การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จสำหรับหาเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารประเภทเนื้อสัตว์โดยวิธีอิมมูโนแมกเนติกร่วมกับอิมมูโนแอสเสย์:แคมพัยโลแบคเตอร์และซัลโมเนลลา

172575

บทคัดย่อ

Campylobacter spp. และ *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ สายพันธุ์สำคัญที่มักก่อให้เกิดการปนเปื้อนได้ในเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์อาหาร คือ *C. jejuni*, *S. enterica* serovars Typhimurium และ Enteritidis ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะจำแนกเชื้อเหล่านี้ด้วยวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำ เพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ของผลิตภัณฑ์อาหารและเนื้อสัตว์เพื่อการส่งออก และเพื่อผู้บริโภคภายในประเทศ การพัฒนาวิธีอิมมูโนแมกเนติก-ELISA (IMS-ELISA) และวิธี ELISA ถูกคิดค้นพัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้ เพื่อจำแนกเชื้อดังกล่าว ร่วมกับวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ (m-PCR) เพื่อยืนยันผลที่ได้

ในการศึกษาตรวจความไวและความจำเพาะนี้ ตัวอย่างที่นำมาตรวจทั้งหมดจะทำการเพาะเชื้อใส่ลงในปริมาณที่แน่นอน และนำไปทดสอบโดยไม่มีขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ วิธี IMS-ELISA และ ELISA จะวัดค่าของปฏิกิริยาที่ 450 nm โดยมีผลแสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจเชื้อ *Campylobacter* spp. และ *C. jejuni* ได้ที่ระดับความไวต่ำสุด 10^5 และ10^6 cfu/ml ตามลำดับ ส่วนวิธี m-PCR ให้ที่ระดับต่ำสุด 10^2 cfu/ml (10 cfu/PCR reaction) และได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 460 คู่เบส สำหรับ *Campylobacter* spp. และ *C. coli* ขณะที่เชื้อ *C. jejuni* ได้ดีเอ็นเอขนาด 460 และ 160 คู่เบส

สำหรับการตรวจเชื้อกลุ่ม *Salmonella* ด้วยวิธี m-PCR พบว่า *Salmonella* spp. ทุกชนิดที่ตรวจสอบ ให้ผลที่ระดับความไวต่ำสุด 10^5 cfu/ml (10^3 cfu/PCR reaction) และได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 526 คู่เบส ขณะที่ *S.* Typhimurium ได้ดีเอ็นเอขนาด 620 และ 526 คู่เบส ส่วน *S.* Enteritidis ได้ดีเอ็นเอขนาด 526 และ 316 คู่เบส สำหรับวิธี ELISA จะให้ผลความไวในปริมาณต่ำสุด 10^6, 10^6 และ 10^8 cfu/ml สำหรับ *Salmonella* spp., *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis ตามลำดับ ส่วนวิธี IMS-ELISA ให้ผลความไวในปริมาณต่ำสุด 10^5, 10^4 และ 10^7 cfu/ml สำหรับ *Salmonella* spp., *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis ตามลำดับ

ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นทั้งหมดให้ความจำเพาะที่ร้อยละ 100 เมื่อตรวจกับเชื้อมาตรฐานต่างๆในห้องปฏิบัติการ ในการทดลองเพิ่มเติมพบว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้สามารถตรวจการปนเปื้อนของจุลชีพที่ต่ำสุด 1 cfu/ml หากได้มีการบ่มตัวอย่างก่อนเป็นเวลาเพียง 6 ชั่วโมง ชุดตรวจสอบนี้สามารถเก็บรักษาได้ที่ 4°ซ อย่างน้อย 9 เดือน ในระหว่างที่ทำการวิจัย โดยที่ผลการตรวจสอบโดยการวัดการดูดกลืนแสงในระยะการเก็บที่ 0, 3, 6 และ 9 เดือน ยังคงมีความคงตัว และมีประสิทธิภาพ ($p > 0.5$, ANOVA) ซึ่งอาจเก็บรักษาได้นานกว่านี้

ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นด้วยวิธี IMS-ELISA, ELISA และ m-PCR สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจการปนเปื้อนในตัวอย่างเนื้อไก่โดยการเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา (BAM 2003) ทำการเพาะเชื้อมาตรฐานใส่ลงตัวอย่างปริมาณ 10^2 cfu/ml ก่อนบ่มต่อเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ผลที่ได้สามารถตรวจเชื้อทั้งสองกลุ่มจากเนื้อไก่ได้ วิธีที่พัฒนานี้ให้ผลการตรวจไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าทุกวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานแล้ว จะให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว ทำได้ง่ายและไม่สิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน ชุดตรวจสอบที่ได้พัฒนานี้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยและสามารถผลิตได้เองในประเทศ เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจอาหาร และเนื้อสัตว์ต่างๆ เพื่อความปลอดภัยด้านอาหาร รวมทั้งการตรวจสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์

Development of immunomagnetic - immunoassay diagnostic kits for food-borne microorganisms in meat : *Campylobacter* and *Salmonella*

ABSTRACT

172575

Campylobacter spp. and *Salmonella* spp. are contagious organisms which are the most common causes of human gastroenteritis. *Campylobacter jejuni, S. enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis can infect both human and animals and they are major pathogens that can contaminate meat and food products. Rapid methods for identifying *Campylobacter* and *Salmonella* spp. are required, especially for meat and food exports and for local consumer protection. To do these rapid assays, immunoassays; immunomagnetic separation-ELISA (IMS-ELISA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were developed in order to identify these organisms efficiently. The multiplex polymerase chain reaction (m-PCR) was also developed to identify and confirm the targeted DNA of interest.

In this study, all samples tested were directly inoculated with exact numbers of organisms and the tests were performed without further enrichment. Absorbance at 450 nm was selected to measure and interpret the results of immunoassays. For *Campylobacter*: developed IMS-ELISA and ELISA test kits gave the sensitivity at 10^5 and 10^6 cfu/ml for *Campylobacter* spp. and *C. jejuni* respectively. Developed m-PCR generated the sensitivity at 10^2 cfu/ml (10 cfu/PCR reaction) and gave only 460 bp for *Campylobacter* spp. and *C. coli*, whereas 460 and 160 bp for *C. jejuni*.

For *Salmonella*: m-PCR also generated the sensitivity at 10^5 cfu/ml (10^3 cfu/PCR reaction) and gave only 526 bp for *Salmonella* spp., 620 and 526 bp for *S.* Typhimurium and 526 and 316 bp for *S.* Enteritidis. Developed ELISA test kits for *Salmonella* spp., *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis gave the sensitivity at 10^6, 10^6 and 10^8 cfu/ml respectively. IMS-ELISA gave the sensitivity for *Salmonella* spp., *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis at 10^5, 10^4 and 10^7 cfu/ml respectively.

Every test kit gave the specificity at 100% with all standard organisms available in laboratory. Moreover, the developed methods could detect the contamination at 1 cfu/ml when the samples were pre-enriched for 6 hours only. The immunodiagnostic kits were stored at 4°C for at least 9 months during the experiments. The absorbance value of the reaction to identify positive and negative controls for sensitivity and specificity study during storage at 0, 3, 6 and 9 months showed no significant difference ($p>0.05$, ANOVA). It was concluded that the kits possessed stability and gave reproducible results not less than 9 months.

Developed diagnostic kits; IMS-ELISA, ELISA and m-PCR, were applied to detect the contamination in chicken samples by inoculated samples with 10^2 cfu/ml standard control microorganism before incubating for 18-24 hours. The identification followed the standard protocol for *Campylobacter* and *Salmonella* detection in meat recommended by the Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2003) with some modifications. The inoculated samples gave positive results, while the un-inoculated samples gave negative results. All kits gave the same patterns of results. In conclusion, all the techniques used were accurate, rapid, simpler and less time and labor-consuming than the conventional methods. The developed kits fulfilled the aims of the study. They have been established in Thailand and are available to be applied to fresh foods, meat, and food products in food safety-control, including clinical specimens.