

Development of a Screening Test for Detection of *Streptococcus suis* Serotype 2

Bootsarakham Suriya¹, Poomin Cheunsombut², Phattharawee Muneekaew²,
Sudanee Sanghong² and Krung Phiwpan^{1*}

¹Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao
Phayao Province, Thailand

²Clinical Microbiology Section, Medical Technology Department, Chiangkham Hospital, Phayao
Province, Thailand

Abstract

Streptococcus suis (*S. suis*) is typically a swine pathogen that can cause death in human. Routine diagnosis of this swine pathogen in infected patient is complicated and time consuming. The purpose of this study was to develop an easy, convenient and quick screening test for detecting *S. suis*. Firstly, Rabbits were immunized with capsular polysaccharide (cps) antigen of *S. suis* serotype 2. Serum was collected for detecting anti-cps by indirect ELISA. Nonspecific antibodies were removed by adsorption method. Then, the adsorbed anti-cps antibodies were used to develop a screening test using latex agglutination test. Finally, the screening test was evaluated using cps of *S. suis* and cps or extracted cell membrane of other organisms. The results showed that serum contained nonspecific and specific anti-cps antibodies. The non-specific antibodies could not be adsorbed completely. The screening test made from the adsorbed anti-cps antibodies was able to detect the lower limit of cps of *S. suis* at 125 µg/mL and cross-react to cps of *S. pyogenes*. In conclusion, this study is able to develop a screening test for detecting *S. suis* by choosing an alpha hemolysis and gram-positive bacteria for performing with this kit.

Keywords: *Streptococcus suis*, Screening test, Latex agglutination test

*Corresponding author E-mail address: krungphiwpan@gmail.com

การพัฒนาชุดตรวจคัดกรองเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2

บุษราคัม สุริยะ¹ ภูมิินทร์ ชื่นสมบัติ² ภัทรวีร์ มุณีแก้ว²

สุดาณี แสงโฮง² และกรุง พิวพรรณ^{1*}

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

²งานจุลชีววิทยาคลินิก กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลเชียงราย จังหวัดพะเยา

บทคัดย่อ

สเตรปโตคอคคัส ซูอิสเป็นแบคทีเรียก่อโรคในสุกรที่สามารถก่อให้เกิดการเสียชีวิตในคนได้ การวินิจฉัยผู้ติดเชื้อนี้ในงานประจำวันทางห้องปฏิบัติการมีความซับซ้อนและใช้เวลานาน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจคัดกรองเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 ที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว การศึกษาเริ่มจากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยแอนติเจนที่เตรียมจากแคปซูลของเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 เก็บซีรัมมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิสโดยวิธี indirect ELISA แอนติบอดีที่ไม่จำเพาะจะถูกกำจัดโดยวิธีการดูดซับ จากนั้นนำแอนติบอดีดังกล่าวมาพัฒนาชุดตรวจคัดกรองโดยวิธี latex agglutination test ประเมินชุดตรวจด้วยแคปซูลของเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิสและแคปซูลหรือสารสกัดจากเซลล์ของเชื้ออื่น ๆ ผลการศึกษาพบว่าซีรัมกระต่ายมีแอนติบอดีที่จำเพาะและไม่จำเพาะต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิสโดยแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะไม่สามารถถูกกำจัดได้หมด ชุดตรวจคัดกรองสามารถตรวจหาแคปซูลของเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิสได้ด้วยความเข้มข้นต่ำสุดที่ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปฏิกิริยาข้ามได้กับแคปซูลของเชื้อ *S. pyogenes* สรุปผลการศึกษาได้ว่าสามารถพัฒนาชุดตรวจคัดกรองเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิสได้แต่ต้องเลือกใช้เชื้อแบคทีเรียทดสอบกลุ่มแกรมบวกที่สลายเมื่อดูดแห้งได้ไม่สมบูรณ์เท่านั้น

คำสำคัญ: สเตรปโตคอคคัส ซูอิส ชุดตรวจคัดกรอง วิธี latex agglutination test

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: krungphiwpan@gmail.com

รับบทความ: 9 กันยายน 2561

แก้ไขบทความ: 25 ตุลาคม 2561

รับตีพิมพ์บทความ: 4 มีนาคม 2562

บทนำ

เชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส (*Streptococcus suis*, *S. suis*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นคู่หรือเส้นสาย สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้แบบไม่สมบูรณ์ (α -hemolysis) และมีการสร้างแคปซูล⁽¹⁾ ปัจจุบันเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส สามารถแบ่งได้เป็น 35 ซีโรไทป์ โดยอาศัยความแตกต่างของแอนติเจนบนผิวแคปซูล⁽²⁾ เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้จะอาศัยอยู่บริเวณโพรงจมูกและต่อมทอนซิลของสุกรและจัดเป็นเชื้อก่อโรคจากสัตว์สู่คน (zoonosis agent) ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรที่ปรุงไม่สุก เช่น ลาบ หลู้ดิบ และเลือดที่มีเชื้อปนเปื้อน⁽³⁾ การติดเชื้อในคนส่วนใหญ่พบได้ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย โดยมีสาเหตุจากซีโรไทป์ 2 มากที่สุด (ร้อยละ 92.2) รองลงมา ได้แก่ ซีโรไทป์ 14 (ร้อยละ 6.7) ซีโรไทป์ 5 และ ซีโรไทป์ 24 (ร้อยละ 0.6) ตามลำดับ⁽⁴⁾ ผู้ติดเชื้ออาจเริ่มมีอาการในระยะเวลาที่แตกต่างกันในแต่ละคน (1-10 วัน) ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ปริมาณเชื้อที่ได้รับ ชนิดของซีโรไทป์และการสร้าง superantigen ของเชื้อ^(5, 6) โดยผู้ป่วยที่แสดงอาการทางคลินิกจะมีอัตราการเสียชีวิตร้อยละ 28 แต่ในรายที่มีอาการช็อกจากการติดเชื้อ (septic shock) จะมีอัตราการเสียชีวิตมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 80⁽⁷⁾

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *S. suis* ในผู้ติดเชื้อเป็นสิ่งสำคัญ โดยทางห้องปฏิบัติการสามารถทำได้โดยการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากเลือด (hemoculture) ผลบวกของ hemoculture ต้องทดสอบต่อด้วยการย้อมสีแกรมและแยกเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยวในอาหาร blood agar จากนั้นพิสูจน์เชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิสด้วยการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีและวิธี PCR ที่จำเพาะ^(8, 9) ซึ่งวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบันใช้เวลานาน ชุบน้ำยาและเครื่องมือราคาสูง จึงไม่สามารถตรวจวินิจฉัยได้ในห้องปฏิบัติการของ

โรงพยาบาลทั่วไป หรือโรงพยาบาลชุมชนขนาดเล็ก ซึ่งมีโอกาสพบผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง ดังนั้น การมีชุดตรวจวินิจฉัยที่ง่าย สะดวกและให้ผลรวดเร็ว จึงจำเป็นสำหรับการวินิจฉัยผู้ติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส Nakayama และคณะ⁽¹⁰⁾ ได้พัฒนาชุดตรวจคัดกรองหาแอนติเจนของเชื้อจากตัวอย่างปัสสาวะ โดยการนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซูลของเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 มาผลิตชุดตรวจ immunochromatographic strip test และ Porter และคณะ⁽¹¹⁾ ได้พัฒนาชุดตรวจโดยอาศัยวิธี latex agglutination test ในการตรวจโรคติดเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับแคปซูลของเชื้อมาเคลือบลงบน polystyrene latex beads ซึ่งทั้ง strip test และ latex agglutination test จัดเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและให้ผลรวดเร็ว

จากงานวิจัยข้างต้น^(10, 11) ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาชุดตรวจคัดกรองเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 โดยวิธี latex agglutination test ในการตรวจหา capsular polysaccharide (cps) antigen ของเชืวดังกล่าว เนื่องจากเป็นซีโรไทป์ที่ก่อโรครุนแรงและพบอุบัติการณ์สูงที่สุด โดยการนำ rabbit anti-cps ของเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 มาใช้พัฒนาชุดตรวจคัดกรองด้วยวิธีดังกล่าว

วัสดุและวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

ใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White Rabbit น้ำหนัก 1.5-2 กิโลกรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยพะเยา (เลขที่ 600104001)

2. ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 (code no. DMST18783) จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 และ 14 จากผู้ป่วยติดเชื้อ โรงพยาบาลเชิงคำ จังหวัดพะเยา (เลขที่จดแจ้ง 0615-9/59) และเชื้ออื่นๆ เช่น *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp. และ *Streptococcus pyogenes* ได้รับการอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อและเตรียมแคปซูลของเชื้อ

เชื้อ *S. suis*, *S. pyogenes* และ *S. pneumoniae* เพาะเลี้ยงเชื้อโคโลนีเดี่ยวจาก blood agar ในอาหาร Todd Hewitt Broth (THB) ส่วนเชื้ออื่นๆ เพาะเลี้ยงใน Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 1 ลิตร จนเชื้ออยู่ในระยะ log phase จึงปั่นล้างด้วย PBS จากนั้นสกัดแคปซูลของเชื้อ (capsular polysaccharide (cps) antigen) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Van Calsteren และคณะ⁽¹²⁾ สรุปโดยย่อคือ autoclave เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 75 นาที นำไปแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีแล้วละลายน้ำแข็ง นำไปปั่นที่ 2,700×g นาน 15 นาที คัดส่วนน้ำใสมาผสมกับคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 2,700×g นาน 15 นาที คัดส่วนใสข้างบนมาทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง คัดส่วนน้ำใสมาเติมเอทานอลและแคลเซียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 20 และ 0.1 โมลาร์ ตามลำดับ เขย่าแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นที่ 2,700×g นาน 15 นาที คัดส่วนน้ำใสมาผสมเอทานอลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 80 แช่ไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส บ่มที่ 2,700×g นาน 15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น จากนั้นไดอะไลซ์ด้วย PBS นาน 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง cps และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Thermo Scientific, Biomate3)

4. การผลิตและการตรวจพิสูจน์แอนติบอดีต่อแคปซูล

นำ cps ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous) 3 ตำแหน่งของกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White Rabbit สำหรับครั้งที่ 1 ส่วนครั้งที่ 2 และ 3 ผสม cps ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับ Freund's incomplete adjuvant อัตราส่วน 1:1 ในปริมาตรทั้งหมด 1 มิลลิลิตรตามวิธีของ Nakayama และคณะ⁽¹⁰⁾ โดยการฉีดแต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ และเก็บซีรัมก่อนฉีดกระตุ้นครั้งที่ 1 และหลังการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3 แล้ว 1 สัปดาห์ เพื่อนำมาตรวจหาการสร้างและไตเตอร์ของ anti-cps โดยวิธี indirect ELISA โดยการเคลือบเพลทด้วยเชื้อตาย *S. suis*, *E. coli*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Shigella* spp. และ *S. Enteritidis* ในแต่ละหลุมที่ความเข้มข้น 1×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.05% Tween-PBS 3 ครั้ง แล้วเติม 2% BSA-PBS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.05% Tween-PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติมซีรัมกระต่ายที่เจือจาง 1:10 ก่อนการฉีดกระตุ้นและหลังการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.05% Tween-PBS 3 ครั้ง แล้วเติม mouse anti-rabbit IgG-HRP (ImmunoTools) ที่เจือจาง 1:2000 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.05%

Tween-PBS 3 ครั้ง แล้วเติม TMB substrate หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วย HCl เข้มข้น 1 N แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

5. การดูดซับแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะ

ซีรัมกระต่ายที่มีแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้ออื่นๆ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA จะถูกดูดซับโดยใช้เชื้อตาย *E. coli*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Shigella* spp. และ *S. Enteritidis* ที่ความเข้มข้น 1×10^9 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ของแต่ละเชื้อรวมกันแล้วนำมาผสมร่วมกับซีรัมกระต่ายหลังฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3 ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส หมุนตลอดเวลา นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำซีรัมที่ผ่านการดูดซับมาทดสอบหา specific anti-cps อีกครั้งด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีการในหัวข้อที่ 4 และวัดปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

6. การผลิตและทดสอบชุดน้ำยา Latex Agglutination Test (LAT)

การผลิต LAT ทำตามวิธีของ Porter และคณะ⁽¹¹⁾ โดยใช้แอนติบอดีก่อนการฉีดกระตุ้นและแอนติบอดีหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3 ที่ผ่านการดูดซับแล้วมาเจือจางด้วยน้ำเกลือ (ร้อยละ 0.9) ในอัตราส่วน 1:5, 1:10, 1:20 และ 1:40 แล้วนำมาผสมเม็ดลาเท็กซ์ (latex particle) (ความเข้มข้น 0.8 ไมโครเมตร, Sigma-Aldrich) เพื่อพัฒนาชุดควบคุม (immunoglobulins-LAT) และชุดตรวจ (anti-cps-LAT) ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบว่ามีแอนติบอดีเกาะอยู่บนเม็ดลาเท็กซ์ โดยใช้ anti-cps-LAT ปริมาตร 40 ไมโครลิตรผสมกับ mouse anti-rabbit IgG-HRP (Immuno Tools) ที่เจือจาง 1:5 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เขย่านาน 2 นาที แล้วอ่านผลปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกันของเม็ดลาเท็กซ์

ทดสอบความไวของน้ำยา LAT โดยการใช้ cps ของเชื้อ *S. suis* ที่เจือจางลง 2 เท่าเป็นลำดับ (เริ่มจากความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร - 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำ cps ของเชื้อ *S. suis* ที่เจือจางแล้ว 40 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยา LAT 40 ไมโครลิตร แล้วอ่านผลปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม การทดสอบความจำเพาะ ทำได้โดยนำ cps ของเชื้อต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรผสมกับน้ำยา LAT 40 ไมโครลิตร อ่านผลปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มในเวลา 2 นาที

ผลการวิจัย

จากการตรวจวัดระดับไตเตอร์ของ rabbit anti-cps หลังการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3 ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามีไตเตอร์เท่ากับ 125 (ไม่แสดงผล) และพบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถทำปฏิกิริยาข้ามได้กับเชื้ออื่นๆ เช่น *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. Enteritidis*, *E. coli* และ *Shigella* spp. เมื่อกำจัดแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะโดยวิธีการดูดซับพบว่าสามารถลดระดับแอนติบอดีลงได้ (Fig. 1) เมื่อนำ

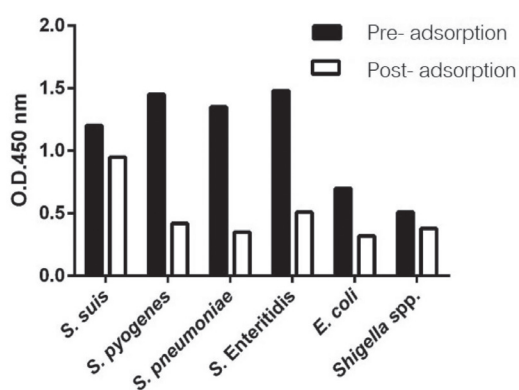


Fig. 1 Detecting anti-cps and non-specific antibodies to different organisms of pre-adsorption and post-adsorption of two weeks post- third immunization serum by indirect ELISA

anti-cps ที่ผ่านการกำจัดแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะแล้ว มาเคลือบบนเม็ดยาเท็กซ์ พบว่าซีรัมกระต่ายที่เจือจาง 1:5 และ 1:10 สามารถเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มให้เห็นด้วยตาเปล่า (ความแรงของปฏิกิริยาเกาะกลุ่มเท่ากับ 3+) เมื่อผสมกับ cps ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงคำ และให้ผลบวกกับเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 จำนวน 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จาก

ผู้ป่วยโรงพยาบาลเชียงคำ (Fig. 2) โดยชุดน้ำยาสามารถตรวจวัด cps ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความจำเพาะเมื่อทดสอบชุดน้ำยาด้วย cps ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อ *S. Enteritidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ให้ผลลบ ขณะที่ให้ผลบวกกับ cps ของเชื้อ *S. pyogenes* (ความแรงปฏิกิริยาเกาะกลุ่มเท่ากับ 1+) (Table 1)

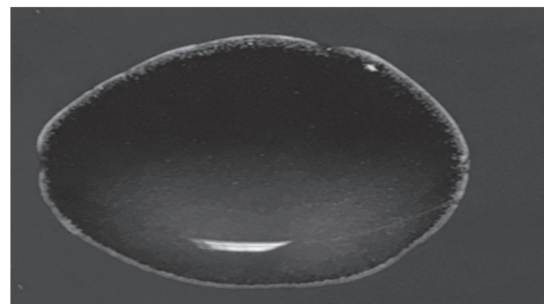
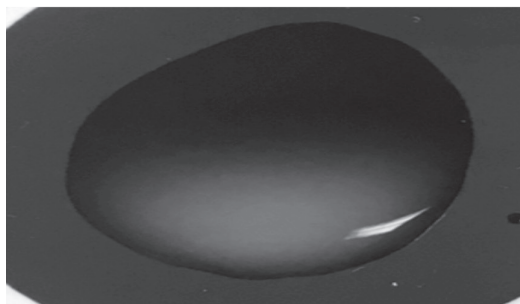


Fig. 2 The demonstrated results of immunoglobulins-LAT (Left) and anti-cps—LAT (Right) tested with 1 mg/mL of cps of *Streptococcus suis* serotype 2

Table 1 The summary result of immunoglobulins-LAT and anti-cps –LAT tested with 1 mg/mL of each cps or crude extract

Bacterial strains	Test (Immunoglobulin-LAT)	Control (anti-cps-LAT)
<i>S. suis</i>	Negative	Positive 3+
<i>S. pyogenes</i>	Negative	Positive 1+
<i>S. pneumoniae</i>	Negative	Negative
<i>S. Enteritidis</i>	Negative	Negative
<i>E. coli</i>	Negative	Negative
<i>Shigella</i> spp.	Negative	Negative

วิจารณ์

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *S. suis* ได้อย่างรวดเร็วจำเป็นอย่างยิ่งต่อการรักษาผู้ป่วย Nakayama และคณะ⁽¹⁰⁾ ได้พัฒนาชุดตรวจคัดกรองการติดเชื้อ *S. suis* ด้วยวิธี immunochromatographic strip test โดยการใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้จากกระต่ายจากการฉีดกระตุ้นด้วย cps ของเชื้อ *S. suis* ซึ่งไม่พบปฏิกิริยาข้ามที่เกิดจากแอนติบอดีดังกล่าวจากข้อมูลนี้ ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำ rabbit anti-cps มาผลิตชุดตรวจคัดกรองเชื้อ *S. suis* ด้วยวิธี latex agglutination test เนื่องจากทดสอบง่าย สะดวกและอ่านผลได้รวดเร็ว ผลการศึกษาพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้ (rabbit anti-cps) หลังจากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วย cps ครั้งที่ 3 มีไตเตอร์เท่ากับ 125 ซึ่งถือว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนอื่นๆ เช่น การสร้าง anti-IgG ที่มีไตเตอร์ 8,000 และ anti-CD147 ที่มีไตเตอร์ 16,000 หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3⁽¹³⁾ ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะสมบัติของแอนติเจนคือตัวเชื้อ *S. suis* ที่ใช้ในการกระตุ้นที่แอนติเจนส่วนใหญ่จะเป็นหมู่น้ำตาล (capsular polysaccharides) ซึ่งจัดเป็น T-independent antigen ที่กระตุ้น B cells ให้สร้างแอนติบอดีได้โดยตรงและไม่ผ่าน T helper cells ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีไตเตอร์ต่ำและไม่นำไปสู่การเกิด class switching และ memory B cells⁽¹⁴⁾ และอีกปัญหาหนึ่งที่พบได้ในการศึกษานี้คือการที่แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยาข้ามได้กับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ โดยเฉพาะเชื้อ *S. pyogenes* ทั้งนี้ อาจเป็นผลจากการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีและเป็นแอนติบอดีต่อหมู่น้ำตาลของเชื้อเป็นหลัก และจากการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *S. suis* พบว่ามีความคล้ายคลึงกับของเชื้อ *S. pyogenes* (ยังไม่ได้ตีพิมพ์) ถึงแม้ผู้วิจัยได้กำจัดแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาข้ามมากกว่าหนึ่งรอบหรือแม้กระทั่งดูดซับ

โดยใช้เชื้อตายที่ละลายแล้วก็ตาม เมื่อนำมาพัฒนาเป็นชุดน้ำยาทดสอบ แอนติบอดีที่เหลืออยู่ยังสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาข้ามได้กับเชื้ออื่นๆ ผลการศึกษานี้ นำมาซึ่งแนวทางในการแก้ปัญหาเพื่อพัฒนาชุดตรวจคัดกรองให้มีความจำเพาะยิ่งขึ้นในงานวิจัยครั้งต่อไป โดยการนำ capsular polysaccharide ของเชื้อ *S. suis* มาเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ (capsular polysaccharide glycoconjugate antigen)⁽¹⁵⁾ ซึ่งจัดเป็น T-dependent antigen ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง ซึ่งจะทำให้เกิด class switching และ memory B cells นำไปสู่การได้แอนติบอดีที่มีไตเตอร์สูงเพียงพอต่อการใช้งาน อย่างไรก็ตาม แอนติบอดีดังกล่าวยังจัดเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีอันก่อให้เกิดปฏิกิริยาข้ามได้ ดังนั้น เพื่อลดปัญหาดังกล่าว จึงจะผลิตแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี คัดเลือกหาโคลนที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. suis* เท่านั้นโดยการคัดเลือกโคลนด้วยเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ ต่างๆ และเชื้ออื่นๆ ที่พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามจากการศึกษาครั้งนี้ เพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ 2 เพื่อนำมาพัฒนาชุดตรวจคัดกรองให้มีความไวและความจำเพาะเพิ่มขึ้นต่อไป

สรุป

Rabbit anti-cps ที่นำมาใช้ในการพัฒนาเบื้องต้นของชุดตรวจคัดกรองด้วยวิธี latex agglutination test นั้นยังไม่เหมาะสม ด้วยเหตุผลหลายประเด็น เช่น ระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี การทำปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดี แอนติบอดีที่ได้หลังการดูดซับแต่ละครั้งไม่เท่ากัน เมื่อนำแอนติบอดีดังกล่าวมาพัฒนาชุดตรวจจึงทำให้ได้ผลความไวในการตรวจ cps อยู่ที่ 125 ไม่ไครก้อมต่อมิลลิตร และทำปฏิกิริยาข้ามได้กับเชื้อ *S. pyogenes* การใช้งานชุดน้ำยานี้ยังมีข้อจำกัดคือต้องคัดเลือกเชื้อที่เป็น

แกรมบวกและให้ผลการสลายเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์ (α -hemolysis) มาทดสอบ จากข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดสอบหาความจำเพาะเพิ่มเติมด้วยเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซูอิส ซีโรไทป์ต่างๆ และเชื้ออื่นๆ ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจให้ได้ตามวัตถุประสงค์ที่สามารถตรวจแอนติเจนของเชื้อในกระแสเลือดหรือน้ำปัสสาวะ จึงจำเป็นต้องเตรียมแอนติบอดีจากการฉีดกระตุ้นด้วย cps-glycoconjugate antigen เพื่อให้ได้แอนติบอดีที่มีไตเตอร์สูงและผ่านเทคนิคไฮบริโดมาเพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะและความไวสูง ก่อนนำมาพัฒนาเป็นชุดน้ำยาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือ พร้อมทั้งทุนสนับสนุนจากรายได้คณะเลขที่ AHS-RD-60003 ในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Dutkiewicz J, Sroka J, Zajac V, *et al.* *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part I - Epidemiology. *Ann Agric Environ Med* 2017; 24: 683-95.
2. Okura M, Osaki M, Nomoto R, *et al.* Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens* (Basel, Switzerland) 2016; 5: 45.
3. Takeuchi D, Kerdsin A, Pienpringam A, *et al.* Population-based study of *Streptococcus suis* infection in humans in Phayao Province in northern Thailand. *PLoS ONE* 2012; 7: e31265.
4. Kerdsin A, Dejsirilert S, Sawanpanyalert P, *et al.* Sepsis and spontaneous bacterial peritonitis in Thailand. *The Lancet* 2011; 378: 960.
5. Yu H, Jing H, Chen Z, *et al.* Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 914-20.
6. Hanterdsith B, Tharavichitkul P, Mahanupab P, Raksamat W. Postmortem diagnosis of sudden unexpected death from *Streptococcus suis* type 2 infection: a case report. *J Forensic Leg Med* 2013; 20: 347-9.
7. Fongcom A, Pruksakorn S, Netsirisawan P, Pongprasert R, Onsibud P. *Streptococcus suis* infection: a prospective study in northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40: 511-7.
8. Liu Z, Zheng H, Gottschalk M, *et al.* Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis*. *PLoS ONE* 2013; 8: e72070.

9. Stanojković A, Petrovic MM, Škrbić Z, *et al.* Biochemical characteristics of *Streptococcus suis* strains isolated from healthy and deceased pigs. *Biotechnol Anim Husb* 2014; 30: 699-704.
10. Nakayama T, Zhao J, Takeuchi D, *et al.* Colloidal gold-based immunochromatographic strip test compromising optimised combinations of anti-*S. suis* capsular polysaccharide polyclonal antibodies for detection of *Streptococcus suis*. *Biosens Bioelectron* 2014; 60: 175-9.
11. Porter BD, Ortika BD, Satzke C. Capsular serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by latex agglutination. *J Vis Exp* 2014; 91: 51747.
12. Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, Fittipaldi N, Gottschalk M. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol* 2010; 88: 513-25.
13. Phiwpan K, Pata, S, Tayapiwatana C, Kasinrer W. Induction of antibodies to two different proteins simultaneously by DNA immunization. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2003; 36. (in Thai)
14. Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect* 2014; 3: e45.
15. Goyette-Desjardins G, Calzas C, Shiao TC, *et al.* Protection against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a capsular polysaccharide glycoconjugate vaccine. *Infect Immun* 2016; 84: 2059-75.