

## ผลและการวิจารณ์

### 1. การหาปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรัม (crude antiserum)

แอนติซีรัมที่ใช้ในการทดสอบมี 3 ชนิด คือ กลุ่ม OMA, OMB และ I สาเหตุที่เลือกแอนติซีรัม 3 ชนิดนี้เนื่องจากในตัวอย่างอาหารมักจะพบเชื้อ *Salmonella* ที่อยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งแอนติซีรัมกลุ่ม OMA, OMB และ I ผลิตจากโอแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* โดยแอนติซีรัมกลุ่ม OMA ได้จากการฉีดเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม A, B, D, E และ L ส่วนกลุ่ม OMB ได้จากการฉีดเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม C, F, G และ H สำหรับแอนติซีรัม I ได้จากการฉีดเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม I เพียงกลุ่มเดียว ทำการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรัม (crude antiserum) แต่ละชนิดโดยวิธี direct agglutination พบว่าปริมาณแอนติบอดี (antibody titer) ในแอนติซีรัมกลุ่ม OMA เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. Derby*, *S. Enteritidis* และ *S. Weltevreden* จะได้ 1:64, 1:128 และ 1:512 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ส่วนปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรัมกลุ่ม OMB เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. Rissen*, *S. Aberdeen* และ *S. Worthington* จะได้ 1:256, 1:2,048 และ 1:1,024 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สำหรับแอนติซีรัมกลุ่ม I มีปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1:512 เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. Hvitvingfoss* ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่ม I

ตารางที่ 1 ปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรัมกลุ่ม OMA เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* ที่เป็นตัวแทนของกลุ่ม

| เชื้อ                              | ปริมาณแอนติบอดี |    |    |    |    |    |     |     |     |       |       | ตัว<br>ควบคุม |
|------------------------------------|-----------------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-------|-------|---------------|
|                                    | 1:              | 1: | 1: | 1: | 1: | 1: | 1:  | 1:  | 1:  | 1:    | 1:    |               |
|                                    | 2               | 4  | 8  | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1,024 | 2,048 |               |
| <i>S. Derby</i><br>(กลุ่ม B)       | +4              | +4 | +4 | +4 | +4 | +3 | -   | -   | -   | -     | -     | -             |
| <i>S. Enteritidis</i><br>(กลุ่ม D) | +4              | +4 | +4 | +4 | +4 | +4 | +2  | -   | -   | -     | -     | -             |
| <i>S. Weltevreden</i><br>(กลุ่ม E) | +4              | +4 | +4 | +4 | +4 | +4 | +4  | +4  | +3  | -     | -     | -             |

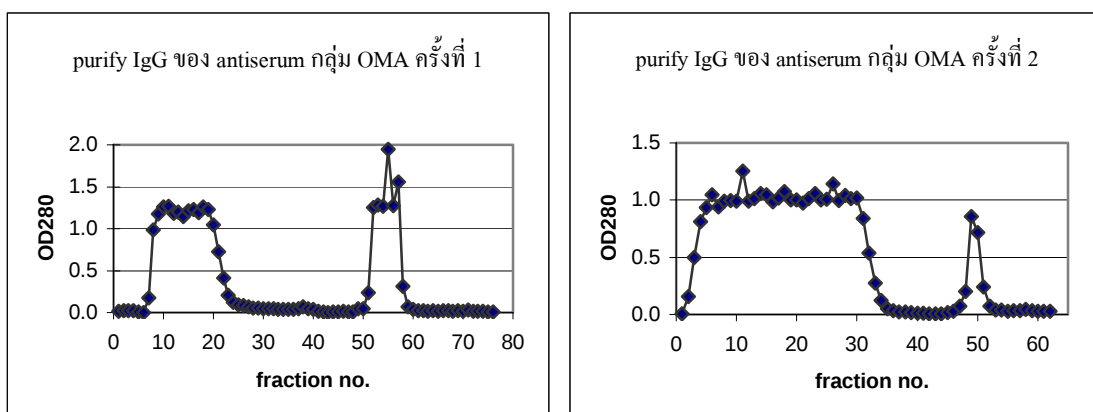
ตารางที่ 2 ปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรัมกลุ่ม OMB เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* ที่เป็นตัวแทนของกลุ่ม

| เชื้อ                              | ปริมาณแอนติบอดี |    |    |    |    |    |     |     |     |       |       | ตัว<br>ควบคุม |
|------------------------------------|-----------------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-------|-------|---------------|
|                                    | 1:              | 1: | 1: | 1: | 1: | 1: | 1:  | 1:  | 1:  | 1:    | 1:    |               |
|                                    | 2               | 4  | 8  | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1,024 | 2,048 |               |
| <i>S. Rissen</i><br>(กลุ่ม C)      | +4              | +4 | +4 | +4 | +4 | +3 | +3  | +3  | -   | -     | -     | -             |
| <i>S. Aberdeen</i><br>(กลุ่ม F)    | +4              | +4 | +4 | +4 | +4 | +4 | +3  | +3  | +3  | +3    | +3    | -             |
| <i>S. Worthington</i><br>(กลุ่ม G) | +4              | +4 | +4 | +4 | +4 | +4 | +4  | +4  | +3  | -     | -     | -             |

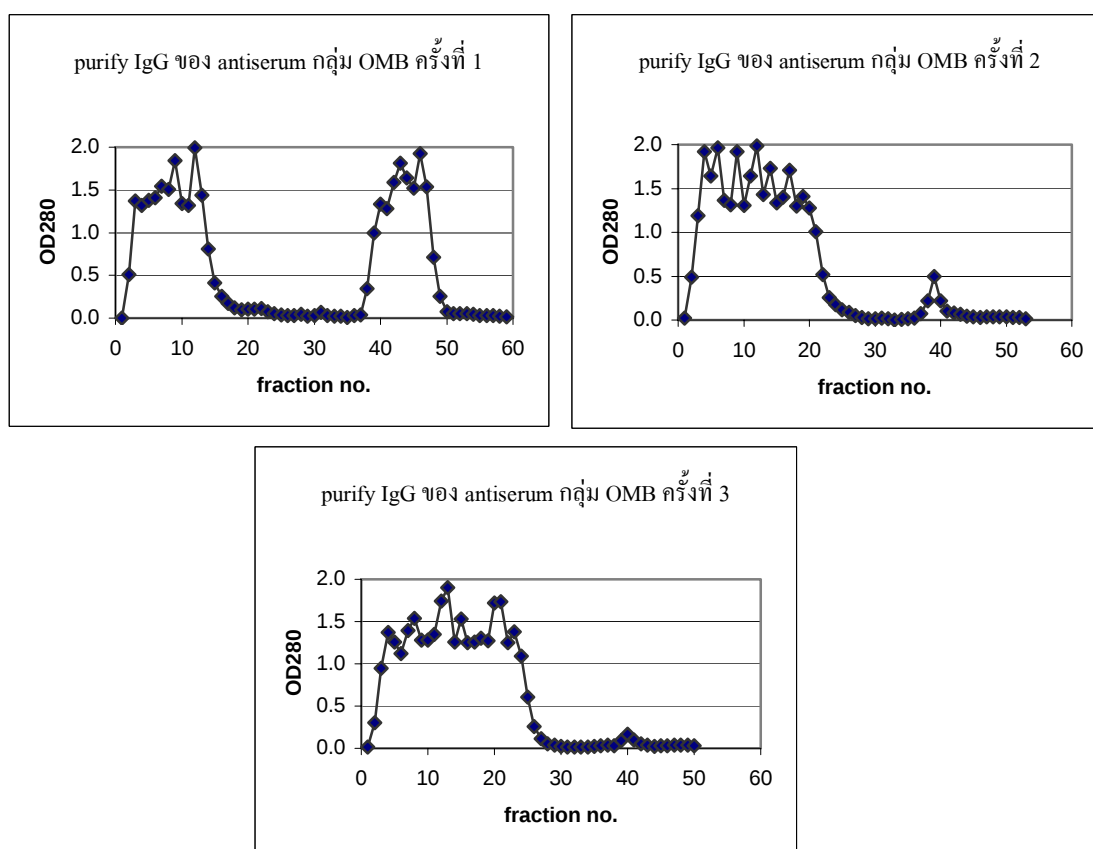
## 2. การเตรียม IgG บริสุทธิ์

นำแอนติซีรั่มกลุ่ม OMA, OMB และ I ที่ได้จากการฉีดเชื้อ *Salmonella* เข้าไปในกระต่าย มาเตรียม IgG บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยแยกเตรียมจากแอนติซีรั่มแต่ละชนิด สำหรับวิธี affinity chromatography นั้นจะใช้คอลัมน์ที่บรรจุ protein A-sepharose โดยโปรตีนเอ (Protein A) จัดเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของ *S. aureus* ที่จะจับกับส่วน FC ของ IgG ส่วนที่ไม่ถูกจับจะหลุดออกมา และจะทำลายการจับกันของ IgG กับ ligand เพื่อให้ IgG หลุดออกมาโดยการเปลี่ยน pH ในการทดลองได้ใช้คอลัมน์ Hitrap™ protein A ขนาด 5 มิลลิลิตร โดยมี 20 mM sodium phosphate pH 7.0 เป็น binding buffer และ 0.1 M citric acid pH 3.0 เป็น elution buffer

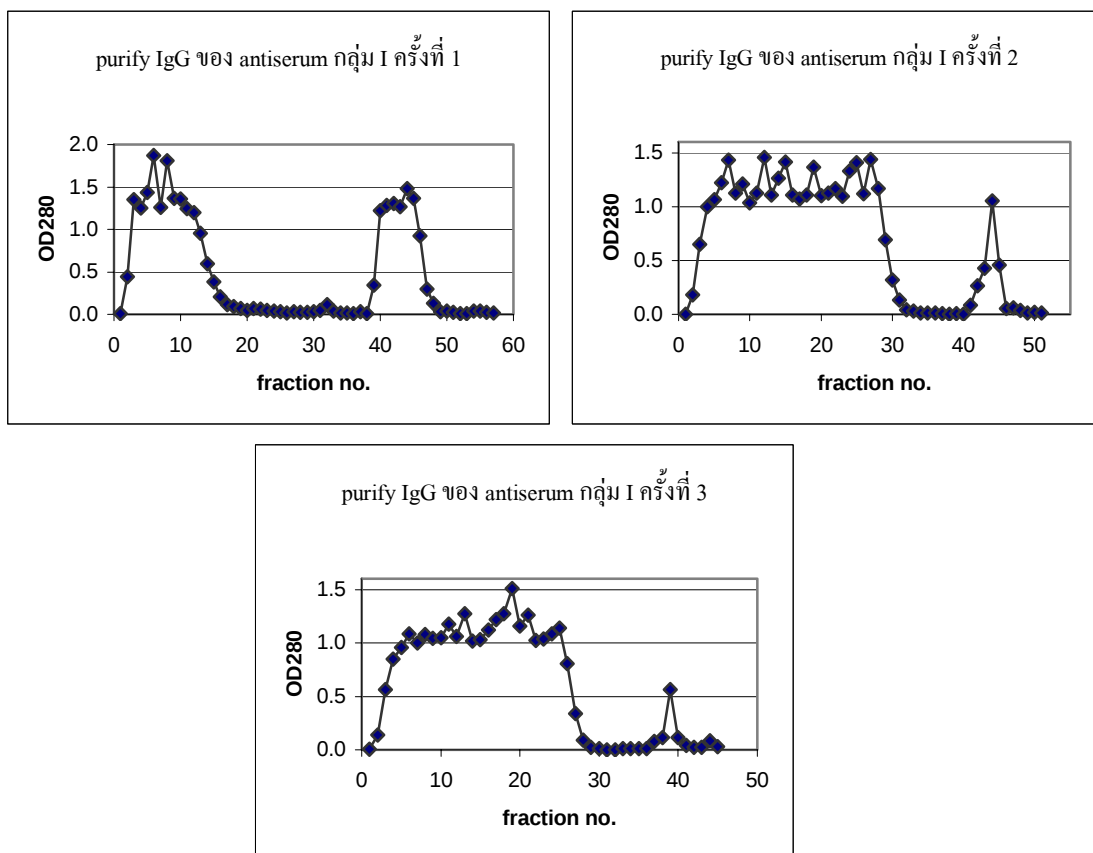
จากการทำ affinity chromatography ของแอนติซีรั่มกลุ่ม OMA และ OMB พบว่าต้องทำการแยก IgG 2 รอบ โดยแอนติซีรั่มกลุ่ม OMA รอบแรกทำการเก็บ IgG ที่ fraction 51 ถึง 58 ส่วนรอบที่ 2 ทำการเก็บที่ fraction 48 ถึง 51 (ภาพที่ 2) สำหรับแอนติซีรั่มกลุ่ม OMB รอบแรกทำการเก็บ IgG ที่ fraction 38 ถึง 49 รอบที่ 2 ทำการเก็บที่ fraction 38 ถึง 40 (ภาพที่ 3) แอนติซีรั่มกลุ่ม I ทำการแยก IgG 3 รอบ รอบแรกทำการเก็บ IgG ที่ fraction 39 ถึง 47 รอบที่ 2 ทำการเก็บที่ fraction 42 ถึง 45 และรอบที่ 3 เก็บที่ fraction 39 (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 2 การแยก IgG จากแอนติซีรั่มกลุ่ม OMA โดยวิธี affinity chromatography



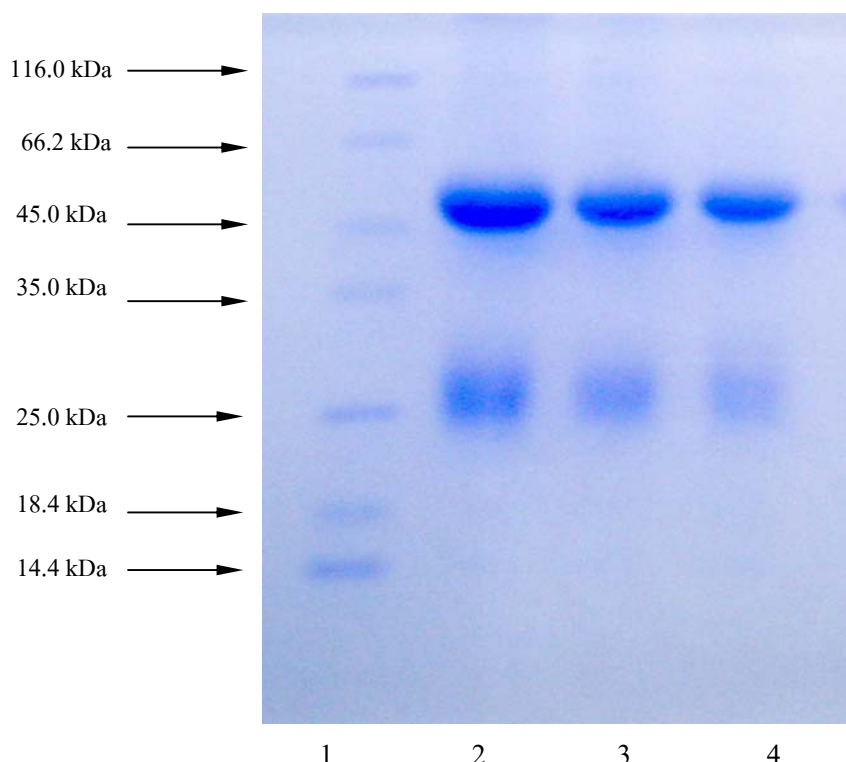
ภาพที่ 3 การแยก IgG จากแอนติซีรั่มกลุ่ม OMB โดยวิธี affinity chromatography



ภาพที่ 4 การแยก IgG จากแอนติซีรั่มกลุ่ม I โดยวิธี affinity chromatography

เมื่อได้ IgG บริสุทธิ์จากแอนติซีรั่มกลุ่ม OMA, OMB และ I แล้ว จะนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ SDS-PAGE (BIO-RAD, n.d.) ด้วยวิธี reduced form เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อม heavy chain และ light chain ของ IgG ทำให้เห็น IgG แยกเป็น 2 bands คือ heavy chain ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน และ light chain ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 ดาลตันเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาพที่ 5)

เมื่อตรวจสอบว่าเป็น IgG บริสุทธิ์แล้วจึงรวม IgG ที่ได้จากแอนติซีรั่มกลุ่ม OMA, OMB และ I ไป lyophilize ด้วยเครื่อง lyophilizer แล้วนำมาหาปริมาณโปรตีนใน IgG ด้วยวิธี Lowry โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (ภาพผนวกที่ ข1) พบว่ามีปริมาณโปรตีนประมาณ 450 ไมโครกรัมต่อ 0.001 กรัมของ IgG หรือ 450 มิลลิกรัมต่อกรัม



ภาพที่ 5 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG โดยการทำให้ SDS-PAGE

lane 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน

lane 2 คือ IgG ของแอนติซีรัมกลุ่ม OMA

lane 3 คือ IgG ของแอนติซีรัมกลุ่ม OMB

lane 4 คือ IgG ของแอนติซีรัมกลุ่ม I

### 3. การหาปริมาณ IgG โดยวิธี direct agglutination

นำ IgG ที่ผ่านการ lyophilize มาละลายใน 0.85% NaCl เพื่อหาปริมาณด้วยวิธี direct agglutination โดยนำมาทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* และ non-*Salmonella* พบว่าปริมาณแอนติบอดีของ IgG ต่อเชื้อ *Salmonella* ลดลงมาก เมื่อเทียบกับก่อนการเตรียม IgG บริสุทธิ์ ผลการทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* เป็นดังนี้ เชื้อ *S. Derby*, *S. Rissen*, *S. Enteritidis*, *S. Weltevreden*, *S. Aberdeen*, *S. Worthington* และ *S. Hvittefoss* ปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1:16, 1:4, 1: 16, 1:16, 1:8, 1:2 และ 1:8 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ non-*Salmonella* คือ เชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *Shigella sonnei* และ *P. mirabilis* ไม่เกิดการตกตะกอน (agglutination) ยกเว้น *Staphylococcus aureus* ที่มีปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1:8 อาจเป็นเพราะ *S. aureus* มีโปรตีนเอนไซม์ที่ผนังเซลล์ที่สามารถจับส่วน

Fc ของ IgG ได้ (ตารางที่ 3) แสดงว่า IgG นี้ค่อนข้างมีความจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella* สำหรับสาเหตุที่ปริมาณแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ลดลงมากอาจมาจากการทำ affinity chromatography ทำให้ Ig ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ IgG ถูกกำจัดออกไป โดยเฉพาะ IgM ซึ่งเป็น Ig ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา agglutination หรือเกิดจากการสูญเสีย IgG บางส่วนในระหว่างการเตรียม IgG บริสุทธิ์

ตารางที่ 3 ปริมาณแอนติบอดีของ IgG บริสุทธิ์ เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* และ non-*Salmonella* โดยวิธี direct agglutination

| เชื้อ                                 | ปริมาณแอนติบอดี |     |     |      |      |      |       |       | ตัวควบคุมลบ |
|---------------------------------------|-----------------|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------------|
|                                       | 1:2             | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 |             |
| <i>S. Derby</i><br>(กลุ่ม B)          | +4              | +4  | +4  | +3   | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>S. Rissen</i><br>(กลุ่ม C)         | +4              | +3  | -   | -    | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>S. Enteritidis</i><br>(กลุ่ม D)    | +4              | +4  | +4  | +4   | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>S. Weltevreden</i><br>(กลุ่ม E)    | +4              | +4  | +4  | +4   | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>S. Aberdeen</i><br>(กลุ่ม F)       | +4              | +4  | +4  | -    | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>S. Worthington</i><br>(กลุ่ม G)    | +4              | -   | -   | -    | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>S. Hvitittingfoss</i><br>(กลุ่ม I) | +4              | +4  | +4  | -    | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>E. coli</i>                        | -               | -   | -   | -    | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>K. pneumoniae</i>                  | -               | -   | -   | -    | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>E. aerogenes</i>                   | -               | -   | -   | -    | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>S. sonnei</i>                      | -               | -   | -   | -    | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>P. mirabilis</i>                   | -               | -   | -   | -    | -    | -    | -     | -     | -           |
| <i>S. aureus</i>                      | +               | +   | +   | -    | -    | -    | -     | -     | -           |

#### 4. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเคลือบ IgG บน Dynabeads M-280 Tosylactivated โดยเปรียบเทียบกับ Dynabeads<sup>®</sup> anti-Salmonella

##### 4.1 การตรวจหาจำนวน beads ที่เหมาะสมในการเคลือบด้วย IgG

จากการทดลองนำ Dynabeads M-280 Tosylactivated จำนวน 5 และ 10 ไมโครลิตร (จากขวดที่มี beads ประมาณ  $2 \times 10^9$  ต่อมิลลิลิตร) คิดเป็นอนุภาค beads ประมาณ  $1 \times 10^7$  และ  $2 \times 10^7$  ตามลำดับ มาเคลือบด้วย IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม แล้วนำไปจับเชื้อ *S. Enteritidis* จำนวน 8,000 CFU/มิลลิลิตร โดยใช้เวลาจับเชื้อ 10 และ 60 นาที พบว่าที่เวลาจับเชื้อเท่ากัน beads มีความสามารถในการจับเชื้อใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4) และไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ beads ปริมาตร 5 ไมโครลิตรเพื่อประหยัด เนื่องจาก beads มีราคาสูง คือ ประมาณ 45 บาท/5 ไมโครลิตร

ตารางที่ 4 การจับเชื้อ *S. Enteritidis* เมื่อใช้ปริมาตร beads และเวลาต่างกันโดยใช้ปริมาณเชื้อ 8,000 CFU/มิลลิลิตร

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

#### 4.2 การตรวจหาบัพเฟอร์และอนุภูมิที่เหมาะสมในการเคลือบ beads

การเคลือบ IgG ตามวิธีที่ผู้ผลิต Dynabeads M-280 Tosylactivated แนะนำมีบัพเฟอร์ที่ใช้อยู่ 2 ชนิด คือ 0.1M borate buffer pH 9.5 กับ 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 และอนุภูมิที่ใช้เคลือบ คือ 37 องศาเซลเซียส หรือ 4 องศาเซลเซียส โดยการใช้อนุภูมิต่ำจะทำให้การจับกันทางเคมีของ IgG กับ beads เกิดขึ้นช้า (ใช้เวลามากกว่า 48 ชั่วโมง) ในขณะที่อนุภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 16-24 ชั่วโมง ซึ่ง Dynabeads M-280 Tosylactivated จะจับโปรตีนด้วยการดูดติดทางกายภาพ และทางเคมี โดยพันธะโควาเลนต์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ทั้งอนุภูมิและ pH สูงจากการทดลองเปรียบเทียบการเคลือบ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัมบน beads ที่สภาวะต่างๆ กัน 4 สภาวะแล้วนำไปจับเชื้อ *S. Enteritidis* จำนวน 10,500 CFU/มิลลิลิตรนาน 10 นาที พบว่าการใช้ 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 ให้ผลการจับเชื้อดีกว่าการใช้ 0.1 M borate buffer pH 9.5 และเมื่อเปรียบเทียบอนุภูมิที่ใช้ในการเคลือบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง กับ 4 องศาเซลเซียส นาน 48-60 ชั่วโมงโดยใช้บัพเฟอร์ชนิดเดียวกัน พบว่าการจับเชื้อของ beads ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการเคลือบ IgG โดยใช้ 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 และที่อนุภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง เพื่อประหยัดเวลาในการทำ

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบบัพเฟอร์และอนุภูมิที่เหมาะสมในการเคลือบ IgG บน beads ในการจับเชื้อ *S. Enteritidis* โดยใช้ปริมาณเชื้อ 10,500 CFU/มิลลิลิตร

| สภาวะการเคลือบ                                                | จำนวนเชื้อที่พบ (CFU/มิลลิลิตร) |             |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------|
|                                                               | Beads                           | Supernatant |
| 0.1 M borate buffer, 37 องศาเซลเซียส, 16-24 ชั่วโมง           | 110                             | 9,050       |
| 0.1 M borate buffer, 4 องศาเซลเซียส, 48-60 ชั่วโมง            | 75                              | 9,700       |
| 0.1 M sodium phosphate buffer, 37 องศาเซลเซียส, 16-24 ชั่วโมง | 500                             | 9,400       |
| 0.1 M sodium phosphate buffer, 4 องศาเซลเซียส, 48-60 ชั่วโมง  | 405                             | 8,800       |

#### 4.3 การตรวจหาปริมาณ IgG ที่เหมาะสมในการเคลือบ beads

เนื่องจากวิธีการเคลือบแอนติบอดีของ Dynabeads M-280 Tosylactivated ในคู่มือกล่าวว่าใช้แอนติบอดีเพียง 3-8 ไมโครกรัมต่อ  $10^7$  Dynabeads จึงทดลองใช้ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมมาเคลือบ beads แล้วไปจับเชื้อ *S. Rissen* (กลุ่ม C) และ *S. Hvittingfoss* (กลุ่ม I) นาน 60 นาที โดยทั้งสองเชื้อเป็นเชื้อที่ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับได้น้อยที่สุด และมากที่สุด ตามลำดับ (ข้อมูลไม่แสดง) เมื่อเปรียบเทียบกับ Dynabeads<sup>®</sup> anti-Salmonella ที่จับเชื่อนาน 10 นาที สาเหตุที่ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองต้องใช้เวลารับเชื่อนาน 60 นาทีเนื่องจากพบว่าถ้าใช้เวลาจับเชื้อ 10 นาทีจะจับเชื้อ *Salmonella* ได้น้อยลง (ตารางที่ 4) ผลการทดลองพบว่า beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองยังคงจับเชื้อ *S. Rissen* ได้น้อยกว่า Dynabeads<sup>®</sup> anti-Salmonella แต่จับเชื้อ *S. Hvittingfoss* ได้มากกว่าถึงแม้จะใช้ IgG 50 ไมโครกรัม (ตารางที่ 6) แต่การลด IgG ลงความสามารถในการจับเชื้อ *Salmonella* ของ beads ก็ลดลงเช่นกัน ดังนั้นจึงไม่ควรที่จะลด IgG ลงเพราะจะทำให้การจับเชื้อ *Salmonella* กลุ่มที่ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับได้น้อยลดลง เช่น กลุ่ม C และ D ดังนั้นในการตรวจหาเวลาที่ใช้ในการจับเชื้อจะใช้ IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 200 ไมโครกรัม

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของ IgG ที่ระดับต่างๆที่ใช้ในการเคลือบ beads ในการจับเชื้อ *Salmonella*

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

#### 4.4 การตรวจหาเวลาที่เหมาะสมในการจับเชื้อของ beads ที่เคลือบ IgG

ทำการเคลือบ beads ด้วย IgG ที่มีปริมาณโปรตีน 200 ไมโครกรัม แล้วนำไปจับเชื้อ S. Derby, S. Rissen, S. Enteritidis, S. Weltevreden และ S. Hvittingfoss ซึ่งอยู่ในกลุ่ม B, C, D, E และ I ตามลำดับ โดยใช้เวลา 60 และ 180 นาทีเปรียบเทียบผลการจับกับ Dynabeads® anti-Salmonella ที่ใช้เวลาการจับเชื้อ 10 นาที สาเหตุที่ต้องหาเวลาในการจับเชื้อของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง เนื่องจากได้ทดลองจับเชื้อ *Salmonella* ที่เวลา 10 นาทีแล้วพบว่าความสามารถในการจับเชื้อ *Salmonella* กลุ่มต่างๆ ยังน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ Dynabeads® anti-Salmonella ยกเว้นกลุ่ม I ผลการจับเชื้อที่เวลา 60 และ 180 นาที พบว่าการใช้เวลามากขึ้นสามารถจับเชื้อได้มากขึ้น โดยที่เวลา 60 นาที beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองสามารถจับเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม B และ E ได้ใกล้เคียงกับ Dynabeads® anti-Salmonella ส่วนกลุ่ม C และ D, beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อได้น้อยกว่าแต่จับเชื้อกลุ่ม I ได้มากกว่า ส่วนที่เวลา 180 นาที beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อกลุ่ม B, E และ I ได้มากกว่า แต่กลุ่ม C และ D ยังคงน้อยกว่า (ตารางที่ 7) ดังนั้นในการทดลองต่อไป beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจะใช้เวลาจับเชื้อ 60 นาที สาเหตุที่ไม่ใช้เวลานานกว่านี้เพราะต้องการลดการเกิด non-specific binding หรือการเกาะกันอย่างไม่จำเพาะกับเชื้อ non-*Salmonella* ที่อยู่ในอาหาร

ตารางที่ 7 การจับเชื้อของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับ  
Dynabeads<sup>®</sup> anti-Salmonella

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

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

จากการเปรียบเทียบการจับเชื้อ *Salmonella* ในกลุ่ม B, C, D, E, F, G, I รวมทั้งกลุ่ม N ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้ใช้ในการผลิตแอนติซีรัมกลุ่ม OMA, OMB และ I ของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง กับที่ไม่เคลือบด้วย IgG ใช้เวลาจับเชื้อ 60 นาที และ Dynabeads® anti-Salmonella ใช้เวลาจับเชื้อ 10 นาที พบว่า beads ที่ไม่เคลือบด้วย IgG สามารถจับเชื้อที่ทดสอบได้ทุกเชื้อโดยจับ *S. Weltevreden* ได้ดีที่สุดแสดงว่าเกิด non-specific binding ส่วน beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อ *S. Aberdeen*, *S. Worthington* และ *S. Hvitvingfoss* ได้ดีกว่า Dynabeads® anti-Salmonella แต่เชื้อ *Salmonella* กลุ่มเหล่านี้พบไม่บ่อยในอาหาร แต่กลุ่มที่พบบ่อย คือ B, C, D และ E ซึ่ง beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อได้น้อยกว่า Dynabeads® anti-Salmonella สำหรับการจับเชื้อ *S. Urbana*, beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองก็ยังจับได้อาจเป็นเพราะมี antigenic determinant คล้ายกันหรือเกิด non-specific binding เช่นเดียวกับ beads ที่ไม่เคลือบด้วย IgG ส่วน Dynabeads® anti-Salmonella นั้นผู้ผลิต beads ชนิดนี้กล่าวว่าจับเชื้อ *Salmonella* ได้ในกลุ่ม B ถึง Z โดยความสามารถในการจับจะแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามจำนวนเชื้อ *S. Urbana* ที่จับได้ของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง กับที่ไม่เคลือบด้วย IgG และ Dynabeads® anti-Salmonella ก็ไม่สูงนักจึงน่าจะเกิดจาก non-specific binding (ตารางที่ 8)

ส่วนการจับเชื้อของ beads ในกลุ่ม non-*Salmonella* พบว่า beads ที่ไม่เคลือบด้วย IgG จับเชื้อที่ทดสอบได้เกือบทุกเชื้อ ยกเว้นเชื้อ *E. coli* และ *Shigella sonnei* (ตารางที่ 9) โดยเฉพาะ *K. pneumoniae* และ *P. mirabilis* ที่จับได้มากพอๆ กับ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง สำหรับ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองกับ Dynabeads® anti-Salmonella สามารถจับได้ทุกเชื้อ โดยเฉพาะ *E. aerogenes*, *P. mirabilis* และ *Staphylococcus aureus* ที่ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อได้มากกว่า แต่สำหรับเชื้อ *K. pneumoniae*, beads ทั้งสามชนิดจับได้พอๆ กัน การจับเชื้อ non-*Salmonella* ได้จัดเป็น non-specific binding ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการให้เกิด เพราะแสดงว่า beads เหล่านี้ไม่มีความจำเพาะ การจับเชื้อได้ของ beads อาจเป็นเพราะเชื้อไปเกาะติดเฉยๆ โดยไม่เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ของแอนติบอดีกับแอนติเจน เพราะจากการทำการทดลองหลายๆ ครั้งพบว่าจำนวนเชื้อที่จับได้ไม่สม่ำเสมอ ยกเว้นการจับเชื้อ *E. aerogenes* และ *Staphylococcus aureus* ที่ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อได้มากกว่า Dynabeads® anti-Salmonella และ beads ที่ไม่เคลือบด้วย IgG ทุกครั้ง (ข้อมูลไม่แสดง) ซึ่งอาจเป็นเพราะในการเคลือบ IgG อาจจะมีโครงสร้าง

ส่วน Fab ของ IgG ที่ไปเกาะบนผิว bead แล้วหันส่วน Fc ออกมาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งมีโปรตีนเอจิงไปเกาะส่วน Fc ของ IgG ที่ใช้ในการเคลือบ beads จึงถูกจับได้มากทั้งที่ไม่ได้อยู่ใน Family Enterobacteriaceae ส่วนการจับเชื้อ *E. aerogenes* ได้มากอาจเป็นเพราะอยู่ใน Family Enterobacteriaceae เหมือนกันจึงอาจมี antigenic determinant คล้ายกัน การที่ Dynabeads® anti-Salmonella มีความจำเพาะในการจับเชื้อมากกว่าอาจเป็นเพราะ IgG ที่ใช้เคลือบเป็นส่วนผสมของโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เกาะแบบโควาเลนต์บนผิว beads (Poppe *et al.*, 1996) หรือแอนติบอดีที่ใช้ อาจมีการ adsorbed antigen คือ นำเชื้อที่ไม่ต้องการให้เกิด non-specific binding มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ใช้เคลือบก่อน

**ตารางที่ 8** ความจำเพาะของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง  
เปรียบเทียบกับ Dynabeads<sup>®</sup> anti-Salmonella เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella*

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

ตารางที่ 8 (ต่อ)

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

**ตารางที่ 9** ความจำเพาะของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง  
เปรียบเทียบกับ Dynabeads<sup>®</sup> anti-Salmonella เมื่อทดสอบกับเชื้อ non-*Salmonella*

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

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

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

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

ตารางที่ 10 ความไวของ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองเปรียบเทียบกับ Dynabeads<sup>®</sup> anti-Salmonella เมื่อใส่เชื้อ *Salmonella* ที่ระดับต่างๆ

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

## 7. การศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี IMS และวิธีมาตรฐาน ISO6579:2002

### 7.1 การตรวจเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ

จากการตรวจตัวอย่างอาหารจำนวน 30 ตัวอย่าง จำแนกเป็น ไก่สด 27 ตัวอย่าง และอาหารทะเลแช่แข็ง 3 ตัวอย่าง โดยใช้ coated beads ที่ผลิตเอง กับ Dynabeads® anti-Salmonella และวิธี ISO6579:2002 มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW เป็น enrichment medium เพื่อเพิ่มการเจริญของเชื้อ โดยการตรวจด้วยวิธี IMS จะลดเวลาการบ่มตัวอย่างอาหารใน BPW จาก 18-24 ชั่วโมง เป็น 8 ชั่วโมงเพื่อลดเวลาการตรวจเชื้อ *Salmonella* ลง แต่วิธี ISO6579:2002 ยังบ่มตามปกติ คือ นาน 18±2 ชั่วโมง และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ MSRV และ XLD ในการแยกเชื้อ *Salmonella* โดยลักษณะเชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV จะมีโซนขุ่น 2 โซนด้านนอกจะขุ่นน้อยกว่า (ภาพผนวกที่ 3) ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่จะไม่มีสีและมีจุดสีดำตรงกลางโคโลนี (ภาพผนวกที่ 4) ผลการตรวจตัวอย่างอาหารทั้งหมด 30 ตัวอย่าง เมื่อใช้ coated beads ที่ผลิตเองพบเชื้อ *Salmonella* 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 83.3) จากอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ MSRV และ 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.3) จากอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ XLD ส่วน Dynabeads® anti-Salmonella พบเชื้อ *Salmonella* 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 83.3) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10.0) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD วิธี ISO6579:2002 พบเชื้อ *Salmonella* 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 86.7) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ XLD เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ RVS แต่เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ MKTT พบเชื้อ *Salmonella* 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 86.7) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 56.7) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD (ตารางที่ 11) แต่เวลาที่ใช้ในการจับเชื้อของ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง คือ 60 นาทีซึ่งนานกว่า Dynabeads® anti-Salmonella ที่ใช้เวลา 10 นาที อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทดลองใช้ beads เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเองจับเชื้อนาน 10 นาที กับบางตัวอย่างก็พบว่ายังจับเชื้อ *Salmonella* ได้ (ข้อมูลไม่แสดง) การที่วิธี ISO6579:2002 พบเชื้อ *Salmonella* มากกว่าวิธี IMS ซึ่งตรงข้ามกับการศึกษาของ Coleman *et al.* (1995) อาจเป็นเพราะการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW ของวิธี ISO6579:2002 นานกว่าทำให้เชื้อ *Salmonella* สามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นจนเพียงพอสำหรับการตรวจพบอีกทั้งยังมีอาหารเลี้ยงเชื้อ MKTT และ RVS ที่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น หรือตัวอย่างมีไขมันมากทำให้สูญเสียเชื้อไปในขั้นตอนการทำ IMS (Skjerve and Olsvik, 1991) เพราะ beads ถูกจับโดยแม่เหล็กไม่หมด ซึ่ง Coleman *et al.* (1995) ได้แนะนำวิธีแก้ปัญหาโดยการนำตัวอย่างก่อนที่จะไปผสมกับ beads แช่ในตู้เย็นนาน 1 ชั่วโมงเพื่อให้ไขมัน

แข็งตัวและอนุภาคอาหารตกตะกอน หรือทำการเจือจางตัวอย่างที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อใน BPW ก่อนนำมาทำ IMS (DynaL, 1999)

เมื่อเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ XLD ที่ใช้ในการตรวจทั้งวิธี IMS และ ISO6579:2002 พบว่าสามารถพบเชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV ได้มากกว่า ยกเว้นวิธี ISO6579:2002 ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RVS เป็น selective medium ที่พบเชื้อ *Salmonella* เท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV คล้ายกับการศึกษาของ Poppe *et al.* (1996) ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ Rambach ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งในการตรวจเชื้อ *Salmonella* แล้วพบเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV มากกว่า อีกทั้งการตรวจตัวอย่างอาหารโดยวิธี IMS แล้วเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD ทันทีพบว่าทำการแยกเชื้อ *Salmonella* ได้ยากเนื่องจากมีเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันขึ้นปกคลุม (Cudjoe *et al.*, 1994; Coleman *et al.*, 1995) โดยเฉพาะอาหารที่ไม่ผ่านกรรมวิธีผลิตที่จะมีเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันปนเปื้อนสูง ทำให้ต้องเสียเวลาในการแยกเชื้อซ้ำกับโคโลนีที่สงสัย คือมีโคโลนีสีดำแต่ไม่ใช่โคโลนีบริสุทธิ์ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันที่พบส่วนใหญ่เป็นพวกใช้น้ำตาลแลกโตสที่อาจจะเกาะ beads แบบไม่จำเพาะ หรือเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีที่เคลือบ beads (Cudjoe and Krona, 1997) แต่ในอาหารที่มีเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันปนเปื้อนน้อยจะไม่พบปัญหาการแยกเชื้อ จึงมีการแก้ปัญหาคัดเลือกกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันโดยใช้ bacto selenite brilliant green sulfa enrichment (SBG) ซึ่งเป็น selective enrichment แทนอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW แล้วทำ IMS และแยกเชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และ brilliant green agar (BGA) โดยตรง พบว่าการทำ IMS พบเชื้อ *Salmonella* ในไก่สดและอาหารสัตว์เท่ากับวิธี ISO6579:1990(E) และมากกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BPW (Cudjoe and Krona, 1997) ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV สามารถอ่านผลได้ชัดเจนว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* โดยจะเกิดโซนขุ่น 2 โซน ด้านนอกจะขุ่นน้อยกว่า โซนขุ่นดังกล่าวเกิดจากการเคลื่อนที่ของเชื้อ *Salmonella* ส่วนเชื้ออื่นๆ การเคลื่อนที่จะถูกยับยั้งโดยสารแมกนีเซียมคลอไรด์ มาลาไคท์ กรีน และ Novobiocin ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV รวมทั้งการใช้อุณหภูมิสูงคือ 42 องศาเซลเซียสในการบ่มเชื้อ จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการแยกเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์แข่งขันสูง (De Medici *et al.*, 1998) ถึงแม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ใช้ได้กับเชื้อ *Salmonella* ที่เคลื่อนที่ได้เท่านั้น แต่เชื้อ *Salmonella* ที่ไม่เคลื่อนที่ เช่น *S. Pullorum* และ *S. Gallinarum* ก็พบน้อยมาก และการเจือเชื้อจาก MSRV มาทดสอบทางชีวเคมีโดยตรงบางครั้งจะไม่ได้โคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อ *Salmonella* ทำให้ผลทางชีวเคมีไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* แต่เมื่อทดสอบทางชีววิทยาแล้วเป็นเชื้อ *Salmonella* ซึ่งเหตุการณ์เช่นนี้พบไม่บ่อยนัก

## 7.2 การประเมินผล

ในการหาความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง (accuracy) ของ Dynabeads<sup>®</sup> anti-Salmonella (ตารางผนวกที่ ๑1) กับ Dynabeads M-280 Tosylactivated เคลือบด้วย IgG ที่ผลิตเอง (ตารางผนวกที่ ๑2) พบว่ามีค่าเท่ากัน คือ ร้อยละ 96.15, ร้อยละ 100 และร้อยละ 96.67 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ISO6579:2002 แต่เวลาที่ใช้ในการตรวจอาหารจนพบเชื้อ *Salmonella* ในการวิจัยครั้งนี้วิธี IMS จะใช้เวลารวม 2 วัน แต่วิธีมาตรฐาน ISO6579:2002 ใช้เวลา 4 วัน

ตารางที่ 11 การตรวจเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร โดยวิธี IMS และ ISO6579:2002

| ชนิดอาหาร            | จำนวน<br>ตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ <i>Salmonella</i> โดยวิธี |                              |              |     |
|----------------------|-------------------|---------------------------------------------------|------------------------------|--------------|-----|
|                      |                   | IMS                                               |                              | ISO6579:2002 |     |
|                      |                   | Dy anti<br>beads <sup>1</sup>                     | Coated<br>beads <sup>2</sup> | MKTT         | RVS |
| เนื้อไก่สด           | 27                | 25                                                | 25                           | 26           | 26  |
| อาหารทะเลแช่<br>แข็ง | 3                 | 0                                                 | 0                            | 0            | 0   |
| รวม                  | 30                | 25                                                | 25                           | 26           | 26  |

<sup>1</sup> Dy anti beads = Dynabeads<sup>®</sup> anti-Salmonella

<sup>2</sup> Coated beads = Dynabeads M-280 Tosylactivated ที่เคลือบ IgG เอง