

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonellae* อย่างรวดเร็วในตัวอย่างอาหารโดยวิธี
immunomagnetic enrichment และ enzyme immunoassay

ยุวดี มหาคุณกิจเจริญ ประมวลญ เทพชัยศรี มนัส จงสงวน ยุวพร สากลวารี
และ วันเพ็ญ ชัยคำภา

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ *Salmonellae* ในตัวอย่างอาหารผู้วิจัยใช้ Ab-reacted beads (goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads ที่ react กับ *Salmonella*-specific rabbit Igs) จับเชื้อ *Salmonellae* และ/หรือ antigens ของเชื้อในตัวอย่างอาหาร จากนั้นจึงแยก antigen captured beads ออกจากส่วนน้ำของตัวอย่างตรวจด้วยอำนาจแม่เหล็ก เมื่อ resuspend beads ใน medium ปริมาณน้อยๆ จึงทำให้ความเข้มข้น (concentration) ของเชื้อหรือ antigens ที่จับอยู่กับ beads เพิ่มขึ้น (การแยกเชื้อโดยวิธีนี้เรียกว่า immunomagnetic enrichment [IME]) จากนั้นจึงนำ beads มาตรวจหาเชื้อต่อด้วยวิธี monoclonal antibody (MAb)-based dot-blot ELISA ในการศึกษาใช้ BioMag beads ซึ่งมีข้อดีกว่า beads ชนิดอื่นๆ ที่มีจำหน่ายในขณะนี้เพราะสามารถเกาะติดกับแผ่น nitrocellulose membrane ได้ดีกว่า ไม่ร่อนหลุดง่ายเหมือน beads อื่น และพบว่าการเพิ่มขึ้นตอนการแยกเชื้อด้วย Ab-reacted beads ก่อนนำไปตรวจด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA ให้ผลดี (sensitive) กว่าตรวจด้วย MAb-based dot-blot ELISA เพียงอย่างเดียว เนื่องจากสามารถอ่านผลจากปฏิกิริยากับเชื้อในระดับ 10^5 cfu/ml ได้ชัดเจนขึ้น นอกจากนี้ยังเมื่อเปรียบเทียบวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเดิม วิธีใหม่มีความไวและความถูกต้องแม่นยำประมาณ 72.81-96.55% และ 58.33-68.29% ตามลำดับ และไม่พบผลบวกปลอม วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจได้ทั้งเชื้อที่ยังมีชีวิต เชื้อที่ตายแล้ว รวมถึงชิ้นส่วนของเชื้อด้วย ซึ่งวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจะตรวจได้แต่เพียงเชื้อที่ค่อนข้างสมบูรณ์และสามารถ resuscitate ได้โดย enrichment culture media เท่านั้น แม้ว่าตัวอย่างอาหารที่จะตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีใหม่จะต้องนำมาบ่มเชื้อใน tryptic soy broth (TSB) อย่างน้อย 18 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกเชื้อด้วย beads รวมเวลาการตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดประมาณ 20-24 ชั่วโมง แต่ก็ยังเร็วกว่าเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมาก ช่วยลดระยะเวลาในการเก็บผลิตภัณฑ์เพื่อรอผลการตรวจก่อนการส่งออก ซึ่งนอกจากเป็นการลดค่าใช้จ่ายแล้วยังเป็นการช่วยรักษาคุณภาพอาหารด้วย และไม่มีของเสียที่ติดเชื้อเหลือจากการเพาะเลี้ยงเชื้ออันเป็นปัญหาสำคัญทั้งทางเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม

Project Code: PDF/17/2541

Rapid detection of Salmonellae in contaminated foods by immunomagnetic enrichment and enzyme immunoassay

Yuvadee Mahakunkijcharoen, Pramuan Tapchaisri, Manas Chongsa-nguan, Yuwaporn Sakolvaree and Wanpen Chaicumpa

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine,
Mahidol University

E-mail address: tmymh@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years (July 1998 to June 2001)

We established a method for rapid detection of Salmonellae in contaminated food by immunomagnetic enrichment (IME) in combination with enzyme immunoassay. Ab-reacted beads (goat anti-rabbit IgG coated superparamagnetic beads [BioMag] binding to *Salmonella*-specific rabbit immunoglobulins [RIg]) were used to capture the bacteria and/or their antigens in food samples. The antigen-capturing beads were collected using a magnetic power and resuspended in a small volume of medium. MAb-based dot-blot ELISA was then proceeded to detect the bacteria bound to the beads by using *Salmonella*-specific monoclonal antibody (MAb 102 B₂). The BioMag superparamagnetic beads were suitable for this study because of their superior ability to adsorb onto nitrocellulose membrane (NC). Our results showed that IME combining MAb-based dot-blot ELISA (IME/MAb-based dot-blot ELISA) was able to detect as less as 10⁵ cfu/ml of Salmonellae in culture suspension. It should be noted that food samples should be cultured in tryptic soy broth (TSB) for at least 18 hours before the test. Although the sensitivity of the IME/MAb-based dot-blot ELISA was not significantly higher than that of the MAb-based dot-blot ELISA alone, the reaction of the former test observed on the NC was stronger. In comparison with conventional culture method, the sensitivity and accuracy of IME/MAb-based dot-blot ELISA were about 72.81-96.55% and 58.33-68.29%, respectively, with no false positive results. The test was able to detect both lived- and dead- bacteria or even antigens of the bacteria. Moreover, it took totally 20-24 hours for the whole process with much less amount of waste products. This method is thus useful for detection of the bacteria in food products before exportation. The less time consuming in detection process is more advantage not only in reducing cost for food preservation but also in maintaining the food quality.