



การพัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนก *Salmonella* Enteritidis
จาก *S. Typhimurium*, *S. Virchow* และ *S. Hadar*

THE DEVELOPMENT OF IMMUNOLOGICAL TECHNIQUES FOR DETECTION AND
DIFFERENTIATION OF *Salmonella* Enteritidis FROM *S. Typhimurium*, *S. Virchow*
AND *S. Hadar*

ชลธิชา จินาพร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2562

การพัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนก *Salmonella*
Enteritidis จาก *S. Typhimurium*, *S. Virchow* และ *S. Hadar*



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE DEVELOPMENT OF IMMUNOLOGICAL TECHNIQUES FOR DETECTION AND
DIFFERENTIATION OF *Salmonella* Enteritidis FROM *S. Typhimurium*, *S. Virchow*
AND *S. Hadar*



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of DOCTOR OF PHILOSOPHY
(Biotechnology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนก *Salmonella* Enteritidis จาก
S. Typhimurium, S. Virchow และ S. Hadar

ของ

ชลธิชา จินาพร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

..... ประธาน

(ศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิราษฎร์)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อใช้ในการตรวจสอบและ จำแนก <i>Salmonella</i> Enteritidis จาก <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Virchow</i> และ <i>S.</i> <i>Hadar</i>
ผู้วิจัย	ชลธิชา จินาพร
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* โดยการปลูก
ภูมิคุ้มกันในหนูด้วยเชื้อ *Salmonella* Enteritidis เท่านั้นหรือเชื้อ *Salmonella* 4 ซีโรวาร์ผสมกัน (*S. Enteritidis*,
S. Typhimurium, *S. Hadar* และ *S. Virchow*) ในรูปแบบที่ทำให้ตายด้วยความร้อนผสมกับรูปแบบที่คงสภาพ
ด้วยฟอร์มาลิน สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 3 ชนิด ซึ่งมีความจำเพาะที่แตกต่างกัน โดยโมโน
โคลนอลแอนติบอดีชนิดที่ 1 (SE-13D) เป็น IgM มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* เท่านั้น โมโนโคลนอล
แอนติบอดีชนิดที่ 2 (Sal-06G) เป็น IgG2a สามารถจับกับเชื้อ *Salmonella* serogroups B, D, E, I และบางซีโร
วาร์ในกลุ่ม C (*S. Winston* และ *S. Bovismorbificans*) โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดที่ 3 (Sal-08G) เป็นชนิด
IgG1 สามารถจับกับเชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่ แต่มีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Shigella dysenteriae* และ
Escherichia coli โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดที่ผลิตได้ มีความไวในการตรวจอยู่ในช่วง 2.5×10^6 -
 10^7 cfu/mL เมื่อทดสอบโดยวิธี dot blotting อย่างไรก็ตามสามารถเพิ่มความไวในการตรวจด้วยการเพิ่มจำนวน
เชื้อ *S. Enteritidis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง ทำให้สามารถตรวจพบแบคทีเรียในตัวอย่าง
เพียง 10 - 1 cfu/mL ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *S. Enteritidis* กับตัวอย่างเนื้อไก่บดในอาหาร
เลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ก็ยังคงให้ผลการทดสอบที่คล้ายคลึงกัน ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิต
ได้ในครั้งนี้ สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์เพื่อจำแนกเชื้อ *S. Enteritidis* ออกจาก
Salmonella ซีโรวาร์อื่น และแบคทีเรียต่างชนิด โดยวิธี dot blotting ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์ที่มีความไวและ
ความแม่นยำสูง ใช้เวลาในการตรวจน้อย ไม่จำเป็นต้องทำการแยกเชื้อและทดสอบทางชีวเคมี ทำให้สามารถ
ตรวจสอบการปนเปื้อนของ เชื้อ *Salmonella* ได้อย่างรวดเร็วจึงช่วยป้องกันและเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อ
S. Enteritidis ที่เป็นสาเหตุหลักของโรค salmonellosis

คำสำคัญ : เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา โมโนโคลนอลแอนติบอดี การจำแนกเชื้อ *S. Enteritidis* *S.*
Typhimurium *S. Virchow* *S. Hadar*

Title	THE DEVELOPMENT OF IMMUNOLOGICAL TECHNIQUES FOR DETECTION AND DIFFERENTIATION OF <i>Salmonella</i> Enteritidis FROM S. Typhimurium, S. Virchow AND S. Hadar
Author	CHONTICHAR JINAPON
Degree	DOCTOR OF PHILOSOPHY
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Associate Professor Siwaporn Longyant , Ph.D.
Co Advisor	Associate Professor Parin Chaivisuthangkura , Ph.D.

In this study, three monoclonal antibodies (MAbs) against *Salmonella* were produced from mice immunized with a combination of heat-killed and formalin-fixed of *Salmonella* Enteritidis alone or a mixture of four *Salmonella* serovars (S. Enteritidis, S. Typhimurium, S. Hadar and S. Virchow). The first MAb, SE-13D is IgM, which bound specifically and only to S. Enteritidis. The second MAb Sal-06G is IgG2a, and bound to the *Salmonella* serogroups B, D, E, I and some serovars in group C (S. Winston and S. Bovismorbificans). The third, MAb Sal-08G is IgG1, bound to most *Salmonella* serovars but cross-reacted to *Shigella dysenteriae* and *Escherichia coli*. Using a dot-blot assay, the detection sensitivity limits of MAbs ranged from 2.5×10^6 - 10^7 cfu/mL. However, the detection of these MAbs could be improved to 10 or 1 cfu/mL after pre-enriching the bacterial sample in tryptic soy broth (TSB) or chicken homogenate in TSB for 6 or 12 h, respectively. Therefore, these MAbs can be used as simple, rapid, specific, and effective immunological tool for direct detection and differentiation of S. Enteritidis from an assortment of *Salmonella* serovars from other bacteria in complex samples including poultry products, foods, and medical samples without the need for bacterial isolation and the conventional characterizations which is required by series of biochemical tests.

Keyword : Immunological techniques Monoclonal antibody Detection S. Enteritidis S. Typhimurium S. Virchow S. Hadar

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือ รวมถึงให้คำปรึกษาอย่างดียิ่งจากบุคคลหลายท่าน อาทิเช่น รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิฐานกูร อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาแนะนำอบรมให้ความรู้ทั้งภาคทฤษฎี เทคนิคปฏิบัติการ และการเขียนงานวิจัยเพื่อการตีพิมพ์ อีกทั้งยังให้ความช่วยเหลือทางด้านอื่นๆ ซึ่งอำนวยความสะดวกให้การทำปริญญานิพนธ์เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

นอกจากนี้ต้องขอขอบคุณ ดร.ประดิษฐ์ หวังมาน ผู้ซึ่งคอยให้คำแนะนำ เป็นกำลังใจ ช่วยแก้ปัญหา และถ่ายทอดเทคนิคต่างๆทั้งในห้องปฏิบัติการและงานเอกสาร รวมถึง ดร. ชลินันท์ เพ็งสุข ที่ได้แบ่งปันความรู้และประสบการณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี และน้องๆในภาควิชาชีววิทยา สำหรับมิตรภาพอันงดงาม ความช่วยเหลือและน้ำใจอันดีเยี่ยม ที่ผู้วิจัยได้รับทั้งทางตรงและทางอ้อม ตลอดระยะเวลาที่ได้ศึกษาและทำวิจัยในหลักสูตรนี้

ขอขอบพระคุณ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม ที่สนับสนุนทุนการศึกษาวิจัย และคุณสมชาย อินจ่อหอ เจ้าหน้าที่ฝ่ายนักเรียนทุนรัฐบาลด้านวิทยาศาสตร์ ที่คอยอำนวยความสะดวก ความช่วยเหลือและข้อแนะนำปรึกษาต่างๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา อีกทั้งขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ที่สนับสนุนการศึกษาต่อในระดับดุษฎีบัณฑิต รวมถึงขอบคุณภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือ สถานที่ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวอันเป็นที่รัก ที่คอยเป็นกำลังใจ สนับสนุน และเป็นแรงผลักดัน ให้ก้าวข้ามผ่านอุปสรรคต่างๆ ในทุกช่วงของชีวิต และขอบคุณมิตรภาพของเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่ช่วยสนับสนุน ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจเสมอมา ทำยนี้ ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงคุณพระศรีรัตนตรัยและสิ่งศักดิ์สิทธิ์ทั่วสากลโลก ขอให้กุศลประโยชน์อันเกิดจากงานวิจัยในครั้งนี้ อุทิศเป็นกุศลแก่หนุทดลองทั้งหลายที่ได้สละชีวิต เพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของผู้ทำวิจัยในครั้งนี้

ชลธิชา จินาพร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
สมมติฐานการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ประวัติการค้นพบ <i>Salmonella</i>	4
การจัดจำแนกและการเรียกชื่อ <i>Salmonella</i>	5
แอนติเจนของ <i>Salmonella</i>	7
โรคติดเชื้อ <i>Salmonella</i> (salmonellosis)	8
ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในการเกิดโรค (Virulence factor) ของเชื้อ <i>Salmonella</i>	9
การแพร่กระจายของเชื้อ <i>Salmonella</i>	12
เชื้อ <i>Salmonella</i> ในไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่	15
รายงานการตรวจพบเชื้อ <i>Salmonella</i> ในประเทศไทย.....	16
การตรวจวินิจฉัยเชื้อ <i>Salmonella</i> ในห้องปฏิบัติการ	19

การผลิตและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (production and selection of hybridoma cell) ..	29
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	33
สัตว์ทดลองและแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย	33
อุปกรณ์.....	33
สารเคมี.....	34
วิธีการดำเนินงานวิจัย	38
1. การตรวจเพื่อยืนยันเชื้อ S. Enteritidis ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ..	38
1.1 การสกัด DNA.....	38
1.2 วิธี PCR.....	38
2. การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกัน (antigen preparation and immunization) ..	40
2.1 การเตรียมแบคทีเรีย (bacteria preparation)	40
2.2 การเตรียมแอนติเจน (antigen preparation).....	40
2.3 การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว (immunization in Swiss mice)	40
3. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell production)	41
4. การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell screening)	42
4.1 การคัดเลือกระดับที่ 1 โดยวิธี dot blotting (first screening by dot blotting)	42
4.2 การคัดเลือกระดับที่ 2	42
4.2.1 การคัดเลือกโดยวิธี Western blotting	42
4.2.2 การคัดเลือกจากปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) โดยวิธี dot blotting	43
4.3 การโคลนซ้ำโดยวิธี limited dilution (cloning by limiting dilution)	46
4.4 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา (cryopreservation of hybridoma cells)	46
5. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (study of monoclonal antibody properties)	46

5.1 การจำแนก heavy chain และ light chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	46
5.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจเชื้อ S. Enteritidis โดยวิธี dot blotting	49
6. การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีภายหลังการเพิ่มจำนวนเชื้อ (pre-enrichment)	50
6.1 การตรวจเชื้อ S. Enteritidis ภายหลังการเพิ่มจำนวนเชื้อ ใน TSB	50
6.2 การตรวจเชื้อ S. Enteritidis ภายหลังการเพิ่มจำนวนเชื้อในเนื้อไก่บดผสม TSB	50
บทที่ 4 ผลการทดลอง	51
1. การตรวจเชื้อ S. Enteritidis ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)	51
2. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ S. Enteritidis และ <i>Salmonella enterica</i> subsp.	54
3. การผลิตและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา.....	56
4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	57
5. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจเชื้อ S. Enteritidis โดยวิธี dot blotting	60
6. การตรวจเชื้อ S. Enteritidis ภายหลังการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB.....	62
7. การตรวจหาเชื้อ S. Enteritidis ภายหลังการบ่มเชื้อในตัวอย่างเนื้อไก่บดผสม TSB.....	63
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	65
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก.....	80
ประวัติผู้เขียน.....	98

สารบัญตาราง

ตาราง 1 ลักษณะทางชีวเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการจัดกลุ่ม species และ subspecies ของเชื้อ <i>Salmonella</i>	5
ตาราง 2 เชื้อ <i>Salmonella</i> ที่แยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ	14
ตาราง 3 ปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ <i>Salmonella</i>	21
ตาราง 4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Salmonella</i> บน selective media ชนิดต่างๆ	22
ตาราง 5 ผลการทดสอบ IMVIC และการทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ ของเชื้อ <i>Salmonella</i>	25
ตาราง 6 ไพรเมอร์ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ <i>Salmonella</i> spp. <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Thompson</i> และ <i>S. Infantis</i>	27
ตาราง 7 forward และ reverse primer ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ <i>Salmonella</i> ในเทคนิค real time PCR.....	28
ตาราง 8 แบคทีเรียที่ใช้ในการปลูกหมั้คั่วกัน (*) และทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่จำเพาะต่อเชื้อ <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Hadar</i> และ <i>S. Virchow</i>	35
ตาราง 9 ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR.....	39
ตาราง 10 ขั้นตอน อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	39
ตาราง 12 การตรวจพิสูจน์เชื้อด้วยวิธี PCR และความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	52
ตาราง 13 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>Salmonella</i> ซีโรวาร์ต่างๆ ทดสอบ โดยวิธี dot blotting และ Western blotting โดยใช้แบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/mL.....	64

สารบัญรูปภาพ

ภาพประกอบ 1 วงจรชีวิตของเชื้อ <i>Salmonella</i> และการแพร่กระจายมาสู่มนุษย์.....	13
ภาพประกอบ 2 วงจรการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Salmonella</i> ในฟาร์มไก่.....	16
ภาพประกอบ 3 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ <i>Salmonella</i>	23
ภาพประกอบ 4 การสังเคราะห์ DNA โดยเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร HAT medium	31
ภาพประกอบ 5 แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting	44
ภาพประกอบ 6 แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และการทดสอบปฏิกิริยา	45
ข้าม โดยวิธี dot blotting	45
ภาพประกอบ 7 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	49
ภาพประกอบ 8 การตรวจเพื่อยืนยันเชื้อสกุล <i>Salmonella</i> ด้วยวิธี PCR	51
ภาพประกอบ 9 การตรวจเพื่อยืนยันเชื้อ <i>S. Enteritidis</i> ด้วยวิธี PCR.....	52
ภาพประกอบ 10 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ	55
<i>S. Enteritidis</i>	55
ภาพประกอบ 11 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย	56
เชื้อ <i>Salmonella</i> ทั้ง 4 ซีโรวาร์.....	56
ภาพประกอบ 12 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี แต่ละชนิดที่ผลิตได้กับ	
แบคทีเรียต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting	58
ภาพประกอบ 13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดต่อแอนติเจน	
.....	59
ภาพประกอบ 14 การทดสอบชนิดของแอนติเจน ที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ	
.....	60
ภาพประกอบ 15 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ	61
ภาพประกอบ 16 การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ <i>S. Enteritidis</i> หลังการบ่มเพิ่มจำนวนใน	
อาหาร TSB	62

ภาพประกอบ 17 การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ S. Enteritidis หลังการบ่มเพิ่มจำนวนในอาหาร TSB ที่มีเนื้อไก่บดผสมอยู่.....	63
--	----



บทที่ 1

บทนำ

โรคติดเชื้อแซลโมเนลลา (Salmonellosis) เป็นโรคที่มีการระบาดอย่างรุนแรงทั่วโลกในทุกปี โดยมีสาเหตุจากเชื้อ *Salmonella enterica* กลุ่ม nonthypoidal ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษและท้องร่วงอย่างรุนแรง เนื่องมาจากสารพิษที่เชื้อ *Salmonella* สร้างขึ้น (endotoxin, cytotoxin และ enterotoxin) โดยระดับความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่นปริมาณของเชื้อที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายและสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* และความแข็งแรงของผู้ได้รับเชื้อ เป็นต้น จากการประมาณการพบผู้เสียชีวิตทั่วโลก 155,000 ราย ในแต่ละปีที่มีปัจจัยเกี่ยวข้องกับโรค salmonellosis (Little, Rawal, De Pinna, & McLauchlin, 2010; Majowicz et al., 2010; Mead et al., 1999) เชื้อ *Salmonella* สามารถอยู่ได้ทั้งในทางเดินอาหารของมนุษย์ และสัตว์เลื้อยคลาน เมื่อมีการขับถ่ายจะเกิดการปนเปื้อนของอุจจาระและเป็นช่องทางการแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมทั้งในน้ำและดิน และกลับเข้าสู่วงจรเดิมในขั้นตอนการทำปศุสัตว์และการเพาะปลูกทางเกษตรกรรม มีรายงานพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ทั้งในพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ และในน้ำ เมื่อใช้วัตถุดิบเหล่านี้ในการเลี้ยงสัตว์เชื้อ *Salmonella* จะเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ เพิ่มจำนวน และอาจเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อเป็นวงกว้าง ซึ่งเชื้อสามารถก่อโรคแก่สัตว์ในฟาร์มที่มีภาวะอ่อนแอ หรือการจัดการฟาร์มไม่มีประสิทธิภาพที่ดีพอ โดยสัตว์ที่ได้รับเชื้ออาจแสดงอาการ หรือไม่แสดงอาการของโรค salmonellosis อย่างไรก็ตามหากนำผลิตภัณฑ์ของสัตว์กลุ่มดังกล่าวมาบริโภค ก็จะเป็นการส่งต่อเชื้อมายังร่างกายของมนุษย์ ซึ่งเมื่อได้รับสารพิษที่เชื้อ *Salmonella* สร้างขึ้นจะเกิดอาการป่วยในที่สุด ในปัจจุบันแหล่งโปรตีนที่นิยมบริโภคกันทั่วโลกคือโปรตีนที่มาจากสัตว์ โดยไก่และหมูจัดเป็นแหล่งโปรตีนที่นิยมบริโภคมากที่สุดทั่วโลก ประเทศไทยสามารถผลิตและจำหน่าย ผลิตภัณฑ์จากไก่ในรูปแบบต่างๆ เช่นการแช่แข็งทั้งตัว หรือการแยกชิ้นส่วนแช่แข็งและไข่ เพื่อบริโภคทั้งภายในประเทศและการส่งออก ซึ่งมีแนวโน้มการผลิตสูงขึ้นทุกปี โดยในปี 2556 ประเทศไทยมีการผลิตและส่งออกไก่แช่แข็งถึง 1,067 ล้านตัว และในปี 2560 ไทยส่งออกผลิตภัณฑ์จากไก่เป็นอันดับที่ 4 (6.5 %) ของโลกรองจากประเทศบราซิล (36.4 %) สหรัฐอเมริกา (28.2 %) และสหภาพยุโรป (11.9 %) (วิบูลย์, 2016) อย่างไรก็ตามไก่ถือเป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* มากที่สุด (29%) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งในเนื้อและไข่ไก่ (Goodman et al., 2017) จากความกังวลเกี่ยวกับการปนเปื้อนและการแพร่ระบาดของเชื้อ *Salmonella* กรมปศุสัตว์ จึงได้ออกระเบียบว่าด้วยการควบคุมโรค *Salmonella* สำหรับสัตว์ปีก พุทธศักราช 2553 ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนพิเศษ 140 ง. เพื่อควบคุมการแพร่ระบาด

และการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ในสัตว์ปีกพันธุ์ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกและสถานที่พักไข่สัตว์ปีก (เกษตร) สำหรับเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์สำคัญที่เป็นสาเหตุของโรค salmonellosis และพบการปนเปื้อนได้มากในสัตว์ปีกได้แก่เชื้อ *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* และ *S. Virchow* ทั้งนี้ ซีโรวาร์ ของ *Salmonella* ที่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก มากที่สุดคือเชื้อ *S. Enteritidis* (Goodman et al., 2017) จากสถานะการณ์ดังกล่าว การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ที่มีความถูกต้อง รวดเร็ว มีประสิทธิภาพและราคาถูก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยการตรวจสอบในระดับซีโรวาร์ จะช่วยในการวางแผนการป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ และการรักษาได้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการตรวจ วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการนิยมใช้วิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาร่วมกับเทคนิคชีวเคมี (biochemical test) และปฏิกิริยาการตกตะกอน (agglutination) กับแอนติซีรัม เนื่องจากมีต้นทุนที่ไม่สูงมาก แต่วิธีการเหล่านี้ใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ อีกทั้งผลการตรวจวิเคราะห์ยังไม่สามารถเชื่อถือได้ในระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงอาจไม่สามารถแยกแต่ละซีโรวาร์ออกจากกันได้ นอกจากนี้ต้องการบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญสูง ส่วนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่มีความไว ความถูกต้องสูง และให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว (Glynn et al., 2006; Mogani, Goyvaerts, Venter, & Sibara, 2007; Štefanovičová, Drahovská, Sásik, & Kuchta, 2002; Tomás, Rodrigo, Hernandez, & Ferrus, 2009) โดยในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* นิยมตรวจหา ยีนที่ใช้ในการก่อโรคเช่น *inv-A*, *sdf*, *IE-1* และ *Flic* เป็นต้น (Hendriksen, Agenaar, & Van Bergen, 2003; Malorny et al., 2004; McCarthy et al., 2009; Seo, Valentin-Bon, & Brackett, 2006; Shimizu et al., 2014; Wang & Yeh, 2002) นอกจากนี้ยังพบการพัฒนาเทคนิคอื่นทางด้าน biosensor platforms เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* เช่นการใช้ bacteriophage m13 ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. (Niyomdech et al., 2018) หรือ P22::PrmB-gfp phage ในการตรวจเชื้อ *S. Typhimurium* LT2 (Vinay et al., 2015) เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังคงต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญ และมีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างสูง ดังนั้นในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาและกลุ่มประเทศด้อยพัฒนาจะสามารถเข้าถึงเทคนิคดังกล่าวได้น้อย การผลิตและนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในแต่ละซีโรวาร์ จึงเป็นอีกทางเลือกที่จะสามารถนำมาพัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ที่มีความไว แม่นยำสูง ใช้เวลาในการตรวจน้อย ไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญมากนัก อีกทั้งมีค่าใช้จ่ายที่ถูกลง ซึ่งจะสามารถช่วยป้องกันและเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อ *S. Enteritidis* ที่เป็นสาเหตุหลักของโรค salmonellosis ได้ในลำดับต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* และ *Salmonella enterica* subsp.
2. เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* และ *Salmonella enterica* subsp. มาใช้ในการตรวจสอบและจำแนกเชื้อ *S. Enteritidis* ออกจากเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นๆ และแบคทีเรียต่างชนิด

ความสำคัญของการวิจัย

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจพิสูจน์จำแนก และวินิจฉัยการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ *S. Enteritidis* ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก และตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ที่คัดแยกจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมเชื้อ *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* และ *S. Virchow* เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว
2. คัดเลือกหนูขาวตัวที่ตอบสนองดีที่สุดเพื่อนำมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา
3. คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน โดยวิธี dot blotting, Western blotting และการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction)
4. ทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบเชื้อ *S. Enteritidis* โดยวิธี dot blotting
5. นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปใช้ในการจำแนกเชื้อ *S. Enteritidis* ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกโดยวิธี dot blotting

สมมติฐานการวิจัย

เชื้อ *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* และ *S. Virchow* ต่างก็มีคุณสมบัติของแอนติเจนที่หลากหลาย (O-antigen, H-antigen และ Vi-antigen) โดยในจำนวนนี้จะมีลักษณะแอนติเจนร่วมกันของแต่ละซีโรวาร์ ในขณะที่เดียวกันก็มีลักษณะเฉพาะของแต่ละซีโรวาร์นั้นๆ ซึ่งหากสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออีพิโทปดังกล่าวได้ นอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อการแยกเชื้อ *Salmonella* กลุ่มดังกล่าวออกจาก *Salmonella* ซีโรวาร์อื่นๆ รวมถึงแบคทีเรียชนิดอื่นได้อีกด้วย

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติการค้นพบ *Salmonella*

เชื้อ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (negative bacteria) รูปร่างท่อนสั้น (short-bacilli) ขนาดประมาณ $0.7-1.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ จัดอยู่ในกลุ่ม aerobiac หรือ facultative anaerobic สร้างก๊าซจากกระบวนการหมัก (fermentation) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) เคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella ยกเว้นเชื้อ *S. Pullorum* และ *S. Gallinarum* ซึ่งไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) (Forshell & Wierup, 2006) เจริญได้ในช่วง pH ระหว่าง 4.0-9.0 โดยค่า pH ที่เหมาะสมคือ 7.0 และสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 7-47 °C แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (optimum temperature) คือ 35-37 °C (Franco & Landgraf, 1996) พบการกระจายของเชื้อ *Salmonella* ได้ทั่วไปตามธรรมชาติ และสามารถพบได้ในทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลื้อยคลาน แต่ไม่พบในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำจำพวกปลา หอย และสัตว์เปลือกแข็ง ดังนั้นคาดว่า การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในสัตว์กลุ่มดังกล่าวเกิดขึ้นภายหลังจากถูกจับในขั้นตอนของการทำประมง (Jakabi et al., 1999) ปัจจุบันพบเชื้อ *Salmonella* จำนวนมากกว่า 2,500 ซีโรวาร์ (serovar) โดยถูกจัดเป็นเชื้อสาเหตุหลักของโรคอาหารเป็นพิษ (food-borne illness) ที่มีการระบาดทั่วโลก เป็นอันดับที่สองรองจากเชื้อ *Campylobacter*

แบคทีเรียในสกุล *Salmonella* ถูกพบครั้งแรกช่วงปลายศตวรรษที่ 19 โดยในปี 1880 มีการแยกเชื้อ *Salmonella Typhi* จากม้ามและต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยได้สำเร็จและถูกจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อก่อโรค (pathogen) แต่ยังไม่มีการศึกษาเชื่อดังกล่าวอย่างจริงจัง ต่อมาในปี 1885 Salmon และ Smith ได้แยกแบคทีเรียรูปร่างท่อนจากหมูที่ป่วยเป็นโรค และให้ชื่อเชื้อว่า *Bacterium suipestifer* โดยในภายหลังเพื่อเป็นเกียรติแก่ Salmon ผู้ค้นพบเชื่อดังกล่าวได้มีการชื่อเปลี่ยนเป็น *Salmonella Choleraesuis* ต่อมา มีรายงานการพบเชื้อในกลุ่ม *Salmonella* มากขึ้นเช่นในปี 1888 พบเชื้อ *Salmonella Enteritidis* โดย Gaetner ปี 1892 พบเชื้อ *Salmonella Typhimurium* โดย Loefer เป็นต้น และในปี 1913 Jones ใช้วิธีการ agglutination test ในการแยกเชื้อ *Salmonella Pullorum* (Corrêa & Corrêa, 1983)

การจัดจำแนกและการเรียกชื่อ *Salmonella*

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ทางโมเลกุล ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ *Salmonella* ออกเป็น 2 species (Hein, Flekna, Krassnig, & Wagner, 2006) ได้แก่ *S. enterica* และ *S. bongori* โดย *S. enterica* ถูกแบ่งออกเป็น 6 subspecies คือ *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* และ *S. enterica* subsp. *indica* อย่างไรก็ตามทั้ง 2 species และ 6 subspecies มีคุณสมบัติพื้นฐานทางชีวเคมีที่ช่วยในการจัดกลุ่มและแบ่งแยกสมาชิกที่มีอยู่อย่างมากมายออกจากกันได้ ดังตาราง 1 ต่อมาได้มีการคิดค้นระบบการแบ่งกลุ่มเป็น serovar ขึ้น โดยอาจตั้งชื่อตามชื่อโรคเช่น *S. Typhi* หรือตามความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกันเช่น *S. Paratyphi* A, B, C เป็นต้น หรือแม้แต่การตั้งชื่อตามสัตว์ที่มักเป็นแหล่งเพาะโรคเช่น *S. Typhi-murium* หรือ *S. Cholerae-suis* ซึ่งสร้างความสับสนเป็นอย่างมาก เนื่องจากสัตว์ที่เป็นแหล่งโรคของเชื้อ *Salmonella* แต่ละซีโรวาร์ มีได้มากกว่า 1 ชนิด ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าว จึงได้มีการกำหนดให้ใช้ชื่อเมืองที่ค้นพบเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ต่างๆเป็นครั้งแรกในการกำหนดชื่อซีโรวาร์นั้นๆ เช่น *S. London*, *S. Panama* เป็นต้น นอกจากนี้การเขียนชื่อเต็มของเชื้อ *Salmonella* ยังทำให้เกิดความไม่สะดวกในการสื่อสาร เนื่องจากความยาวที่มากเกินไปเช่น *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ดังนั้นจึงมีการอนุญาตให้เขียนชื่อสกุล (genus) และตามด้วยชื่อซีโรวาร์ในการเรียกชื่อ โดยอักษรตัวแรกของชื่อซีโรวาร์จะต้องขึ้นต้นด้วยตัวใหญ่ และตั้งตรงตัวอย่างเช่น *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* และ *S. Virchow* เป็นต้น

ตาราง 1 ลักษณะทางชีวเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการจัดกลุ่ม species และ subspecies ของเชื้อ *Salmonella*

species	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
Subspecies	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Characters							
Ducitol	+	-	-	-	-	D	+
ONPG (2h)	-	+	+	+	-	D	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+

ตาราง 1 (ต่อ)

species	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
Subspecies	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Characters							
growth with KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+) tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ-glutamyltransferase	+	+	-	+	+	+	+
β-gluconidase	D	D	-	+	-	D	-
Mucate	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	D	-
lysed by phage O1	+	+	-	+	-	+	D
Member	1531	505	99	336	73	13	22
total number				2557 2579			
usual Habitat	warm-blood animals			cold-blood animals and environment			

หมายเหตุ : + = 90% หรือมากกว่า เป็นผลบวก

- = 90% หรือมากกว่า เป็นผลลบ

D = เกิดปฏิกิริยาที่แตกต่าง

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hendriksen (2003). A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization

อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันความถูกต้องในการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* หลังการทดสอบทางชีวเคมี จะทำการทดสอบทางซีโรวิทยา โดยอาศัยคุณสมบัติของแอนติเจนที่อยู่บนผนังเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* แต่ละชนิด ซึ่งช่วยให้เกิดการจำแนกในระดับซีโรวาร์ได้

แอนติเจนของ *Salmonella*

เช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรียในวง Enterobacteriaceae ส่วนใหญ่ เชื้อที่อยู่ในสกุล *Salmonella* จะประกอบด้วยแอนติเจนหลัก 3 ชนิดด้วยกันคือ somatic, surface และ flagellar ซึ่งสามารถใช้ในการจัดจำแนกและวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella*

1. somatic (O) antigen หรือ cell wall antigen

O-antigen เป็นแอนติเจนที่อยู่บริเวณ outer membrane ของผนังเซลล์ มีลักษณะเป็น polysaccharide เรียงตัวซ้ำๆ จัดเป็นแอนติเจนที่ทนต่อความร้อน (heat stable) และทนต่อแอลกอฮอล์ O-antigen สามารถใช้ในการจัดกลุ่ม *Salmonella* กว่า 2,500 ซีโรวาร์ ออกเป็น 67 กลุ่ม โดยอาศัยการทดสอบ agglutination ในการวิเคราะห์ผล

2. flagellar (H) antigen

H-antigens เป็นแอนติเจนที่ปรากฏบริเวณพื้นผิวของ flagella ของเชื้อ จัดเป็นแอนติเจนที่ไม่ทนต่อความร้อน (heat-labile protein) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ flagella-specific antisera ในการทดสอบ agglutination ทำให้แยกเชื้อ *Salmonella* แต่ละซีโรวาร์ออกจากกันได้

3. capsular (Vi) antigen

เชื้อ *Salmonella* บางซีโรวาร์ เช่น *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* และ *S. Dublin* สามารถสร้าง capsule หุ้มชั้นนอกของเซลล์ถัดจากชั้นผนังเซลล์ได้ เรียกว่า Vi-antigen (superficial antigen) ทำให้เชื้อกลุ่มนี้ไม่ทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับ O-antisera (Hitchcock et al., 1986; Rietschel, 1982)

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อ *Salmonella* โดยใช้เกณฑ์แหล่งที่อยู่อาศัยได้ดังนี้

1. เชื้อ *Salmonella* ที่พบในมนุษย์เท่านั้น ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อ *Salmonella* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคและมีอัตราการตายสูง โดยเป็นสาเหตุของโรคไทฟอยด์ (typhoid fever) ได้แก่ *S. Typhi* และโรคไขรากสาดน้อย (paratyphoid fever) ได้แก่ *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* และ *S. Paratyphi C* ซึ่งสามารถตรวจพบ *S. Typhi* ได้ในสิ่งส่งตรวจจากเลือด อุจจาระ และปัสสาวะของผู้ป่วย

2. กลุ่ม nontyphoidal salmonellosis ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อ *Salmonella* ที่ไม่เลือกโฮสต์ และสามารถปรับตัวตามโฮสต์ได้ดี จึงถือว่าเป็นกลุ่มของเชื้อที่มีคุณสมบัติ zoonosis เนื่องจากมักติดเชื้อในสัตว์โดยที่อาจแสดงหรือไม่แสดงอาการ เมื่อมนุษย์นำสัตว์ที่ติดเชื้อมานั้นมาบริโภคก็จะได้รับเชื้อดังกล่าวเข้าสู่ร่างกาย และทำให้เกิดโรค salmonellosis ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น *S. Enteritidis* และ *S. Typhimurium* เป็นต้น (Bangtrakulnonth et

al., 2012) นอกจากนี้โรค salmonellosis ยังถูกจัดเป็นโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารลำดับต้นๆ ที่มีการแพร่ระบาดอย่างรุนแรงทั่วโลกในทุกปีอีกด้วย

โรคติดเชื้อ *Salmonella* (salmonellosis)

หลังจากได้รับเชื้อ *Salmonella* เข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะมีระยะฟักตัวระหว่าง 5-60 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปมักปรากฏอาการช่วง 12-36 ชั่วโมง ในจำนวนนี้พบการดำเนินโรคในเด็กคนชรา และผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอ อันเนื่องมาจากสาเหตุต่างๆ เช่นการมีโรคประจำตัวหรือโรคเรื้อรัง ซึ่งความรุนแรง ของอาการจะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของเชื้อ *Salmonella* ที่ได้รับด้วย ซึ่งผู้ป่วยมักมีอาการท้องเดินท้องร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ ไข้สูงปานกลาง อุจจาระเหลว หากไม่ได้รับการปฐมพยาบาลในเบื้องต้น ผู้ป่วยอาจมีอาการขาดน้ำ (dehydration) เป็นสาเหตุให้อ่อนเพลียและปวดศีรษะ โดยอาการดังกล่าวจะปรากฏ 2-5 วันและอาจหายได้เองเนื่องจากปริมาณเชื้อลดลง แต่บางรายอาจมีการพัฒนาเป็นการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ (septicemia) อย่างไรก็ตามหากนำอุจจาระของคนไข้ไปตรวจ จะสามารถพบเชื้อ *Salmonella* ได้ในปริมาณมาก (Archer & Young, 1988; Williams & Smith, 1993) กลไกการก่อโรสดังกล่าวเริ่มต้นจากการที่เชื้อ *Salmonella* เดินทางมายังบริเวณ lumen ของลำไส้เล็กตอนปลาย และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมาก หลังจากนั้นเชื้อสามารถไ้ผ่านบริเวณผนังของลำไส้เล็ก เพื่อเข้าสู่ระบบท่อน้ำเหลือง และทำลายเม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถพัฒนาไปเป็นการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ นอกจากนี้เชื้อ *Salmonella* สามารถสร้าง enterotoxin และ cytotoxin (Koupal & Deibel, 1975) ซึ่งคล้ายคลึงกับที่พบใน *Escherichia coli* แต่มีปริมาณที่น้อยกว่า โดยสามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ cAMP (cyclic 3',5' adenosine monophosphate) ในลำไส้ ส่งผลให้มีของเหลวปริมาณมากหลั่งมาสู่ลำไส้ นอกจากนี้ยังพบว่า enterotoxin ของเชื้อ *Salmonella* มีความคล้ายคลึงกับ cholera toxin-CT ของเชื้อ *Vibrio* อีกด้วย ดังนั้นบางครั้งการติดเชื้อ *Salmonella* ทำให้เกิดอาการปวดบิดของลำไส้ได้ (Koo, 1984) ทั้งนี้เชื้อ *Salmonella* ยังมีปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรคอีกมากมาย ซึ่งนอกจากจะช่วยให้เชื้อ *Salmonella* เข้าสู่ร่างกายเพื่อก่อโรคในโฮสต์ได้แล้ว ในบางกรณียังช่วยให้เชื้อเกิดความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในการเกิดโรค (Virulence factor) ของเชื้อ *Salmonella*

1. สารพิษ (Toxin)

สารพิษที่ *Salmonella* ผลิตขึ้น มีทั้งชนิดที่เป็น endotoxin และ exotoxin โดย endotoxin คือส่วนของ lipid portion (lipid A) ซึ่งอยู่ที่ชั้น outer membrane lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อ *Salmonella* ส่วน exotoxin ที่สร้างโดยเชื้อ *Salmonella* แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ enterotoxin และ cytotoxin (Hitchcock et al., 1986)

1.1 endotoxin : เป็นส่วนของ outer membrane lipopolysaccharide (LPS) ที่ประกอบด้วย polysaccharide, lipid และ protein โดย Westphal และ Luderitz (1954) สามารถสกัดและวิเคราะห์โครงสร้างดังกล่าวได้และพบว่า ภายในโมเลกุลของ LPS นั้นเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalently bound) (Galanos, 1977; Gallanos, Lüderitz, & Westphal, 1971; Lüderitz et al., 1982; Orskov, Orskov, Jann, & Jann, 1977; Otto Westphal, Jann, & Himmelsbach, 1983) โดยมีชื่อเรียกและคุณสมบัติเฉพาะดังนี้

1.1.1 O-specific antigen (O-antigen หรือ somatic antigen) ประกอบด้วยสายยาวของ polysaccharide ที่เรียงต่อกันในรูปแบบซ้ำๆ เช่น monosaccharide (L'vov et al., 1984; Luderitz, 1968; Orskov et al., 1977) โดยในสายพันธุ์ปกติ O-antigen มีลักษณะสำคัญ 2 ประการคือช่วยให้เกิดผิวโคโลนีของแบคทีเรียที่เรียบ (smooth colony) และไม่ทำปฏิกิริยา autoagglutination กับสารละลาย normal saline อย่างไรก็ตามปัจจุบันพบว่ามีเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ส่งผลให้บริเวณ LPS ผิดปกติไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild-type organism) เนื่องจากขาด O-antigen โดยสังเกตได้จากโคโลนีของเชื้อที่ขรุขระและหยาบ (irregular and rough colony) นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยา autoagglutinate กับสารละลาย normal saline อีกด้วย โดยสามารถสังเกตการตกตะกอนได้ภายในเวลา 30 นาที (Schmidt, Schlecht, Luderitz, & Westphal, 1969)

1.1.2 core oligosaccharide เกิดจากการเรียงตัวของ monosaccharide ประมาณ 10 โมเลกุล เช่น 3-keto-2-deoxyoctonate [KDO], heptose, glucose, galactose และ N'-acetylglucosamine

1.1.3 lipid A ประกอบด้วย diglucosamine เชื่อมต่อกับ ester-, amide-, and diester-linked fatty acid โดยชนิดและตำแหน่งของ fatty acid ขึ้นอยู่กับแต่ละสปีชีส์ (Gallanos et al., 1971; Rietschel, 1982, 1984) ต่อมามีการศึกษาพบว่าส่วน lipid A ของ LPS เป็นส่วนที่แสดงคุณสมบัติ 1. pyrogenicity ทำให้ร่างกายของโฮสต์มีอุณหภูมิที่สูงขึ้นและเกิดไข้ (fever) เนื่องจากสมองส่วน hypothalamus ถูกกระตุ้น 2. endotoxicity ส่งผลโดยตรงต่อจำนวน

เม็ดเลือดและเกล็ดเลือดทำให้ลดลงอย่างรวดเร็ว ความดันเลือดเปลี่ยนแปลง และหากได้รับสารพิษในปริมาณมากอาจเกิดอาการช็อคได้ (O Westphal & Lüderitz, 1954)

1.2 exotoxin แบ่งออกได้ 2 ชนิดคือ

1.2.1 cytotoxin สามารถฆ่าเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cell) ได้ทุกชนิด จากการทดสอบพบว่าเชื้อ *S. Choleraesuis* และ *S. Enteritidis* สามารถออกฤทธิ์ได้เท่ากับเชื้อ *S. Typhi* โดยน้ำหนักโมเลกุลของ cytotoxin และปริมาณที่เซลล์ผลิตได้จะแตกต่างกันไปตามแต่ละซีโรวาร์ ตัวอย่างเช่น cytotoxin ของเชื้อ *S. Choleraesuis* มีขนาด 78 kDa, *S. Enteritidis* มีขนาด 70 kDa และ *S. Typhi* มีขนาด 56 kDa เป็นต้น อย่างไรก็ตาม cytotoxin ไม่ทนความร้อน โดยสามารถทำลายได้ที่ 100°C 15 นาที (Ketyi et al., 1979; Malik, Sharma, & Thapliyal, 1996; Reitmeyer, Peterson, & Wilson, 1986)

1.2.2 Heat labile *Salmonella* enterotoxin (Stn) เป็นสารพิษที่ไม่ทนความร้อน มีมวลโมเลกุลประมาณ 29 kDa (Chary, Prasad, Chopra, & Peterson, 1993; Libby et al., 1994; Prager, Fruth, & Tschäpe, 1995) ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *stn* นอกจากนี้ในบาง serovars อาจพบโปรตีน salmolyisin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยา hemolytic โดยจะสามารถสังเกตุได้ในเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ (clinical sample) ใน passage แรกๆ เท่านั้น (Libby et al., 1994; O'brien & Holmes, 1996)

2. Plasmids และ prophages

ประมาณ 90% ของยีนแต่ละ serovars จะมีความคล้ายคลึงกัน โดย 10% ที่ต่างกันนั้นพบว่าเป็นส่วนของ *Salmonella* pathogenicity islands (SPI) (McClelland et al., 2001) ในกลุ่มของเชื้อ *Salmonella* spp. มีระบบที่เรียกว่า self-transmissible virulence plasmid หรือ pSLT ซึ่งช่วยในการขนส่งยีนในกลุ่ม *spv* genes โดยยีนในกลุ่มดังกล่าวเป็นยีนมีความสำคัญเช่น *spvB* enzyme ทำหน้าที่เป็น intracellular ADP-ribosylating toxin ทำให้เกิดการตายของเซลล์โฮสต์ (cytotoxicity) ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อรอดจากการทำลายของ macrophage ได้ (Lesnick, Reiner, Fierer, & Guiney, 2001; Sabbagh, Forest, Lepage, Leclerc, & Daigle, 2010) *stx8* ช่วยในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (drug resistance) และเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ใน macrophages (Huang, Wu, Zhang, & Zhang, 2005; Wu et al., 2010) นอกจากนี้ยังมียีนชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะในวงกว้าง (multidrug anti- microbial resistance : MDR) และสามารถส่งผ่านระหว่างกลุ่มของเชื้อ *Salmonella* spp. กับ *E. coli* และแบคทีเรียเอนเทอริก (enteric bacteria) อื่นๆ ได้อีกด้วย เช่น *cat*, *dhfr7*, *dhfr14*, *sul1* และ *blaTEM-1* (Phan et al.,

2009; Sabbagh et al., 2010) st313 ช่วยในการเกิดการติดเชื้อในเนื้อเยื่อชั้นในของทางเดินอาหาร (invasive infection) (Kingsley et al., 2009)

3. Type III secretion system และ outer membrane vesicles

เชื้อที่อยู่ในกลุ่มของ *S. enterica* spp. มีระบบ type III secretion system (T3SS) gene clusters ที่ทำหน้าที่คล้าย molecular syringe ในการนำโปรตีนหรือโมเลกุลต่างๆ เข้าสู่ส่วนเป้าหมายภายในเซลล์โฮสต์เช่น บริเวณ cytosol ของเซลล์โฮสต์ เป็นผลให้เกิดการกระตุ้นสัญญาณต่างๆ

3.1 *SopB* ช่วยให้เกิดการบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นใน (invasion)

3.2 *akt* กระตุ้นการหลั่งของสารน้ำ และทำให้เกิด *Salmonella* containing vacuole (SCV) formation (Hernandez, Hueffer, Wenk, & Galán, 2004; Ibarra & Steele-Mortimer, 2009; Knodler, Finlay, & Steele-Mortimer, 2005; Terebiznik et al., 2002)

3.3 *spi-1* ในระบบ T3SS1 ช่วยในการ invasion และการกีด non-phagocytic (Glynn et al., 2006)

3.4 *spi-2* ในระบบ T3SS ช่วยในการเอาชีวิตรอดจากการทำลายของ macrophages และช่วยให้เชื้ออยู่รอดในร่างกายโฮสต์ได้เป็นเวลานานโดยไม่แสดงอาการของโรค (long-term asymptomatic infection) (Forest, Ferraro, Sabbagh, & Daigle, 2010)

3.5 bacterial outer membrane vesicles (OMV) ปัจจุบันทราบว่าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกใช้โดยเชื้อ *Salmonella* ในการส่งถ่าย virulence factor ต่างๆ เช่น cytotoxin เข้าสู่ชั้น cytoplasm ของเซลล์โฮสต์ (Yoon, Ansong, Adkins, & Heffron, 2011)

4. fimbriae และ flagella

4.1 fimbriae พบบริเวณพื้นผิวรอบนอกของแบคทีเรีย มีความสำคัญอย่างยิ่งในการเกิด biofilm, การเกาะติด (colonization) เนื้อเยื่อต่างๆ ของโฮสต์ในขั้นตอนแรกของการก่อโรค ส่วน pili มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับ fimbriae แต่มีขนาดที่ยาวกว่าและจำนวนที่น้อยกว่า มักพบมีส่วนสำคัญในการส่งถ่าย plasmid หรือ DNA ขนาดเล็กระหว่างแบคทีเรีย บางครั้งจึงอาจเรียก sex-pili (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009; Sabbagh et al., 2010)

4.2 flagella เป็นยางค์เส้นยาว (long helical filament) มีส่วนที่คล้ายมอเตอร์ที่ทำหน้าที่หมุนได้ ฝังอยู่ในส่วนของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย flagella จึงสามารถช่วยให้เชื้อ *Salmonella* เคลื่อนที่ไปยังบริเวณต่างๆ ของโฮสต์ได้และเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมการติดเชื้อทั้งระบบ (systemic infection) โปรตีน flagellin ที่เป็นองค์ประกอบใน flagella ยังทำหน้าที่เป็นแอนติเจนของเชื้อได้อีก

ด้วย (H-antigen) (Lockman & Curtiss, 1990; Schmitt et al., 2001; Winter et al., 2009; Zeng et al., 2003)

5. polysaccharide

เชื้อ *Salmonella* บางชนิดสามารถผลิต polysaccharide capsule หรือ Vi antigen ได้ ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญที่เพิ่มความรุนแรงในการเกิดโรค เนื่องจาก capsule จะช่วยให้เชื้อทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ทั้งภายในและภายนอกร่างกายโฮสต์ ดังนั้นจึงมักพบองค์ประกอบดังกล่าวในเชื้อ *Salmonella* ที่ก่อโรครุนแรงเช่นเชื้อ *S. Typhi* เป็นต้น (Kolyva, Waxin, & Popoff, 1992; Wain et al., 2005; Wilson et al., 2008; Zhang, Jeza, & Pan, 2008)

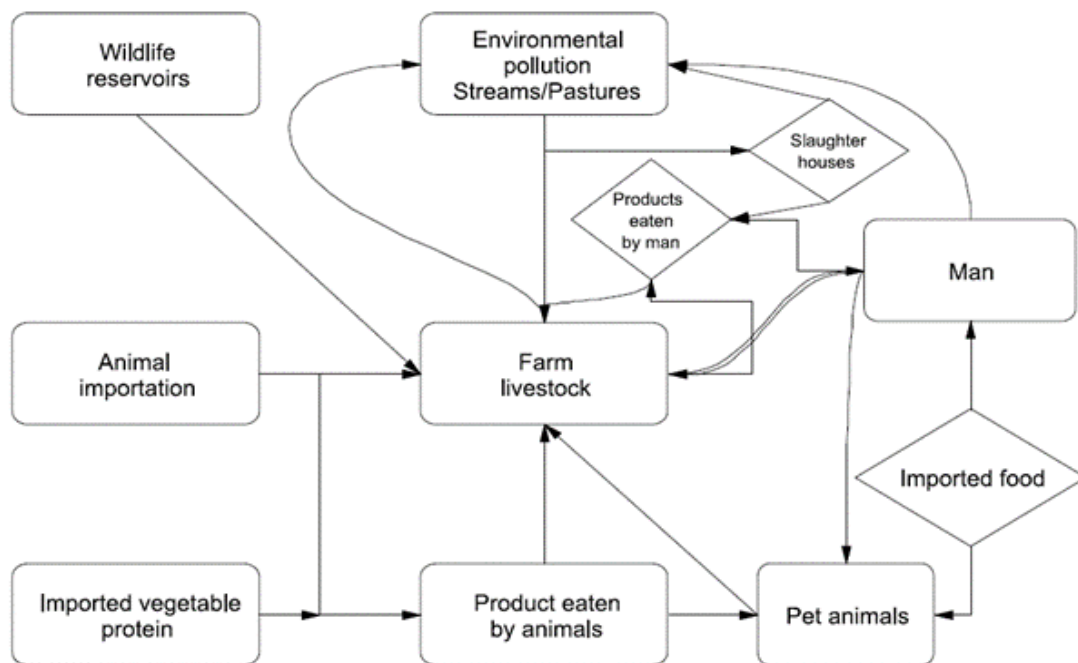
6. superoxide dismutase

ร่างกายโฮสต์ มักมีกลไกในการผลิต reactive oxygen species (ROS) เพื่อใช้ในการทำลาย intracellular pathogens เพื่อลดผลกระทบดังกล่าวเชื้อ *Salmonella* จะมีการสร้าง superoxide dismutase เพื่อป้องกัน extracellular reactive oxygen species (Krishnakumar, Kim, Mollo, Imlay, & Slauch, 2007; Pacello et al., 2008)

การแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella*

เชื้อ *Salmonella* สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์จำพวก แกะ แพะ สัตว์ปีก สุนัข โค กระบือ เป็นต้น ซึ่งในจำนวนนี้สัตว์ที่สามารถพบการติดเชื้อ *Salmonella* ได้บ่อยคือกลุ่มปศุสัตว์จำพวกสัตว์ปีก เช่น ไก่ เป็ด ห่าน นกยูง เนื่องจากได้รับเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนอยู่ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ และน้ำที่ใช้ในกระบวนการทำปศุสัตว์ เมื่อมูลของสัตว์เหล่านี้ถูกถ่ายลงสู่สิ่งแวดล้อม เชื้อ *Salmonella* สามารถปนเปื้อนสู่ ดิน น้ำ แปลงเกษตร และส่งต่อไปยังสัตว์ชนิดอื่นได้ (De Felip, 2001) การติดเชื้อ *Salmonella* ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ มักเกิดจากการปนเปื้อนในน้ำและอาหาร โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์จากไก่ ไข่ เนื้อ และน้ำนมดิบ ซึ่งถือเป็นช่องทางหลักในการแพร่กระจายเชื้อ รองลงมาคือผัก ผลไม้ อาหารทะเล และสัตว์เลื้อย ดังภาพประกอบ 1 และตาราง 2 โดยตั้งแต่ปี 1962 พบรายงานการเกิดโรค salmonellosis ในมนุษย์จากการได้รับเชื้อจากอาหารที่ปนเปื้อนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีสาเหตุหลักจากเชื้อในกลุ่ม nontyphoid strain โดยหลังปี 1980 เป็นต้นมาสามารถระบุเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของการระบาดดังกล่าวคือ *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* นอกจากนี้ The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ได้จัดทำรายงาน ที่ระบุว่าในปี 2010 การแพร่ระบาดของเชื้อ *Salmonella* สูงขึ้นกว่าช่วงปี 2006–2008 ประมาณ 10% (Matyas et al., 2010) โดยอาหารหรือวัตถุดิบในการ

ประกอบอาหารที่มักพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ได้อยู่คือไก่ ไช้ไก่ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก



ภาพประกอบ 1 วงจรชีวิตของเชื้อ *Salmonella* และการแพร่กระจายมาสู่มนุษย์

ที่มา : ดัดแปลงจาก WHO (1988). Salmonellosis control: the role of animal and product hygiene

ตาราง 2 เชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ

ประเทศ	อาหาร	ซีโรวาร์	อ้างอิง
United States	Papaya	Agona	CDC, 2011
United States	Raw milk	Anatum, Cerro, Dublin, Infantis, Kentucky, Mbdanka, Montevideo,	Van Kessel et al., 2011
China	Beef	Enteritidis, Typhimurium	Yang et al., 2010
Iran	Chicken	Thompson	Dallal et al., 2010
Brazil	Poultry carcass	Enteritidis	Freitas et al., 2010
Uruguay	Poultry and Eggs	Enteritidis, Derby, Gallinarum,	Betancor et al., 2010
Bangladesh	Chick egg	Typhimurium	Hasan et al., 2009
Senegal	Chicken carcasses and Street-Restaurants	Brancaster, Goelzau, Kentucky, Hadar, Agona, Poona, Bandia, Bessi, Brunei, Hull, Istanbul, Javiana,	Dione et al., 2009
United States	Chicken carcasses from retail stores	Enteritidis, Braenderup, Montevideo, Thompson, Mbandaka, Agona	Lestari et al., 2009
Iran	Raw poultry	Enteritidis, Baibouknown	Jalali et al., 2008
Turkey	Chicken	Infantis	Cetinkaya et al., 2008
Vietnam	Pork, beef, Chicken	London, Havana, Anatum, Hadar, Albany, Typhimurium	Van et al., 2007
Canada	Chicken nuggets and strips	Heidelberg, Orion, Kentucky, Hadar, Indiana, Infantis, Enteritidis, Mbandaka,	Bucher et al., 2007
Malaysia	Street food, fried chicken,	Biafra, Braenderup, Weltevreden	Tunung et al., 2007

ที่มา ดัดแปลงจาก :Gómez-Aldapa et al. (2012). The role of foods in *Salmonella* infections

เชื้อ *Salmonella* ในไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่

เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญที่สุดที่พบการปนเปื้อนในไข่ (Foods & Swanson, 2011) ซึ่งมีหลายปัจจัยและหลายขั้นตอนที่เชื้ออำนวยการให้เกิดการปนเปื้อน เชื้อดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามไข่มีกลไกตามธรรมชาติที่ช่วยป้องกันการติดเชื้อได้เช่นเดียวกัน

1. ปัจจัยทางกายภาพ (physical factors) เช่น ชั้น cuticle, เปลือกไข่, เยื่อใต้เปลือกไข่ (shell membranes) เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้ถือเป็นด่าน (barrier) ตามธรรมชาติ ที่ช่วยกันการผ่านเข้าออกของเชื้อจุลินทรีย์

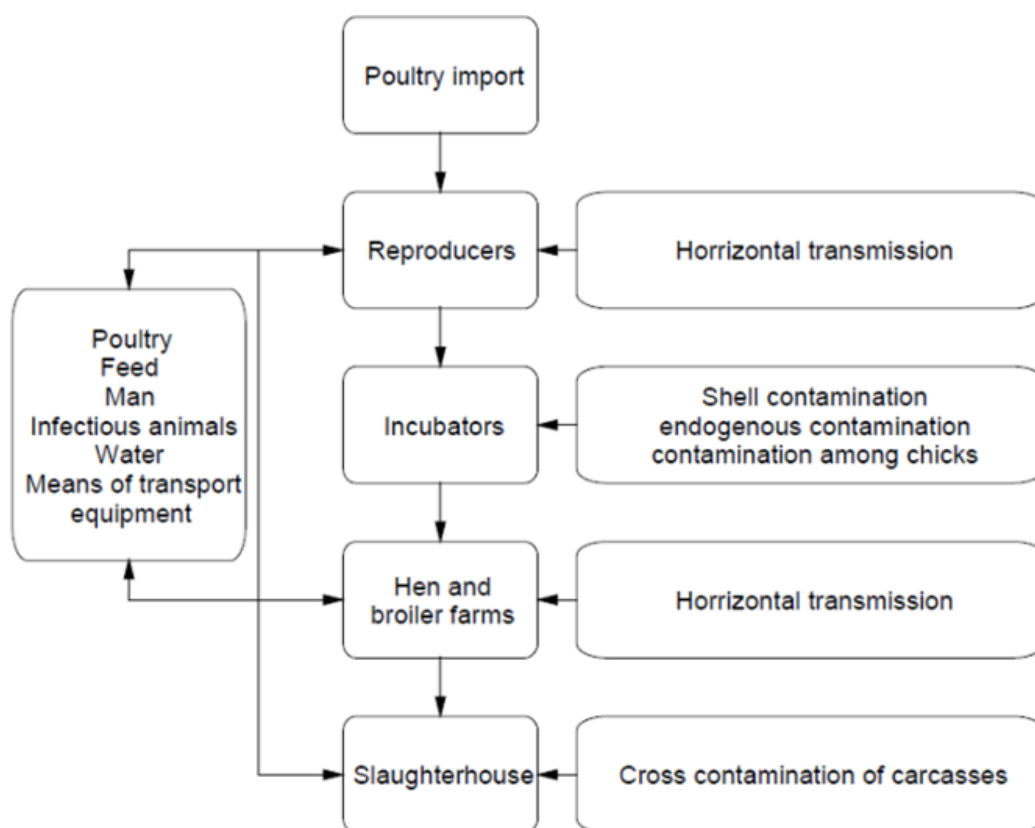
2. ปัจจัยทางเคมี (chemical factors) เช่น ค่าความเป็นกรดต่างของ abumen, lysozyme, avidin, flavoprotein, เอนไซม์ protease เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์

การติดเชื้อในไข่สามารถแบ่งออกได้ 2 แบบ

1. endogenous contamination โดยเชื้อถูกส่งผ่านจากแม่ไก่ที่ติดเชื้อ *Salmonella* มายังไข่ในระหว่างกระบวนการสร้างไข่ (Colavita, 2008) ดังนั้นหากมีการเลี้ยงไก่อย่างถูกสุขลักษณะ และทำให้ไก่มีสุขภาพที่ดี จะสามารถลดการติดเชื้อจากขั้นตอนนี้ได้ถึง 90% (Gandini, 1993)

2. exogenous contamination มักเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการบรรจุภัณฑ์ การขนส่ง และการจัดจำหน่าย (Colavita, 2008) โดยมีรายงานเกี่ยวกับการปนเปื้อนข้าม (cross-contamination) ซึ่งมักจะเกิดขึ้นใน กระบวนการต่างๆ ของโรงงานอุตสาหกรรม ทำให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อไปยังเปลือกไข่ฟองอื่นๆ (Andreoletti et al., 2009) ดังภาพประกอบ 2 อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลเพียงพอเกี่ยวกับความสามารถของเชื้อ *Salmonella* ในการผ่านชั้นเปลือกไข่เข้าสู่ด้านในเพื่อเพิ่มจำนวน แต่พบว่าภายในไข่ที่มีอายุมากสามารถพบจำนวนของเชื้อ *Salmonella* ได้มากกว่าไข่ที่มีอายุน้อย ทั้งนี้เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไปของเปลือกไข่ตามอายุที่เพิ่มมากขึ้น (De Felip, 2001)

จากปัจจัยต่างๆ เหล่านี้เป็นสาเหตุในการปนเปื้อนและสะสมเชื้อ *Salmonella* ในไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่ ซึ่งสามารถส่งต่อมาสู่มนุษย์ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าหากเก็บไข่ไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส จะสามารถจำกัดการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรคต่างๆ ซึ่งรวมถึงเชื้อ *Salmonella* ด้วย ดังนั้นในขั้นตอนหลังการผลิตจากฟาร์ม การขนส่ง การจัดจำหน่ายจนถึงมือผู้บริโภค หากสามารถควบคุมอุณหภูมิของไข่ให้ต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส จะเป็นหนทางหนึ่งที่ลดการเพิ่มจำนวนของ เชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนมา กับไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่ได้ (Van Hoorebeke et al., 2010)



ภาพประกอบ 2 วงจรการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในฟาร์มไก่

ที่มา: ดัดแปลงจาก WHO (1988). Salmonellosis control: the role of animal and product hygiene

รายงานการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในประเทศไทย

ลัดดา และสมหมาย (2552) ได้ทำการสำรวจความชุกของเชื้อ *Salmonella* spp. ในโรงฟักไข่และการดื้อยาต้านจุลชีพ โดยทำการสำรวจความชุกของเชื้อ *Salmonella* ในโรงฟักไข่ในจังหวัด 4 จังหวัดคือ ชลบุรี นครราชสีมา ลพบุรี และสระบุรี ช่วงระหว่างปี 2545 ถึง 2550 โดยเก็บตัวอย่างมูลลูกไก่แรกเกิด และอวัยวะภายในของลูกไก่ตายโคม จำนวน 8,465 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Salmonella* 16.6% (1,405 ตัวอย่าง จาก 8,465 ตัวอย่าง) serovars ที่พบมากที่สุด ได้แก่ *S. Enteritidis* 9.7% (825/8,456 ตัวอย่าง) รองลงมาได้แก่ *S. Mbandaka* (1.4%), *S. Altona* (0.7%), *S. Kentucky* (0.5%) และ *S. Stanley* (0.4%) ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการทดสอบการดื้อยาต้านจุลชีพจำนวน 13 ชนิด ด้วยวิธี disk diffusion ต่อเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้พบดื้อต่อยา nalidixic

acid สูงที่สุด (62.9%) ซึ่งเชื้อ *S. Enteritidis* มีแนวโน้มดื้อต่อยา 3 ชนิดเพิ่มขึ้นได้แก่ nalidixic acid จาก 60.9% ในปี 2545 เป็น 80% ในปี 2549, amoxicillin จาก 0 ในปี 2545 เป็น 31.6% ในปี 2550 และ ampicillin จาก 3.7% ในปี 2545 เป็น 31.6% ในปี 2550 การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้บ่งชี้ว่าเชื้อ *S. Enteritidis* เป็นปัญหาสำคัญในโรงพักไข่ โดยเป็นเชื้อหลักที่เกิดการปนเปื้อนและมีอัตราการดื้อต่อยาที่สูงขึ้น

ชุติมา และบุญญิตติ (2559) ได้ทำการศึกษาสถานะการณ์การระบาดของวิทยาของเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อไก่สด โดยตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อไก่สดที่จำหน่ายในตลาดสดหนองมนและตลาดนัดหลังมหาวิทยาลัยบูรพา โดยจำแนกเป็นเนื้อไก่สดส่วนนอก สะโพก สันใน ปีกและโครงไก่ อย่างละ 20 ตัวอย่าง รวมจำนวน 100 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Salmonella* 18.0% จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยพบในเนื้อไก่จากตลาดสดหนองมน 14% ตลาดนัดหลังมหาวิทยาลัยบูรพา พบ 4% เมื่อนำมาวิเคราะห์หิโรวารโดยใช้เทคนิคทางเซโรวิทยาพบเชื้อ *Salmonella* หลาย serovars ดังนี้ *S. Albany*, *S. Brunei*, *S. Corvallis*, *S. Enteritidis*, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 6,8: eh:-, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. 1,4,12: H rough, *S. Newport*, *S. Paratyphi* B, *S. Seintpaul*, *S. Schwarzengrund*, *S. Stanley*, *S. Virchow* และ *Salmonella* rough strain

จิรวรรณ และสายญาติ (2559) ได้ทำการศึกษาสถานะการณ์การปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ไทย โดยผลจากการศึกษาพบว่าวัตถุดิบอาหารสัตว์ ที่นำไปใช้ผลิตเป็นอาหารสัตว์ พบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* 10.0% (100/1004) เมื่อพิจารณาตามประเภทวัตถุดิบพบว่า ประเภทวัตถุดิบอาหารสัตว์จากสัตว์ และอาหารสัตว์จากพืช มีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* 13.4% (57/425) และ 7.4% (43/579) ตามลำดับ โดยวัตถุดิบอาหารสัตว์จากสัตว์พบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* มากกว่าประเภทวัตถุดิบอาหารสัตว์จากพืช ($P < 0.05$) และยังพบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ในวัตถุดิบทุกชนิด โดยเรียงจากมากไปน้อย คือ เนื้อป่น เนื้อสัตว์ปีกป่น เนื้อและกระดูกป่น เนื้อหมูป่น ขนสัตว์ปีกป่น และปลาป่น ตามลำดับ ซึ่งเชื้อ *Salmonella* ที่สะสมในวัตถุดิบเหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนและส่งต่อไปยังปศุสัตว์ในฟาร์มได้เป็นลำดับถัดไป

จรัส และคณะ (2561) ได้ทำการศึกษาความชุกของเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อหมูและไก่ที่จำหน่ายในตลาดจังหวัด ภูเก็ต พังงา และกระบี่ โดยทำการเก็บตัวอย่างเนื้อหมูและเนื้อไก่จากตลาดสด ในระหว่างเดือน มกราคม ถึงเดือน กุมภาพันธ์ 2560 จำนวน 133 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเนื้อหมู 76 ตัวอย่าง เนื้อไก่ 57 ตัวอย่าง โดยผลการตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 85 ตัวอย่าง คิดเป็น 63.91% เมื่อจำแนกตามชนิดเนื้อสัตว์พบปนเปื้อนในเนื้อหมู 63.16%

และเนื้อไก่ 64.91% โดยซีโรวาร์ที่พบในได้แก่ *S. Corvallis*, *S. Kentucky*, *S. Agona*, *S. Rissen*, *S. Bovismorbificans*, *S. Weltevreden*, *S. Hadar*, *S. Schwarzengrund*, *S. Stanley*, *S. Heidelberg*, *S. Lexington*, *S. Typhimurium*, *S. Molade* และ *S. Mgulani*

สุมาลี (2561) ได้ทำการศึกษา ความชุกของเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากเนื้อสัตว์ค้าปลีก ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช ช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 โดยทำการเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ค้าปลีกจำนวน 172 ตัวอย่าง พบเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* จำนวน 116 ตัวอย่าง (67.4%) โดยมีค่าความชุกของเชื้อในเนื้อสัตว์จากตลาดสด เท่ากับ 74.6% (67 ตัวอย่าง จาก 90 ตัวอย่าง) และในเนื้อสัตว์จากซูเปอร์มาร์เก็ตเท่ากับ 59.8% (49 ตัวอย่าง จาก 82 ตัวอย่าง) โดยค่าความชุกของเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อสัตว์แต่ละชนิดมีค่าสูงกว่า 50% โดยในเนื้อหมูพบ 75.0% (45 ตัวอย่างจากหมู 60 ตัวอย่าง) เนื้อไก่พบ 73.3% (45 ตัวอย่างจากไก่ 60 ตัวอย่าง) และเนื้อวัวพบ 51.9% (27 ตัวอย่างจากเนื้อวัว 52 ตัวอย่าง)

Sakai และ Chalermchaikit (1996) ได้รายงานสถานการณ์การระบาดของเชื้อ *S. Enteritidis* ในประเทศไทย ช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1990 ถึง ค.ศ. 1993 โดยเก็บตัวอย่างเชื้อจากเนื้อไก่ และอุจจาระของมนุษย์จำนวน 3,000 ตัวอย่างต่อปี พบค่าความชุกของเชื้อ *S. Enteritidis* เพิ่มขึ้น 1.33%, 2.98%, 9.54% และ 16.98% ตามลำดับ

Bangtrakulnonth และคณะ (2004) ทำการตรวจวิเคราะห์ซีโรวาร์ของเชื้อ *Salmonella* โดยแยกเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บจากอุจจาระของมนุษย์และจากแหล่งอื่นๆเช่น ไก่ เป็ด และ อาหารทะเลแช่แข็งเป็นต้น จำนวน 26,148 ตัวอย่างในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1993 ถึง ค.ศ. 2002 พบเชื้อ *Salmonella* 44,087 ไอโซเลต เมื่อตรวจวิเคราะห์ซีโรวาร์พบเชื้อ *S. Weltevreden* มากที่สุดในตัวอย่างที่แยกได้จากมนุษย์และอาหารทะเลแช่แข็ง และพบเชื้อ *S. Enteritidis* มากที่สุดในตัวอย่างที่แยกได้จากไก่ และเป็ดแช่แข็ง

Whistler และคณะ (2018) ได้ศึกษาการแพร่ระบาดและการติดต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* ที่อยู่ในกลุ่ม nontyphoidal salmonellosis ในเขตชนบท โดยเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยในทุกเพศและทุกช่วงวัย ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลระหว่างปี ค.ศ. 2006-2014 พบผู้ป่วยจำนวน 221 ราย ในจังหวัดนครพนม และ 314 ราย ในจังหวัดสระแก้ว ติดเชื้อแบบ invasive nontyphoidal salmonellosis ในจำนวนนี้ จังหวัดนครพนม พบการติดเชื้อ *S. Enteritidis* 28.9% (61 ราย) ซึ่งดื้อต่อยา ampicillin 38.8% และจังหวัดสระแก้วพบการติดเชื้อ *S. Enteritidis* 18.5% (58 ไอโซเลต) ดื้อต่อยา ampicillin 59% ตามลำดับ

จากรายงานสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อ *Salmonella* ดังกล่าว ทำให้เข้าใจได้ว่า *Salmonella* สามารถปนเปื้อนได้ ตั้งแต่ในขั้นตอนการผลิตวัตถุดิบอาหารจากสัตว์ ซึ่งขั้นตอนนี้ คาดว่าอาจมีการปนเปื้อนมาจากน้ำ ดิน หรือสิ่งแวดล้อมบริเวณรอบๆ แหล่งผลิต ดังนั้นเมื่ออาหารเหล่านี้ถูกส่งต่อมายังฟาร์มปศุสัตว์ และใช้ในการเลี้ยงสัตว์ก็จะส่งต่อเชื้อ *Salmonella* มายังร่างกายของสัตว์ และมักมีการเพิ่มจำนวนแพร่กระจาย ซึ่งในกรณีนี้อาจเกิดการระบาดของโรคได้ หากสุขภาพของสัตว์อ่อนแอ และการจัดการฟาร์มไม่ดีพอ จากนั้นเมื่อนำเนื้อสัตว์ชำแหละหรือผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากฟาร์มมาสู่ผู้บริโภคจะเป็นการส่งต่อเชืวดังกล่าวมาสู่มนุษย์ หากได้รับสารพิษที่เชื้อ *Salmonella* ผลิตขึ้นมาก็จะเกิดอาการป่วยเช่น มีอาการของโรค salmonellosis ได้ ซึ่งความรุนแรงของโรคนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ได้รับ และซีโรวาร์ของเชื้อ *Salmonella* เป็นต้น อย่างไรก็ตามพบว่าเนื้อสัตว์ที่ได้รับความนิยมในการบริโภคทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก คือเนื้อหมูและเนื้อไก่ โดยไก่นั้นนอกจากจะเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ทำรายได้ทั้งในประเทศไทยและส่งออกไปยังต่างประเทศแล้ว ยังเป็นแหล่งที่มีการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ได้บ่อยเป็นอันดับต้นๆ เสมอ ดังนั้นกรมปศุสัตว์จึงได้ออกระเบียบว่าด้วยการควบคุมโรค salmonellosis สำหรับสัตว์ปีก พ.ศ. 2553 โดยกำหนดให้มีการตรวจวิเคราะห์และเฝ้าระวังเชื้อ *Salmonella* ชนิดหลักที่พบการปนเปื้อนสูงในสัตว์ปีกและฟาร์มเพาะเลี้ยงคือ *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Virchow* และ *S. Infantis* โดยในจำนวนนี้ serovars ที่พบการปนเปื้อนได้สูงที่สุดคือ *S. Enteritidis*

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* ในห้องปฏิบัติการ

1. วิธีการเพาะเลี้ยงและการจัดจำแนก (Culture and identification methods for *Salmonella*) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเชื้อ *Salmonella* นิยมใช้อาหาร pre-enrichment และ selective medium โดยการเลือกใช้อาหารดังกล่าวต้องคำนึงถึงหลายปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ เช่นในสิ่งส่งตรวจที่จะทำการแยกเชื้อ *Salmonella* อาจมีจำนวนของ *Salmonella* น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่น ที่ปนเปื้อนมาในตัวอย่างด้วย หากตัวอย่างอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม อาจไม่สามารถเพิ่มจำนวน ดังนั้นจึงควรให้เชื้อได้เจริญในสภาวะที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญด้วยปัจจัยต่างๆ ดังตาราง 3 อย่างไรก็ตามในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจ จะถูกแบ่งเป็นขั้นตอนหลักคือ การเพิ่มจำนวนเชื้อใน non-selective pre-enrichment media การเพิ่มจำนวนเชื้อใน selective enrichment media การทดสอบยืนยันด้วยวิธีทางชีวเคมี และการตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางซีโรวิทยาตามภาพประกอบ 3

1.1 non selective enrichment

นำสิ่งส่งตรวจ เติมลงใน TSB (tryptic soy broth), peptone water, nutrient broth (Cruickshank, 1975) หรือ Rappaport-Vassiliadis (RV) (Waltman, 2000) โดยอาจเลี้ยงใน erlenmeyer flask หรือขวด Duran บ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเพิ่มจำนวนมากขึ้น นำไปเลี้ยงต่อในอาหาร selective enrichment หรืออาจแยกเชื้อต่างๆ ออกจากกันด้วยเทคนิค cross- streak บนอาหาร TSA

1.2 selective enrichment

นำเชื้อที่ผ่านการเพิ่มจำนวนใน non selective enrichment ปริมาตร 1 ml ย้ายลงในอาหาร selenite cysteine broth ปริมาตร 10 ml และอีก 1 ml ย้ายลงในอาหาร tetrathionate medium ปริมาตร 10 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3 selective agar medium

นำเชื้อจากชั้นตอน selective enrichment จำนวน 1 colony (single colony) มา streak ลงบน selective agar ต่างๆ เช่น brilliant green agar, Mac Conkey agar, *Salmonella* - *Shigella* Agar, deoxycholate citrate agar และ Bismuth sulphite agar เป็นต้น เพื่อสังเกตลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Salmonella* บน selective agar นั้นๆ ทำให้สามารถแยกเชื้อ *Salmonella* spp. ออกจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้

1.3.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* บนอาหาร brilliant green agar
โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* บนอาหารดังกล่าวสามารถปรากฏได้หลายลักษณะ เช่น ชมพู ขาวขุ่น กึ่งโปร่งแสง ไปจนถึงใสไม่มีสี โดยสีของอาหาร brilliant green agar รอบๆ โคโลนี มีสีชมพู หรือสีแดง นอกจากนี้เชื้อ *Salmonella* บางสายพันธุ์อาจให้โคโลนีสีเขียวกึ่งโปร่งแสง เนื่องมาจากกระบวนการหมักน้ำตาล lactose หรือ sucrose (fermentation) ดังตาราง 4

1.3.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* บนอาหาร Mac Conkey agar
โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* จะไม่มีสีหรืออาจโปร่งแสง ในขณะที่แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) จะตกตะกอน bile salt ที่อยู่ในอาหารทำให้โคโลนีมีสีขาวขุ่น จึงทำให้สามารถแยกเชื้อ *Salmonella* ออกจาก แบคทีเรียโคลิฟอร์ม บนอาหาร Mac Conkey agar ได้ ดังตาราง 4

1.3.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* บนอาหาร *Salmonella* - *Shigella* agar (SS)

โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* ทัวไปจะไม่มีสี มีสีชมพูสว่าง ตกตะกอนขาวขุ่น หรือกึ่งโปร่งแสงบนอาหาร *Salmonella – Shigella* agar (SS) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ *Salmonella* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสีดำบริเวณกลางโคโลนีได้ ดังตาราง 4

1.3.4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* บนอาหาร deoxycholate citrate agar

ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* ที่ปรากฏบนอาหาร deoxycholate citrate agar คล้ายคลึงกับที่พบบนอาหาร SS agar โดยมักไม่มีสี มีสีชมพูสว่าง ตกตะกอนขาวขุ่น หรือกึ่งโปร่งแสงบนอาหาร และเชื้อ *Salmonella* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสีดำหรือเทาบริเวณกลางโคโลนีได้ โดยบริเวณโดยรอบโคโลนีจะใสไม่มีสี ดังตาราง 4

1.3.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* บนอาหาร bismuth sulphite agar

โคโลนีมักปรากฏสีน้ำตาล เทา หรือดำ บางครั้งอาจมีสี metallic สว่าง โดยครั้งแรกที่บ่มเชื้อจะมีสีน้ำตาลเป็นอันดับแรกและค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นจนถึงสีดำ บางสายพันธุ์อาจสร้างสีเหลืองเขียวรอบโคโลนี ดังตาราง 4

1.3.6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* บนอาหาร EMB agar

โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* จะโปร่งแสงหรือไม่มีสีบนอาหาร EMB agar และมีขนาดโคโลนีประมาณ 4 มิลลิเมตร ดังตาราง 4

ตาราง 3 ปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *Salmonella*

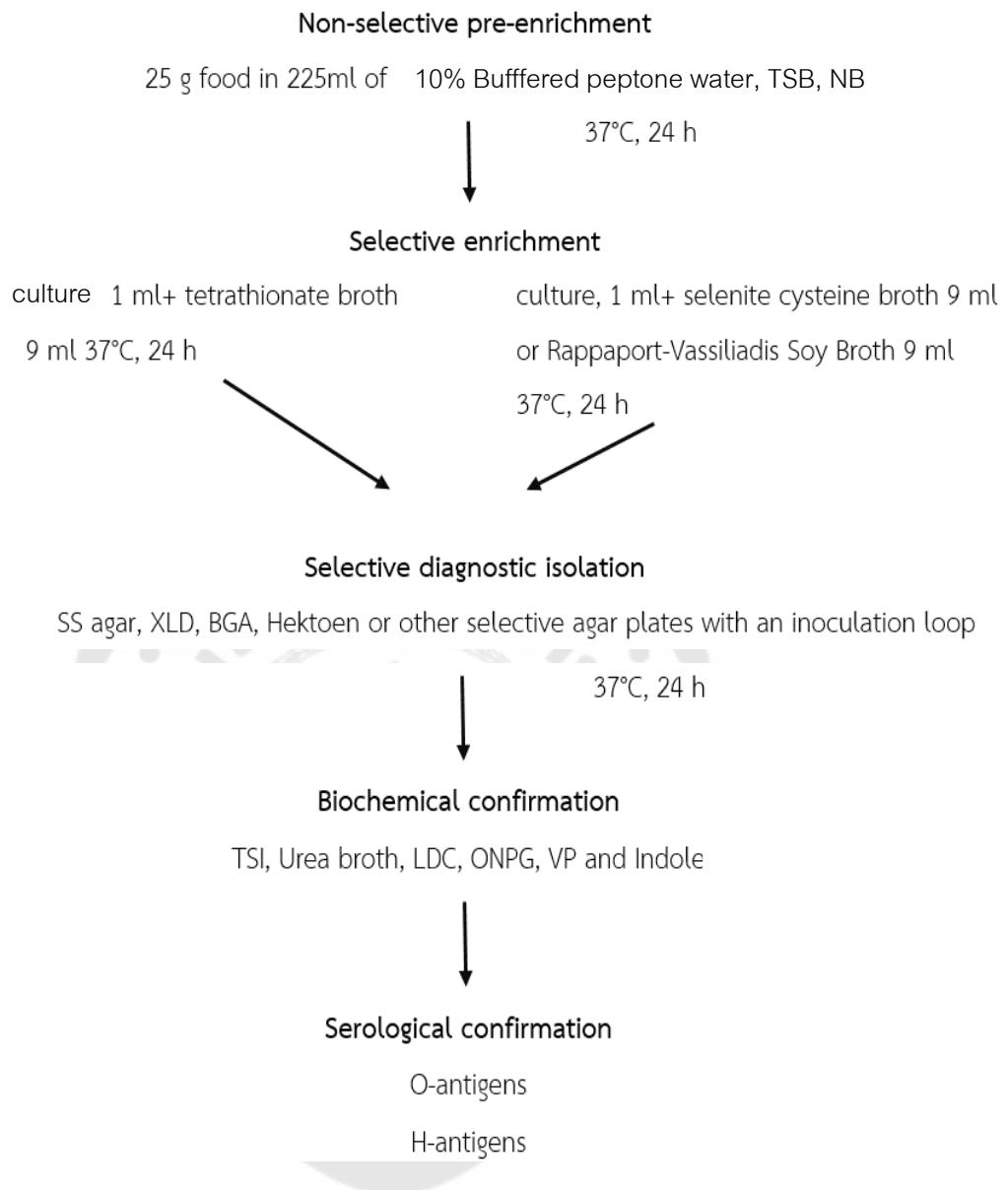
Conditions	Minimum	Optimum	Maximum
T (°C)	7.0	35-37	47
pH	4.0	7.0-7.5	9.0
Aw	0.94	-	-
tolerance to salt (%)	-	-	4

ที่มา : ICMSF (1996). Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens

ตาราง 4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* บน selective media ชนิดต่างๆ



ที่มา : Hendriksen R.S. (2003). A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization



ภาพประกอบ 3 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella*

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hendriksen (2003), A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization

2. การทดสอบขั้นยืนยัน (confirmatory test) โดย biochemical reactions

2.1 การทดสอบการหมักน้ำตาล (carbohydrate fermentation)

เชื้อ *Salmonella* จะมีการผลิตกรดและก๊าซ หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* และ *S. Newport* จะหมักน้ำตาลโดยให้กรดอย่างเดียว ทั้งนี้โดยทั่วไปเชื้อ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* สามารถหมัก glucose, mannitol, arabinose, maltose, dulcitol และ sorbitol ได้ ในขณะที่ไม่สามารถหมัก lactose, sucrose, salicin และ adonitol ส่วนการทดสอบ ONPG ให้ผล negative (Cruickshank, 1975)

2.2 การทดสอบด้วยอาหาร triple sugar iron (TSI) agar

โคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Salmonella* ที่ถูกนำมาจากขั้นตอนการทดสอบการหมักน้ำตาล จะถูกนำมาเลี้ยงบนอาหาร TSI agar ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล glucose, lactose, sucrose, ferrous sulphate และใช้ phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) โดยหากน้ำตาลทั้งสามชนิดเกิดการหมัก อาหาร TSI จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่หากมีเฉพาะ glucose ที่ถูกหมัก สีแดงของ alkaline จะปรากฏบนอาหาร ซึ่งการทดสอบควรทำในอาหารเอียง (slants) เพื่อคงสภาวะ aerobic condition (Cruickshank, 1975)

2.3 การทดสอบ IMVIC (ประกอบด้วย การทดสอบ I=indole, M=methyl red, V=voges-proskauer และ C=citrate)

การทดสอบ indole เพาะเชื้อบนอาหาร tryptophan medium หลังจากบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้หยดสารละลาย Kovac indicator ลงบนอาหารดังกล่าว หากเกิดวงแหวนสีแดงขึ้นรอบๆ บริเวณที่หยดให้แปลผลเป็น positive

การทดสอบ methyl red โดยเพาะเชื้อในอาหาร BGB (buffered glucose bouillon) หรือ peptone medium บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้หยดสารละลาย methyl red indicator จำนวน 5-6 หยดลงบนอาหาร หากค่า pH ต่ำกว่า 4.2 จะปรากฏสีแดง และถือว่าผลการทดสอบเป็น positive แต่หากอาหารไม่เกิดการเปลี่ยนสี ผลการทดสอบจะเป็น negative

การทดสอบ Voges-proskauer โดยนำเชื้อที่เพาะในอาหาร BGB medium ปริมาตร 1 ml เติม 40% KOH ปริมาตร 0.2 ml จากนั้นเติม alpha naphthol indicator ปริมาตร 0.6 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที อ่านผลโดยสังเกตการเกิดวงแหวนสีแดงบริเวณด้านบนของอาหาร ถือเป็นผล positive

การทดสอบ citrate (Simmons citrate) ทำการเพาะเชื้อบนอาหาร citrate medium แบบที่เรียกว่าใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ จะทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งผลการทดสอบทางชีวเคมีสามารถสรุปได้ ดังตาราง 5

ตาราง 5 ผลการทดสอบ IMVIC และการทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ ของเชื้อ *Salmonella*

Reaction		<i>Salmonella</i>
Indole		Negative
Methyl red		Positive
Voges-proskauer		Negative
Citrate		Positive
Urease		Negative
Production of H ₂ S in ferrous chloride gelatin medium		Positive / Negative
Decarboxylates	Lysine	Positive
	Ornithine	Positive
	Arginine	Positive
	glutamic acid	Negative

ที่มา ดัดแปลงจาก :Cruickshank et al. (1975). Medical microbiology: The practice of medical microbiology

3. การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางซีโรวิทยา (serological test)

หลังจากการตรวจทางจุลชีววิทยาในเบื้องต้น จะทำให้ทราบถึงโคโลนีของเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* จากนั้นจึงนำเชื้อมาทำการทดสอบทางซีโรวิทยาด้วยวิธี slide agglutination ต่อ polyvalent antiserum ซึ่งจะทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อ O - antigen ของ serological group ของเชื้อ *Salmonella* โดยในขั้นตอนแรกให้นำเชื้อมาทดสอบกับ 1 หยด ของ 0.85% normal saline จากนั้นสังเกตปฏิกิริยาการตกตะกอนภายในเวลา 30 นาที ถ้าเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนจะถือว่าเชื้อมีลักษณะเป็นกลุ่ม rough ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนได้ ถึงแม้จะยังไม่ได้ทำการทดสอบกับ antiserum ชนิดใดก็ตาม ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดประการหนึ่งของวิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยเทคนิคทางซีโรวิทยา อย่างไรก็ตามโคโลนีที่ไม่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับ

0.85% normal saline จะถูกนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป โดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับ polyvalent antiserum ชนิดต่างๆ ดังนี้

1. *Salmonella* polyvalent A-67 antiserum คือ antiserum ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *Salmonella* group A + group B + group C + group D ++ *Salmonella* group O:67 antiserum (หรือ O:1 + O:2 + O:3 + O:4 ++ O:67 antiserum)

2. *Salmonella* polyvalent A-I antiserum คือ antiserum ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *Salmonella* group A + group B + group C + group D ++ *Salmonella* group I (O:16) antiserum (หรือ O:1 + O:2 + O:3 + O:4 ++ O:16 antiserum)

3. *Salmonella* polyvalent O:17 - O:67 antiserum คือ antiserum ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *Salmonella* group J (O:17) + group K (O:18) ++ group Z (O:50) + O:51 ถึง O:67

4. *Salmonella* group A, group B, group C antiserum คือ antiserum ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *Salmonella* แต่ละ group ที่มี O antigen ของ group นั้นประกอบอยู่

5. *Salmonella* polyvalent H : H antiserum คือ antiserum ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ flagella ของเชื้อ *Salmonella* ตั้งแต่ flagella H:a + H:b + H:c + H:d + H:f ++ z59 + H:1 + H:2 ++ H:7

6. *Salmonella* polyvalent H:L คือ antiserum ชนิดที่ประกอบด้วยแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยากับ flagella ของเชื้อ *Salmonella* ตั้งแต่ flagella H:l + H:v + H:w + H:z13 + H:z28

7. *Salmonella* polyvalent H:G คือ antiserum ชนิดที่ประกอบด้วย แอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยากับ flagella ของเชื้อ *Salmonella* ตั้งแต่ flagella ดังนี้ H:f + H:g + H:s + H:t + H:m + H:p + H:q

8. *Salmonella* polyvalent H:Unspecific antiserum คือ antiserum ชนิดที่ประกอบด้วยแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยากับ flagella ของเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม H:1,2 + H:2 + H:5 + H:6 + H:7 + H:z6 (อรุณ, 2541)

4. การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology test)

การพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* นิยมตรวจหาชิ้นที่เชื้อใช้ในการก่อโรคหรือสร้างสารพิษ (virulence gene) เช่น ยีน *sdf*

(*Salmonella* difference fragments) (Shimizu et al., 2014), *IE1* and *IEII* (Insertion Element) (Wang & Yeh, 2002), *Flic* (Flagellin synthesis: flagella antigen H: i, k and r) และ *Inv-A* (Invasion protein A gene) (Fratamico & Strobaugh, 1998) เป็นต้น โดยมีการออกแบบ forward primer และ reverse primer เพื่อใช้ในเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ดังตาราง 6 และ ตารางที่ 7

ตาราง 6 ไพร์เมอร์ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Thompson* และ *S. Infantis*

Gene target	Primers	Primer sequence 5' → 3'	Amplification product (bp)	Serovar	Source
<i>Inv-A</i>	Inv-A forward	CGG TGG TTT TAA GCG TAC TCT T	796	<i>Salmonella</i> specific	Fratamico (2003)
	Inv-A reverse	CGA ATA TGC TCC ACA AGG TTA			
<i>IE-1</i>	IE-1 forward	AGT GCC ATA CTT TTA ATG AC	316	<i>S. Enteritidis</i>	Wang and Yeh (2002)
	IE-1 reverse	ACT ATG TCG ATA CGG TGG G			
<i>Flic-C</i> (i)	Flic-C forward	CCCCGCTTACAGGTGGACTAC	432	<i>S. Typhimurium</i>	Paião et al. (2013)
	Flic-C reverse	AGCGGGTTTTCGGTGGTTGT			
<i>Flic-C</i> (k)	H: k forward	AACGACGGTATCTCCATTGC	658	<i>S. Thompson</i>	Shimizu et al., (2014)
	H: k reverse	CAGCCGAACCTCGGTGTATTT			
<i>Flic-C</i> (r)	878 forward	AACAACGACAGCTTATGCCG	413	<i>S. Infantis</i>	Kardos et al, 2007
	1275 reverse	CCACCTGCGCCAACGCT			
<i>Sdf</i>	sdf forward	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG	333	<i>S. Enteritidis</i>	Agron et al, (2001)
	sdf reverse	CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC			
<i>IE-1</i>	IE-2 forward	GGATAAGGGATCGATAATTGC	599	<i>S. Enteritidis</i>	Wang and Yeh (2002)
	IE-3 reverse	GGACTTCCAGTTATAGTAGG			

ดัดแปลงจาก Paião et al. (2013). Detection of *Salmonella* spp, *S. Enteritidis* and *Typhimurium* in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay

ตาราง 7 forward และ reverse primer ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในเทคนิค real time PCR

Gene Target	Matrices	Enrichment	Limit of Detection	Primers (1-forward; 2-reverse; 3-probe)	References
<i>ttrBCA</i>	Chicken Meat Fish	20 h	< 3 CFU/ml	1: CTC ACC AGG AGA TTA CAA CATGG 2: AGC TCA GAC CAA AAG TGA CCATC 3: CAC CGA CGG CGA GAC CGA CTT T	(Malorny et al., 2004)
<i>fimC</i>	ice cream	Without None	10 ³ CFU/ml	1: ATA AAT CCG GCG GCC TGA TG 2: TGG TAT CGA CGC CTT TAT CTGAGA 3: TTA CAC CGG AGT GGA TTA AAC GGC TGG G	(Seo et al., 2006)
<i>invA</i>	Salmon Chicken meat Milk	16h	2.5-5 CFU/25g (salmon, chicken) 5 CFU/25 ml (milk)	1: GTG AAA TAA TCG CCA CGT TCG GGC AA 2: TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC CGT AA 3: TTA TTG GCG ATA GCC TGG CGG TGG GTT TTG TTG	(Hein et al., 2006)
<i>invA</i>	Chili powder Shrimp	35°C-24h 41°C-24h (selective medium)	0.04 CFU/g	1: AAC GTG TTT CCG TGC GTA AT 2: TCC ATC AAA TTA GCG GAG GC 3: TGG AAG CGC TCG CAT TGT GG	Cheng et al., 2008
<i>oriC</i>	Cheddar Turkey meat cooked Turkey meat	48 h (selective medium)	6.1 x 10 ¹ CFU/ml	1: TCACCTGCGACAGCCATGA 2: TGAGCATCGCCATCGGCAT 3: ATTCCAGCAGTCGGCCATAGCTG (Set I)	(McCARTHY et al., 2009)

อย่างไรก็ตามเพิ่มความแม่นยำ ในการตรวจวิเคราะห์โรวาร์ของเชื้อ *Salmonella* ได้ ควร ทำการตรวจยืนยันในระดับสกุล (genus specific) ควบคู่ไปด้วย

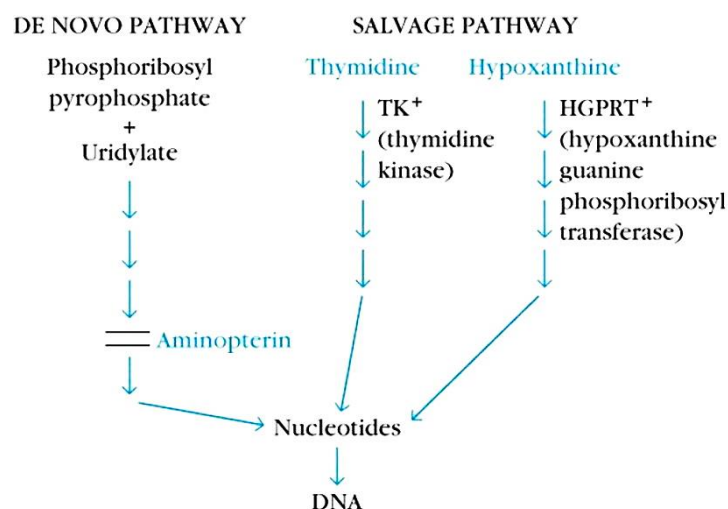
สำหรับการศึกษาค้างนี้จะเป็นการผลิตแอนติบอดีในรูปแบบโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody : MAb) เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกเชื้อ *S. Enteritidis* โมโนโคลนอลแอนติบอดี เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่ออีพิโทป (epitope) เดียวของแอนติเจน (antigen) ในปี 1975 Köhler และ Milstein ได้พัฒนาเทคนิคการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีขึ้น โดยสร้างสภาวะให้เกิดการหลอมรวมระหว่างบีเซลล์ที่ได้จากม้ามของหนูที่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดกระตุ้นกับเซลล์ไมอีโลมา (myeloma cell) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่มีคุณสมบัติเป็น

อมตะและไม่สร้างอิมมูโนโกลบูลิน จนเกิดเป็นเซลล์ลูกผสม (hybridoma cell) หลังจากทำการคัดเลือกโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการด้วยวิธี immunoassay ต่างๆ และผ่านการโคลนซ้ำ (re-clone) แล้ว สามารถนำโคลนนั้นมาเพิ่มจำนวนได้อย่างมากมาย และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้จำนวนมาก ซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ เช่น จำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจนตำแหน่งเดียวกัน คุณสมบัติของ immunoglobulin เช่น ชนิดของ light chain และ heavy chain ซึ่งเป็นตัวกำหนด class และ sub class ของแอนติบอดี เป็นต้น ปัจจุบันการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ค่อนข้างมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ในการวินิจฉัยทั้งในกลุ่มโรคติดต่อที่มีสาเหตุมาจาก แบคทีเรีย เชื้อรา หรือไวรัส และกลุ่มโรคไม่ติดต่อเช่น มะเร็ง และโรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmune disease) ทั้งนี้ยังนิยมนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจโรคต่อโรคต่างๆ ที่แพร่ระบาดในสัตว์เศรษฐกิจอีกด้วย (ไพศาล, 2548)

การผลิตและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (production and selection of hybridoma cell)

ภายหลังการฉีดกระตุ้นหนูขาวด้วยแอนติเจนเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (จำนวน 4 ครั้ง) ทำการแยกม้ามของหนูด้วยวิธีปลอดเชื้อ (sterile technique) จากนั้นบดม้ามเพื่อให้เซลล์ต่างๆ แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว (single spleen cell) นำกลุ่มเซลล์ดังกล่าวมาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโดมา ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน โดยใช้ polyethylene glycol (PEG) ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยให้ส่วนของ lipid bilayer ของผนังเซลล์เกิดการหลอมรวมกัน ดังนั้นจึงเกิดการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์ม้ามกับเซลล์ม้าม เซลล์ไมอีโดมากับเซลล์ไมอีโดมา และเซลล์ไฮบริโดมาที่เกิดจากเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอีโดมา เป็นต้น อย่างไรก็ตามทั้งเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอีโดมาต่างก็มีข้อจำกัด กล่าวคือ แม้เซลล์ม้ามจะสามารถผลิต immunoglobulin ที่จำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจนที่ต้องการได้ แต่เซลล์ม้ามไม่เป็นอมตะ ดังนั้นเมื่อนำออกมาจากร่างกายของสัตว์จะมีชีวิตอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้เพียงชั่วคราวเท่านั้น ส่วนเซลล์ไมอีโดมามีคุณสมบัติที่เป็นอมตะและไม่ผลิต immunoglobulin แต่มีความบกพร่องในการผลิตเอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ที่จำเป็นต้องใช้ในกระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในกระบวนการ salvage pathway ดังนั้นหากนำเซลล์ไมอีโดมามาเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) จะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ จึงมีเฉพาะไฮบริโดมาเซลล์ที่เกิดจากการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอีโดมาเท่านั้นที่จะสามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวนในอาหาร HAT medium ได้ ทั้งนี้เซลล์ม้ามจำเป็นต้องพึ่งพาคุณสมบัติที่เป็นอมตะ (immortal) ของเซลล์ไมอีโดมา ส่วนเซลล์ไมอีโดมาที่บกพร่องการสร้าง

เอนไซม์ HGPRT ต้องอาศัยเซลล์ม้ามในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ โดยกระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเซลล์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมี 2 แบบคือ salvage pathway และ de novo pathway แต่ใน HAT medium ที่มีการเติม aminopterin (folic acid analog) จะไปยับยั้งขั้นตอนการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl จาก tetrahydrofolate ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ ดังนั้นเซลล์จึงหันมาใช้ salvage pathway ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ โดยการเปลี่ยน purine หรือ pyrimidine เป็นนิวคลีโอไทด์โดยตรง ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ salvage pathway ได้แก่ HGPRT และ thymidine kinase (TK) หากบกพร่องที่เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่ง จะเกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยกระบวนการ salvage pathway ดังภาพประกอบ 4 และตายใน HAT medium ดังนั้นจึงมีเฉพาะไฮบริโดมาเซลล์ที่เกิดจากการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์ม้ามและเซลล์ไมโอโลมาเท่านั้นที่จะรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนใน HAT medium ได้ โดยจะเป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่มีทั้งคุณสมบัติความเป็นอมตะและผลิตแอนติบอดีเพียงชนิดเดียว อย่างไรก็ตามต้องมีการทดสอบเพื่อคัดเลือกเฉพาะไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการด้วย ซึ่งจำเป็นต้องใช้วิธีการทาง immunoassay ต่างๆ ในการคัดเลือกเช่น dot blotting, Western blotting, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) และวิธีการอื่นๆ ตามความเหมาะสม และเมื่อพบไฮบริโดมาเซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการแล้ว ให้ทำการโคลนซ้ำเพื่อให้มั่นใจว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นั้นมีต้นกำเนิดจากเซลล์เดียว จากนั้นจึงสามารถขยายเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในปริมาณมากในลำดับต่อไป (ไพศาล, 2548)



ภาพประกอบ 4 การสังเคราะห์ DNA โดยเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร HAT medium

ที่มา : Quinn, (2016)

สำหรับการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร์โดยการใช้ประโยชน์จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นได้มีงานวิจัยต่างๆ ที่ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อนี้เช่นในปี 1991 Luk และ Lindberg ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อบริเวณของ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งอยู่ในส่วนของ outer membrane ในชั้นผนังเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม B ถึง E พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 8 ตัวที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* 4 กลุ่มดังกล่าว อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ยังไม่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในระดับของซีโรวาร์ ได้ (Luk & Lindberg, 1991) ต่อมาในปี 2005 Schneid และคณะ ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. enterica* ในเนื้อไก่ โดยใช้วิธีการเตรียมแอนติเจนจากส่วน outer membrane ของเชื้อ *S. Enteritidis* ผลการศึกษาพบโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับเชื้อ *Salmonella* กลุ่ม B-E และ G และโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางตัวเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* และ *Enterobacter aerogenes* (Schneid, Lüdtke, Diel, & Aleixo, 2005) และในปี 2009 Rementeria และคณะ ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ *Salmonella* serovar (4,5,12:i:_) โดยผลการทดลองสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 1 ตัว คือ 23D4 ซึ่งเป็นชนิด IgM โดยพบการทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อ *S. Typhimurium* ในส่วนของ flagellin

(Rementeria et al., 2009) ในปี 2013 Hiriart และคณะ ได้ทำการสร้างและทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ flagellin เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร์ จากผลการศึกษาพบโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ตัว ที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. Typhimurium* ในบริเวณ H surface ของ flagella (Hiriart et al., 2013)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

1. หนูขาวเพศเมีย (female Swiss mice) อายุ 6 สัปดาห์ จากศูนย์วิจัยสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยได้ผ่านการขออนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ COA/AE-018-2562

2. แบคทีเรีย (bacteria) ที่ใช้ในการเตรียมแอนติเจน เชื้อ *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* และ *S. Virchow* และทดสอบปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) (ตาราง 8)

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) รุ่น IX 70 (Olympus, U.S.A.)
2. เครื่องชั่งสาร รุ่น A200s (Sartorius, Germany)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (Centurion England)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง ความคมอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K (Kontron Instrument, Germany)
5. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G560E (Scientific Industries, Inc., Switzerland)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Jenway 6400 (Bausch & Lomb, U.S.A.)
7. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น ES315 (Tomy, Japan)
8. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น NU-201-330E (Nuair, U.S.A.)
9. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator) รุ่น NU-2500V (Nuair, U.S.A.)
10. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Sanyo, Japan)
11. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น RO-8 (Mettler, Germany)
12. ตู้แช่แข็ง -20°C (Sanyo, Japan)
13. ตู้แช่แข็ง -70°C (Sanyo, Japan)
14. เครื่อง thermal cycler (Eppendorf, Germany)
15. เครื่อง electrophoresis apparatus (Bio-Rad, U.S.A.)

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (Difco laboratories, U.S.A.)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (Difco laboratories, U.S.A.)
3. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (GIBCO, U.S.A.)
4. fetal bovine serum (SIGMA, U.S.A.)
5. D-glucose (GIBCO, U.S.A.)
6. L-glutamine (GIBCO, U.S.A.)
7. sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$) (SIGMA, U.S.A.)
8. $NaHCO_3$ (AMRESCO, U.S.A.)
9. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) (AMRESCO, U.S.A.)
10. HT supplement (GIBCO, U.S.A.)
11. aminopterin (SIGMA, U.S.A.)
12. dimethylsulfoxide (DMSO) (SIGMA, U.S.A.)
13. acrylamide (BIO-RAD, U.S.A.)
14. Bis (N, N'-methylene-bis-acrylamide) (BIO-RAD, U.S.A.)
15. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD, U.S.A.)
16. glycine (SIGMA, U.S.A.)
17. 2-mercaptoethanol (SIGMA, U.S.A.)
18. SDS (sodium dodecyl sulfate) (BIO-RAD, U.S.A.)
19. ammonium persulfate (BIO-RAD, U.S.A.)
20. SDS molecular weight markers (SIGMA, U.S.A.)
21. thimerosal (SIGMA, U.S.A.)
22. triton X-100 (SIGMA, U.S.A.)
23. ethyl alcohol (BDH, Thailand)
24. formaldehyde (Carlo Erba, Italy)
25. ชุดทดสอบ hybridoma sub-isotype, mouse (Zymed, U.S.A.)
26. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline, PBS) 0.15 M pH 7.2
27. diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB (SIGMA, U.S.A.)

28. o-phenylenediamine, OPD (SIGMA, U.S.A.)
29. hydrogen peroxide (H₂O₂) (SIGMA, U.S.A.)
30. cobalt chloride (CoCl₂) (SIGMA, U.S.A.)
31. coomassie brilliant blue R-250 (SIGMA, U.S.A.)
32. sodium hydroxide, NaOH (Riedel-de Haen)
33. hydrochloric acid, HCl (Merck)
34. GAM-HRP (goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) (BIO-RAD, U.S.A.)
35. GAR-HRP (goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate)
36. *Taq* DNA polymerase (PCR Biosystems, UK)
37. primers (Integrated DNA Technologies IDT, U.S.A.)

ตาราง 8 แบคทีเรียที่ใช้ในการปลูกหมั้คั่วกัน (*) และทดสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* และ *S. Virchow*

No.	Bacteria (isolate)	Code	Institute	Antigen property	Serovar (Group)
1.*	<i>S. Enteritidis</i> 581101	SE1	KMP	1,9, 12 g,m	D1
2.*	<i>S. Enteritidis</i> 581102	SE2	KMP	1,9, 12 g,m	D1
3.	<i>S. Enteritidis</i> 33953	SE3	DMST	1,9, 12 g,m	D1
4.	<i>S. Enteritidis</i> 33954	SE4	DMST	1,9, 12 g,m	D1
5.	<i>S. Enteritidis</i> 33955	SE5	DMST	1,9, 12 g,m	D1
6.	<i>S. Enteritidis</i> 33956	SE6	DMST	1,9, 12 g,m	D1
7.	<i>S. Enteritidis</i> 33957	SE7	DMST	1,9, 12 g,m	D1
8.	<i>S. Enteritidis</i> 33959	SE8	DMST	1,9, 12 g,m	D1
9.	<i>S. Enteritidis</i> 15676	SE9	DMST	1,9, 12 g,m	D1

ตาราง 8 (ต่อ)

No.	Bacteria (isolate)	Code	Institute	Antigen property	Serovar (Group)
10.	S. Enteritidis 13768	SE10	DMST	1,9, 12 g,m	D1
11.	S. Winston 581123	SWi	KMP	6,7,m,t,1,6	C1
12.*	S. Typhimurium 581105	ST1	KMP	1,4,[5],12 i 1,2	B
13.*	S. Typhimurium 581106	ST2	KMP	1,4,[5],12 i 1,2	B
14.	S. Saintpaul 581118	SSa	KMP	1,4[5],12 e,h 1,2	B
15.	S. Stanley 5811121	SSt	KMP	1,4[5],12,27 d 1,2	B
16.	S. Agona 581111	Sag	KMP	1,4[5],12 f,g,s [1,2]	B
17.*	S. Virchow 581107	SV1	KMP	6,7,14 r 1,2	C1
18.*	S. Virchow 581108	SV2	KMP	6,7,14 r 1,2	C1
19.	S. Singapore 581120	SSi	KMP	6,7 k, e, n, x	C1
20.*	S. Hadar 581103	SH1	KMP	6,8 Z ₁₀ e,n,x	C2-C3
21.*	S. Hadar 581104	SH2	KMP	6,8 Z ₁₀ e,n,x	C2-C3
22.	S. Albany 581109	SAI	KMP	8,20 Z ₄ Z ₂₄	C2-C3
23.	S. Bovismorbificans 581112	SB	KMP	6,8,20 r,[i] 1,5	C2-C3
24.	S. Newport 581116	SN	KMP	6,8,20 e,h 1,2	C2-C3
25.	S. Weltevreden 581122	SW	KMP	3,10,15 r Z ₆	E1
26.	S. Orion 581117	SO	KMP	3,10,15,[15,34] y 1,5	E1
27.	S. Anatum 581110	SA _n	KMP	3,10,15,[15,34] e,h 1,6	E1
28.	S. Give 581114	SG	KMP	3,10,15,[15,34] 1,v 1,7	E1

ตาราง 8 (ต่อ)

No.	Bacteria (isolate)	Code	Institute	Antigen property	Serovar (Group)
29.	<i>S. Senftenberg</i> 581119	SSe	KMP	1,3,19 g,[s],t	E4
30.	<i>S. Hvittingfoss</i> 581115	SHv	KMP	16 b e,n,x	I
31.	<i>Shigella dysenteriae</i>	ShD	DMST	-	-
32.	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>	DMST	-	-
33.	<i>Aeromonas</i> sp.	Ae	KMP	-	-
34.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp	DMST	-	-
35.	<i>Listeria monocytogenes</i>	Lm	DMST	-	-
36.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	En	DMST	-	-
37.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sa	DMST	-	-
38.	<i>Bacillus cereus</i>	Ba	DMST	-	-

หมายเหตุ : DMST = กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (Department of medical sciences, ministry of public health); KMP = บริษัท เค.เอ็ม.พี.ไบโอเทค จำกัด (K.M.P. biotech Co., LTD)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การตรวจเพื่อยืนยันเชื้อ *S. Enteritidis* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

1.1 การสกัด DNA

นำแบคทีเรียในตาราง 8 ทั้ง 38 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA) ยกเว้นเชื้อ *Escherichia coli*, *Aeromonas* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ทำการเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) และทำการคัดเลือก菌ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหาร tryptic soy broth (TSB) หรือ nutrient broth (NB) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตร ย้ายลงในหลอด microtube และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายทิ้ง และละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 ในปริมาตรเท่าเดิม และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.1% Triton-X 100 ในสารละลาย PBS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ให้ความร้อนในเครื่อง heat block ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลาย DNA ใส่ใน microtube เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการทดสอบในขั้นตอนต่อไป (Wang & Yeh, 2002)

1.2 วิธี PCR

เตรียมส่วนผสมต่างๆ ดังแสดงในตาราง 9 ลงในหลอด thin-walled PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน Invasion protein A gene (*Inv-A*: 796 bp) ของเชื้อ *Salmonella* spp. (Fratamico & Strobaugh, 1998) หรือจำเพาะต่อยีน Insertion Element (*IE-1*: 316 bp) ของเชื้อ *S. Enteritidis* (Wang & Yeh, 2002) (ตาราง 6) อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ทำงานในสภาวะที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา PCR ดังแสดงในตาราง 10 จำนวน 30 รอบ จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ให้กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 70 นาที และตรวจสอบขนาดของผลผลิต PCR ภายใต้แสง ultraviolet (UV) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2. การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกัน (antigen preparation and immunization)

2.1 การเตรียมแบคทีเรีย (bacteria preparation)

นำแบคทีเรีย *Salmonella* ทั้ง 4 ซีโรวาร์ คือ *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* และ *S. Virchow* มาเพิ่มจำนวนบนอาหาร TSA โดยวิธี simple streak บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียม cell suspension โดยใช้สารละลาย PBS ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียให้อยู่ในช่วง 10^9 cfu/mL ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 1.0 จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาฆ่าด้วยความร้อน (heat killed) ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate บนอาหาร TSA

2.2 การเตรียมแอนติเจน (antigen preparation)

นำแบคทีเรีย *S. Enteritidis* (SE1-2), *S. Typhimurium* (ST1-2), *S. Hadar* (SH1-2) และ *S. Virchow* (SV1-2) ที่ได้จากข้อ 2.1 มาทำการเตรียมแอนติเจน 2 รูปแบบ คือ (1) รูปแบบ heat killed ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/mL โดยนำแบคทีเรียในรูป heat killed ความเข้มข้น 10^9 cfu/mL มาเจือจางด้วยสารละลาย PBS และ (2) รูปแบบ formalin fixed ทำโดยนำแบคทีเรียในรูป heat killed มาเติม 40% formaldehyde ในอัตราส่วน 1:10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ 8,000 g เป็นเวลา 10 นาที ด้วยสารละลาย PBS ปรับปริมาตรสารละลายตะกอนเซลล์ให้เท่าเดิม เก็บแอนติเจนทั้ง 2 รูปแบบ ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวเป็นลำดับต่อไป

2.3 การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว (immunization in Swiss mice)

ปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วยแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ (1) *S. Enteritidis* (SE1-2) เท่านั้น หรือ (2). แอนติเจนที่ผสมระหว่างเชื้อ *Salmonella* 4 ซีโรวาร์ คือ *S. Enteritidis* (SE1-2), *S. Typhimurium* (ST1-2), *S. Hadar* (SH1-2) และ *S. Virchow* (SV1-2) โดยที่แต่ละกลุ่มใช้แอนติเจนในรูปแบบ heat killed ผสมกับรูปแบบ formalin fixed (อัตราส่วน 1:1) แล้วนำมาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของหนูขาว กลุ่มละ 4 ตัว ปริมาตร 100 μ L จากนั้นทำการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนทั้ง 2 รูปแบบผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 μ L ทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง ดังตาราง 11 หลังการปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 4 นาน 1 สัปดาห์ ทำการเจาะเก็บเลือด

จากบริเวณหัตถา (orbital sinus) ของหนูแต่ละตัว แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกซีรัม (serum) นำซีรัมที่ได้ไปทดสอบความจำเพาะต่อแอนติเจน โดยวิธี Western blotting นำหนูที่มีการตอบสนองดีที่สุดมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ในลำดับต่อไป

ตาราง 11 แผนการปลูกภูมิคุ้มกัน (immunization program)

เข็มที่	สัปดาห์ที่	แอนติเจน	ระดับความเข้มข้น
1	1	[H+F] + Complete Freund's adjuvant	5×10^7 cfu/ml
2	3	[H+F] + Incomplete Freund's adjuvant	5×10^7 cfu/ml
3	5	[H+F] + Incomplete Freund's adjuvant	5×10^7 cfu/ml
4	7	[H+F] + Incomplete Freund's adjuvant	5×10^7 cfu/ml
-	8	ตรวจสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ต่อเชื้อ S. Enteritidis	

หมายเหตุ : H = แอนติเจนรูปแบบ heat killed

F = แอนติเจนรูปแบบ formalin fixed

3. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell production)

นำหนูที่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ดีที่สุดมาฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนอีกครั้ง โดยผสมแอนติเจนทั้ง 2 รูปแบบกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 μ l ก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน ทำการผ่าตัดเพื่อแยกเซลล์ม้าม จากนั้นนำมาหลอมรวมกับเซลล์ P3X myeloma โดยอาศัยการทำงานของ polyethylene glycol ที่ความเข้มข้น 50% (w/v) เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บ่มเพื่อแยกเซลล์ไฮบริโดมาที่ 1,500 g เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำอาหาร RPMI ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) กับ 20% fetal bovine serum (FBS) และ 0.5% เม็ดเลือดแดง จากนั้นกระจายเซลล์ลงใน 96 wells microculture plate จำนวน 20 plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 10 วัน ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ทำการ

คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting

4. การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell screening)

4.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting (first screening by dot blotting)

นำแบคทีเรีย *S. Enteritidis* ในรูปแบบ heat killed มาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ปริมาตร 1 μ l ต่อจุด อบที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการบล๊อคแผ่นไนโตรเซลลูโลสส่วนที่เหลือด้วยสารละลาย 5% blotto (ในสารละลาย PBS; 135 mM NaCl, 15 mM sodium phosphate, pH 7.2) เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาให้ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสใส่ลงใน microculture plate จำนวน 20 plate ทำการทดสอบปฏิกิริยาโดยเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (ที่ระดับความเจือจาง 1:4 ในสารละลาย 1% blotto) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS 4 ครั้งและบ่มด้วย GAM-HRP (goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) ที่ระดับความเจือจาง 1:1,500 เท่า ในสารละลาย 1% blotto บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS 4 ครั้ง ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยบ่มในสารละลายซับสเตรทซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2) และ 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) ในสารละลาย PBS (ภาพประกอบ 5) หลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* จะปรากฏจุดสีดำนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสให้นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาดังกล่าวมาทดสอบการคัดเลือกขั้นที่ 2 (second screening) ในลำดับต่อไป

4.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2

4.2.1 การคัดเลือกโดยวิธี Western blotting

นำเชื้อ *S. Enteritidis* ในรูปแบบ heat killed มาแยกใน 15% SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 70 โวลต์ เป็นเวลา 130 นาที จากนั้นย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 60 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ย้ายแผ่นไนโตรเซลลูโลสลงในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 15 นาที แล้วบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ระดับความเจือจาง 1:40 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS 4 ครั้ง และบ่มด้วย GAM-HRP ที่ระดับความเจือจาง 1:1,500 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.1 (ภาพประกอบ 6)

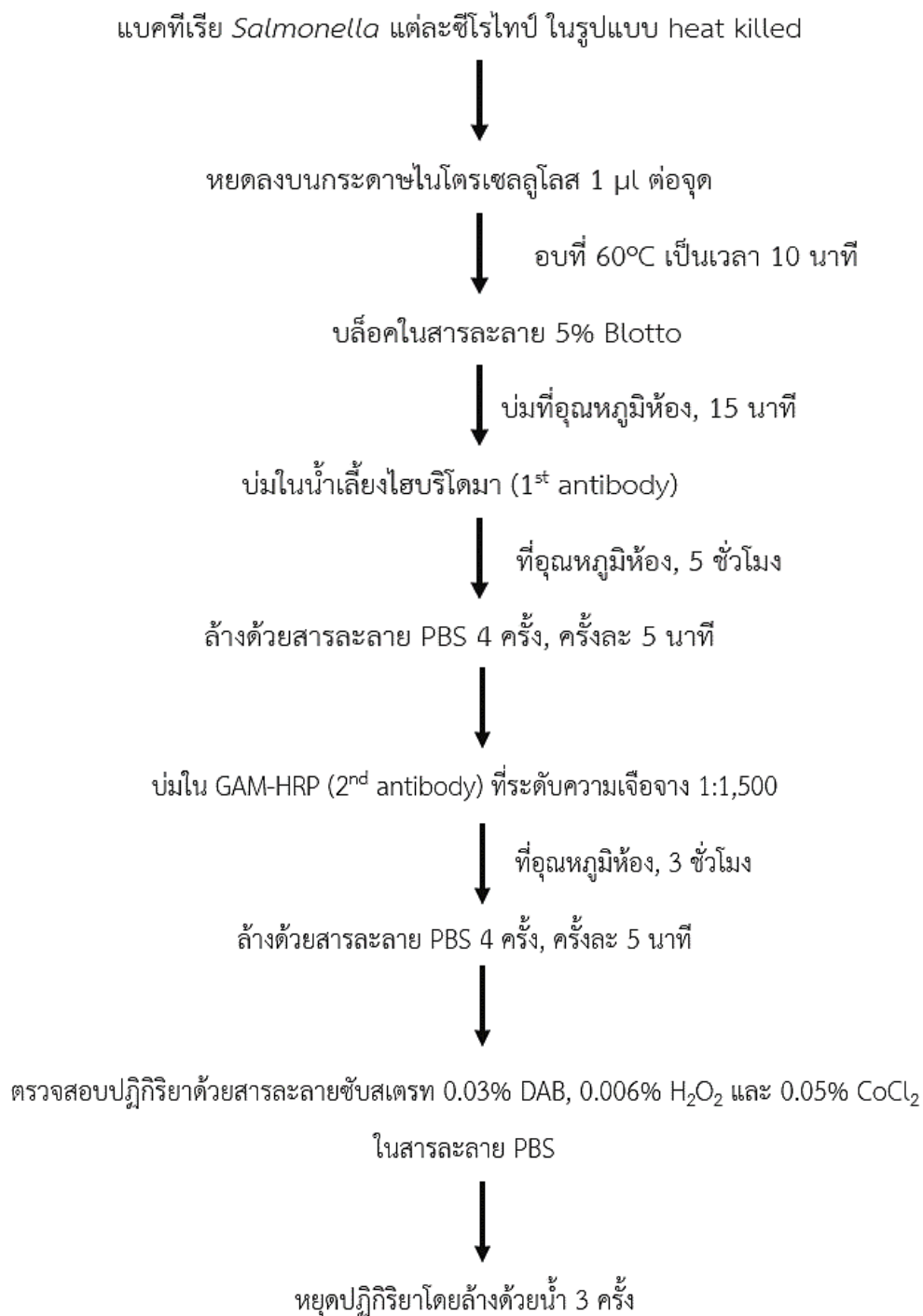
เพื่อตรวจสอบแอนติเจนที่เป็นโปรตีน นำแผ่นไนโตรเซลลูโลส ที่ได้จากข้อ

4.2.1 มาบ่มด้วย 1 U/mL proteinase K (Roche, Basel, Switzerland) ใน Tris-HCl buffer (20

mM, pH 8) ที่มีส่วนผสมของ 1 mM CaCl_2 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Nygren, Holmgren, & Attridge, 2008; Pengsuk et al., 2011) ก่อนนำไปบ่มร่วมกับน้ำเลี้ยงไฮบริโดมา ที่ระดับความเจือจาง 1:40 ในสารละลาย 1% blotto และตรวจสอบปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 4.1

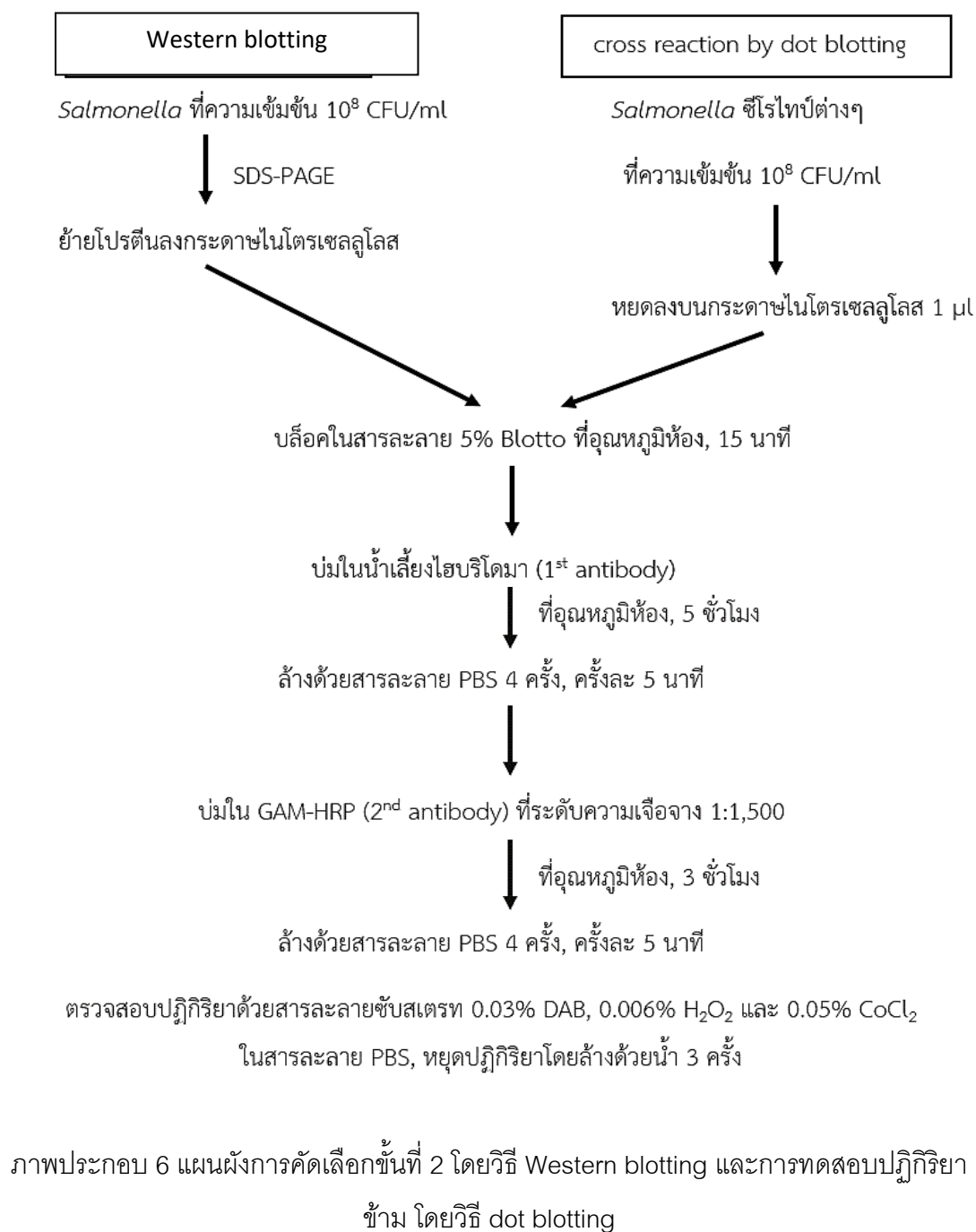
4.2.2 การคัดเลือจากปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) โดยวิธี dot blotting

นำแบคทีเรีย *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow* และ *Salmonella* ซีโรวาร์และแบคทีเรียอื่นๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/mL ในรูปแบบ heat killed มาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสปริมาตร 1 μL ต่อจุด อบที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการบล็อกแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 15 นาที นำมาบ่มในน้ำเลี้ยงไฮบริโดมา ที่ระดับความเจือจาง 1:40 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้ล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วย GAM-HRP ที่ระดับความเจือจาง 1:1,500 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.1 (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 5 แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

ที่มอดัดแปลงจาก; Sithigorngul, et al. (2000) Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*.



ที่มาดัดแปลงจาก; Sithigorngul, et al. (2000) Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*.

4.3 การโคลนซ้ำโดยวิธี limited dilution (cloning by limiting dilution)

หลังการคัดเลือกและพบกลุ่มเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ S. Enteritidis แล้ว ให้นำกลุ่มเซลล์ไฮบริโดมาดังกล่าวมากระจายในหลุม โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงหลายครั้ง จากนั้นดูดสารละลายเซลล์แขวนลอย 1-2 μ l มาหยดลงบนจานเพาะเชื้อ ปรับจำนวนเซลล์ให้มีจำนวนประมาณ 100 เซลล์ โดยเจือจางด้วยอาหาร RPMI จากนั้นดูดเซลล์เติมลงในอาหาร RPMI ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum และ 0.5% เม็ดเลือดแดง ปริมาตรรวม 7.5 ml ผสมให้เข้ากัน และทำการกระจายเซลล์แขวนลอยลงใน 96 wells microculture plate จำนวน 48 หลุมแรก ปริมาตรหลุมละ 100 μ l จากนั้นเติม RPMI สูตรดังกล่าวลงในจานเพาะเชื้อเพิ่มอีก 2.5 ml ผสมให้เข้ากัน ดูดเซลล์แขวนลอยกระจายลงใน 48 หลุมของ microculture plate ส่วนที่เหลือจนครบ บ่มที่ 37°C ในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 10 -12 วัน สังเกตหลุมที่มีโคลนเดี่ยวด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ นำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมดังกล่าวมาทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อ S. Enteritidis ด้วยวิธี dot blotting และทำการขยายเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในลำดับต่อไป

4.4 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา (cryopreservation of hybridoma cells)

เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในอาหาร RPMI ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum ให้อยู่ในระยะ log phase จากนั้นดูดเซลล์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 g เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสออกจากตะกอนเซลล์ จากนั้นเติมสารละลาย 12% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide : DMSO) ในอาหาร RPMI ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากับเซลล์อย่างรวดเร็ว ดูดสารละลายเซลล์แขวนลอยทั้งหมดลงในหลอดแช่แข็ง (cryopreservation tube) เก็บรักษาเซลล์ดังกล่าวในถังไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิประมาณ -196°C

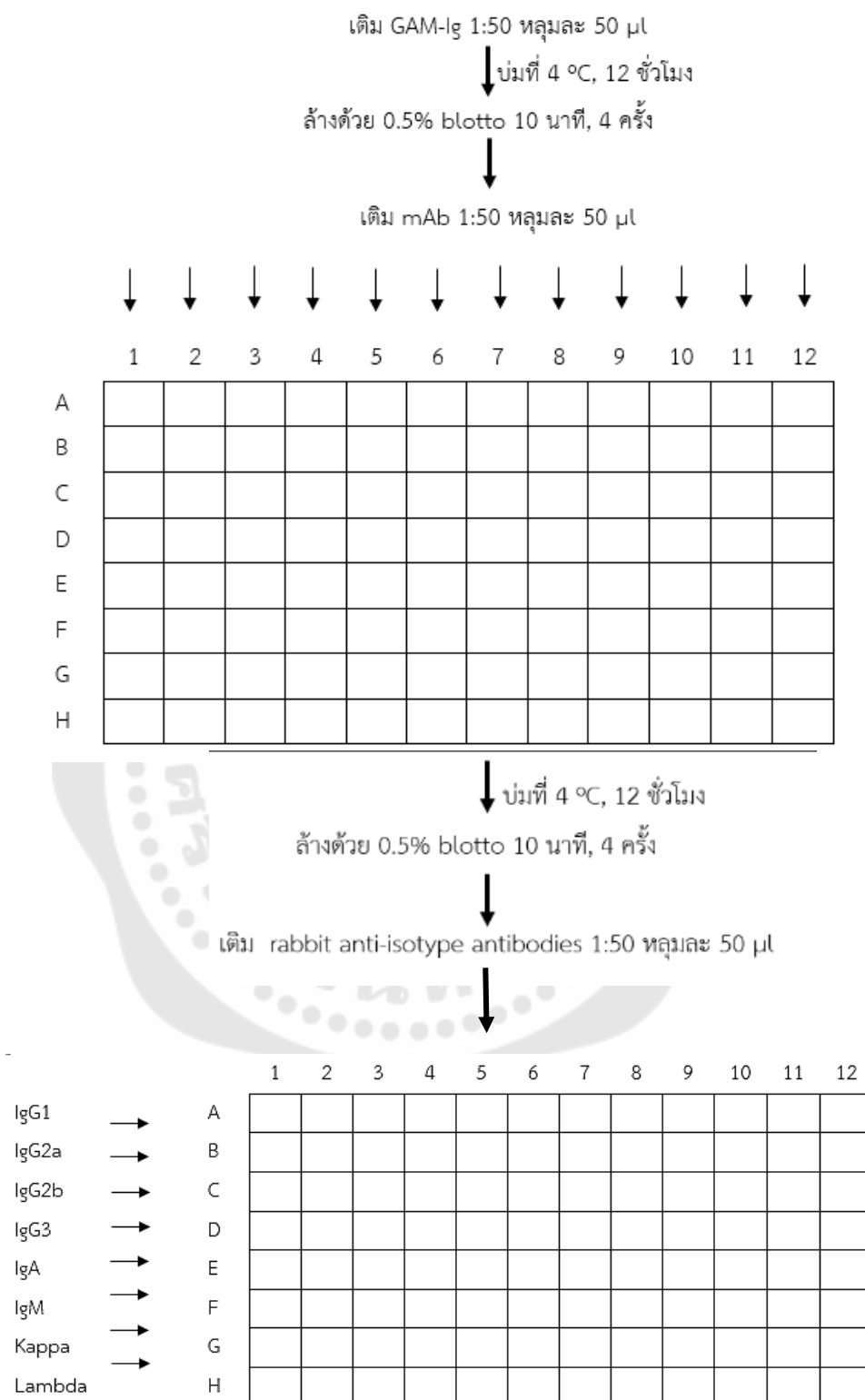
5. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (study of monoclonal antibody properties)

ศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการ reclone โดยจำแนก heavy chain และ light chain ของแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA จากนั้นตรวจสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ S. Enteritidis ด้วยวิธี dot blotting

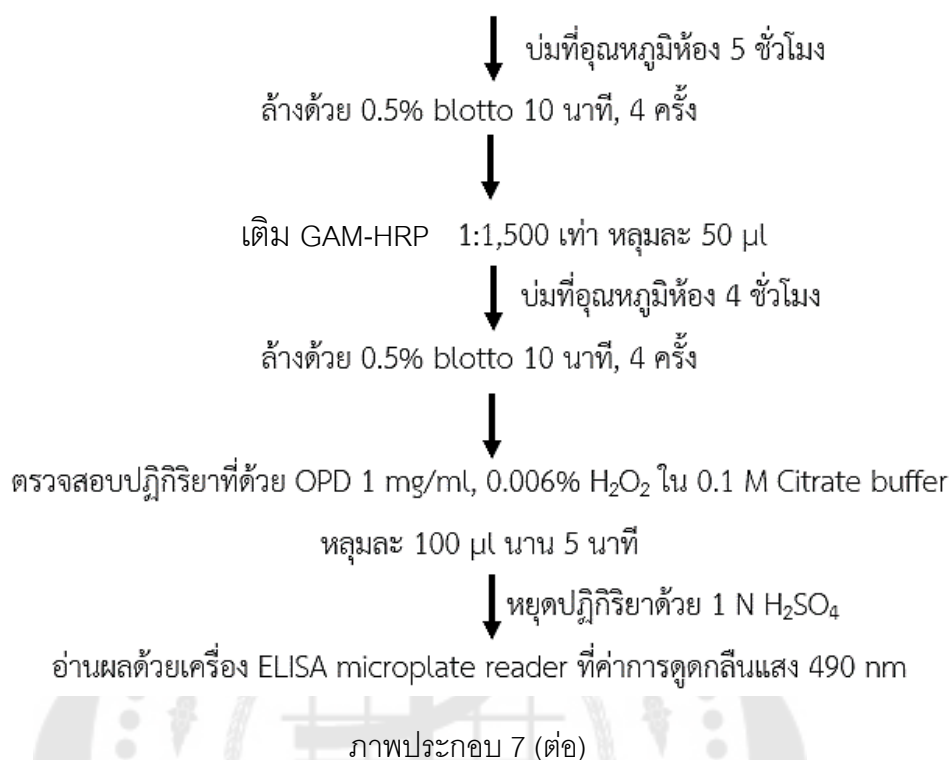
5.1 การจำแนก heavy chain และ light chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกคัดเลือกไว้ มาจำแนก heavy chain และ light chain โดยวิธี sandwich ELISA ด้วยชุด sub-isotyping kit (Zymed Laboratories) ทำโดยการเคลือบหลุม plate กันแบนด้วย GAM-Ig (goat anti-mouse Ig) ความเข้มข้น 10 μ g/ml ในสารละลาย PBS ปริมาตรหลุมละ 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างด้วย

สารละลาย 0.5% blotto ปริมาตรหลุมละ 150 μ l ครั้งละ 10 นาที จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นบล็อคด้วย สารละลาย 5% blotto ปริมาตรหลุมละ 50 μ l เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาให้สัลดสารละลาย ทั้งแล้วเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบที่ระดับความเจือจาง 1:50 ในสารละลาย 5% blotto ปริมาตรหลุมละ 50 μ l โดยเติมแถวละ 1 ชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลุมที่ 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตรหลุมละ 150 μ l ครั้งละ 10 นาที จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเติม rabbit anti-heavy or light chains (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, λ และ κ ตามลำดับ) ที่ระดับความเจือจาง 1:20 ในสารละลาย 5% blotto ปริมาตร หลุมละ 50 μ l แถวละ 1 ชนิด แถว (A-H) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตรหลุมละ 150 μ l ครั้งละ 10 นาที จำนวน 4 ครั้ง ทำการเติม GAR-HRP (goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) ที่ระดับความเจือจาง 1:1,500 เท่า ในสารละลาย 5% blotto ปริมาตรหลุมละ 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง ล้างด้วย สารละลาย 0.5% blotto ปริมาตรหลุมละ 150 μ l ครั้งละ 10 นาที จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นตรวจสอบ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเติมสารละลายซับสเตรทซึ่งประกอบด้วย o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml และ 0.006% H_2O_2 ที่ละลายใน 0.1 M citrate buffer ปริมาตรหลุมละ 100 μ l ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N กรด sulfuric ปริมาตร 100 μ l สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดโดยอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA microplate reader ที่ค่าการดูดกลืน แสง 490 nm ตามภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี



5.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจเชื้อ S.

Enteritidis โดยวิธี dot blotting

นำเชื้อ S. Enteritidis ในรูปแบบ heat killed ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/mL มาเจือจางครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ด้วยสารละลาย PBS นำแอนติเจนดังกล่าวไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส 1 µl ต่อจุด อบที่อุณหภูมิ 60 °C 10 นาที บล็อกด้วยสารละลาย 5% Blotto 15 นาที จากนั้นบ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ S. Enteritidis ที่เจือจางในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วย GAM-HRP ที่ระดับความเจือจาง 1:1,500 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.1 วิเคราะห์ผลโดยสังเกตจุดสีดำที่เกิดขึ้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ระดับความเข้มข้นของแอนติเจนต่ำสุดที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

6. การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีภายหลังการเพิ่มจำนวนเชื้อ (pre-enrichment)

6.1 การตรวจเชื้อ *S. Enteritidis* ภายหลังการเพิ่มจำนวนเชื้อ ใน TSB

นำเชื้อ *S. Enteritidis* มา streak บนอาหาร TSA บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียมให้อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยโดยสารละลาย PBS ปรับปริมาณแบคทีเรียให้ได้ประมาณ 10^9 cfu/mL โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 1.0 จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยดังกล่าวมาเจือจางครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ด้วยอาหาร TSB ให้อยู่ในช่วง 10^8 - 10^0 cfu/mL โดยมีหลอดควบคุมคือหลอดที่มีเฉพาะอาหาร TSB โดยไม่ผสมเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อแต่ละหลอดและแต่ละช่วงเวลามาทำการ heat-killed โดยต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 3 นาที นำแอนติเจนดังกล่าวมาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส 1 μ l ต่อจุด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที บล็อกในสารละลาย 5% Blotto 15 นาที บ่มร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 4 ครั้ง บ่มด้วย GAM-HRP ที่ระดับความเจือจาง 1:1,500 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.1

6.2 การตรวจเชื้อ *S. Enteritidis* ภายหลังการเพิ่มจำนวนเชื้อในเนื้อไก่บดผสม TSB

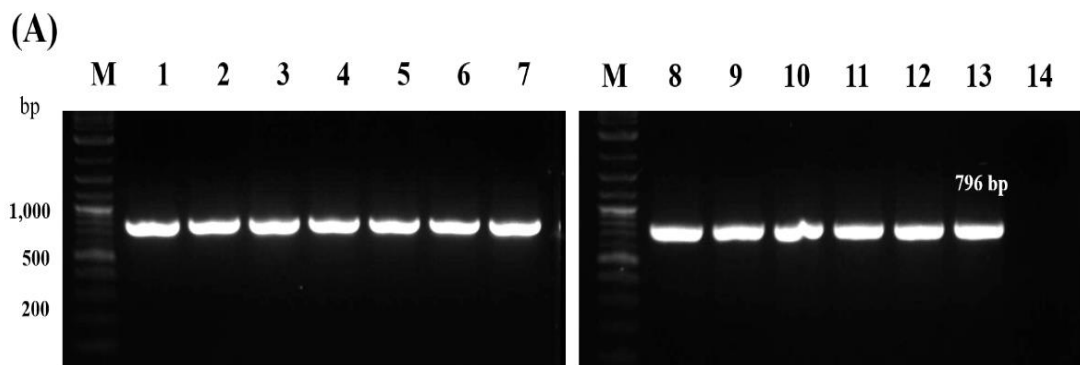
เตรียมเชื้อ *S. Enteritidis* ในรูปแบบเซลล์แขวนลอย เช่นเดียวกับข้อ 6.1 และนำมาเจือจางครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ให้อยู่ในช่วง 10^8 - 10^0 cfu/mL ด้วยอาหาร TSB ซึ่งมีเนื้อไก่ที่ถูกบดในอัตราส่วน 1:10 โดยมีหลอดควบคุมคือหลอดที่มีเฉพาะอาหาร TSB ผสมกับเนื้อไก่บดเท่านั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อแต่ละหลอด ในแต่ละช่วงเวลามาทำการ heat-killed โดยต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 3 นาที นำแอนติเจนดังกล่าวมาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส 1 μ l ต่อจุด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที บล็อกในสารละลาย 5% blotto 15 นาที บ่มในโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* ทดสอบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 4 ครั้ง บ่มด้วย GAM-HRP ที่ระดับความเจือจาง 1:1,500 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4.1

บทที่ 4

ผลการทดลอง

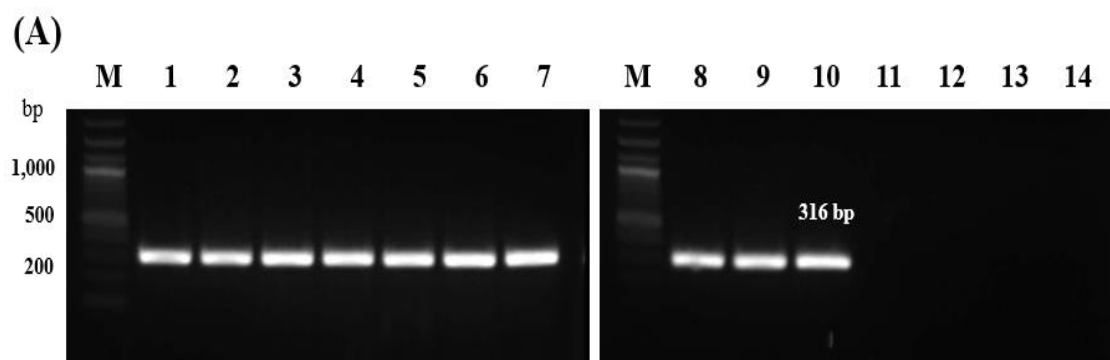
1. การตรวจเชื้อ *S. Enteritidis* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

จากการตรวจสอบแบคทีเรียจำนวน 38 ไอโซเลต ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ (ตาราง 8) ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *Inv-A* ของ *Salmonella* spp. พบเชื้อ *Salmonella* ทุกซีโรวาร์ ให้ผลบวกโดยพบ PCR product ขนาด 796 bp ในขณะที่แบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ใช้ทดสอบให้ผลเป็นลบ (ภาพประกอบ 8 และ ตาราง 12) และเมื่อตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *IE-1* ของเชื้อ *S. Enteritidis* พบว่าเชื้อ *S. Enteritidis* ทั้ง 10 ไอโซเลต ที่ใช้ทดสอบให้ผลเป็นบวกโดยพบ PCR product ขนาด 316 bp ในขณะที่เชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่น และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ใช้ทดสอบให้ผลเป็นลบ (ภาพประกอบ 9 และ ตาราง 12)



ภาพประกอบ 8 การตรวจเพื่อยืนยันเชื้อสกุล *Salmonella* ด้วยวิธี PCR

โดยใช้ไพรเมอร์ *Inv-A* forward และ *Inv-A* reverse ซึ่งมีคุณสมบัติจำเพาะต่อยีน *Inv-A* ของเชื้อสกุล *Salmonella* (แสดงผลการทดสอบตัวอย่างบางไอโซเลต) Lane; (1-10) *S. Enteritidis* (SE1-10), (11) *S. Typhimurium* (ST1), (12) *S. Hadar* (SH1), (13) *S. Virchow* (SV1) และ (14) *Shigella dysenteriae*, (M) standard markers



ภาพประกอบ 9 การตรวจเพื่อยืนยันเชื้อ *S. Enteritidis* ด้วยวิธี PCR

โดยใช้ไพรเมอร์ IE-1 forward และ IE-1 reverse ซึ่งมีคุณสมบัติจำเพาะต่อ ยีน *IE-1* ของเชื้อ *S. Enteritidis* (แสดงผลการทดสอบตัวอย่างบางไอโซเลต) Lane; (1-10) *S. Enteritidis* (SE1-10), (11) *S. Typhimurium* (ST1), (12) *S. Hadar* (SH1), (13) *S. Virchow* (SV1) และ (14) *Shigella dysenteriae*, (M) standard markers

ตาราง 12 การตรวจพิสูจน์เชื้อด้วยวิธี PCR และความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

No.	Bacteria (isolate)	PCR Primers		Specificity of MAbs by dot blotting		
		IE-1*	Inv-A**	SE-13D	Sal-06G	Sal-08G
1.	<i>S. Enteritidis</i> 581101 (SE1)	+	+	+	+	+
2.	<i>S. Enteritidis</i> 581102 (SE2)	+	+	+	+	+
3.	<i>S. Enteritidis</i> 33953 (SE3)	+	+	+	+	+
4.	<i>S. Enteritidis</i> 33954 (SE4)	+	+	+	+	+
5.	<i>S. Enteritidis</i> 33955 (SE5)	+	+	+	+	+
6.	<i>S. Enteritidis</i> 33956 (SE6)	+	+	+	+	+
7.	<i>S. Enteritidis</i> 33957 (SE7)	+	+	+	+	+
8.	<i>S. Enteritidis</i> 33959 (SE8)	+	+	+	+	+
9.	<i>S. Enteritidis</i> 15676 (SE9)	+	+	+	+	+
10.	<i>S. Enteritidis</i> 13768 (SE10)	+	+	+	+	+
11.	<i>S. Winston</i> 581123	-	+	-	+	+
12.	<i>S. Typhimurium</i> 581105 (ST1)	-	+	-	+	+
13.	<i>S. Typhimurium</i> 581106 (ST2)	-	+	-	+	+

ตาราง 12 (ต่อ)

No.	Bacteria (isolate)	PCR Primers		Specificity of MAbs by dot blotting		
		IE-1*	Inv-A**	SE-13D	Sal-06G	Sal-08G
14.	<i>S. Saintpoul</i> 581118	-	+	-	+	+
15.	<i>S. Stanley</i> 5811121	-	+	-	+	+
16.	<i>S. Agona</i> 581111	-	+	-	+	+
17.	<i>S. Virchow</i> 581107 (SV1)	-	+	-	-	+
18.	<i>S. Virchow</i> 581108 (SV2)	-	+	-	-	+
19.	<i>S. Singapore</i> 581120	-	+	-	-	+
20.	<i>S. Hadar</i> 581103 (SH1)	-	+	-	-	+
21.	<i>S. Hadar</i> 581104 (SH2)	-	+	-	-	+
22.	<i>S. Albany</i> 581109	-	+	-	-	+
23.	<i>S. Bovismorbificans</i> 581112	-	+	-	+	+
24.	<i>S. Newport</i> 581116	-	+	-	-	+
25.	<i>S. Weltevreden</i> 581122	-	+	-	+	+
26.	<i>S. Orion</i> 581117	-	+	-	+	+
27.	<i>S. Anatum</i> 581110	-	+	-	+	+
28.	<i>S. Give</i> 581114	-	+	-	+	+
29.	<i>S. Senftenberg</i> 581119	-	+	-	±	±
30.	<i>S. Hvittefoss</i> 581115	-	+	-	±	±
31.	<i>Shigella dysenteriae</i>	-	-	-	-	+
32.	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+
33.	<i>Aeromonas</i> sp.	-	-	-	-	-
34.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
35.	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-
36.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-
37.	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
38.	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-

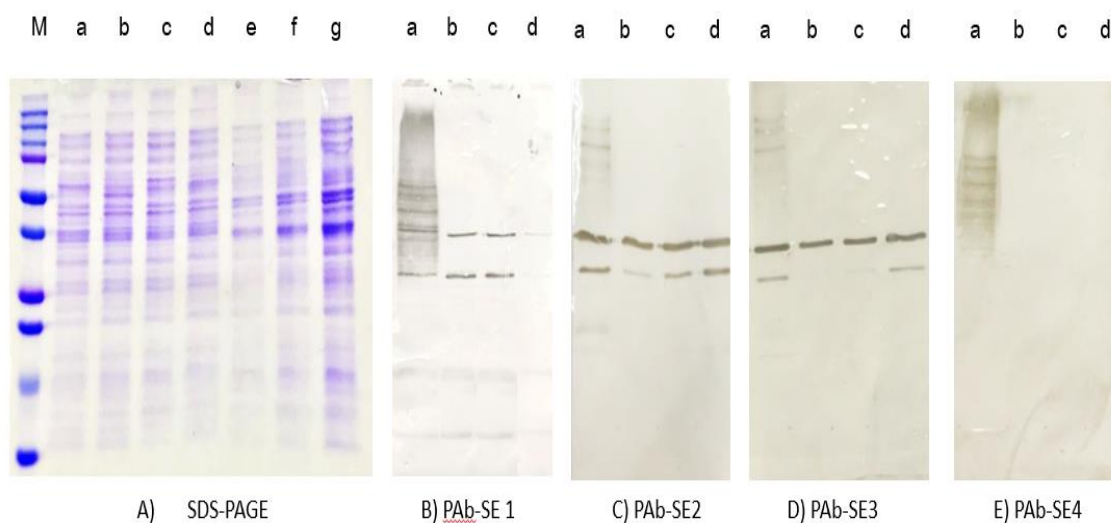
หมายเหตุ : + = positive result; - = negative result; ± = light positive

* = *IE-1* gene (Wang & Yeh, 2002); ** = *Inv-A* gene (Fratamico, 2003).

2. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ *S. Enteritidis* และ *Salmonella enterica* subsp.

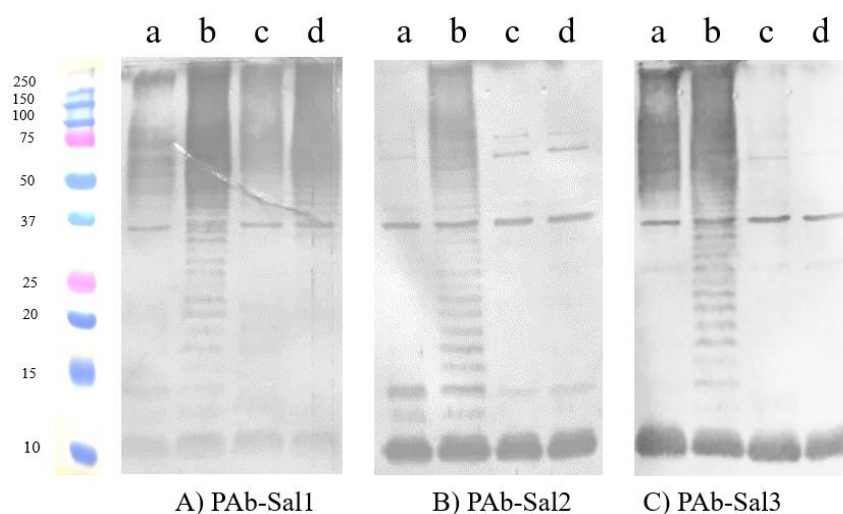
เมื่อนำเชื้อ *Salmonella* 4 ซีโรวาร์ และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น (*Shigella dysenteriae*, *Aeromonas* sp. และ *Escherichia coli*) ในรูปแบบ heat killed มาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้าและย้อมด้วยสี Coomassie blue พบรูปแบบโปรตีนในกลุ่มเชื้อ *Salmonella* ทั้ง 4 ซีโรวาร์ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีรูปแบบโปรตีนที่แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นเล็กน้อย

เมื่อปลุกภูมิคุ้มกันหนูขาวด้วยแอนติเจนในรูปแบบ heat killed และ formalin fixed จากแอนติเจน 2 กลุ่มคือเชื้อ *S. Enteritidis* หรือแอนติเจนที่ผสมระหว่างเชื้อ *Salmonella* 4 ซีโรวาร์ (*S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Typhimurium* และ *S. Virchow*) จำนวน 4 ครั้ง และได้ทำการเก็บซีรั่มจากหนูทุกตัวเพื่อทดสอบความจำเพาะต่อแอนติเจน ด้วยวิธี Western blotting โดยแอนติซีรั่มจากหนูแต่ละตัวถูกดูดซับด้วยเชื้อ *Shigella dysenteriae* ในอัตราส่วน 1:100 อย่างไรก็ตามพบว่าแอนติซีรั่มจากหนูยังคงสามารถจับกับเชื้อ *Salmonella* ทั้ง 4 ซีโรวาร์ ได้ในระดับที่ต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับความจำเพาะต่อแอนติเจน (ภาพประกอบ 10 ถึง 11) โดยดูจากหนูตัวที่มีแอนติซีรั่มที่ทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนจำนวนมาก และมีแถบโปรตีนร่วมกันในทุกซีโรวาร์ ซึ่งจากการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มที่ปลุกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *S. Enteritidis* พบว่าหนูตัวที่ 1 มีการตอบสนองดีที่สุด ส่วนหนูที่ปลุกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *Salmonella* ทั้ง 4 ซีโรวาร์ พบว่าหนูตัวที่ 3 มีการตอบสนองดีที่สุด นำหนูตัวดังกล่าวมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในลำดับถัดไป



ภาพประกอบ 10 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ
S. Enteritidis

ด้วยวิธี SDS- PAGE และ Western blotting นำ และแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ (a) S. Enteritidis, (b) S. Typhimurium, (c) S. Hadar, (d) S. Virchow, (e) *Shigella dysenteriae*, (f) *Aeromonas* sp. และ (g) *Escherichia coli* มาแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (A) โดยใช้ กระแสไฟฟ้า เจลส่วนหนึ่งนำมาย้อมสี Coomassie blue เจลอีกส่วนหนึ่งนำมาถ่ายโปรตีนจาก เจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยวิธี Western blotting (B ถึง E) แล้วนำมาทดสอบความจำเพาะ ของแอนติซีรั่มจากหนูทั้ง 4 ตัว ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ S. Enteritidis, M = standard markers



68

ภาพประกอบ 11 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *Salmonella* ทั้ง 4 ซีโรวาร์

ด้วยวิธี Western blotting นำแผ่นไนโตรเซลลูโลส ที่ทำการย้ายแถบโปรตีนของแบคทีเรียต่างๆ ได้แก่ (a) *S. Enteritidis*, (b) *S. Typhimurium*, (c) *S. Hadar*, (d) *S. Virchow* จากเจล มาทดสอบความจำเพาะกับแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 3 ตัว ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *Salmonella* ทั้ง 4 ซีโรวาร์

3. การผลิตและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากทำการหลอมเซลล์ม้ามของหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนจากแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม กับเซลล์ P3X myeloma แล้ว ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวด้วยอาหาร HAT medium ใน 96 wells microculture plate พบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา ประมาณ 1,500 หลุม และให้ผลบวกกับแอนติเจนที่ใช้ทดสอบประมาณ 15 หลุม เมื่อคัดเลือกต่อโดยทำการทดสอบกับเชื้อ *S. Enteritidis* โดยวิธี dot blotting และ Western blotting สามารถคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* และ *Salmonella* ทั้ง 4 ซีโรวาร์ จำนวน 3 โคลน โดยสามารถเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเป็น cell line ถาวร (ตาราง 13)

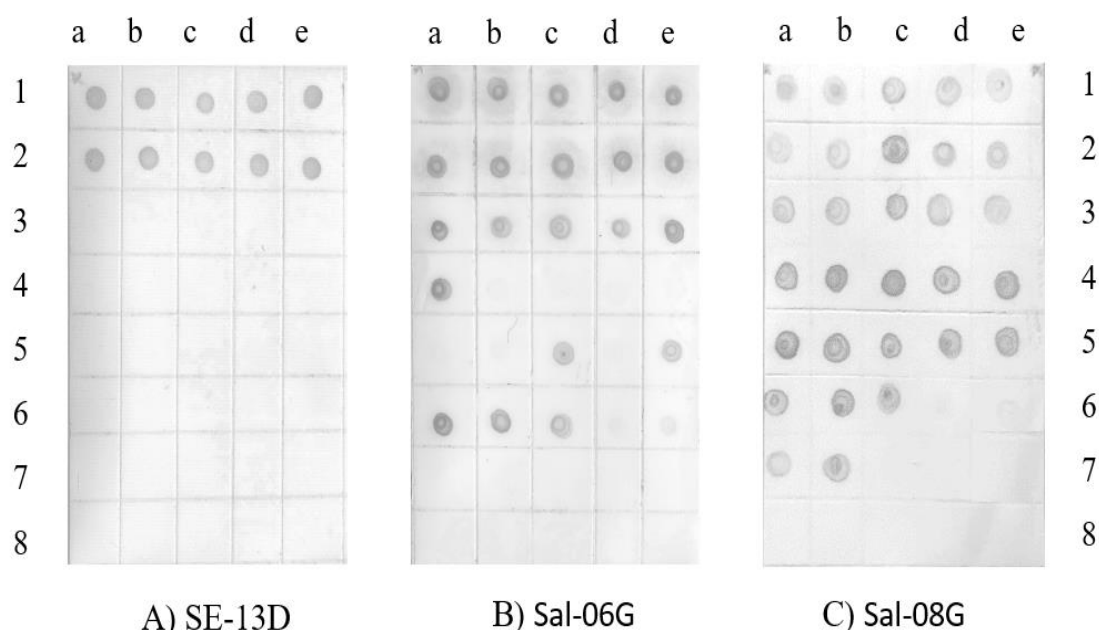
4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดที่ 1 คือ SE-13D ได้จากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *S. Enteritidis* พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* เท่านั้น (ภาพประกอบ 12 A และ ตาราง 12) และเป็น immunoglobulin ชนิด IgM (ตาราง 13) โดยสามารถจับกับแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 10^7 cfu/mL เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D มาทดสอบความจำเพาะต่อแอนติเจน โดยวิธี Western blotting พบโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D จับกับแอนติเจนในบริเวณ lipopolysaccharide (LPS) (ภาพประกอบ 13 A) และเมื่อนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาบ่มกับเอนไซม์ Proteinase K ก่อนนำมาบ่มซ้ำร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D พบว่ายังสามารถเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแอนติเจนได้ตามปกติ (ภาพประกอบ 14 A)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดที่ 2 คือ Sal-06G ได้จากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแบคทีเรีย *Salmonella* ทั้ง 4 ซีโรวาร์ พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* ซีโรกรุ๊ป B, D, E, I และบางซีโรวาร์ในกลุ่ม C (*S. Winston* และ *S. Bovismorbificans*) (ภาพประกอบ 12 B และ ตาราง 12) และเป็น immunoglobulin ชนิด IgG2a (ตาราง 13) โดยสามารถจับกับแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 2.5×10^6 cfu/mL เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-06G ทดสอบความจำเพาะต่อแอนติเจน โดยวิธี Western blotting พบโมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-06G จับกับแอนติเจนในบริเวณ lipopolysaccharide (LPS) (ภาพประกอบ 13 B) และเมื่อนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาบ่มกับเอนไซม์ Proteinase K ก่อนนำมาบ่มซ้ำร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-06G พบว่ายังสามารถเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแอนติเจนได้ตามปกติ (ภาพประกอบ 14 B)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดที่ 3 คือ Sal-08G ได้จากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแบคทีเรีย *Salmonella* ทั้ง 4 ซีโรวาร์ พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella dysenteriae* และ *Escherichia coli* (ภาพประกอบ 12 C และ ตาราง 12) และเป็น immunoglobulin ชนิด IgG1 (ตาราง 13) โดยสามารถจับกับแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 2.5×10^6 cfu/mL เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-08G มาทดสอบความจำเพาะต่อแอนติเจน โดยวิธี Western blotting พบโมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-08G จับในส่วนที่เป็น outer membrane protein ขนาด 18 kDa ของเชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella dysenteriae* และ *Escherichia coli* (ภาพประกอบ 13 C) และเมื่อนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาบ่มกับเอนไซม์ Proteinase K ก่อนนำมาบ่มซ้ำร่วมกับโมโน

โคลนอลแอนติบอดี Sal-08G พบแถบโปรตีนที่เคยเกิดปฏิกิริยาหายไปทั้งหมด (ภาพประกอบ 14 C)



ภาพประกอบ 12 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี แต่ละชนิดที่ผลิตได้กับแบคทีเรียต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting

โดยหยดแบคทีเรียในรูป heat killed ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/mL บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ได้แก่ A) SE-13D, B) Sal-06G และ C) Sal-08G

แถวที่ 1: (a-e) *S. Enteritidis* 1-5

แถวที่ 2: (a-e) *S. Enteritidis* 6-10

แถวที่ 3: (a) *S. Winston*, (b และ c) *S. Typhimurium* ST1 และ ST2, (d) *S. Saintpoul*, (e) *S. Stanley*

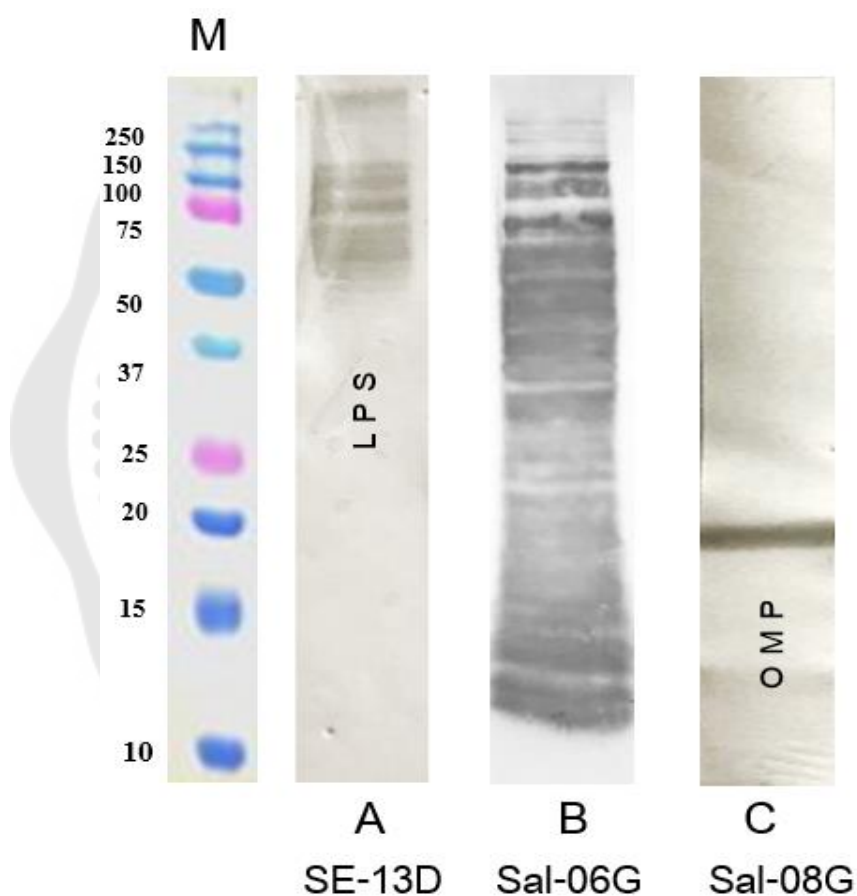
แถวที่ 4: (a) *S. Agona*, (b และ c) *S. Virchow* SV1 และ SV2, (d) *S. Singapore*, (e) *S. Hadar* SH1

แถวที่ 5: (a) *S. Hadar* SH2 (b) *S. Albany*, (c) *S. Bovismorbificans*, (d) *S. Newport*, (e) *S. Weltevreden*

แถวที่ 6: (a) *S. Orion*, (b) *S. Anatum*, (c) *S. Give*, (d) *S. Senftenberg*, (e) *S. Hvitittingfoss*

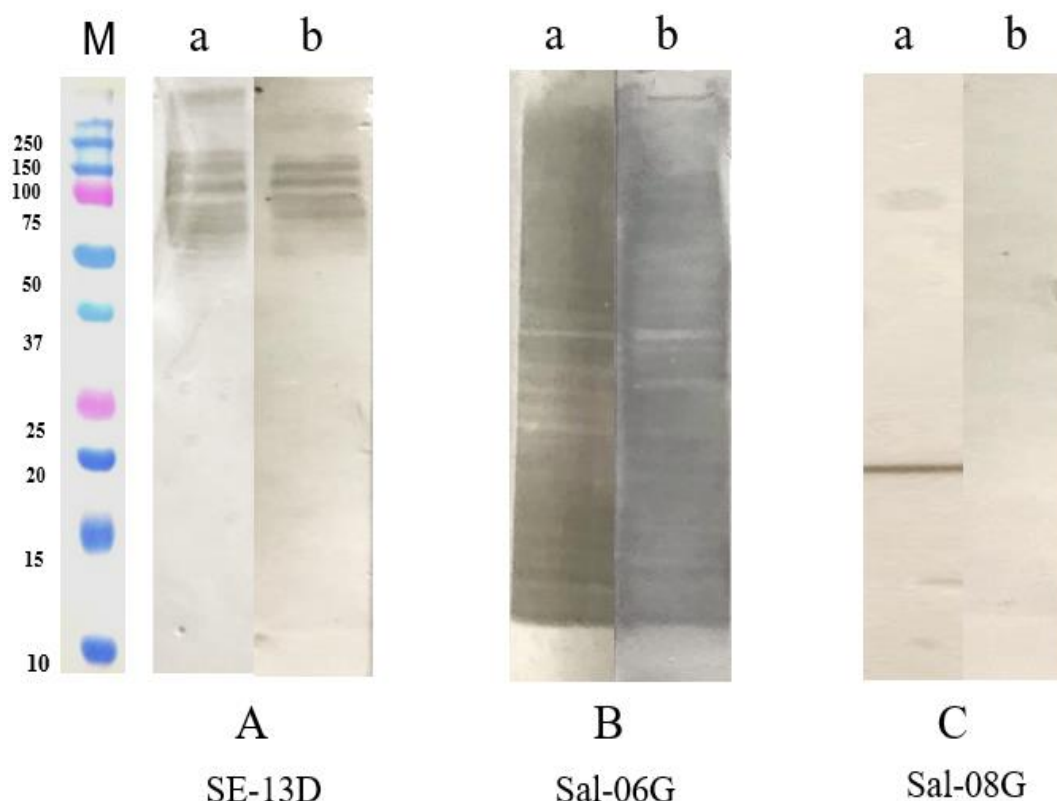
แถวที่ 7: (a) *Shigella dysenteriae*, (b) *Escherichia coli*, (c) *Aeromonas* sp., (d) *Klebsiella pneumoniae*, (e) *Listeria monocytogenes*

แถวที่ 8: (a) *Enterobacter aerogenes*, (b) *Staphylococcus aureus*, (c) *Bacillus cereus*.



ภาพประกอบ 13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดต่อแอนติเจน

โดยวิธี Western blotting นำเชื้อ *S. Enteritidis* ในรูปแบบ heat killed แยกด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้ายลงแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยวิธี Western blotting แล้วนำมาบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ได้แก่ (A) SE-13D, (B) Sal-06G และ (C) Sal-08G M = standard markers โดย LPS = lipopolysaccharide, OMP = outer membrane protien



ภาพประกอบ 14 การทดสอบชนิดของแอนติเจน ที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้คือ A) MAb SE13D, B) MAb Sal06G, C) MAb Sal08G, M = standard markers

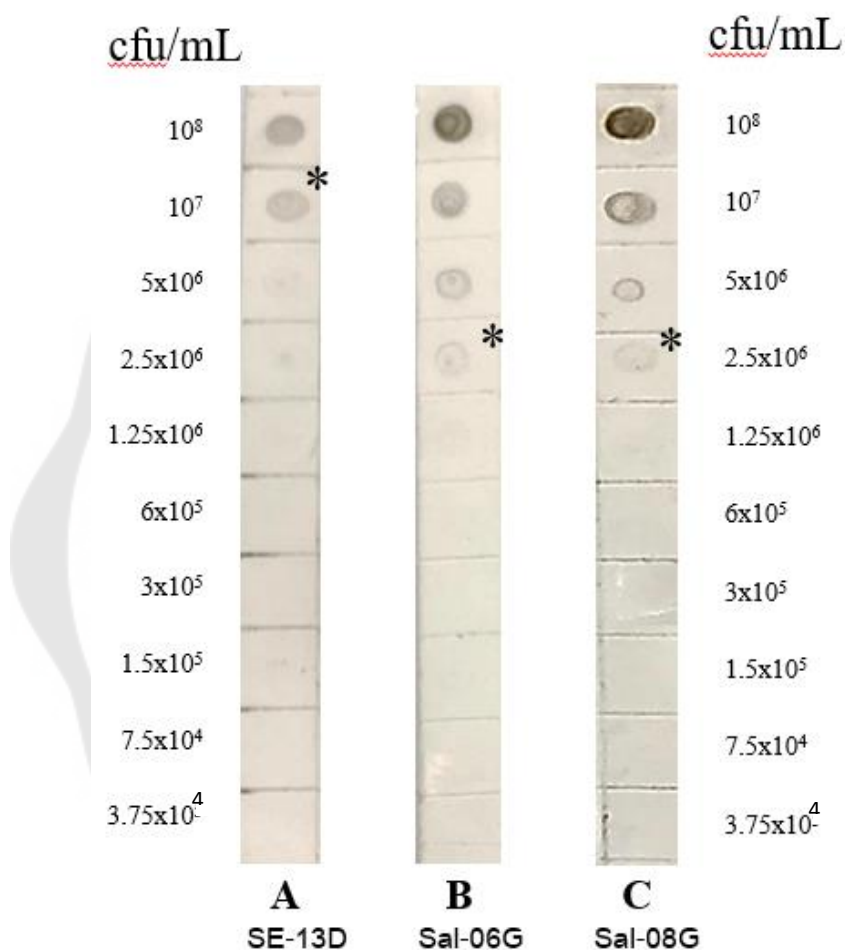
โดยนำเชื้อ *S. Enteritidis* ในรูปแบบ heat killed แยกด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้ายลงแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยวิธี Western blotting จากนั้นแบ่งทดสอบเป็น 2 กลุ่ม (a) กลุ่มที่ 1 บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดโดยตรง (b) กลุ่มที่ 2 นำแผ่นไนโตรเซลลูโลส ไปบ่มกับ Proteinase K ก่อนนำไปทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ซึ่งพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด SE-13D และ Sal-06G ยังคงให้แถบปฏิกิริยาต่อแอนติเจนเหมือนเดิม ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด Sal-08G ไม่ปรากฏแถบปฏิกิริยาหลังบ่มด้วย Proteinase K

5. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจเชื้อ *S.*

Enteritidis โดยวิธี dot blotting

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบการตรวจหาเชื้อ *S. Enteritidis* โดยวิธี dot blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความสามารถ ในการตรวจจับ

แอนติเจนดังกล่าวที่แตกต่างกันในช่วงระหว่าง 2.5×10^6 ถึง 10^7 cfu/mL (ภาพประกอบ 15 และ ตาราง 13) โดยพบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* ที่ 10^7 cfu/mL และความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-06G และ Sal-08G สามารถตรวจจับเชื้อ *S. Enteritidis* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 2.5×10^6 cfu/mL

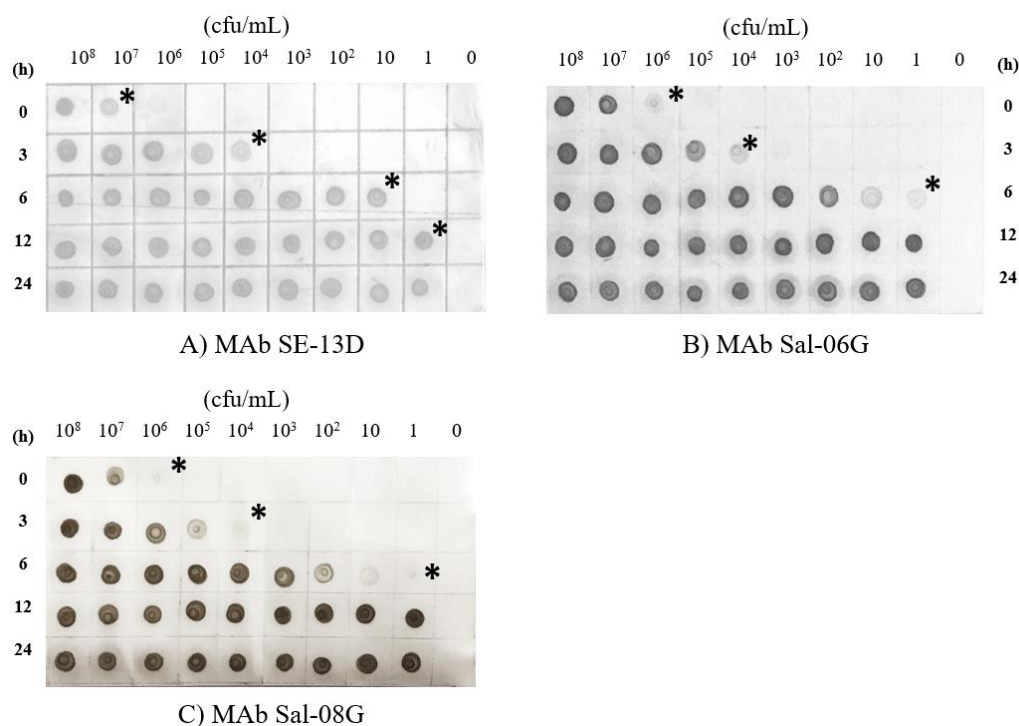


ภาพประกอบ 15 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ได้แก่ A) SE-13D, B) Sal-06G และ C) Sal-08G ในการตรวจเชื้อ *S. Enteritidis* โดยวิธี dot blotting

โดยหยดแอนติเจนที่ต้องการทดสอบในรูป heat killed ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 3.75×10^5 - 10^8 cfu/mL ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดนั้นๆ ; * = ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ต่ำที่สุด ที่สามารถเห็นการเกิดปฏิกิริยาได้ชัดเจน

6. การตรวจเชื้อ *S. Enteritidis* หลังการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

หลังจากการเพิ่มจำนวนเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และทำการทดสอบกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี SE-13D ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* และโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีก 2 ชนิด คือ Sal-06G และ Sal-08G ที่สามารถตรวจจับเชื้อ *Salmonella* หลายซีโรวาร์ โดยทำการตรวจที่เวลา 0-24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อตรวจที่เวลา 0 ชั่วโมง โมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D, Sal-06G และ Sal-08G สามารถตรวจจับเชื้อ *S. Enteritidis* ได้ที่ 10^7 , 10^6 และ 10^6 cfu/mL ตามลำดับ และโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวสามารถเพิ่มความไวในการตรวจที่ 1 cfu/mL เมื่อบ่มเชื้อ *S. Enteritidis* ในอาหาร TSB ที่ 12, 6 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพประกอบ 16)

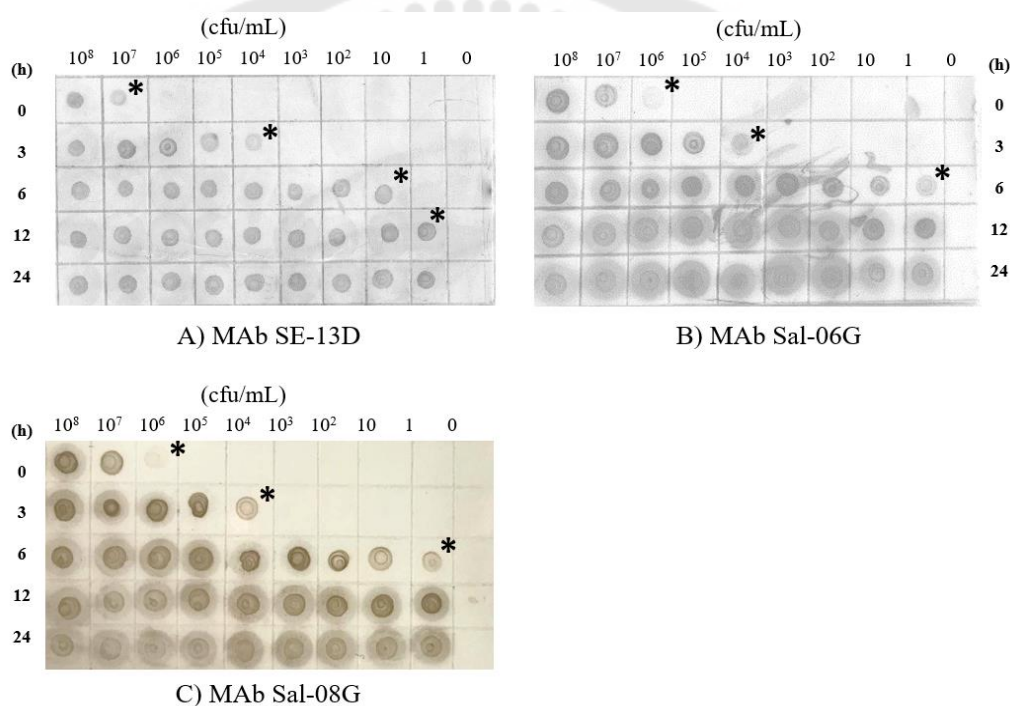


ภาพประกอบ 16 การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ *S. Enteritidis* หลังการบ่มเพิ่มจำนวนในอาหาร TSB

โดยนำเชื้อ *S. Enteritidis* ความเข้มข้นระหว่าง $0-10^8$ cfu/mL เติมลงในอาหาร TSB และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างแต่ละช่วงเวลามาฆ่าด้วยความร้อนและหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D, Sal-06G และ Sal-08G; * = ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ต่ำที่สุด ที่สามารถเห็นการเกิดปฏิกิริยาได้ชัดเจน

7. การตรวจหาเชื้อ *S. Enteritidis* หลังการบ่มเชื้อในตัวอย่างเนื้อไก่บดผสม TSB

หลังจากการเพิ่มจำนวนเชื้อ *S. Enteritidis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีเนื้อไก่บดผสมอยู่ในช่วงเวลาระหว่าง 0-24 ชั่วโมง แล้วบ่มร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-06G และ Sal-08G ที่สามารถตรวจจับเชื้อ *Salmonella* หลายสปีชีส์พบว่าเมื่อตรวจที่เวลา 0 ชั่วโมง โมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D, Sal-06G และ Sal-08G สามารถตรวจจับเชื้อ *S. Enteritidis* ได้ที่ 10^7 , 10^6 และ 10^6 cfu/mL และโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวสามารถเพิ่มความไวในการตรวจที่ 1 cfu/mL เมื่อบ่มเชื้อ *S. Enteritidis* ในอาหาร TSB ที่ 12, 6 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ 17 การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ *S. Enteritidis* หลังการบ่มเพิ่มจำนวนในอาหาร TSB ที่มีเนื้อไก่บดผสมอยู่

โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับภาพประกอบ 16 และบ่มด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D, Sal-06G และ Sal-08G ; * = ความเข้มข้นของแอนติเจนที่ต่ำที่สุดที่สามารถเห็นการเกิดปฏิกิริยาได้ชัดเจน

ตาราง 13 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ต่างๆ ทดสอบโดยวิธี dot blotting และ Western blotting โดยใช้แบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/mL

Group	MAb	Class & Subclass	Sensitivity dot blotting (cfu/mL)	Antigen Western blotting	Bacterial immunoreactivity (dot blotting)
1.	SE-13D	IgM, k	10^7	LPS	<i>S. Enteritidis</i>
2.	Sal-06G	IgG2a, k	2.5×10^6	LPS	Some <i>Salmonella</i> in serogroups B,C,D,E, I
	Sal-08G	IgG1, k	2.5×10^6	OMP (18 kDa)	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Escherichia coli</i>

หมายเหตุ : LPS = lipopolysaccharide, OMP = outer membrane protien

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การทดลองครั้งนี้เป็นการเตรียมแอนติเจนจากเชื้อ *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* และ *S. Virchow* ซึ่งเป็นกลุ่ม nonthyphoidal ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและท้องร่วงอย่างรุนแรง และพบได้มากในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก โดยทำการเตรียมเชื้อในรูปแบบ heat killed และ formalin fixed แล้วนำมาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว โดยทำการฉีดแอนติเจน 2 กลุ่มคือ แอนติเจนจากเชื้อ *S. Enteritidis* และแอนติเจนที่ผสมกันระหว่างเชื้อ *Salmonella* 4 ซีโรวาร์ (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* และ *S. Virchow*) เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูทั้งหมดด้วยเทคนิค Western blotting พบว่า มีการตอบสนองต่อแอนติเจนแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน โดยพบว่ามีบางแถบโปรตีนที่ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันกับทุกซีโรวาร์ ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่แบคทีเรียแต่ละซีโรวาร์มีลักษณะแอนติเจนที่เหมือนกัน จึงสามารถจับกับแอนติซีรั่มเดียวกันได้ ขณะที่บางแถบโปรตีนพบเพียงในบางซีโรวาร์เท่านั้น ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวอาจเป็นส่วนของแอนติเจนจากแบคทีเรีย ที่มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันของแต่ละซีโรวาร์ และสามารถนำมาผลิตเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้

หลังจากทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา โดยหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามและเซลล์ P3X myeloma สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 2 กลุ่ม รวม 3 ชนิด ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ที่แตกต่างกันไป เนื่องมาจากการใช้แอนติเจนจากเชื้อ *S. Enteritidis* และแอนติเจนที่ผสมระหว่างเชื้อ *Salmonella* 4 ซีโรวาร์ (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* และ *S. Virchow*) ในการปลูกภูมิคุ้มกันให้หนูขาว อย่างไรก็ตามพบโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1 ชนิด (MAb SE-13D) ที่มีลักษณะจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* เพียงซีโรวาร์เดียวเท่านั้น โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D ซึ่งเกิดจากการฉีดกระตุ้นหนูขาวด้วยแอนติเจนจากเชื้อ *S. Enteritidis* จึงมีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* เท่านั้น โดยไม่ปรากฏปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์อื่น หรือแบคทีเรียต่างชนิด ทำให้สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D มาใช้ในการคัดแยกเชื้อ *S. Enteritidis* ออกจากเชื้อ *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Virchow*, *Salmonella* ซีโรวาร์อื่น หรือแบคทีเรียต่างชนิดได้ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนี้สามารถจับกับเชื้อ *S. Enteritidis* ในรูปแบบ heat killed ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 10^7 cfu/ml ในส่วนที่เป็น lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อ โดยสามารถสังเกตลักษณะ smear บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส และเมื่อนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มด้วยเอนไซม์ Proteinase K ก่อนการบ่มร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D ยังคงพบลักษณะ smear ได้เช่นเดิม โดยมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับ

การจับกันระหว่าง โมโนโคลนอลแอนติบอดี กับ lipopolysaccharides ที่พบในเชื้อ *S. Anatum* (Luk & Lindberg, 1991 ; Jaradat & Zawistowski, 1996) ก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. Enteritidis* โดยในปี 2005 Schneid และคณะ ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี 336D และ 348C ที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 37 kDa ของเชื้อ *S. Enteritidis* อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานผลแสดงความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าว ปี 2010 Nalbantsoy และคณะ ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้โปรตีน flagellin ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55 kDa ของเชื้อ *S. Adeyo* ชีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี D7 ที่จำเพาะต่อทั้งเชื้อ *S. Adeyo* และ *S. Enteritidis* อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวยังคงมีความไวในการจับกับแอนติเจนที่ต่ำ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. Enteritidis* เพียงซีโรวาร์เดียว จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดแยกเชื้อ *S. Enteritidis* ด้วยวิธี dot blotting ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าความไวในการตรวจแอนติเจนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D อยู่ที่ 10^7 cfu/ml ซึ่งค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับวิธี polymerase chain reaction (PCR) และเทคนิคทางอณูชีววิทยาต่างๆ (10^2 – 10^4 cfu/mL) (Paião et al., 2013) แต่ความไวในการตรวจแอนติเจนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าว สามารถเพิ่มจนใกล้เคียงกับวิธีการตรวจด้วย PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ 3-6 ชั่วโมง และสามารถเพิ่มความไวในการจับแอนติเจนได้ถึง 1 cfu/mL เมื่อทำการเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยประสิทธิภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D ยังคงให้ผลเช่นเดิมเมื่อทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ *S. Enteritidis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีเนื้อไก่บดผสมอยู่

ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีก 2 ชนิด (MAb Sal-06G และ MAb Sal-08G) เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* หลายซีโรวาร์ ซึ่งเกิดจากการนำแอนติเจนที่เตรียมจากการผสมกันของเชื้อ *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Typhimurium* และ *S. Virchow* มาชีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว ทำให้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับเชื้อ *Salmonella* ได้หลายซีโรวาร์ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้เพื่อคัดแยกเชื้อ *Salmonella* ได้ในระดับสกุล (genus) ทั้งนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-06G ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* ซีโรกรุ๊ป B, D, E I และ บางซีโรวาร์ในกรุ๊ป C (*S. Winston* และ *S. Bovismorbificans*) เมื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี SE-13D ช่วยให้ผลการทดลองมีความแม่นยำมากขึ้น

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-08G มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. และพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Shigella dysenteriae* และ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน (Enterobacteriaceae) ซึ่งแม้จะสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-08G มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. เพื่อยืนยันผลร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี Mab SE-13D ได้อย่างไรก็ตามเนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด Sal-08G แสดงการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Shigella dysenteriae* และ *Escherichia coli* จึงควรเพิ่มความระมัดระวังในการนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. เพื่อป้องกันการเกิดผลบวกปลอม ทั้งนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 2 ชนิด (MAbSal-06G และ MAbSal-08G) สามารถจับกับแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 2.5×10^6 cfu/mL โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-06G จับในส่วนที่เป็น lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี Sal-08G จับในส่วนที่เป็น outer membrane protein ขนาด 18 kDa ของเชื้อ อย่างไรก็ตามความไวในการตรวจแอนติเจนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด สามารถเพิ่มได้ถึงระดับ 1 cfu/mL เมื่อทำการเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยประสิทธิภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด ยังคงให้ผลเช่นเดิมเมื่อทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ *S. Enteritidis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีเนื้อไก่บดผสมอยู่

ก่อนหน้านี้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ *Salmonella* โดยในปี 2005 Schneid และคณะ ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี 424H ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* ในกลุ่ม B-E และ G โดยเตรียมแอนติเจนจาก outer membrane protein ของเชื้อ *S. Enteritidis* และในปี 1988 Chaicumpa และคณะ ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี 102B₂ โดยเตรียมแอนติเจนจาก lipopolysaccharide ของเชื้อ *S. Typhi* และเมื่อนำมาทดสอบการตรวจเชื้อ *Salmonella* ในอาหารจำนวน 873 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่าการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 102B₂ มีความไวและความแม่นยำที่สูงกว่าวิธีมาตรฐาน 81.5% และ 85% ตามลำดับ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นในงานวิจัยครั้งนี้ สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจ เพื่อจำแนกเชื้อ *S. Enteritidis* ออกจาก *Salmonella* ซีโรวาร์อื่น และแบคทีเรียต่างชนิด โดยวิธี dot blotting ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมาใช้ในการตรวจด้วยวิธี dot blotting จึงเป็นการตรวจวิเคราะห์ที่มีความไว แม่นยำสูง ใช้เวลาในการตรวจน้อย โดยไม่ต้องทำการแยกเชื้อ หรือทดสอบทางชีวเคมี จึงสามารถนำมาใช้ในป้องกันและเฝ้าระวัง

การแพร่ระบาดของเชื้อ S. Enteritidis ที่เป็นสาเหตุของโรค salmonellosis ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
ในลำดับต่อไป



บรรณานุกรม

- Andreoletti, O., Budka, H., Buncic, S., Colin, P., Collins, J., De Koeijer, A., . . . Klein, G. (2009). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European commission on assessment of the public health significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *EFSA J*, 993, 1-73.
- Archer, D. L., & Young, F. E. (1988). Contemporary issues: diseases with a food vector. *Clinical microbiology reviews*, 1(4), 377-398.
- Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Sawanpanyalert, P., Hendriksen, R.S., Wong, D.M.L.O.F., & Aarestrup, F. (2004). "Salmonella" serovars from humans and other sources in Thailand, 1993–2002. *Emerging infectious diseases* 10(1): 131.
- Bangtrakulnonth, A., Pornruangwong, S., Terajima, J., Watanabe, H., Kaneko, K.-i., Ogawa, M., & Boonmar, S. (2012). Epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis in human and broiler chicken isolates in Thailand by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis.
- Chaicumpa, W., Khusmith, S., Tapchaisri, P., Echeverria, P., Kalambaheti, T., & Chongsanguan, M. (1988). Detection with monoclonal antibody of *Salmonella* Typhi antigen 9 in specimens from patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(9), 1824-1830.
- Chary, P., Prasad, R., Chopra, A., & Peterson, J. (1993). Location of the enterotoxin gene from *Salmonella* Typhimurium and characterization of the gene products. *FEMS microbiology letters*, 111(1), 87-92.
- Cheng, C. M., Lin, W., Van, K. T., Phan, L., Tran, N. N. & Farmer, D. (2008). Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. *Journal Food Protection*, Vol.71, No.12, pp. 2436-41.
- Colavita, G. (2008). Igiene e tecnologie degli alimenti di origine animale. *Veterinaria Italiana*, 44(3), 561.
- Corrêa, W., & Corrêa, C. (1983). *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*: JM Varela.

- Cruickshank, R. (1975). *Medical microbiology: The practice of medical microbiology* (Vol. 2): Churchill Livingstone.
- De Felip, G. (2001). *Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti: Tecniche Nuove*.
- Foods, I. C. o. M. S. f., & Swanson, K. M. (2011). *Microorganisms in Foods: Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance*: Springer Science.
- Forest, C. G., Ferraro, E., Sabbagh, S. C., & Daigle, F. (2010). Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2. *Microbiology*, 156(12), 3689-3698.
- Forshell, L. P., & Wierup, M. (2006). *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 25(2), 541-554.
- Franco, B. D. G. d. M., & Landgraf, M. (1996). Microbiologia dos alimentos.
- Fratamico, P., & Strobaugh, T. (1998). Simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157: H7 by multiplex PCR. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(3), 92-98.
- Galanos, C. (1977). Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their lipid A component. *Int. Rev. Biochem.*, 14, 239-335.
- Gallanos, C., Lüderitz, O., & Westphall, O. (1971). Preparation and properties of antisera against the lipid-A component of bacterial lipopolysaccharides. *European journal of biochemistry*, 24(1), 116-122.
- Gandini, G. (1993). Sistema HACCP applicato all'industria degli ovoprodotti e proposta di procedura ispettiva. *Ingegneria alimentare*, 3(6), 25-30.
- Glynn, B., Lahiff, S., Wernecke, M., Barry, T., Smith, T. J., & Maher, M. (2006). Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 126-139.
- Gómez-A., Alberto C., Torres-Vitela D.R., Villarruel-López M., & Castro-Rosas A. (2012).

"The role of foods in *Salmonella* infections. *Salmonella—A Dangerous Foodborne Pathogen*: 21-46.

- Goodman, L. B., McDonough, P. L., Anderson, R. R., Franklin-Guild, R. J., Ryan, J. R., Perkins, G. A., . . . Thompson, B. S. (2017). Detection of *Salmonella* spp. in veterinary samples by combining selective enrichment and real-time PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(6), 844-851.
- Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M., & Wagner, M. (2006). Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: an alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *Journal of microbiological methods*, 66(3), 538-547.
- Hendriksen, R. S., Agenaar, J., & Van Bergen, M. (2003). A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. *Laboratory Protocols (Isolation of Salmonella)* <http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/salmonella2-pdf>, 4.
- Hernandez, L. D., Hueffer, K., Wenk, M. R., & Galán, J. E. (2004). *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science*, 304(5678), 1805-1807.
- Hiriart, Y., Serradell, M., Martínez, A., Sampaoli, S., Maciel, D. G., Chabalgoity, J. A., . . . Rumbo, M. (2013). Generation and selection of anti-flagellin monoclonal antibodies useful for serotyping *Salmonella enterica*. *SpringerPlus*, 2(1), 640.
- Hitchcock, P. J., Leive, L., Mäkelä, P., Rietschel, E. T., Strittmatter, W., & Morrison, D. (1986). Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *Journal of bacteriology*, 166(3), 699.
- Huang, R., Wu, S., Zhang, X., & Zhang, Y. (2005). Molecular analysis and identification of virulence gene on pRST98 from multi-drug resistant *Salmonella* Typhi. *Cell Mol Immunol*, 2(2), 136-140.
- Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O. (2009). *Salmonella*—the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular microbiology*, 11(11), 1579-1586.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods *Salmonellae*.

(1996). In: ICMSF (Ed.), *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional: London, 192, 217-264.

Jakabi, M., Buzzo, A. A., Ristori, C. A., Tavechio, A. T., Sakuma, H., Paula, A. M. R. d., & Gelli, D. S. (1999). Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp, ocorridos na Grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58(1), 47-51.

Jaradat, Z. W., & Zawistowski, J. (1996). Production and characterization of monoclonal antibodies against the O-5 antigen of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(1), 1-5. [https://doi.org/ 10.1128/AEM.62.1.1-5](https://doi.org/10.1128/AEM.62.1.1-5).

Ketyi, I., Pacsa, S., Emödy, L., Vertenyi, A., Kocsis, B., & Kuch, B. (1979). *Shigella dysenteriae* 1-like cytotoxic enterotoxins produced by *Salmonella* strains. *Acta microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 26(3), 217-223.

Kingsley, R. A., Msefula, C. L., Thomson, N. R., Kariuki, S., Holt, K. E., Gordon, M. A., . . . Sangal, V. (2009). Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome research*, 19(12), 2279-2287.

Knodler, L. A., Finlay, B. B., & Steele-Mortimer, O. (2005). The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9058-9064.

Kolyva, S., Waxin, H., & Popoff, M. Y. (1992). The Vi antigen of *Salmonella* typhi: molecular analysis of the *viaB* locus. *Microbiology*, 138(2), 297-304.

Koo, L. C. (1984). The use of food to treat and prevent disease in Chinese culture. *Social Science & Medicine*, 18(9), 757-766.

Koupal, L., & Deibel, R. (1975). Assay, characterization, and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infection and immunity*, 11(1), 14-22.

- Krishnakumar, R., Kim, B., Mollo, E. A., Imlay, J. A., & Slauch, J. M. (2007). Structural properties of periplasmic SodCI that correlate with virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology*, 189(12), 4343-4352.
- L'vov, V. L., Shashkov, A. S., Dmitriev, B. A., Kochetkov, N. K., Jann, B., & Jann, K. (1984). Structural studies of the O-specific side chain of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O: 7. *Carbohydrate research*, 126(2), 249-259.
- Lesnick, M. L., Reiner, N. E., Fierer, J., & Guiney, D. G. (2001). The *Salmonella* spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Molecular microbiology*, 39(6), 1464-1470.
- Libby, S. J., Goebel, W., Ludwig, A., Buchmeier, N., Bowe, F., Fang, F. C., . . . Heffron, F. (1994). A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), 489-493.
- Little, C., Rawal, N., De Pinna, E., & McLauchlin, J. (2010). Survey of *Salmonella* contamination of edible nut kernels on retail sale in the UK. *Food microbiology*, 27(1), 171-174.
- Lockman, H. A., & Curtiss, r. (1990). *Salmonella* Typhimurium mutants lacking flagella or motility remain virulent in BALB/c mice. *Infection and immunity*, 58(1), 137-143.
- Luderitz, O. (1968). Somatic and capsular antigens of gram-negative bacteria. *Comprehensive biochemistry*, 26, 105-228.
- Lüderitz, O., Freudenberg, M. A., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E. T., & Shaw, D. H. (1982). Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria *Current topics in membranes and transport* (Vol. 17, pp. 79-151): Elsevier.
- Luk, J., & Lindberg, A. (1991). Anti-*Salmonella* lipopolysaccharide monoclonal antibodies: characterization of *Salmonella* BO-, CO-, DO-, and EO-specific clones and their diagnostic usefulness. *Journal of clinical microbiology*, 29(11), 2424-2433.
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'brien, S. J., . . . Studies, I. C. o. E. D. B. o. I. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical infectious diseases*, 50(6), 882-889.

- Malik, P., Sharma, V., & Thapliyal, D. (1996). Partial purification and characterization of *Salmonella* cytotoxin. *Veterinary microbiology*, 49(1-2), 11-19.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., & Helmuth, R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(12), 7046-7052.
- Matyas, B., Cronquist, A., Cartter, M., Tobin-D'Angelo, M., Blythe, D., Smith, K., . . . Dunn, J. (2010). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, 2009 (Reprinted from MMWR, vol 59, pg 418-422, 2010). *Jama-Journal of the American Medical Association*, 303(21), 2130-2132.
- McCARTHY, N., Reen, F. J., Buckley, J. F., Frye, J. G., Boyd, E. F., & Gilroy, D. (2009). Sensitive and rapid molecular detection assays for *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Heidelberg. *Journal of food protection*, 72(11), 2350-2357.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., . . . Du, F. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858), 852.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., . . . Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607.
- Moganedi, K., Goyvaerts, E., Venter, S. N., & Sibara, M. (2007). Optimisation of the PCR-invA primers for the detection of *Salmonella* in drinking and surface waters following a pre-cultivation step. *Water Sa*, 33(2).
- Nalbantsoy, A., Karaboz, I., & Gurhan, I. D. (2010). Production of monoclonal antibody against *Salmonella* H: g, m flagellar antigen and potential diagnostic application. *Hybridoma*, 29(5), 419-423. <https://doi:10.1089/hyb.2010.0023>.
- Niyomdech, S., Limbut, W., Numnuam, A., Kanatharana, P., Charlermroj, R., Karoonuthaisiri, N., & Thavarungkul, P. (2018). Phage-based capacitive biosensor for *Salmonella* detection. *Talanta*, 188, 658-664.

- O'brien, A., & Holmes, R. (1996). Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Escherichia coli*, 2788-2802.
- Orskov, I., Orskov, F., Jann, B., & Jann, K. (1977). Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological reviews*, 41(3), 667.
- Pacello, F., Ceci, P., Ammendola, S., Pasquali, P., Chiancone, E., & Battistoni, A. (2008). Periplasmic Cu, Zn superoxide dismutase and cytoplasmic Dps concur in protecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from extracellular reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(2), 226-232.
- Paião, F., Arisitides, L., Murate, L., Vilas-Bôas, G., Vilas-Boas, L., & Shimokomaki, M. (2013). Detection of *Salmonella* spp, *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 37-42.
- Phan, M.-D., Kidgell, C., Nair, S., Holt, K. E., Turner, A. K., Hinds, J., . . . Titball, R. (2009). Variation in *Salmonella enterica* serovar typhi IncHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 716-727.
- Prager, R., Fruth, A., & Tschäpe, H. (1995). *Salmonella* enterotoxin (stn) gene is prevalent among strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(1), 47-50.
- Reitmeyer, J. C., Peterson, J. W., & Wilson, K. J. (1986). *Salmonella* cytotoxin: a component of the bacterial outer membrane. *Microbial pathogenesis*, 1(5), 503-510.
- Rementeria, A., Vivanco, A., Ramirez, A., Hernando, F., Bikandi, J., Herrera-Leon, S., . . . Garaizar, J. (2009). Characterization of a Monoclonal Antibody Directed against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Serovar [4, 5, 12: i:–]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(5), 1345-1354.
- Rietschel, E. T. (1982). The chemistry and biology of lipopolysaccharides and their lipid A component. *Immunopharmacology and the regulation of leukocyte function*, Marcel Dekker, Basel., 183-229.

- Rietschel, E. T. (1984). Structure and conformation of the lipid A component of lipopolysaccharides. *Handbook of endotoxin, Vol. 1, Chemistry of endotoxin*, 187-220.
- Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., Leclerc, J.-M., & Daigle, F. (2010). So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS microbiology letters*, 305(1), 1-13.
- Sakai, T. and Chalermchaikitb, T. (1996). The major sources of *Salmonella* Enteritidis in Thailand. *Journal of Food Microbiology*, 31(1-3), 173-180.
- Schmidt, G., Schlecht, S., Luderitz, O., & Westphal, O. (1969). Investigational work on typing of *Salmonella*-R-forms. I. communication microbiological and serological test on *Salmonella* Minnesota mutants. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Abteilung 1-Originale Medizinisch Hygienische Bakteriologie Virusforschung und Parasitologie*, 209(4), 483-&.
- Schmitt, C. K., Ikeda, J. S., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S., . . . O'Brien, A. D. (2001). Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infection and immunity*, 69(9), 5619-5625.
- Schneid, A. d. S., Lüdtke, C. B., Diel, C., & Aleixo, J. A. (2005). Production and characterization of monoclonal antibodies for the detection of *Salmonella enterica* in chicken meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(2), 163-169.
- Seo, K., Valentin-Bon, I., & Brackett, R. (2006). Detection and enumeration of *Salmonella* Enteritidis in homemade ice cream associated with an outbreak: comparison of conventional and real-time PCR methods. *Journal of food protection*, 69(3), 639-643.
- Shimizu, R., Osawa, K., Shigemura, K., Yoshida, H., Fujiwara, M., Iijima, Y., . . . Shirakawa, T. (2014). Development of multiplex PCR for rapid identification of four *Salmonella* serovars most commonly isolated in Japan. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 45(3), 654.

- Sithigorngul, P., Chauychuwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., & Menasveta P. (2000). Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 42: 27–34.
- Štefanovičová, A., Drahovská, H., Sásik, M., & Kuchta, T. (2002). Detection of *Salmonella* in food, equivalent to ISO 6579, by a three-days polymerase chain reaction-based method. *Food Control*, 13(3), 191-194.
- Terebiznik, M. R., Vieira, O. V., Marcus, S. L., Slade, A., Yip, C. M., Trimble, W. S., . . . Grinstein, S. (2002). Elimination of host cell PtdIns (4, 5) P 2 by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*. *Nature cell biology*, 4(10), 766.
- Tomás, D., Rodrigo, A., Hernandez, M., & Ferrus, M. (2009). Validation of real-time PCR and enzyme-linked fluorescent assay-based methods for detection of *Salmonella* spp. in chicken feces samples. *Food Analytical Methods*, 2(3), 180-189.
- Van Hoorebeke, S., Van Immerseel, F., Schulz, J., Hartung, J., Harisberger, M., Barco, L., . . . De Vylder, J. (2010). Determination of the within and between flock prevalence and identification of risk factors for *Salmonella* infections in laying hen flocks housed in conventional and alternative systems. *Preventive veterinary medicine*, 94(1-2), 94-100.
- Vinay, M., Franche, N., Grégori, G., Fantino, J.-R., Pouillot, F., & Ansaldi, M. (2015). Phage-based fluorescent biosensor prototypes to specifically detect enteric bacteria such as *E. coli* and *Salmonella enterica* Typhimurium. *PLoS One*, 10(7).
- Wain, J., House, D., Zafar, A., Baker, S., Nair, S., Kidgell, C., . . . Hasan, R. (2005). Vi antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi clinical isolates from Pakistan. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1158-1165.
- Waltman, W. D. (2000). Methods for cultural isolation. *Salmonella in domestic animals*. CAB International, London, 355-372.

- Wang, S. J., & Yeh, D. B. (2002). Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella* Enteritidis in foods and faecal samples. *Letters in applied microbiology*, 34(6), 422-427.
- Westphal, O., Jann, K., & Himmelsbach, K. (1983). Chemistry and immunochemistry of bacterial lipopolysaccharides as cell wall antigens and endotoxins *Host Parasite Relationships in Gram-Negative Infections* (Vol. 33, pp. 9-39): Karger Publishers.
- Westphal, O., & Lüderitz, O. (1954). Chemische erforschung von lipopolysacchariden gramnegativer bakterien. *Angewandte Chemie*, 66(13-14), 407-417.
- Williams, G. T., & Smith, C. A. (1993). Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*, 74(5), 777-779.
- Wilson, R. P., Raffatellu, M., Chessa, D., Winter, S. E., Tükel, Ç., & Bäumlér, A. J. (2008). The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cellular microbiology*, 10(4), 876-890.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Nuccio, S.-P., Haneda, T., Winter, M. G., Wilson, R. P., . . . Lawhon, S. D. (2009). Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection. *Infection and immunity*, 77(5), 1904-1916.
- Whistler, T., Sapchookul, P., McCormick, D.W., Sangwichian, O., Jorakate, P., Makprasert, S., Jatapai, . . . Koosakunwat, S. (2018). "Epidemiology and antimicrobial resistance of invasive non-typhoidal Salmonellosis in rural Thailand from 2006-2014." *PLoS neglected tropical diseases* 12(8): e0006718.
- World Health Organization (1988). Salmonellosis control: the role of animal and product hygiene, World Health Organization technical report series, 774,1-83.
- Wu, S., Li, Y., Xu, Y., Li, Q., Chu, Y., Huang, R., & Qin, Z. (2010). A *Salmonella enterica* serovar Typhi plasmid induces rapid and massive apoptosis in infected macrophages. *Cellular & molecular immunology*, 7(4), 271.
- Yoon, H., Ansong, C., Adkins, J. N., & Heffron, F. (2011). Discovery of *Salmonella* virulence factors translocated via outer membrane vesicles to murine macrophages. *Infection and immunity*, 79(6), 2182-2192.

- Zeng, H., Carlson, A. Q., Guo, Y., Yu, Y., Collier-Hyams, L. S., Madara, J. L., . . . Neish, A. S. (2003). Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *The Journal of Immunology*, 171(7), 3668-3674.
- Zhang, X.-L., Jeza, V. T., & Pan, Q. (2008). *Salmonella* Typhi: from a human pathogen to a vaccine vector. *Cellular & molecular immunology*, 5(2), 91.
- เกษตร, ก. ว. ระเบียบ กรม วิชาการ เกษตร ว่า ด้วย การ รับรอง ผลิต พีช ผล ตาม มาตรฐาน ระบบ การ จัดการ คุณภาพ การ ปฏิบัติ ทาง การเกษตร ที่ ดี สำหรับ พีช.
- จิรวัดณ์, อ. และ สายญาติ ส. (2559). การศึกษาสภาวะการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลาในวัตถุดิบอาหารสัตว์ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ไทย. *กรมปศุสัตว์*, 1-20.
- ชุติมา, ม. และ บัญญัติ ส. (2549). ระบาดวิทยาของ *Salmonella* ในเนื้อไก่สด. *NU Science Journal* , 2(2): 215 - 230.
- ไพศาล, ส. (2548). วิทยานิพนธ์คัมภีร์ สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริม กรุงเทพฯ.
- วิบูลย์, ว. ก. (2016). การ พยากรณ์ ปริมาณ การ ส่ง ออก เนื้อ ไก่ แซ่ แซ่ และ แซ่เย็น. *RMUTP Research Journal*, 10(1), 37-50.
- ลัดดา, ม. และ สมหมาย ย. (2552).การสำรวจความชุกของซัลโมเนลลาในโรงพักไข่และ การ ดื้อยา ด้านจุลชีพ, รายงานการประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น “สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้” ครั้งที่ 9 คณะสัตว แพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 307-312.
- สุมาลี, ล. (2561) ความชุกของเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากเนื้อสัตว์ค้าปลีก ในอำเภอเมือง จังหวัด นครศรีธรรมราช. *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 36(1), 72-85.
- อรุณ, บ. (2541). คู่มือประกอบการวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ การตรวจยืนยันแบคทีเรียก่อโรคลำไส้. *WHO national Salmonella and Shigella center กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*, 1-210.



ภาคผนวก



1.อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tryptic soy agar (TSA)

Tryptone	17.0 กรัม
Soytone	3.0 กรัม
Dextrose	2.5 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
K ₂ HPO ₄	2.5 กรัม
agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มล.

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. pH 7.3 และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2.อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB)

Tryptone	17.0 กรัม
Soytone	3.0 กรัม
Dextrose	2.5 กรัม
NaCl	5.0 กรัม
K ₂ HPO ₄	2.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มล.

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. จากนั้นผสมส่วนผสมจนเข้ากันดี ปรับ pH 7.3 และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3.อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มล.

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. จากนั้นผสมส่วนผสมจนเข้ากันดี ปรับ pH 7.0 และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

4.อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient broth (NB)

Beef extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มล.

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล จากนั้นผสมส่วนผสมจนเข้ากันดี ปรับ pH 7.0 และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข

บัพเพอร์และสารเคมี



1.สารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

NaCl	8.0 กรัม
KCl	0.2 กรัม
KH_2PO_4	0.2 กรัม
Na_2HPO_4	1.15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มล.

2.สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%

Skimmed milk	5.0 กรัม
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100 มล.
Merthiolate 1% (Sigma)	1 มล.
Tritin X-100 (Sigma)	0.1 มล.

3.Merthiolate ความเข้มข้น 1%

Thimerosal (Sigma)	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มล.

ภาคผนวก ค

สารเคมีที่ใช้ในการผลิตไฮบริโดมา



1.อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (RPMI medium)

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4 กรัม
D-glucose (Sigma)	3.6 กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923 กรัม
Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$) (Sigma)	1.1005 กรัม
Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	2.0160 กรัม
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid) (Sigma)	5.5925 กรัม
Penicillin G	20,000 units
Streptomycin G	200 มก.
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1,000 มล.

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. จากนั้นผสมส่วนผสมจนเข้ากันดี ทำ. ให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่าน sterilized Millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย Fetal bovine serum ความเข้มข้น 20%

RPMI medium (1)	80 มล.
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)	20 มล.
หรือ Bovine calf serum (BCS, Starrate, Australia)	
100 x HT supplement (Gibco BRL, USA)	1 มล.

3.อาหารคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT medium)

เม็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์ 1% ใน RPMI medium (1)	80 มล.
FBS RPMI medium (1)	20 มล.
100 x HT supplement RPMI medium (1)	1 มล.
50 x Aminopterin (Sigma) RPMI medium (1)	2 มล.

4.สารละลายเพื่อใช้ในการหลอมรวมเซลล์ (Polyethylene glycol ความเข้มข้น 40%)

Polyethylene glycol	5.0 กรัม
RPMI medium (1)	5 มล.

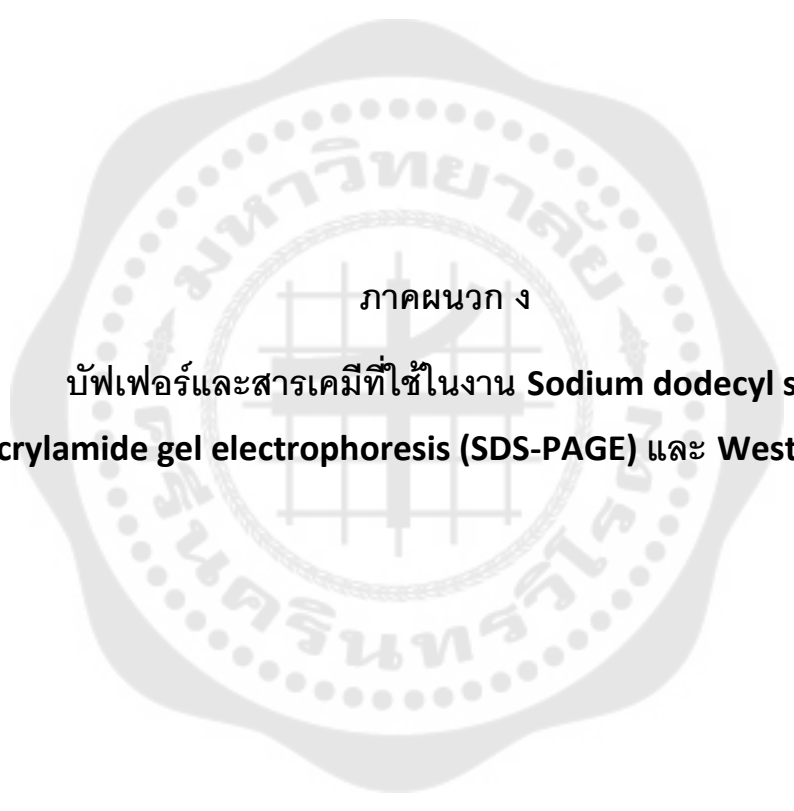
เติม RPMI medium (1) ลงใน Polyethylene glycol ที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้งาน

5.สารละลายเพื่อใช้ในการแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (Dimethylsulfoxide ความเข้มข้น 12%)

Dimethylsulfoxide (Sigma)	12 มล.
RPMI medium (1)	88 มล.

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้งาน





ภาคผนวก ง

บัฟเฟอร์และสารเคมีที่ใช้ในงาน Sodium dodecyl sulfate-
polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western blotting

1. Stock solution

1.1 สารละลายโมโนเมอร์ (30% T, 2.7% CBis)

Acrylamide	58.4 กรัม
N,N'-methylene-bis-acrylamide	1.6 กรัม
น้ำกลั่น	200 มล.

ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 4x running gel buffer (tris-HCl ความเข้มข้นความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	36.3 กรัม
น้ำกลั่น	200 มล.

1.3 4X Stacking gel buffer (tris-HCl ความเข้มข้นความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	3.0 กรัม
น้ำกลั่น	50 มล.

1.4 SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10%

Sodium dodecyl sulfate	50.0 กรัม
น้ำกลั่น	500 มล.

1.5 Ammonium persulfate (APS) ความเข้มข้นความเข้มข้น 10%

Ammonium persulfate	0.1 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 มล.

1.6 Running gel overlay

Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (1.2)	25 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	1 มล.
น้ำกลั่น	100 มล.

1.7 2x treatment buffer

Tris ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (1.3)	2.5 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	4 มล.
Glycerol	2 มล.
β -mercaptoethanol	1 มล.
น้ำกลั่น	0.5 มล.

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

2.1 การเตรียม separating gel สำหรับ SDS-PAGE 15% gel (15% T2.7% CBis)

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	15 มล.
Tris-HCl 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.3 มล.
น้ำกลั่น	0.75 มล.
Ammonium persulfate (APS)	
ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.5)	150 ไมโครลิตร
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	20 ไมโครลิตร

2.2 การเตรียม stacking gel สำหรับ SDS-PAGE 4% gel (4% T2.7% CBis)

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	2.66 มล.
Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	5.0 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.2 มล.
น้ำกลั่น	12.2 มล.
Ammonium persulfate (APS) ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.5)	100 ไมโครลิตร
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	10 ไมโครลิตร

ตาราง 1 ส่วนผสมพอลิอะครีลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel

ส่วนผสม	Separating gel	Stacking gel
	15% T, 2.7% C _{Bis}	4% T, 2.7% C _{Bis}
30% T, 2.7% C _{Bis}	15 มล.	2.66 มล.
Tris-HCl 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5 มล.	-
Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	-	5 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.3 มล.	0.2 มล.
น้ำกลั่น	6.75 มล.	12.2 มล.
ผสมและใช้ปั๊มสุญญากาศดึงอากาศออกจากสารละลาย		
Ammonium persulfate (APS) ความเข้มข้น 10% (1.5)	150 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
(TEMED)	20 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
ผสมและเทอย่างเร็วลงในช่องระหว่างกระจก		

3. Running buffer

3.1 SDS-PAGE Tank buffer

Tris	12.0 กรัม
Glycine	57.6 กรัม
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	40 มล.
น้ำกลั่น	4,000 มล.

4. สารละลายย้อมโปรตีน และล้างสีส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมโปรตีน (Coomassie blue)

4.1.1 Stain stock (สี Coomassie blue R-250 ความเข้มข้น 1%)

สี Coomassie blue R-250	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มล.

4.1.2 Stain (สี Coomassie blue R-250 ความเข้มข้น 0.01%)

Stain stock	50 มล.
Methanol	250 มล.
Acetic acid	50 มล.
น้ำกลั่น	500 มล.

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain)

4.2.1 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1

Methanol	550 มล.
Acetic acid	100 มล.
น้ำกลั่น	1000 มล.

4.2.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2

Methanol	50 มล.
Acetic acid	70 มล.
น้ำกลั่น	1000 มล.

ทำการย้อมเจลโดยถอดเจลออกจากกระຈก แฉ่งลงในสีย้อม Coomassie blue R-250 ความเข้มข้น 0.01% (4.1.2) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างสีส่วนเกินโดยนำเจลลงแช่ใน สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1 (4.2.1) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ย้ายเจลลงแช่ใน สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2 (4.2.2) จนสีพื้นของเจลใสปราศจากสี

5. Towbin transfer buffer pH 8.8 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Westernlotting

Tris	3.03 กรัม
Glycine	14.4 กรัม
Methanol	200 มล.
น้ำกลั่น	800 มล.

แช่บัฟเฟอร์ให้เย็นจัดก่อนนำไปใช้



ภาคผนวก จ

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบ **Iso**type และ **Subisotype** ของโมโนโคลนอล
แอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

- 1) Rabbit anti-Mouse IgG₁ (γ 1 chain specific)
- 2) Rabbit anti-Mouse IgG_{2a} (γ 2a chain specific)
- 3) Rabbit anti-Mouse IgG_{2b} (γ 2b chain specific)
- 4) Rabbit anti-Mouse IgG₃ (γ 3 chain specific)
- 5) Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
- 6) Rabbit anti-Mouse IgM (μ chain specific)
- 7) Rabbit anti-Mouse kappa light chain
- 8) Rabbit anti-Mouse lambda light chain
- 9) Normal Rabbit Serum (negative control)
- 10) Positive control, Monoclonal Mouse IgG₁ (Mouse IgG₁ ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10% FBS)
- 11) Substrate buffer, concentrated (10x) (1M citrate, pH 4.2, containing 0.03% H₂O₂)
- 12) ABTS substrate, concentrated (50x) (2,2-azino-di (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid))
- 13) Blocking solution, concentrated (50x) (25% BSA in PBS and 0.05% NaN₃)
- 14) HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), concentrated (50x)
- 15) Goat anti- Mouse IgGAM, concentrated (50x) (0.5 mg/ml in PBS containing 10% glycerol and 0.05% NaN₃)
- 16) 50% Tween 20



ภาคผนวก จ

บัฟเฟอร์และสารเคมีที่ใช้ในงาน Enzyme-linked immunosorbent assay
(ELISA)

1. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%

Skimmed milk	5.0 กรัม
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100 มล.
Merthiolate 1% (Sigma)	1 มล.
Tritin X-100 (Sigma)	0.1 มล.

2. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 0.5%

สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%	50 มล.
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	950 มล.

3. Citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5

Sodium citrate	29.41 กรัม
Merthiolate 1% (Sigma)	10 มล.
น้ำกลั่น	1000 มล.
ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N	

4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N

Sulfuric acid	27 มล.
น้ำกลั่น	1000 มล.

5 .O-Phenylenediamine (OPD)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ชลธิชา จินาพร
วัน เดือน ปี เกิด	2 เมษายน 2524
สถานที่เกิด	นครราชสีมา
วุฒิการศึกษา	วท.ม. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ที่อยู่ปัจจุบัน	160 ถ.มิตรภาพ ม.1 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
ผลงานตีพิมพ์	Development of monoclonal antibodies for the rapid detection and identification of Salmonella enterica serovar Enteritidis in food sample using dot-blot assays. (2020). Journal of Food Safety
รางวัลที่ได้รับ	รางวัลคุณภาพระดับ 4 ดาว การประกวดข้อเสนอและสิ่งประดิษฐ์นวัตกรรม จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.)



