที่จำเพาะกับเอช และวี โอ แอนติเจนเพื่อหาซีโรวาร์

การตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี ISO6579:2002

วิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* ในอาหารทางจุลชีววิทยามีหลายวิธี เช่น Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (AOAC), FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM), United States Department of Agriculture (USDA) และ International Organization for Standardization (ISO) เป็นต้น สำหรับวิธี ISO6579:2002 เป็นวิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารและอาหารสัตว์ สามารถใช้เป็นวิธีอ้างอิงในการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร เนื่องจาก AOAC ให้การยอมรับว่าเป็น Official method วิธี ISO6579:2002 ได้รับการแก้ไขและตีพิมพ์ในเดือนตุลาคม ค.ศ. 2002 โดยมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อบางอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ISO6579:1993 ดังนี้คือ เปลี่ยน Selenite cystine broth (SC) ไปเป็น Muller Kauffmann tetrathionate novobiocin broth (MKTn) ซึ่งเหมาะกับการตรวจ *S. Typhi* และ *S. Paratyphi* มากกว่า อีกทั้ง selenite ยังเป็นอันตรายต่อร่างกายคน ทำการเปลี่ยน Rappaport Vassiliadis broth (RV) ไปเป็น Rappaport Vassiliadis peptone broth (RVS) และให้ใช้ XLD แทน Brilliant green agar (BGA)

สำหรับขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ก็เหมือนกับวิธีมาตรฐานทั่วไปดังที่กล่าวข้างต้น แตกต่างกันตรงชนิดของอาหารที่เลือกใช้ในขั้นตอนที่ 2 และ 3

การตรวจสอบโดยใช้วิธีมาตรฐานต้องใช้เวลามากกว่าจะทราบผล รวมทั้งใช้แรงงานมาก ค่าใช้จ่ายสูง จึงได้มีการพัฒนาวิธีทดสอบที่รวดเร็วขึ้น

วิธีที่รวดเร็ว (Rapid Methods)

เป็นวิธีที่ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว โดยอาจเกิดจากการเปลี่ยนหรือหลีกเลี่ยงขั้นตอนที่ใช้เวลานานในการทดสอบ หรือใช้วิธีเดิมแต่มีความไวสูงขึ้น (Berlin, 1990) วิธีรวดเร็วที่ใช้ตรวจเชื้อ *Salmonella* ที่พัฒนาขึ้นและมีการผลิตทางการค้ามีหลายวิธี คือ

1. การปรับปรุงระบบการเลี้ยงเชื้อ โดยรวมขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดไม่จำเพาะและจำเพาะ เพื่อลดเวลาในการตรวจสอบ ชุดทดสอบที่ใช้วิธีนี้คือ SPRINT ของบริษัท Oxoid, Inc. โดยใช้ Buffered Peptone Water (BPW) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่จำเพาะ และ Rappaport Vassiliadis (RV) เป็นอาหารชนิดจำเพาะที่อยู่ในแคปซูล ซึ่งจะถูกล่อยออกมาเมื่อถึงเวลาที่กำหนด ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่จำเพาะเปลี่ยนเป็นชนิดจำเพาะ

2. การเคลื่อนที่ของเชื้อ *Salmonella* ใช้ตรวจสอบเฉพาะเชื้อ *Salmonella* ที่เคลื่อนที่ได้ เช่น อาหาร Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) และ Diasal M ของบริษัท Merck ใช้ตรวจสอบเชื้อที่ผ่านการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่จำเพาะมาแล้ว การอ่านผลโดยการเคลื่อนที่ของเชื้อจากจุดที่ใส และนำเชื้อที่สงสัยมาตรวจลักษณะทางชีวเคมี MSRV ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว (ให้ผลบวกเบื้องต้นใน 48 ชั่วโมง) และมีความน่าเชื่อถือสูง ชุดทดสอบ 1-2 test ของบริษัท BioControl Systems, Inc. ถ้ามี *Salmonella* จะพบแถบการตกตะกอนรูปตัวยูที่เกิดจาก immunodiffusion ของแอนติซีรัมโพลีคลอนัลที่เติมลงไป ชุดทดสอบนี้มีความไวและความจำเพาะ $\geq 89.6\%$ และ 94.9% ตามลำดับ ชุดทดสอบ Oxoid Rapid *Salmonella* การอ่านผลจากการเกิดสีด้านล่างบนของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอด มีความไวและความจำเพาะ $\geq 77.7\%$ และ 93.6% ตามลำดับ (D'Aoust, 2001)

3. Hydrophobic Grid Membrane Filtration (HGMF) วิธีนี้จะใช้การกรองแล้วนำกระดาษกรองวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ตัวกระดาษกรองจะมีเส้นสีดำแบ่งเป็นช่อง ๆ เพื่อแยกการเจริญของแบคทีเรียออกจากกัน การตรวจผลจะดูจากลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นหลังการบ่มเชื้อ ได้แก่ ชุดทดสอบ ISO-GRID™ ของบริษัท Neogen Corporation ในการตรวจถ้าไม่พบเชื้อ *Salmonella* จะใช้เวลาตรวจ 48 ชั่วโมง แต่ถ้าพบเชื้อจะต้องทำการตรวจยืนยันต่อจะใช้เวลาตรวจ 72 ชั่วโมง ซึ่งเร็วกว่าวิธีมาตรฐาน 1 วัน

4. PCR เป็นการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการตรวจสอบวิธีนี้มีความไวสูงกว่าวิธีมาตรฐาน แต่มีข้อเสีย คือ อาจเกิดผลบวกปลอมได้ถ้าในตัวอย่างมีเซลล์ที่ตายแล้วแต่ยังมีดีเอ็นเอที่สภาพยังสมบูรณ์อยู่ หรืออาจตรวจไม่พบทั้งที่มีอยู่เนื่องจากปัจจัยของอาหารไปรบกวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำให้ต้องเลี้ยงเชื้อก่อนทำ PCR (วัฒนาลัย, 2538) ตัวอย่างชุดทดสอบ เช่น ชุดทดสอบ BAX[®] ของบริษัท Qualicon, Inc. มีความไว 10^2 - 10^3 เซลล์เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* ชุดทดสอบ Probelia Systems ของบริษัท BioControl Systems, Inc. TaqMan System ของบริษัท Perkin-Elmer Biosystems เป็นเครื่องอัตโนมัติ เครื่องนี้มีความไว 99.7% ความจำเพาะ 100% เมื่อใช้กับเชื้อ *Salmonella* บริสุทธิ์ ใช้เวลาตรวจประมาณ 30 ชั่วโมง

5. DNA Hybridization

5.1 การตรวจสอบกรดนิวคลีอิก มีการพัฒนาชุดทดสอบที่เป็นการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอโพรบกับกรดนิวคลีอิกของเซลล์เป้าหมาย และใช้การตรวจวัดสีหรือการเรืองแสงทางเคมี เช่น ชุดทดสอบ GENE TRAK ของบริษัท Neogen Corporation มีความไว $\geq 89.3\%$ ความจำเพาะ 95.2% ใช้เวลาตรวจ 48 ชั่วโมง (D'Aoust, 2001)

5.2 Chromosomal Fingerprinting ใช้ดีเอ็นเอจากโครโมโซมของเชื้อ *Salmonella* เป็นโพรบในการแยกซีโรวาร์ต่าง ๆ Fingerprinting เรียกอีกชื่อว่า RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) วิธีการ คือ เลือเอนไซม์ที่ใช้ตัดดีเอ็นเอ และโพรบที่จะมาเข้าคู่กัน (hybridize) เพื่อให้

ได้แถบสีอื่นเอนที่สามารแยกความแตกต่างของแต่ละซีโรวาร์ได้ (วัฒนาลัย, 2538) การแยกซีโรวาร์มีความสำคัญในการศึกษาการแพร่ระบาดของโรค

6. เทคนิคทางกระแสไฟฟ้า อาศัยความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกระแสไฟฟ้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการใช้สารในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นสารโมเลกุลขนาดใหญ่แล้วเปลี่ยนเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กที่มีประจุมากกว่า เครื่องมือที่ใช้หลักการนี้ คือ Malthus ของบริษัท Malthus ใช้เวลาตรวจประมาณ 42 ชั่วโมง หรือการใช้ Bactometer ของบริษัท bioMérieux Inc.

7. การจำแนกโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมี ตรวจสอบโคโลนีที่สงสัยโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีและเอนไซม์ ในการเปลี่ยนแปลงสีอาหารเลี้ยงเชื้อ มีทั้งชุดทดสอบที่แปลผลโดยผู้ใช้ เช่น API 20E ของบริษัท bioMérieux Inc., O.B.I.S ของบริษัท Oxoid Ltd. หรือใช้เครื่องอัตโนมัติ เช่น VITEX เป็นต้น

8. Ice-nucleation เป็นการใช้ไวรัสของแบคทีเรียพาติเอนเอนที่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์เข้าสู่เซลล์ *Salmonella* ทำให้เกิดการสร้างโปรตีนสำหรับการสร้างผลึกน้ำแข็งเมื่อนำตัวอย่างไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -9.3 องศาเซลเซียส โดยมีสี่เป็นตัวบ่งบอก ตัวอย่างที่มีเชื้อ *Salmonella* จะแข็งและมีสีส้ม ชุดทดสอบที่ใช้หลักการนี้ คือ Bind[®] *Salmonella* ของบริษัท BioControl Systems, Inc. ใช้เวลาตรวจประมาณ 22 ชั่วโมง

9. เทคนิคทางอิมมูโนวิทยา

9.1 Latex agglutination ใช้ตรวจยืนยันโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยใช้เม็ด latex ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ต้องมีเชื้อปริมาณมาก 10^7 - 10^9 CFU จึงจะตรวจพบด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำงานให้ผลเร็ว ตัวอย่างเช่น *Salmonella* latex ของบริษัท Oxoid, Inc., Spectate ของบริษัท Rhone Poulenc Diagnostics, Microscreen *Salmonella* ของบริษัท Microgen Bioproducts Ltd. เป็นต้น

9.2 Immunochromatography ใช้แอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* 2 ตัว ตัวที่ 1 จะติดฉลากอนุภาค เช่น ทอง จะเคลือบบนแผ่นเมมเบรนส่วนล่าง แอนติบอดีตัวที่ 2 จะอยู่ส่วนบน เมื่อหยดตัวอย่างที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้วปรากฏขีดสีในช่องทดสอบแสดงว่ามีเชื้อ *Salmonella* ตัวอย่างเช่น ชุดทดสอบ Reveal[®] ของบริษัท Neogen Corporation หรือ Path-Stik ของบริษัท Celsis, Inc. มีความไวประมาณ 10^6 CFU ถ้ามีเชื้อ *Salmonella* จะปรากฏขีดสี 2 เส้น ใช้เวลาตรวจประมาณ 48 ชั่วโมง

9.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* โดยการเคลือบโพลีโคลนอล (polyclonal) หรือโมโนโคลนอล (monoclonal) แอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* บนพื้นผิววัสดุแข็ง เมื่อแอนติเจนกับแอนติบอดีทำปฏิกิริยากัน แอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* ตัวที่ 2 ที่ติดฉลากเอนไซม์จะเข้าไปจับ เมื่อเติมสารตั้งต้นของเอนไซม์จะเกิดสี หรือสารเรืองแสง ต้องเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ *Salmonella* ให้อยู่ระดับที่ตรวจพบได้ คือ 10^4 - 10^6 CFU/มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับซีโรวาร์ ใช้เวลาตรวจประมาณ 48 ชั่วโมง มีความไว $\geq 94.1\%$ ความจำเพาะ $\geq 79.4\%$ ตัวอย่างของชุดทดสอบ ได้แก่ VIDAS SLM ของบริษัท bioMérieux

Inc., TECRA Salmonella Visual Immunoassay ของบริษัท International Bioproducts, ALERT[®] ของบริษัท Oxoid, Inc., Transia Plate Salmonella ของบริษัท Diffchamb AB, EIA Foss จากบริษัท Foss North America, Inc.

9.4 Immunomagnetic Separation (IMS) ใช้แอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* เคลือบ beads เพื่อจับเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท enrichment medium แล้วตรวจผลโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง หรือใช้เทคนิคอื่น ๆ ร่วม IMS ทำให้ประสิทธิภาพการตรวจเชื้อ *Salmonella* ดีขึ้น ตัวอย่างชุดทดสอบเช่น Dynabeads[®] anti-Salmonella ของบริษัท Dynal, Inc. ใช้เวลาตรวจ 48 หรือ 72 ชั่วโมง

Immunomagnetic Separation (IMS)

IMS เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจ มีการนำไปใช้ตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และตัวอย่างอื่น ๆ หลายชนิด เช่น เชื้อ *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ตรวจหาเอนไซม์ TNase ของ *Staphylococcus aureus* ในนม (Yazdankhah *et al.*, 1999) และยังนำไปใช้ทางด้านการแพทย์สำหรับการคัดเลือกลิมโฟไซต์ และเซลล์ชนิดอื่นๆของมนุษย์ IMS สามารถใช้ร่วมกับวิธีอื่น เช่น ELISA, Immunofluorescence, PCR หรือการตรวจทางกระแสไฟฟ้า เป็นต้น

การใช้ IMS ทำให้ใช้เวลาการตรวจน้อยกว่าการใช้เพียงวิธีเดียว (Liu and Li, 2002) ช่วยกำจัดสารที่ขยับยั้งการเจริญ (Cudjoe *et al.*, 1993) เศษต่างๆ และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย (Yu *et al.*, 2001) ทำให้แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ง่าย เนื่องจากเชื้อเป้าหมายจะเกาะติดแอนติบอดีที่เคลือบ beads อย่างจำเพาะทำให้แยกออกจากตัวอย่างได้ ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ เมื่อใช้ร่วมกับ PCR จะช่วยลดโปรตีนที่ปนเปื้อนและดีเอ็นเอแปลกปลอมได้ (Skjerve and Olsvik, 1991) อย่างไรก็ตามยังพบการจับกันอย่างไม่จำเพาะของจุลินทรีย์อื่นกับ beads หรือเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติบอดีที่เคลือบ beads ตัวอย่างเช่น *Proteus* spp., โคลิฟอร์มที่มีเมือก (Cudjoe and Krona, 1997) และ *Citrobacter freundii* (Coleman *et al.*, 1995) การใช้ IMS ยังช่วยเพิ่มความไวของวิธีโดย Tutenel *et al.* (2003) ตรวจพบเชื้อ *E. coli* O157 ในอุจจาระวัวมากกว่าวิธีมาตรฐาน และ VIDAS ICE ส่วน Angen *et al.* (2001) แยกเชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 จากต่อมทอนซิลของหมูซึ่งวิธีมาตรฐาน และ PCR ตรวจไม่พบ เมื่อตรวจเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อไก่ดิบพบมากกว่าวิธีมาตรฐาน (Coleman *et al.*, 1995) โดยมีความไวในการตรวจเชื้อ *Salmonella* 10-20 เซลล์ต่อกรัมอาหาร แต่ IMS อาจมีปัญหาเกี่ยวกับอาหารที่มีไขมันสูง หรือจุลินทรีย์แข่งขันสูงมากกว่า 10^7 CFU/มิลลิลิตร เพราะจะสูญเสีย beads ไประหว่างขั้นตอนการล้างและการแยกช่วงแรก การนำเทคนิคนี้ไปใช้อาจต้องทำการเปลี่ยนสารละลาย หรือบัฟเฟอร์ที่ใช้เคลือบ beads (Skjerve and Olsvik, 1991) หรือนำตัวอย่างที่มีไขมันสูงหลังการเลี้ยงเชื้อไปแช่เย็นก่อนการทำ IMS (Coleman *et al.*, 1995) แต่ในการใช้ Dynabeads[®] anti- *Salmonella* แนะนำให้

นำตัวอย่างที่มีไขมันสูง ขึ้นหีด หรือมีอนุภาคอื่นมากไปทำการเจือจางตัวอย่างหลังจากการเลี้ยงเชื้อ แล้วก่อนทำ IMS Yu *et al.* (2001) กล่าวว่าเพื่อการจับของแอนติบอดีที่เคลือบ beads กับเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพควรทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมก่อน เทคนิค IMS เป็นวิธีที่ง่าย ช่วยเพิ่มความไว ความจำเพาะ และทำให้การตรวจใช้เวลาลดลง จึงควรนำมาใช้ร่วมกับวิธีการตรวจอื่น ๆ

ปัจจัยที่มีผลต่อการจับจุลินทรีย์เป้าหมายกับ beads ที่เคลือบแอนติบอดี

1. แอนติบอดี ที่ใช้เคลือบอาจเป็นโพลีโคลนอล หรือโมโนโคลนอล แต่ถ้าใช้โมโนโคลนอลจะมีความจำเพาะสูงจำกัดให้จุลินทรีย์ที่มี epitope ของแอนติเจนเหมือนกันหลายๆที่จะจับแอนติบอดีที่เคลือบ beads ได้ และแอนติเจนจากเซลล์ที่ตายอาจรบกวนการเกาะบน beads ที่เคลือบแอนติบอดี Yu *et al.* (2001) พบว่าโพลีโคลนอลมีความจำเพาะน้อยกว่าแต่ความไวสูงกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี ส่วนความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ถ้ามากเกินไปจะทำให้เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มบน beads (Cudjoe *et al.*, 1993)
2. จำนวน beads ที่เคลือบแอนติบอดี ถ้าใช้มากจะมีความไวในการตรวจสูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมีเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายจำนวนน้อย
3. การเลี้ยงเชื้อ ช่วยเพิ่มความไว เพราะจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายที่มีจำนวนน้อยเพิ่มมากขึ้น และพ้นตัวจากการบาดเจ็บ (Parham *et al.*, 2003) แต่ถ้าเลี้ยงเชื่อนานเกินไปจะทำให้ความไวลดลงเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันสูงขึ้น
4. การบ่ม beads ที่เคลือบแอนติบอดีกับตัวอย่าง ถ้าเวลานานจะช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายเกาะแอนติบอดีบน beads ดีขึ้น แต่หากนานเกินไปจะทำให้เกิดการเกาะแบบไม่จำเพาะของจุลินทรีย์อื่น และถ้ามีการหมุนตลอดเวลาจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายเกาะแอนติบอดีบน beads ดีกว่า (Cudjoe *et al.*, 1993)
5. ชนิดตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างที่จะตรวจมีไขมันและอนุภาคอื่น ๆ อยู่มากจะทำให้สูญเสีย beads ระหว่างการล้าง และลดการจับกับเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย
6. การล้าง ถ้าล้างมากไปจะสูญเสียเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย แต่ถ้าล้างน้อยไปจะไม่สามารถกำจัดจุลินทรีย์อื่นที่เกาะแบบไม่จำเพาะกับ beads ได้ (Cudjoe *et al.*, 1993)
7. ปริมาตรตัวอย่าง ถ้าใช้มากจะมีความไวสูงขึ้นสามารถตรวจสอบเชื้อที่มีจำนวนน้อยๆ ได้ (Skjerve and Olsvik, 1991)

วิธีการแยกเชื้อ *Salmonella* จากอาหารโดยใช้ IMS

1. การเตรียมตัวอย่าง เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท enrichment medium เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

2. การใช้ IMS โดยการนำ beads ที่เคลือบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ใส่ลงไปเพื่อจับเซลล์ *Salmonella* ทำให้เชื้อเข้มข้นขึ้น แล้วทำการล้าง beads ที่จับเซลล์ไว้
3. การตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ที่เกาะติด โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ selective agar หรือย้อมสีอะคริดีน ออเรนจ์ หรือใช้ร่วมกับ ELISA, PCR, การวัดทางกระแสไฟฟ้า เป็นต้น

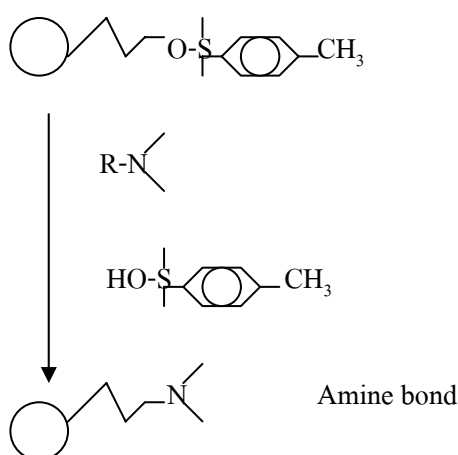
Dynabeads[®] anti-Salmonella

Dynabeads[®] anti-Salmonella เป็นอนุภาคโพลิสไตรีน (Polystyrene) ที่เป็น superparamagnetic แสดงคุณสมบัติแม่เหล็กเมื่ออยู่ในสนามแม่เหล็ก มีขนาดเท่ากันและรูปร่างเหมือนกัน ถูกเคลือบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ที่มีความสำคัญในการทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์มักพบในอาหารคน อาหารสัตว์ และสิ่งแวดล้อม เป็นเชื้อที่มีโอแอนติเจนอยู่ในกลุ่ม B ถึง Z ซึ่งจะเกาะติดแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนผิว beads แตกต่างกันไปตามซี-โรวาร์ของเชื้อ

อาหารที่มีเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นมากต้องนำ beads ที่จับเชื้อ *Salmonella* แล้วใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อประเภท selective enrichment medium ทำให้ต้องใช้เวลาเพิ่ม 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ISO6579 พบว่า Dynabeads[®] anti-Salmonella ให้ผลลบปลอมน้อยกว่า และ Dynabeads[®] anti-Salmonella สามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ได้ที่ระดับต่ำ คือ 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่มีเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นเท่ากับหรือมากกว่า 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (DynaL, 1999)

Dynabeads M-280 Tosylactivated

Dynabeads M-280 Tosylactivated เป็น beads ที่มีขนาด 2.8 ไมโครเมตร พื้นที่ผิว 4-8 ตารางเมตรต่อกรัมถูกเคลือบด้วยชั้นโพลียูรีเทน hydroxy group ถูกกระตุ้นโดยการทำปฏิกิริยากับ p-toluenesulphonyl chloride เป็นผลให้ sulphonyl ester สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์กับโปรตีน หรือ ligands ที่มี amino หรือ sulfhydryl groups, beads ชนิดนี้สามารถนำไปใช้แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยการนำไปเคลือบ ligand ที่จะใช้ในการแยกโปรตีน นำไปใช้ตรวจทางอิมมูโนวิทยาโดยเป็น solid phase ที่ถูกเคลือบด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดี หรืออาจใช้ในการแยกเซลล์ แต่ Dynabeads M-450 เหมาะสมที่จะใช้ในการแยกเซลล์มากกว่า เช่น การแยก CD2⁺ หรือ CD3⁺ T cells จากเลือด เป็นต้น



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีน หรือ ligands ที่มี amino หรือ sulfhydryl groups
ที่มา: (Dyna1, 1999)

แอนติบอดี

แอนติบอดีเป็นสารประเภทไกลโคโปรตีนที่ร่างกายโฮสต์สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองและทำลายสิ่งแปลกปลอม เป็นกลุ่มของ immunoglobulin (Ig) โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดีประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายยาว (heavy chain) ที่เหมือนกัน 2 สาย ที่เข้าคู่กับโพลีเปปไทด์สายสั้น (light chain) ที่เหมือนกัน 2 สายที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ มีรูปร่างเป็นรูป “Y” และน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 150,000 ดาลตัน สามารถแบ่ง Ig ออกเป็น 5 กลุ่ม คือ IgG, IgM, IgA, IgD และ IgE โดย IgG พบมากที่สุดในซีรัม ถูกสร้างมากที่สุดในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม มีความทนทานต่อขบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ ส่วนใหญ่นำมาใช้ในการตรวจทางอิมมูโนวิทยา ส่วน IgM มีความจำเพาะน้อยกว่า รวมทั้งทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ยากกว่า IgG สำหรับ IgA, IgD และ IgE นำมาใช้ในการตรวจทางอิมมูโนวิทยาน้อยมาก เพราะมีความจำเพาะต่ำ (Liddell, 2001)

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาชุดทดสอบสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. (screening method) ในไก่สด และ อาหารทะเลแช่เยือกแข็ง ด้วยเทคนิค immunomagnetic separation (IMS) เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อที่พบมากที่สุดในประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยคือ

1. เพื่อผลิต beads ที่เคลือบ IgG ต่อเชื้อ *Salmonella* สำหรับการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ได้หลายกลุ่มมากขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มที่มักจะพบในอาหาร
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองและ Dynabeads® anti-*Salmonella* ด้านความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องโดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน
3. เปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ในอาหารและผลที่ได้โดยใช้ bead ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีที่ผลิตเอง และที่มีจำหน่ายทางการค้า และ วิธีมาตรฐาน (conventional method)
4. จัดทำชุดทดสอบ (test kit) ที่ใช้ในประเทศไทย

อุปกรณ์การทดลอง

1. จุลินทรีย์

เชื้อ *Salmonella* ได้รับจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

1. *Salmonella* Derby (กลุ่ม B)
2. *Salmonella* Rissen (กลุ่ม C)
3. *Salmonella* Enteritidis (กลุ่ม D)
4. *Salmonella* Weltevreden (กลุ่ม E)
5. *Salmonella* Aberdeen (กลุ่ม F)
6. *Salmonella* Worthington (กลุ่ม G)
7. *Salmonella* Hvitittingfoss (กลุ่ม I)
8. *Salmonella* Urbana (กลุ่ม N)

เชื้อแบคทีเรียอื่น ได้รับจากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. *Escherichia coli* ATCC 8739
2. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736
3. *Enterobacter aerogenes*
4. *Shigella sonnei*
5. *Proteus mirabilis*
6. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 Tryptone soya agar (TSA)
- 2.2 Buffered peptone water (BPW)
- 2.3 Rappaport Vassiliadis broth (RVS)
- 2.4 Muller-Kauffmann tetrathionate broth base (MKTT)
- 2.5 Xylose lysine desoxycholate agar (XLD)
- 2.6 Modified semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV)
- 2.7 Mannitol salt egg yolk agar (MSEY)
- 2.8 Eosin methylene blue lactose sucrose agar (EMB)
- 2.9 MacConkey agar
- 2.10 Standard plate count agar (PCA)

2.11 Triple sugar iron agar (TSI)

2.12 MIL medium (MIL)

3. สารเคมี

3.1 *Salmonella* O polyvalent A-67 antisera

3.2 *Salmonella* O polyvalent A-I antisera

3.3 *Salmonella* O Multi group antisera

3.3.1 OMA

3.3.2 OMB

3.4 *Salmonella* O antisera group I

3.5 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.4

3.6 Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 with 0.1% (w/v) BSA

3.7 0.01 M Sodium phosphate buffer pH 7.4 with 0.05% Tween 20 (PBS-tween 20)

3.8 Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4

3.9 0.85% NaCl

3.10 Ammonium sulfate $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ อิมตัว

3.11 0.15 M Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2

3.12 20 mM Sodium phosphate pH 7.0

3.13 0.1M Citric acid pH 3.0

3.14 1.0 M Tris-HCl pH 9.0

3.15 Kovacs' reagent

3.16 แอลกอฮอล์ 70%

4. วัสดุและเครื่องมือ

4.1 เครื่องตีปั่นอาหาร

4.2 เครื่องชั่งน้ำหนัก

4.3 ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 ± 1 °C และ 41.5 ± 1 °C ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 800 และ B 50

4.4 ตู้เย็น

4.5 เครื่องผสมตัวอย่าง (Vortex mixer) ยี่ห้อ Vortex-2 Genie รุ่น G-560E

4.6 แผ่นแม่เหล็ก (Dynal MPC) ยี่ห้อ Vicam

4.7 เครื่องหมุนระหว่างการบ่ม beads ยี่ห้อ Stuart Scientific serial R000100757

4.8 Freeze-dryer (Lyophilizer) ยี่ห้อ Dura-Dry TM μ P รุ่น FD 2055 D0000

- 4.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ SORVALL[®] RC 26 PLUS
- 4.10 อ่างน้ำร้อน (Water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W 270
- 4.11 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV/VIS Spectrometer) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Lamda 2
- 4.12 ไมโครปิเปตขนาด 1-10, 10 – 100 และ 100-1000 ไมโครลิตร พร้อมทิป (Tip)
- 4.13 หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 4.14 ปิเปตปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 และ 10 มิลลิลิตร
- 4.15 ลูปและเข็มเย็บเชื้อ (Loop and Needle)
- 4.16 ไม้พันสำลี
- 4.17 ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- 4.18 จานเพาะเชื้อ
- 4.19 หลอดทดลอง ขนาด 16x150 มิลลิเมตร และ 13x100 มิลลิเมตร
- 4.20 Dynabeads[®] anti-Salmonella
- 4.21 Dynabeads M-280 Tosylactivated
- 4.22 คอลัมน์ Hitrap protein A Sepharose ขนาด 5 มิลลิลิตร
- 4.23 ชุด Mini-PROTEAN[®] 3 Cell ยี่ห้อ BIO-RAD
- 4.24 Dialysis tube (MW cut off 12,000-14,000)
- 4.25 Membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
- 4.26 คิวเวต
- 4.27 แผ่นกระจกสไลด์

วิธีการทดลอง

1. แอนติซีรัม (crude antiserum)

ใช้แอนติซีรัมกลุ่ม OMA, OMB และ I ที่ผลิตจากโอแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* ของบริษัท S&A REAGENT LAB LTD., PART โดยแอนติซีรัมกลุ่ม OMA ได้จากการฉีดเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม A, B, D, E และ L เข้าไปในกระต่ายส่วนกลุ่ม OMB ได้จากการฉีดเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม C, F, G และ H และแอนติซีรัม I ได้จากการฉีดเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม I เพียงกลุ่มเดียว

การหาปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรัม (crude antiserum)

แอนติซีรัมกลุ่ม OMA, OMB และ I จะถูกนำมาหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี direct agglutination โดยทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* เฉพาะกลุ่มที่ใช้ในการผลิตแอนติซีรัม เชื้อ *Salmonella* ที่ใช้ทดสอบจะถูกเลี้ยงบนอาหาร Tryptone soya agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมาใส่ใน 0.85% NaCl หลังจากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 1 ชั่วโมงปรับค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ 0.6-0.7 ทำการทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีโดยใส่ 0.85% NaCl ปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงใน microtitre plate ทุกหลุมจนครบ 12 หลุม ต่อด้วยการใส่แอนติซีรัมปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงในหลุมที่ 1 แล้วทำการเจือจาง 2 เท่า (two fold dilution) ในหลุมต่อไปด้วย 0.85% NaCl จนความเจือจางสุดท้ายของหลุมที่ 11 เท่ากับ 1 : 2,048 ส่วนหลุมที่ 12 ใช้เป็นตัวควบคุมลบ ใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบปริมาตร 25 ไมโครลิตรทั้ง 12 หลุม เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ข้ามคืน อ่านผลการตกตะกอน โดยที่ระดับ +2 (50% agglutination) ขึ้นไปจะถือว่าให้ผลบวก

2. การเตรียม IgG บริสุทธิ์

เตรียม IgG บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ดังนี้ ผสมแอนติซีรัมกับ 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วทำการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อิ่มตัวทิ้งไว้ข้ามคืน แยกตะกอนออกโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 แล้วใส่ใน dialysis tube นำไป dialyse ใน 0.85% NaCl ที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นนำสารละลายใน dialysis tube มาเจือจางด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 แยก IgG บริสุทธิ์ด้วยการทำ affinity chromatography โดยใช้คอลัมน์ Hitrap protein A Sepharose ขนาด 5 มิลลิลิตร ใช้ 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 เป็น binding buffer และ 0.1M citric acid pH 3.0 เป็น elution buffer โดยมี 1.0 M Tris-hydrochloric acid pH 9.0 เป็นตัวปรับสภาพ IgG ให้เป็นกลาง ทำการเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ fraction ละ 1 มิลลิลิตร

แล้วทำการ dialyse ในสารละลาย 0.15 M PBS pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจาก dialyse แล้วนำสารละลายไป lyophilize ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยการทำ SDS - PAGE และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

3. การหาปริมาณ IgG โดยวิธี direct agglutination

ทำเช่นเดียวกับการหาปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรัม (crude antiserum) แต่ทำการทดสอบกับเชื้อ non-Salmonella เพิ่ม โดยนำ IgG ที่ผ่านการ lyophilize แล้วมาละลายใน 0.85% NaCl ก่อนนำไปทดสอบ

4. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเคลือบ IgG บน Dynabeads M-280 Tosylactivated เปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella

วิธีการเคลือบ IgG

การเคลือบ IgG บน beads ปฏิบัติตามวิธีของผู้ผลิต Dynabeads M-280 Tosylactivated โดยถ้าทำการเคลือบที่อุณหภูมิ 37 °C จะใช้เวลา 16-24 ชั่วโมง แต่ถ้าเคลือบที่อุณหภูมิ 4 °C จะใช้เวลานานมากกว่า 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง beads ด้วย PBS ผสม 0.1%(w/v) BSA ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จะได้ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่พร้อมใช้งาน

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อ *Salmonella* และ non-*Salmonella* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อใส่ใน PBS pH 7.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่าความขุ่นตามต้องการ ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เตรียมได้บนอาหาร Plate count agar (PCA) เพื่อใช้เป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดสอบ IMS ต่อไป การใช้ beads จับเชื้อ

นำ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง หรือไม่เคลือบด้วย IgG หรือ Dynabeads® anti-Salmonella ใส่ในหลอด eppendorf แล้วใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบ หรือตัวอย่างอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อใน buffered peptone water (BPW) แล้วลงไป 1 มิลลิลิตร ทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิห้องโดยนำ eppendorf ไปใส่ในเครื่องหมุน หลังจากนั้นแยก beads โดยการนำ eppendorf ใส่แท่นแม่เหล็กเพื่อจับ beads นาน 3 นาที ระหว่างนี้ทำการกลับหลอดไปมา 4-5 ครั้ง ดูส่วนของเหลวที่นำ eppendorf ออกจากแท่นแม่เหล็ก หลังจากนั้นล้าง beads ด้วย PBS-tween 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

จำนวน 2 ครั้ง แล้วแขวนลอย beads ใน PBS-tween 20 ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำ beads ที่จับเชื้อแล้วไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อนับจำนวนเชื้อ

4.1 การตรวจหาจำนวน beads ที่เหมาะสมในการเคลือบด้วย IgG

ปิเปต Dynabeads M-280 Tosylactivated ใส่ในหลอด eppendorf หลอดละ 5 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตร แต่ละหลอดทำการล้าง beads ด้วย 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตบัฟเฟอร์ดังกล่าว 850 ไมโครลิตรใส่ในหลอด eppendorf ที่มี beads ที่ล้างแล้ว ใส่ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม ที่ละลายใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ลงไปในแต่ละหลอด ทำการเคลือบในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 4 °C) นาน 10 นาที แล้วใส่ 0.5% (w/v) BSA 100 ไมโครลิตรที่ละลายใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 ทำการเคลือบต่อไปในตู้เย็นนานประมาณ 60 ชั่วโมง ต่อจากนั้นล้าง beads นำ beads ที่เคลือบ IgG แล้วไปทดสอบกับเชื้อ *S. Enteritidis* ทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก หลังจากนั้นล้าง beads นำ beads ที่จับเชื้อที่แยกได้ไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ xylose lysine desoxycholate agar (XLD) เพื่อนับจำนวนเชื้อ

4.2 การตรวจหาบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเคลือบ beads

ทำการเปรียบเทียบบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ 0.1M borate buffer pH 9.5 กับ 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 และอุณหภูมิ 37 °C กับ 4 °C โดยปิเปต Dynabeads M-280 Tosylactivated ใส่ในหลอด eppendorf หลอดละ 5 ไมโครลิตร แต่ละหลอดทำการล้าง beads ด้วยบัฟเฟอร์ที่จะเปรียบเทียบปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตบัฟเฟอร์ดังกล่าว 850 ไมโครลิตรใส่ในหลอด eppendorf ที่มี beads ที่ล้างแล้ว ต่อจากนั้นนำ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัมละลายในบัฟเฟอร์ที่จะเปรียบเทียบ 100 ไมโครลิตรใส่ลงไป ทำการเคลือบที่อุณหภูมิที่จะเปรียบเทียบ คือ 37 °C กับ 4 °C นาน 10 นาที แล้วใส่ 0.5% (w/v) BSA 100 ไมโครลิตรที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่จะเปรียบเทียบ ทำการเคลือบต่อไปสำหรับที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C นานมากกว่า 48 ชั่วโมง ต่อจากนั้นล้าง beads นำ beads ที่เคลือบ IgG แล้วไปทดสอบกับเชื้อ *S. Enteritidis* โดยใช้เวลาจับเชื้อ 10 นาที แล้วแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก หลังจากนั้นล้าง beads นำ beads ที่จับเชื้อที่แยกได้ไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อนับจำนวนเชื้อ

4.3 การตรวจหาปริมาณ IgG ที่เหมาะสมในการเคลือบ beads

ทดลองใช้ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมไปเคลือบ beads จำนวน 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* โดยใช้เวลาล้างเชื้อ 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella (20 ไมโครลิตร) ที่ใช้เวลาจับเชื้อ 10 นาที ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก หลังจากนั้นล้าง beads นำ beads ที่จับเชื้อแล้วไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อนับจำนวนเชื้อ

4.4 การตรวจหาเวลาที่เหมาะสมในการจับเชื้อของ beads ที่เคลือบ IgG

นำ beads 5 ไมโครลิตรที่เคลือบ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 200 ไมโครกรัมไปทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* โดยใช้เวลาล้างเชื้อ 1 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง ส่วน Dynabeads® anti-Salmonella (20 ไมโครลิตร) ใช้เวลาล้างเชื้อ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก หลังจากนั้นล้าง beads นำ beads ที่จับเชื้อแล้วไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อนับจำนวนเชื้อ

5. การศึกษาความจำเพาะ (Specificity) ของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองเปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella

นำ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ beads ที่ไม่ได้เคลือบด้วย IgG กับ Dynabeads® anti-Salmonella ทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* และ non-*Salmonella* โดยการใส่เชื้อประมาณ 10^3 ถึง 10^4 CFU/มิลลิลิตร ลงไปในหลอด eppendorf ที่มี beads ทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาทีสำหรับ Dynabeads® anti-Salmonella และ 60 นาทีสำหรับ bead เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองและไม่ได้เคลือบด้วย IgG ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก หลังจากนั้นล้าง beads นำ beads ที่จับเชื้อแล้วไปนับจำนวนเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD ยกเว้น *Staphylococcus aureus* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol salt egg yolk agar (MSEY), *E. coli* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ eosin methylene blue lactose sucrose agar (EMB) และ *Shigella sonnei* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ macConkey agar

6. การศึกษาความไว (Sensitivity) ของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองเปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella

นำ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองและ beads ที่ไม่ได้เคลือบด้วย IgG กับ Dynabeads® anti-Salmonella ทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* โดยการใส่เชื้อ 3 ระดับ ได้แก่ 1-9, 10-99 และ 100-999 CFU/มิลลิลิตร ลงไปในหลอด eppendorf ที่มี beads ทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาทีสำหรับ Dynabeads® anti-Salmonella และ 60 นาทีสำหรับ beads

เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองและ beads ที่ไม่ได้เคลือบด้วย IgG ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก หลังจากนั้นล้าง beads นำ beads ที่จับเชื้อแล้วไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อบันทึกจำนวนเชื้อ

7. การศึกษาการทำซ้ำ (Repeatability) ของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง

นำ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองทดสอบกับเชื้อ *S. Weltevreden* โดยการใส่เชื้อที่ความเข้มข้นระดับต่ำ คือ 10^2 ถึง 10^3 และระดับสูง คือ 10^5 ถึง 10^6 ทำการทดสอบเชื้อที่ความเข้มข้นเดียวกัน พร้อมๆ กันทั้งหมด 5 ซ้ำ ทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก หลังจากนั้นล้าง beads นำ beads ที่จับเชื้อแล้วไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อบันทึกจำนวนเชื้อ

8. การศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี IMS และวิธีมาตรฐาน ISO 6579 : 2002

8.1 การตรวจเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ ทำการตรวจสอบตัวอย่างอาหารด้วยวิธี IMS โดยใช้ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ Dynabeads[®] anti-Salmonella กับวิธีมาตรฐาน ISO 6579

การเตรียมตัวอย่างอาหาร

ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกเดิม BPW 225 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องตีปั่นอาหาร 2 นาที แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 ± 1 °C นาน 8 ชั่วโมง สำหรับวิธี IMS และ 18 ± 2 ชั่วโมง สำหรับวิธี ISO 6579 แล้วทดสอบดังต่อไปนี้

8.1.1 การตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี IMS (DynaI, 1999)

เปิดตัวอย่างอาหารที่เตรียมใน BPW มา 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอด eppendorf ที่มี Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองที่มีอนุภาค beads ประมาณ 1×10^7 และ Dynabeads[®] anti-Salmonella (20 ไมโครลิตร) ลงไปอย่างละหลอด นำไปใส่ในเครื่องหมุนทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาทีสำหรับ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ 10 นาที สำหรับ Dynabeads[®] anti-Salmonella ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก หลังจากนั้นล้าง beads แล้วแขวนลอย beads ใน 100 ไมโครลิตร PBS-tween 20 ผสมให้เข้ากัน แบ่งมาอย่างละ 50 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ streak บน XLD agar ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 41.5 ± 1 °C และ 37 ± 1 °C ตามลำดับ นาน 24 ± 3 ชั่วโมง เลือกเชื้อที่สงสัยอย่างน้อย 2 โคโลนีมาทดสอบทางชีวเคมีและซีรัมวิทยา

8.1.2 การตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี ISO 6579 : 2002 (Conway, 2003)

ปีเปตตัวอย่างอาหารที่เตรียมใน BPW มา 0.1 มิลลิลิตรใส่ใน rappaport and vassiliadis broth (RVS) 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 24 ± 3 ชั่วโมง และอีก 1 มิลลิลิตรใส่ใน muller-kauffmann tetrathionate broth base (MKTT) 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 24 ± 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ streak บน XLD agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ตามลำดับ นาน 24 ± 3 ชั่วโมง เลือกเชื้อที่สงสัยอย่างน้อย 2 โคโลนีมาทดสอบทางชีวเคมีและซีรัมวิทยา

8.2 การประเมินผล

ทดสอบความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) และความถูกต้อง (Accuracy) ของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ Dynabeads® anti-Salmonella โดยใช้ตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ISO 6579

การทดสอบความไวทำโดยนำจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยเทคนิค IMS และตรงกับวิธี ISO 6579 หาคด้วยจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี ISO 6579

การทดสอบความจำเพาะทำโดยนำจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยเทคนิคIMS และตรงกับวิธี ISO 6579 หาคด้วยจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธี ISO 6579

การทดสอบความถูกต้องทำโดยนำจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลที่ตรงกันระหว่างเทคนิค IMS และวิธี ISO 6579 หาคด้วยจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจ

9. การจัดทำเป็นชุดทดสอบ

ผลและการวิจารณ์

1. การหาปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรัม (crude antiserum)

จากการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ใน crude serum ด้วยวิธี direct agglutination โดยใช้เชื้อในกลุ่มของแอนติซีรัมชนิดนั้นทดสอบ พบว่าปริมาณแอนติบอดี (antibody titer) ในแอนติซีรัมกลุ่ม OMA เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. Derby*, *S. Enteritidis* และ *S. Weltevreden* จะได้ 1:64, 1:128 และ 1:512 ตามลำดับ ส่วนปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรัมกลุ่ม OMB เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. Rissen*, *S. Aberdeen* และ *S. Worthington* จะได้ 1:256, 1:2048 และ 1:1,024 ตามลำดับ สำหรับแอนติซีรัมกลุ่ม I มีปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1:512 เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. Hvittefoss*

2. การเตรียม IgG บริสุทธิ์

จากการทำ affinity chromatography ของแอนติซีรัมกลุ่ม OMA และ OMB พบว่าต้องทำการแยก IgG 2 รอบ ส่วนแอนติซีรัมกลุ่ม I ทำการแยก IgG 3 รอบ เมื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ SDS-PAGE ด้วยวิธี reduced form ทำให้เห็น IgG แยกเป็น 2 bands คือ heavy chain ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน และ light chain ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 ดาลตัน (ภาพผนวกที่ 1) เมื่อตรวจสอบว่าเป็น IgG บริสุทธิ์แล้วจึงรวม IgG ที่ได้จากแอนติซีรัม กลุ่ม OMA, OMB และ I ไป lyophilize แล้วนำมาหาปริมาณโปรตีนใน IgG ด้วยวิธี Lowry พบว่ามีปริมาณโปรตีนประมาณ 450 ไมโครกรัมต่อ 0.001 กรัมของ IgG หรือ 450 มิลลิกรัมต่อกรัม

3. การหาปริมาณ IgG โดยวิธี direct agglutination

นำ IgG ที่ผ่านการ lyophilize มาหาปริมาณด้วยวิธี direct agglutination โดยนำมาทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* และ เชื้อ non-*Salmonella* พบว่าปริมาณแอนติบอดีของ IgG ต่อเชื้อ *Salmonella* ลดลงมาก เมื่อเทียบกับก่อนการเตรียม IgG บริสุทธิ์ ผลการทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* เป็นดังนี้ เชื้อ *S. Derby*, *S. Rissen*, *S. Enteritidis*, *S. Weltevreden*, *S. Aberdeen*, *S. Worthington* และ *S. Hvittefoss* ปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1:16, 1:4, 1:16, 1:16, 1:8, 1:2 และ 1:8 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ non-*Salmonella* คือ เชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *Shigella sonnei*, *P. mirabilis* ไม่เกิดการตกตะกอน (agglutination) ยกเว้น *Staphylococcus aureus* ที่มีปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1:8 อาจเป็นเพราะ *S. aureus* มีโปรตีนเอนไซม์ที่ผนังเซลล์ที่สามารถจับส่วน Fc ของ IgG ได้ แสดงว่า IgG นี้ค่อนข้างมีความจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella* สำหรับสาเหตุที่ปริมาณแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ลดลงมากอาจมาจากการทำ affinity chromatography ทำให้ Ig ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ IgG ถูก

กำจัดออกไป โดยเฉพาะ IgM ซึ่งเป็น Ig ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา agglutination รวมทั้งการสูญเสีย IgG บางส่วนในระหว่างการเตรียม IgG บริสุทธิ์

4. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเคลือบ IgG บน Dynabeads M-280 Tosylactivated เปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella

4.1 การตรวจหาจำนวน beads ที่เหมาะสมในการเคลือบด้วย IgG

จากการทดลองนำ Dynabeads M-280 Tosylactivated จำนวน 5 และ 10 ไมโครลิตร (จากขวดที่มี beads ประมาณ 2×10^9 ต่อมิลลิลิตร) คิดเป็นอนุภาค beads ประมาณ 1×10^7 และ 2×10^7 ตามลำดับ มาเคลือบด้วย IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม แล้วนำไปจับเชื้อ *S. Enteritidis* จำนวน 8,000 CFU/มิลลิลิตร โดยใช้เวลาจับเชื้อ 10 และ 60 นาที พบว่าที่เวลาจับเชื้อเท่ากัน beads มีความสามารถในการจับเชื้อใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ beads ปริมาตร 5 ไมโครลิตรเพื่อประหยัด beads เนื่องจากมีราคาแพง

ตารางที่ 1 การจับเชื้อ *S. Enteritidis* เมื่อใช้ปริมาตร beads และเวลาต่างกันโดยใช้ปริมาณเชื้อ 8,000 CFU/มิลลิลิตร

ปริมาตร beads(ไมโครลิตร)/ เวลาจับเชื้อ	จำนวนเชื้อที่พบ (CFU/มิลลิลิตร)	
	Beads	Supernatant
5 / (10 นาที)	345	3,450
10 / (10 นาที)	340	7,300
5 / (60 นาที)	1,290	4,150
10 / (60 นาที)	1,380	3,150

4.2 การตรวจหาบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเคลือบ IgG

จากการทดลองเปรียบเทียบการเคลือบ IgG บน beads ที่สถานะต่างๆ กัน 4 สถานะ แล้วนำไปจับเชื้อ *S. Enteritidis* จำนวน 10,500 CFUต่อมิลลิลิตรนาน 10 นาที พบว่าการใช้ 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 ให้ผลการจับเชื้อดีกว่าการใช้ 0.1 M borate buffer pH 9.5 และ

เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในการเคลือบที่ 37 °C นาน 16-24 ชั่วโมง กับ 4 °C นานมากกว่า 48 ชั่วโมงโดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน พบว่าการจับเชื้อของ beads ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2) การเคลือบ IgG โดยการใช้อุณหภูมิต่ำจะทำให้การจับกันทางเคมีของ IgG กับ beads เกิดขึ้นช้า (ใช้เวลามากกว่า 48 ชั่วโมง) ในขณะที่อุณหภูมิ 37 °C ใช้เวลา 16-24 ชั่วโมง ซึ่ง Dynabeads M-280 Tosylactivated จะจับโปรตีนด้วยการดูดติดทางกายภาพ และทางเคมีโดยพันธะโควาเลนต์ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการเคลือบ IgG โดยใช้ 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 และที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16-24 ชั่วโมง เพื่อประหยัดเวลาในการทำ

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเคลือบ IgG บน beads ในการจับเชื้อ *S. Enteritidis* โดยใช้ปริมาณเชื้อ 10,500 CFU/มิลลิลิตร

สภาวะการเคลือบ	จำนวนเชื้อที่พบ (CFU/มิลลิลิตร)	
	Beads	Supernatant
0.1 M borate buffer, 37 °C, 16-24 ชั่วโมง	110	9,050
0.1 M borate buffer, 4 °C, มากกว่า 48 ชั่วโมง	75	9,700
0.1 M sodium phosphate buffer, 37 °C, 16-24 ชั่วโมง	500	9,400
0.1 M sodium phosphate buffer, 4 °C, มากกว่า 48 ชั่วโมง	405	8,800

4.3 การตรวจหาปริมาณ IgG ที่เหมาะสมในการเคลือบ beads

จากการใช้ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมมาเคลือบ beads แล้วไปจับเชื้อ *S. Rissen* (กลุ่ม C) และ *S. Hvittingfoss* (กลุ่ม I) นาน 60 นาที โดยทั้งสองเชื้อเป็นเชื้อที่ beads ที่เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับได้น้อยที่สุด และมากที่สุด ตามลำดับ (ข้อมูลไม่แสดง) เมื่อเปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella ที่จับเชื่อนาน 10 นาที สาเหตุที่ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองต้องใช้เวลาจับเชื่อนาน 60 นาที เนื่องจากพบว่าถ้าใช้เวลาจับเชื้อ 10 นาทีจะจับเชื้อ *Salmonella* ได้น้อยลง ผลการทดลองพบว่า beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองยังคงจับเชื้อ *S. Rissen*

ได้น้อยกว่า Dynabeads® anti-Salmonella แต่จับเชื้อ *S. Hvittingfoss* ได้มากกว่าถึงแม้จะใช้ IgG 50 ไมโครกรัม (ตารางที่ 3) แต่การลด IgG ลงความสามารถในการจับเชื้อ *Salmonella* ของ beads ก็ลดลงเช่นกัน ดังนั้นจึงไม่ควรที่จะลด IgG ลงเพราะจะทำให้การจับเชื้อ *Salmonella* กลุ่มที่ beads ที่เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับได้น้อยลง เช่น กลุ่ม C และ D ดังนั้นในการตรวจหาเวลาที่ใช้ในการจับเชื้อจะใช้ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 200 ไมโครกรัม

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของ IgG ที่ระดับต่างๆที่ใช้ในการเคลือบ bead ในการจับเชื้อ *Salmonella*

ปริมาณโปรตีนของ IgG (ไมโครกรัม)	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (CFU/มิลลิลิตร)	จำนวนเชื้อที่พบ (CFU/มิลลิลิตร)	
		Beads	Supernatant
S. Rissen	33,000		
Dynabeads® anti-Salmonella		11,050	9,350
Coated beads 50		1,550	22,450
Coated beads 100		3,400	25,400
Coated beads 200		3,650	21,450
S. Hvittingfoss	35,000		
Dynabeads® anti-Salmonella		300	27,900
Coated beads 50		3,400	22,800
Coated beads 100		6,700	18,900
Coated beads 200		8,000	19,400

4.4 การตรวจหาเวลาที่เหมาะสมในการจับเชื้อของ beads ที่เคลือบ IgG

จากการจับเชื้อ *S. Derby*, *S. Rissen*, *S. Enteritidis*, *S. Weltevreden* และ *S. Hvittingfoss* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม B, C, D, E และ I ตามลำดับ โดยใช้เวลา 60 และ 180 นาทีเปรียบเทียบผลการจับกับ Dynabeads® anti-Salmonella ที่ใช้เวลาการจับเชื้อ 10 นาที สาเหตุที่ต้องหาเวลาในการจับเชื้อของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง เนื่องจากได้ทดลองจับเชื้อ *Salmonella* ที่เวลา 10 นาทีแล้วพบว่าความสามารถในการจับเชื้อ *Salmonella* กลุ่มต่างๆ ยังน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella ยกเว้นกลุ่ม I (ข้อมูลไม่แสดง) ผลการจับเชื้อที่เวลา 60 และ 180 นาที พบว่าการใช้เวลามากขึ้นสามารถจับเชื้อได้มากขึ้น โดยที่เวลา 60 นาที beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง สามารถจับเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม B และ E ได้ใกล้เคียงกับ Dynabeads® anti-Salmonella ส่วน

กลุ่ม C และ D beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง จับเชื้อได้น้อยกว่า แต่กลุ่ม I จับเชื้อได้มากกว่า ส่วนที่เวลา 3 ชั่วโมง beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อกลุ่ม B, E และ I ได้มากกว่า แต่กลุ่ม C และ D ยังคงน้อยกว่า (ตารางที่ 4) ดังนั้นในการทดลองต่อไป beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจะใช้เวลาจับเชื้อ 60 นาที สาเหตุที่ไม่ใช้เวลาานานกว่านี้เพราะต้องการลดการเกิด non-specific binding หรือการเกาะกันอย่างไม่จำเพาะกับเชื้อ non- *Salmonella* ที่อยู่ในอาหาร

ตารางที่ 4 การจับเชื้อของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับ
Dynabeads® anti-Salmonella

ชนิด beads, เวลาจับเชื้อ	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (CFU/มิลลิลิตร)	จำนวนเชื้อที่พบ (CFU/มิลลิลิตร)	
		Beads	Supernatant
S. Derby	18,300		
Dynabeads® anti-Salmonella, 10 นาที		5,100	12,450
Coated beads, 60 นาที		5,475	12,650
Coated beads, 180 นาที		26,100	6250
S. Rissen	33,900		
Dynabeads® anti-Salmonella, 10 นาที		10,950	17,700
Coated beads, 60 นาที		2,200	23,800
Coated beads, 180 นาที		7,800	17,300
S. Enteritidis	21,600		
Dynabeads® anti-Salmonella, 10 นาที		8,050	12,350
Coated beads, 60 นาที		1,600	15,500
Coated beads, 180 นาที		5,850	7,000
S. Weltevreden	26,600		
Dynabeads® anti-Salmonella, 10 นาที		5,400	9,850
Coated beads, 60 นาที		5,010	17,700
Coated beads, 180 นาที		18,250	1,950
S. Hvittefoss	28,100		
Dynabeads® anti-Salmonella, 10 นาที		250	26,900
Coated beads, 60 นาที		5,365	19,000
Coated beads, 180 นาที		16,150	9,050

5. การศึกษาความจำเพาะ (Specificity) ของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองเปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella

จากการเปรียบเทียบการจับเชื้อ *Salmonella* ในกลุ่ม B, C, D, E, F, G, I รวมทั้งกลุ่ม N ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้ใช้ในการผลิตแอนติชีรั่มกลุ่ม OMA, OMB และ I ของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง กับที่ไม่เคลือบด้วย IgG ใช้เวลาจับเชื้อ 60 นาที และ Dynabeads® anti-Salmonella ใช้เวลาจับเชื้อ 10 นาที พบว่า beads ที่ไม่เคลือบด้วย IgG สามารถจับเชื้อที่ทดสอบได้ทุกเชื้อโดยจับ *S. Weltevreden* ได้ดีที่สุดแสดงว่าเกิด non-specific binding ส่วน beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อ *S. Aberdeen*, *S. Worthington* และ *S. Hvitittingfoss* ได้ดีกว่า Dynabeads® anti-Salmonella แต่เชื้อ *Salmonella* กลุ่มเหล่านี้พบไม่บ่อยในอาหาร แต่กลุ่มที่พบบ่อย คือ B, C, D และ E ซึ่ง beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อได้น้อยกว่า Dynabeads® anti-Salmonella สำหรับการจับเชื้อ *S. Urbana*, beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองก็ยังจับได้อาจเป็นเพราะมี antigenic determinant คล้ายกันหรือเกิด non-specific binding เช่นเดียวกับ beads ที่ไม่เคลือบด้วย IgG ส่วน Dynabeads® anti-Salmonella นั้นผู้ผลิต beads ชนิดนี้กล่าวว่าจับเชื้อ *Salmonella* ได้ในกลุ่ม B ถึง Z โดยความสามารถในการจับจะแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามจำนวนเชื้อ *S. Urbana* ที่จับได้ของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง กับที่ไม่เคลือบด้วย IgG และ Dynabeads® anti-Salmonella ก็ไม่สูงนักจึงน่าจะเกิดจาก non-specific binding (ตารางที่ 5)

ส่วนการจับเชื้อของ beads ในกลุ่ม non-*Salmonella* พบว่า beads ที่ไม่เคลือบด้วย IgG จับเชื้อที่ทดสอบได้เกือบทุกเชื้อ ยกเว้นเชื้อ *E. coli* และ *Shigella sonnei* (ตารางที่ 6) โดยเฉพาะ *K. pneumoniae* และ *P. mirabilis* ที่จับได้มากพอๆ กับ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง สำหรับ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองกับ Dynabeads® anti-Salmonella สามารถจับได้ทุกเชื้อ โดยเฉพาะ *E. aerogenes*, *P. mirabilis* และ *Staphylococcus aureus* ที่ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อได้มากกว่า แต่สำหรับเชื้อ *K. pneumoniae*, beads ทั้งสามชนิดจับได้พอๆ กัน การจับเชื้อ non-*Salmonella* ได้จัดเป็น non-specific binding ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการให้เกิด เพราะแสดงว่า beads เหล่านี้ไม่มีความจำเพาะ การจับเชื้อได้ของ beads อาจเป็นเพราะเชื้อไปเกาะติดเฉยๆ โดยไม่เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ของแอนติบอดี กับแอนติเจน เพราะจากการทำการทดลองหลายๆ ครั้งพบว่าจำนวนเชื้อที่จับได้ไม่สม่ำเสมอ ยกเว้นการจับเชื้อ *E. aerogenes* และ *Staphylococcus aureus* ที่ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อได้มากกว่า Dynabeads® anti-Salmonella และ beads ที่ไม่เคลือบด้วย IgG ทุกครั้ง (ข้อมูลไม่แสดง) ซึ่งอาจเป็นเพราะในการเคลือบ IgG อาจจะมีโครงสร้างส่วน Fab ของ IgG ที่ไปเกาะบนผิว bead แล้วหันส่วน Fc ออกมาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งมีโปรตีนแข็งไปเกาะส่วน Fc ของ IgG ที่ใช้ในการเคลือบ beads จึงถูกจับได้มากทั้งที่ไม่ได้อยู่ใน Family Enterobacteriaceae ส่วนการจับเชื้อ *E. aerogenes* ได้มากอาจเป็นเพราะอยู่ใน Family

Enterobacteriaceae เหมือนกันจึงอาจมี antigenic determinant คล้ายกัน การที่ Dynabeads® anti-Salmonella มีความจำเพาะในการจับเชื้อมากกว่าอาจเป็นเพราะ IgG ที่ใช้เคลือบเป็นส่วนผสมของ โพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เกาะแบบโควาเลนต์บนผิว beads (Poppe et al.,1996)

ตารางที่ 5 ความจำเพาะของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง
เปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella*

ชนิด beads	จำนวนเชื้อที่ใส่ (CFU/มิลลิลิตร)	จำนวนเชื้อที่พบ (CFU/มิลลิลิตร)	
		Beads	Supernatant
S. Derby (กลุ่ม B)	7,500		
Dynabeads® anti-Salmonella		2,200	5,450
Uncoated beads		10	8,600
Coated beads		1,445	6,050
S. Rissen (กลุ่ม C)	7,900		
Dynabeads® anti-Salmonella		3,600	4,950
Uncoated beads		24	7,900
Coated beads		1,140	6,850
S. Enteritidis (กลุ่ม D)	6,250		
Dynabeads® anti-Salmonella		3,150	2,850
Uncoated beads		16	6,550
Coated beads		1,915	2,900
S. Weltevreden (กลุ่ม E)	4,600		
Dynabeads® anti-Salmonella		2,600	4,550
Uncoated beads		145	8,000
Coated beads		1,950	3,450
S. Aberdeen (กลุ่ม F)	5,050		
Dynabeads® anti-Salmonella		315	3,200
Uncoated beads		2	3,350
Coated beads		650	2,150

ตารางที่ 5 (ต่อ) ความจำเพาะของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง
เปรียบเทียบกับ Dynabeads[®] anti-Salmonella เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella*

ชนิด beads	จำนวนเชื้อที่ใส่	จำนวนเชื้อที่พบ (CFU/มิลลิลิตร)	
	(CFU/มิลลิลิตร)	Beads	Supernatant
S. Worthington (กลุ่ม G)	6,450		
Dynabeads [®] anti-Salmonella		10	8,300
Uncoated beads		1	8,550
Coated beads		1,310	5,450
S. Hvitittingfoss (กลุ่ม I)	5,700		
Dynabeads [®] anti-Salmonella		15	5,350
Uncoated beads		8	5,400
Coated beads		1,040	4,050
S. Urbana (กลุ่ม N)	4,550		
Dynabeads [®] anti-Salmonella		10	4,650
Uncoated beads		35	5,200
Coated beads		40	5,150

ตารางที่ 6 ความจำเพาะของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง
เปรียบเทียบกับ Dynabeads[®] anti-Salmonella เมื่อทดสอบกับเชื้อ non-Salmonella

ชนิด beads	จำนวนเชื้อที่ใส่ (CFU/มิลลิลิตร)	จำนวนเชื้อที่พบ (CFU/มิลลิลิตร)	
		Beads	Supernatant
<i>E. coli</i>	9,050		
Dynabeads [®] anti-Salmonella		10	5,350
Uncoated beads		0	7,300
Coated beads		5	8,350
<i>E. aerogenes</i>	3,400		
Dynabeads [®] anti-Salmonella		18	3,100
Uncoated beads		77	2,600
Coated beads		671	1,250
<i>K. pneumoniae</i>	4,150		
Dynabeads [®] anti-Salmonella		157	4,050
Uncoated beads		123	3,100
Coated beads		215	3,950
<i>S. sonnei</i>	9,800		
Dynabeads [®] anti-Salmonella		1	5,150
Uncoated beads		0	6,450
Coated beads		4	5,200
<i>P. mirabilis</i>	6,900		
Dynabeads [®] anti-Salmonella		49	4,450
Uncoated beads		107	4,650
Coated beads		221	5,800
<i>S. aureus</i>	4,200		
Dynabeads [®] anti-Salmonella		26	3,150
Uncoated beads		5	2,700
Coated beads		670	2,150

6. การศึกษาความไว (Sensitivity) ของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองเปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella

จากการใส่เชื้อ *Salmonella* ที่ระดับ 1-9, 10-99 และ 100-999 CFU/มิลลิลิตร พบว่าที่ระดับต่ำกว่า 10 CFU/มิลลิลิตร Dynabeads® anti-Salmonella สามารถตรวจพบเชื้อ *S. Derby*, *S. Rissen*, *S. Enteritidis* และ *S. Weltevreden* ส่วน beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง ตรวจพบเชื้อ *S. Derby*, *S. Rissen*, *S. Weltevreden* และ *S. Worthington* ที่ระดับเชื้อ 10-99 CFU/มิลลิลิตร Dynabeads® anti-Salmonella ตรวจพบเชื้อ *S. Aberdeen* beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง ตรวจพบเชื้อ *S. Enteritidis*, *S. Aberdeen*, *S. Hvittefoss* และ *S. Urbana* ที่ระดับเชื้อสูงกว่า 100 CFU/มิลลิลิตร Dynabeads® anti-Salmonella ตรวจพบเชื้อ *S. Hvittefoss*, *S. Worthington* และ *S. Urbana* แต่การพบยังไม่สม่ำเสมอ (ข้อมูลไม่แสดง) เช่นเดียวกับการพบ *Salmonella* ที่ระดับเชื้อต่ำกว่า 10 CFU/มิลลิลิตร ของ coated beads ทั้ง 2 ชนิดที่ยังตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ที่กล่าวมาแล้วไม่สม่ำเสมอ ยกเว้นเชื้อ *S. Rissen* และที่ระดับ 10-99 CFU/มิลลิลิตร beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองก็ยังพบเชื้อที่กล่าวมาแล้วไม่สม่ำเสมอ ยกเว้นเชื้อ *S. Enteritidis* สำหรับ beads ที่ไม่เคลือบด้วย IgG ที่ระดับเชื้อ *Salmonella* ต่ำกว่า 100 CFU/มิลลิลิตรจะตรวจไม่พบและเมื่อเชื้อมีจำนวนมากขึ้นการจับเชื้อก็สูงขึ้น (ตารางที่ 10)

Dynabeads® anti-Salmonella สามารถจับเชื้อ *S. Derby*, *S. Rissen*, *S. Enteritidis* และ *S. Weltevreden* ได้ดีกว่า beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง แต่จับเชื้อ *S. Aberdeen*, *S. Worthington*, *S. Hvittefoss* และ *S. Urbana* ได้น้อยกว่า ในการทดลองนี้เป็นการทดสอบในสภาวะที่ไม่มีเชื้ออื่นผสม แต่ในความเป็นจริงตัวอย่างอาหารจะมีเชื้ออื่นปนเปื้อนด้วยเสมอ รวมทั้งมีอนุภาคอาหารชิ้นเล็ก ๆ ที่อาจขัดขวางการจับเชื้อ *Salmonella* ดังนั้นความสามารถของ coated beads ในการจับเชื้อ *Salmonella* ที่ระดับต่ำสุด (low detection limit) ย่อมลดลง

ตารางที่ 7 ความไวของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองเปรียบเทียบกับ Dynabeads[®] anti-Salmonella เมื่อใส่เชื้อ *Salmonella* ที่ระดับต่างๆ

เชื้อ	จำนวนเชื้อ ที่ใส่ (CFU/มิลลิลิตร)	จำนวนเชื้อที่พบบน beads (CFU/มิลลิลิตร)		
		Dynabeads [®] anti-Salmonella	Coated beads	Uncoated beads
<i>S. Derby</i> (กลุ่ม B)	5	1	1	0
	18	3	1	0
	102	31	29	0
<i>S. Rissen</i> (กลุ่ม C)	7	4	3	0
	28	12	4	0
	128	47	23	0
<i>S. Enteritidis</i> (กลุ่ม D)	6	1	0	0
	85	35	20	0
	115	50	50	1
<i>S. Weltevreden</i> (กลุ่ม E)	5	1	1	0
	85	44	23	0
	102	39	34	2
<i>S. Aberdeen</i> (กลุ่ม F)	8	0	0	0
	63	1	6	0
	120	2	10	0
<i>S. Worthington</i> (กลุ่ม G)	5	0	2	0
	50	0	3	0
	161	0	24	0
<i>S. Hvittingfoss</i> (กลุ่ม I)	20	0	0	0
	65	0	9	0
	106	2	27	0
<i>S. Urbana</i> (กลุ่ม N)	3	0	0	0
	80	0	2	0
	660	0	9	6

7. การศึกษาการทำซ้ำ (Repeatability) ของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง

Repeatability เป็นการทดสอบซ้ำด้วยวิธีทดสอบเดียวกัน ตัวอย่างที่เหมือนกันภายใต้สภาวะเดียวกันเพื่อหาความแม่นยำ (Precision) ของวิธีการทดลอง วิธีการหาทำโดยการใส่เชื้อที่ระดับต่างๆ กันแล้วเปรียบเทียบผลจาก % Relative standard deviation (RSD) หรือ Coefficient of variation (CV) ในการทดลองนี้ได้ใช้ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองไปจับเชื้อ *S. Weltevreden* โดยการใส่เชื้อในบัพเฟอรัให้มีจำนวนเชื้อที่ระดับต่ำและสูง ทำการทดลองอย่างละ 5 ซ้ำ แล้วดูการกระจายของข้อมูลจาก %CV ของ $\log_{10}$ ของจำนวนเชื้อที่พบจาก beads พบว่าการใส่เชื้อที่ระดับต่ำ และระดับสูงมีค่า %CV เท่ากับ 5.9 และ 1.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 8 และ 9) แสดงว่าการมีเชื้อที่ระดับสูงมีความใกล้เคียงกันของข้อมูลหรือมีความแม่นยำในการทำซ้ำมากกว่า อย่างไรก็ตามการมีความแม่นยำสูงไม่จำเป็นที่จะต้องเป็นค่าที่ถูกต้อง (Accuracy) เสมอไป เพราะวิธี Immunomagnetic separation (IMS) จัดเป็น qualitative method หรือ semiquantitative method เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* หลายๆ เซลล์อาจเกาะกับ beads เพียง 1 bead แล้วเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเพียง 1 โคโลนี และค่า Precision ยังขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร ดังนั้น beads ทางการค้า หรือ Dynabeads® anti-Salmonella จึงไม่มีผลตรงส่วน accuracy และ precision

ตารางที่ 8 การทำซ้ำ (Repeatability) ของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองในการจับเชื้อ *S. Weltevreden* โดยใช้ปริมาณเชื้อ 595 CFU/มิลลิลิตร

ครั้งที่	จำนวนเชื้อที่พบ (CFU/มิลลิลิตร)			
	log ₁₀ Coated		Supernatant	log ₁₀ Supernatant
	Coated beads	beads		
1	86	1.93	275	2.44
2	162	2.21	235	2.37
3	121	2.08	310	2.49
4	202	2.31	270	2.43
5	199	2.30	235	2.37
mean	154	2.17	265	2.42
SD	50.26	0.13	24	0.04
%CV	3.3	5.9	9.1	1.6

ตารางที่ 9 การทำซ้ำ (Repeatability) ของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองในการจับเชื้อ *S. Weltevreden* โดยใช้ปริมาณเชื้อ 73.5×10^4 CFU/มิลลิลิตร

ครั้งที่	จำนวนเชื้อที่พบ (CFU/มิลลิลิตร)			
	log ₁₀ Coated		Supernatant	log ₁₀ Supernatant
	Coated beads	beads		
1	340,500	5.53	478,500	5.68
2	377,000	5.58	331,500	5.52
3	413,000	5.62	379,000	5.58
4	382,500	5.58	422,000	5.63
5	294,000	5.47	421,000	5.62
mean	361,400	5.56	406,400	5.61
SD	45636.3	0.06	40920	0.04
%CV	12.6	1.0	10.1	0.8

8. การศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี IMS และวิธีมาตรฐาน ISO 6579 : 2002

8.1 การตรวจเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ

จากการตรวจตัวอย่างอาหารจำนวน 30 ตัวอย่าง จำแนกเป็นไก่สด 27 ตัวอย่าง และอาหารทะเลแช่แข็ง 3 ตัวอย่าง โดยใช้ coated beads ที่ผลิตเอง กับ Dynabeads® anti-*Salmonella* และวิธี ISO 6579 : 2002 มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW เป็น enrichment medium โดยการตรวจด้วยวิธี IMS จะลดเวลาการบ่มตัวอย่างอาหารใน BPW จาก 18-24 ชั่วโมง เป็น 8 ชั่วโมงเพื่อลดเวลาการตรวจเชื้อ *Salmonella* ลง แต่วิธี ISO 6579 : 2002 ยังบ่มตามปกติ คือ 18±2 ชั่วโมง และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ MSRV และ XLD ในการแยกเชื้อ *Salmonella* โดยลักษณะเชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV จะมีโซนบ่ม 2 โซน ด้านนอกจะบ่มน้อยกว่า ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD โคโลนิของเชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่จะไม่มีสีและมีจุดสีดำตรงกลางโคโลนี ผล

การตรวจตัวอย่างอาหารทั้งหมด 30 ตัวอย่าง เมื่อใช้ coated beads ที่ผลิตเองพบเชื้อ *Salmonella* 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 83.3) จากอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ MSRV และ 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) จากอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ XLD ส่วน Dynabeads® anti-*Salmonella* พบเชื้อ *Salmonella* 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 83.3) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10.0) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD วิธี ISO 6579 : 2002 พบเชื้อ *Salmonella* 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 86.7) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 56.7) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD (ตารางที่ 11) แต่เวลาที่ใช้ในการจับเชื้อของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง คือ 60 นาทีซึ่งนานกว่า Dynabeads® anti-*Salmonella* ที่ใช้เวลา 10 นาที อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทดลองใช้ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อนาน 10 นาที กับบางตัวอย่างก็พบว่ายังจับเชื้อ *Salmonella* ได้ (ข้อมูลไม่แสดง) การที่วิธี ISO 6579 : 2002 พบเชื้อ *Salmonella* มากกว่าวิธี IMS ซึ่งตรงข้ามกับการศึกษาของ Coleman et al. (1995) อาจเป็นเพราะการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW ของวิธี ISO 6579 : 2002 นานกว่าทำให้เชื้อ *Salmonella* สามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นจนเพียงพอสำหรับการตรวจพบอีกทั้งยังมีอาหารเลี้ยงเชื้อ MKTT และ RVS ที่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น หรือตัวอย่างมีไขมันมากทำให้สูญเสียเชื้อไปในขั้นตอนการทำ IMS (Skjerve and Olsvik, 1991) เพราะ beads ถูกจับโดยแม่เหล็กไม่หมด ซึ่ง Coleman et al. (1995) ได้แนะนำวิธีแก้ปัญหาโดยการนำตัวอย่างก่อนที่จะไปผสมกับ beads แช่ในตู้เย็น นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไขมันแข็งตัวและอนุภาคอาหารตกตะกอน

เมื่อเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ XLD ที่ใช้ในการตรวจทั้งวิธี IMS และ ISO 6579 : 2002 พบว่า สามารถพบเชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV ได้มากกว่า ยกเว้นวิธี ISO 6579 : 2002 ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RVS เป็น selective medium ที่พบเชื้อ *Salmonella* เท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV คล้ายกับการศึกษาของ Poppe et al. (1996) ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ Rambach ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งในการตรวจเชื้อ *Salmonella* แล้วพบเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV มากกว่า อีกทั้งการตรวจตัวอย่างอาหารโดยวิธี IMS แล้วเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD ทันทีพบว่าทำการแยกเชื้อ *Salmonella* ได้ยากเนื่องจากมีเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันขึ้นปกคลุม (Cudjoe et al., 1994; Coleman et al., 1995) โดยเฉพาะอาหารที่ไม่ผ่านกรรมวิธีผลิตที่จะมีเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันปนเปื้อนสูง ทำให้ต้องเสียเวลาในการแยกเชื้อซ้ำกับโคโลนีที่สงสัย คือมีโคโลนีสีดำแต่ไม่ใช่โคโลนีบริสุทธิ์ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันที่พบส่วนใหญ่เป็นพวกใช้น้ำตาลแลคโตสที่อาจจะเกาะ beads แบบไม่จำเพาะ หรือเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีที่เคลือบ beads (Cudjoe and Krona, 1997) แต่ในอาหารที่มีเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันปนเปื้อนน้อยจะไม่พบปัญหาการแยกเชื้อ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV สามารถอ่านผลได้ชัดเจนว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* โดยจะเกิดโซนขุ่น 2 โซนด้านนอกจะขุ่นน้อยกว่า โซนขุ่นดังกล่าวเกิดจากการเคลื่อนที่ของเชื้อ

Salmonella ส่วนเชื้ออื่นๆ การเคลื่อนที่จะถูกยับยั้งโดยสารแมกนีเซียมคลอไรด์ มาลาไคท์ กรีน และ Novobiocin ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV รวมทั้งการใช้อุณหภูมิสูงคือ 42 °C ในการบ่มเชื้อ จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการแยกเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ แข่งขันสูง (De Medici et al., 1998) ถึงแม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ใช้ได้กับเชื้อ *Salmonella* ที่เคลื่อนที่ได้เท่านั้นแต่เชื้อ *Salmonella* ที่ไม่เคลื่อนที่ เช่น *S. Pullorum* และ *S. Gallinarum* ก็พบน้อยมาก และการเชื้อเชื้อจาก MSRV มาทดสอบทางชีวเคมีโดยตรงบางครั้งจะไม่ได้โคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อ *Salmonella* ทำให้ผลทางชีวเคมีไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* แต่เมื่อทดสอบทางชีววิทยาแล้วเป็นเชื้อ *Salmonella* ซึ่งเหตุการณ์เช่นนี้พบไม่บ่อยนัก

วิธี ISO 6579 เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อและสัตว์ปีก (พบ-ไม่พบ) ไม่ใช่วิธีการนับปริมาณเชื้อเป้าหมาย ระบุให้เลือกโคโลนีเพียง 1 โคโลนี มาทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี หากเป็นบวก ก็ถือว่าจบ แต่หากเป็นลบ ต้องเลือกมาอีก 4 โคโลนีเพื่อตรวจสอบ ตามเอกสารของ ISO (<http://www.ukmeat.org/pdf/SalmonellaPoultry.pdf>) ในกรณีนี้ ได้เลือกไว้อย่างน้อย 2 โคโลนี หากพบว่าเป็นเชื้อเป้าหมายจริง ก็น่าจะพอเพียง แต่หากพบผลเป็นลบ ต้องเลือกเพิ่มให้ครบอีก 4 โคโลนี หรือมากกว่าแต่ไม่เกิน 20 กรณีสืบเชื้อน้อยกว่า 5 ให้เลือกทั้งหมดตามเกณฑ์ ใช้จำนวนตัวอย่าง 30 ตัวอย่างซึ่งที่เป็นที่ยอมรับทางสถิติต้องมีขนาดใหญ่เพียงพอ (large) คือ เท่ากับหรือมากกว่า 30 ตัวอย่างขึ้นไป จึงวิเคราะห์เพียง 30 ตัวอย่างในเบื้องต้น เนื่องจากชุดทดสอบที่พัฒนามีปัญหาด้านคุณภาพของแอนติบอดี false+(ve) ค่อนข้างมาก ทีมงานไม่มีความสามารถในการเตรียมแอนติบอดีใช้เอง จึงไม่ได้ทำเพิ่มเติมและหยุดการทดลองไว้

8.2 การประเมินผล

ในการหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) และความถูกต้อง (Accuracy) ของ Dynabeads® anti-Salmonella (ตารางผนวกที่1) กับ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง (ตารางผนวกที่ 2) พบว่ามีค่าเท่ากัน คือ 96.15%, 100% และ 96.67% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ISO 6579 : 2002

ตารางที่ 10 การตรวจเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร โดยวิธี IMS และ ISO 6579 : 2002

ชนิดอาหาร	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ <i>Salmonella</i> โดยวิธี			
		IMS		ISO 6579 : 2002	
		Dy anti beads ¹	Coated beads ²	MKTTn	RVS
เนื้อไก่สด	27	25	25	26	26
อาหารทะเลแช่แข็ง	3	0	0	0	0
รวม	30	25	25	26	26

¹ Dy anti beads = Dynabeads[®] anti-Salmonella

² Coated beads = Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง

9. การจัดทำเป็นชุดทดสอบ

9.1 ชุดทดสอบจะประกอบด้วย beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองซึ่งจะถูกเก็บไว้ใน PBS ผสมกับ 0.1%(w/v) BSA และ 0.02% sodium azide โดยเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C เช่นเดียวกับชุดทดสอบทางการค้า หรืออาจจะเพิ่มความสะดวกให้กับผู้ใช้ คือ จัดหา PBS-tween 20 ที่ใช้สำหรับการล้าง beads ที่จับเชื้อแล้วและใช้ในการแขวนลอยเชื้อสำหรับการนำ beads ไปทดสอบต่อไป สำหรับอุปกรณ์อื่นๆ เช่น แท่นแม่เหล็ก เครื่องหมุนระหว่างการจับเชื้อของ beads และไมโครปิเปต ผู้ใช้งานจะต้องจัดหาเองเนื่องจากมีราคาแพงแต่เป็นอุปกรณ์ที่คงทน ส่วนหลอด eppendorf สามารถหาได้ง่ายและราคาไม่แพง

9.2 การคำนวณราคาค่าต้นทุนในการผลิต Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองเปรียบเทียบกับ Dynabeads[®] anti-Salmonella ต่อ 1 ตัวอย่าง (test)

ค่าใช้จ่ายในการเคลือบ beads ด้วย IgG มีดังนี้

9.2.1 ค่า Dynabeads M-280 Tosylactivated ราคาขวดละ 18,000บาท (รวมภาษีมูลค่าเพิ่ม 7%) ต่อ 2 มิลลิลิตร (2×10^9 beadsต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรที่ใช้ในการเคลือบ 5 ไมโครลิตร คิดเป็น 45 บาท

9.2.2 ค่าเตรียม IgG บริสุทธิ์ ได้แก่

- ค่าแอนติชีรั่มกลุ่ม OMA, OMB และ I ราคารวมทั้งหมด 9,000 บาท ต่อ 40 มิลลิลิตร จำแนกเป็น OMA และ OMB อย่างละ 15 มิลลิลิตร และ I จำนวน 10 มิลลิลิตร

- ค่า dialysis tube 150 บาท
- ค่า membrane filter 60 บาท
- ค่าน้ำแข็งแห้ง 300 บาท
- ค่าสารเคมีและบัฟเฟอร์ 34.36 บาท

รวมเป็น 544.36 บาท แต่เมื่อนำ IgG มาทำ lyophilize แล้วนำไปชั่งน้ำหนักจะได้ IgG น้หนักประมาณ 0.3 กรัม ซึ่งสามารถใช้เคลือบ beads ได้ 600 ตัวอย่าง ดังนั้นค่าใช้จ่ายในการเตรียม IgG เท่ากับ 15.91 บาทต่อตัวอย่าง

9.2.3 ค่า coat beads ได้แก่ BSA และบัฟเฟอร์ 0.96 บาท

รวมค่าใช้จ่ายทั้งหมดต่อการผลิต Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG คือ $45 + 15.91 + 0.96$ เท่ากับ 61.87 บาทต่อตัวอย่าง แต่ค่าใช้จ่ายในการผลิตอาจลดลงได้อีกถ้าผู้วิจัยทำการผลิตแอนติชีรั่ม และ beads เอง เนื่องจาก IgG ที่ใช้เคลือบในครั้งนี้ตกประมาณ 15 บาทต่อตัวอย่าง ส่วน beads เปล่าราคา 45 บาทต่อตัวอย่าง

สำหรับ Dynabeads[®] anti-Salmonella ราคาขวดละ 35,845 บาท (รวมภาษีมูลค่าเพิ่ม 7%) ตรวจได้ 250 ตัวอย่าง คิดเป็น 143.38 บาทต่อตัวอย่าง

สรุป

เนื่องจากการวิจัยนี้มุ่งผลิตชุดทดสอบที่ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ที่พบมากตัวอย่างอาหารในประเทศไทยเท่านั้น แต่เนื่องจาก *Salmonella* มีมากกว่า 3,000 ซีโรวาร์ แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะและความสามารถที่จะตรวจพบได้ต่างกัน ดังนั้นจึงได้เลือกวิธีการตรวจที่ไวต่อกลุ่ม ซีโรวาร์ ที่เป็นเป้าหมายน่าจะมีประโยชน์โดยรวมมากกว่า

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ Dynabeads M-280 Tosylactivated มาทำการเคลือบด้วย IgG ที่ผลิตจากโอแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม OMA, OMB และ I ที่ฉีดเข้าไปในกระด่าย แอนติซีรัมที่ได้เป็นโพลีโคลนอลเมื่อมาทำให้เป็น IgG บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography แล้วหาปริมาณโปรตีนพบว่า IgG 1 กรัมมีโปรตีน 450 มิลลิกรัม

เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบ beads ด้วย IgG สำหรับนำไปใช้จับเชื้อ *Salmonella* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบว่าต้องใช้ IgG ปริมาณโปรตีน 200 ไมโครกรัมเคลือบ beads จำนวน 5 ไมโครลิตร หรือประมาณ 1×10^7 beads โดยใช้ 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 เป็นบัฟเฟอร์ ทำการเคลือบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16-24 ชั่วโมง ใช้เวลาจับเชื่อนาน 1 ชั่วโมงเพื่อให้มีประสิทธิภาพใกล้เคียง Dynabeads[®] anti-*Salmonella*

ในการหาความจำเพาะของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองเปรียบเทียบกับ Dynabeads[®] anti-*Salmonella* พบว่า beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อ *Salmonella* ในกลุ่ม F, G และ I ได้มากกว่า ส่วนกลุ่ม B, C, D และ E ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบมากในอาหารจับเชื้อได้น้อยกว่า เมื่อทดสอบกับเชื้อ non-*Salmonella* พบว่า beads ทั้งสองชนิดยังจับเชื้อได้แต่ความสามารถในการจับไม่เท่ากัน ซึ่งการจับเชื้อ non-*Salmonella* ได้น่าจะเกิดจาก non-specific binding แสดงให้เห็นว่า beads ทั้งสองชนิดไม่มีความจำเพาะ

เมื่อนำมาหาความไว หรือจำนวนเชื้อระดับต่ำสุดที่ beads ทั้งสองชนิดสามารถจับกับเชื้อ *Salmonella* บริสุทธิ์ พบว่าเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม C ตรวจพบได้ที่ระดับต่ำกว่า 10 เซลล์ ส่วนกลุ่ม B, D และ E ตรวจพบได้เมื่อมีจำนวนเชื้อมากกว่า 10 เซลล์ขึ้นไป สำหรับกลุ่ม F, G, I และ N นั้นเมื่อใช้ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจะตรวจพบเชื้อได้ในช่วง 10-99 เซลล์ ซึ่งดีกว่า Dynabeads[®] anti-*Salmonella* ยกเว้นกลุ่ม F อย่างไรก็ตามความสามารถในการจับเชื้อ *Salmonella*

ที่ระดับดังกล่าวอาจจะลดลงเมื่อนำไปใช้ตรวจอาหาร เพราะอาหารโดยทั่วไปจะมีการปนเปื้อน เชื้อจุลินทรีย์แข่งขันสูงหรือมีอนุภาคอาหารทำให้ขัดขวางการจับเชื้อของ beads

จากการตรวจอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติด้วยวิธี IMS โดยเฉพาะ อาหารที่ไม่ผ่านกรรมวิธีการผลิต พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะใช้ในการแยกเชื้อ คือ MSRV เพราะอ่านผลง่าย แม่นยำ และพบเชื้อ *Salmonella* มากกว่า การที่เพิ่มจำนวนเชื้อโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW นาน 8 ชั่วโมง (วิธีมาตรฐานทั่วไปกำหนดให้บ่มนาน 18-24 ชั่วโมง) เพราะต้องการลดเวลาการตรวจ ผลการตรวจเชื้อ *Salmonella* ของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ Dynabeads[®] anti-*Salmonella* พบว่ามีประสิทธิภาพเท่ากันเพราะมีความไว ความจำเพาะ และ ความถูกต้องเท่ากัน คือ 96.15%, 100% และ 96.67% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ISO 6579 : 2002 ถึงแม้เวลาที่ใช้จับเชื้อของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจะนานกว่า Dynabeads[®] anti-*Salmonella* แต่ราคาของ beads ด้วย IgG ที่ผลิตเองก็ถูกกว่า Dynabeads[®] anti-*Salmonella*

ดังนั้นวิธี IMS โดยใช้ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง หรือ Dynabeads[®] anti-*Salmonella* สามารถใช้แทนวิธี ISO 6579 : 2002 ได้เนื่องจากให้ผลการตรวจเร็วกว่า 2 วัน วิธีการตรวจง่าย ประหยัดแรงงาน ถึงแม้ค่าใช้จ่ายในการตรวจจะสูงกว่าวิธีมาตรฐานเพราะ beads ที่ใช้มีราคาแพง แต่ก็คุ้มค่ากับโรงงานอาหารหรือห้องปฏิบัติการที่ต้องการความรวดเร็วในการตรวจอาหาร

อย่างไรก็ตามจากการวิจัยพบว่าปัญหาที่พบเกิดจากคุณภาพของแอนติบอดี เพราะผลจากการกระตุ้นสัตว์ให้สร้างภูมิคุ้มกันออกมา จึงเกิด cross reaction ได้บ้างอาจมากหรือน้อย จากเอกสารงานวิจัยในปีหลังๆพบว่า การใช้ serum free medium ในการผลิตจะลดการเกิดปฏิกิริยาแบบจำเพาะได้ เพราะฉะนั้นในการวิจัยต่อไปอาจใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีผสมกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี หรือใช้แอนติซีรัมที่ผลิตจากโอแอนติเจน และ เอชแอนติเจนผสมกันเพื่อเพิ่มความจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella* มากขึ้น อีกทั้งอาจใช้แอนติซีรัมของกลุ่ม *Salmonella* ที่พบมากในอาหารมาทำการเคลือบ beads โดยไม่จำเป็นต้องใช้ทุกกลุ่มเพราะเชื้อ *Salmonella* จะมี antigenic determinant บางส่วนที่คล้ายกันทำให้ถูกจับโดย beads ได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจับเชื้อ *Salmonella* กลุ่มที่พบมากในอาหาร

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2547. อาหารเป็นพิษ. รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ประจำสัปดาห์ 35: 226.
- เกรียงศักดิ์ สายธนู และ อรุณ บำงตระกูลนนท์. 2541. การประมาณอุบัติการณ์ (จริง?) ของโรคติดเชื้อซาลโมเนลล่าชนิดที่ไม่ใช่เชื้อไทฟอยด์ในประเทศไทย, น. 1-14. ใน การสัมมนา ระดับชาติเพื่อกำหนดแนวทางแก้ไขปัญหา Non-Typhoidal Salmonellosis ในประเทศไทย ครั้งที่ 2. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. 2. NOBLE PRINT, กรุงเทพฯ.
- เพ็ญศรี รอดมา. 2541. Detection of NTS from food, น. 88-106. ใน การสัมมนา ระดับชาติเพื่อกำหนดแนวทางแก้ไขปัญหา Non-Typhoidal Salmonellosis ในประเทศไทย ครั้งที่ 2. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2538. การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella*, น. 58-72. ใน การอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง Modern and Rapid Technology on Microbiological Analysis of Food วันที่ 25-27 ธันวาคม 2538. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, โรงแรมโซลทวินทาวเวอร์.
- Angen, Ø., P. M.H. Heegaard, D.T. Lavritsen and V. Sørensen. 2001. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 by immunomagnetic separation. **Vet. Microbiol.** 79: 19-29.
- Bell, C. and A. Kyriakides. 2002. **Salmonella**. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Berlin, R.M. 1990. Rapid methods for food analysis possibilities and limits. pp. 28-29. In W. Baltes, ed. **Rapid Methods for Analysis of Food and Food Raw Material**. Technomic Publishing Co., Inc., Pennsylvania.

- Chopra, A.K., C.W. Houston, J.W. Peterson, R. Prasad and J.J. Mekalanos. 1987. Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene. **J. Bacteriol.** 169: 5095-5100.
- Coleman, D.J., K.E. Chick and K.J. Nye. 1995. An evaluation of immunomagnetic separation for the detection of *Salmonella* in raw chicken carcasses. **Lett. Appl. Microbiol.** 21: 152-154.
- Conway, B. 2003. *Salmonella* detection in food. **VWR INTERNATIONAL**. Available Source: <http://www.rapidmicrobiology.com/news/516h1.php>, March 10, 2004.
- Crosa, J.H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. **Microbiol. Rev.** 53: 517-530.
- Cudjoe, K.S. and R. Krona. 1997. Detection of *Salmonella* from raw food sample using Dynabeads anti-*Salmonella* and a conventional reference method. **Int. J. Food Microbiol.** 37:55-62.
- Cudjoe, K.S., R. Krona and E. Olsen. 1994. IMS-A new selective enrichment technique for detection of *Salmonella* in food. **Int. J. Food Microbiol.** 23:159-165.
- Cudjoe, K.S., P.D. Patel, E. Olsen, E. Skjerve and Ø. Olsvik. 1993. Immunomagnetic separation techniques for the detection of pathogenic bacteria in foods, p. 19. In R.G. Kroll, A. Gilmour and M. Sussman, eds. **New Techniques in Food and Beverage Microbiology**. Blackwell Scientific, Oxford.
- D'Aoust, J.-Y. 1989a. **Foodborne Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, Inc., New York.
Cited J.A. Alford and S.A. Palumbo. 1969. **Appl. Microbiol.** 17: 528-532.
- D'Aoust, J.-Y. 1989b. **Foodborne Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, Inc., New York.
Cited J.M. Goepfert and R. Hicks. 1969. **J. Bacteriol.** 97: 956-958.

D'Aoust, J.-Y. 1989c. **Foodborne Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, Inc., New York.

Cited K.C. Chung and J.M. Goepfert. 1970. **J. Food Sci.** 35: 326-328.

D'Aoust, J.-Y. 1989d. **Foodborne Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, Inc., New York.

Cited N.A. Cox and A.J. Mercuri. 1978. **J. Food Prot.** 41: 521-524.

D'Aoust, J.-Y. 1989e. **Foodborne Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, Inc., New York.

Cited H.G. Smith. 1959. **J. Gen Microbiol.** 21: 61-71.

D'Aoust, J.-Y. 1989f. *Salmonella*, pp. 327-445. In M.P. Doyle, ed. **Foodborne Bacterial**

Pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York.

D'Aoust, J.-Y. 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. **Int. J. Food. Microbiol.** 12: 17-40.

D'Aoust, J.-Y. 1997a. *Salmonella* species, pp. 129-158. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J.

Montville, eds. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. ASM press,

Washington D.C.

D'Aoust, J.-Y. 1997b. *Salmonella* species. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**.

ASM press, Washington D.C. Cited M.L. Droffner, and N. Yamamoto. 1992.

Procedure for isolation of *Escherichia*, *Salmonella* and *Pseudomonas* mutants capable of growth at the refractory temperature of 54 °C. **J. Microbiol. Methods** 14: 201-203.

D'Aoust, J.-Y. 2001. *Salmonella*, pp. 163-191. In R.G. Labbe and S. Garcia, eds. **Guide to**

foodborne Pathogens. John Wiley & Sons, Inc., New York.

De Medici, D., G. Pezzotti, C. Marfoggia, D. Caciolo, G. Foschi and L. Orefice. 1998.

Comparison between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. **Int. J. Food Microbiol.** 45: 205-210.

- Doyle, M.P. and D.O. Cliver. 1990. *Salmonella*. pp. 185-204. In D.O. Cliver, ed. **Foodborne Disease**. Academic Press, Inc., Sandiego, California.
- Dynal. 1999. Enrichment of *Salmonella*-package insert. **DYNAL BIOTECH**. Available
Source: <http://www.dynalbead.net/kunder/dynal/DynalPub401.nsf/frames/index.html>,
March 10, 2004.
- Finlay, B.B. 1994. Molecular and cellular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 192: 163-185.
- Gulig, P.A., H. Danbar, D.G. Guiney, A.J. Lax, F. Norel and M. Rhen. 1993. Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. **Mol. Microbiol.** 7: 825-830.
- Hoertt, B.E., J. Ou, D.J. Kopecko, L.S. Baron and R.L. Warren. 1989. Novel virulence properties of the *Salmonella* Typhimurium virulence-associated plasmid: Immune suppression and stimulation of splenomegaly. **Plasmid** 21(1): 48-58.
- Liddell, E. 2001. Antibodies, p. 118-119. In D. Wild, ed. **The Immunology Handbook**. 2nd ed. NATURE PUBLISHING GROUP, 2001, New York.
- Liu, Y. and Y. Li. 2002. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement. **J. Microbiol. Methods** 51: 369-377.
- Mossel, D.A.A., M. Jansma and J. De Waart. 1981. pp. 29-37. In T.A. Roberts, G. Hobbs, J.H.B. Christian and N. Skovgaard, eds. **Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity**. Academic Press, London.
- Parham, N., J. Spencer, D. Taylor, H. Ternent, G. Innocent, D. Mellor, M. Roberts and A. Williams. 2003. An adapted immunomagnetic cell separation methods for use in

quantification of *Escherichia coli* O157:H7 from bovine faeces. **J. Microbiol. Methods** 53: 1-9.

Polotsky, Y., E. Dragunsky and T. Khavkin. 1994. Morphologic evaluation of the pathogenesis of bacterial enteric infections. **Crit. Rev. Microbiol.** 20: 161-208.

Popoff, M.Y. 2001. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars.** 8th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris.

Poppe, C., L.A. Elliott and C.L. Duncan. 1996. Evaluation of immunomagnetic separation in combination with modified semi-solid Rappaport Vassiliadis medium and Rambach agar for the isolation of *Salmonella*. **J. Microbiol. Methods.** 25: 237-244.

Rambach, A. 1990. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. From *Proteus* spp. and other enteric bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 56(1): 301-330.

Skjerve, E. and Ø. Olsvik. 1991. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. **Int. J. Food Microbiol.** 14: 11-18.

Taira, S., M. Baumann, P. Riikonen, S. Sukupolvi and M. Rhen. 1991. Amino-terminal sequence analysis of four plasmid-encoded virulence-associated proteins of *Salmonella* Typhimurium. **FEMS Microbiol. Lett.** 61(2-3): 319-323.

Threlfall, E.J., B. Rowe and L.R. Ward. 1989. Subdivision of *Salmonella* Enteritidis phage types by plasmid profile typing. **Epidemiol. Infect.** 102(3): 459-465.

Tutenel, A.V., D. Pierard, D. Vandekerchove, J. Van Hoof and L. De Zutter. 2003. Sensitivity of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from naturally infected bovine faeces. **Vet. Microbiol.** 94: 341-346.

- Valone, S.E. and G.K. Chikami. 1991. Characterization of three proteins expressed from the virulence region of plasmid pSDL2 in *Salmonella* Dublin. **Infect. Immun.** 59(10): 3511-3517.
- Yazdankhah, S.P., L. Sølverød, S. Simonsen and E. Olsen. 1999. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease in composite milk. **Vet. Microbiol.** 67: 113-125.
- Yu, L.S.L., J. Uknalis and S.I. Tu. 2001. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. **J. Immunol. Methods** 256: 11-18.
- Ziprin, R.L. 1994a. **Salmonella. Foodborne Disease Handbook Diseases Caused by Bacteria.** Marcel Dekker, Inc., New York. Cited W. Burrows. 1959. **Textbook of Microbiology.** 7th ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Ziprin. 1994b. *Salmonella*, pp. 253-318. In Y.H. Hui, J.R. Gorham, K.D Murrell and D.O. Cliver, eds. **Foodborne Disease Handbook Diseases Caused by Bacteria.** Marcel Dekker, Inc., New York.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยวิธี Laemmli SDS-PAGE

1. สารเคมี

1.1 Acrylamide/bis (30%T, 2.67%C)

Acrylamide (FW 71.08)	29.2	กรัม
-----------------------	------	------

N'N'-bis-methylene-acrylamide (FW 154.17)	0.8	กรัม
---	-----	------

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีด

1.2 4x Running gel buffer (1.5M Tris-HCl pH 8.8)

Tris base (FW 121.1)	27.23	กรัม
----------------------	-------	------

น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร
----------	----	-----------

ปรับ pH 8.8 ด้วย 6N HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 150 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีด

1.3 4x Stacking gel buffer (0.5M Tris-HCl pH 6.8)

Tris base	6	กรัม
-----------	---	------

น้ำกลั่น	60	มิลลิลิตร
----------	----	-----------

ปรับ pH 6.8 ด้วย 6N HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีด

1.4 10% SDS

SDS	10	กรัม
-----	----	------

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.5 10% Ammonium persulfate

Ammonium persulfate (MW 228.20)	0.1	กรัม
---------------------------------	-----	------

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร เตรียมก่อนใช้งาน

1.6 Sample buffer (Reducing buffer)

4x Stacking gel buffer	1.25	มิลลิลิตร
Glycerol	2.5	มิลลิลิตร
10%(w/v) SDS	2	มิลลิลิตร
0.5% Bromophenol blue	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.55	มิลลิลิตร

ใส่ β -Mercaptoethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใน Sample Buffer ปริมาตร 950 ไมโครลิตร
ก่อนนำไปใช้

1.7 Running buffer (pH 8.3)

Tris base (FW 121.1)	3.03	กรัม
Glycine	14.40	กรัม
SDS	10	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.8 Staining solution

Coomassie brilliant blue R	0.25	กรัม
Methanol	400	มิลลิลิตร
Acetic acid	70	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.9 Destaining solution I

Methanol	400	มิลลิลิตร
Acetic acid	70	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.10 Destaining solution II

Methanol	50	มิลลิลิตร
Acetic acid	70	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. วิธีทำ

2.1 ประกอบอุปกรณ์ Mini-PROTEAN[®] 3 cell ของ BIO-RAD ที่จะใช้เตรียม gel ให้พร้อม

2.2 เตรียม running gel ความเข้มข้น 15 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยต้องผสมสารในบีกเกอร์ให้เข้ากันอย่างเบา ๆ ก่อนจะได้สารตัวต่อไป ตามลำดับดังนี้ ได้ acrylamide/Bis 2.5 มิลลิลิตร, 4x running gel buffer 1.25 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 1.17 มิลลิลิตร, 10% SDS 50 ไมโครลิตร, 10% ammonium persulfate 25 ไมโครลิตร และ tetramethylethylenediamine (TEMED) 1.7 ไมโครลิตร แล้วรีบเทใส่ glass plate ที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นปรับผิวหน้า running gel โดยใส่น้ำกลั่นลงไป ตั้งทิ้งไว้จน gel แข็งตัว

2.3 เตรียม stacking gel ความเข้มข้น 3% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยต้องผสมสารในบีกเกอร์ให้เข้ากันอย่างเบา ๆ ก่อนจะได้สารตัวต่อไป ตามลำดับดังนี้ ได้ acrylamide/bis 0.498 มิลลิลิตร, 4x stacking gel buffer 1.25 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 3.17 มิลลิลิตร, 10% SDS 50 ไมโครลิตร, 10% ammonium persulfate 25 ไมโครลิตร และ tetramethylethylenediamine (TEMED) 2.5 ไมโครลิตร แล้วรีบเปิดใส่ running gel ที่เทน้ำออกแล้ว นำ comb ของชุด gel ใส่น้ำลงไป ตั้งทิ้งไว้จน gel แข็งตัวอย่างน้อย 60 นาที แล้วดึง comb ออก และย้าย gel มาใส่ใน tank buffer เท running buffer ลงไปให้ท่วม gel

2.4 นำตัวอย่างปริมาตร 4 ไมโครลิตรผสมกับ sample buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที แล้วนำมาใส่ในหลุม gel และได้โปรตีนมาตรฐาน # SM0431 ของ MBI Fermentas ปริมาตร 5 ไมโครลิตรอีก 1 หลุม เปิดเครื่องโดยใช้ไฟ 100 โวลท์ หลังจากนั้นนำ gel ไปย้อมสี coomassie brilliant blue R สีนําย้อมด้วย destaining solution I และ destaining solution II ตามลำดับ

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. สารเคมี

1.1 สารละลาย 2% (w/v) sodium carbonate (Na_2CO_3) ใน 0.1 N NaOH

1.2 สารละลาย 2% (w/v) sodium potassium tartrate

1.3 สารละลาย 1% (w/v) copper sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

1.4 สารละลาย alkali copper

นำสารละลายข้อ 1.1 ปริมาตร 98 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายข้อ 1.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายข้อ 1.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ควรเตรียมสารละลายนี้ก่อนนำไปใช้)

1.5 1 N folin-ciocalteau phenol reagent นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 ก่อนนำไปใช้

1.6 สารละลายมาตรฐานโปรตีน ใช้ bovine serum albumin ปริมาณ 0.005 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 50 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีทำ

2.1 ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin ความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 ใส่ตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรในหลอดทดสอบ

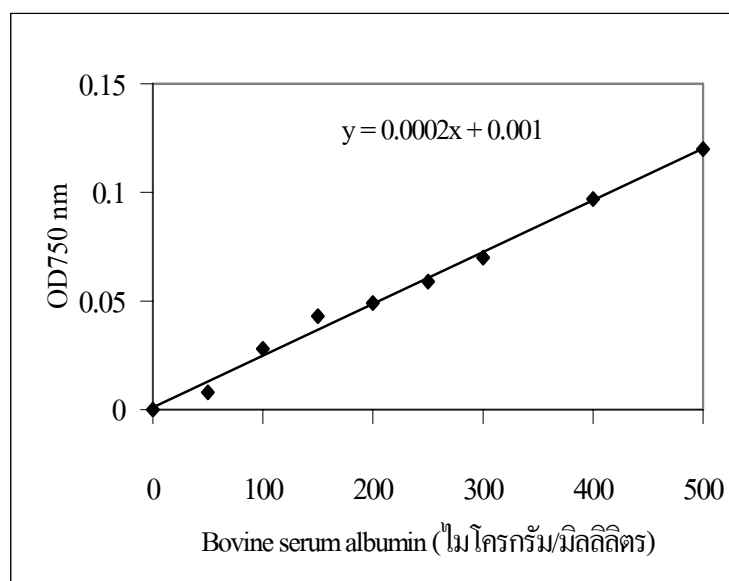
2.3 เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

2.4 เติม 1 N folin-ciocalteau phenol reagent ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน

2.5 การหาปริมาณโปรตีนใน IgG ปฏิบัติตามข้อ 2.2 ถึง 2.4 แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

3. การคำนวณ

หั่ง IgG ปริมาณ 0.001 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และนำมาเจือจาง 2 เท่า วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.045 นำมาคำนวณสมการ $y = 0.0002x + 0.001$ ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่เจือจาง 2 เท่า คือ 225×2 เท่ากับ 450 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟโปรตีนมาตรฐานของ Bovine serum albumin

ภาคผนวก ค

การตรวจยืนยันเชื้อ *Salmonella* ทางชีวเคมี

1. นำโคโลนีเชื้อที่คิดว่าเป็น *Salmonella* ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI และ MIL แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง

2. ตรวจสอบผลการทดสอบโดยอ่านผลปฏิกิริยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

TSI ดูการใช้น้ำตาล การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และ ก๊าซ

MIL หรือ LIM ดูการสร้างเอนไซม์ lysine decarboxylase, การสร้างอินโดล และการเคลื่อนที่

ตารางผนวกที่ ค1 ปฏิกิริยาของเชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI และ MIL

เชื้อ	TSI				L	I	M
	Slant	butt	gas	H ₂ S	lysine	indole	motile
<i>S. Typhi</i>	K	A	-	+	+	-	+
<i>S. Paratyphi A</i>	K	A	+	-	-	-	+
<i>S. Choleraesuis</i>	K	A	+	d	+	-	+
<i>S. Pullorum</i>	K	A	+	-	+	-	-
<i>S. Gallinarum</i>	K	A	-	-	+	-	-
Other <i>Salmonella</i>	K	A	+	+(-)	+	-	+(-)

ภาคผนวก ง 1

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Xylose lysine desoxycholate agar

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

Yeast extract	3.0	กรัม
L-Lysine HCl	5.0	กรัม
Xylose	3.75	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
Sodium desoxycholate	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium thiosulphate	6.8	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	12.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ต้มจนเดือด แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ		

Modified semisolid rappaport vassiliadis medium

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

Tryptose	4.59	กรัม
Casein hydrolysate (Acid)	4.59	กรัม
Sodium chloride	7.34	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.47	กรัม
Magnesium chloride (Anhydrous)	10.93	กรัม
Malachite green oxalate	0.037	กรัม
Agar	2.7	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ต้มจนเดือด ทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วใส่ MSRVR supplement ลงไปจำนวน 1 ขวดต่อ MSRVR 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ

MSRV supplement

Novobiocin	10	มิลลิกรัม
ใส่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 มิลลิลิตรลงในขวด		

Eosin methylene blue lactose sucrose agar

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

Peptone	10.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Sucrose	5.0	กรัม
Eosin yellowish	0.4	กรัม
Methylene blue	0.07	กรัม
Agar	13.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ

MacConkey agar

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

Peptone	20.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bile salt no.3	1.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Neutral red	0.05	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
Agar	15.0	กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ

Tryptone soya agar

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

Tryptone	15.0	กรัม
Soya peptone	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ทำการต้มจนเดือด แล้วเปิดไฟให้ลดทอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำมาวางเรียงจนอาหารแข็งตัว

Buffered peptone water

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium phosphate	9.0	กรัม
Potassium phosphate	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Rappaport and Vassiliadis broth

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

Peptone from soymeal	4.5	กรัม
Magnesium chloride-hexahydrate	28.6	กรัม
Sodium chloride	7.2	กรัม

di-Potassium hydrogen phosphate	0.18	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.26	กรัม
Malachite green oxalate	0.036	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Muller-Kauffman tetrathionate broth

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

Tryptone	7.0	กรัม
Soya peptone	2.3	กรัม
Sodium chloride	2.3	กรัม
Calcium carbonate	25.0	กรัม
Sodium thiosulphate	40.7	กรัม
Ox bile	4.75	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ต้มจนเดือด รอนอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียสแล้วจึงใส่ iodine solution และ brilliant green solution ก่อนการใช้งาน สำหรับ MKTT broth ที่ยังไม่ได้เติมสารละลายดังกล่าว สามารถเก็บไว้ได้ในตู้เย็น

Iodine solution

Iodine	20	กรัม
Potassium iodide	25	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

MKTT broth 1 ลิตร ใส่ Iodine Solution 19 มิลลิลิตร

Brilliant green solution

Brilliant Green	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

MKTT broth 1 ลิตร ใส่ Brilliant Green Solution 9.5 มิลลิลิตร

Standard plate count agar (PCA)

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

Yeast extract	2.5	กรัม
Pancreatic digest of casein	5.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Mannitol salt egg yolk agar (MSEY)

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

'Lab-Lemco' powder	1.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Mannitol	10.0	กรัม
Sodium chloride	75.0	กรัม
Phenol red	0.025	diy,
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ร่อนอุณหภูมิประมาณ 45 ถึง 50 องศาเซลเซียสแล้วจึงใส่ไข่แดง 3% ผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ

Triple sugar iron agar (TSI)

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

'Lab-Lemco' powder	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Sodium chloridr	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม

Sucrose	10.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Ferric citrate	0.3	กรัม
Sodium thiosulphate	0.3	กรัม
Phenol red	q.s.	
Agar	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ต้มจนเดือด แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำมาวางเรียงจนอาหารแข็งตัว

MIL medium

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

Bacto peptone	10.0	กรัม
Bacto tryptone	10.0	กรัม
Bacto Yeast Extract	3.0	กรัม
L-Lysine Hydrochloride	10.0	กรัม
Bacto dextrose	1.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Bacto brom cresol purple	0.02	กรัม
Bacto agar	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ต้มจนเดือด แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวในลักษณะ deep tube

ภาคผนวก ง 2

สูตรสารละลายบัฟเฟอร์

0.85% สารละลายน้ำเกลือ

NaCl	8.5	กรัม
------	-----	------

ซึ่งสารนำมาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรด้วยให้เป็น 1 ลิตร

0.15 M Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2

NaCl (MW 58.4)	8.0	กรัม
----------------	-----	------

KCl	0.2	กรัม
-----	-----	------

Na ₂ HPO ₄ (MW 142.1)	1.15	กรัม
---	------	------

KH ₂ PO ₄ (MW 136.09)	0.2	กรัม
---	-----	------

ซึ่งสารนำมาละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7.2 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

20 mM Sodium phosphate pH 7.0

Na ₂ HPO ₄ (MW 142.1)	1.73	กรัม
---	------	------

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (MW 156.01)	1.22	กรัม
---	------	------

ซึ่งสารนำมาละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

0.1 M Citric acid pH 3.0

Citric acid (MW 210.14)	21.014	กรัม
-------------------------	--------	------

ซึ่งสารนำมาละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 3.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

1.0 M Tris-hydrochloric acid pH 9.0

Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃ , MW 121.14)	12.114	กรัม
---	--------	------

ซึ่งสารนำมาละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 9.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

0.1 M Sodium phosphate buffered pH 7.4

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99)	2.62	กรัม
--	------	------

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW 177.99)	14.42	กรัม
---	-------	------

ซึ่งสารนำมาละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 with 0.1% (w/v) BSA

NaCl	0.88	กรัม
------	------	------

Bovine serum albumin	0.1	กรัม
----------------------	-----	------

ซึ่งสารนำมาละลายใน 0.01 M Sodium phosphate pH 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วย 0.01 M Sodium phosphate pH 7.4 ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

0.01 M Sodium phosphate buffer pH 7.4 with 0.05% Tween 20 (PBS-tween 20)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.262	กรัม
--	-------	------

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.442	กรัม
---	-------	------

NaCl	8.8	กรัม
------	-----	------

Tween 20	0.5	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

ซึ่งสารนำมาละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4

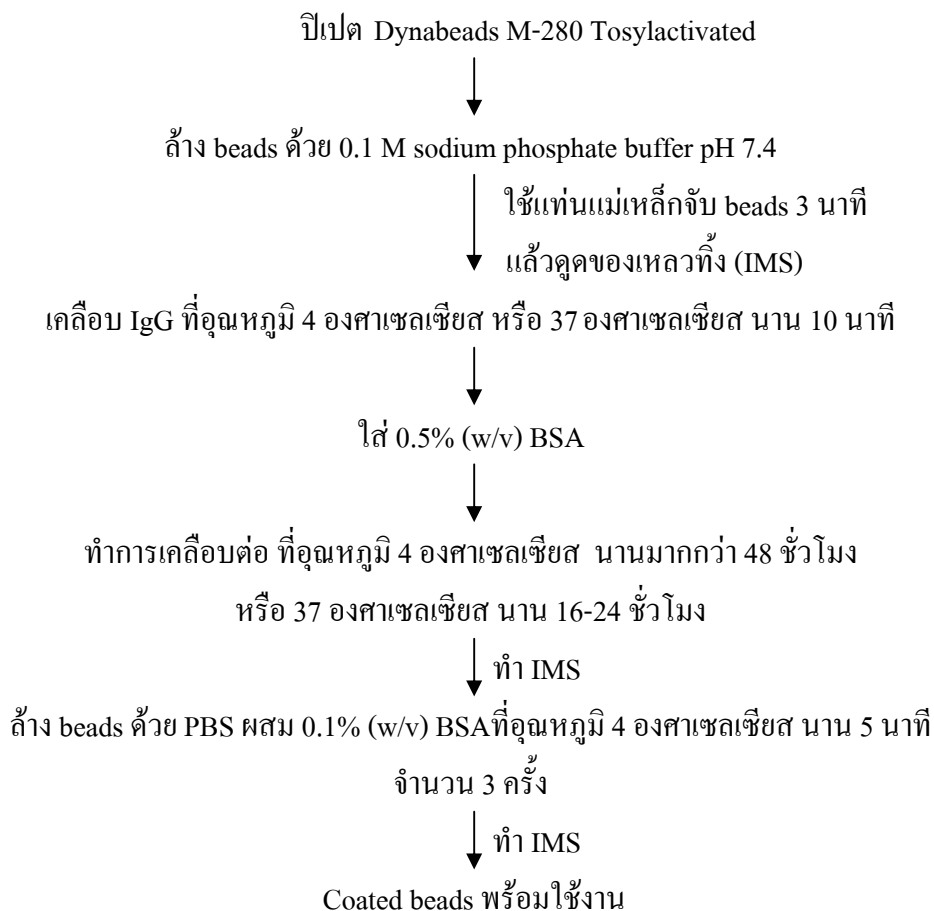
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99)	0.16	กรัม
--	------	------

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW 177.99)	0.98	กรัม
---	------	------

NaCl (MW 58.44)	8.10	กรัม
-----------------	------	------

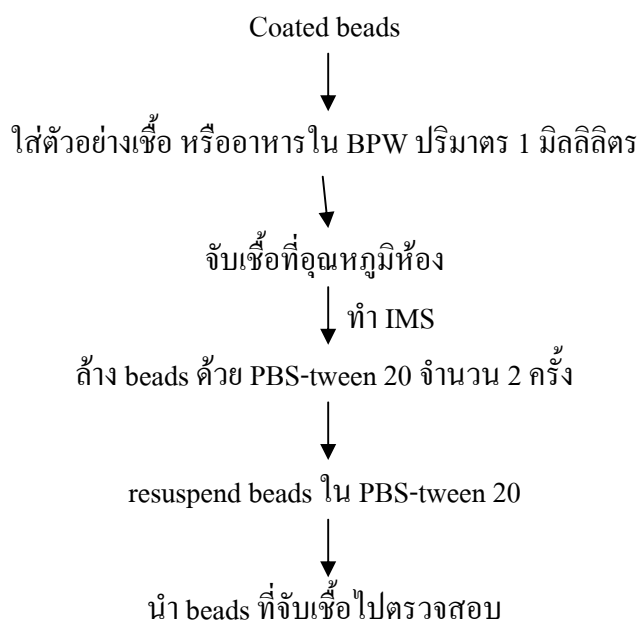
ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

ภาคผนวก จ



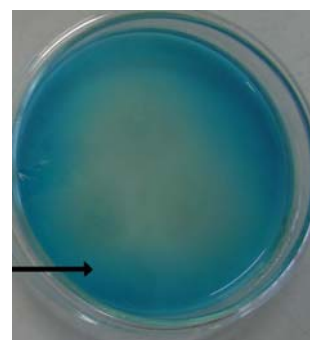
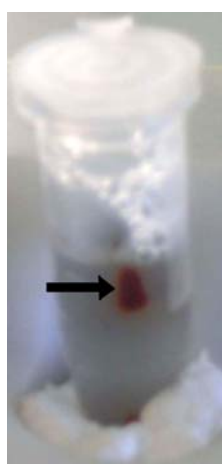
ภาคผนวกที่ จ1

ขั้นตอนการเคลือบ IgG บน Dynabeads M-280 Tosylactivated



กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

ได้นำผลงานที่วิจัยได้นี้ไปใช้ประกอบการสอนนิสิตระดับปริญญาตรี และปริญญาโทของ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร หัวข้อเรื่องการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยเน้นที่สามารถจัดทำ ชุดทดสอบใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. (screening method) ในอาหารด้วยเทคนิค immunomagnetic separation (IMS) ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่สามารถผลิตขึ้นเองได้ในประเทศไทย และมีราคาถูกกว่าชุดทดสอบที่นำเข้าจากต่างประเทศเป็นอย่างมาก



**ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการ
และผลที่ได้รับตลอดโครงการ**

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้ (1)	กิจกรรมที่ดำเนินการ (2)	ผลที่ได้รับ
พัฒนาชุดทดสอบ สำหรับการตรวจ วิเคราะห์เชื้อ <i>Salmonella</i> spp. (screening method)		รวบรวมเอกสารเกี่ยวกับ การระบาดและการตรวจ พบเชื้อ <i>Salmonella</i> ใน ประเทศไทยและทำการ จำแนกกลุ่มของสายพันธุ์	
ในไก่สด และ อาหาร ทะเลแช่เยือกแข็ง ด้วย เทคนิค immunomagnetic separation (IMS) เพื่อ ตรวจสอบสายพันธุ์ เชื้อที่พบมากที่สุด ในประเทศไทย		คัดเลือกกลุ่ม <i>Salmonella</i> ที่ พบมากในประเทศไทย และผลิตแอนติบอดีสำหรับ กลุ่มที่พบมากในอาหาร	ได้กลุ่มสายพันธุ์ <i>Salmonella</i> ที่พบมาก ในประเทศไทย
	ผลิตแอนติบอดีสำหรับ เชื้อทดสอบ <i>Salmonella</i> เฉพาะกลุ่มสายพันธุ์ที่ พบมากในประเทศไทย เตรียมชุด IMF อาหาร เลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์ อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการ วิเคราะห์	เหมือน (1)	ได้แอนติบอดีสำหรับ เชื้อทดสอบ <i>Salmonella</i> เฉพาะกลุ่ม สายพันธุ์ที่พบมากใน ประเทศไทย
	ทดสอบประสิทธิภาพ ของแอนติบอดีข้างต้น	เหมือน (1)	ทราบประสิทธิภาพ ของแอนติบอดีข้างต้น
	เคลือบ bead ด้วย แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นใน ประเทศไทย	เหมือน (1)	
		ทดสอบประสิทธิภาพการ เคลือบแอนติบอดีบนเม็ด bead (tosyl activated)	ทราบประสิทธิภาพ การเคลือบโดยทดสอบ กับเชื้อบริสุทธิ์

	ตรวจวิเคราะห์โดยใช้ bead ที่เคลือบด้วย แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นในประเทศไทยในการแยก <i>Salmonella</i>	เหมือน (1)	ทราบผลการตรวจวิเคราะห์
	ตรวจวิเคราะห์โดยใช้ Dynalbead anti <i>Salmonella</i> (bead สำเร็จรูป) ในการแยก <i>Salmonella</i>	เหมือน (1)	ทราบผลการตรวจวิเคราะห์
		เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ bead ที่เคลือบเองกับ bead สำเร็จรูป (anti-salmonella beads) ด้วยเชื้อบริสุทธิ์	ทราบประสิทธิภาพของเม็ด bead ที่เคลือบได้เองเปรียบเทียบกับชุดทดสอบทางการค้า
	ศึกษาการทำซ้ำ (repeatability) ของ bead ทั้งสองชนิดที่เคลือบด้วย แอนติบอดี	เหมือน (1)	ทราบ sensitivity, repeatability และ specificity ของเม็ด bead ที่ผลิตเอง กับชุดทดสอบทางการค้า
	ศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของ bead ทั้งสองชนิดที่เคลือบด้วย แอนติบอดี	เหมือน (1)	
	ศึกษาความไว (sensitivity) ของ bead ทั้งสองชนิดที่เคลือบด้วย แอนติบอดี	เหมือน (1)	
		หาข้อมูลและพัฒนาวิธีการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเม็ด bead ที่เคลือบด้วย	ผลที่ได้ไม่ค่อยแตกต่างจากเดิม

		แอนติบอดี	
	เปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> ในอาหารและผลที่ได้โดยใช้ bead ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีที่ผลิตเองและที่มีจำหน่ายทางการค้า และวิธีมาตรฐาน (conventional method) .	เหมือน (1)	ทราบรายละเอียดวิธีการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> ในอาหารและผลที่ได้โดยใช้ bead ทั้งสองชนิด และวิธีมาตรฐาน (conventional method) .
		ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ bead ที่เตรียมเองและทางการค้า กับวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> ในอาหาร	ทราบประสิทธิภาพของ bead ที่เตรียมเองและทางการค้า กับวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> ในอาหาร
	จัดทำชุดทดสอบ (test kit)	คิดและวางแผนการจะจัดทำชุดทดสอบ แต่ไม่ได้จัดทำเป็นชุดทดสอบที่ใช้ออกสนามจริง	
		คำนวณราคาต้นทุนถ้าได้จัดทำเป็นชุดทดสอบ เปรียบเทียบกับชุดทดสอบทางการค้า	รู้ราคาประมาณของต้นทุนคร่าวๆ และทราบความแตกต่างของราคาระหว่างชุดทดสอบที่จะจัดทำและชุดทดสอบทางการค้าที่นำเข้าจากต่างประเทศ
	สรุปผลจัดทำรายงานส่ง	เหมือน (1)	ได้ทำสรุปผลและรายงานส่ง