



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

สาขา

จุลชีววิทยา

ภาควิชา

เรื่อง การตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหาร ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้
โพลีโคลนอลแอนติบอดี

Detection of *Staphylococcus aureus* in Foods by dot-ELISA Technique using
Polyclonal Antibody

نامผู้วิจัย นางสาวภัทรพร ทองไทย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พัชรี สุนทรนนท์, ปร.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ร.อ. ชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร.อ. ชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหาร ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้
โพลีโคลนอลแอนติบอดี

Detection of *Staphylococcus aureus* in Foods by dot-ELISA Technique using
Polyclonal Antibody

โดย

นางสาวกัทรพร ทองไทย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อขอความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2552

ภัทรพร ทองไทย 2552: การตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหาร ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พัชร สุทรนนท์, ประ.ด.
105 หน้า

เชื้อ *Staphylococcus aureus* สามารถก่อโรคในคนได้หลายโรครวมทั้งโรคอาหารเป็นพิษ เชื้อสร้างเอนไซม์และสารพิษได้หลายชนิดและสร้างโปรตีน เอ ที่ผนังเซลล์ เป็นแอนติเจนที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้การตรวจเชื้อได้มักพบเชื้อปนเปื้อนในอาหารดิบและอาหารปรุงสำเร็จ การตรวจเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาใช้เวลาหลายวัน แต่การตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยาจะใช้เวลาน้อยกว่า การตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้ จะใช้วิธี dot-ELISA โดยใช้ โพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งผลิตในกระต่ายด้วยการฉีดเชื้อ *Staph. aureus* และ Protein A แล้วเจาะเลือดกระต่ายเพื่อแยกแอนติซีรัม จากนั้นจึงนำไปเตรียม Immunoglobulin G (IgG) บริสุทธิ์โดยใช้วิธี affinity chromatography ตรวจหาความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE และตรวจหาปริมาณโปรตีนของ IgG บริสุทธิ์จากเชื้อ *Staph. aureus* ทั้งเซลล์และ Protein A ได้ในปริมาณ 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 18.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แล้วนำ IgG บริสุทธิ์ทั้งสองชนิดไปตรวจเชื้อ *Staph. aureus* ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ปริมาณ IgG ที่เหมาะสมคือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ conjugate ที่ความเจือจาง 1:5,000 ซึ่งตรวจพบเชื้อได้ที่ 10^3 CFU/ml

เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับ *Staph. aureus* ชนิดอื่นและแบคทีเรียกลุ่ม enteric จึงใช้อาหาร Baird-Parker broth เพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อส่งเสริมการเจริญและคัดแยกเชื้อ *Staph. aureus* แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่มอื่นได้ดีพบว่าสามารถกำจัดปฏิกิริยาข้ามได้ เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธี dot-ELISA และสามารถตรวจพบเชื้อ *Staph. aureus* ในจำนวนเท่าเดิม คือ ที่ 10^3 CFU/ml

การนำวิธีนี้มาตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Baird-Parker broth ก่อนตรวจด้วยวิธี dot-ELISA แล้วเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่าให้ผลการตรวจพบเชื้อเหมือนกันแต่ใช้เวลาน้อยกว่าโดยใช้เพียง 30 ชั่วโมงขณะที่วิธีมาตรฐานใช้เวลาประมาณ 5-6 วัน วิธีการตรวจที่ง่ายกว่าใช้สารทดสอบในปริมาณน้อย จึงจัดเป็นวิธีที่มีความสะดวกรวดเร็วและน่าจะเป็นทางเลือกที่ดี อีกทางหนึ่งในการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่างอาหารและตัวอย่างน้ำบริโภค

Pattaraporn Thongthai 2009: Detection of *Staphylococcus aureus* in Foods by dot-ELISA Technique using Polyclonal Antibody. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor Patcharee Sunthornandh, Ph.D. 105 pages.

Staphylococcus aureus can cause many kinds of disease include food poisoning in raw and ready-to-eat foods. It can produce enzymes, toxins and contain protein A at the cell wall which is the surface antigen using for indicate the present of this bacteria in any samples. Detection of *Staph. aureus* by conventional microbiological method take much more time than immunological method. The immunological method by dot-ELISA was developed by using polyclonal antibody; produced from rabbit injected by whole cell of *Staph. aureus* and purified protein A. Antibodies (IgG) were purified by using affinity chromatography and purity were characterized by SDS-PAGE. Amount of purified IgG from whole cell of *Staph. aureus* and purified protein A were 0.58 mg/ml and 18.96 mg/ml, respectively. Both of purified IgG were used to detect *Staph. aureus* by dot-ELISA at the optimum concentration of 50 µg/ml and the optimum conjugate of 1:5,000, which could detect *Staph. aureus* at 10^3 CFU/ml.

The cross reaction with other *Staphylococcus* and enteric bacteria were eliminated by using Baird-Parker broth for enrich and selection of *Staph. aureus* and followed by same condition of dot-ELISA. This technique can be detected *Staph. aureus* at 10^3 CFU/ml, the same result as mention before.

Dot-ELISA technique was used for detection of *Staph. aureus* in food sample by inoculated the food samples in selective Baird-Parker broth for 24 hours, then followed by dot-ELISA. It revealed the same result when compared with conventional method, but detection by dot-ELISA include cultured in selective broth took only 30 hours, shorter than conventional method which took about 5-6 days. This method was easy and less amount of reagent was used, high sensitivity and might be a good option for detection of *Staph. aureus* in food and water.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พัชรี สุนทรนนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล กรรมการที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอน และมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ต่อไป และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ด้วยดี ในการจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอกราบขอบพระคุณหัวหน้าฝ่ายชุดทดสอบและฝ่ายพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ทางการแพทย์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุขทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการค้นคว้าวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้ อบรมและให้กำลังใจ ชี้นำและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายขอขอบคุณความดีและประโยชน์ที่พึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ แก่บิดา มารดา และคณาจารย์ผู้ประสทาวิชาความรู้ทุกท่านตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ภัทรพร ทองไทย

กันยายน 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	68
สรุป	68
ข้อเสนอแนะ	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	80
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	81
ภาคผนวก ข การเตรียมบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้ใน dot-ELISA	86
ภาคผนวก ค การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี	89
ภาคผนวก ง การเตรียมสารสำหรับทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ และการตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE	92
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	98
ภาคผนวก ฉ ภาพการทำ dot-ELISA	102
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	105

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลักษณะเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ <i>Staphylococcal</i>	14
2	แสดงวิธีการตรวจหาเชื้อ <i>Staph. aureus</i> โดยใช้ kit test	24
3	แสดงวิธีการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ <i>Staph. aureus</i> โดยใช้ kit test	25
4	การนับจำนวนเชื้อโดยวิธี dilution plate count โดยใช้เชื้อจากการเตรียมแอนติเจน ที่วัด OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1	45
5	แสดงผลการทดสอบหาความจำเพาะของ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ <i>Staph. aureus</i> และต่อโปรตีนเอ	46
6	แสดงผลการทดสอบปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม	47
7	แสดงผลการทดสอบปริมาณ conjugate ที่เหมาะสม	48
8	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti-protein A (IgG บริสุทธิ์) ต่อเชื้อ <i>Staphylococcus</i> สายพันธุ์อื่น	49
9	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti- <i>Staph. aureus</i> (IgG บริสุทธิ์) ต่อเชื้อ <i>Staphylococcus</i> สายพันธุ์อื่น	49
10	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti-protein A (IgG บริสุทธิ์) ต่อแบคทีเรียกลุ่ม non- <i>Staphylococcal</i> ในกลุ่ม enterobacteriaceae	51
11	แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti- <i>Staph. aureus</i> (IgG บริสุทธิ์) ต่อแบคทีเรียกลุ่ม non- <i>Staphylococcal</i> ในกลุ่ม enterobacteriaceae	52
12	แสดงการเจริญของเชื้อทดสอบในอาหาร Baird-Parker broth ที่บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	54
13	แสดงผลการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ anti-protein A ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	55
14	แสดงผลการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ anti- <i>Staph. aureus</i> ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อน (artificial contaminated food) โดยใช้ IgG ต่อ anti-protein A	59
16	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อน (artificial contaminated food) โดยใช้ IgG ต่อ anti- <i>Staph. aureus</i>	61
17	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิดจากแหล่งขาย เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา	63
18	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิดจากแหล่งขาย เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา	65
19	แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหาร TSB ที่มีปริมาณ NaCl แตกต่าง	69
ตารางผนวกที่		
ก1	การนับกระดุนสัตว์ทดลองด้วยเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ทั้งเซลล์	90
ก2	การนับกระดุนสัตว์ทดลองด้วย recombinant protein A	91
จ1	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ ตัวอย่าง	101
ฉ1	แสดงผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่วัด OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ	103
ฉ2	แสดงผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่วัด OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ <i>Staph. aureus</i>	104

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะโครงสร้างของเชื้อ <i>Staph. aureus</i>	6
2	แสดงผลการ load ตัวอย่างผ่าน affinity column ด้วยวิธี affinity chromatography	42
3	แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG โดยการทำ SDS-PAGE	43
4	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti-protein A และ anti- <i>Staph. aureus</i> (IgG บริสุทธิ์) ต่อแบคทีเรียกลุ่ม <i>Staphylococcus</i>	50
5	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti-protein A และ anti- <i>Staph. aureus</i> (IgG บริสุทธิ์) ต่อแบคทีเรียกลุ่ม non- <i>Staphylococcal</i> ในกลุ่ม <i>enterobacteriaceae</i>	52
6	แสดงผลการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ anti-protein A ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	56
7	แสดงผลการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ anti- <i>Staph. aureus</i> ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	58
8	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อน (artificial contaminated food) โดยใช้ IgG ต่อ anti-protein A	60
9	แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อน (artificial contaminated food) โดยใช้ IgG ต่อ anti- <i>Staph. aureus</i>	62
10	แสดงผลการทำ dot-ELISA ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหาร TSB ที่มีปริมาณ NaCl แตกต่างกัน	70
ภาพผนวกที่		
จ1	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของโปรตีนมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	101

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IgG	=	Immunoglobulin G
CFU	=	Colony forming unit
SDS-PAGE	=	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

การตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหาร ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ โพลีโคลนอลแอนติบอดี

Detection of *Staphylococcus aureus* in Foods by dot-ELISA Technique using Polyclonal Antibody

คำนำ

เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก อยู่เป็นกลุ่ม ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ แบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์และสารพิษได้หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่มีผลในการก่อโรคร่วมกับโฮสต์ทั้งสิ้น สารพิษที่มีผลในการก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ได้แก่ Staphylococcal enterotoxin (SE) ซึ่งมีอยู่ 12 ชนิด คือ SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ (Balaban and Rasooly, 2000), SEK (Orwin *et al.*, 2001), SEL, SEM, SEN และ SEO (Zahoor and Bhatia, 2007) เชื้อนี้ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและโรคอื่นๆ อีกหลายอย่าง แพร่กระจายได้ง่าย นอกจากนี้ เชื้อ *Staph. aureus* มากกว่าร้อยละ 99 ยังสร้างสารโปรตีน เอ (Huang *et al.*, 2007) ซึ่งมีลักษณะเป็นแอนติเจนและสามารถใช้เป็นสารบ่งชี้ในการตรวจหาเชื้อที่ปนเปื้อนมาในอาหารได้

จากข้อกำหนดของการควบคุมคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยา ที่กำหนดไว้ว่าอาหารที่มีสัญลักษณ์ที่ดี จะต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Salmonella sp.* *Vibrio sp.* เป็นต้น รวมทั้ง *Staph. aureus* ด้วย ในบทเพิ่มเติมท้ายพระราชบัญญัติอาหารของปี พ.ศ.2552 มีข้อกำหนดให้อาหารเกือบทุกประเภทจะต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่างอาหาร 0.1 กรัม ถ้าเป็นประเภทเครื่องดื่มนั้นต้องตรวจไม่พบเชื้อใน 0.1 มิลลิลิตร จึงจำเป็นต้องมีการตรวจและควบคุมจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหาร ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร (พัชร, 2552)

ในการตรวจเชื้อ *Staph. aureus* ส่วนใหญ่ที่ปฏิบัติกันอยู่ คือ แยกเชื้อจากอาหารโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อประเภท selective media เมื่อตรวจแยกได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจำแนกชนิดของเชื้อโดยทดสอบทางชีวเคมีซึ่งจะใช้เวลาหลายวันและถ้าสงสัยว่าเชื้อที่แยกได้อาจเป็นสาเหตุของ staphylococcal food poisoning จะต้องตรวจหาแอนติเจนที่ก่อพิษ ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีการ

ทางอิมมูโนวิทยาที่มีความไวสูงและใช้เวลาน้อยในการทดสอบ ซึ่งในปัจจุบันมีผู้พัฒนาวิธีการตรวจเอนเทอโรท็อกซินโดยวิธี Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) ซึ่งเป็นการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินชนิดต่างๆ ในอาหาร โดยตรวจผลจากปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (agglutination) ของเม็ด latex ซึ่งเป็นวิธีที่มีหลายขั้นตอน

ดังนั้นจึงก่อให้เกิดแนวความคิดในการตรวจหาเชื้อโดยตรง ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยาที่มีความจำเพาะต่อตัวเชื้อโดยตรงซึ่งใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าการตรวจเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา จากการที่เชื้อ *Staph. aureus* มากกว่าร้อยละ 99 สร้างสารโปรตีน เอ (Huang *et al.*, 2007) ซึ่งมีลักษณะเป็นแอนติเจนและสามารถใช้เป็นสารบ่งชี้ในการตรวจหาเชื้อที่ปนเปื้อนมาในอาหารได้ โปรตีน เอ เป็นแอนติเจนที่สามารถนำมากระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Staph. aureus* แล้วนำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน เอ ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ได้ รวมทั้งนำไปใช้ ในการตรวจหาเชื้อที่ปนเปื้อนมากับอาหารได้ด้วย โพลีโคลนอลแอนติบอดี มีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะกับ epitope หลายตำแหน่งบนโมเลกุลแอนติเจน

ในปัจจุบันการตรวจเชื้อ *Staph. aureus* รวมทั้งการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อโดยอาศัยวิธีทางอิมมูโนวิทยา เป็นที่นิยมตรวจกันมาก (ภานุกิจ, 2546; Cliver and Riemann, 2002; Huang *et al.*, 2007) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง มีความไวในการตรวจ รวมทั้งใช้เวลาสั้นกว่าวิธีการทางจุลชีววิทยา วิธี dot-ELISA เป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่ง ซึ่งนอกจาก จะมีข้อดีดังกล่าวแล้วยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และใช้สารในการทดสอบในปริมาณที่น้อยมาก

วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และต่อโปรตีน เอ และเตรียมให้ได้เป็น IgG บริสุทธิ์
2. เพื่อนำ IgG บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ในข้อ 1 ไปพัฒนาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ด้วยวิธี dot-ELISA
3. ตรวจสอบหาสถานะที่เหมาะสม ในการทำ dot-ELISA เพื่อนำไปใช้ในการตรวจเชื้อ *Staph. aureus*
4. นำวิธีที่ทดลองแล้วและสถานะที่เหมาะสมในข้อ 3 ไปใช้ในการตรวจเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอาหารที่เตรียมขึ้น (artificial contaminated food sample) และ ตัวอย่างอาหารที่สุ่มเก็บจากแหล่งต่างๆ

การตรวจเอกสาร

เชื้อ *Staphylococcus*

ลักษณะทั่วไป

เชื้อ *Staphylococcus* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกใน Family Micrococcaceae ซึ่งสมาชิกในตระกูลนี้เป็นแบคทีเรียพวก aerobe/facultative anaerobe รูปร่างกลมติดสี่แกรมบวก สร้างเอนไซม์ catalase ประกอบด้วยเชื้อ 4 genera ได้แก่ *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* และ *Planococcus* (Baron *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1994)

เชื้อ *Staphylococcus* มีด้วยกันอย่างน้อย 31 สปีชีส์ บางสปีชีส์ก่อโรคในคน บางสปีชีส์ก่อโรคในสัตว์และเป็น normal flora อยู่บริเวณส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ใบน้ํา (Arvola *et al.*, 2006), ระบบทางเดินหายใจส่วนบน (Smith *et al.*, 2001) ผิวหนัง จมูก มือ ลำไส้ และช่องคลอด เป็นต้น สปีชีส์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ มี 3 สปีชีส์ คือ *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis* และ *Staph. saprophyticus* โดยเฉพาะเชื้อ *Staph. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคในคนได้มากที่สุด (เพ็ญฟ้า, 2542)

Staph. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม อยู่เป็นกลุ่ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่มักจะมีการเรียงตัวคล้ายพวงองุ่น (grape like cluster) แต่บางครั้งอาจพบว่าการเรียงตัวเป็นสายเดี่ยวๆ เป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีแฟลกเจลลา และไม่สร้างสปอร์ (Murray *et al.*, 1994, 1998)

ลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ส่วนประกอบของผนังเซลล์และโครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน

- แคปซูล (capsule) เชื้อ *Staph. aureus* บางสายพันธุ์สร้างแคปซูล ซึ่งประกอบด้วย glucosaminuronic acid เป็นโครงสร้างที่หุ้มอยู่ชั้นนอกสุดของเซลล์ การสร้างแคปซูลของเชื้อมัก

เกิดขึ้นในเซลล์สิ่งมีชีวิต แล้วมักสูญเสียความสามารถในการสร้างไปเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

- แอดฮีซิน (Adhesins) เป็นโปรตีนอยู่ที่ผนังเซลล์ช่วยให้เชื้อสามารถเกาะติดกับ laminin, fibronectin หรือ collagen ซึ่งจะทำให้เชื้อมีความสามารถในการยึดเกาะ (colonization) บนพื้นผิวอวัยวะในผู้ป่วย หรือช่วยในการต่อต้านการจับกินของเม็ดเลือดขาวและเกี่ยวข้องกับการบุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อของโฮสต์

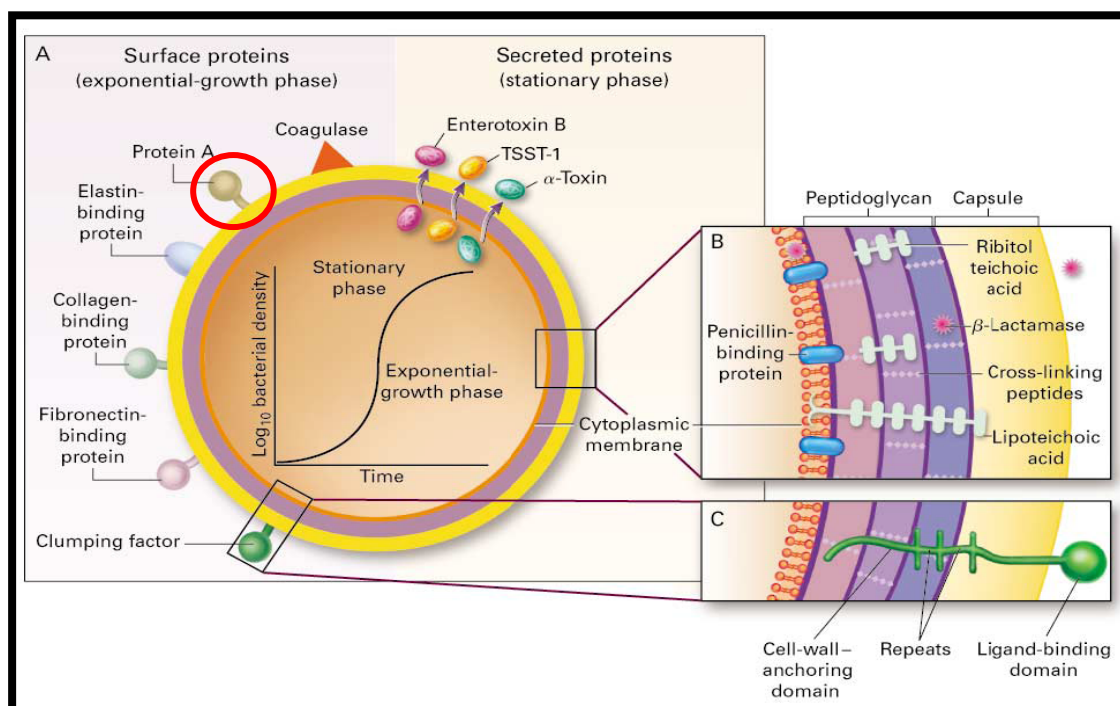
- โพลีแซ็กคาไรด์ เอ (polysaccharide A) เป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อ *Staph. aureus* ซึ่งประกอบด้วย ribitol teichoic acid โดยมี N-acetyl glucosamine เกาะติดที่ตำแหน่ง C-4 ของ ribitol และ 50% ของ D- alanine ที่ตำแหน่ง C-2 โดยที่ antigenic determinant อยู่ที่ glucosamine residue ซึ่งอาจจะเป็น alpha หรือ beta-glucosidic linkage

- กรดไทเทอิก (teichoic acid) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยฟอสเฟตชนิดจำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อ *Staph. aureus* ที่มี polysaccharide A (ribitol- teichoic acid จับกับ N- acetylglucosamine)

- เอนไซม์โคแอกกูเลซชนิดติดกับเซลล์ (clumping factor หรือ bound coagulase) เข้าใจกันว่า clumping factor นี้เป็น coagulase ที่อยู่บนผิวเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus*. สายพันธุ์ที่ไม่สร้างแคปซูลส่วนใหญ่จะจับกลุ่มกัน เมื่อผสมพลาสมาหรือสารละลายที่มีไฟบริโนเจน (fibrinogen) (Murray *et al.*, 1994, 1998)

- โปรตีน เอ (protein A) มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน เป็นโปรตีนที่อยู่บนผนังเซลล์ของ *Staph. aureus* โปรตีนนี้ส่วนใหญ่จะเชื่อมต่อกับชั้น peptidoglycan บางส่วนอาจถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 42 KDa สามารถจับกับส่วน Fc ของ IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกสายพันธุ์ (Larsson and Sjoquist, 1989) ตามปกติมักพบโปรตีน เอ ใน *Staph. aureus* สายพันธุ์ที่อยู่ในคน สำหรับสายพันธุ์ในโคและกระบือพบน้อย (Easmon and Goodfellow, 1990) โปรตีน เอ ทนความร้อนได้สูงมาก สามารถสกัดออกจากเซลล์โดยการต้มเชื้อใน phosphate buffer pH 5.9 ให้เดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Forsgren and Sjoquist, 1968) หรือสามารถสกัดออกโดยต้มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่ให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที (Archibad,

1972) โปรตีน เอ ทำให้เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของ *Staph. aureus* ทุกสายพันธุ์ในน้ำเหลืองคนปกติ เพราะโปรตีน เอ สามารถจับกับส่วน Fc ของ IgG ในน้ำเหลืองแบบไม่จำเพาะเจาะจง โปรตีน เอ ทำปฏิกิริยาแบบนี้กับ IgG ของหนูตะเภาและหนูเม้าส์แต่เกิดปฏิกิริยาเล็กน้อยกับ IgG ของกระต่าย ในน้ำเหลืองของคนจะเกาะติดกับบาง subclass ของ IgG คือ IgG₁, IgG₂ และ IgG₄



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างของเชื้อ *Staph. aureus*

ที่มา: Franklin and Lowy (1998)

โปรตีน เอ ทำให้เกิดผลทางชีวภาพได้หลายประการ เช่น

- เกิดภาวะภูมิไวเกินแบบ anaphylaxis ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อแบบเฉพาะที่และทั่วร่างกายในสัตว์
- เกิดตุ่มคล้ายยุงกัดหรือลมพิษ (wheal) และเกิดขอบแดงรอบๆ เนื่องจากเกิด erythema (flare)

- การเกิดภาวะภูมิไวเกิน ที่มีเลือดและการเน่าตายของเนื้อเยื่อ (arthus reaction) ซึ่งความรุนแรงขึ้นอยู่กับปริมาณของแอนติเจน
- กระตุ้น complement ทั้งระบบ alternative และ classical ทำให้เกิด chemotactic factor ซึ่งมีผลทำให้เกิดการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียง
- ยับยั้งการจับของแอนติบอดี เนื่องจากโปรตีน เอ ไปแย่งจับกับส่วน Fc
- เหนียวน้ำให้มีการปล่อยสารฮีสตามีนจากเม็ดเลือดขาว
- กระตุ้นให้มีการเพิ่มปริมาณ บี ลิมโฟไซต์ ในคน

เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า โปรตีน เอ มีคุณสมบัติต่อต้าน phagocytosis ปริมาณโปรตีน เอ จาก *Staph. aureus* สายพันธุ์ที่มาจากคนมีการสร้างมากหรือน้อยแตกต่างกันไป นอกจากนี้ยังพบว่า *Staph. aureus* สายพันธุ์ที่ทำให้คนเป็น mastitis แบบเฉียบพลัน จะสร้างโปรตีน เอ มากกว่าสายพันธุ์ที่ทำให้โคเป็น mastitis แบบเรื้อรัง

Forsgren (1970) ศึกษาการสร้างโปรตีน เอ และ deoxyribonuclease (DNase) จาก *Staph. aureus* พบว่าสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส จำนวน 700 สายพันธุ์ สามารถสร้าง DNase ได้ทุกสายพันธุ์ โดยมีเพียง 8 สายพันธุ์เท่านั้นที่สร้างโปรตีนเอชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์

Aasen and Oeding (1971) ศึกษาการสร้างโปรตีน เอ ของ *Staph. epidermidis* จำนวน 48 สายพันธุ์ ไม่พบสายพันธุ์ใดที่สร้างโปรตีนเอ

โปรตีน เอ ได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการติดเชื้อ *Staph. aureus* ในคนโดยวิธี latex agglutination (Larsson and Sjoquist, 1989) และการตรวจหา *Staph. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างโปรตีน เอ ในอาหาร (Fey and Burkhard, 1981; Brook *et al.*, 1990, 1991; Mirhabibollahi *et al.*, 1990; Huang, 2007)

การสร้างเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme)

- โคแอกกูเลส (coagulase) เป็นเอนไซม์ที่สร้างโดยเชื้อ *Staph. aureus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคกับคน ซึ่งมีผลทำให้พลาสมาแข็งตัวได้ มี 2 ชนิด คือ bound coagulase หรือ clumping factor เป็นเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นแล้วจะติดอยู่ที่ตัวเซลล์ และ free coagulase เป็นเอนไซม์ที่เชื้อสร้างแล้วปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อและมีผลทำให้พลาสมาแข็งตัวทำให้เม็ดเลือดขาวของโฮสต์ไม่สามารถจับทำลายเชื้อได้โดยเอนไซม์จะไปจับกับ coagulase reacting factor (CRF) ในพลาสมา ส่งผลให้ prothrombin เปลี่ยนเป็น thrombin และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง coagulase-CRF จะทำให้ fibrinogen เปลี่ยนเป็น fibrin แล้วทำให้พลาสมาแข็งตัว

- ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย hyaluronic acid ซึ่งเป็นสารเชื่อมเซลล์ของร่างกายให้ติดต่อกันเป็นเนื้อเยื่อจึงส่งผลให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าไปเจริญในเนื้อเยื่อและแพร่กระจายได้ดี ถือว่าเป็น spreading factor (Murray *et al.*, 1994; Bartelt *et al.*, 2000)

- ไดออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease หรือ DNase) มีคุณสมบัติเป็น phosphodiesterase ทำให้สามารถทำลาย DNA ซึ่งสลายมาจากเม็ดเลือดขาว มีน้ำหนักโมเลกุล 16,800 ดาลตัน ต้องการแคลเซียมเข้าร่วมในปฏิกิริยาเพื่อให้มีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด นอกจากนี้ยังเป็นส่วนที่ทำให้หนองมีความข้นเหนียวอีกด้วย (Devriese and Kerckhove, 1979)

- เพนิซิลลินเนส (penicillinase) หรือ เบต้า-แลคตามเอส (β -lactamase) เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เชื้อ *Staph. aureus* ประมาณร้อยละ 90 คือยากลุ่มเพนิซิลลิน (penicillin) และเซฟาโลสปอริน (cephalosporin) โดยที่เอนไซม์นี้จะไปทำลาย β - lactam ring

- สเตฟไฟโลไคเนส (staphylokinase) ทำให้เกิดการสลายตัวของไฟบริน (fibrinolysis) โดยกระตุ้นและเปลี่ยน proenzyme plasminogen ในพลาสมาของคน กระจาย หนูตะเภา สุนัข และแมว ไปเป็น plasmin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อย fibrin ได้

- ไลเปส (lipase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไขมันเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งอาหาร จึงมักพบเชื้อ *Staph. aureus* ตามรูขุมขนของผิวหนัง และต่อมไขมัน ซึ่งทำให้เกิดฝีขึ้นได้ เอนไซม์นี้ทดสอบโดยดูการเกิดโซนขุ่นบนอาหาร egg yolk agar

การสร้างสารฮีโมไลซิน (hemolysin)

Staph. aureus ทำให้เกิดโรคโดยการบุกรุกและแพร่กระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อของร่างกาย และมีความสามารถในการสร้างสารพิษ และฮีโมไลซินต่างๆ ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ฮีโมไลซิน (hemolysins หรือ staphylosins) เป็นสารประกอบที่เชื่อมปล่อยออกมาภายนอกเซลล์มีคุณสมบัติเป็น แอนติเจน ออกฤทธิ์ที่เชื่อมหุ้มเซลล์ ถูกทำลายด้วยความร้อน สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่าง สมบูรณ์ (β - hemolysis) ทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะที่ และทำให้สัตว์ทดลองตายได้ hemolysins มีความแตกต่างกันที่ความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของสัตว์ต่างชนิดด้วย จำแนกเป็น 4 ชนิด ดังต่อไปนี้ (Dinges *et al.*, 2000)

แอลฟาฮีโมไลซิน (α - hemolysin) มีคุณสมบัติเป็น โปรตีน น้ำหนักโมเลกุล 34,000 ดาลตัน สามารถทำลายเกล็ดเลือด (platelets) ของคน และทำลายเม็ดเลือดแดงกระต่ายหากฉีดเข้าหลอด เลือดจะทำให้สัตว์ทดลองนั้นตายได้ ถ้านำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่ายจะทำให้เกิดการอักเสบอย่าง รุนแรง และทำให้เนื้อเยื่อส่วนนั้นเน่าตาย

เบตาฮีโมไลซิน (β - hemolysin) มีคุณสมบัติเป็น sphingomyelinase น้ำหนักโมเลกุล 30,000 ดาลตัน เนื่องจากความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงจะเกิดขึ้น ได้ดีเมื่อผสมกับเลือด หรือเลี้ยงบน blood agar ที่อุณหภูมิต่ำๆ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสจึงเรียก hemolysin ชนิดนี้ ว่า hot - cold ซึ่งไม่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงของกระต่ายได้แต่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงของ แกะได้

เดลตาฮีโมไลซิน (δ - hemolysin) มีคุณสมบัติเป็น phospholipase น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน ฮีโมไลซินชนิดเดลตาจะย่อยเม็ดเลือดแดงแบบ β - hemolysis ล้อมรอบโคโลนีของ *Staph. aureus* ที่เจริญบนอาหาร blood agar และมีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวและต่อเนื้อเยื่ออื่นๆ หลายชนิด

แกมมาฮีโมไลซิน (γ - hemolysin) ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด ทำหน้าที่ร่วมกัน สามารถ ทำลายเม็ดเลือดแดง คน กระต่าย และแกะ ไม่พบลักษณะการทำลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar เนื่องจาก hemolysin ชนิดนี้จะถูกยับยั้งโดยวุ้นและ sulfotol polymer อื่นๆ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์น้อยกว่าชนิดอื่นและไม่ค่อยมีความสำคัญในการก่อโรค

การสร้างสารพิษ (toxin)

Staph. aureus สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด ได้แก่

แพนตัน-วาเลนไทน์ ลิวโคซิดิน (Panton-Valentine-Leucocidin) มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ละลายน้ำได้ ถูกทำลายด้วยความร้อนได้ง่าย สามารถออกฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด polymorphonuclear leucocyte และ macrophage

เอ็กโฟเลียทีฟท็อกซิน (Exfoliative toxins หรือ epidermolytic toxins) ส่วนใหญ่สร้างจาก *Staph. aureus* ในกลุ่ม phage group II โดยออกฤทธิ์ที่ชั้น stratum granulosum ของผิวหนังทำให้ผิวหนังลอกหลุดคล้ายกับผิวหนังที่โดนน้ำร้อนลวกและเกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “Ritter’s disease” หากมีการติดเชื้อ *Staph. aureus* ที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย สารพิษจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตทำให้เกิดอาการไข้ ผิวหนังเป็นผื่นแดง และลอกหลุดได้ทั่วร่างกายโดยเฉพาะบริเวณรอบๆ ปาก มือ เท้า และข้อพับต่างๆ มองเห็นผิวหนังชั้นในแดงเข้มเหมือนน้ำร้อนลวก มักเกิดกับเด็กแรกเกิดและเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี หรืออาจพบในผู้ใหญ่ ในรายที่ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Ladhani *et al.*, 1999; Rago *et al.*, 2000; Plano *et al.*, 2001) การรักษาทำได้โดยการทำลายเชื้อโดยการฉีดยาปฏิชีวนะ และการให้สารเกลือแร่ทดแทนเนื่องจากสูญเสียน้ำและอิเล็กโทรไลต์ รวมทั้งการดูแลรักษาผิวหนังจะช่วยให้แผลหายเร็วขึ้นและไม่เกิดแผลเป็น

ท็อกซิกช็อกซัลโดมท็อกซิน 1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1; TSST-1) เชื้อ *Staph. aureus* ที่สร้างสารพิษชนิดนี้ได้แก่ สายพันธุ์ที่ไวต่อ phage type 29 หรือ 52 และมักมียีนที่ต่อต้านแคมเมียม สารหนู และเพนิซิลลินร่วมอยู่ด้วย TSST-1 ทำให้เกิดกลุ่มอาการ เช่น ไข้สูง ความดันลดลง ช็อค หมดสติ ที่เรียกว่า Toxic Shock Syndrome ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดกับหญิงที่ใช้ผ้าอนามัยแบบสอดซึ่งสามารถดูดซับได้มากและทิ้งไว้ในช่องคลอดเป็นเวลานาน เชื้อจึงเจริญและสร้างสารพิษได้ สารพิษจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดทางช่องคลอดหรือจากบาดแผลที่มีการติดเชื้อ สารพิษมีบทบาทเป็น superantigen ทำให้เกิดกลุ่มอาการต่างๆ มากมาย คือ ไข้สูง อาเจียน ท้องเสีย ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เกิดการช็อคเนื่องจากสูญเสีย น้ำ มีผื่นแดงและการหลุดลอกของผิวหนังคล้ายกับ scald skin syndrome แต่มักจะรุนแรงกว่า (Tsen *et al.*, 1998 ; Dinges *et al.*, 2000)

เอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) เป็นสารพิษที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหารโดยที่เชื้อ *Staph. aureus* ที่เป็น normal flora อยู่ได้ตามผิวหนังโดยเฉพาะบริเวณจมูก ซึ่งจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของ *Staph. aureus* ในอาหารได้ง่ายจากการปรุงอาหารโดยไม่ถูกสุขลักษณะ ซึ่งอาหารที่มักพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Staph. aureus* ได้แก่ เนื้อสัตว์ เบเกอรี่ นม และ ผลิตภัณฑ์นม ขนมนมจืด เอแคลร์ เป็นต้น เชื้อสามารถเจริญสร้างเอนเทอโรท็อกซินอยู่ในอาหารและเป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดของ Staphylococcal food poisoning ได้ ปกติ *Staph. aureus* จำนวน 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ก็จะสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้เพียงพอที่จะก่อให้เกิดโรคได้ สารพิษชนิดนี้มี 14 ชนิด คือ SEA-SEO (Bhatia and Zahoor, 2007) สารพิษทนต่อความร้อน 100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที และทนต่อเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร ดังนั้นอาหารปรุงสำเร็จที่มี *Staph. aureus* ปนเปื้อนอยู่เพียงเล็กน้อยถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานพอที่เชื้อจะสามารถเจริญเพิ่มจำนวนมากพอที่จะสร้างเอนเทอโรท็อกซินก็จะทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ แม้ว่าจะอุ่นก่อนรับประทานก็ตาม

ปัจจุบันได้มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับเอนเทอโรท็อกซินซึ่งเป็นสารพิษที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร โดยมีการค้นพบสารพิษเพิ่มเติมจากเดิมที่มี 12 ชนิด คือ SEA-SEK เป็น 14 ชนิด คือ SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SHH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN และ SEO ซึ่งอาศัยการจำแนกบนพื้นฐานของ antigenicity เอนเทอโรท็อกซินเหล่านี้จะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 27 kDa ถึง 34 kDa (Bhatia and Zahoor, 2007)

การสร้างเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

Staph. aureus จะสร้างเอนเทอโรท็อกซินที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Staphylococcal food poisoning) โดยการสร้างเอนเทอโรท็อกซินของ *Staph. aureus* มักจะสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์ coagulase คือ สายพันธุ์ที่สร้าง coagulase ก็มักจะสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้ด้วย แต่ก็มีเชื้อ *Staphylococcus* บางสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase แต่สร้างเอนเทอโรท็อกซินได้ (Maria *et al.*, 2007) ส่วนใหญ่ 30-50 เปอร์เซ็นต์ของ *Staph. aureus* สามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้และมักจะเรียกว่า Staphylococcal enterotoxins (SE) ซึ่งมีด้วยกัน 14 ชนิด SEA-SEO คือ SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ (Balaban and Rasooly, 2000), SEK (Orwin *et al.*, 2001), SEL, SEM, SEN และ SEO (Bhatia and Zahoor, 2007) แต่ละชนิดมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ต่างกัน เอนเทอโรท็อกซินมีคุณสมบัติเป็นโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24,000-35,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติทนความร้อนสูง (100 องศาเซลเซียส

30 นาที) ซึ่ง SEB ทนความร้อนได้สูงที่สุด เอนเทอโรท็อกซินไม่สูญเสียฤทธิ์ถึงแม้จะถูกแช่แข็งไว้ และทนต่อการถูกทำลายด้วยกรดและเอนไซม์ต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร การสร้างเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อนั้นอาจถูกควบคุมโดยยีนบนโครโมโซมหรือพลาสมิดก็ได้ เอนเทอโรท็อกซินชนิดที่พบว่าทำให้เกิดอาหารเป็นพิษบ่อย คือ SEA และ SED เนื่องจากเป็นเอนเทอโรท็อกซินที่สร้างในอาหารที่มีช่วง pH และ a_w ได้กว้างกว่า SEB และ SEC จึงเป็นเอนเทอโรท็อกซินที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษได้เสมอๆ อุณหภูมิที่สร้างท็อกซินได้ดีที่สุดอยู่ในช่วงระหว่าง 21-40 องศาเซลเซียส ส่วนประกอบที่เป็นกรดอะมิโนของ SEA คล้ายกับของ SED และ SEE และของ SEB คล้ายกับ SEC1, SEC2 และ SEC3 (Dinges *et al.*, 2000) *Staph. aureus* อย่างน้อย 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหารนั้นเพียงพอที่จะสร้างเอนเทอโรท็อกซินที่จะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ อาหารที่พบเชื้อ *Staph. aureus* ปนเปื้อนและเจริญได้ดี เช่น เนื้อโค ไก่ผลิตภัณฑ์นม ขนมนึ่ง อาหารทะเล ในประเทศไทย พบว่าอาหารประเภทน้ำปลาทู ขนมนึ่ง จะมีการปนเปื้อนของ *Staph. aureus* อาหารจากตลาดตรวจพบ SEA ร้อยละ 24 และ SED ร้อยละ 27 ส่วนอาหารแช่เย็นจากภัตตาคาร อาหารส่งออก อาหารแช่แข็ง นม และไอศกรีม พบ SEA และ SED ร้อยละ 18 นอกจากนี้ยังพบ *Staph. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษระบาดในช่วงปี 2528-2538 จำนวน 11 ครั้ง พบมีสาเหตุจาก SEA 8 ครั้ง SEA และ/หรือ SEC 1 ครั้ง SEC และ/หรือ SED 2 ครั้ง

การสร้างเอนเทอโรท็อกซินในอาหาร

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนเทอโรท็อกซินในอาหารของ *Staph. aureus* มีหลายปัจจัย เช่น จำนวนเซลล์ ค่าความเป็นกรดค่าด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของออกซิเจน ความเข้มข้นของเกลือ กลูโคส ยาปฏิชีวนะ streptomycin, acriflavin และ สาร Tween 80 การสร้างเอนเทอโรท็อกซินแตกต่างกันตามลักษณะของการผลิตจึงแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย SEB และ SEC ซึ่งเชื้อสามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้ในปริมาณมากและการสร้างขึ้นอยู่กับสภาวะของการบ่มหรือสภาวะของการเพาะเลี้ยง ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย SEA SED และ SEE ซึ่งเชื้อจะสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้น้อยกว่ากลุ่มแรกและการสร้างจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการเจริญของสายพันธุ์มากกว่าสภาวะของการบ่ม ถ้ามีเชื้อจำนวนมากในอาหารจะสามารถสร้างสารพิษได้ในปริมาณที่สูง เพราะจะทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษได้ดีที่สุดอยู่ในช่วงระหว่าง 10-45 องศาเซลเซียส ส่วน pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษ คือ 6.5-7.5, SEA จะถูกสร้างได้ดีที่ค่า $a_w < 0.90$, SEB จะถูกสร้างได้ดีที่ค่า $a_w > 0.90$ การสร้างสารพิษ

สร้างได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่สภาวะมีออกซิเจนสามารถสร้างได้ดีกว่า (Cliver, 1990)

Staph. aureus เมื่ออยู่ในอาหารที่มีสภาวะแวดล้อมเหมาะสมจะสร้างสารพิษออกมา ซึ่งสามารถตรวจพบสารพิษได้หลังจาก 6 ชั่วโมงไปแล้ว และปริมาณของสารพิษจะเพิ่มเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาของ Stationary phase ซึ่งเชื้อ *Staph. aureus* จะเริ่มสร้าง SEB ในระยะ early stationary phase ขณะที่การสร้าง SEA เกิดขึ้นในระยะ exponential phase ส่วน SEC1 และ SEC2 จะมีการสร้างในระยะ exponential phase และ early stationary phase (Cliver, 1990) จากการศึกษาวิเคราะห์ผลของปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเร็วรอบในการเขย่า flask และเวลาในการบ่ม เพื่อสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A พบว่า การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้ความเร็วรอบ 280 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการบ่ม 96 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการสร้างสารพิษชนิดนี้ คือ 4% N-Z Amine (NAK) และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้สามารถสร้างสารพิษนี้ได้ปริมาณมากที่สุด คือ pH 6.0-6.5 เมื่อทดลองใช้ flask ขนาด 2 ลิตร พบว่า การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 4% NAK, pH 6.5 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 280 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารพิษชนิดนี้

Staph. aureus จะปล่อยเอนเทอโรท็อกซิน ออกมามากที่สุดถึง 95 เปอร์เซ็นต์ที่ปลายระยะ exponential phase การสร้างเอนเทอโรท็อกซินของ *Staph. aureus* ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในช่วงรอยต่อระหว่างปลายระยะ exponential phase กับระยะ early stationary phase พร้อมๆ กับการสร้างโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยสารพิษที่สร้างขึ้นมานี้ได้มาจากโปรตีนที่สร้างขึ้นใหม่ ไม่ได้มาจากโปรตีนที่ใช้ในการสร้างเซลล์ที่ไม่ได้อยู่ในระยะที่แบ่งเซลล์ (Non-growing cells) ยังคงสามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้และกลไกในการสร้างเอนเทอโรท็อกซินต่างกับกลไกในการเพิ่มจำนวนเซลล์และเมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ *Staph. aureus* ที่อยู่ในระยะ Stationary phase ในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนแต่น้ำตาลกลูโคสปริมาณเล็กน้อย พบว่าเชื้อยังคงสามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้ แสดงว่าการสร้างเอนเทอโรท็อกซินเป็นกระบวนการที่ต้องการพลังงาน (energy-requiring process) ถ้าเพิ่มอัตราการให้อากาศ (aeration) จะช่วยให้การสร้างเอนเทอโรท็อกซินเพิ่มขึ้น pH ที่เหมาะสมในการสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด B ของเชื้อที่ไม่ได้อยู่ในระยะที่แบ่งตัวในอาหารที่มีไนโตรเจน คือ pH 7.0-7.5 และในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-phosphate คือ pH 8.0-8.5 ส่วนกลูโคสจะมีผลยับยั้งการสร้างสารพิษ กล่าวคือ ถ้ากลูโคสมีความเข้มข้นสูงขึ้นจะสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษได้ดีแต่ไม่มี

ผลต่อระดับการสร้างโปรตีนในอาหารที่มีไนโตรเจน นอกจากนี้ Chloramphenicol, penicillin, streptomycin sulfate และ CaSO_4 มีผลต่อการสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด B ของ growing cells แต่ไม่มีผลต่อการสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด B ของเซลล์ที่ไม่ได้อยู่ระยะแบ่งตัว (Non-growing cells)

มีการจัดจำแนกชนิดของ Staphylococcal enterotoxins (SE) ตามความแตกต่างของ peptide sequence ซึ่งมีด้วยกัน 14 ชนิดคือ SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI และ SEJ (Balaban and Rasooly, 2000), SEK (Orwin *et al.*, 2001), SEL, SEM, SEN และ SEO (Bhatia and Zahoor, 2007) รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลของเอนเทอโรท็อกซินแต่ละชนิดด้วย ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staphylococcus*

<i>SE Type</i>	<i>Mature SE length (aa)</i>	<i>Molecular mass (Kda)</i>
A	233	27,100
B	239	28,336
C1	239	27,531
C2	239	27,531
C3	239	27,563
C (bovine)		27,618
C (goat)		27,600
D	228	26,360
E	230	26,425
G	233	27,043
H	218	25,210
I	218	24,928
J	245	28,565
K	219	25,539
L	215	24,593
M	217	24,842
N	227	26,067
O	232	26,777

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bhatia and Zahoor (2007)

***Staphylococcus aureus* ในสิ่งแวดล้อม**

เชื้อ *Staph. aureus* มักพบได้ทั่วไปทั้งในคน สัตว์ สิ่งของ เครื่องใช้ สิ่งส่งตรวจ อาหาร และในธรรมชาติจากแหล่งต่างๆ โดยเชื้อ *Staph. aureus* ที่สามารถก่อโรคในคนพบได้ที่อวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย เช่น ระบบทางเดินหายใจตอนบน ระบบทางเดินอาหาร ผิวหนังทั้งที่ปกติและผิวหนังที่ผิดปกติ (เป็นฝี แผลผ่าตัด แผลอักเสบ) เชื้อนี้สามารถแยกได้จากสัตว์ เช่น สุนัข เป็ด ไก่ โค กระบือ ห่าน แพะ สุกร แกะ และยังพบได้ในอาหารสัตว์ รวมทั้งยังพบเชื้อนี้ได้จากสิ่งของเครื่องใช้ต่างๆ และสิ่งส่งตรวจ เช่น เสื้อผ้า ผ้าปูเตียง หนองจากแผล เลือด อุจจาระ swab จากโพรงจมูก (nasal swab) swab จากลำคอ (throat swab) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Staph. aureus* ในอาหารพวก เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ นมและผลิตภัณฑ์นม ไข่กรอก เบเกอรี่ ขนมหวาน ขนมจีน เส้นก๋วยเตี๋ยว และสามารถแยกเชื้อในธรรมชาติจากแหล่งต่างๆ เช่น ดิน อากาศ น้ำ ขยะ เป็นต้น (พราว และคณะ, 2552; Varnam *et al.*, 1991; Hui *et al.*, 1994)

การก่อโรคของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

โรคที่เกิดจากเชื้อ *Staph. aureus* (Murray *et al.*, 1994, 1998; Mahon *et al.*, 2000) ได้แก่

ปอดบวม (staphylococcal pneumonia) อาการที่พบ คือ มีไข้ หนาวสั่น เจ็บหน้าอก การอักเสบอาจเป็นแบบปอดอักเสบเฉพาะกลีบ (lobar pneumonia) หรือ ปอดอักเสบรอบหลอดลม โดยทั่วไปมักติดเชื้อนี้ภายหลังจากการเป็นโรคอื่นๆ มาก่อน เช่น ผู้ป่วยหลังผ่าตัด หรือภายหลังจากการป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่

ผิวหนังลอกหลุด (scald skin syndrome) หรือที่เรียกกันอีกชื่อหนึ่งว่า “Ritter’s Disease” เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากสารพิษ exfoliative toxin โดยเมื่อมีการติดเชื้อ *Staph. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษนี้ได้ที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย สารพิษจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต มีผลให้เกิดอาการไข้ ผิวหนังเป็นผื่นแดงและลอกหลุดได้ทั่วร่างกาย โดยเฉพาะบริเวณรอบๆ ปาก มือ เท้า และข้อพับต่างๆ มองเห็นผิวหนังชั้นในแดงเข้มเหมือนน้ำร้อนลวก มีอาการคล้ายกับไข้ดำแดง (Scarlet fever) ซึ่งเกิดจาก erythrogenic toxin ที่เชื้อสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*) สร้างขึ้นมักพบบ่อยในทารกแรกคลอดและเด็กอ่อน

อาการช็อค (toxic shock syndrome) เกิดจาก Toxic shock syndrome toxin-1 ที่เชื้อสร้างขึ้น ทำให้เกิดกลุ่มอาการต่างๆ คือ มีไข้สูง ท้องเดิน ความดันลดลง มีผื่นตามผิวหนัง ช็อค และหมดสติ มักพบในสตรีขณะที่มีประจำเดือนวันที่ 2-3

เชื้อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) ที่เกิดจากเชื้อ *Staph. aureus* มักมีปัญหายุงยากซับซ้อน หากมีการติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจเทียม (prosthetic heart valves) ก็ควรจะต้องผ่าตัดเอาส่วนที่ติดเชื้อออกไป

ลำไส้อักเสบ (staphylococcal enteritis) ตามปกติไม่ค่อยพบเชื้อ *Staph. aureus* ในลำไส้มากนัก แต่ถ้าหากกินยาปฏิชีวนะ อาจทำให้สมดุลของเชื้อในลำไส้เสียไป ส่งผลให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้ อาการที่พบ คือ ท้องเดินเฉียบพลัน มีไข้สูง อาเจียน สูญเสียน้ำ และเกลือแร่

แผลพุพอง (impetigo) อาการเริ่มจากเป็นผื่นแดงต่อมากลายเป็นตุ่มพองมีน้ำขุ่น หรือมีหนอง เมื่อตุ่มแตกออกจะกลายเป็นแผลพุพอง มีสะเก็ดหนา สีเหลือง เป็นวงมีขอบสีแดงซ้ำ พบตามแขนขา หลัง ก้น มักพบมากในเด็ก การรักษาต้องใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อป้องกันการลุกลามของเชื้อ

ไขกระดูกอักเสบ (osteomyelitis) โดยทั่วไปมักเป็นโรคนี้เมื่อมีการติดเชื้ออื่นเล็กน้อยอยู่แล้ว หรือมีบาดแผลธรรมดา โดยเฉพาะในเด็กอาการจะเกิดขึ้นในทันทีทันใด ซึ่งจะเจ็บปวดบริเวณแผล มีไข้ และอ่อนเพลีย

หูอักเสบ เชื้อ *Staph. aureus* ทำให้หูชั้นนอกและชั้นกลางอักเสบ โดยมักเกิดร่วมกับการติดเชื้อในลำคอแล้วลามเข้าหูชั้นกลาง อาจลามไปถึงโพรงกระดูกหลังหูได้ และจะเป็นอันตรายร้ายแรงหากลุกลามไปยังเยื่อหุ้มสมอง

ตาถุ้งยิง (stye หรือ external hordeolum) เป็นการติดเชื้อที่ขอบเปลือกตา เกิดจากมีการอุดตันของต่อมมาก่อน แล้วเชื้อจากจมูกของผู้ที่เป็นพาหะเข้าไป ทำให้เกิดโรคภายหลัง และเชื่อว่าถุ้งยิงเกิดจาก *Staph. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิต esterase, lipase ได้ดี ทำให้ต่อมบริเวณนั้นอุดตันและอักเสบ

ฝี (boil, carbuncle, furuncle) เป็นการติดเชื้อ *Staph. aureus* บริเวณต่อมเหงื่อ ต่อมไขมัน หรือรูขุมขน เกิดการอักเสบเป็นตุ่มแดงจนกลายเป็นฝีมีหนอง พบบ่อยที่บริเวณก้น รักแร้ หลัง ใบหน้า ถ้าหากเชื้อลุกลามไปยังรูขุมขนบริเวณใกล้เคียง จะเกิดเป็นฝีจำนวนมากในเนื้อเยื่อชั้นใต้ ผิวหนัง เรียกว่า ฝีฝักบัว (carbuncle) การเกิดฝีหนองอาจเรื้อรัง หรือกลับเป็นซ้ำได้

เต้านมอักเสบ (mastitis) เต้านมที่มีการติดเชื้อ *Staph. aureus* จะอักเสบแดง หรืออาจเป็น หนอง มีไข้ พบในหญิงหลังคลอดบุตร มักเกิดในช่วงสัปดาห์ที่ 2-3 หลังคลอด การรักษาใช้ยา ปฏิชีวนะ หากเกิดการอักเสบเป็นหนองอย่างรุนแรงต้องเอาหนองออก

อาหารเป็นพิษ (Staphylococcal food poisoning) พยาธิสภาพเกิดขึ้นเนื่องจากการ รับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเอนเทอโรท็อกซิน ที่สร้างโดยเชื้อ *Staph. aureus* เข้าไป สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมักเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ coagulase ได้ การสร้างเอนไซม์ coagulase มักมีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนเทอโรท็อกซิน ในอาหารถ้าอาหารนั้นๆ อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญ สารพิษจะทำให้เกิดโทษกับผู้ บริโภคได้นั้นต้องมีปริมาณไม่ต่ำกว่า 0.1-1.0 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมอาหาร ซึ่งปริมาณเชื้อจะ ต้องมากถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร แม้ว่าเชื้อจะสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้แต่ถ้ามีเซลล์ปริมาณ ต่ำกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ก็จะไม่ทำให้เกิดอันตราย ตามมาตรฐานอาหารกำหนดว่า ต้องตรวจ ไม่พบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรครวมทั้ง *Staph. aureus* ด้วย เมื่อเอนเทอโรท็อกซินถูกดูดซึมที่ กระเพาะอาหารจะไปกระตุ้นเส้นประสาท vagus และ sympathetic nerves ไปยัง subcortical vomiting center ที่สมอง ทำให้เกิดการอาเจียนขึ้น ดังนั้นเอนเทอโรท็อกซินของ *Staph. aureus* จัดเป็น emetic enterotoxin ในขณะเดียวกันทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณ cAMP ในเยื่อผนังลำไส้ เป็นผลทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงเป็นน้ำ อาการของโรคเกิดขึ้นภายใน 1-6 ชั่วโมง หลังจาก รับประทานอาหารที่มี เอนเทอโรท็อกซิน ของ *Staph. aureus* อาการที่เกิดขึ้น คือ คลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเดิน และเป็นตะคริว อาเจียนอย่างรุนแรง มักไม่มีอาการไข้ ปวดบิดในท้อง ถ่ายเป็นน้ำ อุจจาระร่วง ปวดศรีษะ เหงื่อออก หนาวสั่น ในรายที่รุนแรงอาจช็อคหรือมีมูกและ เลือดปนในอุจจาระ แต่ส่วนใหญ่อาการจะหายเป็นปกติภายใน 1-3 วัน หลังจากขับถ่ายเอาเชื้อ และสารพิษออกไปหมดแล้ว ถ้าเกิดในเด็กเล็กและผู้สูงอายุอาการอาจรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ โรคอาหารเป็นพิษจาก *Staph. aureus* มักเกิดจากมือที่มีเชื้อของคนที่เป็นพาหะมาประกอบอาหาร มือของผู้ที่เป็นพาหะติดเชื้อมาจากสารคัดหลั่งจากจมูก อาหารที่รับประทานนั้นดิบ หรือปรุง/อุ่นที่

ความร้อนน้อยหรือทำในเวลาสั้นๆ ซึ่งไม่สามารถทำลายเอนเทอโรท็อกซินที่ทนทานต่อการต้มเป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่าได้ ดังนั้นการป้องกันและควบคุมโรคอาหารเป็นพิษจาก *Staph. aureus* คือ ผู้ที่เป็นพาหะของเชื้อ *Staph. aureus* ไม่ควรสัมผัสอาหาร หรือใช้มือในการหยิบหรือจับอาหารที่ปรุงแล้ว ไม่ควรตั้งอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลานานก่อนรับประทาน ควรเก็บอาหารไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิต่ำเพื่อไม่ให้เชื้อ *Staph. aureus* เจริญเพิ่มจำนวนก่อนที่จะนำไปประกอบหรือเสิร์ฟ ซึ่งปริมาณเชื้อจะต้องมากถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ตามข้อกำหนดของการควบคุมคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยา กำหนดไว้ว่าอาหารที่มีสุขลักษณะที่ดี จะต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรครวมทั้ง *Staphylococcus aureus* ด้วย (พระราชบัญญัติอาหาร, 2522) ซึ่งในบทเพิ่มเติมท้ายพระราชบัญญัติอาหารของปี พ.ศ.2552 มีข้อกำหนดให้อาหารเกือบทุกประเภทจะต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่างอาหาร 0.1 กรัม ถ้าเป็นประเภทเครื่องดื่มนั้นต้องตรวจไม่พบเชื้อใน 0.1 มิลลิลิตร

การปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร

ประเภทของอาหารที่ตรวจพบเชื้อ *Staph. aureus* มีหลายชนิด ได้แก่

- เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อไก่ เนื้อโค เนื้อสุกร แหนม หมูยอ กุนเชียง ไส้กรอก ลูกชิ้น
- นมและผลิตภัณฑ์จากนม เช่น นมพาสเจอร์ไรส์ เนยแข็ง เนยเหลว เนยเทียม นมผง โยเกิร์ต (Carmo *et al.*, 2002; Fujikawa *et al.*, 2006)
- อาหารหมัก เช่น ไส้กรอก (salami) หน่อไม้ดอง ผักดองเปรี้ยวประเภทหัวหอม แดงวากะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) และผลิตภัณฑ์จากนม เช่น เนยแข็ง
- ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และขนมหวาน เช่น ขนมปังไส้ครีม ขนมไส้สี เอแคลร์ เค้กจาก มันฝรั่ง แชนวิช และสก็อตแพนเค้ก
- ส่วนประกอบของอาหารจำพวกสลัด เช่น ไข่ น้ำสลัด ไข่ ทูน่า แสม มะเขือเทศ มันฝรั่ง และมักกะโรนี (Cliver, 1990; Varnam *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1994)

- อาหารทะเลผ่านความร้อนและแช่เยือกแข็ง เช่น ปลาหมึก กุ้ง ปลาบดปรุงรส (เนาวรัตน์, 2540)

- เครื่องดื่ม เช่น น้ำลำไย น้ำมะพร้าว น้ำพุทรา น้ำสับปะรด น้ำลิ้นจี่ น้ำส้ม น้ำกระเจียบ น้ำบัว น้ำลูกเกด น้ำหวาน น้ำมะนาว น้ำนมเย็น น้ำโอเลี้ยง (ธาริยา, 2540)

- ผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ไอศกรีม ขนมหิน เส้นก๋วยเตี๋ยว อาหารปรุงสำเร็จ กระทียมครีม (garlic butter) และวิปครีม (whipped butter)

การตรวจเชื้อ *Staph. aureus* ในอาหารพร้อมบริโภคที่สุ่มตรวจเป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่าอาหาร 9 ชนิด คือ อาหารคาว 3 ชนิด ประเภทเบเกอรี่ 2 ชนิด ประเภทขนมหวานและน้ำปั่น 4 ชนิด สามารถแยกเชื้อ *Staph. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนโทโรท็อกซินและดี้อยา ในตัวอย่างอาหารจำนวนทั้งหมด 864 ตัวอย่าง จากร้านค้าในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 4 แห่ง จำนวน 432 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *Staph. aureus* ในอาหาร 142 ตัวอย่าง (ร้อยละ 32.87) แยกได้เชื้อ 172 isolates จากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร 4 แห่ง จำนวน 432 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *Staph. aureus* ในอาหาร 163 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.73) แยกเชื้อได้ 195 isolates รวมเชื้อที่ตรวจแยกได้ 367 isolates เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 335 isolates มาทดสอบการสร้างเอนโทโรท็อกซินพบว่าเชื้อสร้างเอนโทโรท็อกซินได้จำนวน 137 isolates (ร้อยละ 40.90) โดยสร้างเอนโทโรท็อกซินชนิด A, B, A&B, A&C และ A&B&C&D จำนวน 31, 41, 20, 23 และ 1 isolates ตามลำดับในการตรวจหาเชื้อสายพันธุ์ดี้อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin จากเชื้อ *Staph. aureus* ที่สร้างเอนโทโรท็อกซินทั้ง 137 isolates พบเชื้อสายพันธุ์ดี้อยาปฏิชีวนะ methicillin 12 isolates คิดเป็นร้อยละ 8.76 และ vancomycin 7 isolates คิดเป็นร้อยละ 5.11 ตามลำดับ (พราว, 2552)

การรายงานระบาดวิทยาของเชื้อ *Staphylococcus aureus* สาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (Staphylococcal food poisoning)

ในประเทศไทยระหว่างปี พ. ศ. 2527-2535 กองระบาดวิทยา รายงานโรคที่มีน้ำและอาหารเป็นพาหะจำนวน 160 ครั้ง มีผู้ป่วยทั้งสิ้น 8,851 ราย โรคระบาดที่มีผู้ป่วยมากที่สุด สาเหตุเกิดจากสารพิษของเชื้อ *Staph. aureus* มีผู้ป่วยรวม 517 ราย จาก 8,851 ราย (กองระบาดวิทยา, 2537)

มัลลย์ และคณะ (2543) รายงานว่าในประเทศไทย ได้สำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของอาหารพร้อมบริโภคประเภท ยำ สลัดผัก และข้าว ที่จำหน่ายในซูเปอร์มาเก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร ตรวจพบ *Staph. aureus* ในอาหารทุกชนิดในปริมาณตั้งแต่ $1.0-7.0 \times 10^2$ CFU/g

ในปี พ. ศ. 2548 กองระบาดวิทยา รายงานโรคอาหารเป็นพิษ จำนวน 140,949 ราย โรคระบาดที่มีผู้ป่วยที่มี สาเหตุเกิดจากสารพิษของเชื้อ *Staph. aureus* มีผู้ป่วยรวม 61 ราย (กองระบาดวิทยา, 2548)

Fueyo *et al.* (2005) รายงานการสำรวจและควบคุมการเกิดโรคจากการติดเชื้อและสารพิษในอาหารของ WHO ในทวีปยุโรประหว่างปี 1999-2000 พบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อในกลุ่ม Staphylococci มากกว่า 3,700 ครั้ง

ประเทศออสเตรเลียตั้งแต่ปี 1990-2006 มีรายงานการติดเชื้อของผู้ป่วยจากเชื้อ *Staph. aureus* มีความถี่มากขึ้นตามลำดับ โดยเป็นเชื้อในกลุ่ม community-associated methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) (Nimmo and Coombs, 2008)

เทคนิคในการตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเอนเทอโรท็อกซิน

1. เทคนิคการตรวจทางจุลชีววิทยา (microbiological technique)

การตรวจวิเคราะห์ *Staph. aureus* ในตัวอย่างอาหารทั่วไป จะเป็นการตรวจนับจำนวน ทำโดยการนับโคโลนีในจานเพาะเชื้อ (direct plate count method) หรือ การหาค่า MPN ตามวิธีของ FDA Bacteriological Analytical Manual 8th edition 2001 และ AOAC 16th edition 1995 ใช้อาหาร Baird-Parker agar ในการศึกษาลักษณะโคโลนี ร่วมกับการทดสอบทางชีวเคมี เช่น การสร้างเอนไซม์ coagulase, catalase activity และการเฟอร์เมนต้าตาล mannitol มาตรฐานของอาหารและน้ำบริโภค พ.ศ. 2549 และ พ.ศ. 2552 นั้นจะต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่าง 0.1 กรัม หรือ 0.1 มิลลิลิตร ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์จะรายงานผลตรวจว่า มีเชื้อหรือไม่ เชื้อ หรือ พบเชื้อหรือไม่พบเชื้อ ไม่จำเป็นต้องตรวจนับจำนวน ถ้าเป็นอาหารแห้ง ผักหรือผลไม้ตากแห้ง อาจต้อง pre-enrichment ตัวอย่างอาหารก่อน แล้วทำการตรวจวิเคราะห์

2. เทคนิคการตรวจ ทางอิมมูโนวิทยา (immunological technique)

วิธีการทางอิมมูโนวิทยาหลายวิธีที่ได้รับการพัฒนามาใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* และเอนเทอโรท็อกซิน ได้แก่ Microslide gel Immunodiffusion, Immunofluorescence, electroimmunodiffusion, Hemagglutination, Radioimmunoassay, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) และ Western Blotting (Immunoblotting) (Park and Szabo, 1986; Kawabata *et al.*, 1997; Rasooly and Rasooly, 1998) นอกจากนี้มีการพัฒนานำ วิธี DNA hybridization และ Polymerase chain reaction (PCR) มาใช้ตรวจสอบหาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staph. aureus* (Atanassova *et al.*, 2001)

- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Staph. aureus* อีกวิธีหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้กันมากและนำมาใช้แทนวิธี microslide gel double diffusion ได้เพื่อลดขั้นตอนในการทำให้เข้มข้นเป็นการประหยัดเวลาและทำได้ง่ายขึ้น วิธี ELISA เป็นวิธีที่มีการพัฒนามาก มีความจำเพาะ มีความไว และมีการผลิตชุดทดสอบสำเร็จรูป (kit test) ออกจำหน่าย (Park *et al.*, 1996) ซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ การทดสอบมีทั้งวิธี Double-antibody-sandwich ELISA และ Indirect ELISA โดยการตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี Double-antibody sandwich method (Thompson *et al.*, 1986) มีขั้นตอนคือการเคลือบเพลทด้วยแอนติบอดี จากนั้นเติมตัวอย่างอาหารที่ต้องการทดสอบถ้ามีแอนติเจนที่จำเพาะจะจับกับแอนติบอดี ขึ้นต่อไปคือ เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจะจับกับแอนติเจน เมื่อเติมสับสเตรทลงไป เอนไซม์ย่อยสับสเตรททำให้เกิดสี ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ส่วนการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA นั้นจะเคลือบเพลทด้วยแอนติเจนแล้วเติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ถ้ามีแอนติบอดีจำเพาะจะจับกับแอนติเจน หลังจากนั้นเติมแอนติอิมมูโนโกลบูลินติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจะจับกับแอนติบอดีในตัวอย่าง เมื่อเติมสับสเตรททำให้เกิดสี ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าและวัดปริมาณสีด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (กนกรัตน์, 2541) อย่างไรก็ตามวิธี ELISA ยังมีข้อจำกัดคืออาจเกิดผลลบปลอม (false negative) และอาจเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ได้ (Rasooly and Rasooly, 1998)

- Western Blotting (Immunoblotting) เป็นวิธีทดสอบทางอิมมูโนวิทยาวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staph. aureus* ได้ผลดีโดยการแยกแอนติเจนในวุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (150 V, 2 ชั่วโมง) แล้วย้ายโปรตีนจากวุ้นลงบนแผ่น nitrocellulose (400

mA, 60 นาที) แล้วบ่มด้วย Anti-SEs (rabbit) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเอาส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยากันออกไป หลังจากนั้นบ่มด้วย goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase 2 ชั่วโมงล้างอีกครั้งแล้วย้อมด้วยสี BCIP/NTB จะเกิดแถบโปรตีนทำให้มองเห็นได้ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) สูง เนื่องจากสามารถทดสอบพบ SEA ในตัวอย่างอาหารที่มีปริมาณต่ำประมาณ 100 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตรได้ และสามารถตรวจพบ SEA ได้ทั้งในตัวอย่างอาหารที่ผ่านความร้อนและยังไม่ผ่านความร้อน นอกจากนี้ยังสามารถแก้ปัญหาการเกิดผลบวกปลอม (false positive) ผลลบปลอม (false negative) และปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ได้ (Rasooly and Rasooly, 1998)

- Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) เป็นวิธีทดสอบทางอิมมูโนวิทยาอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Staph. aureus* (Park *et al.*, 1986; Fujikawa and Igarashi, 1988; Adesiyun *et al.*, 1992) และเป็นวิธีที่นำมาใช้แทนวิธี Reverse Passive Hemagglutination (RPHA) แม้ว่าวิธี RPHA เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและรวดเร็ว แต่อาจจะเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนที่ไม่จำเพาะ (non-specific) กับองค์ประกอบบางอย่างของอาหาร ดังนั้นต่อมาจึงได้มีการนำเอาเม็ด latex ซึ่งเป็น Polystyrene มาใช้แทนเม็ดเลือดแดง โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเช่นเดียวกับวิธีอื่นๆ ซึ่งในการทดสอบจะต้องเตรียมแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดนั้นๆ ขึ้นมาเสียก่อน โดยการนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อผลิตแอนติเจนซึ่งเป็นแอนติเจน หลังจากทำให้แอนติเจนโตขึ้น บริสุทธิ์แล้วทำการฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง ทิ้งไว้ระยะหนึ่ง (2-3 สัปดาห์) แล้วฉีดซ้ำอีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีในปริมาณที่มากพอ จากนั้นจะเลือกสัตว์ทดลอง แล้วทิ้งให้เลือดแข็งตัวโดยเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ค้างคืน แล้วนำไปปั่นแยกเอาส่วนของแอนติซีรั่มที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำแอนติซีรั่มมาเตรียมแอนติบอดีบริสุทธิ์ แล้วนำไปเคลือบบนผิวเม็ด latex แล้วนำมาทดสอบหาแอนติเจนของเชื้อ *Staph. aureus* ต่อไป วิธี RPLA นี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายเพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ให้ผลรวดเร็ว มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specific) สูง เครื่องมือเครื่องใช้ราคาไม่แพง สามารถสังเกตผลได้ด้วยตาเปล่า (Bankes and Rose, 1989)

3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

เป็นวิธีการตรวจอีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาชนิดเอนเทอโรท็อกซินได้โดยอาศัยการตรวจจาก DNA ซึ่งจะช่วยแก้ปัญหาในกรณีตัวอย่างอาหารที่นำมาวิเคราะห์ผ่านความร้อนสูงๆ มาทำให้ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ได้ ในขณะที่วิธี PCR นี้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เพราะอาศัยคุณสมบัติของ DNA ที่ไม่มีประจุ (uncharged) ตรวจวิเคราะห์เอนเทอโรท็อกซินจากยีนในการควบคุมการสร้าง (specific gene sequences) แทนการตรวจ เอนเทอโรท็อกซินที่เชื้อสร้างขึ้นหรือตัวเชื้อ โดยตรง (Tsen and Chen, 1992; Holeckova *et al.*, 2002)

4. Biosensors

เป็นวิธีที่มีการพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการคล้ายกับ real-time PCR ร่วมกับ sensor chip surface เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ Staphylococcal enterotoxins ชนิดต่างๆ (Nedlkov *et al.*, 2000) ซึ่งจะใช้เวลาในการตรวจน้อยมากเพียง 4 นาที รวมทั้งมีความไวในการวิเคราะห์ที่ดีคือสามารถตรวจที่อกซินได้ 10-100 นาโนกรัมต่อกรัมอาหาร ในตัวอย่างอาหารที่มีความหลากหลาย ทั้ง สลัดมันฝรั่ง ไข่กรอก นม และเห็ด เป็นต้น โดยไม่เกิด non-specific จากส่วนประกอบอื่นของตัวอย่างมารบกวนการตรวจ

ปัจจุบันในการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* และการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staph. aureus* มี kit test จำนวนมาก (ตารางที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 2 แสดงวิธีการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* โดยใช้ kit test

Test system	Manufactured by	Reference
Staphylatex	American Scientific Products	Baron and Finegold (1990)
Staphylochrome	Innovative Diagnostics	"-----"
Sero-STAT	Scott Laboratories	"-----"
Bacto Staph Latex	Difco Laboratories	"-----"
Staphaurex	Wellcome Diagnostics	"-----"
AUREUS TEST™	Trisum Corp., Taipei, Taiwan	Chang and Huang (1993)
Staphaurex	Murex Biotech Ltd., Dartford, United Kingdom	Leeuwen <i>et al.</i> (1999)
API-Staph	bioM'erieux, Marcy I,ETOILE, France	"-----"
Pasteurex-Staph-Plus	Sanofi Diagnostics Pasteur GmbH, Feriburg, Germany	Eiff <i>et al.</i> (2000)
ID 32 Staph	bioM'erieux, Nurtingen, Geramany	"-----"
GENE-TRAK	Gene-Trak Hopkinton, MA	Bennett (2001)
AccuProbe	Gen-Probe, San Diego, CA	"-----"
<i>SmaI</i> -PFGE	Bio-Rad laboratories	Fueyo <i>et al.</i> (2005)
Lightcycler	Roche Diagnostics	Choudhury <i>et al.</i> (2006)
Staphylococcus kit		

ตารางที่ 3 แสดงวิธีการตรวจหาแอนโทโรท็อกซินของเชื้อ *Staph. aureus* โดยใช้ kit test

Test system	Manufactured by	Reference
SET-RPLA kit	Denka Seike Ltd., Tokyo, Japan	Park <i>et al.</i> (1992)
Bommeli kit or	W.Brommeli A.G., Bern,	"-----"
Swiss Ball kit or	Switzerland	
Swiss EIA kit		
TECRA kit	Bioenterprises Pty.Ltd., Roseville, New South Wales, Australia	Park <i>et al.</i> (1996)
EIA membrane &	France	"-----"
EIA tube kit		
RIDASCREEN	Geramany	"-----"
SET-RPLA kit	Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England	Fitzgerald <i>et al.</i> (2000)
TECRA-SET	TECRA Diagnostics, Rosseville,NSW, Australia	Bennett, (2001)
VIDAS-SET	BioMerieux-Vitex, Hazelwood,MO	"-----"
Ridascreen SET	R. Biopharm GmbH, Darnstadt, Germany	"-----"

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุและเครื่องมือ

- 1.1 กระต่าย
- 1.2 ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
- 1.3 ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
- 1.4 Autoclave
- 1.5 กระบอกฉีดยา
- 1.6 เข็ม two way needle
- 1.7 เข็มฉีดยาเบอร์ 20 และ 22 ยาว 1 นิ้ว
- 1.8 สำลี
- 1.9 หลอดทดลอง
- 1.10 จานเพาะเชื้อ
- 1.11 หลอด eppendorf
- 1.12 Vortex mixer
- 1.13 Pasteur pipette
- 1.14 ปิเปต
- 1.15 ไมโครปิเปต
- 1.16 ทิป
- 1.17 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 1.18 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- 1.19 แผ่นไนโตรเซลลูโลส
- 1.20 เครื่อง lyophilizer
- 1.21 ปากกีสบ
- 1.22 Moist chamber

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 Braid-Parker broth
- 2.2 Braid-Parker agar
- 2.3 Trypticase Soy broth
- 2.4 Standard plate count agar
- 2.5 Mannitol salt agar

3. เชื้อ

- 3.1 *Staphylococcus aureus*
- 3.2 *Staphylococcus epidermidis*
- 3.3 *Staphylococcus hominis*
- 3.4 *Staphylococcus saprophyticus*
- 3.5 *Escherichia coli*
- 3.6 *Enterobacter aerogenes*
- 3.7 *Salmonella Anatum*
- 3.8 *Shigella sonnei*

4. สารเคมี

- 4.1 Purified Protein A polyclonal antibody, Purified *Staphylococcus aureus* polyclonal antibody
- 4.2 Phosphate Buffer Saline – Tween 20 (PBS-T)
- 4.3 0.85% NaCl
- 4.4 2% skim milk
- 4.5 Goat Anti-Rabbit IgG Horseradish peroxides
- 4.6 Tetramethylbenzidine (TMB)

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติซีรั่ม (antiserum)

1.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้น

เตรียมเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยวัดความขุ่นเทียบกับความขุ่นมาตรฐานของ McFarland no. 7 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.5% ที่ 56°C ค้างคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสที่มีฟอร์มาลินทิ้งไป ล้างเซลล์ด้วย normal saline อีก 2-3 ครั้ง แล้วจึง resuspend ด้วย normal saline นำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นแสดงในตารางผนวกที่ ค1

การเตรียมโปรตีน เอ (Zymed) ใช้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางด้วย normal saline ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ ผสมแอนติเจนที่เตรียมไว้คือเชื้อ *Staph. aureus* และโปรตีน เอ (Zymed) ใช้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผสมกับ complete Freund's adjuvant (Sigma) ในอัตราส่วน 1: 1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ของกระต่ายน้ำหนักประมาณ 1.5-2 กิโลกรัม โดยแบ่งฉีดประมาณ 2-3 จุดเพื่อป้องกันการเกิด granuloma ที่ใหญ่เกินไป ฉีดซ้ำ (boost) หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ด้วยแอนติเจนที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant (Sigma) ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเข้าใต้ผิวหนังเช่นเดียวกัน และฉีดซ้ำอีก 5 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ แสดงในตารางผนวกที่ ค2

1.2 การเจาะเลือดและแยกแอนติซีรั่ม

หลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งที่ 2 เจาะเลือดกระต่าย โดยเจาะจากหลอดเลือดดำใหญ่ที่หู (ear vein) โดยใช้เข็มเบอร์ 20 จะเจาะต่อเนื่องทุก 1 สัปดาห์หลังการฉีดซ้ำแต่ละครั้ง จนกว่าจะได้ปริมาณแอนติบอดีที่ต้องการทำการ เจาะเลือดกระต่ายแล้ว ต้องนำเลือดที่ได้มาทิ้งไว้ให้ตกตะกอนทิ้งให้เลือดแข็งตัวโดยเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ค้างคืน นำมาปั่นแยกซีรั่มที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูส่วนใสลงในหลอดแล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง ในส่วนของการเตรียม normal serum (pre-immunized serum) เพื่อใช้เป็น negative control เตรียมโดยเจาะเลือดกระต่ายที่ไม่ได้ฉีดสารแอนติเจน แล้วทำการแยกซีรั่มออกจากเซลล์เม็ดเลือด

2. การตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี immunodiffusion ในกรณีที่ฉีดโปรตีน เอ

2.1 การตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน เอ ด้วยวิธี immunodiffusion

ตรวจสอบปริมาณของแอนติบอดี (anti-protein A) ในแอนติซีรัมที่เตรียมไว้ โดยการทำ immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (Clark, 1991) โดยใช้ Noble agar 1.5% ละลายใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 + 0.1% NaN₃ ใช้ 3-3.5 มิลลิลิตร ของ Noble agar ที่เตรียมไว้ เคลือบลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งตัว แล้วเจาะหลุมตามแบบที่ใช้ เตรียมความเจือจางของแอนติซีรัม ใน PBS pH 7.2 เป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 ตามลำดับ ปิเปิดแอนติซีรัมที่ความเจือจางต่างๆ ใส่ลงในหลุมแต่ละหลุมๆ ละ 10 ไมโครลิตร ส่วนของแอนติเจน คือ โปรตีน เอ ใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม จากนั้นเก็บสไลด์ไว้ในกล่องขึ้นที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.2 การตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* ด้วยวิธี microtiter plate direct agglutination

นำแอนติซีรัมที่แยกได้มาตรวจสอบปริมาณแอนติบอดี มีวิธีการดังนี้ คือ ใส่ 0.85% NaCl ลงในหลุมของ microtiter plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร จนครบทั้ง 12 หลุม ทำ serial dilution ของแอนติซีรัมแบบ two-fold dilution จนความเจือจางสุดท้ายเป็น 1:20,480 (หลุมที่ 11) ส่วนหลุมที่ 12 ใส่ normal serum เพื่อเป็น negative control เติมน้ำแอนติเจน คือเชื้อ *Staph. aureus* (เตรียมโดยใช้ suspension ของเชื้อ *Staph. aureus* มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาว 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.5 แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที) ลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร จนครบทุกหลุม นำ microtiter plate ไปใส่ในกล่องขึ้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง การตรวจผลโดยดูจากการเกิด agglutination pattern ซึ่งจะเกิดที่ก้นหลุม

อ่านผลโดยดูปริมาณของการเกิด agglutination

++++	100%	complete agglutination
+++	75%	agglutination
++	50%	agglutination
+	25%	agglutination
-	0%	agglutination

โดยอ่านผลเป็นบวกตั้งแต่ 50% agglutination ขึ้นไป

3. การเตรียม IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ และ IgG บริสุทธิ์ต่อ เชื้อ *Staph. aureus* ทั้งเซลล์

3.1 ตกตะกอน IgG ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำแอนติซีรัมที่ตรวจหาปริมาณแอนติบอดีแล้วในข้อ 2 มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว เพื่อตกตะกอนโปรตีนในซีรัมรวมทั้ง IgG ด้วย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสออก แล้วนำตะกอนที่ได้ไปแยก IgG บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography

3.2 การเตรียม IgG บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography

นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย 20 mM phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 จากนั้นนำไปกรองผ่าน membrane ที่มีขนาด pore size เท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร ก่อนนำไปทำ affinity chromatography โดยผ่านไปบน HiTrap Protein A HP ขนาด 5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที equilibrate ด้วย buffer จนค่าดูดกลืนแสงของสารที่ไหลออกมาเท่ากับ base line แล้วชะเอา IgG ที่เกาะติดกับ bead ให้หลุดออกมาด้วย 100 mM glycine-HCl buffer pH 2.7 เก็บ fraction ที่มี IgG โดยดูจากการวัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยสารละลาย 1 M Tris-HCl buffer pH 9.0 (neutralize buffer) แล้วรวม fraction ที่มีโปรตีน เก็บไว้เพื่อนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยการทำ SDS-PAGE ต่อไป

3.3 การทำแห้งแข็ง (lyophilize)

รวมแต่ละ fraction ที่มี IgG นำไป dialyze ใน dialysis tube ด้วย 0.15 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยการทำให้ SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีของ Laemmli (1970) แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

3.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ต่อโปรตีน เอ และ IgG ต่อเชื้อ *Staph. aureus* ทั้งเซลล์

นำ IgG บริสุทธิ์ที่ทำ lyophilize และหาปริมาณโปรตีนแล้วมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE ดังนี้

3.4.1 เตรียม running gel ความเข้มข้น 15% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยต้องผสมสารในบีกเกอร์ให้เข้ากันอย่างเบาๆ ก่อนจะได้สารตัวต่อไป ตามลำดับดังนี้ ใส่ bis-acrylamide 5 มิลลิลิตร 4x running gel buffer 1.25 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1.17 มิลลิลิตร 10% SDS 50 ไมโครลิตร 10% ammonium persulfate 25 ไมโครลิตร และ tetramethyl ethylene diamine (TEMED) 1.7 ไมโครลิตร แล้วรีบเทใส่ glass plate ที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นปรับผิวหน้า running gel โดยใส่น้ำกลั่นตั้งทิ้งไว้จน gel แข็งตัวเพื่อปรับผิวหน้าให้อยู่แนวระนาบ

3.4.2 เตรียม stacking gel ความเข้มข้น 3% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยต้องผสมสารในบีกเกอร์ให้เข้ากันอย่างเบาๆ ก่อนจะได้สารตัวต่อไป ตามลำดับดังนี้ ใส่ bis-acrylamide 0.498 มิลลิลิตร 4x running gel buffer 1.25 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 3.17 มิลลิลิตร 10% SDS 50 ไมโครลิตร 10% ammonium persulfate 25 ไมโครลิตร และ tetramethylethylenediamine (TEMED) 2.5 ไมโครลิตร แล้วรีบเปิดใส่ running gel ที่เทน้ำออกแล้วนำ comb ของชุดเจล gel ใสลงไป ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 60 นาทีจน gel แข็งตัว แล้วดึง comb ออก และย้าย gel มาใส่ใน tank buffer เท running buffer ลงไปให้ท่วม gel

3.4.3 นำตัวอย่างมาผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ผสมและต้มแล้วจำนวน 5 ไมโครลิตรใส่ในช่อง gel และใส่โปรตีนมาตรฐาน 5 ไมโครลิตร อีก 1 ช่อง เปิดเครื่องโดยใช้ไฟฟ้า 100 โวลต์ รอนจนเห็นแนวสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาอยู่ห่างจากปลายด้านล่างของ separating gel ประมาณ 1 เซนติเมตร จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นนำ gel ไปย้อมสี coomassie brilliant blue R แล้วล้างด้วย destaining solution I และ destaining solution II ตามลำดับ รายละเอียดการเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์แสดงในภาคผนวก ง

4. การนับจำนวนเชื้อโดยวิธี dilution plate count เพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจากการเตรียมแอนติเจนที่วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

ตรวจนับจำนวนเชื้อต่างๆ โดยแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อสายพันธุ์ *Staphylococcus* จำนวน 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* และ *Staphylococcus saprophyticus* และเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non- *Staphylococcal* ในกลุ่ม enterobacteriaceae จำนวน 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* Anatum และ *Shigella sonnei* โดยวิธี dilution plate count ซึ่งใช้เชื้อที่เตรียมความขุ่นซึ่งวัดค่า OD₆₀₀ ได้เท่ากับ 0.1 โดยมีวิธีการทำดังต่อไปนี้

4.1 เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารผิวแข็ง TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เตรียม suspension ของเชื้อด้วย 0.85% NaCl แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเจือจางเซลล์ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.1 ซึ่งจะเป็นปริมาณเชื้อที่จะใช้ในการเตรียมแอนติเจนเพื่อทดสอบโดยวิธี dot-ELISA ในทุกๆ ครั้งของการทดสอบ

4.2 นำ suspension ของเชื้อที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 มาทำการเจือจางต่อที่ระดับความเจือจางต่างๆ คือ 1: 10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000, 1:1,000,000 และ 1:10,000,000 แล้วนำแต่ละความเจือจางมา spread ลงบนอาหาร TSA plate บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

4.3 ตรวจนับจำนวนเชื้อแล้วคำนวณเป็น CFU/ ml

5. การทดสอบความจำเพาะของ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Staph. aureus* โดยวิธี dot-ELISA

5.1 การทดสอบความจำเพาะของ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ โดยวิธี dot-ELISA

ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสให้มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตรต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วทำสัญลักษณ์ หยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยใช้แอนติเจนของเชื้อ *Staph. aureus* ที่วัดความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 คัมเป็นเวลา 10 นาที เพื่อสกัดแอนติเจน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เพื่อนำส่วนใสมาใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบ ดูดส่วนใสปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส สำหรับ negative control ใช้ 0.85% NaCl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิท นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสใส่ลงใน chamber แล้วเติม blocking solution (ใช้ skim milk powder 2% ใน PBS-T) ลงไปให้ท่วมแผ่นไนโตรเซลลูโลส จากนั้น rotate เป็นเวลา 30 นาที เติมแอนติบอดี (IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อ โปรตีน เอ) ที่เจือจางด้วย 0.85% NaCl ลงใน chamber ให้ท่วมแผ่นไนโตรเซลลูโลส rotate เป็นเวลา 90 นาที ล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม goat anti-rabbit horseradish peroxidase (conjugate) ลงใน chamber แล้ว rotate เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติมสับสเตรท tetramethylbenzidine (TMB) ให้ท่วมแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทิ้งไว้ 2 นาทีแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

5.2 ทดสอบปริมาณแอนติบอดี (IgG บริสุทธิ์) ที่เหมาะสม

นำ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ ไปเจือจางใน 0.85% NaCl ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ คือ ที่ 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบโดยใช้วิธีตามข้อ 5.1 เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมเพื่อใช้ทำ dot-ELISA ในการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ต่อไป

5.3 ทดสอบปริมาณ conjugate ที่เหมาะสม

การทดสอบหาปริมาณ conjugate (goat anti- rabbit IgG horseradish peroxidase) ที่เหมาะสม โดยเจือจาง conjugate ใน 0.85% NaCl เป็น 1:2,000 , 1:5,000 และ 1:10,000 จากนั้น

นำไปทดสอบโดยใช้วิธีตามข้อ 5.1 เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสม ที่จะนำมาใช้ทำ dot-ELISA ในการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ต่อไป

6. การทดสอบปฏิกิริยาของ IgG บริสุทธิ์กับเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่นโดยวิธี dot-ELISA

ใช้วิธี dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ กับ *Staphylococcus* ชนิดอื่น และทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อ *Staph. aureus* ไปพร้อมกันด้วย โดยใช้วิธีตามข้อ 5.1

6.1 นำเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่นคือ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* และ *Staphylococcus saprophyticus* มาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารผิวแข็ง TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เตรียม suspension ของเชื้อ ด้วย 0.85% NaCl แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรโดยเจือจางเซลล์ให้ได้ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

6.2 นำ suspension ของแต่ละเชื้อที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 มาทำการเจือจางต่อด้วย 0.85% NaCl ที่ระดับความเจือจางต่างๆ คือ 1: 10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 แล้วต้มเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนใสมาใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบ

6.3 นำไปทดสอบด้วยวิธี dot-ELISA ตามความเข้มข้นของ IgG และ conjugate ที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 5.2 และข้อ 5.3 ตามลำดับ

6.4 นำผลการทำ dot-ELISA มาเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของโพลีโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด คือ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ จากความเข้มของสีที่เกิดขึ้นกับเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่นในระดับความเจือจางต่างๆของแต่ละเชื้อเพื่อหาความสามารถการทำปฏิกิริยาของ IgG บริสุทธิ์ที่ผลิตขึ้น

7. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) ของ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ กับเชื้อกลุ่ม non- Staphylococcal

ใช้วิธี dot-ELISA เพื่อทดสอบว่าเมื่อใช้ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ ต่อ โปรตีน เอ จะเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับแบคทีเรียกลุ่มที่เป็น non-Staphylococcal ในกลุ่ม enterobacteriaceae ซึ่งบางชนิดเป็น food-borne pathogen และอาจมีผลในการรบกวนการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่างอาหารต่อไปได้ โดยใช้วิธีทดสอบตามข้อ 5.1 และความเหมาะสมของแอนติบอดีและ conjugate ตามข้อ 5.2 และข้อ 5.3 ซึ่งมีวิธี การเตรียมเชื้อกลุ่มที่เป็น non- Staphylococcal มีขั้นตอนดังนี้

7.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non- Staphylococcal ในกลุ่ม enterobacteriaceae จำนวน 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum* และ *Shigella sonnei* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารผิวแข็ง TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงแล้วทำ suspension ด้วย 0.85% NaCl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรโดยเจือจางเซลล์ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.1

7.2 นำ suspension ของแต่ละเชื้อที่มี OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 มาทำการเจือจางต่อด้วย 0.85% NaCl ที่ระดับความเจือจางต่างๆ คือ 1: 10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนใสมาใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบต่อไป

7.3 นำไปทดสอบด้วยวิธี dot-ELISA ตามความเข้มข้นของ IgG ทั้งสองชนิด คือ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อ โปรตีน เอ และ conjugate ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองตามข้อ 5.2 และ 5.3

7.4 นำผลการทำ dot-ELISA มาเปรียบเทียบหาปฏิกิริยาของโพลีโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด คือ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อ โปรตีน เอ จากความเข้มของสีที่เกิดขึ้นกับเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non- Staphylococcal

8. การวัดการเจริญของเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี การวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับคัดแยกเฉพาะเชื้อ *Staph. aureus* และส่งเสริมการเจริญดีกว่าเชื้อกลุ่มอื่น (อาหารประเภท selective enrichment broth) จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่น และกลุ่ม non-Staphylococcal ได้หรือไม่

ทำการทดสอบโดยแบ่งแบคทีเรียเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อ *Staphylococcus* จำนวน 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* และ *Staphylococcus saprophyticus* รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non-Staphylococcal ในกลุ่ม enterobacteriaceae จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum* และ *Shigella sonnei* โดยมีวิธีทำดังต่อไปนี้

8.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ คือเชื้อ *Staphylococcus* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* และ *Staphylococcus saprophyticus* รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non-Staphylococcal ในกลุ่มของ enterobacteriaceae คือ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum* และ *Shigella sonnei* มาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารผิวเยือก TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงแล้วทำ suspension ด้วย 0.85% NaCl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรโดยเจือจางเซลล์ให้ได้ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

8.2 นำ suspension ของแต่ละเชื้อที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 มาทำการเจือจางด้วย 0.85% NaCl ที่ระดับความเจือจางต่างๆ คือ 1: 10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 แล้วนำแต่ละความเจือจางใช้ปริมาณเท่ากับ 1 มิลลิลิตรเท่าๆ กันไปเพาะเลี้ยงลงในอาหาร Baird-Parker broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.3 สังเกตการณ์เจริญของเชื้อโดยนำเชื้อชนิดต่างๆ แต่ละระดับความเจือจางในข้อ 8.2 ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร รวมทั้งสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อว่าเกิดการเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีดำ

9. การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Baird-Parker broth ก่อนนำไปตรวจด้วยวิธี dot-ELISA

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 7 เกิด cross reaction กับเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่นๆ คือ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* และ *Staphylococcus saprophyticus* รวมทั้งเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non- *Staphylococcal* ในกลุ่มของ enterobacteriaceae คือ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum* และ *Shigella sonnei* จึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร Baird-Parker broth ก่อนเพื่อการคัดเลือกเชื้อ *Staph. aureus* และ enrich ไปด้วยในขั้นตอนเดียวกัน ก่อนตรวจด้วยวิธี dot-ELISA โดยมีวิธีการดังนี้

9.1 เพาะเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ คือ เชื้อ *Staphylococcus* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* และ *Staphylococcus saprophyticus* รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non- *Staphylococcal* ในกลุ่มของ enterobacteriaceae ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Somonella Anatum* และ *Shigella sonnei* มาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารผิวเยือก TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงแล้วทำ suspension ด้วย 0.85% NaCl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรโดยเจือจางเซลล์ให้ได้ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

9.2 นำ suspension ของแต่ละเชื้อที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 มาทำการเจือจางต่อด้วย 0.85% NaCl ที่ระดับความเจือจางต่างๆ คือ 1: 10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 แล้วนำแต่ละความเจือจางจำนวน 1 มิลลิลิตร ไปเพาะเลี้ยงลงในอาหาร Baird-Parker broth 9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.3 นำแต่ละเชื้อ ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในอาหาร Baird-Parker broth จากข้อ 9.2 มาต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนใสมาใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบต่อไป

9.4 ทำการทดสอบด้วยวิธี dot-ELISA ตามความเข้มข้นของ IgG ทั้งสองชนิด คือ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อ โปรตีน เอ และ conjugate ที่เหมาะที่ได้จากการทดลองตามข้อ 5.1, 5.2 และ 5.3

10. การใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อในอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อน (artificial contaminated food) ที่เตรียมขึ้นโดยเปรียบเทียบกับการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี dilution plate count

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ ไข่กรอกไก่ โดยทำให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave หลังจากนั้น จึงเพาะเชื้อแบคทีเรียลงไป โดยทำการทดลองกับเชื้อ 5 กลุ่ม ในปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแต่ละชนิดโดยเตรียมจากการวัดค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 นำ suspension ของเชื้อมาทำการเจือจางเพื่อให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.5×10^5 CFU/ml และ 2.5×10^6 CFU/ml เพื่อนำแต่ละเชื้อใส่ลงในอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว คือ ไข่กรอกไก่ น้ำหนัก 25 กรัม จากนั้นเติมน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับไข่กรอกไก่ซึ่งปริมาณเชื้อสุดท้ายจะมีจำนวนเชื้อแต่ละชนิดเท่ากับ 10^4 และ 10^5 CFU/g ของอาหารตามลำดับโดยเตรียมเชื้อที่ผสมในไข่กรอก ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ เชื้อ *Staph. aureus*

กลุ่มที่ 2 คือ เชื้อ *Staph. aureus* และ *Staph. epidermidis*

กลุ่มที่ 3 คือ เชื้อ *Staph. aureus*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum*, และ *Shigella sonnei*

กลุ่มที่ 4 คือ เชื้อ *Staph. epidermidis*

กลุ่มที่ 5 คือ เชื้อ *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum* และ *Shigella sonnei*

จากนั้นเปิดตัวอย่างอาหารที่ผสมเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรของแต่ละกลุ่มใส่ลงในอาหาร Baird-Parker broth 9 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นอาหาร selective enrichment broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปสกัดแอนติเจนเพื่อใช้ในการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA ตามวิธีข้อ 5

11. การใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิดจากแหล่งขาย เปรียบเทียบกับวิธีตรวจมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

นำสภาวะที่เหมาะสมในการทำ dot-ELISA ที่ได้จากข้อ 5 มาทำการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่างอาหารจากแหล่งขาย โดยนำตัวอย่างอาหารมาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Baird-Parker broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เพื่อ enrich และคัดแยกเชื้อ *Staph. aureus* ก่อนแล้วจึงนำไปสกัดแอนติเจนเพื่อทำ dot-ELISA โดยใช้ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อ โปรตีน เอ ตามวิธีข้อ 5 และทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา โดยนำตัวอย่างอาหารมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker agar แยกโคโลนีที่แสดงลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Staph. aureus* ไปทดสอบลักษณะที่สำคัญที่ระบุว่าเป็นเชื้อ *Staph. aureus* เช่น การทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase การทนเกลือ และการใช้น้ำตาล mannitol เป็นต้น ซึ่งจากผลทางชีวเคมีที่กล่าวมาสามารถจำแนกเชื้อ *Staph. aureus* ออกจากเชื้ออื่นๆ ได้

ผลและวิจารณ์

1. การเตรียมแอนติซีรั่ม

ทำการเจาะเลือดครั้งแรกก่อนฉีดแอนติเจนเพื่อแยก normal serum เป็น pre-immunized serum ซึ่งแยกซีรั่มได้ประมาณ 6-7 มิลลิลิตร และหลังจากฉีดแอนติเจนก็ทำการเจาะเลือดครั้งละประมาณ 20 มิลลิลิตร ซึ่งแยกซีรั่มได้ประมาณ 10-12 มิลลิลิตรต่อครั้ง แล้วจึงนำซีรั่มในแต่ละครั้งที่เจาะได้ไปตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีต่อไป

2. การตรวจสอบปริมาณแอนติบอดี

2.1 immunodiffusion

การตรวจสอบโดยการทำ immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony โดยเจือจางแอนติซีรั่มเป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 ตามลำดับ ใช้โปรตีน เอ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน ตรวจสอบเส้นตะกอน (precipitation band) ที่เกิดขึ้น ใน bleeding ที่ 1, 2 ให้แอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 1:16 และ ใน bleeding ที่ 3 ให้แอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 1:32

2.2 direct agglutination

เตรียมความเจือจางของแอนติซีรั่มใน 0.85% NaCl ทำ two-fold dilution ส่วนเชื้อ *Staph. aureus* เตรียมโดยการทำ suspension แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 แล้วนำไปต้มเป็นเวลานาน 10 นาที ปิเปตใส่แต่ละหลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผล agglutination pattern ซึ่งจะเกิดที่ก้นหลุมได้ end point titer เท่ากับ 1:640

3. การเตรียม IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ และต่อเชื้อ *Staph. aureus* ทั้งเซลล์

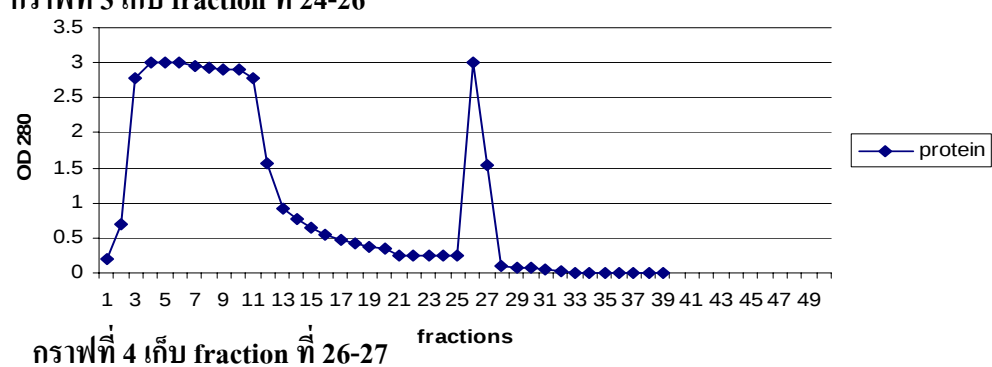
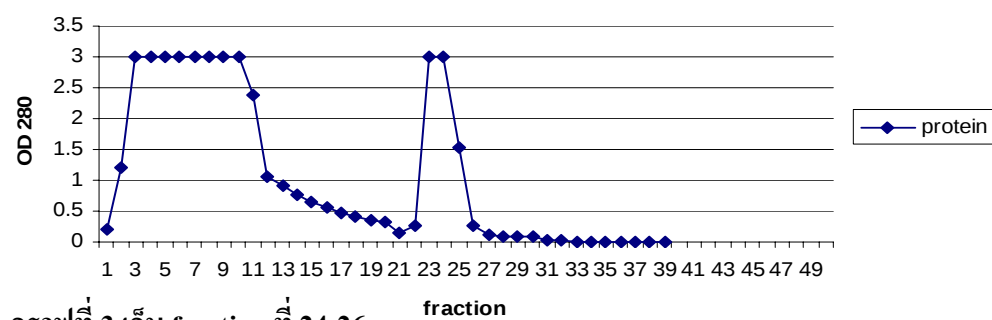
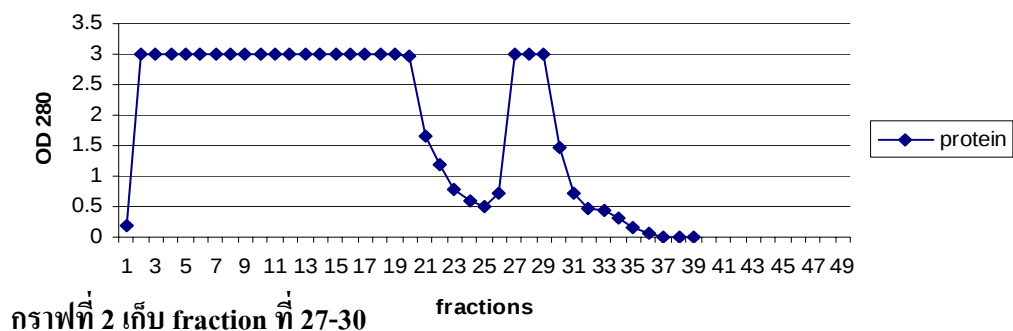
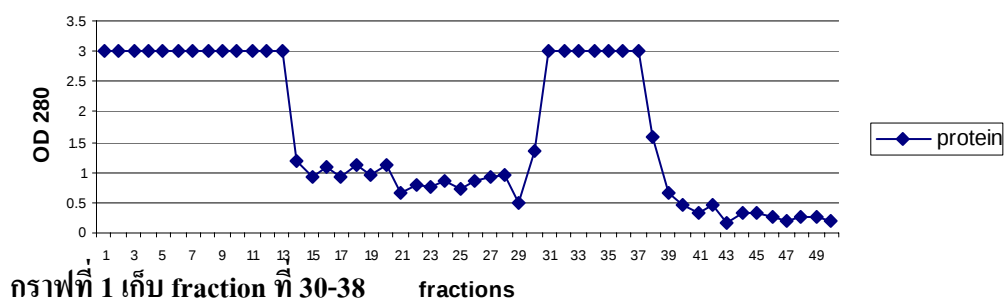
การเตรียมแอนติซีรั่มต่อโปรตีน เอ และ ต่อเชื้อ *Staph. aureus* ทั้งเซลล์ โดยนำแอนติซีรั่มที่ตรวจหาปริมาณแอนติบอดีแล้ว ที่มีปริมาณแอนติบอดีสูงๆ มารวมกันแล้วตกตะกอนด้วยเกลือ

แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว เพื่อตกตะกอนโปรตีนในซีรัมรวมทั้ง IgG ด้วย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสออก จะได้ตะกอนเพื่อนำไปเตรียมการแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี affinity chromatography โดยผ่านลงใน protein A-sepharose ผลที่ได้แสดงในภาพที่ 2

การเตรียม IgG บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยการผ่านตัวอย่างใน column หลายครั้งเพราะว่าปริมาณ IgG ในตัวอย่างที่ผ่านลงใน column มีมากกว่า protein A ที่บรรจุใน column จะจับไว้ได้ทั้งหมด โดยจะเห็นได้จากกราฟที่ 1 ว่าใน peak ที่ 1 (fraction 1-12) คือส่วนของโปรตีนที่ไม่ได้ถูกจับไว้ใน column ทั้งหมด ซึ่งมีทั้ง IgG ส่วนเกินที่ column จะจับไว้ได้และโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่ IgG อยู่ด้วย เมื่อทำการชะด้วย elution buffer ก็จะพบโปรตีนออกมาใน fraction 30-38 คือ peak ที่ 2 ซึ่งเป็นส่วนของ IgG ถูกชะออกมาจึงเก็บส่วนนี้เอาไว้

กราฟที่ 2 เป็นการนำเอาส่วนที่เป็นโปรตีนที่ไม่ถูกจับในส่วน of peak ที่ 1 (fraction 1-12 ของกราฟที่ 1) มาผ่านลงใน column อีกครั้ง ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อชะด้วย elution buffer แล้วมี peak ที่ 2 คือ ส่วนของ IgG (fraction 27-30 ของกราฟที่ 2) ซึ่งพบโปรตีนในปริมาณมากจึงเก็บส่วนนี้ไว้ในส่วนของ peak ที่ 1 (fraction 2-20 ของกราฟที่ 2) คือส่วนของโปรตีนส่วนเกินที่ไม่ได้ถูกจับไว้ใน column จะเก็บเอาไว้เพื่อผ่าน column ซ้ำอีกครั้งด้วย ซึ่งจะแสดงผลดังกล่าวในกราฟที่ 3

กราฟที่ 3 เป็นการนำเอาส่วนที่เป็นโปรตีนที่ไม่ถูกจับในส่วน of peak ที่ 1 (fraction 2-22 ของกราฟที่ 2) มาผ่านลงใน column อีกครั้ง ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อชะด้วย elution buffer แล้วมี peak ที่ 2 คือ ส่วนของ IgG (fraction 24-26 ของกราฟที่ 3) ซึ่งพบโปรตีนปริมาณมากเก็บส่วนนี้ไว้ในส่วนของ peak ที่ 1 (fraction 2-12 ของกราฟที่ 3) คือส่วนของโปรตีนส่วนเกินที่ไม่ได้ถูกจับไว้ใน column จะเก็บเอาไว้เพื่อผ่าน column ซ้ำอีกครั้ง ซึ่งจะแสดงผลดังกล่าวในกราฟที่ 4 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อชะด้วย elution buffer แล้วมี peak ที่ 2 (ส่วนของ IgG) ในปริมาณที่น้อยลงเมื่อเทียบกับผลที่แสดงในกราฟที่ 1, 2 และ 3 จึงเก็บส่วนของ IgG บริสุทธิ์ที่ได้นี้เป็นครั้งสุดท้ายโดยที่ไม่นำส่วนของโปรตีนที่ไม่ได้ถูกจับไว้ใน column มาผ่าน column ซ้ำอีก



ภาพที่ 2 การ load แอนติซีรัมต่อโปรตีน เอ ผ่าน affinity column ด้วยวิธี affinity chromatography

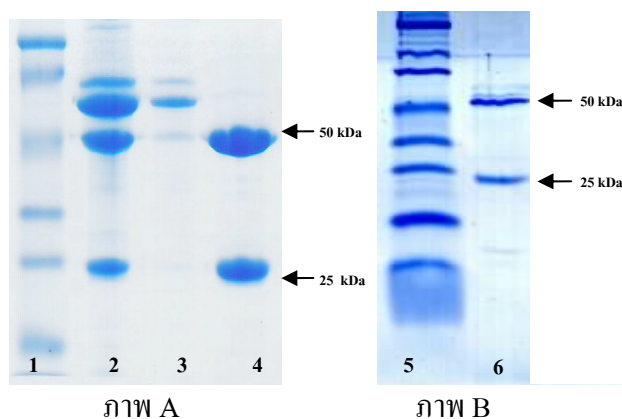
หมายเหตุ กราฟที่ 1 เป็นการ load ตัวอย่างโปรตีนลงใน column protein A - sepharose

กราฟที่ 2 เป็นการ load ตัวอย่างเก็บจาก fraction 1-12 ในกราฟที่ 1 มา load ซ้ำลง column

กราฟที่ 3 เป็นการ load ตัวอย่างเก็บจาก fraction 2-20 ในกราฟที่ 2 มา load ซ้ำลง column

กราฟที่ 4 เป็นการ load ตัวอย่างเก็บจาก fraction 2-10 ในกราฟที่ 3 มา load ซ้ำลง column

การแยก IgG ด้วยวิธี affinity chromatography อาศัยปฏิกิริยาการจับกับ IgG โดยโปรตีน เอ (protein A) ซึ่งเคลือบอยู่บน sepharose bead ที่บรรจุใน column เมื่อผ่านตัวอย่างลงใน column แล้ว IgG จะจับกับโปรตีน เอ หลังจากนั้นจึงชะเอา IgG ออกมาด้วย elution buffer (100 mM glycine-HCl buffer pH 2.7) ซึ่งความเป็นกรดจะลดการจับกันของโมเลกุล ทำให้สารที่ต้องการ(IgG) หลุดออกมาโดยไม่เสถียร ซึ่ง IgG ที่ได้นั้นจะถูกปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยสารละลาย 1 M Tris-HCl buffer pH 9.0 (neutralize buffer) แล้วรวม fraction ที่มี IgG เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการเก็บโปรตีนคือ PBS ด้วยวิธีนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย viva spin column ที่มีขนาด 30 kDa ซึ่งวิธีดังกล่าวนอกจากจะเป็นการทำให้ IgG บริสุทธิ์ที่ได้นั้นอยู่ในสารละลายที่มีสถานะเหมาะสมแล้วยังเป็นการทำให้ IgG บริสุทธิ์ที่ได้เข้มข้นขึ้นเพื่อสะดวกแก่การนำไปใช้งานอีกด้วย ในส่วนของ protein A column นั้นก็สามารถนำกลับไปใช้แยกสารบริสุทธิ์ซ้ำได้อีก



ภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG โดยการทำให้ SDS-PAGE

หมายเหตุ ภาพ A คือ ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ต่อโปรตีน เอ

แถวที่ 1 marker (low range)

แถวที่ 2 แอนติซีรัม

แถวที่ 3 unbound

แถวที่ 4 IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ

ภาพ B คือ ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ต่อ *Staph. aureus* ทั้งเซลล์

แถวที่ 5 marker (broad range)

แถวที่ 6 IgG บริสุทธิ์ต่อ *Staph. aureus* ทั้งเซลล์

ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยการทำ SDS-PAGE พบว่ามี 2 band คือส่วนของ heavy chain น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 kDa และ ส่วนของ light chain น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 kDa ดังแสดงในภาพที่ 3

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) ภายหลังนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer โดยเทียบกับ BSA ที่ใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ IgG บริสุทธิ์ต่อ *Staph. aureus* ทั้งเซลล์เท่ากับ 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ IgG บริสุทธิ์ต่อ โปรตีน เอ เท่ากับ 18.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีการคำนวณอยู่ในภาคผนวก ง)

4. การนับจำนวนเชื้อโดยวิธี dilution plate count เพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจากการเตรียมแอนติเจนที่วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

เพาะเลี้ยงเชื้อ โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มเชื้อ *Staphylococcus* จำนวน 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* และ *Staphylococcus saprophyticus* รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non- *Staphylococcal* ในกลุ่ม enterobacteriaceae จำนวน 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* Anatum แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเจือจางเซลล์ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.1 จากนั้นนำ suspension ของเชื้อมาทำ dilution plate count เพื่อนับจำนวนโดย spread ลงบนอาหาร plate count agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วตรวจนับจำนวนเชื้อแต่ละเชื้อแล้วคำนวณเป็น CFU/มิลลิลิตร เพื่อให้ทราบค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 นั้นในแต่ละเชื้อมีจำนวนเชื้อเท่าใด ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การนับจำนวนเชื้อโดยวิธี dilution plate count โดยใช้เชื้อจากการเตรียมแอนติเจนที่วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	จำนวนเชื้อ (CFU/มิลลิลิตร)
<i>Staph. aureus</i>	3.30×10^8
<i>Staph. epidermidis</i>	1.80×10^8
<i>Staph. hominis</i>	1.86×10^8
<i>Staph. saprophyticus</i>	4.10×10^8
<i>Escherichia coli</i>	13.60×10^9
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.2×10^8
<i>Salmonella Anatum</i>	2.0×10^8
<i>Shigella sonnei</i>	2.1×10^8

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าจำนวนเชื้อที่นับได้จาก 2 กลุ่ม นั้นมีจำนวนใกล้เคียงกันที่ค่าความขุ่น OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ซึ่งน่าจะเกิดจาก generation time ที่ใกล้เคียงกัน โดยเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* ใช้เวลาในการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 (generation time) ประมาณ 27 นาที ในขณะที่เชื้อ *Escherichia coli* ใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ประมาณ 23 นาที ซึ่งใช้ระยะเวลาใกล้เคียงกัน (Neidhardt et al., 1990)

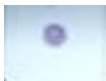
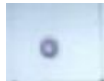
เหตุผลของการทดลองนี้เพื่อตรวจสอบว่าการวัดค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ซึ่งจะใช้ในการเตรียมแอนติเจนสำหรับการทำ dot-ELISA นั้นจะมีเชื้ออยู่จำนวนเท่าใดในตัวอย่างเพื่อเป็นการแสดงว่าในการทำ dot-ELISA ทุกครั้งของเชื้อทุกชนิดที่เตรียมแอนติเจนโดยวัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 จะมีเชื้อในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 แสดงดังตารางผนวกที่ ฉ1 และ ฉ2

5. การทดสอบหาความจำเพาะของ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Staph. aureus* โดยวิธี dot-ELISA

5.1 การทดสอบหาความจำเพาะของ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Staph. aureus* และ ต่อโปรตีน เอ โดยใช้แอนติเจนที่สกัดจาก เชื้อ *Staph. aureus* ที่วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 และ โปรตีน เอ 50 ไมโครกรัม ซึ่งใช้แอนติเจนปริมาณ 2 ไมโครลิตร และใช้แอนติบอดีทั้งสองชนิดที่ระดับความ

เข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของ goat anti -rabbit IgG horseradish peroxidase (conjugate) ใช้ที่ระดับความเจือจางที่ 1:5,000 ซึ่งสับสเตรทที่ใช้คือ Tetramethylbenzidine (TMB) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบหาความจำเพาะของ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Staph. aureus* และต่อ โปรตีน เอ

Sample	anti-protein A IgG 50 µg/ml	anti- <i>Staph. aureus</i> IgG 50 µg/ml
Protein A 50 µg/ml		
<i>Staph. aureus</i> OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1		
Negative Control		

จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้แอนติเจนทั้งสองชนิดคือ เชื้อ *Staph. aureus* ที่วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 และโปรตีน เอ 50 ไมโครกรัม พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้ผลจากการทำ dot-ELISA เป็นสีน้ำเงินม่วงใกล้เคียงกันซึ่งแสดงว่าแอนติบอดี (IgGบริสุทธิ์) ทั้ง 2 ชนิดที่เตรียมขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจเชื้อ *Staph. aureus* ด้วยวิธี dot-ELISA ได้

5.2 ทดสอบปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม

โดยใช้เชื้อ *Staph. aureus* ที่เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารผิวเอียง TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบด้วยวิธี dot-ELISA (เตรียมแล้วใช้ทันที) แอนติบอดีที่ความเข้มข้นคือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้ goat anti -rabbit IgG horseradish peroxidase ที่ระดับความเจือจางเท่ากับ 1:5,000 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม

ปริมาณเชื้อ	ความเข้มข้น แอนติบอดี	ความเข้มข้น conjugate	anti-protein A	anti- <i>Staph.</i> <i>aureus</i>	Negative Control
<i>Staph. aureus</i> OD ₆₀₀ = 0.1	50 µg/ml	1:5,000			
<i>Staph. aureus</i> OD ₆₀₀ = 0.1	100 µg/ml	1:5,000			
<i>Staph. aureus</i> OD ₆₀₀ = 0.1	200 µg/ml	1:5,000			

จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้แอนติเจนทั้งสองชนิดคือ เชื้อ *Staph. aureus* ที่วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับ IgG บริสุทธิ์ทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังคงให้สีน้ำเงินม่วงที่ชัดเจนอยู่ถึงแม้จะใช้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าอีกสองความเข้มข้นที่ให้สีชัดเจนเพิ่มมากขึ้น จากความเข้มของสีที่ยังคงชัดเจนแม้จะมีปริมาณแอนติบอดีน้อยเพียง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่น้อยที่สุดนี้เอาไว้ทำการทดลองต่อไปเพื่อให้สิ้นเปลือง IgG น้อยที่สุด

5.3 ทดสอบปริมาณ conjugate ที่เหมาะสม

โดยใช้เชื้อ *Staph. aureus* ที่เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารผิวเอียง TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบด้วยวิธี dot-ELISA (เตรียมแล้วใช้ทันที) โดยใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ goat anti -rabbit IgG horseradish peroxidase ใช้ที่ระดับความเจือจางต่างๆคือ 1:2,000 ,1:5,000 และ 1:10,000 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงทดสอบปริมาณ conjugate ที่เหมาะสม

ปริมาณเชื้อ	ความเข้มข้น แอนติบอดี	ความเข้มข้น conjugate	anti-protein A	anti- <i>Staph.</i> <i>aureus</i>	Negative Control
<i>Staph. aureus</i> OD ₆₀₀ = 0.1	50 µg/ml	1:2,000			
<i>Staph. aureus</i> OD ₆₀₀ = 0.1	50 µg/ml	1:5,000			
<i>Staph. aureus</i> OD ₆₀₀ = 0.1	50 µg/ml	1:10,000			

จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้แอนติเจนทั้งสองชนิดคือ เชื้อ *Staph. aureus* ที่วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทั้งสองชนิด ที่ระดับความเจือจางของ goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase เท่ากับ 1:5,000 นั้นยังคงให้สีน้ำเงินม่วงที่ชัดเจนในขณะที่ 1:10,000 ให้สีที่จางไม่ชัดเจน จึงเลือกใช้ conjugate ที่ 1:5,000 ไว้ทำการทดลองต่อไป

ปริมาณแอนติบอดี และ conjugate ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 5.2 และ 5.3 คือ แอนติบอดี (IgG บริสุทธิ์) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ conjugate 1:5,000 ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองส่วนอื่นต่อไป

6. การทดสอบปฏิกิริยาของ IgG บริสุทธิ์กับเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่นโดยวิธี dot-ELISA

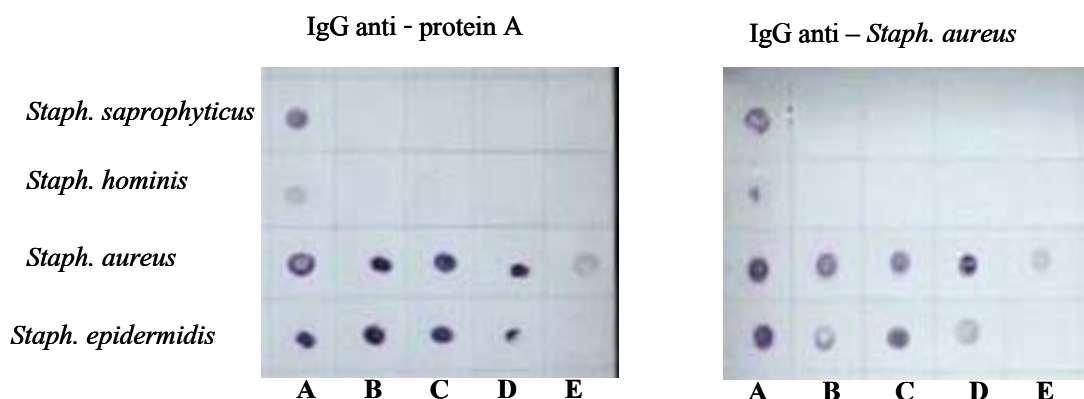
ใช้วิธี dot-ELISA เพื่อทดสอบว่า IgG ต่อเชื้อ *Staph. aureus* ทั้งเซลล์ และต่อโปรตีน เอ นั้นสามารถทำปฏิกิริยากับ *Staphylococcus* ชนิดอื่นได้หรือไม่ โดยใช้ปริมาณแอนติบอดี และ conjugate ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 5.2 และ 5.3 คือ แอนติบอดี 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ conjugate 1:5,000 แสดงผลในตารางที่ 8 และ 9

ตารางที่ 8 แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti-protein A (IgG บริสุทธิ์) ต่อเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่น

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	ระดับความเจือจางจากความเข้มข้นที่ OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1				
	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	1:100,000
	(10 ⁷ CFU/ml)	(10 ⁶ CFU/ml)	(10 ⁵ CFU/ml)	(10 ⁴ CFU/ml)	(10 ³ CFU/ml)
<i>Staph. aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>Staph. epidermidis</i>	+	+	+	+	-
<i>Staph. saprophyticus</i>	+	-	-	-	-
<i>Staph. hominis</i>	+	-	-	-	-

ตารางที่ 9 แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti-*Staph. aureus* (IgG บริสุทธิ์) ต่อเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่น

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	ระดับความเจือจางจากความเข้มข้นที่ OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1				
	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	1:100,000
	(10 ⁷ CFU/ml)	(10 ⁶ CFU/ml)	(10 ⁵ CFU/ml)	(10 ⁴ CFU/ml)	(10 ³ CFU/ml)
<i>Staph. aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>Staph. epidermidis</i>	+	+	+	+	-
<i>Staph. saprophyticus</i>	+	-	-	-	-
<i>Staph. hominis</i>	+	-	-	-	-



ภาพที่ 4 แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti-protein A และ anti-*Staph. aureus* (IgG บริสุทธิ์) ต่อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus*

หมายเหตุ ระดับความเจือจางความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

แถว A เท่ากับ 1: 10 (10^7 CFU/ml)

แถว B เท่ากับ 1: 100 (10^6 CFU/ml)

แถว C เท่ากับ 1: 1,000 (10^5 CFU/ml)

แถว D เท่ากับ 1: 10,000 (10^4 CFU/ml)

แถว E เท่ากับ 1: 100,000 (10^3 CFU/ml)

จากผลการทดลองตารางที่ 8 และ 9 ภาพที่ 4 จะเห็นว่าแอนติบอดีทั้งสองชนิดนี้สามารถตรวจเชื้อ *Staph. aureus* ได้ในระดับความเจือจางที่ 1:100,000 ตรวจเชื้อ *Staph. epidermidis* ได้ในระดับความเจือจางที่ 1:10,000 แต่ตรวจเชื้อ *Staph. saprophyticus* และ *Staph. hominis* ได้ในระดับความเจือจางที่ 1:10 ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณเปรียบเทียบกับผลการนับจำนวนเชื้อตามผลการทดลองข้อ 4. แสดงให้เห็นถึงความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อแต่ละชนิดคือ สามารถตรวจเชื้อ *Staph. aureus* ได้ที่จำนวน 10^3 CFU/ml ซึ่งสามารถตรวจได้ใกล้เคียงกับการตรวจด้วยวิธี One-Step immunochromatography assay (Huang, 2007) ส่วนเชื้อ *Staph. epidermidis* ได้ที่จำนวน 10^4 CFU/ml, *Staph. saprophyticus* และ *Staph. hominis* ได้ที่จำนวน 10^7 CFU/ml แต่อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวแสดงว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่น แสดงว่าไม่มีความจำเพาะ หรือ specificity ต่อเชื้อ *Staph. aureus* เพียงชนิดเดียว ซึ่งถ้าจะนำไปใช้งานในการ

ตรวจเฉพาะเชื้อ *Staph. aureus* จำเป็นต้องเพิ่มเติมวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนแรกก่อนการทำ dot-ELISA เพื่อคัดเลือเชื้อ *Staph. aureus* และยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น

7. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม ของ IgG บริสุทธิ์ต่อทั้งเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* และ IgG บริสุทธิ์ต่อ โปรตีน เอ ต่อเชื้อกลุ่ม non- Staphylococcal

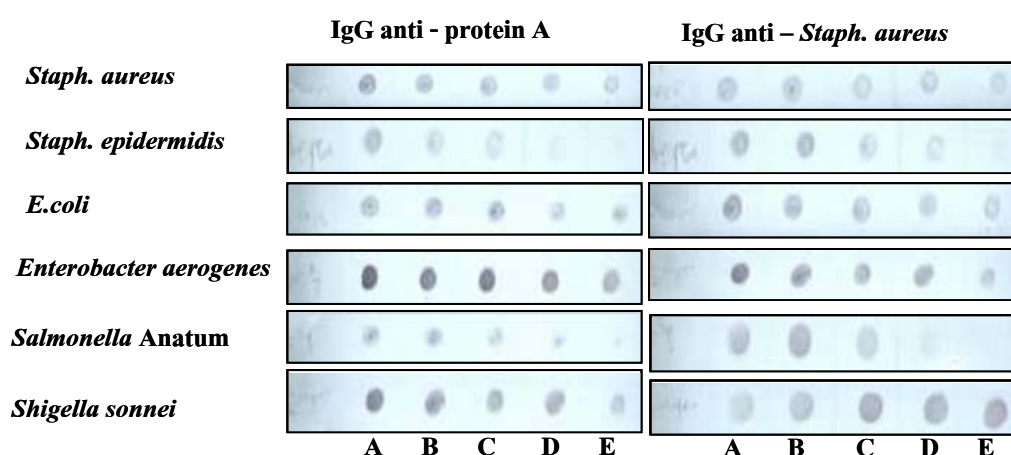
ผลการใช้วิธี dot-ELISA เพื่อทดสอบว่าเมื่อใช้ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Staph. aureus* ทั้ง เซลล์และ IgG บริสุทธิ์ ต่อโปรตีน เอ ว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับแบคทีเรียกลุ่ม non-Staphylococcal ในกลุ่ม enterobacteriaceae จำนวน 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum* และ *Shigella sonnei* แสดงผลในตารางที่ 10 ,11 และภาพที่ 5

ตารางที่ 10 แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti-protein A (IgG บริสุทธิ์) ต่อแบคทีเรียกลุ่ม non- Staphylococcal ในกลุ่ม enterobacteriaceae

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	ระดับความเจือจางจากความเข้มข้นที่ OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1				
	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	1:100,000
	(10 ⁷ CFU/ml)	(10 ⁶ CFU/ml)	(10 ⁵ CFU/ml)	(10 ⁴ CFU/ml)	(10 ³ CFU/ml)
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	+	+
<i>Salmonella Anatum</i>	+	+	+	+	-
<i>Shigella sonnei</i>	+	+	+	+	+

ตารางที่ 11 แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti-*Staph. aureus* (IgG บริสุทธิ์) ต่อแบคทีเรียกลุ่ม non- Staphylococcal ในกลุ่ม enterobacteriaceae

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	ระดับความเจือจางจากความเข้มข้นที่ OD ₆₀₀ เท่ากับ 0.1				
	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	1:100,000
	(10 ⁷ CFU/ml)	(10 ⁶ CFU/ml)	(10 ⁵ CFU/ml)	(10 ⁴ CFU/ml)	(10 ³ CFU/ml)
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	+	+
<i>Salmonella Anatum</i>	+	+	+	+	-
<i>Shigella sonnei</i>	+	+	+	+	+



ภาพที่ 5 แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ anti-protein A และ anti-*Staph. aureus* (IgG บริสุทธิ์) ต่อแบคทีเรียกลุ่ม non- Staphylococcal ในกลุ่ม enterobacteriaceae

หมายเหตุ ระดับความเจือจางจากความเข้มข้นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

แถว A เท่ากับ 1: 10 (10⁷ CFU/ml)

แถว B เท่ากับ 1: 100 (10⁶ CFU/ml)

แถว C เท่ากับ 1: 1,000 (10⁵ CFU/ml)

แถว D เท่ากับ 1: 10,000 (10⁴ CFU/ml)

แถว E เท่ากับ 1: 100,000 (10³ CFU/ml)

จากผลในตารางที่ 10, 11 และภาพที่ 5 แสดงให้เห็นถึงผลของการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อในกลุ่ม enterobacteriaceae บางชนิดซึ่งจะเป็นอุปสรรคสำคัญในการนำวิธี dot-ELISA นี้ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Staph.aureus* ในตัวอย่างอาหารต่อไป การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มทั้งกับ *Staphylococcus* ชนิดอื่นและกลุ่ม enterobacteriaceae อาจเกิดจากการใช้ โพลีโคลนอล แอนติบอดีซึ่งมีความจำเพาะหรือสามารถทำปฏิกิริยากับหลายๆ epitope บนเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันอาจจะมี epitope บนเซลล์ที่มีความเหมือนหรือคล้ายกัน จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม ปัญหาเหล่านี้จะต้องแก้ไขก่อนการนำไปใช้ตรวจด้วยวิธี dot-ELISA (กฤษฎา, 2552) โดยการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อกลุ่มเหล่านี้ในอาหารที่ใช้คัดเลือกเฉพาะเชื้อ *Staph.aureus* ให้เจริญได้ดีและยับยั้งเชื้ออื่นไม่ให้เจริญก่อนการตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ซึ่งโดยทั่วไปก่อนการตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยาอื่นๆ ก็จะต้องมีการ pre-enrichment ในอาหาร enrichment broth ก่อนอย่างน้อย 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ส่วนวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาทั่วไปก็มักปฏิบัติเช่นเดียวกัน (Bennett and Lancete, 1998) ดังนั้นในการทดลองต่อไปโดยใช้อาหาร selective enrichment broth ได้แก่ Baird-Parker broth จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเพื่อ pre-enrichment และคัดเลือกเชื้อ *Staph.aureus* ไปพร้อมกันโดยไม่เสียเวลาเพิ่มขึ้น

8. การวัดการเจริญของเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยวิธี การวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ตรวจนับจำนวนเชื้อต่างๆ โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มเชื้อสายพันธุ์ *Staphylococcus* จำนวน 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* และ *Staphylococcus saprophyticus* และเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non- *Staphylococcal* ในกลุ่ม enterobacteriaceae จำนวน 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* Anatum และ *Shigella sonnei* แสดงผลในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงการเจริญของเชื้อทดสอบในอาหาร Baird-Parker broth ที่บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	การเจริญของเชื้อโดยวัดค่าที่ OD ₆₀₀ ในระดับความเจือจาง				
	1:10 (10 ⁷ CFU/ml)	1:100 (10 ⁶ CFU/ml)	1:1,000 (10 ⁵ CFU/ml)	1:10,000 (10 ⁴ CFU/ml)	1:100,000 (10 ³ CFU/ml)
<i>Staph. aureus</i>	1.047	0.861	0.744	0.357	0.079
<i>Staph. epidermidis</i>	0.903	0.060	0.007	0.014	0.005
<i>Staph. saprophyticus</i>	0.799	0.084	0.048	0.013	0.038
<i>Staph. hominis</i>	0.274	0.056	0.048	0.023	0.046
<i>Escherichia coli</i>	0.016	0.018	0.020	0.020	0.017
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.004	0.005	0.018	0.021	0.023
<i>Salmonella Anatum</i>	0.057	0.015	0.019	0.003	0.013
<i>Shigella sonnei</i>	0.070	0.010	0.020	0.015	0.017

ผลในตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทุกชนิดจะถูกยับยั้งการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth ซึ่งเป็นอาหาร selective enrichment broth ที่ใช้เพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกเชื้อ *Staph. aureus* ซึ่งจากผลการวัดความขุ่นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Staph. aureus* เจริญได้ดีถึงแม้จะเพาะเชื้อเริ่มต้นในปริมาณน้อย จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่วัดความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 นั้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมานับจำนวนเชื้อด้วยวิธี dilution plate count พบว่าการเจริญ ในขณะที่เชื้อกลุ่ม non- Staphylococcal ไม่มีการเจริญเมื่อนำไปวัดความขุ่นที่ OD₆₀₀ ภายหลังนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

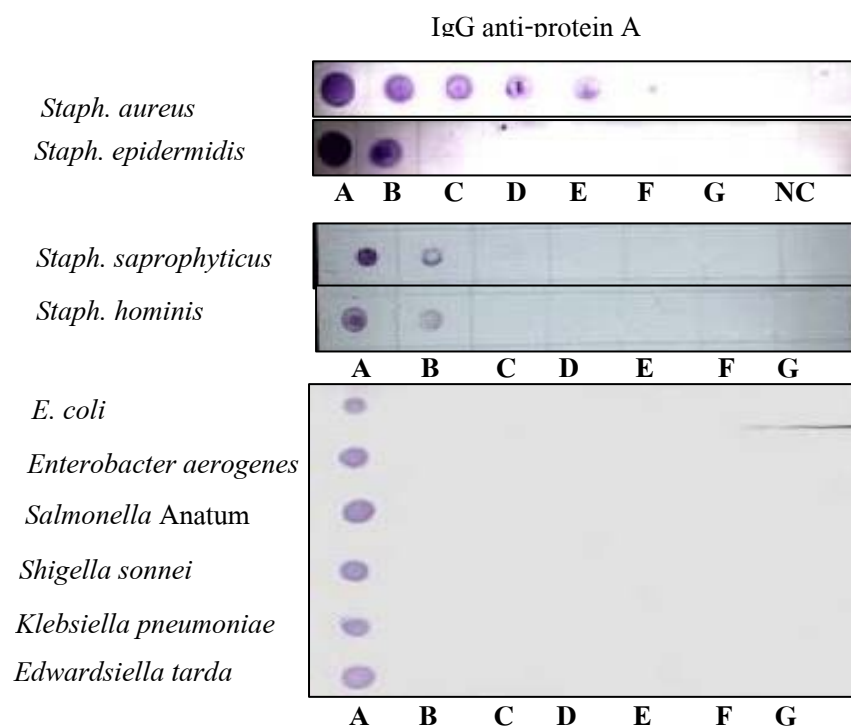
9. การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Baird-Parker broth ก่อนการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 7 การทำ dot-ELISA เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่นๆ คือ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* และ *Staphylococcus saprophyticus* รวมทั้งเกิดกับเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non- Staphylococcal ในกลุ่มของ enterobacteriaceae คือ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum* และ

Shigella sonnei จึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร Baird-Parker broth เพื่อการคัดเลือกเชื้อ และ pre-enrich ไปด้วยในขั้นต้น ก่อนตรวจด้วยวิธี dot-ELISA ซึ่งวิธีทั่วไปในการตรวจเชื้อในตัวอย่างอาหารทั้งวิธีทางอิมมูโนวิทยาและวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาจะต้องปฏิบัติอยู่แล้วโดยอาจจะเลือกใช้อาหาร enrichment broth หรือ selective enrichment broth สำหรับ Baird-Parker broth จัดว่าเป็น selective enrichment broth ที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ *Staph. aureus* ให้เจริญได้ดีและขณะเดียวกันยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่มที่ไม่ใช่ *Staph. aureus* การทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนแล้วจึงตรวจด้วยวิธี dot-ELISA แสดงผลดังในตารางที่ 13 และ 14 ภาพที่ 6 และ 7

ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ anti-protein A ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	การเจริญของเชื้อโดยวัดค่าที่ OD ₆₀₀ ในระดับความเจือจาง				
	1:10 (10 ⁷ CFU/ml)	1:100 (10 ⁶ CFU/ml)	1:1,000 (10 ⁵ CFU/ml)	1:10,000 (10 ⁴ CFU/ml)	1:100,000 (10 ³ CFU/ml)
<i>Staph. aureus</i>	+	+	+	+	-
<i>Staph. epidermidis</i>	+	-	-	-	-
<i>Staph. saprophyticus</i>	+	-	-	-	-
<i>Staph. hominis</i>	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Anatum</i>	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	-



ภาพที่ 6 แสดงผลการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ anti-protein A ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ ระดับความเจือจางจากความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

แถว A เท่ากับ Positive control (protein A)

แถว B เท่ากับ 1: 10 (10^7 CFU/ml)

แถว C เท่ากับ 1: 100 (10^6 CFU/ml)

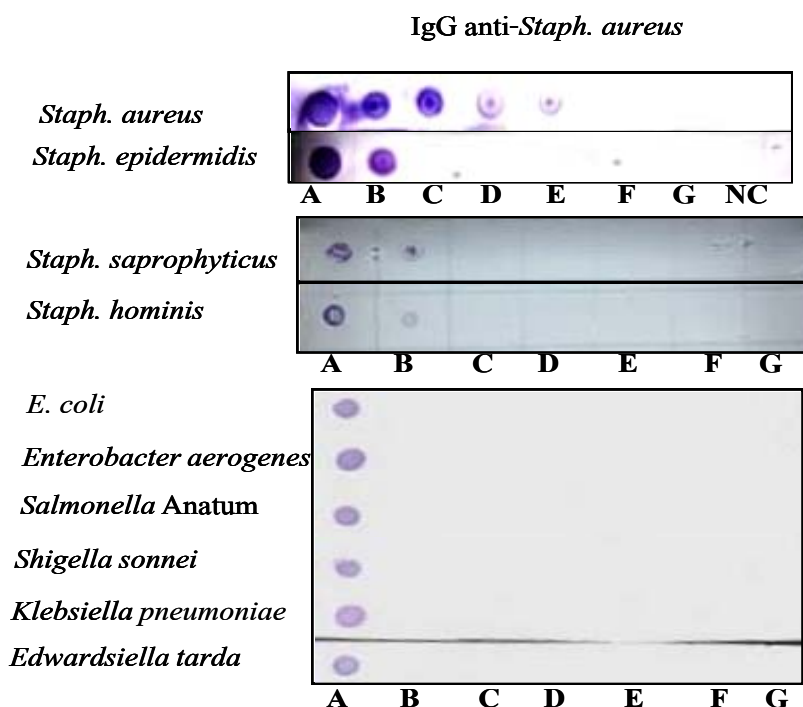
แถว D เท่ากับ 1: 1,000 (10^4 CFU/ml)

แถว E เท่ากับ 1: 10,000 (10^3 CFU/ml)

แถว NC เท่ากับ Negative Control

ตารางที่ 14 แสดงผลการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ anti-*Staph. aureus* ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	การเจริญของเชื้อโดยวัดค่าที่ OD ₆₀₀ ในระดับความเจือจาง				
	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	1:100,000
	(10 ⁷ CFU/ml)	(10 ⁶ CFU/ml)	(10 ⁵ CFU/ml)	(10 ⁴ CFU/ml)	(10 ³ CFU/ml)
<i>Staph. aureus</i>	+	+	+	+	-
<i>Staph. epidermidis</i>	+	-	-	-	-
<i>Staph. saprophyticus</i>	+	-	-	-	-
<i>Staph. hominis</i>	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Anatum</i>	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	-



ภาพที่ 7 แสดงผลการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ anti-*Staph. aureus* ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ ระดับความเจือจางจากความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1

แถว A เท่ากับ Positive control (protein A)

แถว B เท่ากับ 1: 10 (10^7 CFU/ml)

แถว C เท่ากับ 1: 100 (10^6 CFU/ml)

แถว D เท่ากับ 1: 1,000 (10^4 CFU/ml)

แถว E เท่ากับ 1: 10,000 (10^3 CFU/ml)

แถว NC เท่ากับ Negative Control

จากผลการทดลองในตารางที่ 13 ภาพที่ 6 และ ตารางที่ 14 ภาพที่ 7 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Baird-Parker broth ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงนำมาตรวจด้วยวิธี dot-ELISA จะไม่พบเชื้ออื่นเลยแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบทุกชนิด ยกเว้นเชื้อ *Staph. aureus* ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้น้อยมากในอาหาร Baird-Parker broth ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในข้อ 8. ดังนั้นเมื่อนำอาหาร Baird-Parker broth ที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดมาตรวจด้วย

วิธี dot-ELISA จึงตรวจไม่พบเชื้ออื่น ตรวจพบแต่เชื้อ *Staph. aureus* ได้ที่ความเจือจาง 1:10,000 (10^4 CFU/ml) ซึ่งเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth (อาหารเลี้ยงเชื้อ 9 ml โดยผสมเชื้อ 1 ml) ดังนั้นความสามารถในการตรวจเชื้อจะอยู่ที่จำนวน 10^3 CFU/ml ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับผลที่ได้ก่อนจะใช้อาหาร Baird-Parker broth เพื่อกำจัดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มก่อนตรวจด้วยวิธี dot-ELISA จากผลของการใช้ IgG ต่อทั้งเซลล์ของ *Staph. aureus* และ IgG ต่อ โปรตีน เอ ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อนำมาใช้ตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus*

10. การใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อน (artificial contaminated food) ที่เตรียมขึ้น

ผลการทดลองโดยแบ่งเชื้อเป็น 5 กลุ่ม แล้วผสมเชื้อที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นกันในตัวอย่างอาหาร คือ ไข่กรอกไก่ โดยใช้เชื้อที่เจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^4 และ 10^5 CFU/g อาหาร แล้วเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจด้วยวิธี dot-ELISA แสดงผลในตารางที่ 15, 16 และภาพที่ 8, 9 ตามลำดับ

ตารางที่ 15 แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อน (artificial contaminated food) โดยใช้ IgG ต่อ anti-protein A

กลุ่มของเชื้อ	ผลการทำ dot-ELISA	
	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/g	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/g
กลุ่มที่ 1	+	+
กลุ่มที่ 2	+	+
กลุ่มที่ 3	+	+
กลุ่มที่ 4	-	-
กลุ่มที่ 5	-	-

กลุ่มของเชื้อ	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (CFU/g)	
	10^4	10^5
กลุ่มที่ 1		
กลุ่มที่ 2		
กลุ่มที่ 3		
กลุ่มที่ 4		
กลุ่มที่ 5		

ภาพที่ 8 แสดงภาพผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อน (artificial contaminated food) โดยใช้ IgG ต่อ anti-protein A

หมายเหตุ แบ่งเชื้อเป็น 5 กลุ่ม แล้วผสมเชื้อที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในตัวอย่างอาหาร คือ ไล์กรอกไก่ โดยใช้เชื้อที่เจือจางความเข้มข้นเท่ากับ 10^4 และ 10^5 CFU/g อาหาร

กลุ่มที่ 1 คือ เชื้อ *Staph. aureus*

กลุ่มที่ 2 คือ เชื้อ *Staph. aureus* และ *Staph. epidermidis*

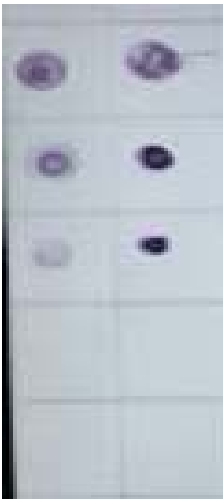
กลุ่มที่ 3 คือ เชื้อ *Staph. aureus*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum*, และ *Shigella sonnei*

กลุ่มที่ 4 คือ เชื้อ *Staph. epidermidis*

กลุ่มที่ 5 คือ เชื้อ *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum* และ *Shigella sonnei*

ตารางที่ 16 แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อน (artificial contaminated food) โดยใช้ IgG ต่อ *anti-Staph. aureus*

กลุ่มของเชื้อ	ผลการทำ dot-ELISA	
	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/g	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/g
กลุ่มที่ 1	+	+
กลุ่มที่ 2	+	+
กลุ่มที่ 3	+	+
กลุ่มที่ 4	-	-
กลุ่มที่ 5	-	-

กลุ่มของเชื้อ	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (CFU/g)	
	10^4	10^5
กลุ่มที่ 1		
กลุ่มที่ 2		
กลุ่มที่ 3		
กลุ่มที่ 4		
กลุ่มที่ 5		

ภาพที่ 9 แสดงภาพผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจเชื้อผสมในอาหารที่ถูกทำให้ปนเปื้อน (artificial contaminated food) โดยใช้ IgG ต่อ anti-*Staph. aureus*

หมายเหตุ แบ่งเชื้อเป็น 5 กลุ่ม แล้วผสมเชื้อที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในตัวอย่างอาหาร คือ
 ไข่กรอกไก่ โดยใช้เชื้อที่เจือจางความเข้มข้นเท่ากับ 10^4 และ 10^5 CFU/g อาหาร
 กลุ่มที่ 1 คือ เชื้อ *Staph. aureus*
 กลุ่มที่ 2 คือ เชื้อ *Staph. aureus* และ *Staph. epidermidis*
 กลุ่มที่ 3 คือ เชื้อ *Staph. aureus*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum*,
 และ *Shigella sonnei*
 กลุ่มที่ 4 คือ เชื้อ *Staph. epidermidis*
 กลุ่มที่ 5 คือ เชื้อ *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum*
 และ *Shigella sonnei*

จากตารางที่ 15, 16 และภาพที่ 8, 9 แสดงให้เห็นว่าการใช้อาหาร Baird-Parker broth เพื่อ pre-enrich และคัดเลือกเชื้อ *Staph. aureus* ทำให้ตัวอย่างอาหารที่เตรียมขึ้นในกลุ่มที่ไม่มีเชื้อ *Staph. aureus* จะให้ผลการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA เป็นลบแต่กลุ่มที่มีเชื้อ *Staph. aureus* ให้ผลการทดลองเป็นบวก โดยที่เชื้อกลุ่ม enteric bacteria หรือแม้แต่ *Staph. epidermidis* ก็ไม่มีผลรบกวนการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA ซึ่งเป็นการยืนยันว่าอาหาร Baird-Parker broth จะช่วยยับยั้งการเจริญของ

เชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่นและ enteric bacteria ที่ปนเปื้อนในอาหาร แต่ช่วยส่งเสริมและคัดเลือกเชื้อ *Staph. aureus* ได้ดี

11. การใช้วิธี dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิดจากแหล่งขาย เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ผลการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่างอาหารจากแหล่งขายโดยวิธี dot-ELISA และทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาควบคู่ไปด้วยกัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 17 และ 18

ตารางที่ 17 แสดงผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิดจากแหล่งขาย เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ตัวอย่างอาหาร	ผลการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA		ผลการตรวจทางจุลชีววิทยา
	anti-protein A IgG	anti- <i>Staph. aureus</i> IgG	
1. แครก 1	+	+	+
2. ขนมเปียกปูน	+	+	+
3. ขนมชั้น	+	+	+
4. ขนมเมื่ดขนุน	-	-	-
5. ขนมจีน	-	-	-
6. ไข่กรอกไก่	-	-	-
7. ไข่กรอกหมู	-	-	-
8. ลูกชิ้นหมู	-	-	-
9. แหนมหมู	-	-	-
10. ขนมปังกรอบ	-	-	-
11. แครก 2	+	+	+
12. แครก 3	+	+	+
13. ขนมปังสังขยา	+	+	+
14. ขนมปังไส้ครีม	+	+	+
15. ข้าวเหนียวปิ้ง	+	+	+

ตารางที่ 17 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ผลการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA		ผลการตรวจ ทางจุลชีววิทยา
	anti-protein A IgG	anti- <i>Staph. aureus</i> IgG	
16. ไส้กรอกไก่ทอด	-	-	-
17. หอยจืดทอด	-	-	-
18. ขนมจีน 2	+	+	+
19. ขนมจีน 3	+	+	+
20. แครกเกอร์	-	-	-

ตารางที่ 18 แสดงภาพผลการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจหาเชื้อในตัวอย่างอาหารบางชนิดจากแหล่ง
ขายเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ตัวอย่างอาหาร	ผลการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA		ผลการตรวจ ทางจุลชีววิทยา
	Anti-protein A IgG	Anti- <i>Staph. aureus</i> IgG	
1. แอเคร์ 1			+
2. ขนมเปียกปูน			+
3. ขนมชั้น			+
4. ขนมเมื่อดขนุน			-
5. ขนมจีน			-
6. ไข่กรอกไก่			-
7. ไข่กรอกหมู			-
8. ลูกชิ้นหมู			-
9. แหนมหมู			-
10. ขนมปังกรอบ			-
11. แอเคร์ 2			+
12. แอเคร์ 3			+
13. ขนมปังสังขยา			+
14. ขนมปังไส้ครีม			+
15. ข้าวเหนียวปิ้ง			+
16. ไข่กรอกไก่ทอด			-
17. หอยจืดทอด			-
18. ขนมจีน 2			+
19. ขนมจีน 3			+
20. แครกเกอร์			-

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA นั้นให้ผลบวกเหมือนกับการตรวจด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาทั่วไปซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้วิธี dot-ELISA สามารถนำไปใช้ในการตรวจเชื้อ *Staph. aureus* ได้ดีเหมือนการตรวจด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา แต่ใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่ามาก คือ เมื่อรวมเวลาในการเลี้ยงเชื้อใน selective enrichment broth แล้วใช้เวลาประมาณ 30 ชั่วโมงเท่านั้นและที่สำคัญคือประหยัดค่าใช้จ่าย

จากตารางที่ 17 และ 18 แสดงให้เห็นได้ว่าการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการทำ dot-ELISA มีความสอดคล้องกับวิธีตรวจมาตรฐานทางจุลชีววิทยา จึงน่าจะนำมาใช้ในการตรวจเชื้อ *Staph. aureus* เพื่อช่วยลดเวลาในการตรวจลง เนื่องจากวิธีการนี้ใช้เวลาตรวจประมาณ 5 ชั่วโมง เมื่อรวมกับขั้นตอนการ pre-enrichment และคัดเลือกแล้ว ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 30 ชั่วโมง ในขณะที่วิธีการตรวจทางจุลชีววิทยาแบบมาตรฐาน เช่น ISO 6888-1:1999 จะใช้เวลาตั้งแต่การแยกเชื้อไปจนถึงการจำแนกชนิดหรือระบุชนิดของเชื้อ ใช้เวลารวมทั้งสิ้นประมาณ 5-6 วัน

ในการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานแล้ว จะมีข้อดีตรงที่ประสิทธิภาพในการตรวจพอๆ กัน แต่ใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่ามาก ถ้ามีตัวอย่างจำนวนมากสามารถทำพร้อมกันใน chamber เดียวกันได้ซึ่งเพิ่มความสะดวกให้แก่ผู้ปฏิบัติงาน ใช้พื้นที่ในการปฏิบัติงานน้อย สารเคมี หรือ reagents ต่างๆ ก็น้อยมาก ในขณะที่วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดตั้งแต่ขั้นตอน pre-enrichment จนถึงขั้นตอนการตรวจลักษณะทางชีวเคมี ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีราคาแพง และถ้ามีตัวอย่างจำนวนมากก็ต้องใช้พื้นที่ในการทำงานและพื้นที่ในการบ่มเชื้อและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจำนวนมากตามไปด้วย ข้อเสียของวิธี dot-ELISA เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาก็ คือ ต้องมีขั้นตอนการเตรียมโพลีโคลนอลแอนติบอดีรวมทั้งการ purify เพื่อให้ได้แอนติบอดี IgG บริสุทธิ์เอง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยามีจำหน่ายเป็นอาหารสำเร็จรูป หรือเป็นอาหารพร้อมใช้งาน (prepared medium) ซึ่งจะลดขั้นตอนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไปได้

เมื่อเทียบกับวิธีรวดเร็วอื่นๆ เช่น PCR วิธี dot-ELISA นั้นจะใช้ระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน ราคาต่อตัวอย่างจะถูกกว่า และไม่ต้องใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่จำเพาะเหมือนกับวิธี PCR ที่จำเป็นต้องใช้เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ร่วมกับ reagents ที่มีราคาแพง แต่ขั้นตอนในการทำ dot-ELISA นั้นจะยุ่งยากกว่าเล็กน้อย สำหรับการทำให้ dot-ELISA ร่วมกับการใช้อาหาร Baird-Parker broth ที่ทำในการทดลองครั้งนี้ เมื่อรวมค่าสารเคมีที่ใช้และอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะมีราคาประมาณ 20 บาทต่อตัวอย่างเท่านั้น

ข้อเสียของการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจทางอิมมูโนวิทยาก็คือ การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแบคทีเรียอื่นที่มีความใกล้เคียง (จากผลการทดลองข้างต้น) ซึ่งหมายถึง การขาดความจำเพาะ (specificity) แต่ก็แก้ปัญหานี้ได้ด้วย การใช้วิธีทางจุลชีววิทยา โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร selective broth ที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อเฉพาะกลุ่มเข้ามารวม การวิจัยในเรื่องนี้มีความคาดหวังในครั้งแรกว่าถ้าใช้ IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ ซึ่งเชื้อ *Staph. aureus* จะสร้างได้ในขณะที่ *Staphylococcus* สายพันธุ์อื่นไม่สร้างหรือสร้างน้อยมาก (Maxim *et al.*, 1997) IgG ดังกล่าวเมื่อนำมาทำปฏิกิริยาหรือนำมาตรวจเชืื่อน่าจะมีความจำเพาะกับ *Staph. aureus* มากกว่าการใช้ IgG ต่อทั้งเซลล์ของ *Staph. aureus* ซึ่งน่าจะเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับ *Staphylococcus* ชนิดอื่นๆ ได้ แต่จากผลการทดลองที่ได้ กลับปรากฏว่าไม่ว่าจะใช้ IgG ต่อโปรตีน เอ (anti-protein A) หรือ IgG ต่อทั้งเซลล์ของ *Staph. aureus* (anti-*Staph. aureus*) ก็เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับ *Staphylococcus* สายพันธุ์อื่น ซึ่งแสดงว่าการจับกับ IgG ทั้งสองแบบที่ผลิตนั้นไม่ให้ผลที่แตกต่างกัน รวมทั้งเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแบคทีเรียใน enterobacteriaceae บางชนิดที่เลือกมาทดสอบด้วย จึงจัดว่า IgG บริสุทธิ์ที่เตรียมขึ้นมาใช้งานทั้ง 2 ชนิดไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Staph. aureus* ซึ่งจำเป็นจะต้องแก้ปัญหาโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร selective enrichment broth คือ Baird-Parker broth ก่อนที่จะนำไปตรวจด้วยวิธี dot-ELISA ซึ่งก็สามารถแก้ปัญหาได้ในระดับหนึ่ง

เหตุผลประการหนึ่งที่เป็นไปได้ในกรณีของความไม่จำเพาะของ anti-protein A น่าจะเกิดจาก protein A ที่ใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติบอดีนั้นเป็น rec-protein A คือ recombinant ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Staph. aureus* โดยวิธีทาง recombinant technology (Tan *et al.*, 2002) จึงอาจเป็นสาเหตุของการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมขึ้นจากการฉีดด้วยเชื้อ *Staph. aureus* ทั้งเซลล์และการฉีดด้วย โปรตีน เอ นั้นมาตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองชนิดในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ conjugate ความเจือจาง 1:5,000 พบว่าสามารถตรวจเชื้อ *Staph. aureus* ได้ที่จำนวน 10^3 CFU/ml แต่เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มจึงต้องใช้อาหาร Braid-Parker broth เพาะเลี้ยงเชื้อก่อน

การใช้อาหาร Braid-Parker broth เพาะเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร่วมกับการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองชนิด คือ IgG ต่อโปรตีน เอ และ IgG ต่อ *Staph. aureus* ในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ conjugate ความเจือจาง 1:5,000 ทำให้สามารถตรวจเชื้อ *Staph. aureus* ได้ที่จำนวน 10^3 CFU/กรัมอาหาร เท่ากับการตรวจเชื้อที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงในอาหาร Baird-Parker broth โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่นๆ เช่น *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* และ *Staphylococcus saprophyticus* รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม enteric อื่นๆ เช่น *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella Anatum* และ *Shigella sonnei* เป็นต้น ซึ่งแสดงถึง sensitivity ที่ดีของวิธี dot-ELISA ที่ทำการทดลอง ถึงแม้ว่าในด้านของ specificity อาจไม่สมบูรณ์เท่าที่ควร เนื่องจากใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี แต่ก็สามารถกำจัดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มที่เกิดขึ้นได้ โดยใช้อาหาร Braid-Parker broth เพาะเลี้ยงเชื้อก่อน ในการตรวจเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA รวมทั้งการเลี้ยงเชื้อใน selective enrichment จะใช้เวลาในการตรวจเพียง 30 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาประมาณ 3 เท่าที่ใช้เวลา 5 ถึง 6 วัน ใช้สารในปริมาณน้อย ทง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีราคาแพง สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

การใช้วิธี dot-ELISA โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Baird-Parker broth นำไปใช้เพื่อตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่างอาหารพบว่าได้ผลตรงกับวิธีตรวจตามมาตรฐานทางจุลชีววิทยา รวมทั้งสามารถใช้ตรวจเชื้อที่ตายแล้วได้ด้วยโดยตรวจหาโปรตีน เอ แทนการตรวจหาตัวเชื้อ *Staph. aureus* โดยตรง

การใช้วิธี dot-ELISA โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Baird-Parker broth นำไปใช้เพื่อตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่างอาหารพบว่าได้ผลตรงกับวิธีตรวจตามมาตรฐานทางจุลชีววิทยานั้นอาจไม่สามารถใช้กำหนดมาตรฐานอาหารที่แน่นอนได้ แต่อาจสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อในกรณีที่เกิดการระบาดของโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Staph. aureus* ได้

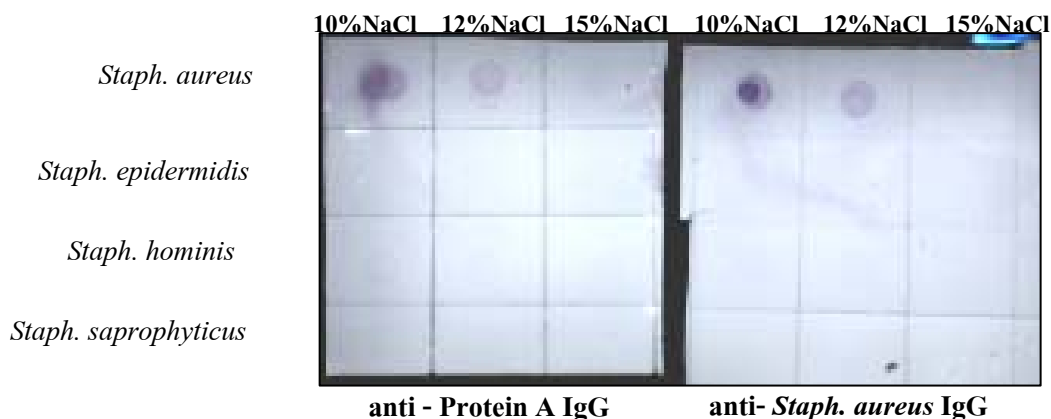
ข้อเสนอแนะ

จากการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ IgG บริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดนั้น จึงจำเป็นต้องกำจัดการเกิดปฏิกิริยานี้ก่อนนำไปใช้ตรวจหาเชื้อด้วยวิธี dot-ELISA ซึ่งการกำจัดการได้หลายวิธี คือ การใช้วิธีการ absorb IgG ด้วยแอนติเจนที่ต้องการกำจัดก่อนเพื่อให้เหลือเฉพาะส่วนที่จับกับ epitope ที่ต้องการเท่านั้นจึงนำไปใช้ หรือการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อประเภท selective enrichment กำจัดเชื้อที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มก่อน รวมทั้งการใช้คุณสมบัติของเชื้อนี้ในการทนเกลือ (NaCl) ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ซึ่งให้ผลที่ดีและสีของอาหารไม่รบกวนการตรวจด้วยวิธี dot-ELISA ซึ่งผู้วิจัยได้ทดลองปฏิบัติตามแนวความคิดนี้ พบว่าได้ผลที่ดีมากกว่าการใช้ Baird-Parker broth เพราะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus* ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองได้โดยดูจากค่า OD₆₀₀

ผลการเจริญและการทำ dot-ELISA ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหาร TSB ที่มีปริมาณ NaCl แตกต่างกัน

ตารางที่ 19 แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหาร TSB ที่มีปริมาณ NaCl แตกต่าง

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	10%NaCl	12%NaCl	15%NaCl
<i>Staph. aureus</i>	0.122	0.080	0.001
<i>Staph. epidermidis</i>	0.027	0.006	0.001
<i>Staph. saprophyticus</i>	0.003	0.002	0.000
<i>Staph. hominis</i>	0.030	0.007	0.003
<i>Escherichia coli</i>	0.002	0.000	0.000
<i>Shigella sonnei</i>	0.005	0.000	0.000
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.003	0.000	0.000
<i>Salmonella Anatum</i>	0.006	0.000	0.000



ภาพที่ 10 แสดงผลการทำ dot-ELISA ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่มีปริมาณ NaCl แตกต่างกัน

จากตารางที่ 19 และภาพที่ 10 นั้นจะเห็นว่าผลการเจริญของเชื้อทั้งกลุ่ม *Staphylococcus* และ non-*Staphylococcal* ในอาหาร TSB ที่ความเข้มข้นของ NaCl ที่ 10%, 12% และ 15% นั้นสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ในขณะที่เชื้อ *Staph. aureus* นั้นยังสามารถเจริญได้จากคุณสมบัติของเชื้อที่ทนเกลือโดยดูจากค่า OD₆₀₀ ที่อ่านได้ และเมื่อตรวจด้วยวิธีการทำ dot-ELISA พบว่าให้ผลบวกที่ชัดเจนในขณะที่เชื้อชนิดอื่นให้ผลลบ

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้อาหาร TSB ที่มีเกลือ (NaCl) 10% นั้นสามารถนำมาใช้เป็น selective enrichment เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่นได้ดี ซึ่งจะช่วยในการกำจัดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม ก่อนการตรวจ *Staph. aureus* ด้วยวิธี dot-ELISA ได้เป็นอย่างดี ซึ่งอาจจะให้ผลการตรวจที่ดีกว่าการใช้อาหาร Baird-Parker broth เสียอีก

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤษฎา ตู๊จันดา. 2551. การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ โพลีโคลนอลแอนติบอดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กองระบาดวิทยา. 2537. รายงานการเฝ้าระวังโรคประจำสัปดาห์. สำนักงานปลัดกระทรวง สาธารณสุข, กรุงเทพฯ.
- ธาริยา เสาวรัญ. 2540. การปรับปรุงคุณภาพทางจุลชีววิทยาในเครื่องดื่มจากสถานศึกษาบางแห่ง ในจังหวัด สงขลา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 39 (4): 243-251.
- เนาวรัตน์ สุพรรณภานัน. 2540. การปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในอาหารทะเลผ่าน ความร้อนแช่เยือกแข็งเพื่อการส่งออก. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 39 (2): 95-103.
- พราว ศุภจริยาวัตร, องอาจ เลหาวินิจ และ พัชรีย์ สุนทรนนท. 2552. การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่สร้างเอนโทโรท็อกซินและดื้อต่อยา methicillin และ vancomycin จากอาหารพร้อมบริโภค ภายในวิทยาเขตบางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และตลาดสี่แยกเกษตร, น. 431-439. ใน การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- _____. 2552. การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์สร้างเอนโทโรท็อกซิน จากอาหารจำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พัชรีย์ สุนทรนนท. 2552. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ แบคทีเรียในตัวอย่างน้ำและอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เฟื่องฟ้า อุตราชต์กิจ. 2542. เอกสารประกอบการเรียน วิชา food microbiology. ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ. (อัคราเนนา)

- ภานุกิจ กันหาจันทร์. 2546. การแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนโทโร
 ท็อกซินและทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าในโรงพยาบาลใน
 กรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มาลัย บุญรัตน์กรกิจ, สิริพร สธนเสาวภาคย์, พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์ และ จันทิมา จาปเกษตร.
 2543. คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ต.
 วารสารวิทยาศาสตร์ ม.ก. 35 (1): 205-211.
- สำนักกระบวนวิชา. 2548. รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษ ประจำปี 2548.
 กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ.
- เสถียร วิชัยลักษณ์ และ สืบวงศ์ วิชัยลักษณ์. 2522. พระราชบัญญัติอาหาร. นิติเวช, กรุงเทพฯ.
- Aasen, J. and P. Oeding. 1971. Antigenic studied on *Staphylococcus epidermidis*. **Acta. Path.
 Microbiol. Scand. Section B** 79: 827-834.
- Adesiyum, A.A., M. Eschbach, W. Lenz and K.P. Schaal. 1992. Detection of
 enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strain: a comparative use of the modified
 Ouchterlony precipitation test, reversed passive latex agglutination test, and avidin -
 biotin ELISA. **Can. J. Microbiol.** 38: 1097-1101.
- Archibad, A.R. 1972. The chemistry of *Staphylococcal* cell wall, pp. 75-109. In J.D. Cohen, ed.
The Staphylococci. Wiley-Interscience, New York.
- Arvola, T., T. Ruuska, J. Keranen, H. Hyoty, S. Salminen and E. Isolauri. 2006. Rectal bleeding
 in infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. **Pediatrics** 117 (4):
 e760-8.

- Atanassova, V., A. Meindl and C. Ring. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **Int. J. Food Microbiol.** 68: 105-113.
- Balaban, N. and A. Rasooly. 2000. Staphylococcal enterotoxins. **Int. J. Food Microbiol.** 61: 1-10.
- Baron, E.J. and S.M. Finegold. 1990. **Diagnostic Microbiology**. 8th ed. The C.V. Mosby company, Toronto.
- Bartelt, M.A. 2000. **Diagnostic bacteriology: A study guide**. F.A. Davis company, USA.
- Bennett, R.W. 2001. *Staphylococcus aureus*, pp. 201-220. In R.G., Labbe and S. Garcia, eds. **Guide to food borne pathogens**. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- _____ and G.A. Lancette. 1998. *Staphylococcus aureus*, pp. 12.01-12.06. In Anonymous, ed. **FDA bacteriology analytical manual**. 8th ed. AOAC International, Gaithersburg.
- Bhatia, A. and S. Zahoor. 2007. Staphylococcus aureus enterotoxins: A review. **J. Clin. Diagnostic Res.** 1 (2): 188-197.
- Brooks, J.L., B. Mirhabibollahi and R.G. Kroll. 1991. Increased sensitivity of an enzyme-amplified colorimetric immunoassay for protein A-Staphylococcus aureus in foods. **J. Immunol. Methods** 140: 79-84.
- _____, _____ and _____. 1990. Sensitive enzyme-amplified electrical immunoassay for protein A - *Staphylococcus aureus* in processed food. **J. Food Prot.** 57: 184-189.

- Carmo, L.S., R.S. Dias and V.R. Linardi. 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **J. Food Microbiol.** 19: 9-14.
- Chang, T.C. and S.H. Huang. 1993. Evaluation of a latex agglutination test for rapid identification of *Staphylococcus aureus* from foods. **J. Food Prot.** 56 (9): 759-762.
- Choudhury, R.S.R., D.C. Melles, K. Eadie, M. Vos, H.F.L. Wertheim, H.A. VerBRUGH, A. Van Belkum and W.B. Van Leeuwen. 2006. Direct detection of human *Staphylococcus aureus* carriage in the nose using the lightcycle *Staphylococcus* kit. **J. Microbiol. Methods** 65: 354-356.
- Cliver, D.O. 1990. **Food Disease**. Academic press, Inc., USA.
- _____ and H.P. Riemann. 2002. **Food Disease**. 2nd ed. Academic press, Inc., USA.
- Devriese, L.A. and A.V.D. Kerckhove. 1979. A comparison of methods and the validity of deoxyribonuclease test for the characterization of *Staphylococci* isolated from animals. **J. Appl. Bacteriol.** 46: 385-393.
- Dinges, M.M., P.M. Orwin and P.M. Schlievert. 2000. Enterotoxin of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev.** 13: 16-34.
- Easmon, C.S.F. and M. Goodfellow. 1990. **Topley and Wilson's Principle of Bacteriology, Virology and Immunity**. 8th ed. Vol.2. B.C. Decker, Inc., Great Britain.
- Eiff, C., R.R. Reinert, M. Kresken, J. Brauers, D. Hafner and G. Peters. 2000. Nationwide German multicenter study on prevalence of antibiotic resistance in *Staphylococcal* blood stream isolates and comparative in vitro activities of quinupristin-dalfopristin. **J. Clin. Microbiol.** 38 (8): 2819-2823.

- Fey, H. and G.A. Burkhard. 1981. Measurement of staphylococcal protein A and detection of protein A-carrying *Staphylococcus* strains by a competitive ELISA methods. **J. Immunol. Methods** 47: 99-107.
- Fitzgerald, J.R., P.J. Hartigan, W.E. Meaney and C.J. Smith. 2000. Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. **J. Appl. Microbiol.** 88: 1028-1037.
- _____, S.R. Monday, T.J. Foster, G.A. Bohach, P.J. Hartigan, W.J. Meaney and C.J. Smith. 2001. Characterization of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **J. Bacteriol.** 183: 63-70.
- Forsgren, A. 1970. Significance of protein A production by staphylococci. **Infect. Immun.** 2: 672-673.
- _____ and J. Sioquist. 1968. Protein A from *Staphylococcus aureus* VII Physiochemical and immunological characterization of protein A. **Acta Pathol. Microbial Scand.** 75: 466-480.
- Franklin, D. And M.D. Lowy. 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. **N. Engl. J. Med.** 8 (339): 520-530.
- Fueyo, J.M., M.R. Mendoza and M.C. Martin. 2005. Human and bovine constitute reservoirs of difference subpopulation of *Staphylococcus aureus* in process of the highly prevent enterotoxin gene cluster egc, pp. 697-701. In A. Mendez-Vilas, ed. **Modern multidisciplinary applied microbiology exploiting microbes and their interaction.** Wiley-VCH Verlag GmbH and KGaA, Weinheim.

- Fujikawa, H. and H. Igarashi. 1988. Rapid latex agglutination test for detection of Staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. **Appl. Environ. Microbiol.** 54 (10): 2345-2348.
- _____ and S. Morozumi. 2006. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. **J. Food Microbiol.** 23: 260-267.
- Huang, S.H., H.C. Wei and Y.C. Lee. 2007. One-step immunochromatography assay for the detection of *Staphylococcus aureus*. **Food Control** 18: 893-897.
- Hui, Y.H., J.R. Gorham, K.D. Murrell and D.O. Cliver. 1994. **Foodborne Disease Handbook.** Marcel Dekker, Inc., USA.
- Kawabata, A., S. Ichiyama, Y. Iinuma, Y. Hasegawa, M. Ohta and K. Shimokata. 1997. Exfoliative toxin detection using reverse passive latex agglutination: clinical and epidemiologic applications. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1984-1987.
- Ladhani, S., C.L. Joannou, D.P. Lochrie, R.W. Evans and S.M. Poston. 1998. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing Staphylococcal Scalded-Syndrome. **Clin. Microbiol. Rev.** 12: 224-242.
- Larsson, A. and J. Sjoquist. 1989. Novel latex agglutination method with chicken antiproteina for detection of *Staphylococcus aureus* infections. **J. Clin. Microbiol.** 27: 2856-2857.
- Leeuwen, W.B., C. Pelt, A. Luijendijk, H.A. Verbrugh and W.H.F. Goessens. 1999. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA Screen Latex Agglutination Test. **J. Clin. Microbiol.** 37 (9): 3029-3030.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrought, A.L. Farr and R.J. Roandall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

- Mahon, C.R. and G. Manuselies. 2000. **Diagnostic microbiology**. 2nd ed. W.B. Saunders company, USA.
- Maxim, P.T., H.L. Mathews and H.F. Mengoli. Single-tube mixed agglutination test for the detection of Staphylococcal Protein A. **J. Clin. Microbiol.** 4 (5): 418-422.
- Mirhabibollah, B., J.L. Brooks and R.G. Kroll. 1990. An improved amperometric immunosensor for the detection and enumeration of protein A bearing *Staphylococcus aureus*. **Lett. Appl. Microbiol.** 11:119-122.
- Murray, P.R., K.S. Rosenthal, G.S. Kobayashi and M.A. Pfaller. 1994. **Medical microbiology**. 2nd ed. Mosby-Year Book, Inc., USA.
- _____, _____, _____ and _____. 1998. **Medical microbiology**. 3rd ed. Mosby-Year Book, Inc., USA.
- Namura, S., S. Nishijima, T. Higashida and Y. Asada. 1995. *Staphylococcus aureus* isolated from nostril anteriors and subungual spaces of the hand: comparative study of medical staff, patients, and normal controls. **J. Dermatol.** 22 (3):175-180.
- Nedelkov, D., A. Rasooly and R.W. Nelson. 2000. Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food. **Int. J. Food Microbiol.** 60:1-13.
- Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham and S.M. Chaechter. 1990. **Physiology of bacteria cells**. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Nimmo, G.R. and G.W. Coombs. 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in australia. **Int. J. Antimicrob. Agents** 31 (5): 401-410.

- Noble, W.C. 1998. Skin bacteriology and the role of *Staphylococcus aureus* in infection. **Br. J. Dermatol.** 139 (Supply 53): 9-12.
- Orwin, P.M., D.Y.M. Leung, H.L. Donahue, R.P. Novick and P.M. Schlievert. 2001. Biochemical and biological properties of Staphylococcal toxin A, B, C and D in foods. **Can. J. Microbiol.** 32: 723-727.
- Park, C.E. and R. Szabo. 1986. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of Staphylococcal enterotoxins A, B, C and D in foods. **Can. J. Microbiol.** 32: 723-727.
- _____, D. Warburton, P.J. Laffey. 1996. A Collaborative study on the detection of Staphylococcal enterotoxins in food with an enzyme immunoassay kit (TERCA). **J. Food Prot.** 59 (4): 390-397.
- _____, M. Akhtra and M.K. Rayman. 1992. Nonspecific reactions of a commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (TECRA) for detection of Staphylococcal enterotoxins in foods. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (8): 2509-2512.
- Plano, L.R.W., M. Woischnik, R. Ewing and C.M. Collins. 2001. Toxin levels in serum correlate with the development of Staphylococcal growth in mixed population. **Appl. Microbiol.** 12: 77-82.
- Rago, J.V., G.M. Vath, G.A. Bohach, D.H. Ohlendorf and P.M. Schlievert. 2000. Mutation analysis of the superantigen Staphylococcal Exfoliative Toxin A (ETA). **J. Immunol.** 164: 2207-2213.
- Rasooly, A. and R.S. Rasooly. 1998. Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by western immunoblotting. **J. Food. Microbiol.** 41: 205-212.

- Smith, A.J., M.S. Jackson and J. Bagg. 2001. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. **J. Med Microbiol.** 50 (11):940-946.
- Tan, N.S., B. Ho and J.L. Ding. 2002. Engineering a novel secretion signal for cross-host recombinant protein expression. **Protein Eng.** 15 (4): 337-345.
- Thompson, N.E., M. Razdan, G. Kuntsmann, J.M. Aschenbach, M.L. Evenson and M.S. Bergdoll. 1986. Detection of Staphylococcal enterotoxins by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Radioimmunoassaya: comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 885-890.
- Tsen, H.Y. and T.R. Chen. 1992. Use of polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 37: 685-690.
- Tsen, H.Y., G.K. Y, K.C. Wang, S.J. Wang, M.Y. Chang and L.Y. Lin. 1998. Comparison of the enterotoxigenic types toxic shock syndrome toxin I (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. **Food Microbiol.** 15: 33-41.
- Varnam, A.H. and M.G. Evan. 1991. **Forborne Pathogens an Illustrated Text.** Wolfe Publishing Ltd., England.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird-Parker broth

Pancreatic digest of casein	10.00	กรัม
Beef extract	5.00	กรัม
Yeast extract	1.00	กรัม
Lithium chloride	5.00	กรัม
Glycine	12.00	กรัม
Sodium pyruvate	10.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.00	มิลลิลิตร
ปรับ pH 7.0 ± 0.2		

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง 45-50 องศาเซลเซียส เติมน้ำตาลละลาย 1% potassium tellurite 10.00 มิลลิลิตร

2. Baird-Parker agar

ส่วนประกอบของอาหาร Baird-Parker agar base มีดังนี้

Pancreatic digest of casein	10	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Lithium chloride	5	กรัม
Sodium pyruvate	10	กรัม
Glycine	12	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH สุดท้ายเป็น $7.0 + 0.2$ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบของ supplement มีดังนี้

Bacto egg yolk tellurite enrichment

(1% potassium tellurite ผสมกับ 50% egg yolk)

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหาร Baird-Parker agar base ให้ได้สัดส่วนกับน้ำ 1 ลิตร แต่เติมน้ำเพียง 950 มิลลิลิตร ก่อน
2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. รอให้อาหารมีอุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส ในขณะเดียวกันอุ่น supplement (egg yolk tellurite enrichment) โดยคุมให้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส
5. ผสม 50 มิลลิลิตร ของ supplement ลงใน agar base เขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน เทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อบางๆ ประมาณ 12-15 ml/plate รอให้อาหารแข็งและผิวหน้าแห้งจึงจะนำมาใช้ได้

3. Trypticase Soy Broth

Pancreatic digest of casein	17.0	กรัม
Papaic digest of soybean meal	3.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH สุดท้ายเป็น $7.3 + 0.2$ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหารให้ได้ตามสูตรผสมกับน้ำ 1 ลิตร
2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Standard Plate Count Agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหารให้ได้ตามสูตรผสมกับน้ำ 1 ลิตร
2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทลงในจานเพาะเชื้อ

5. Mannitol Salt Agar

Proteose Peptone	10.0	กรัม
Beef Extract	1.0	กรัม
D-Mannitol	10.0	กรัม
Sodium Chloride	75.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Phenol Red	25.0	มิลลิกรัม

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหารให้ได้ตามสูตรผสมกับน้ำ 1 ลิตร
2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทลงในจานเพาะเชื้อ

ภาคผนวก ข

การเตรียมบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ใน dot-ELISA

1. Phosphate buffer saline (PBS) ซึ่งใช้ในการเจือจางสารต่างๆ ในการทำ dot-ELISA

KH_2PO_4	0.2	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NaCl	8.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

2. Phosphate buffer saline (PBS-T pH 7.4 + tween 20 ความเข้มข้น 0.05%) ซึ่งใช้ในขั้นตอนการล้างและเจือจางสารต่างๆ ในการทำ dot-ELISA

KH_2PO_4	0.2	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NaCl	8.0	กรัม
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3. Blocking solution

Skim milk	5	กรัม
PBS-T	100	มิลลิลิตร

4. 0.85% NaCl (normal saline)

NaCl

8.5 กรัม

ละลายน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

ภาคผนวก ค

การนิคกระตุ้นสัตว์ทดลองเพื่อผลิตโพลิโกลอนอลแอนติบอดี

ตารางผนวกที่ ค1 การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั้งเซลล์

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั้งเซลล์ จำนวน 10^9 CFU/ml

Adjuvant คือ Complete Freund's Adjuvant (CFA)

Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)

สัปดาห์ที่	Manipulation	Adjuvant	Titer
0	Primary Immunization	CFA	-
2	Boost #1	IFA	-
4	Boost #2	IFA	-
6	Boost #3	IFA	-
	Bleed #1	-	1:320
8	Boost #4	IFA	-
9	Bleed #2	-	1: 640
10	Bleed #3	-	1: 640

หมายเหตุ Titer ตรวจด้วยวิธี agglutination

ตารางผนวกที่ ค2 การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วย recombinant protein A

recombinant protein A ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

Adjuvant คือ Complete Freund's Adjuvant (CFA)

Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)

สัปดาห์ที่	Manipulation	Adjuvant	Titer
0	Primary Immunization	CFA	-
2	Boost #1	IFA	-
4	Boost #2	IFA	-
6	Boost #3	IFA	-
	Bleed #1	-	1:16
8	Boost #4	IFA	-
9	Bleed #2	-	1: 32
10	Bleed #3	-	1: 32

หมายเหตุ Titer ตรวจสอบด้วยวิธี immunodiffusion

ภาคผนวก ง

การเตรียมสารสำหรับทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ และการตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีน
ด้วยวิธี SDS-PAGE

การเตรียมสารสำหรับทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ (Antibody Purification)

1. 20 mM Phosphate buffer pH 7.00 (binding buffer)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.17	กรัม
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.62	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7.00		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1,000.00	มิลลิลิตร

2. 100 mM Glycine hydrochloric acid buffer pH 2.7 (elution buffer)

Glycine hydrochloric acid		
ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 2.7		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1,000.00	มิลลิลิตร

3. 1.0 M Tris-HCl buffer pH 9.00

$\text{Tris}(\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3)$	12.114	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 9.0		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	100.000	มิลลิลิตร

4. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อิ่มตัว 50%

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.4	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

ละลายเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมงจนกว่าสารละลายอิ่มตัวจึงดูดเก็บเฉพาะส่วนใส

การเตรียมสารสำหรับแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

1. Acrylamide stock

Acrylamide (Bio-rad)	30.0	กรัม
Bisacrylamide (sigma)	0.8	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

กรองผ่านมิลทิพอร์ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. บัฟเฟอร์ A (0.5 M tris-hydrochloric pH 6.8)

Tris(hydroxymethyl) aminomethane (sigma)	6.05	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นประมาณ	50.0	มิลลิลิตร

ปรับให้ได้ pH 6.8 ด้วยสารละลาย 2 M HCl หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. บัฟเฟอร์ B (1.5 M tris-hydrochloric pH 8.8)

Tris(hydroxymethyl) aminomethane (sigma)	18.15	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นประมาณ	50.00	มิลลิลิตร

ปรับให้ได้ pH 8.8 ด้วยสารละลาย 2 M HCl หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. APS (ammonium persulfate ความเข้มข้น 10%)

Ammonium persulfate (sigma)	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

5. SDS (sodium dodecylsulfate ความเข้มข้น 10%)

sodium dodecylsulfate (sigma)	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

6. TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine)

ใช้ TEMED (sigma) โดยตรงไม่ต้องทำให้เจือจางก่อน

7. Acrylamide separate gel ความเข้มข้น 12%

น้ำกลั่น	3.25	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ B	2.50	มิลลิลิตร
SDS	100.00	ไมโครลิตร
Acrylamide stock	4.00	มิลลิลิตร
Glycerol (Merk)	100.00	มิลลิลิตร
APS	50.00	ไมโครลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร

8. Acrylamide separate gel ความเข้มข้น 4%

น้ำกลั่น	3.00	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ A	1.25	มิลลิลิตร
SDS	50.00	ไมโครลิตร
Acrylamide stock	0.65	มิลลิลิตร
Glycerol (Merk)	50.00	มิลลิลิตร
APS	25.00	ไมโครลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร

9. บัฟเฟอร์ C (1 M tris-hydrochloric, ph 6.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	12.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นประมาณ	50.0	มิลลิลิตร

ปรับให้ได้ pH 6.8 ด้วยสารละลาย 2 M HCl หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

10. Bromphenol blue ความเข้มข้น 0.5%

Bromphenol blue	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

11. Sample buffer

บัฟเฟอร์ C	3.75	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol (sigma)	3.00	มิลลิลิตร
Glycerol	6.00	มิลลิลิตร
SDS	1.38	ไมโครลิตร
bromphenol blue ความเข้มข้น 0.5 %	0.60	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	20.00	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดแช่แข็งหลอดละ 2 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

12. Electrophoresis buffer

Tris (hydroxymethyl) ammoniummethane	3.03	กรัม
Glycine (Merk)	14.40	กรัม
Sodium dodecylsulfate	1.00	กรัม
เติมน้ำกลั่นครบ	1.00	ลิตร

การเตรียมสารย้อมสีโปรตีนในเจลโดย coomassie blue

1. Coomassie blue

Coomassie Blue R-25	00.25	กรัม
ethanol	100.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

ละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม 25 มิลลิลิตร acetic acid แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในภาชนะทึบแสง จนกว่าจะใช้

2. การเตรียมสี Coomassie blue เพื่อใช้ย้อมโปรตีน

Coomassie blue	100	ไมโครลิตร
acetic acid	10	มิลลิลิตร
ethanol	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. สารเคมี

1.1 สารละลาย 2% (w/v) sodium carbonate (Na_2CO_3) ใน 0.1 NaOH

1.2 สารละลาย 2% (w/v) sodium potassium tartrate

1.3 สารละลาย 1% (w/v) copper sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

1.4 สารละลาย alkali copper

นำสารละลายข้อ 1.1 ปริมาตร 98 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายข้อ 1.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายข้อ 1.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนนำไปใช้)

1.5 1 N folin-ciocalteau phenol reagent

นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 ก่อนนำไปใช้

1.6 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ใช้ bovine serum albumin 0.001 กรัม ละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 62.5 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีการ

2.1 ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานโปรตีน bovine serum albumin ความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 ใส่ตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอด

2.3 เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

2.4 เติม 1 N folin-ciocalteau phenol reagent ปริมาตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เขียนกราฟ มาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณ โปรตีน

3. การคำนวณ

การคำนวณ IgG ต่อ *Staph.aureus* (X1)

ซั่ง IgG ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจาง 5 เท่าวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ได้ 0.0604 เมื่อนำมาใส่ในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานจะได้

$$\begin{aligned} Y &= 0.2532X + 0.0311 \\ X1 &= (0.0604 - 0.0311) / 0.2532 \\ &= 0.116 \end{aligned}$$

นั่นคือ 0.116 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นเมื่อคูณกลับจะได้ $0.116 \times 5 = 0.58$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 580 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การคำนวณ IgG ต่อ protein A (X2)

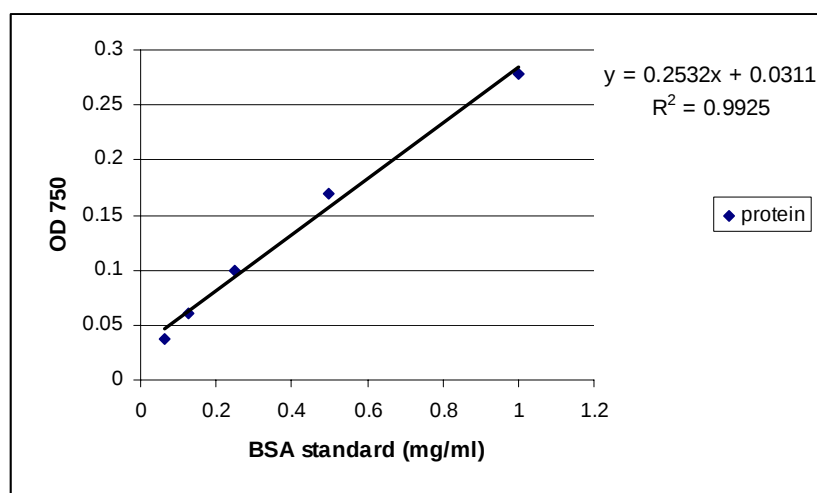
ซั่ง IgG ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจาง 50 เท่าวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ได้ 0.127 เมื่อนำมาใส่ในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานจะได้

$$\begin{aligned} Y &= 0.2532X + 0.0311 \\ X2 &= (0.127 - 0.0311) / 0.2532 \\ &= 0.379 \end{aligned}$$

นั่นคือ 0.379 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นเมื่อคูณกลับจะได้ $0.379 \times 50 = 18.96$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ จ1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและตัวอย่าง

BSA standard (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร
1.0	0.278
0.5	0.169
0.25	0.100
0.125	0.061
0.0625	0.038
5x IgG ต่อ <i>Staph.aureus</i> (ผง)	0.060
50x IgG ต่อ protein A (ผง)	0.127



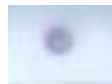
ภาพผนวกที่ จ1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของโปรตีนมาตรฐานที่ ความเข้มข้น 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก จ
ภาพผลการทำ dot-ELISA

ตารางผนวกที่ ๑1 แสดงผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ IgG บริสุทธิ์ต่อโปรตีน เอ

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	ที่ OD ₆₀₀ มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1
<i>Staph. aureus</i>	
<i>Staph. epidermidis</i>	
<i>Staph. hominis</i>	
<i>Staph. saprophyticus</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	
<i>Salmonella Anatum</i>	
<i>Shigella sonnei</i>	

ตารางผนวกที่ ๑๒ แสดงผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่วัด OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้ IgG บริสุทธิ์ต่อเชื้อ *Staph. aureus*

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	ที่ OD ₆₀₀ มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1
<i>Staph. aureus</i>	
<i>Staph. epidermidis</i>	
<i>Staph. hominis</i>	
<i>Staph. saprophyticus</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	
<i>Salmonella Anatum</i>	
<i>Shigella sonnei</i>	

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาว ภัทรพร ทองไทย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	24 พฤษภาคม 2519
สถานที่เกิด	นครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์