การประเมินประสิทธิภาพของอิมมิวโนแมกเนติกบีดส์ที่เคลือบแอนติบอดีต่อ *Salmonella*

Efficiency Evaluation of Immunomagnetic Beads Coated with Antibody to *Salmonella*

คำนำ

ในโลกปัจจุบันเป็นยุคของการแข่งขันที่ต้องการความรวดเร็ว โดยเฉพาะทางด้านการค้าประเทศไทยมีสินค้าส่งออกและนำเข้าหลายชนิด สินค้าส่งออกที่เป็นรายได้หลักของประเทศส่วนใหญ่จะเป็นสินค้าเกษตรกรรมที่เป็นพืชผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ และอาหารทะเลรวมทั้งอาหารที่แปรรูปแล้ว สินค้าเหล่านี้จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพให้เป็นไปตามข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้าสิน-ค้า เชื้อแบคทีเรียที่มีผลกระทบต่อการส่งออกอาหารมีหลายชนิด ซึ่งเชื้อที่สำคัญชนิดหนึ่ง คือ เชื้อ *Salmonella*

เชื้อ *Salmonella* sp. เป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่ง มักจะตรวจพบได้ในอาหารหลายประเภททั้งเนื้อสัตว์ อาหารทะเล พืชผัก ผลไม้ และอาหารหมัก เป็นต้น ตามข้อกำหนดมาตรฐานระบุว่าอาหารที่มีคุณภาพดีจะต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* รวมทั้งแบคทีเรียอีกหลายชนิด (Forsythe, 2000) การใช้วิธีการตรวจเป็นสิ่งสำคัญซึ่งควรจะเป็นวิธีที่ถูกต้องแม่นยำ มีความไว มีความจำเพาะ และที่สำคัญ คือ ความรวดเร็วในการตรวจ เพื่อป้องกันการเน่าเสียของอาหารก่อนที่จะทราบผลการตรวจวิเคราะห์ และผู้ผลิตสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปค้นหาสาเหตุและวิธีแก้ไข ส่วนเจ้าหน้าที่ของรัฐก็สามารถดำเนินการกับสินค้าที่ไม่ได้คุณภาพก่อนที่จะเกิดความเสียหายมากขึ้น การตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในอาหารจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อโรงงานผู้ผลิต เศรษฐกิจและชื่อเสียงของประเทศในกรณีที่เป็นสินค้าส่งออก สำหรับผู้บริโภคจะส่งผลถึงสุขภาพ วิธีที่ใช้ตรวจในปัจจุบันและได้รับการยอมรับจะเป็นวิธีมาตรฐาน ซึ่งต้องใช้เวลาและมีความไวระดับหนึ่ง แต่ถ้ามีการใช้เทคนิคอื่นเข้าช่วยจะทำให้มีความไว และเวลาการตรวจเร็วขึ้น วิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารอย่างรวดเร็วมีหลายวิธี เช่น PCR, การตรวจสอบกรดนิวคลิอิก, การวัดความเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้า และวิธีทางอิมมิวโนวิทยา เป็นต้น สำหรับวิธีทางอิมมิวโนวิทยามีผู้นิยมใช้อยู่หลายวิธี เช่น Latex agglutination, Immunochromatography,

Enzyme linked immunosorbant assay และ Immunomagnetic separation (IMS) ซึ่ง IMS เป็นเทคนิคที่น่าสนใจเพราะสามารถแยกเชื้อ *Salmonella* จากแบคทีเรียชนิดอื่นโดยเชื้อ *Salmonella* จะไปเกาะแอนติบอดีที่เคลือบบน beads และนำไปแยก beads ที่มีเชื้อโดยใช้สนามแม่เหล็กซึ่งทำให้สามารถแยกเชื้อ *Salmonella* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นได้ง่าย ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์มากขึ้นสำหรับการตรวจสอบต่อไป และสามารถนำไปใช้ร่วมกับวิธีตรวจอื่นๆ แล้วทำให้ประสิทธิภาพการตรวจเชื้อ *Salmonella* ของวิธีเหล่านั้นดีขึ้น แต่วัสดุในการตรวจที่สำคัญ คือ beads เคลือบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้าสินค้าประเภทนี้ ตัวอย่างเช่น Dynabeads® anti- Salmonella ทำให้ประเทศไทยต้องเสียดุลการค้ากับต่างประเทศ และราคาค่าตรวจสูงขึ้น จึงได้มีผู้วิจัยผลิต beads เคลือบ Immunoglobulin G (IgG) ต่อเชื้อ *Salmonella* ขึ้น แต่ IgG ที่ใช้ในการเคลือบผลิตจากเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม E (พัชรีย์, 2547) ซึ่งยังไม่ครอบคลุมเชื้อ *Salmonella* ทุกกลุ่ม ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองใช้ IgG ที่ผลิตจากเชื้อ *Salmonella* หลายกลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่มที่มักจะพบในอาหาร เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* หลายกลุ่มมากขึ้น และเป็นข้อมูลสำหรับการนำไปปรับปรุงและพัฒนาเป็นชุดทดสอบต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองและ Dynabeads® anti-Salmonella ด้านความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องโดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

การตรวจเอกสาร

<u>Salmonella</u>

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

<u>ประวัติการค้นพบ</u>

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

<u>ลักษณะทั่วไป</u>

Salmonella เป็นแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนตรงขนาดเล็ก (0.7-1.5x2.0-5.0 ไมโครเมตร) ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีและไม่มีอากาศ เคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ยกเว้น *S.* Pullorum และ *S.* Gallinarum ที่ไม่มีแฟลกเจลลา และสายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่เนื่องจากแฟลกเจลลาผิดปกติ ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส และยูรีเอส แต่สร้างคะตะเลส เมตาโบไลท์อาหารโดยขบวนการหายใจและการหมัก ย่อยสลายกลูโคสแล้วได้กรด หรือทั้งกรดและแก๊ส สามารถใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนใหญ่สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์

การจำแนกเชื้อ *Salmonella* ใช้ระบบ Kauffman-White โดยอาศัยความแตกต่างทางแอนติเจน ซึ่งเริ่มครั้งแรกโดย P.B. White ในปี ค.ศ. 1926 และต่อมาถูกพัฒนาโดย F. Kauffman ในช่วงต้นปี ค.ศ. 1930s (Bell and Kyriakides, 2002) แอนติเจนที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ โอ แอนติเจน (O antigen) หรือเรียกว่า Somatic antigen, เอช แอนติเจน (H antigen) และวีไอ แอนติเจน (Vi antigen) ต่อมาได้มีการนำเทคนิคทางยีนเข้ามาช่วยทำให้สามารถจำแนกเชื้อ *Salmonella* ได้เป็น 2 สปีชีส์ คือ *S. enterica* และ *S. bongori* ใน *S. enterica* ยังแบ่งย่อยได้อีก 6 subspecies ได้แก่ *enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae* และ *indica*, *S. enterica* subsp. *enterica* พบมากที่สุด และพบได้ในคนและสัตว์เลือดอุ่น ส่วน subsp. *arizonae* พบในสัตว์เลือดเย็น (D’Aoust, 1989c) ปัจจุบันพบเชื้อ *Salmonella* มากกว่า 2,501 ซีโรวาร์ (serovar) (Popoff, 2001)

<u>โครงสร้างทางแอนติเจน</u>

1. โอ แอนติเจน (O antigen) หรือ Somatic antigen อยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เป็นสารพวกลิโปโพลีแซคคาไรด์ ทนต่อความร้อน มีตั้งแต่กลุ่ม A ถึง 67 การให้ชื่อจะเป็นเลขอารบิค

2. แฟลกเจลลา หรือ เอช แอนติเจน (H antigen) เป็นสารประเภทโปรตีน ไม่ทนความร้อน แบ่งได้ 2 เฟส คือ เฟส 1 และ เฟส 2 *Salmonella* จะสร้างเพียง 1 หรือ 2 เฟสก็ได้ หรือบางชนิดไม่มีทั้ง 2 เฟส เฟส 1 และ เฟส 2 จะถูกควบคุมด้วยยีน H_1 และ H_2 ตามลำดับ การทรานสคริป-ชันจะถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน vh_2 (D’Aoust, 1997a) การให้ชื่อจะใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก เริ่มจาก a ถึง z

3. แคปซูลาร์ หรือ วีไอ แอนติเจน (Vi antigen) เป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์คลุมอยู่รอบนอกโอ แอนติเจน ถูกทำลายเมื่อได้รับความร้อน เชื้อที่มีวีไอ แอนติเจนจะก่อโรครุนแรง ได้แก่ *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C และ *S.* Dublin

<u>แหล่งที่พบ และการติดเชื้อ</u>

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

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ</u>

1. อุณหภูมิ *Salmonella* เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 5-47 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35-37 องศาเซลเซียส สามารถปรับตัวได้เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสม เช่น สามารถเป็น psychrotrop เจริญในเนื้อไก่ เนื้อวัว และเปลือกไข่ที่เก็บที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส (D’Aoust, 1997a) นอกจากนี้การเจริญที่อุณหภูมิต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อยังขึ้นกับซีโรวาร์ (Mossel *et al*., 1981) อุณหภูมิต่ำสุดในการเจริญของเชื้อ *Salmonella* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะสูงกว่าในอาหารแข็ง และมีการแสดงว่าเชื้อที่ชอบอุณหภูมิปานกลางเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดอันเนื่องมาจากอุณหภูมิจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น *S*. Typhimurium สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส (D’Aoust, 1997b)

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

3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสม คือ 6.5-7.5 และสามารถเจริญได้ในช่วง 4.5-9.0 กรดอินทรีย์อาจสร้างขึ้นจากหัวเชื้อที่ใช้หมัก หรือการเติมกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ต่าง ๆ เพื่อทำให้อาหารเป็นกรด ใช้ถนอมอาหาร ความสามารถในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อของกรดนั้นจะต้องอยู่ในรูปไม่แตกตัวซึ่งขึ้นกับ pH อาหาร พบว่าความสามารถในการทำลายเชื้อ *S*. Typhimurium ของกรดจะลดลงเมื่อมี long chain fatty acid เพิ่มขึ้น (D’Aoust, 1989b) และอุณหภูมิยังมีผลต่อ pH ต่ำสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ (D’Aoust, 1989c) แม้เชื้อ *Salmonella* จะถูกทำลายเมื่ออยู่ในอาหารที่มี pH ซึ่งเชื้อไม่สามารถเจริญได้แต่เชื้อไม่ถูกทำลายทันทีแต่จะตายอย่างช้าๆ และบางเซลล์อาจมีชีวิตอยู่ได้นานในอาหารที่เป็นกรดและทำให้เกิดโรคกับผู้บริโภคอาหารนั้น การเจริญของเชื้อ *Salmonella* ในสภาวะกรดจะเกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอาหารหมัก โดยเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนอยู่แล้วในอาหารจะเพิ่มความต้านทานกรดทำให้ผู้บริโภคเพิ่มความเสี่ยงต่อสุขภาพมากขึ้น เพราะเชื้อจะทนต่อการทำลายของกรดในกระเพาะอาหารและส่งเสริมการอยู่รอดภายในเซลล์ฟาโกไซท์ของคนซึ่งมีสภาพเป็นกรด (D’Aoust, 1991)

การทำให้เกิดโรค

โรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่เกิดจากการได้รับเชื้อจากอาหารและน้ำจึงทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ ปริมาณของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสายพันธุ์ อายุผู้ติดเชื้อ ภาวะภูมิคุ้มกัน และการสร้างกรดในกระเพาะอาหาร เนื่องจากกรดไฮโดร-คลอริกในกระเพาะอาหารจะทำลายเชื้อได้ (Doyle and Cliver, 1990) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับส่วนประกอบอาหารถ้ามีไขมันสูงเชื้อจะถูกปกคลุมด้วยไขมันทำให้ไม่ถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร โดยทั่วไปเชื้อ *Salmonella* ปริมาณ 10^5-10^6 เซลล์จะทำให้เกิดโรค แต่พบว่าเชื้อ *Salmonella* เพียง 1-10 เซลล์ก็สามารถก่อโรคได้ (D’Aoust, 1997a) การติดเชื้อ *Salmonella* ขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อในการเกาะติด และบุกรุกเซลล์เยื่อบุลำไส้ ซึ่งยีนที่ควบคุม คือ กลุ่มยีน *inv* ประกอบด้วยยีนไม่ต่ำกว่า 15 ยีน *invA* ถึง *invO* ควบคุมการสร้างส่วนที่ก่อความรุนแรง หรือเอนไซม์ที่ทำให้เชื้อ *Salmonella* บุกรุกเข้าเยื่อบุลำไส้ และระบบ *pho P/pho Q* ช่วยให้เชื้อ *Salmonella* มีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมภายในฟาโกไซท์ที่มีความเป็นกรดสูง และสารดี-เฟนซิน (defensins) (D’Aoust, 1997a)

โรคที่เกิดในคนแบ่งเป็น 3 ประเภท คือ

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

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

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

<u>ระบาดวิทยา</u>

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

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค</u>

1. พลาสมิด (plasmid) พลาสมิดเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค พบในเชื้อ *Salmonella* หลายซีโรไทป์ เช่น *S.* Enteritidis, *S.* Paratyphi C, *S.* Typhimurium และ *S.* Dublin เป็นต้น แต่พบว่าการมีพลาสมิดใน *S.* Infantis, *S.* Panama และ *S.* Heidelberg ไม่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค (Threlfall *et al.*, 1989) กลไกของการก่อความรุนแรง คือ พลาสมิดจะควบคุมการสร้างโปรตีนที่ผนังเซลล์ที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อในเนื้อเยื่อของโฮสต์ (Taira *et al.*, 1991; Valone and Chikami, 1991) และยังไปทำลายกลไกการต่อต้านของโฮสต์ (Hoertt *et al.*, 1989) *spv* เป็นกลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างสารสำหรับการเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อเรติคิวโลเอนโดทีเรียล (reticuloendothelial) มีขนาด 8 kb (Gulig *et al.*, 1993)

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

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

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

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

4. Vi antigen, LPS และ Porins

4.1 Vi antigen เป็นส่วนของแคปซูลซึ่งเป็นสารพวกโพลีแซคคลาไรด์ ป้องกันแมคโครฝาจจับกินโดยยับยั้งการ opsonization ของคอมพลีเมนต์ C3b กลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างวีไอ แอนติเจนที่สำคัญ คือ *via B*

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

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

<u>การตรวจวิเคราะห์</u>

จากการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในอาหารที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการผลิต รวมทั้งระบาดวิทยาที่เกิดขึ้นในแต่ละปีของแต่ละประเทศ เน้นให้เห็นความสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* ปัจจัยหลักที่จะช่วยลดปริมาณผู้ป่วยลง คือ การให้การศึกษาแก่ผู้บริโภคและการควบคุมคุณภาพอาหารโดยการตรวจในห้องปฏิบัติการ (เพ็ญศรี, 2541) โดยเฉพาะในโรงงานผลิตอาหารการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธีที่รวดเร็วจะช่วยค้นหาสาเหตุและแก้ไขได้ทันที

วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* จำแนกได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีมาตรฐาน (conventional methods)

2. วิธีที่รวดเร็ว (rapid methods)

<u>วิธีมาตรฐาน (conventional methods)</u>

วิธีนี้มีความหลากหลายในการใช้ขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้ใช้ในด้านความไว ความจำเพาะของวิธี หรือชนิดอาหารที่ตรวจ แต่โดยทั่วไปประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท enrichment medium

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

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท selective enrichment medium

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

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

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (plating on selective and differential agar)

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

4. การตรวจสอบเบื้องต้นทางชีวเคมี (biochemical screening)

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

5. การตรวจยืนยันทางซีรั่มวิทยา

หลังการตรวจสอบทางชีวเคมีแล้วให้ผลตรงกับเชื้อ *Salmonella* จะต้องนำมาตรวจสอบโดยวิธี slide agglutination กับแอนติซีรั่มที่จำเพาะกับโอ แอนติเจนเพื่อหากลุ่ม และที่จำเพาะกับเอช และวีไอ แอนติเจนเพื่อหาซีโรวาร์

การตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี ISO6579:2002

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

สำหรับขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ก็เหมือนกับวิธีมาตรฐานทั่วไปดังที่กล่าวข้างต้น แตกต่างกันตรงชนิดของอาหารที่เลือกใช้ในขั้นตอนที่ 2 และ 3

การตรวจสอบโดยใช้วิธีมาตรฐานต้องใช้เวลานานกว่าจะทราบผล รวมทั้งใช้แรงงานมาก ค่าใช้จ่ายสูง จึงได้มีการพัฒนาวิธีทดสอบที่รวดเร็วขึ้น

<u>วิธีที่รวดเร็ว (Rapid Methods)</u>

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

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

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

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

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

5. DNA Hybridization

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

5.2 Chromosomal Fingerprinting ใช้ดีเอ็นเอจากโครโมโซมของเชื้อ *Salmonella* เป็นโพรบในการแยกซีโรวาร์ต่าง ๆ Fingerprinting เรียกอีกชื่อว่า RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) วิธีการ คือ เลือกเอนไซม์ที่ใช้ตัดดีเอ็นเอ และโพรบที่จะมาเข้าคู่กัน (hybridize) เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างของแต่ละซีโรวาร์ได้ (วัฒนาลัย, 2538) การแยกซีโรวาร์มีความสำคัญในการศึกษาการแพร่ระบาดของโรค

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

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

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

9. เทคนิคทางอิมมิวโนวิทยา

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

9.2 Immunochromatography ใช้แอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* 2 ตัว ตัวที่ 1 จะติดฉลากอนุภาค เช่น ทอง จะเคลือบบนแผ่นเมมเบรนส่วนล่าง แอนติบอดีตัวที่ 2 จะอยู่ส่วนบน เมื่อหยดตัวอย่างที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้วปรากฏขีดสีในช่องทดสอบแสดงว่ามีเชื้อ *Salmonella* ตัวอย่างเช่น ชุดทดสอบ Reveal[ฑ] ของบริษัท Neogen Corperation หรือ Path-Stik ของบริษัท Celsis, Inc. มี

ความไวประมาณ 10^6 CFU ถ้ามีเชื้อ *Salmonella* จะปรากฏขีดสี 2 เส้น ใช้เวลาตรวจประมาณ 48 ชั่วโมง

9.3 Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* โดยการเคลือบโพลีโคลนอล (polyclonal) หรือโมโนโคลนอล (monoclonal) แอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* บนพื้นผิววัสดุแข็ง เมื่อแอนติเจนกับแอนติบอดีทำปฏิกิริยากัน แอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* ตัวที่ 2 ที่ติดฉลากเอนไซม์จะเข้าไปจับ เมื่อเติมสับสเตรตของเอนไซม์จะเกิดสี หรือสารเรืองแสง ต้องเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ *Salmonella* ให้อยู่ระดับที่ตรวจพบได้ คือ 10^4-10^6 CFU/มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับซีโรวาร์ ใช้เวลาตรวจประมาณ 48 ชั่วโมง มีความไว ≥ 94.1% ความจำเพาะ ≥ 79.4% ตัวอย่างของชุดทดสอบ ได้แก่ VIDAS SLM ของบริษัท bioMérieux Inc., TECRA Salmonella Visual Immunoassay ของบริษัท International Bioproducts, ALERT[ฯ] ของบริษัท Oxoid, Inc., Transia Plate Salmonella ของบริษัท Diffchamb AB, EIA Foss จากบริษัท Foss North America, Inc.

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

Immunomagnetic Separation (IMS)

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

การใช้ IMS ทำให้ใช้เวลาการตรวจน้อยลงกว่าการใช้เพียงวิธีเดียว (Liu and Li, 2002) ช่วยกำจัดสารที่ยับยั้งการเจริญ (Cudjoe *et al*., 1993) เศษต่างๆ และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมาย (Yu *et al*., 2001) ทำให้แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ง่าย เนื่องจากเชื้อเป้าหมายจะเกาะติดแอนติบอดีที่เคลือบ beadsอย่างจำเพาะทำให้แยกออกจากตัวอย่างได้ ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ เมื่อใช้ร่วมกับ PCR จะช่วยลดโปรตีนที่ปนเปื้อนและดีเอ็นเอแปลกปลอมได้ (Skjerve and Olsvik, 1991) อย่างไรก็ตามยังพบการจับกันอย่างไม่จำเพาะของจุลินทรีย์อื่นกับ beads หรือเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติบอดีที่เคลือบ beads ตัวอย่างเช่น *Proteus* spp., โคลิฟอร์มที่มีเมือก (Cudjoe and Krona, 1997) และ *Citrobacter freundii* (Coleman *et al*., 1995) การใช้ IMS ยังช่วยเพิ่มความไวของวิธีโดย Tutenel *et al*. (2003) ตรวจพบเชื้อ *E. coli* O157 ในอุจจาระวัวมากกว่าวิธีมาตรฐาน และ VIDAS ICE ส่วน Angen *et al*. (2001) แยกเชื้อ *Actinobacilllus pleuropneumoniae* serotype 2 จากต่อมทอนซิลของหมูซึ่งวิธีมาตรฐาน และ PCR ตรวจไม่พบ เมื่อตรวจเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อไก่ดิบพบมากกว่าวิธีมาตรฐาน (Coleman *et al*., 1995) โดยมีความไวในการตรวจเชื้อ *Salmonella* 10-20 เซลล์ต่อกรัมอาหาร แต่ IMS อาจมีปัญหากับอาหารที่มีไขมันสูง หรือจุลินทรีย์แข่งขันสูงมากกว่า 10^7 CFU/มิลลิลิตร เพราะจะสูญเสีย beadsไประหว่างขั้นตอนการล้างและการแยกช่วงแรก การนำเทคนิคนี้ไปใช้อาจต้องทำการเปลี่ยนสารละลาย หรือบัฟเฟอร์ที่ใช้เคลือบ beads (Skjerve and Olsvik, 1991) หรือนำตัวอย่างที่มีไขมันสูงหลังการเลี้ยงเชื้อไปแช่เย็นก่อนการทำ IMS (Coleman *et al*., 1995) แต่ในการใช้ Dynabeads® anti- Salmonella แนะนำให้นำตัวอย่างที่มีไขมันสูง ข้นหนืด หรือมีอนุภาคอื่นมากไปทำการเจือจางตัวอย่างหลังจากการเลี้ยงเชื้อแล้วก่อนทำ IMS Yu *et al*. (2001) กล่าวว่าเพื่อการจับของแอนติบอดีที่เคลือบ beads กับเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพควรทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมก่อน เทคนิค IMS เป็นวิธีที่ง่าย ช่วยเพิ่มความไว ความจำเพาะ และทำให้การตรวจใช้เวลาลดลง จึงควรนำมาใช้ร่วมกับวิธีการตรวจอื่น ๆ

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อการจับจุลินทรีย์เป้าหมายกับ beads ที่เคลือบแอนติบอดี</u>

1. แอนติบอดี ที่ใช้เคลือบอาจเป็นโพลีโคลนอล หรือโมโนโคลนอล แต่ถ้าใช้โมโน-โคลนอลจะมีความจำเพาะสูงจำกัดให้จุลินทรีย์ที่มี epitope ของแอนติเจนเหมือนกันมากๆที่จะจับแอนติบอดีที่เคลือบ beads ได้ และแอนติเจนจากเซลล์ที่ตายอาจรบกวนการเกาะบน beads ที่เคลือบแอนติบอดี Yu *et al*. (2001) พบว่าโพลีโคลนอลมีความจำเพาะน้อยกว่าแต่ความไวสูงกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี ส่วนความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ถ้ามากเกินไปจะทำให้เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มบน beads (Cudjoe *et al*., 1993)

2. จำนวน beads ที่เคลือบแอนติบอดี ถ้าใช้มากจะมีความไวในการตรวจสูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมีเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายจำนวนน้อย

3. การเลี้ยงเชื้อ ช่วยเพิ่มความไว เพราะจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายที่มีจำนวนน้อยเพิ่มมากขึ้น และฟื้นตัวจากการบาดเจ็บ (Parham *et al*., 2003) แต่ถ้าเลี้ยงเชื้อนานเกินไปจะทำให้ความไวลดลงเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันสูงขึ้น

4. การบ่ม beads ที่เคลือบแอนติบอดีกับตัวอย่าง ถ้าเวลานานจะช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายเกาะแอนติบอดีบน beads ดีขึ้น แต่หากนานเกินไปจะทำให้เกิดการเกาะแบบไม่จำเพาะของจุ-ลินทรีย์อื่น และถ้ามีการหมุนตลอดเวลาจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายเกาะแอนติบอดีบน beads ดีกว่า (Cudjoe *et al*., 1993)

5. ชนิดตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างที่จะตรวจมีไขมันและอนุภาคอื่น ๆ อยู่มากจะทำให้สูญเสีย beads ระหว่างการล้าง และลดการจับกับเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

6. การล้าง ถ้าล้างมากไปจะสูญเสียเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย แต่ถ้าล้างน้อยไปจะไม่สามารถกำจัดจุลินทรีย์อื่นที่เกาะแบบไม่จำเพาะกับ beads ได้ (Cudjoe *et al*., 1993)

7. ปริมาตรตัวอย่าง ถ้าใช้มากจะมีความไวสูงขึ้นสามารถตรวจสอบเชื้อที่มีจำนวนน้อยๆได้ (Skjerve and Olsvik, 1991)

<u>วิธีการแยกเชื้อ *Salmonella* จากอาหารโดยใช้ IMS</u>

1. การเตรียมตัวอย่าง เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท enrichment medium เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

2. การใช้ IMS โดยการนำ beads ที่เคลือบแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ใส่ลงไปเพื่อจับเซลล์ *Salmonella* ทำให้เชื้อเข้มข้นขึ้น แล้วทำการล้าง beads ที่จับเซลล์ไว้

3. การตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ที่เกาะติด โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ selective agar หรือย้อมสีอะคริดีน ออเรนจ์ หรือใช้ร่วมกับ ELISA, PCR, การวัดทางกระแสไฟฟ้า เป็นต้น

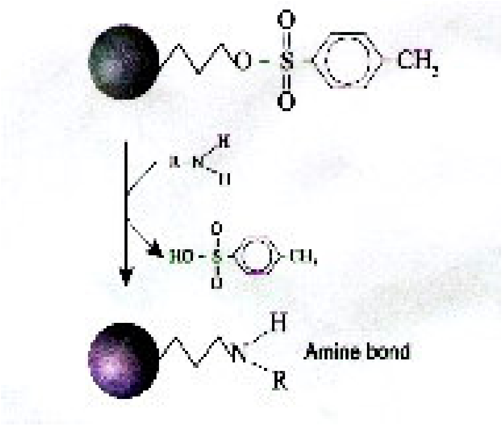
Dynabeads® anti-Salmonella

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

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

Dynabeads M-280 Tosylactivated

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



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีน หรือ ligands ที่มี amino หรือ sulfhydryl groups

ที่มา: (Dynal, 1999)

แอนติบอดี

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

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุและเครื่องมือ

1.1 เครื่องตีป่นอาหาร

1.2 เครื่องชั่งน้ำหนัก

1.3 ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส และ 41.5 ± 1 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 800 และ B 50

1.4 ตู้เย็น

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

1.6 แท่นแม่เหล็ก (Dynal MPC) ยี่ห้อ Vicam

1.7 เครื่องหมุนระหว่างการบ่ม beads ยี่ห้อ Stuart Scientific serial R000100757

1.8 Freeze-dryer (Lyophilizer) ยี่ห้อ Dura-Dry TM μP รุ่น FD 2055 D0000

1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ SORVALL® RC 26 PLUS

1.10 อ่างน้ำร้อน (Water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W 270

1.11 สเปคโตโฟโตมิเตอร์ (UV/VIS Spectrometer) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Lamda 2

1.12 ไมโครปิเปตขนาด 2-20, 10 – 100 และ 100-1000 ไมโครลิตร พร้อมทิป (Tip)

1.13 หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

1.14 ปิเปตปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 และ 10 มิลลิลิตร

1.15 ลูปและเข็มเขี่ยเชื้อ (Loop and Needle)

1.16 ไม้พันสำลี

1.17 ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ

1.18 จานเพาะเชื้อ

1.19 หลอดทดลอง ขนาด 16x150 มิลลิเมตร และ 10x60 มิลลิเมตร

1.20 Dynabeads® anti-Salmonella

1.21 Dynabeads M-280 Tosylactivated

1.22 คอลัมน์ Hitrap protein A Sepharose ขนาด 5 มิลลิลิตร

1.23 ชุด Mini-PROTEAN® 3 Cell ยี่ห้อ BIO-RAD

1.24 Dialysis tube (MW cut off 12,000-14,000)

1.25 Membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

1.26 คิวเวต

1.27 แผ่นกระจกสไลด์

2. <u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

2.1 Tryptone soya agar (TSA)

2.2 Buffered peptone water (BPW)

2.3 Rappaport and Vassiliadis broth (RVS)

2.4 Muller-Kauffmann tetrathionate broth base (MKTT)

2.5 Xylose lysine desoxycholate agar (XLD)

2.6 Modified semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV)

2.7 Mannitol salt egg yolk agar (MSEY)

2.8 Eosin methylene blue lactose sucrose agar (EMB)

2.9 MacConkey agar

2.10 Standard plate count agar (PCA)

2.11 Triple sugar iron agar (TSI)

2.12 MIL medium (MIL)

3. <u>สารเคมี</u>

3.1 *Salmonella* O polyvalent A-67 antisera

3.2 *Salmonella* O polyvalent A-I antisera

3.3 *Salmonella* O Multi group antisera (crude antiserum) ได้จากห้างหุ้นส่วนจำกัด S&A reagents แล็บบอราตอรี่

3.3.1 OMA ผลิตจากเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม A, B, D และE

3.3.2 OMB ผลิตจากเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม C, F, G และH

3.4 *Salmonella* O antisera group I

3.5 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.4

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

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

3.8 Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4

3.9 0.85% Sodium chloride (NaCl)

3.10 Ammonium sulfate $[(NH_4)_2SO_4]$

3.11 0.15 M Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2

3.12 20 mM Sodium phosphate pH 7.0

3.13 0.1 M Citric acid pH 3.0

3.14 1.0 M Tris- hydrochloric acid (Tris-HCl) pH 9.0

3.15 Kovacs' reagent

3.16 แอลกอฮอล์ 70%

4. <u>เชื้อบริสุทธิ์</u>

ได้รับจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1 เชื้อ *Salmonella* ได้แก่

4.1.1 *Salmonella* Derby (กลุ่ม B)

4.1.2 *Salmonella* Rissen (กลุ่ม C)

4.1.3 *Salmonella* Enteritidis (กลุ่ม D)

4.1.4 *Salmonella* Weltevreden (กลุ่ม E)

4.1.5 *Salmonella* Aberdeen (กลุ่ม F)

4.1.6 *Salmonella* Worthington (กลุ่ม G)

4.1.7 *Salmonella* Hvittingfoss (กลุ่ม I)

4.1.8 *Salmonella* Urbana (กลุ่ม N)

4.2 เชื้อ non-*Salmonella* ได้แก่

4.2.1 *Escherichia coli* ATCC 8739

4.2.2 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736

4.2.3 *Enterobacter aerogenes*

4.2.4 *Shigella sonnei*

4.2.5 *Proteus mirabilis*

4.2.6 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

วิธีการ

1. การหาปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรั่ม (crude antiserum)

1.1 การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ

นำเชื้อ *Salmonella* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อใส่ใน 0.85% NaCl หลังจากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับให้ได้ OD. 0.6-0.7

1.2 วิธีทำ

1.2.1 ใส่ 0.85% NaCl ปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงใน microtitre plate ทุกหลุมจนครบ 12 หลุม

1.2.2 ใส่แอนติซีรั่มปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงในหลุมที่ 1 แล้วทำการเจือจาง 2 เท่า ในหลุมต่อๆ ไปด้วย 0.85% NaCl จนความเจือจางสุดท้ายของหลุมที่ 11 เท่ากับ 1 : 2,048 ส่วนหลุมที่ 12 ใช้เป็นตัวควบคุมลบ

1.2.3 ใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบปริมาตร 25 ไมโครลิตรทั้ง 12 หลุม เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

1.2.4 อ่านผลการตกตะกอน ดังนี้

+4 = 100% complete agglutination

+3 = 75% agglutination

+2 = 50% agglutination

+1 = 25% agglutination

\- = no agglutination

โดยที่ระดับ +2 ขึ้นไปจะถือว่าให้ผลบวก

2. <u>การเตรียม IgG บริสุทธิ์</u>

เตรียมแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* โดยการฉีดเชื้อ *Salmonella* ในกระต่ายแล้วเจาะเลือดแยกเอาแอนติซีรั่มมาเตรียม IgG บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography เพื่อนำ IgG บริสุทธิ์ที่เตรียมได้เคลือบบน Dynabeads M-280 Tosylactivated

เตรียม IgG บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ดังนี้ ผสมแอนติซีรั่มที่ได้จากกระต่ายกับ 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วทำการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2$ SO_4 อิ่มตัวทิ้งไว้ข้ามคืน แยกตะกอนออกโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 แล้วใส่ใน dialysis tube (Cellu. Sep T4; MW. Cut-off 12,000 -14,000) นำไป dialyse ใน 0.85% NaCl ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4-6 ชั่วโมง เปลี่ยน 0.85% NaCl 3-4 ครั้ง ในปริมาตรรวม 200 เท่าของสารที่ต้องการ dialyse หลังจากนั้นนำสารละลายใน dialysis tube มาเจือจางด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 แล้วกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำสารที่กรองได้ไปแยก IgG บริสุทธิ์ด้วยการทำ affinity chromatography โดยใช้คอลัมน์ Hitrap protein A Sepharose (Anonymous, 1997-2005) ขนาด 5 มิลลิลิตร ใส่ 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตรรวม 10 เท่าของขนาดคอลัมน์ แล้วใส่สารละลายแอนติซีรั่ม อัตราเร็ว 1-5 มิลลิลิตร/นาที ทำการเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมา fraction ละ 1 มิลลิลิตร แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตรรวม 5 เท่าของขนาดคอลัมน์ นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทุก fraction ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนได้ค่า OD.ประมาณ 0.02 แล้วจึงใส่ 0.1 M citric acid pH 3.0 ปริมาตรรวม 2-5 เท่าของขนาดคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก fraction ถ้าค่าที่วัดได้หลังจากใส่ 0.1 M citric acid pH 3.0 สูงกว่า 0.05 จะทำการเก็บสารละลาย fraction นั้นและเติม 1.0 M Tris-hydrochloric acid pH 9.0 เพื่อปรับสภาพให้เป็นกลาง รวม fraction ที่มี IgG เข้าด้วยกันใส่ใน dialysis tube นำไป dialyse ในสารละลาย 0.15 M PBS pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หลังจาก dialyse แล้วนำสารละลายไป lyophilize ด้วยเครื่อง lyophilizer ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยการทำ SDS-PAGE และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al*., 1951)

3. <u>การหาปริมาณ IgG โดยวิธี direct agglutination</u>

ทำเช่นเดียวกับการหาปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรั่ม (crude antiserum) แต่ทำการทดสอบกับเชื้อ non-*Salmonella* เพิ่ม และนำ IgG ที่ผ่านการ lyophilize แล้วมาละลายใน 0.85% NaCl ก่อนนำไปทดสอบ

4. <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบ IgG บน Dynabeads M-280 Tosylactivated เปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella</u>

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อ *Salmonella* และ non-*Salmonella* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อใส่ใน PBS pH 7.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่าความขุ่นตามต้องการ ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เตรียมได้บนอาหาร PCA เพื่อใช้เป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดสอบ IMS ต่อไป

วิธีการเคลือบ IgG (ภาพผนวกที่ จ1)

การเคลือบ IgG บน beads ปฏิบัติตามวิธีของผู้ผลิต Dynabeads M-280 Tosylactivated โดยถ้าทำการเคลือบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะใช้เวลา 16-24 ชั่วโมง แต่ถ้าเคลือบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะใช้เวลานานมากกว่า 48 ชั่วโมง

4.1 การตรวจหาจำนวน beads ที่เหมาะสมในการเคลือบด้วย IgG

ปิเปต Dynabeads M-280 Tosylactivated ใส่ในหลอด eppendorf หลอดละ 5 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตร แต่ละหลอดทำการล้าง beads ด้วย 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดบัฟเฟอร์ทิ้ง หลังจากนั้นปิเปตบัฟเฟอร์ 850 ไมโครลิตรใส่ในหลอด eppendorf ที่มี beads ที่ล้างแล้ว ใส่ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม ที่ละลายใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ลงไปในแต่ละหลอด ทำการเคลือบในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที แล้วใส่ 0.5% (w/v) BSA 100 ไมโครลิตรที่ละลายใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 ทำการเคลือบต่อไปในตู้เย็นนานประมาณ 60 ชั่วโมง ต่อจากนั้นล้าง beads ด้วย PBS ผสม 0.1% (w/v) BSA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำ beads ที่เคลือบ IgG แล้วไปทดสอบกับเชื้อ *S.* Enteritidis

โดยใส่เชื้อลงไป 1 มิลลิลิตรทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที โดยนำ eppendorf ไปใส่ในเครื่องหมุน หลังจากนั้นแยก beads โดยการนำ eppendorf ใส่แท่นแม่เหล็กเพื่อจับ beads นาน 3 นาที ระหว่างนี้ทำการกลับหลอดไปมา 4-5 ครั้ง ดูดส่วนของเหลวทิ้ง นำ eppendorf ออกจากแท่นแม่เหล็ก ทำการล้าง beads ด้วย PBS-tween 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วแขวนลอย beads ใน PBS-tween 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำ beads ที่จับเชื้อแล้วไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อนับจำนวนเชื้อ

4.2 การตรวจหาบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเคลือบ beads

ทำการเปรียบเทียบบัฟเฟอร์ 2 ชนิดในการเคลือบ beads คือ 0.1 M borate buffer pH 9.5 กับ 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กับ 4 องศาเซลเซียส โดยปิเปต Dynabeads M-280 Tosylactivated ใส่ในหลอด eppendorf หลอดละ 5 ไมโครลิตร แต่ละหลอดทำการล้าง beads ด้วยบัฟเฟอร์ที่จะเปรียบเทียบปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตบัฟเฟอร์ดังกล่าว 850 ไมโครลิตรใส่ในหลอด eppendorf ที่มี beads ที่ล้างแล้ว ต่อจากนั้นนำ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัมละลายในบัฟเฟอร์ที่จะเปรียบเทียบ 100 ไมโครลิตรใส่ลงไป ทำการเคลือบที่อุณหภูมิที่จะเปรียบเทียบ คือ 37 องศาเซลเซียส กับ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วใส่ 0.5% (w/v) BSA 100 ไมโครลิตรที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่จะเปรียบเทียบ ทำการเคลือบต่อไปสำหรับที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง ส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานมากกว่า 48 ชั่วโมง ต่อจากนั้นล้าง beads ด้วย PBS ผสม 0.1% (w/v) BSA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำ beads ที่เคลือบ IgG แล้วไปทดสอบกับเชื้อ *S.* Enteritidis โดยใช้เวลาจับเชื้อ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก แล้วล้าง beads ด้วย PBS-tween 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรจำนวน 2 ครั้ง นำ beads ที่จับเชื้อแล้วไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อนับจำนวนเชื้อ

4.3 การตรวจหาปริมาณ IgG ที่เหมาะสมในการเคลือบบน beads

ทดลองใช้ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมไปเคลือบ beads จำนวน 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* โดยใช้เวลาจับเชื้อ 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella (20 ไมโครลิตร) ที่ใช้เวลาจับเชื้อ 10 นาที ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก แล้วล้าง beads ด้วย PBS-tween 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรจำนวน 2 ครั้ง นำ beads ที่จับเชื้อแล้วไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อนับจำนวนเชื้อ

4.4 การตรวจหาเวลาที่เหมาะสมในการจับเชื้อของ beads ที่เคลือบ IgG

นำ beads 5 ไมโครลิตรที่เคลือบ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 200 ไมโครกรัมไปทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* โดยใช้เวลาจับเชื้อ 1 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง ส่วน Dynabeads® anti-Salmonella (20 ไมโครลิตร) ใช้เวลาจับเชื้อ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก แล้วล้าง beads ด้วย PBS-tween 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรจำนวน 2 ครั้ง นำ beads ที่จับเชื้อแล้วไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อนับจำนวนเชื้อ

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

นำ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ beads ที่ไม่ได้เคลือบด้วย IgG กับ Dynabeads® anti-Salmonella ทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* และ non-*Salmonella* โดยการใส่เชื้อดังกล่าวประมาณ 10^{3} ถึง 10^{4} CFU/มิลลิลิตร ลงไปในหลอด eppendorf ที่มี beads ทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาทีสำหรับ Dynabeads® anti-Salmonella และ 60 นาทีสำหรับ beads ที่เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองและไม่ได้เคลือบด้วย IgG ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็กแล้วล้าง beads ด้วย PBS-tween 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรจำนวน 2 ครั้ง แยก beads ที่จับเชื้อแล้วไปนับจำนวนเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD ยกเว้น *Staphylocococus aureus* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MSEY, *E. coli* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ EMB และ *Shigella sonnei* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey

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

นำ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองและ beads ที่ไม่ได้เคลือบด้วย IgG กับ Dynabeads® anti-Salmonella ทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* โดยการใส่เชื้อ 3 ระดับ ได้แก่ 1-9, 10-99 และ 100-999 CFU/มิลลิลิตร ลงไปในหลอด eppendorf ที่มี beads ทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาทีสำหรับ Dynabeads® anti-Salmonella และ 60 นาทีสำหรับ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองและ beads ที่ไม่ได้เคลือบด้วย IgG ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก แล้วล้าง beads ด้วย PBS-tween 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรจำนวน 2 ครั้ง นำ beads ที่จับเชื้อแล้วไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เพื่อนับจำนวนเชื้อ

7. <u>การศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี IMS และวิธีมาตรฐาน ISO6579: 2002</u>

7.1 การตรวจเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ ทำการตรวจสอบตัวอย่างอาหารด้วยวิธี IMS โดยใช้ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ Dynabeads® anti-Salmonella กับวิธีมาตรฐาน ISO6579

การเตรียมตัวอย่างอาหาร

ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกเติม BPW 225 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องตีปั่นอาหาร 2 นาที แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง สำหรับวิธี IMS และ 18$\pm$2 ชั่วโมง สำหรับวิธี ISO6579 แล้วทดสอบดังต่อไปนี้

7.1.1 การตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี IMS (ภาพผนวกที่ จ2)

ปิเปตตัวอย่างอาหารที่เตรียมใน BPW มา 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มี Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองที่มีอนุภาค beads ประมาณ $1x10^7$ และ Dynabeads® anti-Salmonella (20 ไมโครลิตร) ลงไปอย่างละหลอดนำไปใส่ในเครื่องหมุนทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาทีสำหรับ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ10 นาที สำหรับ Dynabeads® anti-Salmonella ทำการแยก beads โดยใช้แท่นแม่เหล็ก แล้วล้าง beads ด้วย PBS-tween 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วแขวนลอย beads ใน 100 ไมโครลิตร PBS-tween 20 ผสมให้เข้ากัน แบ่งมาอย่างละ 50 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ streak บน XLD agar ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 41.5 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส และ 37$\pm$ 1 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นาน 24 $\pm$ 3 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเชื้อที่คิดว่าเป็น *Salmonella* อย่างน้อย 2 โคโลนีมาทดสอบทางชีวเคมีและซีรั่มวิทยา

7.1.2 การตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี ISO6579:2002 (Conway, 2003)

ปิเปตตัวอย่างอาหารที่เตรียมใน BPW มา 0.1 มิลลิลิตรใส่ใน RVS broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 41.5 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส นาน 24 $\pm$ 3 ชั่วโมง ปิเปตตัวอย่างอาหารที่เตรียมใน BPW อีก 1 มิลลิลิตรใส่ใน MKTT broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส นาน 24 $\pm$ 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ streak บน XLD agar บ่มที่อุณหภูมิ 41.5 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส และ 37$\pm$ 1 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นาน 24 $\pm$ 3 ชั่ว-

โมง เลือกโคโลนีเชื้อที่คิดว่าเป็น *Salmonella* อย่างน้อย 2 โคโลนีมาทดสอบทางชีวเคมีและซีรั่มวิทยา

7.2 การประเมินผล

ทดสอบความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง (accuracy) ของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง และ Dynabeads® anti-Salmonella โดยใช้ตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ISO6579:2002

การความไว (ร้อยละ) ทำโดยนำจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยเทคนิค IMS และตรงกับวิธี ISO6579 หารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี ISO6579

การทดสอบความจำเพาะ (ร้อยละ) ทำโดยนำจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยเทคนิค IMS และตรงกับวิธี ISO6579 หารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธี ISO6579

การทดสอบความถูกต้อง (ร้อยละ) ทำโดยนำจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลที่ตรงกันระหว่างเทคนิค IMS และวิธี ISO6579 หารด้วยจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจ