



การพัฒนาการเตรียมแอนติเจนสำหรับการตรวจไก่ที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ด้วยวิธี Rapid Slide Agglutination

Development of Antigen Preparation for Detecting Chicken Antibodies Directed Against *Salmonella* Enteritidis by Using Rapid Slide Agglutination

รุ่งโรจน์ แจ่มอัน¹ ภัทรา มุลจิตร์¹ ปันณิ พนมวัลย์² Sysavath Syhalath^{1,3} ณภัทร ปัญญาวรรณ¹ พงศกร ศรีจันทรา¹

มณฑิพย์ ยิ้มเจริญ¹ สมภพ เพริศพรายวงศ์¹ นวลอนงค์ ลินวัต¹ อรวรรณ บุตรดี¹ และ นรินทร์ อุประกรินทร์^{1*}

¹ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

²หน่วยงานชั้นสูตโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

³Research and Post-Graduate Studies Office, Savannakhet University, Savannakhet Province, Lao PDR

Rungrot Jam-on¹ Pattra Moonjit¹ Pun Panomwan² Sysavath Syhalath^{1,3} Napat Punyawan¹ Pongsakorn Srijantara¹

Montip Yimcharoen¹ Somphop Pertpraiwong¹ Nuananong Sinwat¹ Orawan Boodee¹ and Narin Upragarin^{1*}

¹Department of Farm Resources and Production Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

²Kamphaengsaen Veterinary Diagnostic center, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

³Research and Post-Graduate Studies Office, Savannakhet University, Savannakhet Province, Lao PDR

*Corresponding Author, E-mail: fvetru@ku.ac.th

Received: 7 May 2020 | Revised: 25 January 2021 | Accepted: 31 January 2021

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาการเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis (SE) สำหรับการตรวจ rapid slide agglutination (RSA) และเปรียบเทียบการเตรียมแอนติเจนด้วยวิธี formalin inactivation และ วิธี alcohol inactivation ตัวอย่างซีรัมที่ใช้สำหรับการทดสอบแบ่งเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม 1 ซีรัมจากไก่สุขภาพดีและปลอดการติดเชื้อซัลโมเนลลาจำนวน 60 ตัวอย่าง กลุ่ม 2 ซีรัมจากไก่ที่ได้รับ killed SE antigen จำนวน 20 ตัวอย่าง และกลุ่ม 3 ซีรัมจากไก่ที่ป้อนเชื้อ SE (10^6 CFU/ตัว) จำนวน 20 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า เมื่อทดสอบ RSA ด้วยแอนติเจนทั้ง 2 วิธี ตัวอย่างซีรัมจากไก่กลุ่ม 1 ให้ผลลบทั้ง 60 ตัวอย่าง (100%) ตัวอย่างจากไก่กลุ่ม 2 ให้ผลบวก 20 ตัวอย่าง (100%) ต่อแอนติเจน SE formalin inactivated และให้ผลบวก 19 ตัวอย่าง (95%) ต่อแอนติเจน SE alcohol inactivated และตัวอย่างซีรัมจากไก่กลุ่ม 3 ให้ผลบวก 19 ตัวอย่าง (95%) ต่อแอนติเจน SE formalin inactivated และให้ผลบวก 16 ตัวอย่าง (80%) ต่อแอนติเจน SE alcohol inactivated เมื่อนำแอนติเจนที่เตรียมทั้ง 2 วิธี มาทดสอบ cross reactivity ต่อเชื้อ *S. Typhimurium* (ST) โดยใช้ตัวอย่างซีรัมของไก่ที่ให้ killed ST antigen หรือได้รับเชื้อ ST (10^6 CFU/ตัว) พบว่าผลการตรวจ RSA กับแอนติเจน SE formalin inactivated ให้ผลบวกต่ำกว่า แอนติเจน SE alcohol inactivated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อนำ แอนติเจนที่เตรียมทั้ง 2 วิธี ไปทดสอบ RSA กับซีรัมที่มาจากฝูงไก่ที่เลี้ยงเพื่อการค้า จำนวน 3 ฝูงพบว่า ผลการตรวจ RSA กับแอนติเจนที่เตรียมทั้ง 2 วิธีนี้ สามารถตรวจแยกฝูงไก่ที่สุขภาพดีและฝูงไก่ที่ติดเชื้อ SE ในฝูงได้

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าผลการทดสอบ RSA กับแอนติเจน formalin inactivated ให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าแอนติเจน alcohol inactivated และแอนติเจนที่เตรียมมาจากทั้ง 2 วิธีนี้สามารถนำไปใช้ตรวจซีรัมจากฝูงไก่ที่สงสัยมีการติดเชื้อ SE ในทางปฏิบัติได้

ABSTRACT

The aim of this study was to develop antigen preparation methods of *Salmonella* Enteritidis (SE) for rapid slide agglutination test (RSA) and to compare the methods between SE formalin inactivation and SE alcohol inactivation. Three groups of serum samples were prepared, including group 1 60 serum samples originated from healthy SE-negative chickens, group 2 20 serum samples originated from chickens injected with SE killed antigen, and group 3 20 serum samples originated from chickens infected with SE (10^6 CFU/bird). The result showed that all 60 serum samples from group 1 were tested and negative (100%) for RSA with either SE formalin inactivated antigen or SE alcohol inactivated antigen. In group 2, all serum samples were positive (100%) for RSA with SE formalin inactivated antigen and 19 samples were positive (95%) for RSA with SE alcohol inactivated antigen. In group 3 19 serum samples were positive (95%) for RSA with SE formalin inactivated antigens and 16 serum samples were positive (80%) for RSA with SE alcohol inactivated antigen. Furthermore, for testing a cross reactivity with *S. Typhimurium* (ST), the serum samples originated from either chickens injected with killed ST antigen or infected with ST (10^6 CFU/bird) were tested RSA with the antigen prepared and the result found that all serum samples were reacted to RSA with SE formalin inactivated antigen lower than to RSA with SE alcohol inactivated antigen ($p < 0.05$). Finally, serum samples originated from 3 chicken flocks raised commercially with healthy and SE infected conditions were tested RSA with the antigen prepared and gave specific results for both healthy and infected flocks. In conclusion, RSA with SE formalin-inactivated antigens gave better results than the test with SE alcohol-inactivated antigens and both SE antigens prepared could be practically used with RSA for detecting the serum samples originated from the SE infected chicken flock.

คำสำคัญ: Rapid Slide Agglutination *Salmonella* Enteritidis ไก่ ซีรัมวิทยา

Keywords: Rapid Slide Agglutination, *Salmonella* Enteritidis, Chicken, Serology

บทนำ

โรคซัลโมเนลโลซิส (salmonellosis) มีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียซัลโมเนลลา (*salmonella*) รูปร่างแท่งสั้น ย้อมติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เจริญเติบโตในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ มักพบเชื้อนี้อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ และเป็นเชื้อที่ก่อโรครุนแรงในสัตว์ปีกและสัตว์อื่น ๆ โรคนี้มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขศาสตร์ เชื้อซัลโมเนลลา สามารถติดต่อระหว่างสัตว์และคน (zoonosis) ได้ ในคนพบปัญหาก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ผู้ป่วยจะแสดงอาการท้องเสีย อุจจาระร่วง รุนแรง (Gast et al., 2002) ผู้ติดเชื้อจะได้รับเชื้อจากการกินอาหารดิบ ไม่ผ่านการปรุงสุก หรือจากวัตถุดิบอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ เช่น ไข่ เนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์

โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มาจากกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ในประเทศไทย พบมีการรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ตัวอย่างเช่น การสำรวจความชุกของเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในไข่ที่วางจำหน่ายในจังหวัดปทุมธานี พบว่า ไข่ไก่มีการปนเปื้อนถึงร้อยละ 9 ไข่เป็ดร้อยละ 12 และไข่นกกระทาร้อยละ 15 ตามลำดับ (ณัฐา และคณะ, 2558) รายงานการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อสัตว์จากร้านค้าปลีกที่วางจำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาเก็ตในจังหวัดนครศรีธรรมราชสูงถึงร้อยละ 67.4 (สมาลี, 2560) และรายงานความชุกของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคจากร้านจำหน่ายข้างถนนในจังหวัดร้อยเอ็ด พบมีการปนเปื้อนถึงร้อยละ 14.7 (อดิสร และคณะ, 2554) เป็นต้น

เชื้อซัลโมเนลลาที่ก่อโรคในสัตว์ปีกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม โรค fowl typhoid และ pullorum มีสาเหตุเกิดจากเชื้อ *S. Gallinarum* และ *S. Pullorum* ตามลำดับ (Barrow et al., 2012) และกลุ่มโรค paratyphoid มีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อซัลโมเนลลา ที่ไม่เลือกโฮสต์ ตัวอย่างเช่น *S. Enteritidis* (SE) หรือ *S. Typhimurium* (ST) เป็นต้น สำหรับประเทศไทย ฟาร์มสัตว์ปีกที่มีระบบการเลี้ยงแบบเชิงพาณิชย์ มีมาตรการในการควบคุมป้องกัน โรคซัลโมเนลโลซิส และการควบคุม การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก ตั้งแต่ภายในฟาร์ม ภายใต้แนวทางปฏิบัติของระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการควบคุมโรคซัลโมเนลลาสำหรับสัตว์ปีก พ.ศ. 2553 โดยเฉพาะเชื้อซัลโมเนลลาที่สำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ SE ST *S. Hadar* *S. Infantis* และ *S. Virchow* สำหรับสัตว์ปีกไข่และสัตว์ปีกเนื้อ จะเน้น SE และ ST เป็นหลัก ฟาร์มสัตว์ปีกภายในฟาร์มจะต้องไม่พบการติดเชื้อซัลโมเนลลา ชนิดที่กำหนดไว้ จากการเก็บตัวอย่างจากตัวสัตว์ มูลสัตว์ สิ่งปฏุนอง พื้นโรงเรือนเลี้ยงสัตว์ ส่งตรวจห้องปฏิบัติการเพาะแยกหาเชื้อ (bacterial culture) ตลอดระยะเวลาในการเลี้ยง

การวินิจฉัยโรคซัลโมเนลโลซิส สามารถตรวจสัตว์ที่ติดเชื้อได้ด้วยวิธีการเพาะแยกหาเชื้อ การตรวจทางซีรัมวิทยา (serology) หรือ การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี PCR ซึ่งในแต่ละวิธีจะมีข้อดีข้อด้อยแตกต่างกัน การเพาะแยกหาเชื้อถือเป็นวิธีมาตรฐานอ้างอิง (gold standard) สำหรับการวินิจฉัยโรคซัลโมเนลโลซิส (manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2019) จะใช้ระยะเวลา 5-7 วัน ในการทราบผลการตรวจ ซึ่งใช้เวลานาน และราคาสูง ในกรณีที่สัตว์มีการติดเชื้อ แต่ปริมาณการปล่อยเชื้อออกมาทางมูล (fecal shedding) ในระดับต่ำ จะส่งผลทำให้ผลการตรวจเป็นลบ ทั้ง ๆ ที่สัตว์นั้นมีการติดเชื้อแล้ว โดยเฉพาะเชื้อซัลโมเนลลาบางชนิดที่มักพบในมูลระดับต่ำ เช่น *S. Pullorum* (Jones, 1913) เป็นต้น ระยะเวลาภายหลังการติดเชื้อที่ยาวนานขึ้นจะส่งผลต่อตรวจพบเชื้อที่ลดลง และสายพันธุ์ของสัตว์ปีกที่ส่งผลต่อปล่อยเชื้อปนเปื้อนออกมากับมูลใกล้เคียงกัน (Barrow et al., 2004) สัตว์ที่มีการติดเชื้อแฝงแต่ไม่แสดงอาการ จะไม่สามารถกำจัดสัตว์ปีกที่ติดเชื้อออกจากฝูงได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช่วิธีอื่น ๆ ร่วมกับการตรวจเพาะแยกเชื้อ ในการกำจัดโรคออกจากฝูงสัตว์ปีก

นอกจากวิธีการเพาะแยกหาเชื้อแล้ว การตรวจตัวอย่างทางซีรัมวิทยา เป็นอีกวิธีที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยสัตว์ปีกที่ติดเชื้อในทางปฏิบัติ ซึ่งจะใช้ระยะเวลาการตรวจและรายงานผลรวดเร็วกว่าการเพาะแยกหาเชื้อ ในการควบคุมและการป้องกันโรค มีความจำเป็นต้องตรวจพบสัตว์ปีกภายหลังที่ได้รับเชื้อในระยะเวลาที่สั้นที่สุด ตัวอย่างวิธีการตรวจทางซีรัมวิทยาได้แก่ tube agglutination test (TA) ที่ได้พัฒนาและรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1913 (Jones, 1913) rapid serum agglutination test (RSA) ได้พัฒนาและรายงานในปี ค.ศ. 1927 (Runnels et al., 1927) และ whole-blood agglutination test (WBA) ได้พัฒนาและรายงานในปี ค.ศ. 1931 (Schaffer et al., 1931) เป็นต้น

วิธี RSA เป็นการตรวจ ทหาระดับแอนติบอดี immunoglobulin (Ig) M และ IgG ที่จำเพาะต่อเชื้อซัลโมเนลลาในซีรัมของสัตว์ปีกภายหลังจากการติดเชื้อ ซึ่งวิธี RSA จะตรวจระดับ IgM ได้ดีกว่าและตรวจพบได้รวดเร็วกว่า IgG แต่จะลดระดับในกระแสเลือดลงในระยะเวลาสั้น ความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของการตรวจ RSA ขึ้นอยู่กับ คุณภาพ ชนิด และการเตรียมแอนติเจน ที่นำมาใช้ตรวจ ซึ่งอาจทำให้ผลการตรวจผิดพลาดได้ (Barrow et al., 1992) (Tanaka, 1975) จากรายงานของ Yang และคณะ (2019) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบเชื้อ *S. Pullorum* ที่นำมาเตรียมแอนติเจนสำหรับการตรวจ RSA ระหว่างแอนติเจนที่เตรียมมาจากเชื้อ *S. Pullorum* ที่แยกได้จากฟาร์มสัตว์ปีกในท้องถิ่น กับแอนติเจนที่ผลิตจำหน่ายเพื่อการค้า พบว่าแอนติเจน ที่เตรียมเองให้ผลการตรวจ ที่ดีกว่า แอนติเจนที่จำหน่ายเพื่อการค้า (Yang et al., 2019)

ในส่วนของการตรวจ SE ด้วยวิธี RSA ในทางปฏิบัติ โดยทั่วไปจะใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *S. Pullorum* เนื่องจาก แอนติเจนของผนังเซลล์ ของเชื้อทั้งสองชนิดนี้เป็นซัลโมเนลลา serogroup D เหมือนกัน แต่มีรายงานปัญหาการตรวจ พบว่าผลการตรวจ RSA โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *S. Pullorum* มักจะไม่สัมพันธ์กับผลเพาะแยกเชื้อในราย *S. Pullorum* (Kim et al., 1991; Shivaprasad et al., 1990; Waltman and Horne, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่า แอนติเจนที่เตรียมมาจากเชื้อ SE ไม่มีจำหน่ายทั่วไป รวมทั้งในสิ่งแวดล้อมจะพบเชื้อซัลโมเนลลามีจำนวนหลากหลายชนิด ซึ่งจะส่งผลต่อการตรวจ

RSA ได้ ถ้าไม่ได้มีการใช้แอนติเจนที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อนั้น ๆ ดังนั้น จุดประสงค์ของการศึกษาคั้งนี้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเตรียมแอนติเจนของเชื้อ SE สำหรับการทดสอบ RSA เพื่อใช้ในการตรวจซีรัมไก่ที่มีปัญหาติดเชื้อ SE และเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ในทางปฏิบัติได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ SE จำนวน 2 isolates ได้แก่ F52 และ LAB และ ST isolate AV19 ที่ใช้ในการศึกษา เป็นเชื้อที่เพาะแยกได้มาจากลำไส้ของไก่ป่วย ที่ส่งตรวจวินิจฉัยโรคที่หน่วยงานชั้นสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

2. การเตรียม SE แอนติเจน สำหรับการทดสอบ RSA

การเตรียม SE แอนติเจน สำหรับการตรวจ RSA ได้ใช้ 2 วิธี เพื่อเปรียบเทียบกัน ได้แก่ formalin-inactivation และ alcohol-inactivation โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้

2.1 วิธี formalin inactivation ได้ใช้วิธีการของ Sumithra et al. (2013) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ SE F52 และ SE LAB ใน nutrient broth นำเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่บ่มได้จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ลงใน nutrient agar จำนวน 150 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อ ด้วยสารละลาย 0.5% formal saline นำสารละลายเชื้อที่ได้ กรองผ่านผ้ามีสลินและกระชอน แล้วนำเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อ inactivation จนสมบูรณ์ นำสารละลายเชื้อไปปั่นที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังปั่นเสร็จเทส่วนสารละลายทิ้ง แล้วนำตะกอนเชื้อที่ได้มาเจือจาง ด้วยละลายด้วย antigen working solution (1% formalin 1% KH_2PO_4 และ 0.85% NaCl) ในอัตราส่วนตะกอนเชื้อ 1 มิลลิลิตร ต่อ antigen working solution 10 มิลลิลิตร

2.2.วิธี alcohol inactivation ใช้วิธีดัดแปลงมาจากรายงานของ พรรณรักษา และคณะ (2521) เริ่มจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ SE F52 และ SE LAB ใน nutrient broth นำเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่บ่มได้จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ลงใน nutrient agar จำนวน 150

มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการชะล้างเก็บเชื้อด้วย สารละลาย 12% NaCl นำสารละลายเชื้อที่ได้ปั่นที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากปั่นเสร็จเทส่วนสารละลายทิ้ง ทำการ ฆ่าเชื้อ (inactivated) โดยละลายตะกอนเชื้อที่ได้ด้วย 95% ethyl alcohol เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นอีกครั้งด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากปั่นเสร็จเทส่วนสารละลายทิ้ง นำตะกอนเชื้อที่ได้มาเจือจางเพื่อใช้สำหรับตรวจ RSA โดยละลายด้วย สารละลาย 12% NaCl ในอัตราส่วนตะกอนเชื้อ 1 มิลลิลิตร ต่อ สารละลาย 12% NaCl 7 มิลลิลิตร

3. การเตรียม killed salmonella antigen

การเตรียม killed salmonella antigen สำหรับฉีดไก่ เพื่อสร้างภูมิคุ้มกันในซีรัม ได้ใช้วิธีปรับปรุงมาจากวิธีของ Sumitra et al. (2013) โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อซัลโมเนลลา ใน tryptic soy broth นำเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^{10} CFU นำเชื้อที่ได้ปั่นที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากปั่นเสร็จเทส่วนสารละลายทิ้ง นำตะกอนเชื้อที่ได้ล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS) แชนเยิน ปริมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนสารละลายทิ้ง นำตะกอนมาละลายด้วย 0.5 % formal saline เพื่อ inactivate เชื้อ แล้วนำเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากปั่นเสร็จ เทส่วนสารละลายทิ้ง นำตะกอนเชื้อที่ได้ละลายด้วย PBS แชนเยิน 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นอีกครั้ง เทส่วนสารละลายทิ้ง แล้วนำตะกอนเชื้อที่ได้มาเจือจางด้วย 0.9 % NaCl ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10^9 CFU/ มิลลิลิตร แล้วนำ killed salmonella antigen สำหรับทดลองในขั้นต่อไป

4. ตัวอย่างซีรัมที่ใช้ในศึกษา

เก็บเลือดจากไก่ผ่านทางเส้นเลือด brachial (wing) vein ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเก็บซีรัม โดยตัวอย่างซีรัมที่ใช้ใน

การศึกษาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่สุขภาพดีและปลอดการติดเชื้อซัลโมเนลลา กลุ่ม 2 ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่สุขภาพดีและได้รับ killed salmonella antigen และ กลุ่ม 3 ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่ที่เหนียวน้ำให้มีการติดเชื้อซัลโมเนลลา

4.1. ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่สุขภาพดีและปลอดการติดเชื้อ Salmonella (กลุ่ม 1) สุ่มเลือกลูกไก่เนื้ออายุ 1 วัน คณะแพศ สยพันธุ์อาร์เบอร์ เอเคอร์ส จากฟาร์มไก่เนื้อพ่อแม่พันธุ์ที่มีประวัติปลอดการติดเชื้อซัลโมเนลลา จำนวน 60 ตัว โดยที่อายุ 1 วัน ทำการเก็บตัวอย่างปายกัน (cloacal swab) และเพาะหาเชื้อซัลโมเนลลาตามวิธีการของ ISO 6579-1:2017 จากไก่ทุกตัว ให้ผลเป็นลบทั้งหมด เมื่อลูกไก่อายุ 7 วัน ทำการเจาะเลือดแล้วเก็บตัวอย่างซีรัม เพื่อนำไปทดสอบ RSA ต่อไป

4.2. ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่สุขภาพดีและได้รับ killed salmonella antigen (กลุ่ม 2) สุ่มเลือกลูกไก่เนื้ออายุ 1 วัน คณะแพศ สยพันธุ์อาร์เบอร์ เอเคอร์ส จากฟาร์มไก่เนื้อพ่อแม่พันธุ์ที่มีประวัติปลอดการติดเชื้อซัลโมเนลลา จำนวน 30 ตัว เมื่อลูกไก่อายุ 7 วัน ทำการให้ killed SE F52 antigen ที่เตรียม

จากเชื้อ SE F52 จำนวน 10 ตัว killed SE LAB antigen ที่เตรียมจากเชื้อ SE LAB จำนวน 10 ตัว และ killed ST AV19 antigen ที่เตรียมมาจากเชื้อ ST AV19 จำนวน 10 ตัว โดยวิธีฉีดเข้ากล้ามเนื้ออก เมื่อไก่อายุ 14 วัน ทำการเจาะเลือดแล้วเก็บตัวอย่างซีรัม สำหรับการทดสอบ RSA ต่อไป

4.3. ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่ที่มีการติดเชื้อซัลโมเนลลา (กลุ่ม 3) สุ่มเลือกลูกไก่เนื้ออายุ 1 วัน คณะแพศ สยพันธุ์อาร์เบอร์ เอเคอร์ส จากฟาร์มไก่เนื้อพ่อแม่พันธุ์ที่มีประวัติปลอดการติดเชื้อซัลโมเนลลา จำนวน 30 ตัว เมื่อลูกไก่อายุ 7 วัน ทำป้อนเชื้อ SE F52 จำนวน 10 ตัว เชื้อ SE LAB จำนวน 10 ตัว และ ST AV19 จำนวน 10 ตัว โดยการป้อนเชื้อเข้ากระเพาะพัก ปริมาณ 10^6 CFU/ ตัว เมื่อไก่อายุ 14 วัน ทำเก็บตัวอย่างปายกันไก่ทุกตัวเพื่อเพาะแยกหาเชื้อซัลโมเนลลา และ ทำการเจาะเลือดแล้วเก็บตัวอย่างซีรัม สำหรับการทดสอบ RSA ต่อไป

ลูกไก่ทุกกลุ่มเลี้ยงในเล้าแบบกรงยกพื้น ที่มีตาข่ายป้องกันแมลงและยุง ได้รับอาหารและน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclaving) อย่างไม่จำกัดตลอดระยะเวลาของการทดลอง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงกลุ่มตัวอย่างซีรัมที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่ม	ชนิดซีรัม	จำนวนตัวอย่าง
1	ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่สุขภาพดีและปลอดการติดเชื้อซัลโมเนลลา	60
2	ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่สุขภาพดีและได้รับ killed salmonella antigen	
	2.1 SE F52	10
	2.2 SE LAB	10
	2.3 ST AV19	10
3	ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่ที่เหนียวน้ำให้มีการติดเชื้อซัลโมเนลลา	
	3.1 SE F52	10
	3.2 SE LAB	10
	3.3 ST AV19	10
	รวม	120

5. การตรวจตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี RSA

นำตัวอย่างซีรัมมาทดสอบด้วยวิธี RSA ด้วยแอนติเจนที่เตรียมไว้จากวิธีดังกล่าวข้างต้น โดยหยดซีรัมเจือจาง 1:10 (ซีรัม 10 ไมโครลิตร ต่อ 0.9% NaCl 90 ไมโครลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงแผ่นกระจกที่แห้งสะอาด แล้วหยดแอนติเจนที่เตรียมไว้ในแต่ละวิธี ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนหยดของซีรัม (อัตราส่วน 1:1) แล้วคนให้เข้ากัน เอียงกระจกไปมา 3-5 นาที

แล้วอ่านผล โดยตัวอย่างซีรัม แต่ละตัวอย่างจะทดสอบ RSA โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมไว้ 4 ชนิด (SE F52 formalin inactivated antigen, SE LAB formalin inactivated antigen, SE F52 alcohol inactivated antigen และ SE LAB alcohol inactivated antigen) สำหรับตัวอย่างควบคุมลบ (negative control) ใช้ 0.9% NaCl ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แทนซีรัมผสมกับแอนติเจนจำนวนเท่ากัน การอ่านผลการตรวจตัวอย่างซีรัมที่

ให้ผลบวกต่อการทดสอบ จะเห็นตะกอนสีขาวเกิดขึ้นชัดเจน เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมลบ ซึ่งจะยังขาวขุ่นตามเดิม ในกรณีที่ตัวอย่างซีรัมให้ผลลบจะให้ผลเหมือนตัวอย่างควบคุมลบ

6. การทดสอบ cross reactivity ต่อ ST

สำหรับการทดสอบ cross reactivity ต่อ ST ของแอนติเจนที่เตรียมขึ้น ได้เตรียมตัวอย่างซีรัมของไก่ที่ฉีดด้วย killed ST AV19 จำนวน 10 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างซีรัมของไก่ที่ติดเชื้อ ST AV19 จำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาทดสอบ RSA กับแอนติเจนที่เตรียมไว้ทั้ง 4 ชนิดข้างต้น

7. การตรวจ RSA ด้วยแอนติเจนที่เตรียมกับตัวอย่างในภาคสนาม

เก็บตัวอย่างซีรัมจากฝูงไก่ที่เลี้ยงเพื่อการค้า จำนวน 3 ฝูง จากฟาร์มไก่เนื้อในเขตภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ ตัวอย่างซีรัมที่ได้มาจากฝูงไก่เนื้อสุขภาพดี ที่มีการสุ่มเก็บตัวอย่างป้ายกันเพาะแยกเชื้อไม่พบ SE จำนวน 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างซีรัมที่ได้มาจากฝูงไก่อีก 2 ฝูง ที่มีการเก็บตัวอย่างป้ายกันตรวจพบเชื้อ SE จำนวนฝูงละ 6 ตัวอย่าง นำมาทดสอบ RSA กับแอนติเจนที่เตรียมไว้ทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวข้างต้น

8. การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาในครั้งนี้กำหนดขนาดของกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป G*Power version 3.1.9.7 ผลการตรวจตัวอย่างซีรัมของไก่ทุกกลุ่มด้วย RSA กับแอนติเจนแต่ละชนิด ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลเหมือนกันในแต่ละการตรวจจะถูกนับเป็น total coincident rate (TCR) และจะนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยสถิติแบบนอนพาราเมตริกซ์ และ Fisher's exact test ใช้วิเคราะห์ผลที่ได้จากซีรัมของแต่ละกลุ่มที่ทดสอบกับแอนติเจนทั้ง 4 ชนิด ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

1. การทดสอบ RSA ตัวอย่างซีรัมไก่สุขภาพดีและปลอดภัยต่อเชื้อซัลโมเนลลา

ลูกไก่ที่นำมาเลี้ยงสำหรับการเตรียมซีรัมสำหรับกลุ่มตัวอย่างไก่สุขภาพดี ให้ผลเพาะแยกเชื้อไม่พบเชื้อซัลโมเนลลาทุกตัวอย่างที่ตรวจ เมื่อนำซีรัมมาทดสอบ RSA กับแอนติเจนที่เตรียมไว้โดยเจือจางซีรัมที่อัตราส่วน 1:1 และ 1:10 พบว่า ซีรัม

ทั้ง 60 ตัวอย่าง ให้ผลลบต่อการตรวจ RSA ด้วยแอนติเจนที่เตรียมไว้ทั้ง 4 ชนิด (false positive 0 ตัวอย่าง, 0%)

2. การทดสอบ RSA ตัวอย่างซีรัมไก่สุขภาพดีและได้รับการฉีดด้วย killed salmonella antigens

ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่ที่ได้รับ killed salmonella antigens ที่เตรียมมาจากเชื้อ SE F52 จำนวน 10 ตัวอย่าง และ SE LAB จำนวน 10 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจ RSA ด้วยแอนติเจนที่เตรียมมาจากวิธี formalin inactivation ให้ผลบวกทั้งหมด และเมื่อนำมาทดสอบด้วยแอนติเจนที่เตรียมมาจากวิธี alcohol inactivation ให้ผลบวก เกือบทั้งหมด มีเพียง 1 ตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อแอนติเจน SE LAB เมื่อเปรียบเทียบแต่ละตัวอย่างซีรัมต่อแอนติเจนที่เตรียมมาทั้ง 4 ชนิด จะพบว่าตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลเหมือนกัน (total coincident rate, TCR) ต่อ SE F52 และ SE LAB ที่เตรียมด้วยวิธี formalin inactivation มีค่า TCR สูงถึง 100 % ในขณะที่แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธี alcohol inactivation มีค่า TCR 95% ส่วนผลการตรวจซีรัมต่อแอนติเจนทั้ง 4 ชนิด มีค่า TCR 95% (ตารางที่ 2)

3. การทดสอบ RSA ตัวอย่างซีรัมไก่ที่มีการติดเชื้อ SE

ภายหลังจากการป้อนเชื้อ SE F52 หรือ SE LAB กลุ่มไก่ทั้งสองกลุ่มแสดงอาการเพียงถ่ายเหลวในช่วง 3-4 วันแรกแล้ว กลับเป็นปกติ เมื่อครบ 7 วันหลังจากการป้อนเชื้อได้ทำการเก็บตัวอย่างป้ายกันไก่ทุกตัว ส่งเพาะแยกเชื้อซัลโมเนลลา พบว่า ในกลุ่มไก่ป้อนเชื้อด้วย SE F52 พบ 2 ตัวอย่างและกลุ่มไก่ป้อนเชื้อ SE LAB พบ 2 ตัวอย่างเช่นกัน ส่วนผลการตรวจ RSA ตัวอย่างซีรัมของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยแอนติเจน formalin inactivated SE F52 ให้ผลบวก 19 ตัว (95%) แอนติเจน formalin inactivated SE LAB ให้ผลบวก 18 ตัว (90%) แอนติเจน alcohol inactivated SE F52 ให้ผลบวก 16 ตัว (80%) และแอนติเจน alcohol inactivated SE LAB ให้ผลบวก 16 ตัว (80%) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบแต่ละตัวอย่างซีรัมต่อแอนติเจนที่เตรียมมาทั้ง 4 ชนิด จะพบว่าแอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธี formalin inactivation มีค่า TCR 85% ซึ่งสูงกว่า แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธี alcohol inactivation มีค่า TCR เพียง 60% ส่วนผลการตรวจซีรัมต่อแอนติเจนทั้ง 4 ชนิด มีค่า TCR 50% (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่ที่ได้รับ killed SE F52 antigen และ killed SE LAB antigen

Serum samples (n=20)	Formalin inactivated antigens			Alcohol inactivated antigens			TCR4
	SE F52	SE LAB	TCR2	SE F52	SE LAB	TCR2	
1. SE F52 (n=10)							
Positive	10	10	10	10	9	9	9
negative	0	0	0	0	1	0	0
2. SE LAB (n=10)							
positive	10	10	10	10	10	10	10
negative	0	0	0	0	0	0	0
Total positive	20	20	20	20	19	19	19
Total negative	0	0	0	0	1	0	0

TCR คือ จำนวนตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลเหมือนกัน (Total coincident rate), TCR2 ให้ผลตรวจเหมือนกันทั้ง 2 แอนติเจน, TCR4 ให้ผลเหมือนกันทั้ง 4 แอนติเจน

ตารางที่ 3 ผลการตรวจตัวอย่างซีรัมที่ได้จากไก่ที่มีการติดเชื้อ SE F2 และ SE LAB

Serum samples (n=20)	Formalin inactivated antigens			Alcohol inactivated antigens			TCR4
	SE F52	SE LAB	TCR2	SE F52	SE LAB	TCR2	
1. SE F52 (n=10)							
Positive	9	9	8	6	8	4	3
negative	1	1	0	4	2	0	0
2. SE LAB (n=10)							
positive	10	9	9	10	8	8	7
negative	0	1	0	0	2	0	0
Total positive	19	18	17	16	16	12	10
Total negative	1	2	0	4	4	0	0

TCR คือ จำนวนตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลเหมือนกัน (Total coincident rate), TCR2 ให้ผลตรวจเหมือนกันทั้ง 2 แอนติเจน, TCR4 ให้ผลเหมือนกันทั้ง 4 แอนติเจน

4. การเปรียบเทียบผลการตรวจตัวอย่างซีรัมทั้ง 3 กลุ่ม

เมื่อนำผลการตรวจ RSA ด้วยแอนติเจนที่เตรียมจากทั้ง 2 วิธี พบว่า ในกลุ่มตัวอย่างซีรัมของไก่สุขภาพดีให้ผลลบทั้งหมด และในกลุ่มไก่ที่ให้ killed SE antigens ก็ให้ผลลบทั้งหมด ซึ่งไม่พบความแตกต่าง ของแอนติเจนที่เตรียมมาจาก SE F52 ในขณะที่ แอนติเจนที่เตรียมมาจาก SE LAB ให้ผลแตกต่างเพียง 1 ตัวอย่าง ส่วนในกลุ่มไก่ที่ติดเชื้อ SE พบว่า แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธี formalin inactivation ให้ผลบวกที่สูงกว่า แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธี alcohol inactivation เมื่อนำผลมาทดสอบทางสถิติ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4)

5. การทดสอบ cross reactivity ของแอนติเจนที่เตรียม

เมื่อนำตัวอย่างซีรัมไก่ที่ให้ killed ST AV19 antigen และ ตัวอย่างซีรัมไก่ที่ติดเชื้อ ST AV19 ทดสอบ RSA ด้วย

แอนติเจนที่เตรียมไว้ทั้ง 4 ชนิดพบว่า แอนติเจนของ SE F52 ที่เตรียมด้วยวิธี formalin inactivation ให้ผลตรวจเป็นลบทั้ง 10 ตัวอย่าง ส่วนแอนติเจนของ SE LAB ที่เตรียมด้วยวิธี alcohol inactivation ให้ผลบวกถึง 16 ตัวอย่าง (80%) เมื่อเปรียบเทียบผลพบว่า แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธี formalin inactivation มี cross reactivity ต่อ ST ต่ำกว่า วิธี alcohol inactivation และ SE F52 ให้ผลการตรวจที่มี cross reactivity ต่อ ST ต่ำกว่า SE LAB ($p < 0.05$) และเมื่อเทียบรวมแอนติเจนทั้งสองวิธีพบว่า formalin inactivated antigens ให้ผล cross reactivity ที่ต่ำกว่า alcohol inactivated antigen อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5)

6. การตรวจ RSA ด้วยแอนติเจนที่เตรียม กับตัวอย่างซีรัมที่มาจากฝูงไก่ที่เลี้ยงเพื่อการค้า

ผลการตรวจตัวอย่างซีรัมที่ได้มาจากฝูงไก่เนื้อที่มีการเลี้ยงเพื่อการค้าจำนวน 3 ฝูง จากฟาร์มไก่เนื้อในเขตภาคกลางของประเทศไทย พบว่าซีรัมที่ได้มาจากฝูงไก่เนื้อที่ตรวจไม่พบเชื้อ SE ให้ผลลบเกือบทั้งหมด และผลการตรวจที่เป็นบวกต้องยืนยันการตรวจจนถึง dilution 1:40 (เจือจางด้วย PBS) พบว่าให้ผลบวกที่ระดับ dilution 1:10 มีเพียง 3 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่

ระดับ dilution 1:20 ต่อการตรวจด้วยแอนติเจน SE F52 ที่เตรียมมาจากวิธี formalin inactivation ส่วนตัวอย่างซีรัมในไก่ฝูงที่ 2 ซึ่งเป็นฝูงไก่ที่มีการตรวจพบเชื้อ SE พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลบวกทั้งหมดและซีรัมส่วนใหญ่ให้ผลบวกที่ระดับ dilution 1:20 และตัวอย่างซีรัมในไก่ฝูงที่ 3 เป็นฝูงไก่ที่ตรวจพบเชื้อ SE พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลบวกต่อการตรวจ มีบางส่วนให้ผลบวกที่ระดับ dilution 1:20 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจตัวอย่างซีรัมทั้ง 3 กลุ่มด้วย RSA เปรียบเทียบวิธีการเตรียม antigen ทั้ง 2 วิธี

Serum samples (n= 100)	Formalin inactivated antigens		Alcohol inactivated antigens	
	SE F52 (%)	SE LAB (%)	SE F52 (%)	SE LAB (%)
1. Healthy chicken (n=60)				
positive (%)	0	0	0	0
negative (%)	60 (100)	60 (100)	60 (100)	60 (100)
2. Killed SE antigens (n=20)				
positive (%)	20 (100)	20 (100)	20 (100)	19 (95)
negative (%)	0	0	0	1 (5)
3. SE infected (n=20)				
positive (%)	19 (95) ^a	18 (90) ^a	16 (80) ^a	16 (80) ^a
negative (%)	1 (5)	2 (10)	4 (20)	4 (20)

วิเคราะห์ผลที่ได้จากซีรัมของแต่ละกลุ่มที่ทดสอบกับแอนติเจน ทั้ง 4 ชนิดด้วย Fisher's exact test

ค่าที่มีตัวอักษรกำกับที่ต่างกันจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจ cross reactivity ตัวอย่างซีรัมไก่ที่ได้รับ killed ST AV19 antigen หรือ มีการติดเชื้อ ST AV19

Serum samples	Formalin inactivated antigens		Alcohol inactivated antigens	
	SE F52	SE LAB	SE F52	SE LAB
1. Killed ST AV19 antigen (n=10)	0 ^a	2 ^{ab}	3 ^{ab}	9 ^c
2. ST AV19 infected (n=10)	0 ^a	6 ^{bc}	5 ^{bc}	7 ^{bc}
Total	0^a	8^b	8^b	16^c

วิเคราะห์ผลที่ได้จากซีรัมของแต่ละกลุ่มที่ทดสอบกับแอนติเจน ทั้ง 4 ชนิดด้วย Fisher's exact test

ค่าที่มีตัวอักษรกำกับที่ต่างกันจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6 ผลการตรวจตัวอย่างซีรัมที่มาจากฝูงไก่ที่เลี้ยงเพื่อการค้า ด้วย RSA กับแอนติเจนที่เตรียมทั้ง 4 ชนิด

Serum samples		Dilution				Positive/Total
		Negative	1:10	1:20	1:40	
1. ฝูงไก่ตรวจไม่พบเชื้อ (n=6)						
Formalin inactivated antigens	SE F52	3	0	3	ND	3/6
	SE LAB	5	1	ND	ND	1/6
Alcohol inactivated antigens	SE F52	5	1	ND	ND	1/6
	SE LAB	4	2	ND	ND	2/6
2. ฝูงไก่ที่ตรวจพบ SE (n=6)						
Formalin inactivated antigens	SE F52	0	2	4	ND	6/6
	SE LAB	0	2	4	ND	6/6
Alcohol inactivated antigens	SE F52	0	1	5	ND	6/6
	SE LAB	0	6	ND	ND	6/6
3. ฝูงไก่ที่ตรวจพบ SE (n=6)						
Formalin inactivated antigens	SE F52	0	4	2	ND	6/6
	SE LAB	0	4	2	ND	6/6
Alcohol inactivated antigens	SE F52	0	2	4	ND	6/6
	SE LAB	0	5	1	ND	6/6

ND คือ นอกเหนือการทดสอบ (not determined)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การตรวจทางซีรัมวิทยาสำหรับโรคซัลโมเนลโลซิสในไก่ ในกรณีโรค pullorum และ fowl typhoid จะใช้วิธีการตรวจ agglutination test เช่น RSA (pullorum test) TA หรือ WBA เป็นต้น ซึ่งแอนติเจนที่ใช้ในการตรวจจะเตรียมมาจากเชื้อ *S. Pullorum* ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดี ข้อด้อยแตกต่างกัน จากรายงาน การทดลองเปรียบเทียบวิธีการตรวจระหว่าง WBA และ TA พบว่า TA ให้ผลที่ดีกว่า (Gast, 1997) ส่วนเชื้อซัลโมเนลลา ชนิดอื่น ๆ นั้นไม่มีแอนติเจนจำเพาะชนิดของเชื้อจำหน่ายเพื่อการค้า แต่สำหรับการติดเชื้อ SE การตรวจ RSA ส่วนใหญ่จะนิยมใช้แอนติเจนของเชื้อ *S. Pullorum* นำมาใช้ตรวจแทน เพราะว่าเชื้อ *S. Pullorum* และ SE เป็นเชื้อที่อยู่ใน serogroup D เดียวกัน ซึ่งมีแอนติเจนที่ผนังเซลล์บางส่วนเหมือนกัน (O antigen 9 และ 12) ซึ่งแอนติเจน *S. Pullorum* นี้ สามารถให้ผลบวก ต่อ IgM และ IgG ที่มีต่อ SE ด้วยวิธีการตรวจ RSA แต่ก็มีรายงานพบว่าการตรวจ RSA มักจะไม่สัมพันธ์กับผลเพาะแยกเชื้อในกรณีเชื้อ SE (Kim et al., 1991; Shivaprasad et al., 1990; Waltman and Horne, 1993) ดังนั้นการตรวจ RSA ด้วยแอนติเจนทั่วไป หรือ ที่มีจำหน่ายทางการค้าจึงมักให้ผลการตรวจได้ไม่ดัดนัก การผลิตแอนติเจนจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อในแต่ละท้องถิ่น จึง

เป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจที่ดีกว่า ในการตรวจ RSA เท่าที่รายงาน ในต่างประเทศรวมทั้งประเทศไทย ไม่พบแอนติเจนจำเพาะ สำหรับการตรวจ RSA ในตัวอย่างซีรัมไก่ที่มีการติดเชื้อ SE ดังนั้น จุดประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าเพื่อเปรียบเทียบวิธีการเตรียมแอนติเจนของเชื้อ SE สำหรับการทดสอบ RSA เพื่อใช้ในการตรวจซีรัมไก่ที่มีปัญหาติดเชื้อ SE และเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ในทางปฏิบัติได้ จากผลการศึกษาวิธีการเตรียมแอนติเจนทั้ง 2 วิธี เมื่อทดสอบกับซีรัมไก่ที่สุภาพดี พบว่าแอนติเจนทั้ง 4 ชนิด มีความจำเพาะสูง (specificity) และเมื่อทดสอบกับซีรัมของไก่ที่ให้ killed SE antigen และติดเชื้อ SE พบว่า แอนติเจนที่เตรียม มีความไวในการตรวจสูงเช่นกัน (sensitivity) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yang และคณะ (2019) ใช้การเตรียมแอนติเจน *S. Pullorum* ด้วย วิธี formalin inactivation ก็ให้ผลคล้ายคลึงกัน มีความจำเพาะ และความไวในการตรวจสูง (Yang et al., 2019) เมื่อนำแอนติเจนที่เตรียมทั้ง 4 ชนิด มาทดสอบ cross reactivity กับซีรัมไก่ที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ ST พบว่า แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธี formalin inactivation ให้ผล cross reactivity ของแอนติบอดีต่อ ST ที่ต่ำกว่า วิธี alcohol inactivation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เชื้อ ST เป็นซัลโมเนลลาที่อยู่ใน serogroup B ซึ่งอาจมี cross reactivity

ของแอนติบอดีกับแอนติเจนบางส่วนของผนังเซลล์ของเชื้อ SE (อาจเป็นไปได้ O antigen 1 หรือ 12 ที่ SE กับ ST มีเหมือนกัน) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมแอนติเจนด้วย ในการเตรียมแอนติเจนด้วย วิธี formalin inactivation จะเน้นที่แอนติเจนของ flagella (H antigen) ในขณะที่วิธี alcohol inactivation จะเน้นแอนติเจนของผนังเซลล์ (Kolmer, 1951) ซึ่งการตอบสนองของแอนติบอดีของไก่ที่ติดเชื้อ ต่อ flagella จะรวดเร็วและมีความจำเพาะต่อชนิดของซัลโมเนลลาสูงกว่าแอนติเจนของผนังเซลล์ (Timoney et al., 1990) สุกท้ายเมื่อนำแอนติเจนที่เตรียมทั้ง 4 ชนิด ทดสอบกับซีรัมที่ได้มาจากฝูงไก่ที่มีการเลี้ยงเพื่อการค้าจำนวน 3 ฝูง สำหรับฝูงไก่แรกเป็นฝูงที่ตรวจเพาะแยกเชื้อไม่พบเชื้อ SE พบว่า จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบเกือบทั้งหมดและให้บวกต่อการตรวจในระดับต่ำ (1:10) เพียง 1 – 2 ตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งเป็นไปได้ที่ผลบวกนี้อาจเกิดจากการติดเชื้อซัลโมเนลลา หรืออาจเกิดจาก cross reactivity ต่อเชื้อแบคทีเรียกรัมลชนิดอื่น ๆ ได้ ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป แต่เมื่อนำแอนติเจนที่เตรียมทั้ง 4 ชนิด ไปตรวจกับฝูงไก่ที่พบการติดเชื้อ SE พบตัวอย่างให้ผลบวกทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า วิธีเตรียมแอนติเจนทั้ง 2 วิธีนี้ สามารถใช้ในการตรวจ RSA กับตัวอย่างซีรัมในทางปฏิบัติในภาคสนามได้ ซึ่งวิธี formalin inactivation จะให้ผลการตรวจที่จำเพาะดีกว่าวิธี alcohol inactivation และเหมาะสำหรับเป็นวิธีตรวจเชื้อซัลโมเนลลาบางชนิดที่มักพบในมูลระดับต่ำ ซึ่งไม่สามารถใช้วิธีเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างปายกันได้ (Immerseel et al., 2004)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาการเตรียมแอนติเจนของเชื้อ SE และเปรียบเทียบวิธี formalin inactivation กับ วิธี alcohol inactivation เพื่อใช้ในการทดสอบ RSA กับซีรัมไก่ที่มีปัญหาติดเชื้อ SE และเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ในทางปฏิบัติ ผลการทดลองพบว่าแอนติเจนที่เตรียมมาจากทั้ง 2 วิธี มีความไว และความจำเพาะในการตรวจสูง การศึกษานี้พบว่า SE แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธี formalin inactivation ให้ผล cross reactivity ต่อ ST ต่ำกว่าวิธี alcohol inactivation อย่างไรก็ตามการสรุปผลให้แน่ชัด ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป และสุดท้ายแอนติเจนที่เตรียมมาจากทั้ง 2 วิธีสามารถนำไปตรวจซีรัมในฝูงไก่ในภาคสนามได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานชั้นสูงตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการศึกษาวิจัย ตลอดระยะเวลาทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐา จริยมกรกูร วิชัย สุทธิธรรม และดรณิ ศรีชนะ. (2558). การสำรวจแบคทีเรียก่อโรคซึ่งปนเปื้อนในไข่ที่วางจำหน่ายในเขตอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี. Thai Journal of Science and Technology 4(1): 104-114.
- ระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการควบคุมโรคแซลโมเนลลาสำหรับสัตว์ปีก. (2553, 8 ธันวาคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 127 ตอนพิเศษ 140 ง. หน้า 2.
- วรรณภา พรหมรักษา สดใส เวชชาชีวะ และติลก เย็นบุตร. (2521). การศึกษาเบื้องต้น ในการหา *Salmonella* Typhi O antibody โดยวิธี slide agglutination test. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 22 (4): 261-264.
- สมาลี เสียมทอง. (2560). ความชุกของเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากเนื้อสัตว์ค้าปลีก ในอำเภอเมืองจังหวัดนครศรีธรรมราช. วารสารวิชา 36(1): 72-85
- อดิศร ดวงอ่อนนาม คมกริช พิมพ์ภักดี และปิยวัฒน์ สายพันธุ์. (2554). ความชุกและซีโรวารของซัลโมเนลลาในเนื้อโคที่จำหน่ายข้างถนนจากขั้นตอนการตัดแต่งซากในโรงฆ่าสัตว์ การขนส่งซากและร้านจำหน่ายในจังหวัดร้อยเอ็ด. ใน: รายงานการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 12 มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น. 1105-1115.
- Barrow, P. A., Berchieri, A., Jr. and Al-Haddad, O. (1992). Serological response of chickens to infection with *Salmonella* Gallinarum-S. Pullorum detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Diseases 36(2): 227-236.
- Barrow, P. A., Bumstead, N., Marston, K., Lovell, M. A. and Wigley, P. (2004). Faecal shedding and intestinal colonization of *Salmonella* Enterica in in-bred chickens: the effect of host-genetic background. Epidemiology and Infection 132(1): 117-126.
- Barrow, P. A., Jones, M. A., Smith, A. L. and Wigley, P. (2012). The long view: *Salmonella*-the last forty years. Avian Pathology 41(5): 413-420.

- Gast, R. K. (1997). Detecting infections of chickens with recent *Salmonella* Pullorum isolates using standard serological methods. *Poultry Science* 76(1): 17-23.
- Gast, R. K., Guard-Petter, J. and Holt, P. S. (2002). Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Diseases* 46(3): 629-635.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Bohez, L., Boyen, F., Haesebrouck, F., and Ducatelle, R. (2004). Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. *Poultry Science* 83(11): 1911-1916.
- Jones, F. S. (1913). The value of the macroscopic agglutination test in detecting fowls that are harboring *Bact.* Pullorum. *Journal of Medical Research* 27(4): 481-495.
- Kim, C. J., Nagaraja, K. V. and Pomeroy, B. S. (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. *American Journal of Veterinary Research* 52(7): 1069-1074.
- Kolmer, J. A., Spaulding, E. H. and Robinson, H. W. (1951). *Approved laboratory technic*, 5th ed New York: Appleton-Century-Crofts. pp. 751-756.
- OIE. (2019). Chapter 3.9.8. Salmonellosis. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* (2019). <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Runnels, R. A., Coon, C. J., Farley, H. and Thorp, F. (1927). An application of the rapid method agglutination test to the diagnosis of bacillary white diarrhea infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 70: 660-662.
- Schaffer, J. M., MacDonald, A. D., Hall, W. J. and Bunyey, H. (1931). A stained antigen for the rapid whole blood test for pullorum disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 79: 236-240.
- Sumithra, T. G., Chaturvedi, V. K., Rai, A. K., Sunita, S. C. C., Susan, C. and Siju, S. J. (2013). Development of slide agglutination test for the differentiation of *Salmonella* Typhimurium infection from poultry specific salmonella serovars. *Journal of Veterinary Public Health* 11(2): 83-90.
- Shivaprasad, H. L., Timoney, J. F., Morales, S., Lucio, B. and Baker, R. C. (1990). Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. *Avian Diseases* 34(3): 548-557.
- Tanaka, S. (1975). Production of pullorum antigen by continuous submerged culture. *Japan Agricultural Research Quarterly* 9(1): 60-65.
- Timoney, J. F., Sikora, N., Shivaprasad, H. L. and Opitz, M. (1990). Detection of antibody to *Salmonella* Enteritidis by a gm flagellin-based ELISA. *Veterinary Record* 127(7): 168-169.
- Waltman, W. D. and Horne, A. M. (1993). Isolation of *Salmonella* from chickens reacting in the pullorum-typhoid agglutination test. *Avian Diseases* 37(3): 805-810.
- Yang, B., Niu, Q., Yang, Y., Dai, P., Yuan, T., Xu, S., Pan, X., Yang, Y. and Zhu, G. (2019). Self-made *Salmonella* Pullorum agglutination antigen development and its potential practical application. *Poultry Science* 98(12): 6326-6332.

