



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี

Development of Detection Method for *Salmonella* by Dot-ELISA using Polyclonal Antibody

นามผู้วิจัย นายกฤษฎา ตูจันดา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พัชรี สุนทรนนท์, ปร.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์องอาจ เล่าหิวนิจ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี

Development of Detection Method for *Salmonella* by Dot-ELISA using Polyclonal Antibody

โดย

นายกฤษฎา คูจินดา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2551

กฤษฎา คูจินดา 2551: การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พัชร สุพรรณนันท, 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 ฉะเล็ดกระต่ายแยกแอนติซีรัม แล้วนำไปเตรียม IgG บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ตรวจความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจหาปริมาณโปรตีนของ IgG บริสุทธิ์ได้ 625 ไมโครกรัมต่อกรัมของตัวอย่างนำ IgG ที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจหา *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA ปรากฏว่าสามารถตรวจพบ *Salmonella* ทุกซีรอร์ทที่ใช้เป็นตัวแทนในแต่ละ 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 มาตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร 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

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.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พัชรี สุนทรนนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล รองศาสตราจารย์ ดร.องอาจ เลาหิณีจ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่คอยแนะนำ ช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มอบทุนสนับสนุนการทำวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาให้ ซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์นี้ดำเนินไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และคุณป้าที่คอยให้กำลังใจ ชี้นำและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายขอขอบคุณความดีและประโยชน์ที่พึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ แก่บิดา มารดา และคุณป้าผู้มีพระคุณสูงสุด และคณาจารย์ผู้ประสพวิชาความรู้ทุกท่านตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

กฤษฎา คูจินดา

กันยายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	51
สรุปผลการทดลอง	51
ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	53
ภาคผนวก	57
ภาคผนวก ก	58
ภาคผนวก ข	62
ภาคผนวก ค	66
ภาคผนวก ง	72
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	78

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการทดสอบทางชีวเคมีบางอย่างที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ <i>Salmonella</i>	13
2	ตัวอย่างของ Rapid test kits ที่ใช้ในการตรวจหา <i>Salmonella</i> ที่ผลิตเป็นการค้า (Baylis, 2000)	19
3	แสดงกลุ่มของเชื้อผสมที่จะผสมลงในอาหาร artificial contaminated food	32
4	แสดงผลการนับจำนวนเชื้อบางชนิดโดยวิธี dilution plate count จาก suspension ของเชื้อที่ OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1	38
5	แสดงผลการตรวจเชื้อ <i>Salmonella</i> ซีโรวาร์อื่นด้วยวิธี dot ELISA	40
6	แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแบคทีเรียกลุ่ม non-salmonella ที่เป็น enteric bacteria โดยวิธี dot-ELISA	42
7	แสดงผลการใช้อาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ร่วมกับวิธี dot-ELISA	43
8	แสดงผลการนับจำนวนเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง	46
9	แสดงผลการใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหาร artificial contaminated food ที่เตรียมขึ้น	47
10	แสดงผลการใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิดจากแหล่งขาย โดยเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี conventional method ที่ดัดแปลงขึ้น	48

ตารางผนวกที่

ข1	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของโปรตีนมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่าง ที่เจือจาง 5 เท่า	64
----	--	----

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ง1 ภาพผลการตรวจเชื้อ <i>Salmonella</i> ซีโรวาร์อื่นด้วยวิธี dot ELISA	73
ง2 แสดงภาพผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแบคทีเรียกลุ่ม non-salmonella ที่เป็น enteric bacteria โดยวิธี dot-ELISA	74
ง3 แสดงภาพผลการใช้อาหาร Rappaport-Vassiliadis broth (RVS) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ร่วมกับวิธี dot-ELISA	74
ง4 แสดงภาพผลการใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหาร artificial contaminated food ที่เตรียมขึ้น โดยเปรียบเทียบกับการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี dilution plate count	75
ง5 แสดงภาพผลการใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิด จากแหล่งขาย โดยเปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี conventional method	76

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะ O antigen ของเชื้อ <i>Salmonella</i>	5
2	แสดงลักษณะของ flagella (H antigen) และ capsule (Vi antigen)	6
3	แสดงกลไกการบุกรุกและก่อโรคของเชื้อ <i>Salmonella</i>	7
4	การตรวจหาเชื้อ <i>Salmonella</i> โดยวิธี standard conventional method ของ หน่วยงาน BAM, AOAC, Canada และ ISO	14
5	แสดงผลการ load ตัวอย่างผ่าน affinity column ด้วยวิธี affinity chromatography	35
6	ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG โดยการทำให้ SDS-PAGE	37
ภาพผนวกที่		
ข1	กราฟโปรตีนมาตรฐานของ bovine serum albumin	65

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BAM	=	Bacteriological Analytical Manual
ISO	=	International Organization for Standardization
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IgG	=	Immunoglobulin G
CFU	=	Colony forming unit
AOAC	=	Association of Official Analytical Chemist
SDS-PAGE	=	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
ser.	=	serovar

การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอล แอนติบอดี

Development of Detection Method for *Salmonella* by Dot-ELISA using Polyclonal Antibody

คำนำ

Salmonella เป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่ง ตรวจพบเชื้อได้ในธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน หรือ พืชต่าง ๆ รวมทั้งพบการปนเปื้อนของเชื้อในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิด เช่น เนื้อสัตว์ นม ไข่ พืชผัก และผลิตภัณฑ์อาหารที่แปรรูปจากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก เบคอน แฮม เป็นต้น ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไข่เป็นส่วนประกอบ เช่น น้ำสลัด มายองเนส ก็มีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อ นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อในอาหารที่ปรุงสำเร็จแล้ว หรืออาหารที่พร้อมบริโภคอีกหลายชนิด โรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* มักเรียกว่า Salmonellosis ซึ่งรวมทั้งโรคไข้รากสาด (typhoid fever) ด้วย การเกิดโรคเนื่องจากเชื้อนี้พบได้ทั่วโลกแต่พบมากในประเทศเขตร้อน โดยเฉพาะแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย และเชื้อสามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์

โดยทั่วไปเกณฑ์มาตรฐานอาหารของทุกประเทศไม่ว่าจะเป็นอาหารที่บริโภคในประเทศ หรือส่งออกจะต้องตรวจไม่พบ *Salmonella* เลยในอาหารทุกประเภท ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการตรวจเชื้อที่ดีพอ เช่น ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ มีความจำเพาะ มีความไวในการตรวจ ประหยัดค่าใช้จ่าย และที่สำคัญอย่างยิ่งคือต้องมีความรวดเร็วในการตรวจ เพื่อป้องกันความเสียหายต่อผู้ผลิตและปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค การตรวจหาเชื้อโดยวิธีทางจุลชีววิทยาที่ใช้ standard conventional method ซึ่งกำหนดโดยหน่วยงานที่เป็นที่ยอมรับ เช่น AOAC และ BAM เป็นต้น จัดเป็นวิธีมาตรฐานที่ยอมรับในระดับสากล ถึงแม้ว่าวิธีดังกล่าวจะใช้เวลานานในการตรวจยืนยัน อาจประมาณ 3-4 วัน หรือมากกว่านี้ ดังนั้นในปัจจุบัน การตรวจเชื้อโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยาจึงมีผู้นิยมกันมากขึ้น เพราะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ มีความไวสูง สามารถตรวจพบเชื้อที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างได้ และที่สำคัญคือให้ผลรวดเร็ว บางวิธีอาจใช้เวลาตรวจเพียง

2-3 ชั่วโมง ก็สามารถบอกผลได้ วิธีที่ใช้กันอยู่มีหลายวิธี เช่น ELISA การใช้ immunomagnetic separation วิธี immunoprecipitation เป็นต้น บางวิธีมีผู้ผลิตเป็นชุด kit test ขายเป็นการค้า สำหรับวิธี dot ELISA ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่ง เพราะเป็นวิธีที่ทำงาน สะดวก รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย เพราะใช้อุปกรณ์ไม่มาก ใช้สารทดสอบปริมาณน้อยมากและมีความไว สูง

วิธีการผลิต monoclonal antibody นั้นมีความยุ่งยากมาก อีกทั้งยังต้องการอุปกรณ์และความชำนาญของผู้ทำการผลิต ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่การผลิต polyclonal antibody นั้นใช้อุปกรณ์ที่มีอยู่ทั่วไปในห้องทดลองได้ และผลิตได้ง่ายไม่ยุ่งยาก เสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับการผลิต monoclonal antibody

การตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยใช้ monoclonal antibody มีความจำเพาะมากเกินไป โดยมีความจำเพาะต่อ epitope เพียง epitope เดียวของเซลล์เมื่อนำมาตรวจเชื้อ *Salmonella* ที่มีหลาย ซีโรวาร์ จะทำให้ตรวจได้เฉพาะซีโรวาร์ที่มี epitope นั้นเท่านั้นซึ่งอาจตรวจได้เพียง 2-3 ซีโรวาร์ แต่การใช้ polyclonal antibody นั้นจะมีแอนติบอดีต่อหลาย epitope ของเซลล์ ซึ่งแต่ละ epitope ก็สามารถพบได้ในเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ต่างๆ ทำให้สามารถตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นๆ ได้มาก แต่จากการที่มีแอนติบอดีต่อหลาย epitope นี้ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อในกลุ่ม non-*Salmonella* เช่น *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp. และ *Klebsiella* sp. เป็นต้น จึงได้เพิ่มขั้นตอนการใช้ Rappaport Vassiliadis Soya (RVS) broth ซึ่งเป็นอาหาร selective enrichment สำหรับ *Salmonella* เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ non-*Salmonella* และเพิ่มการเจริญของเชื้อ *Salmonella* ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ปริมาณน้อยๆ ในตัวอย่างอาหารได้ การใช้อาหาร RVS broth นั้นโดยปกติจะให้อยู่ในขั้นตอน pre-enrichment ของวิธีมาตรฐานตาม ISO 6579 และ BAM อยู่แล้ว จึงนำส่วนนี้ของวิธีมาตรฐานมาช่วยในการคัดกรองเชื้อ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้าม ซึ่งจะทำให้เกิด false positive ขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและเตรียมให้เป็น IgG บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA
2. เพื่อพัฒนาวิธีทางอิมมูโนวิทยาโดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ dot-ELISA เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella*
3. เพื่อนำวิธีทางอิมมูโนวิทยาที่ทดลองแล้วในข้อ 2. มาใช้ในการตรวจเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอาหาร

การตรวจเอกสาร

เชื้อ *Salmonella*

1. ลักษณะทั่วไป

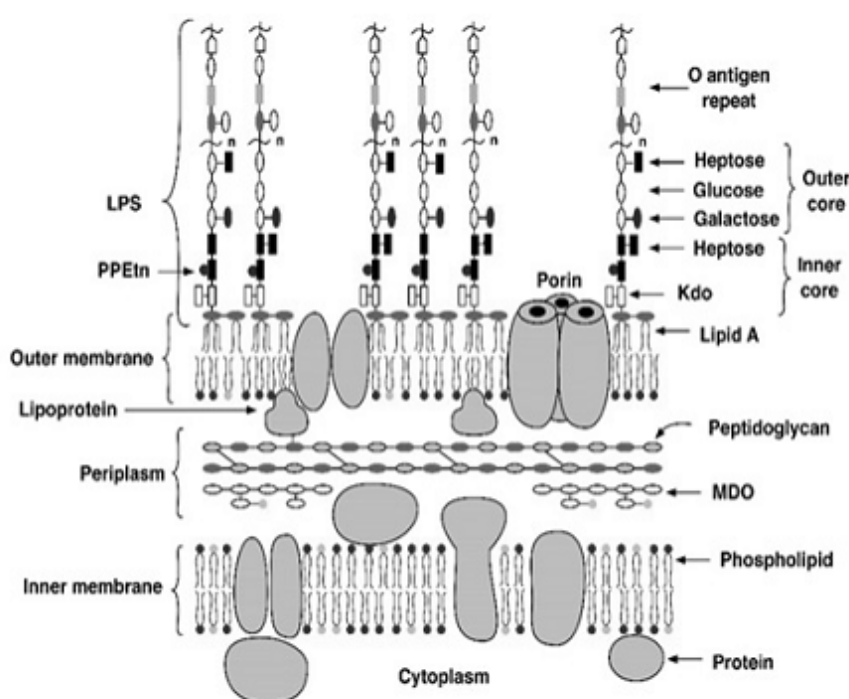
Salmonella จัดอยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae คีดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาด $0.7-1.5 \times 2.0-5.0$ ไมโครเมตร เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ในช่วง pH 4.5-9.0 (Jay, 1970) ความชื้น (A_w) ที่เหมาะต่อการเจริญประมาณ 0.945-0.999 (Hayes, 1985) ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ใช้สารอาหารโดยกระบวนการหายใจและเฟอร์เมนต้น้ำตาล ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลา (flagella) รอบตัวที่เรียกว่า peritrichous (Banwart, 1979) ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) แต่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) *Salmonella* ส่วนมากจะสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) แต่บางซีโรวาร์อาจไม่สร้าง เช่น *Salmonella* ser. Berta, *Salmonella* ser. Cholerae-suis, *Salmonella* ser. Paratyphi A, *Salmonella* ser. Typhi และ *Salmonella* ser. Sendai

2. การเขียนชื่อเชื้อ *Salmonella*

ในปัจจุบันการเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื้อ *Salmonella* จะมีความแตกต่างจากการเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ กล่าวคือ ชื่อ genus ขึ้นต้นด้วยตัวใหญ่และเป็นตัวเอียง ถ้าต้องการเขียนชื่อสปีชีส์ให้เขียนขึ้นต้นด้วยตัวเล็กและตัวเอียงเช่นกัน เช่น *Salmonella enterica* ส่วนชื่อซีโรวาร์จะเขียนขึ้นต้นด้วยตัวใหญ่และไม่เอียง ถ้าต้องการเขียนชื่อเต็มอย่างถูกต้องก็จะเป็น *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium แต่เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* กว่า 99.5% เป็นเชื้อที่อยู่ใน *Salmonella enterica* subsp. *enterica* จึงเขียนย่อลงไปได้ว่า *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium หรือ *S. enterica* serovar Typhimurium หรือ *Salmonella* ser. Typhimurium ก็ได้ การเขียน *S. Typhimurium* ควรใช้ในการจดบันทึกในห้องทดลองเท่านั้น (Grimont and Weill, 2007)

3. ลักษณะทางแอนติเจน (antigen)

โอแอนติเจน (O antigen) หรือ somatic antigen เป็นสารประกอบพวก lipopolysaccharide ประกอบด้วยลิปิด 20-30% โพลีแซคคาไรด์ 60% และ hexosamine 3.5-4.5% อยู่บนผิวของเมมเบรนชั้นนอก ดังแสดงในภาพที่ 1 การจัดเรียงลำดับที่ต่างกันของน้ำตาล ทำให้มีโอแอนติเจนที่ต่างกัน สารประกอบนี้ทนความร้อนได้ ดังนั้นการเตรียมโอแอนติเจน จึงเตรียมได้โดยการต้มที่ 80-100 องศาเซลเซียส นาน 10-30 นาที

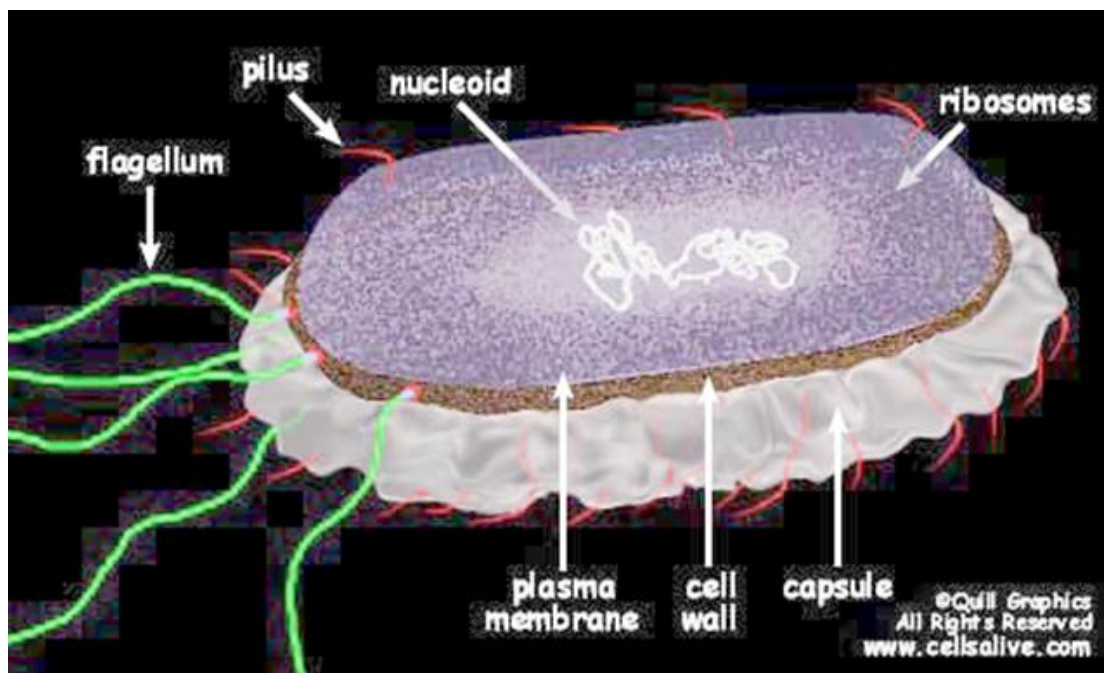


ภาพที่ 1 แสดงลักษณะ O antigen ของเชื้อ *Salmonella*

ที่มา: Perola et al. (2007)

เฮซแอนติเจน (H antigen) หรือ flagella antigen เป็นสารประเภทโปรตีน (protein) ถูกทำลายได้ด้วยความร้อน (heat-labile) แบ่งเป็นเฟส 1 และเฟส 2 ซึ่งอาจมีเฟสใดเฟสหนึ่ง หรือ ทั้ง 2 เฟสก็ได้ จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนจากเฟสหนึ่งเป็นอีกเฟสหนึ่งได้ H antigen นี้ ประกอบด้วยโปรตีน flagellin ซึ่งมีชนิดและลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ทำให้เชื้อนี้มี H antigen ที่แตกต่างกัน

วีไอแอนติเจน (Vi antigen) เป็นโพลีแซคคาไรด์อยู่รอบนอกของ O antigen เชื้อ *Salmonella* ที่มีแอนติเจนชนิดนี้จะก่อโรครุนแรงกว่าที่ไม่มี เช่น *Salmonella* ser. Typhi, *Salmonella* ser. Paratyphi C และ *Salmonella* ser. Dublin

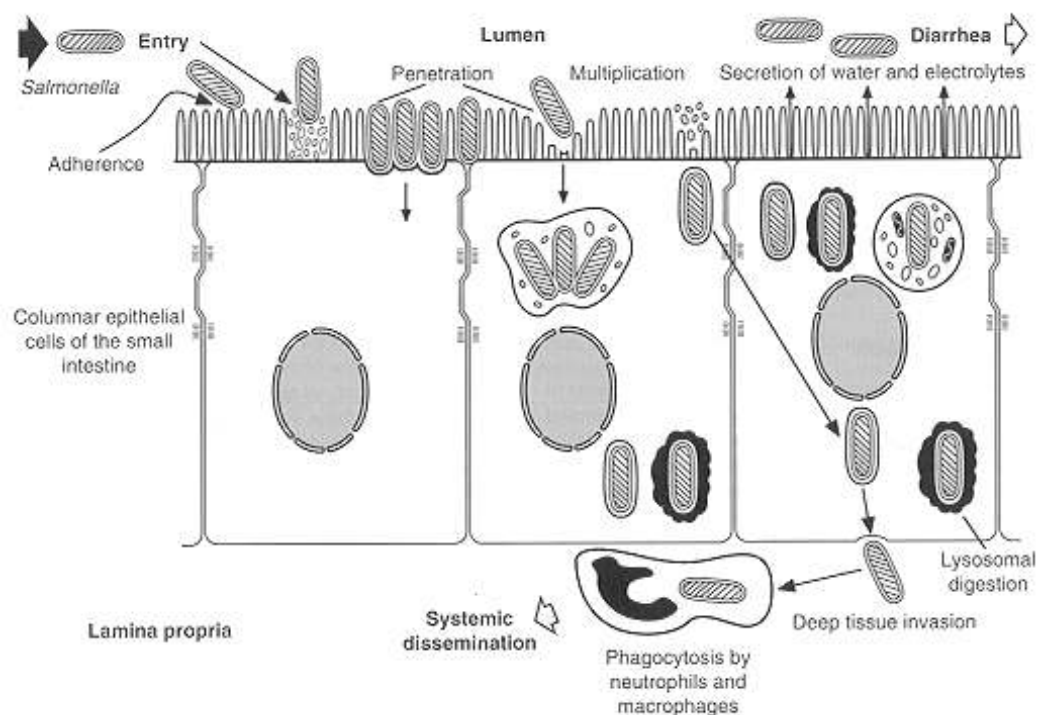


ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของ flagella (H antigen) และ capsule (Vi antigen)

ที่มา: Lawson (2008)

4. ความสามารถในการก่อโรค

ลำไส้เล็กเป็นบริเวณที่เกิดโรค หลังจากบุกรุกเข้าไปในเซลล์แล้ว จะบุกรุกต่อไปที่เยื่อลำไส้ เชื้อ *Salmonella* สามารถผลิต และปลดปล่อยสารพิษ Endotoxin ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโพลีแซคคาไรด์-โพลีเปปไทด์-ลิปิดเอ ซึ่งจะปรากฏอยู่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เชื้อจะเพิ่มจำนวนภายในเซลล์เยื่อลำไส้ และเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งอาจทำให้เซลล์ถูกทำลาย และลุกลามไปยังอวัยวะส่วนอื่น ๆ ได้อีกด้วย เช่น ตับ ม้าม และท่อน้ำดี เป็นต้น จนทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งระบบ



ภาพที่ 3 แสดงกลไกการบุกรุกและก่อโรคของเชื้อ *Salmonella*

ที่มา: Mcfadden (1990)

5. กลไกการก่อโรค (วันเพ็ญ, 2539)

ไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) เป็นกลุ่มที่มีอาการของโรครุนแรงที่สุด การติดเชื้อเริ่มจากเมื่อแบคทีเรียเข้ามาในระบบย่อยอาหารและผ่านมาถึงลำไส้เล็ก แบคทีเรียเจาะทะลุ epithelial cell ของ villi ในลำไส้เล็กตอนล่าง เข้าสู่ lamina propria แล้วเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองของผู้ป่วย ในระบบน้ำเหลืองแบคทีเรียจะถูกเซลล์ macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โอบล้อมเพื่อทำลายเซลล์แปลกปลอมซึ่งเป็นกลไกป้องกันการติดเชื้อในร่างกาย แต่ *Salmonella* ser. Typhi สามารถทนต่อการทำลายของเซลล์ macrophage จึงรอดชีวิตและเจริญภายในเซลล์ macrophage (intracellular bacteria) หลังจากเพิ่มจำนวนแล้ว แบคทีเรียจะกระจายออกมาสู่กระแสเลือด แพร่กระจายไปตามตับ ม้าม กระเพาะปัสสาวะและอวัยวะต่าง ๆ จึงก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดและอวัยวะต่าง ๆ

สำหรับโรค gastroenteritis เริ่มจากแบคทีเรียเข้ามาในระบบย่อยอาหารในจำนวนที่มากเพียงพอจะผ่านเข้าสู่ epithelial cell ของลำไส้เล็กตอนปลาย และผ่านเข้าไปใน lamina propria แบคทีเรียเจริญในบริเวณนั้นเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบบริเวณลำไส้เล็ก แต่ไม่แพร่กระจายไปยังส่วนอื่น ๆ ของร่างกายจึงไม่พบการติดเชื้อในกระแสเลือดและอวัยวะต่าง ๆ

น้ำดีเป็นอาหาร (natural medium) ที่ดีสำหรับ *Salmonella* ser. Typhi เชื้อจึงเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้มากในระบบท่อน้ำดีทำให้มีเชื้อออกมาอยู่ในลำไส้เล็กโดยเฉพาะตรงบริเวณ Peyer's patches เป็นจำนวนมาก ความสามารถของ *Salmonella* ser. Typhi ที่อยู่ในท่อน้ำดีได้ดีทำให้ผู้ป่วยบางรายกลายเป็น carrier ซึ่งจะมีเชื้ออยู่ในอุจจาระบางครั้งบางคราว (intermittent release) และเป็นแหล่งแพร่โรคไปยังผู้อื่นโดยตัวเองไม่มีอาการป่วยใด ๆ เพราะฉะนั้นการพบเชื้อ *Salmonella* ser. Typhi ในอุจจาระไม่ได้หมายความว่าผู้ป่วยนั้นกำลังป่วยเป็นไทฟอยด์เสมอไป

6. อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* จำแนกได้ 4 แบบ (Chris and Alec, 2002) คือ

6.1 Gastroenteritis โรคอุจจาระร่วง โรคอาหารเป็นพิษหรือโรคกระเพาะอาหาร และโรคลำไส้อักเสบ เชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่จะทำให้เกิดอาการแบบนี้ โดยได้รับเชื้อในปริมาณมากกว่า 10,000 เซลล์ หรือได้รับเซลล์ในปริมาณน้อยกว่า 100 เซลล์แต่ปนเปื้อนไปในอาหารที่สามารถป้องกันเซลล์แบคทีเรียได้ เช่น อาหารพวกไขมัน (Chris และ Alec, 2002) เชื้อจะเข้าไปเจริญอยู่ในลำไส้ มีระยะฟักตัวประมาณ 12-36 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ อักเสบ ท้องร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และมีไข้เล็กน้อย จะมีอาการอยู่ 1-4 วัน (Guthrie, 1992) ในช่วงที่มีอุจจาระร่วงจะพบเชื้อในอุจจาระผู้ป่วยประมาณ 10^6 - 10^9 CFU/g. (Boyd และ Hoerl, 1981) เชื้อจะเจริญในลำไส้เท่านั้น ไม่แพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือด

6.2 Enteric fever คือ โรคไข้ไทฟอยด์หรือพาราไทฟอยด์ โดยได้รับเชื้อ *Salmonella* ser. Typhi หรือ *Salmonella* ser. Paratyphi A, B หรือ C ซึ่งจะก่อโรคกับคนเท่านั้น โดยได้รับเชื้อเข้าไปมากกว่า 100,000 เซลล์จากอาหารหรือน้ำดื่ม (Jawetz และคณะ, 1980) มีระยะฟักตัวประมาณ 7-28 วัน ในระยะแรกผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง (39.5-40 องศาเซลเซียส) อาจเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดทำให้เกิดอาการโลหิตเป็นพิษ มีอาการปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว เชื่องซึม เบื่ออาหาร ปวดท้อง ตับและม้ามโต อาจมีผื่นขึ้นตามลำตัว หัวใจเต้นช้ากว่าปกติ ในระยะหลังจะมีอาการท้องร่วง อาจมีเลือดปนมากับอุจจาระด้วย จะมีอาการอยู่ประมาณ 1-3 สัปดาห์ (Guthrie,

1992) และลดลงในสัปดาห์ที่ 3 หรือ 4 ส่วนโรคพาราไทฟอยด์จะมีการคล้ายกันแต่จะรุนแรงน้อยกว่า

6.3 Septicemia คือการที่เชื้อเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรง เป็นการติดเชื้อที่รุนแรง เกิดจากสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง เช่น *Salmonella* ser. Typhi, *Salmonella* ser. Enteritidis, *Salmonella* ser. Dublin และ *Salmonella* ser. Cholerae-suis เป็นต้น (Ziprin, 1994) สามารถตรวจพบเชื้อได้โดยที่ไม่มีอาการของโรคอุจจาระร่วง โดยผู้ป่วยมีอาการไข้สูงเป็นระยะ หนาวสั่น เบื่ออาหาร ตับและม้ามโต น้ำหนักลด เชื้อซึม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ เป็นต้น (นงลักษณ์, 2544) ในรายที่ติดเชื้อ *Salmonella* ser. Typhi อาจพบจุดสีแดงบนหน้าอกและคอ มีเลือดออกจากลำไส้และจมูก บางครั้งอาจเสียชีวิต หรือถ้าหายป่วยก็จะมีเชื้ออยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน

6.4 Sequelae เป็นอาการเรื้อรังของผู้ที่เกิด Septicemia อาจทำให้เกิดโรคไขข้ออักเสบ กระดูกอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อบุลิ้นหัวใจอักเสบ และอาจมีอาการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะร่วมด้วย

7. ความสำคัญของเชื้อ *Salmonella*

Salmonella เป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารซึ่งพบได้ตามธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน อากาศ และติดอยู่ตามพืชต่าง ๆ ทำให้สามารถปนเปื้อนไปในอาหารได้หลายประเภท เช่น น้ำดื่ม เนื้อสัตว์ต่างๆ หรือผักผลไม้ก็ได้ ทำให้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก มีการแพร่กระจายของเชื้อไปทั่วโลก กฎหมายในหลายประเทศไม่อนุญาตให้มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในอาหารหรือน้ำดื่มเลย ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องตรวจเชื้อ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์อาหารและน้ำดื่ม ทั้งในแง่การส่งออก และการบริโภคภายในประเทศ

Salmonella เป็นแบคทีเรียที่มีความหลากหลายมาก โดยมีถึง 2,579 ซีโรวาร์ (Grimont and Weill, 2007) ซึ่งมีลักษณะของแอนติเจนที่แตกต่างกันไปตามลักษณะของ somatic (O) lipopolysaccharide และ flagella(H) protein

การก่อโรคนั้นเกิดขึ้นได้ทั้งในคนและสัตว์ ซึ่งรู้จักกันในชื่อ Salmonellosis และยังพบว่าเชื้อ *Salmonella* เป็นสาเหตุของโรคไทฟอยด์ (typhoid) ซึ่งค้นพบโดย Eberth ในปี 1880 และในปี 1884 Graffky สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (Ziprin, 1994) ส่วนในปี 1885 D.E. Salmon และ T. Smith สามารถแยก *Salmonella* ser. Cholerae-suis จากหมูที่เป็นอหิวาตกโรค ในปี 1900 จึงใช้ชื่อจีนส์ว่า *Salmonella* เพื่อเป็นเกียรติกับ D.E. Salmon โรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* โดยทั่วไปเกิดจากการรับประทานอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ปริมาณของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสายพันธุ์ อายุผู้ติดเชื้อ ภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ และการสร้างกรดในกระเพาะอาหาร เนื่องจากกรดไฮโดรคลอริกในกระเพาะอาหารจะทำลายเชื้อได้ (Doyle และ Cliver, 1990) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหาร ถ้ามีไขมันสูงเชื้อจะถูกปกคลุมด้วยไขมัน ทำให้ไม่ถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร โดยทั่วไปเชื้อ *Salmonella* ปริมาณ 10^5 - 10^6 เซลล์จะทำให้เกิดโรค แต่พบว่าในบางกรณีเชื้อ *Salmonella* เพียง 1-10 เซลล์ก็สามารถก่อโรคได้ (D'Aoust, 1997)

แหล่งที่พบเชื้อ *Salmonella* คือภายในกระเพาะอาหาร และลำไส้ ทั้งของมนุษย์ และสัตว์ โดยออกมากับอุจจาระ และแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อมเช่น ดิน และน้ำ การติดต่อเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อลงสู่อาหาร ซึ่งอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้วหรืออาหารที่พร้อมบริโภคไม่ควรพบเชื้อ *Salmonella* อยู่เลย

การวิเคราะห์การระบาดที่ผ่านมามีพบว่าเกิดจากการปนเปื้อนข้ามจากเนื้อสัตว์ที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปไปยังอาหารที่พร้อมบริโภค รวมถึงกระบวนการแปรรูปที่ไม่ได้มาตรฐาน และสุขวิทยาส่วนบุคคลที่ไม่ถูกต้อง ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการระบาดของโรค (Chris and Alec, 2002)

ในประเทศไทยได้สำรวจแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในอาหารพร้อมบริโภค ได้แก่ ยำประเภทต่าง ๆ ผักสด แกงจืด แกงเผ็ด และอาหารทอด โดยเก็บตัวอย่างจากห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานครและนนทบุรี จำนวน 100 ตัวอย่าง พบ *Salmonella* spp. ปนเปื้อนมากถึง 57% รองลงมาได้แก่ *Staphylococcus aureus* 32% และ *Clostridium perfringens* 22% ตามลำดับ (อรุณ, 2540)

การระบาดของโรค Salmonellosis ครั้งใหญ่ในสหรัฐอเมริกาหลายครั้งมีสาเหตุจากการบริโภคผลไม้ตระกูลแตง ในปี 1990 มีการระบาดของโรคเนื่องจากการบริโภคแคนตาลูปจากสไลด์บาร์ที่มีการปนเปื้อน *Salmonella* ser. Chester พบว่าเชื้อฝังภายในเนื้อแคนตาลูปเพราะไม่ล้างเปลือกขณะหั่น ต่อมาในปี 1991 เกิดจาก *Salmonella* ser. Poona ซึ่งคาดว่าเซลล์เพิ่มจำนวนในแคนตาลูปหลังจากการหั่นเป็นชิ้นแล้ว และในปี 1995 มีการติดเชื้อของ *Salmonella* ser. Miami และ *Salmonella* ser. Bareilly จากการบริโภคแตงโมหั่นชิ้น และจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการได้แสดงให้เห็นว่า *Salmonella* ser. Typhi และ *Salmonella* ser. Derby สามารถเจริญได้ในแตงโมสดที่หั่นเป็นชิ้นลูกบาศก์ (Golden et al., 1993)

การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella*

การตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารและน้ำ รวมทั้งการระบาดที่เกิดขึ้นในแต่ละปีของหลายๆ ประเทศ ทำให้เห็นถึงความสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* วิธีหลักที่จะช่วยลดปริมาณผู้ป่วยลง คือ การให้การศึกษากับผู้บริโภค และการควบคุมคุณภาพของอาหารและน้ำดื่ม โดยเฉพาะการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องและรวดเร็ว จะช่วยให้มีการป้องกันและแก้ไขได้อย่างทันท่วงทีโดยการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* นั้นจำแนกได้ 2 วิธี คือ

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

1. วิธีมาตรฐาน (conventional methods)

มีหลายหน่วยงานที่ทำหน้าที่ตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ในอาหาร และกำหนดวิธีมาตรฐานเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ได้แก่ Association of Official Analytical Chemist (AOAC), American Public Health Association (APHA), Food and Drug Administration (FDA), International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF), International Organization for Standardization (ISO) และ United States Department of Agriculture (USDA) เป็นต้น โดยมีขั้นตอนต่างๆ ที่สำคัญอยู่ 5 ขั้นตอน คือ

1.1 pre-enrichment โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท enrichment medium เพื่อให้เซลล์ของเชื้อ *Salmonella* ที่มีในปริมาณน้อย หรือเซลล์ที่บาดเจ็บมีโอกาสปรับตัวให้แข็งแรง และมีปริมาณมากขึ้นจนถึงระดับที่ตรวจพบได้ แต่ในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อ *Salmonella* มากอยู่แล้ว เช่น อุจจาระ ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนนี้ มีการแนะนำให้ใช้ pre-enrichment medium หลายชนิด เช่น Lactose broth, Brilliant green water, Trypticase soy broth, Nutrient broth และ Buffered peptone water เป็นต้น การเลือกใช้อาหารขึ้นอยู่กับประเภทของตัวอย่าง เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อก็เป็นเรื่องสำคัญเพราะต้องนานพอที่จะทำให้เซลล์ที่บาดเจ็บฟื้นตัว และเพิ่มจำนวนได้ปริมาณมาก ๆ เวลาที่เหมาะสม คือ 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

1.2 การเพาะเลี้ยงในอาหารประเภท selective enrichment medium เพื่อเสริมการเจริญของเชื้อ *Salmonella* อาหารชนิดนี้เป็นอาหารเหลวที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แข่งขันอื่น ๆ แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* อาหารนี้มีอยู่หลายชนิด เช่น Tetrathionate broth (TT), Muller-Kauffmann tetrathionate brilliant green (MKTBG), Selenite-F (SelF) broth, Selenite cystine (SC) broth, Selenite brilliant green sulfa (SBGS) และ Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth เป็นต้น การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แข่งขันอื่น ๆ เกิดจากสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อ

1.3 การเพาะเลี้ยงในอาหารประเภท differential selective agar เพื่อพิจารณาลักษณะของโคโลนีบนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ซึ่งในอาหารประเภทนี้นอกจากจะมีสารเคมีชนิดต่างๆ ที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แข่งขันอื่น ๆ แล้ว ยังทำให้โคโลนีของ *Salmonella* มีลักษณะเฉพาะ สามารถแยกจากแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ชัดเจน

1.4 การตรวจสอบทางชีวเคมี (biochemical screening) ลักษณะทางชีวเคมีที่ใช้ตรวจได้แก่ การไม่ใช้น้ำตาลแลคโตสและซูโครสบนอาหาร Triple sugar iron (TSI) ความสามารถในการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส (lysine decarboxylase) ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) และ สารอินโดล (indole) เป็นต้น

1.5 การตรวจยืนยันทางซีรัมวิทยา โดยใช้วิธี slide agglutination กับแอนติซีรัมที่จำเพาะกับโอแอนติเจนเพื่อหากลุ่ม และที่จำเพาะกับ เอช และวีโอแอนติเจนเพื่อหาซีโรวาร์

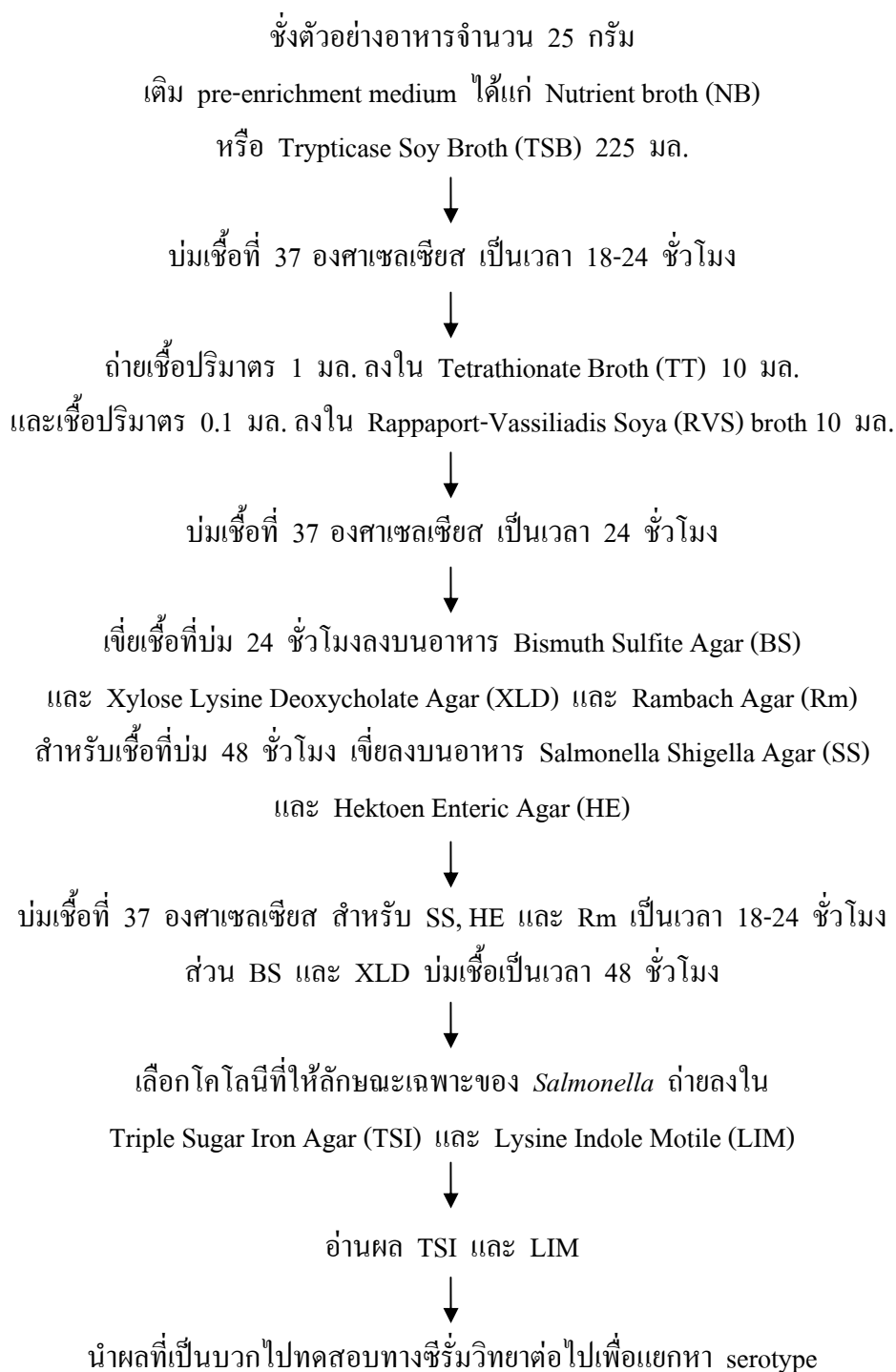
ตารางที่ 1 แสดงการทดสอบทางชีวเคมีบางอย่างที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella*

characteristic	Usual reaction
Oxidase	-
Hydrogen sulphide production	+
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase*	+
Lactose fermentation	-
Sucrose fermentation	-
Glucose fermentation*	+
Mannitol fermentation*	+
Xylose fermentation*	+
Rhamnose fermentation*	+
Arabinose fermentation*	+
Hydrolysis of o-nitrophenyl- β -D-galactoside by action of β -galactosidase (ONPG)	-
Indole production	-
Urea hydrolysis	-
Acetoin production (Voges-Proskauer reaction)	-
Citrate used as sole carbon source*	+

+ = ผลบวก ; - = ผลลบ.

*An important exception is *Salmonella* ser. Typhi this is negative in these test

ที่มา: Chris and Alec (2002)



ภาพที่ 4 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี standard conventional method ของ
หน่วยงาน BAM, AOAC, Canada และ ISO
ที่มา: ดัดแปลงจากอรุณ (2540)

2. วิธีรวดเร็ว (rapid methods)

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

2.1 การปรับปรุงระบบการเลี้ยงเชื้อ โดยรวมขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดไม่จำเพาะ และจำเพาะเข้าด้วยกัน เพื่อลดเวลาในการตรวจสอบ ชุดทดสอบที่ใช้วิธีนี้ คือ SPRINT ของบริษัท Oxoid, Inc. โดยใช้ Buffered peptone water เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะ และ Rappaport-Vassiliadis (RV) broth เป็นอาหารชนิดจำเพาะที่บรรจุอยู่ในแคปซูล ซึ่งจะถูกลอยออกมาเมื่อถึงเวลาที่กำหนด ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่จำเพาะเปลี่ยนเป็นชนิดจำเพาะ

2.2 การเคลื่อนที่ของเชื้อ *Salmonella* ใช้ตรวจสอบเฉพาะเชื้อ *Salmonella* ที่เคลื่อนที่ได้ เช่น อาหาร Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) และ Diasal M ของบริษัท Merck ใช้ตรวจสอบเชื้อที่ผ่านการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่จำเพาะมาแล้ว

2.3 Hydrophobic Grid Membrane Filtration (HGME) วิธีนี้จะใช้การกรองแล้วนำกระดาษกรองวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ตัวกระดาษกรองจะมีเส้นสีดำแบ่งเป็นช่อง ๆ เพื่อแยกการเจริญของแบคทีเรียออกจากกัน การตรวจผลจะดูจากลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นหลังการบ่มเชื้อ ได้แก่ ชุดทดสอบ ISO-GRID™ ของบริษัท Neogen Cooperation

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการตรวจสอบ วิธีนี้มีความไวสูงกว่ามาตรฐาน แต่มีข้อเสีย คือ อาจเกิดผลบวกปลอมจากเซลล์ที่ตายแล้วแต่ยังมีดีเอ็นเอที่สภาพสมบูรณ์อยู่ หรืออาจตรวจไม่พบทั้งที่มีเชื้ออยู่เนื่องจากปัจจัยของอาหารไปรบกวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำให้ต้องเลี้ยงเชื้อก่อนทำ PCR (วัฒนาลัย, 2538) ตัวอย่างชุดทดสอบ เช่น ชุดทดสอบ BAX ของบริษัท Qualicon, Inc., ชุดทดสอบ Probelia System ของบริษัท BioControl System, Inc. และชุดทดสอบ Taqman System ของบริษัท Perkin-Elmer Biosystem ซึ่งเป็นเครื่องอัตโนมัติ

2.5 DNA hybridization

2.5.1 การตรวจสอบกรดนิวคลีอิก มีการพัฒนาชุดทดสอบที่เป็นการทำปฏิกิริยาของ ดีเอ็นเอโพรบกับกรดนิวคลีอิกของเซลล์เป้าหมาย แล้วใช้การตรวจวัดรังสีหรือการเรืองแสงทางเคมี เช่น ชุดทดสอบ GEN TRAK ของ Neogen Cooperation

2.5.2 Chromosomal Fingerprinting ใช้ดีเอ็นเอจากโครโมโซมของเชื้อเป็นโพรบในการแยกซีโรวาร์ต่าง ๆ Fingerprinting เรียกอีกชื่อว่า RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) การแยกซีโรวาร์มีความสำคัญในการศึกษาการแพร่ระบาดของโรค

2.6 เทคนิคทางกระแสไฟฟ้า (Electrical conductance) โดยอาศัยความสามารถของเชื้อในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกระแสไฟฟ้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการใช้สารในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่แล้วเปลี่ยนเป็นสารโมเลกุลเล็กที่มีประจุมากกว่า เครื่องมือที่ใช้หลักการนี้คือ Malthus ของบริษัท Malthus ใช้เวลาตรวจประมาณ 42 ชั่วโมง หรือ Bactometer ของบริษัท bioMerieux Inc.

2.7 การจำแนกโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมี ตรวจสอบโคโลนีที่สงสัยโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีและเอนไซม์ ในการเปลี่ยนสื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ มีทั้งชุดทดสอบที่แปลผลโดยผู้ใช้ เช่น API 20E ของบริษัท bioMerieux Inc. และ O.B.I.S ของบริษัท Oxoid Ltd. หรือใช้เครื่องอัตโนมัติ เช่น VITEX เป็นต้น

2.8 Ice-nucleation เป็นการใช้ไวรัสของแบคทีเรียพาติเอ็นเอที่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์เข้าสู่เซลล์ *Salmonella* ทำให้เกิดการสร้างโปรตีนสำหรับการสร้างผลึกน้ำแข็งเมื่อนำตัวอย่างไปแช่ที่อุณหภูมิ -9.3°C โดยมีสี่เป็นตัวบ่งบอก ตัวอย่างที่มีเชื้อ *Salmonella* จะแข็งและมีสีส้ม เช่น BIND *Salmonella* ของบริษัท BioControl System, Inc. ใช้เวลาตรวจประมาณ 22 ชั่วโมง

2.9 เทคนิคทางอิมมูโนวิทยา

2.9.1 Latex agglutination ใช้ตรวจยืนยันโคโลนีจากอาหารแข็งชนิด selective โดยใช้เม็ด latex ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ต้องมีเชื้อปริมาณมาก 10^7 - 10^9 CFU จึงจะตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้ เป็นวิธีที่ทำงานให้ผลเร็ว เช่น *Salmonella* latex ของบริษัท Oxoid, Inc., Spectate ของบริษัท Rhone Poulenc Diagnostics และ Microscreen *Salmonella* ของบริษัท Microgen Bioproducts Ltd. เป็นต้น

2.9.2 Immunochromatography ใช้แอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* 2 ชนิด ชนิดแรกจะเกาะอยู่กับแผ่นเมมเบรนซึ่งจะเป็นส่วนที่จะเกิดการจับกับเชื้อ *Salmonella* ส่วนชนิดที่สองจะเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีหรือไม่มีเชื้อ โดยจะมีการติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำ เมื่อทำการใส่ตัวอย่างที่เราจะทดสอบ ถ้ามีเชื้อ *Salmonella* อยู่ก็จะจับกับแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ชนิดแรก หลังจากนั้นใส่แอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ชนิดที่สอง ที่มีการติดฉลากไว้ ทำให้เกิด *Salmonella*-antibody-particle complex กับแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ชนิดแรก จะทำให้มีความเข้มข้นของอนุภาคแล้วมีสีขึ้น เช่น REVEAL ของบริษัท Neogen Cooperation และ Path-Stik ของบริษัท Celsis, Inc. มีความไวประมาณ 10^6 CFU

2.9.3 Immunomagnetic Separation (IMS) โดยใช้ magnetic beads ที่มีขนาดเล็กกว่า 100 ไมโครเมตร มาเคลือบด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* เพื่อจับกับเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารประเภท enrichment medium มาแล้ว magnetic beads มีคุณสมบัติในการแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวและนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร selective agar ต่อได้ เช่น Dynabeads anti-*Salmonella* ของบริษัท Dynal, Inc. ใช้เวลาตรวจ 48 หรือ 72 ชั่วโมง

2.9.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นการเคลือบโพลีโคลนอล (polyclonal) หรือ โมโนโคลนอล (monoclonal) แอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* บนผิววัสดุแข็ง เมื่อใส่ตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไป แอนติเจนกับแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากัน แล้วใส่แอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อที่ติดฉลากเอนไซม์ลงไป ซึ่งจะเข้าไปจับกับแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* ที่ติดอยู่ในตอนแรก เมื่อเติมสับสเตรตของเอนไซม์จะเกิดสีหรือสารเรืองแสง ระดับที่ตรวจพบได้ คือ 10^4 - 10^6 CFU/มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับซีโรวาร์ ใช้เวลาตรวจประมาณ 48 ชั่วโมง ตัวอย่าง เช่น VIDAS SLM ของบริษัท bioMerieux Inc., TECRA *Salmonella* Visual Immunoassay ของบริษัท International Bioproduct, ALERT ของบริษัท Oxoid, Inc., Transia

Plate Salmonella ของบริษัท Diffchamb AB และ EIA Foss ของบริษัท Foss North America, Inc. เป็นต้น

Dot-ELISA เป็นวิธีที่มีลักษณะการทำเหมือนกับวิธี ELISA ต่างกันตรงที่แอนติเจนหรือแอนติบอดีจะเคลือบอยู่บนแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) แทนที่จะเป็นวัสดุแข็งอื่น ๆ แผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสมีคุณสมบัติ คือ มีประจุที่ผิวแข็งแรงและจับกับโปรตีนได้อย่างเหนียวแน่น กระดาษจะช่วยจับขวางพวก non-specific protein เช่น albumin ในการวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ จะไม่ละลายผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถบอกปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดได้ด้วย (Frank, 2002) ซึ่งวิธี dot-ELISA นั้นเป็นวิธีที่ใช้สารทดสอบ เช่น แอนติบอดีแอนติเจน และสารอื่น ๆ ในปริมาณน้อยมาก แต่ให้ผลรวดเร็วและแม่นยำ

วันเพ็ญ (2539) ใช้ monoclonal-based dot-blot ELISA ในการตรวจหา *Salmonella* จากสิ่งส่งตรวจ เช่น ปัสสาวะ จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Salmonella* ในกระแสเลือดแทนการเพาะเชื้อจากเลือด ทำให้สามารถเก็บปัสสาวะไปตรวจซ้ำได้หลาย ๆ ครั้งเพื่อเพิ่ม sensitivity และติดตามผลการรักษาโดยผู้ป่วยไม่รู้สีกว่าถูกรบกวน

Kritsana *et al.* (2000) ใช้วิธี dot-ELISA ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ phase1-c *Salmonella* ซึ่งพัฒนาสำหรับการตรวจ *Salmonella* ser. Cholerae-suis โดยตรงในตัวอย่างเลือด ซึ่งผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานพบว่าสามารถตรวจ *Salmonella* ser. Cholerae-suis ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งเมื่อคำนวณออกมาแล้ว มีความไวและความจำเพาะ 100%

Ismail *et al.* (1991) เติมโปรตีนขนาด 50 กิโลดาลตัน ที่เมมเบรนชั้นนอกของ *Salmonella* ser. Typhi บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส เพื่อวินิจฉัยโรคไข้ไทฟอยด์ โดยเติมเอนไซม์ horseradish peroxidase conjugated IgM and IgG antibodies ตามด้วยสับสเตรต 4-chloronaphthol ซึ่งผู้ป่วยโรคไข้ไทฟอยด์ จะเห็นจุดสี blush purple ในขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคไข้ไทฟอยด์จะไม่เกิดสี ซึ่งการตรวจวิธีนี้มีความจำเพาะ ง่าย เชื่อถือได้ และรวดเร็ว วิธี dot-ELISA เป็นการตรวจโรคไข้ไทฟอยด์โดยใช้ single serum specimen

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของ Rapid test kits ที่ใช้ในการตรวจหา *Salmonella* ที่ผลิตเป็นการค้า (Baylis, 200)

Test type	Name of test	เวลา (ชั่วโมง)	Supplier
Electrical conductance	Bactometer	42 maximum	bioMerieux UK Ltd.
	Malthus	42 maximum	Malthus Instruments.
	RABIT	42	Don Whiteley Scientific Ltd.
ELISA	Vidas <i>Salmonella</i>	26	bioMerieux UK Ltd.
	<i>Salmonella</i> -Tex	52	Organon Teknika Ltd.
	TECRA <i>Salmonella</i> Visual Assay	42-52	TECRA Diagnostics, UK.
	Transia Plate <i>Salmonella</i>	52	DiffChamb, S.A.
	EIAFOSS	26	Foss UK Ltd.
	Locate	52	Rhone-diagnostics Technologies Ltd.
Chemiluminescent immunoassay	ISO Screen <i>Salmonella</i>	24	Stratecon Diagnostics
Immuno-chromatography	Path-Stick	56	Celsis International plc.
	REVEAL for <i>Salmonella</i>	21	Neogen Cooperation
Immunoprecipitate	Visual Immunoprecipitate Assay (VIP) <i>Salmonella</i>	24/48	Bio Control System Inc
Ice-nucleation	BIND (Bacterial Ice Nucleation Detection) <i>Salmonella</i>	22	Bio Control System Inc
Nucleic Acid Hybridization Probe	Gene Trak <i>Salmonella</i> Assay	48	Gene Trak Systems
Polymerase chain reaction (PCR)	Foodproof <i>Salmonella</i>	24	BioteCon Diagnostics
	TaqMan for <i>Salmonella</i>	24	PE Applied Biosystems
	Probelia	24	Sanofi Diagnostics Pasteur
	BAX for screening <i>Salmonella</i>	24	Qualicon

Tapchaisri *et al.* (1999) ทำการเปรียบเทียบการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดี โดยวิธี dot-ELISA กับวิธีเลี้ยงเชื้อแล้วพบว่ามี ความไว ความจำเพาะ ผลบวก และผลลบ ในตัวอย่างอาหารเท่ากับ 93.33%, 91.76%, 66.66% และ 98.73% ตามลำดับ และทำการเปรียบเทียบการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี DNA amplification กับวิธีเลี้ยงเชื้อแล้วพบว่ามี ความไว ความจำเพาะ ผลบวก และ ผลลบเท่ากับ 100%, 91.58%, 65.21% และ 100 % ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA กับวิธี DNA amplification แล้วพบว่ามี ความไว ความจำเพาะ ผลบวก และผลลบเท่ากับ 91.3%, 100%, 100% และ 97.5% ตามลำดับ สรุปการทดลองนี้พบว่าวิธี dot ELISA มีความรวดเร็ว ง่าย มีความไว ความจำเพาะ และใช้เงินน้อยกว่าเมื่อเทียบกับวิธี DNA amplification

Chaicumpa *et al.* (1995) ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากโพลีแซคคาไรด์ในส่วนของ lipopolysaccharide ของเชื้อ *Salmonella* ในการทำ dot-blot ELISA กับตัวอย่างอาหาร จำพวกเนื้อสัตว์เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานตั้งแต่ขั้น enrichment จนถึงวิธีทางชีวเคมีและซีรั่มวิทยา พบว่าใช้เวลาในการตรวจด้วยวิธี dot-blot ELISA น้อยกว่าวิธีมาตรฐาน 2 ชั่วโมง โดยพบ *Salmonella* ser. Derby เป็นส่วนใหญ่ในเนื้อหมู ในขณะที่พบ *Salmonella* ser. Paratyphi B มาก ในเนื้อไก่ ความไวและความจำเพาะของวิธี Mab-based dot-blot ELISA เทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ คือ 81.5% และ 85% ตามลำดับ การเปรียบเทียบนี้นำไปสู่ความจริงที่ว่า วิธีที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ จะสามารถตรวจสอบได้เฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น จึงทำให้แยกเชื้อ *Salmonella* ได้น้อยชนิดกว่า การทำ dot-blot ELISA จะสามารถตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ได้ทุกแอนติเจนที่มี ซึ่งมีความ ได้เปรียบมากกว่าในการที่จะหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร โดยเฉพาะอาหารส่งออก ข้อดีของวิธีนี้คือ มีความรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย และง่าย คือไม่ต้องการบุคลากรที่ชำนาญ และไม่ ต้องการเครื่องมือที่พิเศษ และที่สำคัญสามารถป้องกันผลลบปลอม ซึ่งรับประทับใจว่าการ ตรวจสอบนั้นมีคุณภาพ

Pinheiro *et al.* (2005) นำ dot-ELISA มาใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อ *Neospora caninum* ที่เป็น coccidian protozoan ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของ bovine abortion และ canine neuropathies จากการตรวจหาแอนติบอดีต่อ *N. caninum* โดยใช้ *N. caninum* antigen ด้วยวิธี dot-ELISA พบว่ามีความไวและความจำเพาะที่ดี น่าจะถูกนำไปใช้สำหรับ screening test ในการตรวจหา แอนติบอดีต่อ *N. caninum* ในสุนัขได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุและเครื่องมือ

- 1.1 กระจกถ่าย
- 1.2 กล่องบังคัมกระจกถ่าย
- 1.3 ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
- 1.4 ตู้บ่มเชื้อ 42 องศาเซลเซียส
- 1.5 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
- 1.6 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
- 1.7 autoclave
- 1.8 กระจกบอกลึก
- 1.9 เข็ม two way needle
- 1.10 เข็มฉีดยาเบอร์ 20 และ 22 ยาว 1 นิ้ว
- 1.11 สำลี
- 1.12 หลอดทดลอง
- 1.13 จานเพาะเชื้อ
- 1.14 microwell plate
- 1.15 หลอด eppendorf
- 1.16 Vortex mixer
- 1.17 Pasteur pipette
- 1.18 ปิเปต
- 1.19 ไมโครปิเปต
- 1.20 ทิป
- 1.21 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 1.22 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

1.23 แผ่นไนโตรเซลลูโลส

1.24 เครื่อง lyophilizer

1.25 ปากกีสบ

1.26 moist chamber

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Tryptone soya agar

2.2 Rappaport-Vassiliadis Soya broth

2.3 Xylose Lysine Desoxycholate agar

2.4 Simmon's citrate agar

2.5 Triple sugar iron agar

2.6 Lysine iron agar

2.7 SIM medium

3. สารเคมี

3.1 Freund's adjuvant, complete และ incomplete

3.2 Phosphate Buffer Saline pH 7.0 – Tween 20 (PBS-T)

3.3 0.85% NaCl

3.4 Blocking solution (skim milk powder 2% ใน PBS-T)

3.5 Goat anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase

3.6 Tetramethylbenzidine (TMB)

4. เชื้อจุลินทรีย์

4.1 *Salmonella* ser. Paratyphi A

4.2 *Salmonella* ser. Paratyphi B

4.3 *Salmonella* ser. Derby

4.4 *Salmonella* ser. Stanley

- 4.5 *Salmonella* ser. Cholerae-suis
- 4.6 *Salmonella* ser. Virchow
- 4.7 *Salmonella* ser. Dublin
- 4.8 *Salmonella* ser. Enteritidis
- 4.9 *Salmonella* ser. Typhi
- 4.10 *Salmonella* ser. Anatum
- 4.11 *Salmonella* ser. Aberdeen
- 4.12 *Salmonella* ser. Yoruba
- 4.13 *Salmonella* ser. Hvittingfoss
- 4.14 *Salmonella* ser. Urbana
- 4.15 *Salmonella* ser. Waycross
- 4.16 *Citrobacter freundii*
- 4.17 *Escherichia coli*
- 4.18 *Enterobacter aerogenes*
- 4.19 *Edwardsiella tarda*
- 4.20 *Klebsiella pneumoniae*
- 4.21 *Shigella sonnei*
- 4.22 *Proteus mirabilis*

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติซีรัม (antiserum)

1.1 การเตรียม normal serum (pre-immunized serum) เพื่อใช้เป็น negative control

เตรียมโดยเจาะเลือดกระต่ายที่ยังไม่ได้ฉีดสารแอนติเจนด้วยเข็มเบอร์ 20 ที่หลอดเลือดดำใหญ่ที่หู (ear vein) แล้วทำการแยกซีรัมออกจากเซลล์เม็ดเลือด โดยนำเลือดที่ได้มาทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกซีรัมที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูส่วนใสลงในหลอด นำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

1.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระต่าย

ในครั้งแรกของการฉีดจะเลือกใช้เชื้อ *Salmonella* ser. Anatum เพราะมี antigenic formula ของ O antigen มาก และเป็นซีโรวาร์ที่พบได้บ่อยในเมืองไทยทั้งในอาหารดิบและอาหารแปรรูป ส่วนในครั้งต่อไปจะใช้ *Salmonella* ser. Anatum และ *Salmonella* ser. Enteritidis อย่างละเท่าๆ กันเพื่อให้มีชนิดของ O antigen ที่เข้าไปกระตุ้นหลากหลายขึ้น นำเชื้อมา resuspend ให้มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยวัดความขุ่นเทียบกับความขุ่นมาตรฐานของ McFarland no. 7 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.5% ทิ้งไว้ข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสที่มีฟอร์มาลินทิ้งไป ล้างเซลล์ด้วย normal saline (0.85% NaCl) อีก 2 - 3 ครั้ง แล้วจึง resuspend ใน normal saline นำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระต่าย

1.3 การฉีดกระต่าย

ในครั้งแรกผสมแอนติเจนที่เตรียมไว้กับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ของกระต่ายที่หนักประมาณ 1.5 - 2 กิโลกรัม โดยแบ่งฉีดประมาณ 2 - 3 จุดเพื่อป้องกันการเกิด granuloma ที่ใหญ่เกินไป ฉีดซ้ำ (boost) หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ด้วยแอนติเจนที่ผสมระหว่าง *Salmonella* ser. Anatum และ

Salmonella ser. Enteritidis อย่างละเท่าๆกัน กับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเข้าใต้ผิวหนังเช่นเดียวกัน และทำการฉีดซ้ำด้วยเชื้อผสมอีก 5 ครั้ง แต่ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์

1.4 การเจาะเลือด

หลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งที่ 2 (boost ครั้งที่ 1) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เจาะเลือด กระต่ายด้วยเข็มเบอร์ 20 ที่ปลอดเลือดคำใหญ่ที่หู และจะเจาะต่อเนื่องทุก 1 สัปดาห์หลังการฉีดซ้ำแต่ละครั้ง จนกว่าจะได้ปริมาณแอนติบอดีที่ต้องการ

1.5 การแยกแอนติซีรั่มออกจากเซลล์เม็ดเลือด

ทำการเจาะเลือดกระต่าย แล้วแยกแอนติซีรั่มโดยวิธีเดียวกับข้อ 1.1

2. การตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี microtiter plate direct agglutination

นำแอนติซีรั่มที่แยกได้ในข้อ 1.5 โดยจะใช้แอนติซีรั่มที่แยกได้ทุก bleeding มาตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี microtiter plate direct agglutination มีวิธีการทำดังต่อไปนี้

2.1 ใส่ 0.85% NaCl ลงในหลุมของ microtiter plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร จนครบ ทั้ง 12 หลุม

2.2 ทำ serial dilution ของแอนติซีรั่มแบบ two-fold dilution จนได้ความเจือจางสุดท้าย เป็น 1:2,048 (หลุมที่ 11) ส่วนหลุมที่ 12 ไม่ต้องใส่แอนติซีรั่ม เพื่อใช้เป็น negative control โดยใช้ normal serum

2.3 ใส่แอนติเจน (เตรียมโดยใช้ suspension ของเชื้อ *Salmonella* มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 แล้วนำไปต้มนาน 10 นาที) ลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตรจนครบทุกหลุม นำ microtiter plate ไปใส่ในกล่องขึ้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 18 ชั่วโมง

2.4 ตรวจสอบโดยดู agglutination pattern ซึ่งจะเกิดที่ก้นหลุม

อ่านผลโดยดูปริมาณของการเกิด agglutinate

++++	100%	complete agglutination
+++	75%	agglutination
++	50%	agglutination
+	25%	agglutination
-	0%	no agglutination

โดยอ่านผลเป็นบวกตั้งแต่ 50% agglutination ขึ้นไป

3. การเตรียม IgG บริสุทธิ์จากแอนติซีรัมของกระต่ายที่ฉีดเชื้อ *Salmonella*

หลังจากตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีในแอนติซีรัมทุก bleeding แล้ว จะนำแอนติซีรัมที่มีค่า antibody titer สูงๆ มารวมกันเพื่อเตรียม IgG บริสุทธิ์

3.1 การตกตะกอน IgG ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

นำแอนติซีรัมมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ซึ่งจะตกตะกอนโปรตีนในซีรัมรวมทั้ง IgG ด้วย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสออก แล้วนำตะกอนที่ได้ไปเตรียมการแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี affinity chromatography

3.2 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography

นำตะกอนที่ได้ไปละลายใน binding buffer (20 mM phosphate buffer pH 7.0) ให้ได้ปริมาตรน้อยที่สุด จากนั้นนำไปกรองผ่าน membrane ที่มี pore size ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปผ่านลงใน protein G-sepharose affinity column ทำการชะด้วย elution buffer (100 mM glycine-HCl buffer pH 2.8) เก็บแต่ละ fraction ใส่หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรเพื่อตรวจสอบว่า fraction ใดมี

โปรตีนอยู่ นำ fraction ที่ได้ไปปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยการเติม Tris-HCl pH 9.0 แล้วจึงเก็บ fraction ที่มี IgG ไว้เพื่อนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยการทำ SDS-PAGE ต่อไป

3.3 การทำ lyophilize

รวมแต่ละ fraction ที่มี IgG นำไป dialyze ใน dialysis tube ด้วย 0.15 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 แล้วนำไปทำแห้งแข็งด้วยเครื่อง lyophilizer และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry et al., 1951)

3.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ที่เตรียมได้

นำ IgG บริสุทธิ์ที่ lyophilize และหาปริมาณโปรตีนแล้วมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE ดังนี้

3.4.1 เตรียม running gel ความเข้มข้น 15% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยต้องผสมสารในบีกเกอร์ให้เข้ากันอย่างเบาๆ ก่อนจะใส่สารตัวต่อไป ตามลำดับดังนี้ ใส่ acrylamide/bis 2.5 มิลลิลิตร 4X running gel buffer 1.25 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1.17 มิลลิลิตร 10% SDS 50 ไมโครลิตร 10% ammonium persulfate 25 ไมโครลิตร และ tetramethylethylenediamine (TEMED) 1.7 ไมโครลิตร แล้วรีบเทใส่ glass plate ที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นปรับผิวหน้า running gel โดยใช้น้ำกลั่นลงไป ตั้งทิ้งไว้จน gel แข็งตัว

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

3.4.3 นำตัวอย่างมาผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ผสมและต้มแล้วมา 5 ไมโครลิตรใส่ในหลุม gel และใส่โปรตีนมาตรฐานปริมาณ 5 ไมโครลิตรอีก 1 หลุม เปิดเครื่องโดยใช้ไฟ 100 โวลต์ รอจนเห็นแนวสีของ Bromophenol blue เคลื่อนที่มาจากปลายด้านล่างของ separating gel ประมาณ 1 เซนติเมตร จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นนำ gel ไปย้อมสี coomassie brilliant blue R ถ้างสีย้อมด้วย destaining solution I และ destaining solution II ตามลำดับ รายละเอียดการเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์อยู่ในภาคผนวก ก

4. การนับจำนวนเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี dilution plate count เพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจากการเตรียมแอนติเจนโดยใช้เชื้อที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

นับจำนวนเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี dilution plate count เปรียบเทียบกับเชื้อที่เตรียมความขุ่นที่วัดค่า OD₆₀₀ ได้ 0.1 ซึ่งใช้เป็น inoculum เริ่มต้นในการทำ dot-ELISA เพื่อเปรียบเทียบว่าประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่เตรียมให้บริสุทธิ์แล้วนำมาทำ dot-ELISA นั้นจะสามารถตรวจเชื้อได้เป็นจำนวนเท่าใดต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง โดยมีวิธีทำดังต่อไปนี้

4.1 เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร TSA slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง resuspend ด้วย 0.85% NaCl แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเจือจางเซลล์ให้ได้ความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

4.2 นำ suspension ของเชื้อมาทำการเจือจางที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} นำมา spread ลงบนอาหาร plate count agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 ตรวจนับจำนวนเชื้อแล้วคำนวณเป็น CFU/มิลลิลิตร

5. การทดสอบความจำเพาะของ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA

5.1 การทดสอบหาความจำเพาะของ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Salmonella*

ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสให้มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตรต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วทำสัญลักษณ์ หยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยใช้แอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* (ใช้ *Salmonella* ser. Anatum เป็นตัวแทนในการตรวจครั้งแรก) ที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 มาต้มนาน 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนใสมาเป็นแอนติเจนในการทดสอบ คูณส่วนใสปริมาตร 2 ไมโครลิตรหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส สำหรับ negative control ใช้ 0.85% NaCl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิท นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสใส่ลงใน chamber แล้วเติม blocking solution (ใช้ skim milk powder 2% ใน PBS-T) ลงไปให้ท่วมแผ่นไนโตรเซลลูโลส จากนั้น rotate เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติมแอนติบอดีที่เจือจางด้วย 0.85% NaCl ลงใน chamber ให้ท่วมแผ่นไนโตรเซลลูโลส rotate เป็นเวลา 90 นาที ล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (conjugate) ลงใน chamber แล้ว rotate เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติมสับสเตรท tetramethylbenzidine (TMB) ให้ท่วมแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

5.2 ทดสอบปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม

นำแอนติบอดีไปเจือจางใน 0.85% NaCl ให้ได้ความเจือจางที่ระดับ 312, 100, 80 และ 50 µg./ml จากนั้นนำไปทดสอบโดยใช้วิธีตามข้อ 5.1 เพื่อหาความเจือจางที่เหมาะสม

5.3 ทดสอบปริมาณ conjugate ที่เหมาะสม

นำ conjugate ไปเจือจางที่ระดับ 1:5,000 , 1:10,000 และ 1:12,000 จากนั้นนำไปทดสอบโดยใช้วิธีตามข้อ 5.1 เพื่อหาความเจือจางที่เหมาะสม

6. การทดสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดี (IgG บริสุทธิ์) ต่อเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นโดยวิธี dot-ELISA

ใช้วิธี dot ELISA เพื่อทดสอบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* สามารถทำปฏิกิริยากับ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นที่ไม่ได้ใช้ในการผลิตได้หรือไม่ โดยเลือกซีโรวาร์ที่พบได้บ่อยและเป็นซีโรวาร์ที่อยู่ใน group ที่แตกต่างจาก *Salmonella* ที่นำมาเตรียมแอนติบอดี เพื่อต้องการศึกษาว่าแอนติบอดีที่ผลิตจากเชื้อเพียง 2 ซีโรวาร์สามารถนำมาใช้ตรวจได้ครอบคลุมเชื้อในหลายๆ group หรือไม่ ทำการทดลองโดยใช้วิธีตามข้อ 5.1 และใช้ความเข้มข้นของ IgG และ conjugate ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยังให้ผลบวก ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 5.2 และ 5.3

7. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแบคทีเรียกลุ่ม non-salmonella ที่เป็น enteric bacteria โดยวิธี dot-ELISA

ใช้วิธี dot ELISA เพื่อทดสอบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ที่เตรียมได้เมื่อนำมาตรวจกับแบคทีเรียในกลุ่ม non-salmonella ที่อยู่ใน Family Enterobacteriaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับ *Salmonella* เนื่องจากอยู่ในตระกูลเดียวกัน จึงน่าจะเกิดปฏิกิริยาข้ามได้มากที่สุด มาทดสอบว่าจะเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มหรือไม่ โดยใช้วิธีตามข้อ 5.1 และใช้ความเข้มข้นของ IgG และ conjugate ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุด

8. การใช้อาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth ก่อนการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 7. เกิด cross reaction กับเชื้อกลุ่ม non-salmonella จึงทำการเพาะเชื้อลงในอาหาร selective enrichment เฉพาะเชื้อกลุ่ม *Salmonella* ก่อน ได้แก่อาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth เพื่อการคัดเลือกเชื้อ และ pre-enrich ไปด้วยในขั้นต้น โดยทดลองกับเชื้อในกลุ่ม non-salmonella ด้วย จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* และ *Shigella sonnei* โดยมีวิธีการดังนี้

8.1 เพาะเลี้ยงเชือบนอาหาร TSA slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง resuspend ด้วย 0.85% NaCl แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเจือจางเซลล์ให้ได้ความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

8.2 นำ suspension ของเชื้อมาทำการเจือจางที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} แล้วเพาะเลี้ยงในอาหาร RVS broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปสกัดแอนติเจนเพื่อทำ dot-ELISA ใช้วิธีตามข้อ 5.1

9. การนับจำนวนของเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

ทำการนำเชื้อ *Salmonella* ser. Anatum, *Salmonella* ser. Aberdeen, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* และ *Shigella sonnei* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง resuspend ด้วย 0.85% NaCl แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเจือจางเซลล์ให้ได้ความขุ่นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 นำ suspension ของเชื้อมาทำการเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^3 และ 10^4 CFU/ml จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร RVS broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวนเชื้อด้วยวิธี dilution plate count

10. การใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหาร artificial contaminated food ที่เตรียมขึ้น โดยเปรียบเทียบกับการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี dilution plate count

ใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ dot-ELISA ที่ได้จากข้อ 5. มาทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่เตรียมขึ้นจากเชื้อผสม โดยใช้เชื้อ *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* ser. Aberdeen และ *Salmonella* ser. Anatum ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง resuspend ด้วย 0.85% NaCl แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเจือจางเซลล์ให้ได้ความขุ่นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 นำ suspension ของเชื้อมาทำการเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ของแต่ละเชื้อประมาณ 2.5×10^4 , 2.5×10^5 และ 2.5×10^6 CFU/ml นำเชื้อแต่ละชนิดใส่ลงในอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วน้ำหนัก 25 กรัม อาหารละ 1 มิลลิลิตร / เชื้อ ตามกลุ่มที่กำหนดตามตารางที่ 3 อาหารที่ทดลองใช้ได้แก่ ไข่กรอกไก่ ไข่กรอกนม และ ลูกชิ้นหมู จะทำให้ได้อาหารที่มีเชื้อผสมจำนวน 3×10^3 , 3×10^4 และ 3×10^5 CFU/g อาหาร การเลือกใช้ปริมาณเชื้อที่ 3 ระดับนี้เนื่องจากในอาหารดิบทั่วไปก่อนการปรุงส่วนใหญ่จะนับจำนวนเชื้อทั้งหมดได้ประมาณ $10^3 - 10^4$ CFU/g อาหาร จากนั้นเติมน้ำปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเปิดตัวอย่างอาหารที่ผสมเชื้อ

แล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน RVS broth ซึ่งเป็นอาหาร selective enrichment broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อ pre-enrich และคัดเลือกเชื้อ แล้วนำไปทำ dot-ELISA โดยใช้วิธีตามข้อ 5.1

ตารางที่ 3 แสดงกลุ่มของเชื้อผสมที่จะผสมลงในอาหาร artificial contaminated food

กลุ่ม	เชื้อ
1	<i>Shigella sonnei</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
2	<i>Salmonella</i> ser. Aberdeen
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
3	<i>Salmonella</i> ser. Anatum
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>

11. การใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิดจากแหล่งขาย เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ conventional method (วิธีตรวจทางจุลชีววิทยา)

นำสภาวะที่เหมาะสมในการทำ dot-ELISA ที่ได้จากข้อ 5. มาทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารจากแหล่งขาย โดยนำตัวอย่างอาหารมาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร RVS broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อ pre-enrich และคัดเลือกเชื้อ แล้วนำไปตรวจหาเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้วิธีตามข้อ 5.1 และทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี conventional method (ดัดแปลงมาจาก ISO6579/2002) โดยนำตัวอย่างอาหารมาเพาะเลี้ยงใน RVS broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมา spread ลงใน

อาหาร Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar เพื่อเป็นการเปรียบเทียบและแยกโคโลนีที่แสดงลักษณะเฉพาะของ *Salmonella* ไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมีที่สำคัญบางประการที่จะระบุว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* เช่น การสร้าง Lysine decarboxylase และการสร้าง H_2S ในอาหาร Lysine iron agar(LIA) การใช้น้ำตาลและการสร้าง H_2S ในอาหาร Triple sugar iron agar(TSI) การสร้าง indole การเคลื่อนที่และการสร้าง H_2S ในอาหาร SIM medium และ การใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร Simmon's citrate agar เป็นต้น ซึ่งจากผลทางชีวเคมีที่กล่าวมาก็สามารถจำแนกเชื้อ *Salmonella* ออกจากเชื้อ non-*Salmonella* อื่นๆ ได้

ผลและวิจารณ์

1. การเตรียมแอนติซีรัม

ทำการเจาะเลือดครั้งแรกก่อนฉีดแอนติเจนเพื่อแยก normal serum ประมาณ 10 มิลลิลิตร ซึ่งแยกซีรัมได้ประมาณ 6-7 มิลลิลิตร และหลังจากฉีดแอนติเจนก็ทำการเจาะเลือดครั้งละประมาณ 20 มิลลิลิตรซึ่งแยกซีรัมได้ประมาณ 13-15 มิลลิลิตรต่อครั้ง แล้วจึงนำซีรัมในแต่ละครั้งที่เจาะได้ไปตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี microtiter plate direct agglutination

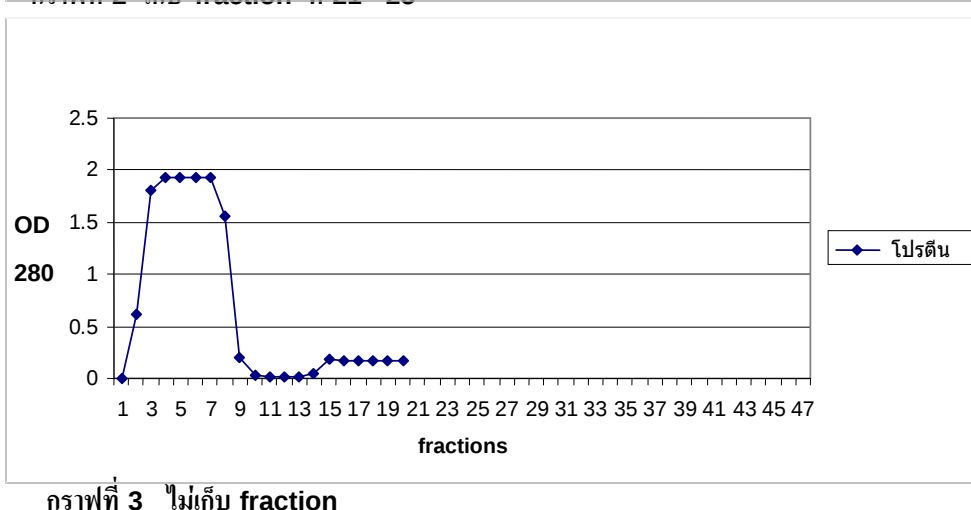
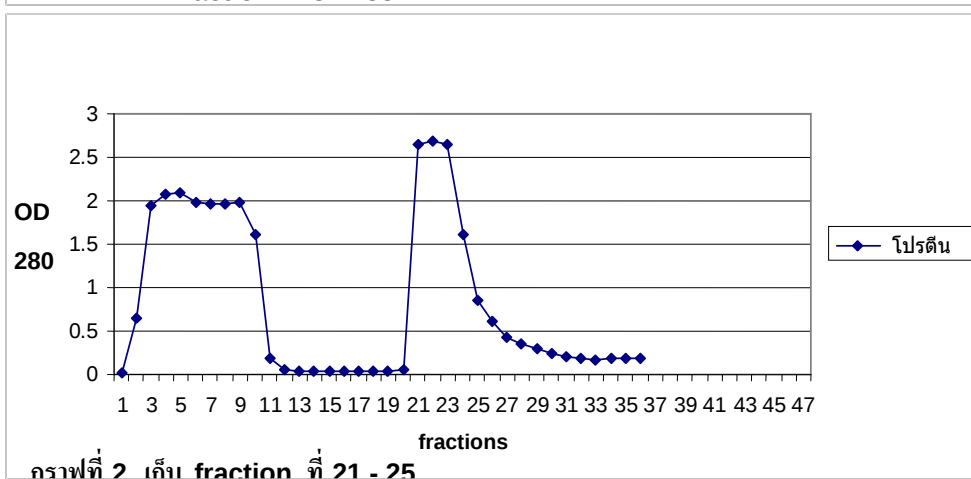
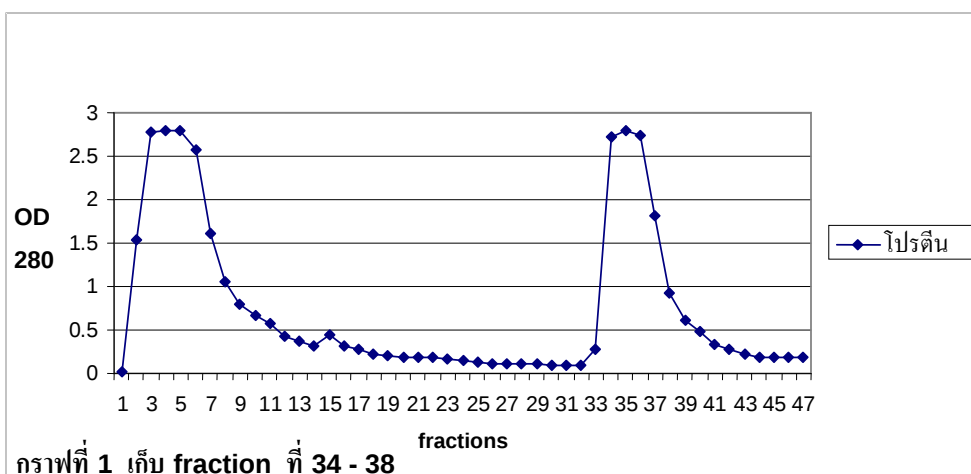
2. การตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี microtiter plate direct agglutination

ทำการฉีดตัวทดลองด้วย *Salmonella* ser. Anatum ซึ่งอยู่ใน group E1 และ *Salmonella* ser. Enteritidis ซึ่งอยู่ใน group D1 เนื่องจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดมักตรวจพบบ่อยในหลายแหล่ง ในการตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี microtiter plate direct agglutination จึงต้องใช้เชื้อทั้ง *Salmonella* ser. Anatum และ *Salmonella* ser. Enteritidis เป็นแอนติเจน

ผลการตรวจพบว่าปริมาณแอนติบอดี (antibody titer) ในการเจาะเลือดครั้งที่ 1, 2 และ 3 ยังไม่สูงพอที่จะใช้เตรียม IgG บริสุทธิ์ แต่ในการเจาะเลือดครั้งที่ 4-12 มีปริมาณเฉลี่ยประมาณ 1:512 ถึง 1:1,024 จึงนำเลือดที่ได้จากการเจาะตั้งแต่ครั้งที่ 4-12 รวมกันเพื่อนำไปเตรียม IgG บริสุทธิ์ต่อไป

3. การเตรียม IgG บริสุทธิ์จากแอนติซีรัมของกระต่ายที่ฉีดเชื้อ *Salmonella*

นำซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4-12 มารวมกันแล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ นำตะกอนที่ได้ไปละลายใน binding buffer (20 mM. phosphate buffer pH 7.0) แล้วนำไปผ่านลงใน protein G-sepharose affinity column ผลที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 5 แสดงผลการ load ตัวอย่างผ่าน affinity column ด้วยวิธี affinity chromatography

หมายเหตุ: กราฟที่ 1 เป็นการ load ตัวอย่างโปรตีนทั้งหมดที่ตกตะกอนได้ลงใน protein G-sepharose

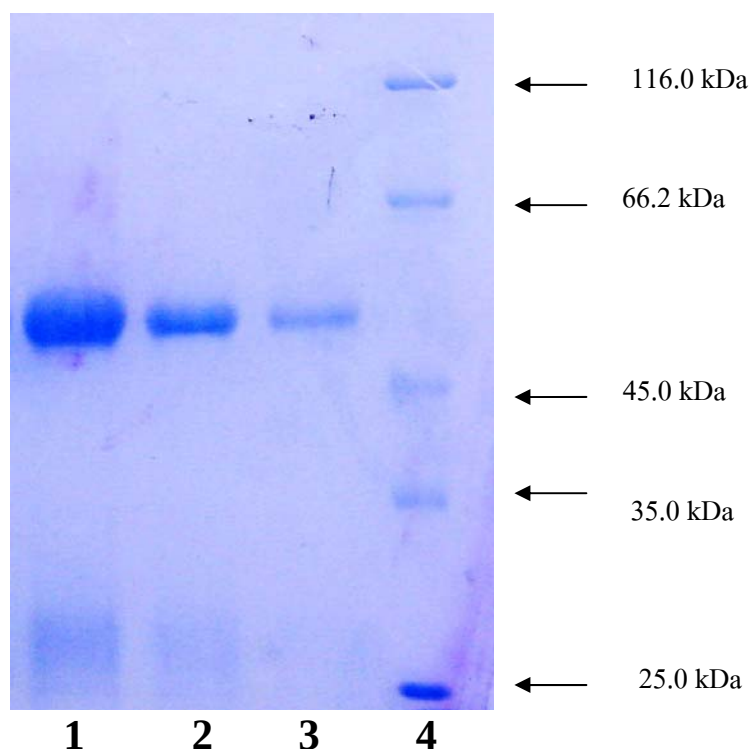
กราฟที่ 2 เป็นการ load ตัวอย่างที่เก็บจาก fraction 2-12 ในกราฟที่ 1 มา load ซ้ำลง column

กราฟที่ 3 เป็นการ load ตัวอย่างที่เก็บจาก fraction 3-10 ในกราฟที่ 2 มา load ซ้ำลง column

ที่ต้องทำการผ่านตัวอย่างลงใน column หลายครั้งเพราะว่าปริมาณ IgG ในตัวอย่างที่ผ่านลง column มีมากกว่าที่ protein G จะจับไว้ได้ทั้งหมด โดยจะเห็นได้จากกราฟที่ 1 ว่าใน peak ที่ 1 (fraction ที่ 2-12) คือส่วนของโปรตีนที่ไม่ได้ถูกจับไว้ใน column ทั้งหมด ซึ่งมีทั้ง IgG ส่วนเกินที่ protein G จะจับไว้ได้และโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่ IgG อยู่ด้วย เมื่อทำการชะด้วย elution buffer ก็จะพบโปรตีนออกมาใน fraction ที่ 34-38 คือ peak ที่ 2 ซึ่งเป็นส่วนของ IgG ถูกชะออกมา จึงเก็บส่วนนี้เอาไว้ ต่อมาจึงเอาส่วนที่เป็นโปรตีนที่ไม่ถูกจับในส่วนของ peak ที่ 1 (fraction ที่ 2-12 ของกราฟที่ 1) มาผ่านลงใน column อีกครั้ง จะได้ผลดังกราฟที่ 2 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อชะด้วย elution buffer แล้ว มี peak ที่ 2 (ส่วนของ IgG) ในปริมาณที่สูงอยู่ เราจึงเก็บ fraction ที่ 21-25 เอาไว้ด้วย แต่เมื่อเอาส่วนที่เป็นโปรตีนที่ไม่ถูกจับในส่วนของ peak ที่ 1 (fraction ที่ 3-10) ในกราฟที่ 2 มาผ่านลงใน column อีกครั้ง จะได้ผลดังกราฟที่ 3 คือเมื่อทำการชะด้วย elution buffer แล้ว peak ที่ 2 ต่ำมาก หมายความว่า มี IgG ออกมาน้อยมาก จึงไม่เก็บ fraction เลยในการ load ครั้งที่ 3

การแยก IgG ด้วยวิธี affinity chromatography อาศัยปฏิกิริยาการจับกับ IgG โดยโปรตีน จี (protein G) ซึ่งเคลือบอยู่บน sepharose bead ที่บรรจุอยู่ใน column เมื่อผ่านตัวอย่างลงใน column แล้ว IgG จะจับกับโปรตีน จี หลังจากนั้นจึงชะเอา IgG ออกมาด้วย elution buffer (100 mM. glycine-HCl buffer pH 2.8) ซึ่งความเป็นกรดจะลดการจับกันของโมเลกุล ทำให้สารที่ต้องการ (IgG) หลุดออกมาโดยไม่เสียสภาพ และสามารถนำ column นั้นกลับไปแยกสารบริสุทธิ์ได้อีก

จากนั้นนำแต่ละ fraction ที่มี IgG มารวมกันแล้วนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยการทำ SDS-PAGE โดยการเตรียมแบบ reduced form พบว่ามี 2 band คือส่วนของ heavy chain 1 band มีลักษณะเข้มหนา น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50.0 kDa ส่วนของ light chain อีก 1 band มีลักษณะจางๆ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26.0 kDa ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG โดยการทำให้ SDS-PAGE

หมายเหตุ: lane ที่ 1, 2 และ 3 เป็น IgG บริสุทธิ์

lane ที่ 4 เป็นโปรตีนมาตรฐาน

นำ IgG บริสุทธิ์ไปทำแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน พบว่าปริมาณของ bovine serum albumin กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรจะมีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง (ภาพผนวกที่ ข1) เมื่อทำการตรวจหาปริมาณโปรตีนของ IgG บริสุทธิ์ที่เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ IgG ได้ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (วิธีการคำนวณอยู่ในภาคผนวก ข)

4. การนับจำนวนเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี dilution plate count เพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจากการเตรียมแอนติเจนที่ใช้เชื้อ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* บนอาหาร TSA slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง resuspend ด้วย 0.85% NaCl โดยเจือจางเซลล์ให้ได้ความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 จากนั้นนำไปทำ

dilution plate count เพื่อนับจำนวน โดยทดลองกับเชื้อบางชนิดด้วย เพื่อให้ทราบว่าค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 จะให้จำนวนเชื้อใกล้เคียงกันหรือไม่ โดยได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการนับจำนวนเชื้อบางชนิดโดยวิธี dilution plate count จาก suspension ของเชื้อที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

เชื้อ	จำนวน (CFU/ml)
<i>Salmonella</i> ser. Anatum	1.99×10^8
<i>Shigella sonnei</i>	1.1×10^8
<i>Escherichia coli</i>	8.2×10^7
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.7×10^8

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่นำมาับจำนวนนั้นมีจำนวนใกล้เคียงกัน ที่ค่าความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ซึ่งน่าจะมาจากการที่เชื้อที่นำมาทดลองนั้นมีลักษณะคล้ายๆ กัน คือเป็นท่อนสั้นอยู่ในกลุ่ม enteric bacteria เช่นเดียวกัน และมีอัตราการเจริญเพิ่มจำนวนที่ใกล้เคียงกัน

5. ผลการทดสอบความจำเพาะของ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี dot-ELISA

5.1 ผลการหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยใช้เชื้อ *Salmonella* ser. Anatum ที่วัดค่าความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 และใช้ conjugate 1:10,000 ได้ผลดังนี้

แอนติบอดี 312 µg/ml	
แอนติบอดี 100 µg/ml	
แอนติบอดี 80 µg/ml	
แอนติบอดี 50 µg/ml	

จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 312 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$ และ 50 $\mu\text{g/ml}$ จะให้ผลบวกทั้ง 4 ความเข้มข้น แต่ที่ 50 $\mu\text{g/ml}$ ให้สีน้ำเงินที่จางลงจนเกือบไม่เห็น แต่อีก 3 ความเข้มข้นให้สีน้ำเงินเข้มในส่วนที่ทำการหยดแอนติเจนลงไป จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่น้อยที่สุดที่เห็นสีน้ำเงินอย่างชัดเจนเอาไว้ทำการทดลองต่อไป

5.2 ผลการหาปริมาณ conjugate ที่เหมาะสม โดยใช้เชื้อ *Salmonella* ser. Anatum ที่วัดค่าความขุ่นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และใช้ปริมาณแอนติบอดี 80 $\mu\text{g/ml}$ ได้ผลดังนี้

Conjugate 1:5,000



Conjugate 1:10,000



Conjugate 1:12,000



จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ conjugate ที่มีความเข้มข้น 1:5,000 , 1:10,000 และ 1:12,000 ผลที่ได้จะให้ผลบวกทั้ง 3 ความเข้มข้น แต่ที่ 1:12,000 ให้สีน้ำเงินที่จางลงจนเกือบไม่เห็น แต่อีก 2 ความเข้มข้นให้สีน้ำเงินเข้มในส่วนที่ทำการหยดแอนติเจนลงไป จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ conjugate ที่น้อยที่สุดที่เห็นสีน้ำเงินอย่างชัดเจนในการทำการทดลองต่อไป

ปริมาณของแอนติบอดี และ conjugate ที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 5.1 และ 5.2 คือ แอนติบอดี 80 $\mu\text{g/ml}$ และ conjugate 1:10,000 ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองในส่วนอื่นต่อไป

สำหรับสีที่เกิดขึ้นจากการทำ dot-ELISA ที่เป็นบวกนั้น ถ้าสีจางจะมีความคงทนอยู่ได้ 2-3 วัน และถ้าสีเข้มจะคงอยู่ได้เป็นอาทิตย์ แต่ถ้าจะอ่านผลให้ถูกต้องแม่นยำที่สุดควรอ่านผลทันทีหลังทำการทดลอง

6. การทดสอบความจำเพาะของ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นโดยวิธี dot-ELISA

สกัดแอนติเจนจากเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ต่าง ๆ ที่เตรียมความเจือจางของเชื้อโดยใช้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 เท่ากันทุกซีโรวาร์และใช้ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Salmonella* ที่เตรียมได้ในปริมาณ 80 µg/ml และ conjugate 1:10,000 ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นด้วยวิธี dot-ELISA

เชื้อ	group	ผลการทำ dot-ELISA
<i>Salmonella</i> ser. Paratyphi A	A	+
<i>Salmonella</i> ser. Paratyphi B	B	+
<i>Salmonella</i> ser. Derby	B	+
<i>Salmonella</i> ser. Stanley	B	+
<i>Salmonella</i> ser. Cholerae-suis	C1	+
<i>Salmonella</i> ser. Virchow	C1	+
<i>Salmonella</i> ser. Dublin	D1	+
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	D1	+
<i>Salmonella</i> ser. Typhi	D1	+
<i>Salmonella</i> ser. Anatum	E1	+
<i>Salmonella</i> ser. Aberdeen	F	+
<i>Salmonella</i> ser. Yoruba	I	+
<i>Salmonella</i> ser. Hvitittingfoss	I	+
<i>Salmonella</i> ser. Urbana	N	+
<i>Salmonella</i> ser. Waycross	S	+

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้ สามารถใช้ตรวจหา *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ IgG ที่เตรียมได้ ปริมาณ 80 µg/ml และ conjugate 1:10,000 ได้ ซึ่งให้ผลบวกในการทดสอบทั้งหมด แม้จะทำซ้ำเชื้อละ 2-3 ครั้ง ก็ให้ผลที่ตรงกัน แสดงว่าเชื้อ *Salmonella* ที่ใช้ในการเตรียมแอนติบอดีถึงแม้จะอยู่คนละ group กับเชื้อซีโรวาร์อื่นๆ ก็ให้ผลบวกได้ ซึ่งเป็นข้อดีของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมขึ้น

การตรวจเชื้อได้ครอบคลุมหลายๆ ซีโรวาร์ ทำให้สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างที่ต้องการทราบเพียงว่ามี *Salmonella* ปนเปื้อนหรือไม่โดยไม่ต้องทราบถึงระดับซีโรวาร์ เช่น ในตัวอย่างอาหารหลายๆ ประเภทรวมทั้งตัวอย่างน้ำด้วย สำหรับการใส่โพลิโคลนอลอาจไม่เหมาะสมกับการนำไปใช้ในการตรวจหา *Salmonella* ในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่จำเป็นจะต้องบ่งชี้เจาะจงว่ามีสาเหตุการป่วยมาจากเชื้อซีโรวาร์อะไร ซึ่งกรณีนี้การใช้โมโนโคลนอลอาจจะดีกว่า มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า ทำให้ตรวจได้เฉพาะซีโรวาร์นั้นๆ เช่น Kritsana และคณะ (2000) นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ phase1-c *Salmonella* ซึ่งพัฒนาสำหรับการตรวจ *Salmonella* ser. Cholerae-suis โดยตรงในตัวอย่างเลือด ซึ่งผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานพบว่าสามารถตรวจ *Salmonella* ser. Cholerae-suis ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งเมื่อคำนวณออกมาแล้ว มีความไวและความจำเพาะ 100% ซึ่งการทดลองดังกล่าวอาจใช้ตรวจหา *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นๆ ไม่ได้ ดังนั้นการจะเลือกใช้โพลิโคลนอลหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีก็มีข้อดีทั้ง 2 ชนิด แล้วแต่วัตถุประสงค์ของการตรวจว่าต้องการระดับใด

ในการทดสอบโดยใช้เชื้อ *Salmonella* หลายๆ ซีโรวาร์ ซึ่งบางซีโรวาร์ก็อยู่ group เดียวกับ *Salmonella* ser. Anatum และ *Salmonella* ser. Enteritidis ที่ใช้เป็นตัวแทนในการเตรียมแอนติบอดี ซึ่งถ้าอยู่ group เดียวกันลักษณะของ O-antigen หรือ H-antigen ก็จะมีบางส่วนที่คล้ายกัน ยกตัวอย่างเช่น *Salmonella* ser. Enteritidis จะมี antigenic formula ของ O-antigen เป็น 1, 9, 12 *Salmonella* ser. Typhi จะมี antigenic formula ของ O-antigen เป็น 9, 12 จะเห็นได้ว่าเชื้อทั้งสองซีโรวาร์ที่อยู่ใน group เดียวกันจะมีบาง epitope ของ O-antigen เหมือนกัน ซึ่งปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนในส่วนที่เหมือนกันของเชื้อแต่ละซีโรวาร์กับแอนติบอดีก็จะเกิดขึ้นได้ สำหรับกรณีที่อยู่คนละ group กันกับเชื้อที่ใช้เตรียมแอนติบอดี เช่น *Salmonella* ser. Enteritidis ที่อยู่ใน group D1 จะมี antigenic formula ของ O-antigen เป็น 1, 9, 12 ส่วน *Salmonella* ser. Paratyphi A ที่อยู่ใน group A จะมี antigenic formula ของ O-antigen เป็น 1, 2, 12 ซึ่งก็จะมีบาง epitope ที่เหมือนกันอยู่จึงเกิดปฏิกิริยากันได้ (ตารางผนวกที่ 1) ในขณะที่ *Salmonella* ser. Cholerae-suis ที่อยู่ใน group C1 จะมี antigenic formula ของ O-antigen เป็น 6, 7 แต่ยังเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เตรียมจากเชื้อที่มี antigenic formula ไม่เหมือนกัน อาจจะเนื่องมาจากความคล้ายคลึงกันของ epitope บาง epitope เพราะในบางกรณี ความคล้ายคลึงของ epitope ก็สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นก็อาจจะไม่เด่นชัดเท่ากับ epitope ที่เหมือนกันทุกประการ

7. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแบคทีเรียกลุ่ม non-salmonella ที่เป็น enteric bacteria โดยวิธี dot-ELISA

โดยใช้แอนติเจนที่สกัดจากแบคทีเรียกลุ่ม non-salmonella ที่มีความใกล้เคียง เช่น มีการผลิต H_2S เหมือนกัน หรือ มีการใช้สารบางชนิดเหมือนกัน และเชื้อบางชนิดก็มีรายงานว่าเกิด cross reaction กับแอนติบอดีของเชื้อ *Salmonella* เป็นต้น โดยเจือจางเชื้อให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.1 เท่ากันทุกเชื้อ ใช้ IgG ของเชื้อ *Salmonella* ปริมาณ 80 $\mu\text{g/ml}$ และ conjugate 1:10,000 ได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแบคทีเรียกลุ่ม non-salmonella ที่เป็น enteric bacteria โดยวิธี dot-ELISA

เชื้อ	ผลการทำ dot-ELISA		
	Antigen undiluted	Dilute แอนติเจน	Dilute แอนติเจน
	($OD_{600} = 0.1$)	10 เท่า	100 เท่า
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	-
<i>Shigella sonnei</i>	+	+	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	-

จากตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าเชื้อที่เตรียมความขุ่นให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีจำนวนเชื้ออยู่ระหว่าง 8.2×10^7 - 2.7×10^8 CFU/ml เมื่อนำมาทำ dot-ELISA จะให้ผลบวกทั้งหมด แต่เมื่อทำการเจือจางแอนติเจนไป 100 เท่าจะตรวจไม่พบ non-salmonella เกือบทุกชนิด แต่จากการทดลองใน *Salmonella* ser. Anatum และ *Salmonella* ser. Aberdeen ที่ความเจือจาง 10, 100 และ 1,000 เท่า พบว่า *Salmonella* ser. Anatum ยังคงให้ผลบวกที่ความเจือจาง 100 เท่า แต่ *Salmonella* ser. Aberdeen ให้ผลบวกที่ความเจือจาง 10 เท่า แต่ที่ความเจือจาง 100 เท่าให้ผลลบเหมือน non-salmonella จึงเป็นสาเหตุให้ต้องใช้อาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya broth เพื่อ

pre-enrich และคัดเลือกเชื้อ เพื่อให้เชื้อ *Salmonella* ที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างอาหารมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่จะทำการตรวจได้ ก่อนทำการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA

จากตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่ามี cross reaction เกิดขึ้นกับ non-salmonella ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ แต่บางตัวจะมีสีที่จางลงไป (ภาคผนวก ง) เช่น *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei* และ *Edwardsiella tarda* เป็นต้น ปฏิกริยาข้ามกลุ่มนี้อาจจะเกิดจากเชื้อในกลุ่มที่ใช้ทดสอบอยู่ใน Enterobacteriaceae เหมือนกันจึงอาจมีความใกล้เคียงกัน เนื่องมาจากลักษณะของ epitope ที่คล้ายคลึงกันในบาง epitope เพราะเชื้อ non-salmonella ทุกชนิดที่นำมาทดสอบอยู่ในแฟมิลีเดียวกันกับ *Salmonella* คือ Enterobacteriaceae จึงอาจจะมี epitope บาง epitope ที่มีลักษณะเหมือนหรือคล้ายคลึงกับ epitope ของเชื้อ *Salmonella* ทำให้เกิด cross reaction ขึ้น และเชื้อเหล่านี้มีโอกาสพบในตัวอย่างอาหาร น้ำ หรือสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยได้มากกว่าหรือเท่ากับการพบเชื้อ *Salmonella* ซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อการตรวจด้วยวิธี immunoassay จึงจำเป็นจะต้องแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการใช้ selective enrichment เพื่อให้เชื้อ *Salmonella* เจริญได้ดีที่สุดในขณะที่เชื้ออื่นไม่เจริญหรือเจริญน้อยมาก ซึ่งจะดีกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อหรือ pre-enrichment ในอาหารประเภท enrichment ทั่วไปที่เชื้อทุกชนิดเจริญได้ดีพอๆ กัน โดยที่ไม่สิ้นเปลืองเวลาในการบ่มเชื้อมากขึ้น เพราะใช้เวลาบ่มเชื้อ 18 ชั่วโมง เท่ากับการ pre-enrichment ในขั้นต้นทั่วไป หลังจากการบ่มเชื้อแล้วจึงใช้วิธีตรวจด้วย dot-ELISA ดังนั้นจึงต้องพิจารณาเลือกอาหารเพื่อ pre-enrich และคัดเลือกเชื้อ ให้เชื้อ *Salmonella* มีปริมาณมากและให้เชื้อ non-salmonella นั้นมีปริมาณน้อยลงก่อนทำการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA เพื่อให้ได้ผลที่ดีที่สุด

8. การใช้อาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth ก่อนการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA

ใช้ *Salmonella* ser. Anatum ซึ่งให้ผลบวกที่ชัดเจนที่สุดเป็น positive control และใช้ *Salmonella* ser. Aberdeen ซึ่งให้ผลบวกที่น้อยที่สุด (สีจางที่สุด) เพื่อให้รู้ว่าสามารถตรวจเชื้อ *Salmonella* ทุกซีโรวาร์ได้ และใช้ non-Salmonella บางชนิดที่พบได้บ่อยในตัวอย่างอาหารมาทำการทดลองควบคู่ไปด้วย โดยเตรียมเชื้อทุกชนิดให้มีความขุ่นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 แล้วนำมาเจือจางเป็น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ตามลำดับ ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการใช้อาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ร่วมกับวิธี dot-ELISA

เชื้อ	ระดับความเจือจางจากความเข้มข้นที่ OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
<i>Salmonella</i> ser. Anatum	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> ser. Aberdeen	+	+	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + ผล dot-ELISA เป็นบวก, - ผล dot-ELISA เป็นลบ

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อ 4 จะได้ผลว่า ในเชื้อ *Salmonella* ที่ระดับความเจือจาง 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ และ 10⁻⁶ จากความเข้มข้นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 จะได้จำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 2×10⁷, 2×10⁶, 2×10⁵, 2×10⁴, 2×10³ และ 2×10² CFU/ml ตามลำดับ จะเห็นว่า *Salmonella* ser. Anatum ที่เจือจางจนเหลือเชื้อเริ่มต้นประมาณ 2×10² CFU/ml ยังสามารถตรวจพบได้อยู่ และ *Salmonella* ser. Aberdeen ที่มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 2×10³ CFU/ml ก็ยังสามารถตรวจพบเชื้อได้เช่นกัน แต่ในเชื้อ non-salmonella ชนิดอื่นนั้นให้ผลลบทั้งหมด ยกเว้น *Enterobacter aerogenes* ที่ยังตรวจพบที่จำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 2.7×10⁶ - 2.7×10⁷ CFU/ml (เทียบกับ OD₆₀₀ 0.1 แล้วนำมาเจือจาง 10 – 100 เท่า ตามลำดับ)

จากการศึกษาของ Fries และ Steinhof ในปี 1997 พบว่าการเจริญของเชื้อที่ผสมกันระหว่าง *Salmonella* ser. Enteritidis, *Klebsiella pneumoniae* และ *Staphylococcus aureus* ในสัดส่วนต่างๆ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร RVS broth หลังการบ่ม 24 ชั่วโมง สามารถพบเชื้อ *Salmonella* ในทุก mixture ที่มี *Salmonella* ผสมอยู่ โดยไม่ขึ้นกับเชื้ออื่นๆ ที่ผสมอยู่ด้วย

ในการศึกษาร่วมกัน 18 ห้องทดลอง เพื่อหาเหตุผลในการใช้อาหาร RVS broth โดยใช้ RVS broth บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการใช้ Selenite cystine (SC) broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส และ Tetrathionate (TT) broth บ่มที่ 35 และ 43 องศาเซลเซียส และใช้

artificial contaminated food 4 ชนิด (หอยนางรม, ขากบ, กุ้ง และ เห็ด) และใช้ตัวอย่างจริงเป็นอาหารไก่ และ ไก่สด โดยใน artificial contaminated food จะ inoculate เชื้อ 2 ระดับ คือ 0.04 CFU/g และ 0.4 CFU/g จากการทดลองพบว่า สามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงในอาหาร RVS broth ได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ ยกเว้นตัวอย่างที่เป็นเห็ด ซึ่งใช้ SC broth จะดีกว่าใช้ RVS broth (June และคณะ, 1996)

ต่อมา Hammack และคณะก็ใช้วิธีเดียวกับ June แต่เปลี่ยนตัวอย่างเป็น dried egg yolk, dried active yeast, ground black pepper, guar gum และ instant nonfat dry milk ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันคือ สามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงในอาหาร RVS broth ได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ ยกเว้นตัวอย่างที่เป็น guar gum ซึ่งใช้ SC broth หรือ TT broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส จะดีกว่าใช้ RVS broth (Hammack และคณะ, 2001)

สำหรับในการทดลองครั้งนี้ เหตุผลที่เลือกใช้ RVS broth เป็น selective enrichment broth นอกจากการตรวจสอบผลการทดลองจากเอกสารอ้างอิงดังกล่าวข้างต้นแล้ว เหตุผลที่ใช้ประกอบการเลือกอาหารอีกประการหนึ่งก็คือ RVS broth เป็นอาหารที่ใช้ในวิธีตรวจเชื้อมาตรฐานของ Microbiological method ISO 6579/2002 ที่นิยมทำกันอยู่ในปัจจุบัน

9. การนับจำนวนของเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เตรียมเชื้อเริ่มต้นให้มีจำนวนเซลล์เท่ากันโดยนำเชื้อ *Salmonella* ser. Anatum, *Salmonella* ser. Aberdeen, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* และ *Shigella sonnei* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง มา resuspend ด้วย 0.85% NaCl แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเจือจางเซลล์ให้ได้ความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ซึ่งเราทราบจำนวนอยู่แล้วจากผลการทดลองในข้อ 4. จากนั้นนำ suspension ของเชื้อมาทำการเจือจางด้วย 0.85% NaCl ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^3 และ 10^4 CFU/ml แล้วเพาะเลี้ยงในอาหาร RVS broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมานับจำนวนเชื้อด้วยวิธี dilution plate count ได้ผลดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการนับจำนวนเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เชื้อ	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)	Dilution ที่ นับได้	จำนวน (CFU/จาน)	จำนวน (CFU/ml).
<i>Salmonella</i> ser. Aberdeen	10^3	10^{-5}	50,-	5×10^7
		10^{-6}	4,-	-
	10^4	10^{-5}	40,34	3.7×10^7
		10^{-6}	1,-	-
<i>Salmonella</i> ser. Anatum	10^3	10^{-5}	34,61	4.75×10^7
		10^{-6}	5,7	-
	10^4	10^{-5}	59,52	5.6×10^7
		10^{-6}	12,7	-
<i>Escherichia. Coli</i>	10^3	Undiluted	0	-
	10^4	Undiluted	0	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10^3	Undiluted	0	-
	10^4	Undiluted	0	-
<i>Shigella sonnei</i>	10^3	Undiluted	0	-
	10^4	Undiluted	0	-

จากตารางที่ 8 จะเห็นว่าสอดคล้องกับผลการทดลองในช่วงแรก คือ การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการทำ dot-ELISA นี้สามารถตรวจเชื้อได้ชัดเจนในระดับ 10^6 - 10^8 CFU/ml จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเชื้อลงในอาหาร RVS broth จะช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Salmonella* ในขณะที่เชื้ออื่นถูกยับยั้งการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับผลจากวิธีการตรวจแบบมาตรฐานทางจุลชีววิทยาของ ISO6579/2002 ที่ดัดแปลง

10. การใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหาร artificial contaminated food ที่เตรียมขึ้น โดยเปรียบเทียบกับการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี dilution plate count

ทำการทดลองโดยแบ่งเชื้อเป็น 3 กลุ่ม (ในวิธีการทดลอง) แล้วผสมเชื้อทั้ง 3 กลุ่มที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากันลงในตัวอย่างอาหาร คือ ไข่กรอกไก่ ไข่กรอกนม และลูกชิ้นหมู หลังจากนั้น ทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่เตรียมขึ้นจากการผสมเชื้อแบคทีเรีย 3 กลุ่มๆ ละ 3 ชนิดลงไป โดยใช้เชื้อผสมที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 3×10^3 , 3×10^4 และ 3×10^5 CFU/g อาหาร แล้วเพาะเลี้ยงในอาหาร RVS broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปตรวจด้วยวิธี dot-ELISA ผลที่ได้เป็นดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหาร artificial contaminated food ที่เตรียมขึ้น

ตัวอย่างอาหาร	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (CFU/g)	ผลการทำ dot-ELISA		
		กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 3
ไข่กรอกไก่	3×10^3	-	+	+
	3×10^4	-	+	+
	3×10^5	-	+	+
ไข่กรอกนม	3×10^3	-	+	+
	3×10^4	-	+	+
	3×10^5	-	+	+
ลูกชิ้นหมู	3×10^3	-	+	+
	3×10^4	-	+	+
	3×10^5	-	+	+

จากตารางที่ 9 แสดงว่าเมื่อใช้อาหาร RVS broth เพื่อ pre-enrich และคัดเลือกเชื้อแล้ว ทำให้ในตัวอย่างอาหารที่เตรียมขึ้นจากกลุ่มที่ไม่มีเชื้อ *Salmonella* จะให้ผลตรวจเป็นลบ แต่เมื่อมีเชื้อ *Salmonella* อยู่ก็จะให้ผลเป็นบวก โดยที่เชื้อ *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* ไม่มีผลขัดขวางการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA เป็นการแสดงผลยืนยันที่ชัดเจนของการใช้ RVS broth เป็น selective enrichment broth ในการ pre-enrich เชื้อ *Salmonella* ใน

ตัวอย่างอาหารก่อนการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA อาหาร RVS broth จะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อ enteric ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนมากับตัวอย่างอาหารได้เป็นอย่างดี

11. การใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิดจากแหล่งขาย โดยเปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี conventional method

ทำการซื้อตัวอย่างอาหารจากแหล่งขายมาตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยใช้อาหาร RVS broth เพื่อ pre-enrich และคัดเลือกเชื้อแล้วนำมาตรวจด้วยวิธี dot-ELISA เปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี conventional method ตามวิธีมาตรฐาน ได้ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิดจากแหล่งขาย โดยเปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี conventional method ที่ดัดแปลงขึ้น

ตัวอย่าง	ผลการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA	ผลการตรวจด้วยวิธี Conventional method
ไส้กรอก 1	-	-
ไส้กรอก 2	-	-
แฮม 1	+	+
แฮม 2	+	+
แฮม 3	+	+
ข้าวผัด	-	-
ผัดกระเพรา	-	-
หมูบด 1	+	+
หมูบด 2	+	+
ไก่สด	+	+
ดับไก่สด	+	+
ลูกชิ้น 1	-	-
ลูกชิ้น 2	-	-
ผักสดในห้างสรรพสินค้า	-	-
ผักสดในตลาด	+	+

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ผลการตรวจด้วยวิธี	ผลการตรวจด้วยวิธี
	dot-ELISA	conventional method
อาหารสุนัข	-	-
อาหารกระต่าย	-	-
น้ำแข็งในโรงอาหาร 1	-	-
น้ำแข็งในโรงอาหาร 2	-	-
น้ำแข็งในโรงอาหาร 3	-	-
น้ำดื่ม 1	-	-
น้ำดื่ม 2	-	-
น้ำดื่ม 3	-	-
น้ำผลไม้ 1	-	-
น้ำผลไม้ 2	-	-

จากตารางที่ 10 เห็นได้ว่าการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการทำ dot-ELISA มีความสอดคล้องกับวิธี conventional method ที่ดัดแปลงขึ้น จึงน่าจะสามารถนำไปใช้ในการตรวจเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร หรือสิ่งส่งตรวจอื่นๆ ที่ไม่เฉพาะเจาะจงซีโรวาร์ได้ เพื่อช่วยลดเวลาในการตรวจลง เนื่องจากวิธีการนี้ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 5 ชั่วโมง เมื่อรวมกับขั้นตอนการ pre-enrich และคัดเลือกเชื้อแล้ว จะใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 24 ชั่วโมง ในขณะที่วิธีการตรวจทางจุลชีววิทยาแบบมาตรฐาน เช่น วิธีมาตรฐาน ISO 6579:2002 จะใช้เวลาตั้งแต่การแยกเชื้อไปจนถึงการจำแนกชนิดหรือระบุชนิดของเชื้อ รวมทั้งสิ้นประมาณ 4-5 วัน

ในการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานแล้ว จะมีข้อดีอยู่ตรงที่มีประสิทธิภาพในการตรวจพอๆ กัน แต่ใช้เวลาในการตรวจสั้น ถ้ามีตัวอย่างมากสามารถทำพร้อมกันใน chamber เดียวกันได้ซึ่งเพิ่มความสะดวกให้ผู้ปฏิบัติงาน ใช้พื้นที่ในการปฏิบัติงานน้อย ใช้สารเคมีหรือ reagents ต่างๆ น้อยมาก ในขณะที่วิธีมาตรฐานจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ตั้งแต่ขั้นตอน pre-enrichment จนถึงขั้นตอนการตรวจลักษณะทางเคมี ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีราคาแพง และถ้ามีตัวอย่างมากก็ต้องใช้พื้นที่ในการทำงานและพื้นที่ในการบ่มเชื้อมากตามไปด้วย

ข้อเสียของวิธี dot-ELISA เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานก็คือ สารบางตัวต้องเตรียมขึ้นเองเนื่องจากไม่มีขายสำเร็จรูป ต้องทำการ purify โพลีโคลนอลแอนติบอดีเอง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในวิธีมาตรฐานมีขายเป็นอาหารสำเร็จรูป หรือเป็นอาหารพร้อมใช้งาน (prepared medium) ซึ่งจะลดขั้นตอนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไปได้

เมื่อเทียบกับวิธีรวดเร็วอื่นๆ เช่น PCR วิธี dot-ELISA นั้นจะมีความรวดเร็วเท่ากัน มีการใช้อาหาร selective enrichment 1 ชนิดเท่านั้น ราคาต่อตัวอย่างจะถูกกว่าวิธี PCR แต่ขั้นตอนในการทำ dot-ELISA นั้นจะยุ่งยากกว่าเล็กน้อย สำหรับราคาการตรวจด้วยวิธี PCR ราคาต่อตัวอย่างจะค่อนข้างแพง เช่น BAX system ของ Qualicon จะมีราคาประมาณ 300 บาทต่อตัวอย่าง ส่วนวิธี ELISA เช่นวิธีการตรวจด้วยเครื่อง VIDAS Salmonella จะใช้เวลามากกว่าวิธี dot-ELISA เล็กน้อย มีการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อ pre-enrich และคัดเลือกเชื้อ โดยใช้อาหาร 2 ชนิด แต่ขั้นตอนทำ kit test และหลังทำ kit test ไม่ยุ่งยาก แต่ยังคงมีราคาต่อตัวอย่างที่สูงพอสมควร ประมาณ 250 บาทต่อตัวอย่าง สำหรับการทำให้ dot-ELISA ร่วมกับการใช้ RVS broth ที่ทำในการทดลองครั้งนี้ เมื่อรวมค่าสารเคมีที่ใช้และอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะมีราคาประมาณ 20 บาทต่อตัวอย่างเท่านั้น

การตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยใช้เครื่องอัตโนมัตินั้นจะต้องมีปริมาณการตรวจมากพอสมควรต่อวัน บริษัทจึงจะทำการติดตั้งเครื่องให้ฟรี แล้วขายเอากำไรเฉพาะ kit test โดยตัวเครื่องแต่ละชนิดจะมีราคาแพงมาก เช่น เครื่อง BAX system จะมีราคาประมาณ 3,500,000 บาท จึงมักมีใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เท่านั้น ในขณะที่โรงงานขนาดเล็กหรือห้องทดลองที่มีปริมาณการตรวจน้อยมักไม่มีโอกาสได้ใช้เนื่องจากราคาที่แพงมาก ซึ่งเมื่อเทียบกับวิธี dot-ELISA ที่มีราคาประมาณ 20 บาทต่อตัวอย่างเท่านั้นและไม่ต้องอาศัยเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีราคาแพงมากมาใช้ตรวจร่วมด้วย

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมขึ้นจากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วย *Salmonella* ser. Anatum และ *Salmonella* ser. Enteritidis มาตรวจเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นๆ ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี (IgG) 80 µg/ml และ conjugate 1:10,000 พบว่าสามารถตรวจเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ต่างๆ ที่มีจำนวน 10^6 CFU/ml ได้ แต่เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามอยู่จึงต้องใช้อาหาร selective broth เข้ามาช่วย

การใช้อาหาร Rappaport-Vassilidis Soya (RVS) broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมงร่วมกับการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีมาตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ IgG 80 µg/ml และ conjugate 1:10,000 ทำให้สามารถตรวจอาหารที่มีเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนอยู่จำนวนน้อยถึง 10^2 - 10^3 CFU/กรัมอาหารได้ ซึ่งแสดงถึง sensitivity ที่ดีของวิธี dot-ELISA ที่ทำการทดลอง โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ non-salmonella ที่เป็นเชื้อ enteric bacteria อื่นๆ เช่น *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* และ *Shigella sonnei* เป็นต้น ถึงแม้ว่าในด้าน specificity ต่อเชื้อ *Salmonella* โดยตรงอาจจะไม่สมบูรณ์เท่าที่ควรเนื่องจากใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี แต่ก็สามารถขจัดปัญหาของการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแบคทีเรียในกลุ่ม enteric ที่ใกล้เคียงกันได้โดยใช้อาหาร RVS broth เพาะเลี้ยงเชื้อก่อน ในการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA รวมทั้งการเพาะเลี้ยงเชื้อใน selective enrichment จะใช้เวลาในการตรวจเพียง 24 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาประมาณ 3-4 เท่า ใช้สารในปริมาณน้อย ทำงาน ไม่ต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีราคาแพง สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ *Salmonella* ซีโรวาร์ที่อยู่ใน group อื่นเพื่อดูว่าจะสามารถนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีไปตรวจเชื้อ *Salmonella* ได้ครอบคลุมในหลาย group หรือไม่
2. ควรทดลองนำวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อใน RVS broth ร่วมกับวิธี dot-ELISA ไปตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่มีส่วนประกอบหลากหลาย เช่น แป้ง โปรตีน ไขมัน เพื่อดูว่าส่วนประกอบของอาหารมีผลขัดขวางหรือรบกวนการตรวจเชื้อมัด้วยวิธี dot-ELISA

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3.

สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

วันเพ็ญ ชัยคำภา. 2539. การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารและการวินิจฉัยโรคติดเชื้อซัลโมเนลลา (Salmonellosis). น. 6. การประชุมเชิงปฏิบัติการ “การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella*” วันที่ 20 ธันวาคม 2539. อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2538. การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella*. น. 58-72. การอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง Modern and Rapid Technology on Microbiological Analysis of Food. วันที่ 25-27 ธันวาคม 2538. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, โรงแรมโซลทวินทาวเวอร์.

อรุณ บำรุงตระกูลนนท์. 2540. การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารและผลิตภัณฑ์ : ผลการสำรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ในประเทศไทย. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ.

Banwart, G.J. 1979. **Basic Food Microbiology**. AVI Publishing Company, Inc., New York.

Baylis, C. 2000. **The Catalogue of Rapid Microbiological Methods**, Review No. 1, 4th edition. Campden and Chorleywood Food Research Association, Chipping Campden, UK.

Berlin, R.M. 1990. Rapid methods for food analysis possibilities and limits. pp. 28-29. In W. Baltes, ed. **Rapid Methods for Analysis of Food and Food Raw Material**. Technomic Publishing Co., Inc., Pennsylvania.

Boyd, R.F. and B.G. Hoerl. 1981. **Basic Medical Microbiology**. Little, Brown and Company, Inc., Boston.

Bridge Lawson. 2003. **Salmonella food poisoning**. Available Sources:
<http://www.homepages.uel.ac.uk/u0220158/>, September 9, 2008.

Chaicumpa W., Ngren-ngarmlert W., Kalambaheti T., Ruangkunapom Y., Chongsa-nguan M., Tapchaisri P., Desakorn V. and Suthienkul O. 1995. Monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for the detection of *Salmonella* in foods. **Asian Pac J Allergy Immunol**. 13(2): 159-166

Chris Bell and Alec Kyriakides. 2002. **Salmonella: a practical approach to the organism and its control in foods**. Blackwell Science Ltd. UK.

D'Aoust, J.Y. 1997. *Salmonella* species, pp. 129-158. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville, eds. **Food Microbiology Fundamental and Frontiers**. ASM press, Washington D.C.

Doyle, M.P. and D.O. Cliver. 1990. *Salmonella*. pp. 185-204. In D.O. Cliver, ed. **Foodborn Disease**. Academic Press, Inc., Sandiego, California.

Frank, C.H. and Olwyn M.R. Westwood. 2002. **Immunoassay**. Practical Immunology.

Fries, R. and Steinhof U. 1997. **Growth kinetics of *Salmonella* in mixed cultures incubated in Rappaport-Vassiliadis medium**. Food Microbiology. 14(5) : 505-513

Golden, D.A., E.J. Rhodehamel and D.A. Kautter. 1993. Growth of *Salmonella* spp. in cantaloupe, watermelon and honeydew melons. **J. Food Prot**. 56 (3) : 194-196

Grimont P.A.D. and F.X. Weill. 2007. **Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars**. 9th ed. Institut Pasteur, Paris, France.

Guthrie, R.K. 1992. ***Salmonella***. CRC Press, Inc., Florida.

Hammack T.S., Anaguana R.M., Andrews WH. and Lerner I. 2001. Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp. from low microbial load foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**. U.S. Food and Drug Administration, Division of Microbiological Studies, Washington, DC 20204, United States. 84(1): 65-83

Hayes, P.R. 1985. **Food Microbiology and Hygiene**. Elsevier Applied Science Publishers, London.

Ismail, A., Kader Z.S. and Kok-Hai O. 1991. Dot enzyme immunosorbent assay for the serodiagnosis of typhoid fever. **Southeast Asian J. Trop Med Public Health**. 22(4): 563-566

Jay, J.M. 1970. **Modern Food Microbiology**. Rienhold Book Coporation, New York.

June, G.A., Sherrod P.S., Hammack T.S., Amaguana R.M. and Andrew W.H. 1996. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp. from raw flesh highly contaminated foods and poultry feed: collaborative study. **Journal of AOAC International**. U.S. Food and Drug Administration, Division of Microbiological Studies, Washington, DC 20204, United States. 79(6):1307-23

Kritsana J., Sunee K., Hatairat T., Sittichai T., Suwattana K., Niramol W. and Suttipant S. 2000.

Rapid Detection of *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis in Blood Cultures by a Dot Blot Enzyme-Linked Immunosorbant Assay. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**. 7(6): 977-979

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275

Mcfadden, J. 1990. **Salmonella epithelial**. University of SURREY. Available Sources:

http://www.surrey.ac.uk/SBMS/ACADEMICS_homepage/mcfadden_johnjoe/img/salmonella-epithelial%20interactions.jpg, September 9, 2008.

Perola, O.M., A.M. Lopes, P.G. Mazzola, C. Rangel-Yagui, T.C.V. Penna and A. Pessoa Jr.

2007. **Methods of Endotoxin Removal From Biological Preparations: a Review.**

J Pharm Pharmaceut Sci. Available Sources:

http://www.ualberta.ca/~csps/JPPS10_3/MS_996/MS_996.html, September 9, 2008.

Pinhero, A.M., M.F. Costa, B. Paule, V. Vale, M.I. Ribeiro, I. Nascimento, R.E. Schaer, M.A.O.

Almeida, R. Meye and S.M. Freire. 2005. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. **Veterinary parasitology**. 130 : 73-79

Tapchaisri P., Wangroongsarb P., Panbangred W., Kalambaheti T., Chongsa-nguan M.,

Srimanote P., Kurazono H., Hayasha H. and Chicumpa W. 1999. Detection of *Salmonella* contamination in food samples by dot-ELISA, DNA amplification and bacterial culture. **Asian Pac J Allergy Immunol**. 17(1): 41-51

Ziprin, R.L. 1994. **Salmonella**. Foodborne Disease Handbook Diseases Caused by Bacteria.

Marcel Dekker, Inc., New York. Cited W. Burrows. 1959. **Textbook of Microbiology**. 7th ed. W.B. Saunders, Philadelphia.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยวิธี Laemmli SDS-PAGE

1. สารเคมี

1.1 Acrylamide/bis

Acrylamide	29.2	กรัม
N’N’-bis-methylene-acrylamide (FW 154.17)	0.8	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด		

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

Tris base (FW 121.1)	27.23	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร
ปรับให้ได้ pH 8.8 ด้วย HCl		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	150	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด		

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

Tris base	6	กรัม
น้ำกลั่น	60	มิลลิลิตร
ปรับให้ได้ pH 6.8 ด้วย HCl		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	100	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด		

1.4 10% SDS

SDS	10	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิห้อง		

1.5 10% Ammonium persulfate

Ammonium persulfate (FW 228.20)	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น เตรียมก่อนใช้งาน	1	มิลลิลิตร

1.6 Sample buffer (Reducing buffer)

4X Stacking gel buffer	1.25	มิลลิลิตร
Glycerol	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	2	มิลลิลิตร
0.5% Bromophenol blue	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.55	มิลลิลิตร
ใส่ β -Mercaptoethanol 50 ไมโครลิตร ใน sample buffer 950 ไมโครลิตรก่อนใช้		

1.7 Running buffer (pH 8.3)

Tris base (FW 121.1)	3.03	กรัม
Glycine	14.40	กรัม
SDS	10	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น เก็บที่อุณหภูมิห้อง	1,000	มิลลิลิตร

1.8 Staining solution

Coomassie brilliant blue R	0.25	กรัม
Methanol	400	มิลลิลิตร
Acetic acid	70	มิลลิลิตร
ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น เก็บที่อุณหภูมิห้อง	1,000	มิลลิลิตร

1.9 Destaining solution I

Methanol	400	มิลลิลิตร
Acetic acid	70	มิลลิลิตร
ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น เก็บที่อุณหภูมิห้อง	1,000	มิลลิลิตร

1.10 Destaining solution II

Methanol	400	มิลลิลิตร
Acetic acid	70	มิลลิลิตร
ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น เก็บที่อุณหภูมิห้อง	1,000	มิลลิลิตร

2. อุปกรณ์

ชุดอุปกรณ์ Mini-PROTEAN 3 cell ของ BIO-RAD

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. สารเคมี

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

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

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

1.4 สารละลาย alkali copper

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

1.5 1 N folin-ciocalteau phenol reagent

นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 ก่อนนำไปใช้

1.6 สารละลายมาตรฐานโปรตีน

ใช้ bovine serum albumin 0.001 กรัม ละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 62.5 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีทำ

2.1 ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin ความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 ใส่ตัวอย่าง 1.5 ml ลงในหลอดทดลอง

2.3 เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

2.4 เติม 1 N folin-ciocalteau phenol reagent ปริมาตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน

3. การคำนวณ

ซึ่ง IgG ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจาง 5 เท่า วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรได้ 0.059 เมื่อนำมาใส่ในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานจะได้

$$Y = 0.4283 X + 0.0054$$

$$0.059 = 0.4283 X + 0.0054$$

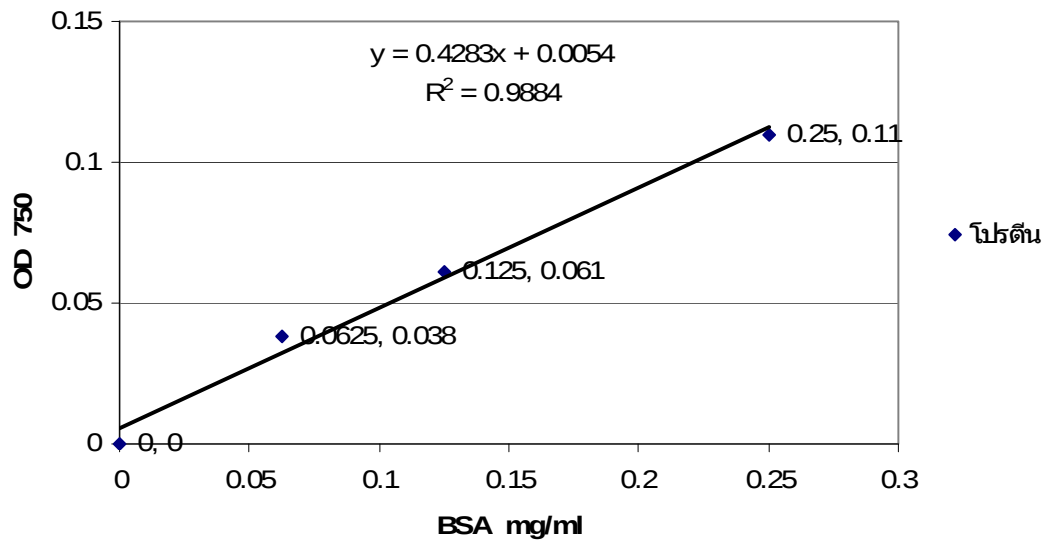
$$X = 0.125$$

นั่นคือ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นเมื่อคูณกลับจะได้ $0.125 \times 5 = 0.625$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของโปรตีน

มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างที่เจือจาง 5 เท่า

BSA std. (mg/ml)	Average OD ₇₅₀
0.5	0.169
0.25	0.11
0.125	0.061
0.0625	0.038
5X IgG ต่อ <i>Salmonella</i> (ผง)	0.059



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟโปรตีนมาตรฐานของ bovine serum albumin

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptone soya agar (TSA)

Tryptone	15.0	กรัม
Soya peptone	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มจนเดือด แล้วใส่ในหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำมาวางเลี้ยงจนอาหารแข็งตัว

2. Rappaport Vassiliadis broth (RVS)

Peptone from soymeal	4.5	กรัม
Magnesium chloride-hexahydrate	28.6	กรัม
Sodium chloride	7.2	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	0.18	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.26	กรัม
Malachite green oxalate	0.036	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Xylose lysine deoxycholate agar (XLD)

Yeast extract	3.0	กรัม
L-Lysine HCl	5.0	กรัม
Xylose	3.75	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
Sodium deoxycholate	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium thiosulphate	6.8	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	12.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 7.4 ต้มจนเดือด แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ		

4. Standard plate count agar (PCA)

Yeast extract	2.5	กรัม
Pancreatic digest of casein	5.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ

5. Triple sugar iron agar (TSI)

'Lab-Lemco' powder	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Ferric citrate	0.3	กรัม
Sodium thiosulphate	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.4 ต้มจนเดือด แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาเชื่อมด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำมาวางเอียงเล็กน้อยจนอาหารแข็งตัวโดยให้มีส่วน slant และ butt

6. Lysine iron agar (LIA)

Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
L-lysine	10.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Sodium thiosulphate	0.04	กรัม
Bromocresol purple	0.02	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

7. SIM medium

Peptone from casein	20	กรัม
Peptone from meat	6.6	กรัม
Ammonium iron citrate	0.2	กรัม
Sodium thiosulphate	0.2	กรัม
Agar	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มจนเดือด ใส่หลอดทดลอง ให้สูงประมาณ 4 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งในลักษณะตั้งตรง (deep tube)

สารละลายและบัฟเฟอร์

1. 0.85% NaCl (normal saline)

NaCl	8.5	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	1,000	มิลลิลิตร

2. 0.15 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7.2		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1,000	มิลลิลิตร

3. 20 mM Phosphate buffer pH 7.0 (binding buffer)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.17	กรัม
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.62	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7.0		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1,000	มิลลิลิตร

4. 100 mM Glycine hydrochloric acid buffer pH 2.8 (elution buffer)

Glycine	7.507	กรัม
Hydrochloric acid (conc.)	100	มิลลิลิตร
ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 2.8		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1,000	มิลลิลิตร

5. 1.0 M Tris-HCl buffer pH 9.0

Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	12.114	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 9.0		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	100	มิลลิลิตร

6. Phosphate buffer saline – Tween 20 (PBS-T)

Phosphate buffer saline (PBS)	100	มิลลิลิตร
Tween 20	0.05	มิลลิลิตร

7. Blocking solution

Skim milk powder	2.0	กรัม
PBS-T	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

ภาพผลการทำ dot-ELISA

ตารางผนวกที่ 1 แสดงภาพผลการตรวจเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นด้วยวิธี dot ELISA

เชื้อ	group	ผลการทำ dot-ELISA
<i>Salmonella</i> ser. Paratyphi A	A	
<i>Salmonella</i> ser. Paratyphi B	B	
<i>Salmonella</i> ser. Derby	B	
<i>Salmonella</i> ser. Stanley	B	
<i>Salmonella</i> ser. Cholerae-suis	C1	
<i>Salmonella</i> ser. Virchow	C1	
<i>Salmonella</i> ser. Dublin	D1	
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	D1	
<i>Salmonella</i> ser. Typhi	D1	
<i>Salmonella</i> ser. Anatum	E1	
<i>Salmonella</i> ser. Aberdeen	F	
<i>Salmonella</i> ser. Yoruba	I	
<i>Salmonella</i> ser. Hvitittingfoss	I	
<i>Salmonella</i> ser. Urbana	N	
<i>Salmonella</i> ser. Waycross	S	

ตารางผนวกที่ ๖๒ แสดงภาพผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแบคทีเรียกลุ่ม non-salmonella ที่เป็น enteric bacteria โดยวิธี dot-ELISA

เชื้อ	ผลการทำ dot-ELISA		
	Antigen undiluted	Dilute แอนติเจน	Dilute แอนติเจน
	(OD ₆₀₀ = 0.1)	10 เท่า	100 เท่า
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Enterobacter aerogenes</i>			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
<i>Citrobacter freundii</i>			
<i>Proteus mirabilis</i>			
<i>Shigella sonnei</i>			
<i>Edwardsiella tarda</i>			

ตารางผนวกที่ ๖๓ แสดงภาพผลการใช้อาหาร Rappaport-Vassiliadis broth (RVS) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ร่วมกับวิธี dot-ELISA

เชื้อ	ระดับความเจือจางจากความเข้มข้นที่ OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
<i>Salmonella Anatum</i>						
<i>Salmonella Aberdeen</i>						
<i>Escherichia coli</i>						
<i>Enterobacter aerogenes</i>						
<i>Shigella sonnei</i>						

ตารางผนวกที่ ๔ แสดงภาพผลการใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหาร artificial contaminated food ที่เตรียมขึ้น โดยเปรียบเทียบกับการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี dilution plate count

ตัวอย่างอาหาร	ความเข้มข้นของเชื้อ (CFU/g)	ผลการทำ dot-ELISA		
		กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 3
ไส้กรอกไก่	3×10^3			
	3×10^4			
	3×10^5			
ไส้กรอกนม	3×10^3			
	3×10^4			
	3×10^5			
ลูกชิ้นหมู	3×10^3			
	3×10^4			
	3×10^5			

หมายเหตุ: กลุ่มที่ 1 มีเชื้อ *Shigella sonnei*, *E. coli* และ *Enterobacter aerogenes*

กลุ่มที่ 2 มีเชื้อ *Salmonella* ser. Anatum, *E. coli* และ *Enterobacter aerogenes*

กลุ่มที่ 3 มีเชื้อ *Salmonella* ser. Aberdeen, *E. coli* และ *Enterobacter aerogenes*

ตารางผนวกที่ 5 แสดงภาพผลการใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิด จากแหล่งขาย โดยเปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี conventional method

ตัวอย่าง	ผลการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA	ผลการตรวจด้วยวิธี conventional method
ไส้กรอก 1		-
ไส้กรอก 2		-
แฮม 1		+
แฮม 2		+
แฮม 3		+
ข้าวผัด		-
ผัดกระเพรา		-
หมูบด 1		+
หมูบด 2		+
ไก่สด		+
ตับไก่สด		+
ลูกชิ้น 1		-
ลูกชิ้น 2		-
ผักสดในห้างสรรพสินค้า		-
ผักสดในตลาด		+
อาหารสุนัข		-
อาหารกระต่าย		-
น้ำแข็งในโรงอาหาร 1		-
น้ำแข็งในโรงอาหาร 2		-

ตารางผนวกที่ ๖ (ต่อ)

ตัวอย่าง	ผลการตรวจด้วยวิธี	ผลการตรวจด้วยวิธี
	dot-ELISA	conventional method
น้ำแข็งในโรงอาหาร 3		-
น้ำดื่ม 1		-
น้ำดื่ม 2		-
น้ำดื่ม 3		-
น้ำผลไม้ 1		-
น้ำผลไม้ 2		-

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายกฤษฎา ตู้จินดา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	29 สิงหาคม พ.ศ. 2523
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประวัติการทำงาน	นักวิทยาศาสตร์ 3 คณะทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	Product Specialist
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท Clinical Diagnostic
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา