บทที่ 5
สรุปวิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการผลิตแอนติซีรั่ม ต่อเชื้อ *Salmonella* เพื่อตรวจติดตามเชื้อจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ปนเปื้อนมากับตัวอย่างอาหารหรือ น้ำดื่ม ผลการทดลองพบว่า การใช้ antibody ทดสอบวิธี dot blotting ผลการทดลองพบว่า ผลการใช้ antibody ในการตรวจติดตามในการพัฒนาการตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยใช้ Anti-Salmonella O polyvalent A-I และ Anti-Salmonella O group B พบว่า แอนติบอดีจับกับเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ที่ปริมาณโปรตีน 0.015625 ไมโครกรัม และ 0.00049 ไมโครกรัม แต่ก็มี cross reactivity อยู่บ้างต่อ *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. coli* ATCC 8738, *E. coli* DMST 4212, *E. coli* ATTC 25922, *E. coli* 0157 H :7 และ *Vibrio* spp. และมี cross reactivity สูงมากต่อ *S. aureus*, และ *S. aureus* ATCC 1466 เนื่องมาจากการจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella* เป็น serotype ต่างๆนั้นอาศัยสมบัติของแอนติเจนทั้ง O และ H แอนติเจน ซึ่ง O แอนติเจน ของ *Salmonella* จะคล้ายกับ O แอนติเจนของสมาชิกอื่นในตระกูล Enterobacteriaceae แต่ H แอนติเจนจะแตกต่างออกไปเพราะมี 2 เฟส คือ เฟส 1 และ เฟส 2 และจากโครงสร้างทางแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* บริเวณ O แอนติเจน เป็นแอนติเจนของพอลิแซ็คคาร์ไรด์ที่ ผิวเมม-เบรนชั้นนอก และทนความร้อนได้ O แอนติเจนแบ่งเป็นหมายเลข 1 ถึง 67 และอาศัย O แอนติเจนในการจัดออกเป็น group ตั้งแต่group A ถึง group Z ส่วน H แอนติเจน เป็นเอนติเจนของแฟลกเจลลาโปรตีน ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ไม่ทนความร้อน มี 2 เฟส คือ เฟส 1 แอนติเจน เป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละสปีชีส์ ใช้อักษรตัวเล็ก a – z ส่วนเฟส 2 แอนติเจน กำหนดด้วยหมายเลข โดยอาศัยคุณสมบัติของ H แอนติเจนทำให้แบ่ง *Salmonella* ออกเป็น serotypes ต่างๆ ได้ นอกจากนี้ยังมี Vi แอนติเจน ซึ่งแสดงความรุนแรงของเชื้อ แอนติเจนนี้เป็นแอนติเจนของแคปซูล ซึ่งจะทำลายด้วยความร้อน 100 องศาเซลเซียส Vi แอนติเจนพบใน *S. typhi* และเชื้อ serotypes อื่นเล็กน้อย (นงลักษณ์, 2547) ดังนั้นการจับกันทางโครงสร้างของ Anti-Salmonella O polyvalent A-I คือ *Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum, Poly A-I and Vi (poly O antiserum) ที่สามารถจับกับ O แอนติเจนที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 22, 23, 24, 25, 34, และ เฟส 1 แอนติเจน เป็นลักษณะจำเพาะของสปีชีส์คือ A, B, C1, C2, D, E1, E2, E3, E4, F, G1, G2, H, I และ Vi ในการจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella* มีความซับซ้อนมาก โดยสมบัติของแอนติเจนซึ่งเป็นหลักการของ Kauffmann และ

White แบ่ง *Salmonella* ได้มากกว่า 2000 serotypes ส่วน Ewing และคณะ แบ่ง *Salmonella* เป็น 3 สปีชีส์ คือ *Salmonella cholerae – suls* , *Salmonella enteritidis* และ *S. typhi*

แต่อย่างไรก็ตาม พบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. aureus* สูงมาก อาจเป็นเพราะคุณสมบัติทางโครงสร้างที่ผิวเซลล์ ทำหน้าที่เป็นกระบวนการฟาโกไซซิส (phagocytosis) ทำให้เชื้อได้เปรียบโฮสต์ เชื้อ *Staphylococcus* ที่มีแคปซูล (capsule) และยังประกอบไปด้วยกรดไทรโคอิก (teichoic acid) เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ฟอสเฟตจับกับเพปติโนไกลแคน (peptidogycan) และเยื่อหุ้มเซลล์ พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความจำเพาะกับของเชื้อ *S. aureus* กรดไทโคอิคจะเป็นบิลทอล (ribiol) จับกับเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน (n-acetyl glucosamine) เรียกกว่า พอลิแซ็กคาไรด์เอ (polysaccharide A) และยังประกอบไปด้วย โปรตีนเอ (protein A) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อ *S. aureus* โปรตีนเอยึดติดกับชั้นเพปติโนไกลแคน (peptidogycan) ด้วยพันธะโควาเลนต์ องค์ประกอบนี้จะจับกับส่วน Fc ของ Ig G1, Ig G2 และ Ig G4 จึงสามารถกับ Anti-Salmonella O polyvalent A-I คือ *Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum, Poly A-I and Vi (poly O antiserum) ได้อย่างเด่นชัด ทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อ *S. aureus* กับเชื้อ *S. typhi, S. typhi* B, *S. typhimurium*, *S. paratyphi* B, และ *S. enteritidis* ได้ในการทดสอบด้วยเทคนิค western immunoblotting และเกิดการ cross reaction กับเชื้ออื่น ๆ อยู่บ้าง เช่น *E. coli* หลาย strain *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* นั้นพบว่าโครงสร้างทางแอนติเจนของ *E. coli* หลาย strain เป็นเพราะ *E. coli* จับเป็นหนึ่งในตระกูล Enterobacteriaceae เหมือนกับ *Salmonella* ทำให้มีลักษณะของ O แอนติเจน เป็นแอนติเจนของพอลิแซ็คคาร์ไรด์ที่ผิวเมมเบรนชั้นนอก ทำให้เกิดการจับกันในบางส่วนของโปรตีนของ *E. coli* อยู่บ้าง แต่จากผลการทดลองด้วยเทคนิค dot blotting ก็สามารถแยกเชื้อ *Salmonella* ออกจาก *E. coli*, *E. coli* ATCC 8738, *E. coli* DMST 4212, *E. coli* ATCC 25922, และ *E. coli* 0157 H:7 ออกจากกันอย่างเห็นได้ชัดเจน

ส่วนเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียในตระกูล Vibrionaceae มีรูปร่างเป็นแท่งงอคล้ายกล้วยหอม มี flagella ที่ปลาย 1 เส้นที่ตัว เชื้อมีโซมาติกแอนติเจน (somatic antigen) หรือ O แอนติเจน ส่วนที่แฟลกเจลลา มีแฟลกเจลลา แอนติเจน (flagella antigen) หรือ H แอนติเจนและ O แอนติเจน เป็นสารที่ทนความร้อน ส่วน H แอนติเจน ไม่ทนความร้อน พบว่า classical และ El Tor vibrio จัดเป็น O แอนติเจน กรุ๊ป 1 ปัจจุบันจึงเรียกว่า *V. Cholerae* O1

O แอนติเจน ที่สำคัญมี 3 ชนิด คือ A, B หรือ C โดยที่ A เป็นกรุ๊ปสเปกซิฟิก โอแอนติเจน (group specific O antigen) ซึ่งมีใน vibrio กรุ๊ป 1 ทุกตัว ส่วน B และ C เป็นทัยป์สเปกซิฟิก O แอนติเจน (type specific O antigen) ทำให้ไม่เกิดการจับกันของ Anti-Salmonella O polyvalent A-I

โดย O แอนติเจน เป็นแอนติเจนของพอลิแซ็คคาร์ไรด์ที่ผิวเมมเบรนชั้นนอก และทนความร้อนได้ ส่วน O แอนติเจน เป็นสารที่ทนความร้อน ส่วน H แอนติเจน ไม่ทนความร้อน ส่วนเชื้อ *B. cereus, B. subtilis, C. perfringens* และ *P. aeruginosa* จัดเป็นแบคทีเรียในคนละตระกูลกับเชื้อ *Salmonella* และส่วนมากยังไม่พบการปนเปื้อน ในการตรวจวิเคราะห์ ทั้งลักษณ์ภายนอกทางโครงสร้าง colony ที่ขึ้นบนอาหารมีลักษณะที่แตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเลี้ยงบนอาหารเฉพาะของแต่ละเชื้อแบคทีเรีย

เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการจับกันของ Anti-Salmonella group B กับโปรตีนจากเชื้อ *Salmonella* และเชื้อต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting แอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนของเชื้อ *S. typhi, S. typhi* B และ *S. typhimurium* ได้ โดยปรากฏ spot แต่พบ cross reaction ของแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. aureus* จากผลการทดลอง น่าจะพอคาดได้ว่า Salmonella Strip ที่จะพัฒนาขึ้นจากการใช้ Anti-Salmonella group B นี้ อาจใช้ตรวจแยกจากเชื้อ *Staphylococcus* ไม่ได้เลย

จากการทดสอบ mouse anti-salmonella antibody แอนติบดีได้นำแอนติบอดีทั้ง 3 ช่วงมารวมกัน เนื่องจากนำมาทดสอบต่อโปรตีนของเชื้อ *S. typhi, S. typhi* B, *S. typhimurium*, *S. paratyphi* B, *S. enteritidis* ที่ปริมาณโปรตีน 1 ไมโครกรัม และ mouse anti-salmonella antibody เกิดการ cross reactivity กับเชื้อ *E. coli* , *E. coli* ATCC 8738, *E. coli* DMST 4212, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 0157 H:7, *Staphylococcus aureus, S. aureus* ATCC 1466, *Bacillus subtilis, B. cereus, V. parahaemolyticus, V. cholerae, Clostridium perfringen* และ *P. aeruginosa* ด้วยเทคนิค western immunoblotting แล้วทำการทดสอบด้วยการหาปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมของเชื้อ *Salmonella* คือ 0.015625 ไมโครกรัม ทำการบ่มด้วย mouse anti-salmonella antibody จากผลทดสอบการจับของแอนติบอต่อเชื้อทั้งหมด 18 ชนิด โดยรูปจะแสดงให้เห็นการจับกันของเชื้อแต่ละชนิดอย่างเห็นได้ชัดเจน การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี western immunoblotting และ Dot blotting เกิดการจับกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ อีก ด้วยทำให้ anti-salmonella ที่เราผลิตขึ้นยังใช้งานไม่ดีพอ จึงเปลี่ยนมาใช้แอนติบดี จากการใช้โปรตีนของเชื้อ *Salmonella* ที่เป็นบริเวณเป็นแอนติเจนของพอลิแซ็คคาร์ไรด์ที่ผิวเมมเบรนชั้นนอก บริเวณที่มี flagella ที่ 37 kDa ที่ปริมาณโปรตีน (Begum *et al.*, 2008) จากการทดสอบการใช้มีโปรตีนที่บริเวณนี้เนื่องจากมีคุณสมบัติในการจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella* ที่แสดงออด คือเป็นโปรตีน O แอนติเจน เป็นแอนติเจนของพอลิแซ็คคาร์ไรด์ที่ผิวเมมเบรนชั้นนอก โดยมีความจำเพาะต่อ IgG และ IgA (M.E. Sbrogio-Almeida [a],*, L.C.S. Ferreira [b]2001) ในการจำแนกเชื้อ *Salmonella* ออกจากเชื้อตัวอื่น

การพัฒนาการใช้ แอนติบซีรั่มที่ผลิตขึ้น โดยใช้ Mouse anti-salmonella antibody 37 Kb ต่อเชื้อ Salmonella พบว่า แอนติบอดีจับกับเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ ปริมาณโปรตีน 0.1 ไมโครกรัม

หลังจากนั้น ไม่อาจนำมาใช้ในการพัฒนาตรวจเชื้อ *Salmonella* ได้ เพราะมี cross reactivity กับเชื้อ *S. aureus* , *E. coli* และ *Vibrio* spp. ได้ แต่ก็สามารถใช้แยกออกจากเชื้อ *Bacillus* spp., *C. perfringens*.,และ *P. aeruginosa* ได้บ้าง

การพัฒนาการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วย DNA strip โดยใช้ Sal1 probe gyrase B gene (TCCGGTGGTC TGCACGGGGT GGGC GTCTCG GTAGTCAACG CTCTGTCGCA) มาใช้ในการตรวจด้วยวิธี DNA hybridization พบว่า Sal1 probe สามารถจับกับเชื้อ *S. typhi*, *S. typhi* B, *S. typhimurium*, *S. paratyphi* B, และ *S. enteritidis* จากการทดสอบกับ *Salmonella sp.* ได้ที่ปริมาณ DNA 1 ไมโครกรัม สามารถแยกตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* spp. ออกจากตัวเนื้อหมู ตัวอย่างเนื้อวัว และตัวอย่างเนื้อไก่ที่ปนเปื้อนได้

จากการนำลำดับเบสข้างต้นไปเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ต่างๆ โดยมีค่า max score = 99.6 ได้แก่ *Salmonella enteritidis, Salmonella enterica, Salmonella paratyphi, Salmonella typhimurium* และ *Salmonella choleraesuis* ซึ่งเมื่อนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากแบคทีเรีย พบว่ามีจำนวน max score < 36.2 จากกานำ probe มาใช้ทดสอบการแยกเชื้อ *Salmonella* ออกจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นมีการใช้ DNA probes specific for *Salmonella* spp. (Ivor *et al.*, 1990) และการพัฒนาการใช้ DNA probes คือ DNA probe (5'-GCAGACACTGGACAATGG-3') มาแยกโดยใช้เทคนิคทางด้าน colony hybridization สามารถแยกเชื้อ *Salmonella* ได้ถึง 129 isolates (Hanes *et al.*, 1995)

จากการนำมาทดสอบ แสดงว่าการนำ Sal1 probe มาแยกตัวอย่างอาหาร เพื่อเป็นการยืนยันโดยใช้เทคนิค DNA hybridization มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* ในการแยกตัวอย่างที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ออกจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ อาจเป็นแนวทางเบื้องต้นในการพัฒนาชุดตรวจเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำต่อไป