การพัฒนาและการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

DEVELOPMENT AND COMPARATIVE STUDY ON DETECTION OF *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

วัฒณะ สมสิทธิ์

WATTANA SOMSIT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2541

ISBN 974-622-135-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DEVELOPMENT AND COMPARATIVE STUDY ON DETECTION OF *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

WATTANA SOMSIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE PROGRAM IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

1998

ISBN 974-622-135-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 1998

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาและการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

DEVELOPMENT AND COMPARATIVE STUDY ON DETECTION OF *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

ชื่อนักศึกษา นายวัฒณะ สมสิทธิ์ **รหัสประจำตัว** 38064200

หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปีพันธ์

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	
รศ.ดร.ดุษณี	ธนะบริพัฒน์	
รศ.ดร.วิมลมาศ	ลิปีพันธ์	
ผศ.ฉัฐดา	วิโรจน์แสงอรุณ	
ผศ.อรไท	สุขเจริญ	

ค่าระดับคะแนนที่ผ่านเป็นเอกฉันท์จากคณะกรรมการสอบ GOOD

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 24 มีนาคม 2541 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ. ห้อง 424 อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.มนัส สังวรศิลป์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 12 **เดือน** เมษายน **พ.ศ.** 2541

หมายเหตุ การวัดผลวิทยานิพนธ์ให้ใช้ค่าระดับคะแนนดังนี้

ค่าระดับคะแนน	ผลการศึกษา
O	Outstanding (ดีเยี่ยม)
G	Good (ดี)
P	Pass (ผ่าน)
F	Fail (ไม่ผ่าน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาและการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
นักศึกษา	นาย วัฒณะ สมสิทธิ์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2541

บทคัดย่อ

การพัฒนาและเปรียบเทียบวิธีตรวจสอบเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เทคนิค Dot-ELISA และปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination) โดยวิธี ELISA และ Dot-ELISA จำเป็นต้องใช้ antibody-enzyme conjugate เป็นสำคัญในการตรวจสอบเชื้อ ดังนั้นในการศึกษานี้ทำการเชื่อมโยงแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแฟลกเจลลาของเชื้อ*Salmonella* กับเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสโดยวิธีเพอริโอเดท จากการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* โดยวิธี ELISA พบว่า การเคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วย IgG ของ rabbit anti-whole cell ที่ระดับความเข้มข้นโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ระดับการเจือจาง antibody-enzyme conjugate เท่ากับ 1:400 หรือใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับการเจือจาง antibody-enzyme conjugate เท่ากับ 1 : 800 เป็นระดับที่มีความเหมาะสม สามารถตรวจเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และการตรวจโดยอาศัยเทคนิค Dot-ELISA วิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ให้ผลบวกชัดเจนที่ความเข้มข้น 10^{7} - 10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้น IgG ของ rabbit anti-flagella serum เท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลส ใช้ระดับการเจือจาง antibody-enzyme conjugate เท่ากับ 1 : 100 สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* โดยอาศัยปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ พบว่าสามารถเกิดการตกกลุ่มกับเชื้อที่ความเข้มข้น 10^{7} - 10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำอาหารทะเลส่งออก และตัวอย่างอาหารจากตลาดสดจำนวน 68 ตัวอย่าง มาตรวจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เทคนิค Dot-ELISA และปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination) เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีความไว (sensitivity) เท่ากับ 84.6 % , 92.3 % และ 92.3 % ตามลำดับมีความจำเพาะ(specificity) เท่ากับ 96.36 %, 100 % และ 96.36 % ตามลำดับ ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) เท่ากับ 84.62% ,100% และ 85.71% ค่าคาดหวังผลลบ(negative predictive value) เท่ากับ 96.3% , 98.2 % และ 98.15 % และระยะเวลาในการตรวจสอบวิเคราะห์ 53 , 75 และ 73 ชั่วโมงตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มขั้นตอนการบ่มใน selective enrichment ทำให้ประสิทธิภาพ การตรวจสอบสูงขึ้น แต่การบ่มเป็นเวลานานทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ดังนั้นวิธีELISAสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วและสามารถตรวจสอบครั้งละมาก ๆ และมีแนวโน้มในการพัฒนานำไปใช้ตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Development and Comparative Study on Detection of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
Student	Mr. Wattana Somsit
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun
Thesis Co-advisor	Associate Professor Dr. Dusanee Thanaboripat
Degree	Master of Science Program in Biotechnology
Year	1998

ABSTRACT

Development and comparative study for detection of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 were investigated by double-sandwich ELISA, Dot - ELISA and latex-agglutination. ELISA and Dot-ELISA techniques required the antibody-enzyme conjugate which was specific to flagella of *Salmonella* and combined with horseradish peroxidase (HRP) by periodate method. In ELISA method , it was found that the optimum condition required IgG from rabbit anti-whole cell serum coated to microtiter plates at concentration of 20 μg /ml and the dilution of antibody-enzyme conjugate at 1 : 400 while the IgG from rabbit anti- flagella serum was at 10 μg/ml and the dilution of antibody-enzyme conjugate was 1 : 800 . *Salmonella typhimuriun* at the minimum concentration of 10^6 cells / ml was detected by ELISA . The optimum concentration of rabbit anti-flagella serum coated to nitrocellulose was 30 μg / ml and the antibody-enzyme conjugate was 1 : 100 in Dot-ELISA. The minimum concentration of *Salmonella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

typhimurium at 10^7 - 10^8 cells / ml was detected by Dot-ELISA. For the latex method, it could detect the reaction at 10^7 - 10^9 cells / ml. When using the three developed methods for detection of *Salmonella* in export-frozen seafood samples ,chicken, meat and pork of total 68 samples, it was found that double antibody sandwich ELISA, Dot-ELISA and latex - agglutination compared to the culture method, showed the sensitivity of 84.6%, 92.3% and 92.3, and the specificity of 96.36%, 100% and 96.36% respectively . The positive predictive values were 84.62%, 100% and 85.71% and the negative values were 96.3%, 98.2% and 98.15%, respectively and the time for analysis was 53 , 75 and 73 hours. Although the Dot -ELISA and latex - agglutination were more efficient than ELISA , they consumed more time for incubation in selective enrichment medium and more expensive. As ELISA method could detect rapidly and economically so it should be developed for the detection of *Salmonella* in food industry.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาจาก รศ.ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์ และ รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณองค์การเภสัชกรรมที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการดำเนินการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีและขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ผศ. ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ และ ผศ. อรไท สุขเจริญ ที่กรุณาให้คำแนะนำ รวมทั้งชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ขอขอบคุณ คุณอัชฌา สัจจะปาละ ที่เอื้อเฟื้ออาหารทะเลส่งออก คุณพัลลภา พัฒนวงศ์รวมทั้งเพื่อน ๆ นักศึกษาทุกคนที่ได้ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจต่อผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจทำให้ผู้วิจัยมีวันแห่งความสำเร็จนี้ได้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน

วัฒณะ สมสิทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....XI

สารบัญภาพ.....XIV

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์.....1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....3

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง.....5

2.1*Salmonella*.....8

2.2 คุณสมบัติทางเคมีที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของแอนติเจน *Salmonella*.....9

2.3 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยใช้เทคนิคเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์.....12

2.4 การใช้แอนติบอดีในการวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella*.....23

2.5 การใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็นเฟสของแข็งในการวิเคราะห์ทางอิมมูโนแอสเสย์.....27

2.6 การใช้เม็ดแม่เหล็กขนาดเล็กเป็นเฟสของแข็งในการวิเคราะห์ทางอิมมูโนแอสเสย์.....29

2.7 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยปฏิกิริยาตกกลุ่ม (agglutination).....30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....34
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....34
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....37
3.2.1. การติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดส.....37
3.2.1.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสกับ rabbit anti-flagella serum โดยวิธีเพอริโอเดท (periodate method).....37
3.2.1.2 ศึกษาความสัมพันธ์ของอัตราส่วนเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสกับปริมาณแอนติบอดีใน antibody-enzyme conjugate.....37
3.2.2 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช.....39
3.2.2.1 การทดสอบใช้ rabbit anti-whole cell serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลท และใช้ เชื้อ*Salmonella typhimurium* ATCC14028 เป็นแอนติเจน.....39
3.2.2.2 การทดสอบใช้ rabbit anti-*Salmonella* flagella serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทและใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน.....40
3.2.3 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยเทคนิค Dot-ELISA.....40
3.2.4 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex agglutination) 41
3.2.4.1 การเตรียมเม็ดเลเทกซ์ (latex particle) สำหรับในปฏิกิริยาการตกกลุ่ม....41
3.2.4.2 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.....42
3.2.5 การศึกษา cross-reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ล - แอนติบอดีแซนวิช เทคนิค Dot-ELISA และปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

agglutination)....42
3.2.6 การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารโดยตรงเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method) 43
3.2.6.1การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่าง....43
3.2.6.2การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ....46
3.2.6.3การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* โดยตรงในตัวอย่างอาหาร....46
3.2.6.4การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากตัวอย่างเนื้อหมูและเนื้อไก่....48
3.2.7 เสถียรภาพของวัสดุและสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* เมื่อเก็บไว้นาน 6 เดือน....49

บทที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูล....50
4.1 การศึกษาหาความสัมพันธ์ของอัตราส่วนเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสกับปริมาณ IgG ของ rabbit anti-flagella serum....50
4.1.1 การหาอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ - ออกซิเดสกับปริมาณ IgG ของ rabbit anti-flagella serum....49
4.1.2 การวัดประสิทธิภาพของ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้น....51
4.1.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นโดยวิธี direct-ELISA....54
4.2 ผลการใช้ antibody-enzyme conjugate ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช....57
4.2.1 การทดสอบใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทและใช้ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน....57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

4.2.2 การทดสอบใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum เคลือบไมโคร-ไตเตอร์เพลทและใช้ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน.....57

4.3 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยเทคนิค Dot-ELISA.....70

4.4 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination).....74

4.5 การศึกษา cross-reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ล-แอนติบอดีแซนวิช Dot-ELISA และ ปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination).....75

4.6 การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารโดยตรงเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method).....79

4.6.1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่าง.....79

4.6.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อตามธรรมชาติ.....79

4.6.3 ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* โดยตรงในตัวอย่างอาหาร.....83

4.6.4 ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร.....90

4.7เสถียรภาพอายุการเก็บรักษาของวัสดุและสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* 92

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....93

บรรณานุกรม.....97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

ภาคผนวก.....102
ภาคผนวก ก สารละลายที่ใช้เตรียม antibody-enzyme conjugate.....103
ภาคผนวก ข สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA.....105
ภาคผนวก ค สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี Dot-ELISA.....106
ภาคผนวก ง การทำแอนติซีรัมให้บริสุทธิ์.....107
ภาคผนวก จ สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี culture method.....110
ประวัติผู้เขียน.....114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 จำนวนของเชื้อ *Salmonella* ที่ตรวจพบในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2532 - 2539.....5

2.2 การระบาดที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* และแบคทีเรียสกุลอื่น ๆ 7

2.3 ชนิดของเอนไซม์และสับสเตรทที่นิยมใช้ในงาน ELISA.....20

2.4 แสดงคุณสมบัติของ HRP - sheep antibody conjugate จากการเตรียมโดยวิธีเพอริโอเดท ในอัตราส่วนของน้ำหนักเอนไซม์-โปรตีนในสองอัตราส่วน.....22

4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้น.....51

4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรกับเวลาในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของ antibody - enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นกับ OPD substrate.....52

4.3 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของวิธี direct ELISA.....55

4.4 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell serum ความเข้มข้นโปรตีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....58

4.5 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell serum ความเข้มข้นโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....60

4.6 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิชเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell serum ความเข้มข้นโปรตีน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....62

4.7 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิชเมื่อใช้ IgG ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

rabbit anti-flagella serum ความเข้มข้นโปรตีน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....64
4.8 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum ความเข้มข้นโปรตีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....66
4.9 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิชเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum ความเข้มข้นโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....68
4.10 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรโดยอาศัยเทคนิค Dot-ELISA.....71
4.11 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรโดยอาศัยเทคนิค Dot-ELISA.....72
4.12 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรโดยอาศัยเทคนิค Dot-ELISA.....73
4.13 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination).....74
4.14 ผลการศึกษา cross-reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช.....76
4.15 ผลการศึกษา cross-reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิค Dot-ELISA.....77
4.16 ผลการศึกษา cross-reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยอาศัย ปฏิกิริยาตกกลุ่ม (latex - agglutination).....78
4.17 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่าง.....81
4.18 การตรวจวิเคราะห์โดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่างที่มี การปนเปื้อนของเชื้อตามธรรมชาติ.....82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.19 ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร
โดยวิธี ELISA Dot-ELISA ปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์และวิธี
การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....84
4.20 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง
อาหารจำนวน 68 ตัวอย่างโดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช
และวิธี culture method.....87
4.21 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง
อาหารจำนวน 68 ตัวอย่าง โดยวิธี Dot-ELISA และวิธี culture method.....88
4.22 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง
อาหารจำนวน 68 ตัวอย่าง โดยอาศัยปฏิกิริยาตกกลุ่ม
และวิธี culture method.....89
4.23 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากเนื้อหมู.....90
4.24 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากเนื้อไก่.....91
4.25 เสถียรภาพและอายุในการเก็บรักษาของวัสดุและสารละลาย
ที่เตรียมขึ้นสำหรับตรวจหาเชื้อ *Salmonella* เป็นระยะเวลา 6 เดือน.....92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างผนังเซลล์ *Salmonella* 8

2.2 แอนติเจนที่ผิวเซลล์ของเชื้อ *Salmonella*.....10

2.3 การติดฉลากเอนไซม์กับแอนติบอดีโดยวิธีเพอริโอเดท.....13

2.4 การเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีโดยวิธี one-step glutaraldehyde.....14

2.5 การเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีด้วยวิธี two-step glutaraldehyde.....15

2.6 แบบจำลองการเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีแบบต่าง ๆ 17

2.7 แบบจำลองการเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีด้วยวิธีแบบอ้อมโดยใช้ Protein A เป็นสารตัวกลาง.....18

2.8 แบบจำลองการจับกันระหว่างอนุภาคเลเทกซ์ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีกับแอนติเจนในสิ่งตรวจที่มีการตกกลุ่มในลักษณะร่างแห.....32

3.1 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร 47

4.1 ผลการวัดประสิทธิภาพของ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้น.....53

4.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นโดยวิธี direct-ELISA.....56

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรโดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช.....59

4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรโดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช.....61

4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรโดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช.....63

4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรโดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช.....65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่า
การดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรโดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช.....67
4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่า
การดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรโดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช.....69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

เชื้อ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารกับมนุษย์จำนวนมากโดยอาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่มักพบการปนเปื้อนได้แก่ ไข่ เนื้อหมู เนื้อวัว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ผัก ผลไม้ พริกไทย เนยแข็ง และช็อกโกแลต ในปัจจุบันมาตรฐานความปลอดภัยของอาหารต่อผู้บริโภคสูงมากขึ้น ดังนั้นผู้ควบคุมและผลิตอาหารควรจัดการให้มีการผลิตอย่างปลอดภัย ต้นทุนต่ำ และมีการขนส่งผลิตภัณฑ์ด้วยความรวดเร็ว การเฝ้าระวังและตรวจสอบอาหารเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดการติดเชื้อลง การตรวจสอบแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารโดยวิธีจุลชีววิทยา (culture method) เริ่มมีในช่วงประมาณ ค.ศ. 1980 วิธีการตรวจนี้ใช้แรงงานมากและใช้เวลาในการวิเคราะห์อย่างน้อย 4 วัน โดยอุตสาหกรรมอาหารจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของวัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์ ก่อนนำไปแปรรูปหรือจำหน่าย ซึ่งต้องการผลการตรวจสอบที่รวดเร็วและแม่นยำ ดังนั้นจึงนำเทคโนโลยีทางชีวภาพด้านอิมมูโนแอสเสย์เข้ามาใช้เป็นส่วนหนึ่งในตรวจวิเคราะห์หาแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจ ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ลง

หลักการทางอิมมูโนแอสเสย์อาศัยความสัมพันธ์ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยแอนติเจนคือโมเลกุลที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิต้านทาน และแอนติบอดีคือกลุ่มของโปรตีนที่เกิดขึ้นมาจากการตอบสนองของร่างกายทาง humoral immunity และผลิตโดยเซลล์ B-lymphocytes ในแอนติซีรัมพบอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG มากที่สุด มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับอักษรวาย (Y) ในภาษาอังกฤษ โดยแอนติเจนสามารถจับกับส่วนปลายแขนทั้งสองข้างอย่างจำเพาะ การทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีใช้เป็นหลักการหนึ่งที่นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella*

การตรวจวิเคราะห์ทางอิมมูโนแอสเสย์ โดยอาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี สมัยแรกทำการตรวจในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และพบว่ามีบางวิธีสามารถนำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประยุกต์ตรวจหาแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางอาหาร ซึ่งได้รับความสนใจจากหลาย ๆ หน่วยงานทั้งในและต่างประเทศ ปัจจุบันมีชุดตรวจวิเคราะห์ที่อาศัยความจำเพาะของแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* อยู่หลายวิธี

ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการพัฒนาและศึกษาเปรียบเทียบเทคนิค ELISA (enzyme - linked immunosorbent assay) Dot-ELISA และปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex - agglutination) เนื่องจากเทคนิค ELISA เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้คราวละมาก ๆ สำหรับ Dot-ELISA เป็นเทคนิคที่พัฒนาบางส่วนมาจาก ELISA แต่ใช้อุปกรณ์น้อยกว่า และใช้แอนติบอดีจำนวนน้อย เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก มีจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ไม่มากนักให้ผลการทดสอบภายในระยะเวลา 2 - 3 ชั่วโมง ซึ่งทั้งสองวิธีจำเป็นต้องใช้ antibody-enzyme conjugate เป็นส่วนสำคัญในการวิเคราะห์ ปฏิกิริยาตกกลุ่มเป็นวิธีที่อาศัยการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีที่เคลือบบนอนุภาคเม็ดเลเทกซ์ กับแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* ในสารละลาย สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงด้วยตาเปล่า เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูงวิธีหนึ่ง ใช้เวลาตรวจสอบภายใน 1 - 2 นาที การพัฒนาเทคนิคทั้งสามวิธีดังกล่าวขึ้นเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ให้มีความไว และความจำเพาะสูงสามารถใช้ภายในห้องปฏิบัติการ เป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ลง นอกจากนี้สามารถนำหลักการพื้นฐานไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบแบคทีเรียสายเชื้ออื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารได้ต่อไป

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อเตรียมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสสำหรับใช้ในวิธี ELISA และ Dot-ELISA
2. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหาร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช Dot-ELISA และปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex - agglutination)
3. เปรียบเทียบผลการตรวจสอบหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหาร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช Dot-ELISA และ ปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex - agglutination) กับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถเตรียม antibody-enzyme conjugate ขึ้นใช้เอง และนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านอิมมูโนแอสเสย์อื่น ๆ
2. สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารส่งออกและตัวอย่างที่สงสัยว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว
3. พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพเพื่อเป็นแนวทางในการตรวจหาแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารชนิดอื่นต่อไป

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

การพัฒนาและการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช Dot-ELISA และปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ โดยนำโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแฟลกเจลลาและ whole-cell ของเชื้อ *Salmonella* มาใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของการศึกษา ทำการเชื่อมโยง IgGของ rabbit anti-flagella *Salmonella* serum กับเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดส และนำส่วนดังกล่าวมาใช้ในเทคนิค ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช และ Dot-ELISA ตามลำดับ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช Dot-ELISA และทำการเตรียมเม็ดเลเทกซ์เคลือบด้วยแอนติบอดีเพื่อนำมาใช้เป็นชุดตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยอาศัยปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ นำเทคนิคที่เหมาะสมไปใช้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารส่งออก และตัวอย่างอาหารจากตลาดสดเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในด้านความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และตรวจดูเสถียรภาพในอายุการเก็บรักษาของชุดตรวจ *Salmonella* ที่เตรียมขึ้น

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ตรวจเอกสาร เตรียมอุปกรณ์ สารเคมี และแอนติซีรัม เพื่อใช้ในงานวิจัย
2. ทำการติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดส
3. ตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยเทคนิค Dot-ELISA
5. ตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์
6. ศึกษา cross - reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เทคนิค Dot-ELISA ปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ และตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารโดยตรงเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)
7. สรุปผลวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่เหมาะสมและจัดทำรายงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

ภายในระยะเวลา 10 ปีที่แล้วพบว่า *Salmonella* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงกับมนุษย์เป็นจำนวนมาก จากการวิจัยประชากรทั้งหมด 1.5 ล้านคนพบว่าค่าเฉลี่ยการ ติดเชื้อ *Salmonella* มีประมาณ 17.4 - 187.0 คน จากทุก ๆ 100,000 คน *Salmonella* ชนิด non-human strain ที่พบเป็นจำนวนมากระหว่างปี ค.ศ.1934 -1975 ซึ่งแยกจากแหล่งต่าง ๆ ใน 109 ประเทศ ได้แก่ *S. typhimurium, S. enteritidis, S. infantis , S. heidelberg, S. newport,* และ *S.dubin* (Kelterborn, 1979) *Salmonella* เป็นเชื้อกลุ่มที่พบมากที่สุดในจำนวนแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้ (ตารางที่ 2.1) และมักพบการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารพร้อมปรุง

ตารางที่ 2.1 จำนวนของเชื้อ *Salmonella* ที่ตรวจพบในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2532 - 2539

ปี พ.ศ.	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ	เปอร์เซ็นต์ *
2532	6424	60.25
2533	6101	63.08
2534	5110	63.05
2535	5569	69.96
2536	5992	73.43
2537	8771	78.78
2538	9514	87.76
2539	5682	88.89

* จำนวนเปอร์เซ็นต์คำนวณจาก แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้ทั้งหมดที่ตรวจพบ

ที่มา: WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center (1989 -1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบจำพวกเนื้อสัตว์ อาหารสัตว์ อาหารทะเลแช่แข็ง เนื้อไก่แช่แข็ง และน้ำ การเฝ้าระวังการปนเปื้อนในอาหารและการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ในการลดการระบาดของโรค โดยปกติมนุษย์ไม่มีเชื้อ *Salmonella* อยู่ในร่างกาย แหล่งที่อยู่ในธรรมชาติของแบคทีเรียพวกนี้ได้แก่ผู้ป่วยที่เป็นโรคหรือคนที่เป็นพาหะของโรค มีหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ต่าง ๆ การติดเชื้อเกิดจากการกินอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อปะปนเข้าไป คนที่มีอาการติดเชื้ออาจมีอาการหรือไม่มีอาการของโรคปรากฏ โรคที่เกิดจาก *Salmonella* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่หนึ่ง โรคไข้เอนเทอริค (Enteric fever) ซึ่งเป็นชื่อรวมที่ใช้บอกกลุ่มอาการของโรคโดยไม่บ่งว่าเกิดจาก *Salmonella* ชนิดใด ถ้าผู้ป่วยมีการติดเชื้อจาก *S. typhi* เรียกโรคที่เกิดว่าไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) หากเกิดการติดเชื้อจาก *S . paratyphi* เรียกโรคที่เกิดว่าไข้พาราไทฟอยด์ (paratyphiod fever) การก่อโรคของ *S.typhi* ขึ้นกับการที่เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ในเม็ดเลือดขาวและเพิ่มจำนวนมากขึ้นในเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย ปล่อยเชื้อออกมา endotoxin ของแบคทีเรียทำให้ร่างกายมีอาการไม่สบายต่าง ๆ แคปซูลของแบคทีเรียจะป้องกันตัวเชื้อจากการกินของเม็ดเลือดขาว ระยะฟักตัวของโรค 7-20 วัน ผู้ป่วยมีอาการไข้สูงอยู่หลายวัน ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามลำตัว เบื่ออาหาร มีอาการท้องอืด อุจจาระผูก มีม้ามโต ต่อมาอาจมีอาการอุจจาระร่วง ระยะของโรคไข้เอนเทอริกนาน 3-4 สัปดาห์ ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย ยาปฏิชีวนะที่ถูกต้อง อาการไข้จะลดลงสู่ระดับปกติ ใน 3-5 วัน ประมาณ 2-5 % ของผู้ป่วยที่หายจากโรคจะเป็นพาหะนำโรคนานหลายเดือน หรือเป็นปี โดยเชื้อจะเจริญอยู่ในถุงน้ำดี และถูกขับออกมาปนกับอุจจาระเป็นครั้งคราว กลุ่มที่สอง โลหิตเป็นพิษ เช่น เกิดจาก *S. choleraesuis* ผู้ป่วยมีอาการของโลหิตเป็นพิษ พบเชื้อในกระแสเลือด แต่ไม่มีอาการเกี่ยวกับลำไส้ เชื้อทำให้เกิดฝีที่อวัยวะต่าง ๆ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ กระดูกอักเสบ ปอดอักเสบ และเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ กลุ่มสุดท้ายเป็นเชื้อ*Salmonella* ที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง โดยเชื้อมักเป็นปรสิตของสัตว์พวกวัว ควายและไก่ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น *S. typhimurium* เชื้ออาจปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์ที่นำมาประกอบอาหารแล้วปรุงไม่สุกดี ไม่เพียงพอที่ทำให้เชื้อตายหมด หรือแมลงวันอาจเป็นพาหะนำเชื้อโรคมาปนเปื้อนอาหารที่ปรุงเสร็จ เมื่อทิ้งไว้เชื้อจะเจริญเติบโตมากขึ้นและเมื่อนำอาหารนั้นมาบริโภคจะทำให้เกิดอาการของโรคในคนที่กินเข้าไป ระยะฟักตัวของโรคนาน 8-48 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย ปวดท้อง อาเจียน ความรุนแรงของโรคขึ้นกับจำนวนเชื้อที่เข้าสู่ร่างกาย และความต้านทานของผู้ป่วย (นรีกุล และคณะ, 2530)

จากการศึกษาในสภาพแวดล้อมธรรมชาติพบว่ามีเชื้อ *Salmonella* ปะปนอยู่ในหลาย ๆ พื้นที่ของอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ตารางที่ 2.2 แสดงถึงการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* และแบคทีเรียสกุลอื่น ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 การระบาดที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* และ แบคทีเรียสกุลอื่น ๆ

ประเทศ	ปี	ค่าเฉลี่ยในแต่ละปีของการระบาดที่ตรวจพบ					
		Salmonella spp.	*Staphylococcus aureus*	*Clostridium perfringens*	*Bacillus* spp.	*Campylo-bacter* spp.	*E. coli*
แคนาดา	1985-1986	50.5	20.5	16	14.5	9.5	5
อังกฤษ	1986-1988	438.3	10	53	19.3	12	0.7
ฝรั่งเศส	1991	477	48	25	1	0	0
เนเธอร์-แลนด์	1981-1982	15.5	14	14	16	12	0
สเปน	1985	213	25	7	2	1	0
สหรัฐ-อเมริกา	1983-1987	68.4	9.4	4.8	3.2	5.6	1.4

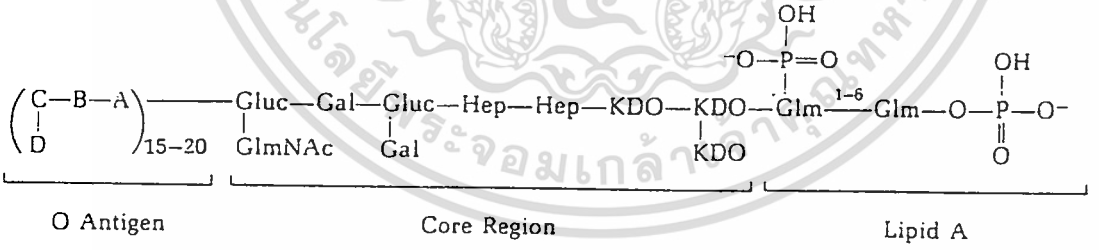
ที่มา : D'Aoust (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 *Salmonella*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในตระกูล (family) Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นแท่ง และมีแฟลกเจลลารอบตัวเซลล์ (peritrichous flagella) ผนังเซลล์ประกอบด้วยลิโพพอลีแซ็กคาไรด์ชนิดที่เป็น endotoxinโดยโครงสร้างของลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียแกรมลบ จะมีความแตกต่างระหว่างสกุลน้อยมาก แต่สำหรับแบคทีเรียทุกสกุลประกอบด้วย 3 ส่วนดังแสดงในภาพที่ 2.1 โดยที่ hydroxyl group อิสระของ glucosamine ใน lipid A ทุกตัวเชื่อมต่อกับกรดไขมันต่างชนิด และความแตกต่างทางด้านซีรัมวิทยาสายเชื้อต่าง ๆ ในแบคทีเรียแต่ละสกุล ขึ้นกับชนิดของน้ำตาลที่เชื่อมต่อกับส่วนของ O-antigen เชื้อ *Salmonella* บางชนิดมีแคปซูล ทำให้มีชีวิตอยู่ได้นานในอาหารแห้ง สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ โดยลักษณะการเจริญของเชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นดังนี้ ขนาดของโคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร หลังจากการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง บนอาหาร nutrient agar จะมีสีขาวออกเทาเป็นวงกลมโค้งนูน ขอบเรียบ จัดเป็นพวก aerobe และ facultative anaerobe สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เจริญได้ง่ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาทั่ว ๆ ไป ลักษณะการเจริญบนอาหาร MacConkey agar และ deoxycholate agar คล้ายกับการเจริญบน nutrient agar และมีสีซีด เนื่องจากไม่หมักน้ำตาลแล็กโทส

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างผนังเซลล์ *Salmonella*



Glm	-	Glucosamine
KDO	-	Ketodeoxyoctonic acid
Hep	-	Heptose
Gluc	-	Glucose
Gal	-	Galactose
GlmNAc	-	N-acetyl glucosamine
A,B,C,D	-	Monosaccharides

ที่มา : Volk (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 คุณสมบัติทางเคมีที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของแอนติเจน *Salmonella*

ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยเทคนิคอิมมูโนแอสเสย์ คุณสมบัติของแอนติเจนที่สำคัญมีดังนี้คือ เป็นแอนติเจนที่พบในทุกซีโรไทป์ มีความเพียงพอในการกระตุ้นให้สร้างแอนติซีรัมที่มีไตเตอร์สูง สามารถแยกออกจากเชื้อจุลินทรีย์และทำให้บริสุทธิ์ได้ และสามารถทำการติดฉลากกับเอนไซม์โดยไม่ทำให้เอนไซม์เสียคุณสมบัติไป

ปัจจุบันไม่พบชนิดของแอนติเจนที่มีคุณสมบัติตาม 2 ข้อแรก แต่แอนติเจนจะมีหลายแอนติเจนิกดีเทอมิแนนท์ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* แอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นโดยแอนติเจนที่มีความเหมาะสม สามารถนำมาใช้ในระบบอิมมูโนแอสเสย์ เพื่อวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในการตรวจวิเคราะห์อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกันกับเชื้อ *Salmonella* ซีโรไทป์อื่น หรือจุลินทรีย์บางชนิด สาเหตุหนึ่งมาจากแอนติบอดีที่เตรียมขึ้นทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่มีโครงสร้างคล้ายกับแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* ดังนั้นการศึกษาและคัดเลือกชนิดของแอนติเจน เช่น แอนติเจน K พิไล โซมาติก แฟลกเจลลาแอนติเจน ที่มีความเหมาะสมเป็นสิ่งจำเป็น (Ibrahim, 1986)

แอนติเจน K

แอนติเจน K พบอยู่ในส่วนแคปซูล (ดังแสดงในภาพที่ 2.2) มีสัญลักษณ์ เช่น A , B , L, Vi และอื่น ๆ พบว่าแอนติเจนของเมมเบรนชั้นนอก(outer membrane antigen)ในแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ที่แตกต่างกันอย่างน้อย 20 ชนิด และจากการศึกษาด้านอิเล็กโทรโฟลิซิสพบว่าโครงสร้างของแอนติเจนมีความซับซ้อน จำนวนโปรตีนของแคปซูลในแบคทีเรียแกรมลบมีประมาณ 150 ชนิด

การศึกษาปฏิกิริยาข้ามกันของแอนติเจนชนิดนี้ ได้รับความสนใจจากหลาย ๆ หน่วยงาน และแอนติเจนถูกใช้เป็น immunogenic agent เพื่อนำไปชักนำให้เกิดภูมิต้านทานป้องกันโรคติดเชื้อทุก ๆ สายเชื้อของจุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ยกเว้นสายเชื้อที่มีการกลาย พบว่ามีอย่างน้อยหนึ่ง antigenic component ที่พบร่วมกันและเรียกว่า enterobacterial common antigen แอนติเจนนี้ไม่พบในจุลินทรีย์แกรมลบอื่น ๆ หรือในกลุ่มจุลินทรีย์แกรมบวก (Makela และ Mayer, 1976)

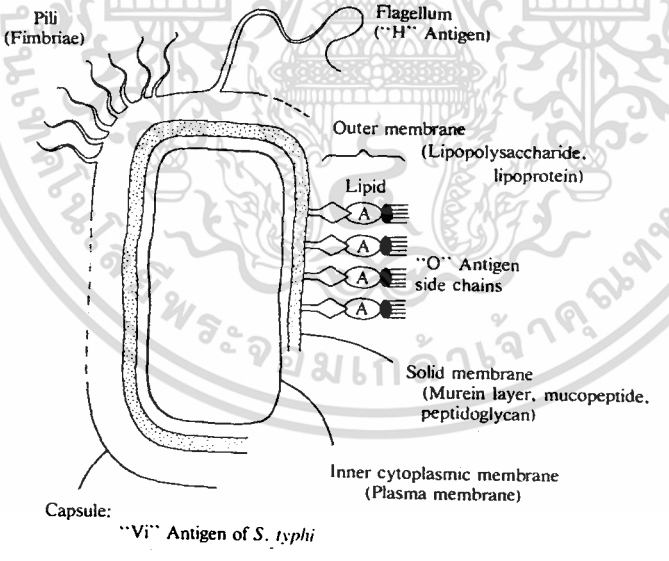
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอนติเจนพิไล (Pili antigen)

พิไล (pili) อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าฟิมบลี (fimbriae) เป็นระยางค์ที่มีลักษณะคล้ายขน มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6 นาโนเมตร พบอยู่ที่ผิวด้านนอกของเซลล์ *Salmonella* ประกอบด้วยโปรตีน subunit (pilin) ไม่ทนความร้อน ในเชื้อ *Salmonella typhimurium* พิไลมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21,000 (Korhonen and others, 1980)

ในปี ค.ศ. 1966 Duguid และคณะ รายงานว่า พิไลเป็นสื่อทำให้เชื้อ *Salmonella typhimurium* เกาะอยู่ที่ผนังลำไส้มนุษย์และเชื้อ *Salmonella* สายเชื้อที่ผลิตพิไลจะมีการสร้างพิไลในสภาวะที่มีออกซิเจนภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง ดังนั้นการบ่มในระยะเวลาสั้นคือประมาณ 6 ชั่วโมง ทำให้เชื้อขาดคุณสมบัติแอนติเจนของพิไลไป และพบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อพิไลของเชื้อ *Salmonella* กับ *Citrobacter* ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีส่วนแอนติเจนิกดีเทอมิแนนท์ที่คล้ายคลึงกันระหว่างพิไลของจุลินทรีย์สองชนิด

ภาพที่ 2.2 แอนติเจนที่ผิวเซลล์ของเชื้อ *Salmonella*



ที่มา : Young and others (1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอนติเจน O

เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ อยู่ที่ผนังเซลล์ มีคุณสมบัติทนความร้อน (100 องศาเซลเซียส นาน 2.5 ชั่วโมง) แอลกอฮอล์และกรดอ่อน ๆ มีประมาณ 65 ชนิด ให้ชื่อเรียงตามลำดับเลขอารบิกจาก 1 2 3 4..... ไปเรื่อย ๆ *Salmonella* ซีโรไทป์หนึ่งอาจมีแอนติเจน O มากกว่า 1 ชนิด แอนติบอดีต่อแอนติเจน O เป็นชนิด IgM พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกันระหว่าง แอนติเจน O ของเชื้อ *Salmonella* กับ *Citrobacter* และ *Escherichia* (Orskor and others, 1977)

แฟลกเจลลาแอนติเจน (แอนติเจน H)

เป็นระยางค์ที่มีลักษณะคล้ายเส้นผม โค้งไปมา ยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ และช่วยให้แบคทีเรียเคลื่อนที่ผ่านของเหลวได้อย่างรวดเร็ว มีความยาวจากผนังเซลล์ประมาณ 22 ไมโครเมตร ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ basal body , ฮุค (hook) และ ฟิลาเมนท์ (filament) โดยส่วน basal body มีน้ำหนักเพียง 1% ของออร์แกนทั้งหมด เป็นส่วนที่มีโครงสร้างซับซ้อน ในแบคทีเรียแกรมลบส่วนนี้ประกอบด้วยวงแหวน 2 คู่ วงแหวนด้านนอกจะยึดติดกับผนังเซลล์ ในขณะที่วงแหวนด้านในยึดติดกับ cytoplasmic membrane ในส่วน basal body ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์หลายโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 9,000-60,000

ฮุค (hook) พบประมาณ 1% ของโปรตีนทั้งหมดในแฟลกเจลลา พบบริเวณฐานของแฟลกเจลลา ประกอบด้วย subunit พอลิเพปไทด์ 1 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุล 42,000 ในเชื้อ *Salmonella* ส่วนนี้จะทนสารเคมี พีเอชต่ำ ๆ ความเข้มข้นของยูเรียสูง ๆ และสารอินทรีย์ คุณสมบัตินี้ทำให้สามารถแยกฮุคออกจากฟิลาเมนท์ และพบว่าแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อฮุคจะไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับส่วนที่เป็นฟิลาเมนท์ของแฟลกเจลลา

ฟิลาเมนท์ (H-antigen) ในส่วนนี้ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของโปรตีนชนิดเดียว คือ แฟลกเจลลิน (flagellin) น้ำหนักโมเลกุลของฟิลาเมนท์ในเชื้อ *Salmonella* มีประมาณ 48,000-58,000 ซึ่งศึกษาโดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ฟิลาเมนท์สามารถเกิดปฏิกิริยาดีพอลีเมอไรด์ (depolymerize) ในสารเคมีหลายชนิด เช่น กรด ด่าง ฟีนอล ความร้อน และ สารประกอบยูเรีย ซึ่งสภาวะนี้ทำให้มีการแตกตัวของพันธะไฮโดรเจน และ subunit ที่เกิดจากการแตกตัวของฟิลาเมนท์สามารถเกิดการรวมตัวเป็นฟิลาเมนท์ในหลอดทดลองได้ จากการทดลองของ Abram และ Koffler ในปี ค.ศ. 1964 และ Asakura และคณะในปี ค.ศ. 1966 พบว่า ความยาวของฟิลาเมนท์ที่ก่อตัวขึ้นใหม่ ขึ้นกับความเข้มข้นของโปรตีนแฟลกเจลลิน พีเอช ความเข้มข้นของเกลือ และอุณหภูมิ ฟิลาเมนท์ที่รวมด้วยกันใหม่มีลักษณะเป็นเส้นตรงยาว โดยมีความแตกต่างจากฟิลาเมนท์เดิมดังนี้ คือ เป็นเส้นตรง ผอมบาง ทนอุณหภูมิสูง (ต้มในน้ำเดือด 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที) ทนกรดและด่างที่ความเข้มข้น 0.1 M และมีลักษณะคล้ายกับพิไล โดยฟิลาเมนท์ที่เกิดขึ้นใหม่มีชื่อว่า P-filament

2.3 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยใช้เทคนิคเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารโดยอาศัยความจำเพาะของแอนติบอดีมาช่วยในการวิเคราะห์และการใช้เทคนิค direct fluorescent antibodies ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากอาหารซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ววิธีหนึ่งและเป็นที่ยอมรับในการวิเคราะห์ผลแบบเบื้องต้น (presumptive identification) แต่เทคนิคนี้มีข้อเสียคือใช้ได้ในงานที่แคบและต้องใช้กล้องฟลูออเรสเซนท์ซึ่งมีราคาแพง ในปี ค.ศ.1974 Nakane และ Kowai ใช้เอนไซม์มาช่วยในงานวิเคราะห์โดยการติดฉลากเอนไซม์กับแอนติบอดี และเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสได้รับการคัดเลือกมาใช้ในการเชื่อมกับแอนติบอดีที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ

การติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์

แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ มีวิธีการเตรียมอยู่ 2 วิธี คือวิธีทางตรง (direct method) และทางอ้อม (indirect method) ในวิธีทางตรงเป็นวิธีการเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีแบบ โควาเลนท์ (covalent) และในวิธีทางอ้อมใช้โมเลกุลตัวกลางเป็นตัวเชื่อมโยงแบบนอนโควาเลนท์ (non covalent) (Goers , 1993)

เนื่องจากเอนไซม์และแอนติบอดีต่างก็เป็นโปรตีน ด้วยเหตุนี้จึงมีส่วนประกอบที่คล้ายคลึงกัน และสามารถมีปฏิกิริยาทางเคมีกับสารที่นำมาใช้เชื่อมโยงดังกล่าวข้างต้นได้คล้ายกัน ดังนั้นจึงอาจจะมีการเชื่อมโยงระหว่างเอนไซม์กับเอนไซม์ หรือระหว่างแอนติบอดีกับแอนติบอดีเกิดขึ้นนอกเหนือจากการเกิดการเชื่อมโยงระหว่างเอนไซม์กับแอนติบอดีในขั้นตอนของการเตรียมคอนจูเกต

วิธีการทำคอนจูเกตที่ถือว่าเป็นวิธีการที่ดีที่สุด คือวิธีที่ไม่ลำบากยุ่งยาก ไม่มีผลเสียต่อการทำปฏิกิริยาของทั้งเอนไซม์และแอนติบอดี สามารถเชื่อมโยงเอนไซม์เข้ากับแอนติบอดีได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้การเชื่อมโยงระหว่างเอนไซม์กับเอนไซม์ หรือแอนติบอดีกับแอนติบอดีเกิดขึ้นได้น้อย ไม่ทำให้คอนจูเกตเกิดมี polymerization เป็นวิธีที่สามารถดัดแปลงได้ตามความเหมาะสมและทำให้ได้คอนจูเกตที่มีส่วนประกอบซึ่งมีลักษณะเหมือน ๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

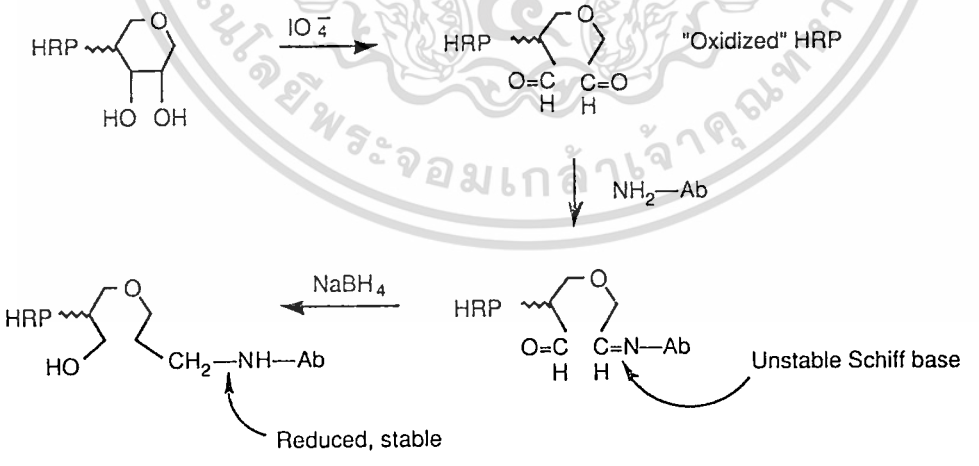
การเชื่อมโยงทางตรง

1. วิธีเพอริโอเดท เป็นวิธีที่ใช้กับเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสเป็นส่วนใหญ่ เอนไซม์นี้เป็นไกลโคโปรตีน ซึ่งมีส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ไม่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของเอนไซม์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในวิธีการติดฉลาก (ดังแสดงในภาพที่ 2.3)มีดังนี้

1. การ block เอนไซม์ตรงส่วนของหมู่อะมิโนโดยการให้ทำปฏิกิริยากับ fluorodinitrobenzene
2. การออกซิไดซ์ส่วนคาร์โบไฮเดรตของเอนไซม์ด้วยโซเดียมเพอริโอเดททำให้เกิดหมู่อัลดีไฮด์ขึ้น
3. ปฏิกิริยา ระหว่าง หมู่อัลดีไฮด์ และหมู่อะมิโนที่เป็นอิสระของแอนติบอดี
4. รีดิวซ์ด้วย sodium borohydride ($NaBH_4$) เพื่อทำให้การเชื่อมโยงที่เกิดขึ้นมีความคงตัว

การที่ทำการ block ส่วนหมู่อะมิโนของเอนไซม์ไว้เสียก่อนนั้นช่วยป้องกันมิให้เกิดการจับกันเองระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ (O'Sullivan และ Marks , 1981)

ภาพที่ 2.3 การติดฉลากเอนไซม์กับแอนติบอดี โดยวิธีเพอริโอเดท



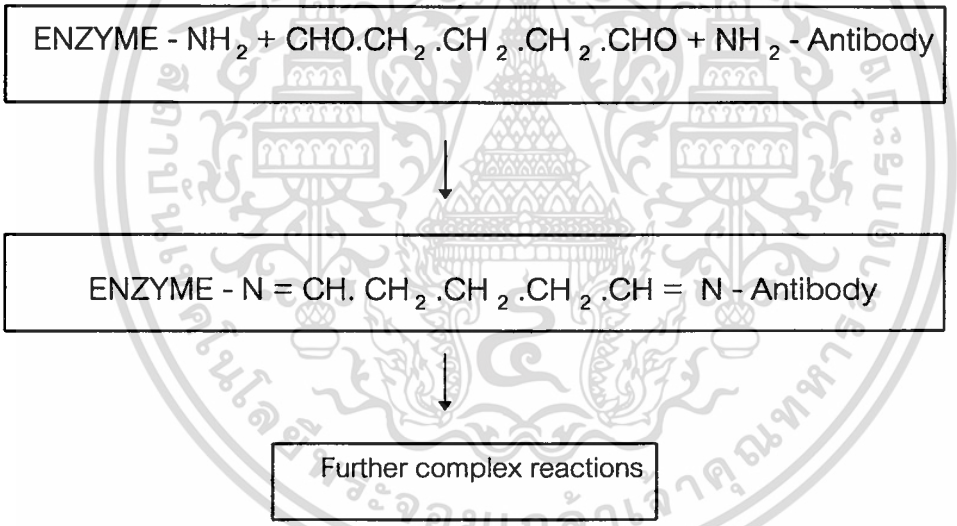
ที่มา : Goers (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การใช้กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เป็นตัวเชื่อม

การเชื่อมโยงโมเลกุลแอนติบอดีเข้ากับเอนไซม์โดยใช้สารกลูตารัลดีไฮด์ด้วยวิธี one - step glutaraldehyde ผู้ที่เริ่มใช้คือ Avrameas (1969) กลไกของปฏิกิริยาแสดงไว้ในภาพที่ 2.4 วิธีนี้ใช้กันมาก ไม่ต้องมีกรรมวิธีที่ยุ่งยาก ใช้ได้ผลในเทคนิคอิมมูโนแอสเสย์หลายระบบ เอนไซม์ที่นำมาติดฉลากแอนติบอดีโดยวิธีนี้ ที่ใช้มากคือ เอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดส และอัลคา-ไลด์ฟอสฟาเตส

ภาพที่ 2.4 การเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีโดยวิธี one - step glutaraldehyde

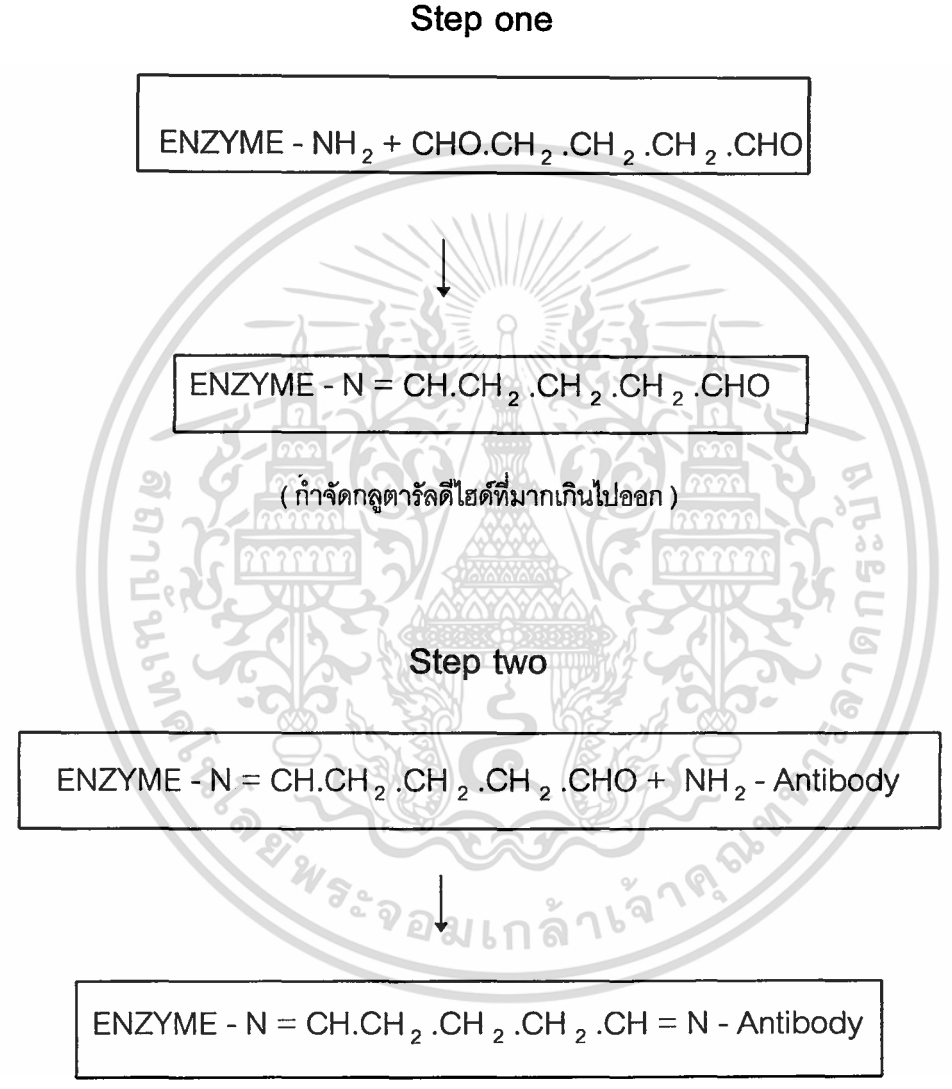


ที่มา : O' Sullivan (1981)

การใช้กลูตารัลดีไฮด์ ในการเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีอาจทำโดยวิธีที่เรียกว่า two - step glutaraldehyde โดยมีกลไกของปฏิกิริยาดังภาพที่ 2.5 ผลการศึกษาเมื่อใช้เอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดส พบว่าเอนไซม์ต่างรุ่นกันมีปฏิกิริยากับกูลตารัลดีไฮด์ต่างกัน คอนจูเกตที่เตรียมขึ้นโดยวิธีนี้ส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ในกรณีของเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสที่เชื่อมโยงกับ IgG พบว่า 1 โมเลกุลประกอบด้วยเอนไซม์ 1 โมเลกุล และแอนติบอดี 1 โมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.5 การเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีด้วยวิธี two - step glutaraldehyde



ที่มา : O' Sullivan (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีโดยวิธีทางตรงมีข้อดีคือ ทำให้แบลคกราวน์ที่เกิดขึ้นต่ำ เนื่องจาก เอนไซม์ที่ใช้ในการติดฉลากทำการเชื่อมติดกับแอนติบอดีที่จำเพาะโดยตรง และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้อยกว่า แต่แอนติบอดีที่นำมาเชื่อมโยงทั้งโมโนโคลนัลแอนติบอดี และโพลี-โคลนัลแอนติบอดี ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่นำมาเชื่อมโยง

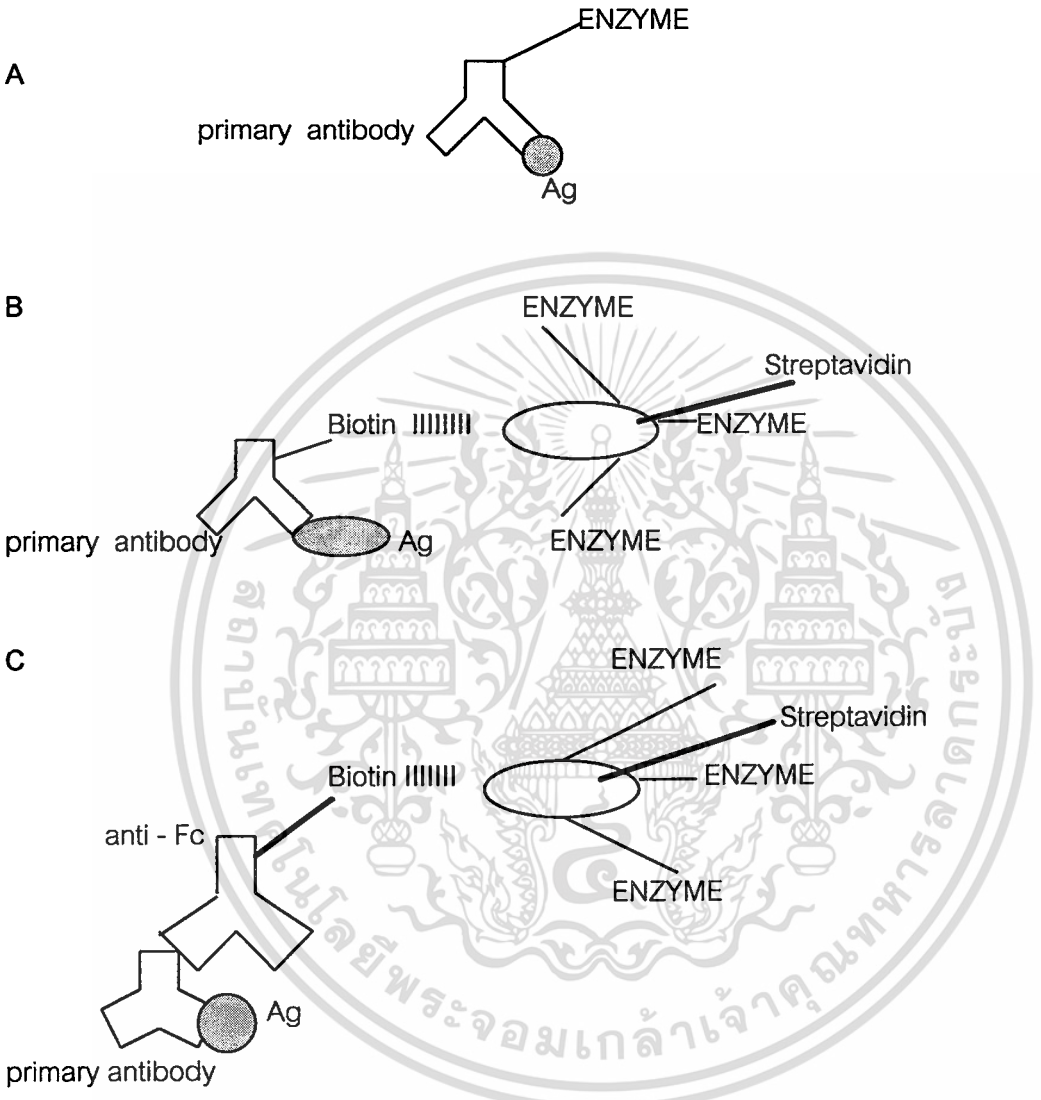
การเชื่อมโยงทางอ้อม

1. การใช้ Biotin - Streptavidin (Goers , 1993)

วิธีทางอ้อมไม่ทำการเชื่อมเอนไซม์กับแอนติบอดีโดยตรง แต่ให้เอนไซม์เชื่อมติดกับโมเลกุลตัวกลางแล้วให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในขั้นตอนต่อไป วิธีทางอ้อมให้ผลเด่นชัดกว่าวิธีทางตรง เพราะหลาย ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับตัวกลางสามารถเกาะกับแอนติบอดี 1 ตัว สารตัวกลางที่มีความนิยมคือ streptavidin เป็นโปรตีนที่เป็นผลิตผลของ *Streptomyces avidinii* และ biotin เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถดึงดูดโปรตีน streptavidin ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถนำเอนไซม์มาเชื่อมโยงกับ biotin หรือ streptavidin และนำคอนจูเกตนี้มาใช้ในเทคนิคเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ได้ ในเทคนิค biotin - labelled antibody ในขั้นตอนแรกแอนติบอดีจะถูกเชื่อมกับ biotin โดยอยู่ในรูปสารเชิงซ้อนและนำ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (ส่วนนี้ทำอยู่ในรูปแบบสำเร็จรูปทางการค้า) ให้ทำปฏิกิริยากับสารเชิงซ้อนของแอนติบอดีกับ biotin เกิดโครงสร้างดังภาพที่ 2.6 B ทางเลือกหนึ่งสามารถใช้ตัวกลางคือ biotin - labelled anti - Fc (ส่วนนี้ทำอยู่ในรูปแบบสำเร็จรูปทางการค้า) ซึ่งเป็นการหลีกเลี่ยงการเชื่อม primary antibody กับ biotin ซึ่ง biotin - labelled anti - Fc มีความจำเพาะกับส่วนของ Fc region บนโมเลกุลของ primary antibody และสามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับ streptavidin ดังภาพที่ 2.6 C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.6 แบบจำลองการเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีแบบต่าง ๆ



รูป A เป็นการเชื่อมโยงโดยวิธีโดยตรง

รูป B การเชื่อมโยงโดยวิธีทางอ้อมใช้ biotin-streptavidin

รูป C การเชื่อมโยงโดยวิธีอ้อมใช้ biotin-anti- Fc intermediate

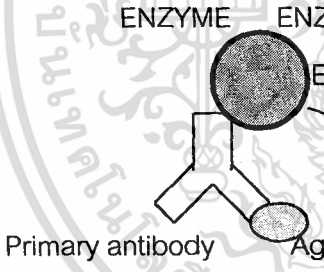
ที่มา : Goers (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.Protein A

คอนจูเกตอาจเตรียมแบบทางอ้อมโดยใช้ protein A โดยเป็นโปรตีนที่พบจากเชื้อ *Streptococcus* โปรตีนนี้สามารถเชื่อมกับเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส สามารถใช้คอนจูเกตชนิดนี้ในเทคนิคเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับตรวจหาแอนติเจนได้เนื่องจาก protein A สามารถจับกับส่วน Fc region ของ IgG ได้ (ดังภาพที่ 2.7) แต่อย่างไรก็ตามเฉพาะอิมมูโนโกลบูลินของคน หรือสัตว์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถจับกับ protein A ได้

ภาพที่ 2.7 แบบจำลองการเชื่อมโยงเอนไซม์กับแอนติบอดีด้วยวิธีแบบอ้อมโดยใช้ Protein A เป็นสารตัวกลาง



ที่มา : Goers (1993)

การใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์มาช่วยในการวิเคราะห์ ให้ผลการทดสอบเป็นที่น่าพอใจ มีความไวของการตรวจวัด ดังนั้นเทคนิคนี้จึงได้รับความยอมรับ และความนิยม antibody - enzyme conjugate ที่ใช้มีอยู่หลายชนิด ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของปฏิกิริยาและลักษณะงานที่นำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลือก antibody - enzyme conjugate และสับสเตรทในการวิเคราะห์แบบ ELISA
(Catty , 1990)

1.ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (HRP conjugate)

ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสใช้ chromogenic substrate เป็นสารที่เปลี่ยนสีเมื่อถูกออกซิไดส์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งกระบวนการออกซิเดชันเกิดหลังจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดส ในรูปแบบการวิเคราะห์แบบ colorimetric assay โดยส่วนใหญ่ใช้ chromogenic substrate ดังต่อไปนี้ O - Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) , 2,2' - Azino - di(3 - ethyl) benzthiazoline sulphonic acid (ABTS) , Tetramethylbenzidine (TMB) , 5-Aminosalicylic acid (ASA) (ดังตารางที่ 2.3) เป็นต้น และพบว่า ABTS และ OPD มีความไวสูงโดยเฉพาะ OPD เป็นสารที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ELISA นอกจากนี้พบว่า TMB มีความเหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการที่ใช้งานด้านอิมมูโนแอสเสย์เป็นประจำ เพราะเป็นสารที่ไม่ก่อมะเร็งและไม่เป็นสารที่กระตุ้นการกลาย และเกิดสีน้ำเงินภายหลังปฏิกิริยายุติ มีความไวสูง และสามารถกำหนดจุดยุติได้ดีกว่า OPD

2.อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต (Alkaline phosphatase conjugate)

อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต มีความคงตัวสูงในการเก็บรักษา และมีความต้านทานการเจริญของแบคทีเรีย มีการใช้เอนไซม์ชนิดนี้อย่างแพร่หลายโดยอาจอยู่ในรูปทางการค้าและสับสเตรทที่นิยมใช้เช่น *N*- *p* - nitrophenyl alkaline phosphate (PNPP)

3.เบต้า-ดี-กาแล็กโตซีเดส (β - D - galactosidase conjugate)

เอนไซม์เบต้า-ดี-กาแล็กโตซีเดส ใช้ เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ของเบต้า-ดี-กาแล็กโทสไปเป็นกาแล็กโทสกับแอลกอฮอล์และสับสเตรทที่นิยมใช้กับเอนไซม์ชนิดนี้คือ *O*-Nitrophenyl-β-D-galactosidase (ONPG)เอนไซม์นี้มีความไวสูงมาก สามารถพัฒนาใช้กับสับสเตรทที่เป็นสารเรืองแสง ทำให้สามารถวัดปริมาณแอนติเจนที่มีขนาดใหญ่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ชนิดของเอนไซม์และสับสเตรทที่นิยมใช้ในงาน ELISA

เอนไซม์	soluble substrate	ค่าการดูดกลืนแสง (nm)	insoluble substrate
HRP	*O*-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)	492	Diaminobenzidine (DAB)
	Tetramethylbenzidine (TMB)	450	4-Chloro-1-napthol (CNP)
	2,2'-Azino-di(3-ethyl)benzthiazoline sulphonic acid (ABTS)	650และ405 หลังหยุดปฏิกิริยา	3-Amino-4-ethyl carbazole (AEC)
	5-Aminosalicylic acid (ASA)	450	
AP	*N-p*-nitrophenyl alkaline phosphate (PNPP)	402-412	Naphthol As-mx phosphate+ Fast BlueBB salt (NAPFB)
			Naphthol As-mx phosphate+ Red BB salt (NAPR)
			5-Bromo-4-chloro-3-idolyl phosphate (BCIP)
β-Galactosidase	*O*-Nitrophenyl-β-D-galactoside(ONPG)	420	
Urease	Bromocresol purple	588	
Penicillinase G (PG)	ไอโอดีนและแป้ง	จากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี	

ที่มา : Catty (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.ยูรีเอสคอนจูเกต (Urease conjugate)

การใช้เอนไซม์ชนิดนี้มีข้อได้เปรียบคือมีจุดยุติง่ายต่อการวิเคราะห์ สามารถกำจัดความไม่คงตัวของสับสเตรทอย่างใน HRP และ AP ไม่พบเอนไซม์ชนิดนี้ในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ก่อปัญหาใน HRP และ AP เอนไซม์ยูรีเอสสามารถเร่งกระบวนการไฮโดรไลซีสของยูเรียไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับแอมโมเนีย โดยการผลิตแอมโมเนียขึ้น สามารถตรวจโดยการเปลี่ยนแปลงพีเอช สับสเตรทที่นิยมใช้คือ Bromocresol purple (BP) มีการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองในสภาวะเป็นกรดไปเป็นสีม่วงเข้มเมื่อเกิดแอมโมเนียขึ้น ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงเด่นชัดและอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 588 นาโนเมตร

5. เพนนิซิลลิเนส คอนจูเกต (Penicillinase conjugate)

เอนไซม์คอนจูเกตชนิดนี้สามารถนำไปใช้วัดปริมาณฮอร์โมนและวัดปริมาณแอนติบอดีได้ เอนไซม์ชนิดนี้มีราคาถูกและสับสเตรทหาได้ง่าย มีรูปแบบการวิเคราะห์เป็นแบบ iodometric assay โดยเอนไซม์เพนนิซิลลิเนสจะย่อยเพนนิซิลินเป็นกรดเพนนิซิลโลอิก (penicilloic acid) และการตรวจเพียงสังเกตการเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นไม่มีสี สามารถพัฒนาการวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับการใช้ในไมโครไตเตอร์เพลทสำหรับเทคนิค ELISA

การตรวจสอบคุณสมบัติของ antibody-enzyme conjugate

ก่อนการเตรียมคอนจูเกตไปใช้งาน ควรทำการตรวจสอบส่วนประกอบ และคุณสมบัติ ซึ่งในการทดสอบสารเคมีต่าง ๆ ต้องอยู่ภายใต้สภาวะที่ควบคุม

คุณสมบัติของคอนจูเกตที่ดี (Catty , 1990)

1. มีแอนติบอดีไตเตอร์สูงแม้ใช้เพียงเล็กน้อย สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีและให้ผลกับ non-specific binding ต่ำ
2.เมื่อทำการเจือจางแล้วยังคงมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.มีคู่ของแอนติบอดีและเอนไซม์ที่เป็นโมโนเมอริกจำนวนมาก โดยถ้าคอนจูเกตเป็นแบบพอลิเมอริกสามารถเกาะกับพลาสติกได้ดี ส่งผลให้มีค่าแบลคกราวน์สูงขึ้น และไม่สามารถทำให้ลดลงได้แม้เพิ่มขั้นตอนการ blocking

4. มีความเหมาะสมระหว่างจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์กับแอนติบอดี โดยทั่ว ๆ ไปอัตราส่วนเฉลี่ยคือ 1 เอนไซม์ต่อ 1 แอนติบอดี ซึ่งส่งผลให้เกิดคอนจูเกตที่ดี

5. มีการเข้าคู่กันอย่างเหมาะสมทำให้เอนไซม์ยังคงมีประสิทธิภาพดีได้ โดยขึ้นกับสภาวะในการเกิดคอนจูเกต และระดับการเข้าคู่กัน ถ้ามากเกินไปหรือน้อยไปทำให้มีคุณสมบัติไม่ดี

โดยข้อ 1, 2 และ 3 สามารถทดสอบคอนจูเกตที่เตรียมขึ้นได้โดยเทคนิค ELISA แบบทางตรงซึ่งมีวิธีการทั่ว ๆ ไปคือการเคลือบแอนติเจนบนไมโครไตเตอร์เพลทและทำการไทเทรตทดสอบความจำเพาะของคอนจูเกตและดูแบลคกราวน์ที่เกิดขึ้น ส่วนข้อ 4 สามารถทดสอบโดยดูค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดของเอนไซม์ และแอนติบอดี ข้อ 5 สามารถทดสอบโดยตรงกับสับสเตรทโดยละลายคอนจูเกตโดยตรง

ตารางที่ 2.4 แสดงคุณสมบัติของ HRP-sheep antibody conjugate จากการเตรียมโดยวิธีเพอริโอเดท ในอัตราส่วนของน้ำหนักเอนไซม์-โปรตีนในสองอัตราส่วน

Specificity (sheep anti-)	Conjugation ratio HRP : IgG (mg)	OD ratio 408:208 nm	Dilution in ELISA giving OD = 1.0 *	Background OD (BSA-coated wells)
human IgG	4:10	0.14	1:4000	<0.1
	8:10	0.30	1:17000	<0.1
human IgA	4:10	0.17	1:1060	<0.1
	8:10	0.31	1:3650	<0.1
human IgM	4:10	0.09	1:285	<0.2
	8:10	0.22	1:925	<0.2

* ทำการปรับความเข้มข้นของคอนจูเกตเป็น 1 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ IgG แลใช้ OPD เป็นสับสเตรทสำหรับการวิเคราะห์ ELISA และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

ที่มา : Catty (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การใช้แอนติบอดีในการวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella*

แอนติบอดีสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงวิจัยทางการแพทย์ หรือใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร นอกจากนี้อาจใช้แอนติบอดีในการตรวจหาแหล่งที่อยู่ของแอนติเจนในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunocytochemistry ในระยะหลังได้มีการตรวจวัดปริมาณแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ ซึ่งสามารถใช้บอกปริมาณแอนติเจนได้ หลักการนี้เป็นพื้นฐานทำให้เกิดมีการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เช่น เทคนิคเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay , ELISA) เป็นวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดี กับแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวตรวจวัดแทนการใช้สารกัมมันตรังสี (radioisotope) หรือ สารเรืองแสง (fluorescence) วิธีนี้มีความไวสูง ง่ายและรวดเร็ว

มีการนำเทคนิค ELISA มาใช้ในการตรวจหาจำนวนแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร และตรวจสารพิษของแบคทีเรียเป็นเวลานานกว่าสิบปีแล้ว เช่น การตรวจหา *Salmonella* spp. , *Clostridium botulinum, Clostridium perfringens* type A toxin, staphylococcal enterotoxin เพราะเทคนิคนี้มีความไวในการวิเคราะห์มาก ใช้เวลาตรวจได้รวดเร็ว การใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในอาหาร สามารถตรวจหาเชื้อที่มีได้แม้มีเพียง 1 เซลล์ต่ออาหาร 25 กรัม (Andrew , 1985) แต่เดิมนั้นการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยใช้เทคนิค radioimmunoassay โดยเทคนิคนี้ใช้สารกัมมันตรังสีเป็นตัวติดตามแทนการใช้เอนไซม์ จึงเป็นวิธีที่อันตรายและมีปัญหาในเรื่องการกำจัดทิ้งภายหลังการใช้แล้ว ดังนั้นเทคนิคทางด้านเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์จึงถูกพัฒนาขึ้น

ในปี ค.ศ.1977 Krysinski และ Heimsch พัฒนาเทคนิคเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ขั้นตอนแรกทำให้เชื้อที่ต้องการมีปริมาณมากขึ้น และตรึงไว้บนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต ต่อจากนั้นทำการบ่มด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะ ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกและทำการเติม antibody-enzyme conjugate ลงไป ล้างแล้วเติมสับสเตรท ทำให้เกิดสีน้ำเงินหรือสีน้ำตาล สามารถมองเห็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ วิธีนี้สามารถตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างที่มีเชื้ออยู่ 10^4 - 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่วิธีนี้ให้ผลบวกผิดพลาด (false positive result) สูงเพราะมีการใช้แอนติซีรัมที่ไม่ผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยกำจัด IgM ออกจากแอนติซีรัม

ในปี ค.ศ.1980 Swaminathan และ Ayres ใช้เทคนิคที่เลียนแบบเทคนิค fluorescent antibody staining แต่ขั้นตอนการติดฉลากแอนติบอดีด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ จะเป็นการติดฉลากเอนไซม์กับแอนติบอดีแทน ในการวิเคราะห์ตัวอย่างต้องนำตัวอย่างมาเพิ่มจำนวนโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงในอาหารประเภท selective enrichment คือ H-broth เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ต่อจากนั้นถ่ายเชื้อมา 1 ลูปลงบนแผ่นสไลด์ ทำให้แห้ง เติม antibody-enzyme-conjugate ลงไป ทำการบ่มและล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก และเติมสับสเตรทของเอนไซม์ลงไป มีผลทำให้แผ่นสไลด์ที่มีเชื้อ *Salmonella* เกิดการย้อมสีขึ้น สามารถตรวจพบได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้มีความไวสูงวิธีหนึ่ง

ในปี ค.ศ. 1982 Minnich และคณะพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารโดยวิธี Indirect ELISA โดยทำการทดสอบในไมโครไตเตอร์เพลทดังนี้ นำตัวอย่างที่ผ่านการบ่มผสมกับโพลีโคลนัลแอนติบอดีเป็นเวลา 1 ชั่งโมง ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก โดยการปั่นเป็นเวลา 5 นาที และเติม goat anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate ลงไปทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรทลงไป ทำการตรวจสอบในอาหารจำนวน 98 ตัวอย่าง พบว่าวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์มีความไวและความจำเพาะมากกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่เหมาะสมที่นำไปใช้ในงานประจำเพราะไม่สะดวกในการปั่นล้าง

ในปี ค.ศ. 1985 Anderson และ Hartman ได้พัฒนาวิธี direct enzyme immunoassay โดยใช้ IgG ของโพลีโคลนัลแอนติบอดีของ Spicer-Edwards anti-H antiserum เคลือบไมโคร-ไตเตอร์เพลท และใช้ antibody-Protein A -β-D-galactosidase เป็นคอนจูเกต ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารของคนและสัตว์ พบว่ามีความไวในการวิเคราะห์ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วิธีนี้ไม่ต้องใช้การล้างโดยการปั่นทำให้สะดวกและประหยัดเวลา

Ibrahim และคณะ(1985) ได้ปรับปรุงวิธีการแยกแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella* ให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น จากนั้นทดสอบความบริสุทธิ์ของแฟลกเจลลาที่ได้ โดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และวิธีเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส พบว่ามีความบริสุทธิ์สูง นำแฟลกเจลลาที่ได้ไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง พบว่าแอนติบอดีไตเตอร์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแฟลกเจลลาสูงกว่าที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวเซลล์

ในปี ค.ศ. 1987 Harford ทำการตรวจสอบหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* จาก 91 ตัวอย่าง โดยเทคนิค ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงทางจุลชีววิทยา โดยเทคนิค ELISA ทำการเตรียมโดยเคลือบแผ่นไมโครไตเตอร์เพลทด้วยโพลีโคลนัลแอนติบอดี (CSA-1) และใช้คอนจูเกตคือ CSA- 1 peroxidase conjugate ที่ระดับการเจือจาง 1 : 100 ในเทคนิค ELISA มีความไวของการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* แต่ละสายเชื้อที่ระดับต่ำสุดแตกต่างกัน เช่น *Salmonella anatum* ที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salmonella enteritidis ที่ความเข้มข้น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถนำเทคนิค ELISA ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ตรวจสอบตัวอย่างอาหารที่สงสัยว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* อย่างมีประสิทธิภาพ

ในปี ค.ศ. 1989 Prusak-Sochaczewski และ Loung ได้พัฒนาวิธี ELISA สำหรับตรวจเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร โดยปรับปรุงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความไวของวิธี ELISA ในการวิเคราะห์โดยอาศัยความสามารถของแอนติบอดีหรือแอนติเจนในการเกาะกับเฟสของแข็งเช่น เซลลูโลส อะกาโลส ไนลอน หรือแก้ว จากการทดลองเคลือบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Salmonella* ลงบนโพลีสไตรลีนเพลท พบว่าแอนติบอดีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่ม 1 ชั่วโมงให้ผลการยึดติดกับผิวหลุมได้ดี ในการกระตุ้นเพลทโดยบ่มเพลทด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ก่อนการเคลือบด้วยแอนติบอดี ไม่มีผลต่อความไวของวิธี ELISA เพลทที่เคลือบด้วยแอนติบอดีมีความเสถียรได้อย่างน้อย 1 สัปดาห์ ดังนั้นจึงสามารถเตรียมเพลทที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่างหากได้ เป็นการลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ ในการเคลือบเพลทด้วยแอนติบอดีจำเป็นต้องมี blocking reagent ใช้เคลือบหรือล้างเพลทซ้ำหลังการเคลือบด้วยแอนติบอดี เพื่อให้ blocking reagent ไปเกาะกับเพลทตรงที่ว่างป้องกันเซลล์แบคทีเรีย หรืออื่น ๆ ในตัวอย่างมาจับกับพื้นผิวที่ว่างของเพลท ในการทดสอบ blocking reagent ใช้ casien , bovine serum albumin และ gelatin โดยพบว่าการผสม gelatin ลงในบัฟเฟอร์ทำให้มีประสิทธิภาพดีในการเกาะกับพลาสติก ฉลากเอนไซม์ที่นิยมใช้มาก คือ ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต พบว่าฮอสเรดีส-เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต มีความเหมาะสมสำหรับวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ โดยให้ผลบวกเด่นชัดกว่าแอนติบอดีที่ติดฉลากเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในการทดสอบเติมตัวเร่ง dextran และ polyethylene glycol ในช่วงการบ่มของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ แต่ความไวจะขึ้นอยู่กับเวลาในการบ่มที่เหมาะสมคือ 15 - 20 นาที การพัฒนาปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ทำให้วิธี ELISA ใช้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ได้อย่างน้อย 5 x 10^4-10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างอาหารจนเสร็จการวิเคราะห์ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง พบว่าวิธีนี้มีความไวสูง มีความถูกต้องและเชื่อถือได้

ในปี ค.ศ. 1990 Lee และคณะ ได้พัฒนา antibody capture ELISA ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร โดยใช้โพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* ทำการเคลือบไมโครไตเตอร์เพลท และใช้โมโนโคลนัลแอนติบดีที่จำเพาะต่อเชื้อเดียวกันเป็นแอนติบอดีตัวที่สอง พบว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับ *Salmonella* สายเชื้ออื่น และมีขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อในตัวอย่างเพียงขั้นตอนเดียว ปริมาณเซลล์ *Salmonella* 10 เซลล์ในอาหาร 25 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถตรวจพบได้ในเวลา 19 ชั่วโมงโดยประกอบด้วยขั้นตอนการบ่มตัวอย่างใน pre-enrichment broth เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และขั้นตอนการวิเคราะห์ ELISA เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* ไม่มีผลต่อการตรวจวัดเชื้อ *Salmonella typhimurium* แม้จะปรากฏในอัตราส่วน 10^6 : 1 (เชื้ออื่น : เชื้อ *Salmonella*) และสามารถทำการวิเคราะห์ได้เสร็จภายในเวลา 1 วัน

ในปี ค.ศ. 1992 Eckner และคณะ ได้พัฒนาELISA สำหรับตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร โดยเปรียบเทียบกับวิธีคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ตัวอย่างอาหาร 20 ตัวอย่าง การพัฒนากระบวนการ ELISA ประกอบด้วยขั้นตอนการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ไม่ต้องกวนไมโครไตเตอร์เพลทในขั้นตอนการบ่ม ไม่ใช้ขั้นตอนการปั่นล้าง ให้ความถูกต้องใกล้เคียงกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีผลบวกผิดพลาด แต่มีผลลบผิดพลาด 1.5 % ส่วนวิธีคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลลบผิดพลาด 5.3 % ทั้งสองวิธีให้ผลตรงกัน 96.7 %

ในปี ค.ศ. 1993 Wyatt และคณะได้พัฒนาการใช้เทคนิค ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช จาก Lee และคณะ(1990) โดยใช้โพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella* ในการเคลือบไมโครไตเตอร์เพลท และใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* หลายสายเชื้อในขั้นการตรวจวัด ขั้นตอนก่อนการทำ ELISA มีสองทางเลือกคือการบ่มขั้นตอนเดียวใน single non-selective broth เป็นเวลา 28 ชั่วโมงหรือบ่มสองขั้นตอนใน pre-enrichment broth เป็นเวลา 7 ชั่วโมงและบ่มใน selective enrichment broth เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (เพื่อกำจัดเชื้ออื่นที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีออกไป) พบว่าการบ่มตัวอย่างเพียงขั้นตอนเดียวมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจเพราะช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

ในปี ค.ศ. 1994 Eckner และคณะได้ทำการวิจัยร่วมกับห้องปฏิบัติการ 30 แห่งโดยทำการพัฒนาวิธี ELISA โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีสำหรับตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารต่าง ๆ เช่น นมผง นมช็อกโกเลต ไข่ผง พริกไทยป่น และแป้งถั่วเหลือง พบว่ามีผลลบผิดพลาดเกิดขึ้นน้อยกว่าวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในปี ค.ศ. 1995 Hoofar และ Weddhopp ตรวจสอบน้ำนมโคโดยใช้เทคนิค ELISA เพื่อตรวจหาแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* จากโคที่ป่วยเป็นโรค salmonellosis พบว่าวิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบ และเฝ้าระวังการติดเชื้อของโคจากตัวอย่างน้ำนมดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในปี ค.ศ.1996 Wyatt และคณะได้พัฒนาเทคนิค ELISA ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ขั้นตอนแรกเป็นการนำตัวอย่างอาหารที่สงสัยว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ มาผ่านขั้นตอน pre-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

enrichment โดยใช้อาหาร *Salmonella* chemically defined medium (SCDM) เป็นเวลา 26 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแบ่งตัวอย่างมาวิเคราะห์ตามเทคนิค ELISA โดยการเคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* หลังจากนั้นทำการล้างและเติมตัวอย่างที่ผ่านการบ่มลงในไมโครไตเตอร์เพลท ทำการล้างและเติมโมโนโคลนัลแอนติบอดีหลายชนิดลงไปทำปฏิกิริยา ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติม anti-mouse IgG horseradish peroxidase บ่มและล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรท ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงขึ้นและหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง พบว่าวิธีนี้สามารถให้ผลการตรวจสอบภายในระยะเวลา30 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ตรวจพบคือ4 x 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.5 การใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็นเฟสของแข็งในการวิเคราะห์ทางอิมมูโนแอสเสย์

นอกจากการใช้ไมโครไตเตอร์เพลทแล้วทางเลือกอื่นที่ไม่ใช้ไมโครไตเตอร์เพลทในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ได้แก่ การใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส เป็นเฟสของแข็งในการวิเคราะห์ทางอิมมูโนแอสเสย์ โดยในปี คศ.1985 Farber และคณะนำรูปแบบเทคนิคเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์มาใช้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากกระดาษกรอง เทคนิคนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้อุปกรณ์น้อย ใช้เวลาตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. จากอาหารภายในเวลา 50 ชั่วโมง 30 นาที วิธีการทดสอบโดยใช้ hydrophobic - grid membrane filter (ISO - GRID) (HGMF) จาก QA Laboratories , Toronto , Ontario , Canada เป็นอุปกรณ์สำคัญในการวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างอาหาร 100 กรัม ผสมกับ nutrient broth จำนวน 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นำสารละลายภายหลังการบ่ม 0.1 มิลลิลิตร ละลายลงใน 10 มิลลิลิตร ของ tetrathionate brilliant green บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 - 8 ชั่วโมงนำสารละลายภายหลังการบ่ม 1 มิลลิลิตร มากรองด้วย HGMF และบ่มแผ่นกรองบนอาหารแข็ง hektoen enteric agar และ selective lysine agar ที่อุณหภูมิ 35 และ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาวางทับบนแผ่นกรองที่ผ่านการบ่มดังกล่าว เพื่อดูดซับโคโลนีจากกระดาษกรองลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทำการ block ด้วย 3 % gelatin ใน Tris buffer saline (TBS) เป็นเวลา 30 นาที และบ่มใน HRP-protein A-Spicer Edwards antiserum จากนั้นทำการล้าง และบ่มในสารละลาย HRP color development ประกอบด้วย 0.05 % 4-chloro-1-napthol , 0.015 % H_2O_2 และ 16 % methanol ใน TBS และผลการทดสอบพบว่า 64 สายพันธุ์ ของเชื้อ *Salmonella* ให้ผลบวกโดยปรากฏสีม่วงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสแต่วิธีนี้มีข้อเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือแอนติเจนจากแผ่น HGMF ที่ให้ผลบวกไม่สามารถยืนยันผลนั้นกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อได้เพราะเมื่อเวลากรองเกิดการรวมกันของเซลล์ขึ้น แต่มีข้อดีคือลดขั้นตอนการปั่นตกตะกอน และไม่ใช้เครื่อง microplate reader ในการอ่านผลการทดสอบ สามารถเพิ่มความจำเพาะของการทดสอบโดยทำการคัดเลือกใช้แอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ และหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งที่เป็น enrichment broth และ selective enrichment และระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อไปได้

ในปี ค .ศ.1991 Todd และคณะ พัฒนาและคัดเลือกหาแอนติซีรัมที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* โดยวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ร่วมกับการใช้ HGMF โดยทำการคัดเลือกแอนติซีรัมที่ให้ผลบวกและผลลบผิดพลาดน้อยที่สุด พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดี M 105 และ *S. typhi* 4 $_2$ มีประสิทธิภาพดี และเป็นแอนติซีรัมชนิด IgG จากการหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการบ่มแผ่น HGMF พบว่า Tryptic Soy Agar และ Nutrient Agar เป็นอาหารที่ให้ผลการทดสอบดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นเช่น Brilliant green sulfa agar , Bismuth sulfite agar, MacConkey agar และ Hemorrhagic Colitis agar

ในปี ค.ศ.1996 Hoszowski และคณะ ได้ใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็นตัวดูดซับโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ในคลอโรฟอร์มเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการล้างด้วย PBS เติมโมโนโคลนัลแอนติบอดี M181 และ M183 ที่เจือจาง 1:400 ทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาบ่มใน alkaline phosphatase conjugate goat anti-mouse IgG ทำการล้าง และบ่มในสับสเตรทเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น พบว่าวิธีนี้มีความไวและมีความจำเพาะสูงวิธีหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่า ความจำเพาะของการทดสอบขึ้นกับชนิดของ selective enrichmentที่ใช้และชนิดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีต้องมีศักยภาพในการตรวจวิเคราะห์

Jaradat และ Zawistowski (1996) ใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็นส่วนหนึ่งในการตรวจดูความจำเพาะของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เตรียมขึ้น โดยนำเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ต่อจากนั้นทำการ block ด้วย 3% gelatin ใน Tris-buffer saline (TBS) และบ่มในโมโนโคลนัลแอนติบอดีเป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ต่อจากนั้นทำการล้างและบ่มใน alkaline phosphatase conjugate goat anti-mouse IgG ทำการล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก และบ่มในสับสเตรท หยุดปฏิกิริยาเมื่อมีสีปรากฏขึ้น โดยใช้น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การใช้เม็ดแม่เหล็กขนาดเล็กเป็นเฟสของแข็งในการวิเคราะห์ทางอิมมูโนแอสเสย์

การใช้เม็ดแม่เหล็กขนาดเล็กเคลือบด้วยแอนติบอดีและนำมาใช้เป็นเฟสของแข็งสำหรับวิเคราะห์ ELISA เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเพราะเม็ดแม่เหล็กสามารถทำการแยกจากสารละลายได้โดยอาศัยแรงโน้มถ่วง หรืออาศัยแรงทางแม่เหล็กไฟฟ้า เม็ดแม่เหล็กหลายชนิดมีการผลิตขึ้นทางการค้าเช่น Dynabead TM anti-*Salmonella* (Dynal , Lake Success , NY.) , Dynabead ^{R} anti-*Salmonella* (Dynal , Oslo , Norway) ใช้สำหรับวิเคราะห์ทางเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ซึ่งมีประโยชน์มากกว่าวิธี ELISA แบบธรรมดาเพราะมีพื้นผิวที่มีประสิทธิภาพจำนวนมาก ทำการล้างได้ง่าย สามารถช่วยลดแบลคกราวน์ลงได้และมีส่วนช่วยให้สัญญาณคมชัดอีกด้วย

การใช้เทคนิค Immunomagnetic separation (IMS) คือการใช้เม็ดแม่เหล็กขนาดเล็กเคลือบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในการแยกเชื้อ *Salmonella* จากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่นพบว่า *Salmonella typhimurium* ถูกทำให้เพิ่มจำนวนขึ้น 13 เท่าด้วยเม็ดพลาสติกขนาด 50 -160 ไมโครเมตร ที่ผ่านการเคลือบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะ หรือเพิ่มจำนวนขึ้น 2700 เท่าใน enrichment broth เมื่อใช้เม็ดพลาสติกขนาด 4.5 ไมโครเมตรของ Dynabead ^{R} M 450 (Dynal , Wirral , Merseysid) ปัจจัยที่มีผลต่อความจำเพาะของเม็ดแมกเนติกคือการเกิดปฏิกิริยาข้ามกันของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ ระยะเวลา อาหารที่ใช้ในการบ่ม และ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (Blackburn , 1993)

ในปี ค.ศ. 1994 Cudjoe พัฒนาการใช้ Dynabeads ^{R} anti-*Salmonella* กับตัวอย่างอาหารภายหลังการบ่มใน pre-enrichment เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง (เพื่อให้เชื้อ *Salmonella* ที่อยู่ในสภาพ inactive เจริญขึ้นมา) โดยเติมอิมมูโนแมกเนติกลงไปเพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella* ที่อยู่ในตัวอย่าง จากนั้นนำอิมมูโนแมกเนติกออกมาโดยใช้แรงทางฟิสิกส์ ล้างและนำมา streak ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น selective enrichment agar เพื่อให้เชื้อ *Salmonella* ที่มีชีวิตอยู่เพิ่มจำนวนขึ้น วิธีนี้สามารถแยกและคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และระยะเวลาในการบ่มมีความสำคัญ ถ้าการบ่มสั้นเกินไปอาจทำให้ความไวในการตรวจลดลง และพบว่าขั้นตอนนี้เสียค่าใช้จ่ายสูงเมื่อใช้ในงานประจำ

ในปี ค.ศ. 1995 Holt และคณะ พัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อ *Salmonella enteritidis* ที่ปนเปื้อนในไข่ โดยใช้อิมมูโนแมกเนติกของ Dynabead TM anti-*Salmonella* มาช่วยในการแยกเชื้อออกจากตัวอย่างอาหาร โดยทำการเคลือบแอนติบอดีที่จำเพาะไว้ที่ผิวซึ่งมีส่วนช่วยในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างไข่ที่ทำการทดสอบได้ดี และสามารถนำอิมมูโนแมกเน-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ติกมาผ่านกรรมวิธีตามเทคนิค ELISA พบว่าวิธีนี้มีความไวสูงวิธีหนึ่ง สามารถตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างได้เท่ากับ 10^5 -10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยถ้ามีเชื้อปนเปื้อนในอาหารเพียง 1 เซลล์สามารถตรวจพบได้ 61 % นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในอาหาร สั้นกว่าวิธีที่ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อถึง 24 ชั่วโมง

ในปีค.ศ. 1995 Cudjoe และคณะ ใช้อิมมูโนแมกเนติกและเทคนิค ELISA สำหรับวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* จากอาหารซึ่งพัฒนาขึ้นโดยใช้ Dynalbead anti-*Salmonella* (Dynal, Oslo , Norway) มาเป็นส่วนหนึ่งในการวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถตรวจสอบอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้วหรืออาหารที่ไม่ผ่านการแปรรูปเช่นอาหารสด ในขั้นตอนการตรวจสอบตัวอย่างควรบ่มตัวอย่างใน pre-enrichment broth ก่อนเพราะในตัวอย่างอาจมีเชื้อน้อย การบ่มทำให้เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น แล้วค่อยผ่านกระบวนการ IMS ต่อจากนั้นนำส่วนของอิมมูโนแมกเนติกมาบ่มใน post-selective enrichment ในระยะเวลาสั้น และนำไปผ่านความร้อนแล้วจึงนำอิมมูโน-แมกเนติกมามาผ่านกรรมวิธีตามเทคนิค ELISA

2.7 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยปฏิกิริยาตกกลุ่ม (agglutination)

ปฏิกิริยาการตกกลุ่ม (agglutination) เป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป และมีใช้เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อบางชนิด การตกกลุ่มอาจเกิดจากการที่เชื้อสัมผัสแอนติบอดีโดยตรงแล้วเกิดการตกกลุ่ม (clumping) หรือเชื้อมีสารที่สามารถทำให้เกิดการตกกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ถือว่าเป็นปฏิกิริยาการตกกลุ่มโดยตรง (direct agglutination) การตกกลุ่มของตัวเชื้อ เรียกว่า bacterial agglutination การตกกลุ่มของเม็ดเลือดเรียกว่า hemagglutination นอกจากนี้การตกกลุ่มของอนุภาคซึ่งเป็นแกน (matrix) เพื่อให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดไว้ก่อน แล้วจึงเกิดปฏิกิริยาภายหลังเมื่อสัมผัสแอนติเจนหรือแอนติบอดีจำเพาะ ถือว่าเป็นการตกกลุ่มทางอ้อม (indirect หรือ passive agglutination) ถ้าใช้เม็ดเลือดเป็นแกนกลางให้จับ เรียกว่า การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดทางอ้อม (indirect หรือ passive hemagglutination) ถ้าใช้อนุภาคของเลเทกซ์ เรียกว่า การตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex agglutination) (สุรางค์ , 2539)

กลไกของปฏิกิริยาตกกลุ่ม

หลักการของปฏิกิริยาตกกลุ่มที่เกิดในตัวกลางที่เป็นของเหลว (liquid media) ใช้เป็นหลักของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีทั่ว ๆ ไป อาจแบ่งได้เป็น 2 ขั้นดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การรวมตัวขั้นต้น (primary complex) จะเกิดการรวมตัวระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในทันทีเมื่อผสมกัน แต่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า โดยมีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งมีได้หลายแบบคล้ายกับแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโปรตีนชนิดอื่น ๆ เช่น electrostatic (coulomb) force, van der waal force, hydrogen bonding และ hydrophobic bonding เป็นต้น

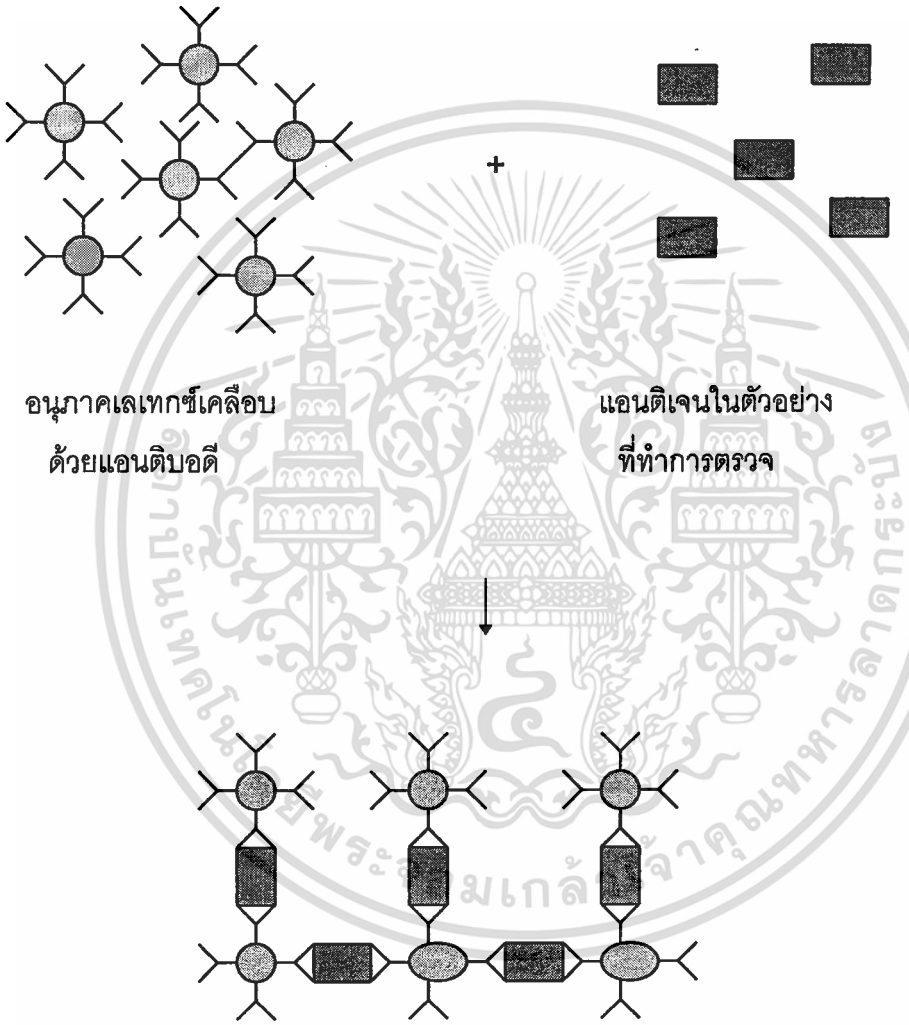
2. การเกิดเป็นกลุ่มก้อนใหญ่ (large aggregate หรือ larger Ag-Ab complex) แอนติบอดีจะเป็นตัวเชื่อมโยงแอนติเจนเข้าด้วยกันเป็นลักษณะของตาข่าย (lattice) และจำนวนตะกอนที่ได้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในส่วนผสมดังแสดงในภาพที่ 2.8

การทดสอบการตกกลุ่มใช้กันอย่างกว้างขวางในการพิสูจน์ชนิดของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย ได้แก่การตรวจสอบเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหารหรือโรคท้องร่วงเป็นส่วนใหญ่เช่น เชื้ออหิวาตกโรค เชื้อ *Salmonella* รวมถึงเชื้อไทฟอยด์ ในการทดสอบมักจะใช้น้ำยาอันได้แก่ แอนติเจน (ตัวเชื้อที่ต้องการตรวจ) กับแอนติบอดีปริมาตรน้อย ๆ ประมาณ 25-50 ไมโครลิตร ผสมอยู่ในวงเขตที่กำหนดบนสไลด์หรือกระดาษ เอียงสไลด์เบา ๆ ผสมน้ำยาให้เข้ากัน เห็นผลการทดสอบภายใน 1 - 5 นาที บางครั้งปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดรวดเร็วมากภายในไม่กี่วินาที ถ้ามากกว่า 5 นาทีไม่เกิดการตกกลุ่มถือว่าให้ผลลบ

ในปี ค.ศ.1980 Essers และ Radelbold ใช้เทคนิคปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex slide agglutination test) ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus* ให้ผลความถูกต้องสูง และไม่มีผลบวกผิดพลาด การเตรียมทำได้สะดวก ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำเม็ดเลเทกซ์ มาเจือจางในอัตราส่วน 1:8 กับ glycine-saline buffer (พีเอช 8.0) ผสมในปริมาตรที่เท่ากันกับ human plasma ที่ผ่านการบำบัดด้วย ethylenediamine tetraacetate (EDTA) และเจือจางในอัตราส่วน 1:1000 ด้วย glycine-saline buffer ต่อจากนั้น บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ นำไปปั่นตกตะกอนและล้างด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน 2 ครั้ง และเจือจางใน phosphate buffer saline พีเอช 7.4 ที่ประกอบด้วย 0.02% sodium azide และ 0.05% human plasma การทดสอบปฏิกิริยาตกกลุ่มเลเทกซ์กับตัวอย่าง นำโคโลนีที่สงสัยผสมกับน้ำเกลือ 1 หยด และผสมกับ latex reagent ที่เตรียมได้บนแผ่นสไลด์ และสังเกตปฏิกิริยาตกกลุ่มที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.8 แบบจำลองการจับกันระหว่างอนุภาคเลเทกซ์ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีกับแอนติเจนในสิ่งตรวจที่มีการตกกลุ่มในลักษณะร่างแห



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี ค.ศ.1988 Metzler และ Nachankin ใช้ปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella*ใน enrichment broth โดยใช้ชุดตรวจวัดอัตโนมัติ Bactigen *Salmonella-Shigella* Latex Agglutination Slide Test ในการทดสอบตรวจหาเชื้อจากอุจจาระผู้ป่วย พบว่าวิธีนี้มีความไวเท่ากับ 80.2 % และมีความจำเพาะ 96.2% โดยการทดสอบถ้ามีการบ่มตัวอย่างใน enrichment broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้การตรวจมีความไวมากขึ้นกว่าการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยชุดตรวจวัดอัตโนมัตินี้ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ ส่วนที่หนึ่งเป็น *Salmonella* latex reagent และส่วนที่สองเป็น *Shigella* latex reagent โดยเม็ดเลเทกซ์เคลือบด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี การทดสอบใช้ 1 หยดของชุดตรวจสอบผสมกับ 50 ไมโครลิตรของ enrichment broth หยดลงบนแผ่นสไลด์และเขย่าเป็นเวลา 10 นาทีที่ 100 -160 รอบต่อนาที และสังเกตปฏิกิริยาตกกลุ่มที่เกิดขึ้น

ในปี ค.ศ.1991 D'Aoust และคณะ ทดสอบความสามารถของชุดตรวจวัดอัตโนมัติของปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ 3 ชุดคือ Bactigen *Salmonella- Shigella* (Wampole Laboratories, Cranbury ,NJ) Microscreen (Mercia Diagnostics , Surrey , UK) และ Spectate (May and Baker Diagnostics , Glasgow , UK) เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร พบว่าใน 190 สายเชื้อของ *Salmonella* ชุดตรวจวัดทั้งสามสามารถวิเคราะห์ให้ผลถูกต้องเท่ากับ 89.5, 81.6 และ 66.3% ตามลำดับ และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับจุลินทรีย์อื่น คือ *Citrobacter freundii* และ *E.coli* นอกจากนี้คณะผู้วิจัยพบว่า ระยะเวลาและชนิดของ enrichment broth มีผลต่อการวิเคราะห์ โดยจุดประสงค์ของการใช้ชุดตรวจวัดอัตโนมัติ คือ มุ่งเน้นในการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น (presumptive) กับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้ออย่างรวดเร็วและสะดวกกว่าวิธีดั้งเดิม (culture method)

ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารมีข้อจำกัดคือมีเชื้อปนเปื้อนจำนวนน้อย และต้องการผลตรวจสอบที่รวดเร็ว ปัจจุบันมีการมุ่งเน้นถึงการพัฒนาความจำเพาะของการแยกเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารให้สูงขึ้น และพัฒนารูปแบบที่มีการใช้ง่ายและรวดเร็ว เทคนิค ELISA , Dot-ELISA และปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยทั้งสามวิธีสามารถใช้ตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อุปกรณ์ที่จำเป็นมีไม่มากนัก ดังนั้นอาจใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารและพัฒนาไปเป็นชุดตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่มีการใช้ที่สะดวกและรวดเร็ววิธีหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

จุลินทรีย์

Salmonella typhimurium ATCC 14028

Salmonella typhimurium S292

Salmonella typhimurium

Salmonella agona

Salmonella derby

Salmonella heidelberg

Salmonella weltreveden

Salmonella orion

Salmonella sp.

Shigella flexneri

Shigella sonnei

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031

Enterobacter cloacae

Citrobacter freundii

Proteus mirabilis

Escherichia coli ATCC 25922

Bacillus subtilis ATCC 6633

Staphylococcus aureus ATCC 6538P

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์

horseradish peroxidase (Sigma , USA)

อุปกรณ์

- microplate reader (Bio Rad Model 3550 , USA)
- ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส
- ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส
- สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-160 A, Shimadzu,Japan)
- เครื่องวัดพีเอช (Beckman,USA)
- graduated pipette
- Hamilton micropipette
- glass bijou bottle ขนาด 5 มิลลิลิตร
- micro tube
- dialysis membrane(Cellu-Sep T3 Tubular Membrane : MWCO 12,000-14,000)
- microtiter plate ขนาด 96 หลุม (Nunc-Immuno Plate,Denmark)

สารเคมี

- absolute ethanol (Merck , Germany)
- acetic acid (J.T. Baker , USA)
- borax (Merck , Germany)
- boric acid (Merck , Germany)
- citric acid (Merck , Germany)
-diethylaminoethyl cellulose (DE52) (Whatman , USA)
- disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Merck , Germany)
- glycerol (J.T. Baker , USA)
- gelatin (Merck , Germany)
- hydrochloric acid (HCl) (Merck , Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-latex particle (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 ไมโครเมตร) (Sigma , USA)

- merthiolate (Sigma , USA)

- O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Zymed , USA)

- potassium chloride (KCl) (BDH , UK)

- potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck , Germany)

- phosphoric acid (H_3PO_4) (J.T. Baker , USA)

- sodium acetate (CH_3COONa) (Merck , Germany)

- sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Merck , Germany)

- sodium borohydride ($NaBH_4$) (Fluka Switzerland)

- sodium m-periodate ($Na\ IO_4$) (Sigma , USA)

- sodium chloride (NaCl) (Merck , Germany)

- sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) (Merck , Germany)

- sodium carbonate (Na_2CO_3) (Fluka , Switzerland)

แอนติซีรัม

-rabbit anti-*Salmonella* flagella serum

-rabbit anti- *Salmonella* whole cell serum

แอนติซีรัมทั้งสองชนิดได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนท์ไวท์ อายุ 2 เดือน ด้วยแอนติเจนคือ whole cell **และ แฟลกเจลลาแอนติเจนของเชื้อ** *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (พัลลภา , 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดส

3.2.1.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสกับ rabbit anti - *Salmonella* flagella serum โดยวิธีเพอริโอเดท (periodate method) (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakane และ Kowai, 1974)

-เตรียมสารละลายเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดส โดยละลายเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์-ออกซิเดส 4.0 - 8.0 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

-เตรียมสารละลาย 0.1 M sodium *m*-periodate ในน้ำกลั่นและนำมา 200 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลายฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสที่อยู่ใน Glass bijou bottle ผสมให้เข้ากันทันที สารละลายที่ได้จะมีสีเขียวเกิดขึ้นและกวนเบาๆ เป็นเวลา 20 นาที

-ไดอะไลซีสสารละลายด้วย 1.0 mM sodium acetate buffer พีเอช 4.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

-ปรับให้ พีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 9.0-9.5 โดยเติมสารละลาย sodium carbonate/bicarbonate buffer 2 พีเอช 9.5และเติมสารละลาย IgG ของ rabbit anti- flagella serum ลงไปทันที ต่อจากนั้นทำการไดอะไลซีส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงด้วยสารละลาย carbonate/bicarbonate buffer 1 พีเอช 9.5

-นำสารละลายที่ได้มากวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องบน rotary wheel mixer

-เติม 100 ไมโครลิตร ของสารละลาย sodium borohydride (ที่เตรียมใหม่)เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

-ไดอะไลซีสสารละลายใน 0.1 M borate buffer พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

-เจือจางแอนติบอดีที่ติดฉลากในเอนไซม์ด้วยอัตราส่วน 1:2 กับ 60% (v/v) glycerol ใน borate buffer และเติม merthiolate จำนวน 0.02%(w/v) และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส

3.2.1.2 ศึกษาความสัมพันธ์ของอัตราส่วนเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสกับปริมาณ แอนติบอดีใน antibody-enzyme conjugate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.2.1 การหาอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสกับแอนติบอดี

เจือจาง antibody-enzyme conjugate ที่ผลิตขึ้นใน phosphate buffer saline (PBS)ให้มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ IgG โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 1.45 เมื่อทำการปรับความเข้มข้นโปรตีนของ antibody-enzyme conjugate แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 403 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสและอิมมูโนโกลบูลินตามลำดับ

3.2.1.2.2 การวัดประสิทธิภาพของ antibody-enzyme conjugate

-เจือจาง antibody-enzyme conjugate ใน PBS ให้มีความเข้มข้นโปรตีนของ IgGเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
-เจือจาง ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1: 10^3 ใน PBS
-เติม 20 ไมโครลิตร ของ antibody-enzyme conjugate ที่เจือจางแล้วลงใน 3.0 มิลลิลิตร ของ substrate OPD ที่เตรียมใหม่ บ่มและเก็บไว้ไม่ให้ถูกแสงที่อุณหภูมิห้อง
-ปิเปตต์ 200 ไมโครลิตรของสารละลายระหว่างเวลา 0, 5, 10, 15, 20,25 และ 30 นาที ใส่ลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลทและเติม 50 ไมโครลิตร ของ 4 N H_2SO_4 ทันที ปิดเพลทไม่ให้ถูกแสงระหว่างปฏิบัติงาน
-อ่านค่า OD ที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
-เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา

3.2.1.2.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antibody-enzyme conjugate โดยใช้เทคนิค ELISA แบบ direct method

-เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยแอนติเจน คือ เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางใน coating

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-เติม blocking reagent (3% gelatin ใน PBS-tween) จำนวน 150 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างไมโครไตเตอร์เพลท 3 ครั้งด้วย washing buffer

-เติม rabbit anti - *Salmonella* flagella HRP conjugate ที่ระดับการเจือจาง 1:100 ถึง 1 : 204800 จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- ล้างไมโครไตเตอร์เพลท 3 ครั้งด้วย washing buffer

-เติม substrate OPD จำนวน 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

-เติม 4 N H_2SO_4 จำนวน 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท

-อ่านค่า OD. ที่ 492 นาโนเมตร ด้วย microplate reader

3.2.2 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช (ดัดแปลงมาจาก Prusak-Sochaczewski และ Loung , 1989)

3.2.2.1 การทดสอบใช้ rabbit anti-whole cell serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทและใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

-เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วย rabbit anti-whole cell serum ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยเจือจางใน coating buffer และบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา12ชั่วโมง

-ล้างไมโครไตเตอร์เพลท 3 ครั้งด้วย washing buffer

-เติม blocking reagent (3% gelatin ใน PBS-tween) จำนวน 150 ไมโครลิตรต่อหลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างไมโครไตเตอร์เพลท 3 ครั้งด้วย washing buffer

-เติมแอนติเจนคือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้น 10^6, 10^7, 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างไมโครไตเตอร์เพลท 3 ครั้งด้วย washing buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-เติมแอนติเจนคือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้น 10^6, 10^7, 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างไมโครไตเตอร์เพลท 3 ครั้งด้วย washing buffer

-เติม rabbit anti-*Salmonella* flagella HRP conjugate ที่ระดับการเจือจาง 1 : 200 ถึง 1 : 3200 จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างไมโครไตเตอร์เพลท 3 ครั้งด้วย washing buffer

-เติม substrate OPD จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาที

-อ่านค่า OD ที่ 492 นาโนเมตร ด้วย microplate reader

3.2.2.2 การทดสอบใช้ rabbit anti-*Salmonella* flagella serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทและใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

-เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วย rabbit anti-*Salmonella* flagella serum ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยเจือจางใน coating buffer และบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงและแอนติเจนที่ใช้ คือ เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้น 10^6, 10^7, 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนการทดลองเหมือนที่กล่าวในข้อ 3.2.2.1

3.2.3. การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยเทคนิค Dot-ELISA

-ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสขนาด 0.75 x 5 เซนติเมตร

-หยด rabbit anti-*Salmonella* flagella serum ที่ละลายใน coating buffer จำนวน 2 ไมโครลิตรทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

-ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย washing buffer

-Block ด้วย 3% gelatin ใน PBS-T ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย washing buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-บ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายตัวอย่างที่มีแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้น 10^6, 10^7, 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

-ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย washing buffer

-บ่มใน rabbit anti-*Salmonella* flagella HRP conjugate ที่ระดับการเจือจาง 1 : 100 , 1 : 200 และ 1 : 400 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย washing buffer

-บ่มใน substrate buffer

-หยุดปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำกลั่น

-ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งและตรวจดูสีที่ปรากฏขึ้น ถ้าเกิดสีม่วงคือปฏิกิริยาผลบวก(positive) และถ้าไม่เกิดสีม่วงคือปฏิกิริยาผลลบ (negative)

3.2.4 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex agglutination) (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Manisha and others, 1995)

3.2.4.1 การเตรียมเม็ดเลเทกซ์ (latex particle) สำหรับในปฏิกิริยาการตกกลุ่ม

-เตรียม 1% ซัสเพนชั่นของเม็ดเลเทกซ์ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 ไมโครเมตร) เติมลงใน 0.1 M glycine-0.15 M NaCl buffer พีเอช 8.2 และผสมแอนติซีรัม ในปริมาตรเท่ากับบัฟเฟอร์ โดยใช้แอนติซีรัม 2 ชนิด คือ rabbit anti-*Salmonella* flagella serum ,rabbit anti-*Salmonella* whole cell serum และใช้ normal rabbit serum เป็น control

-บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อจากนั้นเติม 1%(w/v) BSA และบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างเม็ดเลเทกซ์โดยการปั่น ที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาซัสเพนด์ใน 0.1 M glycine - 0.15 M NaCl buffer พีเอช 8.2 และนำไปปั่นซ้ำอีก 1 ครั้ง

-นำส่วนของเม็ดเลเทกซ์ที่เตรียมได้ซัสเพนด์ ใน Glycine -NaCl buffer (โดยผสม 1%w/v BSA และ 0.02% sodium azide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.2 **การตรวจหาเชื้อ** *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

-นำซัสเพนชั่นของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ผสมกับเม็ดเลเทกซ์ที่เตรียมได้ จากข้อ 4.1 ในปริมาตรเท่ากัน อ่านผลการทดสอบโดยดูการตกกลุ่มของเม็ดเลเทกซ์ที่เกิดขึ้น ถ้ามีการตกกลุ่มคือปฏิกิริยาเป็นบวก (positive) และไม่มีการตกกลุ่มคือปฏิกิริยาเป็นลบ (negative)

3.2.5 **การศึกษา** cross-reaction **กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยวิธี** ELISA **แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เทคนิค** Dot-ELISA **และปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์**(latex-agglutination)

-เชื้อแบคทีเรียต่างๆ ที่ใช้ทดสอบคือ

Salmonella typhimurium ATCC 14028
Salmonella typhimurium S292
Salmonella typhimurium
Salmonella agona
Salmonella derby
Salmonella heidelberg
Salmonella weltreveden
Salmonella orion
Salmonella sp.
Shigella flexneri
Shigella sonnei
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031
Enterobacter cloacae
Citrobacter freundii
Proteus mirabilis
Escherichia coli ATCC 25922
Bacillus subtilis ATCC 6633
Staphylococcus aureus ATCC 6538P

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเชื้อลงในอาหาร brain heart infusion agar (BHI) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซัสเพนด์เซลล์ด้วย saline solution (NaCl 0.85 %) นำมานับเซลล์โดยวิธี standard plate count ปรับปริมาณเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำลายเชื้อโดยใช้ความร้อนที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบโดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดี แซนวิช เทคนิค Dot-ELISA และ ปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination) ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 3.2.2, 3.2.3 และ 3.2.4 ตามลำดับ

3.2.6 การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารโดยตรงเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)

3.2.6.1 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่าง

- ชั่งตัวอย่างเนื้อปลา , กุ้ง , ปลาหมึก , หมู และไก่ จำนวน 25 กรัมนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และใส่ลงในขวดอาหาร Buffer peptone water (BPW) 225 มิลลิลิตร เติมเชื้อปริมาณ 2 -5 เซลล์ต่ออาหาร 25 กรัมลงไปและปั่นให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

-นำสารละลาย BPW ที่ผสมตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Rappaport Vassiliadis Medium (RV broth) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- แบ่งอาหาร RV broth ที่มีตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วน และนำมาวิเคราะห์โดยวิธี ELISA เทคนิค Dot-ELISA ปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination) และวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)

3.2.6.1.1 **วิธี** ELISA

- นำสารละลาย RV broth ที่ผ่านการบ่ม ฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

-แบ่งสารละลาย RV-broth เป็นสองส่วน ส่วนแรกนำ RV-broth จำนวน 200 ไมโครลิตร ไปปั่นที่ความเร็ว 5000 g เป็นเวลา 30 นาที และซัสเพนด์เซลล์ด้วยสารละลาย diluent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(0.1 % gelatin ใน PBS-Tween) จำนวน 200 ไมโครลิตร ส่วนที่สองเป็นสารละลาย RV-broth ที่ไม่ผ่านขั้นตอนการปั่น

-นำสารละลายตัวอย่างทั้งสองเติมลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลทที่ผ่านการเคลือบด้วย IgG ของ rabbit anti - *Salmonella* flagella serum ที่ความเข้มข้นโปรตีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างไมโครไตเตอร์เพลทด้วย washing buffer จำนวน 3 -4 ครั้ง

-เติม blocking reagent (3 % gelatin ใน PBS - Tween) จำนวน 150 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างไมโครไตเตอร์เพลทด้วย washing buffer จำนวน 3 - 4 ครั้ง

-เติม rabbit anti - *Salmonella* flagella HRP conjugate ที่ความเข้มข้น 1 : 400 และ 1 : 800 จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างไมโครไตเตอร์ด้วย washing buffer จำนวน 3 - 4 ครั้ง

-เติม substrate OPD บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที

-เติม 4N H_2SO_4 หลุมละ 50 ไมโครลิตร

-อ่านค่า OD ที่492 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA reader

3.2.6.1.2 **เทคนิค Dot-ELISA**

-นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ผ่านการเคลือบด้วย IgGของ rabbit anti -flagella serum มาบ่มในสารละลาย RV-broth ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมดังการทดลองที่ 3.2.6.1.1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย washing buffer

-บ่มใน rabbit anti-*Salmonella* flagella HRP conjugate ที่เตรียมขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย washing buffer

-บ่มใน substrate buffer

-หยุดปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำกลั่น

-ผึ่งให้แห้งและตรวจดูสีที่ปรากฏขึ้น ถ้าเกิดสีม่วงคือปฏิกิริยาผลบวก(positive) และถ้าไม่เกิดสีม่วงคือปฏิกิริยาผลลบ (negative)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6.1.3 ปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination)

-หยดซัสเพนด์ชั่นของเม็ดเลเทกซ์ ที่เคลือบด้วย IgGของ rabbit anti - whole cell serum ในปริมาตรที่เท่ากันลงในสารละลาย RV-broth ที่ผ่านการเตรียมดังการทดลองที่ 3.2.6.1.1 ผสมและเขย่าเป็นเวลา 3 -5 นาที อ่านผลการทดสอบโดยดูการตกกลุ่มของเม็ดเลเทกซ์ที่เกิดขึ้น ถ้ามีการตกกลุ่มคือปฏิกิริยาเป็นบวก (positive) และไม่มีการตกกลุ่มคือปฏิกิริยาเป็นลบ (negative)

3.2.6.1.4 วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)

(Varadaraj , 1993)

-นำสารละลาย RV broth ที่ผ่านการบ่มจำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Modified Semi Solid Rappaport - Vassiliadis medium (MSRV) โดยหยดลง 5 หยดและทำเครื่องหมายตำแหน่งที่หยดเพื่อให้สังเกตผลง่าย บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

-ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากตำแหน่งที่สังเกตเห็นการเคลื่อนที่ของเชื้อออกมา (เกิดวงขุ่น ๆ รอบหยดตัวอย่าง) เป็นลักษณะที่คาดว่าเป็น *Salmonella* นำมาทดสอบในอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) และ Lysine Indole Motility medium (LIM) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

-ในทำนองเดียวกัน ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากอาหาร RV broth หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Deoxycholate (XLD agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (โคโลนีของ *Salmonella* บน XLD มีสีชมพู มีจุดดำตรงกลางหรือมีสีแดง) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* ลงในอาหาร TSI หรือ LIM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

-บันทึกผลใน TSI ที่ให้ผลบวก คือเกิดสีเหลืองบริเวณ butt (butt acid) และ เกิดสีแดงบริเวณ slant (slant alkaline) อาจมีหรือไม่มี H_2S (สีดำ) ก็ได้ และอาจเกิดก๊าซหรือไม่ก็ได้ ใน LIM ผลบวกคือมีสีม่วงเช่นเดิม *Salmonella* ให้ alkaline reaction ไม่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์และอาจมีรอยขุ่นขาวรอบรอย stab คือให้ผลของ motility เป็นบวก และทำการทดสอบการสร้างอินโดล (indole) โดยใช้ Kovac ' s reagent หยดลงบนผิวอาหาร LIM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับ *Salmonella* ให้ผลการสร้างอินโดลเป็นลบคือเกิดสีเหลืองไม่เกิดสีแดง โดยเชื้อที่เป็น *Salmonella* ให้ผลบวกทั้ง TSI และ LIM

3.2.6.2 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ

- ชั่งตัวอย่างเนื้อปลา , กุ้ง , ปลาหมึก , หมู และไก่ จำนวน 25 กรัม และใส่ลงในขวดอาหาร Buffer peptone water (BPW) 225 มิลลิลิตร เติมเชื้อปริมาณ 2 -5 เซลล์ต่ออาหาร 25 กรัมลงไปและปั่นให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

-นำสารละลาย BPW ที่ผสมตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Rappaport Vassiliadis Medium (RV broth) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- แบ่งอาหาร RV broth ที่มีตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วน และนำมาวิเคราะห์โดยวิธี ELISA เทคนิค Dot-ELISA ปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination) และวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 3.2.6.1

3.2.6.3 การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* โดยตรงในตัวอย่างอาหาร

นำตัวอย่างอาหารส่งออกและตัวอย่างอาหารสดจากตลาดจำนวน 68 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี ELISA , Dot - ELISA และปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (ดังภาพที่ 3.1) เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method) โดยทำการทดลองดังนี้

3.2.6.3.1 วิธี ELISA ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.2.6.1.1

3.2.6.3.2 วิธี culture method ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.2.6.1.4

3.2.6.3.3 วิธี Dot - ELISA ทำการทดลองดังนี้

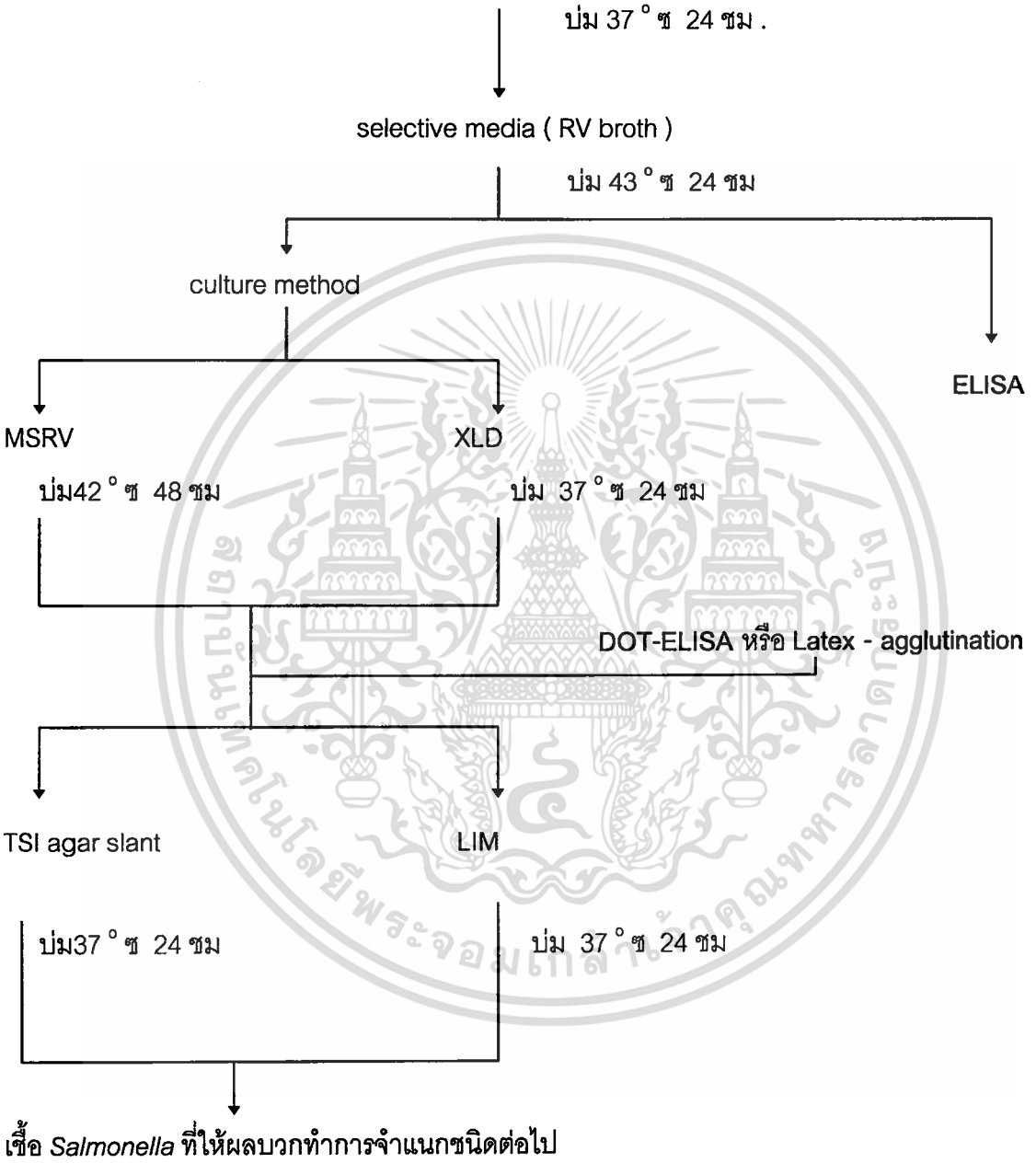
-นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* ภายหลังการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ XLD มาทดสอบ และ ซัสเพนด์ในสารละลาย diluent จำนวน 200 ไมโครลิตร

-นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ผ่านการเคลือบด้วย IgGของ rabbit anti -flagella serum มาบ่มในซัสเพนด์ชั่นเชื้อที่สงสัยเป็นเชื้อ *Salmonella*

- ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย washing buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-บ่มใน rabbit anti-*Salmonella* flagella enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย washing buffer

-บ่มใน substrate buffer

-หยุดปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำกลั่น

-ผึ่งให้แห้งและตรวจดูสีที่ปรากฏขึ้น ถ้าเกิดสีม่วงคือปฏิกิริยาผลบวก(positive) และถ้าไม่เกิดสีม่วงคือปฏิกิริยาผลลบ (negative)

3.2.6.3.4 **วิธีการตกกลุ่มของเลเทกซ์** (latex - agglutination)

-ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* ภายหลังการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV และ XLD มาทดสอบ และ ซัสเพนด์ในน้ำกลั่นที่หยดบนแผ่นสไลด์

-หยดซัสเพนด์ชั่นของเม็ดเลเทกซ์ ที่เคลือบด้วย IgGของ rabbit anti - whole cell serum ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมและเขย่าเป็นเวลา 3 -5 นาที อ่านผลการทดสอบโดยดูการตกกลุ่มของเม็ดเลเทกซ์ที่เกิดขึ้น ถ้ามีการตกกลุ่มคือปฏิกิริยาเป็นบวก (positive) และไม่มีการตกกลุ่มคือปฏิกิริยาเป็นลบ (negative)

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ทั้งสามวิธี กับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในด้านความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าคาดหวังของผลบวก (positive predictive value)และค่าคาดหวังของผลลบ (negative predictive value)

3.2.6.4 **การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากตัวอย่างเนื้อหมูและเนื้อไก่**

นำเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากตัวอย่างเนื้อหมู และเนื้อไก่มาทำการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช โดยวิธีการทดสอบเหมือนดังข้อ 3.2.2.2 แต่ทำการเคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วย IgG ของ rabbit anti - flagella serum ด้วยความเข้มข้นโปรตีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ระดับความเข้มข้นของ anti - *Salmonella* flagella HRP conjugate เท่ากับ 1 : 800

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7. เสถียรภาพของวัสดุและสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* เมื่อเก็บไว้นาน 6 เดือน

ชุดวัสดุและสารละลายที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพมีดังนี้

1. rabbit anti - *Salmonella* flagella HRP conjugate

   ภายหลังการเชื่อมโยง IgG ของ rabbit anti - flagella serum กับเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดส นำส่วนที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพทุก ๆ เดือนเป็นเวลา 6 เดือน โดยทำการทดลองเหมือนข้อ 3.2.1.2.2 และ 3.2.1.2.3 ตามลำดับ

2. แผ่นไมโครไตเตอร์เพลทเคลือบด้วย IgGของแอนติซีรัม

   นำ IgGของ rabbit anti - flagella serum ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา เคลือบบนไมโครไตเตอร์เพลท โดยละลายในสารละลาย coating buffer และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยสารละลาย washing buffer จำนวน 3 - 4 ครั้ง และนำมาบ่มในสารละลาย blocking solution ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย washing buffer จำนวน 3 - 4 ครั้ง จากนั้นนำไมโครไตเตอร์เพลทเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทในที่มืด ที่อุณหภูมิ - 70 องศาเซลเซียส และนำมาทดสอบประสิทธิภาพทุก ๆ เดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือน

3. เม็ดเลเทกซ์เคลือบด้วย IgG ของแอนติซีรัม

   เมื่อทำการเคลือบเม็ดเลเทกซ์กับ IgG ของ แอนติซีรัมแล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเม็ดเลเทกซ์ดังกล่าวมาทดสอบการตกกลุ่มกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ทุกเดือน ๆ เป็นเวลา 6 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษาหาความสัมพันธ์ของอัตราส่วนเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสกับปริมาณ IgG ของ rabbit anti-flagella serum

4.1.1 การหาอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์ออกซิเดสกับปริมาณ IgG ของ rabbit anti-flagella serum

จากการเจือจาง antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นให้มีความเข้มข้นโปรตีนเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ IgG(จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 1.45)เมื่อทำการเจือจางแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 403 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับโดยเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของเอนไซม์และ IgG พบว่า antibody - enzyme conjugate มีสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.72 ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้น

ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 403 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 นาโนเมตร	อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 403 : 208 นาโนเมตร
1.05	1.45	0.72

4.1.2 การวัดประสิทธิภาพของ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้น

เมื่อทำการตรวจสอบ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นโดยให้ทำปฏิกิริยากับ substrate OPD ต่อจากนั้นสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับเวลา พบว่า antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นภายหลังการทำปฏิกิริยากับสับสเตรท ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 1.5 เมื่อเวลามากกว่า 20 นาทีขึ้นไป (ดังตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.1) แสดงว่า antibody-enzyme conjugate มีประสิทธิภาพดีสามารถนำไปทดสอบต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

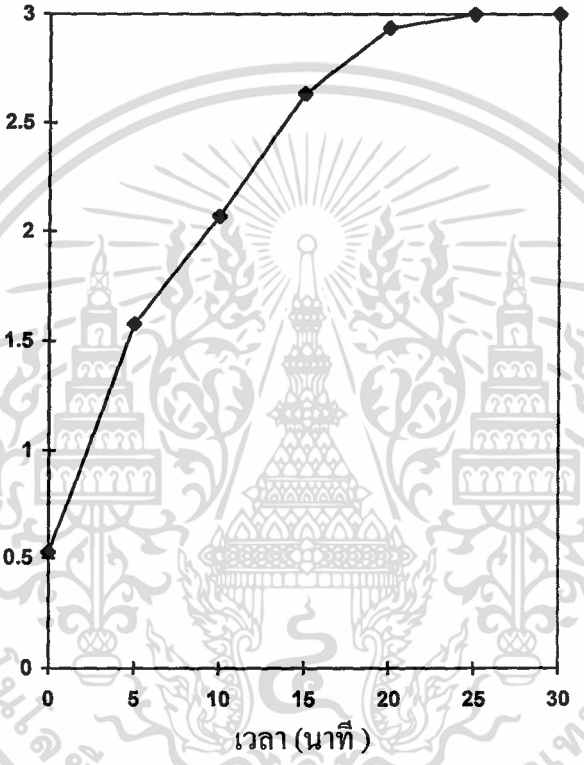
ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรกับเวลาในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของ antibody-enzyme conjugateที่เตรียมขึ้นกับ OPD substrate

เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.531	0.520	0.525
5	1.626	1.527	1.577
10	2.090	2.046	2.068
15	2.593	2.678	2.636
20	2.979	2.896	2.938
25	2.994	มากกว่า 3	มากกว่า 3
30	มากกว่า 3	มากกว่า 3	มากกว่า 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.1 ผลการวัดประสิทธิภาพของ antibody - enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้น

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นโดยวิธี direct- ELISA

จากการเคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยแอนติเจนคือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ทำปฏิกิริยากับ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นโดยทำการเจือจางแบบ 2 - fold dilution คือเริ่มจากระดับการเจือจาง 1 : 100 ถึง 1 : 204800 โดยเติมลงในหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ผลการตรวจสอบโดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร (ตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.2) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ antibody - enzyme conjugate เจือจางลงจะทำให้การจับเกาะลดลงด้วย โดยจุดที่เป็นจุดยุติการเจือจางที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าในกลุ่ม blank คือที่ระดับการเจือจาง 1 : 12800 และระดับการเจือจางของ antibody - enzyme conjugate ที่ระดับการเจือจาง 1 : 400 ถึง 1 : 800 เป็นช่วงระดับการเจือจางที่มีความเหมาะสมนำไปใช้ในเทคนิค ELISA

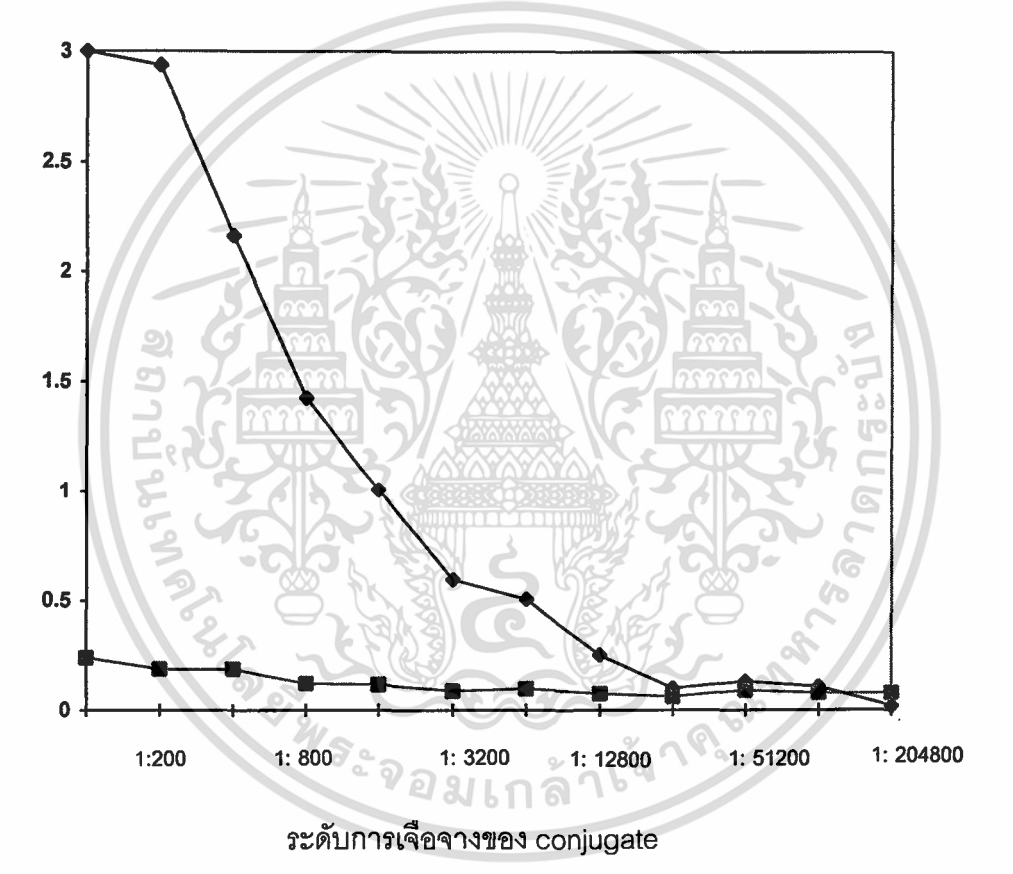
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของวิธี direct ELISA

ระดับการเจือจาง conjugate	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm	
	ความเข้มข้นเชื้อ *Salmonella* 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร	blank
1 : 100	มากกว่า 3	0.240 ± 0.040
1 : 200	2.938 ± 0.068	0.186 ± 0.043
1 : 400	2.162 ± 0.177	0.186 ± 0.041
1 : 800	1.424 ±0.098	0.121 ± 0.013
1 : 1600	1.005 ± 0.108	0.115 ± 0.033
1 : 3200	0.595 ± 0.057	0.086 ± 0.011
1 : 6400	0.506 ± 0.182	0.097 ± 0.014
1 : 12800	0.251 ± 0.040	0.074 ± 0.011
1 : 25600	0.150 ± 0.096	0.060 ± 0.026
1 : 51200	0.130 ± 0.026	0.090 ± 0.024
1 : 102400	0.107 ± 0.026	0.077 ± 0.015
1 : 204800	0.018 ± 0.057	0.083 ± 0.011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นโดยวิธี direct- ELISA



ทำการเคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยแอนติเจนคือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (◆) และใช้ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นที่ระดับการเจือจางต่างกัน (■) แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ blank

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการใช้ antibody-enzyme conjugate ในการตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช

4.2.1 การทดสอบใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทและใช้ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

การทดสอบหาความเข้มข้นและสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบ IgG ของ rabbit anti - whole cell serum ทำโดยเจือจาง IgG ใน carbonate buffer พีเอช 9.6 สำหรับ IgG ของ rabbit anti - whole cell serum ใช้ที่ระดับความเข้มข้น 10 , 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลายที่เตรียมลงในไมโครไตเตอร์เพลท บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และใช้แอนติเจนที่ทดสอบคือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ความเข้มข้น 10^8 , 10^7 และ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antibody - enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นโดยนำมาเจือจางแบบ 2 - fold dilution โดยเริ่มจากความเข้มข้น 1 : 200 ถึง 1 : 3200 โดยผลการทดสอบดังตารางที่ 4.4 - 4.6 และภาพที่ 4.3 - 4.5

4.2.2 การทดสอบใช้ IgG ของ rabbit anti-flagela serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทและใช้ *Salmonella typhimurium* เป็นแอนติเจน

สำหรับการใช้ IgG ของ rabbit anti - flagella serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทที่ระดับความเข้มข้นโปรตีน 5 , 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7 - 4.9 และภาพที่ 4.6 - 4.8

ผลการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 พบว่าเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti - flagella serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ IgG ของ rabbit anti - whole cell serum นอกจากนี้พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ antibody - enzyme conjugate เจือจางลง การจับเกาะจะลดลงด้วย สภาวะที่มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจหาเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

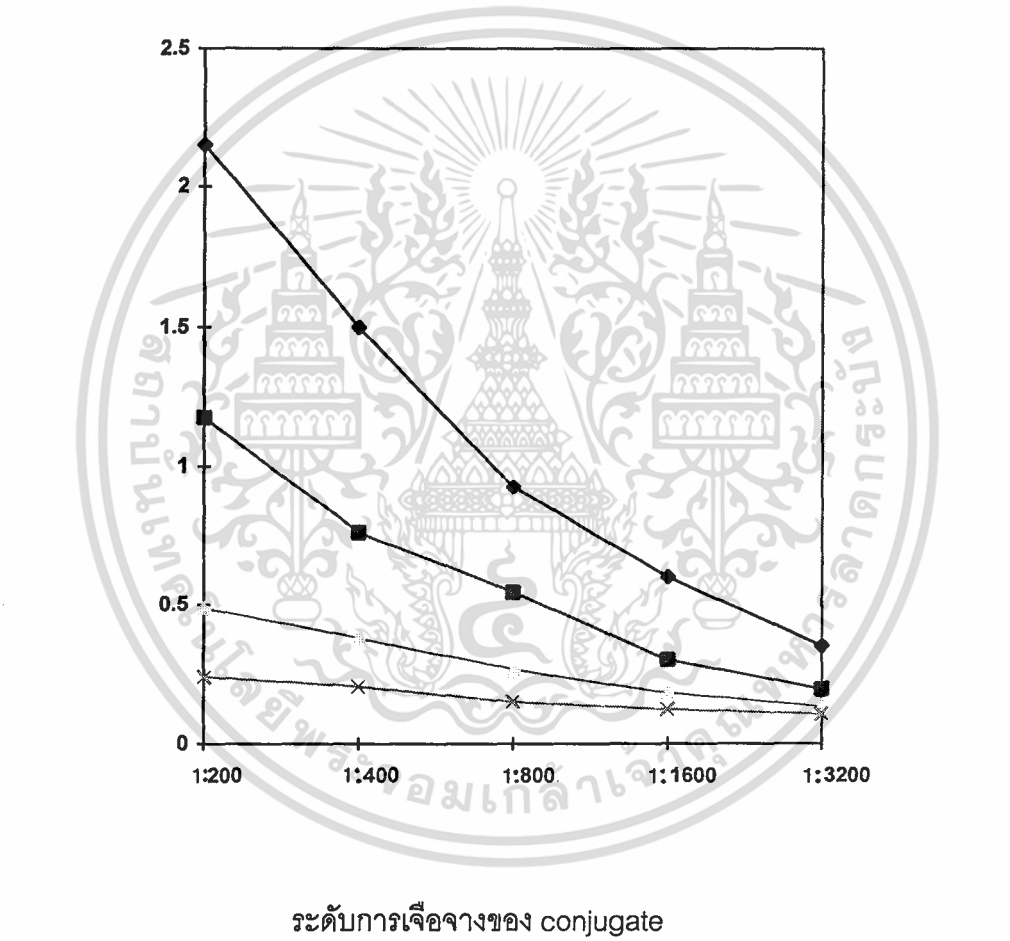
Salmonella typhimurium ATCC 14028 โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช คือ เมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti - whole cell serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทที่ระดับความเข้มข้นโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และระดับความเข้มข้นของ antibody - enzyme conjugate เท่ากับ 1 : 400 หรือใช้ IgG ของ rabbit anti -flagella serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลท ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ระดับความเข้มข้นของ antibody - enzyme conjugate เท่ากับ 1 : 800

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิชเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell serum ความเข้มข้นโปรตีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ระดับการเจือจางของ conjugate	OD. ที่ 492 nm / ระดับความเข้มข้นเชื้อ *Salmonella* (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	10^8	10^7	10^6	blank
1:200	2.151 ±0.089	1.175±0.129	0.488±0.074	0.238±0.030
1:400	1.497 ±0.112	0.758±0.143	0.380±0.047	0.204±0.017
1:800	0.925 ±0.096	0.536±0.070	0.263±0.035	0.151±0.011
1:1600	0.597±0.059	0.299±0.058	0.183±0.045	0.123±0.023
1:3200	0.348±0.065	0.195±0.014	0.137±0.042	0.107±0.029

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช



ใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยความเข้มข้นโปรตีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC14028 ที่ความเข้มข้น 10^8 (◆) ,10^7 (■) และ 10^6 (▲) เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน และ (✕) แทนค่าการดูดกลืนแสงของ blank ทำปฏิกิริยากับ antibody - enzyme conjugate ในระดับการเจือจางต่าง ๆ กัน

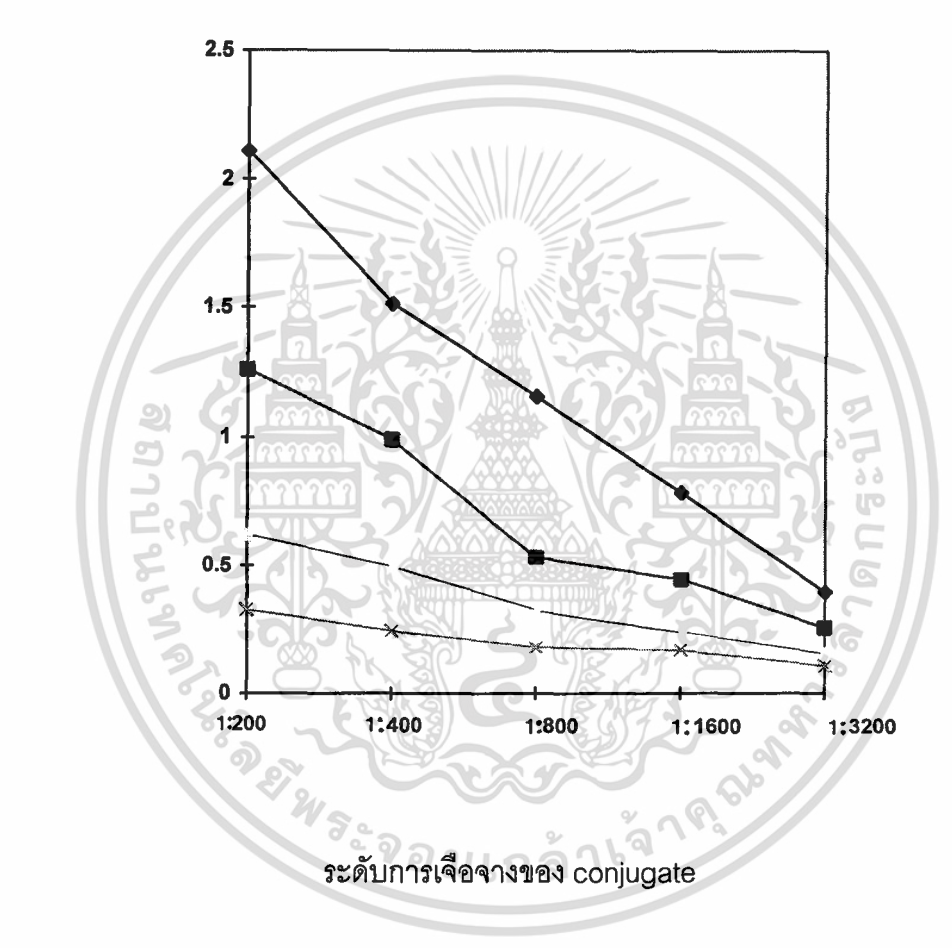
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิชเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell serum ความเข้มข้นโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ระดับการเจือจางของ conjugate	OD. ที่ 492 nm / ความเข้มข้นเชื้อ *Salmonella* (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	10^8	10^7	10^6	blank
1:200	2.111±0.124	1.260±0.159	0.626±0.010	0.326±0.026
1:400	1.513±0.136	0.991±0.163	0.497±0.044	0.243±0.031
1:800	1.157±0.098	0.533±0.042	0.320±0.070	0.180±0.019
1:1600	0.789±0.057	0.444±0.058	0.241±0.045	0.166±0.068
1:3200	0.396±0.041	0.255±0.032	0.154±0.037	0.105±0.030

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช



ใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยความเข้มข้นโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC14028 เป็นแอนติเจนที่ความเข้มข้น 10^8(◆) , 10^7(■) และ 10^6 (▲)เซลล์ต่อมิลลิลิตรและ(X) แทนค่าการดูดกลืนแสงของ blank ทำปฏิกิริยากับ antibody - enzyme conjugate ในระดับการเจือจางต่าง ๆ กัน

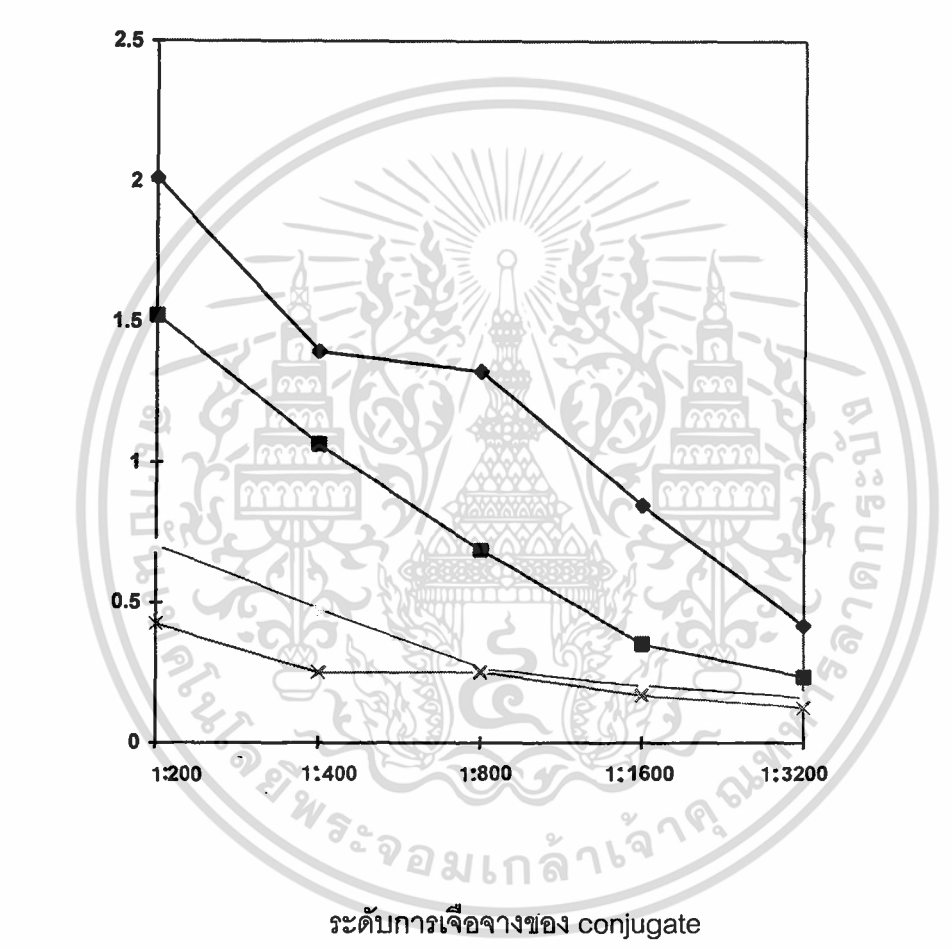
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิชเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell serum ความเข้มข้นโปรตีน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ระดับการเจือจางของ conjugate	OD. ที่ 492 nm / ความเข้มข้นเชื้อ *Salmonella*(เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	10^8	10^7	10^6	blank
1:200	2.012±0.186	1.523±0.096	0.706±0.035	0.423±0.042
1:400	1.393±0.147	1.064±0.043	0.478±0.456	0.248±0.032
1:800	1.323±0.056	0.689±0.055	0.267±0.074	0.250±0.039
1:1600	0.847±0.022	0.351±0.032	0.206±0.019	0.168±0.011
1:3200	0.416±0.048	0.232±0.023	0.158±0.010	0.125±0.010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช



ใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยความเข้มข้นโปรตีน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC14028 เป็นแอนติเจนที่ความเข้มข้น 10^8 (◆), 10^7(■) และ 10^6(▲)เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ (X) แทนค่าการดูดกลืนแสงของ blank ทำปฏิกิริยากับ antibody - enzyme conjugate ในระดับการเจือจางต่าง ๆ กัน

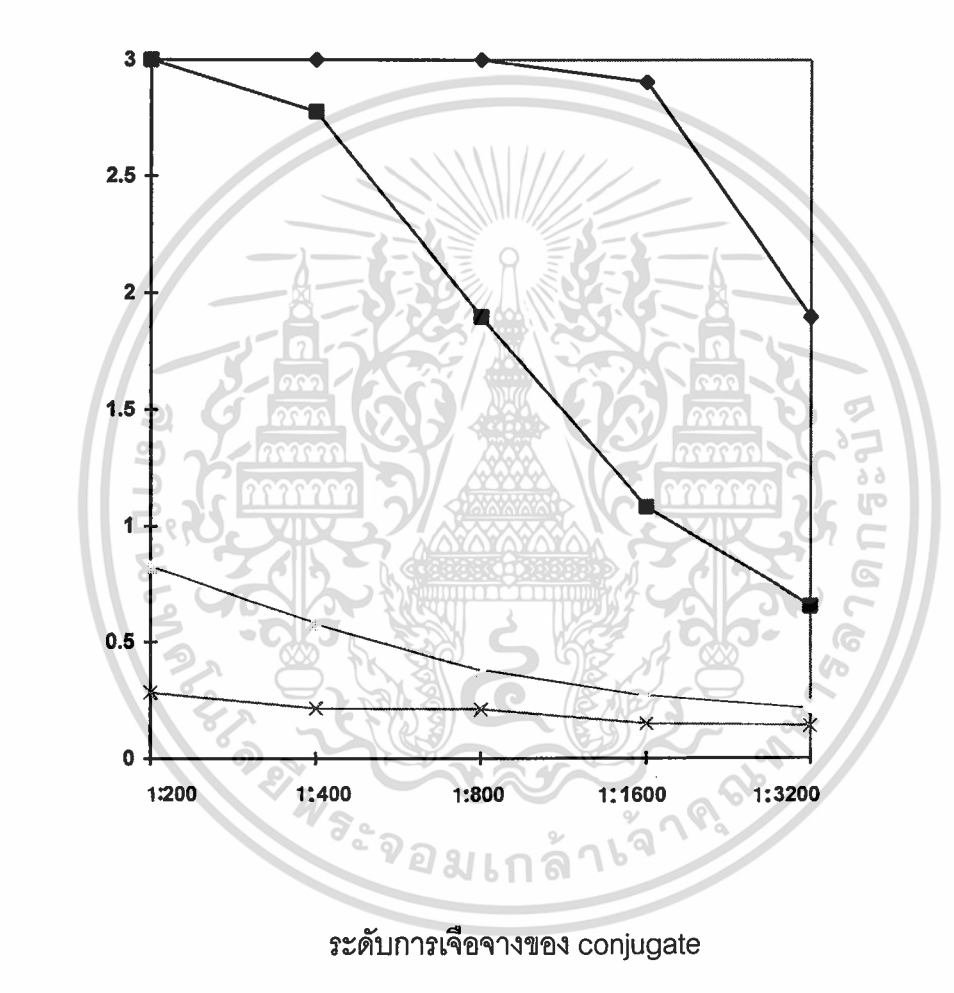
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิชเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum ความเข้มข้นโปรตีน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ระบบการเจือจางของ conjugate	OD. ที่ 492 nm / ความเข้มข้นเชื้อ *Salmonella* (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	10^8	10^7	10^6	blank
1:200	มากกว่า 3	มากกว่า 3	0.821±0.031	0.284±0.011
1:400	มากกว่า 3	2.776±0.045	0.574±0.028	0.215±0.024
1:800	มากกว่า 3	1.899±0.025	0.383±0.045	0.211±0.039
1:1600	2.905±0.060	1.082±0.085	0.269±0.020	0.149±0.020
1:3200	1.896±0.088	0.647±0.025	0.222±0.018	0.139±0.012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช



ใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยความเข้มข้นโปรตีน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC14028 เป็นแอนติเจนที่ความเข้มข้น 10^8 (◆), 10^7 (■) และ 10^6 (▲)เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ (×) แทนค่าการดูดกลืนแสงของ blank ทำปฏิกิริยากับ antibody - enzyme conjugate ในระดับการเจือจางต่าง ๆ

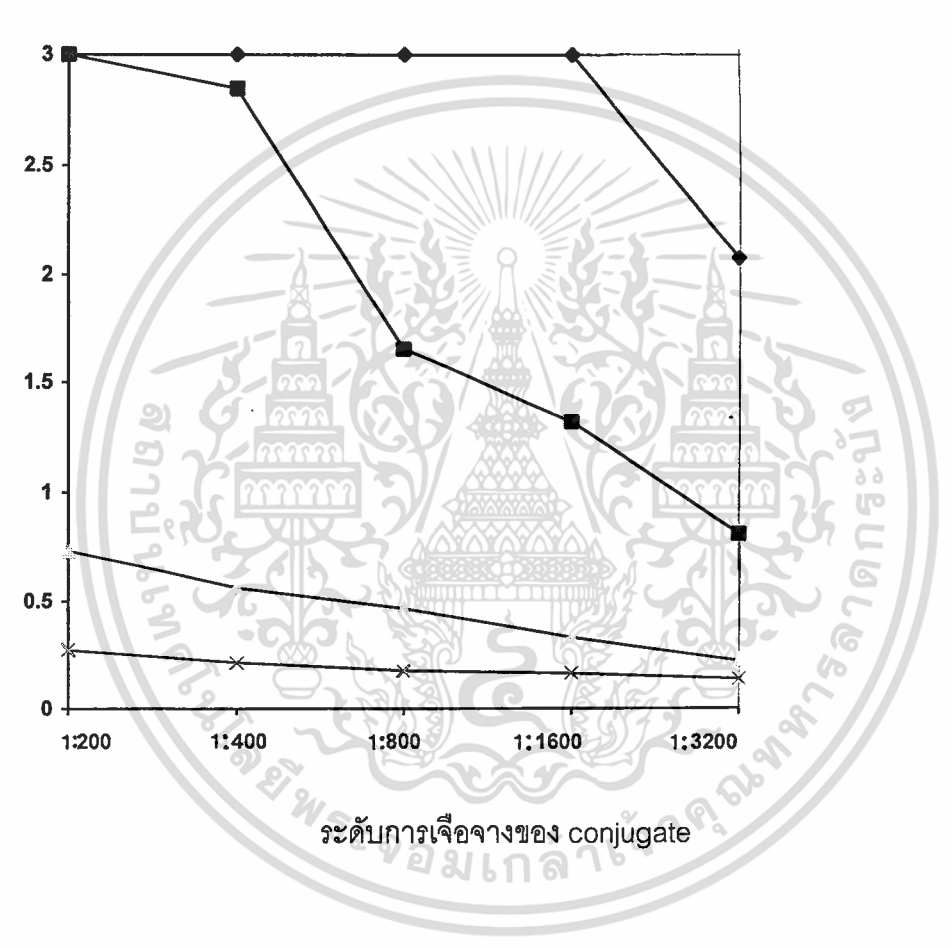
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิชเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum ความเข้มข้นโปรตีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ระดับการเจือจางของ conjugate	OD. ที่ 492 nm / ความเข้มข้นเชื้อ *Salmonella* (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	10^8	10^7	10^6	blank
1:200	มากกว่า 3	มากกว่า 3	0.735±0.070	0.274±0.017
1:400	มากกว่า 3	2.844±0.178	0.560±0.053	0.214±0.013
1:800	มากกว่า 3	1.653±0.200	0.465±0.034	0.176±0.015
1:1600	มากกว่า 3	1.320±0.206	0.329±0.013	0.164±0.013
1:3200	2.073±0.090	0.811±0.125	0.223±0.018	0.136±0.021

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช



ใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยความเข้มข้นโปรตีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC14028 เป็นแอนติเจน ที่ความเข้มข้น 10^8(◆) , 10^7(■) และ 10^6 (▲)เซลล์ต่อมิลลิลิตรและ (X) แทนค่าการดูดกลืนแสงของ blank ทำปฏิกิริยากับ antibody - enzyme conjugate ในระดับการเจือจางต่าง ๆกัน

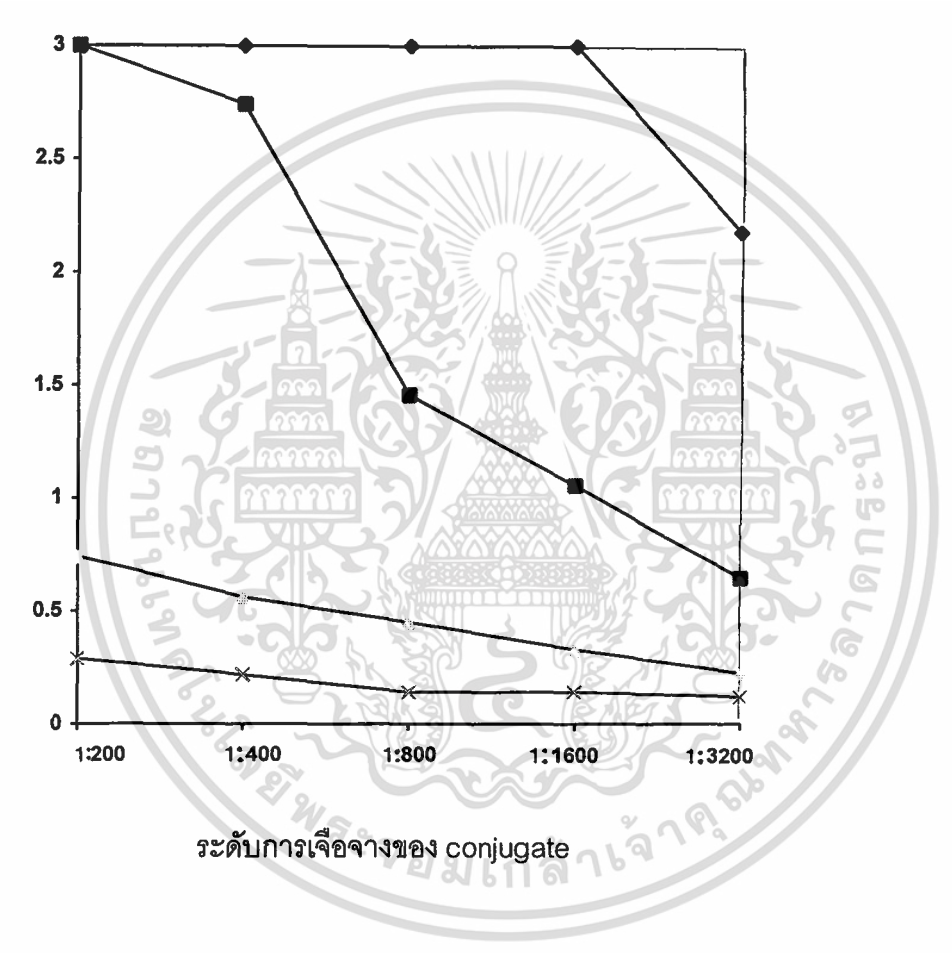
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิชเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum ความเข้มข้นโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ระดับการเจือจางของ conjugate	OD. ที่ 492 nm / ความเข้มข้นเชื้อ *Salmonella*(เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	10^8	10^7	10^6	blank
1:200	มากกว่า 3	มากกว่า 3	0.739±0.066	0.286±0.013
1:400	มากกว่า 3	2.740±0.348	0.561±0.053	0.217±0.011
1:800	มากกว่า 3	1.456±0.146	0.465±0.034	0.142±0.012
1:1600	มากกว่า 3	1.057±0.089	0.329±0.013	0.140±0.018
1:3200	2.177±0.071	0.643±0.047	0.223±0.017	0.121±0.013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของ conjugate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช



ใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยความเข้มข้นโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC14028เป็นแอนติเจน ที่ความเข้มข้น 10^8 (◆), 10^7 (■) และ 10^6 (▲)เซลล์ต่อมิลลิลิตรและ (X) แทนค่าการดูดกลืนแสงของ blank ทำปฏิกิริยากับ antibody - enzyme conjugate ในระดับการเจือจางต่าง ๆ กัน .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยเทคนิค DOT-ELISA

เมื่อทำการเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย IgG ของ rabbit anti-flagella serum ใน coating buffer ที่ความเข้มข้นโปรตีน 30 , 25 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาล้างด้วย PBS - T แล้วนำไปตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ระดับความเข้มข้น 10^{8} ,10^{7} , 10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตรและบ่มใน anti-flagella *Salmonella* enzyme conjugate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วตรวจดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายหลังการบ่มใน substrate buffer พบว่าสามารถทำการตรวจสอบเชื้อได้ดีที่ระดับความเข้มข้น 10^{8} (ตามตารางที่ 4.10) ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อ 10^{7} และ 10^{6} (ตามตารางที่ 4.11และ 4.12)ให้ผลบวกเล็กน้อย แม้ว่าทำการเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนในการเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็นที่ระดับ 45 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเพิ่มระดับความเข้มข้นของ conjugate เป็น 1: 50 และการเพิ่มความเข้มข้นดังกล่าวทำให้เกิดแบลคกราวน์สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยอาศัยเทคนิค DOT-ELISA

ความเข้มข้นโปรตีนบนไนโตรเซลลูโลส (μg / ml)	ระดับการเจือจาง conjugate		
	1:100	1:200	1:400
30	+++	++	+
25	+++	++	+
20	+++	++	+

+++ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงเข้ม บนแผ่น ไนโตรเซลลูโลส

++ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วง บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

\+ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงจาง ๆ บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

\- แสดงปฏิกิริยาผลลบโดยไม่ปรากฏสีม่วง บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยอาศัยเทคนิค DOT-ELISA

ความเข้มข้นโปรตีนบนไนโตรเซลลูโลส (μg / ml)	ระดับการเจือจาง conjugate		
	1 :100	1:200	1:400
30	+++	++	+
25	++	+	-
20	++	+	-

+++ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงเข้ม บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

++ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วง บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

+ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงจาง ๆ บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

- แสดงปฏิกิริยาผลลบโดยไม่ปรากฏสีม่วง บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยอาศัยเทคนิค DOT-ELISA

ความเข้มข้นโปรตีนบนไนโตรเซลลูโลส (µg / ml)	ระดับการเจือจาง conjugate		
	1:100	1:200	1:400
30	+	-	-
25	+	-	-
20	+	-	-

+++ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงเข้ม บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

++ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วง บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

+ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงจาง ๆ บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

- แสดงปฏิกิริยาผลลบโดยไม่ปรากฏสีม่วง บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination)

เมื่อทำการเคลือบเม็ดเลเทกซ์ด้วย IgGของ rabbit anti-flagella serum , rabbit anti-whole cell serum และ normal rabbit serum ผสมกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 บนแผ่นสไลด์ และตรวจดูการตกกลุ่มที่เกิดขึ้น ผลการทดสอบ (ดังตารางที่ 4.13) พบว่า เม็ดเลเทกซ์ที่เคลือบด้วย IgG ของ rabbit anti-flagella serum สามารถเกิดปฏิกิริยาตกกลุ่มกับเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนเม็ดเลเทกซ์ที่เคลือบด้วย IgG ของ rabbit anti-whole cell serum เกิดปฏิกิริยาที่ระดับความเข้มข้นเชื้อต่ำสุด 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.13 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex-agglutination)

การเคลือบเม็ดเลเทกซ์ด้วย IgG	ความเข้มข้นเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028			
	10^9	10^8	10^7	10^6
anti-flagella serum	+	+	-	-
anti- whole cell serum	+	+	+	-
normal rabbit serum	-	-	-	-

+ แสดงว่ามีการตกกลุ่มเกิดขึ้น

- แสดงว่าไม่มีการตกกลุ่มเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การศึกษา cross-reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ล-แอนติบอดีแซนวิช DOT-ELISA และปฏิกิริยาตกกลุ่ม (latex-agglutination)

นำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตรมาทดสอบด้วยเทคนิค ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เทคนิค Dot-ELISA และปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ พบว่าเทคนิค ELISA ไม่เกิด cross-reaction กับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบคือ *Shigella flexneri* , *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 , *Enterobacter cloacae* , *Citrobacter freundii* ,*Proteus mirabilis* , *Escherichia coli* ATCC 25922 และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* ATCC 6633 , *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P โดยวิธี ELISA ให้ผลบวกกับเชื้อ *Salmonella* ทุกสายเชื้อที่นำมาทดสอบและให้ค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกัน โดยเชื้อ *Salmonella typhimurium* ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงและ *Salmonella agona*, *Salmonella derby* , *Salmonella* sp. ให้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงต่ำ (ดังตารางที่ 4.14) ในเทคนิค Dot-ELISA ให้ผลเช่นเดียวกับเทคนิค ELISA แต่ให้ผลลบกับเชื้อ *Salmonella* sp. (ดังตารางที่ 4.15) ส่วนปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ให้ผลเช่นเดียวกับเทคนิค ELISA คือ ให้ผลบวกกับเชื้อ *Salmonella* ทุกสายเชื้อที่นำมาทดสอบ (ดังตารางที่ 4.16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.14 ผลการศึกษาcross-reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ล-แอนติบอดีแซนวิช

แบคทีเรีย	OD. ที่492 nm	ผลการวิคราะห์โดยวิธีELISA
1.*Salmonella typhimurium* ATCC14028	มากกว่า 3	+
2.*Salmonella typhimurium* S 292	มากกว่า 3	+
3.*Salmonella typhimurium*	มากกว่า 3	+
4.*Salmonella agona*	0.281	+
5.*Salmonella derby*	0.456	+
6.*Salmonella heidelberg*	2.000	+
7.*Salmonella weltreveden*	0.621	+
8.*Salmonella orion*	0.967	+
9.*Salmonella* sp.	0.273	+
10.*Shigella flexneri*	0.215	-
11.*Shigella sonnei*	0.212	-
12.*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031	0.145	-
13.*Enterobacter cloacae*	0.150	-
14.*Citrobacter freundii*	0.166	-
15.*Proteus mirabilis*	0.164	-
16.*Escherichia coli* ATCC 25922	0.187	-
17.*Bacillus subtilis* ATCC 6633	0.193	-
18.*Staphylococcus aureus* ATCC6538 P	0.138	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ผลการศึกษา cross-reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิค Dot-ELISA

แบคทีเรีย	ผลการวิเคราะห์โดยวิธี DOT - ELISA
1.*Salmonella typhimurium* ATCC14028	+++
2.*Salmonella typhimurium* S 292	+++
3.*Salmonella typhimurium*	+++
4.*Salmonella agona*	+
5.*Salmonella derby*	+
6.*Salmonella heidelberg*	++
7.*Salmonella weltreveden*	+
8.*Salmonella orion*	+
9.*Salmonella* sp.	-
10.*Shigella flexneri*	-
11.*Shigella sonnei*	-
12.*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031	-
13.*Enterobacter cloacae*	-
14.*Citrobacter freundii*	-
15.*Proteus mirabilis*	-
16.*Escherichia coli* ATCC 25922	-
17.*Bacillus subtilis* ATCC 6633	-
18.*Staphylococcus aureus* ATCC6538 P	-

+++ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงเข้ม บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

++ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วง บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

+ แสดงปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงจาง ๆ บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

- แสดงปฏิกิริยาผลลบโดยไม่ปรากฏสีม่วง บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.16 ผลการศึกษา cross-reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยอาศัยปฏิกิริยาตกกลุ่ม (latex-agglutination)

แบคทีเรีย	F-LATEX	W-LATEX	NRS-LATEX
1.*Salmonella typhimurium* ATCC14028	+	+	-
2.*Salmonella typhimurium* S 292	+	+	-
3.*Salmonella typhimurium*	+	+	-
4.*Salmonella agona*	+	+	-
5.*Salmonella derby*	+	+	-
6.*Salmonella heidelberg*	+	+	-
7.*Salmonella weltreveden*	+	+	-
8.*Salmonella orion*	+	+	-
9.*Salmonella* sp.	+	+	-
10.*Shigella flexneri*	-	-	-
11.*Shigella sonnei*	-	-	-
12.*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031	-	-	-
13.*Enterobactor cloacae*	-	-	-
14.*Citrobacter freundii*	-	-	-
15.*Proteus mirabilis*	-	-	-
16.*Escherichia coli* ATCC 25922	-	-	-
17.*Bacillus subtilus* ATCC 6633	-	-	-
18.*Staphylococcus aureus* ATCC6538 P	-	-	-

เม็ดเลเทกซ์เคลือบด้วยแอนติซีรัม 3 ชนิดคือ rabbit anti-flagella serum (F-LATEX) , rabbit anti-whole cell serum (W-LATEX) และ normal rabbit serum (NRS-LATEX) ใช้เป็นกลุ่มควบคุม (+) พบการตกกลุ่มเกิดขึ้น และ (-) ไม่พบการตกกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารโดยตรงเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)

4.6.1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่าง

เมื่อนำตัวอย่างคือเนื้อปลา กุ้ง ปลาหมึก หมู และ ไก่ นำมานึ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้นเชื้อ 2-5 เซลล์ ต่ออาหาร 25 กรัม บ่มใน Buffer peptone water เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลง RV - broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์โดยวิธี ELISA เทคนิค Dot-ELISA และปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex - agglutination) พบว่าทั้งสามวิธีสามารถใช้ตรวจสอบเชื้อ *Salmonella typhimurium* ที่เติมลงไปในตัวอย่างอาหารที่มีการทำลายเชื้อที่ปะปนมากับตัวอย่างได้เป็นผลสำเร็จ (ตามตารางที่ 4.17) และผลการทดสอบโดยการปั่นสารละลาย RV-broth แล้วนำมาวิเคราะห์กับผลการทดลองที่นำสารละลาย RV-broth มาวิเคราะห์โดยตรงพบว่าให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน

4.6.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อตามธรรมชาติ

จากการนำตัวอย่างเนื้อปลา กุ้ง ปลาหมึก หมู และไก่ มาทดสอบเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.6.1 แต่ไม่ทำลายเชื้อที่ปะปนมากับตัวอย่างอาหารจากนั้นนำสารละลาย RV-broth ภายหลังการบ่มมาวิเคราะห์พบว่าการปั่นสารละลาย RV-broth ก่อนนำมาวิเคราะห์ให้ผลการทดสอบในเทคนิค ELISA ดีกว่าการนำสารละลาย RV-broth มาวิเคราะห์โดยตรง ดังนั้นทำการเลือกขั้นตอนนี้มาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี ELISA ส่วนเทคนิค Dot-ELISA และปฏิกิริยาตกกลุ่ม ให้ผลการทดสอบไม่เด่นชัดในขั้นตอนนี้ (ดังตารางที่ 4.18) ดังนั้นจึงทำการเพิ่มขั้นตอนการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD หรือ MSRV โดยพบว่าภายหลังการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวแล้วนำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* นำมาทดสอบกับเทคนิค Dot-ELISA พบว่าเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาผลบวกเด่นชัดในตัวอย่างอาหารที่มีการเติมเชื้อ *Salmonella* ลงไป ส่วนปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* และนำมาซัสเพนด์ในน้ำกลั่นที่หยดบนแผ่นสไลด์แล้วนำมาทดสอบการตกกลุ่มพบว่าสามารถเกิดการตกกลุ่มกับโคโลนีที่เจริญมาจากตัวอย่างอาหารที่มีการเติมเชื้อลงไปดังนั้นทำการเลือกขั้นตอนนี้มาตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยเทคนิค Dot-ELISA และปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่าง

ระดับการ inoculation ต่ออาหาร 25 กรัม	ELISA ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm		Dot-ELISA		ปฏิกิริยาตกกลุ่ม		ความเข้มข้นของเชื้อภายหลังการบ่มใน RV-broth (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
	ปั่น	ไม่ปั่น	ปั่น	ไม่ปั่น	ปั่น	ไม่ปั่น	
2-5 เซลล์ / ปลา	มากกว่า 3(+)	2.157 (+)	+++	+++	+	+	$1.4x10^8$
2-5 เซลล์ / กุ้ง	มากกว่า 3(+)	มากกว่า 3(+)	+++	+++	+	+	$2.2x10^8$
2-5 เซลล์ / ปลาหมึก	มากกว่า 3(+)	1.672 (+)	+++	+++	+	+	$6.5x10^7$
2-5 เซลล์ / ไก่	มากกว่า 3(+)	มากกว่า 3(+)	+++	+++	+	+	$5.3x10^8$
2-5 เซลล์ / หมู	มากกว่า 3(+)	มากกว่า 3(+)	+++	+++	+	+	$3.9x10^8$
blank	0.418	0.398	-	-	-	-	-

วิธี ELISA (+)แสดงการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* (-)แสดงการตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella*

เทคนิค Dot-ELISA (+++)ปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงเข้มบนแผ่น NC (++) ปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงบนแผ่น NC

(+) ปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงจาง ๆ บนแผ่น NC (-) ปฏิกิริยาผลลบโดยไม่ปรากฏสีม่วงบนแผ่น NC

ปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (+) เกิดการตกกลุ่มขึ้น (-)ไม่พบการตกกลุ่ม

ตารางที่ 4.18 การตรวจวิเคราะห์โดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อตามธรรมชาติ

ระดับการ inoculation ต่อ อาหาร 25 กรัม	ELISA ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm		Dot-ELISA		ปฏิกิริยาตกกลุ่ม		ความเข้มข้นของเชื้อภายหลังการบ่มใน RV - broth (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
	ปัน	ไม่ปัน	ปัน	ไม่ปัน	ปัน	ไม่ปัน	
2-5 เซลล์ / ปลา	2.404(+)	1.638(-)	+	+	+	-	1.8×10^{8}
2-5 เซลล์ / กุ้ง	2.435(+)	0.163(-)	+	-	-	-	3.8×10^{7}
2-5 เซลล์ / ปลาหมึก	0.846(+)	0.376(-)	+	+	-	-	1.0×10^{7}
2-5 เซลล์ / ไก่	1.095(+)	0.252(-)	+	+	-	-	2.3×10^{8}
2-5 เซลล์ / หมู	1.221(+)	0.332(-)	+	+	-	-	5.0×10^{8}
blank	0.406	0.436	-	-	-	-	-

วิธี ELISA (+)แสดงการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* (-)แสดงการตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella*

เทคนิค Dot-ELISA (+++)ปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงเข้มบนแผ่น NC (++) ปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงบนแผ่น NC

(+) ปฏิกิริยาผลบวกโดยปรากฏสีม่วงจาง ๆ บนแผ่น NC (-) ปฏิกิริยาผลลบโดยไม่ปรากฏสีม่วงบนแผ่น NC

ปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ (+) เกิดการตกกลุ่มขึ้น (-)ไม่พบการตกกลุ่ม

4.6.3 ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* โดยตรงในตัวอย่างอาหาร

นำตัวอย่างอาหารส่งออกจำนวน 48 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 1-48)และอาหารสดจากตลาด จำนวน 20 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 49-68) รวม 68 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี ELISA เทคนิค Dot - ELISA ปฏิกิริยาตกกลุ่มของเลเทกซ์ และวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method) ตามตารางที่ 4.19

ผลการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าวิธีนี้ให้ผลบวกจำนวน 11 ตัวอย่าง ผลลบจำนวน 52 ตัวอย่าง ผลบวกผิดพลาดจำนวน 2 ตัวอย่าง ผลลบผิดพลาด 2 ตัวอย่าง มีความไว (sensitivity) เท่ากับ 84.61 % ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 96.36% ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) เท่ากับ 84.62%, ค่าคาดหวังผลลบ (negative predictive value) เท่ากับ 96.36 % ดังตารางที่ 4.20

ผลการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Dot-ELISA เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าวิธีนี้ให้ผลบวกจำนวน 12 ตัวอย่าง ผลลบจำนวน 55 ตัวอย่าง ผลลบผิดพลาด 1 ตัวอย่าง มีความไว (sensitivity) เท่ากับ 92.31 % ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 100 % ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) เท่ากับ 100 % ค่าคาดหวังผลลบ (negative predictive value) เท่ากับ 98.21 % ดังตารางที่ 4.21

ผลการตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าวิธีนี้ให้ผลบวกจำนวน 12 ตัวอย่าง ผลลบจำนวน 53 ตัวอย่าง ผลบวกผิดพลาดจำนวน 2 ตัวอย่าง ผลลบผิดพลาด 1 ตัวอย่าง มีความไว (sensitivity) เท่ากับ 92.31 % ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 96.36 % ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) เท่ากับ 85.71 % ค่าคาดหวังผลลบ (negative predictive value) เท่ากับ 98.15 % ดังตารางที่ 4.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี ELISA Dot - ELISA ปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ และวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่างอาหาร	ELISA		DOT - ELISA	ปฏิกิริยาตกกลุ่ม	วิธีculture
	OD. ที่492 nm	ผลวิเคราะห์			
1	0.288	-	-	-	-
2	0.509	-	-	-	-
3	0.426	-	-	-	-
4	0.439	-	-	-	-
5	0.773	-	-	-	-
6	0.234	-	-	-	-
7	0.353	-	-	-	-
8	0.219	-	-	-	-
9	0.326	-	-	-	-
10	0.413	-	-	-	-
11	0.380	-	-	-	-
12	0.300	-	-	--	+
13	0.454	-	-	-	-
14	0.439	-	-	--	-
15	0.252	-	-	-	-
16	0.981	-	-	-	-
17	0.977	-	-	-	-
18	0.830	-	-	-	-
19	1.235	+	-	-	-
20	1.056	-	-	-	-
21	0.909	-	-	-	-
22	0.826	-	-	-	-
23	1.088	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 (ต่อ) ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี ELISA Dot-ELISAปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ และวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

24	0.433	-	-	-	-
25	0.398	-	-	-	-
26	0.428	-	-	-	-
27	0.541	-	-	-	-
28	0.489	-	-	-	-
29	0.406	-	-	-	-
30	0.438	-	-	-	-
31	0.373	-	-	-	-
32	0.338	-	-	-	-
33	0.543	-	-	-	-
34	0.423	-	-	-	-
35	0.431	-	-	-	-
36	0.449	-	-	-	-
37	0.391	-	-	-	-
38	0.476	-	-	-	-
39	0.415	-	-	-	-
40	0.369	-	-	-	-
41	0.416	-	-	-	-
42	มากกว่า 3	+	-	-	-
43	0.506	-	-	-	-
44	0.410	-	-	-	-
45	0.454	-	-	-	-
46	0.495	-	-	-	-
47	0.394	-	-	-	-
48	0.595	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 (ต่อ) ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี ELISA Dot - ELISA ปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ และวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

49	0.360	-	-	+	-
50	0.293	-	-	-	-
51	1.410	+	+	+	+
52	1.387	+	+	+	+
53	1.744	+	+	+	+
54	0.311	-	-	-	-
55	1.247	+	+	+	+
56	1.305	+	+	+	+
57	0.293	-	-	-	-
58	0.375	-	-	+	-
59	1.541	+	+	+	+
60	1.764	+	+	+	+
61	0.911	-	+	+	+
62	0.510	-	-	-	-
63	1.469	+	+	+	+
64	0.411	-	-	-	-
65	0.314	-	-	-	-
66	1.749	+	+	+	+
67	1.170	+	+	+	+
68	1.420	+	+	+	+

วิธี ELISA ค่า OD. ของ blank เท่ากับ 0.568 และค่าที่ใช้ cut off เท่ากับ 1.136

\+ แสดงการตรวจพบเชื้อ *Salmonella*

\- แสดงการตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารจำนวน 68 ตัวอย่าง โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิชและวิธี culture method

ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ELISA	การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี culture method		รวม
	ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ	
ผลบวก	11 (a)	2 (b)	13
ผลลบ	2 (c)	53 (d)	55
รวม	13	55	68

จากตารางสามารถคำนวณประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ได้ดังนี้

ความไว (sensitivity) = a/a+c = 84.61 %

ความจำเพาะ (specificity) = d / b+d = 96.36 %

ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) = a / a+b = 84.62%

ค่าคาดหวังผลลบ (negative predictive value) = d / c+d = 96.36 %

a = ELISA true positive b = ELISA false positive

c = ELISA false negative d = ELISA true negative

ค่าที่ใช้ cut off เท่ากับ 1.136

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.21 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารจำนวน 68 ตัวอย่าง โดยวิธี DOT - ELISA และวิธี culture method

ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี DOT - ELISA	การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี culture method		รวม
	ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ	
ผลบวก	12 (a)	0 (b)	12
ผลลบ	1 (c)	55 (d)	56
รวม	13	55	68

จากตารางสามารถคำนวณประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ได้ดังนี้

ความไว (sensitivity) = a/a+c = 92.31 %

ความจำเพาะ (specificity) = d / b+d = 100.00 %

ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) = a / a+b =100.00 %

ค่าคาดหวังผลลบ (negative predictive value) = d / c+d = 98.21 %

a = DOT - ELISA true positive b = DOT - ELISA false positive

c = DOT - ELISA false negative d = DOT - ELISA true negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารจำนวน 68 ตัวอย่าง โดยอาศัยปฏิกิริยาตกกลุ่ม และวิธี culture method

ตรวจวิเคราะห์โดยปฏิกิริยาตกกลุ่ม	การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี culture method		รวม
	ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ	
ผลบวก	12 (a)	2 (b)	14
ผลลบ	1 (c)	53 (d)	54
รวม	13	55	68

จากตารางสามารถคำนวณประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ได้ดังนี้

ความไว (sensitivity) = a/a+c = 92.31 %

ความจำเพาะ (specificity) = d / b+d = 96.36 %

ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) = a / a+b =85.71 %

ค่าคาดหวังผลลบ (negative predictive value) = d / c+d = 98.15 %

a = agglutination true positive b = agglutination false positive

c = agglutination false negative d = agglutination true negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.4 ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร

จากการนำเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อหมูสด จำนวน 11 ตัวอย่าง และเนื้อไก่สดจำนวน 8 ตัวอย่างมาวิเคราะห์วิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* กับวิธี ELISAของ พัลลภา (2539) โดยทำการเคลือบไมโครไตรเตอร์เพลทด้วยความเข้มข้น IgG ของanti-flagella serum 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ระดับความเข้มข้นของ conjugate เท่ากับ 1:800 ผลการทดสอบพบว่าวิธีการทั้งสองให้ผลตรงกันดังแสดงในตารางที่ 4.23 และ 4.24 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.23 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากเนื้อหมู

เชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากเนื้อหมู *	OD. ที่ 492 nm	ผลการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช
serogroup B ตัวอย่างที่ 1	มากกว่า 3	+
serogroup B ตัวอย่างที่ 2	มากกว่า 3	+
serogroup E ตัวอย่างที่ 3	2.616	+
serogroup E ตัวอย่างที่ 4	1.704	+
serogroup E ตัวอย่างที่ 5	1.165	+
serogroup E ตัวอย่างที่ 6	มากกว่า 3	+
serogroup E ตัวอย่างที่ 7	2.002	+
serogroup E ตัวอย่างที่ 8	1.309	+
serogroup E ตัวอย่างที่ 9	1.736	+
serogroup E ตัวอย่างที่ 10	2.046	+
serogroup I ตัวอย่างที่ 11	1.371	+

* เชื้อ *Salmonella* ได้จากตัวอย่างเนื้อหมู (พัลลภา , 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.24 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากตัวอย่างเนื้อไก่

เชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากเนื้อไก่*	ค่า OD.ที่ 492 nm	ผลการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช
serogroup C จากตัวอย่างที่ 1	1.198	+
serogroup C จากตัวอย่างที่ 2	2.203	+
serogroup C จากตัวอย่างที่ 3	1.120	+
serogroup C จากตัวอย่างที่ 4	1.268	+
serogroup B จากตัวอย่างที่ 5	มากกว่า 3	+
serogroup B จากตัวอย่างที่ 6	2.597	+
serogroup E จากตัวอย่างที่ 7	1.449	+
serogroup E จากตัวอย่างที่ 8	มากกว่า 3	+

* เชื้อ *Salmonella* ได้จากตัวอย่างเนื้อไก่ (พัลลภา , 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 เสถียรภาพอายุการเก็บรักษาของวัสดุและสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella*

เมื่อทำการเตรียมชุดสารเคมีคือแผ่นไมโครไตเตอร์เพลทเคลือบด้วย IgG ของแอนติซีรัม กับ antibody-enzyme conjugate และ เม็ดเลเทกซ์เคลือบด้วย IgG ของแอนติซีรัม และเก็บไว้จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพทุกเดือน เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าชุดสารเคมีดังกล่าวมีประสิทธิภาพดี สามารถใช้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ได้ (ตารางที่ 4.25)

ตารางที่ 4.25 เสถียรภาพและอายุในการเก็บรักษาของวัสดุและสารละลายที่เตรียมขึ้นสำหรับตรวจหาเชื้อ *Salmonella* เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ชุดวัสดุและสารละลายที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพการเก็บรักษา	ระยะเวลา (เดือน)					
	1	2	3	4	5	6
A. 1.1 แผ่นไมโครไตเตอร์เพลทเคลือบ IgG ของแอนติซีรัม	+	+	+	+	+	+
1.2 antibody - enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้น	+	+	+	+	+	+
B. เม็ดเลเทกซ์เคลือบด้วย IgG ของแอนติซีรัม	+	+	+	+	+	+

+ แสดงความมีเสถียรภาพของสารเคมีที่ทำการเตรียม โดยไมโครไตเตอร์เพลททำการเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส , antibody - enzyme conjugate เก็บที่ - 20 องศาเซลเซียส , เม็ดเลเทกซ์เคลือบด้วย IgG แอนติซีรัม เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร โดยอาศัยเทคนิค ELISA Dot-ELISA และปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ (latex - agglutination) เพื่อเป็นแนวทางในการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร ในเทคนิค ELISA และ Dot-ELISA มีความจำเป็นต้องใช้ antibody-enzyme conjugate เป็นส่วนสำคัญในการวิเคราะห์ ดังนั้นในการศึกษาจึงเชื่อมโยง IgG ของ rabbit anti-flagella serum กับเอนไซม์ฮอสเรดีสเปอร์-ออกซิเดส และทำการทดสอบคุณสมบัติของคอนจูเกตที่เตรียมขึ้น ขั้นตอนแรกเป็นการตรวจดูอัตราส่วนของเอนไซม์กับ IgG ในคอนจูเกตที่เตรียมขึ้นโดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 403 และ 280 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.75 ขั้นตอนที่สองเป็นการทดสอบการทำปฏิกิริยากับ สับสเตรทโดยทำการเจือจางใน substrate OPD ต่อจากนั้นสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับเวลา พบว่าคอนจูเกตที่เตรียมขึ้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร มากกว่า 1.5 เมื่อเวลามากกว่า 20 นาที เป็นต้นไปแสดงว่าคอนจูเกตที่เตรียมขึ้นมีประสิทธิภาพดี เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาในขั้นต่อไป ขั้นตอนสุดท้ายของการตรวจสอบคุณภาพ คือการหาค่าไตเตอร์ของคอนจูเกตโดยวิธี direct - ELISA โดยการเคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยแอนติเจนคือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ทำปฏิกิริยากับคอนจูเกตที่เตรียมขึ้นที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ พบว่าระดับการเจือจางที่ 1 : 12800 เป็นระดับการเจือจางสุดท้ายที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าค่าของ blank และระดับการเจือจางที่เหมาะสมนำไปวิเคราะห์ ELISA คือช่วงระดับค่าการดูดกลืนแสง 1.5 - 2.0 โดยจากการทดลองเป็นที่ระดับการเจือจางที่1 : 400 ถึง 1 : 800 จากการเตรียมคอนจูเกต พบว่าแอนติบอดีที่ใช้ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ก่อนโดยใช้ DEAE cellulose แล้วนำมาเชื่อมโยงกับเอนไซม์ การนำแอนติบอดีที่ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตเพียงอย่างเดียวพบว่าแอนติบอดีดังกล่าวมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอมีผลทำให้ antibody-enzyme conjugate ที่เตรียมขึ้นเกิดปฏิกิริยากับ non-specific binding ต่าง ๆ สูงขึ้นและมีไตเตอร์อยู่ในระดับต่ำ ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ทดสอบต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช พบว่าเมื่อทำการเคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วย IgG ของ rabbit anti-whole cell ที่ความเข้มข้นโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นของคอนจูเกตเท่ากับ 1 : 400 หรือ เมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับคอนจูเกตเท่ากับ 1 : 800 เป็นระดับที่มีความเหมาะสมจากการศึกษาพบว่า IgG ของ rabbit anti-flagella serum ใช้เคลือบไมโครไตเตอร์เพลทมีประสิทธิภาพดีกว่า IgG ของ rabbit anti-whole cell serum ดังนั้นจึงเลือกใช้ rabbit anti-flagella serum ในการทดสอบ Dot-ELISA ต่อไป

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยอาศัยเทคนิค Dot-ELISA โดยใช้ความเข้มข้น IgG ของ rabbit anti-flagella serum ในการเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ระดับความเข้มข้นคอนจูเกตเท่ากับ 1 : 100 วิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อที่ความเข้มข้น 10^6 - 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยที่ระดับความเข้มข้นเชื้อ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรให้ผลบวกเล็กน้อย

เมื่อทำการเคลือบเม็ดเลเทกซ์ด้วย IgG ของแอนติซีรัมแล้วนำมาตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 พบว่าเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-whole cell serum เคลือบเม็ดเลเทกซ์สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อที่ความเข้มข้น 10^7 - 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้ IgG ของ rabbit anti-flagella serum เคลือบเม็ดเลเทกซ์ สามารถเกิดการตกกลุ่มกับเชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 และ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การที่เม็ดเลเทกซ์เคลือบด้วย IgG ของ rabbit anti- whole serum มีความไวในการตรวจสูงกว่า IgG ของ rabbit anti-flagella serum เป็นเพราะ IgG ของ rabbit anti-flagella serum ทำปฏิกิริยากับแฟลกเจลลาอิสระที่ไม่ได้อยู่บนตัวเซลล์ ทำให้มีปริมาณของ IgG น้อยกว่า IgG ของ rabbit anti-whole cell serum ดังนั้นจึงไม่เห็นการตกกลุ่มเกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับความเข้มข้นเซลล์น้อย ๆ

การศึกษาผลของ cross - reaction กับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช พบว่ากลุ่มของเชื้อ *Salmonella typhimurium* และ *Salmonella heidelberg* ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูง และ *Salmonella agona* , *Salmonella derby* , *Salmonella* sp. ให้ผลบวกเล็กน้อย และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นมาทดสอบ พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา cross-reaction กับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ซึ่งให้ผลตรงกันทั้งเทคนิค Dot-ELISA และปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ เพียงแต่ *Salmonella derby* ให้ผลลบกับเทคนิค Dot-ELISA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยเติมลงในตัวอย่าง เนื้อปลา เนื้อกุ้ง ปลาหมึก เนื้อหมู และเนื้อไก่ และบ่มตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffer peptone water ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงใน RV-broth ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลาย RV-broth มาวิเคราะห์โดยพบว่าวิธี ELISA ต้องมีการปั่นสารละลาย RV-broth ก่อนแล้วนำมาวิเคราะห์โดยมีประสิทธิภาพในการตรวจดีกว่าการนำสารละลาย RV-broth มาวิเคราะห์โดยตรง ส่วนในการตรวจสอบของวิธี Dot-ELISA และปฏิกิริยาตกกลุ่ม ต้องเพิ่มขั้นตอนการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกหนึ่งขั้นตอนคือการบ่มในอาหาร XLD หรือ MSRV ก่อนแล้วนำโคโลนีที่สงสัยมาวิเคราะห์โดยเทคนิคทั้งสอง

เมื่อนำตัวอย่างอาหารทะเลส่งออก และตัวอย่างอาหารจากตลาดสด จำนวน 68 ตัวอย่าง มาตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method) พบว่ามีความไว (sensitivity) เท่ากับ 84.6 % ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 96.36 % ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) เท่ากับ 84.62 % ค่าคาดหวังผลลบ (negative predictive value) เท่ากับ 96.3 % โดยพบว่าให้ผลบวกผิดพลาดจำนวน 2 ตัวอย่าง และให้ผลลบผิดพลาดจำนวน 2 ตัวอย่าง วิธีนี้สามารถให้ผลการตรวจภายในเวลา 53 ชั่วโมง โดยรวมขั้นตอนการบ่มใน pre - enrichment เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ selective enrichment เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระยะเวลาในการวิเคราะห์ ELISA เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิธีนี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละมาก ๆ การเพิ่มขั้นตอนการบ่มและหาสูตรอาหารที่เหมาะสม สามารถช่วยให้ผลการวิเคราะห์มีประสิทธิภาพดีขึ้น

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี Dot-ELISA และปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทางจุลชีววิทยา พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์เท่ากับ 75 และ 73 ชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งสองวิธีให้ความถูกต้องสูง แต่เสียเวลาวิเคราะห์นานและมีความไวต่อเชื้อ *Salmonella* ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ น้อย จึงไม่สามารถลดขั้นตอนการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อลง โดยวิธี Dot - ELISA มีความไว (sensitivity) เท่ากับ 92.31 % ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 100.00 % ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) เท่ากับ 100.00 % ค่าคาดหวังผลลบ (negative predictive value) เท่ากับ 98.21 % โดยพบว่าให้ผลลบผิดพลาดจำนวน 1 ตัวอย่าง ส่วนในการทดสอบปฏิกิริยาการตกกลุ่มของเลเทกซ์ มีความไว (sensitivity) เท่ากับ 92.31 % ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 96.36 % ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) เท่ากับ 85.71 % ค่าคาดหวังผลลบ (negative predictive value) เท่ากับ 98.15 % โดยพบว่าให้ผลบวกผิดพลาดจำนวน 2 ตัวอย่าง และให้ผลลบผิดพลาดจำนวน 1 ตัวอย่าง ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร เปรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีของ Wyatt และ (1996) พบว่ามีความไว (sensitivity) เท่ากับ 75.00 % ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 89.00 % ค่าคาดหวังผลบวก (positive predictive value) เท่ากับ 92.00 % ค่าคาดหวังผลลบ (negative predictive value) เท่ากับ 68.00 % พบว่าในการทดสอบครั้งนี้มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าอาจเป็นเพราะการบ่มตัวอย่างใน pre-enrichment และ selective enrichment ที่เป็นระยะเวลานานกว่า โดยในการทดลองของ Wyatt และคณะ (1996) ทำการบ่มตัวอย่างอาหารใน *Salmonella* chemically defined medium (SCDM) เพียงอย่างเดียวเป็นระยะเวลา 26 ชั่วโมง อาจทำให้ประสิทธิภาพการตรวจลดลง

การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากตัวอย่างอาหารจำพวกเนื้อหมู และเนื้อไก่ พบว่าเทคนิค ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช สามารถตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่แยกโดย พัลลภา (2539) ได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ผลบวกตรงกันแต่วิธี ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบดีกว่าวิธีของ พัลลภา (2539) (ที่ทำการเคลือบตัวเซลล์บนเพลท) เพราะสามารถทำการเคลือบแอนติบอดีกับเพลทเตรียมเก็บไว้ได้เป็นเวลาหลายเดือน และจากการทดลองของ Harford (1987) พบว่าการเคลือบแอนติบอดีกับเพลทมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* มากกว่าการเคลือบตัวเชื้อกับเพลท

การเพิ่มขั้นตอนการบ่มใน selective enrichment ทำให้ประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างมีสูงขึ้น แต่การบ่มเป็นเวลานานทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ซึ่งวิธีในการตรวจที่รวดเร็วมีประสิทธิภาพสูงเป็นสิ่งจำเป็น ดังนั้นมีแนวโน้มสูงที่จะพัฒนาวิธี ELISA ไปใช้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป ส่วนวิธี Dot-ELISA กับ เทคนิคปฏิกิริยาตกกลุ่ม เป็นวิธีที่สามารถลดขั้นตอนการตรวจสอบทางชีวเคมีในขั้น TSI และ LIM ของการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดยทั้งสองวิธีให้ผลความถูกต้องสูงและนอกจากนี้สามารถนำวิธีดังกล่าวมาทดสอบเบื้องต้น (presumptive test) กับโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* ทำให้การตรวจวิเคราะห์เป็นไปอย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

นรีกุล สุระพัฒน์ และคณะ. จุลชีววิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพ ฯ : กรุงเทพเวชสาร, 2530.

นภาธร บานชื่น. ELISA: ทฤษฎีและปฏิบัติ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ ฯ : หมอชาวบ้าน, 2536

พัลลภา พัฒนวงศ์. การตรวจหา *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยเทคนิค ELISA. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2539.

สุรางค์ ตันติวนิช,บรรณาธิการ. การวินิจฉัยโรคติดเชื้อทางซีรัมวิทยา. นครปฐม : สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน, 2539

Abram, D. and Koffler H. "In Vitro Formation of Flagella Like Filaments and Other Structures from Flagellin" J. Mol. Biol. 9(1964) : 168-185.

Anderson, M. Joseph and Paul A. Hartman. "Direct Immunoassay for Detection of Salmonellae in Foods and Feeds." App. Env. Microbiol. 49, 3 (1985) : 1124-1127.

Andrew, W. H. " A Review of Cultural Methods and their Relation to Rapid Method for the Detection of *Salmonella* in Foods " Food Technol. 39, 3(1985): 77-82.

Asakura, S., G. Eguchi and T. Lino "*Salmonella* Flagella : In Vitro Reconstruction and Overall Shapes of Flagella Filaments." J. Mol. Biol. 16(1966) : 302-316.

Avrameas, S. " Coupling of Enzymes to Proteins with Glutaraldehyde. Use of the Conjugates for Detection of Antigens and Antibodies " Immunochem 6 (1969) : 43-52

Blackburn, C. de W. "Rapid and Alternative Methods for the Detection of Salmonellas in Foods." J. App. Bacteriol. 75 (1993) : 199-214.

Catty, D. Antibody Volumn II a Practical Approach. Oxford, England : Information Press, 1990.

Cudjoe, Kofitsyo S. ,Ragnhild Krona and Egil Olsen. " IMS : A New Selective Enrichment Technique for Detection of *Salmonella* in Foods. " Int. J. Food Microbiol. 23(1994) :159-165

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cudjoe, Kofitsyo S., Therese Hagtvedt. and Richard Dainty. " Immunomagnetic Separation of *Salmonella* from Foods and Their Detection Using Immunomagnetic Particle (IMP)-ELISA ." Int. J. Food Microbiol. 27(1995):11-25

D'Aoust, Jean-Yves . "Review Paper. *Salmonella* and the International Food Trade." Int. J. Food Microbiol. 24 (1994) : 11-31.

D'Aoust, Jean-Yves, A. M. Sewell and P. Greco. "Commercial Latex Agglutination Kits for the Detection of Foodborne *Salmonella*." J. Food Prot. 54, 9(1991) : 725-730.

Duguid, J. P., E. S. Anderson and I. Campbell. "Fimbriae and Adhesive Properties in *Salmonella*." J. Pathol. Bacteriol. 92(1966) : 107-137.

Eckner ,Karl F. and others. " Use of an Elevated-Temperature and Novobiocin in a Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Improved Recovery of *Salmonella* from Foods." J. Food Prot. 55(1992) : 758-762

Eckner ,Karl F. and others. " Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Rapid Screening of *Salmonella* in Foods-Collaborative Study. " J.AOAC . 77(1994) : 374-394

Essers, Ludwig and Klaus Radelbold. "Rapid and Reliable Identification of *Staphylococcus aureus* by a Latex Agglutination Test." J. Clin. Microbiol. 12, 5(1980) : 641-643.

Farber, Jeffrey M. and others " Enzyme Immunoassay-Membrane Filter Method for Detection of Salmonellae in Foods ." J. Food Prot. 48,9(1985) : 790-793

Flint , S.H. and N. J. Hartley. "Evalution of the TECRA Immunocapture ELISA for the Detection of *Salmonella typhimurium* in Foods." Lett. App.Microbiol. 17(1993) : 4-6

Goers, John . Immunochemical Techniques Laboratory Manual. USA : Academic Press, 1993.

Harford, J. P. " An Evaluation of a Commercially Available Enzyme Immunoassay Test for the Rapid Detection of Salmonellae in Food and Environmental Samples. " Epidem. Inf. 99 (1987) : 127-136

Holt , Peter S., Richard Gast and Cam R. Greene. " Rapid Detection of *Salmonella enteritidis* in Pooled Liquid Egg Samples Using a Magnetic Bead-ELISA System." J. Food Prot. 58,9(1995) : 967-972

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hoorfar , J. and A. Wedderkopp ." Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Screening of Milk Samples for *Salmonella typhimurium* in Dairy Herds. " Am. J. Vet. Res. 56 , 12 (1995) : 1549-1554

Hoszowski, A. and others "Rapid Detection and Enumeration of *Salmonella* in Chicken Carcass Rinses Using Filtration, Enrichment and Colony Blot Immunoassay." Int. J. Food Microbiol, 28 (1996) : 314-350.

Ibrahim , George F. and others. " Method for the Isolation of Highly Purified *Salmonella* Flagellins." J.Clin.Microbiol.,22(1985):1041-1044

Ibrahim, George F. "A Review of Immunoassays and Their Application to Salmonellae Detection in Foods." J. Food Prot. 49 (1986) : 299-310.

Jaradat, Ziad W. and Jerzy Zawistowski. "Production and Charcterization of Monoclonal Antibodies Against the 0-5 Antigen of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharide." App. Env. Microbiol, 62, 1 (1996) : 1-5.

Kerr, S. and others "Diagnostic Application of Monoclonal Antibodies to Outer Membrane Protein for Rapid Detection of *Salmonella* ." J. App. Bacteriol. 72 (1992) : 302-308.

Kelterborn, E. "On the Frequency of Occurrence of *Salmonella* species. An Analysis of 1.5 Million Strains of Salmonellae Isolated in 109 Countries During the Period 1934 -1975 ." Zb1. Bakteriol. Hyg. J. Abt. Orig A. 243 (1979) : 289-304.

Korhonen, T.K and others "Characterization of Type 1 Pili of *Salmonella typhimurium*." J. Bacteriol. 144 (1980) : 800-805.

Krysinski, E.P. and R. C. Heimsch. "Use of Enzyme-Labeled Antibodies to Detect *Salmonella* in Foods." App. Env. Microbiol. 33, 4 (1977) : 947-954.

Lee, Heather A. and others. " Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Salmonella typhimurium* in Food : Feasibility of 1-day *Salmonella* Detection." App. Env. Microbiol. 56, 6 (1990) : 1541-1546.

Makela, P. H. and H. Mayer "Enterobacterial Common Antigen" Bacteriol. Rev. 40(1976): 591-632.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Manisha, P., P. Parakutty and D. Manorama "Rapid Diagnosis of Typhoid Fever by Detection of Barber Protein and Vi Antigen of *Salmonella* serotype typhi." J. Med. Microbiol. 43(1995) : 185-188.

Minnich, Scott A., Paul A. Hartman and Richard C. Heimsch. "Enzyme Immunoassay for the Detection of Salmonellae in Foods." App. Env. Microbiol. 43, 4(1982) : 877-883.

Metzler, Jennifer and Irving Nachankin. "Evaluation of Latex Agglutination Test for the Detection of *Salmonella* and *Shigella* spp. by Using Broth Enrichment." J. Clin. Microbiol. 26, 2 (1988) : 2501-2504.

Nakane, P. K. and Kowai, A. "Periodase-Labeled Antibody : A New Method of Conjugation" J. Histochem Cytochem. 22, 12 (1974) : 1084-1091.

Orskov, I. and others. "Serology, Chemistry and Genetics of O and K Antigen of *Escherichia coli*." Bacteriol. Rev. 41 (1977) : 667-710.

O'Sullivan, M. J., and V. Marks "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay." Meth. Enzymol. 73 (1981) : 147-166.

Pierson, Merle D. and Stern Norman J. Foodborne Microorganisms and Their Toxins : Developing Methodology. New York : Marcel Dakker, 1986.

Prusak-Sochaczewski, E. and J.H.T. Luong. "An Improved ELISA Method for the Detection of *Salmonella typhimurium*." J. App. Bacteriol. 66 (1989) : 127-135.

Swaminathan, B. and J. C. Ayres. " A Direct Immunoenzyme Method for the Detection of *Salmonella* in Foods ." J. Food Sci. 45(1980) : 352-361.

Todd, E.C.D.and others "Evaluation of *Salmonella* Antisera for an Optimum Enzyme-Linked Antibody Detection of *Salmonella* Using Hydrophobic Grid Membrane Filters." Food Microbiol. 8(1991) : 311-324

Varadaraj , M.C. " Methods for Detection and Enumeration of Foodborne Bacteria Pathogens: A Critical Evaluation." J. Food Sci. Technol. 30 (1993) : 1-13

Volk,W.A. Enterics and Related Gram-Negative Organisms. in : Essentials of Medical Microbiology. 2 nd ed. Philadelphia : J.B. Lippincott, 1982 : 373

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center. Annual Report of the Confirmed Enteropathogenic Bacteria,1989-1996. Nonthaburi : Enteric Bacteriology Section,Division of Clinical Pathology, Department of Medical Sciences , Ministry of Public Health, 1989-1996

Wyatt, Gary M. and others "Comparison of Microtitration Plate ELISA with a Standard Cultural Procedure for the Dection of *Salmonella* spp. in Chicken ." J. Food Prot. 59(1996) :238-243.

Wyatt, Gary M., H.A. Lee and M.R.A. Morgan. Immunoassays for Food-poisoning Bacterial Toxin. London : Chapman-Hall, 1992.

Young, L. S. and others. "Gram-negative Rod Bacteremia : Microbiologic, Immunologic, and Therapeutic Considerations." Ann. Intern. Med. 86(1977) : 456-471.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สารละลายที่ใช้เตรียม antibody - enzyme conjugate

1. Sodium acetate (1.0 mM pH 4.4)

การเตรียม สารละลาย A คือ anhydrous sodium acetate 8.24 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลาย B คือ glacial acetic acid 6.005 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร

เตรียมโดยใช้ 1 ส่วนของสารละลาย A และ 2 ส่วนของสารละลาย B หลังจากนั้น เจือจางเป็น 1 : 100 ในน้ำกลั่น เพื่อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 mM

2.Phosphate buffer (0.1 M pH 6.8)

$NaH_2PO_4\ 2H_2O$ 15.6 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร

NaH_2PO_4 14.2 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร

เตรียมโดยผสมสารละลายทั้งสอง ในปริมาตรที่เท่ากัน และปรับ pH เป็น 6.8

3. Sodium carbonate / bicarbonate buffer 1, pH 9.5

Na_2CO_3 1.59 กรัม (0.015 M)

Na_2HCO_3 2.93 กรัม (0.035 M)

ละลายผสมในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร และปรับ pH เป็น 9.5

4. Sodium carbonate / bicarbonate buffer 2 (0.2 M pH 9.5)

Na_2CO_3 21.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

$NaHCO_3$ 16.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

การเตรียมผสม Na_2CO_3 ลงในสารละลายของ $NaHCO_3$ ในปริมาตรที่พอเพียงเพื่อปรับ pH เป็น 9.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Borate buffer (0.1 M pH 7.4)

Boric acid 24.732 กรัม ในน้ำกลั่น 4 ลิตร

Borax 19.07 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

การเตรียม เติม 115 มิลลิลิตรของสารละลาย Borax ลงในสารละลายกรดบอริกจำนวน 4 ลิตร เพื่อปรับ pH เป็น 7.4 โดยเติมสารละลาย Borax ลงที่ละน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA

1. PBS tween (washing buffer, pH 7.4)

NaCl	8	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
$Na_2HPO_4 .12H_2O$	2.9	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Tween 80	0.5	มิลลิลิตร
Thimerosal	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. diluent

0.1% gelatin ใน PBS - Tween (0.5 กรัม ต่อ 500 มิลลิลิตร)

3. blocking solution

3% gelatin in PBS - tween (15 กรัม ต่อ 500 มิลลิลิตร)

4. citrate / phosphate buffer (substrate buffer , pH 5.0)

citric acid	9.32	กรัม
$Na_2HPO_4 .2H_2O$	18.34	กรัม
Thimerosal	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

5. coating buffer (0.65 M carbonate / bicarbonate buffer , pH 9.6)

Na_2CO_3	1.795	กรัม
$NaHCO_3$	1.465	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี Dot - ELISA

1. PBS tween (washing buffer, pH 7.4)

NaCl	8	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
$Na_2HPO_4 .12H_2O$	2.9	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Tween 80	0.5	มิลลิลิตร
Thimerosal	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. diluent

0.1% gelatin ใน PBS - Tween (0.5 กรัม ต่อ 500 มิลลิลิตร)

3. blocking solution

3% gelatin in PBS - tween (15 กรัม ต่อ 500 มิลลิลิตร)

4. substrate buffer

นำ 0.006 กรัม ของ 4-chloro-1-napthol (CNP) ละลายใน 1 มิลลิลิตรของ methanol ผสมกับ 10 มิลลิลิตร ของ Tris-buffer 50 mM , pH 7.4 ทำการกรองก่อนใช้ และเติม 40 ไมโครลิตรของ 30 % (v/v) H_2O_2

5 . coating buffer (0.65 M carbonate / bicarbonate buffer , pH 9.6)

Na_2CO_3	1.795	กรัม
$NaHCO_3$	1.465	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การทำแอนติซีรัมให้บริสุทธิ์

1. การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อนำซีรัมผ่านกระบวนการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) จะแบ่งโปรตีนออกได้เป็น 5 ส่วนใหญ่ คือ อัลบูมิน และโกลบุลิน อีก 4 ส่วน คือ อัลฟา 1 (α_1) , อัลฟา 2 (α_2), เบตา (β) และ แกรมมา (γ) โดยส่วนของแกรมมาโกลบุลิน ประกอบด้วย แอนติบอดีที่มี คลาส (class) แตกต่างกัน คือ IgA, IgD, IgE , IgG และ IgM แต่ละคลาสมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน และมีโครงสร้างโปรตีนคล้ายกันและสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติเจนได้เนื่องจากความเหมือนกันของโครงสร้าง ทำให้ทุกคลาสของแอนติบอดีสามารถตกตะกอนอยู่ในรูปสารเชิงซ้อนของเกลือที่ไม่เสียสภาพธรรมชาติกับสารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีความเข้มข้น 40-50% (w / v) ซึ่งอัลบูลิน แอลฟา โกลบูลิน และ เบตา โกลบูลิน ตกตะกอนเป็นจำนวนน้อยโดยโปรตีนที่ตกตะกอนส่วนใหญ่คือ แกมมา โกลบูลิน แอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นสูงเป็นสาเหตุให้โปรตีนตกตะกอน เนื่องจาก โมเลกุลของน้ำเชื่อมกับโปรตีนโดยพันธะไฮโดรเจนช่วยให้โปรตีนอยู่ในสภาพสารละลาย ถ้าแอมโมเนียมซัลเฟตดึงโมเลกุลของน้ำออกจากโปรตีน โปรตีนที่มีการสูญเสียน้ำออกจากโมเลกุลจะแยกตัวออกจากสารละลาย ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างส่วนใหญ่ภายในโปรตีน โปรตีนที่ตกตะกอนสามารถเก็บได้หลายเดือนจนถึง 1 ปี ที่ 4 องศาเซลเซียส แต่โดยส่วนใหญ่ทำการละลายตะกอนโปรตีนในบัฟเฟอร์ และไดอะไลซีส หรือผ่านกรรมวิธี gel filtration เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออกไป (Goers , 1993)

<u>วิธีปฏิบัติ</u>

1. เตรียมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50% โดยการชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต 1,000 กรัม ในสารละลาย 1 ลิตร และกวนที่อุณหภูมิห้อง ปรับ พีเอช เป็น 7 ด้วย HCl หรือ NaOH และอาจกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
2. ทำการเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ทีละหยด ลงในแอนตีซีรัม ปริมาตร 50% (V / V) ที่ 4 องศาเซลเซียส และทำการกวนอย่างเบา ๆ เป็นเวลา 15 -30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 g (5,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 30 นาที และล้างตะกอนด้วย 50% saturated (V / V) amminonium sulfate 2-3 ครั้ง
4. ละลายตะกอนที่ได้ใน phosphate buffer
5. ทำการไดอะไลซีส ใน phosphate buffer ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3-4 ครั้ง
6. เก็บสารละลายที่ได้ใน microtube ที่ 4 องศาเซลเซียส จดปริมาตรไว้
7. นำไปหาความเข้มข้นโปรตีนและนำไปทดสอบต่อไป

2. Diethylaminoethyl (DEAE) anion-exchange chromatography

เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพใช้สำหรับแยกโปรตีนที่มีประจุ โดยฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่มีประจุบวกของ DEAE สามารถทำให้เป็นกลางโดย counter ion (คือไอออนที่มีประจุตรงข้ามกัน ionic group ที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่ใช้เป็น ion - exchanger) โดยปกติของ DEAE เป็น คลอไรด์ไอออน (Cl^-) และประจุลบอื่น ๆ ที่สามารถแข่งขันจับกับหมู่ฟังก์ชันนัลกรุ๊ปของ DEAE เช่นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุลบ โดยกลุ่ม IgG ในแอนติซีรัมภายในมีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และอะจีนีน (arginine) มากกว่า กลูทาเมต (glutamate) และแอสพาเทต (aspartate) และมีจุด isoelectric point ของ IgG ประมาณ 7.5-8.5 ดังนั้นที่ พีเอช 7.2 IgG ไม่ถูกดึงดูดในการจับกับ DEAE ขณะที่โปรตีนอื่น ๆ ภายในซีรัมที่มี pI (isoelectric point) ต่ำกว่า ยังคงมีประจุลบอยู่ ดังนั้น จึงถูกจับบน DEAE และสามารถแยก IgG ออกแอนติซีรัมได้ วิธีการนี้ใช้แยก IgG ออกจากแอนติซีรัมซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและเหมาะสำหรับงานที่ต้องใช้แอนติซีรัมเป็นปริมาณมากสามารถแยก IgG ให้ที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่การเตรียมวิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับนำ IgG ที่เตรียมได้ไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง (Goers , 1993)

<u>ขั้นตอนการแยก IgG จากแอนติซีรัม</u>

1. เตรียม DEAE (Whatman DE 52) anion-exchanger โดยละลายใน 0.02 M phosphate buffer , pH 7.2
2. ทำการไดอะไลซีสแอนติซีรัมในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นมากกว่า 10 เท่า ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผสม DEAE ลงในบีกเกอร์และเทสารละลายที่มากเกินไปออก (ปริมาตรของ สาร DEAE ที่ใช้ประมาณ 4 - 5 มิลลิลิตรต่อ มิลลิลิตรของแอนติซีรัม) ผสมแอนติซีรัมกับ DEAE โดยเทกลับไปมาระหว่าง 2 บีกเกอร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. นำของผสมที่ได้ ปั่นที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และ เก็บสารละลายใสไว้ โดยส่วนใหญ่เป็น IgG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี Culture method

1. Buffer Peptone Water (BPW)

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
$Na_2HPO_4 .12H_2O$	9	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ± 0.1

ละลายส่วนผสมต่าง ๆ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 225 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 20 นาที

2. Lysine Indole Motility Medium (LIM)

Polypeptone	10.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
L-lysine dihydrochloride	10.0	กรัม
L-tryptophan	0.5	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
Agar	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.7

3. Modified Semi - Solid Rappaport - Vassiliadis Medium (MSRV)

Tryptose	4.59	กรัม
Casein hydrolysate	4.59	กรัม
NaCl	7.34	กรัม
KH_2PO_4 (anhydrous)	1.47	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$MgCl_2 . 6H_2O$	23.31	กรัม
	(anhydrous ใช้ 10.93 กรัม)	
Malachite green (0.4 %)	9.17	มิลลิลิตร
Agar	3.5 - 3.8	กรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 5.2 $\pm$ 0.2

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นส่วนหนึ่ง และนำน้ำกลั่นอีกส่วนหนึ่งผสมกับวุ้นแล้วนำไปต้มจนวุ้นละลาย จากนั้นเทลงในส่วนผสมทั้งหมด นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปวัดพีเอชจากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส (ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) (ถ้าหากพีเอชสูงกว่า 5.2 ให้ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 5.2 $\pm$ 0.2 ก่อนเทลงในในจานเพาะเชื้อด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล ซึ่งฆ่าเชื้อแล้ว)

4. Rappaport - Vassiliadis Medium (RV)

ประกอบด้วยสารละลาย 3 ชนิด คือ

<u>สารละลาย A</u>

Tryptone	5	กรัม
Sodium chloride	8	กรัม
$KH_2 PO_4$	1.6	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

<u>สารละลาย B</u>

$MgCl_2 .6H_2O$	400	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

<u>สารละลาย C</u>

Malachite green oxalate	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ในการเตรียม RV medium ทำได้โดยผสมสารละลาย 1000 มล. สารละลาย B 100 มล. และสารละลาย C 10 มล. จะได้ ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,110 มล. บรรจุใส่หลอดทดลองนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Triple Sugar Iron (TSI) Agar

Polypeptone	20.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Ferrous ammonium sulphate	0.2	กรัม
Sodium thiosulphate	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	13.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 7.3

6. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar

Yeast extract	5.0	กรัม
Xylose	3.5	กรัม
L - Lysine hydrochloride	5.0	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Bile salts	2.5	กรัม
Sodium thiosulphate	4.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	13.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 7.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Kovacs'reagent

Amyl หรือ isoamyl alcohol	150.0	มิลลิลิตร
p-Diamethylaminobenzaldehyde	10.0	กรัม
Hydrochloric acid , concentrated	50.0	กรัม

นำ aldehyde ละลายในแอลกอฮอล์ และค่อย ๆ เติมกรด ไม่ควรใช้แอลกอฮอล์ที่เริ่มมีสีน้ำตาลแก่ รีเอเจนต์นี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิห้อง และมีสีค่อนข้างจาง ควรเตรียมปริมาณน้อย ๆ และควรเก็บไว้ในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายวัฒณะ สมสิทธิ์ เกิดวันที่ 14 มิถุนายน 2516 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร เข้ารับการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เมื่อวันที่ 10 มิถุนายน 2534 สำเร็จการศึกษาเมื่อ 11 มีนาคม 2538 และได้ศึกษาต่อ ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อวันที่ 12 มิถุนายน 2538 จนถึงปี พ.ศ. 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้