

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* โดยเทคนิค ELISA

นายพรทวิ งามพาณิชย์กิจ

นายวุฒิภัณฑ์ คุ้มมินทร์

นายอัฐวรุช แสงนภาพิณู

ร.พ.

พ 238 ก

2537

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....

วัน,เดือน,ปี.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

612542283

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2537 /

หัวข้อโครงการ

โดย

ภาควิชา

อาจารย์ที่ปรึกษา

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* โดยเทคนิค ELISA

นายพรทิว งามพาณิชย์กิจ

นายวุฒิภัณฑ์ คุ้มมินทร์

นายอัฐภาวฐ แสงนภาเพ็ญ

ชีววิทยาประยุกต์

รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์

รศ.ดร.คุณณี ธาระบริพัฒน์



ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(ดร.อุ๋นเรื่อน ศิริวานิชกุล)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบโครงการพิเศษ

(ดร.อุ๋นเรื่อน ศิริวานิชกุล)

ประธานกรรมการ

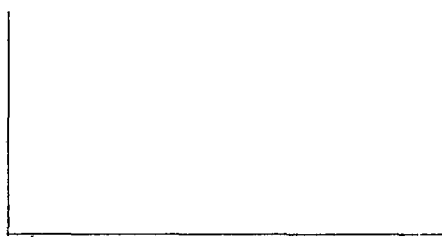
(รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์)

กรรมการ

(รศ.ดร.คุณณี ธาระบริพัฒน์)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



**Detection of *Salmonella typhimurium* by Enzyme Linked Immunosorben
Assay (ELISA)**

Mr. PORNTAWEE NGAMPANITCHAYAKIT

Mr. WUTTIPAN KHUMMIN

Mr. ASSADAWUT SANGNAPAPEAN

Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1994

โครงการพิเศษ	การตรวจหาเชื้อ <i>Salmonella typhimurium</i> โดยเทคนิค ELISA
โดย	นายพรทวิ งามพณิชยกิจ นายวุฒิกัญท์ คุมมินทร์ นายอัฐฎาวุธ แสงนภาเพ็ญ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์ รศ.ดร.คุณณี ธนะบริพัทธ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2537

บทคัดย่อ

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella typhimurium* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อของทางเดินอาหาร โดยเทคนิค ELISA นั้นเป็นที่นิยมและเป็นที่ยอมรับว่าได้ผลถูกต้องและรวดเร็ว การเตรียมแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* ได้โดยการฉีดเชื้อที่ตายแล้วเข้าสู่เส้นเลือดดำของกระต่าย กระต่ายจะสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* เมื่อนำมาทดสอบความจำเพาะพบว่าแอนติบอดี ที่ความเจือจาง $1:10^3$ ในวันที่ 20 และแอนติเจนที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีความเหมาะสมสำหรับการทดสอบมากที่สุด และพบว่าที่ความเจือจางของแอนติบอดีที่ $1:10^7$ สามารถตรวจหาปริมาณเชื้อ *Salmonella typhimurium* ได้ต่ำสุด 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ *Salmonella typhimurium* ในสารละลายที่มีฟอร์มาลินและไม่มีฟอร์มาลิน ซึ่งจะเปรียบเทียบในแต่ละความเข้มข้นที่ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในผลที่ทดสอบ ในการหาความจำเพาะของแอนติบอดีกับ *S.typhimurium* 2 สายพันธุ์และแบคทีเรียชนิดอื่น คือ *S.typhimurium* S292 และ *S.typhimurium* S96, *Bacillus* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp. และ *Staphylococcus aureus* พบว่าให้ผลบวกกับทุกสายพันธุ์ยกเว้น *E. coli* ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า SD ที่ทดสอบในวันเดียวกันและที่ทดสอบคนละวันมีค่าอยู่ระหว่าง 0.00-0.618

Special Project Title Detection of *Salmonella typhimurium* by Enzyme Linked
 Immunosorbent assay (ELISA)

Name Mr.Pornatawee Ngampanitchayakit
 Mr.Wuttiapan Khummin
 Mr.Assadawut Sangnapapean

Special Project Advisor Associate Professor Dr.Vimolmas Lipipun
 Associate Professor Dr.Dusanee Thanaboripat

Department Applied Biology

Academic Year 1994

Abstract

The detection of *Salmonella typhimurium*, a ecusative agent of an enteric disease, by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) has been accepted as the quick and accurate method. A specific antibody has been developed by immunisation of rabbit with dead cells of *Salmonella typhimurium*. The antibody collected from the rabbit after the last injection on day 20 dilution $1:10^3$ and antigen $1:10^8$ cell/ml. are suitable for the detection. The antibody of dilution $1:10^7$ able to detect *Salmonella* sp. at concentratin 10^3 cell/ml. No. differance in detection between the presance cell concentration of 10^8 cell/ml. in suspension with or without formalin has been found. The antibody give cros-reaction with *S.typhimurium* S292, *S.typhimurium* S96, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* but showed no cross-reaction with *E. coli*.The standard deviation of OD obtained from intra-day and extra-day was 0.00-0.618.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์ และรศ.ดร.คุณณี ฐนะบริพัฒน์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ตลอดจนอาจารย์ทุกท่านที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้ความรู้ คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ยิ่ง รวมทั้งช่วยตรวจทานและแก้ไขรายงาน ซึ่งคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ท้ายสุดนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกตลอดการดำเนินงาน คุณพัลลภา พัฒนวงศ์ ที่ได้เอื้อเฟื้อข้อมูลและคำแนะนำเพื่อน ๆ น้อง ๆ ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือทั้งด้านกำลังกายและกำลังใจตลอดมา จนโครงการพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ลงด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2538

เรื่อง	สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญตาราง		ง
สารบัญรูป		จ
บทที่ 1 บทนำ		1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง		3
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน		23
-จุดินทรีย์		23
-อุปกรณ์และสารเคมี		23
-วิธีดำเนินการวิจัย		24
บทที่ 4 ผลการทดลอง		33
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ		44
ภาคผนวก		45
เอกสารอ้างอิง		65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงผลในการทำปฏิกิริยาของ anti- <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028 ที่มีความจำเพาะกับ <i>S. typhimurium</i> กับแบคทีเรียชนิดอื่น	42
2. แสดงช่วงของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า ที่ได้จากการทดสอบในวันเดียวกัน และต่างวันกัน ในแต่ละความเข้มข้นของแอนติบอดี	43

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 โครงสร้างของแอนติบอดี	11
2-2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี RIA	12
2-3 การวิเคราะห์ด้วยวิธี immunoradiometric technique	13
2-4 ELISA แบบแข่งขัน แบบ double antibody sandwich สำหรับวัดแอนติเจน	15
2-5 ELISA แบบไม่แข่งขัน แบบ antibody class capture assay สำหรับวัดแอนติบอดี (IgG, IgM, IgA)	16
2-6 ELISA แบบไม่แข่งขัน แบบ indirect method สำหรับวัดแอนติบอดี	17
2-7 แสดงถึง ELISA แบบแข่งขัน สำหรับวัดแอนติเจน	18
3-1 แสดงเครื่อง ELISA รุ่น LP 400 ที่ใช้ในการทดลอง	28
3-2 เครื่องล้างเพลทรุ่น LP 35	28
3-3 แสดงการเจาะเลือดจากหูกระต่ายเพื่อแยก ซีรัม	29
3-4 แสดงการฉีดเชื้อ <i>S.typhimurium</i> เข้าสู่เส้นเลือด Vein เพื่อให้กระต่ายสร้างแอนติบอดี	29
3-5 การแยกซีรัมจากเลือดกระต่ายที่เจาะได้	30
3-6 แสดงการเคลือบแอนติเจนบนไมโครไตเตอร์เพลทชนิด 96 หลุม	30
3-7 แสดงขั้นตอนของการเติมแอนติบอดีเพื่อให้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน	31
3-8 แสดงการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดซัลฟิวริก 4 N	31
3-9 แสดงผลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จับกับสับสเตรต	32
4-1A การหาสถานะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติบอดี : แอนติเจน จากกระต่าย H-73	33
4-2A การหาสถานะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติบอดี : แอนติเจน จากกระต่าย H-74	34
4-1B การหาสถานะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติเจน : แอนติบอดี จากกระต่าย H-73	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-2B การหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติเจน : แอนติบอดี จากกระต่าย H-74	36
4-3 กราฟเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ <i>S.typhimurium</i> ที่ซัสเพนด์ ในสารละลายที่มี formalin และ ไม่มี formalin ที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร	37
4-4 กราฟเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ <i>S.typhimurium</i> ที่ซัสเพนด์ ในสารละลายที่มี formalin และ ไม่มี formalin ที่ความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร	37
4-5 กราฟเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ <i>S.typhimurium</i> ที่ซัสเพนด์ ในสารละลายที่มี formalin และ ไม่มี formalin ที่ความเข้มข้น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร	38
4-6 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของซีรัมกระต่าย H-73 และ H-74 ที่เจาะได้ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 55	39
4-7 แสดงปฏิกิริยาของ Anti- <i>S.typhimurium</i> ATCC 14028 serum กับ <i>S.typhimurium</i> S292	40
4-8 แสดงปฏิกิริยาของ Anti- <i>S.typhimurium</i> ATCC 14028 serum กับ <i>S.typhimurium</i> S296	41

บทที่ 1

บทนำ

เชื้อ *Salmonella*

เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่สำคัญก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ได้ยกเว้นบางชนิดเช่น *Salmonella typhi* ทำให้เกิดโรคเฉพาะในคนเท่านั้น โรคที่เกิดขึ้นมี Enteric fever (typhoid, paratyphoid) ทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลัน การติดเชื้อในกระแสโลหิต และการติดเชื้อเฉพาะที่ตามอวัยวะภายใน

ในประเทศไทย enteric fever จากเชื้อแซลโมเนลลา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. typhi* เป็นสาเหตุของไข้โดยไม่ทราบสาเหตุในโรงพยาบาลเช่น ในปี ค.ศ. 1979 นั้นมีรายงานคร่าว ๆ จากทั่วประเทศประมาณหนึ่งหมื่นรายที่เป็น Enteric fever ที่ผ่านโรงพยาบาลและได้รับการตรวจรักษา (ตัวเลขนี้ยังมีใช้ตัวเลขที่แท้จริงเพราะมีผู้ป่วยที่แท้จริงเกินครึ่งที่รักษาตนเองและหรือใช้บุคคลากรอื่น,รักษา) นอกจากนั้นรายงานจากโรงพยาบาลจุฬาในปี ค.ศ.1976-1980 พบว่า *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุของอุจจาระร่วงเฉียบพลัน ในทารกแรกเกิดและเด็กเล็กสูงมาก 70-87 % ส่วนรายงานอื่น ๆ พบ *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุอุจจาระร่วงเฉียบพลันได้ 10-30 %

ในประเทศไทยและประเทศกำลังพัฒนาทั้งหลาย จึงต้องให้ความสนใจเชื้อสกุลนี้อยู่มาก นอกจากนี้ในการเตรียมยารับประทานก็มีข้อจำกัดที่ต้องปราศจากเชื้อสกุลนี้

ในปัจจุบันประชากรในประเทศไทย และต่างประเทศมีการติดเชื้อ *Salmonella* spp. กันมาก ซึ่งเชื้อปะปนมากับผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ โดยเฉพาะพวกเนื้อสัตว์และไข่ ที่รู้จักกันดี ได้แก่ *Samonella typhimurium* และ *Salmonella enteritidis* ซึ่งทำให้เกิดโรคติดเชื้อทางเดินอาหาร ท้องร่วงเป็นน้ำ หรือเป็นมูกเลือด

ตามปกติแล้วการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารตลอดจนตัวอย่างทางการแพทย์นั้น จะใช้เวลามากในการแยกเชื้อ อย่างน้อยเป็นเวลา 4 วัน ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงและทดลองวิธีใหม่ๆ ในการตรวจหา *Salmonella* spp. เพื่อให้ได้ผลที่รวดเร็วและมีความแม่นยำขึ้น วิธีต่างๆ เหล่านี้รวมถึงเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่มีการยอมรับและศึกษากันอย่างกว้างขวาง ซึ่งการใช้เทคนิค ELISA จะช่วยลดระยะเวลาจาก 4 วัน ให้เหลือเพียง 24 ชั่วโมง ทำให้การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นไปอย่างรวดเร็ว สะดวก ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

ความสำคัญและที่มาของโครงการ

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ตลอดจนตัวอย่างทางคลินิก เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้เวลาในการแยกเชื้ออย่างน้อย 4 วัน ดังนั้นจึงมีการทดลองใช้เทคนิค ELISA เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ตรวจหา *Salmonella* spp. ให้ได้ผลที่รวดเร็วและแม่นยำ จะช่วยลดระยะเวลาลงจาก 4 วัน ให้เหลือเพียง 24 ชั่วโมง ช่วยลดให้สะดวกและประหยัดเวลายิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อเตรียม polyclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella typhimurium*
2. เพื่อนำแอนติบอดี ที่ได้มาตรวจหาความจำเพาะกับเชื้อ *Salmonella* spp.

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

แอนติเจน-แอนติบอดีและปฏิกิริยาการทดสอบ

แอนติเจน

แอนติเจน (antigen:Ag) คือ โมเลกุลที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) จะประกอบด้วยหลาย ๆ antigenic determinant ซึ่งแต่ละ determinant สามารถจับได้กับ ส่วนของ antigenic-binding site ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วนนั้น ๆ บางครั้งเรียก determinant ว่า epitope โดยทั่วไปมักใช้คำว่า อิมมิวโนเจน (immunogen) เมื่อหมายถึงสารที่ทำปฏิกิริยาได้กับแอนติบอดี

สารที่จะทำหน้าที่เป็นอิมมิวโนเจนได้จะต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสม คุณสมบัติที่เหมาะสมดังต่อไปนี้

1. เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) ควรมีขนาดตั้งแต่ 10,000 daltons (D) ขึ้นไป จะทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่ดี สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เช่น insulin (m.w. 5,700 D), histones (m.w. 6,000 D) เป็นแอนติเจนที่ไม่ดี แต่ส่วนประกอบอื่น ๆ ทางเคมีของสารนั้นก็เป็นสิ่งสำคัญในการกำหนด การตอบสนองของร่างกาย

2. โมเลกุลต้องมีความซับซ้อน (molecular complexity) เช่น พวกรโพรตีนเป็นสารที่มีสูตร โครงสร้างที่ซับซ้อน จะทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่ดี สารบางชนิดมีโมเลกุลขนาดใหญ่แต่ไม่มีความซับซ้อน จะทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่ไม่ดี เช่น พอลิเมอร์สังเคราะห์และโฮโมพอลิเมอร์ ของกรดอะมิโน

3. มีคุณสมบัติเป็นสิ่งแปลกปลอมของร่างกาย (foreignness; non-self) ร่างกายจะมีการตอบสนองต่อสิ่งที่มีความแตกต่างจากองค์ประกอบต่าง ๆ ในร่างกาย (และจะต้องมีคุณสมบัติสำคัญเช่นใน ข้ออื่น ๆ ด้วย) ยกเว้นในบางสภาวะ หรืออาจเกิดจากการชักนำบางชนิดจะก่อให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกัน ต่อเนื้อเยื่อของตัวเอง

4. ละลายได้ในร่างกาย (solubility) สารที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่ไม่ดี เช่น พอลิเมอร์สังเคราะห์ จะขาดคุณสมบัติที่จะถูกละลายได้เมื่อเข้าไปในร่างกายแม้จะใช้ปฏิกิริยาจากเอนไซม์ช่วยก็ไม่สามารถเปลี่ยนสภาพเป็นสารที่ละลายได้ จึงขาดคุณสมบัติที่จะถูกแปรสภาพต่อ หรือไม่สามารถ กระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

แอนติบอดี

แอนติบอดี (antibody:Ab) คือกลุ่มของโปรตีนที่เกิดขึ้นมาจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายทางด้าน humoral immunity กลุ่มของโปรตีนเหล่านี้จะมีความคล้ายคลึงกันหลายอย่างคือทางด้านโครงสร้างหลักของโมเลกุล คุณสมบัติทางชีววิทยาบางชนิดที่เหมือนกัน แต่ในขณะที่เดียวกันก็จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่จะก่อให้เกิดแอนติบอดีแต่ละตัว คุณสมบัติของความจำเพาะในตัวเองในการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีนั้น

ในปี 1940 Tiselius และ Kabat ได้ศึกษาส่วนประกอบของโปรตีนบนซีรัมและพบว่าเมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสกลุ่มของแอนติบอดีจะเคลื่อนที่ช้าอยู่บริเวณของส่วน gamma globulin และเมื่อนำซีรัมของสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนแล้วมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้ง จะพบว่าโปรตีนบริเวณนี้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นภายหลังจึงมีการเรียกโปรตีนนี้หรือกลุ่มของแอนติบอดีนี้ว่า immunoglobulins (Ig) ต่อมาภายหลังพบว่าแอนติบอดีแต่ละชนิดอาจมีคุณสมบัติทางการเคลื่อนที่ทางอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoretic mobility) ที่ต่างกันออกไป

ในคนเราจะแบ่ง immunoglobulin ออกได้เป็น 5 classes คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ซึ่งจะมีส่วนประกอบหลักที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้

1. โครงสร้างหลักของ immunoglobulin

Immunoglobulin (Ig) 1 โมเลกุล จะประกอบด้วย พอลิเพปไทด์ 4 สาย คือ 2 สายยาวที่เหมือนกันเรียก heavy (H) chain และ 2 สายสั้นที่เหมือนกันเรียก light (L) chain เชื่อมกันด้วย disulfide bond (-S-S) ซึ่งจะเป็น non-covalent bond ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ด้วยสาร reducing agent จำนวนของ disulfide bond นั้น จะเปลี่ยนแปลงไปตามชนิด class และ subclass ของ Ig แต่ละชนิด แต่ละสายของ พอลิเพปไทด์ นั้นจะเป็นกรดอะมิโนเรียงกันเป็นสาย เรียงลำดับเหมือนกันจาก N-terminal ไปยังส่วนปลายอีกด้านเป็น C-terminal ทุกสายจะหันปลายด้าน N หรือ C-terminal เรียงไปทางเดียวกัน บริเวณที่อยู่ติดกับ disulfide bond อันสุดท้ายที่เชื่อม H-chain และอยู่ใกล้ทางด้าน N-terminal อยู่บริเวณที่ C_{H1} ต่อกับ C_{H2} เรียกว่า hinge-region จะเป็นบริเวณที่ช่วยในการเคลื่อนไหวของโมเลกุล Ig ทำให้แขนทั้งสองข้างของโมเลกุลกางเข้าออกได้มากขึ้นเพื่อช่วยให้โมเลกุลจับกับแอนติเจนได้ดีขึ้น ตรงนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น proline 3 โมเลกุล ม้วนพับหรือบิดคลี่ได้ ทำให้โมเลกุลของ Ig จัดเป็นรูปตัว Y หรือ T สำหรับจับกับแอนติเจนได้

2. คุณสมบัติทั่วไปของ immunoglobulin แต่ละชนิด

IgG

เป็น Ig ที่มีปริมาณมากที่สุดในซีรัม (80-85%) จึงมีความสำคัญในการช่วยป้องกันสิ่งแปลกปลอม และเป็นภูมิคุ้มกันของร่างกาย สามารถผ่านรกได้ โมเลกุลจะประกอบด้วยโครงสร้างหลักเช่นที่กล่าวมาแล้วเป็น polypeptide chain 4 เส้น ในคนจะมีน้ำหนักประมาณ 150,000 D ส่วนของ H-chain จะเป็นชนิด gamma (γ) จึงมีชื่อว่า IgG

IgG ของคนจะแบ่งออกเป็น 4 subclasses คือ IgG₁, IgG₂, IgG₃ และ IgG₄ และยังมีแบ่ง subclass ย่อยลงไปอีกได้ตามคุณสมบัติทางชีวภาพบางชนิดที่แตกต่างกันเช่นเป็น IgG_{2a}, IgG_{2b} พบว่า IgG₁ จะมีปริมาณสูงสุดใน 4 subclass IgG₁, IgG₂, IgG₄ สามารถทำปฏิกิริยากับ Staphylococcal protein A ได้ทำให้แยกออกจาก subclass IgG₃ และแยกกับ IgM ซึ่งเป็น class อื่น ๆ ได้ เพราะ IgG₃ และ IgM ไม่ทำปฏิกิริยากับ protein A

IgA

พบในซีรัมเป็นปริมาณมารองจาก IgG แต่พบว่าพบเป็นปริมาณสูงที่สุดในน้ำคัดหลั่ง ณ ที่ต่าง ๆ ที่ น้ำตา น้ำลาย น้่านม ทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ ส่วนของ H-chain ชื่อ alpha(α) chain ในซีรัมพบได้ทั้งในรูป monomer, dimer, trimer มี 2 subclass คือ IgA₁ และ IgA₂ พบว่า IgA ที่ขับออกมาบริเวณที่มีน้ำคัดหลั่งจะอยู่ในรูปของ dimeric form ซึ่งการเชื่อมเป็น polymeric form นี้จะอาศัย J-chain (joining chain) เช่นเดียวกับ Ig ชนิดอื่น ๆ และมีส่วนของ glycoprotein ที่สำคัญอีกเส้น ชื่อ secretory component (SC หรือ secretory piece; SP) ซึ่งจะเชื่อมเกาะระหว่าง H-chain ของ dimeric IgA พบว่าการมี SC เกาะอยู่กับ IgA จะช่วยทำให้โมเลกุลของ IgA นี้ทนต่อการทำลายด้วย เอนไซม์ ทำให้ IgA ทำหน้าที่บริเวณนั้นได้ดี เรียกชื่อ IgA ที่พบในรูปแบบนี้ว่า secretory IgA (sIgA) หรืออาจเรียกว่า mucoantibody หรือ coproantibody (คือแอนติบอดีที่ผิวเยื่อเมือก)

IgM

เป็น Ig ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดจะมีน้ำหนักประมาณ 900,000 D ส่วนของ H-chain ชื่อ mu (μ) chain จะประกอบด้วยโมเลกุลพื้นฐานทั้งหมด 5 หน่วย ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วย J-chain และมี SC ร่วมอยู่ในโมเลกุลด้วย พบในน้ำคัดหลั่งบ้าง การมีมันพับไปมาของโมเลกุลซึ่งเกิดจาก secondary และ tertiary structure ทำให้ antigen-binding site บางแห่งทำงานไม่ได้ หรือไม่สามรถจับกับแอนติเจนได้

IgM เป็น Ig ตัวแรกที่ร่างกายสร้างขึ้นภายหลังที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน เป็น Ig ที่สำคัญที่พบบน surface membrane ของ B-lymphocyte พบว่ามี 2 subclasses คือ IgM₁ และ IgM₂ สามารถ

กระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ได้ดีและก่อให้เกิดปฏิกิริยา agglutination ได้ดีเพราะมี antigen-binding siter หลายตำแหน่งนั่นเอง

IgD

เป็น Ig ที่พบปริมาณต่ำในซีรัม ส่วนของ H-chain ชื่อ delta (δ) chain หน้าที่และคุณสมบัติที่สำคัญยังไม่พบ เชื่อว่าทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ของแอนติเจนที่บนเมมเบรนของ B-lymphocyte จึงทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

IgE

เป็น Ig ที่พบปริมาณต่ำสุดในซีรัม ส่วนของ H-chain ชื่อ epsilon (ϵ) chain จะเกี่ยวข้องกับภูมิแพ้แบบ type I คือเมื่อร่างกายได้รับสารที่ทำให้แพ้จะกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง IgE ที่จำเพาะกับสารแพ้นั้นขึ้นมา จึงมีอีกชื่อว่า reaginic antibody และ IgE นี้จะมีคุณสมบัติต่างจาก Ig ตัวอื่น ๆ คือ ส่วนของ Fc จะสามารถจับกับ mast cell และ basophil เพราะมีรีเซพเตอร์ที่เหมาะสมกัน ทำให้เซลล์เหล่านี้สามารถหลั่งสารตัวกลางที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ออกมา จึงอาจเรียกว่าเป็น homocytotropic antibody นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าในกรณีที่เกิดการติดเชื้อของปรสิตนั้นจะพบว่าร่างกายจะมีปริมาณของ IgE สูงกว่าในสภาวะปกติ

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดี (Antigen-Antibody Reaction)

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. **ขั้นปฐมภูมิ (Primary or initial interaction)** เป็นการเริ่มการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เห็นผลหรือตรวจสอบปฏิกิริยาได้ยากด้วยตาเปล่า บางครั้งจะทราบเมื่อปฏิกิริยาได้ต่อเนื่องไปถึงขั้นที่ 2 แล้ว การตรวจสอบปฏิกิริยาขั้นนี้จะใช้เทคนิคพิเศษช่วยตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ โดยใช้ Farr technique การทำ equilibrium dialysis การใช้วิธี immunofluorescence การใช้การติดฉลากด้วย ferritin การทำ radioimmunoassay (RIA), Enzyme immunoassay (EIA) และ fluoroimmunoassay (FIA) เป็นต้น

2. **ขั้นทุติยภูมิ (secondary reaction)**

เป็นปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีที่สามารถทราบได้ด้วยวิธีการตรวจง่าย ๆ หลายชนิด นำมาใช้ช่วยการตรวจในห้องปฏิบัติการ ปฏิกิริยาที่เกิดมักเป็นการเกิดเชื่อมโยงกัน เช่น การตกตะกอน การเกาะกลุ่ม complement-dependent reaction, neutralization, cytotoxic effect เป็นต้น

3. **ขั้นตติยภูมิ (tertiary manifestation)** เป็นปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดผลต่อเนื้อทาง biologic expression ซึ่งผลนี้บางครั้งอาจเป็นผลดีกับร่างกายแต่บางครั้งก็มีผลก่อให้เกิดโรคทางภูมิคุ้มกันหลายชนิด การตรวจโดยใช้หลอดทดลองก็มักจะตรวจผลหรือสารที่เกิดขึ้นซึ่งใช้วิธีการตรวจโดยใช้ RIA หรือ ELISA หรือ FIA

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ ในตอนแรกจะมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ต่อมาแอนติเจนและแอนติบอดีจะเกาะกลุ่มกันใหญ่ขึ้นเป็นร่างแหตกตะกอนลงมาให้เห็นได้ และอาจมีการแสดงลักษณะของปฏิกิริยาต่าง ๆ แล้วแต่ชนิดของปฏิกิริยาและสารที่เกี่ยวข้อง สำหรับความสามารถในการจับอย่างจำเพาะของแอนติบอดีกับแอนติเจนที่เข้าอยู่ในลักษณะของ lock and key แล้วนั้น ความคงตัวของคอมเพล็กซ์ที่เกิดขึ้นคงยึดอยู่ด้วยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล ได้แก่ electrostatic bond (Coulombic force), Van der Waals force, hydrogen bond และ hydrophobic bond

การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ในหลอดทดลองที่จะกล่าวถึงต่อไปมีดังนี้

1. ปฏิกิริยาการตกตะกอน (Precipitation)

เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่เป็นสารละลายทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในปริมาณที่ได้สัดส่วนพอเหมาะกัน จะได้สารประกอบเชิงซ้อน Ag-Ab ที่ไม่ละลายน้ำ และตกตะกอนให้เห็นได้ เมื่อโมเลกุลของแอนติเจนและแอนติบอดีนั้นต่อเชื่อมโยงจับกันเป็นร่างแห (lattice formation) ทำให้โมเลกุลใหญ่ขึ้นตกเป็นตะกอน

การเกิด precipitation นี้จะเกิดมากหรือน้อยจะเป็นไปตามคำอธิบายที่แสดงได้โดย Heidelberger's curve ซึ่งกล่าวว่า เมื่อทำการทดลองโดยใช้แอนติบอดีจำนวนคงที่ในหลอดทดลองทุกหลอดและค่อย ๆ เติมแอนติเจนในหลอดปริมาณความเข้มข้นมากขึ้นลงในแต่ละหลอด โดยเรียงลำดับจากน้อยไปหามาก พบว่าช่วงหลอดแรกๆ มีแอนติบอดีมากเกินไปเมื่อเทียบกับปริมาณของแอนติเจน (antibody excess zone) เมื่อแอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ยังมีโมเลกุลของแอนติบอดีอิสระเหลืออยู่มาก และแอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีเป็น Ag-Ab complex ขนาดเล็ก ไม่มีการเชื่อมโยงให้ใหญ่ขึ้น ดังนั้น Ag-Ab complex จึงตกตะกอนไม่ได้ เกิดภาวะที่เรียกว่า prozone phenomenon

ช่วงถัดมาเป็นช่วงที่พอเหมาะ (equivalent zone) จะมีจำนวนของแอนติเจนและแอนติบอดีในอัตราที่เหมาะสมกัน โมเลกุลจำนวนมากมาเกาะเชื่อมโยงกันให้ได้ Ag-Ab complex ใหญ่ขึ้นตกตะกอนลงมา และเป็นหลอดที่มีตะกอนมากที่สุด

เมื่อมีแอนติเจนจำนวนมากขึ้น (antigen excess zone) แอนติเจนนั้นจะแย่งจับกับแอนติบอดีจนแอนติบอดีหมด ไม่มีพอที่จะต่อเชื่อมโยงเป็นร่างแห จะเกิดเป็น Ag-Ab complex เล็ก ๆ ตกตะกอนไม่ได้ดี ภาวะในช่วงนี้เรียกว่า postzone phenomenon

2. ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (Agglutination)

เป็นปฏิกิริยาที่แอนติเจนที่เป็นเซลล์ เช่น แบคทีเรียหรือเม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีแล้วรวมตัวเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มมองเห็นได้ ปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยาต้องได้สัดส่วนที่พอเหมาะกันถ้าปริมาณแอนติบอดีมากไปจะเกิด prozone phenomenon หรือน้อยไปจะเกิด antigen excess zone ได้

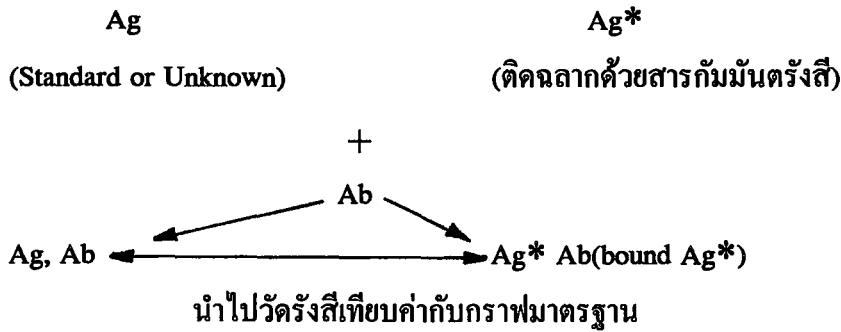
ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มจะเกิดได้ดีหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดี ความเป็นกรดต่าง ความพอเหมาะของ electrolyte ในสารละลาย ตลอดจนการปั่น การเขย่า และอุณหภูมิที่พอเหมาะ เหล่านี้จะมีผลต่อการรวมตัวของแอนติเจนและแอนติบอดี ปัจจัยที่สำคัญที่สุดได้แก่ความแตกต่างระหว่างประจุไฟฟ้าที่ผิวของแอนติเจนกับไอออนในสารละลายเพราะทำให้เกิดแรงผลักระหว่างเซลล์ให้ห่างกันออกไป ทำให้แอนติบอดีไม่สามารถเชื่อมโยงเซลล์เข้าด้วยกันได้ จึงไม่เกิดการเกาะกลุ่ม เราจึงต้องเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ เช่น trypsin หรือ neuramini-dase ก่อนหรือเปลี่ยนแปลงสารละลาย โดยเติมสาร colloid เช่น เจลาติน serum albumin หรือ Ficoll ลงไปจึงจะช่วยให้เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนได้

3. Immunoassays

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เป็นปฏิกิริยาแบบปฐมภูมินั้นจะมองเห็นได้ยากและอาจมีปริมาณน้อยมาก ต้องใช้เทคนิคพิเศษมาช่วยเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบซึ่งอาจเป็นการใช้การติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยสารพิเศษ ได้แก่ สารกัมมันตรังสี สารเรืองแสง สารที่เป็น electron-dense หรือพวก enzyme markers ต่าง ๆ ซึ่งวิธีการเหล่านี้สามารถใช้หาปริมาณได้ด้วยเทคนิคสำคัญที่จะกล่าวถึง คือ

3.1 Radioimmunoassay (RIA) เป็นวิธีที่ไวมากสามารถตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีปริมาณน้อยมากในระดับ 10^{-12} กรัมต่อมล.ได้ จึงนิยมใช้ในการตรวจหาปริมาณเซรุ่มโปรตีนบางชนิด ฮอร์โมน และยาชนิดต่าง ๆ แบ่งวิธีการทดสอบออกเป็น 2 วิธี คือ

3.1.1 Liquid phase RIA มีหลักการคือ ให้แอนติเจนที่ต้องการทราบปริมาณและแอนติเจนชนิดเดียวกันที่ทราบจำนวนและติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (Ag^*) ทำปฏิกิริยาแย่งจับกับแอนติบอดี จำนวนมาตรฐานที่ทราบค่า จากนั้นแยก $Ag^* Ab$ complex และ Ag^* อีสรระออกจากกัน แล้วนำไปวัดรังสีเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะทราบค่าปริมาณแอนติเจนนั้นได้ ดังนี้



3.1.2 Solid phase RIA เป็น RIA อีกแบบหนึ่ง โดยให้แอนติเจน หรือแอนติบอดีเกาะติดกับ supporting medium เช่น polystyrene microplate, bead แก้ว วิธีการทำนี้มีข้อได้เปรียบคือ วิธีการทำได้ง่ายกว่าวิธี liquid phase หลักการทำของวิธีนี้มีได้หลายวิธีซึ่งอาจเป็น competitive binding และ non-competitive binding ซึ่งมีได้ทั้งแบบ direct และ indirect (sandwich technique)

3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ปัจจุบันได้ปรับปรุงวิธีการทำ immuno-assay โดยพยายามหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตรังสี ซึ่งการคูณของปฏิกิริยาอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเอนไซม์บางชนิดกับ substrate ของมัน ตรวจสอบปริมาณความเข้มของสีที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งถ้าวัดความเข้มจากปฏิกิริยาที่ทำใน microtiter plate ก็สามารถใช้ microelisa reader อ่านได้ ซึ่งราคาจะถูกกว่าพวก radioisotope counter

หลักการทำของ ELISA ก็จะมีวิธีการทำเช่น RIA เพียงแต่การติดฉลากนั้นจะใช้เอนไซม์แทนการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี และตามด้วยขั้นตอนการใส่ substrate คูณของปฏิกิริยาปัจจุบันเอนไซม์ที่ใช้ทดลองมากคือ alkaline phosphatase, β -D-galactosidase และ horseradish peroxidase

3.3 Immunofluorescence เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้สารเรืองแสง เช่น fluorescein isothiocyanate (FITC), rhodamine B isothiocyanate (RITC) เข้ามาช่วยแสดงปฏิกิริยา การศึกษาโดยวิธีนี้จะช่วยอย่างมากทาง immunohistopathology ซึ่งจะใช้ควบคู่กับการศึกษารูปร่างของเซลล์ร่วมด้วย การศึกษาโดยวิธีนี้ทำได้ 3 แบบ คือ

3.3.1 Direct immunofluorescent method ใช้ตรวจหาแอนติเจนโดยใช้ specific antibody ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง

3.3.2 Indirect immunofluorescent method ใช้ตรวจหาแอนติเจน โดยให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยากันก่อน และเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่สร้างต่อแอนติบอดีตัวแรก ซึ่งตัวแอนติบอดีตัวที่สองนี้จะติดฉลากสารเรืองแสง

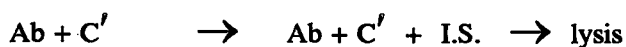
3.3.3 Sandwich method จะคล้ายกับ indirect method แต่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีในเนื้อเยื่อ ใส่แอนติเจนที่จำเพาะไปให้ทำปฏิกิริยา และใส่แอนติบอดีต่อแอนติเจนนั้นอีกครั้ง สุดท้ายใส่

anti-antibody ที่ติดฉลากเรืองแสงที่สร้างต่อแอนติบอดีที่ใส่ไปจับแอนติเจนนั้น

3.4 Fluorescent activated cell sorter (FACS) ใช้หลักการแยกเซลล์ออกจากกันโดยปฏิกิริยาความจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยเซลล์จะแยกออกจากกันได้ เมื่อทำปฏิกิริยาจำเพาะและติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ทำให้เกิดคุณสมบัติในการหักเหแสงของเซลล์ที่แตกต่างกัน เครื่องสามารถที่จะให้เซลล์ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีและทำปฏิกิริยา anti-antibody ที่ติดฉลากด้วย fluorescein แล้วผ่านเข้ามาในอัตราที่สม่ำเสมอครั้งละ 1 เซลล์ จะออกผ่านมาทางช่องลำแสงของ monochromatic light จากเลเซอร์และแต่ละเซลล์ที่ผ่านมาทางช่องนี้จะถูกแยกไว้ตามคุณสมบัติของการหักเหแสงและการปล่อยแสง fluorescence ซึ่งถูกกระตุ้นโดยแสงเลเซอร์ ผลจะถูกบันทึกโดย photodetector และให้ข้อมูลผ่านเข้าคอมพิวเตอร์ วิธีการนี้ให้ผลดี เชื่อถือได้ แต่ราคาเครื่องแพงมาก และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการดูแลควบคุมรักษาเครื่องมือ

4. ปฏิกิริยาตรึงคอมพลีเมนต์ (Complement fixation test - CFT)

เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้ ถ้า Ag-Ab complex นั้นสามารถตรึงคอมพลีเมนต์ได้ มีหลักการคือ ให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยากันโดยมีคอมพลีเมนต์ร่วมด้วย ถ้าปฏิกิริยามีความจำเพาะกันคอมพลีเมนต์ที่ใส่ไปจะถูกใช้หมดไป เมื่อเติม indicator system I.S. (เม็ดเลือดแดงแกะ + แอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงแกะ ซึ่งเท่ากับเป็น Ag-Ab complex อีกชนิดหนึ่ง) ลงไป จะไม่มีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงแกะเพราะคอมพลีเมนต์ถูกใช้ไปหมดแล้ว สรุปว่าปฏิกิริยานั้นให้ผลบวก แต่ถ้าแอนติเจนและแอนติบอดีไม่จำเพาะกัน คอมพลีเมนต์ก็จะไม่ถูกใช้ไปจะเหลือมาทำปฏิกิริยากับ indicator system เกิดจากการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงแกะ แสดงว่าปฏิกิริยานั้นให้ผลลบ



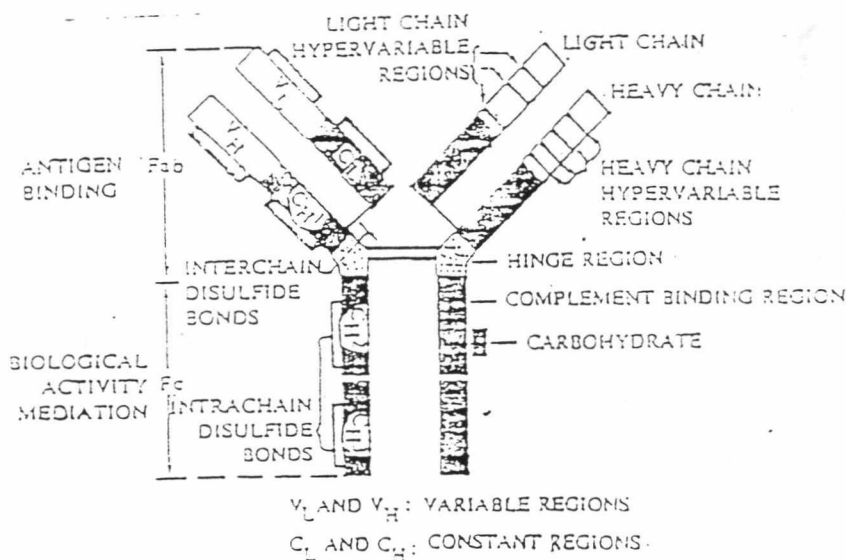
5. Neutralization

เป็นปฏิกิริยาที่แอนติบอดีไปทำแอนติเจนหมดฤทธิ์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจเป็นแบบการเกาะกลุ่มหรือตกตะกอน เช่น ปฏิกิริยาระหว่างสารพิษ กับสารทำลายพิษ ทำให้ฤทธิ์ของสารพิษหมดไป

เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่าเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ชั้นสูงซึ่งรวมทั้งมนุษย์ด้วย สิ่งแปลกปลอมที่เข้าไปนั้นจะกระตุ้น ให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีขึ้นต่อต้าน เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดี คือ เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphoid cells) ซึ่งจะพบในตับ ม้าม ไชกระดุก และต่อมน้ำ

เหลือง สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เราเรียกว่า แอนติเจน หรือ อิมูโนเจน อาจเป็นสารพวกโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน หรือกรดนิวคลีอิกก็ได้ ส่วนแอนติบอดี หรือ อิมูโนโกลบูลิน (Ig) คือ โปรตีนโกลบูลินที่ร่างกายสร้างขึ้น เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนและสามารถปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนดังกล่าวได้

โครงสร้างของแอนติบอดีเป็นโปรตีนขนาดใหญ่โมเลกุลมีความซับซ้อน ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 4 สาย สายยาว 2 สายและสายสั้น 2 สาย แต่ละสายต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ทั้งสายสั้นและสายยาวมีจำนวนและการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่คงที่และเหมือนกันส่วนปลาย(บริเวณที่จับ) กรดอะมิโนจะต่างกัน ซึ่งส่วนนี้เป็นบริเวณที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน และมีความจำเพาะต่อแอนติเจนแต่ละชนิด (ภาพที่ 1)

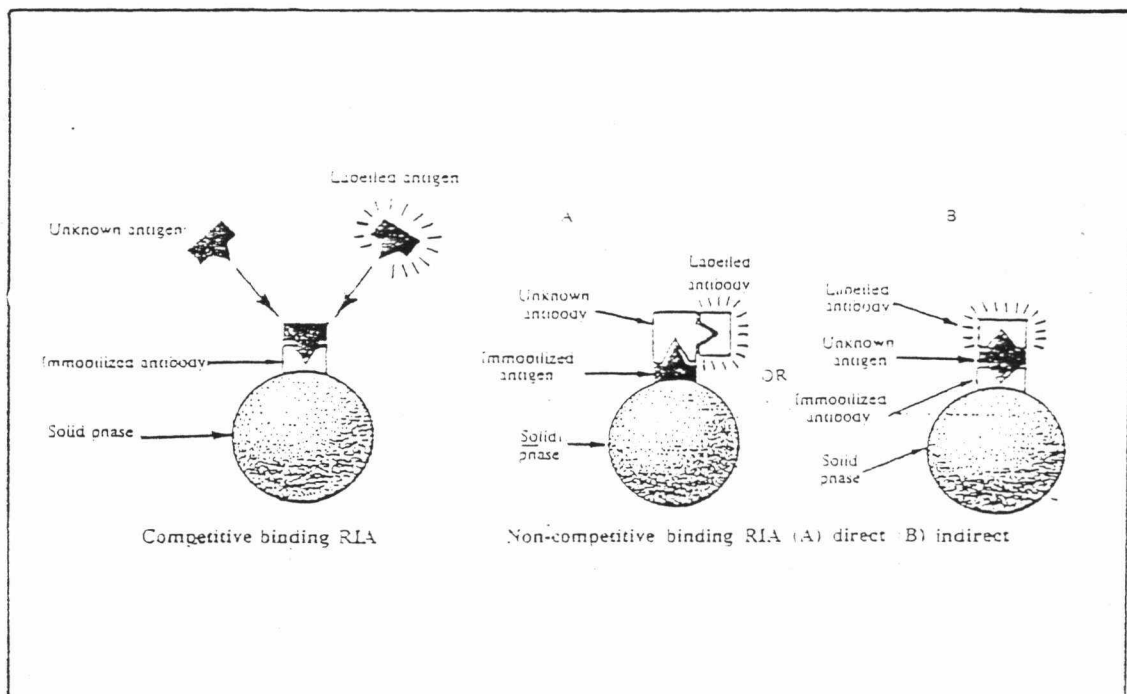


ภาพที่ 1 โครงสร้างของโมเลกุลแอนติบอดี

จากคุณสมบัติความไว (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (specific) ของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี จึงได้มีการนำไปวิเคราะห์สารต่าง ๆ เรียกว่า อิมมูโนแอสเสส (immunoassay) ในปี ค.ศ. 1960 Yellow และ Berson ทำการวิเคราะห์หาอินซูลินในร่างกาย โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เรียกว่าวิธีนี้ว่า เรดิโออิมมูโนแอสเสส (radioimmunoassay) หรือ RIA

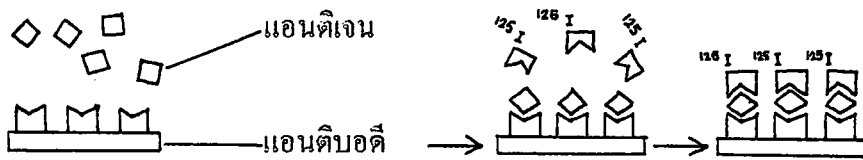
การวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจนด้วยวิธี RIA ทำได้โดยใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีมาจับกับแอนติบอดี เกิดสารประกอบของแอนติเจนกับแอนติบอดี จากนั้นแยกสาร

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจนด้วยวิธี RIA ทำได้โดยใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีมาจับกับแอนติบอดี เกิดสารประกอบของแอนติเจนกับแอนติบอดี จากนั้นแยกสารประกอบที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกมา นำไปวัดปริมาณสารกัมมันตรังสีด้วยฟิล์มเอ็กซ์เรย์ หรือสเปกโทรมิเตอร์ ก็จะทราบปริมาณแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยา ทำการทดลองอีกครั้งโดยเติมแอนติเจนที่ไม่ทราบค่าลงไป แอนติเจนนี้จะไปจับแอนติบอดีแย่งกับแอนติเจนที่ติดฉลาก ทำให้เกิดสารประกอบของแอนติเจนที่ติดฉลากน้อยลง ถ้ามีแอนติเจนในตัวอย่างมาก วิธีนี้ทำให้ทราบปริมาณแอนติเจนในสารตัวอย่างได้ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี RIA

ต่อมาจึงมีการพัฒนาเทคนิคต่างๆขึ้น โดยวิธีการตรึงแอนติบอดีบนเฟสของแข็ง เรียกว่าเทคนิคอิมมูโนเมตริก (immunometric) เพื่อให้สะดวกในการล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป ดังรูปที่ 3 เฟสที่ใช้ยึดแอนติบอดี เช่น เซลลูโลส เมื่อใส่แอนติเจนลงไปจับกับแอนติบอดี แล้วใส่แอนติบอดีที่ติดฉลากลงไป แอนติบอดีที่ติดฉลากจะไปจับกับแอนติเจนล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก นำไปวัดสารกัมมันตรังสี ก็จะทำให้ทราบจำนวนแอนติบอดีที่ติดฉลาก และแอนติเจนได้ วิธีนี้เป็นแบบ two site assay หรือ sandwich assay ซึ่งใช้แอนติบอดี 2 ตัว เมื่อทำกราฟมาตรฐานของปริมาณแอนติเจน ก็จะทราบปริมาณแอนติเจนในตัวอย่างโดยเทียบจากกราฟ



เชลลูโลส

ภาพที่ 3 Immunoradiometric technique

หลังจากปี ค.ศ. 1969 ได้มีการคิดค้นดัดแปลงการติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดี ด้วยสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่สารกัมมันตรังสี เนื่องจากสารกัมมันตรังสีอาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ ฉลากที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่

1. สารกัมมันตรังสี
 - ก) ^{125}I , ^{131}I
 - ข) H
 - ค) C
2. เอนไซม์ phosphatase และ peroxidase
3. สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์
4. สารเรืองแสงลูมิเนสเซนซ์
5. อนุคลิอัส
6. เซลล์เม็ดเลือดแดง
7. protein-bacteriophage

วิธีการที่ใช้เอนไซม์ที่ติดฉลาก เรียกว่า เอนไซม์อิมมูโนแอสเส (enzyme immunoassay) แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. โฮโมจีเนียส เอนไซม์อิมมูโนแอสเส (homogenous enzyme immunoassay)

นำแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี เกิดสารประกอบระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เอนไซม์ที่ใช้ติดฉลากนั้นจะสูญเสียประสิทธิภาพเมื่อเกิดเป็นสารประกอบประสิทธิภาพที่วัดได้ คือ ประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ติดฉลากอยู่กับแอนติเจน

2. เฮเทอโรจีเนียส เอนไซม์อิมมูโนแอสเส (heterogenous enzyme immunoassay)

เอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติเจน เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีแล้ว จะไม่สูญเสียประสิทธิภาพไป สามารถแยกสารประกอบแอนติเจนและแอนติบอดีได้อย่างอิสระ แล้ววัดประสิทธิภาพของ

เอนไซม์ส่วนหนึ่งส่วนใดที่แยกออกมา เทคนิคที่ใช้ในโรงงานพิเศษนี้ คือ enzyme-linked immunosorbent assay หรือ ELISA ก็จัดอยู่ในประเภทนี้

เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่เกิดขึ้น เมื่อปี ค.ศ. 1971 โดยมีหลักการ ดังนี้

1. ตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนผิวของเฟส
2. เติมสารตัวอย่างลงไป ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก
3. เติมแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วล้าง
4. เติมสับสเตรตของเอนไซม์
5. วัดสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

เทคนิค ELISA สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

1. ELISA แบบไม่แข่งขัน (noncompetitive ELISA)

เป็นการให้แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ตรึงไว้บนผิวของภาชนะโดยตรงหรือกลับกัน (ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลาก) ELISA แบบไม่แข่งขันที่นิยมใช้วัดแอนติเจน คือ แบบ double antibody sandwich (ภาพที่ 4) โดยการตรึงแอนติบอดีบนผิวของภาชนะ ล้างส่วนที่ไม่ถูกตรึงออก เติมตัวอย่างแอนติเจนที่ต้องการวิเคราะห์ แอนติเจนจะไปจับกับแอนติบอดีอย่างจำเพาะต่อกัน ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไปให้ไปจับกับแอนติเจนที่เกิดพันธะอยู่แล้ว ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก หลังจากนั้นเติมสับสเตรตของเอนไซม์ลงไป เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสี ซึ่งปริมาณแอนติเจนจะแปรผันตรงกับผลิตภัณฑ์ที่มีสี ในการทดลองครั้งแรกใช้แอนติเจนที่ทราบค่า แล้วนำทำการหาปริมาณและเมื่อทำการวัดครั้งต่อไป นำมาเทียบหาปริมาณแอนติเจนได้

นอกจากแบบ double antibody sandwich ยังมีแบบ antibody class capture assay (ภาพที่ 5) ที่ปรับปรุงเพื่อวัดแอนติบอดี IgG IgM และ IgA โดยเฉพาะวิธีทำ คือ ตรึง class-specific antiglobulin บนผิวของภาชนะ เติมตัวอย่างลงไป class-specific globulin ในตัวอย่างจะเข้าไปจับกับแอนติบอดี แล้วเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป เติมเอนไซม์สับสเตรต วัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้น ซึ่งจะแปรผันตรงกับปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน

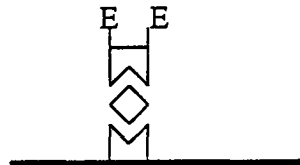
1. การตรึง Ab บนผิวภาชนะ



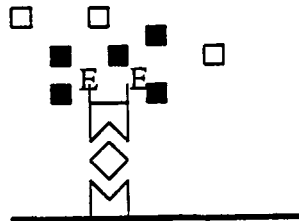
2. เติมตัวอย่าง Ag ให้เกาะกับ Ab



3. เติม Ab ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป



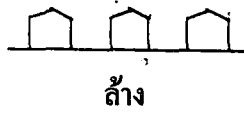
4. เติมเอนไซม์สับสเตรตจะเกิดปฏิกิริยา (◆)



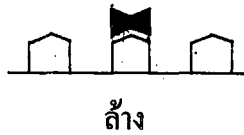
5. วัดผลิตภัณฑ์ที่มีสีซึ่งแปรผันกับปริมาณแอนติเจน

ภาพที่ 4 ELISA แบบไม่แข่งขัน แบบ double antibody sandwich
สำหรับวัดแอนติเจน

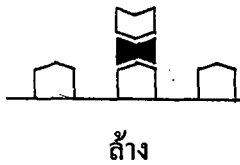
1.ตรึง class-specific antiglobulin บนผิวภาชนะ



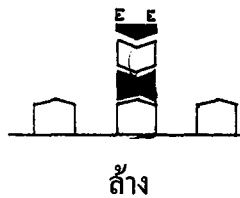
2.เติมตัวอย่าง class-specific globulin ให้ตัวอย่างเกาะกับ antiglobulin



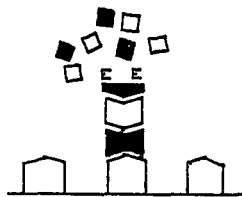
3.เติมแอนติเจนเกาะกับ specific antibody



4.เติมแอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์



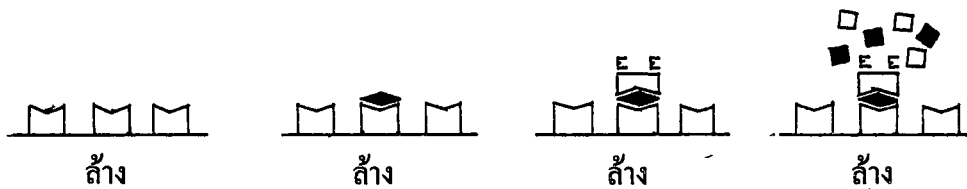
5.เติมสับสเตรต



6.วัดสีที่เกิดจากปฏิกิริยา

ภาพที่ 5 ELISA แบบไม่แข่งขัน แบบ antibody class capture assay
สำหรับวัดแอนติบอดี (IgG, IgM, IgA)

อีกวิธีหนึ่ง คือ indirect method (ภาพที่ 6) ใช้วัดปริมาณแอนติบอดี โดยการตรึงแอนติเจนกับผิวภาชนะ ล้างแล้วเติมตัวอย่างลงไป แอนติบอดีในตัวอย่างจะจับแอนติเจน ล้างแล้วเติมแอนติไทม์สลับสเตรด ซึ่งวิธีนี้ง่ายต่อการคัดเลือก IgG แอนติบอดี แต่ไม่เหมาะสมกับแอนติบอดีตัวอื่น เพราะ IgG แอนติบอดีที่ปรากฏในตัวอย่างสามารถเกิดพันธะได้พอดีกับส่วนที่เกิดพันธะของแอนติเจน (antigen binding site)



ภาพที่ 6 ELISA แบบไม่แข่งขัน แบบ indirect method สำหรับวัดแอนติบอดี

2. ELISA แบบแข่งขัน (competitive ELISA)

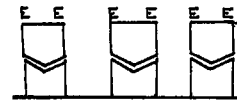
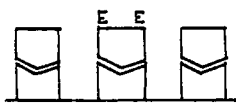
เกิดปฏิกิริยาการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่ติดฉลากกับแอนติเจนอิสระ ซึ่งการวัดแอนติเจนอิสระ จะทำการทดลองเป็น 2 ส่วนโดยการตรึงแอนติบอดีบนผิวของภาชนะ ล้างส่วนที่ไม่ถูกตรึงออก ส่วนหนึ่งเติมแอนติเจนที่ติดฉลากและสารตัวอย่าง อีกส่วนเติมแอนติเจนที่ติดฉลากอย่างเดียว ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ในส่วนแรกแอนติเจนแอนติเจนที่ติดฉลากกับแอนติเจนในสารตัวอย่างจะแย่งกันจับแอนติบอดี จากนั้นเติมแอนติไทม์สลับสเตรดลงไป ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป ปริมาณแอนติเจน คือ ความแตกต่างระหว่าง 2 ส่วน ในการวิเคราะห์แอนติเจนวิธีนี้ อาจมีปัญหาตรงการติดฉลากแอนติเจนซึ่งทำได้ยาก และแอนติเจนที่ติดฉลากอาจไปจับกับสารอื่นในตัวอย่าง จึงนิยมที่จะทำการวิเคราะห์แบบไม่แข่งขันมากกว่า ถ้าต้องการทำก็ให้เปลี่ยนเป็นการตรึงแอนติเจน และใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากแทน

1. ตรึงแอนติบอดีบนภาชนะ

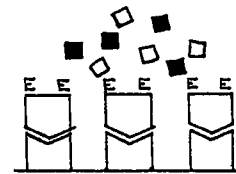
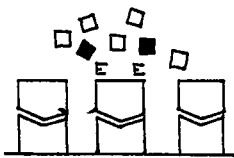


2. เติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์และตัวอย่าง

2. เติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ อย่างเดียว



3. เติมเอนไซม์ซับสเตรต



4. วัดสีที่เกิดจากปฏิกิริยา

ภาพที่ 7 แสดงถึง ELISA แบบแข่งขัน สำหรับวัดแอนติเจน

ในการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค ELISA ทุกแบบ มีขั้นตอนหลัก ดังนี้

1. การตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนผิวของแข็ง
2. การเติมตัวอย่างและสารอื่นๆ
3. การบ่มและการล้าง
4. การเติมแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์
5. การเติมสับสเตรตที่จำเพาะต่อเอนไซม์
6. การวัดและแปลผลของการทดลอง

เทคนิค ELISA เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถใช้จำแนกจุลินทรีย์ หรือหาปริมาณสารได้หลายชนิด ทั้งยังเป็นวิธีที่ทำงานง่าย สะดวก รวดเร็วและไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง แต่ต้องอาศัยความชำนาญในการติดฉลากสาร หรือการทำให้สารที่ติดฉลากมีความบริสุทธิ์ โดยทั่วไป ความไวของเทคนิค ELISA ค่อนข้างสูง สามารถใช้ตรวจหาแอนติเจนได้หลายชนิด ปริมาณที่วัดได้คือ 1-10 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่บางครั้งก็มีความไวน้อยกว่า RIA

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค ELISA มาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ มากมาย ได้แก่
ทางการแพทย์

1. ใช้ในการวินิจฉัยโรค การตรวจหาพวกแอนติเจนพวกไวรัส แบคทีเรีย ราหรือพยาธิและแอนติบอดีต่อจุลินทรีย์ต่างๆ
2. ใช้หาปริมาณฮอร์โมน เช่น ฮีสโตรเจน โปรเจสเตอโรน และอินซูลินที่ประสบความสำเร็จอย่างมาก
3. ใช้หาปริมาณสารบ่งชี้การเป็นมะเร็ง เช่น การหาปริมาณ oncofetal protein, α -fetoprotein (AFP) ในเซรัมของประชากรจำนวนมากๆ เพื่อดูโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในตับ เป็นต้น
4. ใช้หาปริมาณโปรตีนในเซรัม เช่น อิมมูโนโกลบูลิน, เฟอริติน, α -2-catoglobulin ใช้หาปริมาณพิษงูและแอนติบอดีต่อพิษงู
5. ใช้หาแอนติเจนที่เป็นตัวทำให้เกิดโรคติดเชื้อ เช่น การหาปริมาณทอกซินของ *Vibrio cholerae* และ *E. coli* ใช้หาแอนติเจนจาก *Brucella* และ *Salmonella*
6. ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี เช่น ทางไวรัสวิทยาจะใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสรูเบลลาที่ทำให้เกิดโรคหัดเยอรมัน หรือการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อ *Salmonella* O antigen ซึ่งทำให้เกิดอาการท้องเสีย
7. ตรวจหาแอนติบอดีหลังจากได้รับการฉีดวัคซีน เช่น ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อพิษสุนัขบ้า เพื่อทดสอบดูว่าผู้ป่วยตอบสนองต่อวัคซีนหรือไม่

ทางด้านชีวโมเลกุล

ใช้สำหรับตรวจหา monoclonal antibody ในกระบวนการสร้างแอนติบอดี โดยใช้เทคนิคไฮบริโดมา กระบวนการดังกล่าวจำเป็นต้องมีการตรวจหาแอนติบอดีที่รวดเร็ว มีความไวสูงและได้ผลที่นำเชื่อถือ

ทางการเกษตร

1. ใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสในสัตว์ มักใช้การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื่อนั้นๆ เช่น แอนติบอดีต่อ *Trichinella spiralis* ในซีรัมของหมู หรือการหาไวรัสโดยตรง ทำได้โดยตรงแอนติบอดีต่อไวรัสในไมโครไตเตอร์เพลต แล้วใช้แอนติบอดีติดฉลากที่มีความจำเพาะต่อไวรัส

2. ใช้ตรวจหาไวรัสในพืช เช่น *Candida* spp. หรือแบคทีเรียในปมรากถั่ว

จากตัวอย่างต่างๆ จะเห็นได้ว่าเทคนิค ELISA เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง สามารถจำแนกจุลินทรีย์หรือหาปริมาณสารได้หลายชนิด ทั้งยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ถึงแม้ว่าจะต้องใช้ความชำนาญสูงและการตรวจหาประสิทธิภาพขั้นสุดท้าย ที่อาจจะได้ความแม่นยำไม่เท่ากับ RIA แต่ ELISA ก็ยังเป็นวิธีที่น่าสนใจและมีการพัฒนากันต่อมาเรื่อยๆ

การวิจัย

การพัฒนาเทคนิค ELISA ในการตรวจหา *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารเป็นครั้งแรก เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1977 โดย Krysinski และ Heisch ได้นำเซลล์มาหอดและตรึงลงบนแผ่นกรอง cellulose-acetate จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมแอนติบอดีของกระต่ายที่มีความจำเพาะกับแฟลกเจลลา (anti *Salmonella typhimurium* flagella serum) ลงไป ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติม goat anti-rabbit serum ติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสลงไป ล้างออก เติมสับสเตรทไดอะมิโนเบนซิดีน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาล ถ้าใช้เบนซิดีนจะได้สีฟ้า วิธีนี้เป็นแบบ indirect technique แต่การทดลองนี้ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากแอนติบอดีไม่บริสุทธิ์

ในปี ค.ศ. 1978 Minnich ได้ทำการพัฒนาการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ โดยแยกเอา IgM ออกให้เหลือแต่ IgG ซึ่งจะสามารถแก้ปัญหาการเกิดปฏิกิริยาอื่นที่ไม่ต้องการได้ (cross reaction) ที่เกิดจากแอนติบอดีไปจับกับแอนติเจนของเชื้ออื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella* การแยก IgM ออกมา ทำได้โดยวิธีโครมาโตกราฟีและทดสอบความบริสุทธิ์ด้วย gel electrophoresis

ปี ค.ศ. 1983 Robinson และคณะ ทดลองการใช้ monoclonal antibody ในการตรวจหา *Samonella* พบว่า สามารถตรวจหา serotype ได้ร้อยละ 94

ปี ค.ศ. 1989 E. Prusak Sochaczeewski และ J.H.T.Loung ได้ทำการปรับปรุงเทคนิค ELISA ที่ให้ผลเป็นที่ยอมรับ โดยทำดังนี้

- การตรึงแอนติเจน
- การใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจง
- เลือกเอนไซม์สำหรับการติดฉลากแอนติบอดี
- วิธีติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์

- การวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์
- การเลือกและการค้นหาโปรตีนในการเคลือบเพลต

จุดประสงค์ของการศึกษา คือ เพื่อที่จะทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อความไวของเทคนิค ELISA และปรับปรุงกระบวนการทดสอบ เพื่อตรวจหา *Salmonella* spp. ที่มีชีวิตอยู่ในอาหาร

ในปัจจุบันการตรวจหา *Salmonella* spp. ได้มีการทำเป็นชุดตรวจวัด (kit) ขายในทางการค้า สำหรับการตรวจในอาหาร ได้แก่

- Bio-Enzabead *Salmonella* Screen Kit ใช้ monoclonal antibody 2 ชนิด
- Bactelisa Screen Kit for *Salmonella* ใช้ polyclonal antibody จำเพาะต่อ *Salmonella*
- TECRA immunocapture ELISA ตรวจหา *Salmonella* ในอาหาร
- ELISA Kit ตรวจหา *Salmonella* ในน้ำและน้ำเสีย

เอนไซม์ที่ใช้ในการติดฉลาก

เอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดี ควรมีความสมบัติดังนี้

1. สามารถวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่มีปริมาณอยู่ในขนาดนาโนกรัมได้
2. เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอชที่เหมาะสมกับ การจับกันระหว่างแอนติเจนแลแอนติบอดี
3. มีหมู่ -NH, -SH, CHO เป็นต้น ซึ่งจะใช้เชื่อมกับแอนติเจนหรือแอนติบอดีและหลังจากการเชื่อมกันแล้ว จะต้องสูญเสียประสิทธิภาพน้อยที่สุด
4. เอนไซม์ที่เชื่อมอยู่กับแอนติเจนหรือแอนติบอดี จะต้องมีความเสถียรทั้งในขณะที่ทำการทดลองและการเก็บรักษา
5. เอนไซม์มีราคาถูกและบริสุทธิ์ ละลายน้ำได้ดี
6. การวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ ใช้เครื่องมือราคาถูก เช่น สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดี มีหลายชนิด แต่ที่นิยมมากที่สุดคือ horseradish peroxidase หรือ HRPO และ alkaline phosphatase หรือ AP ซึ่งทั้ง 2 ชนิดมีราคาถูก มีประสิทธิภาพและความเสถียรที่สูง เก็บไว้ได้นาน สามารถเชื่อมกับโปรตีนแล้วไม่สูญเสียประสิทธิภาพ เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีสับสเตรตที่แตกต่างกัน

จากการทดลองมีการเปรียบเทียบเอนไซม์ที่ใช้ในการติดฉลากแอนติบอดี ระหว่าง HRPO และ AP พบว่าการติดฉลากที่ใช้ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์น้อย ก็สามารถให้ความไวในการวิเคราะห์สูงในทั้งสองชนิด และเอนไซม์ที่มีการเตรียมในห้องปฏิบัติการใช้ได้ดีกว่าที่มีขายทางการค้า

ชนิดของสับสเตรต

จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่นิยมใช้ คือ HRPO และ AP สับสเตรตที่ใช้จะต้องมีความเหมาะสมกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หลังการล้างจะเติมสับสเตรตและมีการบ่มเพื่อที่จะให้สับสเตรตนั้นจับกับเอนไซม์ ผลที่เกิดขึ้นนำมาเทียบกับค่า O.D มาตรฐาน

ก่อนการอ่านค่าต้องทำการหยุดปฏิกิริยาก่อนเสมอ โดยการเติมสารที่ใช้หยุดปฏิกิริยา (stop solution) เพื่อเปลี่ยนค่าพีเอช ทำให้สับสเตรตจับกับสารที่ใช้หยุดปฏิกิริยา

HRPO เป็นที่นิยมมากกว่า AP เนื่องจากราคาถูกกว่า จับตัวกันเป็นเนื้อเดียวกันและยังง่ายต่อการควบคุมด้วย

Orthophenylenediamine หรือ OPD นิยมใช้เป็นสับสเตรต ถึงแม้ว่าจะเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลาย (mutagenic) OPD นิยมใช้มากกว่า TMB, ABTS เนื่องจากเป็นตัวให้สีที่มีประสิทธิภาพดีกว่า และค่าพีเอชอยู่ในช่วงที่เหมาะสม คือ 4.0 ± 0.1 สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ citrate/phosphate และใช้โซเดียมเอไซด์ เป็นตัวเก็บรักษาสารเอาไว้

การตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนผิวของแข็ง

การตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนผิวของเพลต จะเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของเพลตกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี ในส่วนของโปรตีนที่เป็น non polar ทั้งของเพลต และของแอนติเจนหรือแอนติบอดี เป็นการยากที่จะตรึงแอนติเจน หรือแอนติบอดีให้ติดอยู่ได้ จึงมีการใช้สารที่มีคุณสมบัติที่ช่วยในการตรึง เช่น รั้งสีแกมมา หรือการใช้เอทานอล กรดไฮโดรคลอริก กลูตาโรลดิไฮด์ หรือ poly-1-lysine

Solonen และ Vaheri ทดลองใช้กรดไฮโดรคลอริก เอทานอล และกลูตาโรลดิไฮด์ พบว่า ไม่สามารถปรับปรุงการตรึงได้ และยังทำให้คุณสมบัติของแอนติเจนลดลง การใช้สารอื่น เช่น poly-1-lysine จะเพิ่มประสิทธิภาพการตรึง ตัวอย่างการใช้กับ polysaccharide antigen และ protamine sulphate (histone) การตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดี อาจใช้สารละลายบัฟเฟอร์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ เช่น สารละลาย carbonate/bicarbonate พีเอช 9.6 สารละลาย phosphate buffered saline (PBS) พีเอช 7.2 เป็นต้น

การใช้ coating buffer จะทำให้ความไวในการวิเคราะห์ดีขึ้น ส่วนมากใช้กับแอนติเจนที่เป็นของเหลวและแอนติเจนที่เป็นเชื้อไวรัส เช่น การใช้ sodium deoxycholate การใช้ monoclonal antibody บางตัวยากที่จะทำการตรึงบนผิวของเพลต จึงมีความจำเป็นที่ต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ กัน ในแต่ละช่วงพีเอชและความเข้มข้น

บทที่ 8 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. จุลินทรีย์

Salmonella typhimurium ATCC 14028

2. อุปกรณ์

- microplate reader และ washer
- centrifuge
- Spectrophotometer
- Autoclave
- เครื่องชั่ง
- ตู้บ่ม 37 °ซ.
- ตู้เย็น 4 °ซ. และ -20 °ซ.
- Flask Volume ขนาด 2,000, 1,000, 500 และ 50 มล.
- Microtiter plate ขนาด 96 หลุม
- Micropipette
- Pasteur pipette
- Pipette ขนาด 10, 5, 1.0 และ 0.1 มล.
- Micro tube
- บีกเกอร์ ขนาด 2,000, 1,000, 500, 250 และ 100 มล.
- กระจกบอกลวด ขนาด 1,000, 500, 100 และ 50 มล.
- จานเพาะเชื้อ
- หลอดทดลอง

3. สารเคมี

- NaCl
- KH_2PO_4
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- KCl
- Tween 80

- NaN_3
- Gelatin
- Citric acid
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Na_2HPO_4
- NaCO_3
- NaHCO_3
- Formalin
- OPD
- Goat anti rabbit IgG serum
- HCl
- NaOH

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (aseptic technique)

1.1 ใช้ loop ลนไฟให้ร้อนแดง ทิ้งให้เย็น เชี่ยเชื้อ *S.typhimurium* ATCC 14028 จาก stock ลงใน slant ลงใน media นำไปบ่มที่ 37°C . 48 ชม.

1.2 เชื้อที่ได้นำมาถ่ายลงในจานอาหาร โดยวิธี spread plate บ่มที่ 37°C . 48 ชม เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์

1.3 เตรียมซัสเพนชันของเชื้อที่ได้จากข้อ 1.2 โดยใช้ NaCl 0.85 % เก็บในหลอดทดลอง ในตู้เย็น

1.4 นับจำนวนโคโลนีโดยวิธี standard plate count เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อ (ควรเตรียมให้เชื้อมีความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมล.)

1.5 นำซัสเพนชันของเชื้อ 10^9 เซลล์ต่อมล. มาเติม formalin ให้ได้ความเข้มข้น 0.25 % บ่มที่ 72°C . 1 ชม. ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อโดยการทำให้ spread plate

2. การเตรียม Antibody (aseptic technique)

2.1 ในการทดลองนี้ใช้กระต่ายสีขาวพันธุ์ New Zealand White น้ำหนัก 2.7 กิโลกรัมซื้อจากภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2.2 การฉีดเชื้อเข้ากระต่าย จะฉีดเชื้อที่เตรียมในข้อ 1.5 เข้าสู่เส้นเลือดดำ บริเวณใบหู โดยฉีดตั้ง

นี้

dose 1 ฉีด 0.1 มล.	ในวันที่ 1
dose 2 ฉีด 0.3 มล.	ในวันที่ 4
dose 3 ฉีด 0.5 มล.	ในวันที่ 7
dose 4 ฉีด 1.0 มล.	ในวันที่ 10
dose 5 ฉีด 2.0 มล.	ในวันที่ 13

ก่อนการฉีดทุกครั้งต้องทำการเจาะเอาเลือด ประมาณ 20-40 มล. เพื่อแยกซีรัมเพื่อทดสอบหาปริมาณแอนติบอดี ถ้าแอนติบอดีไตเตอร์ยังไม่สูงพอสามารถที่จะฉีดกระตุ้นได้อีก

2.3 การเจาะเลือด

- เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่ใบหู ครั้งละ 20-40 มล. เก็บในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

- ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดจับกันเป็นก้อนที่อุณหภูมิห้อง
- ใช้ loop ผ่านการฆ่าเชื้อ คว่ำรอบ ๆ หลอดค้ำใน ให้ก้อนเลือดหลุดจากข้างหลอด
- ล้าง loop ที่ใช้ให้สะอาด
- เก็บเลือดแช่เย็นที่ 4°C. ค้างคืน
- นำส่วนใสถ่ายใส่หลอด centrifuge (ใช้ pasteur pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้ว)ปั่นที่ 1,500 g

5-10 นาที

- เปิดส่วนใสใส่ microtube ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 0.5 มล. ติดฉลาก

เก็บที่ -20°C.

3. การวิเคราะห์ ELISA

- เคลือบเพลทด้วย Ag 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 4°C. ค้างคืน
- ล้างเพลทด้วย PBS tween 3 ครั้ง
- block ด้วย 3 % gelatin ใน PBS 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37°C. 1 ชม.
- ล้างเพลทออกด้วย PBS tween 3 ครั้ง
- เติมซีรัมจากกระต่าย 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37°C. 1 ชม.
- ล้างเพลทด้วย PBS tween 3 ครั้ง
- เติม goat anti rabbit IgG serum ความเข้มข้น 1:4,000 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37°C. 1 ชม.

- ล้างเพลทด้วย PBS tween 3 ครั้ง
- เติม enzyme substrate 100 ไมโครลิตร/หลุม ปิดด้วยกระดาษฟอล์ยป้องกันแสง เก็บที่อุณหภูมิห้อง 10-20 นาที
- หยุดปฏิกิริยาคด้วยกรด ซัลฟิวริก 4 N 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
- เคาะเพลทเบา ๆ ให้เกิดการผสมกัน อ่าน O.D โดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ 492 นาโนเมตร

การวิเคราะห์เพื่อศึกษาผลการทดลอง

วิธีการวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์ทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ ELISA (ข้อ 3) แต่ใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดี ตามขั้นตอนการวิเคราะห์แต่ละวิธีดังนี้

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจน

วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมแอนติเจน

- เจือจางเชื้อ *S.typhimurium* (Ag) จาก stock ความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น $10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10$ และ 1 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ coating buffer เป็นสารเจือจาง

- นำเชื้อที่ได้ไปเคลือบเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยให้แถวที่ 1 และ 2 ทั้งแถวเป็นความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เรียงตามลำดับความเข้มข้นที่ลดลงจนครบ

2. การเตรียมแอนติบอดี

- แอนติบอดีที่ได้จากซีรัมกระต่ายนำมาเจือจางให้ได้ $1:10, 1:10^2, 1:10^3, 1:10^4, 1:10^5, 1:10^6$ และ $1:10^7$ โดยใช้สารละลายเจือจาง (diluent)

- เติมซีรัมกระต่ายหลุมละ 100 ไมโครลิตร ตามแถวในแนวนอน โดยให้แถว A ทั้งแถวเป็นความเจือจาง 1:10 เท่า แถว B ทั้งแถวเป็นความเจือจาง $1:10^2$ เท่า เรียงตามลำดับจนครบทุกความเข้มข้น ซึ่งจะเหลือ 2 แถว (G และ H) ให้เติม blank โดยการเติม diluent

2. การหาความแตกต่างของการใช้แอนติเจนที่ซัสเพนด์ในสารละลายที่มี formalin และไม่มี formalin

วิธีการวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในข้อ 1 แต่ใช้แอนติเจน ในสารละลายที่มี formalin และไม่มี formalin เพื่อเปรียบเทียบผล

3. การหาปริมาณการสร้างแอนติบอดีของกระต่าย

วิธีการวิเคราะห์

1. การเจือจางแอนติเจน

- เจือจางแอนติเจนให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมตามผลการวิเคราะห์ในข้อ 1
- เคลือบเพลตด้วยแอนติเจนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม 100 ไมโครลิตร/หลุม

เหมือนกันทุกหลุม

2. การเจือจางแอนติบอดี

- เจือจางแอนติบอดีจาก stock ของแต่ละวันให้ได้ความเข้มข้นดังการ

วิเคราะห์ในข้อ 1

-การเติมแอนติบอดีของแต่ละวัน ให้เติมแอนติบอดีของวันที่ 1 ในแถวที่ 1 และ 2 ทั้งแถว และวันที่ 2 ในแถวที่ 3 และ 4 ทั้งแถว เรียงตามลำดับจนครบทุกวัน

4. การศึกษาปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับ *S.typhimurium* 2 สายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรียอื่น

วิธีการวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในข้อ 1 แต่เปลี่ยนแอนติเจนจาก *S. typhimurium* เป็น *S.typhimurium* S96, *S.typhimurium* S292, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* เพื่อเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดี

5. การหาความแตกต่างของผลการทดลองที่ทดสอบในวันเดียวกันและระหว่างวัน

วิธีการวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในข้อ 1 โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 2 เพลต และทำการวิเคราะห์ในสถานะเดียวกันในวันถัดไป เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลอง



ภาพที่ 3-1 แสดง microplate reader รุ่น LP 400 ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 3-2 เครื่องล้างเพลตรุ่น LP 35



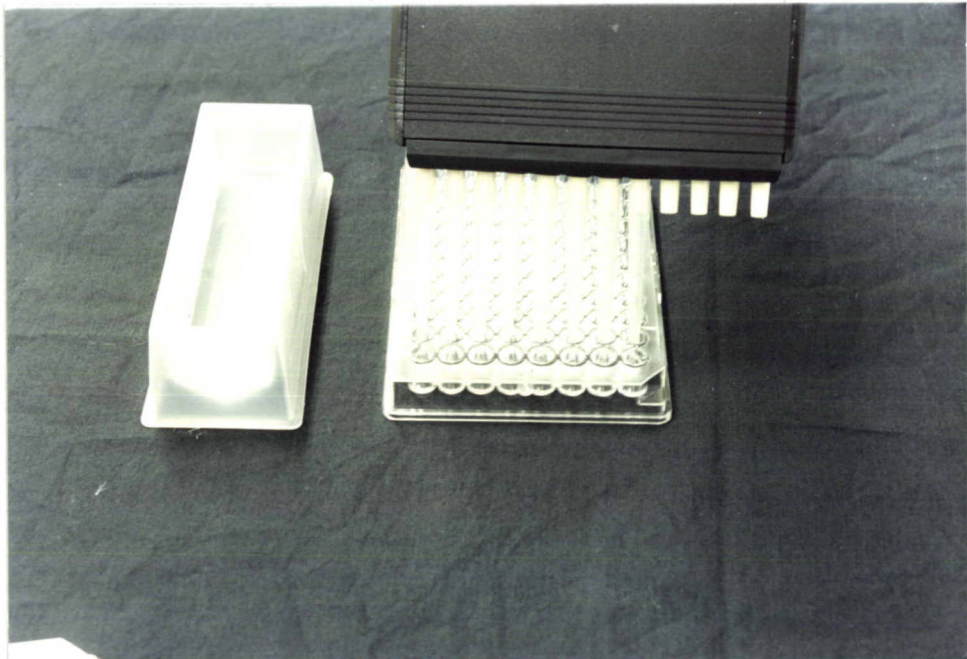
ภาพที่ 3-3 แสดงการเจาะเลือดจากหูกระต่ายเพื่อแยกซีรัม



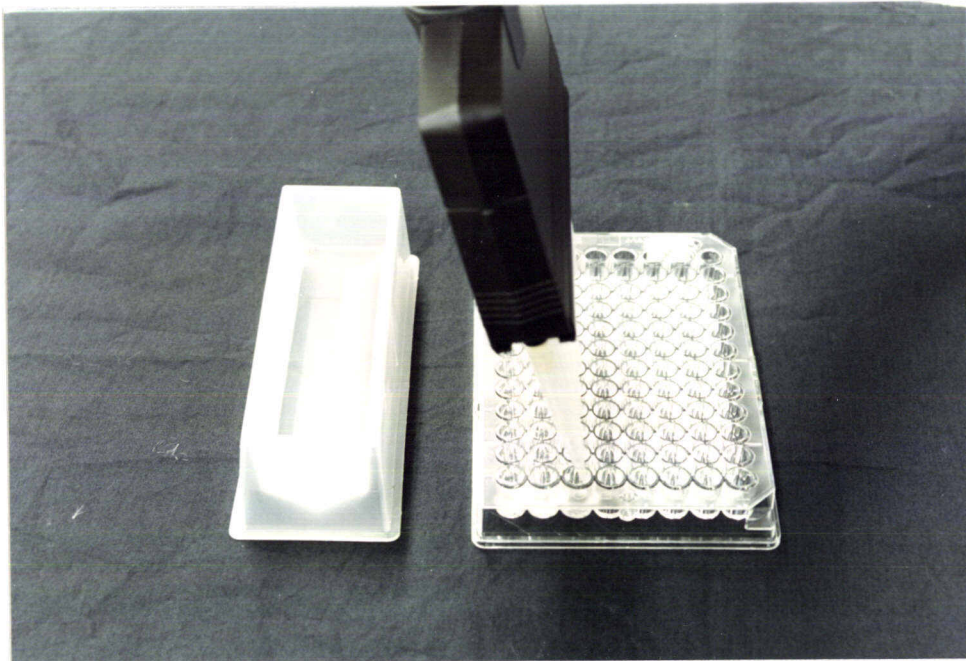
ภาพที่ 3-4 แสดงการฉีดเชื้อ *S.typhimurium* เข้าเส้นเลือด Vein เพื่อให้กระต่ายสร้างแอนติบอดี



ภาพที่ 3-5 การแยกซีรัมจากเลือดกระต่าย



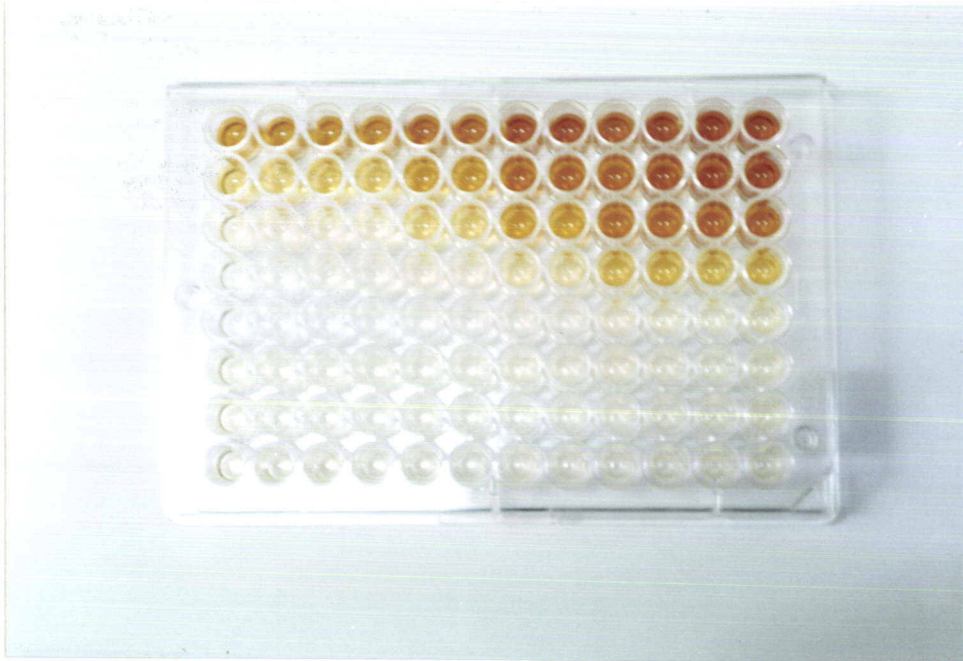
ภาพที่ 3-6 แสดงการเคลือบแอนติเจนบนไมโครไตเตอร์เพลทชนิด 96 หลุม



ภาพที่ 3-7 แสดงการเคลือบแอนติบอดีเพื่อให้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน



ภาพที่ 3-8 แสดงการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดซัลฟิวริก 4 N



ภาพที่ 3-9 แสดงผลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จับกับซับสเตรต

บทที่ 4

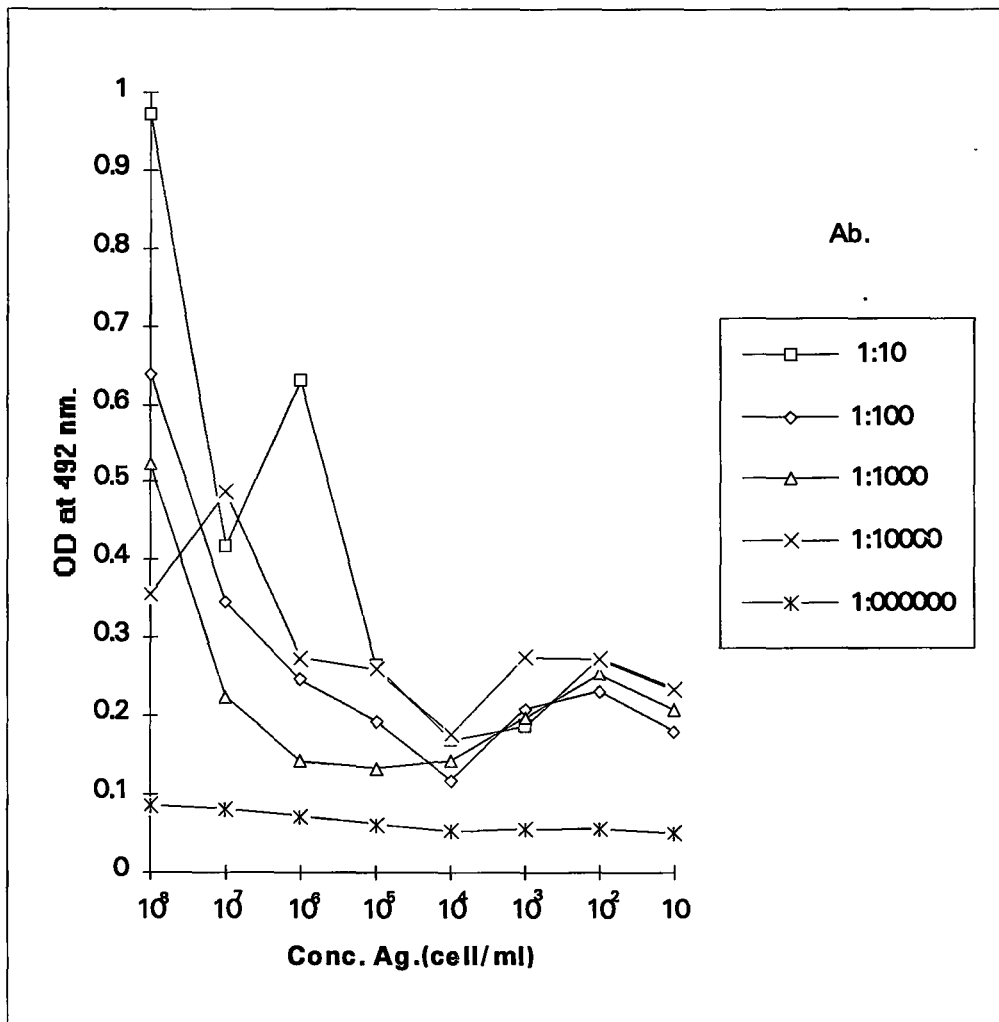
ผลการทดลอง

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นแอนติบอดีและแอนติเจน

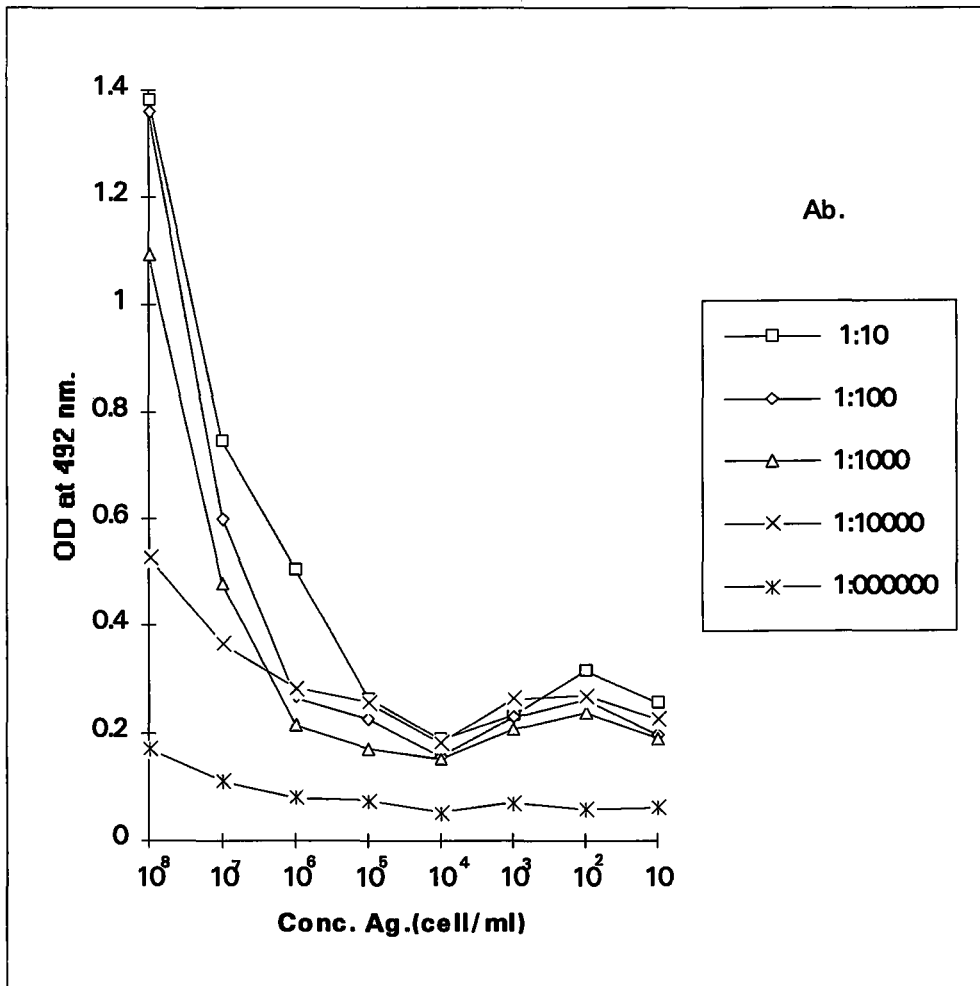
จากการทดลองกับซีรัมจากกระต่าย 2 ตัว คือ H-73 และ H-74 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ *S.typhimurium* ATCC 14028 โดยวิธี ELISA ซึ่งเราสามารถพิจารณาจากกราฟของผลการทดลองที่ทำการเปรียบเทียบแอนติบอดีและแอนติเจนในความเข้มข้นต่างๆ ได้ผลดังภาพที่ 4-1 และ 4-2

A: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD. กับความเข้มข้นของแอนติเจน

B: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD. กับความเข้มข้นของแอนติบอดี



ภาพที่ 4-1A การหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติบอดี : แอนติบอดีจากซีรัมกระต่าย H-73 .

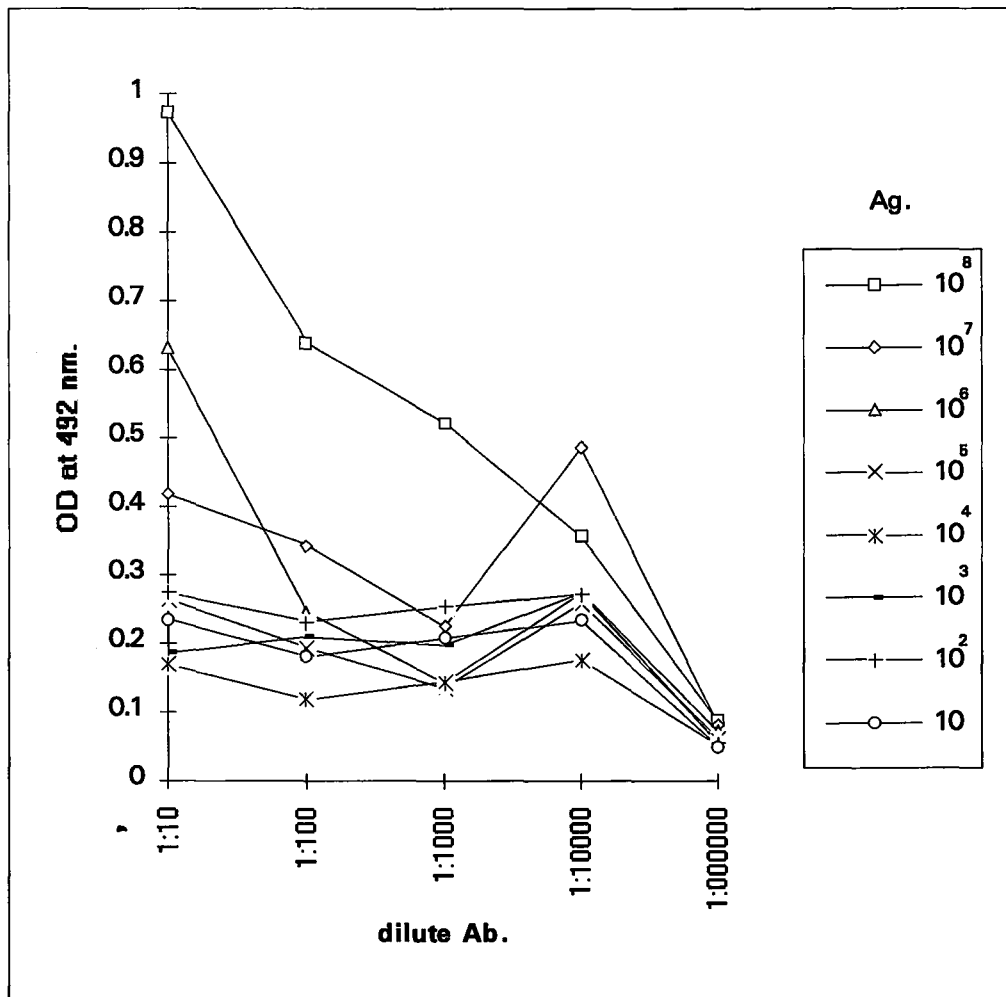


ภาพที่ 4-2A การหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติบอดี : แอนติบอดีจากซีรัมกระต่าย

H-74

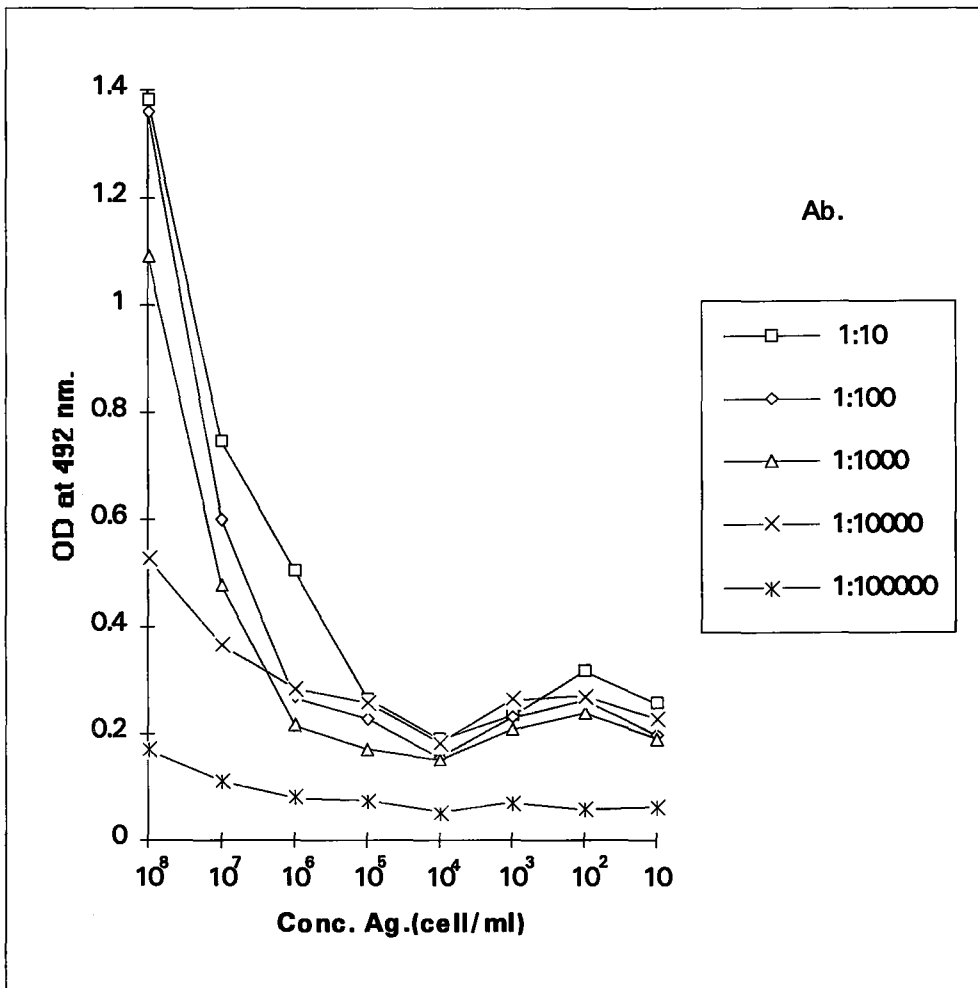
หลักการในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนโดยการพิจารณาเส้นกราฟที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ที่ให้ผลการตรวจวัดที่สูงซึ่งเส้นกราฟนั้นจะต้องลดลงช้าๆ

จากภาพที่ 4-1A และ 4-2A พอสรุปได้ว่า แอนติบอดีที่เหมาะสมคือ 1:1000 ที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดในการศึกษา ELISA ซึ่งเส้นกราฟของ 1:1000 จะให้ผลคล้าย 1:100 แต่ถ้าใช้ความเข้มข้น 1:100 จะสิ้นเปลืองแอนติบอดี



ภาพที่ 4-1B การหาสถานะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติเจน : แอนติบอดีจากซีรัมกระต่าย

H-73



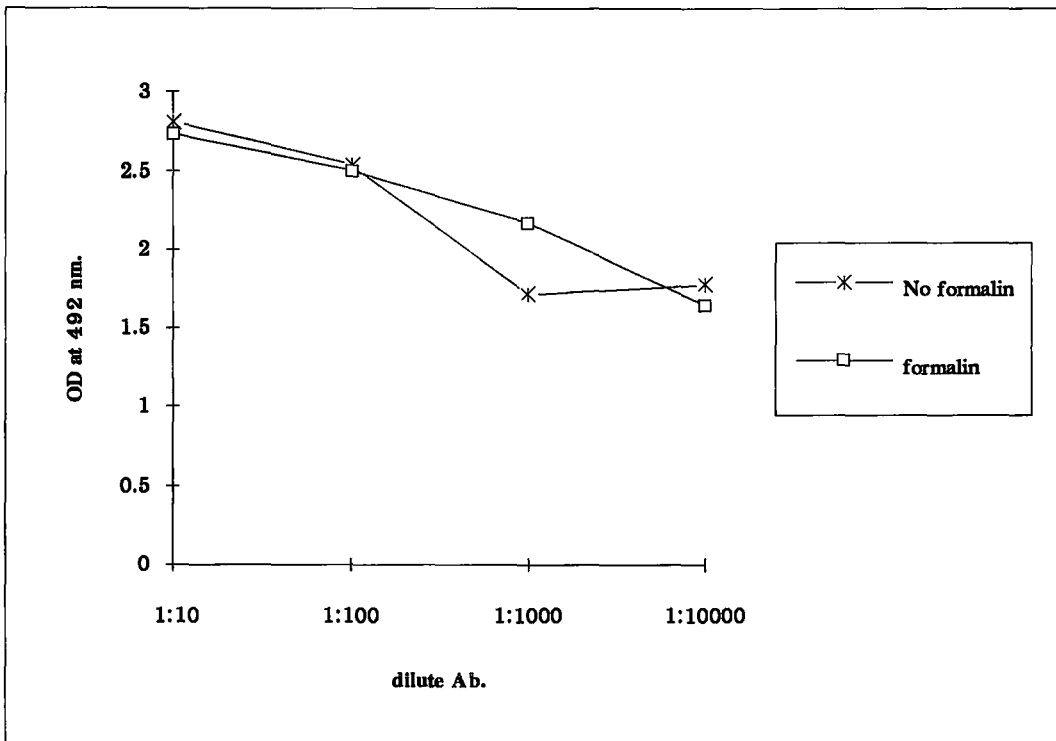
ภาพที่ 4-2B การหาสถานะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติเจน :แอนติบอดีจากซีรัมกระต่าย

H-74

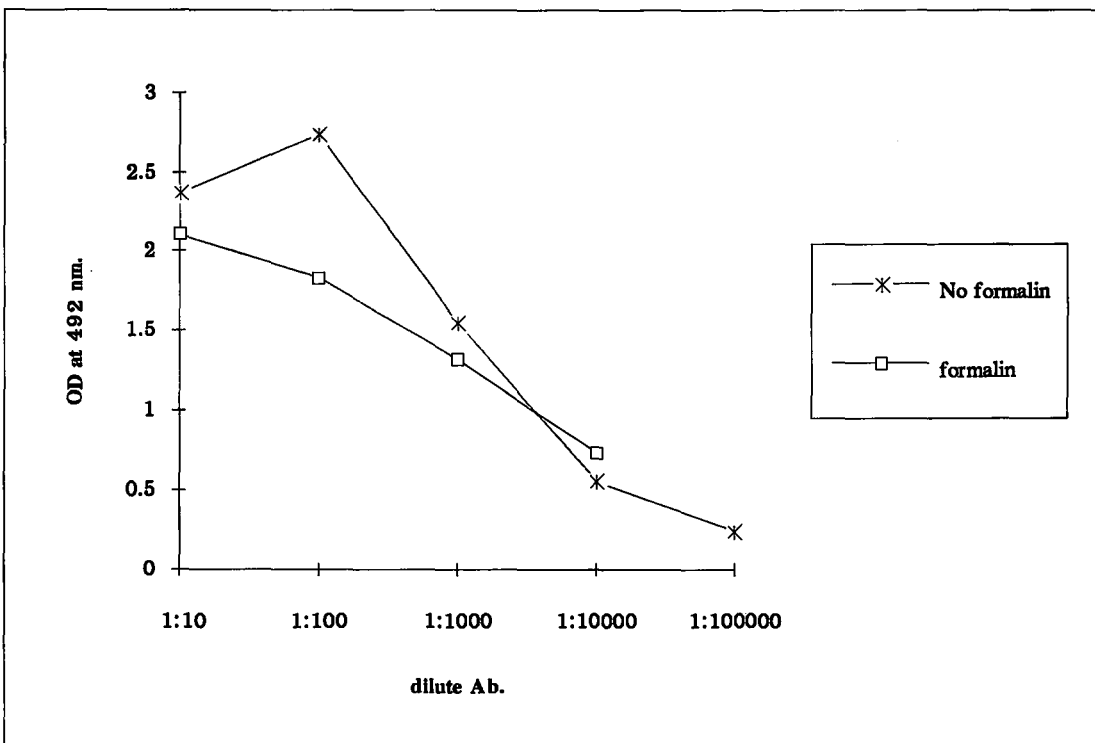
จากภาพที่ 4-1B และ 4-2B พอสรุปได้ว่า แอนติเจนที่เหมาะสมในการศึกษา ELISA คือ 1:10 ซึ่งความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 10⁹ เซลล์ต่อมิลลิลิตรเพราะฉะนั้นความเข้มข้นที่ได้คือ 10⁸ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.การหาความแตกต่างของการใช้แอนติเจนที่ซัสเพนด์ในสารละลายที่มี formalin และไม่มี formalin

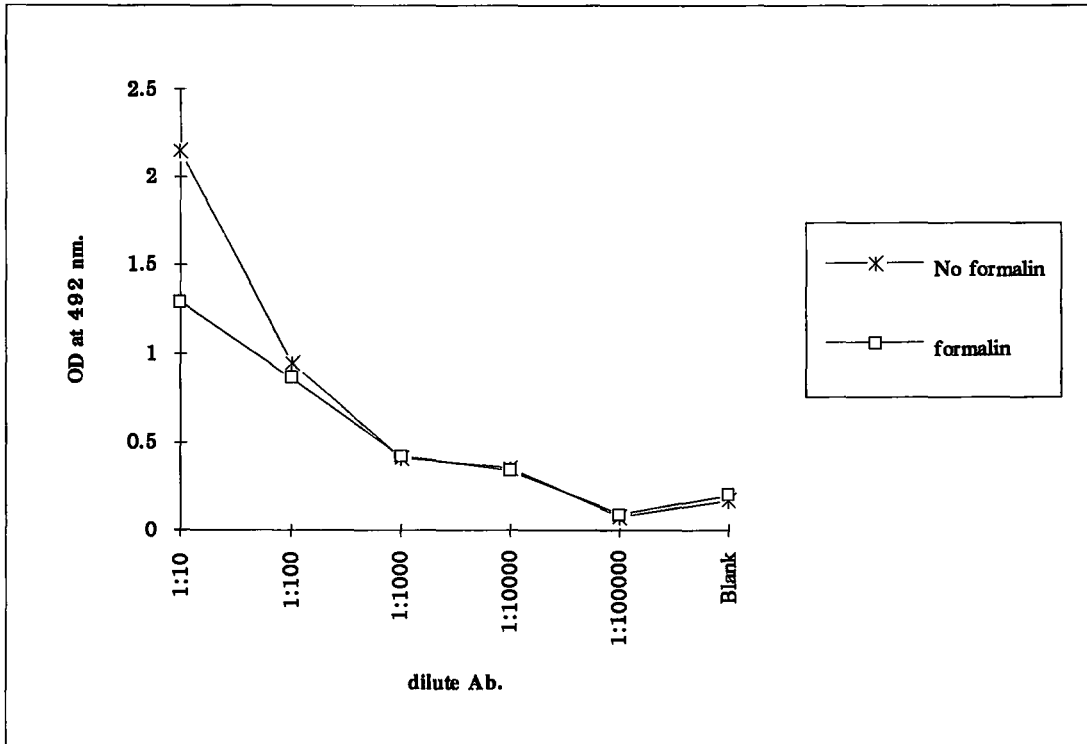
การเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ *S.typhimurium* ที่ซัสเพนด์ในสารละลายที่มี formalin และ ไม่มี formalin ซึ่งจะเปรียบเทียบเป็นแต่ละความเข้มข้นคือ 10⁸,10⁶,10⁴ เซลล์ต่อ มิลลิลิตร ได้ดังภาพที่ 4-3, 4-4 และ 4-5



ภาพที่ 4-3 กราฟเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ *S.typhimurium* ATCC 14028 ที่ซัสเพนด์ในสารละลายที่มี formalin และ ไม่มี formalin ที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์/มล.



ภาพที่ 4-4 กราฟเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ *S.typhimurium* ATCC 14028 ที่ซัสเพนด์ในสารละลายที่มี formalin และ ไม่มี formalin ที่ความเข้มข้น 10^6 เซลล์/มล.



ภาพที่ 4-5 กราฟเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ *S.typhimurium* ATCC 14028 ที่ซัสเพนด์ในสารละลายที่มี formalin และ ไม่มี formalin ที่ความเข้มข้น 10^4 เซลล์/มล.

จากภาพที่ 4-3 การเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ *S.typhimurium* ATCC 14028 ที่ซัสเพนด์ในสารละลายที่มี formalin และ ไม่มี formalin ที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรพบว่าไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ

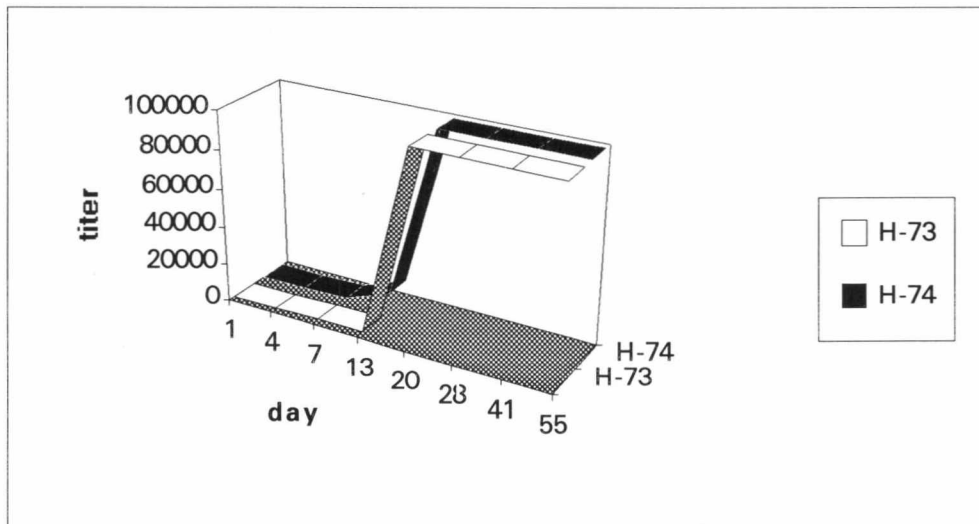
จากภาพที่ 4-4 การเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ *S.typhimurium* ATCC 14028 ที่ซัสเพนด์ในสารละลายที่มี formalin และ ไม่มี formalin ที่ความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรพบว่าที่ความเจือจาง 1:10 และ 1:100 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากภาพที่ 4-5 การเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ *S.typhimurium* ATCC 14028 ที่ซัสเพนด์ในสารละลายที่มี formalin และ ไม่มี formalin ที่ความเข้มข้น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรพบว่าที่ความเจือจาง 1:10 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

8. การหาแอนติบอดีไตเตอร์ของซีรัมกระต่าย

หลังการกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีแล้วจะทำการเจาะเลือดเพื่อแยกซีรัมมา

ตรวจหาไตเตอร์ ได้ผลดังภาพที่ 4-6

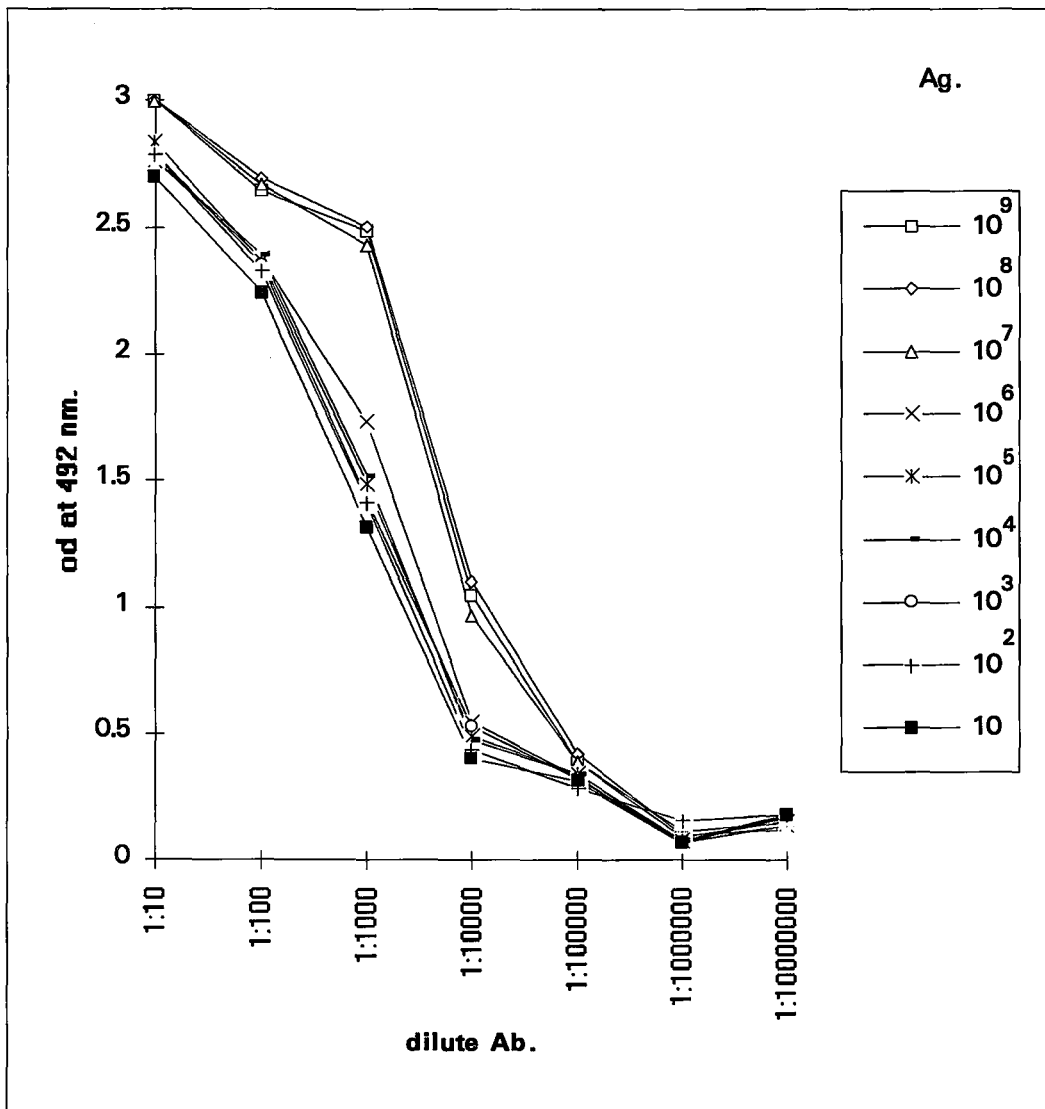


ภาพที่ 4-6 แสดงค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของซีรัมของกระต่าย H-73 และ H-74 ที่เจาะได้ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 55

จากกราฟจะพบว่าการสร้างแอนติบอดีจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 26 ซึ่งจะมีปริมาณสูงสุด และจะคงที่ระยะหนึ่งแล้วจึงลดลง

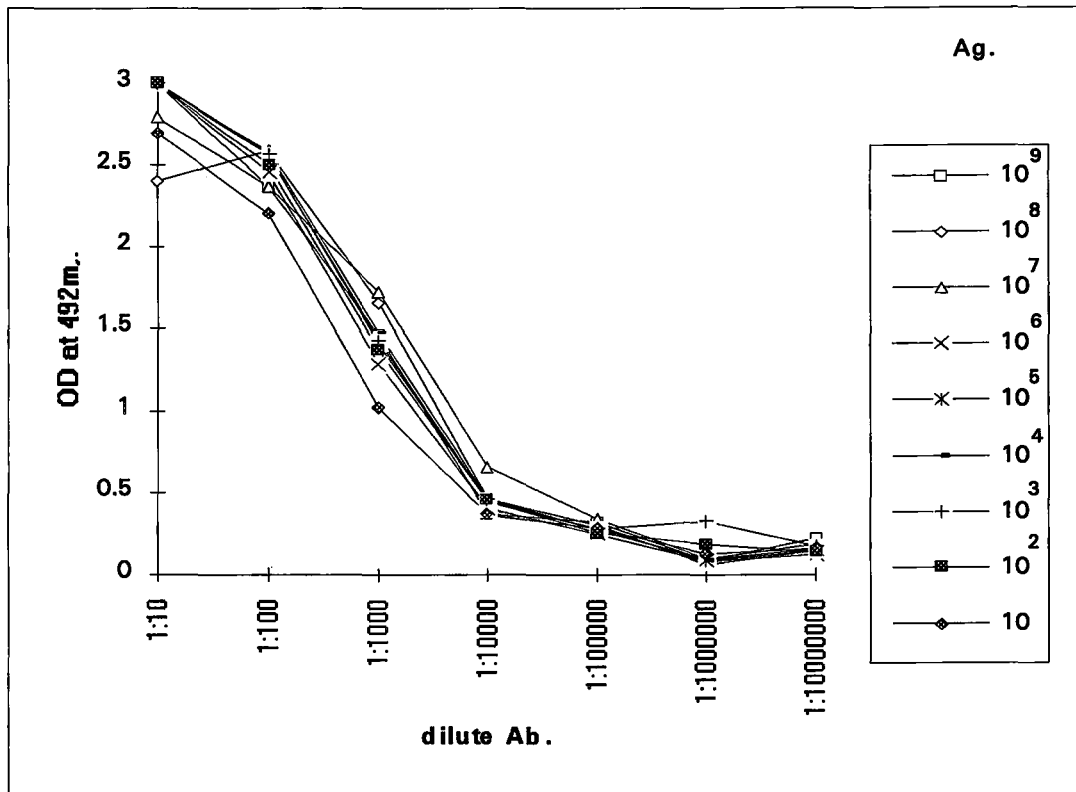
4. การศึกษาปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับ *S.typhimurium* 2 สายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ

การทดลองนี้เพื่อจะได้พิจารณาถึงความจำเพาะของแอนติบอดีที่มีต่อเชื้อ *S.typhimurium* ต่างสายพันธุ์ 2 สายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ได้แก่ *E. coli*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Staphylococcus aureus* ได้ผลดังภาพที่ 4-7 และ 4-8



ภาพที่ 4-7 แสดงปฏิกิริยาของ Anti-*S.typhimurium* ATCC 14028 serum กับ *S.typhimurium*

S292



ภาพที่ 4-8 แสดงปฏิกิริยาของ Anti-*S.typhimurium* ATCC 14028 serum กับ *S.typhimurium*

S96

จากภาพที่ 4-7 และ 4-8 แสดงให้เห็นว่า *S. typhimurium* แม้จะต่างสายพันธุ์ ก็สามารถให้ผลบวกได้

การแสดงผลสามารถแสดงอยู่ในรูปของตารางเนื่องจากผลการทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ให้ผลค่อนข้างต่ำและเพื่อง่ายต่อการศึกษา ซึ่งได้ผลดังนี้ตารางที่ 1 แสดงผลในการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับ *S.typhimurium* กับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ

จากตารางจะพบว่า จุลินทรีย์ที่เป็น *S.typhimurium* ทั้งที่เป็น ATCC14028 , S292 และ S96 ให้ผลบวกหมด ส่วนเชื้อแบคทีเรียตัวอื่นให้ผลคือ *E.coli* จะให้ผลลบทั้งหมด *Pseudomonas spp.* จะให้ผลบวกเฉพาะที่ความเข้มข้นของแอนติบอดีมากกว่า 1:10⁵ ส่วนเชื้อ *Staphylococcus aureus* จะให้ผลบวกที่ความเข้มข้นของแอนติบอดีมากกว่า 1:10⁴ และเชื้อ *Bacillus spp.* จะให้ผลบวกที่ความเข้มข้นของแอนติบอดีสูงกว่า 1:10⁴ ซึ่งที่ความเข้มข้นแอนติบอดี 1:10⁵ และ 1:10⁶ จะวัดได้ที่ความเข้มข้นของ แอนติเจนมากกว่าหรือเท่ากับ 10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ความเข้มข้นแอนติบอดี 1:10⁴ จะวัดได้ที่ความเข้มข้นแอนติเจนมากกว่าหรือเท่ากับ 10⁶ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นแอนติบอดี 1:10³ และ 1:10² จะวัดได้ที่ความเข้มข้นแอนติเจนมากกว่าหรือเท่ากับ 10⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วน

ความเข้มข้นแอนติบอดี 1:10 สามารถวัดได้ถึงความเข้มข้นแอนติเจนมากกว่าหรือเท่ากับ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 1 แสดงผลในการทำปฏิกิริยาของ anti-*S. typhimurium* ATCC 14028 serum กับ *S.*

typhimurium 2 สายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ

เชื้อ	แอนติบอดี						
	ความเจือจาง	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵	1:10 ⁶
<i>S. typhimurium</i> :ATCC 14028	1:10 ⁹	+	+	+	+	+	+
	1:10 ⁸	+	+	+	+	+	+
	1:10 ⁷	+	+	+	+	+	+
	1:10 ⁶	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i> :S292	1:10 ⁹	+	+	+	+	+	+
	1:10 ⁸	+	+	+	+	+	+
	1:10 ⁷	+	+	+	+	+	+
	1:10 ⁶	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i> :S96	1:10 ⁹	+	+	+	+	+	+
	1:10 ⁸	+	+	+	+	+	+
	1:10 ⁷	+	+	+	+	+	+
	1:10 ⁶	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> spp.	1:10 ⁷	+	+	+	+	+	+
	1:10 ⁶	+	+	+	+	-	-
	1:10 ⁵	+	+	+	-	-	-
	1:10 ⁴	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1:10 ⁸	+	+	+	-	-	-
	1:10 ⁷	+	+	+	-	-	-
	1:10 ⁶	+	+	+	-	-	-
	1:10 ⁵	+	+	+	-	-	-

<i>E. coli</i>	1:10 ⁸	-	-	-	-	-	-
	1:10 ⁷	-	-	-	-	-	-
	1:10 ⁶	-	-	-	-	-	-
	1:10 ⁵	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1:10 ⁸	+	+	+	+	-	-
	1:10 ⁷	+	+	+	+	-	-
	1:10 ⁶	+	+	+	+	-	-
	1:10 ⁵	+	+	+	+	-	-

5. การหาความแตกต่างของผลการทดลองในวันเดียวกัน และ ระหว่างวัน

การหาความแตกต่างของผลการทดลองในวันเดียวกัน และระหว่างวัน จะใช้การคำนวณทางสถิติ โดยใช้การหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD.) ของค่า OD เพื่อนำมาพิจารณาถึงผลความคลาดเคลื่อนของข้อมูลที่ทำกรทดลองได้

ตารางที่ 2 แสดงช่วงของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า OD ที่ทดสอบในวันเดียวกัน และ ระหว่างวัน ของแต่ละความเข้มข้นของแอนติบอดี

dilute Ab.	ช่วงของค่า SD	
	วันเดียวกัน	ระหว่างวัน
1:10 ⁹	0.016738-0.383472	0.016738-0.507658
1:10 ⁸	0-0.358841	0.020559-0.330438
1:10 ⁷	0-0.223374	0.030898-0.329828
1:10 ⁶	0.05167-0.191772	0.099167-0.578251
1:10 ⁵	0.02542-0.063048	0.029394-0.618565
1:10 ⁴	0.015707-0.221239	0.012859-0.649977
1:10 ³	0.013322-0.138362	0.02613-0.507628

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ในการตรวจหาเชื้อ *S. typhimurium* ATCC 14028 โดยเทคนิค ELISA พบว่าสถานะที่เหมาะสมต่อการศึกษาโดยใช้เทคนิคดังกล่าวจะใช้เชื้อ *S. typhimurium* ATCC 14028 ที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของแอนติบอดีคือ 1:1000 ของซีรัมที่ได้จากกระต่ายในวันที่ 20 หลังการฉีดเชื้อครั้งแรก

จากการทดลองพบว่า formalin จะมีผลในบางความเข้มข้นของทั้งแอนติบอดีและแอนติเจน บางความเข้มข้นเท่านั้นคือ ที่แอนติเจน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนที่แอนติเจน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะแตกต่างกันที่ความเข้มข้นแอนติบอดี 1:10 และ 1:100 ส่วนที่แอนติเจน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรจะแตกต่างกันที่ความเข้มข้นของแอนติบอดี 1:10 เท่านั้น

การสร้างปริมาณแอนติบอดีของกระต่ายพบว่าจะสร้างได้ปริมาณสูงในวันที่ 20 นับจากวันแรกที่เริ่มฉีดเชื้อเข้าไปในกระต่าย ซึ่งปริมาณแอนติบอดีจะคงที่ในช่วงระยะหนึ่งและจะลดลงอย่างช้าๆ

ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับ *S. typhimurium* ต่างสายพันธุ์ให้ผลการทดสอบเป็นบวก *E.coli* ให้ผลเป็นลบในทุกความเข้มข้น *Pseudomonas* spp. จะให้ผลบวกเฉพาะที่ความเข้มข้นของแอนติบอดีมากกว่า $1:10^5$ *Staphylococcus aureus* จะให้ผลบวกที่ความเข้มข้นของแอนติบอดีมากกว่า $1:10^4$ และ *Bacillus* spp. จะให้ผลบวกที่ความเข้มข้นของแอนติบอดีสูงกว่า $1:10^4$ ซึ่งที่ความเข้มข้นแอนติบอดี 1:10⁵ และ 1:10⁶ จะวัดได้ความเข้มข้นแอนติเจน มากกว่าหรือเท่ากับ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ความเข้มข้นแอนติบอดี 1:10⁴ จะวัดได้ความเข้มข้นแอนติเจนมากกว่าหรือเท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นแอนติบอดี 1:10³ และ 1:10² จะวัดได้ความเข้มข้นแอนติเจนมากกว่าหรือเท่ากับ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นแอนติบอดี 1:10 สามารถวัดได้ความเข้มข้นแอนติเจนมากกว่าหรือเท่ากับ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

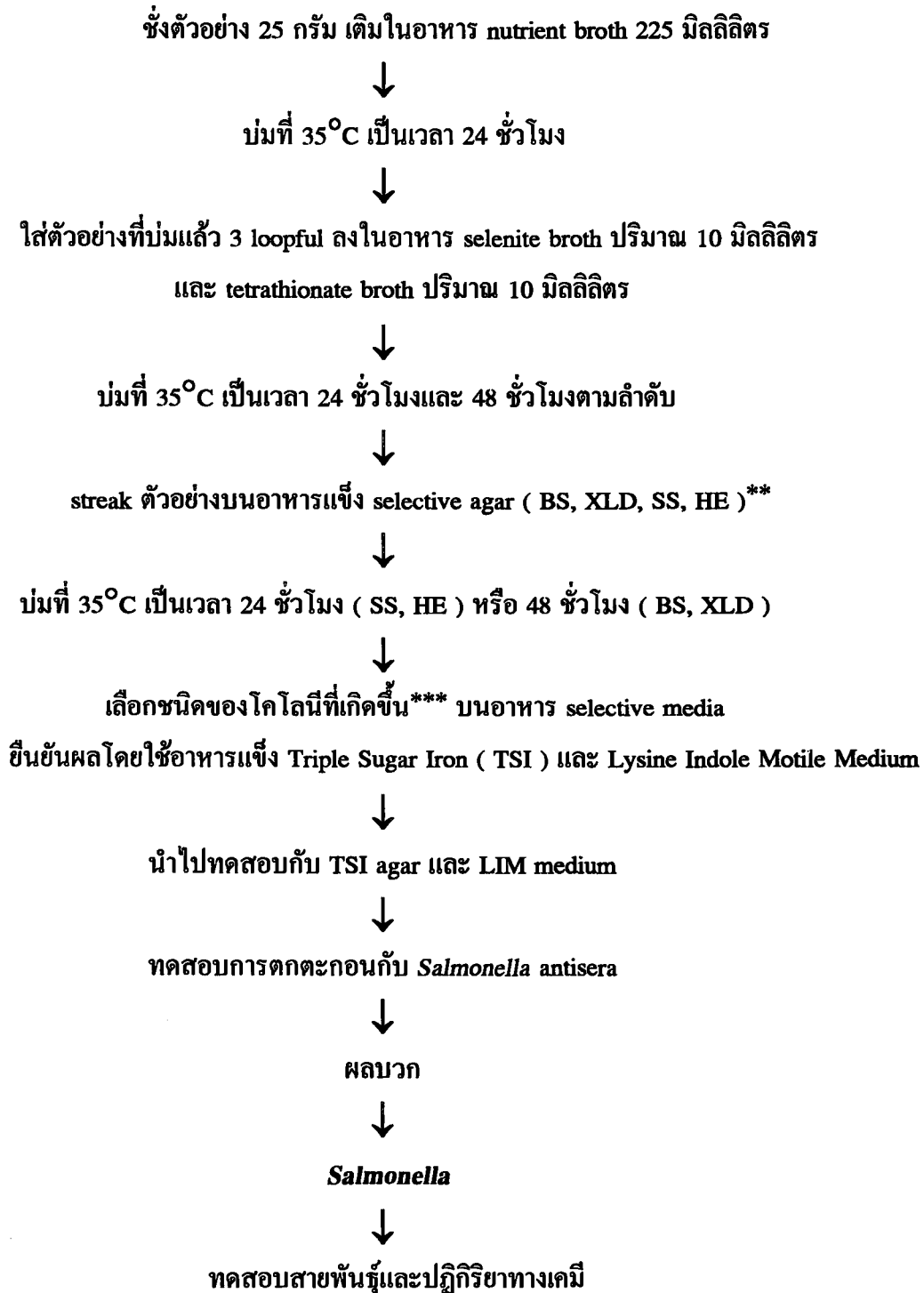
ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของ OD ในการทดลองในวันเดียวกันและระหว่างวันที่ได้จะมีความคลาดเคลื่อนอยู่ระหว่าง 0.00-0.618

จากการทดลองนี้เรายังสามารถทำการศึกษาต่อถึงความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมาโดยการเทียบกับแอนติบอดีมาตรฐานที่มีอยู่ หรือ การพัฒนากระบวนการผลิตแอนติบอดีให้มีความจำเพาะมากขึ้นแล้วนำไปทดสอบเชื้อที่ปนเปื้อนกับอาหารอื่นๆต่อไป

ภาคผนวก ก

การตรวจหา *Salmonella* spp. โดยวิธีทั่วไป

ขั้นตอนการทำ



** BS (Bismuth Sulfite Agar)

XLD (Xylose Lysine Desoxycholate Agar)

SS (Salmonella Shigella Agar)

HE (Hektoen Enteric Agar)

- ***
- a. *Salmonella* spp. ที่เกิดบน BS ปรากฏเป็นสีน้ำตาลหรือเทาจนถึงดำ บางครั้งเป็นสี metallic sheen อาหารที่อยู่รอบๆจะเป็นสีน้ำตาล
 - b. โคโลนีที่เกิดบน XLD จะเป็นสีแดงหรือชมพู และมีจุดสีดำอยู่ตรงกลาง
 - c. *Salmonella* spp. ที่เกิดบน SS โคโลนีจะไม่มีสี ชุ่ม และมีจุดดำตรงกลาง
 - d. *Salmonella* spp. ที่เกิดบน HE โคโลนีมีสีน้ำตาลเงินแกมเขียว และมีจุดดำตรงกลาง

ภาคผนวก ข

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่งปอกเปลือก หั่นชิ้นเล็ก	200 กรัม
กลูโคส	20 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

2. Nutrient Agar (NA)

Lab-Lemco powder	1 g
Yeast extract	2 g
Peptone	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
น้ำกลั่น	1 ลิตร

3. Brain Heart Infusion Agar (BHA)

Calf brain, infusion form	200 g
Beef heart, infusion form	250 g
Proteose peptone	10 g
Bacto-dextrose	2 g
NaCl	5 g
K ₂ PO ₄	2.5 g
Agar	12 g
น้ำกลั่น	1 ลิตร

pH 7.4 ± 0.2

ภาคผนวก ค

ค่าความคลาดเคลื่อน ระหว่าง plate

ilute AB.	แอนติเจน 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	plate1			plate2				
1:10	3	2.959	3	3	3	3	2.99317	0.01674
1:10 ²	2.523	2.481	2.796	2.928	2.959	3	2.78117	0.22718
1:10 ³	2.745	2.526	2.373	3	2.959	3	2.76717	0.26805
1:10 ⁴	1.929	1.802	1.491	2.365	2.52	2.213	2.05333	0.38347
1:10 ⁵	1.802	1.595	1.596	1.643	1.561	1.535	1.622	0.09543
1:10 ⁶	1.776	1.774	1.804	1.546	1.565	1.461	1.65433	0.14739
1:10 ⁷	0.554	0.535	0.581	0.594	0.587	0.599	0.575	0.02513
blank	0.222	1.383	0.288	0.052	0.052	0.083	0.34667	0.51694

dilute AB.	แอนติเจน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	plate1			plate2				
1:10	3	3	3	3	3	3	3	0
1:10 ²	2.866	2.812	2.682	2.866	2.879	2.886	2.83183	0.07789
1:10 ³	2.183	2.495	2.25	2.893	2.735	2.86	2.56933	0.30772
1:10 ⁴	1.356	1.371	1.71	2.209	2.058	1.955	1.7765	0.35884
1:10 ⁵	1.406	1.408	1.483	1.081	1.068	1.095	1.25683	0.19443
1:10 ⁶	1.352	1.315	1.409	0.938	0.962	0.915	1.1485	0.23264
1:10 ⁷	0.425	0.473	0.463	0.457	0.666	0.478	0.49367	0.08645
blank	0.299	0.65	0.104	0.084	0.097	0.09	0.22067	0.22588

dilute AB.	แอนติเจน 10 ⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	plate1			plate2				
1:10	3	3	3	3	3	3	3	0
1:10 ²	2.708	2.588	2.511	2.83	2.848	2.83	2.71917	0.14271
1:10 ³	2.308	2.261	2.498	2.708	2.775	2.721	2.54517	0.22337
1:10 ⁴	1.189	1.15	1.247	1.647	1.442	1.412	1.34783	0.18816
1:10 ⁵	0.867	0.849	0.616	0.63	0.719	0.624	0.7175	0.11519
1:10 ⁶	0.723	0.701	0.737	0.559	0.541	0.52	0.63017	0.1002
1:10 ⁷	0.315	0.384	0.286	0.325	0.357	0.308	0.32917	0.03553
blank	0.108	0.093	0.093	0.136	0.144	0.123	0.11617	0.0217

dilute AB.	แอนติเจน 10 ⁶ เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	plate1			plate2				
1:10	2.907	2.517	2.785	3	3	3	2.86817	0.19177
1:10 ²	2.333	2.238	2.523	2.523	2.439	2.441	2.41617	0.11191
1:10 ³	1.853	1.884	1.87	2.103	2.038	2.011	1.95983	0.10436
1:10 ⁴	1.184	1.269	1.304	1.419	1.383	1.37	1.3215	0.08673
1:10 ⁵	1.149	1.283	1.291	1.394	1.374	1.347	1.30633	0.08883
1:10 ⁶	1.116	1.158	1.183	1.272	1.168	1.193	1.18167	0.05167
1:10 ⁷	1.145	1.266	1.269	1.318	1.283	1.304	1.26417	0.06175
blank	1.084	1.111	1.061	1.225	1.118	1.022	1.1035	0.06908

dilute AB.	แอนติเจน 10 ⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	plate1			plate2				
1:10	2.928	3	3	2.928	2.921	2.943	2.95333	0.03685
1:10 ²	2.266	2.321	2.367	2.315	2.427	2.337	2.33883	0.05433
1:10 ³	1.05	1.081	1.196	1.07	1.149	1.126	1.112	0.05512
1:10 ⁴	0.37	0.37	0.401	0.447	0.462	0.482	0.422	0.04832
1:10 ⁵	0.373	0.388	0.417	0.502	0.408	0.524	0.43533	0.06247
1:10 ⁶	0.269	0.28	0.274	0.296	0.295	0.339	0.29217	0.02542
1:10 ⁷	0.243	0.227	0.259	0.387	0.312	0.345	0.2955	0.06305
blank	0.155	0.154	0.173	0.21	0.217	0.249	0.193	0.03838

dilute AB.	แอนติเจน 10 ⁴ เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	plate1			plate2				
1:10	2.703	2.754	2.785	2.387	2.284	2.78	2.6155	0.22124
1:10 ²	2.02	1.926	2.035	1.834	1.742	2.098	1.9425	0.1349
1:10 ³	0.707	0.702	0.705	0.681	0.737	0.815	0.7245	0.04782
1:10 ⁴	0.226	0.219	0.235	0.288	0.294	0.3	0.26033	0.03742
1:10 ⁵	0.281	0.286	0.298	0.362	0.375	0.406	0.33467	0.05302
1:10 ⁶	0.145	0.148	0.153	0.148	0.179	0.178	0.1585	0.01571
1:10 ⁷	0.154	0.167	0.176	0.266	0.256	0.247	0.211	0.05051
blank	0.084	0.081	0.099	0.106	0.133	0.119	0.10367	0.02012

dilute AB.	แอนติเจน 10 ³ เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	plate1			plate2				
1:10	2.812	2.907	2.796	2.699	2.75	2.812	2.796	0.0698
1:10 ²	2.044	2.256	2.028	1.829	2.11	2.032	2.04983	0.13836
1:10 ³	0.859	0.932	0.842	0.703	0.937	0.906	0.86317	0.08734
1:10 ⁴	0.26	0.29	0.246	0.245	0.357	0.3	0.283	0.04279
1:10 ⁵	0.289	0.351	0.258	0.33	0.437	0.33	0.3325	0.06118
1:10 ⁶	0.178	0.192	0.169	0.152	0.178	0.179	0.17467	0.01332
1:10 ⁷	0.117	0.203	0.132	0.202	0.256	0.194	0.184	0.05131
blank	0.081	0.106	0.09	0.081	0.118	0.09	0.09433	0.01476

ค่าความคลาดเคลื่อน ระหว่างวัน

dilute AB.	แอนติเจน 10 ⁹ เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	วันที่ 1			วันที่ 2				
1:10	3	2.959	3	3	3	3	2.99317	0.01674
1:10 ²	2.523	2.481	2.796	2.635	2.78	2.425	2.60667	0.15652
1:10 ³	2.745	2.526	2.373	2.848	2.495	2.646	2.6055	0.17464
1:10 ⁴	1.929	1.802	1.491	2.04	2.043	1.967	1.87867	0.20954
1:10 ⁵	1.802	1.595	1.596	1.595	1.478	1.116	1.53033	0.22842
1:10 ⁶	1.776	1.774	1.804	0.346	0.412	0.384	1.08267	0.76936
1:10 ⁷	0.554	0.535	0.581	0.267	0.207	0.254	0.39967	0.17376
blank	0.222	1.383	0.288	0.131	0.079	0.066	0.3615	0.50766

dilute AB.	แอนติเจน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	วันที่ 1			วันที่ 2				
1:10	3	3	3	2.975	3	2.951	2.98767	0.02056
1:10 ²	2.866	2.812	2.682	2.451	2.654	2.699	2.694	0.14445
1:10 ³	2.183	2.495	2.25	2.682	2.602	2.75	2.49367	0.23186
1:10 ⁴	1.356	1.371	1.71	1.868	2.145	2.025	1.74583	0.33044
1:10 ⁵	1.406	1.408	1.483	1.154	1.179	1.152	1.297	0.15113
1:10 ⁶	1.352	1.315	1.409	0.247	0.235	0.224	0.797	0.61605
1:10 ⁷	0.425	0.473	0.463	0.201	0.221	0.232	0.33583	0.13045
blank	0.299	0.65	0.104	0.265	0.054	0.057	0.23817	0.22749

dilute AB.	แอนติเจน 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	วันที่ 1			วันที่ 2				
1:10	3	3	3	3	3	2.735	2.95583	0.10819
1:10 ²	2.708	2.588	2.511	2.83	2.708	2.154	2.58317	0.23728
1:10 ³	2.308	2.261	2.498	2.565	2.389	2.556	2.4295	0.1295
1:10 ⁴	1.189	1.15	1.247	1.863	1.714	1.789	1.492	0.32983
1:10 ⁵	0.867	0.849	0.616	0.744	0.79	0.686	0.75867	0.09667
1:10 ⁶	0.723	0.701	0.737	0.159	0.155	0.138	0.4355	0.31231
1:10 ⁷	0.315	0.384	0.286	0.167	0.227	0.11	0.24817	0.10047
blank	0.108	0.093	0.093	0.043	0.073	0.03	0.07333	0.0309

dilute AB.	แอนติเจน 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	วันที่ 1			วันที่ 2				
1:10	2.907	2.517	2.785	2.886	2.983	2.886	2.82733	0.16466
1:10 ²	2.333	2.238	2.523	2.495	2.371	2.654	2.43567	0.15007
1:10 ³	1.853	1.884	1.87	2.31	2.284	2.463	2.11067	0.27189
1:10 ⁴	1.184	1.269	1.304	1.131	1.136	1.033	1.17617	0.09917
1:10 ⁵	1.149	1.283	1.291	0.523	0.504	0.438	0.86467	0.41629
1:10 ⁶	1.116	1.158	1.183	0.092	0.1	0.1	0.62483	0.57825
1:10 ⁷	1.145	1.266	1.269	0.2	0.204	0.164	0.708	0.5701
blank	1.084	1.111	1.061	0.063	0.057	0.051	0.57117	0.56348

dilute AB.	แอนติเจน 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	วันที่ 1			วันที่ 2				
1:10	2.928	3	3	3	3	3	2.988	0.02939
1:10 ²	2.266	2.321	2.367	2.674	2.642	2.541	2.4685	0.17358
1:10 ³	1.05	1.081	1.196	2.19	2.232	2.279	1.67133	0.61856
1:10 ⁴	0.37	0.37	0.401	0.809	0.825	0.842	0.60283	0.24422
1:10 ⁷	0.373	0.388	0.417	0.328	0.339	0.373	0.36967	0.03248
1:10 ⁵	0.269	0.28	0.274	0.11	0.14	0.11	0.19717	0.08531
1:10 ⁶	0.243	0.227	0.259	0.142	0.14	0.157	0.19467	0.05422
blank	0.155	0.154	0.173	0.055	0.054	0.076	0.11117	0.05521

dilute AB.	แอนติเจน 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	วันที่ 1			วันที่ 2				
1:10	2.703	2.754	2.785	2.991	3	2.74	2.82883	0.13179
1:10 ²	2.02	1.926	2.035	2.703	2.735	2.375	2.299	0.35938
1:10 ³	0.707	0.702	0.705	1.92	1.9	1.852	1.29767	0.64998
1:10 ⁴	0.226	0.219	0.235	0.513	0.615	0.587	0.39917	0.19195
1:10 ⁵	0.281	0.286	0.298	0.312	0.307	0.309	0.29883	0.01286
1:10 ⁶	0.145	0.148	0.153	0.134	0.119	0.101	0.13333	0.01995
1:10 ⁷	0.154	0.167	0.176	0.132	0.15	0.143	0.15367	0.01596
blank	0.084	0.081	0.099	0.055	0.061	0.059	0.07317	0.01746

dilute AB.	แอนติเจน 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร						เฉลี่ย	SD
	วันที่ 1			วันที่ 2				
1:10	2.812	2.907	2.796	2.975	3	3	2.915	0.09261
1:10 ²	2.044	2.256	2.028	2.575	2.735	2.678	2.386	0.31775
1:10 ³	0.859	0.932	0.842	1.784	1.832	1.791	1.34	0.50763
1:10 ⁴	0.26	0.29	0.246	0.56	0.571	0.534	0.41017	0.15975
1:10 ⁵	0.289	0.351	0.258	0.27	0.324	0.232	0.28733	0.04387
1:10 ⁶	0.178	0.192	0.169	0.098	0.091	0.089	0.13617	0.0483
1:10 ⁷	0.117	0.203	0.132	0.118	0.149	0.085	0.134	0.03984
blank	0.081	0.106	0.09	0.049	0.054	0.04	0.07	0.02613

ภาคผนวก ง

ข้อมูลสืบ

9/11/1994 1. sensitivity of H74 and H73

H73													AB
Ag	10 ⁸		10 ⁷		10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴	10 ³	10 ²	10	
	0.913	1.032	0.437	0.398	0.682	0.581	0.219	0.309	0.169	0.186	0.274	0.235	1:10
	0.594	0.686	0.364	0.323	0.245	0.246	0.172	0.214	0.118	0.209	0.232	0.18	1:100
	0.512	0.526	0.263	0.238	0.163	0.166	0.137	0.189	0.122	0.188	0.175	0.145	1:1000
	0.457	0.592	0.215	0.179	0.112	0.128	0.091	0.119	0.064	0.121	0.143	0.097	1:1000
	0.366	0.345	0.7	0.271	0.265	0.282	0.23	0.287	0.176	0.274	0.272	0.233	1:10000
	0.063	0.109	0.077	0.085	0.066	0.078	0.059	0.064	0.052	0.055	0.056	0.05	1:000000
	0.202	0.154	0.214	0.165	0.23	0.185	0.15	0.183	0.107	0.189	0.192	0.179	Blank
	0.285	0.289	0.151	0.129	0.137	0.155	0.125	0.131	0.086	0.117	0.107	0.128	NS.

H74													AB
Ag	10 ⁸		10 ⁷		10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴	10 ³	10 ²	10	
	1.381	1.387	0.746	0.743	0.473	0.539	0.247	0.284	0.188	0.234	0.316	0.256	1:10
	1.344	1.373	0.649	0.553	0.248	0.286	0.197	0.257	0.155	0.23	0.262	0.197	1:100
	1.283	1.267	0.623	0.573	0.276	0.28	0.189	0.254	0.151	0.207	0.238	0.191	1:1000
	0.951	0.871	0.365	0.352	0.155	0.15	0.098	0.142	0.071	0.124	0.132	0.109	1:1000
	0.524	0.532	0.388	0.342	0.269	0.301	0.222	0.293	0.182	0.264	0.27	0.226	1:10000
	0.164	0.175	0.102	0.119	0.079	0.079	0.063	0.084	0.052	0.07	0.057	0.061	1:000000
	0.236	0.198	0.212	0.171	0.176	0.177	0.145	0.198	0.103	0.188	0.192	0.166	Blank
	0.681	0.691	0.396	0.366	0.318	0.275	0.215	0.196	0.131	0.228	0.225	0.3	NS.

27/12/94 2. Formain & no Formalin of H74

no Formalin													AB.
Ag	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰			
	2.686	2.812	2.599	2.373	1.536	2.145	1.241	1.013	0.895	1.016	0.853	0.886	1:10
	2.582	2.721	2.708	2.74	1.075	0.952	0.818	0.644	0.567	0.632	0.458	0.698	1:100
	2.498	2.363	2.255	1.78	0.551	0.39	0.356	0.364	0.277	0.324	0.109	0.26	1:1000
	2.073	1.715	1.75	1.315	0.583	0.433	0.375	0.349	0.255	0.264	0.257	0.16	1:1000
	2.103	1.777	1.489	0.554	0.352	0.353	0.271	0.416	0.324	0.325	0.267	0.229	1:00000
	0.373	0.293	0.211	0.241	0.063	0.077	0.052	0.549	0.181	0.041	0.032	0.048	1:000000
	0.501	0.165	0.229	0.128	0.159	0.169	0.149	0.303	0.176	0.166	0.166	0.142	Blank
	1.735	1.651	0.972	0.453	0.279	0.261	0.238	0.363	0.314	0.272	0.266	0.246	NS.

Formalin											AB.		
Ag	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰			
	2.463	2.735	2.695	2.103	1.295	1.292	1.23	1.229	1.143	1.155	1.127	1.147	1:10
	2.001	2.503	2.294	1.83	0.897	0.861	0.788	0.822	0.696	0.723	0.74	0.554	1:100
	2.324	2.14	2.256	1.496	0.833	0.369	0.437	0.358	0.228	0.298	0.263	0.213	1:1000
	2.191	2.203	1.879	1.141	0.612	0.489	0.253	0.398	0.226	0.236	0.26	0.178	1:1000
	1.496	1.644	2.019	0.732	0.345	0.341	0.42	1.126	0.227	0.362	0.346	0.239	1:10000
	0.28	0.251	0.134	1.114	0.162	0.093	0.277	0.248	0.265	0.053	2.333	0.412	1:100000
	0.2	0.12	0.207	0.137	0.189	0.199	0.152	0.451	0.828	1.207	0.744	0.166	Blank
	1.415	0.923	0.657	0.371	0.584	0.319	0.32	0.381	0.333	0.267	0.373	0.254	NS.

27/12/94 3.titer of H73 and H74

H73													AB.
Day	1		4		7		10		13				
	1.656	1.696	1.785	1.766	2.526	2.249	2.429	2.305	2.461	2.717	2.686	2.77	1:10
	0.632	0.693	0.826	0.747	2.004	2	2.067	2.324	2.184	2.286	2.444	2.623	1:100
	0.331	0.26	0.519	0.068	0.949	0.967	2.156	1.886	2.316	2.128	2.642	2.569	1:1000
	0.102	0.386	0.163	0.153	0.282	0.76	0.721	0.82	1.368	1.178	1.355	1.385	1:10000
	0.303	0.236	1.118	0.261	0.28	0.335	0.301	0.53	0.407	0.463	0.488	1.117	1:100000
	0.301	0.393	0.262	0.439	0.333	0.262	0.242	0.278	2.35	0.27	0.24	0.1	Blank
	0.422	0.353	0.472	0.423	0.404	0.426	0.334	0.485	0.312	0.926	0.326	0.29	Blank
	0.432	0.337	0.344	0.374	0.359	0.375	0.381	0.749	0.357	0.378	0.377	0.239	Blank

H74													AB.
Day	1		4		7		10		13				
	2.658	2.65	2.398	2.638	2.74	2.77	2.735	2.599	2.796	2.886	2.686	2.365	1:10
	1.52	1.376	1.744	1.648	2.721	1.439	2.246	2.339	2.466	2.466	2.848	2.52	1:100
	0.422	0.403	0.549	0.512	1.315	1.277	2.124	2.068	2.5	2.7	2.42	2.77	1:1000
	0.222	0.191	0.278	0.267	0.39	0.351	0.67	0.704	1.466	1.584	1.42	1.45	1:10000
	0.367	0.208	0.465	0.389	0.319	0.452	0.356	0.495	0.491	0.614	0.607	0.637	1:100000
	0.245	0.218	0.223	0.242	0.212	0.205	0.264	0.212	0.261	0.246	0.259	0.29	Blank
	0.483	0.364	0.438	0.363	0.421	0.41	0.373	0.422	0.332	0.437	0.464	0.468	Blank
	0.249	0.305	0.328	0.254	0.289	0.227	0.252	0.245	0.206	0.243	0.297	0.259	Blank

H73 and H74												AB.	
Day	20(73)		28(73)		41(73)		55(73)		41(74)		55(74)		
	2.381	2.646	2.385	2.253	2.498	2.65	2.333	2.609	2.726	2.67	2.654	2.526	1:10
	2.101	1.672	2.407	1.948	1.862	2.077	2.201	2.708	2.137	2.535	2.592	2.115	1:100
	2.335	2.371	2.152	2.609	2.06	1.762	2.78	2.726	2.658	2.52	1.969	1.968	1:1000
	2.006	1.924	2.144	1.515	1.284	1.707	1.772	1.692	1.818	2.011	1.496	1.795	1:10000
	0.865	0.672	1.549	1.816	0.612	0.644	0.634	0.649	0.648	0.708	0.746	0.645	1:100000
	0.198	0.112	0.1	0.159	0.122	0.25	0.263	0.265	0.281	0.29	0.239	0.298	Blank
	0.409	0.218	0.464	0.18	0.374	0.422	0.341	0.408	0.295	0.398	0.406	0.428	Blank
	0.151	0.103	0.104	0.098	0.099	0.097	0.258	0.216	0.196	0.259	0.256	0.278	Blank

13/1/95 4.and6. Reaction with *Salmonella typhimurium* (S292 and S96),data precision

**Salmonella typhimurium*(boot)=plate1,2,3, 4,5,6.1

Salmonella typhimurium(S96)=plate 3.2,7

Salmonella typhimurium(s292)=plate6.2,8

พมวช พมช o.f. = over flow

plate1												AB.	
Ag.	10 ⁰			10 ⁸			10 ⁷			10 ⁶			
	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	2.975	<i>o.f.</i>	2.951	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	2.735	2.886	2.983	2.886	1:10
	2.835	2.78	2.425	2.451	2.854	2.899	2.83	2.708	2.154	2.495	2.371	2.854	1:100
	2.848	2.495	2.648	2.882	2.802	2.75	2.585	2.389	2.556	2.31	2.284	2.483	1:1000
	2.04	2.043	1.987	1.888	2.145	2.025	1.883	1.714	1.789	1.131	1.136	1.033	1:10000
	1.595	1.478	1.118	1.154	1.179	1.152	0.744	0.79	0.886	0.523	0.504	0.438	1:100000
	0.346	0.412	0.384	0.247	0.235	0.224	0.159	0.155	0.138	0.092	0.1	0.1	1:1000000
	0.287	0.207	0.254	0.201	0.221	0.232	0.187	0.227	0.11	0.2	0.204	0.184	1:10000000
	0.131	0.079	0.088	0.285	0.054	0.057	0.043	0.073	0.03	0.063	0.057	0.051	blank

plate2												AB.	
Ag.	10 ⁵			10 ⁴			10 ³			10 ²			
	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	2.991	<i>o.f.</i>	2.74	2.975	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	1:10
	2.874	2.642	2.541	2.703	2.735	2.375	2.575	2.735	2.678	2.809	2.599	2.886	1:100
	2.19	2.232	2.279	1.92	1.9	1.852	1.784	1.832	1.791	1.949	1.955	1.884	1:1000
	0.809	0.825	0.842	0.513	0.615	0.587	0.58	0.571	0.534	0.66	0.637	0.613	1:10000
	0.328	0.339	0.373	0.312	0.307	0.309	0.27	0.324	0.232	0.338	0.318	0.287	1:100000
	0.11	0.14	0.11	0.134	0.119	0.101	0.098	0.091	0.089	0.094	0.092	0.091	1:1000000
	0.142	0.14	0.157	0.132	0.15	0.143	0.118	0.149	0.085	0.259	0.155	0.14	1:10000000
	0.055	0.054	0.078	0.055	0.081	0.059	0.049	0.054	0.04	0.06	0.054	0.083	blank

plate3 Ag.	S. typhimurium						S96						AB.
	10		10 ⁰		10 ⁰		10 ⁸		10 ⁷				
<i>o.f.</i>	2.928	2.848	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	2.79	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	1.9	2.907	2.866	2.717	1:10	
2.489	2.498	2.33	2.471	2.581	2.369	2.249	2.495	2.588	2.585	2.308	2.432	1:100	
1.773	1.727	1.777	1.696	1.719	1.674	1.445	1.481	1.607	1.716	1.726	1.721	1:1000	
0.581	0.569	0.596	0.515	0.552	0.555	0.357	0.392	0.417	0.514	0.549	0.776	1:10000	
0.345	0.395	0.369	0.342	0.349	0.37	0.299	0.347	0.25	0.362	0.366	0.318	1:100000	
0.098	0.065	0.076	0.077	0.077	0.131	0.104	0.066	0.054	0.068	0.101	0.089	1:1000000	
0.186	0.293	0.181	0.158	0.187	0.208	0.178	0.27	0.089	0.203	0.216	0.156	1:10000000	
0.128	0.11	0.124	0.115	0.091	0.095	0.147	0.069	0.051	0.089	0.082	0.077	blank	

plate4 Ag.	10 ⁹						10 ⁸						AB.
	10 ⁹		10 ⁸		10 ⁷		10 ⁶		10 ⁶				
<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	1:10	
2.866	2.886	2.848	2.866	2.745	2.658	2.796	2.592	2.703	2.812	2.78	2.848	1:100	
2.914	<i>o.f.</i>	2.75	2.967	2.879	2.873	2.914	2.708	2.796	2.831	2.466	2.432	1:1000	
2.5	2.306	2.441	2.11	1.974	2.051	1.823	1.802	1.799	1.066	0.984	0.954	1:10000	
1.245	1.348	1.356	1.049	1.019	1.004	0.644	0.679	0.575	0.401	0.418	0.348	1:100000	
0.3	0.298	0.3	0.282	2.249	0.21	0.149	0.141	0.136	0.104	0.098	0.099	1:1000000	
0.181	0.175	0.196	0.151	0.167	0.166	0.154	0.21	0.085	0.166	0.151	0.122	1:10000000	
0.078	0.059	1.031	0.04	0.049	0.052	0.047	0.104	0.033	0.052	0.039	0.04	blank	

plate5 Ag.	10 ⁵						10 ⁴						AB.
	10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10 ²				
2.79	2.812	2.951	2.866	2.866	2.866	2.79	2.848	2.726	2.866	2.75	2.389	1:10	
2.439	2.606	2.703	2.627	2.69	2.606	2.55	2.635	2.432	2.495	2.271	2.332	1:100	
1.909	1.94	2.005	1.579	1.626	1.588	1.566	1.594	1.481	1.57	1.642	1.527	1:1000	
0.663	0.703	0.742	0.514	0.532	0.539	0.499	0.523	0.471	0.52	0.535	0.509	1:10000	
0.336	0.338	0.381	0.338	0.332	0.341	0.299	0.443	0.255	0.362	0.377	0.309	1:100000	
0.078	0.064	0.077	0.061	0.067	0.059	0.059	0.057	0.049	0.061	0.065	0.067	1:1000000	
0.145	0.127	0.176	0.149	0.167	0.166	0.145	0.187	0.091	0.183	0.188	0.157	1:10000000	
0.034	0.033	0.038	0.039	0.044	0.026	0.032	0.043	0.016	0.05	0.058	0.044	blank	

plate6		S. typhimurium						S292					AB.
Ag.	10			10 ⁰		10 ⁰		10 ⁸		10 ⁷			
	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	2.951	2.928	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	2.951	<i>o.f.</i>	1:10
	2.529	2.62	2.456	2.495	2.578	2.578	2.627	2.666	2.662	2.735	2.67	2.67	1:100
	1.111	1.814	1.705	1.749	1.801	1.744	2.461	2.511	2.523	2.481	2.398	2.461	1:1000
	0.551	0.575	0.583	0.543	0.562	0.552	1.064	1.034	1.083	1.128	0.963	0.974	1:10000
	0.269	0.269	0.313	0.295	0.297	0.325	0.362	0.41	0.377	0.465	0.409	0.368	1:100000
	0.091	0.084	0.085	0.09	0.095	0.095	0.108	0.125	0.094	0.104	0.092	0.095	1:1000000
	0.119	0.115	0.127	0.106	0.123	0.151	0.138	0.164	0.094	0.153	0.168	0.143	1:10000000
	0.038	0.035	0.042	0.045	0.055	0.049	0.046	0.056	0.03	0.115	0.055	0.16	blank

plate7														AB.
(S96)														
Ag.	10 ⁶	10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10				
	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	2.854	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	<i>o.f.</i>	2.836	2.556	1:10	
	2.377	2.538	2.609	2.532	2.514	2.65	2.517	2.62	2.492	2.517	2.121	2.281	1:100	
	1.233	1.343	1.341	1.479	1.468	1.48	1.41	1.452	1.318	1.428	1.169	0.879	1:1000	
	0.392	0.425	0.449	0.447	0.474	0.463	0.436	0.477	0.434	0.481	0.392	0.348	1:10000	
	0.258	0.239	0.284	0.279	0.267	0.291	0.257	0.305	0.215	0.302	0.3	0.269	1:100000	
	0.074	0.084	0.089	0.082	0.091	0.092	0.574	0.083	0.287	0.086	0.126	0.13	1:1000000	
	0.13	0.117	0.163	0.135	0.156	0.167	0.181	0.173	0.102	0.177	0.169	0.154	1:10000000	
	0.052	0.047	0.05	0.077	0.056	0.063	0.043	0.067	0.047	0.076	0.064	0.059	blank	

plate8 =(S292)														AB.
Ag.	10 ⁶	10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10				
	2.726	2.812	2.848	2.83	2.83	2.712	2.79	2.796	2.785	2.796	2.764	2.635	1:10	
	2.434	2.322	2.345	2.394	2.387	2.4	2.284	2.429	2.363	2.289	2.324	2.166	1:100	
	1.735	1.724	1.559	1.421	1.511	1.533	1.423	1.427	1.38	1.444	1.42	1.22	1:1000	
	0.548	0.552	0.5	0.479	0.48	0.473	0.426	0.63	0.39	0.486	0.442	0.36	1:10000	
	0.336	0.319	0.346	0.336	0.326	0.353	0.281	0.364	0.23	0.341	0.346	0.282	1:100000	
	0.078	0.068	0.072	0.08	0.085	0.07	0.073	0.066	0.241	0.076	0.07	0.067	1:1000000	
	0.149	0.128	0.186	0.154	0.182	0.181	0.153	0.198	0.161	0.201	0.2	0.162	1:10000000	
	0.038	0.037	0.042	0.044	0.071	0.063	0.042	0.061	0.025	0.318	0.404	0.311	blank	

14/1/95 4.and6. Reaction with *Salmonella typhimurium* (S292 and S96), data precision

**Salmonella typhimurium*(boot)=plate1,2,3, 4,5,6.1

Salmonella typhimurium(S96)=plate 3,2,7

Salmonella typhimurium(s292)=plate6.2,8

plate1													AB.	
Ag.	10 ⁹			10 ⁸			10 ⁷			10 ⁶				
	o.f.	2.959	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	2.907	2.517	2.785	1:10
	2.523	2.481	2.796	2.866	2.812	2.682	2.708	2.588	2.511	2.333	2.238	2.523	1:100	
	2.745	2.526	2.373	2.183	2.495	2.25	2.308	2.261	2.498	1.853	1.884	1.87	1:1000	
	1.929	1.802	1.491	1.356	1.371	1.71	1.189	1.15	1.247	1.184	1.269	1.304	1:10000	
	1.802	1.595	1.596	1.406	1.408	1.483	0.867	0.849	0.616	1.149	1.283	1.291	1:100000	
	1.776	1.774	1.804	1.352	1.315	1.409	0.723	0.701	0.737	1.116	1.158	1.183	1:1000000	
	0.554	0.535	0.581	0.425	0.473	0.463	0.315	0.384	0.286	1.145	1.266	1.269	1:10000000	
	0.222	1.383	0.288	0.299	0.65	0.104	0.108	0.093	0.093	1.084	1.111	1.061	blank	

plate2													AB.
Ag.	10 ⁵			10 ⁴			10 ³			10 ²			
	2.928	o.f.	o.f.	2.703	2.754	2.785	2.812	2.907	2.796	2.78	2.83	2.78	1:10
	2.266	2.321	2.367	2.02	1.926	2.035	2.044	2.256	2.028	2.074	2.178	2.08	1:100
	1.05	1.081	1.196	0.707	0.702	0.705	0.859	0.932	0.842	0.796	0.837	0.807	1:1000
	0.37	0.37	0.401	0.226	0.219	0.235	0.26	0.29	0.246	0.259	0.261	0.226	1:10000
	0.373	0.388	0.417	0.281	0.286	0.298	0.289	0.351	0.258	0.316	0.323	0.245	1:100000
	0.269	0.28	0.274	0.145	0.148	0.153	0.178	0.192	0.169	0.162	0.172	0.138	1:1000000
	0.243	0.227	0.259	0.154	0.167	0.176	0.117	0.203	0.132	0.203	0.186	0.15	1:10000000
	0.155	0.154	0.173	0.084	0.081	0.099	0.081	0.106	0.09	0.087	0.076	0.087	blank

plate3													AB.
Ag.	<i>S. typhimurium</i>						S96						
	10		10 ⁰		10 ⁹		10 ⁸		10 ⁷				
	2.812	2.848	2.83	2.578	2.578	2.602	2.848	o.f.	o.f.	2.951	2.745	2.735	1:10
	2.284	2.234	2.306	1.706	1.709	1.9	2.62	2.62	2.547	2.498	2.187	2.333	1:100
	0.88	0.878	0.876	0.526	0.574	0.582	1.169	1.299	1.113	1.207	1.007	1.12	1:1000
	0.345	0.275	0.368	0.211	0.213	0.227	0.22	0.265	0.268	0.346	0.404	0.314	1:10000
	0.363	0.365	0.4	0.343	0.342	0.393	0.284	0.365	0.289	0.408	0.424	0.393	1:100000
	0.187	0.175	0.181	0.126	0.124	0.132	0.115	0.108	0.149	0.178	0.183	0.221	1:1000000
	0.232	0.211	0.255	0.194	0.208	0.23	0.14	0.196	0.157	0.256	0.29	0.256	1:10000000
	0.113	0.12	0.115	0.091	0.07	0.084	0.033	0.037	0.063	0.111	0.127	0.144	blank

plate4													AB.
Ag.	10 ⁹			10 ⁸			10 ⁷			10 ⁶			
	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	1:10
2.928	2.959	o.f.	2.866	2.879	2.886	2.83	2.848	2.83	2.523	2.439	2.441	1:100	
o.f.	2.959	o.f.	2.893	2.735	2.86	2.708	2.775	2.721	2.103	2.038	2.011	1:1000	
2.365	2.52	2.213	2.209	2.058	1.955	1.647	1.442	1.412	1.419	1.383	1.37	1:10000	
1.643	1.561	1.535	1.081	1.068	1.095	0.63	0.719	0.624	1.394	1.374	1.347	1:100000	
1.546	1.565	1.461	0.938	0.962	0.915	0.559	0.541	0.52	1.272	1.168	1.193	1:1000000	
0.594	0.587	0.599	0.457	0.666	0.478	0.325	0.357	0.308	1.318	1.283	1.304	1:10000000	
0.052	0.052	0.083	0.084	0.097	0.09	0.136	0.144	0.123	1.225	1.118	1.022	blank	

plate5													AB.
Ag.	10 ⁵			10 ⁴			10 ³			10 ²			
2.928	2.921	2.943	2.387	2.284	2.78	2.699	2.75	2.812	2.449	2.836	2.9	1:10	
2.315	2.427	2.337	1.834	1.742	2.098	1.829	2.11	2.032	1.983	2.098	2.192	1:100	
1.07	1.149	1.126	0.681	0.737	0.815	0.703	0.937	0.906	0.798	0.844	0.863	1:1000	
0.447	0.462	0.482	0.288	0.294	0.3	0.245	0.357	0.3	0.338	0.352	0.307	1:10000	
0.502	0.408	0.524	0.362	0.375	0.406	0.33	0.437	0.33	0.398	0.434	0.372	1:100000	
0.296	0.295	0.339	0.148	0.179	0.178	0.152	0.178	0.179	0.176	0.182	0.171	1:1000000	
0.387	0.312	0.345	0.266	0.256	0.247	0.202	0.256	0.194	0.262	0.288	0.244	1:10000000	
0.21	0.217	0.249	0.106	0.133	0.119	0.081	0.118	0.09	0.208	0.108	0.112	blank	

plate6													AB.
Ag.	10			<i>S. typhimurium</i>			10 ⁹			S292			
2.886	2.991	2.866	2.606	2.609	2.553	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	o.f.	1:10
2.187	2.232	2.226	1.591	1.67	1.667	2.83	2.721	2.627	2.879	2.759	2.699	1:100	
0.845	0.806	0.641	0.562	0.566	0.673	2.243	2.377	2.359	2.407	1.729	1.598	1:1000	
0.29	0.306	0.293	0.219	0.212	0.241	0.791	0.697	0.709	0.722	0.575	0.534	1:10000	
0.349	0.328	0.349	0.321	0.291	0.332	0.468	0.464	0.486	0.542	0.513	0.448	1:100000	
0.223	0.198	0.214	0.196	0.148	0.181	0.334	0.313	0.392	0.378	0.357	0.337	1:1000000	
0.163	0.166	0.169	0.162	0.137	0.162	0.126	0.123	0.174	0.219	0.27	0.246	1:10000000	
0.101	0.121	0.101	0.07	0.081	0.09	0.022	0.033	0.095	0.122	0.179	0.18	blank	

plate7(S96)

AB.

Ag.	10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10		
2.967	2.907	2.866	2.951	2.674	2.848	2.666	2.73	2.83	2.824	2.86	2.848	1:10	
2.077	2.167	2.085	2.223	2.016	2.018	1.793	1.909	2.041	2.143	2.144	1.967	1:100	
0.879	0.857	0.886	0.912	0.782	0.805	0.807	0.874	0.898	0.962	1.174	1.18	1:1000	
0.322	0.318	0.342	0.315	0.345	0.377	0.499	0.631	0.389	0.43	0.687	0.687	1:10000	
0.416	0.396	0.438	0.424	0.446	0.48	0.649	0.688	0.382	0.526	0.736	0.697	1:100000	
0.211	0.196	0.208	0.188	0.235	0.255	0.428	0.425	0.261	0.292	0.534	0.525	1:1000000	
0.204	0.238	0.323	0.277	0.263	0.55	0.501	0.548	0.291	0.381	0.585	0.62	1:10000000	
0.16	0.138	0.147	0.142	0.176	0.18	0.384	0.41	0.201	0.283	0.42	0.494	blank	

plate8=(S292)

AB.

Ag.	10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10		
2.599	2.599	2.484	2.506	2.349	2.333	2.199	2.16	2.5	2.514	2.595	2.514	1:10	
1.975	1.928	1.681	1.686	1.513	1.477	1.349	1.373	1.698	1.664	1.757	1.678	1:100	
0.806	0.721	0.715	0.734	0.543	0.525	0.579	0.58	0.645	0.693	0.724	0.663	1:1000	
0.358	0.351	0.423	0.394	0.251	0.261	0.342	1.29	0.266	0.341	0.307	0.283	1:10000	
0.333	0.337	0.446	0.446	0.303	0.315	0.429	0.43	0.268	0.393	0.36	0.338	1:100000	
0.254	0.242	0.347	0.348	0.185	0.208	0.333	0.299	0.222	0.288	0.216	0.211	1:1000000	
0.264	0.245	0.382	0.366	0.241	0.241	0.359	0.387	0.196	0.292	0.269	0.239	1:10000000	
0.154	0.15	0.287	0.286	0.139	0.137	0.281	0.284	0.146	0.173	0.156	0.148	blank	

15-Jan-95

plate1+2.1=*E.coli*plate3+2.2=*Bacillus*plate 4+5.1=*pseudomonas*plate6+5.2=*Staphilococcus*

plate1

AB.

Ag.	10 ⁸		10 ⁷		10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴		10 ³		
0.139	0.168	0.136	0.131	0.114	0.123	0.122	0.147	0.122	0.18	0.156	0.141	1:10	
0.154	0.158	0.196	0.171	0.166	0.168	0.156	0.212	0.16	0.25	0.229	0.151	1:100	
0.162	0.161	0.197	0.206	0.169	0.16	0.149	0.2	0.168	0.261	0.169	0.193	1:1000	
0.121	0.124	0.155	0.123	0.128	0.126	0.105	0.152	0.128	0.229	0.153	0.111	1:10000	
0.286	0.277	0.346	0.311	0.31	0.218	0.269	0.349	0.266	0.389	0.313	0.254	1:100000	
0.062	0.05	0.066	0.055	0.044	0.055	0.062	0.058	0.107	0.121	0.061	0.06	1:100000	
0.306	0.238	0.325	0.253	0.264	0.283	0.206	0.319	0.173	0.307	0.248	0.203	1:1000000	
0.085	0.103	0.101	0.077	0.073	0.075	0.061	0.088	0.113	0.16	0.067	0.071	blank	

plate2		<i>E.coli</i>						<i>Bacillus</i>					AB.
Ag.	10^2	10^1	10^0	10^1	10^0	0	10^1	10^0	0	0	0	0	AB.
0.383	0.409	0.143	0.112	0.099	0.106	0.215	0.232	0.061	0.141	0.142	0.128	1:10	
0.296	0.294	0.177	0.153	0.138	0.15	0.179	0.241	0.08	0.179	0.206	0.151	1:100	
0.127	0.146	0.141	0.11	0.114	0.118	0.119	0.174	0.071	0.156	0.162	0.13	1:1000	
0.079	0.064	0.114	0.081	0.09	0.089	0.083	0.125	0.044	0.112	0.112	0.092	1:10000	
0.183	0.216	0.257	0.217	0.228	0.24	0.212	0.275	0.142	0.24	0.245	0.205	1:100000	
0.058	0.059	0.054	0.044	0.046	0.043	0.056	0.049	0.038	0.039	0.05	0.045	1:100000	
0.119	0.125	0.171	0.12	0.15	0.142	0.13	0.191	0.065	0.17	0.159	0.137	1:1000000	
0.036	0.034	0.042	0.035	0.047	0.039	0.035	0.047	0.009	0.044	0.047	0.038	blank	

plate3		<i>E.coli</i>						<i>Bacillus</i>					AB.
Ag.	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	AB.
0.109	0.123	0.154	0.141	0.12	0.52	0.123	0.157	0.077	0.163	0.169	0.175	1:10	
0.343	0.138	0.193	0.169	0.159	0.173	0.151	0.199	0.229	.57*	0.235	0.196	1:100	
0.113	0.12	0.144	0.131	0.117	0.128	0.13	0.164	0.094	0.166	0.246	0.157	1:1000	
0.092	0.088	0.117	0.085	0.092	0.092	0.079	0.119	0.034	0.126	0.13	0.098	1:10000	
0.165	0.222	0.257	0.235	0.235	0.243	0.218	0.307	0.146	0.253	1.078*	0.214	1:100000	
0.045	0.055	0.055	0.05	0.053	0.052	0.052	0.057	0.044	0.051	0.033	0.104	1:100000	
0.136	0.136	0.182	0.136	0.161	0.149	0.145	0.198	0.139	0.195	0.191	0.149	1:1000000	
0.033	0.04	0.07	0.039	0.044	0.049	0.033	0.151	0.049	0.131	0.046	0.059	blank	

plate4		<i>E.coli</i>						<i>Bacillus</i>					AB.
Ag.	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	AB.
0.106	0.109	0.141	0.126	0.117	0.111	0.123	0.154	0.378	0.462	0.174	0.173	1:10	
0.129	0.127	0.171	0.15	0.16	0.159	0.14	0.196	0.342	0.525	0.246	0.193	1:100	
0.118	0.119	0.122	0.129	0.131	0.133	0.121	0.178	0.434	0.489	0.197	0.177	1:1000	
0.073	0.084	0.105	0.076	0.087	0.096	0.079	0.123	0.401	0.453	0.154	0.125	1:10000	
0.168	0.203	0.241	0.213	0.23	0.242	0.21	0.275	0.515	0.611	0.319	0.248	1:100000	
0.044	0.053	0.051	0.043	0.049	0.047	0.082	0.051	0.399	0.421	0.093	0.086	1:100000	
0.123	0.116	0.167	0.121	0.166	0.149	0.128	0.192	0.394	0.551	0.231	0.174	1:1000000	
0.023	0.037	0.035	0.026	0.038	0.039	0.034	0.048	0.288	0.401	0.084	0.08	blank	

plate5		<i>Pseudomonas</i>						<i>Staphilococcus</i>						AB.
Ag.	10^2	10^1	10^0	10^2	10^1	10^0	10^2	10^1	10^0	10^2	10^1	10^0	AB.	
	0.1	0.11	0.147	0.143	0.146	0.143	0.133	0.167	0.079	0.175	0.162	0.148	1:10	
	0.148	0.134	0.189	0.146	0.167	0.162	0.151	0.22	0.084	0.192	0.225	0.176	1:100	
	0.123	0.129	0.156	0.137	0.143	0.145	0.138	0.178	0.09	0.169	0.175	0.148	1:1000	
	0.075	0.083	0.114	0.082	0.093	0.099	0.085	0.105	0.045	0.123	0.117	0.098	1:10000	
	0.21	0.21	0.234	0.213	0.225	0.235	0.2	0.289	0.149	0.239	0.252	0.217	1:100000	
	0.055	0.055	0.045	0.038	0.046	0.043	0.049	0.042	0.035	0.054	0.052	0.042	1:100000	
	0.105	0.13	0.175	0.128	0.112	0.139	0.129	0.192	0.075	0.168	0.168	0.147	1:1000000	
	0.035	0.043	0.031	0.037	0.038	0.048	0.036	0.041	0.015	0.042	0.04	0.046	blank	

plate6		10^8						10^7						10^6						10^5						10^4						10^3						AB.
Ag.	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	AB.							
	0.165	0.192	0.229	0.245	0.162	0.172	0.148	0.158	0.097	0.194	0.162	0.145	1:10																									
	0.195	0.208	0.297	0.275	0.195	0.195	0.16	0.22	0.1	0.218	0.218	0.169	1:100																									
	0.197	0.208	0.265	0.27	0.192	0.188	0.159	0.216	0.12	0.196	0.189	1.64	1:1000																									
	0.097	0.122	0.172	0.137	0.115	0.116	0.087	0.128	0.047	0.12	0.131	0.104	1:10000																									
	0.229	0.253	0.312	0.275	0.256	0.263	0.218	0.282	0.148	0.257	0.27	0.222	1:100000																									
	0.075	0.082	0.111	0.097	0.069	0.067	0.061	0.057	0.031	0.048	0.05	0.039	1:100000																									
	0.15	0.163	0.214	0.167	0.179	0.162	0.145	0.198	0.076	0.19	0.17	0.148	1:1000000																									
	0.049	0.06	0.073	0.055	0.054	0.051	0.039	0.05	0.01	0.052	0.051	0.047	blank																									

เอกสารอ้างอิง

- มหิตล, มหาวิทยาลัย คณะเภสัชศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2531. เภสัชจุลชีววิทยา. ครั้งที่ 1. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิตล. น. 109-136.
- Engvall, E. and Perlmann, P.1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8:871-874.
- Engvall, E. and Perlmann, P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). III Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J.immunol*. 109:129-135.
- Felix , A. , Krikorian, K.S. and Reither, R. 1935. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigen in cases of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. *J. Hyg (Lond)*. 35:421-427.
- 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. 30-42.
- Herscowitz, I.H. 1979. *Immunology Basic Processes*. (Bellanti, J.A. ed.) W.B. Saunders Company, Philadelphia. 15-17.
- Kelsoe, G. and Weller, T.H. 1978. Immunodiagnosis 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.* 75:5715-5717.
- Kurstak, E. 1985. Progress in Enzyme immunoassay : Production of reagents experimental design, and interpretation. *Bulletin of the World Health Organization*. 63:793-811.
- Makela, P.H., Valtonen, V.V. and Valtonen, M. 1973. Role of O antigen (Lipopolysaccharide) factors in the virulence of *Sal. J. Inf. Dis.* 28:581-585.
- Milstein, C. 1980. Monoclonal Antibodies. *Scientific American*. 243(4):66-74.