การตรวจหา *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยเทคนิค ELISA

DETECTION OF SALMONELLA TYPHIMURIUM ATCC 14028 BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

นางสาวพัลลภา พัฒนวงศ์

MISS PANLAPA PATTANAWONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2539

ISBN 974-621-762-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

DETECTION OF SALMONELLA TYPHIMURIUM ATCC 14028 BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

PANLAPA PATTANAWONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE

MASTER OF SCIENCE PROGRAM IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

1996

ISBN 974-621-762-3

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจหา SALMONELLA TYPHIMURIUM ATCC 14028
DETECTION OF SALMONELLA TYPHIMURIUM ATCC 14028 BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

ชื่อนักศึกษา นางสาวพัลลภา พัฒนวงศ์ **รหัสประจำตัว** 36064172

หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.เนาวรัตน์	ปานแย้ม	
รศ.ดร.ดุษณี	ธนะบริพัฒน์	
รศ.ดร.วิมลมาศ	ลิปิพันธ์	
ผศ.วรรณา	ตั้งเจริญชัย	
ผศ.นวลพรรณ	ณ ระนอง	

ค่าระดับคะแนนที่เป็นเอกฉันท์จากคณะกรรมการสอบ GOOD

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 4 ตุลาคม 2539 เวลา 14.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ห้องประชุมคณะกรรมการประจำคณะวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.มนัส สังวรศิลป์)

รักษาราชการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 3 **เดือน** ตุลาคม **พ.ศ.** 2539

หมายเหตุ การวัดผลวิทยานิพนธ์ให้ใช้ค่าระดับคะแนนดังนี้

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

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหา *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยเทคนิค ELISA
นักศึกษา	นางสาวพัลลภา พัฒนวงศ์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ. ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์
ระดับการศึกษา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ ทหาร ลาดกระบัง
พ.ศ.	2539

บทคัดย่อ

ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่ทางเดินอาหารและท้องร่วงในตัวอย่างอาหารโดยวิธี ELISA ทำการเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ทดสอบหาไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้ และหาปริมาณที่เหมาะสมในการทำ ELISA พบว่าปริมาณ anti-whole cell serum ที่เหมาะสม คือที่ความเจือจาง 1: 10^3 และปริมาณ whole cell antigen ที่เหมาะสมคือ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ anti-flagella serum ที่เหมาะสมคือที่ความเจือจาง 1: 10^4 และปริมาณ flagella antigen ที่เหมาะสมคือที่ความเจือจาง 1:10^4 โดยที่ปริมาณโปรตีนของแฟลกเจลลาเริ่มต้นคือ 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการนำ partial purified anti-flagella serum ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp.ในตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อไก่ และนม โดยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าได้ผลตรงกัน 100 % สามารถวิเคราะห์เชื้อในตัวอย่างได้แม้มีเชื้ออยู่ในระดับต่ำ (1-5 cfu / 25g) ทดสอบ cross reaction ของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเชื้ออื่น พบว่า partial purified anti-flagella serum เกิดปฏิกิริยากับเชื้ออื่นน้อยมาก เชื้ออื่นที่ปะปนในตัวอย่างอาหารจึงไม่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ วิธี ELISA ใช้เวลาเร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 วัน สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากได้ในคราวเดียว ลดปริมาณงานและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

Thesis Title	Detection of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 by Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Student	Miss Panlapa Pattanawong
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Dusanee Thanaboripat
Thesis Co-advisor	Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun
Level of Study	Master of Science Program in Biotechnology
Department	Applied Biology King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Year	1996

Abstract

ELISA method was developed for the detection of *Salmonella* spp. , a food-borne disease pathogen. Polyclonal antibody against *Salmonella* was raised and antibody titers were determined to find the optimum dilution for ELISA test. The optimum dilution ratio of anti-whole cell serum was $1:10^{3}$ and optimum concentration of whole cell antigen was 10^{8} cells/ml . The optimum dilution ratio of anti-flagella serum and flagella antigen was $1:10^{4}$, primary protein concentration of flagella was 1.8 mg/ml . Partial purified anti-flagella serum was used to detect the presence of *Salmonella* in pork, chicken and milk samples by ELISA assay in comparison with culture method . The results showed that two methods were in an agreement 100 % and as low levels of bacteria as 1-5 cfu / 25 g were detected in the samples . The cross reactivity of partial purified anti-flagella serum with other organisms was tested and very low cross reaction was found . Thus, other bacterial contamination in food samples would have no interference with the ELISA test. ELISA technique showed to be sensitive , required minimum time , permitted multisample analysis , reduced labour cost and quicker than conventional method.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และ รศ. ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา แนะนำ ติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานและตรวจแก้ไข ตลอดจนให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณองค์การเภสัชกรรมที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการดำเนินงานวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีและขอกราบขอบพระคุณ ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม ผศ. วรรณา ตั้งเจริญชัย ผศ. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ สุรีย์ นานาสมบัติ และอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำ รวมทั้งชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ขอขอบคุณ คุณเลิศชาย หนูพลาย และ คุณกนกรัตน์ ป้องประทุม รวมทั้งเพื่อนร่วมรุ่นและรุ่นน้องที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจต่อผู้วิจัยอย่างใกล้ชิดตลอดมา

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจทำให้ผู้วิจัยมีวันแห่งความสำเร็จนี้ได้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน

พัลลภา พัฒนวงศ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ..... IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ.....IX

บทที่

1. บทนำ.....1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

ขอบเขตการวิจัย.....2

ขั้นตอนของการศึกษา.....3

2. ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง..... 4

Salmonella 4

คุณสมบัติของแอนติเจนและแอนติบอดี.....5

การตอบสนองของระบบภูมิต้านทาน.....9

โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลิน.....11

คุณสมบัติทั่วไปของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละชนิด.....13

ทฤษฎี Clonal Selection ในการสร้างแอนติบอดี.....14

การผลิตแอนติบอดี.....18

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี..... 21

เทคนิค ELISA 25

การประยุกต์ใช้เทคนิค ELISA ในด้านต่างๆ.....33

การตรวจหา *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยเทคนิค ELISA..... 35

บทที่ หน้า

การตรวจหา *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี culture method..... 39
3. ขั้นตอนการดำเนินงาน.....42
เครื่องมือและอุปกรณ์..... 42
วิธีดำเนินการวิจัย.....44
1. การเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดี.....44
1.1 การเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028..... 44
1.2 การเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028..... 46
2. การตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัม *Salmonella typhimurium* ATCC 14028..... 48
2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนและแอนติบอดี ในการทำ ELISA 48
2.2 การทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัม..... 49
2.3 การศึกษา cross reaction ของแอนติซีรัม *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยเทคนิค ELISA..... 50
3. การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารโดยเทคนิค ELISA เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)..... 52
3.1 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่าง.....52
3.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีเชื้ออยู่ตามธรรมชาติ.....61
4. ผลการทดลอง..... 65
1. ผลการเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดี.....65
1.1 ผลการเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028..... 65

บทที่ หน้า

1.2 ผลการเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028..... 65
2. ผลการตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัม *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.....65
2.1 ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนและแอนติบอดีในการทำ ELISA.....65
2.2 ผลการทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัม.....83
2.3 ผลการศึกษา cross reaction ของแอนติซีรัมที่จำเพาะกับ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยเทคนิค ELISA.....88
3. ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารโดยเทคนิค ELISA เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)..... 94
3.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่าง.....94
3.2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีเชื้ออยู่ตามธรรมชาติ.....96
5. บทสรุป.....100
บรรณานุกรม.....103
ภาคผนวก ก สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี culture method.....106
ภาคผนวก ข สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA.....109
ภาคผนวก ค การทดสอบ *Salmonella* โดยใช้ Triple Sugar Iron (TSI) agar 110
ภาคผนวก ง การทดสอบ *Salmonella* โดยใช้ Lysine Indole Motility medium (LIM).....112
ภาคผนวก จ ผลการทดสอบสายพันธุ์ของ *Salmonella* จากตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อหมู.....115
ประวัติผู้เขียน.....117

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. แสดงเอนไซม์และสับสเตรทที่ใช้คู่กัน.....32
2. แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 และ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....67
3. แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 และ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....67
4. แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 และ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 72
5. แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 และ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 72
6. แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 3 และ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....76
7. แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 4 และ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....76
8. แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 3 และ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 80
9. แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 4 และ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....80
10. แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA.....83
11. แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของ anti-whole cell serum ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 56.....84
12. แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของ anti-flagella serum ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 120..... 86
13. แสดงผล cross reaction ของ anti-whole cell serum กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ.....89

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

14.แสดงผล cross reaction ของ anti-flagella serum กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ..... 90

15.แสดงผล cross reaction ของ partial purified anti-whole cell serum
กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ.....91

16.แสดงผล cross reaction ของ partial purified anti-flagella serum
กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ.....92

17.แสดงผลการวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยเติมเชื้อ
ที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่าง..... 95

18.แสดงผลการวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างเนื้อไก่.....97

19.แสดงผลการวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างเนื้อหมู..... 98

20.แสดงผลการวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างนม.....99

สารบัญภาพ

หน้า

1. แสดงโครงสร้างผนังเซลล์ของ *Salmonella*.....8
2. แสดงการตอบสนองของร่างกายแบบ humoral immune response เพื่อสร้าง
แอนติบอดีที่จำเพาะและ cell-mediated immune response เพื่อสร้างสาร lymphokine.....10
3. แสดงโครงสร้างของโมเลกุลแอนติบอดี.....12
4. แสดงทฤษฎี Clonal Selection ของ Burnet.....15
5. แสดงการตอบสนองของระบบภูมิต้านทานแบบปฐมภูมิและทุติยภูมิ.....17
6. แสดงการผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดีโดยวิธี Conventional.....18
7. แสดงการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีโดยวิธี Hybridoma Technique..... 20
8. แสดง ELISA แบบไม่แข่งขัน Double Antibody Sandwich (วัด Ag).....26
9. แสดง Antibody Class Capture Assay วัด Ab: IgG, IgM, IgA.....27
10.แสดงวิธี Indirect method (วัด Ab)..... 28
11.แสดง ELISA แบบแข่งขัน..... 30
12.แสดงการตรวจหา *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร.....35
13.แสดงการฉีดเชื้อเข้าเส้นเลือดดำบริเวณใบหูของกระต่าย.....45
14.แสดงการฉีดแฟลกเจลลาของเชื้อเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย..... 47
15.แสดงวิธีวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร..... 53
16.แสดงตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู นม และไข่ผง บรรจุในขวดอาหาร
Buffer peptone water (BPW) 54
17.แสดงการปิเปตต์ BPW ที่ผสมตัวอย่าง ใส่หลอดทดลองที่มีอาหาร
Rappaport-Vassiliadis medium (RV broth)..... 56
18.แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร
โดยเทคนิค ELISA..... 57
19.แสดงเครื่อง microplate washer (Diagonostic Pasteur Sanofi)..... 58
20.แสดงเครื่อง ELISA Expresso Cassette LP 400 และเครื่องพิมพ์.....59

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

21.แสดงการปีเปตต์อาหาร RV broth 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Semi Solid Rappaport -Vassiliadis medium (MSRV) โดยหยดลง 5 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 1 หยด..... 61

22.แสดงโคโลนีของ *Salmonella* บน XLD ซึ่งมีสีชมพู มีจุดดำตรงกลางหรือมีสีแดง..... 62

23.แสดงผลการทดสอบ *Salmonella* ใน TSI หลอดที่ให้ผลบวกคือ butt acid (เกิดสีเหลืองบริเวณ butt) และ slant alkaline (เกิดสีแดงบริเวณ slant) อาจมี H_2S (สีดำ) และอาจมีก๊าซ..... 63

24.แสดงผลการทดสอบ *Salmonella* โดยใช้อาหาร LIM ให้ผลการสร้างอินโดลเป็นลบคือเกิดสีเหลืองไม่เกิดสีแดง..... 64

25.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 กับ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 68

26.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 กับ whole-cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ 68

27.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ whole cell antigen กับ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 69

28.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ whole cell antigen กับ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 69

29.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 กับ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 73

30.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 กับ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 73

31.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ flagella antigen กับ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 74

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

32.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ flagella antigen
กับ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 74
33.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-flagella serum
จากกระต่ายตัวที่ 3 กับ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ 77
34.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-flagella serum
จากกระต่ายตัวที่ 4 กับ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ 77
35.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ whole cell antigen
กับ anti-flagella serum จาก กระต่ายตัวที่ 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 78
36.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ whole cell antigen
กับ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 78
37.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-flagella serum
จากกระต่ายตัวที่ 3 กับ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ 81
38.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-flagella serum
จากกระต่ายตัวที่ 4 กับ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ 81
39.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ flagella antigen
กับ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 82
40.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ flagella antigen
กับ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 82
41.แสดงกราฟแอนติบอดีไตเตอร์ของ anti-whole cell serum
จากกระต่ายตัวที่ 1 และ 2..... 85
42.แสดงกราฟแอนติบอดีไตเตอร์ของ anti-flagella serum
จากกระต่ายตัวที่ 3 และ 4..... 87

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันเชื้อ *Salmonella* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหาร กำลังเป็นที่สนใจทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากมีผู้ป่วยติดเชื้อนี้กันมาก การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ จึงมีความสำคัญต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และการขนส่งสินค้าอาหารไปต่างประเทศ โดยเฉพาะอาหารแช่แข็งของไทย

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในตระกูล (family) Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นแท่งและมีแฟลกเจลลารอบตัวเซลล์ ทำให้เกิดโรคติดเชื้อที่ทางเดินอาหาร มักพบปะปนอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ โดยเฉพาะพวกเนื้อสัตว์และไข่ การติดเชื้อเกิดจากการกินอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อปะปนเข้าไป การติดเชื้อจาก *S. typhi* ทำให้เกิดไข้ไทฟอยด์ ถ้าได้รับเชื้อ *S. typhimurium* ทำให้เกิดอาการท้องเสียความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อที่เข้าสู่ร่างกายและความต้านทานของผู้ป่วย

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารตลอดจนตัวอย่างทางคลินิก ตามปกติใช้เวลานานและมีปัญหาหลายอย่าง เนื่องจากเชื้อที่ปรากฏมีอยู่ในระดับต่ำและมีแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นๆ วิธีเดิมที่ใช้วิเคราะห์คือวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method) ซึ่งมีการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารที่ใช้แยกเชื้อให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นเพื่อเพิ่มความสะดวกในการวิเคราะห์ แต่ยังคงใช้ระยะเวลาในการแยกเชื้ออย่างน้อย 4 วัน จึงมีการปรับปรุงวิธีการทดสอบหาเชื้อที่รวดเร็วขึ้นในช่วงหลายปีที่ผ่านมา และวิธี ELISA เป็นวิธีที่นิยมใช้ ทำให้มีการศึกษาและปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค ELISA เพื่อเพิ่มความไว ความถูกต้อง ความแม่นยำ และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยที่สุด

งานวิจัยในครั้งนี้จึงได้ผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028และหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำโพลีโคลนัล

แอนติบอดีที่ได้ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี ELISA เพื่อให้ได้ผลที่รวดเร็วและแม่นยำ จะช่วยลดระยะเวลาการทดสอบและลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อเตรียม polyclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
2. เพื่อนำ antibody ที่ได้มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อนำ antibody ที่ผลิตได้มาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella*
2. เพื่อประหยัดเวลาในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆซึ่งทำได้รวดเร็วและมีความแม่นยำมากขึ้น

ขอบเขตการวิจัย

พัฒนาวิธีวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี ELISA โดยเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC14028 โดยการฉีดกระต่ายด้วย whole cell antigen และ flagella antigen ทำการทดลองเพื่อศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยใช้เทคนิค ELISA นำแอนติบอดีไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารเนื้อหมู เนื้อไก่ และนม โดยเทคนิค ELISA เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี

ขั้นตอนของการศึกษา

1. ตรวจเอกสาร เตรียมอุปกรณ์ สารเคมี สัตว์ทดลอง เพื่อใช้ในงานวิจัย
2. ทำการเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยการฉีดกระต่ายด้วย whole cell antigen และ flagella antigen
3. ทำการทดลองเพื่อศึกษาความจำเพาะของ โพลีโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยใช้เทคนิค ELISA
4. ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารต่างๆโดยเทคนิค ELISA เปรียบเทียบกับ วิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. สรุปผลการทดลอง

บทที่ 2
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

Salmonella

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในตระกูล (family) Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นแท่งและมีแฟลกเจลลารอบตัวเซลล์ (peritrichous flagella) บางชนิดมีแคปซูล ทำให้มีชีวิตอยู่ได้นานในอาหารแห้ง เช่นในนมผง มะพร้าวแห้ง ไข่ เชื้อสกุลนี้เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เช่น MacConkey , EMB , SS และ DCA agar โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ลักษณะกลม ขอบเรียบ ผิวเรียบมัน ไม่มีสี (ไม่ใช้น้ำตาลแล็กโทส) ไม่ทึบแต่ไม่โปร่งแสง บางสายพันธุ์โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก โดยปกติคนจะไม่มีเชื้อ *Salmonella* อยู่ในร่างกาย แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติของจุลชีพพวกนี้ได้แก่ ผู้ป่วยที่เป็นโรคหรือคนที่เป็นพาหะของโรค พบ *Salmonella* หลายชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ต่างๆ การติดเชื้อเกิดจากการกินอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อปะปนเข้าไป คนที่มีการติดเชื้ออาจมีอาการหรือไม่มีอาการของโรคปรากฏ โรคที่เกิดจาก *Salmonella* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่

1. โรคไข้เอนเทอริค (Enteric fever) เป็นชื่อรวมที่ใช้บอกกลุ่มอาการของโรค โดยไม่บ่งเฉพาะว่าเกิดจาก *Salmonella* serotype ใด ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อจาก *S. typhi* เรียกโรคที่เกิดว่าไข้รากสาดน้อยหรือไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) ถ้าการติดเชื้อเกิดจาก *S. paratyphi* เรียกไข้รากสาดเทียมหรือไข้พาราไทฟอยด์ (paratyphoid fever) อาการของโรคไข้ไทฟอยด์มักรุนแรงกว่าไข้พาราไทฟอยด์

2. โลหิตเป็นพิษ เกิดจาก *S. choleraesuis* ผู้ป่วยมีอาการของโลหิตเป็นพิษ พบเชื้อในกระแสเลือดแต่ไม่มีอาการเกี่ยวกับลำไส้ เชื้อทำให้เกิดหนองฝีที่อวัยวะต่างๆ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ กระดูกอักเสบ ปอดอักเสบ และเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ เป็นต้น

3. โรคอุจจาระร่วง ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อที่เป็นปรสิตของสัตว์พวก วัว ควาย ไก่ เช่น *S. typhimurium* เชื้ออาจปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์ที่นำมาประกอบอาหารแล้วปรุงไม่สุกดี ใช้ความร้อนไม่เพียงพอที่จะทำให้เชื้อตายหมด หรือแมลงวันอาจเป็นพาหะนำเชื้อโรคมาปนเปื้อนอาหารที่ปรุงเสร็จ เมื่อตั้งอาหารไว้ในที่อุ่น เชื้อจะเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น จนสามารถทำให้เกิดอาการของโรคในคนที่รับประทานอาหารเข้าไป ระยะฟักตัวของโรค 8-48 ชม. ผู้ป่วยมีอาการปวดท้อง อาเจียน อุจจาระร่วง นาน 2-5 วัน ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อที่เข้าสู่ร่างกายและความต้านทานของผู้ป่วย

<u>คุณสมบัติของแอนติเจนและแอนติบอดี</u>

แอนติเจน (antigen) หรืออิมมูโนเจน (immunogen) คือโมเลกุลที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิต้านทาน (immune response) ซึ่งประกอบไปด้วยหลายๆ antigenic determinant แต่ละ determinant สามารถจับกับส่วนของ antigenic-binding site ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วนนั้นๆ บางครั้งเรียก determinant ว่า epitope แอนติเจนอาจเป็นสารพวกโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน หรือ กรดนิวคลิอิกก็ได้ ปกติใช้คำว่าแอนติเจนซึ่งหมายถึงสารที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดี ส่วนอิมมูโนเจนหมายถึงสารที่นำเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ทดลองแล้วสามารถก่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิต้านทาน คุณสมบัติของแอนติเจนหรืออิมมูโนเจนที่ดีมีดังนี้คือ (มหาวิทยาลัยมหิดล, 2531)

1. เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) ควรมีขนาดตั้งแต่ 10,000 ดาลตัล (D) ขึ้นไป ส่วนประกอบทางเคมีอื่นๆของสารนั้นเป็นสิ่งสำคัญในการกำหนดการตอบสนองของร่างกาย

2. โมเลกุลมีความซับซ้อน (molecular complexity) เช่น พวกโปรตีนเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างซับซ้อน จึงทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่ดี สารบางชนิดมีโมเลกุลขนาดใหญ่แต่ไม่มีความซับซ้อน ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่ไม่ดี เช่น พอลิเมอร์สังเคราะห์และโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ของกรดอะมิโน

3. มีคุณสมบัติเป็นสิ่งแปลกปลอมของร่างกาย (foreignness ; non-self) ร่างกายมีการตอบสนองต่อสิ่งที่มีความแตกต่างจากองค์ประกอบต่างๆในร่างกาย ยกเว้นบางสภาวะที่มีการชักนำซึ่งก่อให้เกิดการสร้างภูมิต้านทานต่อเนื้อเยื่อของตนเอง

4. ละลายได้ในร่างกาย (solubility) สารที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่ไม่ดีเช่นพอลิเมอร์สังเคราะห์ เมื่อเข้าสู่ร่างกายไม่สามารถละลายได้แม้จะใช้ปฏิกิริยาจากเอนไซม์ช่วย จึงขาดคุณสมบัติที่จะถูกแปรสภาพต่อทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิต้านทาน

โครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* แบ่งได้เป็น 3 ส่วนคือ

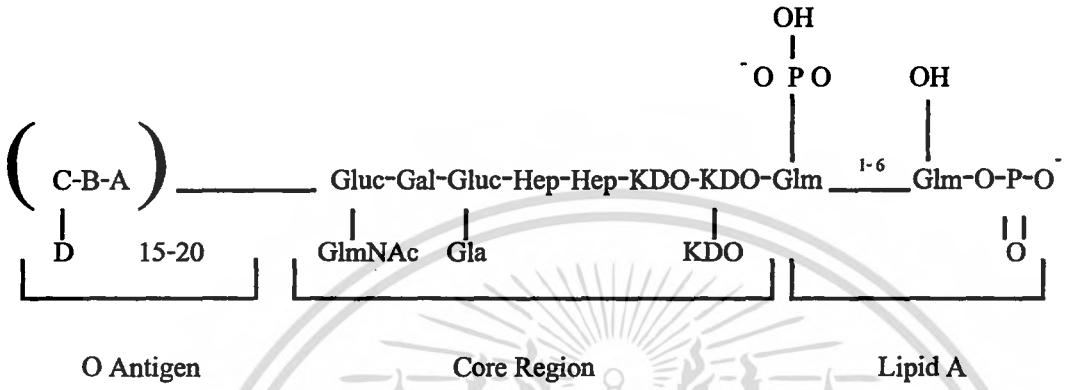
1. Vi-Ag (virulent antigen) เป็นส่วนของแคปซูล สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *Salmonella typhi* และ *Salmonella paratyphi* C มีแอนติเจน Vi ทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงกว่าเชื้อที่ไม่มีแอนติเจนนี้ Vi-Ag มีคุณสมบัติเป็น acidic polysaccharide เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชั้นนอกของเชื้อ *Salmonella* ประกอบด้วยโฮโมพอลิเมอร์สายตรง (linear homopolymer) ของ 1-4 , 2-deoxy-2-N - acetyl galacturonic acid และ C3 ที่เปลี่ยนแปลงได้ พวก O-acetylated (Felix และคณะ , 1935)

จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า antigenic determinant ของ Vi-Ag ประกอบด้วย 2 domains เป็นอย่างน้อย domain แรกอยู่บริเวณ O-acetyl group และ domain ที่ 2 อยู่บน N- acetyl group และ carboxyl group (Szewczyk และ Taylor , 1980)

2. O-Ag (somatic antigen) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ของแบคทีเรีย ประกอบด้วยหน่วยของ oligosaccharide ซ้ำๆกัน จับกับแกน (basal core polysaccharide) ซึ่งจะต่อกับไขมัน A อีกที (ภาพที่ 1) หน่วยของ oligosaccharide ประกอบด้วยน้ำตาล เช่น mannose, rhamnose , galactose และ น้ำตาล dideoxyhexose จับกันหลายพันธะและหลายแบบทำให้ได้ลักษณะความเป็นแอนติเจนที่ต่างกัน (Makela และคณะ , 1973)

3. H-Ag (flagella antigen) เป็นสารที่มีโปรตีน (fagellin) ซึ่งไม่ทนต่อความร้อน มีปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดี เกิดจากกรดอะมิโนในแฟลกเจลลา ฤทธิ์ของH-Agจะถูกทำลายเมื่อมีแอลกอฮอล์หรือกรด แต่ยังคงคุณสมบัติอยู่ได้เมื่อมีฟอร์มาลิน ประโยชน์ของ H-ag นอกจากใช้ชันสูตรโรคโดยดูระดับไตเตอร์ที่สูงขึ้นแล้ว ยังช่วยในการแบ่งแบคทีเรียออกเป็นซีโรไทป์ที่ละเอียด

ภาพที่ 1



Glm = Glucosamine Gluc = Glucose

KDO = Ketodeoxyoctonic acid Gla = Galactose

GlmNAc = N-acetyl glucosamine Hep = Heptose

A , B , C , D = Monosaccharides เช่น mannose , galactose , rhamnose ,glucose , abequose และ colitose น้ำตาลเหล่านี้จะเรียงลำดับซ้ำกัน 15-20 หน่วย

แสดงโครงสร้างผนังเซลล์ของ *Salmonella*

(ที่มา : มหาวิทยาลัยมหิดล , 2531)

ย่อยลงไปอีก สำหรับ *Salmonella* H-Ag มี 2 phase สามารถแบ่งออกได้เกือบ 2000 ชนิด (Silverman และ Simon , 1977)

แอนติบอดี (antibody ; Ab) หรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin ; Ig) คือกลุ่มของโปรตีนที่เกิดจากการตอบสนองทางภูมิต้านทานของร่างกายแบบ humoral immunity กลุ่มของโปรตีนเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันหลายอย่าง เช่นด้านโครงสร้างหลักของโมเลกุล คุณสมบัติทางชีววิทยาบางชนิดที่เหมือนกัน แต่ในขณะเดียวกันก็มีคุณสมบัติที่ต่างกัน โดยเฉพาะการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ทำให้แอนติบอดีแต่ละตัวมีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีนั้นๆ

การตอบสนองของระบบภูมิต้านทาน

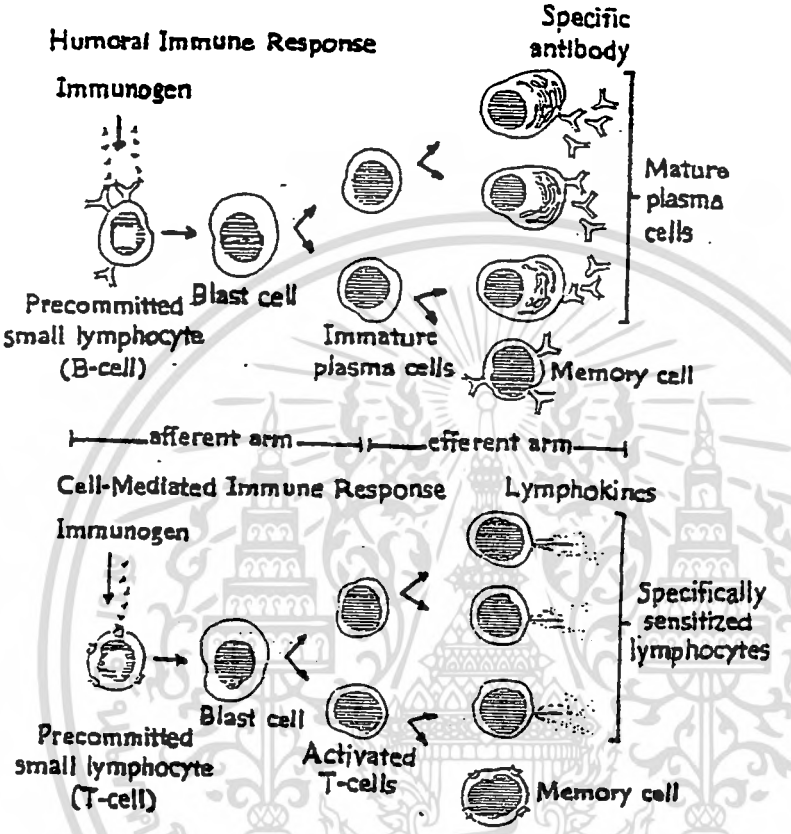
เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย ระบบภูมิต้านทาน (immune system) ของร่างกายจะตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนนั้น เพื่อทำลายและกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนดังกล่าวออกไปจากร่างกาย การตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมมี 2 แบบ คือ

1. การตอบสนองแบบไม่จำเพาะ (**non-specific immune response**) เป็นการตอบสนองเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย ไวรัส และ รา ออกจากร่างกาย ด้วยวิธีการที่ไม่ซับซ้อนและไม่เฉพาะเจาะจง มีผลการทำลายไม่สูงนัก สามารถป้องกันได้เฉพาะจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นอันตรายมากและกำจัดได้ในปริมาณหนึ่งเท่านั้น ร่างกายจะใช้วิธีการตอบสนองแบบนี้ร่วมกับการตอบสนองแบบจำเพาะ ลักษณะการตอบสนองแบบไม่จำเพาะนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดการอักเสบ (inflammation) การป้องกันของผิวหนังหรือเยื่อบุผิวไม่ให้เชื้อโรคผ่านเข้าไป หรือการปล่อยสารเคมีที่มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรีย

2. การตอบสนองแบบจำเพาะ (**specific immune response**) เป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ต้องอาศัยกลไกที่ยุ่งยากกว่าแบบแรก จะเกิดขึ้นเมื่อการตอบสนองแบบไม่จำเพาะไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกไปได้ การตอบสนองแบบจำเพาะสามารถแบ่งออกได้เป็นสองส่วนคือ

2.1 การตอบสนองของระบบภูมิต้านทานแบบ humoral immune response (HIR) เป็นการตอบสนองของระบบภูมิต้านทานโดยมีการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีดังกล่าวได้แก่ B-lymphocyte และพลาสมาเซลล์ (plasma cell) B-lymphocyte ซึ่งมีกำเนิดมาจากไขกระดูก อยู่ในรูปของ pre-B-cell จะโคจรไปยัง lymphoid tissue เพื่อให้มีการพัฒนาไปเป็น B-lymphocyte ที่เจริญเต็มที่ หลังจากนั้นจะถูกปล่อยออกมาสู่ระบบกระแสเลือดและกระแสน้ำเหลืองทั่วร่างกาย เมื่อมีอิมมูโนเจนเข้าไปจะมีการตอบสนองของ B-lymphocyte เฉพาะ clone ที่จำเพาะต่ออิมมูโนเจนนั้น B-lymphocyte จะมีการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็น blast cell และ ท้ายสุดเป็นพลาสมาเซลล์ทำหน้าที่ สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนเจนแต่ละชนิด (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2



แสดงการตอบสนองของร่างกายแบบ humoral immune response เพื่อสร้างแอนติบอดี ที่จำเพาะและ cell- mediated immune response เพื่อสร้างสาร lymphokine

(ที่มา : มหาวิทยาลัยมหิดล , 2531)

2.2 การตอบสนองของระบบภูมิต้านทานแบบ cell-mediated immune response (CMIR) เป็นการตอบสนองโดยเซลล์ที่อยู่ในระบบภูมิต้านทาน เซลล์ที่ทำหน้าที่ดังกล่าวคือ T-lymphocyte ชนิดต่างๆ เช่น helper T-lymphocyte , suppressor T-lymphocyte และ cytotoxic T-lymphocyte มีหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เมื่อแอนติเจนสัมผัสกับ T-lymphocyte ที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นทำให้ T-lymphocyte เกิดการเจริญเปลี่ยนแปลงและแบ่งตัวกลายเป็นสภาพที่ถูกกระตุ้นแล้วเรียกว่า specifically sensitized T-lymphocyte ซึ่งบางเซลล์อาจเปลี่ยนแปลงเป็น memory cell และเมื่อได้รับแอนติเจนอีกครั้งหนึ่งจะสร้างสาร lymphokine ออกมา มีผลช่วยในการทำลายสิ่งแปลกปลอม (มหาวิทยาลัยมหิดล , 2531)

<u>โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลิน</u>

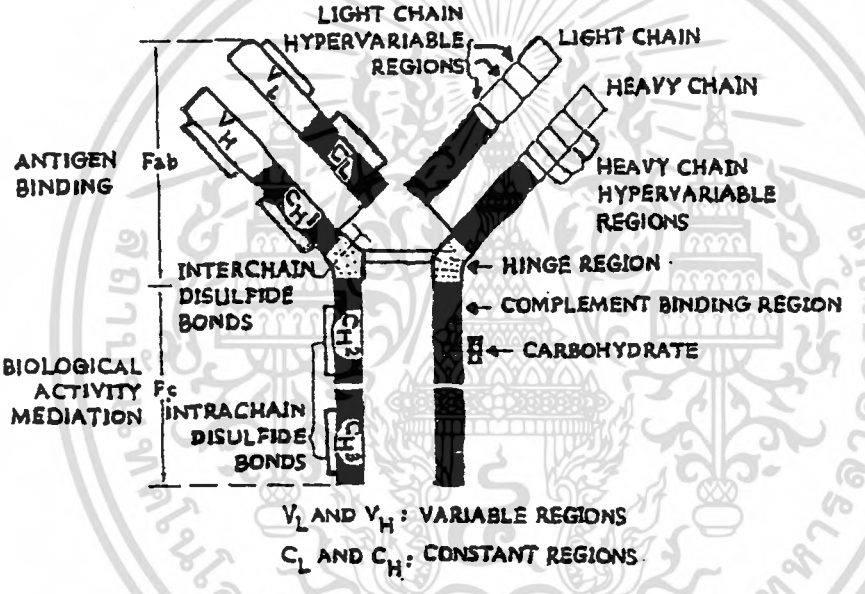
โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลิน (ภาพที่ 3) ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 4 สาย คือสายยาว 2 สายเรียก heavy (H) chain และสายสั้น 2 สายเรียก light (L) chain เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (-S-S-) จำนวนพันธะไดซัลไฟด์เปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของ class และ subclass ของ Ig แต่ละชนิด แต่ละสายของพอลิเพปไทด์มีกรดอะมิโนเรียงกันเป็นสาย เรียงลำดับเหมือนกันจาก N-terminal ไปยังส่วนปลายอีกด้านซึ่งเป็น C-terminal ทุกสายจะหันปลายด้าน N หรือ C-terminal ไปทางเดียวกัน บริเวณที่อยู่ติดกับพันธะไดซัลไฟด์อันสุดท้ายที่เชื่อม H-chain และอยู่ใกล้ทางด้าน N-terminal อยู่บริเวณที่ CH1 ต่อกับ CH2 เรียกว่า hinge-region เป็นบริเวณที่ช่วยในการเคลื่อนไหวของโมเลกุล Ig ทำให้แขนทั้งสองข้างของโมเลกุลกางเข้าออกได้มากขึ้นเพื่อช่วยให้โมเลกุลจับกับแอนติเจนได้ดีขึ้น ตรงส่วนนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น proline 3โมเลกุล ม้วนพับหรือบิดคลี่ได้ ทำให้โมเลกุลของ Ig มีลักษณะเป็นรูปตัว Y หรือ T สำหรับจับกับแอนติเจน

Antigen binding site คือส่วนของ Ig ที่ใช้จับกับแอนติเจนอยู่บริเวณ variable region ของทั้ง L-และ H-chain (VL และ VH) เป็นบริเวณที่แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีแต่ละตัว เนื่องจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนและการบิดไปมาของสายเพปไทด์ตรงบริเวณ VL และ VH ส่วนนี้บางทีเรียกชื่อย่อว่า Fab โดยทั่วไป Ig 1 ตัวจะประกอบด้วย Fab 2 ชิ้นติดกันเรียกว่า F(ab')2 ดังนั้นถ้าเป็นพอลิเมอร์ของ Ig จะมี Fab เป็นเท่าตัวตามกันไป แต่การทำหน้าที่นั้นอาจทำได้ไม่ดีครบทุก Fab

จากความแตกต่างขององค์ประกอบใน H-chain ของโมเลกุลแอนติบอดี สามารถแบ่ง Ig ของคนออกได้เป็น 5 ชนิด (class) คือ IgG , IgM , IgA , IgD , และ IgE โดย H-chain ของ IgG เรียกว่าแกมมา (γ) , IgM เรียกว่ามิว (μ) , IgA เรียกว่า อัลฟา (α) , IgD เรียกว่าเดลตา (δ) ,

IgE เรียกว่าแอปซิลอน (ε) ส่วน L chain แบ่งออกเป็น 2 แบบคือ แคปปา (κ) และแลมด้า (λ) Ig ของคน ทั้ง 5 ชนิด มีคุณสมบัติทางเคมี ชีวภาพ และกายภาพที่ต่างกัน และแต่ละชนิดยังสามารถแบ่งย่อยออกไปได้อีก (Steward , 1984 ; Goodman , 1984)

ภาพที่ 3



แสดงโครงสร้างของโมเลกุลแอนติบอดี

(ที่มา : มหาวิทยาลัยมหิดล , 2531)

<u>คุณสมบัติทั่วไปของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละชนิด</u>

การจัดแบ่งกลุ่มของอิมมูโนโกลบูลินในคนแบ่งออกเป็น 5 ชนิด

1. IgG เป็น Ig ที่มีปริมาณมากที่สุดในซีรัม (80-85 %) จึงมีความสำคัญในการช่วยป้องกันสิ่งแปลกปลอม และเป็นภูมิคุ้มกันของร่างกาย สามารถผ่านรกได้ โมเลกุลจะประกอบด้วยโครงสร้างหลักเช่นที่กล่าวมาแล้วเป็น polypeptide chain 4 สาย ในคนจะมีน้ำหนักประมาณ 150,000 D ส่วนของ H-chain จะเป็นชนิดแกมมา จึงมีชื่อว่า IgG IgG ของคนแบ่งออกเป็น 4 subclass คือ IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 และ IgG_4 และยังแบ่งเป็น subclass ย่อยลงไปได้อีกตามคุณสมบัติทางชีวภาพบางชนิดที่แตกต่างกัน เช่นเป็น IgG_{2a} , IgG_{2b} พบว่า IgG_1 มีปริมาณสูงสุดใน 4 subclass และ IgG_1 , IgG_2 และ IgG_4 สามารถทำปฏิกิริยากับ Staphylococcal protien A ได้ ทำให้แยกออกจาก subclass IgG_3 และแยกกับ IgM ซึ่งเป็น class อื่นๆได้ เพราะ IgG_3 และ IgM ไม่ทำปฏิกิริยากับ protien A

2. IgA พบในซีรัมเป็นปริมาณมาก รองจาก IgG และพบว่ามีปริมาณสูงสุด ในน้ำคัดหลั่งจากที่ต่างๆ เช่น น้ำตา น้ำลาย น้ำนม ทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ ส่วนของ H-chain ชื่อ alpha chain ในซีรัมพบได้ทั้งในรูป monomer , dimer , trimer มี 2 subclass คือ IgA_1 และ IgA_2 พบว่า IgA ที่ขับออกมาบริเวณที่มีน้ำคัดหลั่งจะอยู่ในรูปของ dimeric form ซึ่งการเชื่อมเป็น polymeric form นี้จะอาศัย J-chain (joining chain) เช่นเดียวกับ Ig ชนิดอื่นๆ และมีส่วนของ glycoprotein ที่สำคัญคือ secretory component (SC) ซึ่งจะเชื่อมเกาะระหว่าง H-chain ของ dimeric IgA พบว่าการมี SC เกาะอยู่กับ IgA จะช่วยทำให้โมเลกุลของ IgA นี้ทนต่อการทำลายด้วยเอนไซม์ ทำให้ IgA ทำหน้าที่บริเวณนั้นได้ดี เรียก IgA ที่พบในรูปแบบนี้ว่า secretory IgA (sIgA) หรืออาจเรียกว่า mucoantibody หรือ coproantibody (คือแอนติบอดีที่ผิวเยื่อเมือก)

3. IgM เป็น Ig ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดจะมีน้ำหนักประมาณ 900,000 D ส่วนของ H-chain ชื่อ mu chain จะประกอบไปด้วยโมเลกุลพื้นฐาน ทั้งหมด 5 หน่วย ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วย J-chain และมี SC ร่วมอยู่ในโมเลกุล พบในน้ำคัดหลั่งบ้าง การม้วนพับไปมาของโมเลกุลซึ่งเกิดจาก secondary และ tertiary structure ทำให้ antigen-binding site บางแห่งทำงานไม่ได้ หรือไม่สามารถจับกับแอนติเจนได้ IgM เป็น Ig ตัวแรกที่ร่างกายสร้างขึ้นภายหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย

แอนติเจน เป็น Ig ที่สำคัญที่พบ surface membrane ของ B-lymphocyte พบว่ามี 2 subclass คือ IgM_1 และ IgM_2 สามารถกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ได้ดีและก่อให้เกิดปฏิกิริยา agglutination ได้ดี เพราะมี antigen-binding site หลายตำแหน่ง

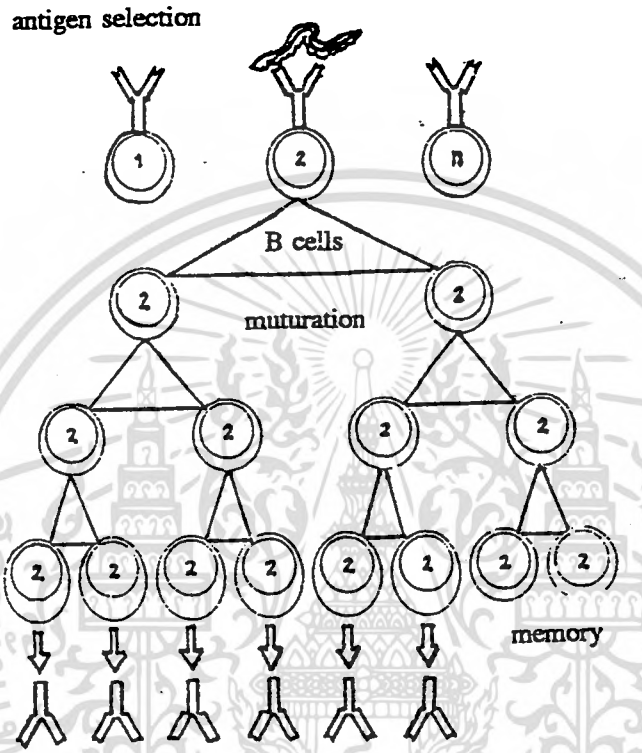
4. IgD เป็น Ig ที่พบปริมาณต่ำในซีรัม ส่วนของ H-chain ชื่อ delta chain ยังไม่ทราบหน้าที่และคุณสมบัติที่สำคัญ เชื่อว่าทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ของแอนติเจนที่อยู่บนเมมเบรนของ B-lymphocyte จึงทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

5. IgE เป็น Ig ที่พบปริมาณต่ำสุดในซีรัม ส่วนของ H-chain ชื่อ epsilon chain เกี่ยวข้องกับภูมิแพ้แบบ type I คือเมื่อร่างกายได้รับสารที่ทำให้แพ้จะกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง IgE ที่จำเพาะกับสารนั้นขึ้นมา จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อว่า reaginic antibody และ IgE นี้มีคุณสมบัติต่างจาก Ig ตัวอื่นคือ ส่วนของ Fc สามารถจับกับ mast cell และ basophil เพราะมีรีเซพเตอร์ที่เหมาะสมกัน ทำให้เซลล์เหล่านี้สามารถหลั่งสารตัวกลางที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ออกมา จึงอาจเรียกว่าเป็น homocyto-tropic antibody นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าในกรณีที่เกิดการติดเชื้อของปรสิตร่างกายจะมีปริมาณของ IgE สูงกว่าในสภาวะปกติ

<u>ทฤษฎี Clonal Selection ในการสร้างแอนติบอดี</u>

ทฤษฎี Clonal Selection ของ Burnet (Roitt และคณะ , 1986) เป็นทฤษฎีที่ยอมรับกันว่าสามารถอธิบายการตอบสนองของระบบภูมิต้านทานต่อแอนติเจนต่างๆได้ดี โดยอธิบายว่า B-lymphocyte แต่ละเซลล์มียีนที่กำหนดการสร้างแอนติบอดีเพียง 1 แบบเท่านั้นและแอนติบอดีดังกล่าวจะปรากฏอยู่บนผิวเซลล์ เรียกว่า membrane Ig หรือ (mIg) ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) สำหรับจับกับแอนติเจนที่จำเพาะ เมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย B-lymphocyte ที่มี mIg จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดนั้นเท่านั้นที่จะจับกับแอนติเจนแล้วเกิดปฏิกิริยาตอบสนองขึ้น โดย B-lymphocyte นั้นถูกกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) และเปลี่ยนแปลงไปเป็นพลาสมาเซลล์ ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนนั้นอย่างเดียว และกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่ทำหน้าที่จดจำแอนติเจนชนิดนั้น เรียกว่า memory cell ดังแสดงในภาพที่ 4

ภาพที่ 4



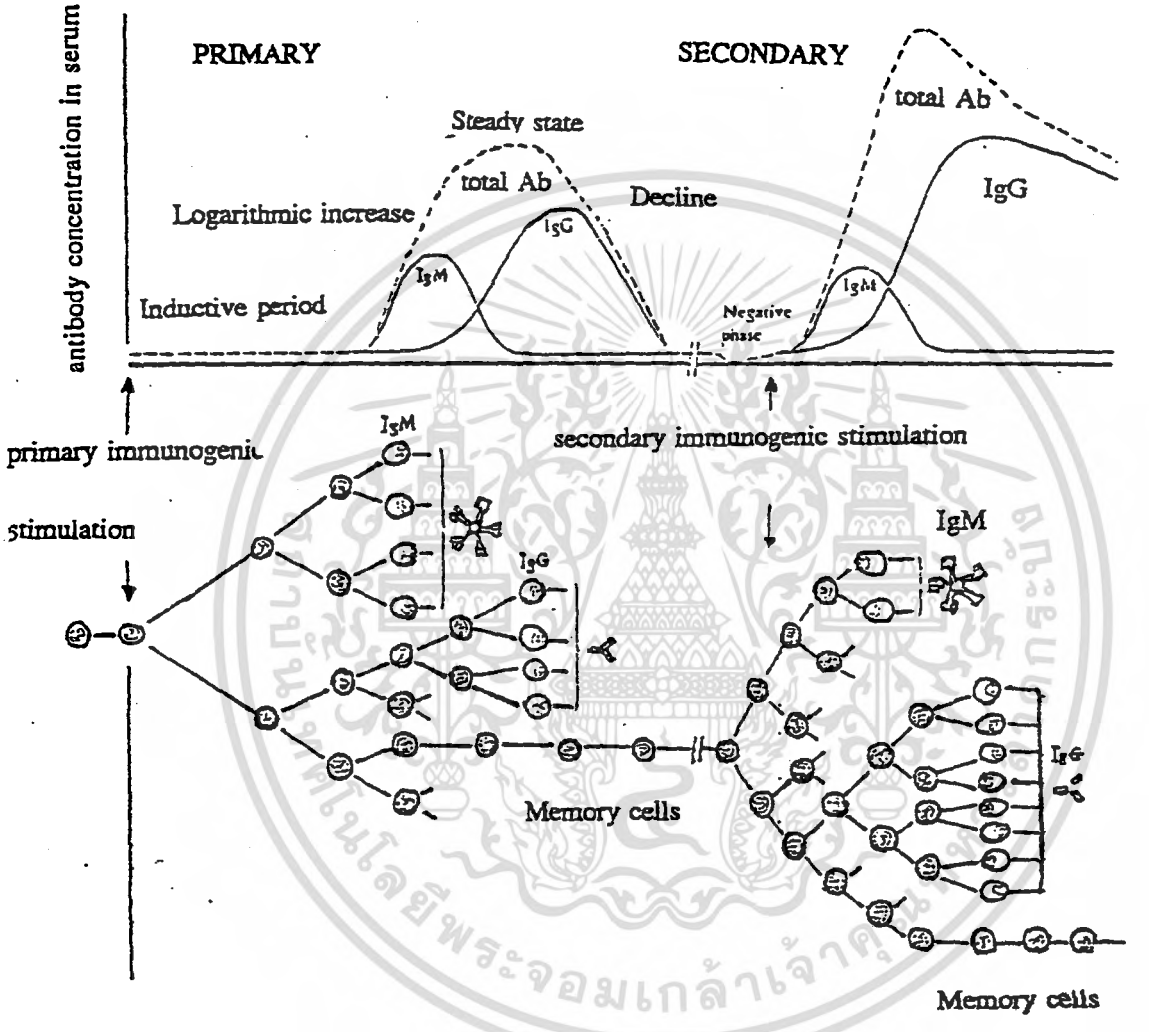
แสดงทฤษฎี Clonal Selection ของ Burnet

(ที่มา : Roitt และคณะ , 1986)

โดยปกติแอนติบอดีจะถูกสร้างขึ้นมาเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่เข้าไป ปริมาณที่ให้ ทางที่นำเข้า ตลอดจนการฉีดแอนติเจนร่วมกับสารอื่นๆที่มีส่วนช่วยในการตอบสนอง การตอบสนองของระบบภูมิต้านทานต่อแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายครั้งแรกเรียกว่า **การตอบสนองแบบปฐมภูมิ (primary immune response)** เมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายจะยังไม่เกิดการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีอยู่ชั่วระยะหนึ่ง เรียกระยะนี้ว่า inductive phase หรือ latent phase ระยะนี้เป็นระยะที่ B-lymphocyte รับรู้แอนติเจนโดยได้รับความช่วยเหลือจาก T-lymphocyte และ macrophage ทำให้ B-lymphocyte เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ต่อมาจะเข้าสู่ระยะ logarithmic phase (log phase) ซึ่งเป็นระยะที่มีการสร้างแอนติบอดีปริมาณสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงจุดสูงสุด ระยะนี้เป็นระยะที่ B-lymphocyte เปลี่ยนแปลงไปเป็นพลาสมาเซลล์และผลิตแอนติบอดีจำนวนมากออกมาอยู่ในซีรัม (serum) ระยะเวลาของ log phase ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจน ระยะต่อมาเรียกว่า steady state เป็นระยะที่มีปริมาณของแอนติบอดีคงที่เพราะมีการสร้างและทำลายแอนติบอดีในอัตราเดียวกัน ส่วนระยะสุดท้ายคือระยะ decline phase เป็นระยะที่ปริมาณของแอนติบอดีที่มีอยู่ค่อยๆลดต่ำลง เนื่องจากมีการทำลายแอนติบอดีมากกว่าการสร้าง และเมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนชนิดเดียวกันซ้ำอีกจะเกิด **การตอบสนองแบบทุติยภูมิ (secondary immune response)** ซึ่งมีการตอบสนองเช่นเดียวกับที่เกิดครั้งแรก แต่จะมีการตอบสนองได้รวดเร็วและรุนแรงกว่าครั้งแรกมาก เนื่องจากมี memory T และ B-lymphocyte ที่เตรียมพร้อมอยู่แล้ว เมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย เซลล์ดังกล่าวซึ่งมีหน้าที่จดจำแอนติเจนชนิดนี้จะเกิดการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปเป็น active T-lymphocyte และพลาสมาเซลล์ สร้างแอนติบอดีออกมาในปริมาณมากกว่าที่เกิดในการตอบสนองแบบปฐมภูมิ และอยู่ในร่างกายได้นานกว่า ดังแสดงในภาพที่ 5 (มหาวิทยาลัยมหิดล , 2531)

การเกิดแอนติบอดีในการตอบสนองแบบปฐมภูมิและทุติยภูมิ พบว่าระดับของ IgM จะขึ้นสูงก่อนแล้วค่อยๆลดลงมา ส่วนระดับของ IgG จะค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นตามมาทีหลังและระดับของ IgG ที่เกิดในการตอบสนองแบบทุติยภูมิมีปริมาณมากกว่าระดับของ IgM (Herscowitz , 1979)

ภาพที่ 5



แสดงการตอบสนองของระบบภูมิต้านทานแบบปฐมภูมิและทุติยภูมิ

(ที่มา : มหาวิทยาลัยมหิดล , 2531)

<u>การผลิตแอนติบอดี</u>

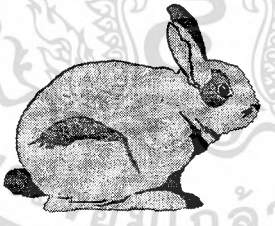
ในปัจจุบันการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ กระทำได้ 2 วิธี (Herscowitz , 1979 ; Milstein , 1980) ดังนี้คือ

1. Conventional Method เป็นวิธีที่สะดวกและใช้เวลาไม่นาน ทำได้โดยการฉีดอิมมูโนเจนเข้าสู่สัตว์ทดลอง เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมจึงฉีดกระตุ้นซ้ำและทำการเจาะเลือด เพื่อเก็บซีรัมที่เรียกว่า antiserum หรือ immune serum ซึ่งมีแอนติบอดีปะปนอยู่ แอนติบอดีที่ได้เรียกว่า polyvalent หรือ polyclonal antibodies ซึ่งมีแอนติบอดีหลายชนิดจำเพาะต่อ epitope ต่างๆของแอนติเจน ภาพที่ 6 แสดงการผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดีโดยวิธี Conventional

ภาพที่ 6

ฉีด

Immunogen



เก็บ

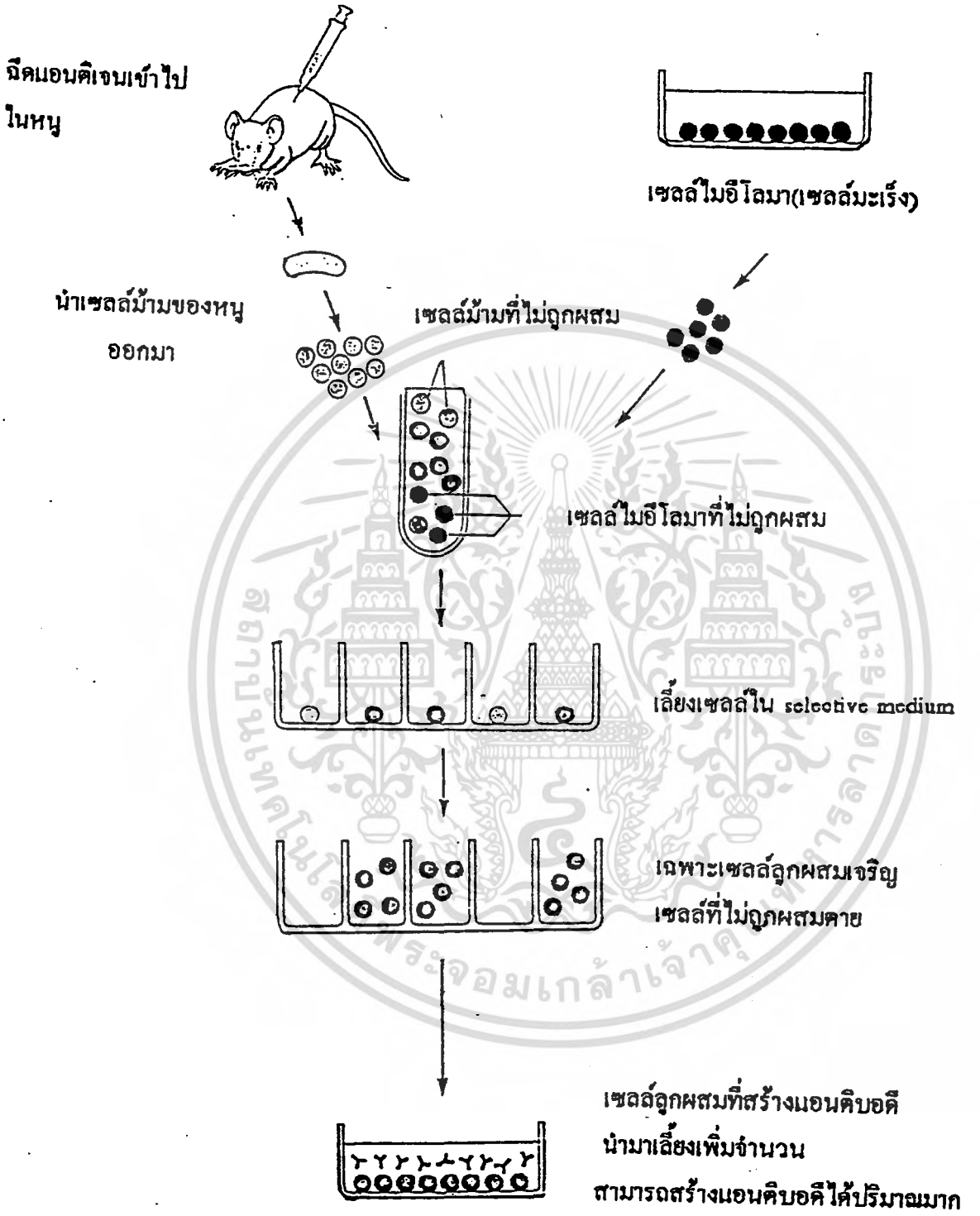
Antiserum

(immune serum)

แสดงการผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดีโดยวิธี Conventional

2. Hybridoma Technique แอนติบอดีที่ได้จาก hybridoma มีเพียงชนิดเดียวเรียกว่า โมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) มีความจำเพาะต่อ epitope บนโมเลกุลของแอนติเจนเพียงตำแหน่งเดียว hybridoma มีคุณสมบัติดังนี้คือ มีลักษณะเหมือนกันเนื่องจากเป็นกลุ่มเซลล์ชนิดเดียวกันที่ได้มาจาก clone เดียวกัน สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนสูง สามารถเติบโตและแบ่งตัวได้เร็วเนื่องจากเป็นลูกผสมของเซลล์มะเร็งและสามารถผลิตแอนติบอดีได้ปริมาณมากในอาหารเลี้ยงเซลล์ การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีแสดงในภาพที่ 7 ทำโดยฉีดอิมมูโนเจนเข้าไปในหนูเพื่อให้เกิดการสร้างแอนติบอดี จากนั้นนำเซลล์ม้าม (spleen cell) ของหนูซึ่งสามารถสร้างแอนติบอดีชนิดที่ต้องการ นำมาเชื่อมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์ที่เรียกว่าเซลล์ไมอีโลมา (myeloma) ที่มีคุณสมบัติเจริญและแบ่งตัวเร็ว การเชื่อมเซลล์ (fusion) นิยมใช้สารเคมีโพลิเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol ; PEG) ทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนและเกิดการเชื่อมเมมเบรน เกิดเป็นเซลล์ลูกผสม (hybrid cell) นำเซลล์ที่ได้ซึ่งมีทั้งเซลล์ที่ไม่ถูกผสมและเซลล์ลูกผสมมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือก (selective medium) เซลล์ม้ามซึ่งเจริญช้าและไม่แข็งแรงจะตายไป ส่วนเซลล์มะเร็งไม่เจริญในอาหารคัดเลือกดังนั้นจึงเหลือเฉพาะเซลล์ลูกผสม ทำการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมและ นำมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อให้ผลิตแอนติบอดีที่ต้องการในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังสามารถเก็บเซลล์ในรูปแช่แข็งไว้ได้เป็นเวลานาน

ภาพที่ 7



แสดงการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี โดยวิธี Hybridoma Technique

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี แบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ (มหาวิทยาลัยมหิดล , 2531)

1. ขั้นปฐมภูมิ (primary or interaction) เป็นการเริ่มการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เห็นผลหรือตรวจสอบปฏิกิริยาได้ยากด้วยตาเปล่า บางครั้งจะทราบเมื่อปฏิกิริยาได้ต่อเนื่องไปถึง ขั้นที่ 2 แล้ว การตรวจสอบปฏิกิริยาขั้นนี้จะใช้เทคนิคพิเศษช่วยตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ โดยใช้ Farr technique การทำ equilibrium dialysis การใช้วิธี Immunofluoresence การใช้การติดฉลากด้วย ferritin การทำ Radioimmunoassay (RIA) ,Enzyme immunoassay (EIA) และ Fluoroimmunoassay (FIA) เป็นต้น

2. ขั้นทุติยภูมิ (secondary reaction) เป็นปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีที่สามารถทราบได้ด้วยวิธีการตรวจแบบง่ายหลายชนิดนำมาใช้ช่วยการตรวจในห้องปฏิบัติการ ปฏิกิริยาที่เกิดมักเป็นการเกิดเชื่อมโยงกัน เช่น การตกตะกอน การเกาะกลุ่ม complement-dependent reaction , neutralization , cytropic effect เป็นต้น

3. ขั้นตติยภูมิ (tertiary manifestration) เป็นปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดผลต่อเนื่องทาง biologic expression ซึ่งผลนี้บางครั้งอาจเป็นผลดีกับร่างกายแต่บางครั้งก็มีผลก่อให้เกิดโรคทางภูมิคุ้มกันหลายชนิด การตรวจโดยใช้หลอดทดลองมักตรวจผลหรือสารที่เกิดขึ้นซึ่งใช้วิธี RIA , FIA หรือ ELISA

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ ในตอนแรกจะมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ต่อมาแอนติเจนและแอนติบอดีจะเกาะกลุ่มกันใหญ่ขึ้นเป็นร่างแหตกตะกอนลงมาให้เห็นได้ และอาจมีการแสดงลักษณะของปฏิกิริยาต่างๆ แล้วแต่ชนิดของปฏิกิริยาและสารที่เกี่ยวข้อง สำหรับความสามารถในการจับอย่างจำเพาะของแอนติบอดีกับแอนติเจนที่เข้าอยู่ในลักษณะของ Lock and key แล้วนั้น ความคงตัวของคอมเพล็กซ์ที่เกิดขึ้นยึดอยู่ด้วยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล ได้แก่ electrostatic bond (coulombic force) , Van der Waals force , hydrogen bond และ hydrophobic bond

การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ในหลอดทดลองที่จะกล่าวถึงต่อไปมีดังนี้

1. ปฏิกิริยาการตกตะกอน (Precipitation) เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่เป็นสารละลายทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ในปริมาณที่ได้สัดส่วนพอเหมาะกัน จะได้สารประกอบเชิงซ้อน Ag-Ab ที่ไม่ละลายน้ำและตกตะกอนให้เห็นได้ เมื่อโมเลกุลของแอนติเจนและแอนติบอดีนั้นเชื่อมโยงจับกันเป็นร่างแห (lattice formation) ทำให้โมเลกุลใหญ่ขึ้นตกเป็นตะกอน การเกิด precipitation จะเกิดมากหรือน้อยเป็นไปตามคำอธิบายที่แสดงได้โดย Heidelberger's curve ซึ่งกล่าวว่า เมื่อทำการทดลองโดยใส่แอนติบอดีจำนวนคงที่ในหลอดทดลองทุกหลอดและค่อยๆ เติมแอนติเจนปริมาณความเข้มข้นมากขึ้น ลงในแต่ละหลอดโดยเรียงลำดับจากน้อยไปหามาก พบว่าช่วงหลอดแรกๆ มีแอนติบอดีมากเกินไป เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของแอนติเจน (antibody excess zone) เมื่อแอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีแล้ว ยังมีโมเลกุลของแอนติบอดีอิสระเหลืออยู่มากและแอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีเป็น Ag-Ab complex ขนาดเล็ก ไม่มีการเชื่อมโยงให้ใหญ่ขึ้น ดังนั้น Ag-Ab complex จึงตกตะกอนไม่ได้ เกิดภาวะที่เรียกว่า prozone phenomenon

ช่วงถัดมาเป็นช่วงที่พอเหมาะ (equivalent zone) จะมีจำนวนของแอนติเจนและแอนติบอดีในอัตราที่เหมาะสมกัน โมเลกุลจำนวนมากมาเกาะเชื่อมโยงกันให้ได้ Ag-Ab complex ใหญ่ขึ้น ตกตะกอนลงมาและเป็นหลอดที่มีตะกอนมากที่สุด เมื่อมีแอนติเจนจำนวนเพิ่มมากขึ้น (antigen excess zone) แอนติเจนนั้นจะแย่งจับกับแอนติบอดีจนแอนติบอดีหมด ไม่มีพอที่จะต่อเชื่อมโยงเป็นร่างแห จะเกิดเป็น Ag-Ab complex เล็กๆ ตกตะกอนไม่ได้ดี ภาวะในช่วงนี้เรียกว่า postzone pheonomenon

2. ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (Agglutination) เป็นปฏิกิริยาที่แอนติเจนที่เป็นเซลล์ เช่น แบคทีเรียหรือ เม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีแล้วรวมตัวเกาะกลุ่มกัน เป็นกลุ่มซึ่งมองเห็นได้ ปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยาต้องได้สัดส่วนที่พอเหมาะกัน ถ้าปริมาณแอนติบอดีมากไปจะเกิด prozone phenomenon หรือน้อยไปจะเกิด antigen excess zone ได้ ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มจะเกิดได้ดีหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดี ความเป็นกรดด่าง ความพอเหมาะของอิเล็กโทรไลต์ในสารละลายตลอดจนการปั่น การเขย่า และอุณหภูมิที่พอเหมาะเหล่านี้จะมีผลต่อการรวมตัวของแอนติเจนและแอนติบอดี ปัจจัยที่สำคัญที่สุดได้แก่ ความแตกต่างระหว่างประจุไฟฟ้าที่ผิวของแอนติเจนกับอิออนในสารละลาย เพราะทำให้เกิดแรงผลักดันระหว่างเซลล์ให้ห่างกันออกไป ทำให้แอนติบอดีไม่สามารถเชื่อมโยง

เซลล์เข้าด้วยกันได้ จึงไม่เกิดการเกาะกลุ่ม จึงต้องเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ เช่น trypsin หรือ neuraminidase ก่อน หรือเปลี่ยนแปลงสารละลาย โดยเติมสารคอลลอยด์เช่น เจลาติน serum albumin หรือ Ficoll ลงไป จึงจะช่วยให้เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนได้

3. Immunoassay ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ที่เป็นปฏิกิริยาแบบปฐมภูมินั้นมองเห็นได้ยากและอาจมีปริมาณน้อยมาก ต้องใช้เทคนิคพิเศษมาช่วยเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบ ซึ่งอาจเป็นการใช้การติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยสารพิเศษ ได้แก่ สารกัมมันตรังสี สารเรืองแสง สารที่เป็น electron-dense หรือพวก enzyme marker ต่างๆ ซึ่งวิธีการเหล่านี้สามารถใช้หาปริมาณได้ด้วย เรียกเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ในการติดฉลากว่า เอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ **Homogenous enzyme immunoassay** และ **Heterogenous enzyme immunoassay** ซึ่ง Homogenous enzyme immunoassay นั้นเมื่อนำแอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Ag*) มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี (Ab) เกิดสารประกอบของแอนติเจนกับแอนติบอดี ($Ag^*.Ab$) เอนไซม์ที่ติดฉลากจะสูญเสียประสิทธิภาพ (activity) ไม่จำเป็นต้องแยกส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป ส่วน Heterogenous enzyme immunoassay เอนไซม์ที่ติดฉลากอยู่กับแอนติเจน เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีแล้วไม่สูญเสียประสิทธิภาพไป จึงต้องแยกสารประกอบออกจากแอนติเจนและแอนติบอดีอิสระ แล้วจึงวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ ในส่วนใดส่วนหนึ่งที่แยกออกมา เอนไซม์ลิ้งอิมมูโนซอฟเบ้นแอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay) หรือ ELISA จัดอยู่ในประเภทนี้

เทคนิคที่สำคัญของปฏิกิริยา Immunoassay ได้แก่

3.1 Radioimmunoassay (RIA) เป็นวิธีที่มีความไวมาก สามารถตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีปริมาณน้อยมากในระดับ 10^{-12} กรัมต่อมิลลิลิตรได้ จึงนิยมใช้ในการตรวจหาปริมาณซีรัมโปรตีนบางชนิด ฮอร์โมน และยาชนิดต่างๆ

3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ปัจจุบันได้ปรับปรุงวิธีการทำ immunoassay โดยพยายามหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตรังสี ซึ่งการดูผลของปฏิกิริยา อาศัยการเกิดสีขึ้นระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเพื่อตรวจหาปริมาณแอนติบอดีที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่องสเปกโทร-โฟโตมิเตอร์ ถ้าวัดความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่ทำในไมโครไตเตอร์เพลทจะใช้ microelisa reader อ่านได้ ซึ่งมีราคาถูกกว่า radioisotope counter

3.3 Immunofluorescence เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้สารเรืองแสงเช่น fluorescein isothiocyanate (FITC) , rhodamine B isothiocyanate (RITC) มาช่วย

แสดงปฏิกิริยา การศึกษาวิธีนี้จะนำมาใช้ในด้าน immunohistopathology ซึ่งใช้ควบคู่กับการศึกษารูปร่างของเซลล์ การศึกษาโดยวิธีนี้ทำได้ 3 แบบคือ

3.3.1 Direct immunofluorescent method ใช้ตรวจหาแอนติเจนโดยใช้ specific antibody ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง

3.3.2 Indirect immunofluorescent method ใช้ตรวจหาแอนติเจนโดยให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยากันก่อนและเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตัวแรก ซึ่งแอนติบอดีตัวที่สองนี้จะติดฉลากด้วยสารเรืองแสง

3.3.3 Sandwich method คล้ายกับ indirect method แต่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีในเนื้อเยื่อ โดยเติมแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีในเนื้อเยื่อลงไปให้ทำปฏิกิริยา แล้วเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นอีกครั้ง สุดท้ายเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ซึ่งสร้างจำเพาะต่อแอนติบอดีที่เติมไปจับกับแอนติเจนนั้น

3.3.4 Fluorescent activated cell sorter (FACS) ใช้หลักการแยกเซลล์ออกจากกันโดยปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ทำให้เกิดคุณสมบัติในการหักเหแสงของเซลล์ที่แตกต่างกันเครื่องสามารถทำให้เซลล์ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีและทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย fluorescein แล้วผ่านเข้ามาในอัตราส่วนที่สม่ำเสมอครั้งละ 1 เซลล์ ซึ่งจะผ่านออกมาทางช่องลำแสงของ monochromatic light จากเลเซอร์ แต่ละเซลล์ที่ผ่านมาทางช่องนี้จะถูกแยกไว้ตามคุณสมบัติของการหักเหแสงและการปล่อยแสง fluorescene ซึ่งถูกกระตุ้นโดยแสงเลเซอร์ ผลจะถูกบันทึกโดย photodetector และให้ข้อมูลผ่านเข้าคอมพิวเตอร์ วิธีการนี้ให้ผลดีเชื่อถือได้ แต่เครื่องมือมีราคาแพงมาก และต้องอาศัยผู้ชำนาญในการดูแลรักษาเครื่องมือ

4. ปฏิกิริยาตรึงคอมพลีเมนต์ (Complement fixation test-CFT) เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้ ถ้า Ag-Ab complex นั้นสามารถตรึงคอมพลีเมนต์ได้ มีหลักการคือให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยากัน โดยมีคอมพลีเมนต์ร่วมด้วย ถ้าปฏิกิริยามีความจำเพาะกันคอมพลีเมนต์ที่เติมลงไปจะถูกใช้หมด เมื่อเติม indicator system , I.S. (เม็ดเลือดแดงแกะ + แอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงแกะ ซึ่งเท่ากับ Ag-Ab complex อีกชนิดหนึ่ง) ลงไป จะไม่มีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงแกะ เพราะคอมพลีเมนต์ถูกใช้ไปหมดแล้ว สรุปว่าปฏิกิริยานั้นให้ผลบวก แต่ถ้าแอนติเจนและแอนติบอดีไม่จำเพาะต่อกัน คอมพลีเมนต์จะไม่ถูกใช้ไป เหลือมาทำปฏิกิริยากับ indicator system เกิดการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงแกะ แสดงว่าปฏิกิริยานั้นให้ผลเป็นลบ

Ag + Ab + C'	⟶	Ag-Ab-C' + I.S.	⟶	no lysis
Ab + C'	⟶	Ab + C' + I.S	⟶	lysis
Ag + C'	⟶	Ag + C' + I.S.	⟶	lysis

5. Neutralization เป็นปฏิกิริยาที่แอนติบอดีไปทำให้แอนติเจนหมดฤทธิ์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจเป็นการเกาะกลุ่มหรือการตกตะกอน เช่น ปฏิกิริยาระหว่างสารพิษกับสารทำลายพิษ ทำให้ฤทธิ์ของสารพิษหมดไป

<u>เทคนิค ELISA</u>

ในปี ค.ศ. 1971 Engvall และ Perlmann กลุ่มหนึ่ง Van Weeman และ Schuurs อีกกลุ่มหนึ่ง ได้นำเทคนิค ELISA มาใช้ โดยมีหลักการคือ การตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนผิวภาชนะ เติมสารตัวอย่างและล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป เติมแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์แล้วล้าง เติมสับสเตรทของเอนไซม์ วัดสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เทคนิค ELISA แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ (Walker , 1987)

1. ELISA แบบไม่แข่งขัน (noncompetitive ELISA) ทำได้โดยตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนผิวภาชนะ แล้วเติมแอนติบอดีหรือแอนติเจนลงไปให้ทำปฏิกิริยากันโดยตรง ภาพที่ 8 แสดง ELISA แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช (double antibody sandwich) นิยมใช้สำหรับวัดปริมาณแอนติเจน ในการวัดปริมาณแอนติบอดี IgG , IgM และ IgA นิยมใช้วิธีแอนติบอดี คลาสแคปเจอร์แอสเสย์ (antibody class capture assay) ซึ่งปรับปรุงขึ้นเพื่อวัดแอนติบอดีที่จำเพาะขึ้น วิธีทำคือ ตรึง class-specific globulin เช่น IgG , IgM , IgA บนผิวภาชนะ เติมตัวอย่างลงไป class-specific globulin ในตัวอย่างจะเกาะกับแอนติบอดีแล้วเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป เติมสับสเตรทของเอนไซม์ วัดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีสีที่เกิดขึ้น ซึ่งจะแปรผันตรงกับปริมาณ Igในตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 9 อีกวิธีหนึ่งของ ELISA แบบไม่แข่งขัน คือ ELISA แบบทางอ้อม (Indirect method) ใช้วัดปริมาณแอนติบอดี ดังแสดงในภาพที่ 10 ทำได้โดยตรึงแอนติเจนกับผิวภาชนะ ล้าง เติมตัวอย่าง แอนติบอดีในตัวอย่างจะเกาะกับแอนติเจน ล้าง แล้วเติมเอนไซม์สับสเตรท วิธีนี้ง่ายต่อการคัดเลือก IgG เพราะ IgG ที่ปรากฏในตัวอย่าง

สามารถเกิดพันธะได้พอดีกับส่วนที่เกิดพันธะของแอนติเจน (antigen binding site) แต่ไม่เหมาะสมสำหรับแอนติบอดีชนิดอื่น

ภาพที่ 8

1. ตรึง Ab บนผิวภาชนะ

ล้าง Ab ส่วนที่ไม่ถูกตรึงออก

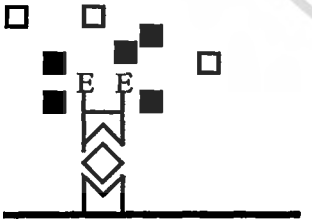
2. เติมตัวอย่าง : Agในตัวอย่างจะเกาะกับ Ab ซึ่งจำเพาะต่อกัน

ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก

3. เติม Ab ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป: Ab ไปเกาะกับ Ag ที่เกิดพันธะอยู่

ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป

4. เติมสับสเตรทของเอนไซม์ลงไป (□) เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสี (■)



5.วัดผลิตภัณฑ์มีสีที่เกิดขึ้น

ปริมาณ Ag แปรผันโดยตรงกับผลิตภัณฑ์มีสีที่เกิดขึ้น เมื่อทำการทดลองครั้งแรก โดยใช้ Ag ที่ทราบค่าแล้วทำกราฟมาตรฐาน เมื่อวัด Agในตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน สามารถทราบปริมาณ Agได้

แสดง ELISA แบบไม่แข่งขัน Double Antibody Sandwich (วัดAg)

ภาพที่ 9

1. ตรึง class-specific antiglobulin บนผิวภาชนะ

ล้าง

2. เติมตัวอย่าง : class-specific antiglobulin ในตัวอย่างเกาะกับ antiglobulin

ล้าง

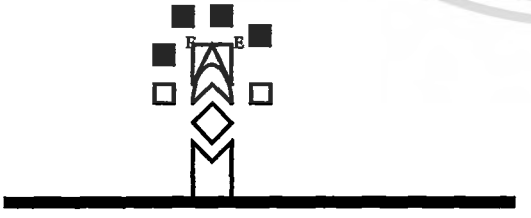
3. เติม Ag : Ag จะเกาะกับ specific antibody

ล้าง

4. เติม Ab ติดฉลากด้วยเอนไซม์

ล้าง

5. เติมสับสเตรท



แสดง Antibody Class Capture Assay วัด Ab : IgG , IgM , IgA

ภาพที่ 10

1. ตรึง Ag

ล้าง

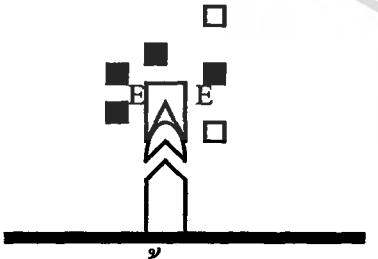
2 . เติมตัวอย่าง : Ab ในตัวอย่างเกาะกับ Ag

ล้าง

3. เติมแอนติโกลบูลินติดฉลากด้วยเอนไซม์

ล้าง

4. เติมสับสเตรท



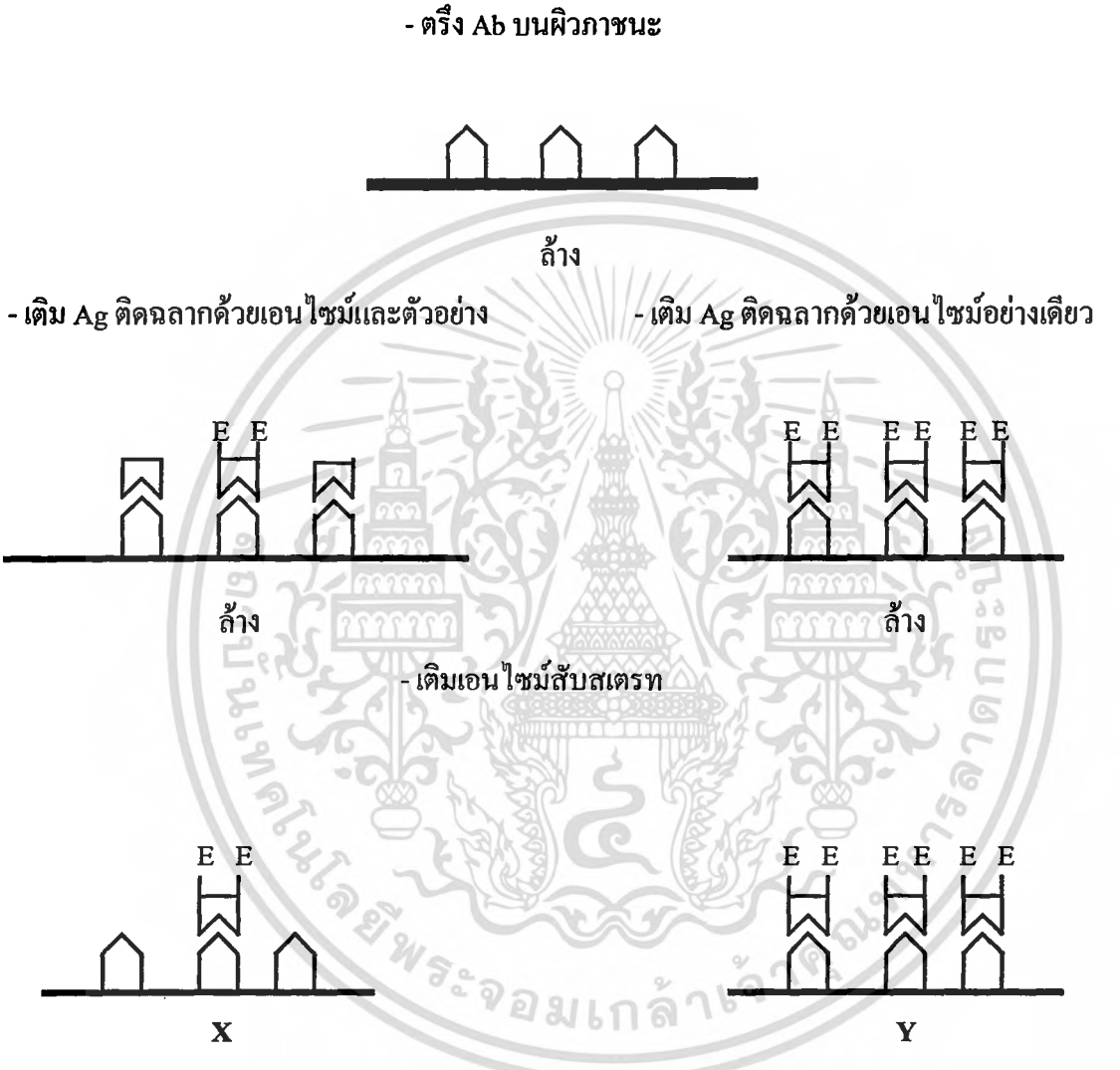
ล้าง

แสดงวิธี Indirect method (วัด Ab)

ELISA แบบทางอ้อม ต้องอาศัยแอนติบอดี 2 ชนิด ซึ่งได้มาจากสัตว์ต่างชนิดกัน แอนติบอดีตัวแรกมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่เราต้องการ โดยทั่วไปมักสร้างจากกระต่าย สำหรับแอนติบอดีตัวที่สองนั้นได้มาจากการใช้โปรตีนโกลบูลินของกระต่ายเป็นแอนติเจนกระตุ้นให้สัตว์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่กระต่าย เช่น แพะหรือแกะ สร้างแอนติบอดีตัวที่ 2 ซึ่งเป็นแอนติอิมมูโนโกลบูลิน จะเห็นได้ว่าวิธีทางอ้อมนี้ถึงแม้จะเสียเวลาในการเตรียมแอนติบอดีตัวที่ 2 แต่แอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของกระต่ายสปีชีส์นั้นๆ ทุกตัว ดังนั้นข้อดีของวิธีนี้คือเตรียมแอนติบอดีตัวแรกสามารถใช้ได้กับแอนติเจนทุกตัวที่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีที่ได้มาจากกระต่ายทั่วไป วิธีนี้จึงเป็นที่นิยมกันอย่างกว้างขวางและมีบริษัทต่างๆ ทำแอนติอิมมูโนโกลบูลินของแพะหรือแกะติดฉลากด้วยเอนไซม์ไว้ขาย ผู้ใช้เพียงแต่เตรียมแอนติบอดีตัวแรกจากกระต่ายเท่านั้น (Engvall และ Perlmann , 1972)

2. ELISA แบบแข่งขัน (competitive ELISA) ปฏิกิริยามีการแข่งขันกันระหว่างแอนติเจนที่ติดฉลากกับแอนติเจนอิสระ ในการวัดแอนติเจนอิสระทำได้โดยทำการทดลอง 2 ส่วน ดังแสดงในภาพที่ 11 ขั้นแรกตรึงแอนติบอดีบนผิวภาชนะ ล้างส่วนที่ไม่ถูกตรึงออก ส่วนหนึ่งเติมแอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์อิสระและตัวอย่าง อีกส่วนเติมแอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์อย่างเดียว ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ในกรณีแรกแอนติเจนในตัวอย่างจะแย่งจับกับที่ติดฉลากเพื่อจับกับแอนติบอดี จากนั้นเติมสับสเตรทของเอนไซม์ลงไป ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ปริมาณแอนติเจนคือความแตกต่างระหว่าง X กับ Y สำหรับวิธีนี้ในการวิเคราะห์แอนติเจนอาจมีปัญหาที่การติดฉลากแอนติเจน ซึ่งทำได้ยาก และแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์อาจไปเกาะกับสารอื่นๆ ในตัวอย่าง ดังนั้นจึงนิยมการวิเคราะห์แบบไม่แข่งขันมากกว่า ถ้าต้องการวิเคราะห์แอนติบอดีแบบแข่งขันโดยวิธีนี้ ทำได้โดยเปลี่ยนเป็นตรึงแอนติเจนบนผิวภาชนะ และใช้แอนติบอดีติดฉลากเอนไซม์แทน

ภาพที่ 11



แสดง ELISA แบบแข่งขัน

เทคนิค ELISA มีรายละเอียดของวิธีการหลายแบบ ELISA แบบแข่งขันถึงแม้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะไม่ยุ่งยากแต่มีข้อเสียคือ ถ้าใช้แอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์จำเป็นต้องใช้แอนติเจนบริสุทธิ์ปริมาณมากเพื่อนำไปติดฉลาก ในกรณีที่ไม่มีแอนติเจนที่บริสุทธิ์จะใช้การติดฉลากแอนติบอดีแทน ในการทำ ELISA แบบแข่งขัน ขั้นตอนการบ่มแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากเอนไซม์กับตัวอย่างซึ่งอาจเป็นซีรัม ปัสสาวะ หรือสารสกัดจากเนื้อเยื่อ อาจทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากในตัวอย่างมีสารพวกโปรตีเอส และสารยับยั้งเอนไซม์อยู่ด้วย ปัญหานี้แก้ไขได้โดยใช้ ELISA แบบไม่แข่งขัน ซึ่งไม่มีขั้นตอนการบ่มตัวอย่างกับสารที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้คือ

- สามารถวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่มีอยู่ในปริมาณนาโนกรัมได้
- เอนไซม์มีความเสถียรดีที่พีเอชเหมาะสม สำหรับการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี
- มีหมู่ $-NH_2$,-SH ,CHO ซึ่งใช้เชื่อมกับแอนติบอดีหรือแอนติเจน และหลังจากเชื่อมกันแล้วสูญเสียประสิทธิภาพน้อยที่สุด
- เอนไซม์ที่เชื่อมอยู่กับแอนติเจนหรือแอนติบอดี มีความเสถียรทั้งในสภาวะการเก็บรักษาและในขณะทำการทดลอง
- มีขายในราคาถูกและเป็นเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ ละลายน้ำได้ดี
- การวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ใช้เครื่องมือราคาถูก เช่น สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการติดฉลากมีหลายชนิด เช่น horseradish peroxidase หรือ HRPO และ alkaline phosphatase หรือ AP ทั้ง 2 ชนิดมีขายในราคาถูก มีประสิทธิภาพสูง มีความเสถียรดีและเก็บไว้ได้นาน เอนไซม์แต่ละชนิดใช้สับสเตรทต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1

แสดงเอนไซม์และสับสเตรทที่ใช้คู่กัน

เอนไซม์	สับสเตรท
Horseradish peroxidase (HRPO)	1. 2,2-azino-di(3-ethylbenzoline-b-sulphonate) หรือ ABTS
	2. O-phenyllenediamine (OPD)
	3. tetra-methylbenzidine หรือ TMB
	4. 5-aminosalicylic acid หรือ 5-AS
Alkaline phosphatase (AP)	1. P-nitrophenyl phosphate (PNPP)
	2. β-galactosidase
	3. O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
Glucose oxidase	1. ABTS

(ที่มา : Wreghitt , 1990)

วิธีที่ใช้เชื่อมเอนไซม์กับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้สำหรับ ELISA มีหลายวิธี ถ้าเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับโปรตีนนิยมใช้วิธีกลูตารัลดีไฮด์ วิธีเพอร์ไอโอเดท และวิธีไดมาไลไมด์ แต่ถ้าเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับเฮพเทน (hapten) นิยมใช้วิธีมิกซ์แอนไฮไดรด์ วิธีคาร์โบไดอิไมด์ และวิธีเพอริไอโอเดท (Schuurs และ Van Weeman , 1977)

การตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีไว้กับที่ สามารถทำได้โดยให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีจับกับ เซลลูโลส อะกาโลส หรือพอลิอะครีลาไมด์ (polyacrylamide) ด้วยพันธะโควาเลนต์ แต่การใช้วิธีนี้จำเป็นต้องปั่นแยกในขั้นตอนการล้างใน ELISA เพื่อให้สารที่ไม่ทำปฏิกิริยาเกาะติดหลุดออกให้หมด ดังนั้นวิธีที่เหมาะสำหรับ ELISA คือ การใช้พอลิสไตรีนไมโครไตเตอร์เพลท (polystyrene microtiter plate) หรือพลาสติกประกอบด้วยหลุมเล็กๆ 96 หลุมหรือน้อยกว่านี้ โปรตีนส่วนใหญ่จะเกาะติดกับผิวพลาสติกโดยอาศัยอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) ระหว่างส่วนของโปรตีนที่ไม่มีขั้ว (non polar) กับพลาสติกส่วนที่ไม่มีขั้ว

การปรับปรุงกระบวนการทำ ELISA อาจทำได้โดยการกระตุ้นเพลท เพื่อให้แอนติเจนหรือแอนติบอดียึดติดกับเพลทได้ดีขึ้น โดยโรงงานที่ผลิตเพลทฉายรังสีแกมมา หรือโดยผู้ใช้ทำการบ่ม

เพลท ก่อนใช้กับสารต่างๆ เช่น เอทานอล กรดไฮโดรคลอริก กลูตารัลดีไฮด์ และ poly-l-lysine การทดลองใช้ เอทานอล และ กรดไฮโดรคลอริก ในการบ่มเพลท พบว่าไม่ช่วยเพิ่มการจับเกาะของโปรตีนบนเฟสของแข็งและการใช้กลูตารัลดีไฮด์ ไม่ช่วยเพิ่มการดูดซับแอนติบอดีบนโพลิสไตรลีนเพลท (Prusak-Sochaczewski และ Loung , 1989) อย่างไรก็ตามมีการทดลองที่ได้รับผลสำเร็จ เช่น การใช้ poly-1-lysine เพิ่มการดูดซับของแอนติเจนพวกพอลิแซ็กคาไรด์ (Kelsoe และ Weller , 1978) และโปรตามีนซัลเฟตเพิ่มการดูดซับของ DNA (Stoker และคณะ , 1982)

โดยปกติต้องใช้ coating buffer เพื่อช่วยให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเกาะติดกับเฟสของแข็ง บัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่คาร์บอเนตหรือไบคาร์บอเนตพีเอช 9.6 phosphate buffer saline (PBS) พีเอช 7.2 และ Tris-saline (HCl 0.1 โมลต่อลิตร พีเอช 8.5 + NaCl 0.1 โมลต่อลิตร) หรืออาจใช้บัฟเฟอร์ที่เฉพาะเพื่อเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ โมโนโคลนัลแอนติบอดีบางชนิดเกาะกับเฟสของแข็งได้ยากมาก จึงต้องค้นหาชนิดของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นและช่วงพีเอชที่เหมาะสม สำหรับแอนติเจนพวกไขมันหรือตัวเชื้อ ควรเติม sodium deoxycholate ลงใน coating buffer (Kurstak , 1985)

การอ่านผล ELISA สามารถอ่านผลที่ได้โดยใช้สายตาหรือใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์หรืออ่านผลโดยตรงจากเครื่องวัด ELISA ซึ่งสามารถต่อกับคอมพิวเตอร์และเครื่องพิมพ์ได้ ผลที่อ่านได้จากการใช้สายตาเป็นผลบวกและผลลบ (+,-) ส่วนที่อ่านได้จากเครื่องจะบอกเป็นค่า OD ที่ความยาวคลื่นค่าหนึ่ง

<u>การประยุกต์ใช้เทคนิค ELISA ในด้านต่างๆ</u>

ในปัจจุบันมีการนำ ELISA มาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ มากมาย เช่น (ปรีดา ชัยศิริ 2530)

ทางด้านการแพทย์

1. ใช้ในการวินิจฉัยโรค การตรวจหาแอนติเจนพวกไวรัส แบคทีเรีย รา พยาธิ หรือ แอนติบอดี ต่อจุลินทรีย์ต่างๆ ใช้มากในการตรวจหาโรคติดเชื้อ
2. ใช้หาปริมาณฮอร์โมน เช่น เอสโตรเจน โปรเจสเตอโรน และอินซูลินที่ประสบความสำเร็จอย่างมาก
3. ใช้หาปริมาณสารบ่งชี้การเป็นมะเร็ง เช่น การหาปริมาณ oncofetal protien , α-fetoprotien (AFP) ในซีรัมของประชากรจำนวนมากๆ เพื่อดูโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในตับ เป็นต้น

4. ใช้หาปริมาณโปรตีนในซีรัม เช่น อิมมูโนโกลบูลิน เฟอริติน α-2-catoglobulin ใช้หาปริมาณพิษงูและแอนติบอดีต่อพิษงู
5. ใช้หาแอนติเจนที่เป็นตัวทำให้เกิดโรคติดเชื้อ เช่น การหาปริมาณสารพิษของ *Vibiro cholerae* และ *E. coli* ใช้หาแอนติเจนจาก *Brucella* และ *Salmonella*
6. ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี เช่น ทางไวรัสวิทยาจะใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส *Rubella* ที่ทำให้เกิดโรคหัดเยอรมัน หรือการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อ *Salmonella* O antigen ซึ่งทำให้เกิดอาการท้องเสีย
7. ตรวจหาแอนติบอดีหลังจากได้รับการฉีดวัคซีน เช่น ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อพิษสุนัขบ้าเพื่อทดสอบดูว่าผู้ป่วยตอบสนองต่อวัคซีนหรือไม่

ทางด้านชีวโมเลกุล

ใช้สำหรับตรวจหาโมโนโคลนัลแอนติบอดีในกระบวนการสร้างแอนติบอดี โดยใช้เทคนิคไฮบริโดมา กระบวนการดังกล่าวจำเป็นต้องมีการตรวจหาแอนติบอดีที่รวดเร็ว มีความไวสูงและได้ผลที่น่าเชื่อถือ

ทางการเกษตร

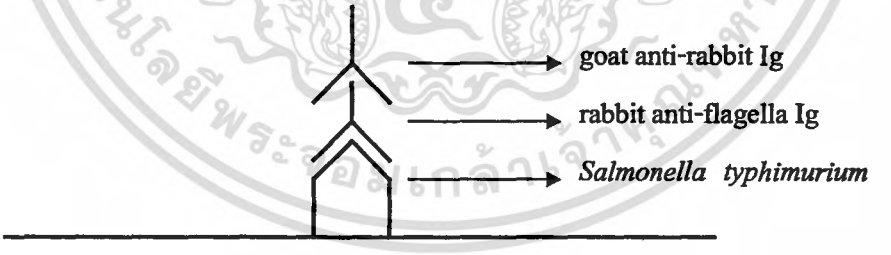
1. ใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสในสัตว์ มักใช้การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อนั้นๆ เช่น แอนติบอดีต่อ *Trichinella spiralis* ในซีรัมของหมู หรือการหาไวรัสโดยตรง ทำได้โดยตรึงแอนติบอดีต่อไวรัสในไมโครไตเตอร์เพลท แล้วใช้แอนติบอดีติดฉลากที่มีความจำเพาะต่อไวรัส
2. ใช้ตรวจหาไวรัสในพืชและแบคทีเรียในปมรากถั่ว

จากตัวอย่างต่างๆ จะเห็นว่าเทคนิค ELISA เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและมีความไวสูง สามารถจำแนกจุลินทรีย์หรือหาปริมาณสารได้หลายชนิด ทั้งยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ถึงแม้ว่าจะต้องใช้ความชำนาญสูงและการตรวจหาประสิทธิภาพขั้นสุดท้าย ที่อาจได้ความแม่นยำไม่เท่ากับวิธี RIA แต่ ELISA ก็ยังเป็นวิธีที่น่าสนใจและมีการพัฒนาต่อมาเรื่อยๆ

การตรวจหา *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยเทคนิค ELISA

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์อาหาร ตามปกติแล้วใช้เวลามากและมีปัญหาหลายอย่าง เนื่องจากเชื้อที่ปรากฏมีอยู่ในระดับต่ำและมีแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นๆ จึงมีการปรับปรุงวิธีการทดสอบหาเชื้อที่รวดเร็วขึ้นในช่วงหลายปีที่ผ่านมา และวิธี ELISA ได้รับการยอมรับมากที่สุด ทำให้มีการศึกษาและปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค ELISA เพื่อเพิ่มความไว ความถูกต้อง ความแม่นยำ และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยที่สุด การนำเทคนิค ELISA มาใช้ตรวจหา *Salmonella* ในอาหารเป็นครั้งแรกเริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1977 โดย Krysinski และ Heimsch ทำโดยนำเซลล์ของเชื้อ *Salmonela typhimurium* มาตรึงบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตแล้วเติม anti-flagella serum ลงไป anti-flagella serum จะทำปฏิกิริยากับเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติม goat anti-rabbit Ig ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสลงไป ล้างออก เติมสับสเตรทไดอะมิโนเบนซิดีน ลงไป จะเกิดสีน้ำตาล เมื่อนำไปวัดสีจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 12

ภาพที่ 12



แผ่นเซลลูโลสอะซิเตต

แสดงการตรวจหา *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร

ในปี ค.ศ. 1980 Swaminathan และ Ayres ได้ใช้เทคนิคอิมมูโนเอนไซม์แบบทางตรง (direct immunoenzyme) ในการวิเคราะห์ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร โดยเตรียม Polyclonal anti - H serum ซึ่งจำเพาะต่อผนังเซลล์และแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella* โดยใช้ 3 - 3' diaminobenzidine เป็นสับสเตรท เซลล์ *Salmonella* จะติดสีน้ำตาล นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 1000 เท่า สามารถแยกเซลล์ที่เกิดสีและไม่เกิดสีได้ เซลล์ที่เกิดสีคือ *Salmonella* และเซลล์ที่ไม่เกิดสีคือแบคทีเรียชนิดอื่น สามารถนำเทคนิคอิมมูโนเอนไซม์แบบทางตรงไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ พบว่าวิธีนี้มีความไวและจำเพาะสูง สามารถปรับปรุงให้สะดวกในการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารได้ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี fluorescent antibody และวิธีคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า วิธีอิมมูโนเอนไซม์ มีความถูกต้องสูงสะดวกและรวดเร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมากและมีความไวใกล้เคียงกับวิธี Fluorescent Antibody แต่ใช้เครื่องมือราคาถูกกว่า

ในปี ค.ศ. 1981 Minnich และคณะ ได้ปรับปรุงการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยแยก IgM ออกให้เหลือเพียง IgG ซึ่งสามารถแก้ปัญหาปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการอื่นๆ (cross reaction) ซึ่งเกิดจากแอนติบอดีไปเกาะกับเชื้อตัวอื่นที่ไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* การแยกIgM ออกทำได้โดยวิธีโครมาโทรกราฟี และทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี เจลอิเล็กโตรโฟลิซิส (Gel electrophoresis) และได้พัฒนาวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์โดยใช้วิธีการปั่น (centrifuge) 5 นาทีในขั้นตอนการล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป พบว่าวิธีนี้มีความไวและจำเพาะกว่าวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่เหมาะที่จะใช้ในงานประจำ เพราะไม่สะดวกในการปั่นล้าง

ในปี ค.ศ. 1982 Vassilidis ได้ค้นพบ RV medium (Rappaport-Vassilidis enrichment medium) สำหรับแยกเชื้อ *Salmonella* และเมื่อเปรียบเทียบอาหารชนิดนี้กับ MK broth, Difco tetrathionate broth , Oxoid selenite broth พบว่า RV medium มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อ *Salmonella* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นซึ่งแข็งแรงและมีอัตราการแข่งขันสูง สามารถนำอาหารชนิดนี้ไปใช้เลี้ยงเชื้อ *Salmonella* ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารก่อนการวัดโดยวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ต่อไป

ในปี ค.ศ. 1983 Robinson และคณะ ได้รายงานถึงการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* สามารถตรวจหา serotype ได้ 94 % ต่อมาในปี ค.ศ. 1984 Mattingly ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีตัวที่ 2 ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* และได้พัฒนาเป็นชุดตรวจวัดอัตโนมัติ (kit) ชื่อว่า Bio-Enzabead *Salmonella* Screen kit (Organon Teknika Corp., Durharm , U.S.A.) และ Bactelisa screening kit for *Salmonella* (Kirkegaard and Perry Laboratories, Maryland, U.S.A.) โดยตรึงแอนติบอดีไว้บน bead (Bio-Enzabead) หรือหลุมใน

ไมโครไตเตอร์เพลท (Bactelisa) เติมตัวอย่างลงไปในชุดตรวจวัด เซลล์ของเชื้อ *Salmonella* ที่มีอยู่ในตัวอย่าง จะทำปฏิกิริยาตรึงจับกับแอนติบอดี เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากเอนไซม์ลงไปจับกับเซลล์ของ *Salmonella* เติมสับสเตรทลงไป เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีขึ้น สามารถอ่านผลได้จาก plate reader

ในปี ค.ศ. 1985 Anderson และ Hartman ได้พัฒนาวิธี direct enzyme immunoassay (EIA) โดยใช้โพลีโคลนัลแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารของคนและสัตว์ โดยตรึงเซลล์ *Salmonella* หรือเติมตัวอย่างลงไปติดกับหลุมของโพลิสไตรีนไมโครไตเตอร์เพลท แล้วเติม Spicer-Edwards anti-H immunoglobulin G ติดฉลากด้วยโปรตีน A-B-D-galactosidase ใช้สับสเตรท billiferyl-B-D galactoside พบว่ามีความไวในการวิเคราะห์ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไม่ต้องใช้การล้างโดยการปั่น จึงทำให้สะดวกและประหยัดเวลา

ในปี ค.ศ. 1985 Ibrahim และคณะได้ปรับปรุงวิธีการแยกแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella* ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น จากนั้นทดสอบความบริสุทธิ์ของแฟลกเจลลาที่ได้โดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนและวิธีเจลอิเล็คโตรโฟลิซิสพบว่ามีความบริสุทธิ์สูง นำแฟลกเจลลาที่ได้ไปฉีดกระตุ้นกระต่ายเพื่อให้สร้างแอนติบอดี พบว่าแอนติบอดีไตเตอร์ของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยแฟลกเจลลาสูงกว่าที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวเซลล์

ในปี ค.ศ. 1989 Prusak-Sochaczewski และ Loung ได้พัฒนาวิธี ELISA สำหรับตรวจวัด *Salmonella* ในอาหาร โดยปรับปรุงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความไวของวิธี ELISA ในการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA ต้องอาศัยความสามารถของแอนติบอดีหรือแอนติเจนในการเกาะกับเฟสของแข็ง เช่น เซลลูโลส อะกาโลส ไนลอน หรือแก้ว จากการทดลองยึดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Salmonella* ลงบนพอลิสไตรลีนเพลท พบว่าแอนติบอดีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่ม 1 ชม. ให้ผลการยึดติดบนผิวหลุมได้ดีที่สุด ในการกระตุ้นเพลทโดยบ่มเพลทด้วย glutaraldehyde ก่อนการยึดด้วยแอนติบอดี ไม่มีผลต่อความไวของวิธี ELISA เพลทที่เคลือบด้วยแอนติบอดี มีความเสถียรได้อย่างน้อยที่สุด 1 สัปดาห์ จึงสามารถเตรียมเพลทที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่างหากได้ เป็นการลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ ในการเคลือบเพลทด้วยแอนติบอดีจำเป็นต้องมี blocking reagent ใช้เคลือบหรือล้างเพลทซ้ำหลังการเคลือบด้วยแอนติบอดี เพื่อให้ blocking reagent ไปเกาะกับเพลทตรงที่ว่างป้องกันเซลล์แบคทีเรีย หรือสารอื่นๆในตัวอย่างมาจับกับพื้นผิวที่ว่างของเพลท ในการทดสอบ blocking reagent ใช้โปรตีน เช่น casien , bovine serum albumin และ Tween 20 พบว่า casien มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเกาะกับพลาสติก ส่วน Tween 20 ให้ความไวในการวิเคราะห์น้อยและเป็นสารที่ใช้ล้างอาจทำให้แอนติบอดีหลุดออกมาได้ ฉลากเอนไซม์ที่นิยมใช้มากคือ horseradish peroxidase และใช้ O-phenylenediamine เป็นสับสเตรท พบว่ามีความเหมาะสมสำหรับ

วิธีเอนไซม์แอสเสย์ ในการทดลองเติมตัวเร่ง dextran และ polyethylene glycol ในช่วงการบ่มของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ แต่ความไวจะขึ้นอยู่กับเวลาในการบ่มที่เหมาะสมคือ 15-20 นาที การพัฒนาปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ พัฒนาวิธี ELISA ให้ตรวจวัดเชื้อ *Salmonella typhimurium* ได้อย่างน้อย 5 $x10^4$-10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาประมาณ 24 ชม. ในการวิเคราะห์ เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างอาหาร จนเสร็จสิ้นการวิเคราะห์พบว่าวิธีนี้มีความไวสูง มีความถูกต้องและเชื่อถือได้

ในปี ค.ศ. 1990 และ 1993 Lee และคณะได้พัฒนา Ab-capture ELISA ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี พบว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับ *Salmonella* สปีชีส์อื่น และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *Salmonella* serotype อื่น 1 ชนิด ซึ่งเกิดน้อยมาก โดยมีขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อในตัวอย่างเพียงขั้นตอนเดียว ปริมาณเซลล์ *Salmonella* 10 เซลล์ในอาหาร 25 กรัม สามารถตรวจพบได้ในเวลา 19 ชม. เชื้ออื่นไม่มีผลต่อการตรวจวัด *Salmonella typhimurium* แม้จะปรากฏในอัตราส่วน 10^6:1 (เชื้ออื่น : เชื้อ *Salmonella*) และสามารถทำการวิเคราะห์ได้เสร็จอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน

ในปี ค.ศ. 1992 Eckner และคณะ ได้พัฒนา ELISA สำหรับตรวจวัดเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร โดยเปรียบเทียบกับวิธีคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ตัวอย่างอาหาร 20 ตัวอย่าง การพัฒนากระบวนการ ELISA ประกอบด้วยขั้นตอนการบ่มที่อุณหภูมิสูง (42 °ซ.) ไม่ต้องกวนไมโครไตเตอร์เพลทในขั้นตอนการบ่ม ไม่ใช้ขั้นตอนการปั่นล้าง ให้ความถูกต้องใกล้เคียงกับวิธีคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าวิธี ELISA ไม่มีผลบวกผิดพลาด แต่มีผลลบผิดพลาด 1.5 % ส่วนวิธีคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลลบผิดพลาด 5.3 % ทั้งสองวิธีมีผลตรงกัน 96.7 %

ในปี ค.ศ. 1993 Flint และ Hartley คิดค้นชุดตรวจวัดอัตโนมัติ TECRA immunocapture ELISA สำหรับตรวจหา *Salmonella typhimurium* ในอาหาร ในปี ค.ศ.1993 Wyatt และคณะได้พัฒนาการใช้แซนวิช ELISA ซึ่งใช้โพลีโคลนัลแอนติบอดีในขั้น capture stage และใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีในขั้นการตรวจวัด สามารถวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ได้หลายซีโรไทป์ ขั้นตอนก่อนการทำ ELISA มีการบ่มเชื้อใน single nonselective broth 28 ชม. บ่มใน preenrichment broth 7 ชม. บ่มใน selective broth 21 ชม. สามารถกำจัดเชื้ออื่นซึ่งทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีออกไปได้ในขั้นตอนการเลี้ยงใน selective medium

ในปี ค.ศ. 1994 Eckner และคณะได้ทำงานวิจัยร่วมกับห้องปฏิบัติการอื่นๆอีก 30 แห่งโดยทำการพัฒนาวิธี ELISA ซึ่งใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดเชื้อ *Salmonella* ในอาหารต่างๆ เช่น นมผง นมช็อกโกเลต ไข่ผง พริกไทยดำป่น และแป้งถั่วเหลือง มีผลลบผิดพลาดเกิดขึ้นน้อยกว่าวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การตรวจหา *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี culture method

Salmonella จัดอยู่ในตระกูล (family) Enterobacteriaceae ลักษณะโดยรวมของ family นี้คือ เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแกรมลบ ไม่มีสปอร์ ซึ่งสามารถเจริญได้ดีบนอาหารพวก artificial media บางสปีชีส์มีแฟลกเจลลา สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้โดยอาจเกิดกรด หรือเกิดกรดกับก๊าซ ให้ผลลบกับ indole phenol oxidase test ไม่ทำให้ alginate เหลว มีอยู่ 1 จีนัสที่สามารถทำเพกตินให้เหลวได้คือ แบคทีเรียในจีนัส *Pectobacterium*

ลักษณะการเจริญของเชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีดังนี้คือ

1. เป็น aerobic และ facultative anaerobic
2. สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน
3. เจริญได้ง่ายบนอาหารธรรมดาทั่วๆไป
4. ขนาดของโคโลนีประมาณ 2-4 มิลลิเมตร หลังการบ่มที่ 37 ° ซ. นาน 18-24 ชม. บน อาหาร NA โดยจะมีสีขาวออกเทา เป็นวงกลมโค้งนูน มีขอบเรียบ
5. ลักษณะบนอาหาร Mac Conkey's และ DCA media คล้ายกับการเจริญบน NA และสีซีดเนื่องจากไม่หมักน้ำตาลแล็กโทส

คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญของ *Salmonella* ได้แก่

1. สามารถหมัก dulcitol และ manitol เกิดกรดกับก๊าซ (ยกเว้น *S. typhi* ไม่ทำให้เกิดก๊าซ)
2. ไม่หมักน้ำตาลแล็กโทสหรือซูโครส
3. ไม่สร้าง indole
4. สามารถเคลื่อนที่ได้

การเพาะเลี้ยงเพื่อหาเชื้อ *Salmonella* สามารถใช้อาหารได้หลายชนิด โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

1. Differential non-selective media ได้แก่

- Eosin methylene blue agar (EMB agar)
- Mac Conkey's agar
- Laifson 's deoxycholate agar

อาหารแต่ละชนิดประกอบด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ เช่น sodium deoxycholate salt ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและในกลุ่มแกรมลบที่เจริญได้นั้นจะเจริญได้โดยมีลักษณะต่างกัน กลุ่มที่หมักน้ำตาลแล็กโทสหรือซูโครสจะทำให้เกิดกรด แล้วเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ ส่วนกลุ่มที่ไม่เกิดการหมักได้แก่ *Shigella* และ *Salmonella* จะได้โคโลนีที่ไม่มีสี การแยกเชื้อมาตรวจจึงทำได้ง่ายขึ้น

2 Differentially moderately หรือ highly selective media ได้แก่

- *Salmonella-Shigella* agar (SS agar)
- Hektoen enteric agar (HEA)
- Deoxycholate citrate agar (DCA)
- Kauffmann brilliant green agar
- Wilson - Blair bismuth sulfite agar

อาหารเหล่านี้มีส่วนประกอบของอาหารและสารเคมีที่ค่อนข้างซับซ้อน สามารถยับยั้งการเจริญของพวก coliform bacilli ส่วน *Salmonella* และ *Shigella* เจริญได้ดี นอกจากการใช้น้ำตาลแล็กโทสหรือซูโครสเป็นพื้นฐานช่วยแยกเชื้อแล้วยังมีการปรับปรุงสูตรเพิ่มเติม โดยใช้ xylose การเกิด lysine decarboxylation และเพิ่มส่วนประกอบโดยดูการเกิด hydrogen sulfide ด้วย เรียกอาหารนี้ว่า Xylose lysine-deoxycholate (XLD) agar

3. Selective enrichment media เป็นอาหารเหลว เช่น

- Leifson's selenite broth
- Mueller tetrathionate broth
- Hajna GN broth

อาหารเหล่านี้จะมีสารเคมีต่างๆ เช่น selenium salt , tetrathionate ซึ่งได้มาจากการออกซิไดส์ thiosulfate โดยการเติมไอโอดีนก่อนนำมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ หรือ มี deoxycholate และ citrate ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและยับยั้งการเจริญของพวก coliform bacilli รวมทั้ง *Proteus* ได้ชั่วคราว (นาน 12-18 ชม.) ในขณะเดียวกันจะช่วยเร่งการเจริญและการแบ่งตัว

ของ *Salmonella* กับ *Shigella* บางสปีชีส์ ในทางปฏิบัติโดยทั่วๆไป นิยมนำตัวอย่างที่สงสัยว่ามีเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella* มาเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวก่อน แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงบน differential หรือ selective plating media เพื่อดูลักษณะของโคโลนี แล้วเลือกเอาโคโลนีที่สงสัยมาทดสอบเพื่อยืนยันต่อไป ถ้ามีโคโลนีที่สงสัยมากขึ้นจะเพิ่มโอกาสได้เชื้อที่สงสัยเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปใช้ประมาณ 2-3 โคโลนีต่อ 1 เพลท

บทที่ 3
ขั้นตอนการดำเนินงาน

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

จุลินทรีย์

Salmonella typhimurium ATCC 14028

Salmonella typhimurium S292

Salmonella typhimurium

Salmonella agona

Salmonella derby

Salmonella heidelberg

Salmonella welteverden

Salmonella orion

Salmonella sp. S96

Shigella flexneri

Shigella sonnei

Klebsiella pneumoniae ATCC10031

Enterobacter cloacae

Citrobacter freundii

Proteus mirabilis

Escherichia coli ATCC 25922

Bacillus subtilis ATCC 6633

Staphylococcus aureus ATCC 6538 P

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- microplate reader (ELISA Expresso Cassette LP400)
- microplate washer (Diagnostics Pasteur Sanofi)
- microtiter plate (Nunc-Immuno Plate)
- ultracentrifuge
- centrifuge (Hermle: ZK 380)
- spectrophotometer (Professional Activities Division : UNICAM 8620)
- autoclave (Hirayama MFG. CORP. : HA-3D)
- oven (WTEbinder : ED 53)
- incubator (New Brunswick Scientific CO. , INC. Edison , N.J. : O- 27)
- refrigerator freezer -20°C (Jouan: VX350)
- dialysis membrane
- micropipette (Nichiryo : 5000)
- เครื่องแก้วต่างๆ (Pyrex)

สารเคมี

- brain heart infusion broth
- O-phenylenediamine
- goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate
- formalin
- tween 80
- sodium chloride
- hydrochloric acid
- sodium hydroxide
- potassium chloride
- gelatin
- สารเคมีอื่นๆ

<u>วิธีดำเนินการวิจัย</u>

1. การเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดี

1.1 การเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

1.1.1 สัตว์ทดลอง

กระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ อายุ 2 เดือน หนัก 2-3 กิโลกรัม จำนวน 2 ตัว

1.1.2 การเตรียมแอนติเจน

เตรียม whole cell antigen โดยเพาะเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ในอาหาร brain heart infusion agar (BHI) เป็นเวลา 2 วัน ซัสเพนด์เซลล์ด้วย saline solution (NaCl 0.85 %) นำมานับเซลล์โดยวิธี standard plate count ปรับปริมาณเชื้อให้ได้ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตรผสมฟอร์มาลินให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 % ทำลายเชื้อโดยใช้ความร้อนที่ 72^{o} ซ.เป็นเวลา 1 ชม. ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อโดยวิธี spread plate

1.1.3 การฉีดกระต่าย

ฉีดเชื้อความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในปริมาณ 0.1 ,0.3 ,0.5 , 1.0 และ 2.0 มิลลิลิตรในวันที่ 1 , 4 , 7 , 10 และ 13 โดยฉีดเข้าเส้นเลือดดำบริเวณใบหูของกระต่าย (ภาพที่ 13) ก่อนการฉีดเชื้อครั้งแรกทำการเจาะเลือด เพื่อใช้เป็น normal serum หลังการฉีดกระตุ้น ทำการเก็บเลือดในวันที่ 20 , 28, 42 และ 56

1.1.4 การเก็บซีรัม

แยกซีรัมจากเลือดกระต่ายโดยปั่นที่ 5000 xg นาน 15 นาที และแบ่งเก็บใส่หลอดขนาดเล็ก (microtube) แช่แข็งที่ -20^{o} ซ.

ภาพที่ 13

แสดงการฉีดเชื้อเข้าเส้นเลือดดำบริเวณใบหูของกระต่าย

1.2 การเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

1.2.1 สัตว์ทดลอง

กระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์อายุ 2 เดือน หนัก 2-3 กิโลกรัม จำนวน 2 ตัว

1.2.2 การเตรียมแอนติเจน (Ibrahim , 1985)

- เตรียมแฟลกเจลลาแอนติเจนโดยเลี้ยงเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ในอาหาร BHI ใส่ฟลาสก์บ่มที่ 35 ^{o}ซ. เขย่าที่ 80 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 16 ชม.
- นำไปปั่น 5,000 xg เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ
- ซัสเพนด์เซลล์ด้วย saline solution (NaCl 0.85%)
- ปรับ pH ให้ได้ 2.0 โดยใช้ HCl 1 โมลาร์ เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
- นำสารละลายส่วนใสไปปั่นที่ 100,000xg ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ. โดยใช้เครื่อง ultracentrifuge เป็นเวลา 1 ชม. เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนออก
- ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 7.2 โดยใช้ NaOH 1 โมลาร์
- เติม $(NH_4)_2SO_4$ อย่างช้าๆ และกวนอย่างแรงให้สารละลายอิ่มตัว 2/3 (2.67 โมลาร์)
- ทิ้งไว้ 1 คืนที่ 4 ^{o}ซ. และ ปั่น 15,000 xg 15 นาที ที่ 4 ^{o}ซ.
- นำตะกอนซึ่งมีแฟลกเจลลาละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เทใส่ dialysis tube (M.W. cut off 50,000) ทำ dialysis 20 ชม. ที่ 4 ^{o}ซ. คนตลอดเวลาในน้ำกลั่น 4 ลิตร
- ปิเปตต์สารละลายใส่หลอดขนาดเล็กเก็บที่ -20 ^{o}ซ.
- หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry โดยใช้ BSA (bovine serum albumin) เป็นสารมาตรฐาน

1.2.3 การฉีดกระต่าย

ฉีดแฟลกเจลลา 500 ไมโครกรัมโดยผสมกับ Complete Freund's adjuvant ใน dose แรก โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) (ภาพที่ 14) dose ถัดไป

ฉีดในปริมาณเท่าเดิมแต่ผสมใน incomplete Freund's adjuvant ในวันที่ 14, 28 และ 63 เจาะเลือดก่อนฉีด dose แรกเพื่อใช้เป็น normal serum และก่อนการฉีดทุกครั้งให้เจาะเลือดเก็บไว้ หลังจาก dose สุดท้ายเจาะเลือดทุก 1 สัปดาห์ ประมาณ 4-5 ครั้ง แยกซีรัมจากเลือดที่เจาะได้เก็บในหลอดขนาดเล็ก แช่แข็งที่ -20 ^{o}ซ.

ภาพที่ 14

แสดงการฉีดแฟลกเจลลาของเชื้อเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย

2. การตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัม *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนและแอนติบอดีในการทำ ELISA

2.1.1 การทดสอบ anti-whole cell serum โดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

วิธีทำ (ดัดแปลงจากวิธีของ Prusak-Sochaczewski , 1989)

- เตรียมซัสเพนชั่นของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยซัสเพนด์เซลล์ใน coating buffer ที่ความเจือจาง 1:10 , $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, และ $1:10^5$ ให้ความร้อนที่ 72^{o}ซ. เป็นเวลา 1 ชม.เคลือบเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่ 4^{o}ซ. ทิ้งไว้ 1 คืน
- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติม blocking reagent (3% gelatin ใน PBS Tween) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37^{o}ซ. เป็นเวลา 1 ชม.
- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติม anti - whole cell serum ของกระต่าย ที่ความเจือจาง 1:10 ,$1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$ และ $1:10^5$ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม.
- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติม goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม.
- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติมสับสเตรท OPD (O-phenylenediamine) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด 20 นาที
- เติม H_2SO_4 4 N หลุมละ 50ไมโครลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท
- อ่านค่า OD ที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Expresso Cassette LP 400

2.1.2 การทดสอบ anti-whole cell serum โดยใช้แฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

วิธีทำ เหมือนที่กล่าวในข้อ 2.1.1 แต่เคลือบเพลทด้วยแอนติเจนคือแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ความเข้มข้นโปรตีน 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.3 การทดสอบ anti-flagella serum โดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

วิธีทำ เหมือนที่กล่าวในข้อ 2.1.1 โดยเคลือบเพลทด้วยแอนติเจนคือซัสเพนชั่นของเชื้อซึ่งเตรียมโดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ซัสเพนด์ใน coating buffer ความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำลายเชื้อโดยให้ความร้อนที่ 72^{o} ซ.เป็นเวลา 1ชม. เคลือบเพลทหลุมละ100 ไมโครลิตรและใช้ anti-flagella serum แทน anti- whole cell serum

2.1.4 การทดสอบ anti-flagella serum โดยใช้แฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

วิธีทำ เหมือนที่กล่าวในข้อ 2.1.3 แต่เคลือบเพลทด้วยแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมความเข้มข้นโปรตีน 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 การทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัม

2.2.1 การทดสอบ anti-whole cell serum

นำซีรัมของกระต่ายตัวที่ 1 และ 2 มาทดสอบโดยวิธี ELISA ใช้แอนติเจนคือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ความเข้มข้นของเชื้อ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เคลือบเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตรทุกหลุม กระบวนการ ELISA เหมือนที่กล่าวในข้อ 2.1.1

2.2.2 การทดสอบ anti-flagella serum

นำซีรัมของกระต่ายตัวที่ 3 และ 4 มาทดสอบโดยวิธี ELISA ใช้แอนติเจนคือแฟลกเจลลาของ เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ปริมาณโปรตีน 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจาง ใน coating buffer ที่ความเจือจาง $1:10^4$ เคลือบเพลทหลุมละ 100ไมโครลิตรทุกหลุมกระบวนการ ELISA เหมือนที่กล่าวในข้อ 2.1.4

2.3 การศึกษา cross reaction ของแอนติซีรัม *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยเทคนิค ELISA

วิธีทำ

- เคลือบเพลทด้วยแอนติเจนคือเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่

Salmonella typhimurium ATCC 14028

Salmonella typhimurium S292

Salmonella typhimurium

Salmonella agona

Salmonella derby

Salmonella heidelberg

Salmonella welteverden

Salmonella orion

Salmonella sp. S96

Shigella flexneri

Shigella sonnei

Klebsiella pneumoniae ATCC10031

Enterobacter cloacae

Citrobacter freundii

Proteus mirabilis

Escherichia coli ATCC 25922

Bacillus subtilis ATCC 6633

Staphylococcus aureus ATCC 6538 P

นำเชื้อแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาทำลายเชื้อโดยใช้ความร้อนที่ 72 °ซ. เป็นเวลา 1 ชม. นำมาเจือจางใน coating buffer ให้ได้ความเข้มข้น 10^8 ,10^7,10^6,10^5,10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เคลือบเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่ 4 °ซ. ทิ้งไว้ 1 คืน

- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติม blocking reagent (3 % gelatin ใน PBS Tween) หลุมละ100ไมโครลิตรบ่มที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 1 ชม.
- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติมซีรัมของกระต่าย 4 ชนิดคือ anti-whole cell serum , anti-flagella serum , partial purified anti-whole cell serum และ partial purified anti-flagella serum เจือจาง 1:10^4 ด้วย diluent หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม.
- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติม goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม.
- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติมสับสเตรท OPD (O-phenylenediamine) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด 20 นาที
- เติม H_2SO_4 4 N หลุมละ 50ไมโครลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท
- อ่านค่า OD ที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Expresso Cassette LP 400

วิธีการทำ partial purified serum

- เตรียม ammonium sulfate อิ่มตัว 10 กรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6-7 เก็บที่ 4°ซ. กวน1-2 วัน ให้มีผลึกเหลือ
- เติม ammonium sulfate ทีละหยดลงในซีรัมที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ปริมาตร 50 % กวนที่ 4°ซ. 30 นาที
- ปั่น 2000 xg ล้างตะกอนด้วย 50 % saturated ammonium sulfate 2-3 ครั้ง
- ละลายตะกอนที่ได้ใน PBS (ฆ่าเชื้อ) ปริมาตรเท่ากับ ปริมาตรเริ่มต้นของซีรัม หรือน้อยกว่า
- ทำ dialysis ใน PBS ปริมาตร 500-1000 มิลลิลิตร ที่ 4°ซ.
- ถ้าต้องการเก็บไว้นาน ให้ทำการกรองผ่าน membrane filter (0.45 ไมโครเมตร)

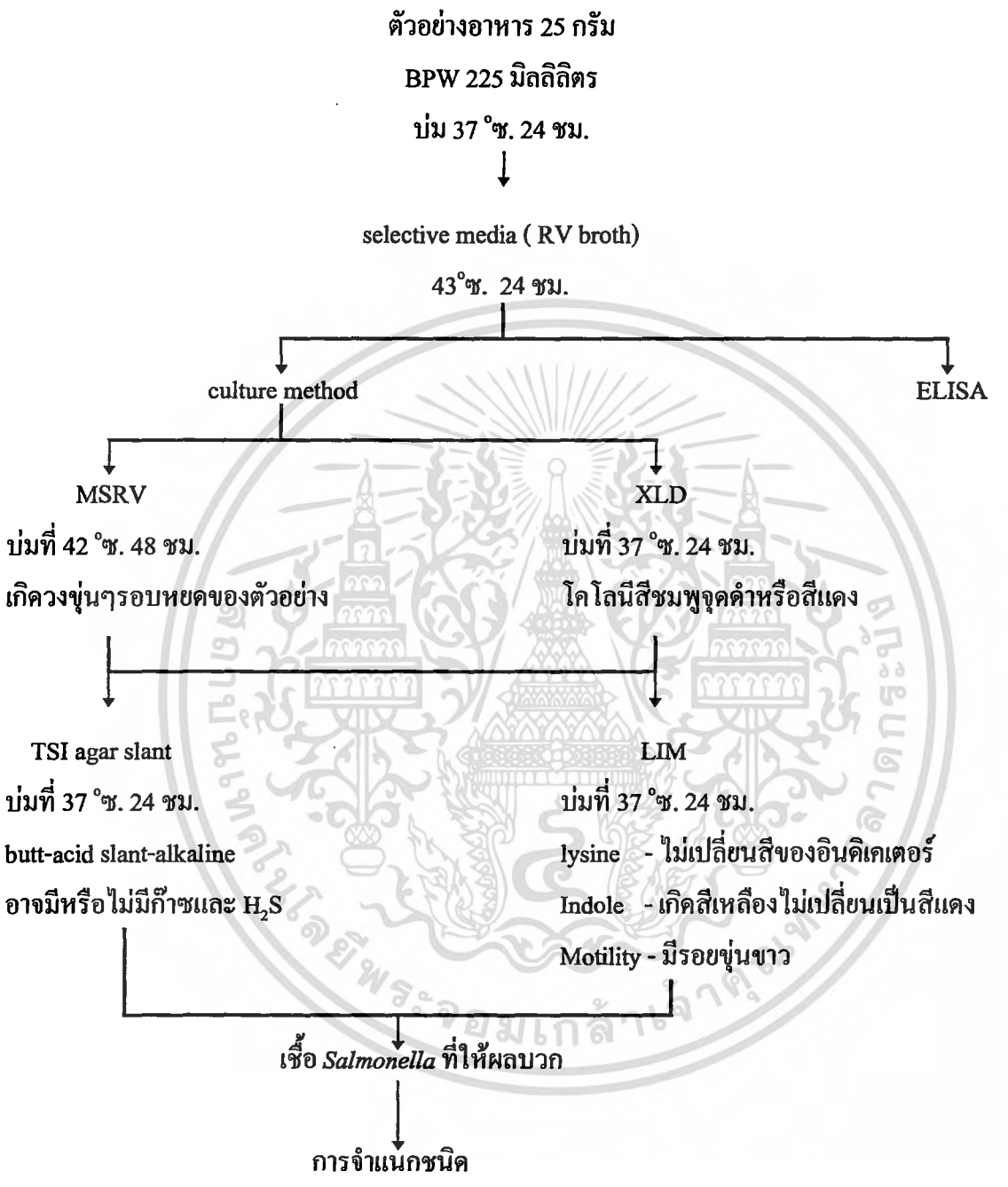
3. การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารโดยเทคนิค ELISA เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)

3.1 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่าง

วิธีทดลอง (ภาพที่ 15)

- ชั่งตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู นม และไข่ผง 25 กรัมนำไปฆ่าเชื้อใส่ลงในขวดอาหาร Buffer peptone water (BPW) 225 มิลลิลิตร เติมเชื้อที่ทราบจำนวน 2 , 5 , 12 , 25 เซลล์ต่อมิลลิลิตรลงไปและปั่นให้เข้ากันบ่ม 37 °ซ. 24 ชม. (ภาพที่ 16)

ภาพที่ 15



แสดงวิธีวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร

ภาพที่ 16

แสดงตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู นม และไข่ผงบรรจุในขวดอาหาร

Buffer peptone water (BPW)

- ปีเปตต์ BPW ที่ผสมตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Rappaport Vassiliadis Medium (RV broth) 10 มิลลิลิตร (ภาพที่ 17) เขย่าให้เข้ากันบ่ม 43 °ซ. 24 ชม. (Vassilidis , 1982)
- แบ่งอาหารRV broth ที่มีตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งนำมาวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* โดยใช้วิธี ELISA ส่วนที่ 2 นำมาวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* โดยวิธี culture method

3.1.1 วิธี ELISA (ภาพที่ 18)

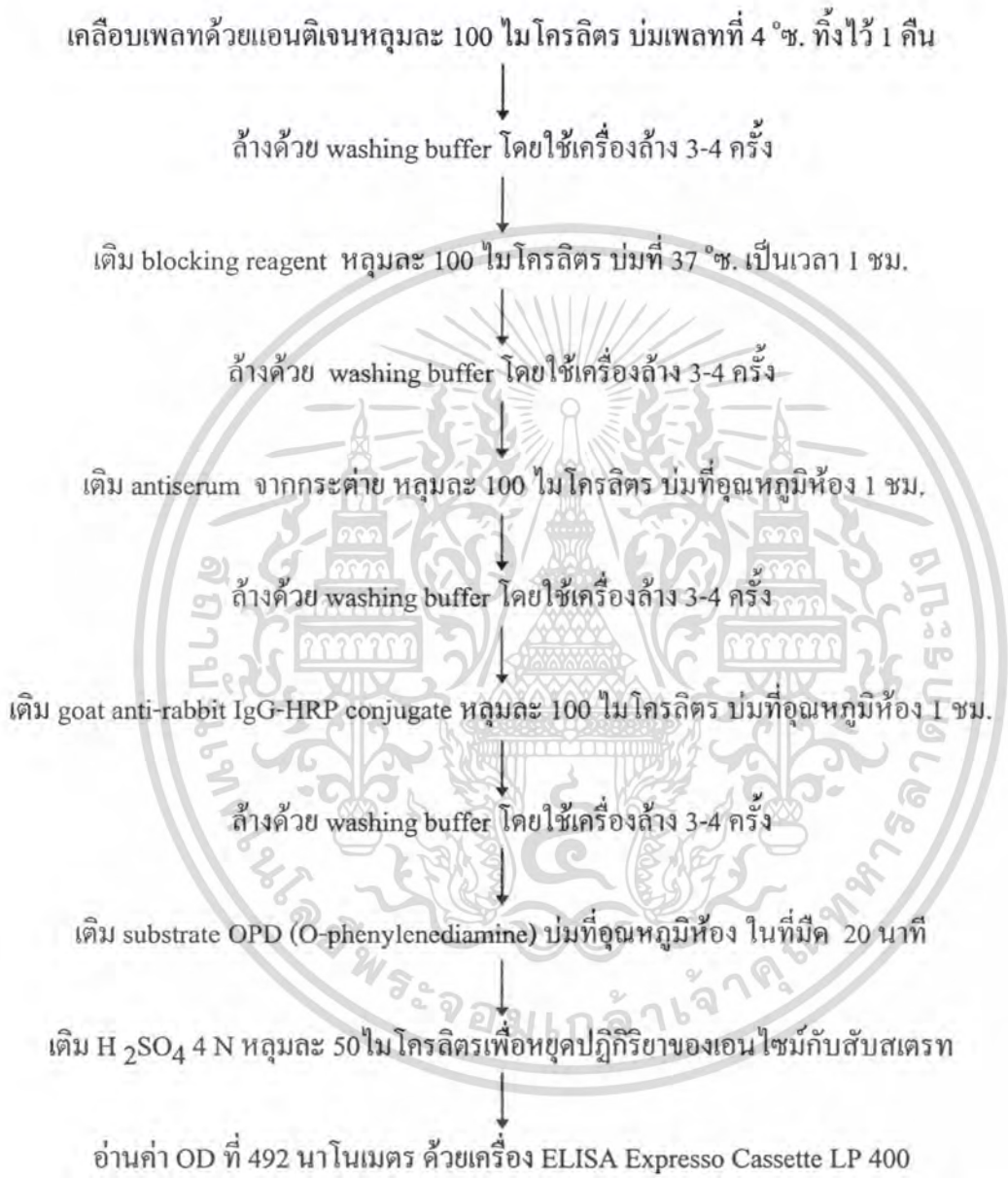
- ปีเปตต์ RV broth 2 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดยให้ความร้อน 72°ซ. เป็นเวลา 15 นาที
- นำไปปั่น 5000xg เป็นเวลา 30 นาที ให้เซลล์ของเชื้อในตัวอย่างตกตะกอน นำตะกอนมาซัสเพนด์ใน coating buffer โดยเติม coating buffer ให้ปริมาตรเท่าเดิมคือ 2 มิลลิลิตรและเจือจาง 1:10 , $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$ และ $1:10^5$
- นำสารละลายที่ได้ไปเคลือบเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่ 4 °ซ.ทิ้งไว้ 1 คืน ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติม blocking reagent (3% gelatin ใน PBS Tween) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ. เป็น เวลา 1 ชม.
- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติม partial purifed anti- flagella serum ของกระต่ายที่ความเจือจาง $1:10^4$ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม.
- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง (ภาพที่ 19)
- เติม goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม.
- ล้างด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้าง 3-4 ครั้ง
- เติมสับสเตรท OPD (O-phenylenediamine) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด 20 นาที
- เติม H_2SO_4 4 N หลุมละ 50ไมโครลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท
- อ่านค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA Expresso Cassette LP 400 (ภาพที่ 20)

ภาพที่ 17

แสดงการปิเปตต์ BPW ที่ผสมตัวอย่างใส่หลอดทดลองที่มีอาหาร

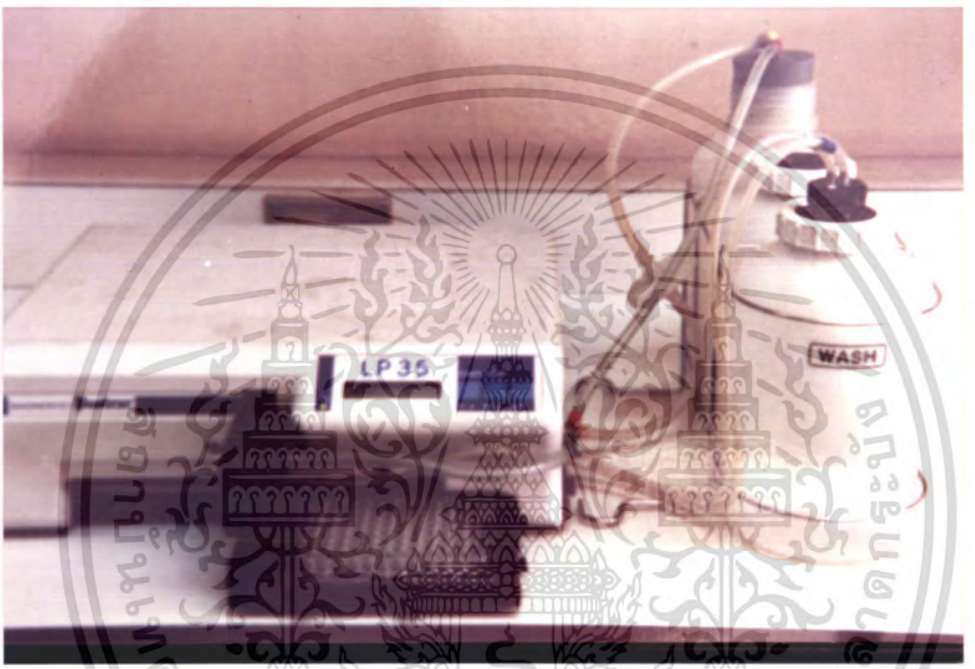
Rappaport Vassiliadis Medium (RV broth)

ภาพที่ 18



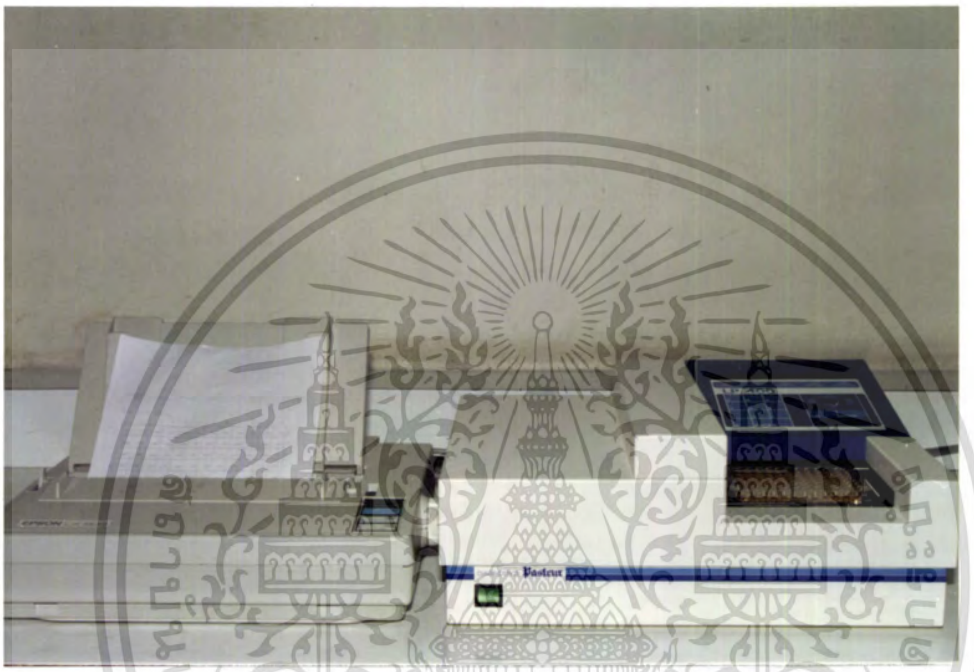
แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารโดยเทคนิค ELISA

ภาพที่ 19



แสดงเครื่อง microplate washer (Diagonostic Pasteur Sanofi)

ภาพที่ 20



แสดงเครื่อง ELISA Expresso Cassette LP 400 และเครื่องพิมพ์

3.1.2 วิธี culture method (Varadaraj , 1993)

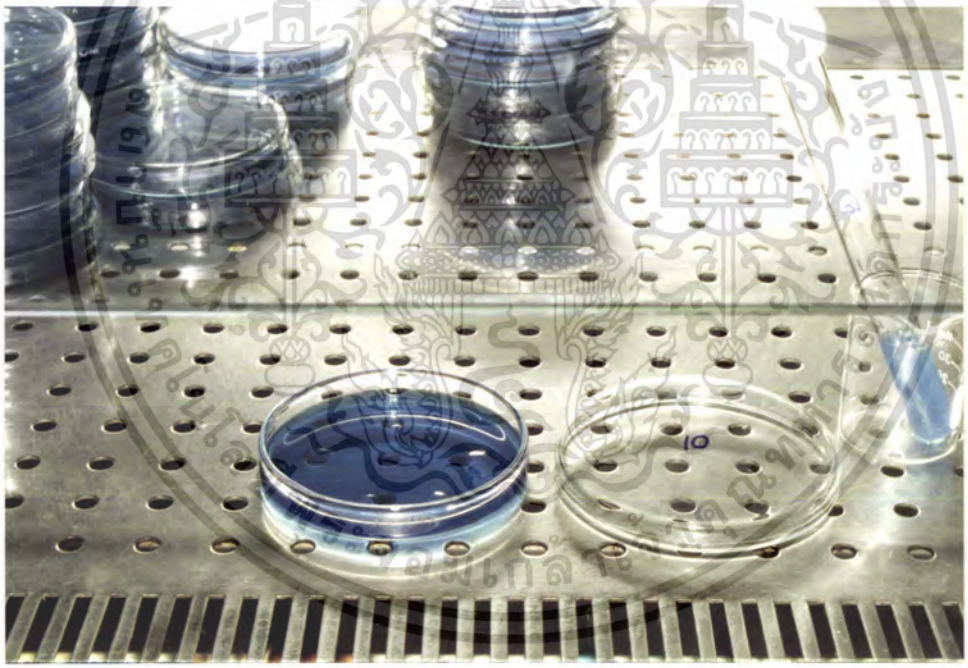
- ปิเปตต์อาหาร RV broth 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Semi Solid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV) โดยหยดลง 5 ตำแหน่ง ๆ ละ 1 หยด (ภาพที่ 21) ทำเครื่องหมายบริเวณตำแหน่งที่หยดตัวอย่างเพื่อให้สังเกตผลได้ง่าย บ่ม 42 °ซ. 48 ชม.
- ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากตำแหน่งที่สังเกตเห็นการเคลื่อนที่ของเชื้อออกมา (เกิดวงขุ่นๆ รอบหยดของตัวอย่าง) เป็นลักษณะที่คาดว่าเป็น *Salmonella* นำมาทดสอบในอาหาร Triple Sugar Iron agar (TSI) และ Lysine Indole Motility medium (LIM)
- ทดสอบใน TSI ทำโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อลงบน slant และ butt ของอาหาร TSI โดยการเพาะเชื้อบนผิวอาหาร (streak) และแทง (stab) เชื้อลงในส่วนของ butt และ stab เชื้อลงในหลอดอาหาร LIM นำอาหารทั้ง TSI และ LIM ที่เพาะเชื้อแล้วนี้ไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 24 ชม.
- ในทำนองเดียวกัน ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากอาหาร RV broth ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Deoxycholate (XLD agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. 24 ชม. (โคโลนีของ *Salmonella* บน XLD มีสีชมพู มีจุดดำตรงกลาง บางครั้งมีสีแดง) แสดงในภาพที่ 22 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่คาดว่าเป็น *Salmonella* ลงในอาหาร TSI และ LIM บ่ม 37 °ซ. 24 ชม.
- บันทึกผลใน TSI หลอดที่ให้ผลบวก คือ butt acid (เกิดสีเหลืองบริเวณ butt) และ slant alkaline (เกิดสีแดงบริเวณ slant) อาจมีหรือไม่มี H_2S (สีดำ) ก็ได้ และอาจเกิดก๊าซหรือไม่ก็ได้ (ภาพที่ 23) ใน LIM ผลบวกคือมีสีม่วงเช่นเดิม *Salmonella* ให้ alkaline reaction ไม่เปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์และอาจมีรอยขุ่นขาวรอบรอย stab คือให้ผลของ motility เป็นบวก และทำการทดสอบการสร้างอินโดล (indole) โดยใช้ Kovac's reagent หยดลง บนผิวของอาหาร LIM สำหรับ *Salmonella* ให้ผลการสร้างอินโดลเป็นลบ คือเกิดสีเหลืองไม่เกิดสีแดง (ภาพที่ 24) คัดเลือกเชื้อเฉพาะที่เป็น *Salmonella* คือ หลอดที่ให้ผลบวกทั้ง TSI และ LIM ไปทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและทำการทดสอบทางซีรัมวิทยาในปฏิกิริยา agglutination (serological agglutination test) โดยใช้ polyvalent serum *Salmonella* somatic (O) กลุ่ม A-E

3.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีเชื้ออยู่ตามธรรมชาติ

วิธีการทดลอง

- นำตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู จากแหล่งต่างๆ ชนิดละ 20 แหล่ง และนมจากบริษัทต่างๆ 10 แห่งชั่งตัวอย่างละ 25 กรัม (ทำ 2 ซ้ำ) ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.1 แต่ไม่ต้องเติมเชื้อ *Salmonella* ลงไปในตัวอย่าง

ภาพที่ 21

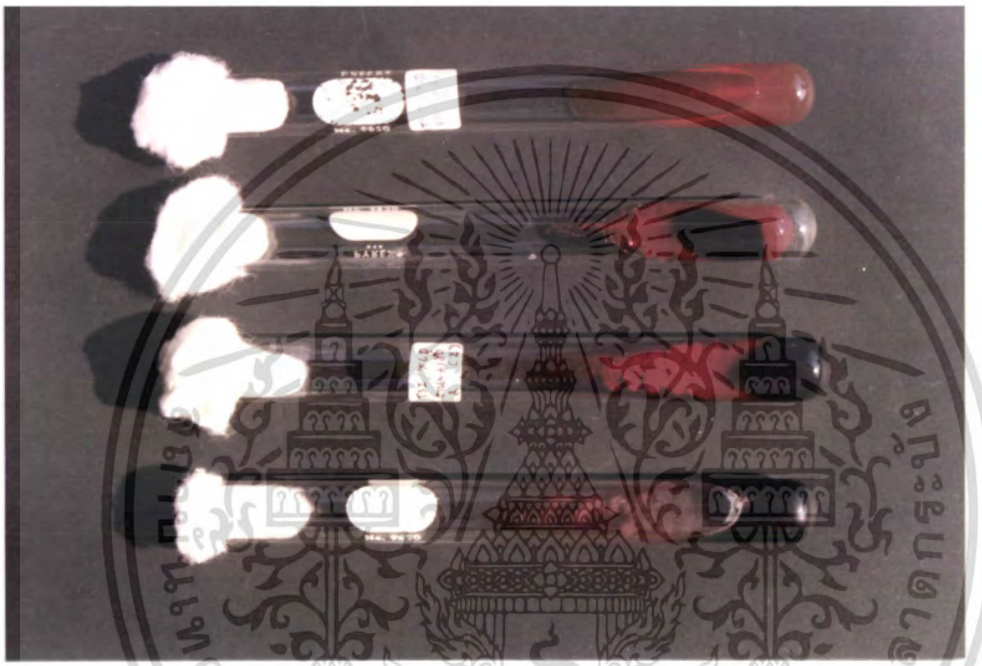


แสดงการปิเปตต์อาหาร RV broth 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Semi Solid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV) โดยหยดลง 5 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 1 หยด

ภาพที่ 22

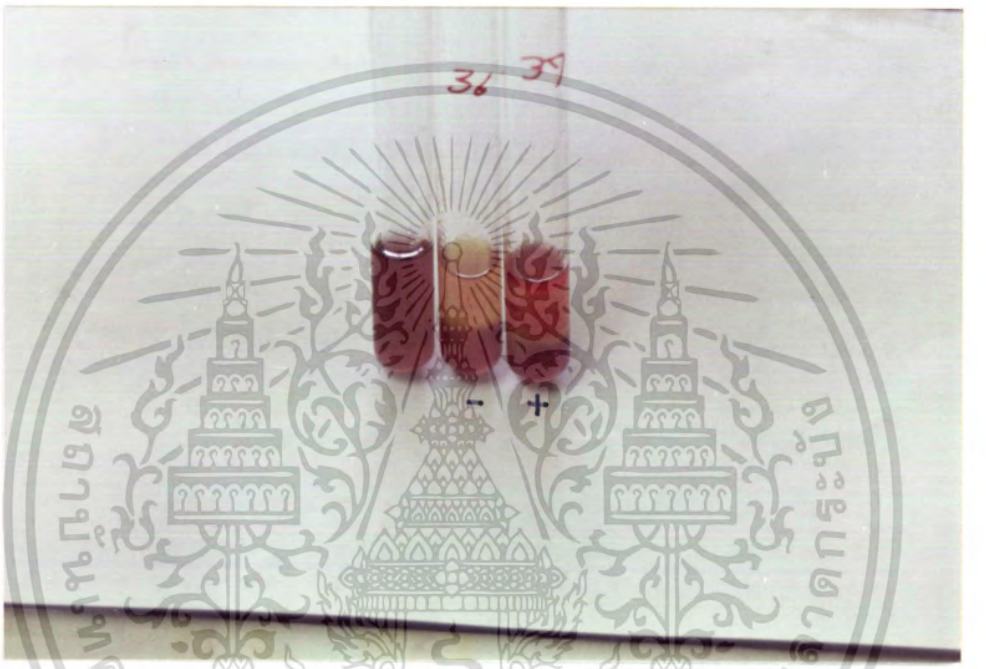
แสดงโคโลนีของ *Salmonella* บน XLD ซึ่งมีสีชมพู มีจุดดำตรงกลาง หรือมีสีแดง

ภาพที่ 23



แสดงผลการทดสอบ *Salmonella* ใน TSI หลอดที่ให้ผลบวกคือ butt acid (เกิดสีเหลืองบริเวณ butt) และ slant alkaline (เกิดสีแดงบริเวณ slant) อาจมี H_2S (สีดำ) และอาจมีก๊าซ

ภาพที่ 24



แสดงผลการทดสอบ *Salmonella* โดยใช้อาหาร LIM ให้ผลการสร้าง
อินโดลเป็นลบคือเกิดสีเหลืองไม่เกิดสีแดง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดี

1.1 ผลการเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

หลังจากการฉีดกระตุ้นกระต่ายตัวที่ 1 และ 2 โดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ในวันที่ 1 , 4 , 7 , 10 และ 13 เก็บซีรัมจากกระต่ายได้ในวันที่ 1 , 4 , 7 , 13 , 20 , 28 , 42 และ 56 นำซีรัมที่ได้ไปทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* และแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ต่อไป

1.2 ผลการเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

หลังจากการฉีดกระตุ้นกระต่ายตัวที่ 3 และ 4 โดยใช้แฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ในวันที่ 1 ,14 , 28 ,63 และ 98 และเก็บซีรัมจากกระต่ายได้ในวันที่ 1 ,14 , 28 , 41 , 55 , 63 , 76 และ 98 นำซีรัมที่ได้ไปทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* และแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ต่อไป

2. ผลการตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัม *Salmonella typhimuriium* ATCC 14028

2.1 ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนและแอนติบอดีในการทำ ELISA

2.1.1 ทดสอบ anti-whole cell serum โดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

จากการทดสอบซีรัมของกระต่ายตัวที่ 1 และ 2 เพื่อหาความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสม ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 โดยวิธี ELISA ใช้ anti-whole cell serum ของวันที่ 13 ที่ความเข้มข้นต่างๆ แอนติเจนที่ใช้คือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 -3 และ ภาพที่ 25-28

ตารางที่ 2

แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตร ในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 และ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

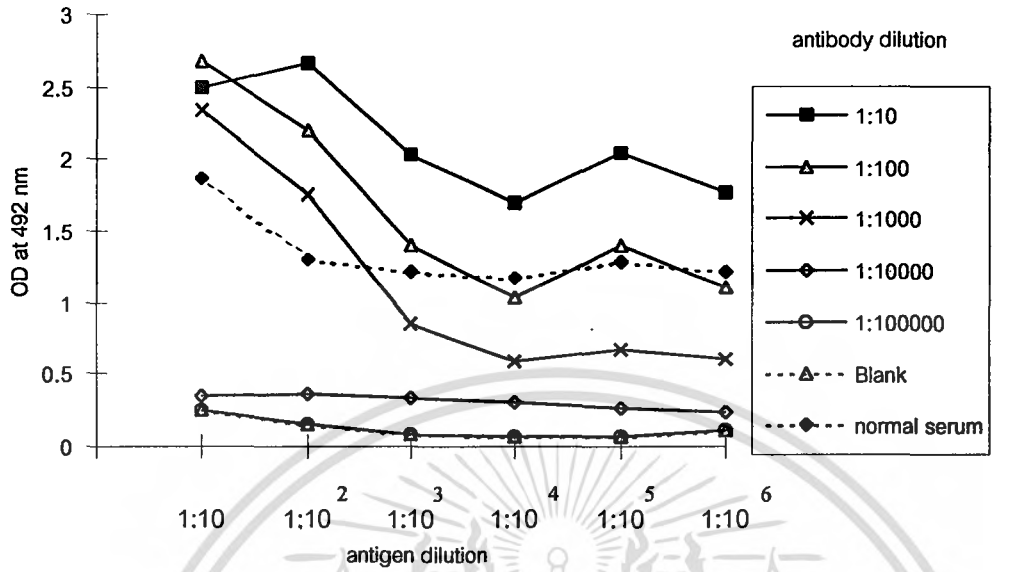
Ab \ Ag	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
1:10	2.492	2.667	2.037	1.693	2.04	1.761
1:100	2.677	2.205	1.407	1.04	1.401	1.109
1:1000	2.342	1.756	0.852	0.595	0.675	0.597
1:10000	0.344	.3630	0.334	0.314	0.27	0.242
1:100000	0.249	0.15	0.082	0.068	0.064	0.115
Blank	0.249	0.15	0.082	0.068	0.064	0.115
normal serum	1.86	1.303	1.217	1.178	1.29	1.213

ตารางที่ 3

แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตร ในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 และ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

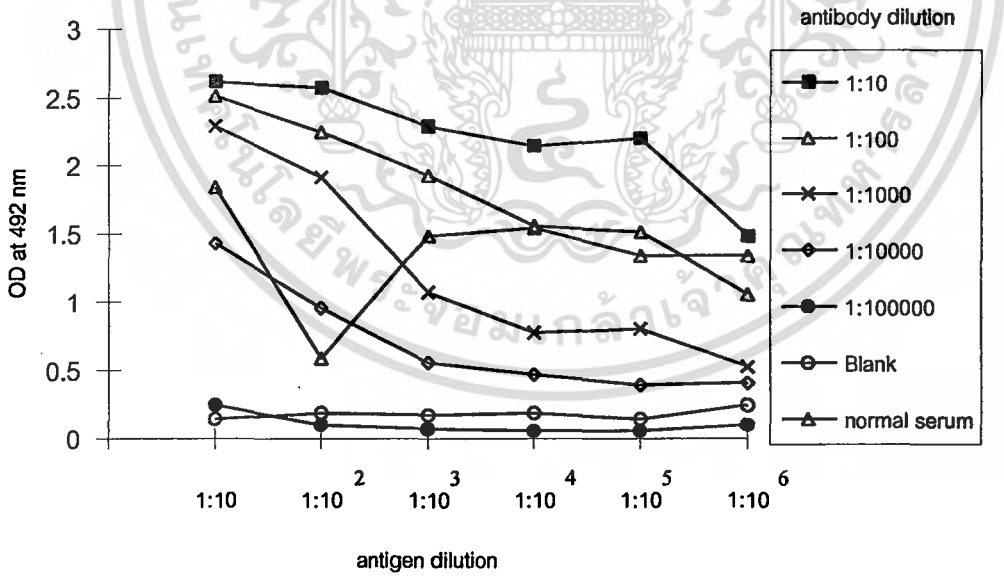
Ab \ Ag	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
1:10	2.625	2.570	2.301	2.149	2.205	1.482
1:100	2.509	2.247	1.929	1.559	1.519	1.058
1:1000	2.289	1.906	1.076	0.776	0.803	0.528
1:10000	1.426	0.955	0.554	0.464	0.39	0.417
1:100000	0.244	0.105	0.075	0.066	0.065	0.099
Blank	0.149	0.198	0.170	0.198	0.154	0.256
normal serum	1.84	0.583	1.492	1.551	1.339	1.343

ภาพที่ 25



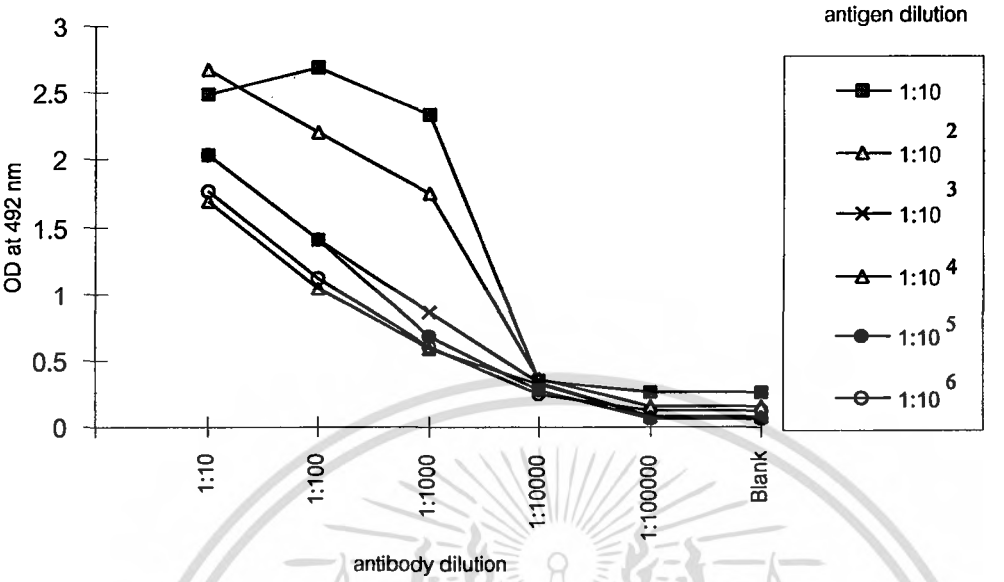
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-whole cell serum จาก กระต่ายตัวที่ 1 กับ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 26



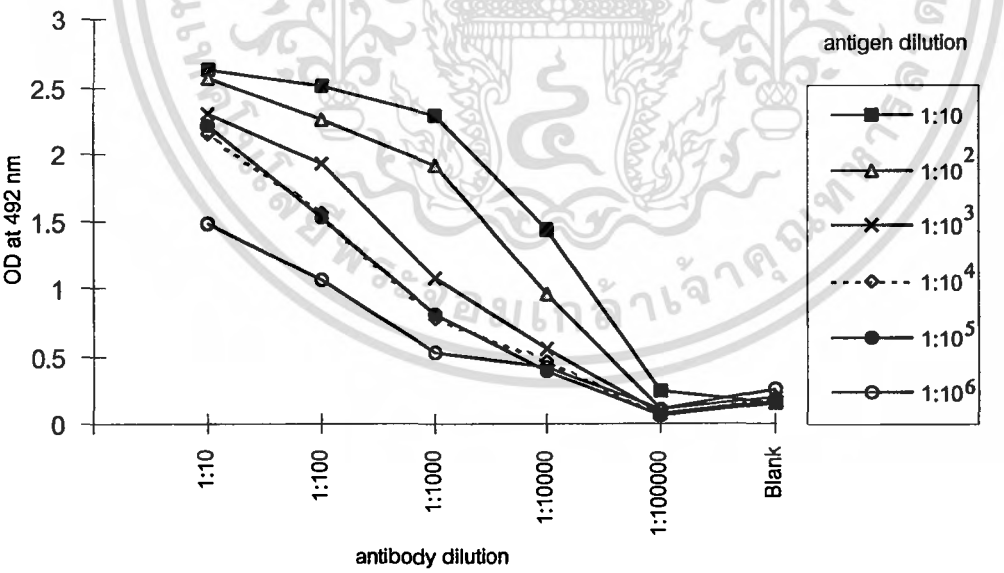
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-whole cell serum จาก กระต่ายตัวที่ 2 กับ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 27



แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ whole cell antigen กับ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 28



แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ whole cell antigen กับ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลักในการเลือกความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสม ในการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA พิจารณาจากเส้นกราฟที่ความเข้มข้นของแอนติบอดีหรือแอนติเจนต่ำๆ ซึ่งให้ผลการตรวจวัดสูงหรือให้ค่า OD สูง โดยเส้นกราฟนั้นจะต้องลดลงช้าๆ

การทดสอบ anti-whole cell serum โดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 25-28 สรุปได้ว่าแอนติบอดีที่เหมาะสมคือที่ความเจือจาง 1:1000 ที่ให้ผลการวิเคราะห์ดีที่สุด ซึ่งเส้นกราฟของ 1:1000 จะให้ผลคล้าย 1:100 แต่ถ้าใช้ความเข้มข้น 1:100 จะสิ้นเปลืองแอนติบอดี ส่วนแอนติเจนที่เหมาะสมในการศึกษา ELISA คือที่ความเจือจาง 1:10 ซึ่งความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมคือ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.1.2 ทดสอบ anti-whole cell serum โดยใช้แฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

จากการทดสอบซีรัมของกระต่ายตัวที่ 1 และ 2 เพื่อหาความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสม ในการทำ ELISA ใช้ anti-whole cell serum ของวันที่ 13 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปลี่ยนแอนติเจนจาก whole cell antigen เป็น flagella antigen โดยใช้แฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่มีปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5 สามารถพิจารณาผลการทดลองเปรียบเทียบแอนติบอดีและแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้จากภาพที่ 29 - 32

ตารางที่ 4

แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 และ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Ab \ Ag	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
1:10	*	*	*	*	*	*
1:100	*	*	*	*	2.250	1.343
1:1000	*	*	*	*	1.43	0.215
1:10000	2.741	2.907	2.515	1.391	0.559	0.184
1:100000	0.583	0.708	0.638	0.334	0.145	0.112
1:1000000	0.137	0.214	0.124	0.231	0.100	0.088
Blank	0.089	0.107	0.103	0.098	0.176	0.100
normal serum	0.132	0.166	0.274	0.286	0.275	0.282

* ค่า OD มากกว่า 3.0

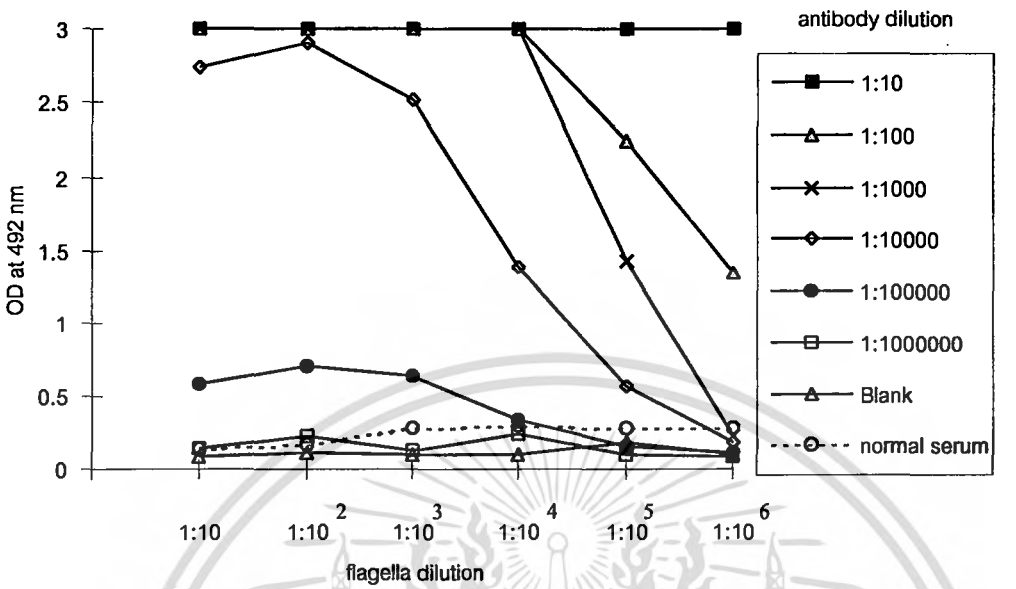
ตารางที่ 5

แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 และ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Ab \ Ag	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
1:10	*	*	*	*	2.313	1.779
1:100	*	*	*	*	1.726	0.914
1:1000	*	*	*	2.794	0.993	0.333
1:10000	2.136	2.521	2.102	0.987	0.364	0.148
1:100000	0.426	0.599	0.463	0.215	0.13	0.112
1:1000000	0.217	0.176	0.149	0.117	0.101	0.102
Blank	0.115	0.145	0.149	0.134	0.103	0.119
normal serum	0.196	0.232	0.376	0.307	0.301	0.330

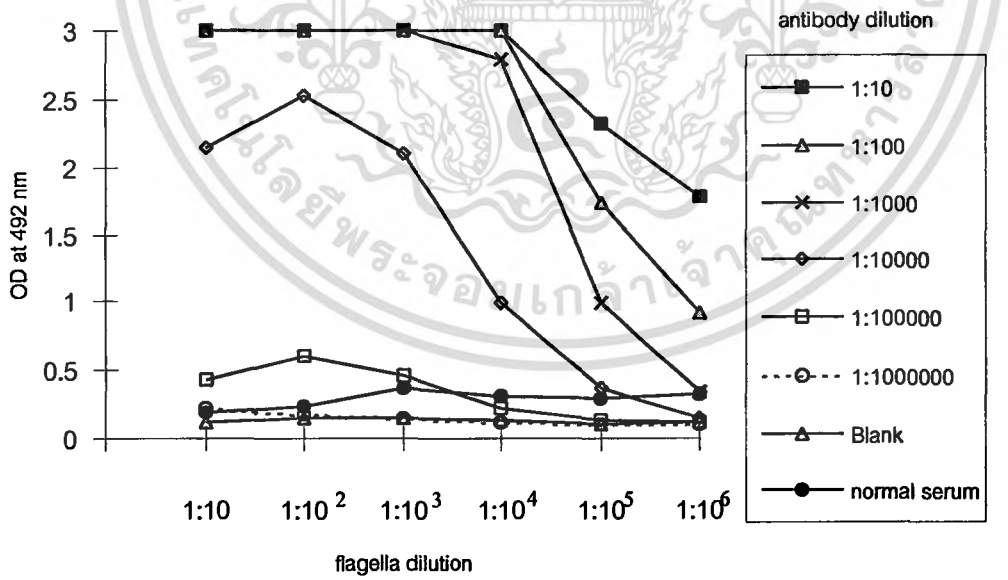
* ค่า OD มากกว่า 3.0

ภาพที่ 29



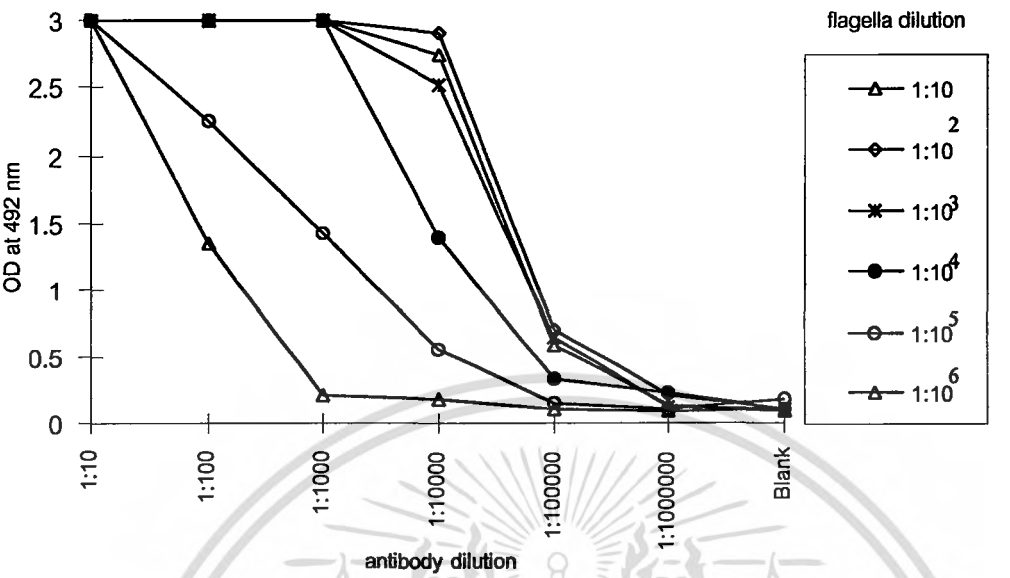
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 กับ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 30



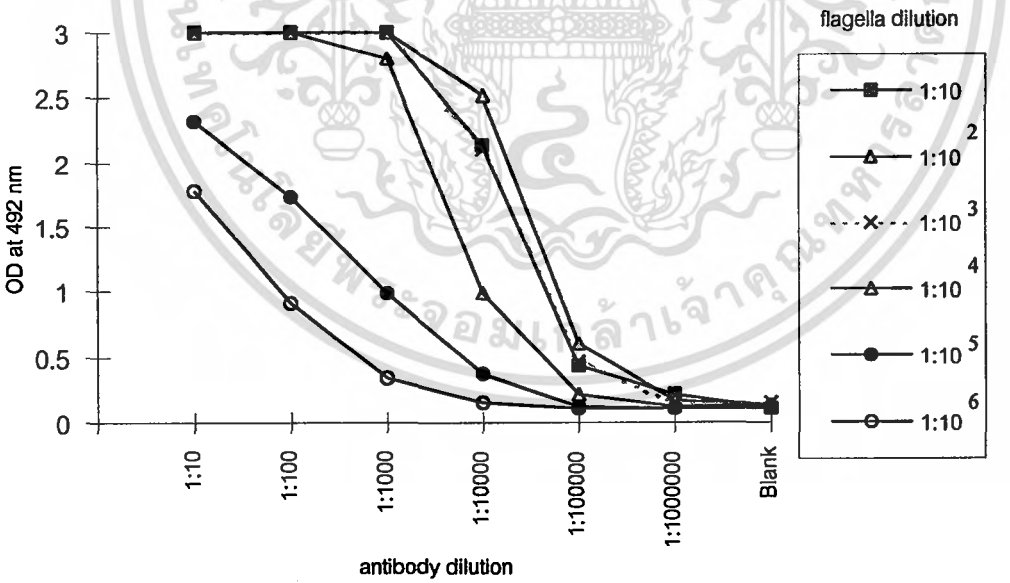
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 กับ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 31



แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ flagella antigen กับ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 32



แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ flagella antigen กับ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA โดยใช้ anti-whole cell serum ของวันที่ 13 แอนติเจนที่ใช้คือแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 จากภาพที่ 29-32 สรุปได้ว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมคือที่ความเจือจาง $1:10^4$ ให้ผลการวิเคราะห์ดีที่สุด เส้นกราฟให้ผลการตรวจวัดสูงและกราฟลดลงอย่างช้าๆ ส่วนแอนติเจนที่เหมาะสมคือที่ความเจือจาง $1:10^4$ โดยที่ dilution สูงๆ กราฟยังคงลดลงช้า

2.1.3 ทดสอบ anti-flagella serum โดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

จากการทดสอบซีรัมของกระต่ายตัวที่ 3 และ 4 เพื่อหาความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสมโดยวิธี ELISA ใช้ anti-flagella serum ของกระต่ายตัวที่ 3 และ 4 วันที่ 28 และแอนติเจนคือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 - 7 และภาพที่ 33-36

ตารางที่ 6

แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 3 และ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Ab \ Ag	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
1:10	2.983	*	2.114	1.351	0.456	0.772
1:100	2.983	1.754	0.903	0.476	0.456	0.392
1:1000	*	2.204	0.855	0.563	0.515	0.649
1:10000	2.70	0.491	0.763	0.460	0.472	0.460
1:100000	1.175	0.932	0.615	0.511	0.572	0.675
1:1000000	0.746	0.587	0.400	0.426	0.310	0.598
Blank	0.623	0.710	0.487	0.686	0.940	0.802
normal serum	1.149	0.899	0.701	0.607	0.801	0.466

* ค่า OD มากกว่า 3.0

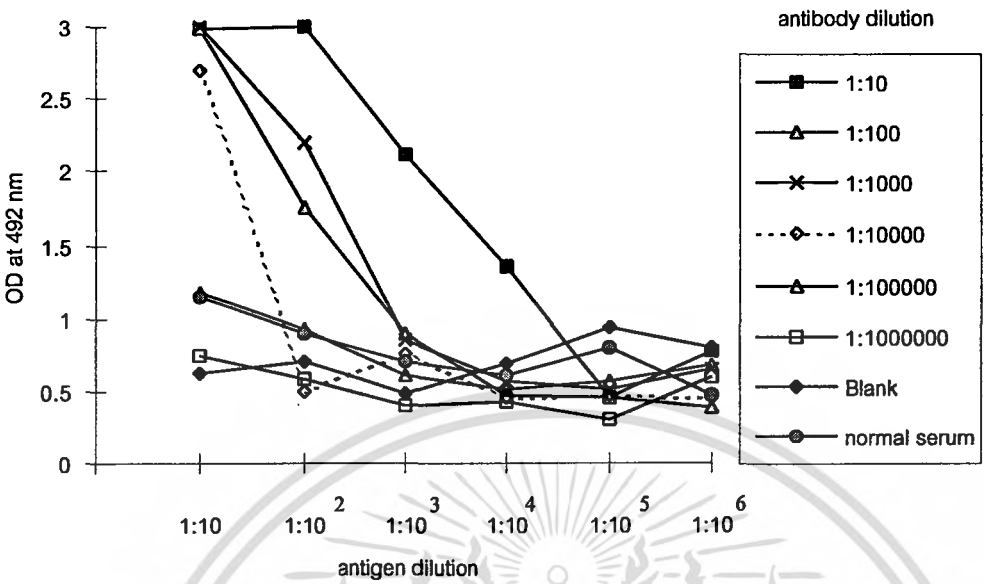
ตารางที่ 7

แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 4 และ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Ab \ Ag	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
1:10	*	*	2.755	2.001	0.456	0.821
1:100	*	2.754	1.583	0.677	0.456	0.721
1:1000	2.255	2.204	1.352	0.535	0.515	0.679
1:10000	2.170	1.941	0.988	0.474	0.472	0.652
1:100000	1.217	1.200	0.615	0.425	0.577	0.575
1:1000000	0.861	0.652	0.400	0.400	0.310	0.498
Blank	0.623	0.698	0.487	0.352	0.340	0.302
normal serum	1.880	0.955	0.651	0.524	0.501	0.466

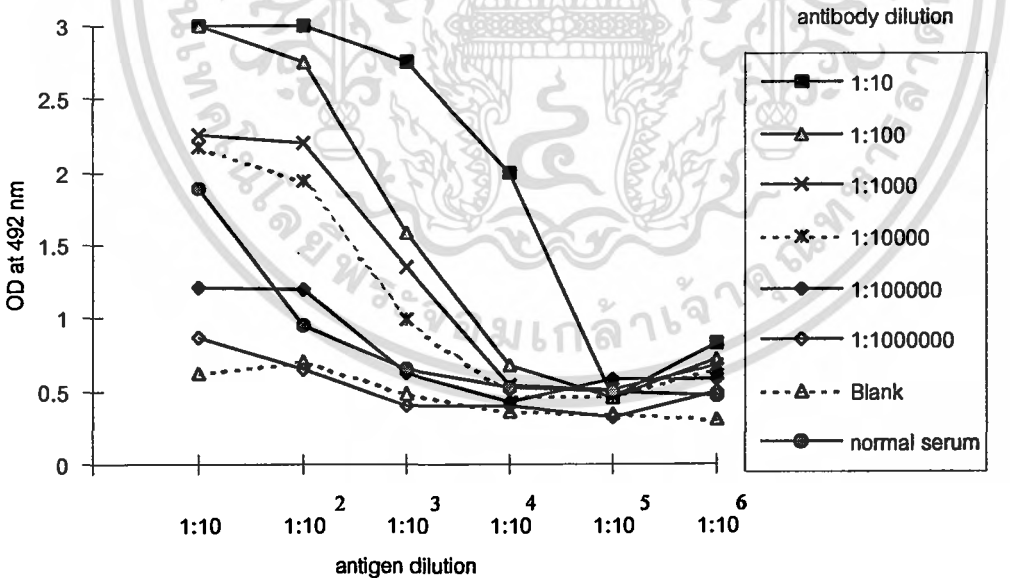
* ค่า OD มากกว่า 3.0

ภาพที่ 33



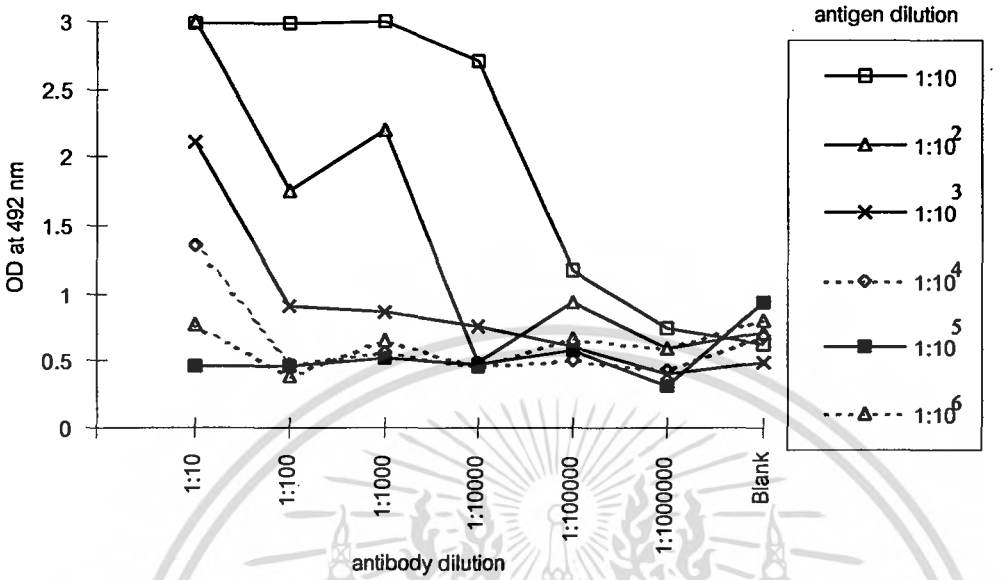
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 3 กับ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 34



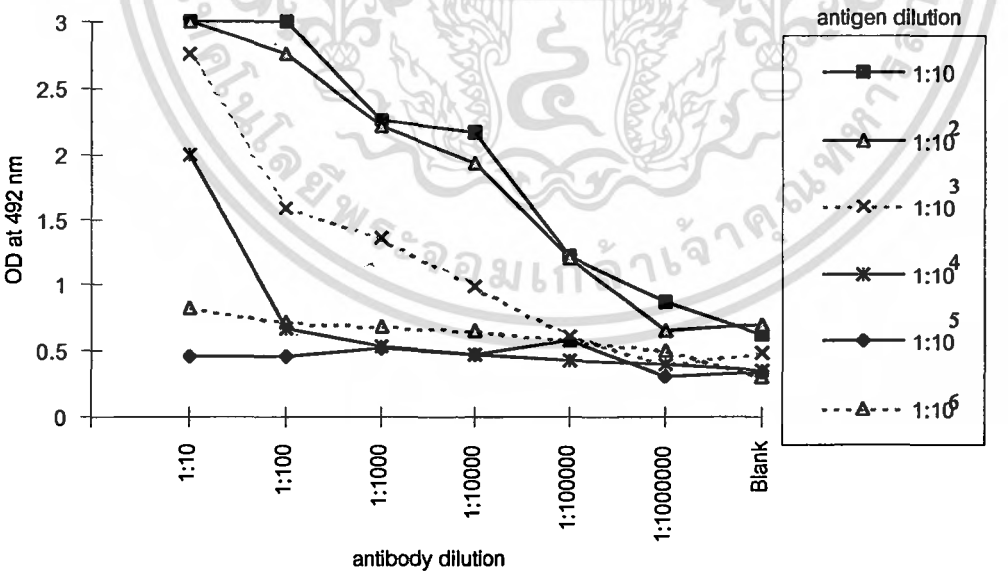
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 4 กับ whole cell antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 35



แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ whole cell antigen กับ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 36



แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ whole cell antigen กับ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA โดยใช้ anti-flagella serum ของกระต่ายตัวที่ 3 และ 4 ในวันที่ 28 แอนติเจนที่ใช้คือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 จากภาพที่ 33-36 สรุปได้ว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมคือที่ความเจือจาง $1:10^4$ ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ดีที่สุด เส้นกราฟให้ผลการตรวจวัดสูง และกราฟลดลงอย่างช้าๆ ส่วนแอนติเจนที่เหมาะสมในการศึกษา ELISA คือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเนื่องจากให้ผลการวิเคราะห์สูง

2.1.4 ทดสอบ anti-flagella serum โดยใช้แฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 เป็นแอนติเจน

จากการทดสอบซีรัมของกระต่ายตัวที่ 3 และ 4 เพื่อหาความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสมในการทำ ELISA โดยใช้ anti-flagella serum ของวันที่ 28 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปลี่ยนแอนติเจนจาก whole cell antigen เป็น flagella antigen โดยใช้แฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 - 9 และภาพที่ 37-40

ตารางที่ 8

แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 3 และ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Ab \ Ag	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
1:10	*	*	*	2.959	1.922	1.928
1:100	*	*	*	2.906	1.440	0.371
1:1000	*	*	2.209	*	0.832	0.251
1:10000	*	*	*	2.344	0.441	0.168
1:100000	2.53	2.434	1.819	0.702	0.154	0.177
1:1000000	0.891	0.796	0.526	0.266	0.043	0.138
Blank	0.254	0.326	0.246	0.127	0.147	0.126
normal serum	0.524	0.527	0.585	0.514	0.472	0.610

* ค่า OD มากกว่า 3.0

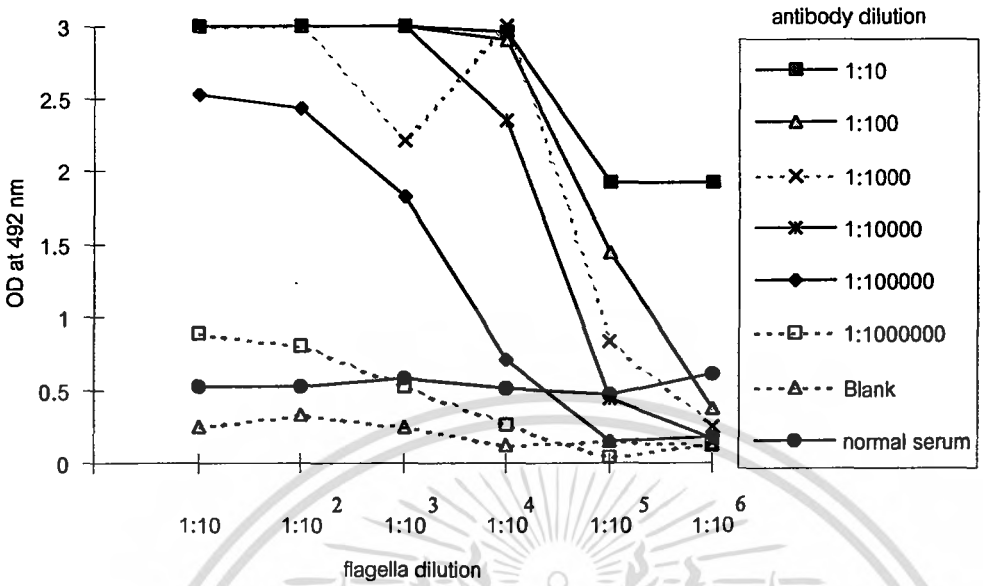
ตารางที่ 9

แสดงค่า OD ที่ 492 นาโนเมตรในปฏิกิริยา ELISA ระหว่าง anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 4 และ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Ab \ Ag	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
1:10	*	*	*	2.840	1.896	1.874
1:100	*	*	*	2.574	1.540	0.455
1:1000	*	*	2.209	2.454	0.758	0.321
1:10000	2.654	2.544	2.004	2.214	0.443	0.196
1:100000	2.487	2.323	1.741	1.110	0.175	0.152
1:1000000	0.779	0.896	0.587	0.322	0.143	0.122
Blank	0.354	0.402	0.324	0.117	0.134	0.104
normal serum	0.447	0.321	0.577	0.544	0.448	0.212

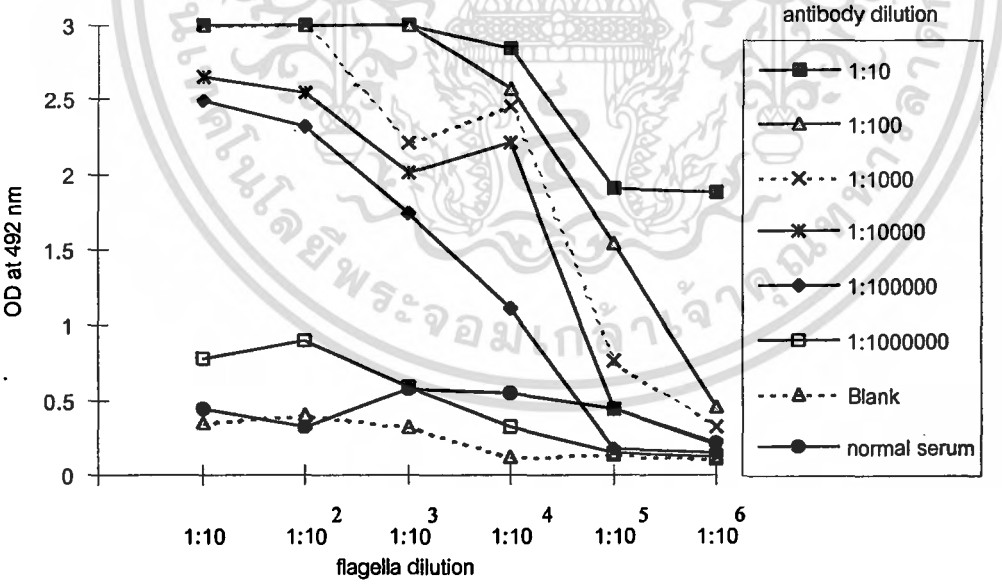
* ค่า OD มากกว่า 3.0

ภาพที่ 37



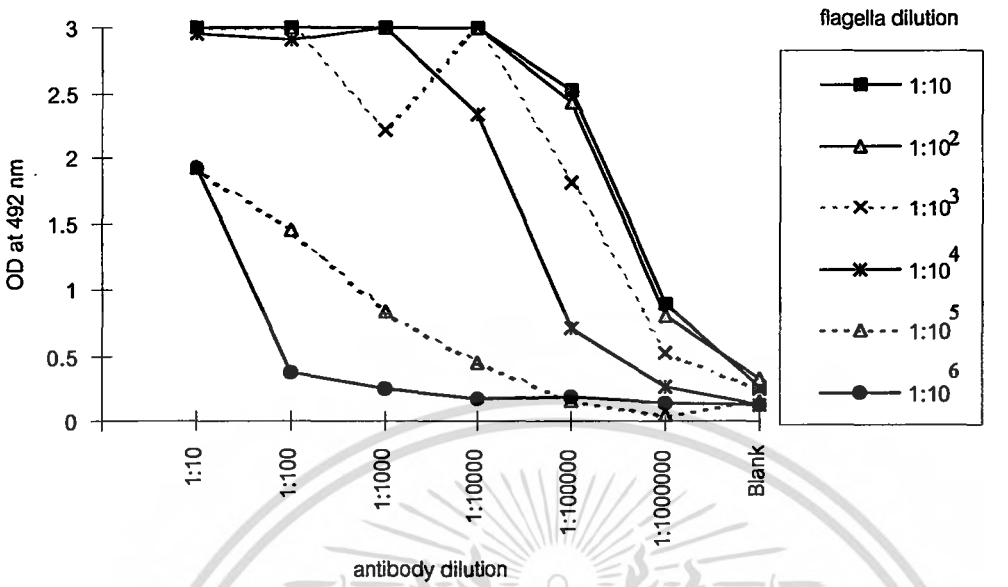
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 3 กับ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 38



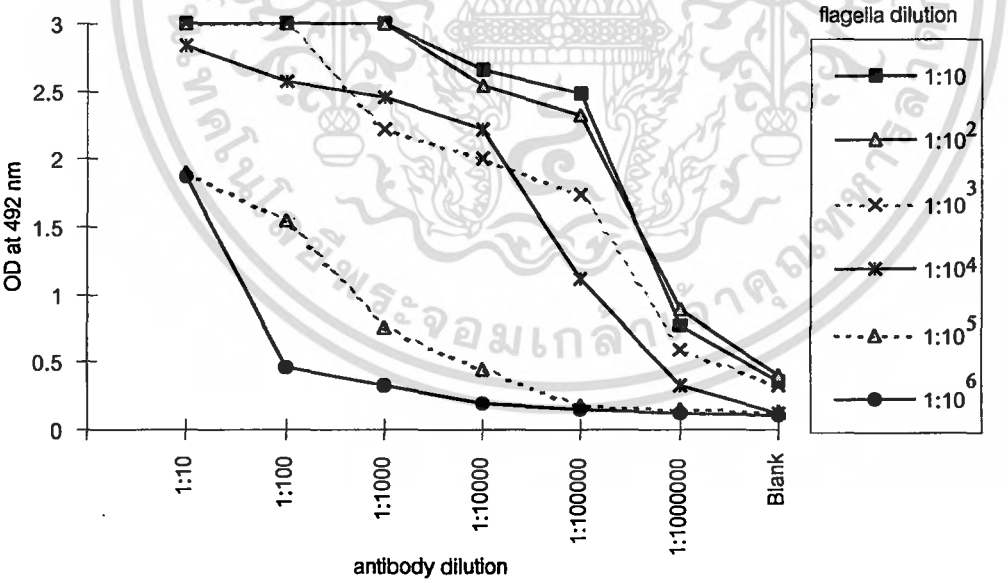
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 4 กับ flagella antigen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 39



แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ flagella antigen กับ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาพที่ 40



แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ในปฏิกิริยา ELISA ของ flagella antigen กับ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA โดยทดสอบ Anti-flagella serum ของกระต่ายตัวที่ 3 และ 4 ในวันที่ 28 แอนติเจนที่ใช้คือแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 จากภาพที่ 37-40 สรุปได้ว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมคือที่ความเจือจาง $1:10^{4}$ ให้ผลการวิเคราะห์ดีที่สุด เส้นกราฟให้ผลการตรวจวัดสูง และกราฟลดลงอย่างช้าๆ และแอนติเจนที่เหมาะสมในการศึกษา ELISA คือที่ $1:10^{4}$ เนื่องจากให้ผลการวิเคราะห์สูง ค่า OD สูงกว่า blank มาก สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA ได้ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10

แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA

anti-serum		antigen	
ชนิด	ความเข้มข้น(dilution)	ชนิด	ความเข้มข้น
anti-whole cell serum	$1:10^{3}$ $1:10^{4}$	whole cell flagella	10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เจือจาง $1:10^{4}$ (โปรตีนแฟลกเจลลาเริ่มต้น 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
anti-flagella serum	$1:10^{4}$ $1:10^{4}$	whole cell flagella	10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เจือจาง $1:10^{4}$ (โปรตีนแฟลกเจลลาเริ่มต้น 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

2.2 ผลการทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัม

2.2.1 ทดสอบหาไตเตอร์ของ anti-whole cell serum

โดยทดสอบกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 มีความเข้มข้น 10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 11 และ ภาพที่ 41 ไตเตอร์ของแอนติซีรั่มคือความเจือจางของแอนติบอดีที่มีค่า OD มากกว่า 2 เท่าของ blank

ตารางที่ 11

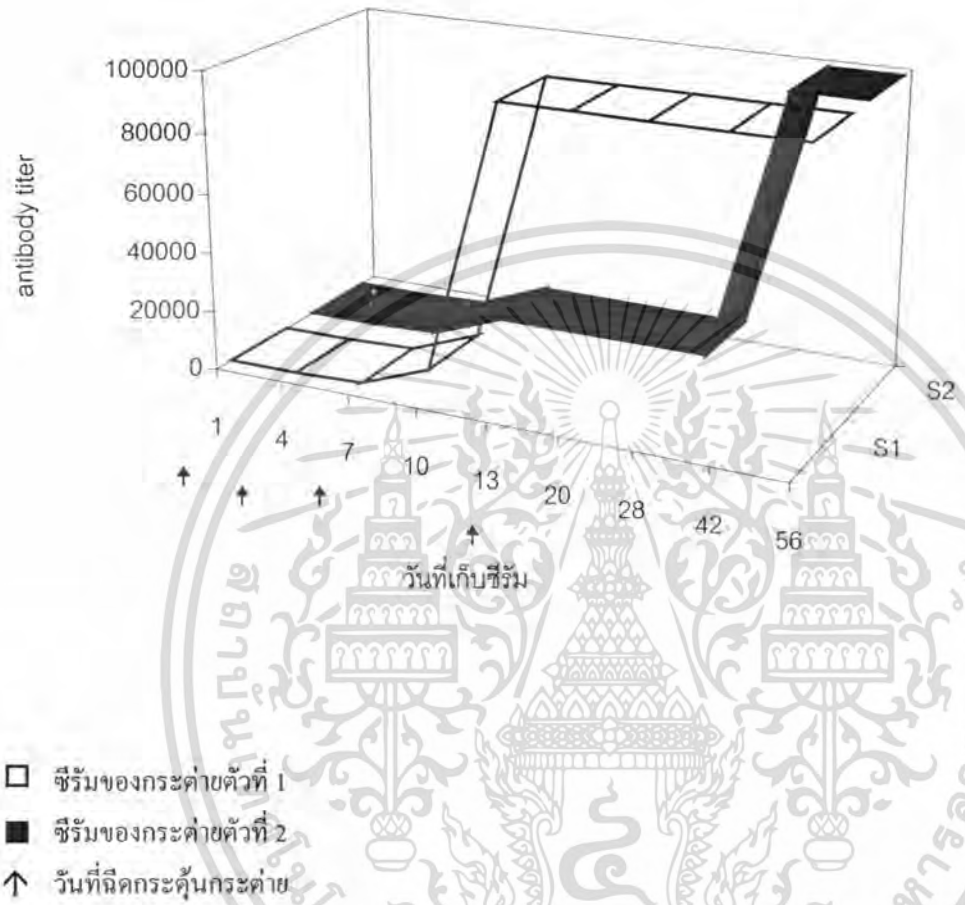
แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของ anti-whole cell serum ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 56

วันที่	แอนติบอดีไตเตอร์	
	กระต่ายตัวที่ 1	กระต่ายตัวที่ 2
1 #	100	100
4 #	100	100
7 #	1000	1000
10 #	10000	10000
13 #	100000	10000
20	100000	*
28	100000	*
42	100000	100000
56	100000	100000

* ไม่ได้ทำการเก็บซีรัมจากกระต่าย

วันที่ฉีดกระตุ้นกระต่าย

ภาพที่ 41



แสดงกราฟแอนติบอดีไตเตอร์ของ anti-whole cell serum จากกระต่ายตัวที่ 1 และ 2

จากกราฟพบว่าการสร้างแอนติบอดีจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงประมาณวันที่ 20 หลังจากนั้นจะคงที่จนถึงวันที่ 56

2.2.2 ทดสอบหาไตเตอร์ของ anti-flagella serum

โดยทดสอบกับแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ที่มีปริมาณโปรตีนของแฟลกเจลลาเริ่มต้นเท่ากับ 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการทดสอบใช้ความเจือจางที่ $1:10^4$ ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12 และภาพที่ 42

ตารางที่ 12

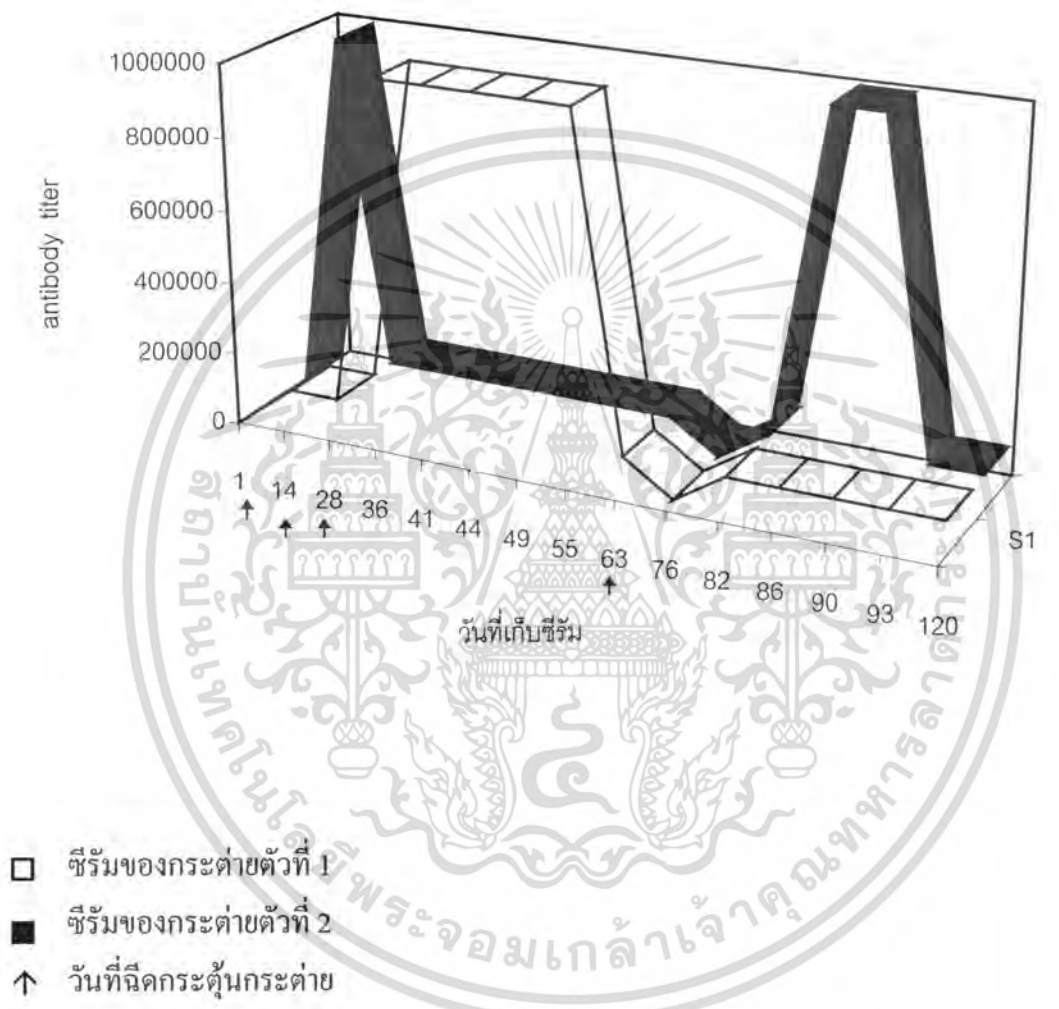
แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของ anti-flagella serum ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 120

วันที่	แอนติบอดีไตเตอร์	
	กระต่ายตัวที่ 3	กระต่ายตัวที่ 4
1 #	1000	100
14 #	100000	1000000
28 #	100000	100000
36	1000000	100000
41	1000000	*
44	1000000	*
49	*	100000
55	1000000	100000
63 #	100000	100000
76	10000	*
82	100000	*
86	*	1000000
90	100000	*
93	*	100000
120	100000	*

* ไม่ได้ทำการเก็บซีรัมจากกระต่าย

วันที่ฉีดกระตุ้นกระต่าย

ภาพที่ 42



แสดงกราฟแอนติบอดีไตเตอร์ของ anti-flagella serum จากกระต่ายตัวที่ 3 และ 4

จากกราฟพบว่าการสร้างแอนติบอดีจะมีปริมาณสูงมากประมาณวันที่ 36 และจะคงที่ระยะหนึ่งแล้วจึงลดลงอย่างช้าๆ

2.3 ผลการศึกษา cross reaction ของแอนติซีรัมที่จำเพาะกับ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยเทคนิค ELISA

ซีรัมที่ทดสอบมี 4 ชนิดคือ anti-whole cell serum , anti-flagella serum , partial purified anti-whole cell serum และ partial purified anti-flagella serum นำมาศึกษาการเกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 13-16

ตารางที่ 13

แสดงผล cross reaction ของ anti-whole cell serum กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ

เชื้อ	ความเข้มข้นของเชื้อ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
1. *Salmonella typhimurium* ATCC14028	+	+	+	+	+	+
2. *Salmonella typhimurium* S.292	+	+	+	+	+	+
3. *Salmonella typhimurium*	+	+	+	+	+	+
4. *Salmonella agona*	+	+	+	+	+	+
5. *Salmonella derby*	+	+	+	+	+	+
6. *Salmonella heidelberg*	+	+	+	+	+	+
7. *Salmonella welteverden*	+	+	+	+	+	+
8. *Salmonella orion*	+	+	+	+	+	+
9. *Salmonella* sp. S96	+	+	+	+	+	+
10. *Shigella flexneri*	+	+	+	+	+	-
11. *Shigella sonnei*	+	+	+	+	+	+
12. *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031	+	+	+	+	+	+
13. *Escherichia coli* ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
14. *Citrobacter freundii*	+	+	+	+	+	+
15. *Proteus mirabilis*	+	+	+	-	-	-
16. *Enterobacter cloacae*	+	+	+	-	-	-
17. *Bacillus subtilis* ATCC 6633	-	-	-	-	-	-
18. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P	-	-	-	-	-	-

+ , เกิดปฏิกิริยา

- , ไม่เกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 14

แสดงผล cross reaction ของ anti-flagella serum กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ

เชื้อ	ความเข้มข้นของเชื้อ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
1. *Salmonella typhimurium* ATCC14028	+	+	+	+	+	+
2. *Salmonella typhimurium* S.292	+	+	+	+	+	+
3. *Salmonella typhimurium*	+	+	+	+	+	+
4. *Salmonella agona*	+	+	+	+	+	+
5. *Salmonella derby*	+	+	+	+	+	+
6. *Salmonella heidelberg*	+	+	+	+	+	+
7. *Salmonella welteverden*	+	+	+	+	+	+
8. *Salmonella orion*	+	+	+	+	+	+
9. *Salmonella* sp. S96	+	+	+	+	+	+
10. *Shigella flexneri*	-	-	-	-	-	-
11. *Shigella sonnei*	+	+	+	-	-	-
12. *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031	+	+	+	+	+	+
13. *Escherichia coli* ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
14. *Citrobacter freundii*	+	+	-	-	-	-
15. *Proteus mirabilis*	+	+	+	-	-	-
16. *Enterobacter cloacae*	-	-	-	-	-	-
17. *Bacillus subtilis* ATCC 6633	-	-	-	-	-	-
18. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P	-	-	-	-	-	-

+ , เกิดปฏิกิริยา

- , ไม่เกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 15

แสดงผล cross reaction ของ partial purified anti-whole cell serum กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ

เชื้อ	ความเข้มข้นของเชื้อ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
1. *Salmonella typhimurium* ATCC14028	+	+	+	+	+	+
2. *Salmonella typhimurium* S.292	+	+	+	+	+	+
3. *Salmonella typhimurium*	+	+	+	+	+	+
4. *Salmonella agona*	+	+	+	+	+	+
5. *Salmonella derby*	+	+	+	+	+	+
6. *Salmonella heidelberg*	+	+	+	+	+	+
7. *Salmonella welteverden*	+	+	+	+	+	+
8. *Salmonella orion*	+	+	+	+	+	+
9. *Salmonella* sp. S96	+	+	+	+	+	+
10. *Shigella flexneri*	-	-	-	-	-	-
11. *Shigella sonnei*	+	+	+	+	-	-
12. *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031	+	+	+	-	-	-
13. *Escherichia coli* ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
14. *Citrobacter freundii*	-	-	-	-	-	-
15. *Proteus mirabilis*	-	-	-	-	-	-
16. *Enterobacter cloacae*	-	-	-	-	-	-
17. *Bacillus subtilis* ATCC 6633	-	-	-	-	-	-
18. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P	-	-	-	-	-	-

+ , เกิดปฏิกิริยา

- , ไม่เกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 16

แสดงผล cross reaction ของ partial purified anti-flagella serum กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ

เชื้อ	ความเข้มข้นของเชื้อ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
1. *Salmonella typhimurium* ATCC14028	+	+	+	+	+	+
2. *Salmonella typhimurium* S.292	+	+	+	+	+	+
3. *Salmonella typhimurium*	+	+	+	+	+	+
4. *Salmonella agona*	+	+	+	+	+	+
5. *Salmonella derby*	+	+	+	+	+	+
6. *Salmonella heidelberg*	+	+	+	+	+	+
7. *Salmonella welteverden*	+	+	+	+	+	+
8. *Salmonella orion*	+	+	+	+	+	+
9. *Salmonella* sp. S96	+	+	+	+	+	+
10. *Shigella flexneri*	-	-	-	-	-	-
11. *Shigella sonnei*	+	+	-	-	-	-
12. *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031	-	-	-	-	-	-
13. *Escherichia coli* ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
14. *Citrobacter freundii*	-	-	-	-	-	-
15. *Proteus mirabilis*	-	-	-	-	-	-
16. *Enterobacter cloacae*	-	-	-	-	-	-
17. *Bacillus subtilis* ATCC 6633	-	-	-	-	-	-
18. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P	-	-	-	-	-	-

+ , เกิดปฏิกิริยา

- , ไม่เกิดปฏิกิริยา

จากการศึกษา cross reaction ของซีรัมทั้ง 4 ชนิด คือ anti-whole cell serum , anti-flagella serum , partial purified anti-whole cell serum และ partial purified anti-flagella serum กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิค ELISA พบว่า anti-whole cell serum เกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ที่ไม่ใช่ *Salmonella* เช่น *Shigella sonnei* , *Klebsiella pneumoniae* เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ในส่วนของไลโพพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ของแบคทีเรียแกรมลบแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันน้อยมาก anti-whole cell serum จึงสามารถทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียแกรมลบอื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella* ได้ ส่วนแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* ไม่เกิดปฏิกิริยากับ anti-whole cell serum เนื่องจากคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบแตกต่างกันมาก anti-flagella serum เกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ เช่นเดียวกัน แต่เกิดปฏิกิริยาน้อยกว่า anti-whole cell serum เนื่องจาก anti-flagella serum มีความจำเพาะต่อ H-antigen ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella* ทำให้มีความจำเพาะมากกว่า anti-whole cell serum จึงเกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่คล้ายคลึงกับ *Salmonella* มาก เท่านั้น เมื่อนำแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดไปทำให้บริสุทธิ์ (partial purified) แล้ว พบว่าเกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียอื่นๆน้อยลง โดย partial purified anti-whole cell serum เกิด cross reaction น้อยกว่าanti-flagella serum ที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แต่เกิด cross reaction มากกว่า partial purified anti-flagella serum ซีรัมที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จะแยกโปรตีนอัลบูมินออกไปทำให้ซีรัมมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จึงเกิด cross reaction กับเชื้ออื่นๆ น้อยกว่าซีรัมที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร จึงเลือกใช้ partial purified anti-flagella serum เนื่องจากเกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่ *Salmonella* เพียงเชื้อเดียวคือ *Shigella sonnei* และเกิดปฏิกิริยาเมื่อแบคทีเรียมีปริมาณมากกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่เป็นปัญหาในการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร

3. ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารโดยเทคนิค ELISA เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture method)

3.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่าง

เมื่อนำตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู ไข่ผง และนม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงไป นำมาวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 17

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธี ELISA พบว่า เมื่อจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้น ค่า OD จากการวิเคราะห์จะเพิ่มขึ้น และจากการใช้แอนติบอดีที่ความเจือจางต่างๆ พบว่าแอนติบอดีที่ความเจือจาง $1:10^4$ ค่า OD ของตัวอย่างที่มีเชื้อ *Salmonella* มีค่ามากกว่าค่า OD ของตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อ 2 เท่า จึงเลือกใช้แอนติบอดีที่ $1:10^4$ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีเชื้อตามธรรมชาติในการทดลองต่อไป ส่วนแอนติบอดีที่ความเจือจาง 1:10 ถึง $1:10^3$ ค่า OD ของตัวอย่างที่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ ต่างกันมากเช่นกัน แต่การใช้แอนติบอดีที่ $1:10^4$ เป็นการประหยัดแอนติบอดีมากกว่า และไม่เลือกใช้แอนติบอดีที่ความเจือจาง $1:10^5$ เนื่องจากในตัวอย่างนม ค่า OD ของตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อกับตัวอย่างที่มีเชื้อมีค่าใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 17

แสดงผลการวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหาร โดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่าง

อาหาร	เชื้อที่เติม ** (เซลล์ต่อ25 กรัม)	ค่า OD ที่ 492 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นต่างๆของแอนติบอดี ***					จำนวนเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 หลังการบ่มใน RV broth (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
		1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	
เนื้อไก่	0	0.824	0.678	0.495	0.149	0.093	0
	2	1.576	1.242	0.660	0.577	0.437	$2.1x10^5$
	5	1.928	1.538	0.872	0.713	0.573	$1x10^6$
	12	1.895	1.822	0.939	0.746	0.648	$1.5x10^6$
	25	2.540	2.304	0.966	0.802	0.688	$3x10^7$
เนื้อหมู	0	2.088	1.674	0.823	0.359	0.122	0
	2	*	2.796	2.237	1.694	0.333	$5.5x10^6$
	4	*	*	2.631	2.200	0.535	$2x10^7$
	13	*	*	2.853	2.443	0.658	$5x10^7$
	52	*	*	*	2.826	0.765	$3.3x10^8$
ไข่ผง	0	1.103	0.848	0.753	0.172	0.100	0
	2	2.710	2.172	2.338	1.880	0.449	$5x10^6$
	4	*	2.586	2.366	2.090	0.640	$3.5x10^7$
	13	*	*	2.826	2.645	0.732	$7.2x10^7$
	52	*	*	2.860	2.763	0.933	$1.25x10^8$
นม	0	0.925	0.772	0.518	0.160	0.101	0
	2	1.612	1.198	0.982	0.357	0.137	$5x10^7$
	4	2.148	1.926	1.174	0.442	0.151	$2.5x10^8$
	13	2.559	2.364	1.415	0.509	0.162	$6x10^8$
	52	2.789	2.647	1.664	0.553	0.171	$1.5x10^9$

* ค่า OD มากกว่า 3.000 ** ปริมาณเซลล์ที่นับได้จริงจาก drop plate count

*** ใช้ partial purified anti-flagella serum ที่ความเจือจาง 1: 10^4

3.2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารที่มีเชื้ออยู่ตามธรรมชาติ

ตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู และนม จากแหล่งต่างๆ นำมาวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 18 -20

ตารางที่ 18

แสดงผลการวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างเนื้อไก่

แหล่งของตัวอย่าง	ผลการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA (ค่า OD)*	ผลการวิเคราะห์โดยวิธี culture method (serotype)**
1	- (0.447)	-
2	- (0.560)	-
3	- (0.412)	-
4	- (0.594)	-
5	- (0.699)	-
6	- (0.515)	-
7	- (0.520)	-
8	- (0.517)	-
9	- (0.652)	-
10	- (0.430)	-
11	- (0.510)	-
12	- (0.725)	-
13	- (0.673)	-
14	+ (1.436)	+ (B, C, G)
15	+ (1.374)	+ (B, C, E)
16	+ (1.165)	+ (B, C, E)
17	+ (1.175)	+ (C, E)
18	+ (1.366)	+ (B, C)
19	+ (1.198)	+ (B, C)
20	+ (1.087)	+ (E)

+ พบเชื้อ *Salmonella*

- ไม่พบเชื้อ *Salmonella*

* ค่า OD ที่ 492 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA ค่า OD ของ blank = 0.4000 ใช้ partial purified anti-flagella serum ที่ความเจือจาง 1: 10^4

** ทดสอบทางซีรัมวิทยาในปฏิกิริยา agglutination โดยใช้ polyvalent serum *Salmonella* somatic กลุ่ม A-E

ตารางที่ 19

แสดงผลการวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างเนื้อหมู

แหล่งของตัวอย่าง	ผลการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA (ค่า OD)*	ผลการวิเคราะห์โดยวิธี culture method (serotype)**
1	- (1.179)	-
2	- (1.126)	-
3	- (1.132)	-
4	- (1.013)	-
5	- (1.115)	-
6	- (1.086)	-
7	+ (1.700)	+ (E)
8	+ (1.386)	+ (C, E)
9	+ (1.284)	+ (E)
10	+ (1.332)	+ (E)
11	+ (1.831)	+ (E, I)
12	+ (1.732)	+ (E)
13	+ (1.957)	+ (C)
14	+ (1.513)	+ (B)
15	+ (1.645)	+ (B)
16	+ (1.800)	+ (E)
17	+ (1.720)	+ (E)
18	+ (1.641)	+ (E)
19	+ (1.806)	+ (E)
20	+ (1.779)	+ (E)

+ พบเชื้อ *Salmonella*

- ไม่พบเชื้อ *Salmonella*

* ค่า OD ที่ 492 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA ค่า OD ของ blank = 0.600

ใช้ partial purified anti-flagella serum ที่ความเจือจาง 1: 10^4

** ทดสอบทางซีรัมวิทยาในปฏิกิริยา agglutination โดยใช้ polyvalent serum *Salmonella* somatic กลุ่ม A-E

ตารางที่ 20

แสดงผลการวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างนม

แหล่งของตัวอย่าง	ผลการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA (ค่า OD)*	ผลการวิเคราะห์โดยวิธี culture method
1	- (0.210)	-
2	- (0.179)	-
3	- (0.128)	-
4	- (0.125)	-
5	- (0.243)	-
6	- (0.177)	-
7	- (0.225)	-
8	- (0.157)	-
9	- (0.222)	-
10	- (0.150)	-

+ พบเชื้อ *Salmonella*

- ไม่พบเชื้อ *Salmonella*

* ค่า OD ที่ 492 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA ค่า OD ของ blank = 0.125

ใช้ partial purified anti-flagella serum ที่ความเจือจาง 1: 10^4

ผลการทดสอบตัวอย่างเนื้อไก่จาก 20 แหล่ง พบเชื้อ *Salmonella* 7 แหล่ง พบ *Salmonella* กลุ่ม C มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่ม B , E และ G ตามลำดับ ในเนื้อหมู 20 แหล่งพบ *Salmonella* 14 แหล่ง พบกลุ่ม E มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่ม B และ C ส่วนกลุ่ม I พบน้อยที่สุด ตัวอย่างนม 10 แหล่ง ไม่พบเชื้อ *Salmonella* และเมื่อเปรียบเทียบวิธี ELISA กับวิธี culture method พบว่าได้ผลตรงกัน 100 % นำเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อหมูมาทดสอบสายพันธุ์โดย WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center ผลการทดสอบแสดงในภาคผนวก จ

บทที่ 5
บทสรุป

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในอาหารโดยวิธี ELISA ในงานวิจัยนี้ ทำโดยเตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีเพื่อใช้ในกระบวนการ ELISA โดยการฉีด whole cell ของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 และแฟลกเจลลาของเชื้อเข้าไปในกระต่าย ทำการกระตุ้นซ้ำและเก็บซีรัมเป็นระยะๆ นำซีรัมที่ได้มาทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมในการทำ ELISA เมื่อทดสอบ anti-whole cell serum โดยใช้ซีรัมของกระต่ายตัวที่ 1 และ 2 ในวันที่ 13 หลังการฉีดเชื้อครั้งแรก และใช้แอนติเจนคือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 พบว่าความเข้มข้นแอนติเจน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นของแอนติบอดีคือ 1:1000 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ โดยพิจารณาจากเส้นกราฟที่ความเข้มข้นต่ำๆ ซึ่งให้ผลการตรวจวัดสูง(ค่า OD สูง) และเส้นกราฟนั้นจะลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเปลี่ยนไปใช้แอนติเจนคือแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ปริมาณโปรตีนของแฟลกเจลลาเริ่มต้นคือ 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ $1:10^4$ และความเข้มข้นของแอนติเจนที่ $1:10^4$ เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ

เมื่อทดสอบ anti-flagella serum โดยใช้ซีรัมของกระต่ายตัวที่ 3 และ 4 ในวันที่ 28 หลังการฉีดเชื้อครั้งแรก และใช้แอนติเจนคือเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 พบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำ ELISA คือ $1:10^4$ และแอนติเจนความเข้มข้นของเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรให้ผลการวิเคราะห์ดีที่สุด เมื่อเปลี่ยนไปใช้แอนติเจนคือแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 พบว่าความเข้มข้นแอนติบอดี $1:10^4$ และความเข้มข้นของแอนติเจนคือ $1:10^4$ เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบโดยวิธี ELISA

จากค่าที่ได้นำมาใช้ในการทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ทดสอบ anti-whole cell serum กับเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ความเข้มข้นของเชื้อ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณแอนติบอดีในซีรัมมีปริมาณสูงสุดประมาณวันที่ 20 นับจากวันแรกที่เริ่มฉีดเชื้อเข้าไปในกระต่ายและปริมาณแอนติบอดีจะคงที่ระยะหนึ่งจนถึงวันที่ 56 หลังจากวันที่ 56 ปริมาณแอนติบอดีจะลดลงอย่างช้าๆ ทดสอบ anti flagella serum กับแฟลกเจลลาของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ปริมาณโปรตีนของแฟลกเจลลาเริ่มต้นเท่ากับ 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ที่ความเจือจาง $1:10^4$ พบว่าปริมาณแอนติบอดีในซีรัมมีปริมาณสูงมาก

ประมาณวันที่ 36 นับจากวันแรกที่เริ่มฉีด และปริมาณแอนติบอดีจะคงที่ระยะหนึ่งแล้วจึงลดลงอย่างช้าๆ

เมื่อนำซีรัมที่ได้ทั้ง 2 ชนิด มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนกับ ammonium sulfate จากการศึกษา cross reaction ของซีรัมทั้ง 4 ชนิด คือ anti-whole cell serum , anti-flagella serum ,partial purified anti-whole cell serum และ partial purified anti-flagella serum กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิค ELISA พบว่า anti-whole cell serum เกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ที่ไม่ใช่ *Salmonella* เช่น *Shigella sonnei* และ *Klebsiella pneumoniae* แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียแกรมบวก สำหรับ anti-flagella serum เกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ เช่นเดียวกัน แต่เกิดปฏิกิริยาน้อยกว่า anti-whole cell serum เมื่อนำแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดไปทำให้บริสุทธิ์ (partial purified) แล้ว พบว่าเกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียอื่นๆน้อยลง ดังนั้นจึงเลือก partial purified anti-flagella serum มาใช้ทดสอบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู ไข่ผง และนม โดยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับวิธี culture method โดยเก็บตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อหมู และ จากแหล่งต่างๆ 20 แหล่ง และนม 10 ชนิด ส่วนไข่ผงทำการทดสอบเฉพาะการเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่าง ผลการทดสอบตัวอย่างเนื้อไก่จาก 20 แหล่ง พบเชื้อ *Salmonella* 7 แหล่ง พบ *Salmonella* กลุ่ม C มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่ม B , E และ G ตามลำดับ ในเนื้อหมู 20 แหล่งพบ *Salmonella* 14 แหล่ง พบกลุ่ม E มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่ม B และ C ส่วนกลุ่ม I พบน้อยที่สุด ตัวอย่างนม 10 แหล่ง ไม่พบเชื้อ *Salmonella* เปรียบเทียบวิธี ELISA กับวิธี culture method พบว่าได้ผลตรงกัน

Sensitivity ของวิธี ELISA

จากการวิเคราะห์โดยเติมเชื้อที่ทราบจำนวนลงไปในตัวอย่าง แล้วทำการตรวจหาโดยวิธี ELISA และ วิธี culture method พบว่าทั้งสองวิธีสามารถตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ได้แม้ว่าจะมีเชื้ออยู่ในระดับต่ำ (1-5 cfu/25g)

Specificity ของวิธี ELISA

จากการทดสอบ cross reaction ของ partial purified anti-flagella serum กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ พบว่าเกิด crooss reaction น้อยมาก ดังนั้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารเชื้ออื่นๆจึงไม่มีผลต่อการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA

การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธี ELISA ตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหาร BPW จนเสร็จสิ้นการวิเคราะห์ใช้เวลาเร็วกว่าวิธี culture method 2 วัน และในการวิเคราะห์แต่ละครั้งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก สามารถลดปริมาณงาน และค่าใช้จ่ายในการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สะดวกและรวดเร็วกว่าวิธี culture method ซึ่งได้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการดัดแปลงวิธีมาจากวิธีของ Prusak-Sochaczewski (1989) โดยใช้โพลีโคลนัลแอนติบอดีในการตรวจเชื้อ *Salmonella* ซึ่งพบว่ามีความไวสูง ถูกต้อง เชื่อถือได้ ใช้เวลาน้อย และเมื่อเปรียบเทียบวิธี ELISA กับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าทั้งสองวิธีมีผลตรงกัน 100 % ใกล้เคียงกับการทดลองของ Eckner และคณะในปี ค.ศ. 1992 และปี ค.ศ. 1994

บรรณานุกรม

ปรีดา ชัยศิริ " การประยุกต์ใช้เทคนิค ELISA ในด้านต่างๆ " วารสารวิทยาศาสตร์ ปีที่ 41 ฉบับที่ 7 (กรกฎาคม 2530) 354-361

มหิดล , มหาวิทยาลัย คณะเภสัชศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2531. เภสัชจุลชีววิทยา. ครั้งที่ 1. ภาคจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.หน้า.109-136.

Anderson , J.M. and Hartman , P.A. "Direct Immunoassay for Detection of *Salmonella* in Foods and Feeds." App. Env. Microbiol. , 49 (1985) PP.1124-1127

Eckner , K.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 Protect. , 55 (1992) PP.758-762

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

Engvall , E. and Perlmann , P. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G." Immunochemistry , 8 (1971) PP. 871-874

Engvall , E. and Perlmann , P. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). III Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labelled Anti-Immunoglobulin in Antigen Coated Tubes." J. Immunol. , 109 (1972) PP.129-135

Felix , A. , Krikorian , K.S. and Reither , R. "The Occurrence of Typhoid Bacilli Containing Vi Antigen in Cases of Typhoid Fever and of Vi Antibody in Their Sera." J. Hyg (Lond). , 35 (1935) PP.421-427

Flint , S.H. and Hartley , N.J. "Evaluation of the TECRA Immunocapture ELISA for the Detection of *Salmonella typhi* in Foods." Lett. App. Microbiol. , 67 (1993) PP.4-6

Goodman , J.W. 1984. Basic and Clinical Immunology. Stites , D.P. , Stobo , J.D. , Fudenberg , H.H. and Wells , J.V. eds. 5th ed. , Lange Medical Publications , U.S.A.

Herscowitz , I.H. 1979. Immunology Basic Processes. (Bellanti , J.A. ed.) W.B. Saunders Company , Philadelphia

Ibrahim , G.F. and others. " Method for the Isolation of Highly Purified *Salmonella* Flagellins. " J. Clin. Microbiol. , 22 (1985) PP.1040-1044

Kelsoe , G. and Weller , T.H. "Immunodiagonosis of Infection with *Schistosoma mansoni* : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibody to Circulating Antigen." Proceedings of the National Academy of Sciences , U.S.A. 75 (1978) PP.5715-5717

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

Kurstak , E. "Progress in Enzyme Immunoassay : Production of Reagents Experimental Design and Interpretation." Bulletin of the World Health Oganization. , 63 (1985) PP.793-811

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

Lee , A.H. and others. " Further Studies on the Feasibility of One-Day *Salmonella* Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay " App. Env. Microbiol. 59 (1993) PP.1383-1390

Makela , P.H. and others. " Role of O Antigen (Lipopolysaccharide) Factors in the Virulence of *Salmonella* " J. Inf. Dis. , 28 (1973) PP.581-585

Mattingly , J.A. "An Enzyme Immunoassay for the Detection of All *Salmonella* Using a Combination of a Myeloma Protein and a Hybridoma Antibody " J. Immunol. Met. , 73 (1984) PP.147-156

Milstein , C. " Monoclonal Antibodies " Scientific American. , 4 (1980) PP.66-74

Minnich , S.A. Hartman , P.A. and Heimsch , R.C. " Enzyme Immunoassay for Detection of *Salmonella* in Foods." App. Env. Microbiol. , 1 (1981) PP.877-883

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

Robinson , B.J. , Pretzman , C.I. and Mattingly , J.A. "Enzyme Immunoassay in which a Myeloma Protein is Used for Detection of *Salmonella* " App. Env. Microbiol. , 45 (1983) PP.1816-1821

Roitt , I. Brostoff , J. and Male , D. 1987. Immunology . Gower Medical Publishing LTD. , London

Schuurs , A.H.W. and Van Weeman , B.K. "Enzyme Immunoassay." Clin. Chem. Acta. 81 (1977) PP.1-40

Silverman , M. and Simon , M. "Bacterial Flagella" Ann. Rev. Microbiol. 31 (1977) PP.397-419

Steward , M.W. 1984. Antibodies:Their Structure and Fuction. Brammar ,W.J. and Edidin , M eds. Arrowsmith LTD. , Bristol.

Stoker , R.P. , Cordwell , A. and Thompson , R.A. "A Simple , Rapid ELISA Method for the Detection of DNA Antibodies" J. Clin. Patho. 35 (1982) PP.566-573

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

Szewczyk , B. and Taylor , A. " Immunochemical Properties of Vi Antigen From *Salmonella typhi* TY2:Presence of Two Antigenic Determinants" Infect Immun. 29 (1980) PP.539-544

Van Weeman , B.K. and Schuurs , A.H.W.M. " Immunoassay Using Antigen Conjugates." FEMS Letts. 15 (1971) PP.232-235

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

Vassilidis , P. "The Rappaport-Vassilidis (RV) Enrichment Medium for the Isolation of *Salmonellas* : An Overview." J. App. Bacteriol. 54 (1982) 69-76

Walker , J.M. 1987. Techniques in Molecular Biology John , M. and Gaastra , eds. Croom , London

Wreghitt , T.G. and Morgan-Capner , P. 1990. ELISA in the Clinical Microbiology Laboratory. Public Health Laboratory Service , London

ภาคผนวก ก

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

ละลายส่วนผสมต่างๆในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่ขวดๆละ 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
$MgCl_2.6H_2O$	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

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

4. Rappaport-Vassiliadis Medium (RV)

ประกอบด้วย สารละลาย 3 ชนิด คือ

<u>สารละลาย A</u>

Tryptone (Difco)	5	กรัม
Sodium chloride	8	กรัม
KH_2PO_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. จะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,110 มล. บรรจุใส่หลอดทดลองนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

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

7. Kovacs' reagent

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

นำ aldehyde ละลายในแอลกอฮอล์ และค่อยๆเติมกรด ไม่ควรใช้แอลกอฮอล์ที่เริ่มมีสีน้ำตาลแก่ รีเอเจนต์นี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิห้อง และมีสีค่อนข้างจาง ควรเตรียมปริมาณน้อยๆ และควรเก็บไว้ในตู้เย็น

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 กรัมต่อ 500 มิลลิลิตร)

3. blocking solution

3% gelatin in PBS-Tween (15 กรัมต่อ 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

ภาคผนวก ค

การทดสอบโดยใช้ Triple Sugar Iron (TSI) agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSI ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง โดยใช้ความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาลกลูโคส แล็กโทส และซูโครส ทำให้เกิดกรดและอาจเกิดก๊าซ เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการให้ H_2S ด้วย

TSI agar ประกอบด้วยโปรตีน โซเดียมคลอไรด์ น้ำตาลแล็กโทส น้ำตาลซูโครส แหล่งซัลเฟอร์ อินดิเคเตอร์ และวุ้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีปริมาณน้ำตาลแล็กโทสและน้ำตาลซูโครส เป็น 10 เท่าของน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพที่ไม่มีอากาศ โดยกระบวนการหายใจ จะให้ผลผลิตเป็นกรด สังเกตได้โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง และจะเห็นสีเหลืองบริเวณก้นหลอดมากกว่าบริเวณผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียที่เจริญบน TSI สามารถให้ผลผลิตเป็นด่างจากการใช้เพปโทน โดยวิธี oxidative decarboxylation ทำให้เห็นอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่สัมผัสกับอากาศ (slant) เปลี่ยนเป็นสีแดง ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแล็กโทสและน้ำตาลซูโครสจะเห็นบนผิววุ้นหรือหน้าวุ้นเป็นสีแดง และสร้างกรด (สีเหลือง) ที่ก้นหลอด หลังบ่มเชื้อ 24 ชม.

สำหรับแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลแล็กโทสหรือน้ำตาลซูโครส (หรือทั้ง 2 อย่าง) รวมทั้งน้ำตาลกลูโคส จะให้ปริมาณกรดมาก ถึงแม้จะเกิด oxidative deamination ซึ่งให้แอมโมเนียที่มีคุณสมบัติทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นด่าง แต่ไม่เพียงพอที่จะเปลี่ยนพีเอช จึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรดจากการหมักน้ำตาลดังกล่าว ดังนั้นแบคทีเรียที่ผลิตกรดทั้งบนผิววุ้น และก้นหลอด จะไม่สามารถบอกได้ว่ามีการหมักน้ำตาลแล็กโทสหรือน้ำตาลซูโครส หรือทั้ง 2 ชนิด

สำหรับการผลิต CO_2 และ H_2S สังเกตได้จากรอยแตกหรือฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ เกิดจากกระบวนการรีดักชันของ thiosulfate ก๊าซ H_2S นี้ไม่มีสี สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี ferric ammonium sulfate (อินดิเคเตอร์) โดยที่เมื่อก๊าซนี้รวมตัวกับเฟอร์ริกไอออน จะเกิดตะกอนสีดำเรียกเฟอร์รัสซัลไฟด์ (ferrous sulfide) และกระบวนการรีดักชันดังกล่าวเกิดขึ้นเฉพาะในสภาพที่เป็นกรดเท่านั้น และมักเกิดบริเวณก้นหลอด

การทดสอบ : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยการใช้เข็มเพาะเชื้อ (streak) บนหน้าวุ้นของ TSI agar ให้ทั่วและแทง (stab) ปลายเข็มที่ใช้เพาะเชื้อในตอนแรกลงลึกประมาณ 2 ใน 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงก้นหลอด บ่มที่ 37 °ซ. 18-24 ชม.

การอ่านผล : 1. ผลการหมักน้ำตาลต่างๆ

1.1 ถ้าแบคทีเรียสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว บนผิววุ้น (slant) ที่มีสีแดงส้ม (สีของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะเปลี่ยนไปเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอด (butt) จะเปลี่ยนจากสีแดงส้มเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) หรืออ่านผลว่า K/A

1.2 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยทั้งน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแล็กโทส หรือสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลซูโครส หรือสามารถหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ทั้งบนผิว (slant) และที่ก้น (butt) ของหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีแดงส้มเป็นสีเหลืองทั้งหลอด หรืออ่านว่า A/A

1.3 ถ้าแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดๆ เลย มีอยู่ 3 แบบ คือ N/N , K/N , K/K (N: ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ K: เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม)

2. การเกิดก๊าซ จะเห็นเป็นรอยแตกหรือสังเกตเห็นฟองอากาศ

3. การเกิดก๊าซ H_2S จะเห็นเป็นสีดำของตะกอนเฟอร์รัสซัลไฟด์อยู่ที่ก้นหลอด

ภาคผนวก ง

การทดสอบกับ Lysine Indole Motility medium (LIM)

แบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วน คือ

1. การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test) เป็นการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ เนื่องจากเชื้อที่มีแฟลกเจลลาสามารถเคลื่อนที่ได้จากบริเวณเดิม ไปยังบริเวณใหม่และเกิดการเจริญ แบ่งตัว ในบริเวณใหม่นั้นต่อไป ดังนั้นการทดสอบในอาหาร LIM จะเห็นลักษณะการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างชัดเจน

การทดสอบ : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM โดยแทง (stab) ตรงๆ เพียงครั้งเดียว ประมาณ 2-3 ของส่วนสูงของอาหาร บ่ม 37 ° ซ. 18-24 ชม. อ่านผล ถ้ายังให้ผลลบ บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 1-2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ

การอ่านผล : ผลบวกจะเห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอยแทงหรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอยแทงแต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม ส่วนผลลบจะเห็นการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจนที่บริเวณรอยแทง โดยเห็นขอบของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจน แม้จะบ่มต่อไปอีก 2 สัปดาห์ ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

2. การทดสอบ Lysine ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการดึง CO_2 ออกจากกรดอะมิโน โดยอาศัยเอนไซม์ decarboxylase ช่วยทำให้กรดอะมิโนมีขนาดเล็กลง เกิดเอมีน (amine) และก๊าซ CO_2 ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นด่างเพิ่มขึ้น อินดิเคเตอร์คือ bromcresol purple ซึ่งมีสีเหลืองในสภาพกรด และมีสีม่วงในสภาพด่าง แบคทีเรียที่นำมาเพาะเลี้ยงใน LIM นี้ต้องเป็นแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส โดยแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคสจะผลิตกรด เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เป็นสีเหลืองที่ก้นหลอดเท่านั้น เพราะเป็นสภาพที่ไม่มีอากาศ และปริมาณกรดที่ผลิตมีปริมาณไม่มากพอที่จะแผ่ขยายเต็มหลอด

แบคทีเรียบางชนิดผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase ทำให้สามารถที่จะดึงก๊าซ CO_2 ออกจากกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ให้ผลผลิตเป็นสารคาดาเวอร์รีน (cadaverine) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่าง

ทำให้กรดที่ผลิตจากการหมักกลูโคสถูกทำให้เป็นกลางทำให้ก้นหลอดเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วง

แบคทีเรียบางชนิดผลิตเอนไซม์ lysine deaminase ที่สามารถดึงกลุ่มอะมิโนออกจากไลซีน ในสภาวะที่มี O_2 กลุ่มอะมิโนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียและปล่อยออกนอกเซลล์ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่สัมผัสกับอากาศเปลี่ยนเป็นสีแดง สาเหตุที่เป็นสีแดงนั้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ lysine deaminase และผลจากการเป็นด่างจากการปลดปล่อยแอมโมเนีย ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีสีม่วง แต่อินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีส้ม ดังนั้นสีแดงที่เกิดขึ้นจึงเป็นผลจากการผสมของสีม่วงและสีส้ม

แบคทีเรียบางชนิดสามารถให้ก๊าซ H_2S จากโซเดียมไทโอซัลเฟต เมื่อ H_2S ทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริกไอออน (ferric ion) ของสารประกอบเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต (ferric ammonium citrate) ให้ผลผลิตเป็นเฟอร์รัสซัลไฟด์ (ferrous sulfide) ซึ่งเป็นสารประกอบสีดำ จึงเกิดสีดำขึ้นทั้งหลอด

การทดสอบ : เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร LIM โดยการแทงเชื้อลงไปตรงๆ ในอาหารถึงกลางหลอด บ่มที่ 35°ซ. เป็นเวลา 18-24 ชม. แล้วอ่านผล

การอ่านผล : 1. สีเหลือง (butt) : ไม่มีการผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase และ lysine deaminase

2. สีม่วง : มีการผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ lysine deaminase

3. สีแดง : มีการผลิตเอนไซม์ lysine deaminase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase

4. สีดำทั้งหลอด มีการผลิตก๊าซ H_2S

3. การทดสอบ Indole เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต indole จากทริปโตแฟน (tryptophan) โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อ Indole broth ประกอบด้วย tryptophan rich peptone และ NaCl เมื่อ ทริปโตแฟนในเพปโทนถูกออกซิไดส์โดยแบคทีเรียให้ indole , skatole และ indoleacetic acid (โดยเอนไซม์ tryptophanase) ซึ่งสามารถตรวจสอบผลที่ได้โดยใช้ alcoholic p-dimethylaminobenzaldehyde โดย indole จะทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ให้ผลผลิตเป็นสีแดงในส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ (alcoholic layer)

ปัจจุบันสาร 2 ชนิดที่ใช้ในการตรวจสอบ indole คือ Kovac's reagent และ Ehrlich's reagent แต่ Ehrlich's reagent มีความไวมากกว่า Kovac's reagent และใช้ในการตรวจสอบ indole ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนและกลุ่มที่เป็น nonfermentative gram negative bacteria สำหรับ Kovac's reagent ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในตระกูล Enterobacteriaceae

การทดสอบ : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร LIM บ่ม 37° ซ. 18-24 ชม. อ่านผลโดยการหยด Kovac's reagent ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หยด เขย่าเบาๆ แล้วอ่านผล

การอ่านผล : ผลบวกสีของสารเปลี่ยนเป็นสีแดง ผลลบสีของสารไม่เปลี่ยนเปลง

ภาคผนวก จ

ผลการทดสอบสายพันธุ์ของ *Salmonella* จากตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อหมู

ทำการทดสอบโดย : WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center

เนื้อไก่สด	*Salmonella* กลุ่ม B พบ	*Salmonella agona*
		Salmonella braenderup
		Salmonella havana
		Salmonella rissen
		Salmonella subspecies I.1,4,5,12 : I:-
		Salmonella typhimurium
	Salmonella กลุ่ม C พบ	*Salmonella bovismorbificans*
		Salmonella hadar
		Salmonella muenchen
		Salmonella quakam
		Salmonella rissen
		Salmonella senftenberg
	Salmonella กลุ่ม E พบ	*Salmonella braenderup*
		Salmonella muenchen
		Salmonella rissen
	Salmonella กลุ่ม G พบ	*Salmonella rissen*
เนื้อหมูสด	*Salmonella* กลุ่ม B พบ	*Salmonella agona*
		Salmonella subspecies I.1 , 4 ,5 , 12 : I:-
	Salmonella กลุ่ม C พบ	*Salmonella rissen*

Salmonella กลุ่ม E พบ *Salmonella amsterdam*

Salmonella anatum

Salmonella derby

Salmonella krefeld

Salmonella london

Salmonella orion

Salmonella saintpaul

Salmonella senftenberg

Salmonella กลุ่ม I พบ *Salmonella agona*

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพัลลภา พัฒนวงศ์ เกิดวันที่ 28 มีนาคม พ.ศ.2515 จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ปีการศึกษา 2536 เข้าทำงานที่บริษัทมาร์ตังกีไดย์สตัฟอินดัสตรีส์จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร ในตำแหน่งเจ้าหน้าที่ฝ่ายควบคุมคุณภาพ เป็นระยะเวลา 4 เดือนจึงได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 จนถึงปี พ.ศ. 2539