

Pembangunan jalur asai aliran lateral untuk pengesanan *Escherichia coli* O157:H7

(Development of a lateral flow assay strip for the detection of *Escherichia coli* O157:H7)

Suria Mohd Saad, Mohd Afendy Abdul Talib, Noor Azlina Masdor dan Zamri Ishak

Pengenalan

Keselamatan makanan secara amnya didefinisikan sebagai disiplin atau kaedah saintifik yang dilaksanakan semasa penyediaan, pengendalian dan penyimpanan produk makanan untuk mencegah penyakit bawaan makanan. Keselamatan makanan adalah salah satu keutamaan dalam aspek kesihatan awam. Globalisasi dan kepesatan pasaran makanan sejak beberapa dekad yang lalu turut memberi cabaran terhadap aspek keselamatan makanan. Wabak penyakit makanan yang berlaku menunjukkan bahawa pencemaran dan sabotaj makanan sama ada yang disengajakan atau tidak disengajakan boleh memberi kesan serius kepada kesihatan manusia.

Penyakit bawaan makanan berlaku akibat pengambilan makanan yang tercemar dengan agen biologi atau kimia. Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) menganggarkan kejadian tahunan penyakit bawaan makanan di Timur Tengah dan Afrika Utara (MENA) termasuk di rantau Mediterranean Timur ialah 100 juta orang dengan 32 juta daripada mereka yang terkena adalah kanak-kanak bawah usia lima tahun. Penyakit bawaan makanan yang dilaporkan kebanyakannya berkaitan dengan mikroorganisma seperti bakteria, parasit, kulat dan virus. Pengambilan bakteria patogenik secara tidak sengaja seperti *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Campylobacter jejuni* dan *Listeria monocytogenes* biasanya akan menyebabkan jangkitan.

Di Malaysia terdapat beberapa kes jangkitan *E. coli* yang berlaku beberapa tahun kebelakangan ini. Wabak jangkitan *E. coli* di Malaysia bukanlah satu kes yang popular dan masyarakat mempunyai kesedaran yang rendah mengenai risiko dan kesan jangkitannya. Jangkitan biasanya berlaku disebabkan oleh pengambilan makanan atau air minuman yang tercemar dengan bakteria secara tidak sengaja. Namun, dalam kes jangkitan *E. coli* yang serius seperti jangkitan *E. coli* daripada seroval O157:H7 boleh menyebabkan kematian jika tidak dirawat dengan betul. Lembu secara konsisten dikenal pasti sebagai perumah *E. coli* O157:H7 ini. Kebanyakan jangkitan dikaitkan dengan pengambilan daging lembu, susu, hasil air dan jus epal tercemar yang tidak dikendalikan, disimpan atau dimasak dengan betul. Jangkitan *E. coli* O157:H7 menyebabkan kolitis hemoragik dan komplikasi

sindrom hemolitik uremik (HUS) yang teruk pada manusia dan kematian. Kaedah mengenalpastian pantas *E. coli* dalam produk makanan dapat mengelakkan pengambilan makanan yang tercemar.

Beberapa kajian saintifik telah dilakukan khususnya dalam penentuan dan prevalens *E. coli* O157:H7 di Malaysia, antaranya adalah laporan kehadiran *E. coli* dalam beberapa sampel makanan seperti salad, santan segar, air yang dijual melalui mesin menjual air, susu mentah, sayur-sayuran mentah dan daging lembu yang dieksport. Penyelidik juga telah melaporkan penemuan *E. coli* O157:H7 pada najis ruminan dan tangan pekerja di rumah sembelihan lembu halal. Terdapat kajian yang mendapati salad *Butterhead* tercemar dengan *E. coli* O157:H7 dalam jumlah yang menghampiri had maksimum yang disyorkan (MRL). Selain itu, terdapat juga kajian yang menunjukkan bahawa pengendali makanan harus meningkatkan prosedur kebersihan dan sanitasi di setiap titik rantai pengeluaran untuk mengelakkan wabak penyakit serius yang berkaitan dengan bakteria ini.

Sejak lebih dua dekad yang lalu, banyak penyelidikan telah dijalankan melalui penggunaan kaedah berasaskan DNA dengan menggunakan tindak balas rantai polimerase (PCR) ditambah dengan teknologi prob gen untuk pengesanan *E. coli* O157:H7. Kaedah berdasarkan DNA ini adalah salah satu kaedah yang paling khusus dan peka dalam ujian pengesanan rutin untuk bakteria. Walau bagaimanapun, pendekatan ini perlu dilakukan oleh tenaga kerja mahir dan terlatih, memerlukan penggunaan alat yang mahal, protokol yang rumit serta perlu dibawa ke makmal yang khusus untuk sampel dianalisis. Oleh itu, ujian berasaskan protein adalah teknik yang lebih fleksibel dibandingkan dengan ujian berasaskan DNA kerana selain mudah alih, ia juga memberikan keputusan yang stabil dan baik serta tepat. Antara teknik analisis protein yang mudah dan stabil untuk pengesanan protein adalah menggunakan gel fokus isoelektrik satu dimensi, analisis imunoblot dan ujian imunisorben berkaitan enzim (ELISA).

Permintaan terhadap kaedah yang pantas, minimum dan sensitif untuk pengesanan *E. coli* O157:H7 adalah tinggi. Oleh itu, pembangunan kaedah pengesanan pantas pencemaran *E. coli* O157:H7 seperti jalur ujian aliran lateral (LFA) adalah penting terutama untuk mengesan pencemaran makanan, mendiagnosis pesakit dan mencegah wabak penyakit. Penggunaan jalur LFA mempunyai beberapa kelebihan antaranya memberikan keputusan pengesanan antigen dan antibodi dengan pantas, prosedur yang mudah, kestabilan untuk jangka masa lama dalam pelbagai keadaan persekitaran, format yang mesra pengguna dan kos yang agak rendah.

Objektif kajian ini adalah bagi membangunkan jalur LFA yang peka untuk pengesanan *E. coli* O157:H7. Poliklonal antibodi terhadap *E. coli* O157:H7 (IgG anti-*E. coli* O157:H7) telah dihasilkan dalam arnab dengan menyuntikkan formalin subkutan

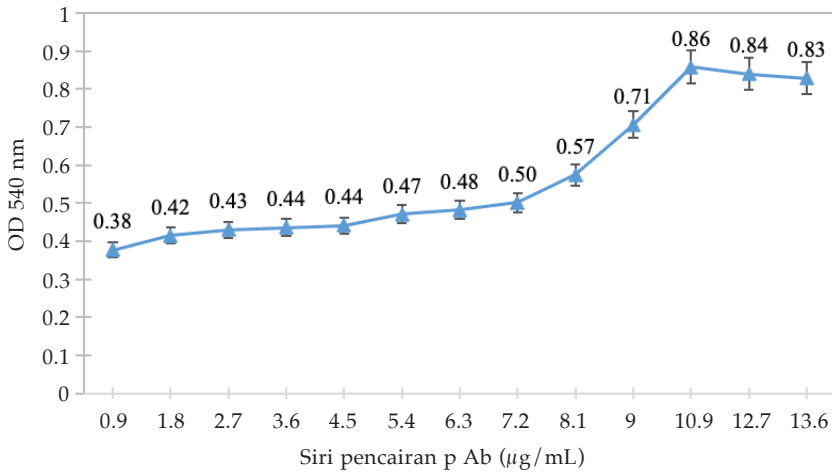
E. coli O157:H7 yang telah dimatikan (antigen imunisasi). Darah arnab kemudian dikumpulkan untuk tempoh dua minggu bagi mendapatkan antibodi daripada serum. Antibodi yang diperolehi akan ditulenkan melalui kromatografi afiniti. Antibodi yang ditulenkan kemudian akan dikonjugasikan dengan nanopartikel emas dan kompleks konjugasi ini akan disembur pada pad konjugat pada jalur LFA. Nanopartikel koloid emas menjadi pilihan utama sebagai label dalam ujian ini kerana mudah disintesis, dilihat dan dikonjugasikan dengan bahan biologi dengan penyediaan makmal yang murah dan stabil dalam bentuk cecair atau kering. Pengikatan khusus IgG anti-*E. coli* O157:H7 membolehkan sel *E. coli* O157:H7 digunakan dalam kajian ini untuk mengesan *E. coli* O157:H7. Kekhususan antibodi poliklonal terhadap *E. coli* O157:H7 turut dikaji melalui kajian kereaktifan silang menggunakan jalur LFA terhadap bakteria lain seperti *S. typhimurium*, ST dan *L. monocytogenes*, LM (bakteria gram negatif) dan *C. jejuni*, CJ (bakteria gram positif). Kajian turut dilakukan bagi menilai kebolehan jalur LFA terbabit untuk mengesan kehadiran *E. coli* O157:H7 dalam pelbagai matriks makanan iaitu ayam, keju dan susu.

Reka bentuk kajian menggunakan jalur LFA

Suspensi 1×10^9 CFU/mL kultur bakteria *E. coli* O157:H7 dalam PBS digunakan sebagai kawalan positif dan juga untuk imunisasi dalam arnab untuk memperoleh tindak balas imun terhadap keseluruhan sel bakteria. Titer tertinggi IgG anti-*E. coli* O157:H7 yang ditulenkan adalah pendarahan kelima dengan 2.51 mg/mL dan dipilih untuk konjugasi disebabkan kandungan IgG tertinggi yang diperolehi untuk dicairkan dengan PBS kepada 0.1 mg/mL. IgG anti-*E. coli* O157:H7 digunakan sebagai penjaluran garis ujian (T) dalam pembangunan jalur LFA dan dikonjugasi dengan nanopartikel emas 40 nm menjadi konjugat dalam sistem pengesanan.

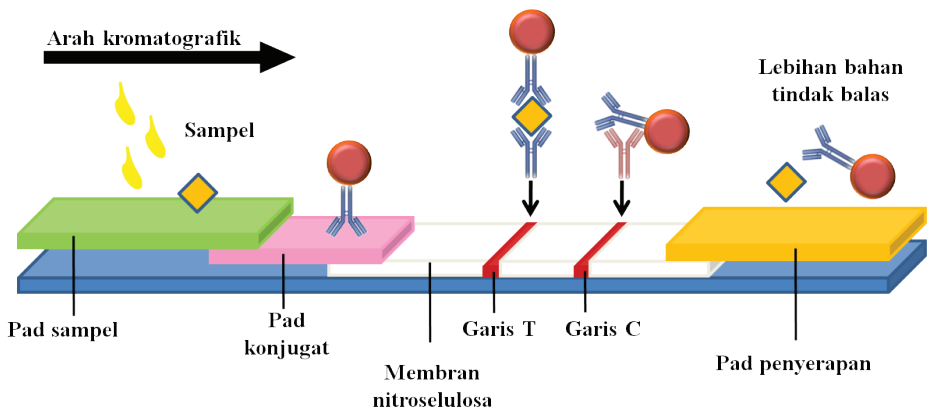
Kepekatan penstabil IgG anti-*E. coli* O157:H7 dengan nanopartikel emas telah ditentukan pada 10.9 $\mu\text{g/mL}$ iaitu penyerapan pasif IgG anti-*E. coli* O157:H7 kepada permukaan nanopartikel emas (*Rajah 1*). Kepekatan ini adalah keadaan di mana nanopartikel emas diselaputi dengan IgG pada jumlah berlebihan untuk menghapuskan atau mengurangkan sebarang permukaan yang tidak diselaputi yang boleh menyebabkan perlekatan tidak khusus dengan antigen atau bahan lain. Perlekatan tidak khusus ini boleh menjurus kepada keputusan positif-palsu dalam jalur LFA.

Antibodi IgG anti-*E. coli* O157:H7 dan anti-IgG arnab daripada kambing dipegunkan pada membran nitroselulosa sebagai garis ujian (T) dan garis kawalan (C), (*Gambar rajah 1*). Larutan tindak balas (sampel) ditambah ke atas pad sampel yang mengandungi konjugat antibodi IgG anti-*E. coli* O157:H7-emas,

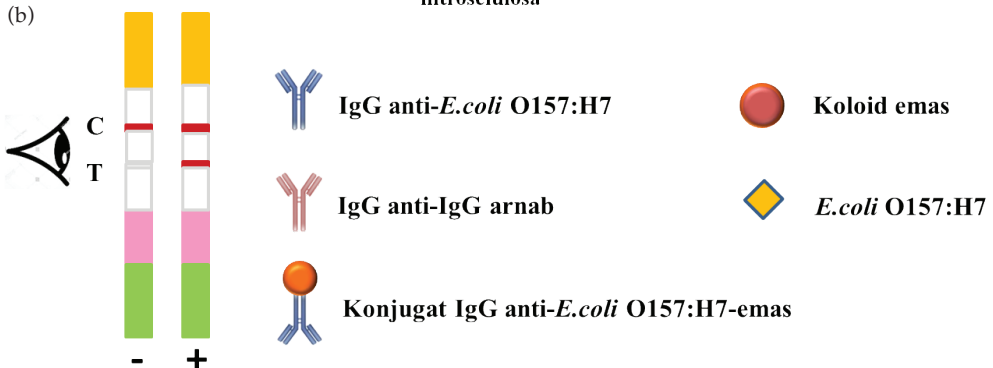


Rajah 1. Membangunkan lekuk piawai julat khusus dalam penentuan kepekatan poliklonal antibodi (pAb) yang optimum dan stabil pada nanopartikel emas. Kepekatan pAb optimum dan stabil pada emas adalah pada 10.9 µg/mL

(a)



(b)



Gambar rajah 1. (a) Ilustrasi skematik jalur LFA, (b) Pengesanan *E. coli* O157:H7 menggunakan jalur LFA

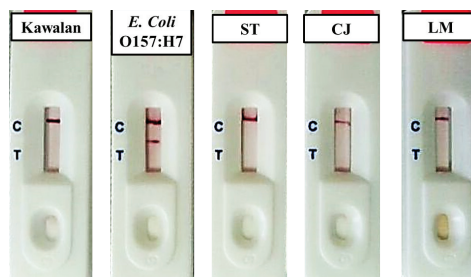
serum bovine-albumin (BSA) dan penimbal (PBS). Selepas 10 minit keputusan diperhatikan dengan hanya menggunakan mata kasar. Keputusan positif akan menunjukkan dua jalur iaitu pada garis ujian (T) dan garis kawalan (C) pada jalur LFA. Manakala keputusan negatif menunjukkan hanya dengan satu jalur iaitu pada garis kawalan (C).

Keputusan dan perbincangan

Kajian kereaktifan silang

Jalur LFA yang dibangunkan menunjukkan kekhususan terhadap sel *E. coli* O157:H7 dan tidak menunjukkan tindak balas terhadap bakteria lain yang digunakan dalam kajian ini iaitu bakteria gram negatif (*S. typhimurium*, ST dan *L. monocytogenes*, LM) dan bakteria gram positif (*C. jejuni*, CJ) yang merupakan bakteria paling biasa mencemari sampel makanan. Kajian kereaktifan silang menggunakan jalur LFA yang dibangunkan menunjukkan garis merah rubi yang jelas pada garis C dan T untuk sampel *E. coli* O157:H7 yang diuji dan tiada jalur yang muncul di garis T untuk kawalan negatif (penimbal lisis). Keputusan kajian juga menunjukkan tidak ada jalur merah rubi yang muncul di garis T untuk sampel ST, LM dan CJ yang diuji. Ini menunjukkan bahawa tidak ada reaktiviti silang yang ditunjukkan pada jalur LFA yang dibangunkan ketika diuji dengan spesies enterobakteria lain (*Gambar 1*).

Kajian ini juga mendapati, penghasilan ukuran dan lebar garis C dan T yang seragam adalah amat penting dalam pembangunan jalur LFA. Melalui kajian ini, garis C dan T dihasilkan secara manual di mana mikropipet telah digunakan untuk mengeluarkan sejumlah kecil (0.3 μ L dan 0.4 μ L) antibodi (IgG kambing anti-*E. coli* O157:H7). Melalui kaedah manual ini, mikropipet perlu dikendalikan dengan betul dan perlu dipastikan memberi tekanan yang konsisten pada panel ujian untuk membolehkan garis C dan T terhasil dengan seragam. Jika tekanan yang diberikan pada hujung mikropipet oleh pengendali tidak sekata, ia akan membentuk alur di permukaan pad ujian. Pembentukan alur ini boleh menyumbang kepada hasil positif yang palsu kerana konjugat IgG anti-*E. coli*-O157:H7-emas akan mudah terperangkap pada alur tersebut sewaktu dalam aliran lateral ketika sampel bergerak semasa ujian dijalankan. Penghasilan garis C dan T secara manual menggunakan mikropipet ini didapati lebih sukar untuk menghasilkan ukuran dan lebar garis yang seragam berbanding dengan menggunakan sistem pendispens automatik. Membangunkan garis yang kemas secara manual akan memerlukan lebih banyak ketelitian dan masa.

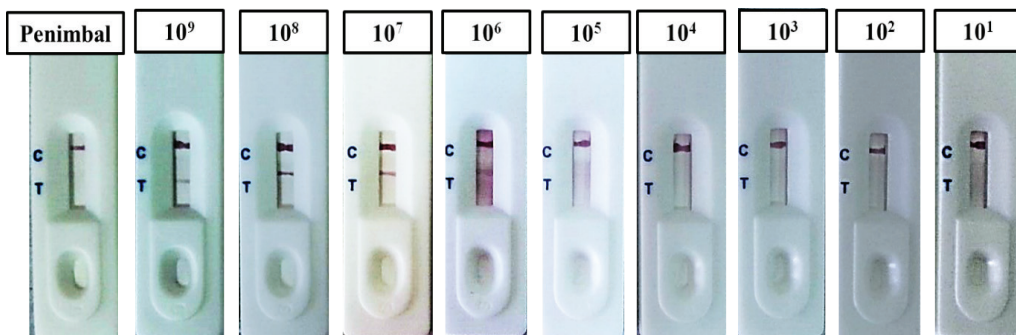


*Gambar 1. Perbandingan ujian kekhususan IgG anti-E. coli O157:H7 dengan bakteria gram negatif (*S. typhimurium*, ST dan *L. monocytogenes*, LM) dan bakteria gram positif (*C. jejuni*, CJ) pada jalur LFA*

Penyediaan antigen yang betul dan steril serta penggunaan medium pengasingan yang betul juga penting untuk memastikan antigen yang disediakan pada jalur LFA adalah bebas daripada bahan cemar lain. Kepekaan jalur LFA yang dibangunkan adalah serendah 1×10^6 CFU/mL (*Gambar 2*).

Kajian simulasi pengesanan E. coli O157:H7 dalam sampel makanan menggunakan jalur LFA

Kajian simulasi telah dijalankan dengan mencemarkan sampel makanan iaitu ayam, keju dan susu dengan *E. coli* O157:H7 secara sengaja. Kajian ini dijalankan bagi menjangka kebolehan jalur LFA untuk mengesan kehadiran *E. coli* O157:H7 dalam sampel makanan sebenar pada masa akan datang. Keputusan kajian pada jalur LFA menunjukkan pembentukan jalur merah rubi pada garis C dan T untuk ketiga-tiga matriks makanan yang dicemarkan secara sengaja (ayam, keju dan susu) (*Gambar 3*). Keputusan juga menunjukkan tiada jalur yang muncul di garis T untuk ketiga-tiga matriks kawalan yang tidak dicemarkan. Pembentukan jalur merah rubi yang jelas muncul di garis T pada kawalan positif (kultur *E. coli* O157:H7) menunjukkan bahawa jalur LFA cukup sensitif untuk mengesan kehadiran *E. coli* O157:H7. Jalur merah rubi pada garis T untuk ketiga-tiga matriks aruhan tidak terang dan ketara seperti jalur merah rubi yang terbentuk untuk kawalan positif walaupun jumlah kiraan koloni adalah tidak begitu berbeza (1×10^9 CFU/mL berbanding dengan 1×10^8 CFU/mL dan 1×10^7 CFU/mL). Ini mungkin disebabkan oleh adanya perencat dalam matriks makanan yang menghalang interaksi antara *E. coli* O157:H7 (antigen) dengan konjugat IgG anti-*E. coli* O157:H7-emas ketika sampel melalui pad konjugat. Terdapat kajian terdahulu yang melaporkan tentang kewujudan bahan perencat dalam larutan penyediaan protein makanan yang boleh mempengaruhi keberkesanan jalur LFA dan mengurangkan kepekaan jalur LFA terhadap *E. coli* O157:H7 dalam sampel matriks makanan berbanding dengan supernatan kultur tulen *E. coli* O157:H7. Matriks makanan boleh mengandungi pelbagai komponen seperti karbohidrat, lipid dan detergen yang boleh mengganggu interaksi

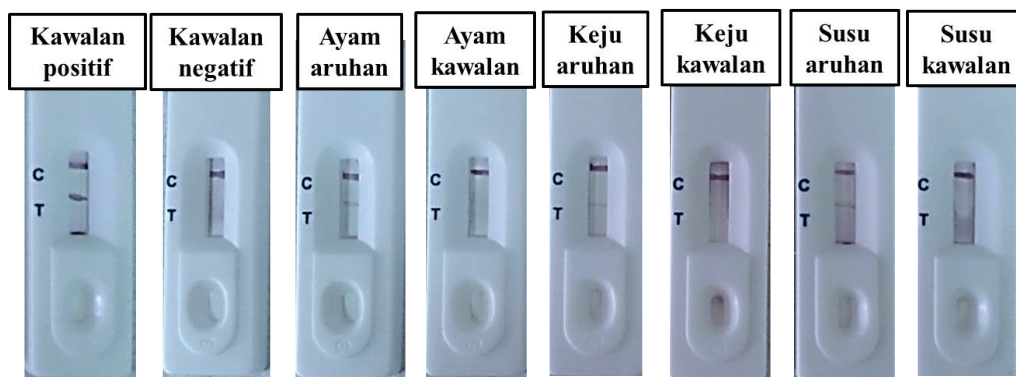


Gambar 2. Perbandingan ujian kepekaan tindak balas IgG anti-E. coli O157:H7 dengan siri pencairan bakteria E. coli O157:H7 (CFU/mL) pada jalur LFA

antara antigen dan antibodi. Prosedur penyediaan sampel disahkan steril dengan tiadanya jalur merah rubi didapati pada garis T untuk kawalan negatif (penimbal lisis).

Kajian ini turut mendapati pengesanan terus *E. coli* O157:H7 daripada matriks makanan adalah memerlukan langkah pengayaan pada peringkat penyediaan sampel makanan. Langkah pengayaan ini diperlukan untuk meningkatkan bilangan salinan bakteria dan dengan itu juga akan mencairkan bahan perencat. Terdapat juga kajian sebelum ini yang telah melaporkan bahawa kehadiran mikroorganisma lain yang tinggi dalam makanan akan dapat mengaburi kehadiran *E. coli* O157:H7 yang hadir dalam jumlah rendah. Jumlah *E. coli* O157:H7 yang sedikit tetap berpotensi untuk mendatangkan bahaya dan situasi tersebut sering kali membuatkan pengesanan *E. coli* O157:H7 menjadi sukar. Oleh itu, langkah awal pengayaan selektif diperlukan untuk meminimumkan mikroorganisma pesaing dan meningkatkan bilangan sel bakteria sasaran (*E. coli* O157:H7) dan kepekaan jalur LFA dalam sampel makanan.

Celupan jalur LFA secara terus ke dalam larutan sampel makanan tanpa mendapatkan supernatan yang tulen terlebih dahulu melalui pengempuran akan berpotensi memberikan keputusan negatif yang palsu. Laporan kajian terdahulu menunjukkan kaedah PCR dapat mengesan kehadiran *E. coli* O157:H7 pada kepekatan minimum 2.8×10^3 CFU/mL manakala jalur LFA yang dibangunkan dalam kajian ini hanya dapat mengesan kehadiran *E. coli* O157:H7 yang hadir dalam jumlah yang lebih tinggi iaitu 1×10^6 CFU/mL (*Gambar 3*). Walaupun jalur LFA yang dibangunkan tidak begitu peka berbanding dengan kaedah PCR yang dapat mengesan minimum 100 ng DNA atau satu salinan gen, tetapi kaedah jalur LFA ini adalah lebih mudah dari segi prosedur dan mesra pengguna berbanding dengan kaedah PCR yang memerlukan tenaga kerja mahir yang terlatih dan makmal yang khusus serta reagen yang mahal.



Gambar 3. Kajian perbandingan untuk matriks makanan pilihan E. coli O157:H7 *pada sampel ayam, keju dan susu menggunakan jalur LFA*

Kesimpulan

Kaedah yang pantas dan khusus untuk mengesan *E. coli* O157:H7 menggunakan jalur LFA berjaya dibangunkan. Kajian menunjukkan penggunaan jalur LFA yang dibangunkan ini tidak dapat mengesan enterobakteria lain yang turut digunakan dalam kajian ini dan hasil ujian dapat diperoleh dalam masa 15 minit setelah langkah pengayaan. Kaedah ini adalah pantas, boleh dilakukan di lapangan tanpa peralatan khas, mudah dan mesra pengguna. Kaedah ini mempunyai potensi untuk pelbagai aplikasi dan sangat praktikal terutama untuk tujuan pemantauan. Kajian yang lebih mendalam diharapkan dapat meningkatkan kepekaan pengesanan ujian LFA untuk kegunaannya di lapangan.

Penghargaan

Penyelidikan ini dibiayai oleh Geran Pembangunan (P-RB-121) daripada Institut Penyelidikan dan Pembangunan Pertanian Malaysia (MARDI), Malaysia.

Bibliografi

- Cathy, M.M.G. dan Stephen, O'D. (2013). Camera phone-based quantitative analysis of c-reactive protein ELISA. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems* 7(5): 655 – 659
- Fach, P., Perelle, S., Grout, J. dan Dilasser, J. (2003). Comparison of different PCR tests for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and development of an ELISA-PCR assay for specific identification of the bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 55: 383 – 392
- Faour-Klingbeil, D. dan Todd, E.C.D. (2020). Prevention and control of foodborne diseases in middle-east north African countries: Review of national control systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(1): 1 – 23
- Gharaibeh, D.N., Frances, M.B. dan Claudia, C.H. (2013). Development of monoclonal antibody-based assays for the detection of *Vibrio tubiashii* zinc- metalloprotease (VtpA). *Journal of Microbiological Methods* 94: 125 – 132
- Gordillo, R., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., Luque, M.I. dan Rodríguez, M. (2011). Development of PCR assays for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat products. *Meat Science* 88: 767 – 773
- Jeffrey, C.A. dan Scott, C.P. (2008). A simple and rapid technique for detecting protein phosphorylation using one-dimensional isoelectric focusing gels and immunoblot analysis. *Plant Journal* 55(5): 881 – 885
- Kamal, R.M., Merwad, A.M., Ali, Saber, T.M. dan Bayoumi, M.A. (2014). Applicability of RIDA® QUICK Verotoxin/O157 Combi kit for detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk. *International Food Research Journal* 21(3): 929 – 934

- Khang, J., Kim, D., Chung, K.W. dan Lee, J.H. (2016). Chemiluminescent aptasensor capable of rapidly quantifying *Escherichia coli* O157:H7. *Talanta* 147: 177 – 183
- Liu, J.-M., Hu, Y., Yang, Y.-K., Liu, H., Fang, G.-Z., Lu, X. dan Wang, S. (2018). Emerging functional nanomaterials for the detection of food contaminants. *Trends in Food Science and Technology* 71: 94 – 106
- Loo, Y.Y., Puspanadan, S., Goh, S.G., Kuan, C.H., Chang, W.S., Lye, Y.L., John, Rukayadi, Yoshitsugu, Nishibuchi, M. dan Son, R. (2013). Quantitative detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 in raw vegetables by MPN-PCR in Malaysia. *International Food Research Journal* 20(6): 3313 – 3317
- Makino, K., Yokoyama, K., Kubota, Y., Yutsudo, C.H., Kimura, S., Kurokawa, K., Ishii, K., Hattori, M., Tatsuno, I., Abe, H., Iida, T., Yamamoto, K., Onishi, M., Hayashi, T., Yasunaga, T., Honda, T., Sasakawa, C. dan Shinagawa, H. (1999). Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes Genet. Syst* 74: 227 – 239
- Moerman, F. (2018). Food defense. *Food Control and Biosecurity*, hlm. 135 – 223. Elsevier
- Nakasone, N., Toma, C., Lu, Y. dan Iwanaga, M. (2007). Development of a rapid immunochromatographic test to identify enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* by detecting EspB. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 57: 21 – 25
- Nataro, J.P. dan Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11(1): 142 – 201
- New, C.Y., Ubong, A., Premarathne, Thung, Lee, E., Chang, Loo, Y.Y., Kwan, S.Y., Tan, Kuan, C.H. dan Son, R. (2017). Microbiological food safety in Malaysia from the academicians' perspective. *Food Research* 1(6): 183 – 202
- Nian, H., Wang, J., Wu, H., Jiunn-Guang, L., Kong-Hwa, C., Joel, G.P. dan Lin, Y. (2012). Electrochemical immunoassay of cotinine in serum based on nanoparticle probe and immunochromatographic strip. *Analytica Chimica Acta* 713: 50 – 55
- Nurul, F.M., Noorlis, A., Nurul Ain, H. dan Suwaibah, M. (2017). Enumeration of *Escherichia coli* from fresh coconut milk in Negeri Sembilan, West Malaysia. *International Food Research Journal* 24(1): 455 – 458
- Perera, A., Clarke, C.M., Dykes, G.A. dan Fegan, N. (2015). Characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates from ruminant feces in Malaysia. *BioMed Research International* 2015: 1 – 8

- Qi, H., Zhong, Z., Zhou, H.X., Deng, C.Y., Zhu, H., Li, J.F., Wang, X. L. dan Li, F.R. (2011). A rapid and highly sensitive protocol for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on immunochromatography assay combined with the enrichment technique of immunomagnetic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* 6: 3033 – 3039
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K. dan Rasmussen, O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA- extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology* 17(1): 37 – 45
- Shamsul, B.M.T., Adamu, M.T., Mohd Desa, M.N. dan Khairani-Bejo, S. (2016). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and Enterobacteriaceae on hands of workers in halal cattle abattoirs in peninsular Malaysia. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 23(5): 65 – 71
- Singh, J., Sharma, S. dan Nara, S. (2015). Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water. *Food Chemistry* 170: 470 – 483
- Sukhumungoon, P., Nakaguchi, Y., Ingviya, Pradutkanchana, Iwade, Y., Seto, K., Son, R., Nishibuchi, M. dan Vuddhakul, V. (2011). Investigation of stx2 + eae+ *Escherichia coli* O157:H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. *International Food Research Journal* 18: 381 – 386
- Suria, M.S., Adlin Azlina, A.K., Mohd Afendy, A.T. dan Zamri, I. (2013). Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) efficiency in detection of pathogenic *Escherichia coli* O157: H7. *International Food Research Journal* 20(6): 3307 – 3311
- Wang, H., Feng, N., Yang, S., Wang, C., Wang, T., Gao, Y., Su, J., Zheng, X., Hou, X., Huang, H., Yang, R., Zou, X., Huang, G. dan Xia, X. (2010). A rapid immunochromatographic test strip for detecting rabies virus antibody. *Journal of Virological Methods* 170: 80 – 85
- Yau Tan, E., Mohammed Arifullah, B. dan Jan Mei Soon, B. (2016). Identification of *Escherichia coli* Strains from Water Vending Machines of Kelantan, Malaysia Using 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Expo Health* 8: 211 – 216
- Yonekita, T., Ohtsuki, R., Hojo, E., Morishita, N., Matsumoto, T., Aizawa, T. dan Morimatsu, F. (2013). Development of a novel multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* 93: 251 – 256
- Yusoff, S.F., Mohamed, M.T.M. dan Haron, F.F. (2018). Screening of *Escherichia coli* O157:H7 contamination and nitrate content on butterhead lettuce from market outlets. *Indian Journal of Public Health Research and Development* 9(11): 1460 – 1466

Ringkasan

Dalam kajian ini, penggunaan antibodi poliklonal (IgG) diaplikasikan untuk pengesanan bakteria pencemar melalui pembangunan jalur asai aliran lateral (LFA) menggunakan IgG khusus dalam kombinasi dengan koloid emas pada membran nitroselulosa. Konjugasi IgG anti-*Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7-nanopartikel emas berjaya dibangunkan untuk mengesan *E. coli* O157:H7 dalam makanan. Nanopartikel koloid emas berukuran 40 nm digunakan untuk konjugasi dengan IgG anti-*E. coli* O157:H7. Kepekatan optimum, 10.9 µg/mL IgG anti-*E. coli* O157:H7 ditentukan oleh lekuk piawai yang dihasilkan dalam kaedah titrasi. Kultur *E. coli* O157:H7 yang dicairkan secara bersiri telah dapat dikesan dan dilihat dengan jelas pada jalur LFA serendah 1×10^6 CFU/mL. IgG yang dihasilkan dalam arnab telah menunjukkan kapasiti pengikatan khusus terhadap *E. coli* O157:H7. Tiada tindak balas terhadap bakteria lain, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* dan *Campylobacter jejuni* yang bertindak balas terhadap IgG. Jalur LFA juga dapat mengesan *E. coli* O157:H7 dalam matriks sampel makanan yang berbeza setelah pengayaan sampel selama 18 jam.

Summary

The use of polyclonal antibody (IgG) has recently been applied to the detection of bacteria. A lateral flow assay (LFA) strip has been developed using a specific IgG in combination with colloidal gold on a nitrocellulose membrane. A conjugate, anti-*Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 IgG-gold nanoparticle was developed in this study for the detection of *E. coli* O157:H7 in food. The 40 nm in size of colloidal gold nanoparticles was used to conjugate the anti-*E. coli* O157:H7 IgG. The optimal concentration, 10.9 µg/mL of the anti-*E. coli* O157:H7 IgG was determined by standard curve generated in titration method. The serially diluted of *E. coli* O157:H7 was detected and clearly visualized on the LFA strip as low as 1×10^6 CFU/mL. The IgG raised in rabbit have shown specific binding capacity against *E. coli* O157:H7. No reaction to other bacteria, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* reacted to the IgG. The LFA strip could also detect *E. coli* O157:H7 in different food samples matrices after 18 h enrichment.

Pengarang

Suria Mohd Saad (Dr.)
Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor
E-mel: suria@mardi.gov.my

Mohd Afendy Abdul Talib, Noor Azlina Masdor (Dr.) dan Zamri Ishak (Dr.)
Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor