215470

กฤษฎา ตู้จินดา 2551: การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พัชรี สุนทรนันท, ปร.ด. 78 หน้า

Salmonella เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคไข้รากสาด โรคอาหารเป็นพิษ มักพบปนเปื้อนอยู่ในอาหารหลายประเภท ทั้งที่เป็นอาหารดิบและอาหารที่ปรุงสำเร็จ การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาทั่วไปมักใช้เวลาในการตรวจหลายวัน การตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยาที่พัฒนาขึ้นในการวิจัยนี้จะใช้วิธี dot-ELISA โดยผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย ด้วยการฉีดเชื้อ *Salmonella* ser. Anatum และ *Salmonella* ser. Enteritidis เจาะเลือดกระต่ายแยกแอนติซีรั่ม แล้วนำไปเตรียม IgG บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ตรวจความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจหาปริมาณโปรตีนของ IgG บริสุทธิ์ได้ 625 ไมโครกรัมต่อกรัมของตัวอย่าง นำ IgG ที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจหา *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA ปรากฏว่าสามารถตรวจพบ *Salmonella* ทุกซีโรวาร์ที่ใช้เป็นตัวแทนในแต่ละ group ของ *Salmonella* แต่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับแบคทีเรียกลุ่ม enteric ที่ไม่ใช่ *Salmonella* จึงได้ใช้อาหาร Rappaport Vassiliadis Soya (RVS) broth เพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อส่งเสริมการเจริญของ *Salmonella* แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม non-Salmonella แล้วจึงตรวจด้วยวิธี dot-ELISA พบว่าสามารถขจัดปัญหาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ดี เมื่อนำวิธี dot-ELISA มาตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหาร โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร RVS broth ก่อนการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA แล้วเปรียบเทียบกับวิธีตรวจทางจุลชีววิทยาโดยใช้วิธีมาตรฐาน (ISO6579:2002) ที่ดัดแปลงโดยใช้ RVS broth เป็น selective enrichment หลังจากนั้น spread บนอาหาร selective และ differential agar โดยใช้อาหาร xylose lysine deoxycholate (XLD) agar แล้วทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญบางประการของเชื้อ *Salmonella* ผลการทดลองพบว่าการใช้อาหาร RVS broth เพาะเลี้ยงเชื้อแล้วตามด้วยวิธี dot-ELISA ให้ผลการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ได้เหมือนกับการตรวจทางจุลชีววิทยาด้วยวิธีมาตรฐาน แต่วิธีการตรวจโดยใช้ RVS broth ร่วมกับ dot-ELISA ใช้เวลารวมประมาณ 24 ชั่วโมง ซึ่งเร็วกว่าวิธีมาตรฐานที่ปฏิบัติทั่วไปและวิธีตรวจก็ง่าย ใช้สารทดสอบในปริมาณน้อย จึงจัดเป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจและน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีอีกทางหนึ่งในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารและตัวอย่างน้ำบริโภค

215470

Krisada Tuchinda 2008: Development of Detection Method for *Salmonella* by Dot-ELISA using Polyclonal Antibody. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor Patcharee Sunthornandh, Ph.D. 78 pages.

Salmonella are pathogenic bacteria in gastrointestinal tract. It cause of many diseases such as typhoid fever and food poisoning. *Salmonella* are contaminated in many kinds of food (raw food and ready-to-eat). Detection of *Salmonella* in food samples by conventional method take a long times. In this study, polyclonal antibody produced from rabbit injected by *Salmonella* ser. Anatum and *Salmonella* ser. Enteritidis were used for dot-ELISA method. Antibody(IgG) were purified by using affinity chromatography and SDS-PAGE were used to check the purity. Amount of purified IgG were 625 μg/mg of sample. The IgG was used to detect *Salmonella* by dot-ELISA. It could detect all serovars of *Salmonella* representing in each group. However, it showed cross reaction with enteric bacteria (non-salmonella). Therefore, Rappaport Vassiliadis Soya (RVS) broth was selected for increase number of *Salmonella* but suppress number of non-salmonella. After that *Salmonella* were detected by dot-ELISA. This method could eliminate cross reaction. Detection of *Salmonella* from artificial contaminated food was compared between dot-ELISA and modified conventional method (ISO6579: 2002). The modified conventional method used RVS broth as selective enrichment medium and spread on xylose lysine deoxycholate (XLD) agar (selective and differential agar), followed by testing the important biochemical reaction of *Salmonella*. Using RVS broth followed by dot-ELISA showed the similar result as modified conventional method. But this detection method (culture in RVS broth and detect by dot-ELISA) took only 24 hours, which shorter than conventional method. Moreover, the method was easy and used a little amount of reagents. This method showed good sensitivity and was a good option for detection *Salmonella* in food samples and water.