



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ระหว่าง 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2546 – 31 ตุลาคม พ.ศ. 2548

โครงการ : การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จสำหรับหาเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหาร
ประเภทเนื้อสัตว์ โดยวิธีอิมมูโนแมกเนติก ร่วมกับอิมมูโนแอสเซย์
: แคมพิลโลแบคเตอร์ และ ซัลโมเนลลา

Development of immunomagnetic - immunoassay diagnostic kits for
food-borne microorganisms in meat: *Campylobacter* and *Salmonella*

คณะผู้วิจัย

รศ. ดร. ปรีมเจนิยน มุ่งการดี
สพ.ญ. ศศิธร คณะรัตน์
ผศ. วัลลา ตั้งรักษาสัตย์
สพ.ญ. สุปราณี สีหาราช

ผู้ประสานงาน

รศ. ดร. ชัยณรงค์ คันทพนิต

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.)

ชุดโครงการ "ผลิตผลจากสัตว์"



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ระหว่าง 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2546 – 31 ตุลาคม พ.ศ. 2548



โครงการ : การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จสำหรับหาเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหาร
ประเภทเนื้อสัตว์ โดยวิธีอิมมูโนแมกเนติก ร่วมกับอิมมูโนแอสเสย์
: แคมพัยโลแบคเตอร์ และ ซัลโมเนลลา

Development of immunomagnetic - immunoassay diagnostic kits for
food-borne microorganisms in meat: *Campylobacter* and *Salmonella*

คณะผู้วิจัย

รศ. ดร. ปริมเจนียน มุ่งการดี
สพ.ญ. ศศิธร คณะรัตน์
ผศ. วัลลา ตั้งรักษาสัตย์
สพ.ญ. สุปราณี สีหาราช

ผู้ประสานงาน

รศ. ดร. ชัยณรงค์ คันทพนิต

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.)

ชุดโครงการ "ผลิตผลจากสัตว์"

สรุปผลรายงานฉบับสมบูรณ์ (Executive Summary)

งานวิจัยนี้เป็นความร่วมมือระหว่างบุคลากรของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยร่วมกันพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบอย่างรวดเร็วสำหรับ เชื้อกลุ่ม *Campylobacter* และ *Salmonella* ที่เป็นปัญหาสำคัญที่อาจเกิดการปนเปื้อนใน อุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์ ซึ่งเป็นรายได้สำคัญของประเทศ

งานวิจัยที่นำเสนอเป็นการวิจัยที่ได้มีการสนับสนุนเริ่มต้นมาจาก สกว. ที่กรุณาสับสนุน งบประมาณ เมื่อ กุมภาพันธ์ 2543 - มกราคม 2545 เพื่อศึกษาการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* ในเนื้อไก่ที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงที่เกิดการปนเปื้อนในอาหารและคาดว่าจะอาจเป็น ปัญหาสำคัญในการก่อเชื้อดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ที่ใช้รักษาโรคท้องร่วงเนื่องจากการใช้ยา กลุ่มนี้มากเกินความจำเป็นในปศุสัตว์ การวิจัยนั้นได้ทำสำเร็จและได้พัฒนาเทคนิค multiplex-PCR มาใช้ในการตรวจได้ ซึ่งก่อให้เกิดแนวคิดจากผู้ร่วมวิจัยที่จะพัฒนาการตรวจสอบที่รวดเร็วและมี ประสิทธิภาพเพื่อใช้ตรวจที่สำคัญห้ามการปนเปื้อนในอุตสาหกรรมอาหาร จึงทำให้เกิดโครงการนี้ เพื่อ เป็นการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จสำหรับหาเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ โดยวิธีอิมมูโนแมก เนติกร่วมกับอิมมูโนแอสเสย์ : แคมฟัยโลแบคเตอร์ และ ซัลโมเนลลา โดยภายหลังการวิจัยที่ได้รับทุน เมื่อ 1 พฤศจิกายน 2546 - 30 ตุลาคม 2548 เป็นเวลา 2 ปี ผู้วิจัยได้ศึกษาวิจัยและได้พัฒนาชุดตรวจ สำเร็จตามที่เสนอในโครงการคือ

1. immunomagnetic separation-ELISA (IMS-ELISA)
2. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
3. multiplex polymerase chain reaction (m-PCR)

สำหรับตรวจเชื้อ

Campylobacter spp.

Campylobacter jejuni

Salmonella spp.

Salmonella enterica serovar Typhimurium

Salmonella enterica group D (serovars Enteritidis และ Typhi)

โดยในโครงการที่นำเสนอได้นำผลที่ได้มาใช้ตรวจจริงจากตัวอย่างที่ได้จาก ตลาด โรงงาน อุตสาหกรรมส่งเนื้อไก่ไปต่างประเทศ และ ฟาร์มเลี้ยงกุ้ง ซึ่งผลที่ได้สัมพันธ์กับชุดที่มีจำหน่ายจาก ต่างประเทศ อย่างไรก็ตามชุดที่เตรียมมานี้ บางชนิดยังไม่มีรายงานรูปแบบการผลิตในต่างประเทศ

และไม่มีการจำหน่าย จึงยังไม่มีผลมาเปรียบเทียบ อนึ่งในการพัฒนานี้ ในส่วนของแอนติบอดีที่ใช้ในการเตรียมชุดตรวจวินิจฉัยนั้นได้คัดเลือกแอนติบอดีจากบริษัทต่างๆที่ได้นำเสนอผลิตภัณฑ์มาใช้ในการวิจัย เพื่อความรวดเร็วขึ้น และมีผลที่ได้ศึกษาข้อมูลละเอียดมาแล้ว และเมื่อนำมาใช้ศึกษาในชุดตรวจสอบก็ให้ผลเป็นที่พอใจ สำหรับราคาต้นทุนการผลิตหลังจากคำนวณในระดับนักวิจัย โดยไม่ได้คิดค่าการตลาดนั้น จะมีราคาต่ำกว่าชุดสำเร็จจากต่างประเทศประมาณเท่าตัว ซึ่งถ้ามีการผลิตจำนวนมากจะสามารถลดการลงทุนลงอีก โดยเป็นชุดสำเร็จที่ใช้ตรวจกันแพร่หลาย คือ *Salmonella* spp. และ *Campylobacter* spp. ซึ่งในรูปแบบอื่นหรือเชื้อตัวอื่นยังไม่มีผลิตภัณฑ์จำหน่ายเปรียบเทียบ

อย่างไรก็ตามการที่จะนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์โดยเฉพาะในระดับสากลนั้น การตรวจตัวอย่างและค่ามาตรฐานจำนวนหนึ่งในการตัดสินผลการตรวจนั้นจึงจะได้รับการรับรอง สำหรับการตรวจเปรียบเทียบกับมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับนั้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนการดำเนินงานที่ต้องได้รับการสนับสนุนและวิธีการที่เหมาะสมที่ทาง สกว. หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจะต้องช่วยแนะนำหรือดำเนินการต่อไป

งานวิจัยนี้ได้รับการปรึกษาและแนะนำสิ่งที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งจาก

- ดร. ชัยณรงค์ คันธพนิต ผู้ประสานงานโครงการ ตลอดเวลา 2 ปี ของการทำการวิจัยนี้ รวมทั้งการให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในช่วงเสนอโครงการ
- ดร. พิรเดช ทองอำไพ และ รศ. ดร. จันทร์จรัส เร็วเดชะ ที่กรุณาช่วยในการประสานงานด้านต่างๆ
- รศ. ดร. ธงชัย เฉลิมลาภ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะในงานวิจัย และให้ reference strain
- นักศึกษาและผู้ช่วยวิจัยทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือให้งานนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์

จึงใคร่ขอขอบคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้

ท้ายสุดคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่เห็นความสำคัญของโครงการที่นำเสนอและให้การสนับสนุนการวิจัยนี้ จนเสร็จสิ้นโครงการ

การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จสำหรับหาเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารประเภทเนื้อสัตว์โดยวิธีอิมมูโนแมกเนติกร่วมกับอิมมูโนแอสเสย์: แคมพัยโลแบคเตอร์และซัลโมเนลลา

บทคัดย่อ

Campylobacter spp. และ *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ สายพันธุ์สำคัญที่มักก่อให้เกิดการปนเปื้อนได้ในเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์อาหาร คือ *C. jejuni*, *S. enterica* serovars. Typhimurium และ Enteritidis ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะจำแนกเชื้อเหล่านี้ด้วยวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำ เพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ของผลิตภัณฑ์อาหารและเนื้อสัตว์เพื่อการส่งออก และเพื่อผู้บริโภคภายในประเทศ การพัฒนาวิธีอิมมูโนแมกเนติก-ELISA (IMS-ELISA) และวิธี ELISA ถูกคิดค้นพัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้ เพื่อจำแนกเชื้อดังกล่าว ร่วมกับวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR) เพื่อยืนยันผลที่ได้

ในการศึกษาตรวจความไวและความจำเพาะนี้ ตัวอย่างที่นำมาตรวจทั้งหมดจะทำการเพาะเชื้อใส่ลงในปริมาณที่แน่นอน และนำไปทดสอบโดยไม่มีขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ วิธี IMS-ELISA และ ELISA จะวัดค่าของปฏิกิริยาที่ 450 nm โดยมีผลแสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจเชื้อ *Campylobacter* spp. และ *C. jejuni* ได้ที่ระดับความไวต่ำสุด 10^5 และ 10^6 cfu/ml ตามลำดับ ส่วนวิธี m-PCR ให้ที่ระดับต่ำสุด 10^2 cfu/ml (10 cfu/PCR reaction) และได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 460 คู่เบส สำหรับ *Campylobacter* spp. และ *C. coli* ขณะที่เชื้อ *C. jejuni* ได้ดีเอ็นเอขนาด 460 และ 160 คู่เบส

สำหรับการตรวจเชื้อกลุ่ม *Salmonella* ด้วยวิธี m-PCR พบว่า *Salmonella* spp. ทุกชนิดที่ตรวจสอบ ให้ผลที่ระดับความไวต่ำสุด 10^5 cfu/ml (10^3 cfu/PCR reaction) และได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 526 คู่เบส ขณะที่ *S. Typhimurium* ได้ดีเอ็นเอขนาด 620 และ 526 คู่เบส ส่วน *S. Enteritidis* ได้ดีเอ็นเอขนาด 526 และ 316 คู่เบส สำหรับวิธี ELISA จะให้ผลความไวในปริมาณต่ำสุด 10^6 , 10^6 และ 10^8 cfu/ml สำหรับ *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ตามลำดับ ส่วนวิธี IMS-ELISA ให้ผลความไวในปริมาณต่ำสุด 10^5 , 10^4 และ 10^7 cfu/ml สำหรับ *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ตามลำดับ

ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นทั้งหมดให้ความจำเพาะที่ร้อยละ 100 เมื่อตรวจกับเชื้อมาตรฐานต่างๆในห้องปฏิบัติการ ในการทดลองเพิ่มเติมพบว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้สามารถตรวจการปนเปื้อนของจุลชีพที่ต่ำสุด 1 cfu/ml หากได้มีการบ่มตัวอย่างก่อนเป็นเวลาเพียง 6 ชั่วโมง ชุดตรวจสอบนี้สามารถเก็บรักษาได้ที่ 4°C อย่างน้อย 9 เดือน ในระหว่างที่ทำการวิจัย โดยที่ผลการตรวจสอบโดยการวัดการดูดกลืนแสงในระหว่างการเก็บที่ 0, 3, 6 และ 9 เดือน ยังคงมีความคงตัว และมีประสิทธิภาพ ($p > 0.5$, ANOVA) ซึ่งอาจเก็บรักษาได้นานกว่านี้

ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นด้วยวิธี IMS-ELISA, ELISA และ m-PCR สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจการปนเปื้อนในตัวอย่างเนื้อไก่โดยการเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา (BAM 2003) ทำการเพาะเชื้อมาตรฐานใส่ลงตัวอย่างปริมาณ 10^2 cfu/ml ก่อนบ่มต่อเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ผลที่ได้สามารถตรวจเชื้อทั้งสองกลุ่มจากเนื้อไก่ได้ วิธีที่พัฒนานี้ให้ผลการตรวจไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าทุกวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานแล้ว จะให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว ทำได้ง่ายและไม่สิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน ชุดตรวจสอบที่ได้พัฒนานี้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยและสามารถผลิตได้เองในประเทศ เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจอาหาร และเนื้อสัตว์ต่างๆ เพื่อความปลอดภัยด้านอาหาร รวมทั้งการตรวจสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์

คำสำคัญ *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*, *Salmonella*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, ELISA, IMS-ELISA, m-PCR, Chicken, Food Safety

Development of immunomagnetic - immunoassay diagnostic kits for food-borne microorganisms in meat : *Campylobacter* and *Salmonella*

ABSTRACT

Campylobacter spp. and *Salmonella* spp. are contagious organisms which are the most common causes of human gastroenteritis. *Campylobacter jejuni*, *S. enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis can infect both human and animals and they are major pathogens that can contaminate meat and food products. Rapid methods for identifying *Campylobacter* and *Salmonella* spp. are required, especially for meat and food exports and for local consumer protection. To do these rapid assays, immunoassays; immunomagnetic separation-ELISA (IMS-ELISA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were developed in order to identify these organisms efficiently. The multiplex polymerase chain reaction (m-PCR) was also developed to identify and confirm the targeted DNA of interest.

In this study, all samples tested were directly inoculated with exact numbers of organisms and the tests were performed without further enrichment. Absorbance at 450 nm was selected to measure and interpret the results of immunoassays. For *Campylobacter*: developed IMS-ELISA and ELISA test kits gave the sensitivity at 10^5 and 10^6 cfu/ml for *Campylobacter* spp. and *C. jejuni* respectively. Developed m-PCR generated the sensitivity at 10^2 cfu/ml (10 cfu/PCR reaction) and gave only 460 bp for *Campylobacter* spp. and *C. coli*, whereas 460 and 160 bp for *C. jejuni*.

For *Salmonella*: m-PCR also generated the sensitivity at 10^5 cfu/ml (10^3 cfu/PCR reaction) and gave only 526 bp for *Salmonella* spp., 620 and 526 bp for *S. Typhimurium* and 526 and 316 bp for *S. Enteritidis*. Developed ELISA test kits for *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* gave the sensitivity at 10^6 , 10^6 and 10^8 cfu/ml respectively. IMS-ELISA gave the sensitivity for *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* at 10^5 , 10^4 and 10^7 cfu/ml respectively.

Every test kit gave the specificity at 100% with all standard organisms available in laboratory. Moreover, the developed methods could detect the contamination at 1 cfu/ml when the samples were pre-enriched for 6 hours only. The immunodiagnostic kits were stored at 4°C for at least 9 months during the experiments. The absorbance value of the reaction to identify positive and negative controls for sensitivity and specificity study during storage at 0, 3, 6 and 9 months showed no significant difference ($p>0.05$, ANOVA). It was concluded that the kits possessed stability and gave reproducible results not less than 9 months.

Developed diagnostic kits; IMS-ELISA, ELISA and m-PCR, were applied to detect the contamination in chicken samples by inoculated samples with 10^2 cfu/ml standard control microorganism before incubating for 18-24 hours. The identification followed the standard protocol for *Campylobacter* and *Salmonella* detection in meat recommended by the Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2003) with some modifications. The inoculated samples gave positive results, while the un-inoculated samples gave negative results. All kits gave the same patterns of results. In conclusion, all the techniques used were accurate, rapid, simpler and less time and labor-consuming than the conventional methods. The developed kits fulfilled the aims of the study. They have been established in Thailand and are available to be applied to fresh foods, meat, and food products in food safety-control, including clinical specimens.

KEY WORDS: *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*, *Salmonella*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, ELISA, IMS-ELISA, M-PCR, Chicken, Food Safety

สารบัญ

สรุปรายงานฉบับสมบูรณ์	หน้า
• สรุปผลรายงานฉบับสมบูรณ์ (Executive Summary)	ก
• บทคัดย่อ	ค
• Abstract	ง
• สารบัญ	จ
• สารบัญตาราง (List of Tables)	ข
• สารบัญภาพ (List of Figures)	ฅ
• คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ (List of Abbreviations)	ฉ
• รายละเอียดการดำเนินงานวิจัย ผลการทดลองและการวิจารณ์	
1. ชื่อโครงการ	1
2. คณะผู้ดำเนินการวิจัย	1
3. สาขาที่ทำการวิจัย	2
4. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	3
5. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
<i>Campylobacter</i>	7
<i>Salmonella</i>	9
Immunoassay, ELISA และ Immunomagnetic Separation	14
Polymerase Chain Reaction	17
6. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	20
7. ระเบียบวิธีวิจัย	20
8. แผนการดำเนินงาน	23
9. ผลการทดลอง และวิจารณ์	25
9.1 <i>Campylobacter</i>	25
9.1.1 <i>Campylobacter</i> :Conventional Microbiology-Methods	25
9.1.2 <i>Campylobacter</i> : Multiplex PCR Analysis	26
9.1.3 <i>Campylobacter</i> : Immunoassays	28
<i>Campylobacter</i> immunodiagnostic kits stability tests	29
ELISA	29
IMS-ELISA	34
Sample detection	39
9.2 <i>Salmonella</i>	52
9.2.1 <i>Salmonella</i> : Conventional Microbiology-Methods	52
9.2.2 <i>Salmonella</i> : Specificity of multiplex PCR	53
9.2.3 <i>Salmonella</i> : Immunoassays	56

<i>Salmonella</i> immunodiagnostic kits stability tests	57
ELISA	57
IMS-ELISA	66
Sample detection	75
Summary of results from immunoassays and multiplex PCR	93
10. เอกสารอ้างอิง	98
● ภาคผนวก (Appendices)	I
<i>Campylobacter</i>	I
<i>Campylobacter</i> : Multiplex-PCR Protocol	I
ELISA	II
IMS-ELISA	IV
คำนวณต้นทุนต่อการตรวจ <i>Campylobacter</i>	VI
ขั้นตอนการตรวจการปนเปื้อน <i>Campylobacter</i> ในอาหาร	VII
<i>Salmonella</i>	VIII
<i>Salmonella</i> : Multiplex-PCR Protocol	VIII
ELISA	IX
IMS-ELISA	XI
คำนวณต้นทุนต่อการตรวจ <i>Salmonella</i>	XIII
ขั้นตอนการตรวจการปนเปื้อน <i>Salmonella</i> ในอาหาร	XIV
Preparation of genomic DNA	XV
การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ triton-X	XVII
บทความสำหรับการเผยแพร่	XVIII
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้	XXI
กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	
ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัยนี้	XXIII

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่ 1	Factors causing food positioning in Thailand.	6
ตารางที่ 2	แสดงชนิดของเชื้อต่างๆที่มักจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนที่จัดแบ่งชนิดอยู่ในระดับอันตรายต่างๆ	6
ตารางที่ 3	Abbreviated antigenic schema for <i>Salmonella</i>	11
ตารางที่ 4	Antigenic structure of some common <i>Salmonellae</i>	13
ตารางที่ 5	ผลของโครงสร้าง (morphology) และการทดสอบทางชีวเคมีของ <i>Campylobacter</i> reference strains.	26
ตารางที่ 6	Results of the specificity of the developed ELISA test kit for detection of <i>Campylobacter</i> spp.	29
ตารางที่ 7	Results of the specificity of the developed ELISA test kit for detection of <i>C. jejuni</i> .	30
ตารางที่ 8	Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of <i>Campylobacter</i> spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months.	31
ตารางที่ 9	Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of <i>Campylobacter</i> spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months.	32
ตารางที่ 10	Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of <i>C. jejuni</i> .	33
ตารางที่ 11	Results of the specificity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>Campylobacter</i> spp.	34
ตารางที่ 12	Results of the specificity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>C. jejuni</i> .	35
ตารางที่ 13	Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>Campylobacter</i> spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., <i>C. jejuni</i> and <i>C. coli</i> at various concentrations varying from 1 to 10^8 cfu/ml.	36
ตารางที่ 14	Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>Campylobacter</i> spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., <i>C. jejuni</i> and <i>C. coli</i> at various concentrations varying from 1 to 10^8 cfu/ml.	37

ตารางที่ 15	Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>C. jejuni</i> after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., <i>C. jejuni</i> at various concentrations varying from 1 to 10^8 cfu/ml.	38
ตารางที่ 16	Detection the contamination of <i>Campylobacter</i> in Chicken sample.	39
ตารางที่ 17	Detection the contamination of <i>C. jejuni</i> in Chicken sample.	41
ตารางที่ 18	Detection the contamination of <i>Campylobacter</i> in Chicken samples (from industrial company A).	44
ตารางที่ 19	Detection the contamination of <i>C. jejuni</i> in Chicken samples (from industrial company A).	46
ตารางที่ 20	Detection the contamination of <i>Campylobacter</i> in samples (Shrimp farm).	48
ตารางที่ 21	Detection the contamination of <i>C. jejuni</i> in samples (Shrimp farm).	50
ตารางที่ 22	Biochemical reaction of <i>Salmonella</i> .	52
ตารางที่ 23	Summary of PCR Specificity.	53
ตารางที่ 24	Results of the specificity of the developed ELISA test kit for detection of <i>Salmonella</i> spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml.	57
ตารางที่ 25	Results of the specificity of the developed ELISA test kit for detection of <i>S. Typhimurium</i> after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml.	58
ตารางที่ 26	Results of the specificity of the developed ELISA test kit for detection of <i>S. Enteritidis</i> (<i>Salmonella</i> group D).	59
ตารางที่ 27	Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of <i>Salmonella</i> spp., i.e., <i>S. Typhimurium</i> .	60
ตารางที่ 28	Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of <i>Salmonella</i> spp., i.e., <i>S. Enteritidis</i> .	61
ตารางที่ 29	Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of <i>Salmonella</i> spp., i.e., <i>S. Typhi</i> .	62
ตารางที่ 30	Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of <i>S. Typhimurium</i> , i.e., <i>S. Typhimurium</i> .	63
ตารางที่ 31	Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of <i>S. Enteritidis</i> (<i>Salmonella</i> group D) i.e., <i>S. Enteritidis</i> .	64

ตารางที่ 32	Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of <i>S. Enteritidis</i> (<i>Salmonella</i> group D) i.e., <i>S. Typhi</i> .	65
ตารางที่ 33	Results of the specificity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>Salmonella</i> spp.	66
ตารางที่ 34	Results of the specificity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>S. Typhimurium</i> .	67
ตารางที่ 35	Results of the specificity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>S. Enteritidis</i> (<i>Salmonella</i> group D). Negative controls were <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Weltevreden</i> , <i>S. Blockley</i> and <i>E. coli</i> .	68
ตารางที่ 36	Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>Salmonella</i> spp. i.e., <i>S. Typhimurium</i> .	69
ตารางที่ 37	Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>Salmonella</i> spp. i.e., <i>S. Enteritidis</i> .	70
ตารางที่ 38	Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>Salmonella</i> spp. i.e., <i>S. Typhi</i> .	71
ตารางที่ 39	Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>S. Typhimurium</i> , i.e., <i>S. Typhimurium</i> .	72
ตารางที่ 40	Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>S. Enteritidis</i> (<i>Salmonella</i> group D) i.e., <i>S. Enteritidis</i> .	73
ตารางที่ 41	Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of <i>S. Enteritidis</i> (<i>Salmonella</i> group D) i.e., <i>S. Typhi</i> .	74
ตารางที่ 42	Detection the contamination of <i>Salmonella</i> in Chicken samples.	75
ตารางที่ 43	Detection the contamination of <i>S. Typhimurium</i> in Chicken samples.	77
ตารางที่ 44	Detection the contamination of <i>Salmonella</i> group D in Chicken samples.	79
ตารางที่ 45	Detection the contamination of <i>Salmonella</i> in Chicken samples (from industrial company A).	81
ตารางที่ 46	Detection the contamination of <i>S. Typhimurium</i> in Chicken samples (from industrial company A).	83
ตารางที่ 47	Detection the contamination of <i>Salmonella</i> group D in Chicken samples (from industrial company A).	85
ตารางที่ 48	Detection the contamination of <i>Salmonella</i> in samples (Shrimp farm).	87

ตารางที่ 49	Detection the contamination of <i>S. Typhimurium</i> in samples (Shrimp farm).	89
ตารางที่ 50	Detection the contamination of <i>Salmonella</i> group D in samples (Shrimp farm).	91
ตารางที่ 51	Summary of immunoassay and multiplex PCR test kits identification for <i>Salmonella</i> and <i>Campylobacter</i>	93

สารบัญรูปภาพ (List of Figures)

รูปที่ 1	ลักษณะของโคโลนีของ <i>C. jejuni</i> ATCC 33291 บน Karmali agar	25
รูปที่ 2	ลักษณะของ <i>C. jejuni</i> ATCC 33291 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ภายหลังจากการย้อมกรัม	25
รูปที่ 3	แสดงผลความจำเพาะ (specificity) ของ duplex primers ต่อ strains of <i>C. jejuni</i> และ <i>C. coli</i>	27
รูปที่ 4	แสดงความไว (sensitivity) ของ duplex PCR โดยการทำการตรวจสอบเชื้อ <i>C. jejuni</i> ATCC 33291 ที่ความเข้มข้น 10-106 cfu/ml	27
รูปที่ 5	Summary of PCR Specificity	54
รูปที่ 6	Specificity of mPCR for <i>Salmonella</i>	54
รูปที่ 7	Sensitivity of mPCR for <i>Salmonella</i>	55

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ (List of Abbreviations)

ATCC	American Type Culture Collection
bp	base pair
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
<i>C. upsiliensis</i>	<i>Campylobacter upsiliensis</i>
°C	degree Celsius
dATP	deoxyadenosine 5' - triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5' - triphosphate
dGTP	deoxyguanosine 5' - triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DMSO	dimethylsulfoxide
dNTPs	deoxyribonucleoside triphosphate
dTTP	deoxythymidine 5' - triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene diamine tetraacetate acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	et alli (Latin), and other people
etc.	et ectera (Latin), other things
g	gram
h	hour
HBSS	Hank's balanced salts solution
i.e.	id est (Latin), which is to say, in other words
IMS	Immunomagnetic separation
kD	kilodalton
KF	Cephaolthin
μl	microliter
μg	microgram

M	molar
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar
min	minute
MHBA	Mueller Hinton blood agar
m-PCR	Multiplex polymerase chain reaction
MW	molecular weight
NA	Nalidixic acid
nm	nanometer
No.	number
O.D.	optical density
PCR	polymerase chain reaction
rpm	revolution per minute
RNA	ribonucleic acid
sec	second
sp., spp.	species
subsp.	subspecies
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

โครงการวิจัย ทนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

1. ชื่อโครงการ การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จสำหรับหาเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ โดยวิธีอิมมูโนแมกเนติก ร่วมกับอิมมูโนแอสเสย์ : แคมป์ปิลแบบเคเตอร์ และ ชัลโมเนลลา

Title	Development of immunomagnetic - immunoassay diagnostic kits for food-borne microorganisms in meat : <i>Campylobacter</i> and <i>Salmonella</i>
-------	--

- ## 2. คณะผู้ดำเนินการวิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ นางสาวปริมเจณีนัน มุ่งการดี

คุณวุฒิ ภ.บ. (เกียรตินิยม), วท.ม. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย), Dr. rer. nat. (Immunology)

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนศรีอยุธยา เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์ 02-6448677 ต่อ 1133-6, 02-6448692 โทรสาร 02-3544326

E-mail Address: pypmk@mahidol.ac.th

ความรับผิดชอบต่อโครงการ วางแผนโครงการวิจัยในภาพรวม และรายละเอียดในหัวข้อต่างๆ รับผิดชอบงานงานด้าน จุลชีววิทยา, immunoassay การพัฒนารูปแบบของชุดตรวจทดสอบ การประเมินความเสี่ยงด้านการปนเปื้อนของเชื้อที่ศึกษาในโรงงาน ติดต่อประสานงานกับผู้ร่วมวิจัย โรงงาน รวบรวมข้อมูล ประมวลผลวิเคราะห์ สรุปผล และนำเสนอผลงาน

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย 45%

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

ชื่อ นางศศิธร คณะรัตน์

คุณวุฒิ วท.บ. (สัตวศาสตร์), สพ.บ.

Diploma in Food Hygiene and Veterinary

ตำแหน่ง สัตวแพทย์ 8 หัวหน้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร

สถานที่ทำงาน กองสัตว์แพทย์สาธารณสุข กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท 02-9639215

โทรสาร 02-9639215

E-mail Address: sk747@hotmail.com

ความรับผิดชอบต่อโครงการ วางแผนโครงการวิจัยในด้านการเก็บตัวอย่าง รับผิดชอบ
การตรวจทางด้านจุลชีววิทยา การจัดหาตัวอย่าง การประเมินความเสี่ยงด้านการปนเปื้อน
ของเชื้อที่ศึกษาในโรงงาน ติดต่อประสานงานกับโรงงาน รวบรวมข้อมูล ประมวลผล
วิเคราะห์ และ สรุปผล

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย 25%

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

ชื่อ นางสาววัลลา ตังรักษาสัตย์

คุณวุฒิ ภ.บ. (เกียรตินิยม), M.S. (Food Science & Technology)

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

สถานที่ทำงาน ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนศรีอยุธยา เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์ 02-6448677 ต่อ 5719, โทรสาร 02-3544326

E-mail Address: pywtg@mahidol.ac.th

ความรับผิดชอบต่อโครงการ วางแผนโครงการวิจัยในด้านการเก็บตัวอย่าง การจัดหาตัว
อย่าง การประเมินความเสี่ยงด้านการปนเปื้อนของเชื้อที่ศึกษาในโรงงาน รวบรวมข้อมูล
ประมวลผล วิเคราะห์ และ สรุปผล

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย 20%

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 3

ชื่อ นางสาวสุปราณี สีหาราช

คุณวุฒิ วท.บ. (สัตวศาสตร์), สพ.บ.

ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

สถานที่ทำงาน กองสัตวแพทย์สาธารณสุข กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์ 02-9639215

โทรสาร 02-9639215

E-mail Address: takapum@hotmail.com

ความรับผิดชอบต่อโครงการ วางแผนในด้านการเก็บตัวอย่าง รับผิดชอบการตรวจ
ทางด้านจุลชีววิทยา การจัดหาตัวอย่าง รวบรวมข้อมูล ประมวลผล วิเคราะห์
และ สรุปผล

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย 15%

3. สาขาที่ทำการวิจัย วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์

4. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การผลิตอาหารเพื่อการอุปโภคในประเทศจำเป็นต้องผลิตของให้มีคุณภาพและมีมาตรฐาน ซึ่งเป็นหลักของสากล เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาคุณภาพชีวิตและเพื่อปรับมาตรฐานและสุขอนามัยที่ดีขึ้นของประชาชนผู้บริโภคในประเทศ และการนำผลิตผลต่างๆออกสู่ตลาดโลกนั้น ประเทศไทยเป็นสมาชิกขององค์การค้าโลก จำเป็นต้องผลิตสินค้าที่มีคุณภาพโดยปฏิบัติตามข้อตกลงและมาตรการทางกฎหมายของประเทศคู่ค้า ซึ่งจะต้องสอดคล้องกับมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ จึงจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมาตรฐานเข้าสู่ตลาดโลกมีโอกาสในการแข่งขัน อันจะเป็นประโยชน์ต่อการค้าและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ

เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์เป็นแหล่งโภชนาการที่สำคัญยิ่งของมนุษย์ เป็นการผลิตในระดับชุมชนและอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อการอุปโภคบริโภคในประเทศ และเป็นสินค้าส่งออกที่นำรายได้สำคัญเข้าสู่ประเทศ การส่งออกอาหารเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เนื้อไก่และผลิตภัณฑ์ ประเทศไทยจัดว่าเป็นประเทศส่งออกอันดับต้นๆของโลก ตามสถิติ พ.ศ. 2542 สามารถผลิตได้สูงถึง 836 ล้านตัว คิดเป็นปริมาณเนื้อไก่ 848,000 ตัน โดยบริโภคในประเทศ 665,000 ตัน ส่งออกต่างประเทศ 270,000 ตัน สำหรับการผลิตสัตว์เศรษฐกิจตัวอื่นๆ ได้แก่ สุกร โค กระบือ เป็นต้น เมื่อรวมทั้งที่ส่งออกต่างประเทศและบริโภคในประเทศนั้นมีมูลค่าไม่ต่ำกว่า 100,000 ล้านบาท (พรศิลป์ พัชรินทร์ – ดนกุล, 2544; ศูนย์สารสนเทศเศรษฐกิจการค้า โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร ปี 2544) และเกี่ยวข้องกับชีวิตของเกษตรกรนับล้านคน โดยมีแนวโน้มว่าจะมีปริมาณการส่งออกที่สูงขึ้น การแข่งขันในตลาดโลกมีความเข้มข้นมากขึ้นและจะทวีความรุนแรงมากขึ้นในอนาคต องค์การการค้าโลก (WTO) จึงได้กำหนดความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application on Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS) ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับความปลอดภัยของอาหารเพื่อปกป้องสุขอนามัยของผู้บริโภคและมีผลต่อเศรษฐกิจและสังคมและการพัฒนาประเทศ

อันตรายที่เกิดการปนเปื้อนในอาหารโดยทั่วไปนั้นเกิดได้จากหลายสาเหตุ พบว่ามากกว่าร้อยละ 50 เกิดการปนเปื้อนที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ ซึ่งจะสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอันตรายในระดับความรุนแรงต่างๆได้ และเป็นเชื้อที่มีความจำเป็นที่ต้องตรวจเพื่อการประกันคุณภาพของสินค้า

เชื้อที่เป็นสิ่งต้องห้ามที่เป็นข้อกำหนดต่างๆเหล่านี้ ใช้วิธีการตรวจมาตรฐานทางจุลชีววิทยาในการแยกแยะและจำแนกเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเชื้อในปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ ก่อนทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และนำเชื้อบริสุทธินั้นมาตรวจต่อโดยวิธีการต่างๆตามวิธีการทางจุลชีววิทยา ได้แก่ การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษ ผลของปฏิกิริยาต่างๆที่ใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมี การตรวจรูปร่างสัณฐานทางกายภาพ เป็นต้น ซึ่งมักจะใช้เวลาค่อนข้างนาน

และมีความแตกต่างกันในเชื้อแต่ละชนิด การตรวจที่ต้องการผลที่รวดเร็วขึ้นจำเป็นต้องใช้ในการควบคุมคุณภาพของสินค้าโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ด้านอาหาร ด้านการเกษตร ปัจจุบันมีวิธีการต่างๆ ที่พัฒนาขึ้นและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ เช่น การใช้วิธีการทางอิมมูโนวิทยา การตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ การใช้อุปกรณ์และเทคนิคพิเศษต่างๆ เป็นต้น ซึ่งสามารถลดเว้นระยะเวลาที่ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ทำให้ทราบผลที่รวดเร็วขึ้น และปฏิริยามักจะให้ความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ที่สูง แม้ว่าวิธีเหล่านี้จะยังไม่เป็นวิธีการตรวจมาตรฐานทั่วไปที่กำหนดไว้ให้ใช้และรับรองผลการตรวจเช่นวิธีทางจุลชีววิทยา และหลายชนิดมักจะไม่สามารถบ่งบอกถึง viability ของเชื้อได้ แม้จะสามารถบอกได้ถึงร่องรอยการปนเปื้อนของเชื้อ จึงคาดว่าเมื่อเทคนิคที่มีการพัฒนาขึ้นและเป็นที่ยอมรับสำหรับเชื้อหลายๆชนิด จึงน่าที่จะเป็นวิธีมาตรฐานอย่างหนึ่งที่สามารถกำหนดนำมาใช้เป็นมาตรฐานรับรองผลการตรวจได้ในอนาคต ปัจจุบันเทคนิคต่างๆ เหล่านี้ยังคงเป็นวิธีที่เป็นทางเลือกที่แนะนำมาประยุกต์ใช้ เพื่อให้ผลการทดลองที่รวดเร็วและได้ผลที่น่าเชื่อถือใกล้เคียงกับวิธีทางจุลชีววิทยา และบางครั้งจะให้ผลที่มีความไวกว่า

วิธีการตรวจสอบที่จะพัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้ ใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยา คืออิมมูโนแอสเสย์ (immunoassay) ซึ่งวิธีการตรวจนี้จำเป็นต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อที่ต้องการตรวจ และประยุกต์การใช้เอนไซม์และสารสับสเตรทที่จะแสดงผลการตรวจสอบให้ได้ชัดเจน เพื่อให้มีชุดตรวจสอบให้มีความรวดเร็ว สะดวก ความไว ความจำเพาะ และแม่นยำขึ้น แอนติบอดีที่จะนำมาใช้ในโครงการนี้ จะใช้แอนติบอดีที่ผลิตจากบริษัทต่างๆที่ได้มีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆมาดีแล้ว เพื่อลดความล่าช้าในการเตรียมแอนติบอดีทำให้เกิดความรวดเร็วขึ้นในการศึกษาและเตรียมพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จ ที่สามารถนำมาใช้ได้ทันทีในระยะเวลาไม่เกิน 2 ปีช่วงที่ทำวิจัย สำหรับชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จที่เตรียมขึ้นมานี้ จะต้องนำมาเปรียบเทียบผลการทดลอง ในด้าน specificity, sensitivity, consistency, stability และ cost effectiveness เปรียบเทียบกับชุดสำเร็จรูปที่เตรียมจากต่างประเทศ และวิธี multiplex PCR ที่จะพัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้เพื่อใช้ร่วมในการตรวจผล

ในการวิจัยนี้เสนอเตรียม immunodiagnostic kit ใน 2 รูปแบบ คือ

1. Immunomagnetic beads ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างใหม่มากสำหรับเป็นชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูป
2. Enzyme-linked immunosorbent assay ซึ่งเป็นวิธีแบบ classical ที่นิยมใช้และราคาถูกกว่า

ในโครงการนี้จะเสนอการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จสำหรับเชื้อแต่ละชนิดต่อไปนี้ คือ
กลุ่มเชื้อ *Campylobacter*

- *Campylobacter* spp.
- *Campylobacter jejuni*

- *Campylobacter coli* (ได้ขอไม่ดำเนินการในรายงาน 2 เนื่องจากไม่สามารถจัดหาแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้เฉพาะในการทดลอง แม้จะพยายามทำการ absorb ส่วนที่เป็นปฏิกิริยาข้ามออกไปด้วยวิธีต่างๆทาง immunology ก็ยังไม่ให้ผลเป็นที่พอใจ จึงไม่สามารถดำเนินการได้ และให้เสร็จทันตามชุดตรวจอื่นที่นำเสนอไว้ อนึ่งในการทดลองนี้สามารถทำการตรวจ *C. coli* ได้ โดยการใช้ชุดตรวจที่เตรียมขึ้นจำเพาะต่อ *Campylobacter* spp ซึ่งทดลองให้ผลดีตามต้องการ นอกจากนั้นยังใช้วิธีการตรวจด้วย multiplex PCR ให้ผลแยกแยะระหว่าง *C. jejuni* และ *C. coli* ได้ จึงได้ขออนุญาตปรับแผนมาแล้วในรายงาน 2 ก่อนหน้ารายงานนี้)

กลุ่มเชื้อ *Salmonella*

- *Salmonella* spp.
- *Salmonella* Typhimurium
- *Salmonella* Enteritidis

สำหรับการนำไปใช้เพื่อตรวจประสิทธิภาพของชุดตรวจสำเร็จนี้ นอกจากจะทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยการใส่เชื้อลงไปปริมาณต่างๆและตรวจสอบประสิทธิภาพด้านต่างๆแล้ว จะศึกษาต่อกับตัวอย่างเนื้อไก่และกุ้งจากตลาดประมาณ 20-30 ตัวอย่าง เพื่อประเมินผลการตรวจจากตัวอย่างในสถานการณ์จริง หลังจากประเมินผลแล้วจะนำชุดตรวจสอบมาประยุกต์ใช้ประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนของเชื้อต่างๆเหล่านี้ในโรงงานผู้ผลิตจริงโดย

- จากการผลิตเนื้อไก่ จะศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อที่อาจมีอยู่ในแต่ละขั้นตอนการผลิตเนื้อไก่ เช่น จุดล้างซาก จุดเก็บน้ำ จุดต่างๆจากสายพานวิ่ง finished product เป็นต้น ขณะนี้ได้ติดต่อขอความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างจาก บริษัท A (มหาชน) ที่ส่งไก่ไปต่างประเทศ
- จากฟาร์มกุ้งจะศึกษา การปนเปื้อนของเชื้อที่อาจมีอยู่ใน feed ที่นำมาใช้ โดยเฉพาะจากวัตถุดิบปลาป่น และจากระบบน้ำในฟาร์มกุ้ง โดยเฉพาะในน้ำเค็มและในบ่อเลี้ยงกุ้งในแต่ละระยะเวลาที่เลี้ยง ขณะนี้ได้ติดต่อขอความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มกุ้งที่จังหวัดจันทบุรี

5. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อันตรายที่เกิดการปนเปื้อนในอาหารและสินค้าต่างๆเหล่านี้โดยทั่วไปนั้นเกิดได้จากหลายสาเหตุ (ตารางที่ 1) พบว่ามากกว่าร้อยละ 50 เกิดการปนเปื้อนที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ ซึ่งจะสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอันตรายในระดับความรุนแรงต่างๆได้ 3 ระดับ (ตารางที่ 2) ดังนี้ คือ

Severe Hazards

Moderate Hazards : Potentially Extensive spread

Moderate Hazards : Limited Spread

ตารางที่ 1 FACTORS CAUSING FOOD POISONING IN THAILAND (Kraidej L, 2001)

Microorganisms	55 %
Chemicals	12 %
Plants	12 %
Animals	2 %
Unknown reasons	19 %

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของเชื้อต่างๆที่มักจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนที่จัดแบ่งชนิดอยู่ในระดับอันตรายต่างๆ เชื้อที่ถูกจัดอยู่ในความรุนแรงระดับกลาง (moderate) ก็อาจทำให้เกิดอันตรายขึ้นในกลุ่มคนบางกลุ่มและผู้ที่มีความไวต่อการติดเชื้อนั้นๆได้

I Severe Hazards	II Moderate Hazards : Potentially Extensive spread	III Moderate Hazards : Limited Spread
<i>Clostridium botulinum</i> types A, B, E and F	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Salmonella typhi, paratyphi</i> A, B	<i>Shigella</i> spp.	<i>Clostridium perfringens</i>
Hepatitis A and E	Enterovirulent <i>Escherichia coli</i> (EEC)	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Vibrio cholerae, non - 01</i>
<i>B. suis</i>	Rotavirus	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Vibrio cholerae</i> 01	Norwalk virus group	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Taenia solium</i>	<i>Diphyllobothrium latum</i>	<i>Taenia saginata</i>
<i>Trichinella spiralis</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	

Adapted from ICMSF (1986), Lavanaya Kraidej, 2001.

Campylobacter

Campylobacter เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เรียกรวมกัน microaerophile ใช้บรรยากาศที่ออกซิเจนจำนวนน้อย พบเป็นสาเหตุสำคัญของ food-borne diseases แม้จะปนเปื้อนมาจำนวนน้อย เพียง 400-500 ตัวก็ทำให้เกิดอาการได้ โดยอาจก่อให้เกิดความรุนแรงจนถึงเสียชีวิตได้ ปัจจุบันพบว่าในรายงานต่างๆ ในสหรัฐอเมริกา จัดว่าเป็นสาเหตุอันดับหนึ่ง (45%) ของเชื้อที่พบในอาหารที่ก่อให้เกิดอาการต่อระบบทางเดินอาหาร ในปี 2535 ประมาณกันว่ามีผู้ติดเชื้อนี้ในสหรัฐอเมริกาประมาณ 2.5 ล้านคน (CDC, 1998) แต่ล่าสุดในปัจจุบันคาดว่าจะมีผู้ติดเชื้อประมาณปีละ 4 ล้านคน (Hingley, 1999) โดยปกติ *Campylobacter* อาจพบได้ในบริเวณทางเดินอาหารของทั้งคนและสัตว์โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรค การปนเปื้อนของเชื้อมักจะเกิดขึ้นในเนื้อไก่จากโรงงานรวมทั้งเนื้อสัตว์อื่นๆ นมที่ไม่ผ่านการ pasteurized และน้ำ ซึ่งเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในอาหารและเนื้อไก่แช่แข็งเชื้อยังสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ หากรับประทานอาหารที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไป หรืออาหารที่ไม่สุก หรือการปรุงอาหารที่ใช้อุปกรณ์การครัวร่วมกัน เช่น เขียง มีด เป็นต้น ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ จะก่อให้เกิดการติดเชื้อ และเกิดอาการทางพยาธิสภาพขึ้น โดยจะมีการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดศีรษะ มีไข้ ตามด้วยอาการท้องเดิน ปวดท้อง คลื่นไส้ ในเด็กเล็กอาจก่อให้เกิดอาการชักได้ การติดเชื้อโดยทั่วไปอาจหายได้โดยไม่ต้องรักษาหรือให้ยาปฏิชีวนะ การให้ยามักจะจ่ายให้ผู้ที่มีการรุนแรง มีรายงานพบอาการแทรกซ้อน เกิดการติดเชื้อร่วมทางกระเพาะปัสสาวะ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ในปัจจุบันยังพบว่าเกิดปัญหาสำคัญคือการต้านยาปฏิชีวนะทั้งในยาระดับพื้นฐานและระดับสูง ซึ่งนำไปสู่ปัญหาทางสุขภาพอื่นๆต่อไป ปัจจุบันพบความสัมพันธ์ของเชื้อว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อให้เกิดโรค autoimmune เช่น โรค Guillain-Barr syndrome ซึ่งเป็นที่มักพบการเกิด paralysis ในเด็กและผู้ใหญ่ (Allos และคณะ, 1997) แต่ละปีจะพบประมาณ 2 ราย ต่อ ประชาชน 100,000 คน และโรค rheumatic (Peterson, 1994) เป็นต้น ด้วยปัญหาที่กล่าวมานี้ว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ ดังนั้นเพื่อป้องกันการเกิดโรคที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษา ในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดการตรวจหาเชื้อ 7 ชนิดในอาหารคือ *Campylobacter*, *E. coli* 0157:H7, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, และ *Yersinia* (FSIS, 1997) สำหรับผู้ส่งออกของประเทศไทย ที่ต้องการเข้าสู่ตลาดของประเทศที่มีข้อกำหนดการตรวจเชื้อเหล่านี้ จำเป็นต้องมีการตรวจ เพื่อการควบคุมคุณภาพของสินค้าให้เข้ามาตรฐาน และสำหรับในประเทศไทยหน่วยงานที่รับผิดชอบด้านสุขภาพและการควบคุมคุณภาพของเนื้อสัตว์และอาหารในท้องตลาด จำเป็นต้องรีบดำเนินการเพื่อเป็นข้อมูลและเตรียมการป้องกันเพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคในประเทศ และศึกษาวิธีการที่ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ท้นต่อเหตุการณ์ เพื่อใช้ปฏิบัติในการตรวจสอบ สำหรับหน่วยงานต่อไป

การแยกและวินิจฉัยเชื้อโดย Conventional Microbiological Method

เชื้อ *Campylobacter* มีมากมายหลายชนิด ทั้งที่ก่อให้เกิดโรคและไม่ก่อให้เกิดโรค พบว่าประมาณ 99% ของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในคนที่สำคัญคือ *Campylobacter jejuni* สำหรับอีกสายพันธุ์คือ *C. coli* ก็มีการศึกษาร่วมด้วย ตามปกติวิธีการตรวจหาเชื้อในเนื้อไก่และอาหาร โดยวิธีการทางจุลชีววิทยาจะใช้เวลาในการทดลอง จนกว่าจะทราบผลชนิดของเชื้อที่ปนเปื้อน และจะใช้อุปกรณ์ตลอดจนเทคนิคที่เฉพาะสำหรับงานทางด้านนี้ สำหรับ *Campylobacter* เป็นเชื้อที่ตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ยากตัวหนึ่ง โดยเฉพาะเมื่อมีเชื้อปนเปื้อนมาปริมาณน้อย การเพาะเชื้อจำเป็นต้องใช้วิธีการเลี้ยงในอาหารพิเศษ ในสภาวะที่พิเศษ ใช้เวลาในการตรวจ identify ที่นานกว่าเชื้ออื่น คือประมาณ 11-14 วัน หรือบางตัวอาจนานกว่านั้น ดังนั้นกระบวนการตรวจสอบเชื้อนี้ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาจะใช้เวลาและจนถึงครบทุกขั้นตอน จะมีราคาสูง

การตรวจวินิจฉัยเชื้อโดย Rapid Methods

ตามที่ได้กล่าวมาแล้วถึงปัญหาการใช้วิธีการทางจุลชีววิทยาในการตรวจ ซึ่งปัจจุบันยังคงใช้เป็นข้อกำหนดมาตรฐานในการตรวจสอบ แต่เนื่องจาก *Campylobacter* เป็นเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพและคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร การจะใช้วิธีการทางจุลชีววิทยาเพียงอย่างเดียว อาจไม่ทันการ จึงมีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการตรวจหาเชื้อให้ได้ผลอย่างรวดเร็วถูกต้องและมีประสิทธิภาพ ซึ่งจากการศึกษาจากข้อมูล พบว่าในรายงานปัจจุบันวิธีการตรวจหาเชื้อที่ช่วยการยืนยันผลการตรวจทาง conventional microbiological technique ที่ให้ผลที่รวดเร็วขึ้น ที่มีรายงาน เช่น immunoassay (Lu และคณะ, 1997), laser-based technology (Lorenz และคณะ, 1998), DNA-based technology (Giesendorf และคณะ, 1992; Korolik และคณะ, 1995; Cardarelli และคณะ, 1996; Harmon และคณะ, 1997; Slater และคณะ, 1997; Winters และคณะ, 1998; Madden และคณะ, 1998; Payne และคณะ, 1999) เป็นต้น

วิธี immunoassay สำหรับ *Campylobacter* และ contaminated food pathogens อื่นๆได้มีการศึกษากันมากพอสมควร ในการตรวจสอบใช้หลักการของปฏิกิริยาความจำเพาะระหว่าง เชื้อหรือโปรตีนแอนติเจนจากตัวเชื้อ ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ แอนติบอดี ที่ผลิตขึ้นมา ซึ่งปัจจุบันมักเป็น monoclonal antibodies สำหรับการตรวจสอบได้พัฒนาการตรวจในรูปแบบต่างๆ เพื่อให้มีความไวในการตรวจตามเทคนิคที่คิดค้นพัฒนาขึ้น การตรวจใช้เวลาสั้นสามารถตรวจได้หลังการเพิ่มจำนวนของเชื้อเช่นวิธีอื่นๆ ชุดตรวจสอบที่มีในท้องตลาดในปัจจุบันสามารถตรวจบอกแต่เพียง genus ของเชื้อ ยังไม่สามารถบอกแยกถึง species ของเชื้อ ซึ่งสำหรับ *Campylobacter* spp. จะมีบทบาทที่ก่อโรคแตกต่างกันมาก ซึ่งแตกต่างกับ pathogens อื่นๆในอาหาร ซึ่งนับเป็นข้อด้อยของการตรวจด้วยวิธีนี้ในขณะนี้ ปัจจุบันเทคโนโลยีในการทำ immunoassay บริษัทต่างได้พัฒนา

ทำไปเร็วมาก เนื่องจากวิธีการและหลักการจะใช้คล้ายคลึงกับการตรวจผลของสารต่างๆทาง การแพทย์ ที่มีการใช้เป็นจำนวนมาก เพียงผลิตแอนติบอดี หรือแอนติเจนให้มีความจำเพาะ แตกต่างกันออกไป พัฒนาการด้านนี้จะมีรูปแบบเปลี่ยนไปให้ทันกับวิทยาการที่ค้นพบ จะพบว่า diagnostic kits ต่างๆจะมีรุ่น (generation) เข้ามาใหม่เป็นระยะๆ และต้องสั่งซื้ออยู่ตลอด ดังนั้น การเตรียมการผลิต immunoassay หากจะเตรียมแอนติบอดีขึ้นใช้เอง จะต้องใช้เวลานานกว่าจะ ทำการ characterize แอนติบอดีที่แน่นอน ในเรื่องนี้แม้จะสามารถดำเนินการได้เอง แต่อาจไม่ทัน กับเหตุการณ์และสถานการณ์ที่จำเป็นต้องมีชุดสำหรับตรวจเชื้อในประเทศใน generation เริ่มต้น และค่อยพัฒนาต่อไปเมื่อสามารถจัดทำรูปแบบของชุดตรวจสอบได้ผลดีแล้ว การปรับใช้ แอนติบอดีที่ผลิตเองทำการ characterize แล้วสามารถทำการศึกษาวิจัยต่อได้ และปรับปรุง อุปกรณ์ชุดตรวจอีกเล็กน้อยให้เหมาะสมสำหรับใช้งานต่อไป สำหรับ *Campylobacter* นั้น ใน ปัจจุบันยังไม่พบ immunoassay kits จำนวนมากในตลาดโลก ปัจจุบันสามารถสั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะและได้ศึกษาคุณสมบัติดีแล้วมาใช้ในการเตรียมเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปได้ ซึ่งจะ นำมาใช้ในโครงการนี้ ส่วนวิธี PCR นั้นจะใช้เป็นเทคนิคในการตรวจผลเปรียบเทียบกับ immunoassay แทนที่จะใช้วิธีทางจุลชีววิทยา PCR มีข้อได้เปรียบและมักจะศึกษานำมา ประยุกต์ใช้มากกว่าวิธีอื่นๆ โดยมีรายงานต่างๆในวารสารที่หลากหลาย มีข้อดีข้อเสียที่แตกต่าง กันที่ควรศึกษาการนำมาประยุกต์ใช้โดยเฉพาะสำหรับงานที่ต้องการความรวดเร็ว ความถูกต้อง และปริมาณตัวอย่างที่มีในการตรวจสอบมาก และเมื่อได้ใช้ primers และวิธีการที่เหมาะสมแล้ว สามารถนำมาใช้ตรวจสอบได้เอง ตามมาตรฐานการทำ PCR และสามารถปรับเทคนิค PCR ที่ ศึกษาแล้วให้ทันสถานการณ์ข้อกำหนดมาตรฐานในภายหลัง แต่การทำวิธี PCR ยังเป็นเทคนิคที่ ต้องให้ผู้ปฏิบัติที่มีทักษะและฝึกการทำมาในระดับหนึ่งก่อนที่จะทำได้ผลถูกต้องเชื่อถือได้ และต้อง มีเครื่องมือพิเศษที่ใช้เฉพาะเจาะจงสำหรับการตรวจ

Salmonella

Salmonella เป็นเชื้อกรัมลบ รูปทรงแท่ง ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในคน จะก่อให้เกิด มีไข้ ท้องปวดเกร็ง ประมาณ 12-72 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ โรคอาจหายภายใน 4-7 วัน โดยไม่ทำการรักษา แต่บางคนจะเกิดอาการรุนแรงต้องรักษา เชื้อโรคจะแพร่กระจายจากระบบ ทางเดินอาหารและเข้ากระแสโลหิต และอาจเป็นอันตรายถึงชีวิต โดยเฉพาะในเด็กและผู้ที่ย่างกาย ไม่แข็งแรงมีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ แม้จะทำการรักษาและให้ยาปฏิชีวนะที่ในระยะเริ่มติดเชื้อแล้วก็ ตาม ยาที่ใช้รักษามักจะเป็น ampicillin, gentamycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin เป็นต้น ปัจจุบันมีรายงานมากมายถึงการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ ผู้ป่วยมักจะมี อาการทางเดินอาหารเป็นเวลานานกว่าที่หายจากการติดเชื้อและกลับสู่สภาวะปกติ มีคนส่วนน้อย

ที่มีอาการของโรคที่พัฒนาเกิดอาการปวดตามข้อ ระบายเคืองตา และมีอาการปวดเมื่อย ปัสสาวะที่เรียกว่าเป็นอาการของ Reiter's syndrome ซึ่งอาจมีอาการเกิดเป็นเชนนานเป็นเดือน หรือ เป็นปี และอาจมีอาการการอักเสบตามข้อเรื้อรัง ซึ่งมักจะรักษาไม่หาย

เชื้อ *Salmonella* อาศัยอยู่ได้ตามลำไส้ทั้งของมนุษย์และสัตว์ เช่น นก ไก่ เป็นต้น เชื้อจะสามารถติดมายังมนุษย์โดยรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน อาหารที่ปนเปื้อนอาจจะมีกลิ่น ไตผิดปกติ ลักษณะปกติ การปนเปื้อนมักเกิดสาเหตุจากอาหารพวกเนื้อสัตว์ต่างๆ เช่น เนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อไก่ สัตว์ปีกต่างๆ นม ไข่ และพบว่าอาหารต่างๆสามารถเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อได้ อาหารที่ปรุงสุกแล้วเชื้อจะตาย การปนเปื้อนอาจเกิดจากผู้ประกอบอาหารหรือมีหน้าที่ด้านบริการ อาหารที่ล้างมือไม่สะอาดหลังจากเข้าห้องน้ำ หรือจากสัตว์เลี้ยง และเกิดการปนเปื้อนทั้งเชื้อจากตนเอง หรือผู้อื่น การติดเชื้อในสหรัฐอเมริกา มีรายงานการติดเชื้อประมาณ 40,000 ราย/ปี และประมาณ 1,000 ราย จะมีการติดเชื้อที่รุนแรง

เชื้อในกลุ่มของ *Salmonella* จะมีประมาณมากกว่า 2,300 serotypes แต่จะพบบางชนิดที่เป็นสาเหตุสำคัญและมีชื่อมูลทาง antigen (ตารางที่ 4, 5) พบว่า *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium พบเป็นสาเหตุสำคัญเกินครึ่งที่ก่อการติดเชื้อจากสัตว์มายังคนโดยที่ในสัตว์จะไม่มีอาการ การปนเปื้อนจากเนื้อสัตว์ หากได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมเชื้อจะถูกทำลาย แต่พบว่าบางครั้งความร้อนที่ทำการปรุงอาหารไม่เพียงพอที่จะทำให้สุกได้ทั่วก้อนเนื้อ ซึ่งยังคงทำให้ติดเชื้อได้

การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *Salmonella* นี้มีรายงานการศึกษาจำนวนมากเพราะเป็นเชื้อสำคัญที่มีข้อกำหนดไม่ให้มีการปนเปื้อนในอาหาร การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR จะมีรายงานหลายชนิด ซึ่งจะมี primers หลายตัวที่ให้ผลดีได้การตรวจสอบที่ชัดเจนและแม่นยำเพื่อที่จะเป็น candidate ให้คัดเลือกมาทำการวิจัย ขณะนี้ได้ศึกษาข้อมูลและคัดเลือกไว้ประมาณ 3 คู่ ที่ให้ PCR products ที่มีขนาดแตกต่างกัน

สำหรับ immunoassays ที่มีจำหน่ายในบริษัทในประเทศไทย จะตรวจได้เฉพาะ *Salmonella* spp. สำหรับโครงการนี้จะนำเสนอการเตรียม immunoassays ที่สามารถตรวจแยก *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ปศุสัตว์ รวมทั้ง *Salmonella* spp. เพื่อให้เป็นตัวควบคุมผลการทดลอง

ตารางที่ 3 ABBREVIATED ANTIGENIC SCHEMA for SALMONELLA

ORGANISM	SOMATIC (O)		FLAGELLAR (H)	
	ANTIGEN		ANTIGEN	
	Group		Phase 1	Phase 2
<i>S. enteritidis</i>				
bio ser Paratyphi A	A	1, 2, 12	a	-
ser Paratyphi B	B	1, 4, 5, 12	b	1, 2
variant Odense	B	1, 4, 12	b	1, 2
bio ser Java	B	1, 4, 5, 12	b	[1, 2]
ser Stanley	B	4, 5, 12	d	1, 2
ser Schwarzengrund	B	1, 4, 12, 27	d	1, 7
ser Saintpaul	B	1, 4, [5], 12	e, h	1, 2
ser Reading	B	4, 5, 12	e, h	1, 5
ser Chester	B	4, 5, 12	e, h	e, n, x
ser Sandiego	B	4, 5, 12	e, h	e, n, z ₁₅
ser Derby	B	1, 4, 5, 12	f, g	[1, 2]
ser California	B	4, 5, 12	m, t	-
ser Typhimurium	B	1, 4, 5, 12	i	1, 2
variant Copenhagen	B	1, 4, 12	i	1, 2
ser Bredeney	B	1, 4, 12, 27	l, v	1, 7
ser Heidelberg	B	[1], 4, [5], 12	r	1, 2
<i>Salmonella choleraesuis</i>	C ₁	6, 7	c	1, 5
bio ser Kunzendorf	C ₁	6, 7	[c]	1, 5
<i>S. enteritidis</i>				
ser Braenderup	C ₁	6, 7	e, h	e, n, z ₁₅
ser Montevideo	C ₁	6, 7	g, m, s	-
ser Oranienburg	C ₁	6, 7	m, t	-
ser Thompson	C ₁	6, 7, [14]	k	1, 5
ser Infantis	C ₁	6, 7, [14]	r	1, 5
ser Bareilly	C ₁	6, 7, [14]	y	1, 5
ser Tennessee	C ₁	6, 7	z ₂₉	-
ser Muenchen	C ₂	6, 8	d	1, 2
ser Manhattan	C ₂	6, 8	d	1, 5

ABBREVIATED SCHEMA (Continued)

ORGANISM	SOMATIC (O)	FLAGELLAR (H)	
	ANTIGEN	ANTIGEN	
	Group	Phase 1	Phase 2
<i>S. enteritidis</i>			
ser Newport	C ₂ 6, 8	e, h	1, 2
ser Blockley	C ₂ 6, 8	k	1, 5
ser Litchfield	C ₂ 6, 8	l, v	1, 2
ser Tallahassee	C ₂ 6, 8	z ₄ , z ₃₂	-
ser Kentucky	C ₃ (8), 20	i	z ₈
bioser Miami	D ₁ 1, 9, 12	a	1, 5
<i>S. typhi</i>	D ₁ 1, 12, VI	d	
<i>S. enteritidis</i>			
ser Berta	D ₁ 9, 12	f, g, t	-
ser Enteritidis	D ₁ 1, 9, 12	g, m	-
ser Dublin	D ₁ 1, 9, 12	g, p	-
ser Panama	D ₁ 1, 9, 12	l, v	1, 5
ser Javiana	D ₁ 1, 9, 12	l, z ₂₈	1, 5
bioser Pullorum	D ₁ 9, 12	-	-
ser Anatum	E ₁ 3, 10	e, h	1, 6
ser Meleagridis	E ₁ 3, 10	e, h	l, w
ser Give	E ₁ 3, 10	l, v	1, 7
ser Newington	E ₂ 3, 15	e, h	1, 6
ser Illinois	E ₃ (3), (15), 34	z ₁₀	1, 5
ser Senftenberg	E ₄ 1, 3, 19	g, s, t	-
ser Simsbury	E ₄ 1, 3, 19	z ₂₇	-
ser Rubislaw	F 11	[d], r	[d], e, n, x
ser Poona	G ₁ [1], 13, 22, [36]	z	1, 6
ser Worthington	G ₂ 1, 13, 23	z	l, w
ser Cubana	G ₂ 1, 13, 23	z ₂₉	-
ser Florida	H 1, 6, 14, 25	d	1, 7
ser Madelia	H 1, 6, 14, 25	y	1, 7
ser Cerro	K 18	z ₄ , z ₂₃	[z ₄₆]

(Continued)

ORGANISM	SOMATIC (O)		FLAGELLAR (H)	
	ANTIGEN		ANTIGEN	
	Group		Phase 1	Phase 2
<i>S. enteritidis</i>				
ser Siegburg	K	6, 14, 18	<u>z₄</u> , <u>z₂₃</u>	[1, 5]
ser Minnesota	L	21	b	e, n, x
ser Urbana	N	30	b	e, n, x

NOTE : Enclosure of the designation of an antigen in parentheses indicates that the complete antigen is not present, e.g., (8). Enclosure of an antigen designation in brackets indicates that the antigen or antigen complex may be present or absent, e.g., [1], [1, 2], etc.

ตารางที่ 4 Antigenic structure of some common Salmonellae

Group	Species/Serovars	O Antigens ^a	H Antigens	
			Phase 1	Phase 2
A	<i>S. paratyphi</i> A	1, 2, 12	a	(1, 5)
B	<i>S. schottmuelleri</i>	1, 4, (5), 12	b	1, 2
	<i>S. typhimurium</i>	1, 4, (5), 12	i	1, 2
C ₁	<i>S. hirschfeldii</i>	6, 7, (vi)	c	1, 5
	<i>S. choleraesuis</i>	6, 7	(c)	1, 5
	<i>S. oranienburg</i>	6, 7	m, t	-
	<i>S. montevideo</i>	6, 7	g, m, s (p)	(1, 2, 7)
C ₂	<i>S. newport</i>	6, 8	e, h	1, 2
D	<i>S. typhi</i>	9, 12, (Vi)	d	-
	<i>S. enteritidis</i>	1, 9, 12	g, m	(1, 7)
	<i>S. gallinarum</i>	1, 9, 12	-	-
E ₁	<i>S. anatum</i>	3, 10	e, h	1, 6

The underlined antigens are associated with phage conversion. () = May be absent.

Immunoassays

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เป็นปฏิกิริยาแบบปฐมภูมินั้นจะมองเห็นได้ยาก และอาจมีปริมาณน้อยมาก ต้องใช้เทคนิคพิเศษมาช่วยเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบซึ่งอาจเป็นการใช้การติดฉลาก (label) แอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยสารพิเศษ ได้แก่ สารกัมมันตรังสี, สาร fluorescence, สารที่เป็น electrodense หรือพวก enzyme markers ต่างๆ ซึ่งวิธีการเหล่านี้สามารถใช้หาปริมาณได้ด้วย (quantitative) เทคนิคสำคัญที่จะกล่าวถึงคือ

Radioimmunoassay (RIA)

เป็นวิธีที่ไวมากสามารถตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดี ที่มีปริมาณน้อยมากในระดับ 1 นาโนกรัม/มล.หรืออาจถึง พิโคกรัม/มล.ได้ จึงนิยมใช้ในการตรวจหาปริมาณซีรัมโปรตีนบางชนิด ฮอรโมน และยาชนิดต่างๆที่มีปริมาณน้อยมากๆ แบ่งวิธีทดสอบออกเป็น 2 วิธีคือ

1. Liquid phase RIA

มีหลักการคือ ให้แอนติเจนที่ต้องการทราบปริมาณและแอนติเจนชนิดเดียวกันที่ทราบจำนวนและติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (Ag^*) ทำปฏิกิริยาแย่งจับกับแอนติบอดีจำนวนมาตรฐาน ที่ทราบค่าจากนั้นแยก $Ag^* Ab$ complex และ Ag^* อีกระหว่างกัน แล้วนำไปวัดรังสี เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะทราบค่าปริมาณแอนติเจนนั้นได้

2. Solid phase RIA

เป็น RIA อีกแบบหนึ่ง โดยให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเกาะติดกับ supporting medium เช่น polystyrene, microplate, beadแก้ว วิธีการทำนี้มีข้อได้เปรียบคือ วิธีการทำได้ง่ายกว่าวิธี liquid phase หลักการทำของวิธีนี้มีได้หลายวิธีซึ่งอาจเป็น competitive binding และ non-competitive binding ซึ่งมีได้ทั้งแบบ direct และ indirect (sandwich technique)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ปัจจุบันได้ปรับปรุงวิธีการทำ immunoassay โดยพยายามหลีกเลี่ยงสารกัมมันตรังสี ซึ่งการดูแลของปฏิกิริยาอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดระหว่างเอนไซม์บางชนิดกับ substrate ของมัน ตรวจหาปริมาณความเข้มของสีที่เกิดขึ้น โดยใช้ spectrophotometer ซึ่งถ้าวัดความเข้มจากปฏิกิริยาที่ทำใน microtiter plate ก็สามารถใช้ microelisa reader อ่านได้ ซึ่งราคาจะถูกกว่าพวก radioisotope counter

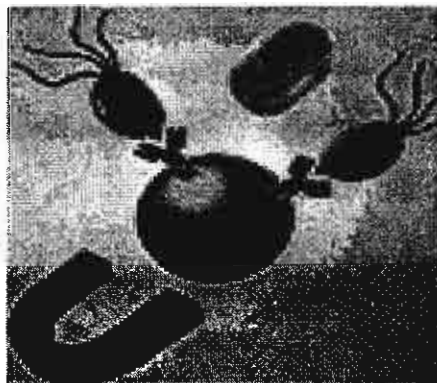
หลักการทำของ ELISA ก็จะมีวิธีการทำ เช่น RIA เพียงแต่การติดฉลากนั้นก็จะใช้เอนไซม์แทนการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี และตามด้วยขั้นตอนการใส่ substrate ผลของปฏิกิริยา ปัจจุบันเอนไซม์ที่ใช้ทดลองมากคือ alkaline phosphatase, β -D-galactosidase, horseradish peroxidase

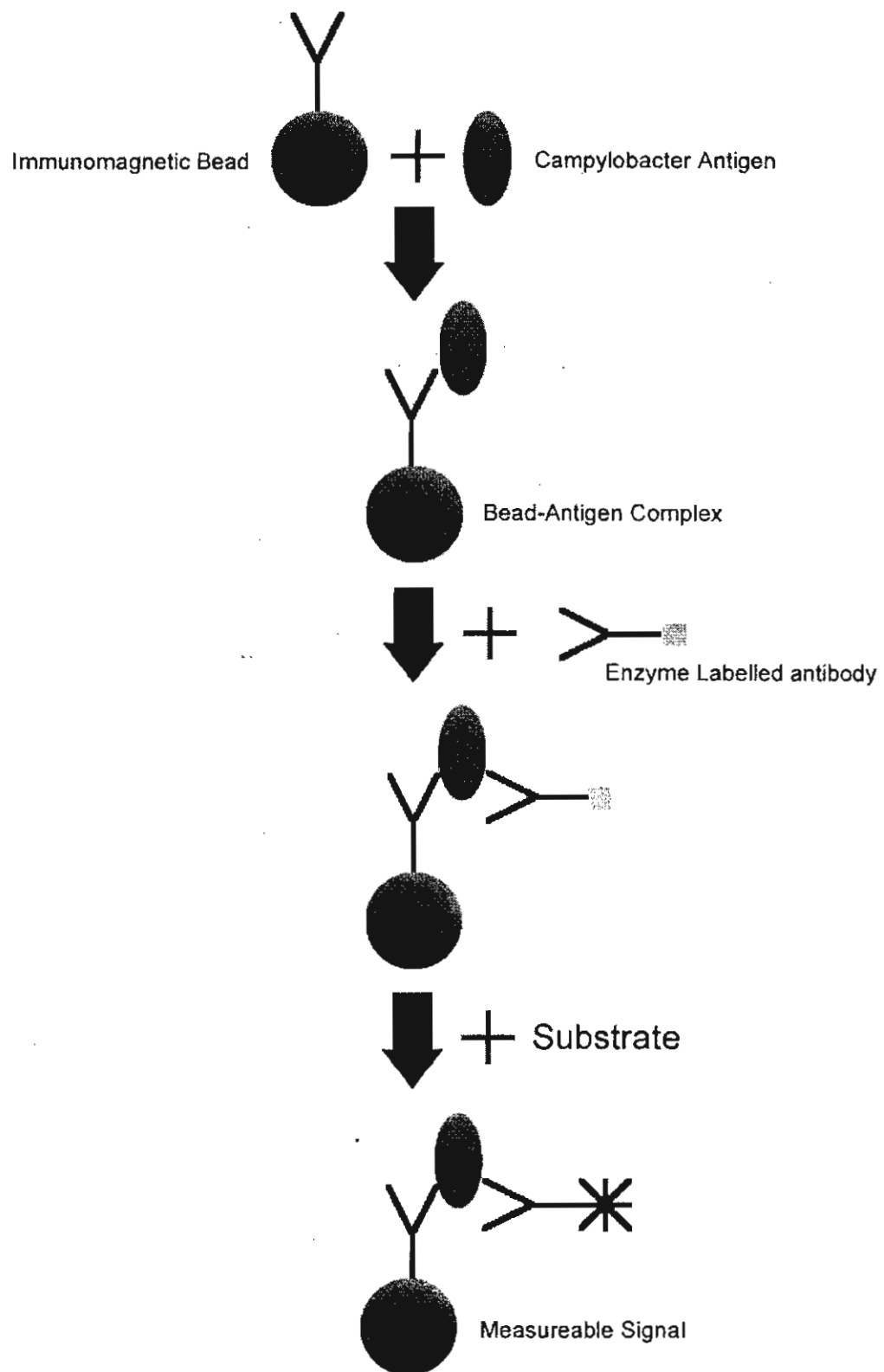
Immunomagnetic beads

Immunomagnetic beads เป็นวิธีที่อาศัยสนามแม่เหล็กในการแยกเชื้อ และสารอื่นๆ ที่ต้องการและใช้ให้ทำปฏิกิริยาทาง immunoassay เพื่อตรวจสอบสารที่แยกมาได้โดย magnetic beads นั้น การใช้ immunomagnetic beads จะให้ผลที่เร็วและมีผลที่เชื่อถือได้ หลักการคือการนำ dispersion ของ magnetic beads ($\delta\text{Fe}_2\text{O}_3$ และ Fe_3O_4) ซึ่งมีขนาดสม่ำเสมอและมีการ coat ไปด้วย thin polymer shell การที่ magnetic bead มีรูปทรงกลมจะป้องกันปฏิกิริยาที่อาจเกิด clumping และปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะกับสารที่รูปร่างไม่สม่ำเสมอ สามารถนำแอนติบอดีหรือสาร ligand อื่นๆที่ต้องการมาเชื่อมกับ beads เพื่อให้จับทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการ การ coat beads กับ ligands สามารถทำได้หลายวิธี

มีขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้

1. การติดเชื่อมกับแอนติบอดี (antibody) ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด เข้ากับ magnetic beads ได้เป็น immunomagnetic beads หลังจากนั้นนำ immunomagnetic beads ไปตรวจหาเชื้อในอาหาร ตัวที่ต้องการที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่เชื่อมไว้กับ beads เมื่อแอนติบอดีจับกับแอนติเจนของเชื้อเกิดเป็น Antigen-Antibody Complex ก็จะใช้สนามแม่เหล็กในการแยก complex ออกจากอาหารที่นำมาตรวจ
2. ใส่แอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากเอนไซม์ (secondary antibody) เข้าไปจับกับ complex
3. ใส่สับสเตรท (substrate) เข้าไป เมื่อสับสเตรท ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี





เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นการสังเคราะห์สาย DNA สายใหม่ จาก DNA ต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ DNA สายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง DNA ติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (*in vitro* mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จากสาย DNA ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลาก DNA และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ DNA ได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียน ต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

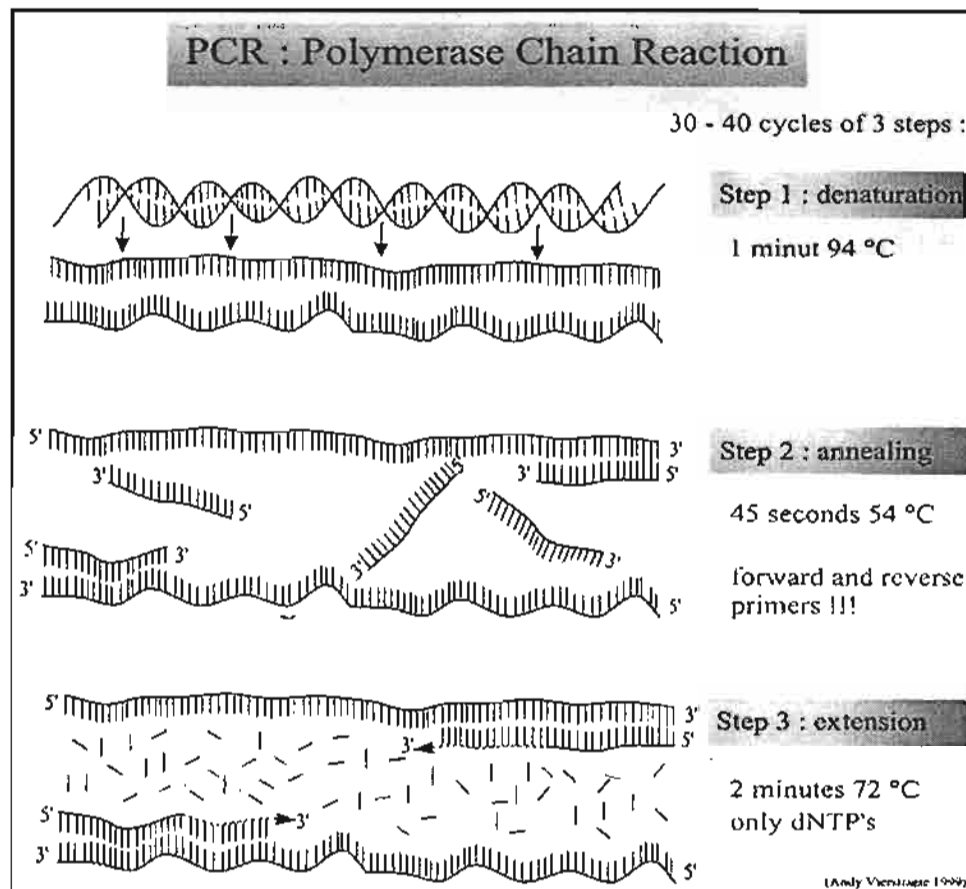
ขั้นแรก เรียกว่า denaturation เป็นการแยกสาย DNA ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°C

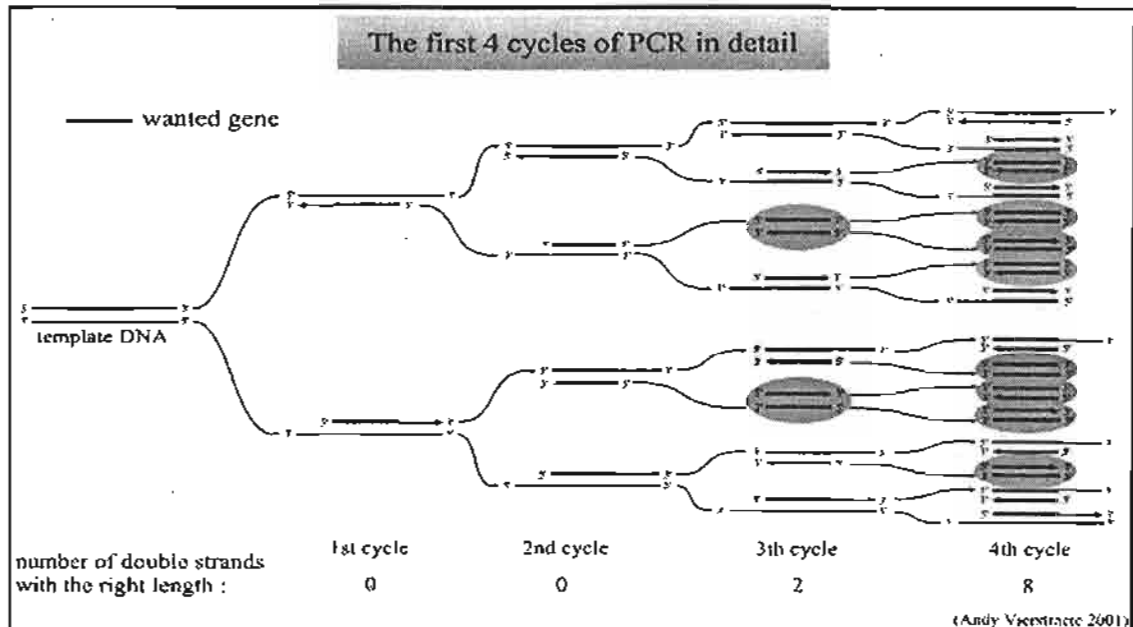
ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็น DNA สายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60°C

ขั้นที่ 3 เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบน DNA ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA โพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75°C เอนไซม์ DNA โพลีเมอร์เรสที่ใช้ควรจะต้อง คุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็น DNA สายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาซ้ำจาก

ขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณ DNA ได้ มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสาร DNA ไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า





การวิเคราะห์ผลผลิต DNA จากปฏิกิริยา PCR

DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหา DNA ผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหา DNA โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel) โดยระยะทางที่ DNA สามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ DNA ที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเคซ ซึ่งจะให้แสงเรืองเมื่อเจอกับแสงอุตราไวโอเลต ซึ่งจะเห็นแถบ DNA เรืองแสงบนแผ่นวุ้น

6. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

6.1 เพื่อพัฒนาและเตรียม immunodiagnostic kit ชนิด immunomagnetic-immunoassay และ ELISA สำหรับตรวจเชื้อ

Campylobacter spp.

C. jejuni

C. coli

6.2 เพื่อพัฒนาและเตรียม immunodiagnostic kit ชนิด immunomagnetic-immunoassay และ ELISA สำหรับตรวจเชื้อ

Salmonella spp.

S. Typhimurium

S. Enteritidis

6.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ immunodiagnostic kits เบื้องต้นโดยการตรวจการปนเปื้อนเชื้อจากตัวอย่างเนื้อไก่ และกุ้ง จากตลาด ประมาณ 20-30 ตัวอย่าง

6.4 เพื่อประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนของเชื้อจากโรงงานไก่ โดยใช้ immunodiagnostic kits ที่พัฒนา

6.5 เพื่อประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนของเชื้อจากโรงงานผลิต feed และฟาร์มกุ้ง โดยใช้ immunodiagnostic kits ที่พัฒนา

6.6 เพื่อจัดทำรูปแบบของ immunodiagnostic kits ที่พัฒนานี้เพื่อนำไปใช้ได้เชิงพาณิชย์

7. ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีดำเนินการแบ่งเป็น 2 ระยะ

ระยะที่ 1 - พัฒนาและเตรียม immunodiagnostic kits

(12 เดือน) - เตรียมการตรวจสอบเชื้อต่างๆ ทางจุลชีววิทยา

- เตรียมการตรวจสอบเชื้อต่างๆ ด้วย PCR

- ตรวจสอบเบื้องต้นจากตัวอย่างเนื้อไก่ 20-30 ตัวอย่าง

ระยะที่ 2 - การประเมินความเสี่ยงการปนเปื้อนของเชื้อในโรงงานไก่

(12 เดือน) - โรงงานผลิต feed และฟาร์มกุ้ง

- ตรวจสอบ stability ของชุดตรวจสำเร็จตามระยะเวลา

- จัดเตรียมรูปแบบชุดตรวจสำเร็จที่สามารถใช้ได้เชิงพาณิชย์

ระยะที่ 1 พัฒนาและเตรียม immunodiagnostic kits

วิธีดำเนินการ

1. การแยกและวินิจฉัยเชื้อโดยวิธี conventional-microbiological method และ PCR ซึ่งได้แยกเชื้อจากเนื้อไก่โดยกรมปศุสัตว์และคณะเภสัชศาสตร์ และอยู่ใน stock คณะเภสัชศาสตร์

1.1 เชื้อกลุ่ม *Campylobacter*

จากงานวิจัยที่เคยได้รับทุนสนับสนุนจาก สกว. (พ.ศ. 2543-2545) สามารถทำการแยก และ วินิจฉัยเชื้อ *C. jejuni*, *C. coli* ได้แล้ว ดังนั้นในงานวิจัยที่นำเสนอนี้จะใช้วิธี multiplex PCR ที่ศึกษาไว้เป็นวิธีพื้นฐานที่จะใช้ตรวจในขั้นตอนต่างๆ เพื่อลดภาระงาน และ มุ่งดำเนินงานพัฒนา immunodiagnostic kit ที่เป็นหลักการใหญ่ของงานวิจัยนี้ สำหรับวิธีพื้นฐานทางจุลชีววิทยานั้นจะให้ เป็นวิธีตรวจสอบที่หากมีปัญหาและต้องการยืนยันผลบางขั้นตอน

1.2 เชื้อกลุ่ม *Salmonella*

เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีผู้วิจัยต่างๆสนใจศึกษากันมาก เพราะเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดความรุนแรงและมีหลาย serovar ที่ก่อให้เกิดปัญหาสำคัญ การแยกทางวิธีจุลชีววิทยาค่อนข้างมีปัญหาที่จะตัดสินผลการทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่มีผลไม่ชัดเจนโดยเฉพาะหากเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไป การใช้ PCR มีรายงานมากมาย ขณะนี้ได้ทดลองศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ primers หลายคู่เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเชื้อ ในงานวิจัยในช่วงต้นจะศึกษา candidate primers ต่างๆที่มีรายงานคัดเลือกมาใช้ โดยส่วนหนึ่งจะทำในรูปของ multiplex PCR เพื่อแยกเชื้อ *Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* และจะใช้ PCR เป็นวิธีพื้นฐาน และ วิธีทางจุลชีววิทยาให้เป็นวิธียืนยันผลบางขั้นตอนเช่นเดียวกับเชื้อ *Campylobacter* โดยเชื้อที่ใช้เป็นเชื้อที่แยกได้จากกรมปศุสัตว์จากเนื้อไก่

2. การเตรียม immunodiagnostic kits ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาการทำให้อยู่ใน 2 แบบ คือ

- Immunomagnetic-immunoassay ในรูป beads
- ELISA ชนิด แบ่งเป็น strip

ขณะนี้ได้ศึกษาชนิดของแอนติบอดี ที่จะนำมาใช้ และวิธีการเชื่อมแอนติบอดีไว้ที่ beads และ solid phase ของ strip โดยจะใช้แอนติบอดีที่มีอยู่ที่มีข้อมูลผ่านทาง internet (โดยการส่งผ่านทางบริษัท) แอนติบอดีแต่ละตัวจะมีความจำเพาะกับเชื้อแต่ละ strain ที่ใช้ ซึ่งขณะนี้ข้อมูลของแอนติบอดีที่พร้อมจะดำเนินการได้ ขณะนี้จากการทำ

preliminary study ของเชื้อ *C. jejuni* การทดลองได้ผลดี แต่ต้องมีชุดสำเร็จของบริษัท เปรียบเทียบ และตรวจความคงตัว (stability) ของชุดสำเร็จทุกชนิดที่เตรียมขึ้นโดยศึกษา

- Sensitivity กับเชื้อในกลุ่มที่ต้องการตรวจ ในระดับปริมาณใดที่จะตรวจพบ
- Specificity กับเชื้อกลุ่มที่ต้องการให้ผลบวก แต่ให้ผลลบกับเชื้อชนิดอื่น
- Stability ที่ 0, 3, 6, 9 เดือน
- Consistency ที่ 0, 3, 6, 9 เดือน
- Cost effectiveness เปรียบเทียบราคาเตรียมใน lot เล็ก, กลาง, ใหญ่ และ อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบในการใช้โดยเปรียบเทียบกับ diagnostic kits ที่มีอยู่ในท้องตลาดในรูปแบบที่มีอยู่ (บางชนิดยังไม่มีในรูปของ immunomagnetic beads หรือแม้แต่ ELISA)
- ตรวจตัวอย่างจากไก่ ที่เก็บจากท้องตลาด ประมาณ 20-30 ตัวอย่าง

ระยะที่ 2 ประเมินความเสี่ยงการปนเปื้อนของเชื้อในโรงงานไก่ โรงงาน Feed และ ฟาร์มกัก

1. ทำการเก็บตัวอย่างในโรงงานไก่ที่ได้ขอความร่วมมือ คือ บริษัท A จำกัด (มหาชน) โดยตัวอย่างจะเก็บจากจุดต่างๆ ที่ได้ประเมินกับผู้ร่วมวิจัยปรับให้เหมาะสมกับสภาพโรงงานที่ไปเก็บตัวอย่าง จุดละ 2 ตัวอย่าง คือ
น้ำจากจุดล้างซาก ที่ 1
น้ำจากจุดล้างซาก ที่ 2
หลังล้างแล้ว ส่วน อก
หลังล้างแล้วส่วน ขา
Finished product
2. ทำการเก็บตัวอย่างใน feed และ น้ำจากฟาร์มกัก
ได้รับความร่วมมือจาก ฟาร์มกักในจังหวัดจันทบุรี โดยตัวอย่างจะเก็บจาก
 - Feed
 - น้ำบ่อเลี้ยงกักที่ใช้เลี้ยงในเวลาต่างๆ คือ
 - ที่บ่อเลี้ยง 10 วัน โดยเก็บ 3 ตัวอย่าง
 - ที่บ่อเลี้ยง 30 วัน โดยเก็บ 3 ตัวอย่าง
 - ที่บ่อเลี้ยง 50 วัน โดยเก็บ 3 ตัวอย่างโดยจะเก็บทั้งหมด 3 ชุด เป็นเวลาประมาณ 4-6 เดือน โดยแต่ละชุดจะแจ้งผลให้โรงงานทราบเพื่อการปรับปรุง หรือ หากดีแล้วก็จะ เป็นข้อมูลของโรงงาน

3. ตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บจะนำมาประเมินโดยใช้ immunodiagnostic kits ที่เตรียมขึ้น
เปรียบเทียบกับ m-PCR และบางส่วนจะทำ Microbiology Method
4. สรุปประเมินผล และเขียนรายงาน
5. จัดทำรูปแบบ model ของ immunodiagnostic kits

8. แผนการดำเนินงาน

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมร่วมเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์	ผู้รับผิดชอบ
1. พัฒนาและเตรียม immunodiagnostic kit สำหรับตรวจเชื้อ <i>Campylobacter</i> spp. <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>	ทดสอบวิธีการตรวจเชื้อด้วย - Microbiology method - M-PCR - Immunoassay	• เตรียมการทดสอบและแยกเชื้อโดยวิธี conventional microbiology method • เตรียมการทดสอบและแยกเชื้อโดยวิธี m-PCR • เตรียมทำ immunoassay kit วิธี - immunomagnetic-immunoassay beads - และ ELISA • ตรวจตัวอย่างจากไก่ กุ้ง ที่เก็บจากท้องตลาด ประมาณ 20-30 ตัวอย่าง ระยะเวลาเก็บตัวอย่าง 3 เดือน และประเมินผลการตรวจสอบที่ได้ • ทดสอบ sensitivity, specificity, stability, consistency ของ kit ที่เตรียมตามระยะเวลา 0,3,6,9 เดือน	ปริมณีนัย ศศิธร สุปราณี
2. พัฒนาและเตรียม immunodiagnostic kit สำหรับตรวจเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Enteritidis</i>	เช่นเดียวกับข้อ 1	เช่นเดียวกับข้อ 1	ปริมณีนัย ศศิธร สุปราณี
3. ประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนของเชื้อจากโรงงานไก่โดยใช้ immunodiagnostic kit ที่พัฒนา	เก็บตัวอย่างในโรงงานไก่ที่ได้รับความร่วมมือ โดยจะเก็บทั้งหมด เป็นเวลาประมาณ 4-6 เดือน	• กำหนดการเก็บตัวอย่างจากจุดต่างๆ ในโรงงานไก่จุดคือ - น้ำจากจุดล้างซาก 1 - น้ำจากจุดล้างซาก 2 - บนราวแล่ ส่วนที่ 1 - บนราวแล่ ส่วนที่ 2 - Finished product • ตรวจตัวอย่างที่เก็บโดยวิธี PCR และ immunoassay ที่เตรียมขึ้น • ประเมินค่าที่ได้เป็นระยะๆ (ช่วง 4-6 เดือน) หากมีการปนเปื้อน ดูการ	ปริมณีนัย วัลลา

		เปลี่ยนแปลงผลของตัวอย่างภายหลังการแจ้งผลแต่ละครั้ง สรุปผลจากโรงงานไก่	
4. ประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนของเชื้อจากโรงงานผลิต feed และฟาร์มกึ่ง โดยใช้ immunodiagnostic kit ที่พัฒนา	เก็บตัวอย่างในโรงงานกึ่งที่ได้รับความร่วมมือ โดยจะเก็บทั้งหมด เป็นเวลาประมาณ 4-6 เดือน	- กำหนดการเก็บตัวอย่างจากจุดต่างๆ ในโรงงานจุดละ 3 ตัวอย่าง คือ - Feed - น้ำบ่อเลี้ยงกึ่งที่ใช้เลี้ยงในเวลาต่างๆ คือ - ที่บ่อเลี้ยง 10 วัน โดยเก็บ 3 ตัวอย่าง - ที่บ่อเลี้ยง 30 วัน โดยเก็บ 3 ตัวอย่าง - ที่บ่อเลี้ยง 50 วัน โดยเก็บ 3 ตัวอย่าง - ตรวจตัวอย่างที่เก็บโดยวิธี m-PCR และ immunoassay ที่เตรียมขึ้น - ประเมินค่าที่ได้เป็นระยะๆ(4-6 เดือน) หากมีการปนเปื้อน ดูการเปลี่ยนแปลงผลของตัวอย่างภายหลังการแจ้งผลแต่ละครั้ง - สรุปผลจากโรงงานผลิต Feed และฟาร์มกึ่ง	ปริมณีนัย วัลลา
5. สรุปผลการเตรียม immunodiagnostic kits และเขียนรายงาน	ตรวจ immunoassay kits ที่เตรียม และเก็บไว้ตามระยะเวลาต่างๆ เป็นเวลาทั้งหมด 9 เดือน (0,3,6,9 เดือน)	- ตรวจ immunodiagnostic kit ชนิดต่างๆ โดยตรวจคุณสมบัติต่างๆ - sensitivity - specificity - consistency - stability (0,3,6,9 เดือน) - cost effectiveness - สรุปผลและทำรายงานการวิจัย	ปริมณีนัย ศศิธร วัลลา สุปราณี
6. จัดทำรูปแบบชุดอุปกรณ์ตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูป	ประชุมกลุ่มผู้วิจัยและออกแบบรูปแบบชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปที่จะนำไปใช้ได้	- ออกแบบรูปแบบชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปที่เหมาะสม - ติดต่อประสานงานกับ สกว. ในการนำผลจากการวิจัยไปสู่การใช้ในเชิงพาณิชย์ - ติดต่อประสานงานกับกรมปศุสัตว์ในการนำไปใช้ - ติดต่อประสานงานกับโรงงานผลิตไก่และกึ่งในการนำไปใช้	ปริมณีนัย ศศิธร วัลลา สุปราณี

Campylobacter

Immunodiagnostic kits

Stability tests

- MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION (m-PCR)
- ENZYME-LINKED IMMUNOSORBANT ASSAY (ELISA)
- IMMUNOMAGNETIC SEPARATION-ENZYME-LINKED IMMUNOSORBANT ASSAY (IMS-ELISA)
- Sample detection

9. ผลการทดลองและวิจารณ์

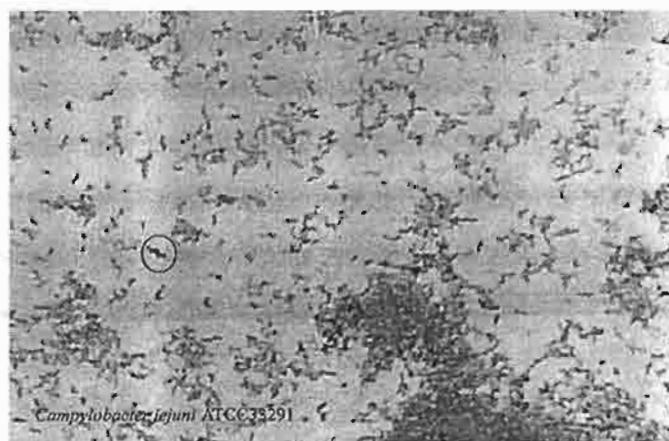
9.1 *Campylobacter*

9.1.1 *Campylobacter* :Conventional Microbiology-Methods

แยกเชื้อ reference strains และ stock เชื้อที่เก็บไว้ ทำการทดสอบต่างๆโดยวิธีการทาง microbiological methods และตรวจปฏิกิริยาทาง biochemical tests



รูปที่ 1 ลักษณะของโคโลนีของ *C. jejuni* ATCC 33291 บน Karmali agar สีเทาแบนมีลักษณะค่อนข้างเยิ้มภายหลังการบ่มที่ 48 ชม



รูปที่ 2 ลักษณะของ *C. jejuni* ATCC 33291 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ภายหลังการทำการย้อมกรัม ซึ่งจะมีลักษณะเป็นกรัมลบ โค้ง curved, เป็นเกลียว (spiral), gull wing หรือ S-shaped (กำลังขยาย x 200)

ตารางที่ 5 ผลของโครงสร้าง (morphology) และการทดสอบทางชีวเคมีของ *Campylobacter* reference strains

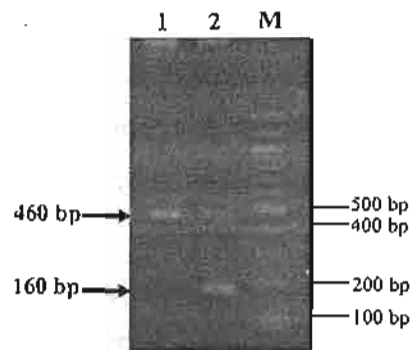
Characteristics	<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	<i>C. jejuni</i> DVL31	<i>C. coli</i> DVL30
Morphology	Small curved bacilli	Small curved bacilli	Small curved bacilli
Gram's stain	Negative	Negative	Negative
Oxidase	+	+	+
Glucose fermentation	-	-	-
Growth at 42°C	+	+	+
H ₂ S production (TSI)	-	-	+
Hippurate hydrolysis	+	+	-
Indoxyl acetate hydrolysis	+	+	+

Notes: + = positive result, - = negative result

จากผลของการทดสอบทาง biochemical tests พบว่า reference strains ของ *C. jejuni* สามารถแสดงความแตกต่างระหว่าง *C. coli* ได้ โดย *C. jejuni* แสดงผลลบในปฏิกิริยาการสร้าง H₂S production บน TSI agar slant และให้ผลบวกใน hippurate hydrolysis test ในการทดลองจะทำ confirmation test โดยใช้ agglutination test

9.1.2 *Campylobacter* : Multiplex PCR Analysis

ได้ศึกษาการทำ multiplex PCR และสามารถแยกผลการตรวจแยกชนิดของเชื้อต่างๆ ในกลุ่ม *Campylobacter* และ *Salmonella* ได้ สำหรับ *Campylobacter* primer C1 และ C4 และ pg3 และ pg50 (*flaA* gene) ผลที่ได้ PCR product จาก reference strains บน agarose gel electrophoresis โดย *C. jejuni* amplification จะได้เป็น dual bands ที่ 460 bp และ 160 bp ในขณะที่ *Campylobacter* spp. และ *C. coli* จะได้เป็น single band ที่ 460 bp

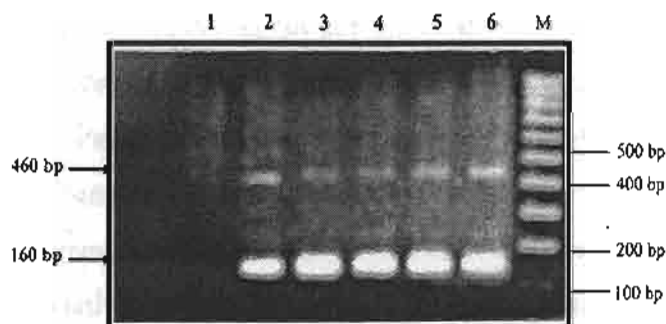


รูปที่ 3 แสดงผลความจำเพาะ (specificity) ของ duplex primers ต่อ strains of *C. jejuni* และ

C. coli Lane 1 : *C. coli* DVL30 Lane 2 : *C. jejuni* ATCC 33291
Lane M : 100 bp standard ladder

Campylobacter : Sensitivity of duplex PCR กับ *C. jejuni* pure culture

การทำ PCR โดยใช้ duplex primers คือ C-1, C-4 and pg3, pg50 primers โดยใช้ serial dilutions ของ boiled lysates ของ *C. jejuni* ATCC 33291 พบว่าสามารถตรวจ *C. jejuni* ATCC 33291 ได้ที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ 10^2 cfu/ml (10 cfu/PCR reaction)



รูปที่ 4 แสดงความไว (sensitivity) ของ duplex PCR โดยการทำการตรวจสอบเชื้อ *C. jejuni* ATCC 33291 ที่ความเข้มข้น 10^{-10^6} cfu/ml ทำการตรวจผลโดยการทำ agarose gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel.

Lane 1 : 10^7 cfu/ml of *C. jejuni*

Lane 4 : 10^4 cfu/ml of *C. jejuni*

Lane 2 : 10^6 cfu/ml of *C. jejuni*

Lane 5 : 10^5 cfu/ml of *C. jejuni*

Lane 3 : 10^3 cfu/ml of *C. jejuni*

Lane 6 : 10^6 cfu/ml of *C. jejuni*

Lane M: 100 bp standard ladder

ผลการทดลองและการวิจารณ์

หลังจากได้ทดลองแยกเชื้อได้แล้วโดยวิธี conventional method จึงได้ทดลองนำเชื้อมาเพิ่มจำนวน และสกัด DNA ด้วยวิธีการต่างๆ (ภาคผนวก) ปรากฏว่าเทคนิคของ Harmon *et al.* สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบได้สะดวกและให้ผลดีที่สุด กับ primer C-1 และ C-4 และ pg3

และ pg50 โดย *Campylobacter jejuni* จะได้ PCR product ที่ 460 และ 160 bp ขณะที่ *Campylobacter coli* จะได้ PCR product ที่ 160 bp จากการทดลอง DNA ของเชื้อที่แยกมา และที่ PCR condition ต่างๆ สามารถตรวจ PCR band ได้ตามรายงาน มีความไวในการตรวจที่ 10^2 cfu/ml (10 cfu/PCR reaction)

9.1.3 *Campylobacter* : Immunoassays

ในวัตถุประสงค์ในการวิจัย (หน้า 20) เสนอการวิจัย

(a) IMMUNOMAGNETIC SEPARATION-ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (IMS-ELISA)

(b) ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

(c) Samples detection

ขั้นตอนการเตรียม IMS-ELISA, ELISA, และการนำประยุกต์ใช้ในการตรวจตัวอย่าง แสดงไว้ใน Appendix สำหรับผลการตรวจสอบทั้งหมดทั้ง specificity, sensitivity และ stability ที่เก็บที่ 0, 3, 6 และ 9 เดือน ได้รายงานสรุปผลไว้ในตารางทั้งหมด และการตรวจตัวอย่างสามารถ นำมาประยุกต์ใช้ได้ทั้งหมดตามที่ได้นำเสนอไว้ในวัตถุประสงค์ในการวิจัย โดยได้สรุปผลไว้ใน ตารางเช่นกัน โดยสรุปวิธี IMS-ELISA และ ELISA จะวัดค่าของปฏิกิริยาที่ 450 nm โดยมีผลแสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจเชื้อ *Campylobacter* spp. และ *C. jejuni* ได้ที่ระดับความไวต่ำสุด 10^5 และ 10^6 cfu/ml ตามลำดับ และชุดตรวจสอบมีความคงตัวอย่างน้อย 9 เดือน (หรือมากกว่า) ซึ่งได้ศึกษา เก็บไว้ในระหว่างการวิจัย

การทดลอง immunoassay kit ของ *C. coli* เนื่องจากไม่มีแอนติบอดีที่ผลิตในเชิงการค้าทั้งในประเทศและต่างประเทศ จึงยังไม่สามารถผลิต test kit ที่จำเพาะได้ ในงานวิจัยได้พยายามนำแอนติบอดีหลายชนิดมาใช้ในการทดสอบ ก็ยังไม่ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ แม้ว่าจะพยายามทำการ absorb แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Campylobacter* spp. ด้วย *C. jejuni* antigens เพื่อให้เป็น monospecific antibody จำเพาะกับ *C. coli* และ *Campylobacter* ตัวอื่นๆ ก็ยังไม่ได้ผล จึงคิดว่าอาจเตรียมไม่ได้ในงานวิจัยนี้ แต่อย่างไรก็ตามขณะนี้ได้เตรียม IMS-ELISA ที่จำเพาะต่อ *Campylobacter* spp. ได้ผลแล้ว จึงคิดว่าน่าจะครอบคลุมการตรวจ *C. coli* ได้เช่นกันหากเป็น strain ที่เป็น *C. coli* ที่แท้จริง นอกจากนี้ PCR ที่ได้พัฒนาการตรวจเชื้อด้วย primers ต่างๆ ในงานวิจัยนี้ ก็สามารถตรวจให้ผลที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. coli* แยกได้ต่างจาก *C. jejuni* อย่างชัดเจน จึงคิดว่า immunodisgnostic kits สำหรับ *C. coli* โดยเฉพาะจะไม่สามารถเตรียมได้ ซึ่งของต่างประเทศขณะนี้ก็ยังไม่ผลิตเช่นกันทั้งของ *C. jejuni* (ในอนาคตคาดว่าจะมีการผลิตออกมาได้) และไม่มีจำเพาะต่อ *C. coli* สำหรับโครงการวิจัยนี้สามารถเตรียมได้ที่จำเพาะต่อ *C. jejuni* ได้นำปัญหาข้อวิจัยนี้ส่งเอกสารเสนอต่อ สกว. แล้ว และได้รับการอนุมัติในหลักการแล้ว

ตารางที่ 6 Results of the specificity of the developed ELISA test kit for detection of *Campylobacter* spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml and applied to each well at 100 μ l without enrichment before testing. Negative control and blank were *E. coli* and non-inoculated media respectively

A _{450nm}																	
Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	Raw data				Average (minus blank)				Result			Standard deviation				
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.549	0.615	0.414	0.164	0.000	0.000	0.000	0.000	.	.	.	.	0.077	0.087	0.092	0.036
		0.567	0.446	0.262	0.103												
		0.425	0.496	0.429	0.100												
E. coli	10 ⁸	0.367	0.519	0.377	0.121	-0.074	0.037	0.042	0.016	.	.	.	.	0.117	0.032	0.029	0.027
		0.575	0.579	0.430	0.124												
		0.377	0.569	0.423	0.169												
C. coli	10 ⁸	0.918	1.506	1.646	0.956	0.400	0.827	1.230	0.852	+	++	++	++	0.050	0.225	0.153	0.050
		0.862	1.089	1.426	1.031												
		0.961	1.442	1.721	0.936												
C. jejuni	10 ⁸	1.023	1.898	1.948	1.332	0.601	1.042	1.506	1.351	++	+++	+++	+++	0.174	0.488	0.193	0.192
		1.006	1.001	2.020	1.691												
		1.316	1.783	1.655	1.395												

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 7 Results of the specificity of the developed ELISA test kit for detection of *C. jejuni*. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months.

Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml and applied to each well at 100 μ l without enrichment before testing. Negative control and blank were *C. coli* and *E. coli* and non-inoculated media respectively

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A_{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.331 0.260 0.259	0.416 0.603 0.525	0.331 0.328 0.308	0.083 0.074 0.081	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000	-	-	-	0.005
<i>E. coli</i>	10^8	0.402 0.356 0.345	0.564 0.393 0.510	0.359 0.241 0.359	0.062 0.078 0.057	0.085 -0.026 -0.002	-0.013	-	-	0.030	0.087	0.068	0.011
<i>C. coli</i>	10^8	0.344 0.307 0.258	0.437 0.469 0.576	0.417 0.362 0.308	0.138 0.244 0.154	0.020 -0.021 0.040	0.100	-	-	0.043	0.073	0.055	0.057
<i>C. jejuni</i>	10^8	1.141 0.983 0.891	2.141 1.173 1.493	2.584 2.486 2.146	1.419 1.501 1.593	0.722 1.087 2.083	1.425	+++	+++	0.126	0.493	0.230	0.087

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $\geq A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 8 Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of *Campylobacter* spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *C. jejuni* and *C. coli* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each well at 100 µl without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
<i>C. jejuni</i>	Blank	0.425 0.549 0.567	0.615 0.446 0.496	0.414 0.262 0.429	0.164 0.103 0.100	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	-	-	-	0.077 0.193 0.036	0.036
	10 ⁸	1.023 1.006 1.316	1.898 1.001 1.783	1.948 2.020 1.655	1.332 1.691 1.395	0.601 1.042 1.506	1.042 1.506 1.351	1.351 1.389 1.389	++	++	++	0.174 0.488 0.192	0.192
	10 ⁷	0.974 0.833	0.866 1.364	1.407 1.464	1.618 1.404	0.390 0.596	0.596 1.068	1.068 0.765	+/-	+	++	0.100 0.352 0.128	0.151
	10 ⁶	0.708 0.557 0.681	0.642 0.801 0.673	1.034 0.860 0.784	0.845 0.974 0.842	0.135 0.186	0.186 0.525	0.525 0.765	-	-	+	0.081 0.084 0.242	0.075
	10 ⁵	0.583 0.655 0.727	0.631 0.618 0.663	1.120 1.008 0.656	0.709 0.811 0.748	0.141 0.118	0.118 0.560	0.560 0.634	-	-	+	0.072 0.023 0.028	0.051
	10 ⁴	0.658 0.490 0.576	0.647 0.664 0.696	0.766 0.732 0.711	0.530 0.517 0.497	0.061 0.150	0.150 0.368	0.368 0.393	-	-	+/-	0.084 0.025 0.069	0.017
	10 ³	0.450 0.410	0.551 0.570	0.472 0.374	0.225 0.239	-0.084 0.042	0.042 0.055	0.055 0.110	-	-	-	0.028 0.013 0.004	0.010
	10 ²	0.607 0.517	0.566 0.588	0.507 0.501	0.130 0.134	0.048 0.058	0.058 0.136	0.136 0.010	-	-	-	0.064 0.016 0.076	0.003
	10 ¹	0.524 0.521	0.537 0.545	0.376 0.483	0.165 0.192	0.008 0.008	0.022 0.062	0.062 0.057	-	-	-	0.002 0.006 0.047	0.019
	10 ⁰	0.515 0.544	0.584 0.513	0.364 0.431	0.179 0.131	0.016 0.030	0.030 0.030	0.030 0.033	-	-	-	0.021 0.050 0.092	0.034

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ ๑ Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of *Campylobacter* spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *C. jejuni* and *C. coli* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each well at 100 µl without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank. (continued)

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.425 0.549 0.567 0.961 0.862 0.918 0.791 0.768	0.615 0.446 0.496 1.506 1.089 1.442 0.827 1.053	0.414 0.262 0.429 1.646 1.426 1.721 1.255 1.207	0.164 0.103 0.100 0.956 1.031 0.936 1.198 0.937	0.000 0.000 0.000 0.000 0.400 0.827 0.266 0.421	0.000 0.000 0.000 0.000 0.400 0.827 0.266 0.421	0.000 0.000 0.000 0.000 0.400 0.827 0.266 0.421	0.000 0.000 0.000 0.000 0.400 0.827 0.266 0.421	-	-	-	-
	10 ⁸	0.817 0.589 0.701	0.764 0.757 0.647	0.876 0.747 0.767	0.910 0.967 0.827	0.852 0.863 0.779	0.852 0.863 0.779	0.852 0.863 0.779	0.852 0.863 0.779	+	+++	+++	+++
	10 ⁷	0.403 0.560 0.638	0.687 0.648 0.587	0.351 0.470 0.531	0.772 0.707 0.652	0.946 0.429 0.588	0.946 0.429 0.588	0.946 0.429 0.588	0.946 0.429 0.588	-	+	+	+
	10 ⁶	0.570 0.527 0.679	0.589 0.593 0.611	0.485 0.345 0.454	0.452 0.352 0.289	0.242 0.060 0.242	0.242 0.060 0.242	0.242 0.060 0.242	0.242 0.060 0.242	-	-	-	-
	10 ⁵	0.412 0.419	0.593 0.603	0.333 0.356	0.188 0.189	0.067 -0.024	0.067 -0.024	0.067 -0.024	0.067 -0.024	-	-	-	-
	10 ⁴	0.585 0.707	0.543 0.618	0.282 0.361	0.148 0.182	0.043 -0.047	0.043 -0.047	0.043 -0.047	0.043 -0.047	-	-	-	-
	10 ³	0.558 0.623	0.583 0.628	0.592 0.542	0.238 0.158	0.076 0.199	0.076 0.199	0.076 0.199	0.076 0.199	-	-	-	-
	10 ²	0.383 0.545	0.502 0.705	0.482 0.456	0.1910 0.160	0.054 0.101	0.054 0.101	0.054 0.101	0.054 0.101	-	-	-	-
	10 ¹												
	10 ⁰												
<i>C. coli</i>													

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 10 Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of *C. jejuni* after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *C. jejuni* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each well at 100 µl without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
<i>C. jejuni</i>	Blank	0.331 0.260 0.259	0.416 0.603 0.525	0.331 0.328 0.308	0.083 0.074 0.081	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	-	-	-	-
	10 ⁸	1.141 0.983 0.891	2.141 1.173 1.493	2.584 2.486 2.146	1.419 1.501 1.593	0.722 0.722 0.722	1.087 1.087 1.087	2.083 2.083 2.083	1.425 1.425 1.425	++	+++	+++	+++
	10 ⁷	0.592 0.646	1.057 1.052	1.073 0.873	1.033 1.175	0.336 0.336	0.540 0.540	0.651 0.651	1.025 1.025	+/-	++	++	+++
	10 ⁶	0.678 0.561 0.616	0.861 0.807 0.886	0.848 0.526 0.652	0.620 0.683 0.716	0.335 0.335	0.336 0.336	0.353 0.353	0.594 0.594	+/-	+/-	+/-	++
	10 ⁵	0.551 0.643 0.553	0.718 0.626 0.760	0.776 0.511 0.483	0.456 0.424 0.452	0.299 0.299	0.186 0.186	0.268 0.268	0.365 0.365	-	-	-	+/-
	10 ⁴	0.343 0.322 0.310	0.780 0.729 0.707	0.337 0.273 0.345	0.286 0.295 0.290	0.042 0.042	0.224 0.224	-0.004 -0.004	0.211 0.211	-	-	-	-
	10 ³	0.354 0.335	0.709 0.799	0.234 0.345	0.092 0.098	0.062 0.062	0.239 0.239	-0.033 -0.033	0.016 0.016	-	-	-	-
	10 ²	0.194 0.267	0.664 0.695	0.345 0.335	0.105 0.074	-0.053 -0.053	0.165 0.165	0.018 0.018	0.011 0.011	-	-	-	-
	10 ¹	0.350 0.207	0.632 0.588	0.236 0.352	0.087 0.099	-0.005 -0.005	0.095 0.095	-0.028 -0.028	0.014 0.014	-	-	-	-
	10 ⁰	0.230 0.258	0.642 0.553	0.250 0.324	0.092 0.083	-0.039 -0.039	0.083 0.083	-0.035 -0.035	0.008 0.008	-	-	-	-

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 11 Results of the specificity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *Campylobacter* spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml and applied to each well at 100 μ l without enrichment before testing. Negative control and blank were *E. coli* and non-inoculated media respectively

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.275 0.233 0.173	0.166 0.247 0.238	0.086 0.155 0.050	0.251 0.199 0.217	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	10^8	0.323 0.312 0.364	0.337 0.411 0.324	0.081 0.046 0.065	0.269 0.264 0.226	0.106	0.140	-0.033	0.031	-	-	-	-
<i>C. coli</i>	10^8	1.441 1.616 1.091	1.571 1.481 1.362	1.435 2.012 0.779	1.025 0.932 0.991	1.156	1.254	1.312	0.761	++	++	++	++
<i>C. jejuni</i>	10^8	1.572 1.469 1.840	1.963 1.777 1.694	1.501 1.056 1.448	1.157 1.155 1.002	1.400	1.594	1.238	0.883	+++	+++	0.243	0.089
												0.138	0.047
												0.053	0.026
												0.044	0.024
												0.267	0.047
												0.105	0.047
												0.617	0.047
												0.138	0.089

ตารางที่ 12 Results of the specificity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *C. jejuni*. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml and applied to each well at 100 μ l without enrichment before testing. Negative control and blank were *C. coli* and *E. coli* and non-inoculated media respectively

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.180 0.161 0.188	0.249 0.324 0.286	0.067 0.055 0.068	0.201 0.234 0.203	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	.	.	.	.
<i>E. coli</i>	10^8	0.198 0.130 0.368	0.372 0.320 0.265	0.161 0.131 0.180	0.256 0.252 0.258	0.056 0.033 0.042	0.056 0.033 0.042	0.094 0.094 0.094	0.094 0.094 0.094	.	.	.	.
<i>C. coli</i>	10^8	0.377 0.208 0.209	0.375 0.372 0.337	0.100 0.147 0.117	0.253 0.222 0.292	0.089 0.075 0.043	0.089 0.075 0.043	0.058 0.058 0.058	0.058 0.058 0.058	.	.	.	.
<i>C. jejuni</i>	10^8	1.500 1.480 1.437	2.162 2.020 2.062	1.081 1.043 0.967	1.148 1.165 1.056	1.296 1.795 0.910	1.296 1.795 0.910	0.967 0.967 0.967	0.910 0.910 0.910	+++	+++	+++	+++

Notes: negative result (-) $\leq$ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 13 Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *Campylobacter* spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *C. jejuni* and *C. coli* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each well at 100 µl without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.275 0.233 0.173	0.166 0.247 0.238	0.086 0.155 0.050	0.251 0.199 0.217	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
	10 ⁸	1.572 1.469 1.840	1.963 1.777 1.694	1.501 1.056 1.448	1.657 1.455 1.602	1.400	1.594	1.238	1.349	+++	+++	+++	+++
	10 ⁷	1.248 1.257	1.284 1.218	1.447 0.976	1.072 1.057	1.026	1.034	1.115	0.843	+++	+++	+++	+++
	10 ⁶	1.200 1.434 1.286	1.221 1.313 0.867	0.740 0.442 0.442	0.685 0.780 1.002	1.080	0.917	0.444	0.600	+++	+++	+	++
	10 ⁵	0.946 0.871 0.838	0.961 0.863 0.992	0.535 0.227 0.380	1.004 0.809 1.041	0.658	0.722	0.284	0.729	++	++	-	++
	10 ⁴	0.630 0.606 0.585	0.383 0.545 0.526	0.363 0.245 0.284	0.433 0.483 0.590	0.380	0.268	0.200	0.280	+/-	-	-	-
	10 ³	0.372 0.272	0.475 0.358	0.210 0.081	0.336 0.331	0.095	0.200	0.049	0.112	-	-	-	-
	10 ²	0.359 0.433	0.332 0.338	0.128 0.202	0.348 0.322	0.169	0.118	0.068	0.113	-	-	-	-
	10 ¹	0.225 0.318	0.567 0.365	0.193 0.198	0.253 0.288	0.045	0.249	0.099	0.049	-	-	-	-
	10 ⁰	0.282 0.265	0.288 0.237	0.201 0.135	0.299 0.233	0.047	0.046	0.071	0.044	-	-	-	-
						Standard deviation							

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 14 Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *Campylobacter* spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *C. jejuni* and *C. coli* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each well at 100 µl without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank. (continued)

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
<i>C. coli</i>	Blank	0.275 0.233 0.173	0.166 0.247 0.238	0.086 0.155 0.050	0.199 0.251 0.217	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	- - -	- - -	0.051 0.044 0.044	0.026 0.617 0.026
	10 ⁸	1.441 1.616 1.091	1.571 1.481 1.362	1.435 2.012 0.779	1.525 1.332 1.491	1.156 1.254 1.312	0.953 0.993 0.689	1.227 1.312 0.868	0.000 0.000 0.000	+++ +++ +++	+++ +++ +++	0.267 0.105 0.303	0.103 0.103 0.103
	10 ⁷	1.303 1.057 0.850	1.432 0.988 1.173	1.000 0.571 0.532	1.034 1.146 0.647	0.953 0.993 0.689	0.953 0.993 0.689	0.868 0.868 0.868	0.000 0.000 0.000	+++ +++ +++	+++ +++ +++	0.174 0.314 0.137	0.079 0.079 0.079
	10 ⁶	0.819 0.745 0.461	0.757 0.874 0.469	0.659 0.386 0.277	0.922 0.827 0.682	0.578 0.718 0.429	0.578 0.718 0.429	0.577 0.577 0.577	0.000 0.000 0.000	++ ++ ++	++ ++ ++	0.054 0.215 0.066	0.140 0.140 0.140
	10 ⁵	0.556 0.469 0.437	0.424 0.510 0.496	0.223 0.145 0.387	0.645 0.664 0.591	0.268 0.251 0.176	0.268 0.251 0.176	0.442 0.442 0.442	0.000 0.000 0.000	- - -	- - -	0.053 0.043 0.067	0.019 0.019 0.019
	10 ⁴	0.399 0.375 0.339	0.337 0.345 0.700	0.304 0.254 0.169	0.598 0.517 0.453	0.177 0.176 0.179	0.177 0.176 0.179	0.347 0.347 0.347	0.000 0.000 0.000	- - -	- - -	0.031 0.090 0.055	0.045 0.045 0.045
	10 ³	0.473 0.405 0.219	0.622 0.545 0.559	0.250 0.158 0.112	0.385 0.334 0.404	0.444 0.335 0.085	0.444 0.335 0.085	0.197 0.197 0.197	0.000 0.000 0.000	+	+	0.095 0.055 0.033	0.048 0.048 0.048
	10 ²	0.337 0.280 0.281	0.585 0.564 0.436	0.079 0.111 0.131	0.373 0.322 0.2150	0.085 0.082 0.055	0.085 0.082 0.055	0.147 0.147 0.147	0.000 0.000 0.000	-	-	0.132 0.010 0.010	0.049 0.049 0.049
	10 ¹	0.337 0.280 0.281	0.585 0.564 0.436	0.079 0.111 0.131	0.373 0.322 0.2150	0.085 0.082 0.055	0.085 0.082 0.055	0.147 0.147 0.147	0.000 0.000 0.000	-	-	0.132 0.010 0.010	0.049 0.049 0.049
	10 ⁰	0.282 0.282 0.282	0.354 0.354 0.354	0.054 0.054 0.054	0.319 0.319 0.319	0.055 0.055 0.055	0.055 0.055 0.055	0.045 0.045 0.045	0.000 0.000 0.000	-	-	0.001 0.058 0.053	0.074 0.074 0.074

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 15 Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *C. jejuni* after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *C. jejuni* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each well at 100 µl without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
<i>C. jejuni</i>	Blank	0.180 0.161 0.188	0.249 0.324 0.286	0.067 0.055 0.068	0.201 0.234 0.203	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	- - -	- - -	0.014 0.058 0.038	0.019 0.059 0.076
	10 ⁸	1.500 1.480 1.437	2.162 2.020 2.062	1.081 1.043 0.967	1.148 1.165 1.056	1.296 1.795 0.967	1.795 0.941 0.509	0.967 0.650 0.640	0.910 0.650 0.640	+++ +++ ++	+++ +++ ++	0.032 0.073 0.083	0.059 0.064 0.110
	10 ⁷	1.109 1.112	1.216 1.237	0.589 0.554	0.809 0.917	0.935 0.773	0.941 0.726	0.509 0.457	0.650 0.640	++ ++	++ ++	0.002 0.069	0.076 0.064
	10 ⁶	1.008 0.966 0.874	1.213 0.851 0.971	0.444 0.609 0.506	0.898 0.881 0.779	0.773 0.688	0.726 0.811	0.457 0.277	0.640 0.458	++ ++	++ ++	0.184 0.030	0.064 0.110
	10 ⁵	0.902 0.951 0.738	1.305 0.928 1.059	0.344 0.308 0.367	0.784 0.564 0.664	0.688 0.245	0.811 0.405	0.277 0.156	0.458 0.365	+++ +	+++ +	0.112 0.041	0.027 0.156
	10 ⁴	0.462 0.422 0.380	0.613 0.649 0.733	0.190 0.222 0.244	0.512 0.756 0.467	0.245 0.187	0.405 0.263	0.156 0.101	0.365 0.020	- -	+	0.041 0.036	0.156 0.036
	10 ³	0.388 0.337	0.608 0.489	0.178 0.150	0.258 0.207	0.187 0.206	0.263 0.376	0.101 0.050	0.020 0.039	- +	- +	0.036 0.023	0.036 0.057
	10 ²	0.271 0.492	0.649 0.674	0.097 0.129	0.292 0.211	0.206 0.171	0.376 0.171	0.050 0.019	0.039 0.030	+	+	0.018 0.013	0.023 0.030
	10 ¹	0.294 0.399	0.448 0.466	0.066 0.098	0.264 0.221	0.171 0.106	0.171 0.117	0.019 0.016	0.030 0.052	- -	- -	0.074 0.037	0.030 0.014
	10 ⁰	0.255 0.308	0.356 0.450	0.073 0.085	0.275 0.255	0.106 0.117	0.117 0.117	0.016 0.016	0.052 0.052	- -	- -	0.037 0.007	0.014 0.014

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 16 Detection the contamination of *Campylobacter* in Chicken sample

Date	Sample No.	Raw datas			Minus blank			Results			
		IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
3/3/2548	Sample 1	0.495	0.687	0.187	0.322	0.390	0.080	+ / -	+ / -	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.524	0.747	0.169	0.351	0.450	0.062	+ / -	+	-?	460, 160 bp
	Sample 2	0.307	0.457	0.200	0.134	0.160	0.093	-	-	-	-
	Sample 2 (inoc)	0.423	0.421	0.189	0.250	0.124	0.082	-?	-?	-?	-?
	<i>C. jejuni</i>	0.958	1.915	3.020	0.785	1.618	2.913	++	+++	+++	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	1.262	1.579	2.455	1.089	1.282	2.348	+++	+++	+++	460 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.401	0.325	0.169	0.228	0.028	0.062	-	-	-	-
	blank	0.173	0.297	0.107	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
7/3/2548	Sample 1	1.218	0.956	1.574	0.686	0.439	1.467	++	+	+++	-
	Sample 1 (inoc)	1.107	0.866	1.641	0.575	0.349	1.534	++	+ / -	+++	460, 160 bp
	<i>C. jejuni</i>	1.972	0.934	3.020	1.440	0.417	2.913	+++	+	+++	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	1.502	0.681	2.455	0.970	0.164	2.348	+++	-	+++	460 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.920	0.287	0.169	0.388	-0.230	0.062	+ / -	-	-	-
	blank	0.532	0.517	0.107	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
9/3/2548	Sample 1	1.043	1.043	0.187	-0.366	0.353	0.080	-	+ / -	-	-
	Sample 1 (inoc)	2.536	2.424	0.134	1.127	1.734	0.027	+++	+++	-?	-?
	<i>C. jejuni</i>	2.427	2.511	3.020	1.018	1.821	2.913	+++	+++	+++	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	2.217	2.542	2.455	0.808	1.852	2.348	+++	+++	+++	460 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	1.331	0.738	0.169	-0.078	0.048	0.062	-	-	-	-
	blank	1.409	0.690	0.107	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
14/3/2548	Sample 1	0.220	0.068	0.434	0.000	0.026	0.327	-	-	+/-	-
	Sample 1 (inoc)	0.328	0.296	1.008	0.108	0.254	0.901	-?	-?	+++	-?
	<i>C. jejuni</i>	0.560	0.366	3.020	0.340	0.324	2.913	+ / -	+ / -	+++	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	0.376	0.203	2.455	0.156	0.161	2.348	-	-	+++	460 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.444	0.045	0.169	0.224	0.003	0.062	-	-	-	-
	blank	0.220	0.042	0.107	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

10/5/2548	Sample 1	0.254	0.898	0.489	-0.179	0.540	0.382	-	+	+	-
	Sample 1 (inoc)	0.289	0.596	0.170	-0.144	0.238	0.063	-?	-?	-?	-?
	Sample 2	0.290	0.668	0.230	-0.143	0.310	0.123	-	+/-	-	-
	Sample 3	0.239	0.657	0.215	0.412	0.448	0.108	+	+	-	-
	<i>C. jejuni</i>	0.845	0.806	3.020	0.217	0.455	2.913	+/-	+	+++	460, 160 bp
	<i>C. coli</i> ATCC	0.650	0.813	2.455	0.020	-0.012	2.348	-	-	+++	460 bp
	<i>E. coli</i>	0.453	0.346	0.169	0.412	0.448	0.062	+	+	-	-
	blank	0.433	0.358	0.107	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

16/5/2548	Sample 1	0.683	0.698	0.225	0.460	0.487	0.118	+	+	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.368	0.377	1.224	0.145	0.166	1.117	-?	-?	+++	-?
	Sample 2	0.265	0.268	0.203	0.042	0.057	0.096	-	-	-	-
	Sample 3	0.335	0.399	0.207	0.112	0.188	0.100	-	-	-	-
	<i>C. jejuni</i>	0.918	0.843	3.020	0.695	0.632	2.913	++	++	+++	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	1.030	0.723	2.455	0.807	0.512	2.348	+++	++	+++	460 bp
	<i>E. coli</i>	0.203	0.212	0.169	-0.020	0.001	0.062	-	-	-	-
	blank	0.223	0.211	0.107	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

26/5/2548	Sample 1	0.260	0.729	0.198	-0.058	0.524	0.091	-	++	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.361	0.821	0.497	0.043	0.616	0.390	-?	++	+	460, 160 bp
	Sample 2	0.482	0.544	0.194	0.164	0.339	0.087	-	+/-	-	-
	Sample 3	0.480	0.532	0.185	0.162	0.327	0.078	-	+/-	-	-
	<i>C. jejuni</i>	1.394	1.362	3.020	1.076	1.157	2.913	+++	+++	+++	460, 160 bp
	<i>C. coli</i> ATCC	0.813	0.968	2.455	0.495	0.763	2.348	+	++	+++	460 bp
	<i>E. coli</i>	0.297	0.292	0.169	-0.021	0.087	0.062	-	-	-	-
	blank	0.318	0.205	0.107	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

26/5/2548	Sample 1	0.354	0.406	0.212	0.084	-0.021	0.105	-	-	-	-
	Sample 2	1.072	0.900	0.363	0.802	0.473	0.256	+++	+	-	-
	Sample 3	0.880	0.912	0.175	0.610	0.485	0.068	++	+	-	-
	Sample 4	0.321	0.646	0.188	0.051	0.219	0.081	-	-	-	-
	Sample 5	0.479	0.585	0.221	0.209	0.158	0.114	-	-	-	-
	Sample 6	0.563	0.796	0.219	0.293	0.369	0.112	-	+/-	-	-
	<i>C. jejuni</i>	1.439	1.038	3.020	1.169	0.611	2.913	+++	++	+++	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	1.133	0.894	2.455	0.863	0.467	2.348	+++	+	+++	460 bp
	<i>E. coli</i>	0.230	0.283	0.169	-0.040	-0.144	0.062	-	-	-	-
	blank	0.270	0.427	0.107	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ตารางที่ 17 Detection the contamination of *C. jejuni* in Chicken sample

Date	Sample No.	Raw data		Minus blank		Results		
		IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
3/3/2548	Sample 1	0.312	0.192	0.185	0.090	-	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.309	0.198	0.182	0.096	-?	-?	-?
	Sample 2	0.175	0.104	0.048	0.002	-	-	-
	Sample 2 (inoc)	0.329	0.136	0.202	0.034	-?	-?	-?
	<i>C. jejuni</i>	1.382	0.214	1.255	0.112	+++	--	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	0.868	0.102	0.741	0.000	++	-	460 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.409	0.085	0.282	-0.017	-	-	-
	blank	0.127	0.102	0.000	0.000	-	-	-

7/3/2548	Sample 1	1.045	0.202	0.243	-0.239	-	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.557	0.205	-0.245	-0.236	-?	-?	-?
	<i>C. jejuni</i>	0.787	0.218	-0.015	-0.223	-	-	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	0.684	0.173	-0.118	-0.268	-	-	460 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.559	0.165	-0.243	-0.276	-	-	-
	blank	0.802	0.441	0.000	0.000	-	-	-

9/3/2548	Sample 1	0.987	0.618	0.417	-0.031	+	-	-
	Sample 1 (inoc)	1.083	0.807	0.513	0.158	++	-?	+
	<i>C. jejuni</i>	1.085	0.674	0.515	0.025	++	-	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	1.386	0.659	0.816	0.010	+++	-	460 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.718	0.622	0.148	-0.027	-	-	-
	blank	0.570	0.649	0.000	0.000	-	-	-

14/3/2548	Sample 1	0.148	0.044	-0.147	0.004	-	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.137	0.042	-0.158	0.002	-	-	-
	<i>C. jejuni</i>	0.322	0.120	0.027	0.080	-	-	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	0.261	0.050	-0.034	0.010	-	-	460 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.199	0.039	-0.096	-0.001	-	-	-
	blank	0.295	0.040	0.000	0.000	-	-	-

10/5/2548	Sample 1	0.096	0.317	-0.082	0.094	-	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.070	0.291	-0.108	0.068	-?	-?	-?
	Sample 2	0.153	0.263	-0.025	0.040	-	-	-
	Sample 3	0.087	0.281	-0.091	0.058	-	-	-
	<i>C. jejuni</i>	0.657	0.814	0.479	0.591	+	++	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	0.258	0.339	0.080	0.116	-	-	460 bp
	<i>E. coli</i>	0.275	0.227	0.097	0.004	-	-	
	blank	0.178	0.223	0.000	0.000	-	-	-

16/5/2548	Sample 1	0.434	0.552	0.230	0.351	-	+ / -	-
	Sample 1 (inoc)	0.152	0.198	-0.052	-0.003	-	-	-
	Sample 2	0.076	0.164	-0.128	-0.037	-	-	-
	Sample 3	0.162	0.187	-0.042	-0.014	-	-	-
	<i>C. jejuni</i>	0.511	0.675	0.307	0.474	+ / -	+	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	0.207	0.293	0.003	0.092	-	-	460 bp
	<i>E. coli</i>	0.229	0.170	0.025	-0.031	-	-	-
	blank	0.204	0.201	0.000	0.000	-	-	-

26/4/2548	Sample 1	0.081	0.210	-0.060	-0.013	-	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.062	0.218	-0.079	-0.005	-	-	-
	Sample 2	0.108	0.234	-0.033	0.011	-	-	-
	Sample 3	0.069	0.197	-0.072	-0.026	-	-	-
	<i>C. jejuni</i>	0.721	0.879	0.580	0.656	++	++	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	0.107	0.332	-0.034	0.109	-	-	460 bp
	<i>E. coli</i>	0.103	0.210	-0.038	-0.013	-	-	-
	blank	0.141	0.223	0.000	0.000	-	-	-

26/5/2548	Sample 1	0.104	0.462	0.008	0.110	-	-	-
	Sample 2	0.166	0.463	0.070	0.111	-	-	-
	Sample 3	0.097	0.243	0.001	-0.109	-	-	-
	Sample 4	0.084	0.434	-0.012	0.082	-	-	-
	Sample 5	0.081	0.213	-0.015	-0.139	-	-	-
	Sample 6	0.065	0.338	-0.031	-0.014	-	-	-
	<i>C. jejuni</i>	0.735	0.788	0.639	0.436	++	+	460, 160 bp
	<i>C. coli</i>	0.173	0.359	0.077	0.007	-	-	460 bp
	<i>E. coli</i>	0.209	0.209	0.113	-0.143	-	-	-
	blank	0.096	0.352	0.000	0.000	-	-	-

ตารางที่ 18 Detection the contamination of *Campylobacter* in Chicken samples (from industrial company A)

ครั้งที่ 1

samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
น้ำจากชุดล้างซาก 1	0.467	0.670	0.144	0.145	0.124	0.037	-	-	-	-
น้ำจากชุดล้างซาก 2	0.293	0.782	0.137	-0.029	0.236	0.030	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.376	0.848	0.120	0.054	0.302	0.013	-	+/-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.357	0.766	0.117	0.035	0.220	0.010	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.237	0.565	0.128	-0.085	0.019	0.021	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.168	0.550	0.137	-0.154	0.004	0.030	-	-	-	-
Finished product 1	0.504	0.870	0.127	0.182	0.324	0.020	-	+/-	-	-
Finished product 2	0.191	0.878	0.126	-0.131	0.332	0.019	-	+/-	-	-
<i>C. jejuni</i>	1.745	1.283	3.020	1.423	0.737	2.913	+++	++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	1.849	1.223	2.455	1.527	0.677	2.348	+++	++	+++	160 bp
<i>E. coli</i>	0.407	0.063	0.169	0.085	-0.483	0.062	-	-	-	-
Blank	0.322	0.546	0.107	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ครั้งที่ 2

Samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
น้ำจากชุดล้างซาก 1	0.261	0.194	0.083	0.125	-0.006	0.041	-	-	-	-
น้ำจากชุดล้างซาก 2	0.287	0.215	0.086	0.151	0.015	0.044	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.159	0.325	0.112	0.023	0.125	0.070	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.185	0.294	0.086	0.049	0.094	0.044	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.200	0.334	0.094	0.064	0.134	0.052	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.198	0.372	0.110	0.062	0.172	0.068	-	-	-	-
Finished product 1	0.226	0.194	0.108	0.090	-0.006	0.066	-	-	-	-
Finished product 2	0.190	0.252	0.113	0.054	0.052	0.071	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	1.742	3.154	0.890	1.606	2.954	0.848	+++	+++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	0.971	2.002	0.901	0.835	1.802	0.859	+++	+++	+++	160 bp
<i>E. coli</i>	0.168	0.189	0.050	0.032	-0.011	0.008	-	-	-	-
Blank	0.136	0.200	0.042	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ครั้งที่ 3

Samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
น้ำจากจุดล้างซาก 1	0.195	0.240	0.037	0.040	-0.041	-0.001	-	-	-	-
น้ำจากจุดล้างซาก 2	0.148	0.278	0.036	-0.007	-0.003	-0.002	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.555	0.558	0.264	0.400	0.277	0.226	+/-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.351	0.323	0.120	0.196	0.042	0.082	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.326	0.344	0.065	0.171	0.063	0.027	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.496	0.547	0.198	0.341	0.266	0.160	-	-	-	-
Finished product 1	0.257	0.271	0.094	0.102	-0.010	0.056	-	-	-	-
Finished product 2	0.231	0.257	0.037	0.076	-0.024	-0.001	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	0.930	1.991	1.899	0.775	1.710	1.861	++	+++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	1.106	1.187	2.147	0.951	0.906	2.109	+++	+++	+++	160 bp
<i>E. coli</i>	0.164	0.351	0.107	0.009	0.070	0.069	-	-	-	-
Blank	0.155	0.281	0.038	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ตารางที่ 19 Detection the contamination of *C. jejuni* in Chicken samples (from industrial company A)

ครั้งที่ 1

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
น้ำจากจุดล้างซาก 1	0.502	0.215	0.169	0.039	-	-	-
น้ำจากจุดล้างซาก 2	0.519	0.188	0.186	0.012	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	1.005	0.781	0.672	0.605	++	++	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.597	0.625	0.264	0.449	-	+	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.486	0.162	0.153	-0.014	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.524	0.165	0.191	-0.011	-	-	-
Finished product 1	0.260	0.554	-0.073	0.378	-	+ / -	-
Finished product 2	0.436	0.624	0.103	0.448	-	+	-
<i>C. jejuni</i>	1.325	0.985	0.992	0.809	+++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	0.578	0.318	0.245	0.142	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.423	0.180	0.090	0.004	-	-	-
Blank	0.333	0.176	0.000	0.000	-	-	-

ครั้งที่ 2

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
น้ำจากจุดล้างซาก 1	0.053	0.185	-0.048	-0.123	-	-	-
น้ำจากจุดล้างซาก 2	0.058	0.186	-0.043	-0.122	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.088	0.283	-0.013	-0.025	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.094	0.261	-0.007	-0.047	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.054	0.130	-0.047	-0.178	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.110	0.227	0.009	-0.081	-	-	-
Finished product 1	0.085	0.183	-0.016	-0.125	-	-	-
Finished product 2	0.099	0.192	-0.002	-0.116	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	1.477	3.124	1.376	2.816	+++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	0.115	0.222	0.014	-0.086	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.102	0.191	0.001	-0.117	-	-	-
Blank	0.101	0.308	0.000	0.000	-	-	-

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
น้ำจากจุดล้างซาก 1	0.227	0.290	0.116	-0.038	-	-	-
น้ำจากจุดล้างซาก 2	0.103	0.324	-0.008	-0.004	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.213	0.336	0.102	0.008	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.304	0.320	0.193	-0.008	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.314	0.345	0.203	0.017	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.220	0.321	0.109	-0.007	-	-	-
Finished product 1	0.325	0.289	0.214	-0.039	-	-	-
Finished product 2	0.221	0.377	0.110	0.049	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	0.908	1.744	0.797	1.416	++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	0.337	0.338	0.226	0.010	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.198	0.372	0.087	0.044	-	-	-
Blank	0.111	0.328	0.000	0.000	-	-	-

ตารางที่ 20 Detection the contamination of *Campylobacter* in samples (Shrimp farm)

ครั้งที่ 1

Samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
เดือนที่ 1	0.124	0.601	0.152	-0.032	0.182	0.045	-	-	-	-
เดือนที่ 1	0.146	0.640	0.154	-0.010	0.221	0.047	-	-	-	-
เดือนที่ 2	0.132	0.321	0.193	-0.024	-0.098	0.086	-	-	-	-
เดือนที่ 2	0.143	0.794	0.205	-0.013	0.375	0.098	-	-	-	-
เดือนที่ 3	0.11	0.329	0.164	-0.046	-0.090	0.057	-	-	-	-
เดือนที่ 3	0.129	0.692	0.167	-0.027	0.273	0.060	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	1.499	1.308	3.020	1.343	0.889	2.913	+++	+++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	1.017	1.229	2.455	0.861	0.810	2.348	+++	+++	+++	160 bp
<i>E. coli</i>	0.141	0.215	0.169	-0.015	-0.204	0.062	-	-	-	-
Blank	0.156	0.419	0.107	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ครั้งที่ 2

Samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
เดือนที่ 1	0.145	0.396	0.199	-0.009	0.169	0.157	-	-	-	-
เดือนที่ 1	0.200	0.619	0.080	0.064	0.419	0.038	-	+	-	-
เดือนที่ 2	0.181	0.204	0.112	0.045	0.004	0.070	-	-	-	-
เดือนที่ 2	0.217	0.350	0.16	0.081	0.150	0.118	-	-	-	-
เดือนที่ 3	0.147	0.188	0.095	0.011	-0.012	0.053	-	-	-	-
เดือนที่ 3	0.142	0.201	0.13	0.006	0.001	0.088	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	1.742	3.154	0.890	1.606	2.954	0.848	+++	+++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	0.971	2.002	0.901	0.835	1.802	0.859	+++	+++	+++	160 bp
<i>E. coli</i>	0.168	0.189	0.050	0.032	-0.011	0.008	-	-	-	-
Blank	0.136	0.200	0.042	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

Samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
เคียนที่ 1	0.297	0.551	0.251	-0.090	-0.057	0.191	-	-	-	-
เคียนที่ 1	0.222	0.530	0.243	-0.165	-0.078	0.183	-	-	-	-
เคียนที่ 2	0.193	0.443	0.118	-0.194	-0.165	0.058	-	-	-	-
เคียนที่ 2	0.198	0.486	0.149	-0.189	-0.122	0.089	-	-	-	-
เคียนที่ 3	0.347	0.565	0.078	-0.040	-0.043	0.018	-	-	-	-
เคียนที่ 3	0.255	0.393	0.121	-0.132	-0.215	0.061	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	1.809	2.196	1.716	1.422	1.588	1.656	+++	+++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	1.062	1.440	1.601	0.675	0.832	1.541	++	+++	+++	160 bp
<i>E. coli</i>	0.334	0.534	0.078	-0.053	-0.074	0.018	-	-	-	-
Blank	0.387	0.608	0.060	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ตารางที่ 21 Detection the contamination of *C. jejuni* in samples (Shrimp farm)

ครั้งที่ 1

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
เดือนที่ 1	0.120	0.375	0.006	0.132	-	-	-
เดือนที่ 1	0.116	0.570	0.002	0.327	-	+ / -	-
เดือนที่ 2	0.132	0.363	0.018	0.120	-	-	-
เดือนที่ 2	0.116	0.440	0.002	0.197	-	-	-
เดือนที่ 3	0.108	0.313	-0.006	0.070	-	-	-
เดือนที่ 3	0.089	0.476	-0.025	0.233	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	1.449	1.781	1.335	1.538	+++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	0.307	0.456	0.193	0.213	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.146	0.284	0.032	0.041	-	-	-
Blank	0.114	0.243	0.000	0.000	-	-	-

ครั้งที่ 2

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
เดือนที่ 1	0.056	0.359	-0.045	0.051	-	-	-
เดือนที่ 1	0.118	0.438	0.017	0.130	-	-	-
เดือนที่ 2	0.060	0.330	-0.041	0.022	-	-	-
เดือนที่ 2	0.055	0.274	-0.046	-0.034	-	-	-
เดือนที่ 3	0.068	0.219	-0.033	-0.089	-	-	-
เดือนที่ 3	0.066	0.254	-0.035	-0.054	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	1.477	3.124	1.376	2.816	+++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	0.115	0.222	0.014	-0.086	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.102	0.191	0.001	-0.117	-	-	-
Blank	0.101	0.308	0.000	0.000	-	-	-

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
เคียนที 1	0.187	0.814	-0.033	0.507	-	++	-
เคียนที 1	0.344	0.539	0.124	0.232	-	-	-
เคียนที 2	0.191	0.420	-0.029	0.113	-	-	-
เคียนที 2	0.240	0.541	0.020	0.234	-	-	-
เคียนที 3	0.162	0.392	-0.058	0.085	-	-	-
เคียนที 3	0.380	0.495	0.160	0.188	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	1.166	2.096	0.946	1.789	+++	+++	460, 160 bp
<i>C. coli</i>	0.225	0.803	0.005	0.496	-	+	-
<i>E. coli</i>	0.228	0.399	0.008	0.092	-	-	-
Blank	0.220	0.307	0.000	0.000	-	-	-

Salmonella

Immunodiagnostic kits

Stability tests

- MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION (m-PCR)
- ENZYME-LINKED IMMUNOSORBANT ASSAY (ELISA)
- IMMUNOMAGNETIC SEPARATION-ENZYME-LINKED IMMUNOSORBANT ASSAY (IMS-ELISA)
- Sample detection

9.2 *Salmonella*

9.2.1 Conventional Microbiology-Methods

แยกเชื้อ reference strains และ stock เชื้อที่เก็บไว้ ทำการทดสอบต่างๆโดยวิธีการทาง microbiological methods และตรวจปฏิกิริยาทาง biochemical tests

ตารางที่ 22 Biochemical reaction of *Salmonella*

Tests	S. Typhimurium	S. Enteritidis	S. Typhi	S. Weltevreden	S. Blockley	E.coli
Indole production	-	-	-	-	-	+
Methyl red	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-
Citrate (Simmons)	+	+	+	+	+	-
TSI						
Hydrogen sulfide	+	+	+	+	+	-
Gas from Glucose	+	+	-	+	+	-
Urea hydrolysis	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	-	+	+	-
Ornithine decarboxylase	+	+	-	+	+	+
Sugar fermentation						
Lactose	-	-	-	-	-	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+
Dextrose	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	-	+	+	+
Arabinose	+	+	-	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+

ซึ่งจากการทดลองที่ได้ศึกษานี้ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, และ *S. Typhi* จำเป็นต้องใช้ การแยกโดย serotype ด้วยการทำปฏิกิริยาด้วย แอนติบอดี และ PCR (ที่ได้พัฒนาในการทดลองนี้)

9.2.2 *Salmonella* : Multiplex PCR Analysis

ได้ศึกษาการทำ PCR จาก primers หลายชนิดและได้ผลที่ดีที่สุด在这个时候ที่สามารถนำไปทำ multiplex PCR (3 คู่) เพื่อใช้แยก *Salmonella* ชนิดต่างๆ หลังจากปรับ condition ให้เหมาะสมที่สุด ได้ผลดังนี้

S. Typhimurium ได้ PCR products ที่ 620 และ 526 bp

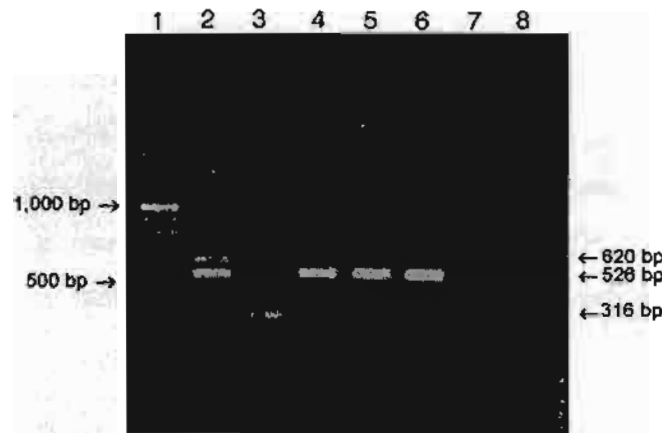
S. Enteritidis ได้ PCR products ที่ 526 และ 316 bp

Salmonella spp. ได้ PCR products ที่ 526 bp

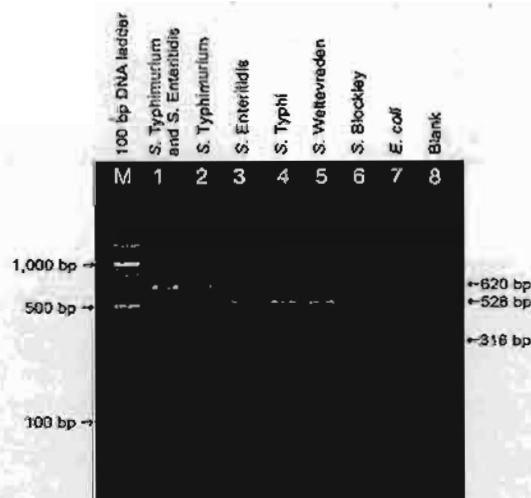
Salmonella : Specificity of multiplex PCR

ตารางที่ 23 Summary of PCR Specificity

No.	DNA Sample	Product size (bp)		
		620	526	316
1	100 pb DNA ladder			
2	<i>S. Typhimurium</i>	+	+	-
3	<i>S. Enteritidis</i>	-	+	+
4	<i>S. Typhi</i>	-	+	-
5	<i>S. Weltevreden</i>	-	+	-
6	<i>S. Blockley</i>	-	+	-
7	<i>E. coli</i>	-	-	-
8	Blank (NFW)	-	-	-



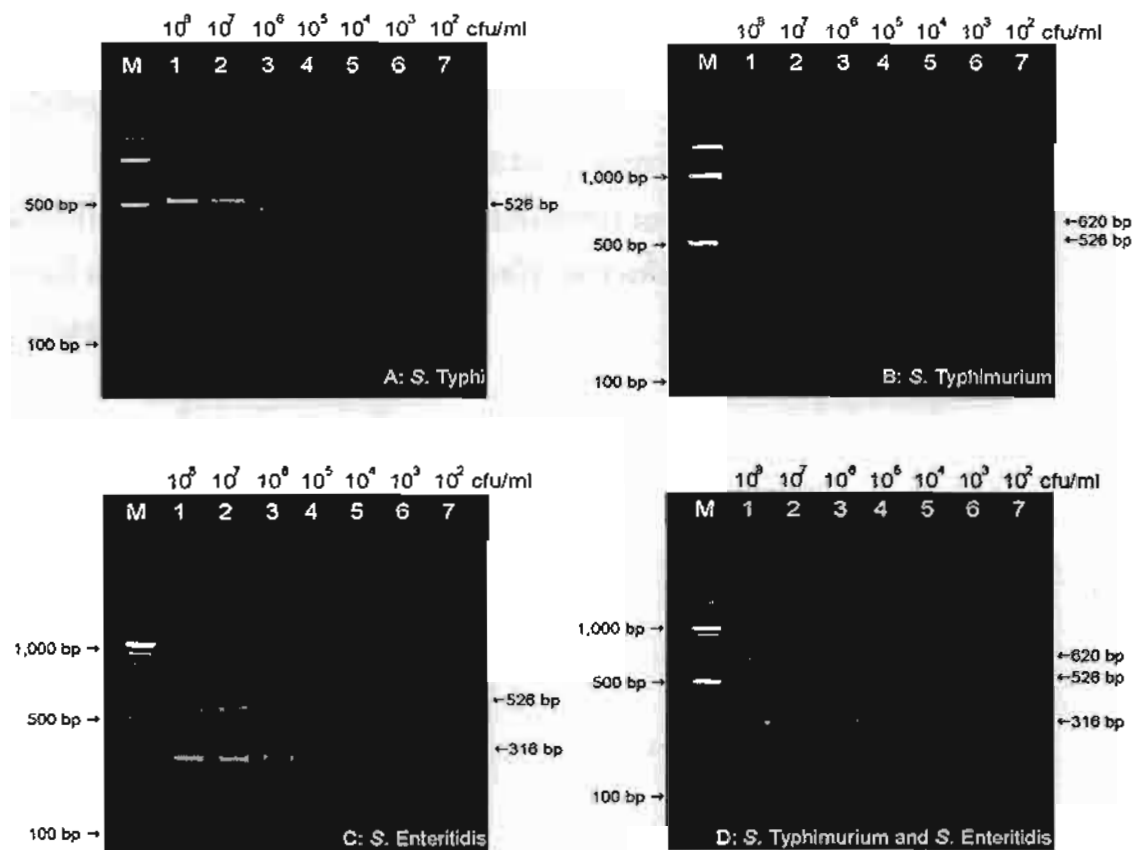
รูปที่ 5 Summary of PCR Specificity



รูปที่ 6 Specificity of mPCR for *Salmonella*. PCR reactions were performed with DNA template from different *Salmonella* serotypes and *E. coli*. Each sample contains 10^8 cfu/ml of reference microorganism strains. M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: mixed culture of *S. Typhimurium* ATCC 13311 and *S. Enteritidis* DMST 8536, Lane 2: *S. Typhimurium* ATCC 13311, Lane 3: *S. Enteritidis* DMST 8536, Lane 4: *S. Typhi* DMST 16122, Lane 5: *S. Weltevreden* DMST 10637, Lane 6: *S. Blockley* DMST 10639, Lane 7: *E. coli* ATCC 35218 (negative control) and Lane 8: blank. Triple bands of 620, 526 and 316 bp were demonstrated for mixed *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*. *S. Typhimurium* was demonstrated the PCR products at 620 and 526 bp whereas *S. Enteritidis* at 526 and 316 bp and a single band of 526 bp for the rest of *Salmonella* spp. Triple bands of 620, 526 and 316 bp for the both *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*.

Salmonella : Sensitivity of multiplex PCR

สำหรับ sensitivity สามารถแยกความแตกต่างของ PCR products ได้ตามที่อธิบายใน PCR specificity สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดของ *Salmonella* spp. (*S. Typhi*), *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ที่สามารถตรวจได้โดย PCR คือที่ความเข้มข้น 10^5 cfu/ml (10^3 cfu/PCR reaction) 10^6 cfu/ml (10^4 cfu/PCR reaction) และ 10^6 cfu/ml (10^3 cfu/PCR reaction) ตามลำดับ (โดยไม่ได้ทำการ enrichment) ซึ่งจะต้องทำการศึกษาคัดไปโดยการใช้ตัวอย่างที่มากขึ้นโดยจะประเมินเฉลี่ยเป็นค่าทางสถิติต่อไป เพื่อใช้เป็นค่า cutoff value สำหรับค่าบวกและค่าลบ ที่เหมาะสมต่อไป



รูปที่ 7 Sensitivity of mPCR for *Salmonella*. PCR reactions were performed with DNA template from serial dilution of (A) *S. Typhi*, (B) *S. Typhimurium* ATCC 13311 (C) *S. Enteritidis* DMST 8536 and (D) mixed culture of *S. Typhimurium* ATCC 13311 and *S. Enteritidis* DMST 8536 without pre-enrichment step. M: 100 bp DNA ladder, Lane 2: 10^8 cfu/ml, Lane 3: 10^7 cfu/ml, Lane 4: 10^6 cfu/ml, Lane 5: 10^5 cfu/ml, Lane 6: 10^4 cfu/ml and Lane 7: blank. Triple bands of 620, 526 and 316 bp were demonstrated for mixed *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*. *S. Typhimurium* was demonstrated the PCR products at 620 and 526 bp whereas *S. Enteritidis* at 526 and 316 bp and a single band of 526 bp for the rest of *Salmonella* spp.

9.2.3 *Salmonella* : Immunoassays

ในวัตถุประสงค์ในการวิจัย (หน้า 20) เสนอการวิจัย

(a) IMMUNOMAGNETIC SEPARATION-ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (IMS-ELISA)

(b) ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

(c) Samples detection

สำหรับวิธี ELISA จะให้ผลความไวในปริมาณต่ำสุด 10^6 , 10^6 และ 10^8 cfu/ml สำหรับ *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ตามลำดับ ส่วนวิธี IMS-ELISA ให้ผลความไวในปริมาณต่ำสุด 10^5 , 10^4 และ 10^7 cfu/ml สำหรับ *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ตามลำดับ และชุดตรวจสอบมีความคงตัวอย่างน้อย 9 เดือน (หรือมากกว่า) ซึ่งได้ศึกษาเก็บไว้ในระหว่างการวิจัย

ขั้นตอนการเตรียม IMS-ELISA, ELISA, และการนำประยุกต์ใช้ในการตรวจตัวอย่าง แสดงไว้ใน Appendix สำหรับผลการตรวจสอบทั้งหมดทั้ง specificity, sensitivity และ stability ที่เก็บที่ 0, 3, 6 และ 9 เดือน ได้รายงานสรุปผลไว้ในตารางทั้งหมด และการตรวจตัวอย่างทั้งหมด ได้นำเสนอสรุปผลไว้ในตารางเช่นกัน

ตารางที่ 24 Results of the specificity of the developed ELISA test kit for detection of *Salmonella* spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml and applied to each well at 100 μ l without enrichment before testing. Negative control and blank were *E. coli* and non-inoculated media respectively

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Results			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.111 0.092 0.099	0.105 0.124 0.111	0.030 0.076 0.035	0.078 0.074 0.073	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	- - -	- - -	- - -	0.003 0.025 0.006
<i>E. coli</i>	10^8	0.368 0.348 0.349	0.253 0.217 0.227	0.036 0.074 0.124	0.083 0.073 0.074	0.254 0.830 0.830	0.119 0.566 0.566	0.031 0.460 0.460	0.002 0.551 0.551	- - - +	- - - +	- - - +	0.044 0.006 0.108
<i>S. Blockley</i>	10^8	0.935 0.964 0.894	0.619 0.720 0.698	0.441 0.528 0.551	0.707 0.503 0.669	0.830 0.724 0.724	0.566 0.522 0.522	0.460 0.507 0.507	0.551 0.489 0.489	+++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	0.035 0.058 0.058
<i>S. Weltevreden</i>	10^8	0.861 0.783 0.830	0.568 0.664 0.672	0.553 0.599 0.511	0.657 0.440 0.594	0.724 1.170 1.170	0.522 0.507 0.507	0.460 0.507 0.507	0.551 0.489 0.489	+++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	0.112 0.044 0.044
<i>S. Typhi</i>	10^8	1.288 1.248 1.276	1.338 1.421 1.340	0.810 0.790 0.925	0.726 0.637 0.716	1.170 1.368 1.368	1.253 1.370 1.370	0.795 0.826 0.826	0.618 0.627 0.627	+++ +++ +++	++ +++ +++	++ ++ ++	0.049 0.019 0.019
<i>S. Enteritidis</i>	10^8	1.504 1.509 1.395	1.427 1.540 1.482	0.816 0.818 0.985	0.724 0.689 0.693	1.368 1.368 1.368	1.370 1.370 1.370	0.826 0.826 0.826	0.627 0.627 0.627	+++ +++ +++	+++ +++ +++	+++ +++ +++	0.011 0.058 0.058
<i>S. Typhimurium</i>	10^8	2.185 2.158 2.245	2.523 2.564 2.420	1.024 1.075 1.140	1.082 1.071 1.092	2.095 2.095 2.095	2.389 2.389 2.389	1.033 1.033 1.033	1.007 1.007 1.007	+++ +++ +++	+++ +++ +++	+++ +++ +++	0.011 0.058 0.058

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 25 Results of the specificity of the developed ELISA test kit for detection of *S. Typhimurium* after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml and applied to each well at 100 μ l without enrichment before testing. Negative controls were *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, *S. Weltevreden*, *S. Blockley* and *E. coli*. Blank was non-inoculated media.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A_{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Results			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.071 0.074 0.066	0.085 0.100 0.151	0.034 0.061 0.034	0.116 0.110 0.097	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.004 0.004 0.004	0.035 0.035 0.035	0.016 0.016 0.016	0.051 0.051 0.051
<i>E. coli</i>	10^8	0.132 0.120 0.106	0.116 0.133 0.175	0.067 0.120 0.152	0.171 0.087 0.222	0.049 0.029 0.070	0.029 0.114 0.108	0.070 0.108 -0.034	0.052 -0.034 -0.042	0.013 0.045 0.007	0.030 0.035 0.004	0.043 0.021 0.077	0.068 0.014 0.003
<i>S. Blockley</i>	10^8	0.349 0.268 0.276	0.265 0.199 0.214	0.141 0.136 0.175	0.059 0.086 0.077	0.228 0.171 0.294	0.114 0.054 0.088	0.108 0.150 0.107	-0.034 -0.042 0.060	0.045 0.007 0.064	0.035 0.004 0.062	0.021 0.077 0.026	0.014 0.003 0.070
<i>S. Weltevreden</i>	10^8	0.248 0.241 0.235	0.167 0.161 0.169	0.133 0.166 0.280	0.069 0.066 0.064	0.171 0.294 0.294	0.054 0.088 0.117	0.150 0.107 0.071	-0.042 0.060 -0.008	0.007 0.064 0.054	0.004 0.062 0.033	0.077 0.026 0.049	0.003 0.070 0.009
<i>S. Typhi</i>	10^8	0.388 0.292 0.413	0.250 0.219 0.130	0.121 0.162 0.168	0.166 0.239 0.100	0.294 0.294 0.328	0.088 0.117 2.025	0.107 0.071 1.189	0.060 -0.008 1.171	0.064 0.054 0.048	0.062 0.033 0.291	0.026 0.049 0.133	0.070 0.009 0.051
<i>S. Enteritidis</i>	10^8	0.338 0.414 0.443	0.222 0.200 0.265	0.104 0.167 0.071	0.100 0.091 0.109	0.328 2.436 2.436	0.117 2.025 2.025	0.071 1.189 1.189	-0.008 1.171 1.171	0.054 0.048 0.048	0.033 0.291 0.291	0.049 0.133 0.133	0.009 0.051 0.051
<i>S. Typhimurium</i>	10^8	2.552 2.509 2.456	1.885 2.071 2.456	1.079 1.299 1.318	1.224 1.324 1.289	2.436 2.436 2.436	2.025 2.025 2.025	1.189 1.189 1.189	1.171 1.171 1.171	0.048 0.048 0.048	0.291 0.291 0.291	0.133 0.133 0.133	0.051 0.051 0.051

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 26 Results of the specificity of the developed ELISA test kit for detection of *S. Enteritidis* (*Salmonella* group D) after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml and applied to each well at 100 μ l without enrichment before testing. Non-inoculated media was used as blank. Negative controls were *S. Typhimurium*, *S. Weltevreden*, *S. Blockley* and *E. coli*. Blank was non-inoculated media.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.053 0.046 0.079	0.066 0.069 0.065	0.081 0.136 0.091	0.124 0.108 0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	10^8	0.093 0.078 0.104	0.092 0.083 0.116	0.252 0.254 0.243	0.090 0.134 0.160	0.033	0.030	0.147	0.017	-	-	-	-
<i>S. Blockley</i>	10^8	0.179 0.203 0.182	0.189 0.205 0.178	0.316 0.198 0.251	0.100 0.106 0.117	0.129	0.124	0.152	-0.003	-	-	-	-
<i>S. Weltevreden</i>	10^8	0.248 0.241 0.235	0.139 0.135 0.139	0.215 0.313 0.395	0.059 0.068 0.090	0.182	0.071	0.205	-0.039	-	-	-	-
<i>S. Typhi</i>	10^8	1.361 1.223 1.119	0.924 0.912 0.805	0.895 0.832 1.026	0.680 0.719 0.583	1.175	0.813	0.815	0.550	+++	+++	+++	++
<i>S. Enteritidis</i>	10^8	0.532 0.576 0.708	0.564 0.621 0.573	0.657 0.727 0.526	0.567 0.510 0.491	0.546	0.519	0.534	0.412	++	++	++	+
<i>S. Typhimurium</i>	10^8	0.150 0.180 0.154	0.140 0.158 0.165	0.158 0.146 0.216	0.056 0.071 0.079	0.102	0.087	0.070	-0.042	-	-	-	-

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 27 Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of *Salmonella* spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and *S. Typhi* at various concentrations varying from 1 to 10^8 cfu/ml and applied to each well at 100 μ l without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A_{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
<i>S. Typhimurium</i>	Blank	0.111 0.092 0.099	0.105 0.124 0.111	0.030 0.076 0.035	0.078 0.074 0.073	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	-	0.010 0.010 0.010	0.010 0.010 0.010	0.025 0.025 0.025	0.003 0.003 0.003
	10^8	2.185 2.158 2.245	2.523 2.564 2.420	1.024 1.075 1.140	1.082 1.071 1.092	2.095 2.095 2.095	2.389 2.389 2.389	1.033 1.033 1.033	+++	0.045 0.045 0.045	0.074 0.074 0.074	0.058 0.058 0.058	0.011 0.011 0.011
	10^7	1.582 1.643	1.508 1.299	0.805 0.797	0.886 0.867	1.512 1.512	1.291 1.291	0.890 0.890	+++	0.043 0.043	0.148 0.148	0.070 0.070	0.013 0.013
	10^6	0.677 0.684 0.659	0.7500 642 0.769	0.805 0.797 0.825	0.811 0.865 0.839	0.572 0.572 0.572	0.607 0.607 0.607	0.762 0.762 0.762	++	0.013 0.013 0.013	0.069 0.069 0.069	0.014 0.014 0.014	0.027 0.027 0.027
	10^5	0.390 0.376 0.350	0.184 0.162 0.221	0.515 0.519 0.589	0.556 0.578 0.521	0.271 0.271 0.271	0.076 0.076 0.076	0.494 0.494 0.494	+	0.020 0.020 0.020	0.030 0.030 0.030	0.042 0.042 0.042	0.029 0.029 0.029
	10^4	0.319 0.332 0.356	0.180 0.163 0.185	0.282 0.097 0.182	0.439 0.403 0.384	0.235 0.235 0.235	0.063 0.063 0.063	0.140 0.140 0.140	-	0.019 0.019 0.019	0.012 0.012 0.012	0.093 0.093 0.093	0.028 0.028 0.028
	10^3	0.309 0.291 0.291	0.163 0.147 0.156	0.140 0.183 0.203	0.164 0.141 0.128	0.196 0.196 0.196	0.042 0.042 0.042	0.128 0.128 0.128	-	0.010 0.010 0.010	0.008 0.008 0.008	0.032 0.032 0.032	0.018 0.018 0.018
	10^2	0.281 0.291	0.148 0.155	0.116 0.134	0.038 0.047	0.185 0.185	0.039 0.039	0.078 0.078	-	0.007 0.007	0.005 0.005	0.013 0.013	0.006 0.006
	10^1	0.244 0.271	0.146 0.136	0.125 0.137	0.038 0.480	0.157 0.157	0.028 0.028	0.084 0.084	-	0.019 0.019	0.007 0.007	0.008 0.008	0.313 0.313
	10^0	0.236 0.304	0.138 0.134	0.108 0.094	0.042 0.038	0.169 0.169	0.023 0.023	0.054 0.054	-	0.048 0.048	0.003 0.003	0.010 0.010	0.003 0.003

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 28 Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of *Salmonella* spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and *S. Typhi* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each well at 100 µl without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank. (continued)

Samples		Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}															
			Raw data				Average (minus blank)				Result				Standard deviation			
			0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.111	0.105	0.030	0.078	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-	0.010	0.010	0.025	0.003	
		0.092	0.124	0.076	0.074													
		0.099	0.111	0.035	0.073													
		1.504	1.427	0.816	0.724	1.368	1.370	0.826	0.627	+++	+++	++	+	0.064	0.057	0.097	0.019	
	10 ⁸	1.509	1.540	0.818	0.689													
		1.395	1.482	0.985	0.693													
		1.240	0.917	0.581	0.641	1.162	0.746	0.501	0.569	+++	++	+	+	0.033	0.082	0.047	0.004	
		1.286	0.801	0.515	0.646													
		0.665	0.578	0.536	0.589	0.528	0.318	0.399	0.547	+	+/	+/	+	0.037	0.128	0.125	0.041	
		0.591	0.371	0.498	0.609													
S. Enteritidis	10 ⁶	0.630	0.343	0.303	0.667													
		0.414	0.164	0.254	0.476	0.272	0.056	0.250	0.321	-	-	-	+/	0.048	0.020	0.139	0.072	
		0.384	0.153	0.346	0.374													
		0.320	0.191	0.290	0.338													
	10 ⁵	0.362	0.135	0.256	0.320	0.224	0.031	0.221	0.187	-	-	-	-	0.044	0.014	0.077	0.050	
		0.336	0.136	0.350	0.236													
		0.277	0.160	0.198	0.231													
		0.263	0.131	0.181	0.106	0.198	0.021	0.087	0.040	-	-	-	-	0.035	0.004	0.092	0.008	
		0.301	0.132	0.193	0.122													
		0.333	0.138	0.028	0.116													
10 ⁴	0.263	0.118	0.182	0.039	0.166	0.005	0.188	-0.035	-	-	-	-	0.006	0.001	0.075	0.001		
	0.271	0.119	0.288	0.041														
	0.259	0.121	0.124	0.039	0.153	0.014	0.086	-0.035	-	-	-	-	0.008	0.008	0.012	0.001		
	0.248	0.132	0.141	0.041														
10 ³	0.242	0.125	0.032	0.039	0.132	0.012	-0.017	-0.036	-	-	-	-	0.013	0.001	0.002	0.001		
	0.224	0.124	0.029	0.040														

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 29 Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of *Salmonella* spp. after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and *S. Typhi* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each well at 100 µl without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank. (continued)

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.111	0.105	0.030	0.078	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
		0.092	0.124	0.076	0.074	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
		0.099	0.111	0.035	0.073	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
	10 ⁸	1.288	1.338	0.810	0.726	1.186	1.388	0.795	0.618	++	++	++	++
		1.298	1.421	0.790	0.637	1.186	1.388	0.795	0.618	++	++	++	++
		1.276	1.745	0.925	0.716	1.186	1.388	0.795	0.618	++	++	++	++
	10 ⁷	1.264	1.340	0.845	0.780	1.168	1.149	0.845	0.694	++	++	++	++
		1.274	1.184	0.919	0.757	1.168	1.149	0.845	0.694	++	++	++	++
		0.778	0.541	0.862	0.619	0.640	0.461	0.695	0.528	+	+	+	+
	10 ⁶	0.729	0.537	0.720	0.629	0.640	0.461	0.695	0.528	+	+	+	+
		0.717	0.643	0.643	0.560	0.640	0.461	0.695	0.528	+	+	+	+
		0.429	0.153	0.294	0.570	0.360	0.065	0.240	0.511	+/-	-	-	-
	10 ⁵	0.503	0.161	0.285	0.592	0.360	0.065	0.240	0.511	+/-	-	-	-
		0.451	0.219	0.283	0.596	0.360	0.065	0.240	0.511	+/-	-	-	-
		0.357	0.139	0.199	0.427	0.235	0.048	0.150	0.343	-	-	-	-
	10 ⁴	0.293	0.144	0.216	0.427	0.235	0.048	0.150	0.343	-	-	-	-
		0.358	0.199	0.177	0.401	0.222	0.027	0.053	0.063	-	-	-	-
		0.319	0.133	0.091	0.177	0.222	0.027	0.053	0.063	-	-	-	-
	10 ³	0.306	0.135	0.111	0.133	0.199	0.011	0.056	0.036	-	-	-	-
		0.344	0.153	0.099	0.104	0.199	0.011	0.056	0.036	-	-	-	-
		0.236	0.126	0.118	0.134	0.199	0.011	0.056	0.036	-	-	-	-
	10 ²	0.364	0.122	0.088	0.088	0.137	0.016	0.051	-0.019	-	-	-	-
		0.243	0.121	0.103	0.066	0.137	0.016	0.051	-0.019	-	-	-	-
		0.232	0.137	0.093	0.047	0.103	-0.002	0.019	-0.035	-	-	-	-
	10 ⁰	0.222	0.111	0.067	0.039	0.103	-0.002	0.019	-0.035	-	-	-	-
		0.186	0.111	0.065	0.041	0.103	-0.002	0.019	-0.035	-	-	-	-
		0.186	0.111	0.065	0.041	0.103	-0.002	0.019	-0.035	-	-	-	-

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 30 Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of *S. Typhimurium* after coating microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *S. Typhimurium* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml without and applied to each well at 100 µl without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
<i>S. Typhimurium</i>	Blank	0.071 0.074 0.066	0.085 0.100 0.151	0.034 0.061 0.034	0.116 0.110 0.097	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	-	-	-	-
	10 ⁸	2.552 2.509 2.456	1.885 2.071 2.456	1.079 1.299 1.318	1.224 1.324 1.289	2.436 2.025 0.835	2.436 2.025 0.835	1.189 1.189 0.892	1.171 1.171 0.842	+++ +++ +++	+++ +++ +++	0.133 0.291 0.129	0.051 0.051 0.203
	10 ⁷	1.638 1.722 0.436	0.917 0.976 0.411	1.026 0.844 0.406	0.806 1.093 0.644	1.610 0.835 0.341	1.610 0.835 0.341	0.892 0.892 0.343	0.842 0.842 0.424	+++ +++ +/-	+++ +++ +/-	0.042 0.121 0.042	0.203 0.098 0.098
	10 ⁶	0.413 0.465 0.107	0.359 0.589 0.091	0.414 0.337 0.217	0.461 0.491 0.270	0.368 0.036 0.036	0.368 0.036 0.036	0.343 0.343 0.208	0.424 0.424 0.161	+/- +/- -	+/- +/- -	0.026 0.022 0.039	0.015 0.015 0.015
	10 ⁵	0.105 0.077 0.091	0.134 0.115 0.120	0.240 0.115 0.120	0.283 0.274 0.303	0.009 0.009 0.009	0.009 0.009 0.009	0.091 0.091 0.091	0.173 0.173 0.173	- - -	- - -	0.030 0.013 0.030	0.020 0.020 0.020
	10 ⁴	0.070 0.071 0.076	0.140 0.103 0.111	0.167 0.385 0.473	0.265 0.095 0.141	0.006 0.006 0.006	0.006 0.006 0.006	0.310 0.310 0.310	-0.005 -0.005 -0.005	- - -	- - -	0.138 0.007 0.138	0.035 0.035 0.035
	10 ³	0.082 0.075 0.078	0.116 0.095 0.122	0.202 0.138 0.181	0.072 0.097 0.090	0.006 0.006 0.006	0.006 0.006 0.006	0.117 0.117 0.117	-0.015 -0.015 -0.015	- - -	- - -	0.030 0.019 0.030	0.005 0.005 0.005
	10 ²	0.070 0.078 0.063	0.078 0.193 0.099	0.098 0.134 0.120	0.090 0.128 0.138	0.004 0.004 0.004	0.004 0.004 0.004	0.073 0.073 0.073	0.001 0.001 0.001	- - -	- - -	0.025 0.081 0.004	0.027 0.027 0.025
	10 ¹	0.078 0.063 0.078	0.193 0.099 0.104	0.134 0.120 0.136	0.128 0.138 0.174	0.001 0.001 0.001	0.001 0.001 0.001	0.085 0.085 0.085	0.048 0.048 0.048	- - -	- - -	0.011 0.011 0.011	0.025 0.025 0.025
	10 ⁰	0.078 0.063 0.078	0.193 0.099 0.104	0.134 0.120 0.136	0.128 0.138 0.174	0.001 0.001 0.001	0.001 0.001 0.001	0.085 0.085 0.085	0.048 0.048 0.048	- - -	- - -	0.011 0.011 0.011	0.025 0.025 0.025

ตารางที่ 31 Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of *S. Enteritidis* (*Salmonella* group D) after microplate microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms i.e., *S. Enteritidis* and *S. Typhi* at various concentrations varying from 1 to 10^8 cfu/ml and applied to each well at 100 μ l without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.071	0.066	0.081	0.124	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
		0.074	0.069	0.136	0.108	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
		0.066	0.065	0.091	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
	10 ⁸	0.532	0.464	0.657	0.567	0.535	0.419	0.600	0.412	++	+	++	+
		0.576	0.521	0.727	0.510	0.535	0.419	0.600	0.412	++	+	++	+
		0.708	0.473	0.726	0.491	0.535	0.419	0.600	0.412	++	+	++	+
	10 ⁷	0.240	0.311	0.457	0.490	0.166	0.243	0.288	0.380	-	-	-	+/-
		0.232	0.308	0.325	0.492	0.166	0.243	0.288	0.380	-	-	-	+/-
		0.110	0.253	0.324	0.398	0.026	0.216	0.258	0.309	-	-	-	+/-
	10 ⁶	0.082	0.280	0.369	0.448	0.026	0.216	0.258	0.309	-	-	-	+/-
		0.095	0.315	0.389	0.414	0.026	0.216	0.258	0.309	-	-	-	+/-
		0.135	0.097	0.238	0.238	0.014	0.008	0.124	0.132	-	-	-	-
	10 ⁵	0.060	0.069	0.208	0.237	0.014	0.008	0.124	0.132	-	-	-	-
		0.058	0.058	0.236	0.255	0.014	0.008	0.124	0.132	-	-	-	-
		0.102	0.074	0.311	0.145	0.037	0.002	0.192	0.038	-	-	-	-
	10 ⁴	0.120	0.065	0.317	0.146	0.037	0.002	0.192	0.038	-	-	-	-
		0.100	0.068	0.258	0.156	0.037	0.002	0.192	0.038	-	-	-	-
		0.085	0.073	0.135	0.121	0.016	0.005	0.074	0.002	-	-	-	-
	10 ³	0.088	0.081	0.199	0.140	0.016	0.005	0.074	0.002	-	-	-	-
		0.086	0.063	0.198	0.078	0.016	0.005	0.074	0.002	-	-	-	-
		0.088	0.060	0.209	0.084	0.017	-0.006	0.130	-0.031	-	-	-	-
	10 ²	0.085	0.063	0.256	0.077	0.017	-0.006	0.130	-0.031	-	-	-	-
		0.079	0.063	0.253	0.069	0.002	0.002	0.119	-0.024	-	-	-	-
		0.065	0.075	0.191	0.105	0.002	0.002	0.119	-0.024	-	-	-	-
	10 ¹	0.079	0.068	0.199	0.094	0.002	-0.009	0.077	-0.025	-	-	-	-
		0.064	0.049	0.160	0.078	0.002	-0.009	0.077	-0.025	-	-	-	-
		0.064	0.049	0.160	0.078	0.002	-0.009	0.077	-0.025	-	-	-	-
	10 ⁰	0.079	0.068	0.199	0.094	0.002	-0.009	0.077	-0.025	-	-	-	-
		0.064	0.049	0.160	0.078	0.002	-0.009	0.077	-0.025	-	-	-	-
		0.064	0.049	0.160	0.078	0.002	-0.009	0.077	-0.025	-	-	-	-
	10 ⁰	0.079	0.068	0.199	0.094	0.002	-0.009	0.077	-0.025	-	-	-	-
		0.064	0.049	0.160	0.078	0.002	-0.009	0.077	-0.025	-	-	-	-
		0.064	0.049	0.160	0.078	0.002	-0.009	0.077	-0.025	-	-	-	-

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 32 Results of the sensitivity of the developed ELISA test kit for detection of *S. Enteritidis* (*Salmonella* group D) after microplate microplate for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms i.e., *S. Enteritidis* and *S. Typhi* at various concentrations varying from 1 to 10^8 cfu/ml and applied to each well at 100 μ l without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank. (continued)

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A_{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
S. Typhi	Blank	0.071 0.074 0.066	0.066 0.069 0.065	0.081 0.136 0.091	0.124 0.108 0.100	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	-	0.004 0.004 0.004	-	0.029 0.029 0.029	0.012 0.012 0.012
	10^8	1.361 1.223 1.119	0.742 0.712 0.705	0.895 0.832 1.026	0.680 0.719 0.583	1.164 0.647 0.383	0.550 0.815 0.327	0.347 0.309 0.184	++ +++ +	0.121 0.037 0.016	0.010 0.034 0.050	0.099 0.045 0.067	0.070 0.033 0.042
	10^7	0.360 0.413 0.109	0.426 0.474 0.287	0.398 0.461 0.292	0.481 0.434 0.462	0.317 0.049 0.005	0.347 0.309 0.181	0.184 0.176 0.080	+/- +/- -	0.037 0.016 0.008	0.034 0.050 0.022	0.045 0.067 0.020	0.033 0.042 0.026
	10^6	0.072 0.064 0.088	0.065 0.101 0.144	0.284 0.321 0.248	0.340 0.243 0.301	0.005 -0.002 -0.004	0.181 0.176 0.080	0.002 0.002 -0.001	-	0.001 0.001 0.001	0.001 0.001 0.001	0.005 0.005 0.005	0.001 0.001 0.001
	10^5	0.069 0.059 0.075	0.052 0.061 0.094	0.220 0.273 0.344	0.152 0.138 0.118	0.002 -0.002 -0.004	0.002 0.002 -0.001	0.002 0.002 -0.001	-	0.008 0.006 0.006	0.022 0.006 0.006	0.062 0.020 0.020	0.017 0.026 0.026
	10^4	0.060 0.072 0.065	0.061 0.064 0.072	0.165 0.180 0.204	0.132 0.123 0.083	0.006 0.006 0.006	0.005 0.005 -0.016	0.121 0.026 -0.017	-	0.002 0.002 0.006	0.018 0.005 0.005	0.061 0.011 0.011	0.040 0.041 0.041
	10^3	0.075 0.078 0.070	0.085 0.059 0.048	0.267 0.181 0.121	0.128 0.072 0.123	0.006 0.004 0.001	0.005 -0.016 -0.007	-0.011 -0.017 -0.023	-	0.002 0.006 0.011	0.018 0.005 0.001	0.061 0.011 0.005	0.040 0.041 0.001
	10^2	0.078 0.078 0.078	0.059 0.055 0.061	0.181 0.136 0.105	0.072 0.065 0.089	0.001 0.001 0.001	-0.001 -0.001 -0.001	-0.023 -0.023 -0.023	-	0.011 0.011 0.011	0.001 0.001 0.001	0.005 0.005 0.005	0.001 0.001 0.001
	10^1	0.078 0.078 0.078	0.060 0.060 0.060	0.098 0.098 0.098	0.087 0.087 0.087	0.001 0.001 0.001	-0.001 -0.001 -0.001	-0.023 -0.023 -0.023	-	0.011 0.011 0.011	0.001 0.001 0.001	0.005 0.005 0.005	0.001 0.001 0.001
	10^0	0.078 0.078 0.078	0.060 0.060 0.060	0.098 0.098 0.098	0.087 0.087 0.087	0.001 0.001 0.001	-0.001 -0.001 -0.001	-0.023 -0.023 -0.023	-	0.011 0.011 0.011	0.001 0.001 0.001	0.005 0.005 0.005	0.001 0.001 0.001

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 33 Results of the specificity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *Salmonella* spp. after coating beads for 0, 3, 6 and 9 months. Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml and applied to each tube at 1 ml without enrichment before testing. Negative control and blank were *E. coli* and non-inoculated media respectively.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A_{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.112 0.081 0.071	0.171 0.160 0.144	0.265 0.286 0.274	0.091 0.130 0.126	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	- - -	- - -	- - -	- - -
<i>E. coli</i>	10^8	0.205 0.256 0.174	0.179 0.158 0.184	0.349 0.262 0.319	0.167 0.159 0.168	0.124 0.016 0.035	0.016 0.016 0.035	0.049 0.035 0.049	0.049 0.035 0.049	- - -	- - -	- - -	- - -
<i>S. Blockley</i>	10^8	0.870 0.764 0.784	0.958 0.820 1.094	0.744 0.869 0.957	0.468 0.389 0.379	0.718 0.620 1.181	0.799 0.875 0.975	0.582 0.602 0.697	0.296 0.377 0.417	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++
<i>S. Weltevreden</i>	10^8	0.936 0.593 0.595	0.946 1.254 0.900	0.862 0.901 0.867	0.395 0.538 0.547	0.620 0.620 1.181	0.875 0.875 0.975	0.602 0.602 0.697	0.377 0.377 0.417	+/- ++ ++	+/- ++ ++	+/- ++ ++	+/- ++ ++
<i>S. Typhi</i>	10^8	1.435 1.183 1.188	1.058 1.196 1.144	0.883 1.110 0.922	0.461 0.530 0.608	1.181 0.983 2.239	0.975 1.021 1.491	0.697 0.803 1.006	0.417 0.565 1.069	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++
<i>S. Enteritidis</i>	10^8	1.038 1.204 0.970	1.258 1.110 1.168	1.091 1.026 1.116	0.783 0.565 0.694	0.983 0.983 2.239	1.021 1.021 1.491	0.803 0.803 1.006	0.565 0.565 1.069	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++
<i>S. Typhimurium</i>	10^8	2.082 2.378 2.522	1.682 1.718 1.548	1.171 1.312 1.361	0.982 0.997 1.575	2.239 2.239 2.239	1.491 1.491 1.491	1.006 1.006 1.006	1.069 1.069 1.069	+++ +++ +++	+++ +++ +++	+++ +++ +++	+++ +++ +++

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) $= A_{450nm}$ 0.300 to 0.400, positive result (+) $= A_{450nm}$ 0.400 to 0.500, highly positive result (++) $= A_{450nm}$ 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 34 Results of the specificity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *S. Typhimurium* after coating beads for 0, 3, 6 and 9 months..Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml and applied to each tube at 1 ml without enrichment before testing. Negative controls were *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, *S. Weltevreden* *S. Blockley* and *E. coli*. Blank was non-inoculated media.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A_{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.061 0.097 0.098	0.063 0.069 0.064	0.233 0.188 0.205	0.072 0.068 0.074	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	10^8	0.057 0.057 0.076	0.100 0.107 0.088	0.128 0.155 0.189	0.043 0.051 0.063	0.000 0.000 0.000	0.033 0.008 0.008	-0.052 -0.033 -0.033	-0.019 0.011 -0.013	-	-	-	-
<i>S. Blockley</i>	10^8	0.049 0.121 0.081	0.084 0.066 0.070	0.174 0.216 0.139	0.090 0.068 0.087	0.000 0.000 0.000	0.008 0.008 0.008	-0.001 0.004 0.004	0.011 -0.013 0.033	-	-	-	-
<i>S. Weltevreden</i>	10^8	0.079 0.147 0.087	0.065 0.062 0.065	0.176 0.252 0.210	0.052 0.069 0.053	0.019 0.000 0.000	-0.001 0.010 0.010	0.004 0.012 0.012	-0.013 0.033 0.029	-	-	-	-
<i>S. Typhi</i>	10^8	0.054 0.085 0.107	0.073 0.078 0.073	0.159 0.200 0.303	0.087 0.086 0.138	0.000 0.000 0.000	0.010 0.013 0.013	0.012 0.017 0.017	0.033 0.029 0.029	-	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	10^8	0.098 0.067 0.110	0.074 0.095 0.066	0.229 0.290 0.159	0.103 0.106 0.092	0.006 0.006 0.006	0.013 0.013 0.013	0.017 0.017 0.017	0.029 0.029 0.029	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	10^8	1.052 1.110 0.935	1.000 0.892 0.985	1.486 1.288 1.441	1.092 1.105 0.983	0.947 0.947 0.947	0.894 0.894 0.894	1.196 1.196 1.196	0.989 0.989 0.989	+++	+++	+++	+++

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 35. Results of the specificity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *S. Enteritidis* (*Salmonella* group D) after coating beads for 0, 3, 6 and 9 months. Each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms at 10^8 cfu/ml and applied to each tube at 1 ml without enrichment before testing. Negative controls were *S. Typhimurium*, *S. Weltevreden*, *S. Blockley* and *E. coli*. Blank was non-inoculated media.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A_{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.075 0.083 0.070	0.316 0.251 0.299	0.136 0.099 0.098	0.164 0.104 0.148	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	0.000 0.000 0.000	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	10^8	0.090 0.076 0.076	0.217 0.291 0.260	0.140 0.143 0.108	0.188 0.228 0.119	0.005 -0.033 -0.081	0.019 0.039 0.023	0.019 0.039 0.023	0.039 0.039 0.023	-	-	-	-
<i>S. Blockley</i>	10^8	0.070 0.092 0.074	0.176 0.254 0.194	0.129 0.136 0.138	0.285 0.234 0.188	0.003 0.016 0.016	-0.050 -0.050 -0.050	0.023 0.053 0.053	0.097 -0.021 -0.021	-	-	-	-
<i>S. Weltevreden</i>	10^8	0.096 0.086 0.093	0.200 0.253 0.263	0.177 0.155 0.161	0.106 0.123 0.126	1.020 0.565 0.039	0.850 0.630 0.192	0.615 0.489 0.036	1.225 0.800 0.072	+++	+++	++	+
<i>S. Typhi</i>	10^8	1.192 1.194 0.903	1.384 1.011 1.021	0.729 0.793 0.793	1.260 1.422 1.410	0.565 0.930 0.912	0.630 0.489 0.036	0.489 0.800 0.036	1.225 0.800 0.072	+++	+++	++	+
<i>S. Enteritidis</i>	10^8	0.656 0.594 0.674	0.944 0.993 0.820	0.588 0.493 0.720	0.974 0.930 0.912	0.565 0.930 0.912	0.630 0.489 0.036	0.489 0.800 0.036	1.225 0.800 0.072	+++	+++	++	+
<i>S. Typhimurium</i>	10^8	0.114 0.112 0.119	0.421 0.513 0.510	0.217 0.097 0.127	0.201 0.264 0.168	0.039 0.039 0.039	0.192 0.192 0.192	0.036 0.036 0.036	0.072 0.072 0.072	-	-	-	-

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) $= A_{450nm}$ 0.300 to 0.400, positive result (+) $= A_{450nm}$ 0.400 to 0.500, highly positive result (++) $= A_{450nm}$ 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 36 Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *Salmonella* spp. after coating beads for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and *S. Typhi* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each tube at 1 ml without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
<i>S. Typhimurium</i>	Blank	0.112 0.099	0.247 0.301	0.155 0.155	0.130 0.179	0.000 1.809	0.000 2.041	0.000 0.810	0.000 0.814	- +++	- +++	- +++	0.032 0.000
	10 ⁸	1.915	2.315	0.965	0.969	1.809	2.041	0.810	0.814	+++	+++	+++	-
	10 ⁷	1.464 1.294	1.787 1.592	1.001 0.868	0.744 0.714	1.273 1.046	1.416 0.661	0.780 0.516	0.574 0.378	++ ++	++ ++	++ ++	0.021 0.021
	10 ⁶	1.137 1.025 1.293	0.921 0.973 0.911	0.603 0.739	0.518 0.547	1.046	0.661	0.516	0.378	++	++	++	0.021
	10 ⁵	1.024 1.103 0.982	0.737 0.879 0.686	0.453 0.562 0.550	0.317 0.217 0.499	0.930	0.493	0.367	0.189	++	+	+/-	0.143
	10 ⁴	0.351 0.385 0.552	0.502 0.487 0.588	0.493 0.470 0.524	0.434 0.339 0.367	0.323	0.252	0.341	0.225	+/-	-	+/-	0.049
	10 ³	0.229 0.280 0.327	0.395 0.319 0.419	0.408 0.347 0.431	0.355 0.282 0.306	0.173	0.104	0.240	0.159	-	-	-	0.037
	10 ²	0.314 0.352	0.327 0.275	0.264 0.340	0.108 0.227	0.227	0.027	0.147	0.013	-	-	-	0.084
	10 ¹	0.327 0.262	0.346 0.461	0.356 0.351	0.226 0.096	0.189	0.130	0.199	0.006	-	-	-	0.092
	10 ⁰	0.306 0.312	0.398 0.328	0.217 0.136	0.178 0.160	0.203	0.089	0.022	0.014	-	-	-	0.013

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 37 Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *Salmonella* spp. after coating beads for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and *S. Typhi* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each tube at 1 ml without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank. (continued)

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.112	0.247	0.155	0.130	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
	10 ⁸	0.099	0.301	0.155	0.179	0.505	0.635	0.881	0.721	++	++	++	++
	10 ⁷	0.629	0.953	0.962	0.876	0.325	0.329	0.357	0.452	+	+	+	+
	10 ⁶	0.452	0.716	0.469	0.585	0.075	0.288	0.151	0.532	-	-	-	-
	10 ⁵	0.446	0.577	0.407	0.628	0.060	0.271	0.177	0.360	-	-	-	-
	10 ⁴	0.215	0.567	0.198	0.655	0.033	0.205	0.111	0.251	-	-	-	-
	10 ³	0.183	0.645	0.266	0.718	0.061	0.152	0.098	0.171	-	-	-	-
	10 ²	0.198	0.603	0.328	0.604	0.047	-0.045	0.066	0.080	-	-	-	-
	10 ¹	0.172	0.526	0.235	0.465	0.068	-0.075	0.066	-0.084	-	-	-	-
	10 ⁰	0.183	0.637	0.210	0.475	-0.003	0.009	0.113	-0.063	-	-	-	-
S. Enteritidis	10 ⁸	0.176	0.453	0.168	0.437	0.033	0.205	0.111	0.251	-	-	-	-
	10 ⁷	0.143	0.614	0.205	0.349	0.061	0.152	0.098	0.171	-	-	-	-
	10 ⁶	0.151	0.502	0.202	0.432	0.033	0.205	0.111	0.251	-	-	-	-
	10 ⁵	0.121	0.478	0.170	0.293	0.061	0.152	0.098	0.171	-	-	-	-
	10 ⁴	0.165	0.468	0.199	0.269	0.061	0.152	0.098	0.171	-	-	-	-
	10 ³	0.270	0.465	0.169	0.417	0.047	-0.045	0.066	0.080	-	-	-	-
	10 ²	0.153	0.222	0.148	0.309	0.047	-0.045	0.066	0.080	-	-	-	-
	10 ¹	0.189	0.325	0.146	0.161	0.068	-0.075	0.066	-0.084	-	-	-	-
	10 ⁰	0.157	0.234	0.184	0.110	0.099	0.382	0.185	0.078	-	-	-	-
	10 ⁰	0.227	0.253	0.183	0.032	0.084	0.304	0.293	0.107	-	-	-	-

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 38 Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *Salmonella* spp. after coating beads for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and *S. Typhi* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each tube at 1 ml without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank. (continued)

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.112	0.247	0.155	0.130	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-
	10 ⁸	0.099	0.301	0.155	0.179	0.000	0.000	0.000	0.000	+++	+++	+++	+++
	10 ⁷	1.203	1.122	1.028	1.006	1.084	0.919	0.928	0.851	+++	+++	+++	+++
	10 ⁶	1.022	1.085	0.807	0.976	0.915	0.915	0.645	0.768	+++	+++	+++	+++
	10 ⁵	0.422	0.507	0.494	0.658	0.347	0.376	0.406	0.535	++	++	++	++
	10 ⁴	0.515	0.651	0.517	0.722	0.347	0.376	0.406	0.535	++	++	++	++
	10 ³	0.460	0.270	0.332	0.400	0.258	0.084	0.272	0.197	+	+	+	+
	10 ²	0.443	0.327	0.422	0.300	0.227	0.061	0.138	0.057	-	-	-	-
	10 ¹	0.418	0.202	0.372	0.357	0.200	0.053	0.079	0.056	-	-	-	-
	10 ⁰	0.306	0.287	0.226	0.284	0.156	0.018	0.083	0.059	-	-	-	-
<i>S. Typhi</i>	10 ⁸	0.324	0.331	0.293	0.211	0.200	0.053	0.079	0.056	-	-	-	-
	10 ⁷	0.410	0.173	0.195	0.142	0.156	0.018	0.083	0.059	-	-	-	-
	10 ⁶	0.289	0.279	0.155	0.231	0.156	0.018	0.083	0.059	-	-	-	-
	10 ⁵	0.329	0.336	0.202	0.154	0.200	0.053	0.079	0.056	-	-	-	-
	10 ⁴	0.340	0.154	0.179	0.249	0.156	0.018	0.083	0.059	-	-	-	-
	10 ³	0.242	0.210	0.130	0.195	0.156	0.018	0.083	0.059	-	-	-	-
	10 ²	0.308	0.232	0.236	0.232	0.156	0.018	0.083	0.059	-	-	-	-
	10 ¹	0.257	0.246	0.164	0.101	0.145	0.052	0.036	-0.013	-	-	-	-
	10 ⁰	0.270	0.263	0.108	0.184	0.145	0.052	0.036	-0.013	-	-	-	-
	10 ⁰	0.133	0.115	0.237	0.192	0.017	0.023	0.061	0.038	-	-	-	-
	10 ⁰	0.100	0.149	0.153	0.194	0.017	0.023	0.061	0.038	-	-	-	-

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 39

Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *S. Typhimurium* after coating beads for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms, i.e., *S. Typhimurium* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each tube at 1 ml without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
<i>S. Typhimurium</i>	Blank	0.068 0.101	0.061 0.060	0.075 0.003	0.087 0.084	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	-	-	-	-
	10 ⁶	0.593 0.661	0.826 0.927	0.988 0.841	0.947 0.995	0.542 0.816	0.816 0.876	0.876 0.885	0.885 0.885	++	+++	+++	+++
	10 ⁵	0.492 0.497 0.475	0.553 0.593 0.646	0.857 0.704 0.774	0.853 0.609 0.500	0.403 0.536	0.536 0.739	0.739 0.568	0.568 0.568	+	++	++	++
	10 ⁴	0.234 0.245 0.220	0.335 0.345 0.347	0.441 0.453 0.447	0.380 0.318 0.297	0.148 0.081	0.081 0.408	0.408 0.246	0.246 0.246	-	-	+	-
	10 ³	0.105 0.106 0.136	0.095 0.075 0.071	0.177 0.093 0.209	0.228 0.224 0.245	0.031 0.019	0.019 0.121	0.121 0.146	0.146 0.146	-	-	-	-
	10 ²	0.107 0.093 0.093	0.080 0.062 0.058	0.123 0.112 0.067	0.186 0.134 0.124	0.015 0.008	0.008 0.056	0.056 0.069	0.069 0.069	-	-	-	-
	10 ¹	0.069 0.065	0.066 0.046	0.042 0.068	0.155 0.113	-0.018 -0.005	0.016 0.016	0.048 0.048	0.048 0.048	-	-	-	-
	10 ⁰	0.060 0.097	0.067 0.064	0.028 0.024	0.081 0.084	-0.007 0.005	-0.013 0.005	-0.003 -0.003	-0.003 -0.003	-	-	-	-

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 40

Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *S. Enteritidis* (*Salmonella* group D) after coating beads for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms i.e., *S. Enteritidis* and *S. Typhi* at various concentrations varying from 1 to 10^8 cfu/ml and applied to each tube at 1 ml without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank.

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A_{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.137 0.110	0.256 0.380	0.073 0.088	0.164 0.148	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000	-	-	-	0.031
	10^8	0.629	0.953	0.962	0.874	0.505	0.635	0.881	0.740	++	++	++	-
	10^7	0.452 0.446	0.716 0.577	0.469 0.407	0.731 0.798	0.325 0.329	0.329	0.357	0.631	+/-	+/-	+/-	0.047
	10^6	0.215 0.183 0.198	0.567 0.645	0.198 0.266	0.674 0.536	0.075	0.288	0.151	0.416	-	-	-	0.118
	10^5	0.198 0.172 0.183	0.603 0.526 0.637	0.328 0.235 0.210	0.600 0.426 0.299	0.060	0.271	0.177	0.308	-	-	-	0.151
	10^4	0.176 0.143 0.151	0.453 0.614 0.502	0.168 0.205 0.202	0.305 0.220 0.264	0.033	0.205	0.111	0.129	-	-	-	0.043
	10^3	0.121 0.165 0.270	0.478 0.468 0.465	0.170 0.199 0.169	0.228 0.154 0.154	0.061	0.152	0.098	0.045	-	-	-	0.043
	10^2	0.153 0.189	0.222 0.325	0.148 0.146	0.135 0.147	0.047	-0.045	0.066	0.007	-	-	-	0.008
	10^1	0.157 0.227	0.234 0.253	0.184 0.183	0.061 0.216	0.068	-0.075	0.066	0.005	-	-	-	0.110
	10^0	0.200 0.219	0.252 0.228	0.113 0.131	0.197 0.223	0.086	-0.078	0.103	0.076	-	-	-	0.018

Notes: negative result (-) $\leq A_{450nm}$ 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) $> A_{450nm}$ 0.800.

ตารางที่ 41 Results of the sensitivity of the developed IMS-ELISA test kit for detection of *S. Enteritidis* (*Salmonella* group D) after coating beads for 0, 3, 6 and 9 months. All samples were enumerated exactly identified numbers of organisms i.e., *S. Enteritidis* and *S. Typhi* at various concentrations varying from 1 to 10⁸ cfu/ml and applied to each tube at 1 ml without enrichment before testing. Non-inoculated medium was used as blank. (continued)

Samples	Number of bacteria (cfu/ml)	A _{450nm}											
		Raw data				Average (minus blank)				Result			
		0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month	0 month	3 month	6 month	9 month
Blank	-	0.071 0.074 0.066	0.066 0.069 0.065	0.081 0.136 0.091	0.164 0.104 0.148	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	0.011	0.006 0.031
	10 ⁸	1.203 1.022 1.046	1.122 1.085 1.151	1.028 0.807 0.683	1.110 0.890 0.722	1.084 0.915 0.915	0.919 0.915 0.915	0.928 0.645 0.672	0.976 0.672 0.672	+++ +++ +++	+++ +++ +++	-	-
	10 ⁷	0.422 0.515 0.460	0.507 0.651 0.517	0.494 0.517 0.517	0.724 0.549 0.549	0.347 0.376 0.406	0.376 0.376 0.406	0.406 0.406 0.406	0.503 0.503 0.503	+/- +/- +/-	+/- +/- +/-	0.047 0.102 0.016	0.124
	10 ⁶	0.270 0.443 0.418	0.332 0.327 0.202	0.321 0.422 0.372	0.739 0.618 0.517	0.258 0.084 0.272	0.084 0.084 0.272	0.272 0.272 0.272	0.491 0.491 0.491	- - -	- - -	0.094 0.074 0.051	0.111
	10 ⁵	0.306 0.324 0.410	0.287 0.331 0.173	0.226 0.293 0.195	0.405 0.297 0.174	0.227 0.061 0.138	0.061 0.061 0.138	0.138 0.138 0.138	0.158 0.158 0.158	- - -	- - -	0.055 0.082 0.050	0.116
	10 ⁴	0.289 0.329 0.340	0.279 0.336 0.154	0.155 0.202 0.179	0.216 0.199 0.129	0.200 0.053 0.079	0.053 0.053 0.079	0.079 0.079 0.079	0.047 0.047 0.047	- - -	- - -	0.027 0.093 0.024	0.046
	10 ³	0.242 0.308 0.257	0.210 0.232 0.246	0.130 0.236 0.164	0.161 0.207 0.295	0.156 0.018 0.083	0.018 0.018 0.083	0.083 0.083 0.083	0.050 0.050 0.050	- - -	- - -	0.047 0.016 0.075	0.033
	10 ²	0.270 0.270 0.129	0.263 0.263 0.195	0.108 0.108 0.135	0.159 0.159 0.202	0.145 0.052 0.027	0.052 0.052 0.027	0.036 0.036 0.017	0.093 0.093 0.042	- - -	- - -	0.009 0.012 0.025	0.096
	10 ¹	0.162 0.162 0.176	0.176 0.176 0.176	0.099 0.099 0.099	0.150 0.150 0.150	0.027 -0.018 0.017	-0.018 -0.018 0.017	0.017 0.017 0.017	0.042 0.042 0.042	- - -	- - -	0.023 0.013 0.013	0.037
	10 ⁰												

Notes: negative result (-) ≤ A_{450nm} 0.300, indetermined result (+/-) = A_{450nm} 0.300 to 0.400, positive result (+) = A_{450nm} 0.400 to 0.500, highly positive result (++) = A_{450nm} 0.500 to 0.800, very highly positive result (+++) > A_{450nm} 0.800.

ตารางที่ 42 Detection the contamination of *Salmonella* in Chicken samples

Date	Sample No.	Raw datas			Minus blank			Results			
		IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
7/3/2548	Sample 1	0.271	0.678	0.415	0.098	0.468	0.364	-	+	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.636	1.776	9.613	0.463	1.566	9.562	+	+++	+++	620, 526, 316 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	1.675	1.353	2.707	1.502	1.143	2.656	+++	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.487	1.098	2.470	0.314	0.888	2.419	+/-	+++	+++	526, 316 bp
	<i>C. jejuni</i>	0.469	0.150	0.057	0.296	-0.060	0.006	-	-	-	-
	Blank	0.173	0.210	0.051	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

9/3/2548	Sample 1	0.340	0.974	0.314	0.153	0.737	0.263	-	++	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.360	2.004	3.022	0.173	1.767	2.971	-	+++	+++	620, 526, 316 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.770	2.517	2.707	0.583	2.280	2.656	++	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.614	1.658	2.470	0.427	1.421	2.419	+	+++	+++	526, 316 bp
	<i>C. coli</i>	0.251	0.221	0.057	0.064	-0.016	0.006	-	-	-	-
	Blank	0.187	0.237	0.051	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

14/3/2548	Sample 1	0.425	0.346	0.207	0.156	0.222	0.156	-	-	-	-
	Sample 2	0.156	0.246	0.116	-0.113	0.122	0.065	-	-	-	-
	Sample 3	0.316	0.562	0.131	0.047	0.438	0.080	-	+	-	-
	Sample 4	0.317	0.403	0.113	0.048	0.279	0.062	-	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.836	1.658	2.707	0.567	1.534	2.656	++	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.832	1.092	2.470	0.563	0.968	2.419	++	+++	+++	526, 316 bp
	<i>C. jejuni</i>	0.460	0.097	0.057	0.191	-0.027	0.006	-	-	-	-
	Blank	0.269	0.124	0.051	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

10/5/2548	Sample 1	0.159	0.540	0.158	-0.058	0.307	0.107	-	+/-	-	-
	Sample 2	0.306	0.553	0.189	0.089	0.320	0.138	-	+/-	-	-
	Sample 3	0.338	0.626	1.296	0.121	0.393	1.245	-	+/-	+++	-
	Sample 4	0.400	0.520	0.231	0.183	0.287	0.180	-	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	1.315	2.258	2.707	1.098	2.025	2.656	+++	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	1.045	0.983	2.470	0.828	0.750	2.419	++	++	+++	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.427	0.148	0.057	0.210	-0.085	0.006	-	-	-	-
	Blank	0.217	0.233	0.051	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

26/4/2548	Sample 1	0.168	0.529	0.183	-0.188	0.410	0.132	-	+	-	-
	Sample 2	0.368	0.287	0.077	0.012	0.168	0.026	-	-	-	-
	Sample 3	0.244	0.548	0.131	-0.112	0.429	0.080	-	+	-	526 bp
	Sample 4	0.296	0.388	0.232	-0.060	0.269	0.181	-	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.924	2.651	2.707	0.568	2.532	2.656	++	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.838	1.239	2.470	0.482	1.120	2.419	+	+++	+++	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.501	0.179	0.057	0.145	0.060	0.006	-	-	-	-
	Blank	0.356	0.119	0.051	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

16/5/2548	Sample 1	0.223	0.888	0.225	0.098	0.627	0.174	-	++	-	-
	Sample 2	0.255	0.634	0.190	0.130	0.373	0.139	-	+/-	-	-
	Sample 3	0.286	0.821	0.290	0.161	0.560	0.239	-	++	-	-
	Sample 4	0.194	0.479	0.210	0.069	0.218	0.159	-	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.766	2.362	2.707	0.641	2.101	2.656	++	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.635	1.194	2.470	0.510	0.933	2.419	++	+++	+++	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.263	0.261	0.057	0.138	0.000	0.006	-	-	-	-
	Blank	0.125	0.261	0.051	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

24/6/2548	Sample 1	0.214	0.434	0.16	0.050	0.294	0.109	-	-	-	-
	Sample 2	0.249	0.363	0.168	0.085	0.223	0.117	-	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.930	1.841	2.707	0.766	1.701	2.656	++	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.610	0.783	2.470	0.446	0.643	2.419	+	++	+++	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.183	0.144	0.057	0.019	0.004	0.006	-	-	-	-
	Blank	0.164	0.140	0.051	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ตารางที่ 43 Detection the contamination of *S. Typhimurium* in Chicken samples

Date	Sample No.	Raw data		Minus blank		Results		
		IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
7/3/2548	Sample 1	0.386	0.256	0.075	0.031	-	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.429	0.340	0.118	0.115	-	-	620, 526, 316 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.817	1.078	0.506	0.853	++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.354	0.099	0.043	-0.126	-	-	526, 316 bp
	<i>C. jejuni</i>	0.548	0.100	0.237	-0.125	-	-	-
	Blank	0.311	0.225	0.000	0.000	-	-	-

9/3/2548	Sample 1	0.290	0.228	-0.004	0.094	-	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.240	0.197	-0.054	0.063	-	-	620, 526, 316 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	1.064	1.710	0.770	1.576	++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.483	0.141	0.189	0.007	-	-	526, 316 bp
	<i>C. coli</i>	0.593	0.110	0.299	-0.024	-	-	-
	Blank	0.294	0.134	0.000	0.000	-	-	-

14/3/2548	Sample 1	0.403	0.101	0.139	0.061	-	-	-
	Sample 2	0.315	0.049	0.051	0.009	-	-	-
	Sample 3	0.323	0.042	0.059	0.002	-	-	-
	Sample 4	0.210	0.051	-0.054	0.011	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	1.131	1.109	0.867	1.069	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.409	0.060	0.145	0.020	-	-	526, 316 bp
	<i>C. jejuni</i>	0.327	0.040	0.063	0.000	-	-	-
	Blank	0.264	0.040	0.000	0.000	-	-	-

10/5/2548	Sample 1	0.082	0.232	-0.174	0.056	-	-	-
	Sample 2	0.166	0.514	-0.090	0.338	-	+/-	-
	Sample 3	0.179	0.240	-0.077	0.064	-	-	-
	Sample 4	0.137	0.229	-0.119	0.053	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	1.269	1.955	1.013	1.779	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.334	0.269	0.078	0.093	-	-	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.403	0.149	0.147	-0.027	-	-	-
	Blank	0.256	0.176	0.000	0.000	-	-	-

26/4/2548	Sample 1	0.106	0.091	-0.209	0.029	-	-	-
	Sample 2	0.150	0.094	-0.165	0.032	-	-	-
	Sample 3	0.170	0.273	-0.145	0.211	-	-	-
	Sample 4	0.149	0.243	-0.166	0.181	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.734	1.767	0.419	1.705	+	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.361	0.290	0.046	0.228	-	-	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.444	0.081	0.129	0.019	-	-	-
	Blank	0.315	0.062	0.000	0.000	-	-	-

16/5/2548	Sample 1	0.153	0.747	0.006	0.480	-	+	-
	Sample 2	0.159	0.580	0.012	0.313	-	+/-	-
	Sample 3	0.189	0.795	0.042	0.528	-	++	-
	Sample 4	0.188	0.249	0.041	-0.018	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.951	2.084	0.804	1.817	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.206	0.395	0.059	0.128	-	-	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.153	0.207	0.006	-0.060	-	-	-
	Blank	0.147	0.267	0.000	0.000	-	-	-

24/6/2548	Sample 1	0.200	0.139	-0.007	0.039	-	-	-
	Sample 2	0.213	0.164	0.006	0.064	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	1.050	1.523	0.843	1.423	+++	+++	620, 526 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.237	0.179	0.030	0.079	-	-	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.220	0.092	0.013	-0.008	-	-	-
	Blank	0.207	0.100	0.000	0.000	-	-	-

ตารางที่ 44 Detection the contamination of *Salmonella* group D in Chicken samples

Date	Sample No.	Raw data		Minus blank		Results		
		IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
7/3/2548	Sample 1	0.302	0.112	-0.003	-0.090	-	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.640	1.167	0.335	0.965	+/-	+++	620, 526, 316 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.378	0.128	0.073	-0.074	-	-	526, 316 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.446	0.772	0.141	0.570	-	++	526, 316 bp
	<i>C. jejuni</i>	0.591	0.109	0.286	-0.093	-	-	-
	Blank	0.305	0.202	0.000	0.000	-	-	-

9/3/2548	Sample 1	0.275	0.184	-0.005	0.063	-	-	-
	Sample 1 (inoc)	0.379	1.121	0.099	1.000	-	+++	620, 526, 316 bp
	<i>S. Typhimurium</i>	0.636	0.223	0.356	0.102	+/-	-	526, 316 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.663	1.216	0.383	1.095	+/-	+++	526, 316 bp
	<i>C. coli</i> ATCC	0.238	0.093	-0.042	-0.028	-	-	-
	Blank	0.280	0.121	0.000	0.000	-	-	-

14/3/2548	Sample 1	0.340	0.047	-0.005	0.003	-	-	-
	Sample 2	0.248	0.043	-0.097	-0.001	-	-	-
	Sample 3	0.249	0.047	-0.096	0.003	-	-	-
	Sample 4	0.180	0.046	-0.165	0.002	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.300	0.124	-0.045	0.080	-	-	526, 316 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.949	0.765	0.604	0.721	++	++	526, 316 bp
	<i>C. jejuni</i>	0.551	0.042	0.206	-0.002	-	-	-
	Blank	0.345	0.044	0.000	0.000	-	-	-

16/5/2548	Sample 1	0.214	0.551	0.088	0.312	-	+/-	-
	Sample 2	0.212	0.681	0.086	0.442	-	+	-
	Sample 3	0.209	0.649	0.083	0.410	-	+	-
	Sample 4	0.137	0.248	0.011	0.009	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.189	0.411	0.063	0.172	-	-	526, 316 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.825	1.034	0.699	0.795	++	++	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.117	0.269	-0.009	0.030	-	-	-
	Blank	0.126	0.239	0.000	0.000	-	-	-

26/4/2548	Sample 1	0.190	0.055	-0.240	-0.011	-	-	-
	Sample 2	0.187	0.061	-0.243	-0.005	-	-	-
	Sample 3	0.193	0.098	-0.237	0.032	-	-	620, 526, 316 bp
	Sample 4	0.272	0.064	-0.158	-0.002	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.397	0.352	-0.033	0.286	-	-	526, 316 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.543	0.773	0.113	0.707	-	++	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.495	0.116	0.065	0.050	-	-	-
	Blank	0.430	0.066	0.000	0.000	-	-	-

10/5/2548	Sample 1	0.225	0.155	-0.043	-0.021	-	-	-
	Sample 2	0.230	0.270	-0.038	0.094	-	-	-
	Sample 3	0.170	0.203	-0.098	0.027	-	-	-
	Sample 4	0.198	0.180	-0.070	0.004	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.342	0.260	0.074	0.084	-	-	526, 316 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.795	0.820	0.527	0.644	++	++	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.246	0.130	-0.022	-0.046	-	-	-
	Blank	0.268	0.176	0.000	0.000	-	-	-

24/6/2548	Sample 1	0.210	0.142	0.004	0.061	-	-	-
	Sample 2	0.179	0.109	-0.027	0.028	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>	0.294	0.218	0.088	0.137	-	-	526, 316 bp
	<i>S. Enteritidis</i>	0.729	0.492	0.523	0.411	++	+	526, 316 bp
	<i>E. coli</i>	0.175	0.087	-0.031	0.006	-	-	-
	Blank	0.206	0.081	0.000	0.000	-	-	-

ตารางที่ 45 Detection the contamination of *Salmonella* in Chicken samples (from industrial company A)

ครั้งที่ 1

Samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
น้ำจากอุจจาระจาก 1	0.490	0.248	0.077	0.303	0.112	0.026	+/-	-	-	-
น้ำจากอุจจาระจาก 2	0.841	0.334	0.043	0.654	0.198	-0.008	++	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.487	0.280	0.181	0.300	0.144	0.130	+/-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.489	0.426	0.062	0.302	0.290	0.011	+/-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.253	0.323	0.241	0.066	0.187	0.190	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.233	0.358	0.069	0.046	0.222	0.018	-	-	-	-
Finished product 1	0.269	0.256	0.065	0.082	0.120	0.014	-	-	-	-
Finished product 2	0.267	0.126	0.045	0.080	-0.010	-0.006	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	0.972	1.708	2.707	0.785	1.572	2.656	++	+++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.626	1.122	2.470	0.439	0.986	2.419	+	+++	+++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.326	0.238	0.057	0.139	0.102	0.006	-	-	-	-
Blank	0.187	0.136	0.051	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ครั้งที่ 2

samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
น้ำจากอุจจาระจาก 1	0.170	0.093	0.107	0.072	-0.018	0.004	-	-	-	-
น้ำจากอุจจาระจาก 2	0.187	0.117	0.106	0.089	0.006	0.003	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.362	0.248	0.095	0.264	0.137	-0.008	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.329	0.165	0.353	0.231	0.054	0.250	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.240	0.187	0.550	0.142	0.076	0.447	-	-	+	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.130	0.141	0.121	0.032	0.030	0.018	-	-	-	-
Finished product 1	0.134	0.281	0.091	0.036	0.170	-0.012	-	-	-	-
Finished product 2	0.261	0.238	0.107	0.163	0.127	0.004	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	1.386	1.503	1.582	1.288	1.392	1.479	+++	+++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.950	0.836	2.194	0.852	0.725	2.091	+++	++	+++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.086	0.260	0.125	-0.012	0.149	0.022	-	-	-	-
Blank	0.098	0.111	0.103	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
น้ำจากทุกถังจาก 1	0.087	0.058	0.057	-0.099	-0.016	0.001	-	-	-	-
น้ำจากทุกถังจาก 2	0.208	0.070	0.049	0.022	-0.004	-0.007	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.215	0.105	0.083	0.029	0.031	0.027	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.207	0.069	0.085	0.021	-0.005	0.029	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.349	0.153	0.218	0.163	0.079	0.162	-	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.215	0.090	0.087	0.029	0.016	0.031	-	-	-	-
Finished product 1	0.192	0.108	0.092	0.006	0.034	0.036	-	-	-	-
Finished product 2	0.109	0.110	0.071	-0.077	0.036	0.015	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	1.346	1.342	0.782	1.160	1.268	0.726	+++	+++	++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.813	0.735	1.162	0.627	0.661	1.106	++	++	+++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.117	0.081	0.063	-0.069	0.007	0.007	-	-	-	-
Blank	0.186	0.074	0.056	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ตารางที่ 48 Detection the contamination of *S. Typhimurium* in Chicken samples (from industrial company A)

ครั้งที่ 1

samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
น้ำจากชุดล้างซาก 1	0.498	0.129	0.446	0.060	+	-	-
น้ำจากชุดล้างซาก 2	0.841	0.252	0.789	0.183	++	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.167	0.097	0.115	0.028	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.094	0.137	0.042	0.068	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.190	0.102	0.138	0.033	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.214	0.137	0.162	0.068	-	-	-
Finished product 1	0.260	0.112	0.208	0.043	-	-	-
Finished product 2	0.251	0.080	0.199	0.011	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	0.724	1.098	0.672	1.029	++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.494	0.237	0.442	0.168	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.338	0.091	0.286	0.022	-	-	-
Blank	0.052	0.069	0.000	0.000	-	-	-

ครั้งที่ 2

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
น้ำจากชุดล้างซาก 1	0.238	0.068	0.134	-0.028	-	-	-
น้ำจากชุดล้างซาก 2	0.168	0.076	0.064	-0.020	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.271	0.113	0.167	0.017	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.295	0.078	0.191	-0.018	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.295	0.101	0.191	0.005	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.322	0.083	0.218	-0.013	-	-	-
Finished product 1	0.270	0.137	0.166	0.041	-	-	-
Finished product 2	0.152	0.154	0.048	0.058	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	1.587	1.239	1.483	1.143	+++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.244	0.184	0.140	0.088	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.176	0.145	0.072	0.049	-	-	-
Blank	0.104	0.096	0.000	0.000	-	-	-

ครั้งที่ 3

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
น้ำจากจุดล้างซาก 1	0.209	0.105	-0.009	0.011	-	-	-
น้ำจากจุดล้างซาก 2	0.245	0.157	0.027	0.063	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.180	0.114	-0.038	0.020	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.206	0.148	-0.012	0.054	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.133	0.087	-0.085	-0.007	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.147	0.064	-0.071	-0.030	-	-	-
Finished product 1	0.187	0.137	-0.031	0.043	-	-	-
Finished product 2	0.110	0.125	-0.108	0.031	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	1.741	1.585	1.523	1.491	+++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.103	0.065	-0.115	-0.029	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.116	0.064	-0.102	-0.030	-	-	-
Blank	0.218	0.094	0.000	0.000	-	-	-

ตารางที่ 47 Detection the contamination of *Salmonella* group D in Chicken samples (from industrial company A)

ครั้งที่ 1

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
น้ำจากอุ้งคางจาก 1	0.317	0.132	0.007	0.071	-	-	-
น้ำจากอุ้งคางจาก 2	1.022	0.236	0.712	0.175	++	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.118	0.068	-0.192	0.007	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.198	0.106	-0.112	0.045	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.197	0.068	-0.113	0.007	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.236	0.075	-0.074	0.014	-	-	-
Finished product 1	0.243	0.104	-0.067	0.043	-	-	-
Finished product 2	0.183	0.085	-0.127	0.024	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	0.250	0.163	-0.060	0.102	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	0.729	0.719	0.419	0.658	+	++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.383	0.078	0.073	0.017	-	-	-
Blank	0.310	0.061	0.000	0.000	-	-	-

ครั้งที่ 2

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
น้ำจากอุ้งคางจาก 1	0.138	0.141	-0.001	0.004	-	-	-
น้ำจากอุ้งคางจาก 2	0.125	0.169	-0.014	0.032	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.193	0.147	0.054	0.010	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.217	0.145	0.078	0.008	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.940	0.160	0.801	0.023	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.309	0.172	0.170	0.035	-	-	-
Finished product 1	0.253	0.338	0.114	0.201	-	-	-
Finished product 2	0.127	0.271	-0.012	0.134	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	0.256	0.293	0.117	0.156	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	1.855	0.722	1.716	0.585	+++	++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.075	0.330	-0.064	0.193	-	-	-
Blank	0.139	0.137	0.000	0.000	-	-	-

Samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
น้ำจากจุดล้างจาก 1	0.371	0.067	0.127	0.012	-	-	-
น้ำจากจุดล้างจาก 2	0.232	0.082	-0.012	0.027	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 1	0.205	0.063	-0.039	0.008	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 2	0.270	0.131	0.026	0.076	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 3	0.176	0.068	-0.068	0.013	-	-	-
ตัวอย่างเนื้อไก่ 4	0.181	0.052	-0.063	-0.003	-	-	-
Finished product 1	0.221	0.136	-0.023	0.081	-	-	-
Finished product 2	0.214	0.053	-0.030	-0.002	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	0.361	0.224	0.117	0.169	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	0.998	1.063	0.754	1.008	++	+++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.304	0.120	0.060	0.065	-	-	-
Blank	0.244	0.055	0.000	0.000	-	-	-

ตารางที่ 48 Detection the contamination of *Salmonella* in samples (Shrimp farm)

ครั้งที่ 1

samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
เดือนที่ 1	0.477	0.449	0.046	0.200	0.176	-0.005	-	-	-	-
เดือนที่ 1	0.603	0.590	0.059	0.326	0.317	0.008	+/-	+/-	-	-
เดือนที่ 2	0.487	0.628	0.055	0.210	0.355	0.004	-	+/-	-	-
เดือนที่ 2	0.508	0.612	0.054	0.231	0.339	0.003	-	+/-	-	-
เดือนที่ 3	0.617	0.505	0.053	0.340	0.232	0.002	- +/-	-	-	-
เดือนที่ 3	0.191	0.299	0.053	-0.086	0.026	0.002	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	0.788	2.359	2.707	0.511	2.086	2.656	++	+++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.773	1.479	2.470	0.496	1.206	2.419	+	+++	+++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.169	0.258	0.057	-0.108	-0.015	0.006	-	-	-	-
Blank	0.277	0.273	0.051	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ครั้งที่ 2

samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
เดือนที่ 1	0.127	0.130	0.122	0.029	0.019	0.019	-	-	-	-
เดือนที่ 1	0.231	0.189	0.130	0.133	0.078	0.027	-	-	-	-
เดือนที่ 2	0.132	0.085	0.089	0.034	-0.026	-0.014	-	-	-	-
เดือนที่ 2	0.097	0.135	0.091	-0.001	0.024	-0.012	-	-	-	-
เดือนที่ 3	0.107	0.099	0.096	0.009	-0.012	-0.007	-	-	-	-
เดือนที่ 3	0.241	0.087	0.090	0.143	-0.024	-0.013	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	1.386	1.503	1.582	1.288	1.392	1.479	+++	+++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.950	0.836	2.194	0.852	0.725	2.091	+++	++	+++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.086	0.260	0.125	-0.012	0.149	0.022	-	-	-	-
Blank	0.098	0.111	0.103	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

samples	Raw data			Minus blank			Results			
	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	IMS-ELISA	ELISA	Company Test Kit	mPCR
เคียนที 1	0.311	0.210	0.089	0.072	-0.025	-0.001	-	-	-	-
เคียนที 1	0.243	0.169	0.092	0.004	-0.066	0.002	-	-	-	-
เคียนที 2	0.222	0.171	0.09	-0.017	-0.064	0.000	-	-	-	-
เคียนที 2	0.215	0.267	0.115	-0.024	0.032	0.025	-	-	-	-
เคียนที 3	0.207	0.217	0.085	-0.032	-0.018	-0.005	-	-	-	-
เคียนที 3	0.171	0.229	0.093	-0.068	-0.006	0.003	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	1.420	2.563	2.478	1.181	2.328	2.388	+++	+++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.868	1.224	1.833	0.629	0.989	1.743	++	+++	+++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.225	0.236	0.116	-0.014	0.001	0.026	-	-	-	-
Blank	0.239	0.235	0.090	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-

ตารางที่ 49 Detection the contamination of *S. Typhimurium* in samples (Shrimp farm)
ครั้งที่ 1

samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
เคียนที่ 1	0.414	0.299	0.226	0.145	-	-	-
เคียนที่ 1	0.418	0.432	0.230	0.278	-	-	-
เคียนที่ 2	0.431	0.420	0.243	0.266	-	-	-
เคียนที่ 2	0.489	0.443	0.301	0.289	+/-	-	-
เคียนที่ 3	0.555	0.366	0.367	0.212	+/-	-	-
เคียนที่ 3	0.248	0.172	0.060	0.018	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	0.947	2.210	0.759	2.056	++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.211	0.357	0.023	0.203	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.175	0.147	-0.013	-0.007	-	-	-
Blank	0.188	0.154	0.000	0.000	-	-	-

ครั้งที่ 2

samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
เคียนที่ 1	0.059	0.135	-0.045	0.039	-	-	-
เคียนที่ 1	0.133	0.177	0.029	0.081	-	-	-
เคียนที่ 2	0.076	0.102	-0.028	0.006	-	-	-
เคียนที่ 2	0.098	0.092	-0.006	-0.004	-	-	-
เคียนที่ 3	0.179	0.083	0.075	-0.013	-	-	-
เคียนที่ 3	0.238	0.067	0.134	-0.029	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	1.587	1.239	1.483	1.143	+++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.244	0.184	0.140	0.088	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.176	0.145	0.072	0.049	-	-	-
Blank	0.104	0.096	0.000	0.000	-	-	-

samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
เคียนที 1	0.409	0.129	0.286	0.093	-	-	-
เคียนที 1	0.257	0.149	0.134	0.113	-	-	-
เคียนที 2	0.176	0.107	0.053	0.071	-	-	-
เคียนที 2	0.202	0.145	0.079	0.109	-	-	-
เคียนที 3	0.252	0.155	0.129	0.119	-	-	-
เคียนที 3	0.148	0.152	0.025	0.116	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	1.261	2.271	1.138	2.235	+++	+++	620, 526 bp
<i>S. Enteritidis</i>	0.129	0.084	0.006	0.048	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.150	0.074	0.027	0.038	-	-	-
Blank	0.123	0.036	0.000	0.000	-	-	-

ตารางที่ 50 Detection the contamination of *Salmonella* group D in samples (Shrimp farm)

ครั้งที่ 1

samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
เดือนที่ 1	0.357	0.415	0.198	0.242	-	-	-
เดือนที่ 1	0.466	0.520	0.307	0.347	+/-	+/-	-
เดือนที่ 2	0.516	0.527	0.357	0.354	+/-	+/-	-
เดือนที่ 2	0.429	0.552	0.270	0.379	-	+/-	-
เดือนที่ 3	0.476	0.500	0.317	0.327	+/-	+/-	-
เดือนที่ 3	0.237	0.257	0.078	0.084	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	0.395	0.196	0.236	0.023	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	1.130	0.819	0.971	0.646	+++	++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.251	0.108	0.092	-0.065	-	-	-
Blank	0.159	0.173	0.000	0.000	-	-	-

ครั้งที่ 2

samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
เดือนที่ 1	0.084	0.141	-0.055	0.004	-	-	-
เดือนที่ 1	0.165	0.257	0.026	0.120	-	-	-
เดือนที่ 2	0.062	0.091	-0.077	-0.046	-	-	-
เดือนที่ 2	0.072	0.093	-0.067	-0.044	-	-	-
เดือนที่ 3	0.163	0.115	0.024	-0.022	-	-	-
เดือนที่ 3	0.148	0.192	0.009	0.055	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	0.256	0.293	0.117	0.156	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	1.855	0.722	1.716	0.585	+++	++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.075	0.330	-0.064	0.193	-	-	-
Blank	0.139	0.137	0.000	0.000	-	-	-

samples	Raw data		Minus blank		Results		
	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	IMS-ELISA	ELISA	mPCR
เดียนที่ 1	0.157	0.166	0.037	0.031	-	-	-
เดียนที่ 1	0.14	0.158	0.020	0.023	-	-	-
เดียนที่ 2	0.152	0.180	0.032	0.045	-	-	-
เดียนที่ 2	0.209	0.243	0.089	0.108	-	-	-
เดียนที่ 3	0.186	0.246	0.066	0.111	-	-	-
เดียนที่ 3	0.141	0.178	0.021	0.043	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	0.150	0.175	0.030	0.040	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	1.463	1.183	1.343	1.048	+++	+++	526, 316 bp
<i>E. coli</i>	0.126	0.147	0.006	0.012	-	-	-
Blank	0.120	0.135	0.000	0.000	-	-	-

**SUMMARY OF RESULTS
FROM
IMMUNOASSAYS
AND
MULTIPLEX PCR**

ตารางที่ 51. Summary of immunoassay and multiplex PCR test kits identification for *Salmonella* and *Campylobacter*

Type of Kits	IMS-ELISA			ELISA			PCR		Note
	Specificity ^a	Sensitivity ^b	Stability	Specificity	Sensitivity	Stability	Specificity	Sensitivity	
<i>Salmonella</i>	Positive to <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 <i>S. Enteritidis</i> DMST 8536 <i>S. Typhi</i> DMST 16122 <i>S. Weltevreden</i> DMST 10637 <i>S. Blockley</i> DMST 10639	<i>S. Typhimurium</i> 10 ⁴ cfu/ml <i>S. Enteritidis</i> 10 ⁵ cfu/ml <i>S. Typhi</i> 10 ⁵ cfu/ml	0, 3, 6, 9 month (on process)	Positive to <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 <i>S. Enteritidis</i> DMST 8536 <i>S. Typhi</i> DMST 16122 <i>S. Weltevreden</i> DMST 10637 <i>S. Blockley</i> DMST 10639	<i>S. Typhimurium</i> 10 ⁶ cfu/ml <i>S. Enteritidis</i> 10 ⁶ cfu/ml <i>S. Typhi</i> 10 ⁶ cfu/ml	0, 3, 6, 9 month (on process)	Positive to <i>S. Typhimurium</i> 620, 526 bp <i>S. Enteritidis</i> DMST 8536 526, 316 bp <i>S. Typhi</i> DMST 16122 526 bp <i>S. Weltevreden</i> DMST 10637 526 bp <i>S. Blockley</i> DMST 10639 526 bp	10 ⁵ cfu/ml	
<i>Salmonella</i> spp.	Negative to <i>E. coli</i> DMST 7948			Negative to <i>E. coli</i> DMST 7948			Negative to <i>E. coli</i> DMST 7948		

ตารางที่ 51. Summary of immunoassay and multiplex PCR test kits identification for *Salmonella* and *Campylobacter* (continued)

Type of Kits	IMS-ELISA			ELISA			PCR		Note
	Specificity ^a	Sensitivity ^b	Stability	Specificity	Sensitivity	Stability	Specificity	Sensitivity	
<i>S. Typhimurium</i>	Positive to <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	<i>S. Typhimurium</i> 10 ⁴ cfu/ml	0, 3, 6, 9 month (on process)	Positive to <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	<i>S. Typhimurium</i> 10 ⁶ cfu/ml	0, 3, 6, 9 month (on process)	Positive to <i>S. Typhimurium</i> 620, 526 bp <i>S. Enteritidis</i> DMST 8536 526, 316 bp <i>S. Typhi</i> DMST 16122 526 bp <i>S. Weltevreden</i> DMST 10637 526 bp <i>S. Blockley</i> DMST 10639 526 bp	10 ⁵ cfu/ml	
	Negative to <i>S. Enteritidis</i> DMST 8536 <i>S. Typhi</i> DMST 16122 <i>S. Weltevreden</i> DMST 10637 <i>S. Blockley</i> DMST 10639 <i>E. coli</i> DMST 7948			Negative to <i>S. Enteritidis</i> DMST 8536 <i>S. Typhi</i> DMST 16122 <i>S. Weltevreden</i> DMST 10637 <i>S. Blockley</i> DMST 10639 <i>E. coli</i> DMST 7948			Negative to <i>E. coli</i> DMST 7948		

ตารางที่ 51. Summary of immunoassay and multiplex PCR test kits identification for *Salmonella* and *Campylobacter* (continued)

Type of Kits	IMS-ELISA			ELISA			PCR		Note
	Specificity ^a	Sensitivity ^b	Stability	Specificity	Sensitivity	Stability	Specificity	Sensitivity	
<i>S. Enteritidis</i>	Positive to <i>S. Enteritidis</i> DMST 8536 <i>S. Typhi</i> DMST 16122	<i>S. Enteritidis</i> 10 ⁷ cfu/ml <i>S. Typhi</i> 10 ⁶ cfu/ml	0, 3, 6, 9 month (on process)	Positive to <i>S. Enteritidis</i> DMST 8536 <i>S. Typhi</i> DMST 16122	<i>S. Enteritidis</i> 10 ⁸ cfu/ml <i>S. Typhi</i> 10 ⁸ cfu/ml	0, 3, 6, 9 month (on process)	Positive to <i>S. Enteritidis</i> DMST 8536 526, 316 bp <i>S. Typhi</i> DMST 16122 526 bp <i>S. Typhimurium</i> 620, 526 bp <i>S. Weltevreden</i> DMST 10637 526 bp <i>S. Blockley</i> DMST 10639 526 bp Negative to <i>E. coli</i> DMST 7948	10 ⁵ cfu/ml	
	Negative to <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 <i>S. Weltevreden</i> DMST 10637 <i>S. Blockley</i> DMST 10639 <i>E. coli</i> DMST 7948			Negative to <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 <i>S. Weltevreden</i> DMST 10637 <i>S. Blockley</i> DMST 10639 <i>E. coli</i> DMST 7948					

ตารางที่ 51. Summary of immunoassay and multiplex PCR test kits identification for *Salmonella* and *Campylobacter* (continued)

Type of Kits	IMS-ELISA			ELISA			PCR		Note
	Specificity ^a	Sensitivity ^b	Stability	Specificity	Sensitivity	Stability	Specificity	Sensitivity	
<i>Campalobacter</i>	ND ^c	ND	ND	Positive to <i>C. jejuni</i> ATTC 33291 <i>C. jejuni</i> DVL31 Indetermine to <i>C. coli</i> DVL30 Negative to <i>E. coli</i> DMST 7948	ND	ND	Positive to <i>C. jejuni</i> ATCC33291 460, 160 bp <i>C. jejuni</i> DVL31 460, 160 bp <i>C. coli</i> DVL30 460 bp Negative to <i>E. coli</i> DMST 7948	10 ² cfu/ml	
<i>C. jejuni</i>	Positive to <i>C. jejuni</i> ATTC 33291 <i>C. jejuni</i> DVL31 Negative to <i>C. coli</i> DVL30 <i>E. coli</i> DMST 7948 S. Enteritidis DMST 8536	<i>C. jejuni</i> ATTC 33291 10 ³ cfu/ml	0, 3, 6, 9 month (on process)	Positive to <i>C. jejuni</i> ATTC 33291 <i>C. jejuni</i> DVL31 Negative to <i>C. coli</i> DVL30 <i>E. coli</i> DMST 7948 S. Enteritidis DMST 8536	ND	ND	Positive to <i>C. jejuni</i> ATCC33291 460, 160 bp <i>C. jejuni</i> DVL31 460, 160 bp <i>C. coli</i> DVL30 460 bp Negative to <i>E. coli</i> DMST 7948 S. Enteritidis DMST 8536	10 ² cfu/ml	

ตารางที่ 51. Summary of immunoassay and multiplex PCR test kits identification for *Salmonella* and *Campylobacter* (continued)

Type of Kits	IMS-ELISA			ELISA			PCR		Note
	Specificity ^a	Sensitivity ^b	Stability	Specificity	Sensitivity	Stability	Specificity	Sensitivity	
<i>C. coli</i>	No antibody for development of diagnostic kits						Positive to <i>C. jejuni</i> ATCC33291 460, 160 bp <i>C. jejuni</i> DVL31 460, 160 bp <i>C. coli</i> DVL30 460 bp	10 ² cfu/ml	
							Negative to <i>E. coli</i> DMST 7948 <i>S. Enteritidis</i> DMST 8536		

Specificity^a = Specificity : each sample was exactly enumerated at 10⁸ cfu/ml

Sensitivity^b = Sensitivity : each sample was enumerated exactly identified numbers of organisms without enrichment

ND^c = Not done at present

เอกสารอ้างอิง

References for *Campylobacter*

- Allos BM. Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barr syndrome. *J Infect Dis* 1997; 176:S125-S128.
- Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI and Swedlow DL. *Campylobacter jejuni*-An emerging foodborne pathogen. *Emerging Infect Dis* 1999;5:1-13.
- Cardarelli-Liete P, Blom K, Patton CM, Nicholson MA, Steigerwalt AG, Hunter SB, Brenner DJ, Barrett TJ, and Swaminathan B. Rapid identification of *Campylobacter* species by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):62-67.
- Chen Y and Zychinsky A. Apoptosis induced by bacterial pathogens. *Microb Pathog* 1994;17:203-212.
- Dubreuil JD, Kostrzyńska M, Logan SM, Harris LA, Austin JW and Trust TJ. Purification, characterization, and localization of a protein antigen shared by thermophilic *Campylobacters*. *J Clin Microbiol* 1990;28(6):1321-1328.
- Feng P. Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in foods. *J AOAC Int* 1996;79(3):809-812.
- Giesendorf BAJ, Quint WGV, Henkens MHC, Stegeman H, Huf FA and Niesters HGM. Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:3804-3808.
- Gonzalez I, Richardson PT, Collins MD and Park SF. Identification of a gene encoding a methyl-accepting chemotaxis-like protein from *Campylobacter coli* and its use in a molecular typing scheme for campylobacters. *J Appl Microbiol* 1998;85:317-326.
- Grant CCR, Konkel ME, Cieplak W JR and Tompkins L. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect Immunol* 1993;61(5):1764-1771.
- Guerrant RL, Wanke CA, Pennie RA, Barrett LJ, Lima AAM and O'Brien AD. Production of a unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1987;55(10):2526-2530.
- Harmon KM, Ransom GM and Wesley IV. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 1997;11:195-200.
- Harvey P and Leach S. Analysis of coccal cell formation by *Campylobacter jejuni* using continuous culture techniques, and the importance of oxidative stress. *J Appl Microbiol* 1998;85:398-404.
- Hebert GA, Edmonds P and Brenner D. DNA relatedness among strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with divergent serogroup and hippurate reactions. *J Clin Microbiol* 1984;20(1):138-140.

- Hingley A. *Campylobacter* : Low-profile bug is food poisoning leader. U.S. Food and Drug Administration, FDA Consumer, September-October, 1999.
- Jimenez A, Barros-Velazquez, Rodriguez J, and Villa T G. Restriction endonuclease analysis, DNA relatedness and phenotypic characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter Coli* isolates involved in food-borne disease. The Society for applied Bacteriology, J Applied Microbiol 1997;82:713-721.
- Johnson M. Research highlights. Food safety consortium annual meeting, October 4-6, Kansas City, Mo. 1998.
- Jonas D, Walev I, Berger T, Liebetrau M, Palmer M and Bhakdi S. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocyte evoke internucleosomal DNA degradation. Infect Immunol 1994;62:1304-1312.
- Klipstein FA and Engert RF. Properties of Crude *Campylobacter jejuni* heat-labile enterotoxin. Infect Immunol 1984;45(1):314-319.
- Klipstein FA, Engert RF, Short H and Schenk EA. Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*: assay and correlation with clinical manifestations. Infect Immunol 1985;50(1):43-49.
- Koneman EW *et al*. Diagnostic Microbiology, 4th edition. Philadelphia : JB Lippincott Company, 1992.
- Korolik V, Moorthy L and Coloe PJ. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains by using restriction endonuclease DNA profiles and DNA Fragment polymorphisms. J Clin Microbiol 1995;33(5):1136-1140.
- Lamoureux M, Fliss I, Blais BW, Messier S, Hoffer RA and Simard RE. Microtitre plate hybridization system for detection of thermophilic *Campylobacter* rRNA. J Appl Microbiol 1997;82:259-266.
- Lin CG, Kao YT, Liu WT, Huang HH, Chen KC, Wang TM and Lin HC. Cytotoxic effects of anthrax lethal toxin on macrophage-like cell line J774A.1. Curr Microbiol 1996;33:224-227.
- Linda S.L. Yu, Joseph Uknalis, and Shu-I Tu. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. J Immunological Methods 2001;256:11-18.
- Lorenz E, Istovica A and Owen RJ. Subtyping of *Campylobacter jejuni* Penner serotypes 9, 38 and 63 from human infections, animals and water by pulsed field gel electrophoresis and flagellin gene analysis. Lett Appl Microbiol 1998;26:179-182.
- Lu P, Brooks BW, Robertson RH, Nielsen KH and Garcia MM. Characterization of monoclonal antibodies for the rapid detection of foodborne campylobacters. Int J Food Microbiol 1997;37:87-91.
- Madden RH, Moran L and Scates P. Frequency of occurrence of *Campylobacter* spp. in red meats and poultry in Northern Ireland and their subsequent subtyping using polymerase chain

- reaction-restriction fragment length polymorphism and the random amplified polymorphic DNA method. *J Appl Microbiol* 1998;84:703-708.
- Mahajan S and Rodgers FG. Isolation, characterization, and host-cell-binding properties of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 1990;28(6):1314-1320.
- Moongkamdi P, Srivattana A, Bunyaphatsara N and Laohathai K. Cytotoxicity assay of hispidulin and quercetin using colorimetric technique. *Mahidol Univ J Pharm Sci* 1991;18:25-31.
- Murphy GS Jr, Echeverria P, Jackson LR, Arness MK, LeBron C and Pitarangsi C. Ciprofloxacin - and azithromycin-resistant *Campylobacter* causing traveler's diarrhea in U.S. troops deployed to Thailand in 1994. *Clin Infect Dis* 1996;22:868-869.
- Murray PR *et al.* Manual of Clinical Microbiology, 6th edition. Washington DC : ASM Press, 1995.
- Payne RE, Lee MD, Dreesen DW and Bamgørt HM. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in broiler flocks using randomly amplified polymorphic DNA-PCR and 23S rRNA-PCR and role of litter in its transmission. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(1):260-263.
- Peterson MC. Rheumatic manifestations of *Campylobacter jejuni* and *C. fetus* infections in adults. *Scan J Rheumatol* 1994;23:167-70.
- Piddock LJV. Quinolone resistance and *Campylobacter* spp. *Antimicrobe Agents Chemother* 1995;36:891-898.
- Sears CI and Kaper JB. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 1996;60:167-215.
- Slater ER and Owen RJ. Restriction fragment length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of *Campylobacter jejuni* is highly conserved. *Lett Appl Microbiol* 1997;25:274-278.
- Szymanska CM, King M, Haardt M and Armstrong GD. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infect Immunol* 1995;63(11):4295-4300.
- Wassenaar TM. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol* 1997;10:466-476.
- Wight JP, Rhodes P, Chapman PA, Lee SM, and Finner P. Outbreaks of food poisoning in adults due to *Escherichia coli* O111 and campylobacter associated with coach trips to northern France. *Epidemiol Infect* 1997;119:9-14.
- Winters DK, O'Leary AE, Slavik MF. Polymerase chain reaction for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in artificially contaminated foods. *Lett Appl Microbiol* 1998;27:163-167.
- Yihua Che, Yanbin Li, and Michael Slavik. Detection of *Campylobacter jejuni* in poultry samples using an enzyme-linked immunoassay coupled with an enzyme electrode. *Biosensors & Bioelectronics* 2001;16:791-797.
- CDC Homepage. www.cdc.gov/ncidod/diseases/bacter/campyfaq.htm, 1998.
- Food Safety and Inspection Service (FSIS), U.S. Department of Agriculture. Sentinel site study, 1997

(www.usda.gov/fsis/ophs/fsisrep1.htm).

<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/microbio.htm>, Microbiological Methods, 3/7/2545.

<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fdcampy.html>, Campylobacter: Low-Profile Bug Is Food Poisoning Leader, 3/7/2545.

<http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/Exfood/files/dataresult/17t.htm>, Division of Food-for-Export, 30/5/45.

<http://www.fst.rdg.ac.uk/foodlaw/news/uk-01-77.htm>, FOOD POISONING-Salmonella in Retail Chicken Drops to All Time Low but the Campylobacter Continues, 5/7/2546

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/wgetorg?mode=Info&id=1...>, Campylobacter jejuni, 3/7/2545.

<http://www.niaid.nih.gov/dmid/meetings/gbssumfi.htm>, Development of Guillain Barre Syndrome Following Campylobacter Infection, 3/7/2545.

References for *Salmonella*

Janyapoon K, Korbsrisate S, Thamapa H, Thongmin S, Kanjanahareutai S, Wongpredee N, and Sarasombath S. Rapid detection of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis in blood cultures by a dot blot enzyme-linked immunosorbent assay. Mahidol University Abstracts of International Publications 2000:13.

Jongerijs-Gortemaker BGM, Goverde RLJ, Knapen F van and Bergwerff AA. Surface plasmon resonance (BIAcore) detection of serum antibodies against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. J Immunol Methods 2002;266:33-44.

Mare L, Dicks LMT and Walt van der ML. Characterization of South African isolates of *Salmonella enteritidis* by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. Inter J Food Microbiol 2001;64:237-245.

Szabo EA and Mackey BM. Detection of *Salmonella enteritidis* by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR). Inter J Food Microbiol 1999;51:113-122.

Wang H, Blais BW and Yamazaki H. Rapid confirmation of polymyxin-cloth enzyme immunoassay for group D Saimonellae including *Salmonella enteritidis* in eggs by polymerase chain reaction. Food Control 1995;6(4):205-209.

Warburton D and Oggel J. Detection of Salmonella in foods by the modified 1-2 test.

Yang SJ, Park KY, Kim SH, No KM, et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. Veterinary Microbiol 2002;86:295-301.

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm, Salmonellosis, 24/2/2546.

<http://www.unext.maine.edu/onlinepubs/htmpubs/foodsafety/2258.htm>, Salmonella and Food safety: Questions and Answers, 5/7/2545.

References for Techniques

- Adams MR and Moss MO. Food microbiology. The Royal Society of Chemistry: Cambridge. 1995.
- Che YH, Li Y and Slavik M. Detection of *Campylobacter jejuni* in poultry samples using an enzyme-linked immunoassay coupled with an enzyme electrode. Biosensors & Bioelectronics 2001;16:791-797.
- Che YH, Li Y, Slavik M and Paul D. Rapid detection of *Salmonella typhimurium* in chicken carcass wash water using an immunoelectrochemical method. J Food Prot 2000;63(8):1043-1048.
- Chou CT, Tsai YF, Liu J, Wei JCC, Liao TS, Chen ML and Liu LY. The detection of the HLA-B27 antigen by immunomagnetic separation and enzyme-linked immunosorbent assay-comparison with a flow cytometric procedure. J Immunol Methods 2001;255:15-22.
- Collins CH, Lyne PM and Grange JM. Microbiology methods. 7th ed. Butterworth-Heinemann: Oxford. 1995.
- Cudjoe KS, Hagtvædt T and Dainty R. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA. Inter J Food Microbiol 1995;27:11-25.
- Cudjoe KS, Thorsen LI, Sørensen T, Reseland J, Ølsvik O and Granum PE. Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in faecal and food samples using immunomagnetic separation (IMS)-ELISA. Inter J Food Microbiol 1991;12:313-322.
- Docherty L, Adams MR, Patel P and McFadden J. The magnetic immuno-polymerase chain reaction assay for the detection of *Campylobacter* in milk and poultry. Lett Appl Microbiol 1996;22:288-292.
- Endtz HP, Ang CW, Braak N van den, Luijendijk A, Jacobs BC, Man P de, Duin JM van, Belkum A van and Verbrugh HA. Evaluation of new commercial immunoassay for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in stool samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:794-797.
- Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. 8th ed. AOAC International: MD. 1998.
- Jay JM. Modern food microbiology. 5th ed. Chapman & Hall: New York. 1996.
- Lamoureux M, MacKay A, Messier S, Fliss I, Blais BW, Holley RA and Simard RE. Detection of *Campylobacter jejuni* in food and poultry viscera using immunomagnetic separation and microtitre hybridization. J Appl Microbiol 1997;83:641-651.
- Liu Y and Li Y. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement. J Microbiol Methods 2002;51:369-377.
- Lu P, Brooks BW, Robertson RH, Nielson KH and Garcia MM. Characterization of monoclonal antibodies for the rapid detection of foodborne campylobacters. Inter J Food Microbiol 1997;37:87-91.

Yazdankhah SP, Solverod L, Simon S and Olsen E. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease in composite milk. Vet Microbiol 1999;67:113-125.

Yu LSL, Uknalis J and Tu SI. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. J Immunol Methods 2001;256:11-18.

www.bdbiosciences.com, Bacterial Detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry.

<http://www.aip.org/enews/physnews/1992/split/pnu072-2.htm>, MAGNETOTACTIC BACTERIA, 5/7/2545.

<http://www.probes.com/handbook/figures/1628.html>, Detection and counting of bacteria in milk using the Bacteria..., 5/7/2545

<http://www.microtek-intl.com/antibodies/agglutination.html>, Latex Bead Agglutination, 11/2/2546.

<http://www.microtek-intl.com/antibodies/polyclonal.html>, Polyclonal Antibodies, 11/2/2546

<http://www.biodesign.com/catalog.asp?page=11&product=Polyclonal%20Antibodies%20to%20Infectious%20Agents&new=>, Polyclonal Antibodies to Infectious Agents, 11/2/2546.

<http://www.calbiochem.com/SearchResults.asp?type=dropdown&criteria=ibrio&subtype=productname>, 11/2/2546.

<http://216.55.34.180/testkits/testedmethods.html>, Rapid Tested Kits, 5/7/2545.

<http://www.vicam.com/products/se-verify.html>, Salmonella Screen/ SEVerify, 5/7/2545.

<http://www.consumersunion.org/food/chickbacny693.htm>, CONSUMER REPORTS FINDS 71 PERCENT OF STORE-BOUGHT CHICKEN CONTAINS HARMFUL BACTERIA, 5/7/2545.

<http://www.igen.com>, ORIGIN Technology Video, 9/9/2545.

<http://www.capricornproducts.com/results.html>, PRODUCT:Rabbit anti-Listeria spp.,IgG fraction, 9/9/2545.

<http://www.cortex-biochem.com/b/b9a.htm>, MagaCell? 9/9/2545.

<http://www.leelabs.com/antibody.htm>, Antibodies and Antisera, 9/9/2545.

http://www.biodesign.com/results_2.asp?searchbox=listeria&page=1&group=2, monoclonal and polyclonal antibodies, antigens, assay reagents, 9/9/2545.

http://www.icllab.com/Products/Infectious_Disease_Reagents/infect_dis.htm, Immunology Consultants Laboratory, Inc., 9/9/2545.

References for Quality Assurance

Adams MR and Moss MO. Food microbiology. The Royal Society of Chemistry: Cambridge. 1995.

Afghanistan Health Update 14 July 2002. WHO-Afghanistan.

Collins CH, Lyne PM and Grange JM. Microbiology methods. 7th ed. Butterworth-Heinemann: oxford. 1995.

Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. 8th ed. AOAC International: MD.

- 1998.
- Garadine D, Brendan K, Justine F and Sheridan JJ. Routine diagnostic tests for food-borne pathogens.
- Hathaway SC, Cook RL and Berry Marchall. Realistic Expectations For Bacterial Quality of Meat The New Zealand Perspective.
- ICMSF. Micro-organisms in foods: microbiological specifications of food pathogens. London: Blackie academic and Professional; 1996.
- Jay JM. Modern food microbiology. 5th ed. Chapman & Hall: New York. 1996.
- John TE, Ward LR, Frost JA and Willshaw GA. The emergence and spread in food-borne bacteria. Inter J Food Microbiol 2001;62:1-5.
- Kraidej L. HACCP MICROBIOLOGICAL ASPECTS. The 1 st Kasetsart University/University of Tennessee Joint Workshop on Recent Advance in Food Safety : From Farm to Fork, 2001.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. 9th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 2000.
- Mageau RP. Most Probable Number Tables. USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 1998; 1&2:A-42-A-48.
- Mahan LK, Escott-Stump S. Krause's food, nutrition and diet therapy. 10th ed. Philadelphia: W.B.Saunders; 2000.
- Miller P. Microbiological Testing in Regulatory Meat Inspection Programs: An Australian Perspective.
- Ray B. Fundamental food microbiology. 2nd ed. London: CRC Press; 2001.
- Talaro KP, Talaro A. Foundations in microbiology. 3rd ed. Boston: McGraw-Hill; 1999.
- Vibulsresth P. The role of SSOP and HACCP System to enhance Food Safety. The 1 st Kasetsart University / University of Tennessee joint workshop on Recent Advance in Food Safety: From Farm to Fork.
- Wang RF, Cao WW and Cerniglia CE. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. J Appl Microbiol 1997;83:727-736.
- Wedding L. Dioxin In Belgian Animal Products. NFPA J 1999:28-33.
- เอกสาร การประชุม 15 มิ.ย. 2544 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ The 1 st Kasetsart University/University of Tennessee Joint Workshop on Recent Advance in Food Safety : From Farm to Fork, 2000, โดยคุณพรศิลป์ พัชรินทร์ – ตนะกุล.
- ฝ่ายวิจัย บริษัทเงินทุนอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย. Frozen Chicken Meat. ภาวะธุรกิจและอุตสาหกรรมปี 2543 และแนวโน้มในอนาคต:1-10.
- สำนักงานชุดโครงการผลิตผลจากสัตว์ฯ สกว. บันทึกการประชุมระดมความคิด เรื่อง แนวทางการวิจัยเพื่อพัฒนาคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ วันที่ 20-21 เมษายน ณ โรงแรมชลจันทร์ พัทยา รีสอร์ท จังหวัดชลบุรี.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. ระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุมในการผลิตอาหารและคำแนะนำในการนำไปใช้. พิมพ์เพิ่มเติมครั้งที่ 4 พ.ศ. 2543
<http://www.foodhaccp.com/d7.html>, Detection of Vibrio, 9/9/2545.
<http://www.foodstandards.gov.uk/news/pressreleases/salmonellachick>, Salmonella in retail chicken drops to all time low but the battle with campylobacter continues, 5/7/2545.
<http://www.niiddk.nih.gov/health/digest/pubs/bacteria/bacteria.htm>, Bacteria and Foodborne Illness, 3/7/2545.
<http://www.uni-leipzig.de/forschb/25000/25210.htm>, Lebensmittelhygiene und Verbraucherschutz Food Hygiene and Consumer Protection, 5/7/2545.
<http://www.watertalk.org/wag/article9.html>, An Overview of Number and Sources of Bacteria, 5/7/2545

ภาคผนวก
Appendices

Campylobacter : Multiplex-PCR Protocol

PCR reaction

		Concentration
Buffer	10 X	1
MgCl ₂	25 mM	2
dNTPs	5 mM	0.2
Primer pg3	10 mM	0.4
Primer pg50	10 mM	0.4
Primer C1	10 mM	0.4
Primer C4	10 mM	0.4
Taq	5 U/ml	0.25 U/25 ml

PCR Temperature Profile

Pre heat	94°C	5 min
Denaturing	94°C	1 min
Annealing	45°C	1min
Extension	72°C	1min
Additional extension	72°C	7 min
	4°C	∞

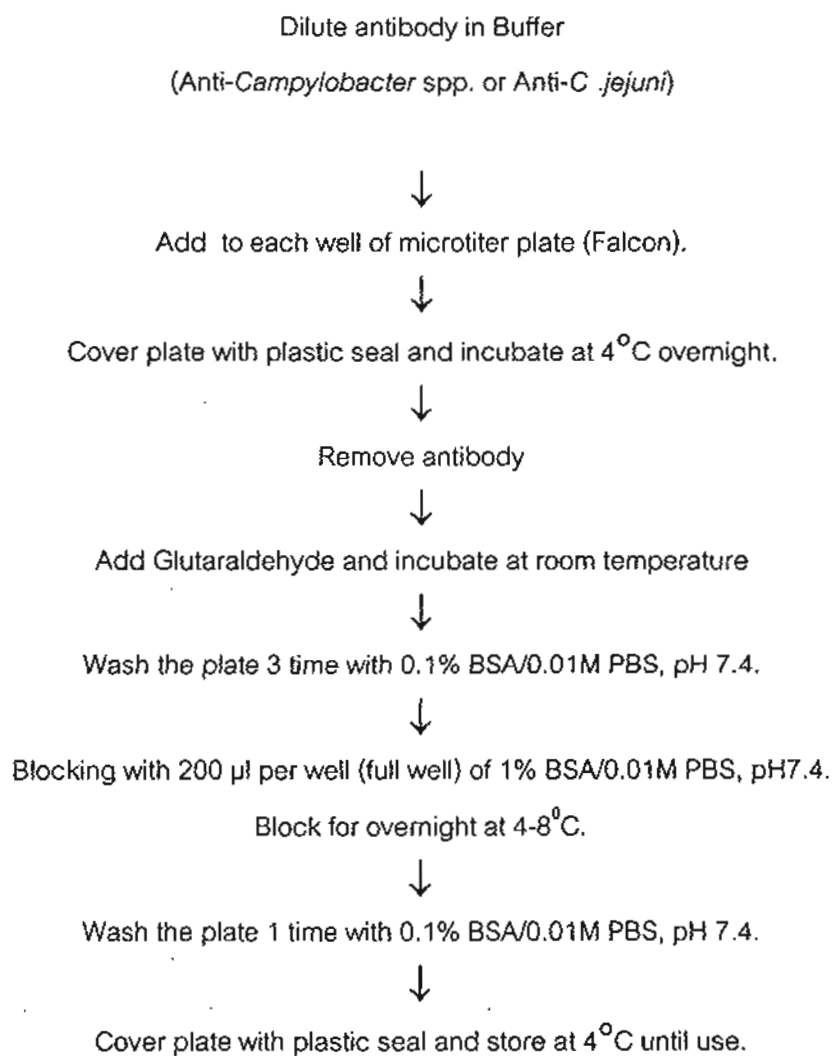
←
25 cycles

Agarose Gel Electrophoresis

- 1.5% Agarose gel
- run at 100v for 60min
- staining with a 0.5µg/ml ethidium bromide

ELISA

COATING PLATE



Detection

Washing each well with 350 μ l 0.1% BSA / 0.01M PBS pH7.4, 1 time



Add Sample to each well.



Cover the plate and incubate at 37°C



Washing each wells with 0.1% BSA/0.01M PBS pH7.4, 3 times



Prepare secondary antibody



Add secondary antibody each well



Cover the plate and incubate at 37°C



Washing each wells with 0.1% BSA/0.01M PBS pH7.4, 3 times



Add substrate



Incubate at room temperature 10 min

(or until the color is developed)



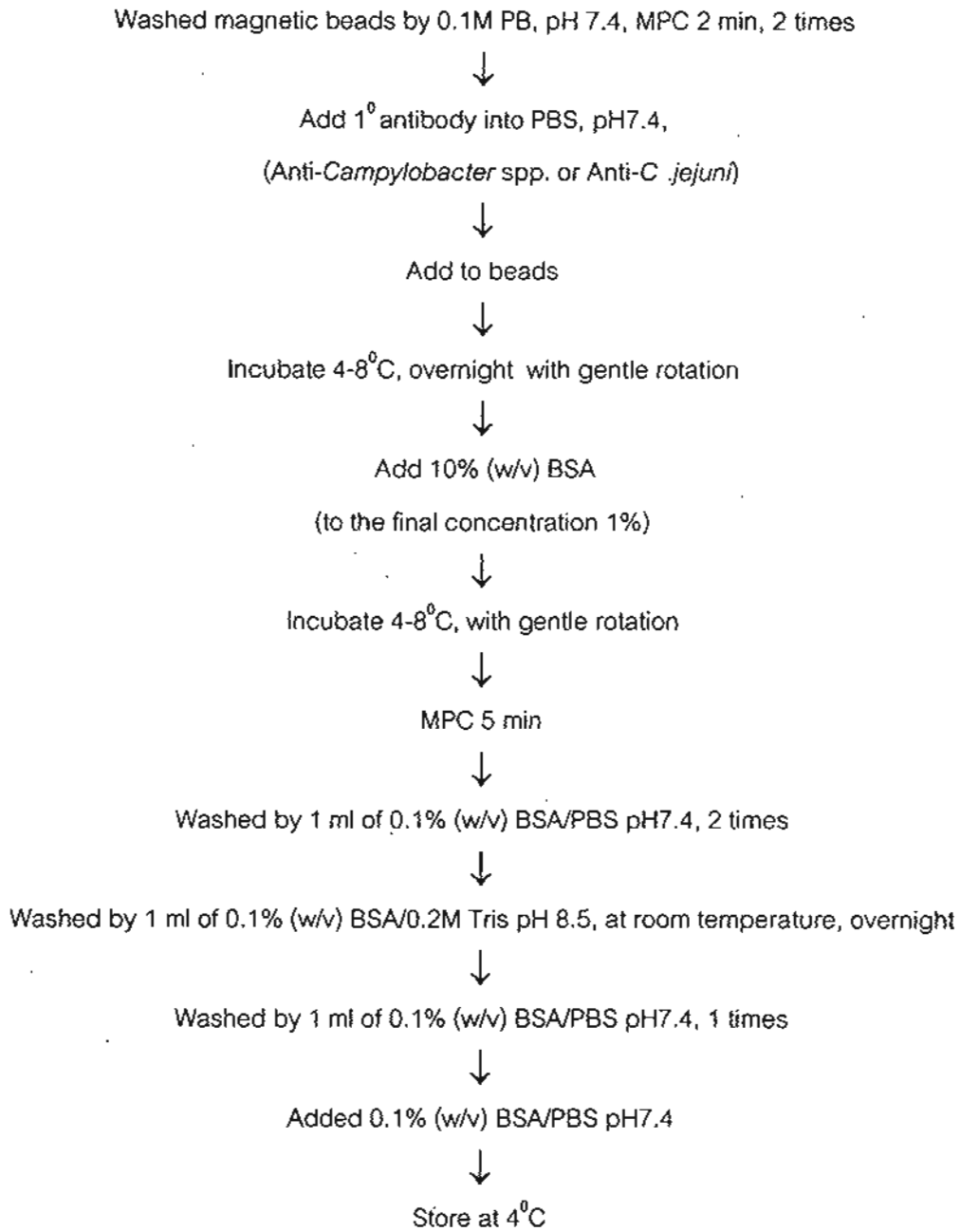
Stop reaction



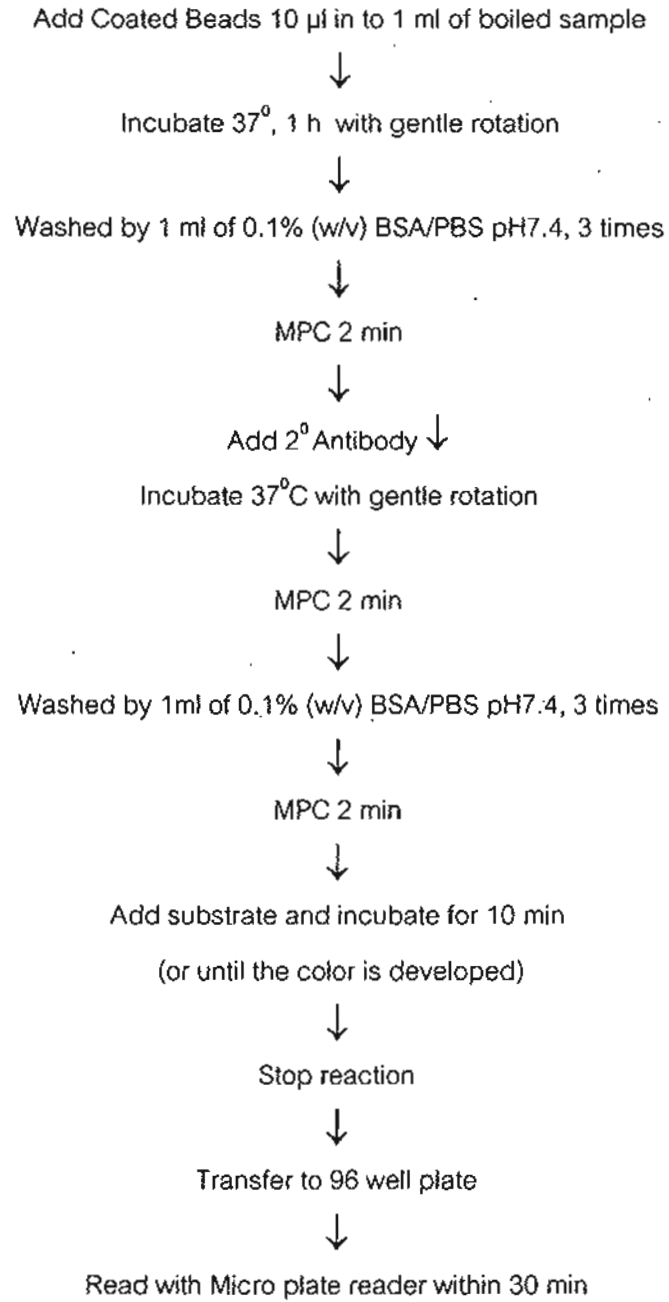
Read with Microtiter plate reader within 30 min

IMS-ELISA

Coat Bead



Immunomagnetic Separation



คำนวณต้นทุนต่อการตรวจ *Campylobacter*

ELISA / 100 well plate

ELISA for <i>Campylobacter</i> spp.	9,398	บาท	
ELISA for <i>C. jejuni</i>	14,762	บาท	(no commercial available)

Immunassay (IMS-ELISA) / 1 ml (100 Tests)

IMS-ELISA for <i>Campylobacter</i> spp.	18,399	บาท	(no data available)
IMS-ELISA for <i>C. jejuni</i>	23,817	บาท	(no commercial available)

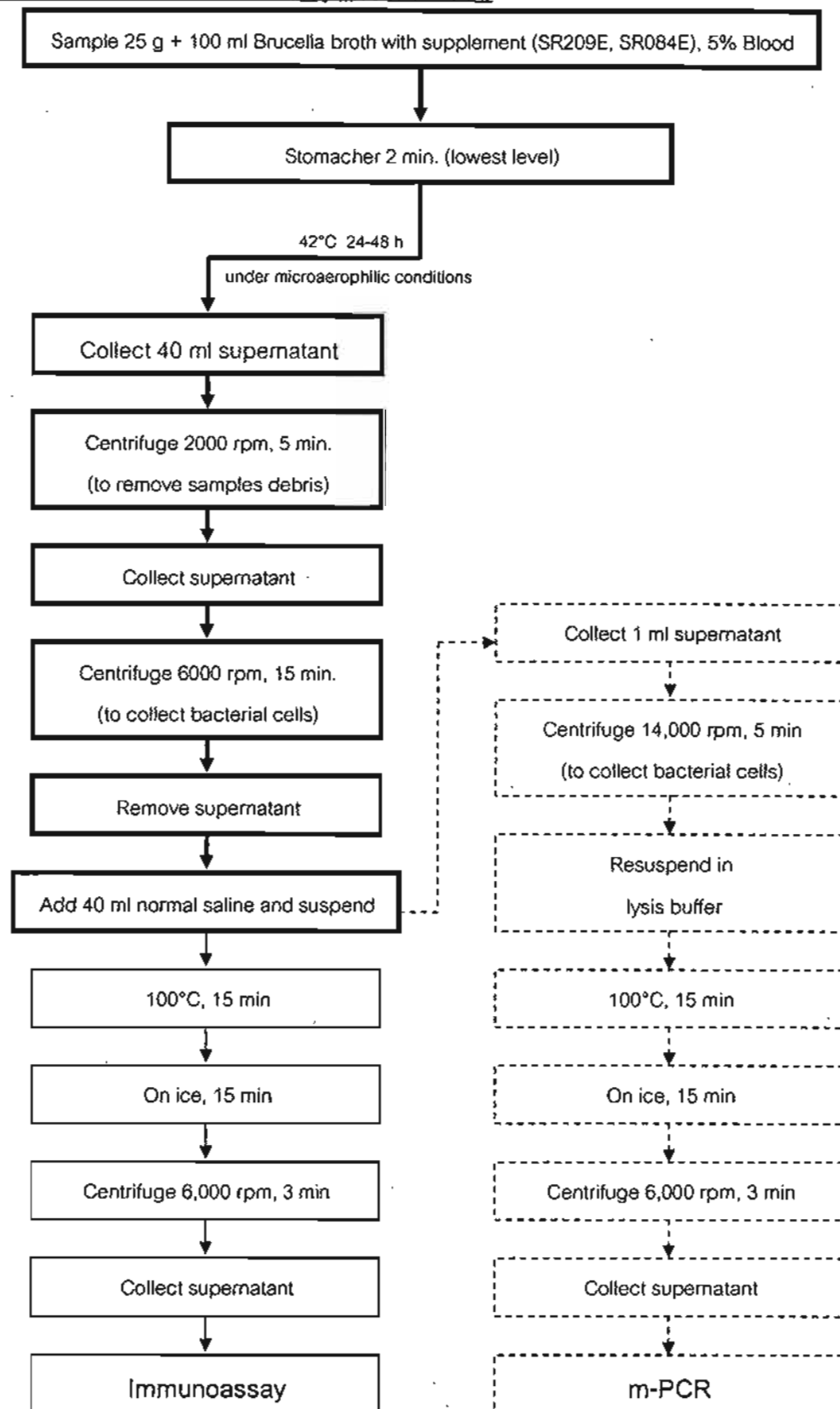
mPCR /100 tests 18,438 บาท

ต้นทุน ของ Medium

Medium ที่ต้องใช้ ประมาณ 250 บาท

ต้นทุนค่าวัสดุ และอุปกรณ์เตรียมอุปกรณ์ ประมาณ 100 บาท

ขั้นตอนการตรวจการปนเปื้อน *Campylobacter* ในอาหาร



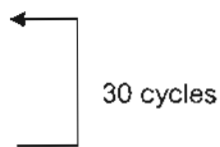
Salmonella : Multiplex-PCR Protocol

PCR reaction

	Concentration
Buffer 10 X	1
MgCl ₂ 25 mM	2
dNTPs 5 mM	0.2
Primer IE1R 10 mM	0.4
Primer IE1L 10 mM	0.4
Primer Fli15 10 mM	0.4
Primer Typ04 10 mM	0.4
Primer <i>fimY</i> 1 10 mM	0.4
Primer <i>fimY</i> 2 10 mM	0.4
Taq 5 U/ml	1 U/25 ml

PCR Temperature Profile

Pre heat	94°C	5 min
Denaturing	94°C	1 min
Annealing	45°C	1min
Extension	72°C	1min
Additional extension	72°C	7 min
	4°C	∞



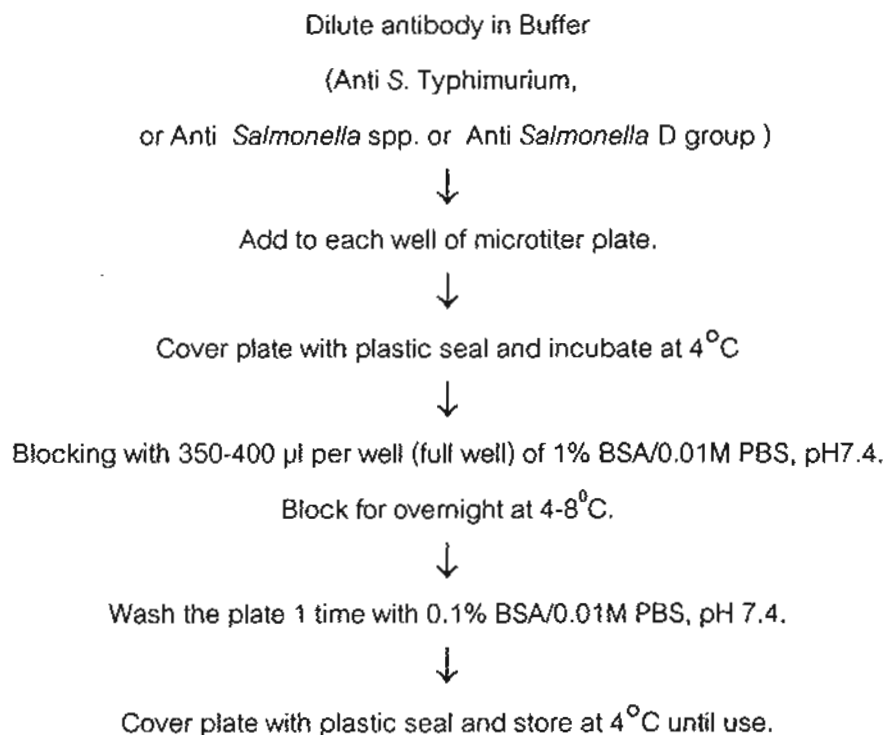
30 cycles

Agarose Gel Electrophoresis

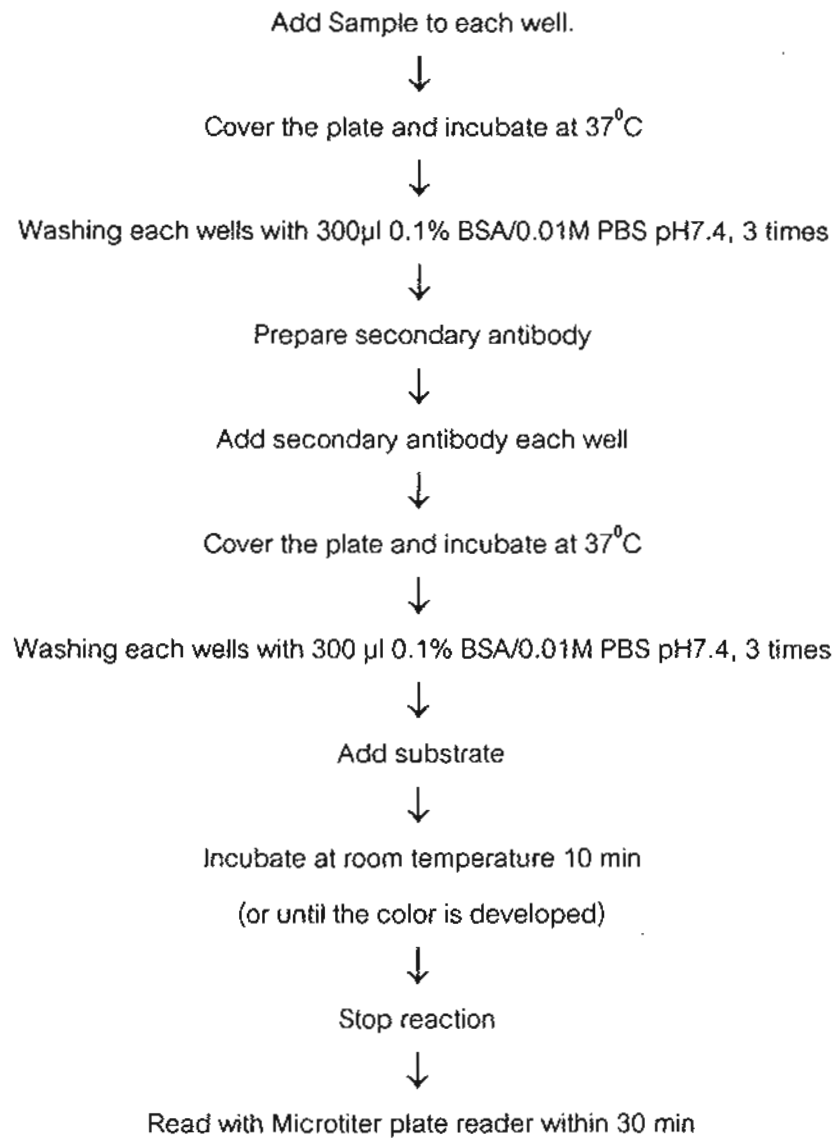
- 1.2% Agarose gel
- run at 100v for 60min
- staining with a 0.5µg/ml ethidium bromide

ELISA

COATING PLATE

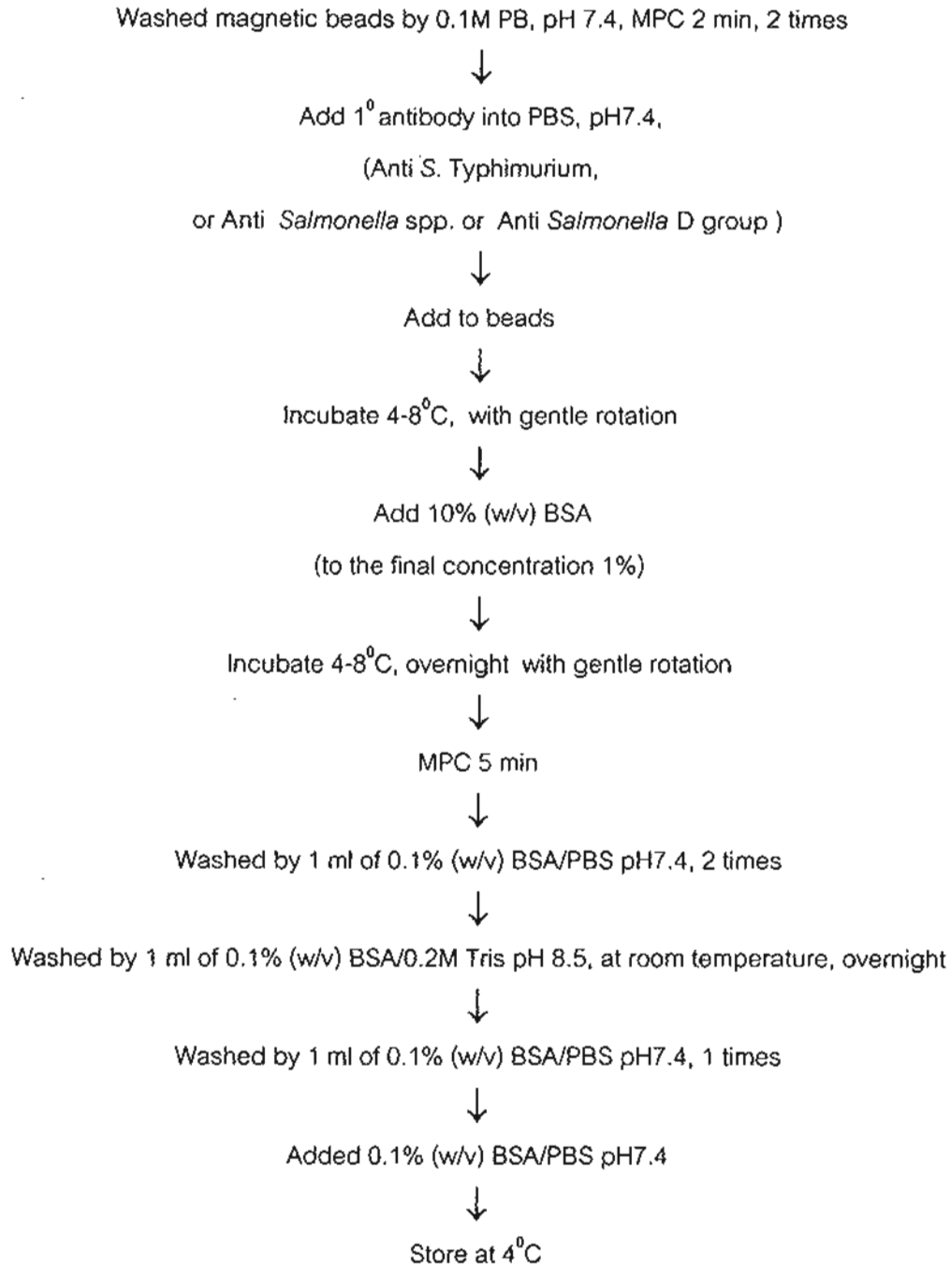


Detection

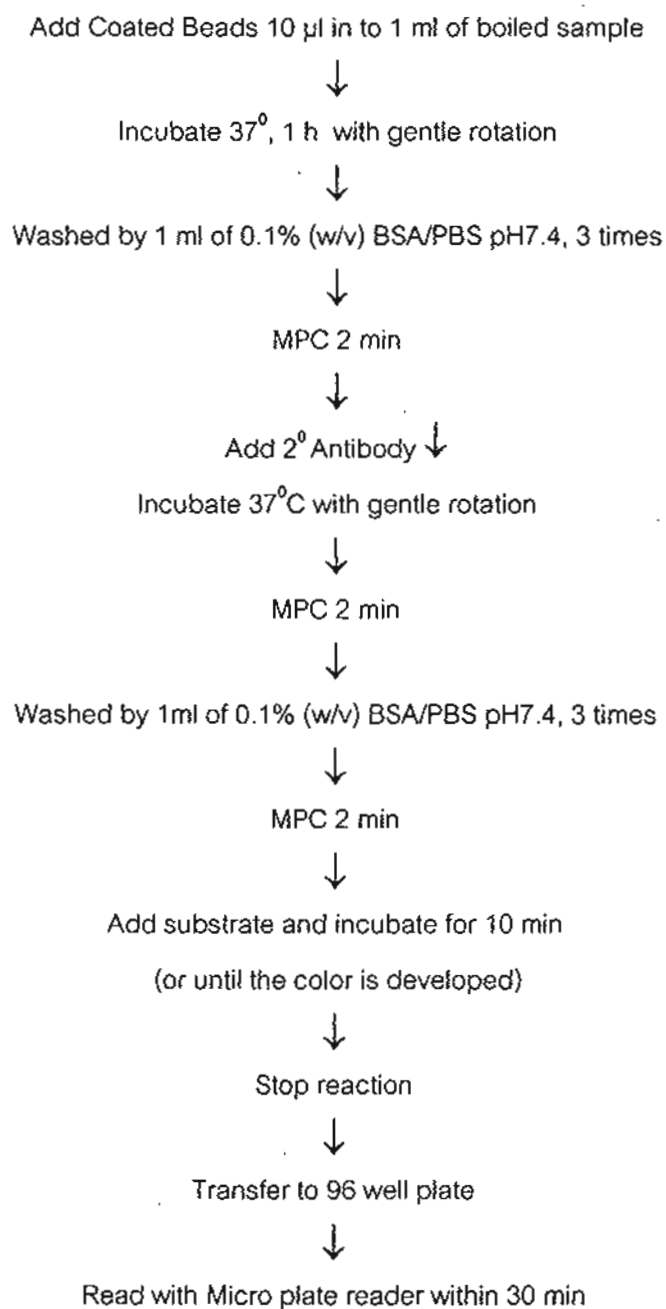


IMS-ELISA

Coat Bead



Immunomagnetic Separation



คำนวณต้นทุนต่อการตรวจ *Salmonella*

ELISA / 100 well plate

ELISA for <i>Salmonella</i> spp.	8,287 บาท	
ELISA for <i>S. Typhimurium</i>	19,173 บาท	(no commercial available)
ELISA for <i>Salmonella</i> group D	10,159 บาท	(no commercial available)

Immunassay (IMS-ELISA) / 1 ml (100 Tests)

IMS-ELISA for <i>Salmonella</i> spp.	16,746 บาท	
IMS-ELISA for <i>S. Typhimurium</i>	27,766 บาท	(no commercial available)
IMS-ELISA for <i>Salmonella</i> group D	18,628 บาท	(no commercial available)

mPCR / 100 tests

13,716 บาท

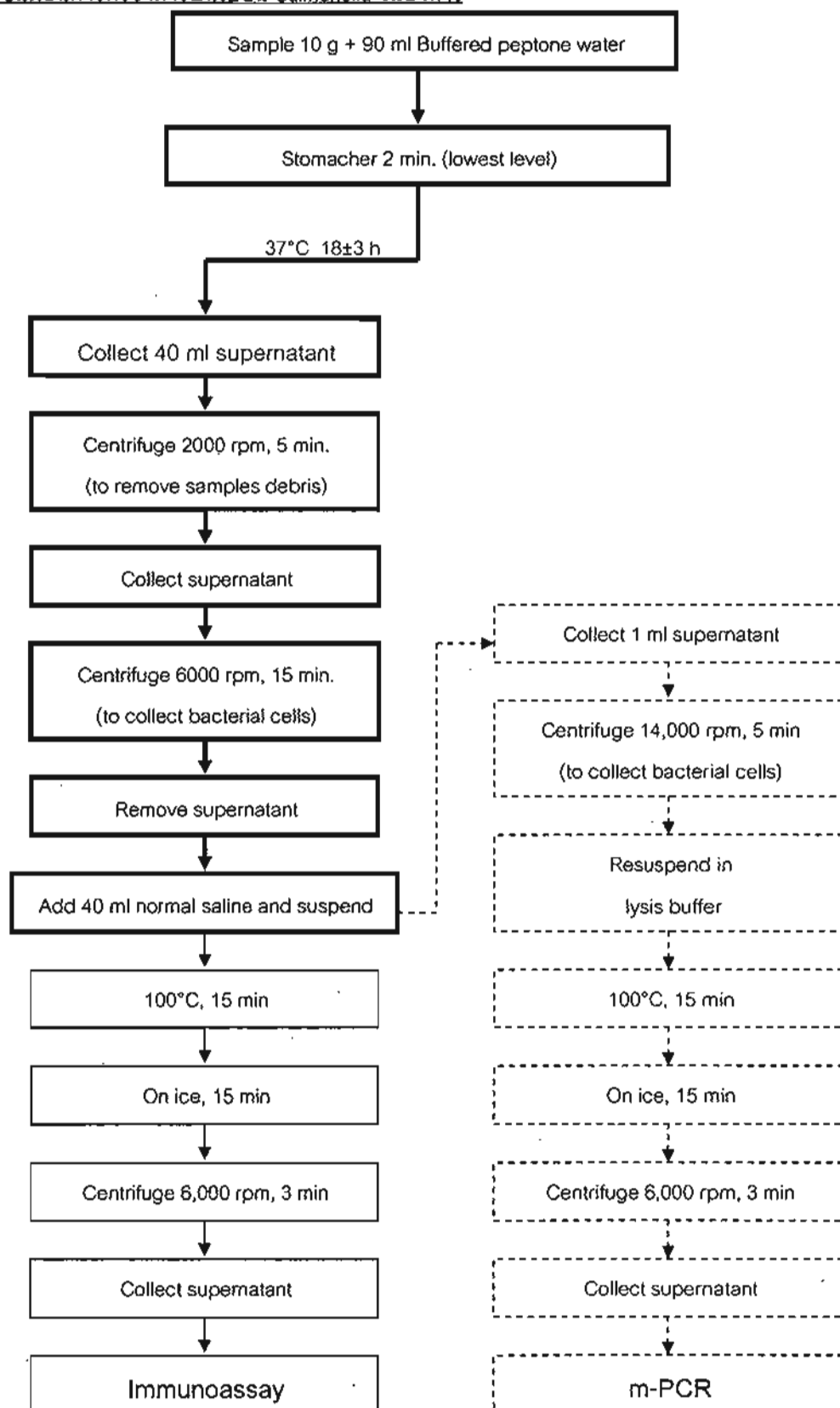
ต้นทุน ของ Medium

Medium ที่ต้องใช้ ประมาณ	100 บาท
--------------------------	---------

ต้นทุนค่าวัสดุ และการเตรียมอุปกรณ์ประมาณ

100 บาท

ขั้นตอนการตรวจการปนเปื้อน *Salmonella* ในอาหาร



Preparation of Genomic DNA from Bacteria
Basic Protocol : Mini prep of Bacterial Genomic DNA

Material

TE Buffer
10% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (SDS)
20 mg/ml Proteinase K
5M NaCl
CTAB/NaCl solution
24:1 Chloroform : Isoamyl alcohol
25:24:1 Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol
Isopropanol
70% Ethanol

1. Grow 5 ml bacterial culture to saturation. Microcentrifuge 1.5 ml of the culture 2 min
2. Resuspend pellet in 567 μ l TE Buffer by repeated pipetting. Add 30 μ l of 10% SDS and 3 μ l of 20 mg/ml Proteinase K, mix, and incubate 1 hr at 37°C
3. Add 100 μ l of 5M NaCl and mix thoroughly. Add 80 μ l CTAB/NaCl solution, mix, and incubate 10 min at 65°C
 - Polysaccharides and other contaminating macromolecule can be removed starting with this step.
4. Add equal volume Chloroform/Isoamyl alcohol, mix, and microcentrifuge 4 to 5 min. Transfer the supernatant to a fresh tube. If it is difficult to remove the supernatant, remove the interface first with a toothpick.
5. Add equal volume Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol, mix, and microcentrifuge 4 to 5 min. Transfer the supernatant to a fresh tube.
 - With some bacteria strains the interface formed after chloroform extraction is not compact to allow easy removal of the supernatant. In such case, most of the interface can be fished out with a sterile toothpick before removal of the supernatant. Any remaining CTAB precipitate is then removed in the Phenol/Chloroform extraction.
6. Add 0.6 Volume Isopropanol and mix gently until DNA precipitates. Transfer precipitate with a sealed pasteur pipet to 1 ml of 70% ethanol and wash.
 - Alternatively, the precipitate can be microcentrifuge briefly and washed with 1 ml of 70% ethanol.
7. Microcentrifuge 5 min, discard supernatant, and dry briefly in a lyophilizer. Resuspend in 100 μ l TE Buffer. Use 10 to 15 μ l per restriction digest.

Support Protocol : Removal of Polysaccharide from Existing Genomic DNA Preps.

การสกัด DNA โดยใช้ Triton X-100

1. ตัวอย่างเชื้อใน LB ที่บ่มที่ 37°C, ข้ามคืน 1 ml ใส่ใน microcentrifuge tube
- 2.ปั่นเหวี่ยงที่ 1,4000 rpm 3 นาที เพื่อเก็บ เซลล์
3. เท mediaทิ้ง เติม 2% Triton X-100/TE buffer* ลงไป 500 µl ผสมให้เข้ากัน
4. ดมในน้ำเดือด 15 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งอีก 15 นาที
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm 3 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์ออก
6. เก็บน้ำใสส่วนบน (เติม NaN₃ ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.01%)
7. เก็บไว้ที่ -20°C
8. ใช้ 10 µl เป็น DNA template สำหรับปฏิกิริยา PCR

* 2% Triton X-100/TE buffer

- 2 ml Triton X-100
- เติม TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) ให้ได้ปริมาตรรวม 100 ml
- 121°C, 15 min

1. Adjust NaCl concentration to 0.7M and add 0.1 volume CTAB/NaCl solution (Step 3 of Basic Protocol)
2. Extract with Chloroform/Isoamyl alcohol (Step 4 of Basic Protocol)
 - A white interface indicates removed of polysaccharide and other contaminating macromolecule.
3. Repeat CTAB extraction (Step 3 of Basic Protocol) and Chloroform/Isoamyl alcohol extraction (Step 4 of Basic Protocol) until no interface is visible

Reference : Murry, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. Nucl. Acids Res. 8: 4321-4325.

From : Ausubel, Frederick M. 1999. Short Protocols in Molecular Biology, 4th edition. John Wiley & Son, INC.

บทความสำหรับการเผยแพร่

Campylobacter และ *Salmonella* เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เรียกว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (food-borne diseases)

สำหรับ *Campylobacter* หากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร และได้รับเชื้อจำนวนเพียง 400-500 ตัว ก็สามารถก่อให้เกิดอาการได้ โดยอาจมีความรุนแรงจนถึงเสียชีวิตได้ ปัจจุบันในรายงานพบว่าเป็นสาเหตุอันดับหนึ่ง (45%) ของเชื้อที่พบในอาหารที่ก่อให้เกิดอาการต่อระบบทางเดินอาหารในสหรัฐอเมริกา ในประเทศไทยแม้จะมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อกลุ่มนี้บ้างแต่ยังไม่มีรายงานระบาดวิทยาของเชื้อมีเปรียบเทียบกับเชื้อตัวอื่นๆ แต่คาดว่าน่าจะมีตัวเลขการติดเชื้อมากเช่นเดียวกับในประเทศอื่นๆ ในปี 2535 ประมาณกันว่ามีผู้ติดเชื้อนี้ในสหรัฐประมาณ 2.5 ล้านคน แต่ล่าสุดในปัจจุบันคาดว่าจะมีผู้ติดเชื้อประมาณปีละ 4 ล้านคน โดยปกติ *Campylobacter* อาจพบได้ในบริเวณทางเดินอาหารของทั้งของคนและสัตว์โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรค การปนเปื้อนของเชื้อมักจะเกิดขึ้นในเนื้อไก่จากโรงงาน รวมทั้งเนื้อสัตว์อื่นๆ นมที่ไม่ผ่านการ pasteurized และน้ำ ซึ่งเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในอาหารและเนื้อไก่แช่แข็งเชื้อยังสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ หากรับประทานอาหารที่ไม่สุก ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ หรือการปรุงอาหารที่ใช้อุปกรณ์การครัวร่วมกัน เช่น เขียง มีด เป็นต้น ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ จะก่อให้เกิดการติดเชื้อ และเกิดอาการทางพยาธิสภาพขึ้นกับสภาพร่างกายของผู้บริโภค ผู้ป่วยจะมีอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดศีรษะ มีไข้ ตามด้วยอาการท้องเดิน ปวดท้อง คลื่นไส้ ในเด็กเล็กอาจก่อให้เกิดอาการชักได้ การติดเชื้อโดยทั่วไปอาจหายได้โดยไม่ต้องรักษาหรือให้ยาปฏิชีวนะโดยจะมีอาการประมาณ 2-10 วัน การให้ยาปฏิชีวนะมักจะจ่ายให้ผู้ที่มีการรุนแรง มีรายงานพบอาการแทรกซ้อน เกิดการติดเชื้อร่วมทางกระเพาะปัสสาวะ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปัจจุบันมีรายงานที่พบความสัมพันธ์ของเชื้อ ว่าเป็นปัจจัยสำคัญกับการเกิดความรุนแรงของโรค autoimmune ได้แก่ โรค Guillain-Barre syndrome, rheumatoid arthritis และ rheumatic ซึ่งกำลังมีผู้ศึกษาวิจัยมากขึ้น จึงจัดว่าการติดเชื้อนี้เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ แม้จะไม่มีอาการของโรคต่อระบบทางเดินอาหารรุนแรงเท่ากับเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการตัวอื่นๆ แต่ก็มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการดำรงชีวิตประจำวันและการทำงาน นอกจากนั้นผู้ป่วยส่วนหนึ่งก็ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาให้หายจากการติดเชื้อ ในปัจจุบันพบรายงานการติดเชื้อของเชื้อ *Campylobacter* ต่อยาด้านจุลชีพที่นิยมใช้ในการรักษาอาการท้องเดินจากผู้ป่วยทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ จึงทำให้การรักษาไม่ได้ผลและมีอาการรุนแรงขึ้นจำเป็นต้องปรับการใช้ยารักษาให้เหมาะสม ดังนั้นจึงควรระมัดระวังการติดเชื้อที่มักมีสาเหตุมาจากเนื้อไก่ที่มีการปนเปื้อน คาดว่าในอนาคตจะมีข้อกำหนดควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในเนื้อไก่ และอาหารส่งออกไปยัง

ประเทศต่างๆ ขณะนี้แม้จะยังไม่มีข้อกำหนดบังคับแต่ก็มีลูกค้าเอกชนบางรายในต่างประเทศที่ต้องการสินค้าที่มีคุณภาพสูงกำหนดให้ตรวจสอบเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ส่งออกให้ ดังนั้นผู้ส่งออกของประเทศไทย ที่ต้องการเข้าสู่ตลาดของประเทศที่คาดว่าจะมีข้อกำหนดการตรวจเชื้อเหล่านี้ในอนาคต จำเป็นต้องมีการเตรียมวิธีต่างๆ ในการตรวจเชื้อนี้

Salmonella

Salmonella เป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในคน จะก่อให้เกิด มีไข้ ท้องปวดเกร็ง ประมาณ 12-72 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ โรคอาจหายภายใน 4-7 วัน โดยไม่ทำการรักษา แต่บางคนจะเกิดอาการรุนแรงต้องรักษา เชื้อโรคจะแพร่กระจายจากระบบทางเดินอาหารและเข้ากระแสโลหิต และอาจเป็นอันตรายถึงชีวิต โดยเฉพาะในเด็กและผู้ที่ย่างกายไม่แข็งแรงมีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ แม้จะทำการรักษาและให้ยาปฏิชีวนะที่ในระยะเริ่มติดเชื้อแล้วก็ตาม ปัจจุบันมีรายงานมากมายถึงการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ ผู้ป่วยมักจะมีอาการทางเดินอาหารเป็นเวลานานกว่าที่หายจากการติดเชื้อและกลับสู่สภาวะปกติ มีคนส่วนน้อยที่มีอาการของโรคที่พัฒนาเกิดอาการปวดตามข้อ ระบายเคืองตา และมีอาการปวดเมื่อยถ่ายปัสสาวะที่เรียกว่าเป็นอาการของ Reiter's syndrome ซึ่งอาจมีอาการเกิดเป็นเชนนานเป็นเดือน หรือ เป็นปี และอาจมีอาการกรอักเสบตามข้อเรื้อรัง ซึ่งมักจะรักษาไม่หาย

เชื้อ *Salmonella* อาศัยอยู่ได้ตามลำไส้ทั้งของมนุษย์และสัตว์ เช่น นก ไก่ เป็นต้น เชื้อจะสามารถติดมายังมนุษย์โดยรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน อาหารที่ปนเปื้อนอาจจะไม่มีกลิ่นผิดปกติใดๆ ลักษณะปกติ การปนเปื้อนมักเกิดสาเหตุจากอาหารพวกเนื้อสัตว์ต่างๆ เช่น เนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อไก่ สัตว์ปีกต่างๆ นม ไข่ และพบว่าอาหารต่างๆ สามารถเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อได้ อาหารที่ปรุงสุกแล้วเชื้อจะตาย การปนเปื้อนอาจเกิดจากผู้ประกอบอาหารหรือมีน้ำที่ด้านบริการอาหารที่ล้างมือไม่สะอาดหลังเข้าห้องน้ำ หรือจากสัตว์เลี้ยง และเกิดการปนเปื้อนทั้งเชื้อจากตนเอง หรือผู้อื่น การติดเชื้อในสหรัฐอเมริกา มีรายงานการติดเชื้อประมาณ 40,000 ราย/ปี และประมาณ 1,000 ราย จะมีอาการติดเชื้อที่รุนแรง

เชื้อในกลุ่มของ *Salmonella* จะมีประมาณมากกว่า 2,300 serotypes แต่จะพบว่า *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium พบเป็นสาเหตุสำคัญเกินครึ่งที่ก่อการติดเชื้อจากสัตว์มายังคนโดยที่ในสัตว์จะไม่มีอาการ การปนเปื้อนจากเนื้อสัตว์ หากได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมเชื้อจะถูกทำลาย แต่พบว่าบางครั้งความร้อนที่ทำการปรุงอาหารไม่เพียงพอที่จะทำให้อสุกได้ทั่วก้อนเนื้อ ซึ่งยังคงทำให้ติดเชื้อได้

การผลิตอาหารเพื่อการอุปโภคในประเทศ จำเป็นจะต้องผลิตของให้มีคุณภาพและมีมาตรฐานซึ่งเป็นหลักของสากล เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาคุณภาพชีวิตและเพื่อปรับมาตรฐานและสุขอนามัยที่ดีขึ้นของประชาชนผู้บริโภคในประเทศ สำหรับการนำผลิตผลต่างๆ ออกสู่

ตลาดโลกนั้น จำเป็นต้องผลิตสินค้าที่มีคุณภาพโดยปฏิบัติตามข้อตกลงและมาตรการทางกฎหมายของประเทศคู่ค้า ซึ่งจะต้องสอดคล้องกับมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ จึงจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมาตรฐานเข้าสู่ตลาดโลก มีโอกาสในการแข่งขันอันจะเป็นประโยชน์ต่อการค้าและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพที่มีประสิทธิภาพและให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วและให้ผลถูกต้อง

จากข้อมูลนี้จึงนำมาสู่การทำวิจัย เพื่อพัฒนาชุดตรวจสำเร็จสำหรับตรวจสอบเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้ โดยได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อที่ปนเปื้อนปริมาณน้อยได้ง่ายและรวดเร็วด้วยวิธี multiplex PCR ซึ่งใช้เวลาในการตรวจประมาณ 6-8 ชั่วโมง และ วิธี immunoassay ที่ตรวจได้ง่าย สะดวก และ รวดเร็ว ซึ่งปัจจุบันชุดตรวจสอบต้องนำเข้าจากต่างประเทศ สำหรับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นจะมีต้นทุนในการผลิตประมาณครึ่งหนึ่งของต่างประเทศ แต่มีผลในการตรวจสอบที่ได้วิจัยแล้วใกล้เคียงกัน โดยได้นำมาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อที่อาจมีในเนื้อไก่ที่ผลิตในโรงงาน และในฟาร์มเลี้ยงไก่ นอกจากนี้ชุดตรวจสอบหลายชนิดที่ได้พัฒนาขึ้นมา ยังไม่พบข้อมูลการผลิตหรือจำหน่ายในต่างประเทศ

งานวิจัยที่รายงานนี้ เป็นความร่วมมือการศึกษาระหว่างบุคลากรของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ได้ร่วมกันพัฒนาพัฒนาชุดตรวจสำเร็จสำหรับเชื้อแต่ละชนิดต่อไปนี้ ในรูปแบบของ ELISA, IMS-ELISA และ m-PCR คือ

กลุ่มเชื้อ *Campylobacter*

- *Campylobacter* spp.
- *Campylobacter jejuni*

กลุ่มเชื้อ *Salmonella*

- *Salmonella* spp.
- *Salmonella* Typhimurium
- *Salmonella* Enteritidis

โดยคาดว่าคณะผู้วิจัยสามารถให้บริการการตรวจสอบในช่วงเริ่มต้นได้ที่คณะเภสัชศาสตร์ ม.มหิดล ซึ่งกรมปศุสัตว์ หน่วยงานอื่นๆ และโรงงานต่างๆ จะเป็นผู้ที่สามารถใช้ชุดตรวจสอบนี้ได้เองในอนาคต การพัฒนาชุดตรวจสอบในรูปแบบอื่นที่จะให้ความสะดวกในการตรวจสอบยิ่งขึ้นในอนาคต สามารถพัฒนาขึ้นแทนการนำเข้า เนื่องจากมีแนวทางวิธีการศึกษา ตลอดจนการศึกษาเชิงวิทยาศาสตร์ของเชื้อกลุ่มนี้ในด้านต่างๆ สามารถนำมาศึกษาได้ในเชิงวิทยาศาสตร์พื้นฐานและการนำไปประยุกต์ต่อไป

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมา	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
1. พัฒนาและเตรียม immunodiagnostic kit สำหรับตรวจเชื้อ <i>Campylobacter</i> spp. <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>	ทดสอบวิธีการตรวจเชื้อด้วย Microbiology method PCR Immunoassay	- เตรียมการทดสอบและแยกเชื้อโดยวิธี conventional microbiology method - เตรียมการทดสอบและแยกเชื้อโดยวิธี PCR - เตรียมทำ immunoassay kit วิธี -immunomagnetic-immunoassay beads - และ ELISA - ตรวจตัวอย่างจากไก่ ที่เก็บจากห้องตลาด ประมาณ 20-30 ตัวอย่าง ระยะเวลาเก็บตัวอย่าง 3 เดือน และประเมินผลการตรวจสอบที่ได้ - ทดสอบ sensitivity, specificity, stability, consistency ของ kit ที่เตรียมตามระยะเวลา 0,3,6,9 เดือน	1.1 ทราบถึงวิธีการ ชนิดของ media และสามารถแยกเชื้อ โดย conventional method 1.2 ทราบวิธีการทำ PCR ที่จะใช้ตรวจสอบ ทราบการเตรียม immunomagnetic-immunoassay beads และ ELISA 1.3 ทราบวิธีการตรวจตัวอย่างจากเนื้อไก่ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น 1.4 ทราบผลของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นในด้านความไว ความจำเพาะ และความคงตัวในระยะเวลาที่ศึกษา 0, 3, 6, 9 เดือน
2. พัฒนาและเตรียม immunodiagnostic kit สำหรับตรวจเชื้อ <i>Salmonella</i> spp. <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Enteritidis</i>	เช่นเดียวกับข้อ 1	เช่นเดียวกับข้อ 1	เช่นเดียวกับข้อ 1
3. ประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนของเชื้อจากโรงงานไก่โดยใช้ immunodiagnostic kit ที่พัฒนา	เก็บตัวอย่างในโรงงานไก่ที่ได้รับความร่วมมือ โดยจะเก็บทั้งหมด เป็นเวลา ประมาณ 4-6 เดือน	- กำหนดการเก็บตัวอย่างจากจุดต่างๆในโรงงานไก่ๆ คือ - น้ำจากจุดล้างซาก 1 - น้ำจากจุดล้างซาก 2 - บนราวแล่ ส่วนที่ 1 - บนราวแล่ ส่วนที่ 2 - Finished product - ตรวจตัวอย่างที่เก็บโดยวิธี PCR และ immunoassay ที่เตรียมขึ้น	ทราบผลทุกอย่างตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ โดยที่ชุดตรวจสอบสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ดี แต่ในโรงงานไม่พบการปนเปื้อน

		- ประเมินค่าที่ได้เป็นระยะๆ (ช่วง 4-6 เดือน) หากมีการปนเปื้อนดูการเปลี่ยนแปลงผลของตัวอย่างภายหลังการแจ้งผลแต่ละครั้ง - สรุปผลจากโรงงานไก่	
4. ประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนของเชื้อจากฟาร์มกึ่ง โดยใช้ immunodiagnostic kit ที่พัฒนา	เก็บตัวอย่างในโรงงานกึ่งที่ได้รับความร่วมมือ โดยจะเก็บทั้งหมด เป็นเวลาประมาณ 4-6 เดือน	- กำหนดการเก็บตัวอย่างจากจุดต่างๆ ในโรงงานจุดละ 3 ตัวอย่าง คือ - Feed - น้ำบ่อเลี้ยงกึ่งที่ใช้เลี้ยงในเวลาต่างๆ คือ - ที่บ่อเลี้ยง 10 วัน โดยเก็บ 3 ตัวอย่าง - ที่บ่อเลี้ยง 30 วัน โดยเก็บ 3 ตัวอย่าง - ที่บ่อเลี้ยง 50 วัน โดยเก็บ 3 ตัวอย่าง - ตรวจตัวอย่างที่เก็บโดยวิธี PCR และ immunoassay ที่เตรียมขึ้น - ประเมินค่าที่ได้เป็นระยะๆ (4-6 เดือน) หากมีการปนเปื้อนดูการเปลี่ยนแปลงผลของตัวอย่างภายหลังการแจ้งผลแต่ละครั้ง - สรุปผลจากโรงงานผลิต Feed และฟาร์มกึ่ง	ทราบผลทุกอย่างตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ โดยที่ชุดตรวจตรวจสอบสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ แต่ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อที่ศึกษาในฟาร์มกึ่ง
5. สรุปผลการเตรียม immunodiagnostic kits และเขียนรายงาน	ตรวจ immunoassay kits ที่เตรียม และเก็บไว้ตามระยะเวลาดังๆ เป็นเวลาทั้งหมด 9 เดือน (0,3,6,9 เดือน)	- ตรวจ immunodiagnostic kit ชนิดต่างๆ โดยตรวจคุณสมบัติต่างๆ - sensitivity - specificity - consistency - stability (0,3,6,9 เดือน) - cost effectiveness - สรุปผลและทำรายงานการวิจัย	ชุดตรวจสำเร็จนำมาประยุกต์ใช้ได้ และมีการคงตัวในช่วงที่วิจัยไม่ต่ำกว่า 9 เดือน

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัยนี้

1. สามารถพัฒนาชุดตรวจสำเร็จชนิดต่างๆได้ตามที่คาดหวังไว้ โดยให้ผลการตรวจสอบ ที่ให้ความไว ความจำเพาะ สะดวกและความรวดเร็วในการตรวจสอบ
2. ทราบข้อมูลการปนเปื้อนของเชื้อ *Campylobacter* และ toxins ของตัวอย่างเนื้อไก่ที่ผลิตในประเทศ โดยใช้วิธีการ conventional method, PCR, และ immunoassay ซึ่งจำเป็นต้องแก้ไขการปนเปื้อนของเชื้อที่ศึกษานี้ในเนื้อไก่ให้ดีขึ้น เป็นการคุ้มครองผู้บริโภค และเพื่อให้คุณภาพเนื้อไก่ได้ตามมาตรฐานสากล หากเชื่อนี้กำหนดเป็นข้อบังคับในอนาคต
3. สามารถนำมาใช้ในเชิงธุรกิจ และสามารถให้บริการการตรวจสำหรับหน่วยงานราชการที่รับผิดชอบเพื่อการควบคุมคุณภาพของเนื้อไก่ เนื้อสัตว์ อาหาร และยา เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคในประเทศและเป็นประโยชน์สำหรับเอกชนที่ต้องการใช้วิธีนี้ในการตรวจ เพื่อเตรียมการประกันคุณภาพสำหรับการส่งออกตามมาตรฐานในอนาคต
4. สามารถประยุกต์ใช้ชุดตรวจสำเร็จนี้กับเนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์อาหาร และ สิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ได้
5. โครงการวิจัยนี้ได้สามารถผลิตนักศึกษาในระดับมหาบัณฑิต สาขาเภสัชศาสตร์ ชีวภาพ 2 คน
6. ได้ส่งผลงานวิจัยในรูป Abstract 1 เรื่อง ในการประชุมวิชาการของบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตุลาคม พ.ศ.2548
7. ขณะนี้ขั้นตอนการเตรียมการทำชุดตรวจสำเร็จรูปให้เป็นรูปธรรม จำเป็นต้องมีการประสานงานกับ สกว. และมหาวิทยาลัยในการดำเนินการ และเตรียมผลงานการวิจัยบางส่วนสำหรับการตีพิมพ์

กลุ่มที่จะได้รับประโยชน์จากการวิจัยครั้งนี้

- สกว. และมหาวิทยาลัย
- หน่วยงานราชการที่รับผิดชอบการควบคุมคุณภาพเนื้อไก่ เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์อาหาร
- บริษัทเอกชนที่ผลิตเนื้อไก่ และผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อไก่ เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์อาหาร
- ประชาชนคนไทยทุกคน
- นักวิจัยในโครงการ นักศึกษา ที่ได้ร่วมกันทำงาน และมีผลต่อการร่วมงานวิจัยอื่นๆที่เป็นประโยชน์ ต่อไป

ปริมเจนียน มุ่งการดี

หัวหน้าโครงการ

30 พฤศจิกายน 2548