จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540

รายงานผลงานวิจัย

การใช้อีไลซ่าเทคนิคในการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *ซาลโมเนลลา เอนเตอริทิดิส* ในไก่

Use of ELISA for detection of antibody against *Salmonella enteritidis* in chicken

อินทิรา กระหม่อมทอง
วารี นิยมธรรม
เกรียงศักดิ์ พูนสุข
วันเพ็ญ ชัยตำภา

636.089
6927
ก449

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
พุทธศักราช 2542

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540

รายงานผลงานวิจัย

การใช้อีไลซ่าเทคนิคในการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *ซาลโมเนลลา เอนเตอริทิดิส* ในไก่

Use of ELISA for detection of antibody against *Salmonella enteritidis* in chicken

อินทิรา กระหม่อมทอง
วารี นิยมธรรม
เกรียงศักดิ์ พูนสุข
วันเพ็ญ ชัยตำภา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
พฤศจิกายน 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

24 พ.ค. 2543
I18656894

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540

รายงานผลงานวิจัย

การใช้อีไลซ่าเทคนิคในการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *ซาลโมเนลลา เอนเตอริทิดิส* ในไก่

Use of ELISA for detection of antibody against *Salmonella enteritidis* in chicken

อินทิรา กระหม่อมทอง
วารี นิยมธรรม
เกรียงศักดิ์ พูนสุข
วันเพ็ญ ชัยคำภา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
พฤศจิกายน 2542

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540-2541 ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ

- นายสัตวแพทย์วุฒิพร รุ่งเวชวุฒิวิทยา ผู้อำนวยการกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ และบุคลากร ที่ได้เอื้อเฟื้อซีรั่มไก่ SPF
- นายสัตวแพทย์มงคล ตงศิริ สำนักเทคนิค บริษัทเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด ที่เอื้อเฟื้อไก่ทดลอง ซีรั่มไก่ SPF และซีรั่มไก่ปลอดเชื้อ
- คุณพจนีย์ ศรีมาโนชญ์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านห้องปฏิบัติการ
- ศาสตราจารย์ มณีวรรณ กมลพัฒนะ และบุคลากรในโครงการการใช้นิวเคลียร์เทคโนโลยีเพื่อส่งเสริมกิจกรรมผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่อนุเคราะห์เครื่องอ่านผลอีไลซ่า
- ศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และคุณชนิดา พลานุเวชแห่งศูนย์วิจัยยาเสพติด ที่อนุเคราะห์เครื่องอ่านผลอีไลซ่า
- อาจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.สันนิภา สุรทัตต์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์อัจฉรา ธวัชสิน ที่ให้คำแนะนำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
- รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์ และบุคลากรที่ให้ความสะดวกในการใช้ห้องสัตว์ทดลอง
- บุคลากรของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

ได้ทำการพัฒนาวิธีทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *ซาลโมเนลลา เอนเตอริทิดิส* (*Salmonella enteritidis*) ในฝูงไก่ โดยวิธีอินไดเร็ค อีไลซ่า (Indirect Enzyme-linked immunosorbent Assay-ELISA) เปรียบเทียบกับวิธี อินไดเร็คฮีแมกกลูติเนชั่น (Indirect Hemagglutination – IHA) โดยใช้สารสกัดไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide – LPS) จากผนังเซลล์ของเชื้อเป็นแอนติเจนในการทดสอบทั้งวิธี ELISA และ IHA ค่าตัดสินบวกและลบของวิธี ELISA คือ 0.34 ได้จากค่า O.D (optical density) เฉลี่ยของซีรั่มไก่ SPF (specific pathogen free) บวกกับ 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ส่วนวิธี IHA ซีรั่มไตเตอร์ 1:16 ขึ้นไปตัดสินเป็นบวก ทำการทดลองในไก่ให้ติดเชื้อ 2 การทดลอง คือ ไก่อายุ 8 วัน ใช้เวลาทดลอง 12 สัปดาห์ และในไก่อายุ 12 สัปดาห์ ใช้เวลา 8 สัปดาห์ โดยป้อนเชื้อ *S.enteritidis* 10^5 CFU ทุกตัวๆ ละ 1 มิลลิลิตรครั้งเดียว แล้วเจาะเลือดไก่ทดลองแยกซีรั่มทุกสัปดาห์ เพื่อทดสอบแอนติบอดีต่อ *S.enteritidis* พร้อมทั้งสวอปอุจจาระจากก้นไก่สัปดาห์ละครั้งเพื่อเพาะแยกเชื้อนี้ ผลการทดลองมีดังนี้

การทดลองที่ 1 ในไก่เล็ก พบว่า สามารถตรวจแยกเชื้อ *S.enteritidis* จากอุจจาระได้สัปดาห์แรกหลังป้อนเชื้อมีเปอร์เซ็นสูงสุด 38.2% จากนั้นพบเชื้อในอัตราไม่แน่นอนจนสิ้นสุดการทดลอง และพบเชื้อต่ำสุด 5.4% ในสัปดาห์ที่ 5 และแยกเชื้อนี้ได้จากอวัยวะภายในของไก่ 13 ตัว ที่ตายลงระหว่างการทดลองและ 4 ตัวจากการทำลายหลังสิ้นสุดการทดลอง ในการทดลองครั้งนี้ ได้สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากไก่ 13 ถึง 18 ตัวจากไก่ 50 ตัวในแต่ละสัปดาห์ ผลการตรวจแอนติบอดีโดยวิธี IHA พบเพียง 2 ตัวอย่าง คือ 1 ตัวอย่าง (1/16) หลังป้อนเชื้อ 4 สัปดาห์ และอีก 1 ตัวอย่าง (1/16) ที่ 11 สัปดาห์ ส่วนวิธี ELISA สามารถตรวจพบ 2 ตัวอย่างสัปดาห์ที่ 4 เช่นกัน และพบอีกครั้งสัปดาห์ที่ 7 ขึ้นไปทุกสัปดาห์ให้ผลบวกระหว่าง 12-36%

การทดลองที่ 2 ในไก่ใหญ่ ตรวจพบเชื้อจากอุจจาระไก่เพียง 1 ตัว (1/58) หลังป้อนเชื้อสัปดาห์แรก และอีก 1 ตัว (1/42) สัปดาห์ที่ 6 และพบเชื้อจากตับไก่ เพียงตัวเดียวที่ตายระหว่างการทดลอง ผลการตรวจแอนติบอดีวิธี IHA ให้ผลบวกหลังป้อนเชื้อสัปดาห์แรกจนตลอดการทดลองในช่วง 8-38% ทำนองเดียวกันวิธี ELISA ให้ผลบวกสัปดาห์แรกขึ้นไปจนสิ้นสุดการทดลองอยู่ในระหว่าง 29-66%

ผลการทดลองแสดงว่าไก่อายุน้อยมีความไวรับโรคติดเชื้อ *S.enteritidis* มากกว่าไก่อายุมาก เนื่องจากพบอัตราการตายและพบเชื้อในอุจจาระมากกว่าไก่อายุมาก การตรวจแอนติบอดีวิธี ELISA มีความไวกว่าวิธี IHA มาก และสามารถบ่งชี้สภาวะการติดเชื้อในฝูงได้ดีในไก่อายุประมาณ 8 สัปดาห์ขึ้นไป การตรวจวิธี IHA และ ELISA มีความสัมพันธ์กัน แต่ไม่สัมพันธ์กับการตรวจแยกเชื้อจากอุจจาระ ดังนั้นจึงสรุปจากผลการทดลองแนะนำว่าวิธี ELISA เป็นวิธีที่มีความเป็นไปได้มากที่สุดในปัจจุบันนี้สำหรับการสำรวจแอนติบอดีต่อ *S.enteritidis* ในฟาร์มเลี้ยงไก่

คำสำคัญ : อีไลซ่า ไอเอชเอ ซาลโมเนลลา ไก่

Abstract

An indirect enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken was developed compared with an indirect hemagglutination (IHA) test using lipopolysaccharide as antigens. A cut off value of ELISA as 0.34 was calculated from the mean optical density from sera of specific pathogen free chicken plus three times of standard deviation. The IHA titers of 1:16 and above were taken as positive . There were two experiments carried out in 8 days to 13 weeks and 12 weeks to 20 weeks old chicken. All chicks were experimentally infected by oral inoculation with one milliliter of 10^5 CFU *S.enteritidis*. Sera from blood samples were collected once a week for detection of antibodies to *S.enteritidis* as well as cloacal swabbing for bacterial isolation.

Experiment 1. In young chicken, *S.enteritidis* was isolated from faecal excretion in 38.2% of the chicken at the first week after bacterial inoculation. The pattern of excretion was fluctuated until the end of an experiment with the lowest of detection at 5.4% at the fifth week. Simultaneously , the pathogen was found from organ samples of 9 chicken died during the experiment and 4 after the experiment had terminated. In this experiment, serum samples were collected from 13 to 18 chicken out of 50 chicken in each week. By using IHA, one chicken (1/16) was identified positive at week 4 and the other (1/16) at week 11 following inoculation. Whereas two chicken (2/16) were identified positive after week 4, and 12 to 36% of the samples were found seropositive between the period of week 7 to 12 by ELISA techique.

Experiment 2. In adult chicken, *S.enteritidis* was isolated from faecal excretion of one chicken (1/58) at one week and the other (1/42) at 6 weeks after inoculation. From organ samples, *S.enteritidis* was isolated from one chicken throughout the experiment. Seropostive by IHA test was detected after the first week and continuously detected in 8 to 38% of the chicken through the experiment. Similarly, ELISA was detected from the first week and ranged 29 to 66%.

The results showed that young chicken were more susceptible to *S.enteritidis* infection. The mortality rate and faecal isolation rate were higher than adult chicken.

ELISA was more sensitive than IHA and possibly used to indicate the disease condition in the flock of over 8 weeks old chicken. There was a relation between ELISA and IHA but not bacterial isolation. In conclusion, our result suggests that ELISA is the possible technique for serological monitoring to *S.enteritidis* in chicken farms.

Key words : ELISA IHA Salmonella chicken

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อภาษาไทย	III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IV
สารบัญ	VI
รายการตารางประกอบ	VII
รายการรูปประกอบ	VIII
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	IX
คำนำ	XI
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	8
ผลการทดลอง	15
วิจารณ์	22
เอกสารอ้างอิง	26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	เชื้อ *S.enteritidis* (SE) ที่แยกได้จากคนและไก่สดแช่แข็งในระหว่างปี 1972-1997	3
ตารางที่ 2	ผลการตรวจแยกเชื้อ *S.enteritidis* จากสวอปอุจจาระไก่ (การทดลองที่ 1)	16
ตารางที่ 3	ผลการทดสอบซีรั่มไก่ SPF จำนวน 145 ตัว โดยวิธี ELISA	18
ตารางที่ 4	ผลการทดสอบแอนติบอดีต่อ *S.enteritidis* (การทดลองที่ 2)	19
ตารางที่ 5	ผลการทดสอบวิธี ELISA (การทดลองที่ 2)	20
ตารางที่ 6	การเปรียบเทียบการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.enteritidis* โดยวิธี IHA และ ELISA	21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ไดอะแกรมแสดงแผนการวิจัย	7
รูปที่ 2	ไดอะแกรมแสดงวิธีเพาะและพิสูจน์เชื้อ *S.enteritidis* ในห้องปฏิบัติการ	10
รูปที่ 3	ไดอะแกรมขั้นตอนการทดสอบวิธี ELISA	14
รูปที่ 4	เปรียบเทียบผลการตรวจแยกเชื้อ *S.enteritidis* จากสวอปอุจจาระไก่	16
รูปที่ 5	การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนไก่ที่ให้ผลบวก (% ความไว) จากการตรวจทางซีโรวิทยา	19
รูปที่ 6	เปรียบเทียบผลการทดลองวิธี ELISA ในไก่กลุ่มติดเชื้อและกลุ่มควบคุม (การทดลองที่ 2)	20
รูปที่ 7	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับ IHA ไตเตอร์ในไก่กลุ่มติดเชื้อ (การทดลองที่ 2)	22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ

ภาษาอังกฤษ

BPW	-	buffer peptone water
BSA	-	bovine serum albumin
CFU	-	colony forming unit
ELISA	-	Enzyme- Linked immunosorbent assay
HACCP	-	Hazard Analysis Critical Control Point
HCL	-	hydrochloric acid
HE	-	heat extract
IgG	-	immunoglobulin G
IHA	-	indirect hemagglutination test
LPS	-	lipopolysaccharide
MAG	-	microantiglobulin
MSRV	-	Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis
MT	-	microagglutination test
N	-	Normal
NaCl	-	sodium chloride
nal^r	-	nalidixic acid resistance
NaOH	-	sodium hydroxide
NSSC	-	National Salmonella and Shigella Center
O.D	-	optical density
PBS	-	phoshate buffer saline
PBS-T	-	phosphate buffer saline – tween
pH	-	potential of hydrogen
ROC	-	Response-Operating Characteristic
RST	-	rapid slide test
SAT	-	serum agglutination test
SPF	-	specific pathogen free

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SRBC - sheep red blood cell

TSA - Tryptic Soy Agar

TSI - Triple Sugar Iron

TSB - Tryptic Soy Broth

TTB - tetrathionate broth

WHO - World Health Organization

XLT_4 - Xylose Lysine $Tergitol_4$

^{0}C - degree celcius

ภาษาไทย

มล. - มิลลิลิตร

มก. - มิลลิกรัม

% - เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำนำ

การปนเปื้อนของเชื้อ ซาลโมเนลลา ในเนื้อสัตว์กำลังเป็นปัญหาที่สำคัญมากในปัจจุบัน เนื่องจากเชื้อดังกล่าวมีโอกาสที่จะก่อโรคในคนรวมทั้งถ่ายทอดลักษณะการดื้อยาของเชื้อสู่คนและเชื้ออื่นๆ ด้วย ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้มีความพยายามที่จะลดอุบัติการของเชื้อนี้ในคน ด้วยการให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และร่วมมือในการที่จะควบคุมเชื้อนี้ในหลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนา วิธีหนึ่งที่หลายประเทศกระทำอยู่ คือ การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในเนื้อสัตว์ โดยเริ่มที่ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่จะต้องมีการจัดการที่ดีต่อฝูงสัตว์ และสิ่งแวดล้อม การตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อในซีรั่ม เป็นมาตรการหนึ่งที่จำเป็นต่อการตรวจคัดฝูงสัตว์และเฝ้าระวังโรค ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจที่มีประสิทธิภาพ และมีความเป็นไปได้ในเชิงการค้า จึงเป็นเป้าหมายของงานวิจัยครั้งนี้

ผศ.สพ.ญ.อินทิรา กระหม่อมทอง
ผู้วิจัยหลัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เชื้อซาลโมเนลลา (Salmonella) เป็นเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีความสำคัญมากเพราะเป็นตัวก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ ในสัตว์ เชื้อจะก่อให้เกิดอาการโลหิตเป็นพิษ ลำไส้อักเสบแบบเฉียบพลันไปจนถึงแบบเรื้อรัง และยังสามารถแฝงในร่างกายสัตว์ โดยไม่แสดงอาการแต่จะเป็นพาหะของโรคได้ (Carter 1984) ในคนก่อให้เกิดอาการลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง จนถึงแสดงอาการอย่างอ่อนของอาการอาหารเป็นพิษ (Lax et al.,1995) ซึ่งคนที่ติดเชื้อนี้มักเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ ซาลโมเนลลาในเนื้อสัตว์ต่างๆ โดยเฉพาะเนื้อไก่ ซึ่งเป็นอาหารโปรตีนที่นิยมรับประทานมากที่สุดเพราะหาซื้อได้ง่าย ราคาถูก ปัจจุบันการเลี้ยงไก่ในประเทศไทยได้มีการพัฒนาไปจนถึงระดับอุตสาหกรรม อาจกล่าวได้ว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกเนื้อไก่แช่แข็งเป็นอันดับที่หนึ่งในประเทศภาคพื้นเอเชีย อย่างไรก็ตามบางครั้งสินค้าเนื้อไก่แช่แข็งบางชุดจะประสบปัญหาเกี่ยวกับมาตรฐานความปลอดภัยในการบริโภค ส่วนใหญ่เกี่ยวกับการตรวจพบสารตกค้าง เช่น พวกยาฆ่าแมลงและมีการปนเปื้อนของพวกจุลินทรีย์ตัวก่อโรคที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อซาลโมเนลลา (*Salmonella spp.*) ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าเนื้อไก่และไข่ไก่เป็นแหล่งสำคัญที่จะแพร่เชื้อนี้มาสู่คน (Misher et al., 1991 : Varavithya, 1990)

เชื้อซาลโมเนลลาที่พบในไก่มีความสำคัญต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์เป็นอย่างมาก เพราะมนุษย์มีโอกาสรับเชื้อซาลโมเนลลาเหล่านี้จากไก่และไข่ไก่ได้ตลอดเวลาและอาจทำให้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษ โดยเฉพาะในเด็กและผู้สูงอายุ จากรายงานของ WHO ในปี 1984 พบว่าอุบัติการของผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อ ซาลโมเนลโลซีส ในออสเตรเลีย เยอรมัน อังกฤษ และเวลล์ ในระหว่างปี 1972-1989 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเชื้อ ***ซาลโมเนลลา เอนเตอริทิดิส*** (*Salmomella enteritidis*) เริ่มทวีความสำคัญต่อสุขภาพอนามัยของมวลมนุษย์มาตั้งแต่ปี 1980 เป็นต้นมา โดยเหตุที่อุบัติการของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *S. enteritdis* เพิ่มสูงขึ้นทุกปี ดังเช่นมีรายงานการแยกเชื้อ *S. enteritidis* ได้มากกว่า 15% ของเชื้อซาลโมเนลลา ทั้งหมดที่แยกได้ในสหรัฐอเมริกา เริ่มจากพบเชื้อจาก 8 มลรัฐ ในปี 1985 จนถึง 23 มลรัฐ ในปี 1990 (Mason and Ebel, 1992) และจำนวนเชื้อ *S. enteritidis* ที่แยกได้ใน แคนาดา เพิ่มจาก 7.6% ของเชื้อ ซาลโมเนลลา ทั้งหมด ในปี 1980 จนถึง 11.5% ในปี 1990 (Altekruse, 1993) ทำให้รัฐบาลของประเทศต่างๆ เหล่านี้ต้องวางมาตรการควบคุมโรคติดเชื้อนี้อย่างเข้มงวด

ในประเทศไทย ศูนย์ทดสอบเชื้อซาลโมเนลลาและชิเกลลาแห่งชาติ (National Salmonella and Shigella Center , NSSC) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ ซาลโมเนลลา ที่ถูกส่งมาตรวจยืนยันที่ศูนย์ฯนี้ ตั้งแต่ปี 2515 จนถึง

ปัจจุบัน พบว่าเชื้อ *S. enteritidis* ที่แยกได้จากคนมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ปี 1990 เป็นต้นมา (Bangtrakulnonth et al., 1993) จากรายงานปี 1972-1989 ที่พบเพียง 0.59% ของเชื้อซาลโมเนลลาทั้งหมด เพิ่มสูงจนถึง 20.5% ในปี 1996 และพบมากเป็นอันดับหนึ่ง ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาเดียวกับที่ประเทศไทย ได้มีการพัฒนาการเลี้ยงไก่อย่างต่อเนื่องจนเป็นอุตสาหกรรม มีการผลิตเนื้อไก่และไข่เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก สอดคล้องกับรายงานการพบว่า *S. enteritidis* เป็นเชื้อที่แยกได้มากที่สุด จากเนื้อไก่สดแช่แข็ง 11-29% ในระหว่างปี 1992-1996 (ตารางที่ 1) แม้จะเริ่มมีแนวโน้มที่จะลดลงมาในปี 1997 ก็ตาม (WHO, NSSC, 1998) และยังมีรายงานการแยกเชื้อนี้ได้จากหอผู้ป่วยเด็กในโรงพยาบาลรามาบดีที่มีการติดเชื้อซาลโมเนลลาในกระแสโลหิตซึ่งมีความสัมพันธ์กับเชื้อที่ก่อโรคในทางเดินอาหารมากเป็นอันดับหนึ่งอีก คือ พบ 18 ราย จาก 40 ราย ในระหว่างปี ค.ศ.1991-1994 (สยมพร 2541) และ พบ 7.6% จากผู้ป่วยเด็กและผู้ใหญ่ที่มีการติดเชื้อในลำไส้ (สยมพร และคณะ 2542) นอกจากนี้ยังพบว่าสถิติข้อมูลของกองพยาธิวิทยาคลินิค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในระยะเวลาตั้งแต่ปี 1993-1995 ได้ทำการทดสอบยืนยันเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ จากหน่วยงานต่างๆ ทั่วประเทศ จำแนกได้เป็น ซาลโมเนลลา ถึง 54.91% โดย *S. enteritidis* เป็นซีโรวาร์ที่พบมากเป็นอันดับหนึ่ง (อรุณ และคณะ 2539)

เป็นที่ทราบกันดีว่าอาหารที่มาจากเนื้อและผลิตภัณฑ์สัตว์ คือ แหล่งกำเนิดของโรคนี้สู่มนุษย์ การไม่แสดงอาการป่วยของสัตว์ที่ติดเชื้อนี้ และวิธีการตรวจที่ยังไม่มีความไวพอเพียง ทำให้สัตว์พาหะเหล่านี้ ยังคงเป็นแหล่งกระจายเชื้อโรคปนเปื้อนไปสู่สิ่งแวดล้อม และสัตว์ชนิดอื่นๆ รวมทั้งมนุษย์ด้วย ทำให้เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขตลอดมา ส่วนด้านปศุสัตว์ มีรายงานพบอัตราการป่วยเนื่องจากโรคนี้ในไก่สูงถึง 18% และ ในสุกร 6% (Annual report of National Institute of Animal Health , 1993) ดังนั้นโรคติดเชื้อดังกล่าวจากสัตว์สู่คนจึงนับว่าเป็นปัญหาสำคัญ ในประเทศที่เจริญแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกาและบางประเทศในทวีปยุโรปได้มีการกำหนดมาตรการ HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) เพื่อควบคุมและตัดวงจรการปนเปื้อนเชื้อ ซาลโมเนลลา ครบวงจรของการผลิตเนื้อสัตว์ที่จะนำมาเป็นอาหาร (Food of Animal Origin) เริ่มตั้งแต่การจัดการในฟาร์ม โรงงานผลิตอาหารสัตว์ โรงฆ่าสัตว์ โรงงานแปรรูป และผลิตภัณฑ์อาหาร ส่วนประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น ประเทศไทย การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อซาลโมเนลลาในเนื้อสัตว์ยังไม่ได้รับการปฏิบัติอย่างจริงจัง โดยเฉพาะเนื้อไก่ แม้ว่าได้มีการพัฒนาจนเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนนับหมื่นล้านบาทต่อปี แต่ก็ยังมีการตรวจพบเชื้อ ซาลโมเนลลาอยู่เสมอในอัตราค่อนข้างสูง ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

ตารางที่ 1 เชื้อ *S.enteritidis* (SE) ที่แยกได้จากคนและไก่สดแช่แข็งในระหว่างปี 1972-1997 (Bangtrakulnonth et al.,1993; WHO, NSSC,1998)

ปี	จำนวนเชื้อ SE/จำนวนซาลโมเนลลาที่แยกได้ทั้งหมด			
	คน	(%)	เนื้อไก่แช่แข็ง	(%)
1972-89	266/44,718	(0.59)	- ไม่มีข้อมูล	-
1990	51/3,839	(1.33)	15/1,073	(1.40)
1991	107/3,648	(2.93)	43/815	(5.28)
1992	421/3,065	(13.73)	108/959	(11.26)
1993	471/3,284	(14.34)	159/949	(16.75)
1994	659/5,861	(11.24)	327/1,920	(17.03)
1995	877/6,644	(13.20)	593/2,010	(29.50)
1996	489/2,378	(20.56)	151/679	(22.23)
1997	304/2,771	(10.97)	110/774	(14.20)

ปัจจุบันฟาร์มเลี้ยงไก่บางแห่งได้เริ่มนำระบบ HACCP เข้ามาใช้โดยเฉพาะในไก่พันธุ์เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อนี้ จากสิ่งแวดล้อม โรงเรือน อาหาร และน้ำที่ให้แก่ไก่ มีการตรวจฝูงไก่อยู่เป็นประจำ เพื่อให้ปลอดโรคติดเชื้อ ซาลโมเนลโลซีส โดยเฉพาะจาก *S. enteritidis* ได้แก่การเพาะแยกเชื้อนี้จากอุจจาระไก่ และสิ่งแวดล้อมในเล้าไก่ อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ คือ การตรวจคัดฝูง (screening test) ได้แก่ การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ ซาลโมเนลลาซีโรกรุ๊ป D ที่รวมไปถึง *S. gallinarum* , *S. pullorum* และ *S.enteritidis* จากซีรั่มไก่ โดยวิธีแอกกลูติเนชั่น (agglutination) คณะผู้ทำการวิจัยจึงเห็นความสำคัญในการที่จะพัฒนาวิธีทดสอบอีไลซ่า(ELISA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ขึ้นมาใช้ตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.enteritidis* ในฝูงไก่ และเป็นจุดประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความจำเพาะ (specificity) มีความไว (sensitivity) สะดวกรวดเร็วและสามารถตรวจจำนวนตัวอย่างได้ครั้งหลายตัวอย่างมากกว่าวิธีแอกกลูติเนชั่นที่ใช้กันทั่วไป และยังสามารถบ่งชี้สภาวะการติดเชื้อนี้ในฝูงไก่ได้ดีกว่าการแยกเชื้อซึ่งใช้เวลาประมาณ 4-5 วันและโอกาสที่จะพบเชื้อมีน้อยมาก (Cooper et al., 1989 ; Chart et al., 1990; Nicholas and Andrew, 1991; Minga, 1992) เป็นการเฝ้าระวังโรคเพื่อตัดวงจรโรค

ติดเชื้อ ซาลโมเนลโลซีส จากสัตว์สู่คนและสิ่งแวดล้อมทางหนึ่ง นอกเหนือไปจากการจัดการฟาร์ม และการสุขาภิบาลที่ดีอีกด้วย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิธีแอกกลูติเนชั่นเป็นวิธีที่ใช้ตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อซาลโมเนลลาในฝูงสัตว์มานาน ในสัตว์ปีกจะใช้น้ำยาทดสอบแอนติเจน ส่วนที่เป็น surface antigen ที่ผนังเซลล์ หรือที่เรียกว่า โซมาติคโอแอนติเจน (somatic O antigen) ย้อมสีแล้วทดสอบกับหยดเลือดหรือซีรั่ม กวนให้เข้ากันบนสไลด์ (rapid slide test-RST) ถ้ามีแอนติบอดีในเลือดหรือซีรั่มมากพอ จะจับกับแอนติเจนในน้ำยา เกิดตะกอนเห็นได้ชัด เป็นวิธีรวดเร็วที่สามารถทำได้ในภาคสนามใช้กันมากว่า 50 ปี และได้ผลดีที่สุดกับ *S.pullorum* และ *S.gallinarum* แต่ให้ผลไม่น่าเชื่อถือกับเชื้อซีโววาร์อื่นๆ (Nagaraja et al., 1991) รวมทั้ง *S.enteritidis* แม้ว่าจะจัดอยู่ในซีโรกรุ๊ป D เช่นเดียวกัน ส่วนในห้องปฏิบัติการจะใช้วิธีการทดสอบแอนติเจนกับซีรั่มในหลอดทดลอง (serum agglutination test - SAT) หรือในไมโครเพลท (microagglutination test - MT) เพื่อยืนยันผลการทดสอบวิธี RST โดยเหตุที่ *S.enteritidis* เป็นเชื้อที่จัดอยู่ในโซมาติคโอแอนติเจน กลุ่ม D เช่นเดียวกับเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว การทดสอบจึงนำมาใช้ตรวจ *S.enteritidis* ด้วย แม้ว่าจะให้ผลไม่ดีนัก เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการพัฒนาวิธีทดสอบแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะ มีความไว สะดวก และรวดเร็วกว่าวิธีเดิม คือ วิธี ELISA สำหรับตรวจสภาวะโรคซาลโมเนลโลซีส ที่เกิดจากเชื้อ ซาลโมเนลลา ซีโรวาร์ต่างๆ ทางด้านปศุสัตว์ ในไก่ มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ทำการทดลองเรื่องนี้ ได้แก่ Cooper et al., (1989) ได้พัฒนาวิธีทดสอบ ELISA โดยใช้แอนติเจนที่สกัดจากผนังเซลล์ เชื้อ *S.enteritidis* ส่วนของ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide – LPS) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าประกอบด้วยส่วนที่เป็นแอนติเจนจำเพาะต่อ ซาลโมเนลลากลุ่ม D เปรียบเทียบกับการทดสอบวิธีแอกกลูติเนชั่น ได้แก่ RST , SAT, MT และวิธี ไมโครแอนติโกลบูลิน (microantiglobulin - MAG) ซึ่งเป็นวิธีที่ดูปฏิกิริยาตกตะกอนเช่นกันแต่เติมน้ำยาแอนติโกลบูลินลงไปด้วย ตลอดจนการเพาะแยกเชื้อในฝูงไก่ที่ติดเชื้อ *S.enteritidis* และฝูงที่ติดเชื้อ *S.typhimurium* โดยธรรมชาติ พบว่าวิธี ELISA มีความไวกว่า สามารถตรวจพบจำนวนไก่ติดเชื้อได้มากกว่าวิธีอื่นๆ การเพาะแยกเชื้อทั้งจากสวอปอุจจาระไก่หรือจากการฆ่าซากไม่สามารถบอกความชุกของโรคติดเชื้อนี้ทางสถิติในตัวอย่างที่นำมาตรวจได้ ผลการแยกเชื้อไม่มีความสัมพันธ์กับผลการตรวจทางซีโรวิทยาและพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม ระหว่าง *S.enteritidis* และ *S.typhimurium* ซึ่งเป็นเชื้อในซีโรกรุ๊ป B จากการตรวจวิธี MT และ MAG

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Chart et al., (1990) รายงานผลจากการทำ immunoblotting ส่วนนอกของผนังเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีน (outer membrane protein) กับส่วน LPS ของเชื้อนี้บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส พบว่าส่วน LPS ที่ใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบ ELISA น่าจะเป็นแอนติเจนสำคัญและมีความจำเพาะในการตรวจแอนติบอดี โดยเฉพาะอิมมูนโนโกลบูลิน G (IgG) ในไก่ และพบว่าค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ได้จากการทดสอบ ELISA มีความสัมพันธ์กับการตรวจเชิงปริมาณ โดยวิธี RST และ immunoblotting ของซีรั่มไก่ติดเชื้อ *S.enteritidis* โดยธรรมชาติ อย่างไรก็ดีซีรั่มไก่บางตัวที่ให้ผลลบกับวิธีแอกกลูติเนชั่นกลับให้ค่าดูดกลืนแสงสูงใน ELISA และซีรั่มที่แอกกลูติเนชั่นบวกกลับมีค่าดูดกลืนแสงที่ต่ำ ต่อมา Nicholas and Cullen (1991) ได้ทดสอบ ELISA โดยใช้แอนติเจนจาก LPS (LPS-ELISA) และแอนติเจนที่สกัดจากความร้อน (Heat Extract – HE) เปรียบเทียบวิธี RST, MT และ MAG ในฝูงที่ติดเชื้อ *S.enteritidis* ในธรรมชาติ พบว่า HE-ELISA สามารถตรวจแอนติบอดีได้เกือบ 100% เช่นเดียวกับวิธี MAG ในขณะที่ LPS – ELISA ตรวจได้มากกว่า 60% และวิธีเพาะแยกเชื้อได้เพียง 25%

Minga (1992) รายงานว่าการตรวจด้วย LPS-ELISA จาก *S.gallinarum* ที่ก่อโรคไทฟอยด์ในไก่ และ LPS-ELISA จาก *S.enteritidis* สามารถตรวจแอนติบอดีได้ทั้งจากโรคไทฟอยด์ และไก่ที่ถูกทำให้มีภูมิคุ้มโรคด้วยการฉีดเชื้อ *S.enteritidis* และยังสัมพันธ์กับการตรวจวิธี SAT กับ RST พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเพียงเล็กน้อย เมื่อทดสอบกับซีรั่มที่มาจากไก่ที่ติดเชื้อ *S. typhimurium* เมื่อเร็วๆ นี้ Desmidt et al. (1996) ได้สนับสนุนรายงานของนักวิจัยหลายท่านในการใช้ LPS-ELISA ด้วยการทดสอบแอนติบอดีให้ผลบวกมีค่าสูง (strong) จากซีรั่มและไข่แดง (yolk) ของไก่ที่ติดเชื้อ *S.enteritidis* โดยธรรมชาติและโดยการทดลอง และผลบวกค่าต่ำ (weak) ในฝูงที่ติดเชื้อ *S.typhimurium* พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในซีรั่มไก่ที่ป้อนเชื้อ *S.typhimurium* และ *S.gallinarum* อย่างไรก็ตามนักวิจัยเหล่านี้ได้รายงานว่า เมื่อเปรียบเทียบในระหว่างวิธีทดสอบค่าดูดกลืนแสง และซีรั่มไตเตอร์ที่สูงของวิธี ELISA และ MAG จะอยู่ได้นานกว่าไตเตอร์จากการทดสอบวิธี RST และ MT ที่จะตกลงอย่างรวดเร็ว

สำหรับปฏิกิริยาข้ามกลุ่มต่อเชื้อแบคทีเรียอื่นๆนั้น ได้มีการทดลองหลายรายงานที่ทดสอบความจำเพาะของวิธีนี้ ต่อเชื้อ *E.coli* หลายสายพันธุ์ที่พบในไก่ และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่ม Enterobacteria พบว่าปฏิกิริยาต่อแอนติเจนเหล่านี้ ยังน้อยกว่าค่า O.D ที่เป็นcut off นั่นคือ ค่า O.D ยังเป็นลบอยู่ (Nicholas and Cullen, 1991; Desmidt, 1996)

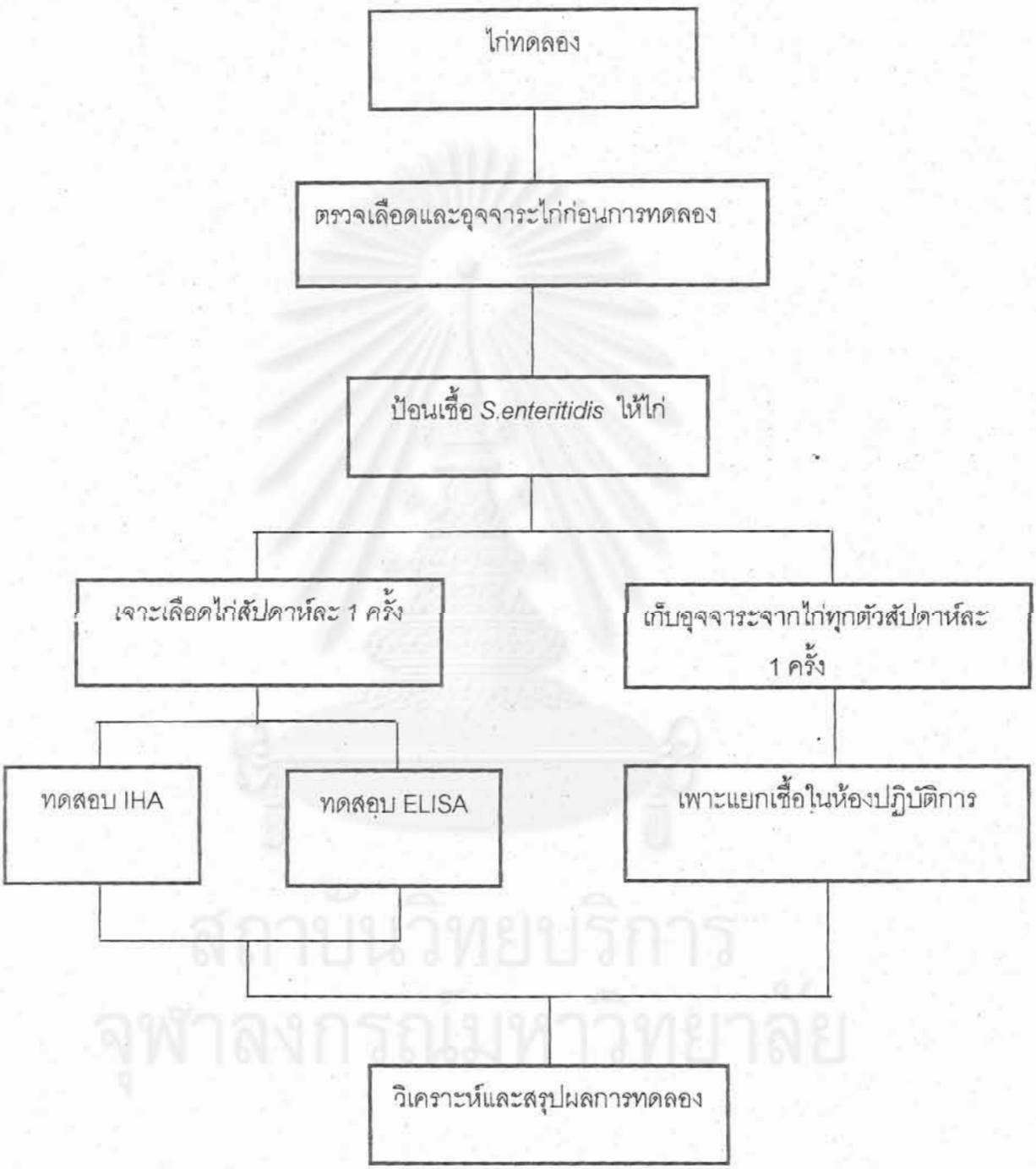
จากเอกสารอ้างอิงดังกล่าวข้างต้น จึงสรุปได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่จะนำวิธีทดสอบ ELISA มาใช้ในการตรวจทางซีโรวิทยา เพื่อตรวจสภาวะการติดเชื้อ *S.enteritidis* ซึ่งเป็นซีโรวาร์ชนิดแทรกซึมเนื้อเยื่อ (invasive serovar) แทนวิธีแอกกลูติเนชั่นที่ใช้อยู่เดิม เนื่องจากมีความไว

I18656894

และความจำเพาะมากกว่าอีกทั้งยังสะดวกและรวดเร็วกว่า เหมาะสำหรับการตรวจในฟาร์มที่เลี้ยงไก่จำนวนมาก ซึ่งเป็นจุดประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ โดยใช้ส่วน LPS ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่า มีความเป็นแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแต่ละสปีซีเป็นแอนติเจนในการทดสอบ ELISA และเป็นแอนติเจนชนิดที่นักวิจัยส่วนใหญ่เลือกใช้ เปรียบเทียบกับ วิธี Indirect Hemagglutination (IHA) โดยใช้แอนติเจน LPS ชนิดเดียวกันกับ ELISA นำไป coat บนเม็ดเลือดแดงของแกะ และทดสอบเหมือนวิธีแอกกลูติเนชั่น ซึ่งวิธี LPS-IHA นี้จะมีความจำเพาะมากกว่าวิธีแอกกลูติเนชั่นทั่วไปเนื่องจากเป็นแอนติเจนที่จำเพาะและให้ผลแม่นยำกว่า นิยมใช้ทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อแกรมลบหลายชนิด ได้แก่ *Vibrio cholera* ที่ก่อโรคอหิวาตกโรค (Chaicumpa et al.,1981) , และทดสอบในไก่ที่ทำให้ติดเชื้อด้วย *S.virchow* และ *S.bredeney* เปรียบเทียบวิธีแอกกลูติเนชั่น (Smith et al., 1972) พบว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 ไดอะแกรมแสดงแผนการวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้เตรียมแอนติเจนสำหรับการทดสอบ IHA และ ELISA คือ S. *enteritidis* ได้รับจากศูนย์ซาลโมเนลลาและชิเกลลาแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เก็บอยู่ในวุ้นอะการ์ (stock agar) บรรจุในหลอดแก้วปิดจุกยางแน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทำให้ไก่ทดลองติดเชื้อนี้ คือ *S. enteritidis* ที่มีเครื่องหมายเป็นพลาสมิดซึ่งต้านทานต่อกรดนาลิกดิซิก (nalidixic acid resistance-nal^r) เป็นเชื้อที่แยกได้จากเนื้อไก่ ได้รับมาจากภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เก็บอยู่ในวุ้นอะการ์บรรจุในหลอดแก้วปิดจุกยางแน่น เก็บที่อุณหภูมิห้องเช่นเดียวกัน

สัตว์ทดลอง

การทดลองที่ 1 ใช้ลูกไก่เนื้อพันธุ์อาเบอร์เอเคอร์ ซึ่งเป็นพันธุ์ไก่ที่นิยมเลี้ยงทั่วไป คละเพศ อายุ 1 วัน จากฟาร์มที่ปลอดเชื้อ *S. enteritidis* จำนวน 50 ตัว นำมาเลี้ยงในกรงลวดตาข่ายยกพื้นสูง พื้นกรงเป็นซี่ลวดปูทับด้วยแผ่นตาข่ายพลาสติกให้อุจจาระไก่ลอดลงพื้นได้ กรงไก่อยู่ในห้องแยกต่างหากในตึกสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลูกไก่ได้รับอาหารและน้ำกินจนพอเพียงทุกวัน

การทดลองที่ 2 ใช้ไก่เนื้อพันธุ์ อาเบอร์เอเคอร์ คละเพศ อายุประมาณ 12 สัปดาห์ จากฟาร์มที่ปลอดเชื้อ S. *enteritidis* จำนวน 60 ตัว นำมาเลี้ยงในกรงลวดตาข่ายยกพื้นสูงปูพื้นกรงด้วยแผ่นตาข่ายพลาสติกชนิดเดียวกัน กรงละ 5 ตัว จำนวน 12 กรง ไก่ได้รับอาหารและน้ำดื่มจนพอเพียงเช่นเดียวกัน

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลองในไก่

นำเชื้อแบคทีเรีย *S. enteritidis* (nal^r) ที่เก็บในวุ้นอะการ์มาเพาะในอาหารวุ้น Trypticase Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}C 18-20 ชั่วโมง ผ่านเชื้อในอาหาร TSA ประมาณ 2-3 ครั้ง ให้ได้โคโลนีที่เหมาะสม ลักษณะกลมใหญ่ ขอบเรียบ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำ Tryptic Soy Broth (TSB) เพื่อให้ได้เชื้อจำนวนมากขึ้น บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}C 18-20 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ จึงเจือจางในน้ำเกลือ 0.85% NaCl ให้เชื้อมีความเข้มข้นที่ 10^5 CFU (Colony Forming Unit) สำหรับการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2

วิธีทดลองในไก่

ก่อนเริ่มการทดลอง ได้ทำการเจาะเลือด แยกซีรั่มเพื่อตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. enteritidis* และตรวจอุจจาระไก่ทุกตัว เพื่อแยกเชื้อนี้ให้แน่ใจว่าไก่ทดลองปลอดเชื้อ *S. enteritidis*

การทดลองที่ 1 ป้อนเชื้อ *S. enteitidis* (nal^r) ความเข้มข้น 4.2 X 10^5 CFU จำนวน 1 มิลลิลิตร ให้ลูกไก่ 50 ตัวที่อายุ 8 วันกิน โดยป้อนผ่านท่อพลาสติกที่สอดเข้าในหลอดอาหารของลูกไก่จนถึงกระเพาะบดเพื่อให้เชื้อเข้าสู่กระเพาะโดยไม่ตกหล่น หลังป้อนเชื้อ 1 สัปดาห์ สุ่มเจาะเลือดไก่แยกซีรั่มเพื่อตรวจแอนติบอดีต่อโรค และทำดังนี้ต่อไปทุกสัปดาห์ๆ ละครั้ง ครั้งละ 13 ถึง 18 ตัว ในขณะเดียวกัน เก็บอุจจาระไก่โดยใช้ปลายไม้พันสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วล้วงเข้าไปในก้นลูกไก่ทุกตัว (cloacal swabs) นำมาตรวจหาเชื้อ *S. enteritidis* ทุกสัปดาห์ๆ ละครั้ง เช่นเดียวกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์

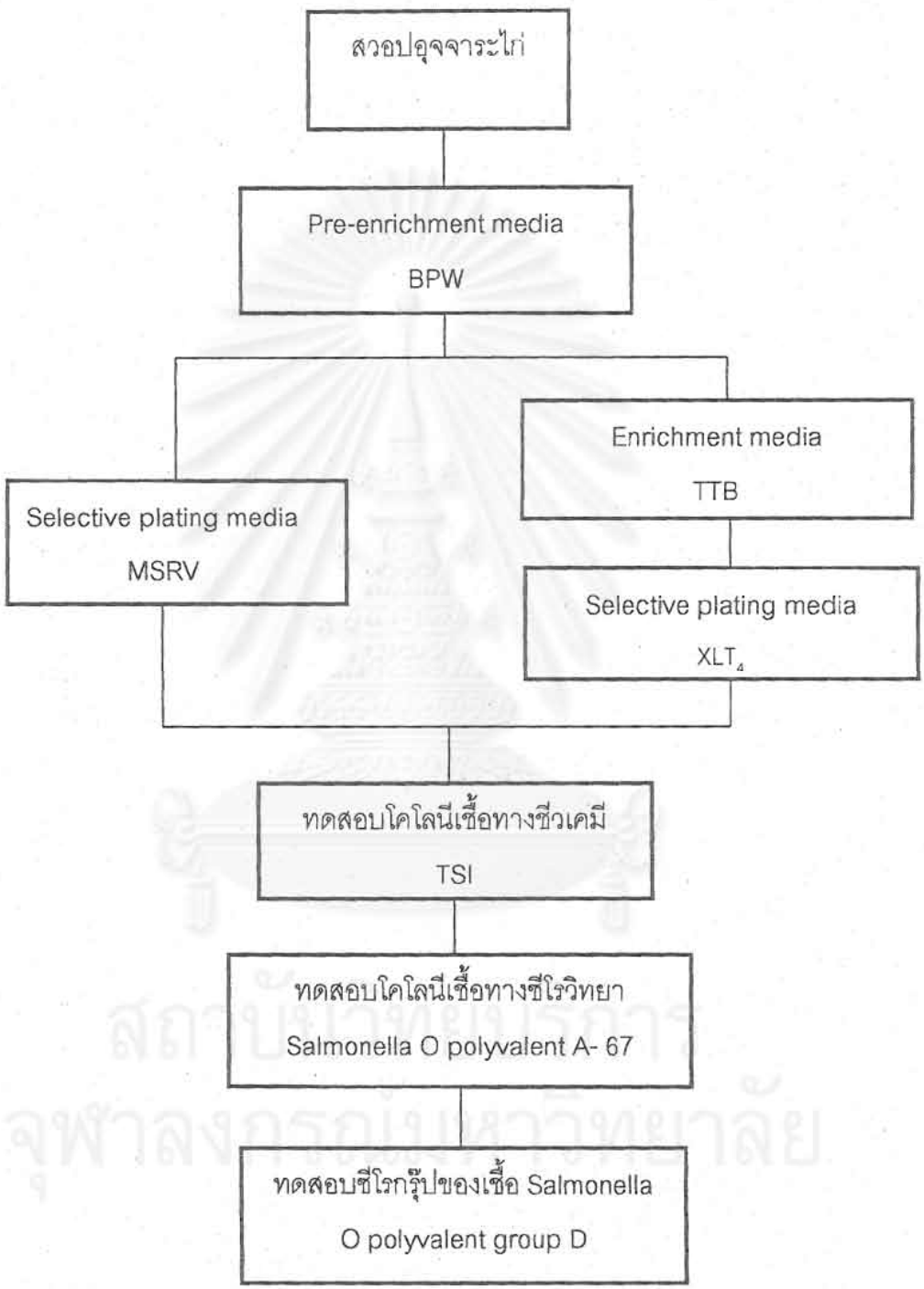
การทดลองที่ 2 ป้อนเชื้อ *S. enteritidis* (nal^r) ความเข้มข้น 4.1 X 10^5 CFU จำนวน 1 มล. ให้ไก่อายุประมาณ 12 สัปดาห์ (83 วัน) กิน โดยผ่านท่อพลาสติกเช่นเดียวกัน เจาะเลือดแยกซีรั่มไก่ทุกตัว และเก็บอุจจาระไก่ทุกตัวสัปดาห์ละครั้ง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

หลังการทดลองทั้งสองครั้งสิ้นสุดลงไก่ถูกทำลายเก็บซีรั่ม และเก็บอวัยวะไก่ทุกตัวคือ ตับ ม้าม ไส้ตรง (ileum) และไส้ตัน (caecum) เพื่อเพาะแยกเชื้อนี้ ซีรั่มทุกตัวอย่างที่ได้ นำมาเก็บที่อุณหภูมิ –20°C เพื่อการทดสอบต่อไป

การเพาะแยกเชื้อ

อุจจาระไก่ที่ได้จากการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 นำมาเพาะแยกเชื้อ (รูปที่ 2) ใน Buffer Peptone Water (BPW) 4 มิลลิลิตร (มล.) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง แล้วแบ่ง BPW ที่มีเชื้อเจริญเติบโตแล้วส่วนหนึ่งลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis Agar (MSRV) ผสม nalidixic acid 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยหยด BPW ลงขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV จำนวน 0.1 มล. แล้วเอียงจานให้น้ำ BPW ไหลกลิ้งรอบขอบจานจนทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 42°C 18-24 ชั่งโมง อ่านผลบน MSRV โดยพิจารณาที่สีของ MSRV เปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินใส เป็นสีขาวขุ่นของเชื้อแผ่เข้าไปยังศูนย์กลางจานเพาะ แสดงถึงเชื้อที่มี Flagella จะเคลื่อนที่ไปรอบๆจุดป้ายเชื้อ จึงใช้ลวดปลายแหลม (needle) ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้ว แตะปลายขอบของโคโลนีเชื้อที่แผ่ออกมา มาตรวจยืนยันการเฟอร์เมนท์น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และแลคโตสใน Triple Sugar Iron agar (TSI)

รูปที่ 2 ไดอะแกรมแสดงวิธีเพาะและพิสูจน์เชื้อ *S.enteritidis* ในห้องปฏิบัติการ



น้ำยา BPW อีกส่วนหนึ่งจำนวน 1 มล. ถ่ายลงใน Pre-enrichment media คือ Tetrathionate Broth (TTB) จำนวน 9 มล. ที่ผสม Brilliant green ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.001% นำไปบ่มที่ 42°C 18-24 ชั่วโมง จึงใช้ไม้สวอปจุ่มใน TTB ที่เชื้อขึ้นแล้วนำมาป้ายลงใน selective plating media คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Tergitol$_4$ Agar (XLT$_4$) ผสม nalidixic acid 100 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 42°C 18-20 ชั่วโมง โคโลนีของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นเชื้อซาลโมเนลลา จะมีลักษณะกลม ขอบเรียบ มีสีชมพูทั้งหมดหรือมีสีชมพูและมีจุดศูนย์กลางโคโลนีเป็นสีดำ ใช้ลวดปลายเป็นห่วงกลม (loop) เผาไฟฆ่าเชื้อ แตะโคโลนีที่สงสัยจาก XLT$_4$ มาทดสอบใน TSI agar เช่นเดียวกัน

จากผลการทดสอบใน TSI agar เชื้อที่สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคส แต่ไม่เฟอร์เมนต์น้ำตาลซูโครสและแลคโตส สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนไดซัลไฟล์ได้เป็นส่วนใหญ่ เป็นเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลา นำมาตรวจทางซีโรวิทยาอีก โดยทดสอบปฏิกิริยาตกตะกอนแอกกลูติเนชั่นของเชื้อกับแอนติซีรั่มต่อ Salmonella O polyvalent กลุ่ม A –67 ดังนี้ คือ หยดแอนติซีรั่ม 1 หยดบนสไลด์ เขี่ยโคโลนีจาก TSI ลงผสมในแอนติซีรั่ม ถ้าให้ผลบวกปฏิกิริยาตกตะกอนจะเกิดภายใน 15 วินาที นำเชื้อที่ให้ผลบวกไปทดสอบหาซีโรกรุ๊ป โดยใช้แอนติซีรั่มจำเพาะต่อ ซาลโมเนลลากลุ่ม D ซึ่งเป็นกลุ่มของ *S. enteritidis*

ในกรณีที่มีไก่ป่วยตายลงระหว่างทดลอง ได้ทำการผ่าชากดูรอยโรค แบ่งอวัยวะภายในคือ ตับ ม้าม ลำไส้เล็กส่วนไส้ตรงและไส้ตัน มาเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar ที่ผสมเลือดแกะ 5% (BA) และ Mac Conkey Agar ส่วนหนึ่ง สำหรับเชื้อแบคทีเรียทั่วไป อีกส่วนหนึ่งเพาะลงใน BPW จากนั้นถ่ายเชื้อลง MSRV กับ TTB จาก TTB เพาะลง XLT$_4$ ทั้ง MSRV และ XLT$_4$ ผสมกรดนาลิกดิซิค จำนวน 100 ไมโครกรัม/มล. สำหรับแยกเชื้อ *S. enteritidis (nal)* ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

การเตรียมแอนติเจนสำหรับการทดสอบฮีแมกกลูติเนชั่นและอีไลซ่า

แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบได้จากการสกัดสาร LPS ที่มีในผนังเซลล์ของเชื้อ นำเชื้อ *S. enteritidis* ที่เก็บในวุ้น agar จากหลอดแก้วมาเพาะในจานเพาะเชื้อบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 18-20 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว TSB เขย่าและบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (shaking incubator) จึงถ่ายเชื้อจาก TSB ลงเพาะใน TSA ที่บรรจุในขวดแก้ว Roux flask ขนาด 250 มล. ขวดละ 3 มล. อีกครั้งหนึ่ง บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ใช้ลูกแก้ว (glass bead) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บรวบรวมเชื้อจาก TSA มาล้างในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) จำนวน 3 ครั้ง ตะกอนเชื้อที่ได้นำมาวัดน้ำหนัก (dry weight) เป็น

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางในน้ำเกลือให้มีน้ำหนักประมาณ 10 มก/มล. จึงเติม น้ำเกลือไปอีก 10 เท่า จากนั้นสกัดสาร LPS จากเซลล์เชื้อด้วยวิธีของ Wesphal et al. (1965) และ Chaicumpa et al. (1980) มีรายละเอียดดังนี้ คือ อุ่น phenol ความเข้มข้น 90% ให้มีอุณหภูมิประมาณ 56°C เติมลงในน้ำเกลือที่มีเซลล์เชื้อแขวนตะกอนปริมาณเท่ากันให้มีแท่งแม่เหล็กกวนอยู่ตลอดเวลา เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและเก็บไว้ที่ 4°C ค้างคืนให้สารละลายแยกชั้น ดูดส่วนใสที่อยู่ด้านบน ปั่น 2000 รอบ 20 นาที ให้ส่วนที่ไม่ต้องการตกตะกอน LPS จะละลายอยู่ในน้ำใส ดูดน้ำใสมาเติมเอธิลเอลกอฮอลล์ 95% ในปริมาณเท่ากัน เพื่อให้กรดนิวคลิอิคที่ละลายอยู่ตกตะกอน กรองสารละลายด้วยไยแก้ว แล้วเติมเอธิลแอลกอฮอลล์ลงไปอีก 4 เท่า จึงนำไปปั่น 12,000 รอบ 30 นาที เทน้ำใสทิ้ง เก็บตะกอนทำเป็นสารละลายโดยเติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย แล้วนำไปไดอาลัยซีส (dialysis) โดยใส่ถุงเซลโลเฟน ผูกหัวและท้ายถุงให้แน่น แช่ในภาชนะใส่น้ำกลั่นจำนวน 4,000 มล. ให้มีแท่งแม่เหล็กกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1-2 วัน เปลี่ยนน้ำ 3 ถึง 4 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายจากถุงเซลโลเฟนมาปั่นในเครื่องปั่นความเร็วสูง (ultracentrifuge) ประมาณ 28,000 รอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตะกอนที่ได้ คือ LPS นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง จึงวัดน้ำหนักอีกครั้งหนึ่ง แล้วปรับให้สารละลาย LPS มีความเข้มข้น 12 มก./มล. ในน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.enteritidis*

เปรียบเทียบวิธีการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. enteritidis* ในไก่ทดลองจากการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 ด้วยวิธี

1. Indirect Hemagglutination (IHA)

ทำการทดสอบด้วยวิธีของ Chaicumpa et al. (1981) คือ นำแอนติเจนส่วนของ LPS ที่เตรียมไว้แล้วมาปรับให้มีความเข้มข้นของ LPS เป็น 1 มก/มล. ในน้ำเกลือและทำให้เป็นด่างด้วยน้ำยา NaOH 5 N ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.1 N บ่มสารละลายที่ 37°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จึงปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย HCl 1N เติมโซเดียมอไซด์ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.02% เก็บที่ 4°C เมื่อเริ่มทำการทดลอง นำสารละลาย LPS ที่เป็นด่างแล้ว ปรับให้เป็น 100 ไมโครกรัม/มล. มา coat บนเม็ดเลือดแดงสดของแกะ (SRBC) ที่ได้ล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง แล้วทำเป็นสารแขวนลอย 5% เติมลงไปในปริมาณเท่ากัน บ่มที่ 37°C เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จึงปั่น แยก SRBC ที่ coat ด้วย LPS แล้ว ให้ตกตะกอน ล้าง 3 ครั้ง จึงปรับให้มีปริมาตรของ SRBC เป็น 2.5% ในน้ำเกลือ

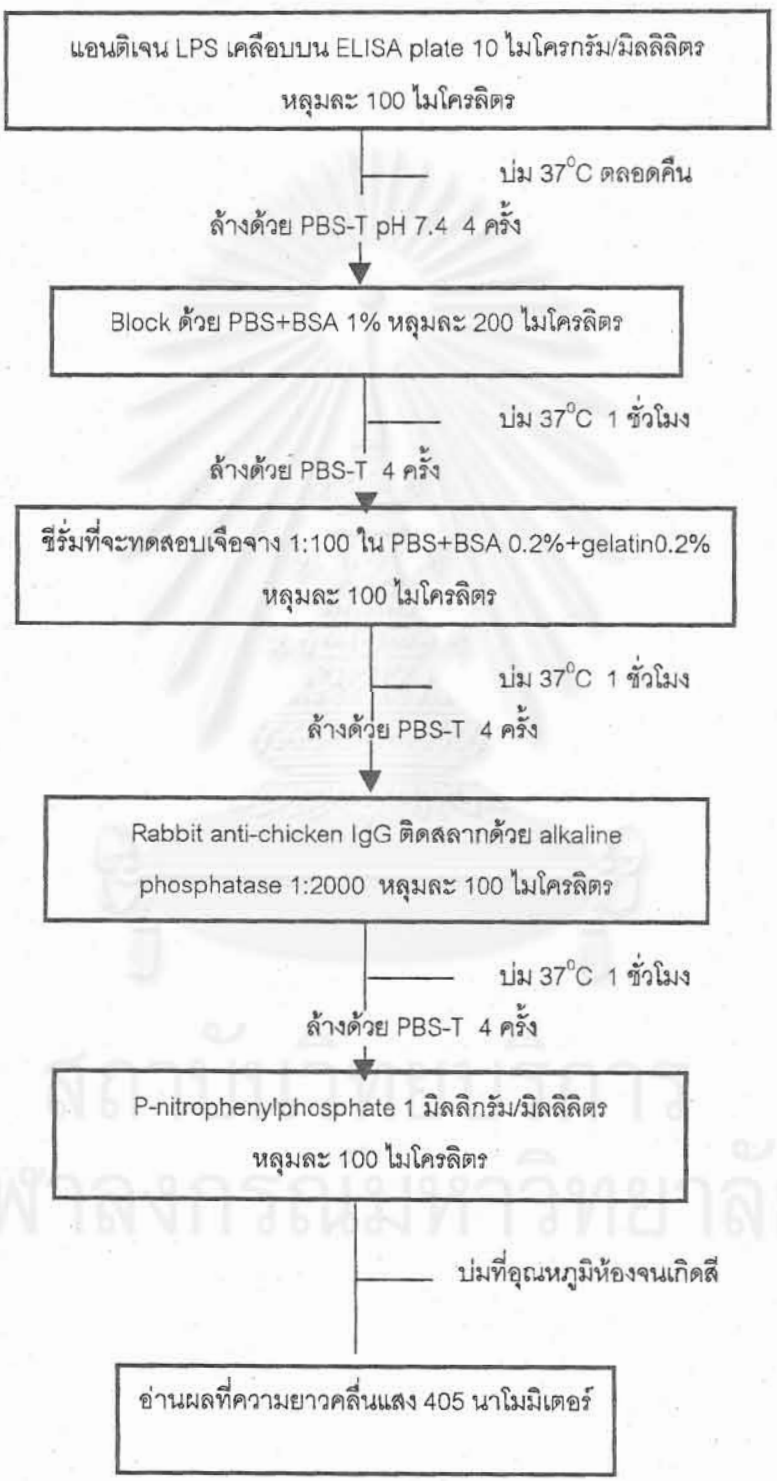
วิธีทดสอบ IHA กระทำในหลุมบน microtiter plate (Greiner) ใช้ปริมาณซีรั่มไก่ป่วย 50 ไมโครลิตร ทำให้เจือจาง เป็น 2 เท่า (two-fold serial dilution) ด้วยน้ำเกลือเริ่มจาก 1 : 2 ถึง 1 : 256 ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน คือ LPS ที่ coat บน SRBC หลุมละ 50 ไมโครลิตรเช่นกัน บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 37°C 30-60 นาที จึงอ่านผลเป็น hemagglutination titer คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของซีรั่มไก่ที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของ SRBC ได้ 50% เปรียบเทียบกับหลุมที่ไม่ได้ใส่ซีรั่ม มีเพียงน้ำเกลือและแอนติเจนเท่านั้นในทุกแถวของตัวอย่างซีรั่ม (negative control)

2. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ใช้แอนติเจน LPS เช่นเดียวกับการทดสอบ IHA แต่ปรับความเข้มข้นของแอนติเจนให้เป็น 10 ไมโครกรัม/มล. วิธีทดสอบ ELISA ใช้โพลีสไตลีนไมโคร ELISA เพลท (NUNC) ดัดแปลงจากวิธีของ Cooper et al. (1989) กับ Chaicumpa et al. (1988) มีขั้นตอนดังรูปที่ 3 คือ เคลือบ ELISA เพลทด้วยแอนติเจน LPS ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. ใน 50 มิลลิโมล ของ carbonate และ bicarbonate buffer pH 9.6 ทุกหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร บ่ม plate ที่ 37°C ทิ้งค้างคืนจนแอนติเจนแห้ง ล้าง 4 ครั้งด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ผสมด้วย Tween 20 0.05% (PBS-T) แล้ว block ด้วย PBS ผสม Bovine Serum Albumin (BSA) 1% จำนวน 200 ไมโครลิตรทุกหลุมบ่มที่ 37°C 1 ชั่วโมง จึงล้าง 4 ครั้ง ด้วย PBS-T จากนั้นเติมซีรั่มไก่ที่ต้องการทดสอบโดยเจือจางเป็น 1:100 ในตัวทำละลาย PBS ผสม BSA 0.2% และ gelatin 0.2% ใส่ในหลุมทดสอบตัวอย่างละ 2 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C 1 ชั่วโมง ล้างอีก 4 ครั้ง แล้วเติม rabbit anti - chicken IgG ที่ติดสลากด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase (Sigma) เจือจางเป็น 1:2000 ในตัวทำละลายเดียวกันกับซีรั่ม ใส่ทุกหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C 1 ชั่วโมง ล้าง 4 ครั้ง จึงเติมสับสเตรท P-nitrophenylphosphate (Sigma) ที่ละลาย ใน diethanolamine buffer 10% (pH 9.5) ให้มีความเข้มข้น 1 มก/มล. จำนวน 100 ไมโครลิตรทุกหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนเกิดสีในหลุมทดสอบ สังเกตได้ด้วยตาเปล่า นำไปวัดค่าความเข้มข้นของสีอ่านเป็นค่า optical density (OD) จากเครื่องอ่าน ELISA Multiskan MS (Labsystems) ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนมิเตอร์ บันทึกผล เปรียบเทียบกับค่าซีรั่มบวกและค่าซีรั่มลบเปรียบเทียบ

ค่า cut off value ของ ELISA คำนวณจากค่า 0.D และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.enteritidis* จาก ซีรั่มไก่ปลอดเชื้อ SPF (specific pathogen free) ตัวอย่างละ 3 หลุม ที่อายุแตกต่างกันตั้งแต่ 12 สัปดาห์ถึง 40 สัปดาห์ จำนวน 145 ตัวอย่าง

รูปที่ 3 ไดอะแกรมขั้นตอนการทดสอบวิธี ELISA



ซีรั่มลบเปรียบเทียบหรือกลุ่มควบคุม (control) ได้จากไก่เนื้อพันธุ์อาเบอร์เอเคอร์ จากฟาร์มที่ปลอดเชื้อ *S.enteritidis* อายุตั้งแต่ 12 สัปดาห์ จนถึง 22 สัปดาห์ จำนวน 6 ฝูง 72 ตัว นำมาทดสอบ ELIS Aหาค่าเฉลี่ย 0.D เพื่อเปรียบเทียบกับไก่ที่ทำให้ติดเชื้อโดยการทดลอง

ซีรั่มบวกเปรียบเทียบได้จากการฉีดเชื้อ *S.enteritidis* 10^6 CFU เข้ากล้ามเนื้อไก่พันธุ์เดียวกัน อายุ 20 สัปดาห์ จำนวน 6 ตัว โดยใช้อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เป็นแอดจูแวนฉีด 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ จึงเก็บซีรั่มนำมารวมกัน (pooled positive sera) ใช้ในการทดสอบ ELISA ต่อไป

ตัวอย่างซีรั่มทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง นำมา inactivate ที่ 56^0C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้ one-way analysis of variance และ Dunnett's Multiple Comparison test วิเคราะห์ความแตกต่างของค่า OD จากวิธี ELISA ในกลุ่มไก่ติดเชื้อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และ t-test วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนไก่ที่ให้ผลบวกวิธี IHA และวิธี ELISA

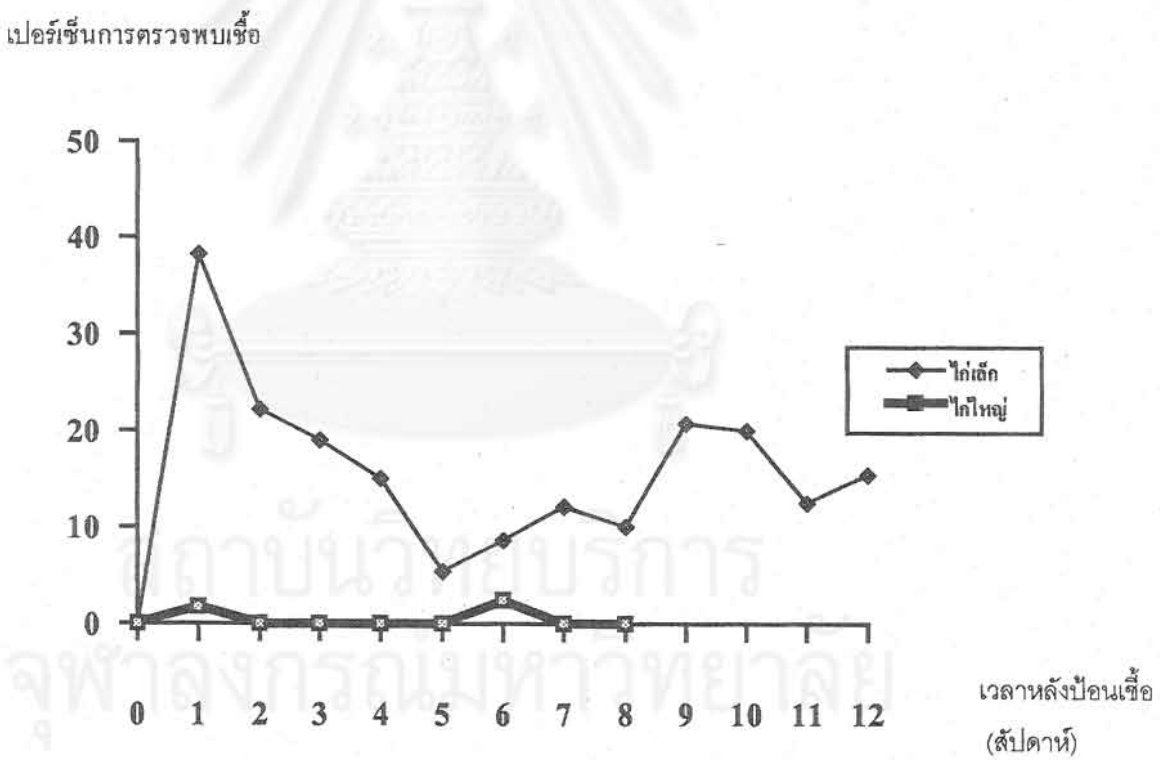
ผลการทดลอง

ผลการเพาะแยกเชื้อ

ผลการตรวจหาเชื้อ *S.enteritidis* จากสวอปอุจจาระไก่ แสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 4 จากการทดลองที่ 1 พบว่าหลังการป้อนเชื้อ ซาลโมเนลลา หนึ่งสัปดาห์ไก่ (อายุ 16 วัน) สามารถตรวจพบเชื้อในอุจจาระได้ ลูกไก่มีการขับเชื้อออกมากับอุจจาระทุกสัปดาห์ในอัตราที่แตกต่างกัน โดยจะพบอัตราการขับเชื้อ (shedding) มากที่สุดในสัปดาห์แรกหลังป้อนเชื้อ 38.2% และค่อยๆ ลดลงตามลำดับจนถึงสัปดาห์ที่ 5 (44 วัน) พบการขับเชื้อต่ำที่สุด 5.4% จากนั้นจะขับเชื้อมากขึ้นอีกในอัตราที่ไม่แน่นอนจนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการเพาะแยกเชื้อจากสวอปอุจจาระไก่ในการทดลองที่ 2 ตรวจพบเชื้อ *S.enteritidis* เพียงตัวอย่างเดียวจากไก่อายุ 13 สัปดาห์ 58 ตัว ภายหลังการป้อนเชื้อสัปดาห์แรก และตรวจพบอีกครั้งจากไก่อายุ 18 สัปดาห์ จำนวน 1 ตัวจากไก่ 48 ตัวหลังป้อนเชื้อ 6 สัปดาห์ ระหว่างการทดลองที่ 1 ได้มีไก่ทยอยตาย เมื่อนำชิ้นส่วนอวัยวะ ตับ ไส้ต้น และลำไส้เล็ก มาเพาะแยกเชื้อ พบเชื้อ *S.enteritidis* ที่ตับและไส้ตันของไก่ตายที่อายุ 42 วัน (1 ตัว) , 48 (1) , 51 (2) , 72 (2) , 79 (1), และ 86 วัน (2) และพบเชื้อ *E.coli* จากอวัยวะไก่ที่ตายเองนอกเหนือจากที่กล่าวมาทั้งหมด หลังการทดลองสิ้นสุดลง ผลการเพาะเชื้อจากอวัยวะไก่ที่

ตารางที่ 2 ผลการตรวจแยกเชื้อ *S.enteritidis* จากสวอปอุจจาระไก่ (การทดลองที่ 1)

อายุไก่ (วัน)	8	16	23	30	37	44	51	58	65	72	79	86	92
สัปดาห์หลังติดเชื้อ	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
จำนวนบวก/ จำนวนทดสอบ	0/50	18/47	10/45	8/42	6/40	2/37	3/35	4/33	5/30	6/29	5/25	2/16	2/13
%	0	38.2	22.2	19.0	15.0	5.4	8.6	12.1	16.7	20.7	20.0	12.5	15.4



รูปที่ 4 เปรียบเทียบผลการตรวจแยกเชื้อ *S enteritidis* จากสวอปอุจจาระไก่

เหลือพบ *S.enteritidis* จากไส้ตันและไส้ตรงของไก่ 1 ตัว และจากม้ามไก่ 2 ตัว รวม 3 ตัว จากจำนวน 13 ตัว ที่เหลือในสัปดาห์สุดท้าย นอกนั้นไม่พบเชื้อใดๆ

สำหรับการทดลองที่ 2 พบว่ามีไก่ตายที่อายุ 18 สัปดาห์ และแยกเชื้อ *S.enteriditis* ได้จากตับเพียงตัวเดียว ไก่ที่ตายนอกจากนั้น ไม่พบเชื้อใดๆ การทดลองสิ้นสุดลงหลังป้อนเชื้อ 8 สัปดาห์ ตรวจไม่พบเชื้อ *S.enteritidis* จากอวัยวะไก่ที่เหลืออยู่ทั้งหมด 35 ตัวเลย

การกำหนดค่าบวกและค่าลบ (positive/negative cut off value)

ค่า cut off วิธี ELISA คำนวณจากค่าเฉลี่ย O.D ของ ซีรั่มไก่ SPF 145 ตัวอย่าง รวมกับ 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของค่าเฉลี่ย O.D นั้น ซึ่งมีค่า อยู่ระหว่าง 0.111 ถึง 0.287 และค่าที่ได้ คือ $0.19 \pm 3\ (0.05) = 0.34$ (ตารางที่ 3) หมายความว่า ค่า O.D ที่ได้จากการตรวจซีรั่มมากกว่าหรือเท่ากับ 0.34 ตัดสินเป็นบวก ค่า O.D ต่ำกว่านี้ตัดสินเป็นลบ ส่วนวิธี IHA จากผลการทดลองครั้งนี้ไตเตอร์ 1:16 ขึ้นไป นับเป็นซีรั่มที่ให้ผลบวกคำนวนตามสูตรและวิเคราะห์ค่าจุดตัดด้วยกราฟเส้น ROC (Response – Operating Characteristic) ตามวิธีของ Smith (1995)

ผลการตรวจแอนติบอดีต่อ *S. enteritidis*

การทดลองที่ 1 จากการสุ่มตัวอย่างตรวจเลือดของไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 8 วันทุกสัปดาห์ตลอดเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าไม่สามารถตรวจหาแอกกลูติเนตแอนติบอดีจากลูกไก่ส่วนใหญ่ โดยวิธี IHA ได้ มีเพียงซีรั่ม 2 ตัวอย่างเท่านั้นที่ตรวจพบแอนติบอดี คือ ไก่ 1 ตัว จากการสุ่มตัวอย่างซีรั่ม 16 ตัว หลังป้อนเชื้อ 4 สัปดาห์ (อายุ 37 วัน) และอีก 1ตัว จาก 16 ตัวอย่าง หลังป้อนเชื้อ 11 สัปดาห์ (86 วัน) มีซีรั่มไตเตอร์ 1 : 16 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบวิธี ELISA ให้ผลบวก 2 ตัวอย่าง หลังป้อนเชื้อ 4 สัปดาห์เช่นกันและไม่พบผลบวกอีก จนไก่อายุ 65 วัน หรือหลังป้อนเชื้อ 7 สัปดาห์ขึ้นไป สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ทุกสัปดาห์ ให้ผลบวกอยู่ในระหว่าง 12 เปอร์เซ็นต์ ถึงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

การทดลองที่ 2 ในไก่ที่ได้รับเชื้อเมื่ออายุ 12 สัปดาห์ ตรวจพบแอกกลูติเนตแอนติบอดี โดยวิธี IHA หลังป้อนเชื้อ 1 สัปดาห์ จนตลอดการทดลอง เริ่มตั้งแต่จาก 8 เปอร์เซ็นต์จนถึง 38 เปอร์เซ็นต์ ไตเตอร์สูงสุดที่ได้คือ 1:128 เช่นเดียวกับวิธี ELISA ที่ตรวจพบแอนติบอดีหลังป้อนเชื้อ 1 สัปดาห์ แต่จำนวนไก่ที่ให้ผลบวกมีมากกว่า คือ จากมากกว่า 29 เปอร์เซ็นต์ จนถึงเกือบ

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบซีรั่มของไก่ SPF จำนวน 145 ตัวโดยวิธี ELISA

ค่า Optical Density (O.D)					
0.239	0.232	0.140	0.155	0.230	0.266
0.218	0.261	0.127	0.159	0.254	0.183
0.253	0.129	0.121	0.178	0.252	0.209
0.263	0.261	0.138	0.145	0.205	0.115
0.287	0.197	0.154	0.205	0.231	0.114
0.225	0.281	0.131	0.162	0.196	0.130
0.237	0.190	0.143	0.174	0.133	0.149
0.266	0.126	0.153	0.138	0.238	0.119
0.281	0.204	0.135	0.167	0.198	0.142
0.217	0.230	0.157	0.143	0.165	0.152
0.237	0.213	0.121	0.264	0.164	0.138
0.273	0.265	0.128	0.177	0.260	0.114
0.269	0.200	0.114	0.230	0.140	0.138
0.286	0.190	0.153	0.246	0.113	0.120
0.251	0.235	0.120	0.232	0.163	0.154
0.276	0.213	0.160	0.131	0.205	0.124
0.257	0.167	0.116	0.199	0.206	0.208
0.209	0.149	0.128	0.267	0.218	0.283
0.237	0.191	0.153	0.254	0.187	0.259
0.239	0.227	0.133	0.252	0.189	0.272
0.225	0.177	0.141	0.172	0.195	0.249
0.253	0.193	0.139	0.166	0.190	0.250
0.258	0.195	0.111	0.221	0.238	0.249
0.252	0.120	0.133	0.210	0.250	0.134
0.230					

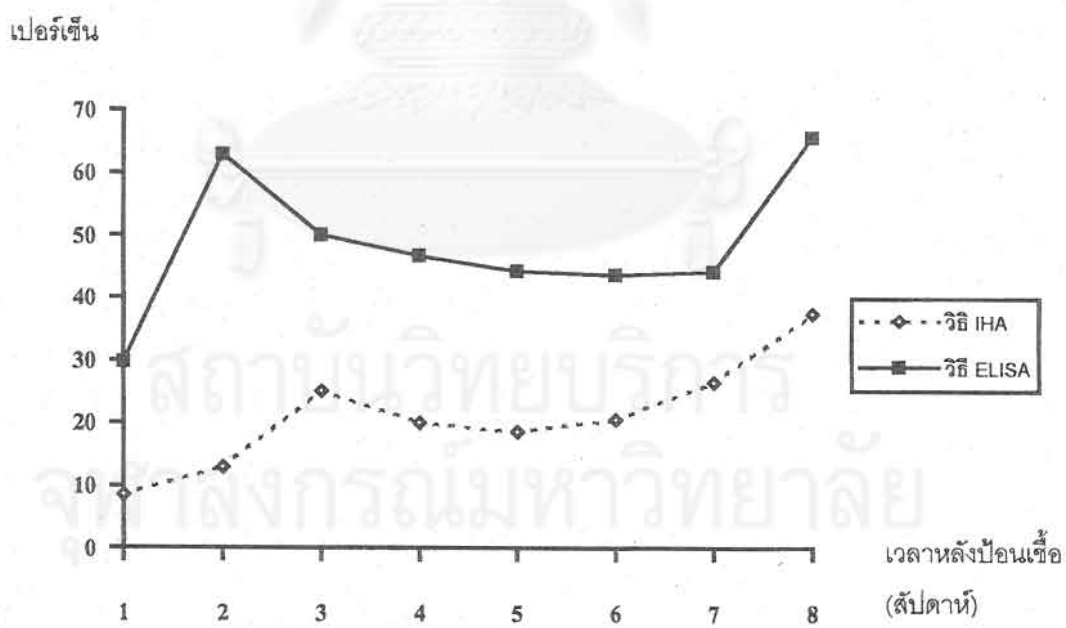
ค่า Cut off = ค่าเฉลี่ย O.D. + 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

= 0.19 + 0.05 = 0.34

ช่วงค่า O.D อยู่ระหว่าง = 0.111 – 0.287

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบแอนติบอดีต่อ *S.enteritidis* ในการทดลองที่ 2

เวลาหลังป้อนเชื้อ (สัปดาห์)	อายุไก่ (สัปดาห์)	IHA		ELISA	
		จำนวนบวก/จำนวนทดสอบ	%	จำนวนบวก/จำนวนทดสอบ	%
1	13	4/47	8.5	14/47	29.8
2	14	7/54	12.9	34/54	62.9
3	15	8/32	25.0	16/32	50.0
4	16	9/45	20.0	21/45	46.7
5	17	8/43	18.6	19/43	44.2
6	18	8/39	20.5	17/39	43.6
7	19	8/34	26.5	15/34	44.1
8	20	12/32	37.5	21/32	65.6

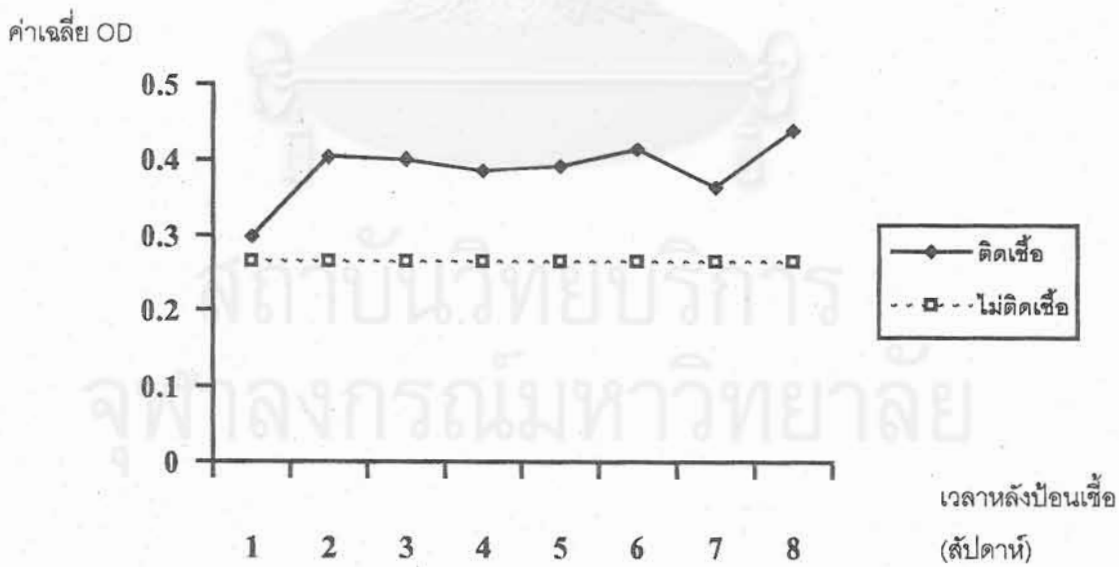


รูปที่ 5 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นของจำนวนไก่ที่ให้ผลบวก (%ความไว) จากการตรวจทางซีโรวิทยา (การทดลองที่ 2)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบวิธี ELISA ในการทดลองที่ 2

เวลาหลังป้อนเชื้อ (สัปดาห์)	อายุไก่ (สัปดาห์)	จำนวนไก่ที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย O.D ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	13	47	0.298 ± 0.107
2	14	54	0.404 ± 0.158
3	15	32	0.400 ± 0.215
4	16	45	0.386 ± 0.196
5	17	43	0.392 ± 0.212
6	18	39	0.413 ± 0.226
7	19	34	0.364 ± 0.130
8	20	32	0.439 ± 0.181

ค่าเฉลี่ย O.D ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากซีรั่มของไก่กลุ่มควบคุมจำนวน 72 ตัว = 0.266 ± 0.075



รูปที่ 6 เปรียบเทียบผลการทดสอบวิธี ELISA ในไก่กลุ่มติดเชื้อกับกลุ่มควบคุม (การทดลองที่ 2)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

66 เปอร์เซ็นต์เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 (ตารางที่ 4) ซึ่งผลการตรวจระหว่างวิธี IHA และ ELISA จะสอดคล้องกันไปในทิศทางเดียวกันและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .005$) ดังรูปที่ 5

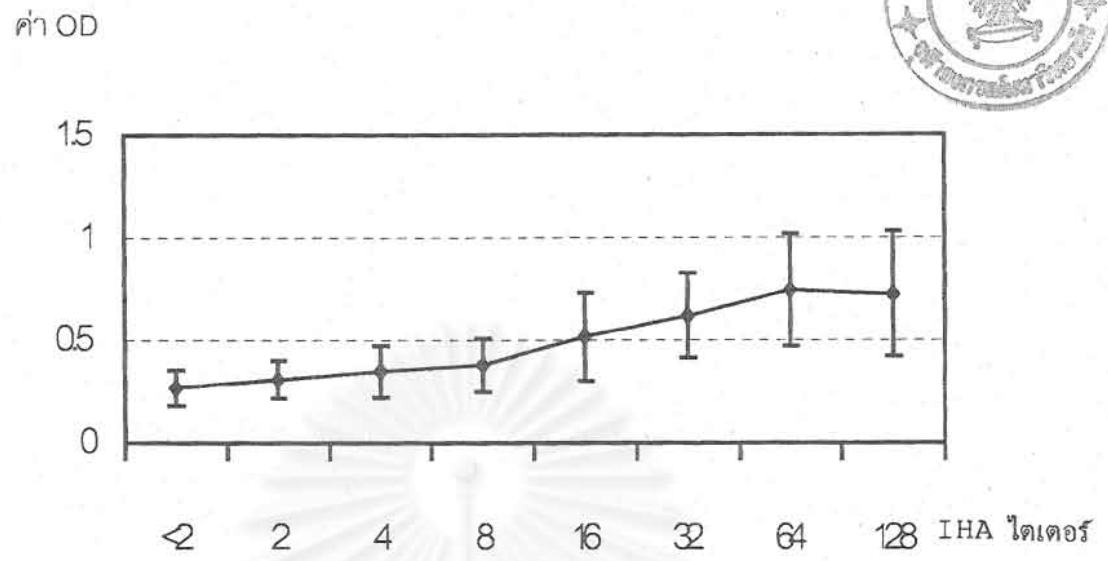
ส่วนค่าเฉลี่ย O.D ที่ได้จากการตรวจไก่ฝูงนี้ทุกสัปดาห์ แสดงในตารางที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับซีรั่มไก่ที่ปลอดเชื้อ *S. enteritidis* กลุ่มควบคุมในช่วงอายุเดียวกัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ย O.D = 266 $\pm$ 0.075 พบว่าค่าเฉลี่ย O.D ในแต่ละสัปดาห์ของไก่ติดเชื้อแตกต่างจากค่าเฉลี่ย O.D ของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่หลังป้อนเชื้อ 2 สัปดาห์ขึ้นไป จนสิ้นสุดการทดลอง ($p < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย O.D อยู่ในช่วง 0.386 – 0.439 และมีแนวโน้มที่ค่า O.D จะสูงขึ้นไปอีกเมื่อไก่มีอายุมากขึ้น (รูปที่ 6)

ตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบแอกกลูติเนตแอนติบอดี จะมีค่าเฉลี่ย O.D จาก ELISA สูง ในทางกลับกันตัวอย่างเลือดที่ตรวจไม่พบแอกกลูติเนตแอนติบอดี จะมีค่า O.D เฉลี่ยต่ำ (ตารางที่6) ค่า OD มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อซีรั่มไตเตอร์จากการตรวจวิธี IHA เพิ่มขึ้น (รูปที่ 7)

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.enteritidis* โดยวิธี IHA และ ELISA

	ผลการตรวจวิธี IHA	
	ฮีแมกกลูติเนชั่น –	**ฮีแมกกลูติเนชั่น +**
ค่าเฉลี่ย O.D วิธี ELISA	0.332 $\pm$ 0.114	0.587 $\pm$ 0.247

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับ IHA ไตเตอร์ในไก่กลุ่มติดเชื้อ (การทดลองที่ 2)

วิจารณ์

จากผลการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบกับการทดลองที่ 2 พบว่า ในไก่อายุน้อยจะมีความไวรับโรคติดเชื้อ *S. enteritidis* ได้มากกว่าไก่อายุมาก ซึ่งไก่ใหญ่สามารถที่จะมีความต้านทานโรคโดยธรรมชาติได้ อาจเนื่องจากการพัฒนาของเชื้อที่พบปกติในลำไส้ (normal flora) หรือสารบางชนิดในลำไส้ที่ได้เพิ่มขึ้นตามอายุจนมีความเข้มข้นมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงกรดด่างในกระเพาะบด (gizzard) และเอ็นไซม์ในผิวเยื่อบุลำไส้ (Cooper and Fahey, 1970 ; Fuller and Jayne-William, 1968) ดังนั้นไก่ที่ได้รับเชื้อก่อนอายุ 2 สัปดาห์ จึงมีอัตราการป่วยและอัตราการตายมากกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อภายหลัง ซึ่งอาจไม่แสดงอาการของโรค แต่คงสภาพการเป็นพาหะของโรค และขับถ่ายเชื้อออกมาเป็นครั้งเป็นคราว (Williams et al., 1976) ในการทดลองที่ 1 จำนวนไก่ตายจากเชื้อนี้มีมากกว่าในการทดลองที่ 2 และสามารถแยกเชื้อจากอุจจาระได้ตลอดการทดลอง โดยเฉพาะอัตราการพบเชื้อสูงสุดในสัปดาห์แรกๆ หลังป้อนเชื้อ ต่อมาการขับเชื้อลดลง(สัปดาห์ที่ 4 และ5) ซึ่งเป็นระยะเดียวกับที่เชื้อแทรกซึมเข้าไปเพิ่มจำนวนมากขึ้นในอวัยวะของ reticulo-endothelial system (ตับ ม้าม ไขกระดูก เป็นต้น) ลุกลามเข้าสู่ระบบ (systemic) ทำให้มีการตายของเนื้อเยื่อ ไก่เริ่มทยอยตาย และตรวจพบเชื้อได้จากอวัยวะไก่ป่วยตายหลายตัว ระยะนี้เชื้อจะถูกพบในอุจจาระเพิ่มขึ้นอีก (Lax et al.,1995) ซึ่งขบวนการก่อโรคของ

เชื้อนี้ยังไม่เป็นที่กระจ่างชัด ตรงกันข้ามกับการทดลองที่ 2 ที่แยกเชื้อจากสวอปอุจจาระไก่ใหญ่ได้เพียง 2 ตัว และอวัยวะภายใน คือ ตับ ได้จากไก่ป่วยตายเพียงตัวเดียวซึ่งสนับสนุนรายงานของ Cooper et al. (1989) ที่ตรวจไม่พบเชื้อในอวัยวะสำคัญของไก่ใหญ่ที่เป็นพาหะยกเว้นที่รังไข่ ดังนั้นจึงเป็นที่ชัดเจนว่า การตรวจสภาวะโรคติดเชื้อในฝูง สำหรับไก่ใหญ่ทำได้ยาก เนื่องจากโอกาสที่จะตรวจแยกเชื้อจากอุจจาระได้มีน้อยและแอนติบอดีที่ตรวจจากวิธีแอกกลูติเนชั่นเดิมมักจะต่ำและไม่แน่นอน (William and Whittemore, 1975 ; Cooper et al., 1989)

การกำหนดค่า cut off value ในวิธี ELISA ใช้ตัดสินจากค่าเฉลี่ยของ O.D รวมกับ 3 เท่า หรือ 4 เท่า ของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยนั้น ซึ่งเป็นวิธีคำนวณเดียวกันกับการทดลองของนักวิจัยหลายท่าน เพื่อทำให้สามารถแยกฝูงไก่ติดเชื้อนี้จากฝูงปลอดเชื้อได้ชัดเจน (Cooper et al., 1989; Nicholas and Cullen, 1991 ; Nicholas, 1992) ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ 3 เท่า ของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็นค่ากำหนดผลบวกและผลลบ

การตรวจแอนติบอดีต่อ *S.enteritidis* ในซีรั่มลูกไก่ป้อนเชื้อที่อายุ 8 วัน แม้ว่า LPS-ELISA จะเริ่มตรวจพบแอนติบอดีได้ 4 สัปดาห์หลังป้อนเชื้อ แต่จำนวนบวกน้อยและไม่ต่อเนื่องจนไม่อาจบอกสภาวะโรคในฝูงได้ชัดเจน และพบว่าหลังป้อนเชื้อ 7 สัปดาห์ขึ้นไปจะสามารถบ่งชี้สภาวะการติดเชื้อนี้ได้สอดคล้องกับรายงานของ Desmidt et al.(1996) ที่สามารถตรวจแอนติบอดีในกลุ่มลูกไก่ป้อนเชื้อได้ตั้งแต่อายุ 8 สัปดาห์ขึ้นไปด้วย LPS-ELISA แม้ว่าเปอร์เซ็นต์จำนวนบวกในการทดลองครั้งนี้ (12-36%) จะไม่มากเท่าไก่ที่ป้อนเชื้ออายุมาก เมื่อเทียบกับวิธี IHA ซึ่งใช้แอนติเจนชนิดเดียวกัน แต่ตรวจพบเพียง 2 ตัวอย่างตลอด 12 สัปดาห์ของการทดลองเท่านั้น แสดงว่าวิธี ELISA มีความไวกว่ามาก

ในการทดลองที่ 2 จากการป้อนเชื้อในไก่อายุ 12 สัปดาห์ สามารถตรวจพบแอนติบอดีในฝูงหลังป้อนเชื้อ 1 สัปดาห์ ได้ทั้งสองวิธี แต่วิธี ELISA ให้จำนวนบวกมากกว่า และแอนติบอดีจะคงอยู่ในฝูงในตลอดการทดลอง โดยเฉพาะสัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป ระดับแอนติบอดีเริ่มสูงขึ้นอยู่ในระหว่าง 44-66% ซึ่งสามารถบ่งชี้สภาวะติดเชื้อได้ และมีความเป็นไปได้ว่าแอนติบอดีต่อ LPS นี้จะอยู่ได้เป็นระยะเวลาหลายเดือน (Dadtrast et al.,1990; Barrow and Lovell, 1991; Desmidt et al.,1996) อาจถึงหนึ่งปี การติดเชื้อโดยธรรมชาติ แอนติบอดีอาจอยู่นานกว่านั้น หรือตลอดชีวิตเพราะเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อที่ขับออกมาเป็นครั้งคราวของไก่ป่วยและไก่พาหะในฝูงเดียวกัน (Nicholas 1992) เปอร์เซ็นต์จำนวนบวกในการตรวจแอนติบอดีด้วย LPS – ELISA ที่ แตกต่างกันออกไปขึ้นกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง การสร้างภูมิคุ้มโรคและอายุไก่ ซึ่งไก่อายุมากขึ้นจะสร้างภูมิคุ้มโรคได้ดีกว่าไก่อายุน้อย (Mcleod and Barrow, 1991) จึงพบจำนวนบวกได้มากกว่า ดังจะเห็นได้จาก Chart et al. (1980) พบ 80% จากไก่กำลังไข่ที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติใกล้

เดียงกับ Cooper et al. (1984) ที่พบประมาณ 70% จากไก่พันธุ์อายุ 35-55 สัปดาห์ Nicholas and Cullen (1991) พบมากกว่า 60% ในไก่อายุ 40 สัปดาห์ ในขณะที่ Desmidht et al. (1996) รายงานเปอร์เซ็นต์การสุ่มตรวจแอนติบอดี ในกลุ่มติดเชื้อโดยธรรมชาติหลายกลุ่มหลายอายุแตกต่างกันมากตั้งแต่ ตรวจพบต่ำมากและบางฝูงตรวจไม่พบเลย จนถึงตรวจพบได้ 100% และในฝูงทดลองทำให้ติดเชื้อพบอย่างต่ำ 30% ซึ่งในฝูงที่พบแอนติบอดีต่ำหรือไม่พบเลย เขาให้เหตุผลว่าอาจเนื่องมาจากเพิ่งเริ่มติดเชื้อ หรือมีการใช้ยาปฏิชีวนะมาก่อน ซึ่งไม่มีใครสามารถบอกได้ว่ายาปฏิชีวนะจะมีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มโรคหรือไม่อย่างไร ดังนั้นการตรวจพบแอนติบอดีจึงไม่ได้สัมพันธ์กับการอยู่ในระยะโรค (active infection) ของไก่แต่ละตัว แต่บ่งชี้ว่าไก่ในฝูงได้ติดเชื้อแล้ว ซึ่งบางตัวอาจอยู่ในระยะของโรค หรือบางตัวอย่างอาจกำลังขับเชื้อเป็นครั้งเป็นคราวจนถึงระยะของการเป็นพาหะ (Thain, 1980 ; Hassan et al., 1990) จึงอาจเป็นสาเหตุของการตรวจพบจำนวนไก่ที่มีแอนติบอดีไม่แน่นอนในแต่ละสัปดาห์แม้ว่าจะเป็นไก่ฝูงเดียวกันก็ตามดังเช่นงานวิจัยครั้งนี้ แต่ก็พบว่าซีรั่มบางตัวอย่างที่ให้ผลฮีแมกกลูติเนชั่นเป็นลบจะมีค่าดูดกลืนแสงที่สูง ในขณะที่ซีรั่มที่ให้ผลฮีแมกกลูติเนชั่นเป็นบวก มีค่าดูดกลืนแสงต่ำ เช่นเดียวกับรายงานของ Chart et al. (1990) ที่เปรียบเทียบวิธี ELISA กับวิธีแอกกลูติเนชั่น ถ้าพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่า ODและซีรั่มไตเตอร์มีแนวโน้มสอดคล้องกัน แต่ค่าODจะมีช่วงแกว่งตัวมากที่ไตเตอร์สูงๆ อาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างที่ไตเตอร์สูงมีน้อย ความไวของวิธีการตรวจที่แตกต่างกัน รวมทั้งชนิดและการเปลี่ยนแปลงของอิมมูนโนโกลบูลิน ซึ่งวิธี ELISA เป็นการตรวจอิมมูนโนโกลบูลิน G เป็นส่วนใหญ่ ส่วนน้อยคืออิมมูนโนโกลบูลิน M (Hasson et al., 1990; Nicholas and Cullen,1991) ในขณะที่วิธี IHA เป็นการตรวจอิมมูนโนโกลบูลินทั้ง G และ M ขึ้นอยู่กับระยะของโรคแต่ละตัว (Chaicumpa et al.,1980)

ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มที่อาจจะเกิดขึ้นกับเชื้อซีโรวาร์อื่นๆ เช่น *S.gallinarum* , *S.typhimurium* ดังรายงานอื่นๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้น ซึ่งคณะผู้วิจัยเห็นว่ามิได้ก่อปัญหามากนัก เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่โฮโมโลกัสกันจะเกิดได้แรงกว่าปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เป็นเฮทเทอโรโลกัสกันหมายความว่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่มจะอ่อนกว่าปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีกลุ่มที่ตรงกัน (Cooper et al., 1989 ; Nicholas and Cullen, 1990 ; Desmidt, 1996) ซึ่งจะมีผลทำให้ค่า O.D ที่อาจเกิดจากปฏิกิริยาข้ามกลุ่มไม่สูงมากจนตัดสินเป็นบวก

สรุปผลการทดลอง วิธี ELISA แม้จะไม่สามารถตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ *S.enteritidis* ได้ 100% แต่สามารถบ่งชี้สภาวะการติดเชื้อในฝูงได้โดยเฉพาะในไก่อายุตั้งแต่ 8 สัปดาห์ขึ้นไป ดีกว่าวิธีอื่นๆ ดังนั้นวิธี ELISA จึงน่าจะเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับตรวจคัดฝูงไก่ เพื่อให้ปลอดโรคติดเชื้อ

S.enteritidis ในปัจจุบันนี้ อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงการทดลองใช้ส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์จากเชื้อเป็นแอนติเจน เพื่อให้มีความจำเพาะมากขึ้น ซึ่งอยู่ในขั้นตอนที่นักวิจัยทั้งหลายรวมทั้งคณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการค้นคว้าและทดลอง ที่อาจจะเป็นทางเลือกใหม่ ซึ่งจำเป็นต้องมีการทดลองให้แน่ชัดถึงประสิทธิภาพของการทดสอบ เพื่อให้ผลการตรวจแม่นยำยิ่งขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

อรุณ บ่างตระกูลนนท์ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และเกรียงศักดิ์ สายธนู. 2539. เชื้อโรคอาหารเป็นพิษ : สถิติของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2536-2538 , การประชุมสัมมนาทางวิชาการโรคติดเชื้อจากอาหารและการจัดระบบเฝ้าระวังการดื้อยาของจุลชีพ. 11-13 ธันวาคม, เพชรบุรี.

สยมพร ศิรินาวิน. 2541. Non-typhoidal Salmonellosis in Thailand : An overview. การสัมมนาระดับชาติเพื่อกำหนดแนวทางการแก้ไขปัญหาNon-typhoidal Salmonellosis ในประเทศไทย 15-16 มกราคม, กรุงเทพฯ.

สยมพร ศิรินาวิน, อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และพนิดา ชัยเนตร. 2542. การติดเชื้อซัลโมเนลลาที่ไม่ใช่ไทฟอยด์ในประเทศไทย. การสัมนาระดับชาติ เรื่อง "แนวทางการดำเนินงานการควบคุมโรคซัลโมเนลโลซีส" 26-27 สิงหาคม, กรุงเทพฯ.

WHO National Salmonella and Shigella Center, Department of Medical Sciences, 1998. Annual reports of Salmonellae in Thailand 1992-1997. การจัดสัมมนาระดับชาติเพื่อกำหนดแนวทางการแก้ไขปัญหา Non-Typhoidal Salmonellosis ในประเทศไทย. 15-16 มกราคม กรุงเทพฯ.

Altekruse, S., Tollefson L. and Bogel K. 1993. Control Strategies for *Salmonella Enteritidis* in five countries. USFDA/WHO in press.

Bangtrakulnonth, A., Pornruangwong S., Chalermchaikit T. and Saitanu K. 1993, *Salmonella enteritidis* infection in Thailand : A public health problem ? Proc 11 th International Symposium WAVFH. The world association of veterinary food hygienists. 24-29 October, Bangkok p. 175-180.

Barrow, P.A.,Lovell M.A.1991. Experimental infection of egg–laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. Avian Patho. 20 : 335-348

Barrow, P.A. 1992. ELISAs and the serological analysis of Salmonella infections in poultry : a review. Epidemiol. Infect. 109 : 361-369.

Carter, G.R. 1984. Enterobacteria, In : Diagnosis procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4 th ed. Charles C Thomas. p 92-110.

Chaicumpa, W., Pacharaprakiti C., Hootongkam C. and Plueksawan W. 1980. Antibody responses in cholera patients. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 11:46

Chaicumpa, W., Thin-Inta W., Khusmith S., Tapchaisri P., Echeverria P., Kalambheti T. and Chongsa-Nguan M. 1988. Detection with monoclonal antibody of *Salmonella typhi* antigen 9 in specimens from patients. J. Clin. Microbiol. 26 : 1824-1830.

Chart, H. Rowe B., Baskerville A. and Humphrey T.J. 1990. Serological response of chicken to *Salmonella enteritidis* infection. Eridemiol. Infect. 104 : 63-71.

Cooper, G.N. and Fahey K.J. 1970. Oral immunization in experimental Salmonellosis. III Behavior of virulent and temperature-sensitive mutant strains in the intestinal tissues of rats. Infection and Immunity 2 : 192-200.

Cooper, G.L., Nicholas R.A. and Bracewell C.D. 1989. Serological and bacteriological Investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella enteritidis.* Vet. Rec. p 567-572.

Dadrast, H., Hesketh D., Taylor D.J. 1990. Egg yolk antibody detection in identification of salmonella infected poultry. Vet. Rec. 126 : 219

Desmidt, M. Ducatelle R., Haesebrouck F., De Groot P.A., Verlinden M., Wijffels R., Hinton M., Bale J.A. and Allen V.M. 1996. Detection of antibodies to *Salmonella Enteritidis* in sera and yolks from experimentally and naturally infected chickens. Vet. Rec. p 223-226.

Fuller, R. and Jayne-William D.J. 1968. The origin of bacteria recovered from the peritoneum and yolk sac of healthy chickens. Brit. Poultry Sci. 9: 159-163.

Hasson, J.O., Barrow P.A. Mockett A.P.A. and Mcleod S. 1990. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. Vet. Rec. p 519-522.

Lax, A.J., Barrow P.A., Jones P.W. and Wallis T.S. 1995. Current perspectives in Salmonellosis , Br. Vet J. 151 : 351 – 377.

Mason, J. and Ebel E. 1992, APHIS SALMONELLA ENTERITIDIS CONTROL PROGRAM. Proceeding, San Diego Symposium on the diagnosis and control of Salmonella, Carter Printing Company, Richmond, USA

Mcleod, S. and Barrow P.A. 1991. Letters in Applied Microbiology. 13:294

Minga, U.M.1992. A disc ELISA for the detection of Salmonella group D antibodies in poultry. Research in Veterinary Science : 52 : 384-386.

Misher, B., Griffin P.M., Tauxe R.V., Cameron D.N., Hutcheson R.M. and Schaffarer W. 1991. *Salmonella Enteritidis* gastroenteritis transmitted by intact chicken eggs. Ann. Intern. Med. 115 : 190 – 494.

Nagaraja, K.V., Pomeroy B.S. and William J.E. 1991. Parathyroid infections : In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M., Yoder H.W., eds, Diseases of poultry Ames, Iowa : Iowa State University Press. p 99-130.

Nicholas, R.A.J., 1992. Serological response of chickens naturally infected with *Salmonella typhimurium* detected by ELSA. Br. Vet. J. 149 : 241-248.

Nicholas, R.A.J., and Andrews S.J. 1991. Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* in the yolk of hens' eggs. Vet. Rec. p 98-100.

Nicholas, R.A.J., and Cullen G.A. 1991. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken flocks. Vet. Rec. 26:74-76

Smith, R.D., 1995. Evaluation of diagnostic test. In: Veterinary Clinical Epidemiology: A problem- oriented approach. 2 nd ed. CRC Press, Inc. Florida, USA

Smith, P.J., Larkin M. and Brooksbank . 1972. Bacteriological and serological diagnosis of salmonellosis of fowls. Research in Veterinary Science. 5 : 460-467.

Thain, J.A. and Cullen G.A. 1978, Detection of *Salmonella typhimurium* infection of chickens. Vet. Rec. p143-145.

Varavithya, W., Vathanophas K., Bondhedatta L., Punyaratabandhu P., Sangchai R., Athipanyakom S., Wasi C., and Echeverria P. 1990. Importance of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in the etiology of diarrheal disease among children less than 5 years of age in a community in Bangkok, Thailand J. Clin. Microbiol. 28 : 2507-2510.

Westphal, O. and Jann K. 1965. Bacterial lipopolysaccharide: extraction with phenol - water and futher applications of the procedure. Methods Carbohydr. Chem. 5:83- 91

Williams, J.E. and Whittemore A.D. 1976. Comparison of six methods of detecting *Salmonella typhimurium* infection in chickens. Avian Dis. 20:728-734

Williams, J.E., and Whittemore A.D. 1975. Influence of age on the serological response of chicken to Salmonella typhimurium infection. Avian Dis. 19 : 745-760

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย