บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การพัฒนาวิธีการตรวจ

3.1.1 วิธี ELISA

3.1.1.1 การสุ่มเลือกสภาวะต่างๆ เพื่อทดสอบระบบ

จากการสุ่มเลือกเจือจางแอนติเจนทั้งสามชนิดได้แก่ HEA SA และ DEA ที่ 1:500 และเจือจางคอนจูเกตทั้งชนิด IgM และ IgG เป็น 1:2,000 แล้วทำการทดสอบ พบว่าตัวควบคุมบวก (PC) มีค่าการดูดกลืนแสง (optical density : OD) สูงกว่าตัวควบคุมลบ (NC) ในทุกแอนติเจนและคอนจูเกต ดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบเมื่อสุ่มเลือกเจือจางแอนติเจน HEA SA และ DEA เป็น 1:500 และเจือจางคอนจูเกตชนิด IgM และ IgG เป็น 1:2,000

แอนติเจน	ตัวควบคุม	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย*	
		IgM	IgG
HEA	PC	0.329	0.393
	NC	0.214	0.131
SA	PC	1.646	1.181
	NC	0.278	0.685
DEA	PC	1.261	0.748
	NC	0.180	0.115

หมายเหตุ *ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

แอนติเจน HEA มีค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงต้องมีการปรับความเข้มข้นของแอนติเจนในการเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตให้มากขึ้น รวมถึงปรับความเข้มข้นของคอนจูเกตแต่ละชนิดให้มากขึ้น (ตาราง 8)

แอนติเจน SA สำหรับการตรวจหา IgM มีค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบเหมาะสมแล้ว สำหรับการตรวจหา IgG มีค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบค่อนข้างสูง (ตาราง 8)

แอนติเจน DEA สำหรับการตรวจหา IgM และ IgG มีค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบเหมาะสมแล้ว (ตาราง 8)

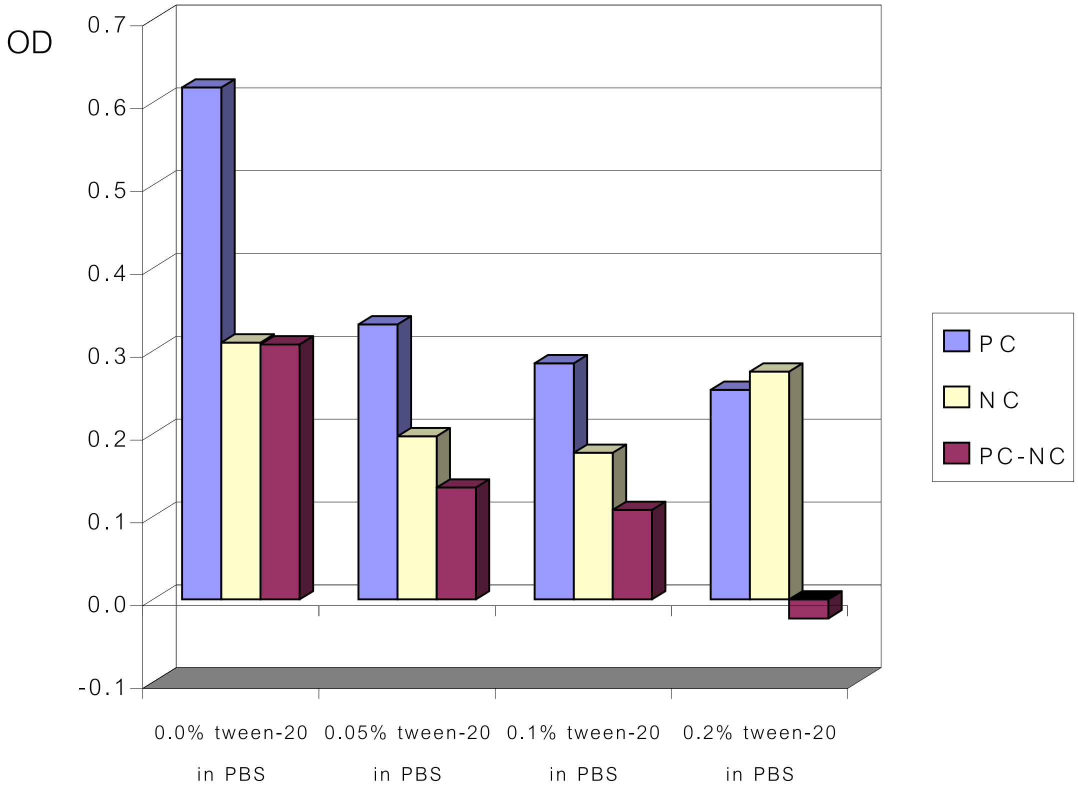
ตาราง 8 ความเข้มข้นของแอนติเจนแต่ละชนิดและความเข้มข้นของคอนจูเกตแต่ละชนิด ที่นำไปใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการทดสอบ ELISA

แอนติเจน	IgM	IgG
HEA	เคลือบเพลต: เจือจาง 1:200 คอนจูเกต: เจือจาง 1:1,000	เคลือบเพลต: เจือจาง 1:200 คอนจูเกต: เจือจาง 1:1,000
SA	เคลือบเพลต: เจือจาง 1:500 คอนจูเกต: เจือจาง 1:2,000	เคลือบเพลต: เจือจาง 1:500 คอนจูเกต: เจือจาง 1:2,000
DEA	เคลือบเพลต: เจือจาง 1:500 คอนจูเกต: เจือจาง 1:2,000	เคลือบเพลต: เจือจาง 1:500 คอนจูเกต: เจือจาง 1:2,000

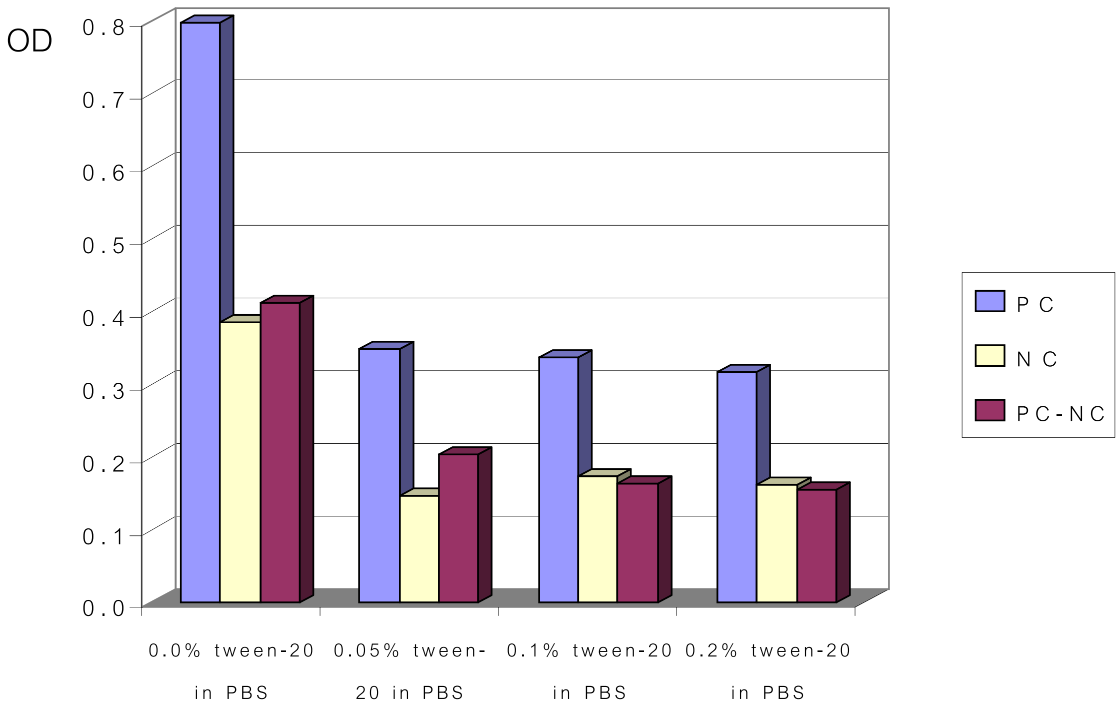
3.1.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารเจือจางตัวอย่างตรวจ

เมื่อทดลองใช้สาร polyethylene-sorbitan monolaurate (tween-20) ที่ความเข้มข้น 0%, 0.05%, 0.1% และ 0.2% เป็นสารเจือจางตัวอย่างตรวจ จะเห็นว่า แอนติเจน HEA มีผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบสูงสุดเมื่อใช้ 0% tween-20 ใน PBS pH 7.4 เป็นสารเจือจางตัวอย่างตรวจ (ภาพประกอบ 4) ขณะที่แอนติเจน SA และ DEA จะให้ผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบสูงสุดเมื่อใช้ 0.05% tween-20 ใน PBS pH 7.4 เป็นสารเจือจางตัวอย่างตรวจ (ภาพประกอบ 5-6)

A



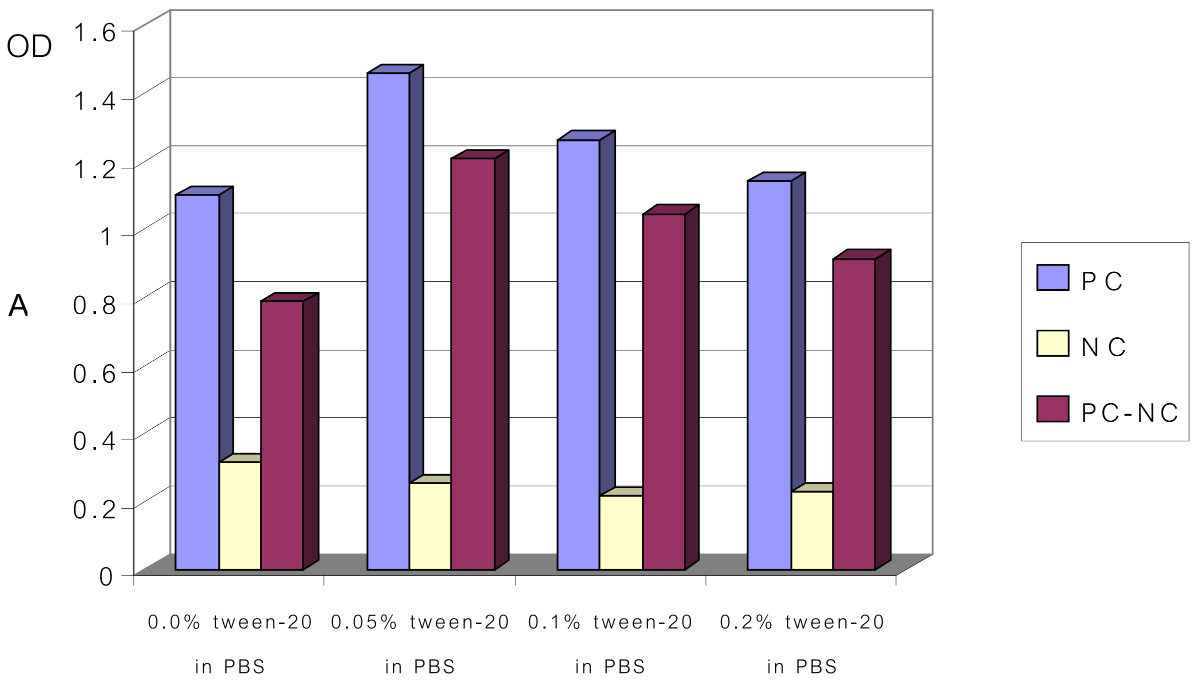
B



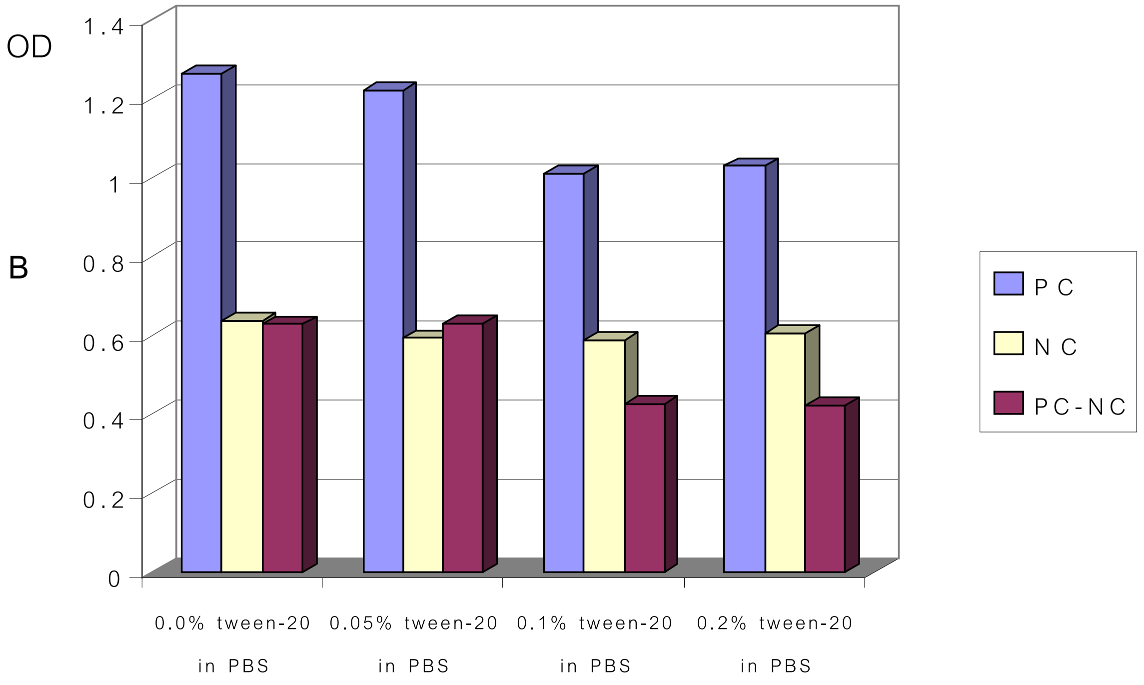
ภาพประกอบ 4 ผลของการใช้สาร polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween-20) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารเจือจางตัวอย่างตรวจ สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจนชนิด HEA

A) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM B) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG

A

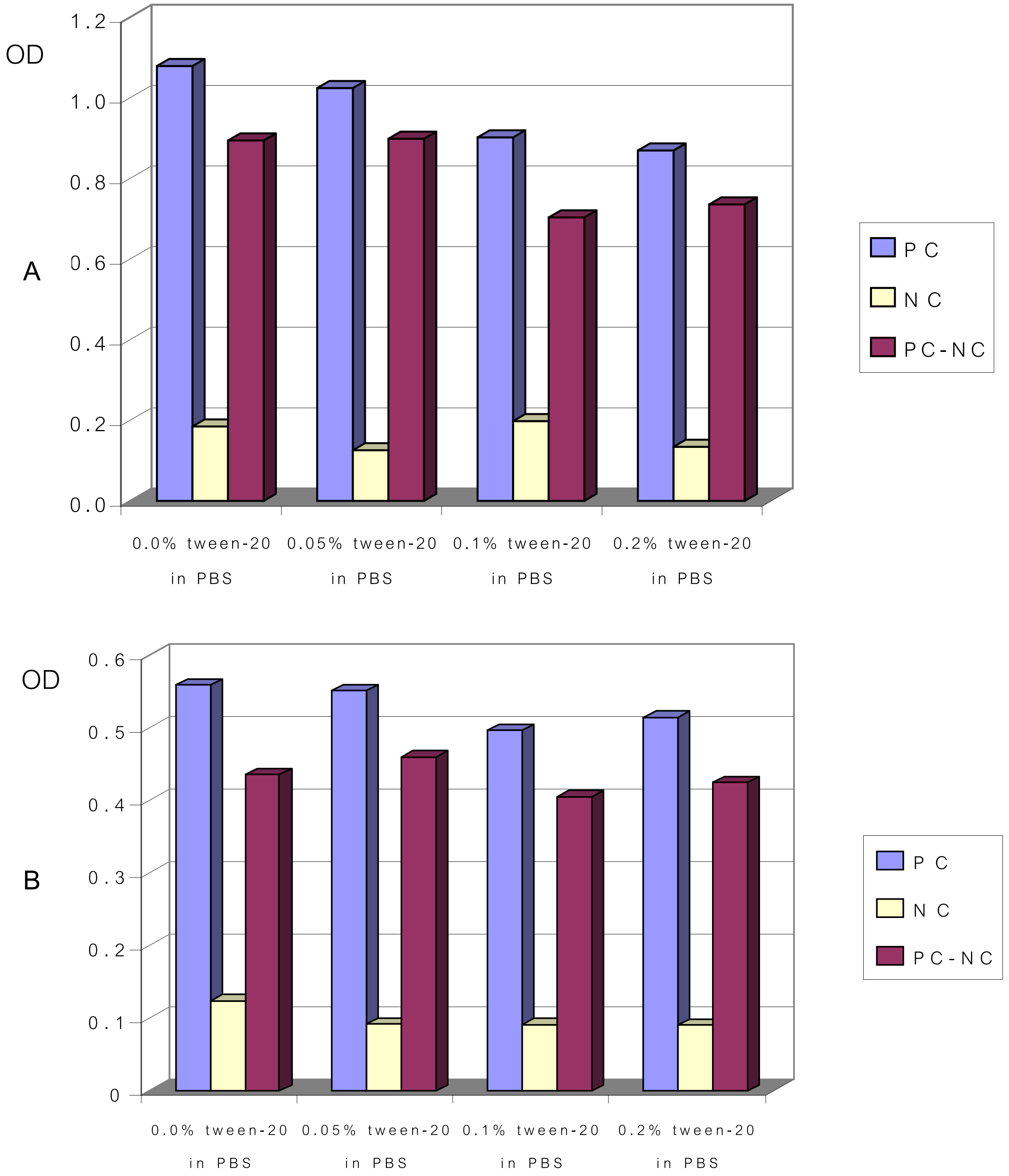


B



ภาพประกอบ 5 ผลของการใช้สาร polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween-20) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารเจือจางตัวอย่างตรวจ สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจนชนิด SA

A) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM B) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG

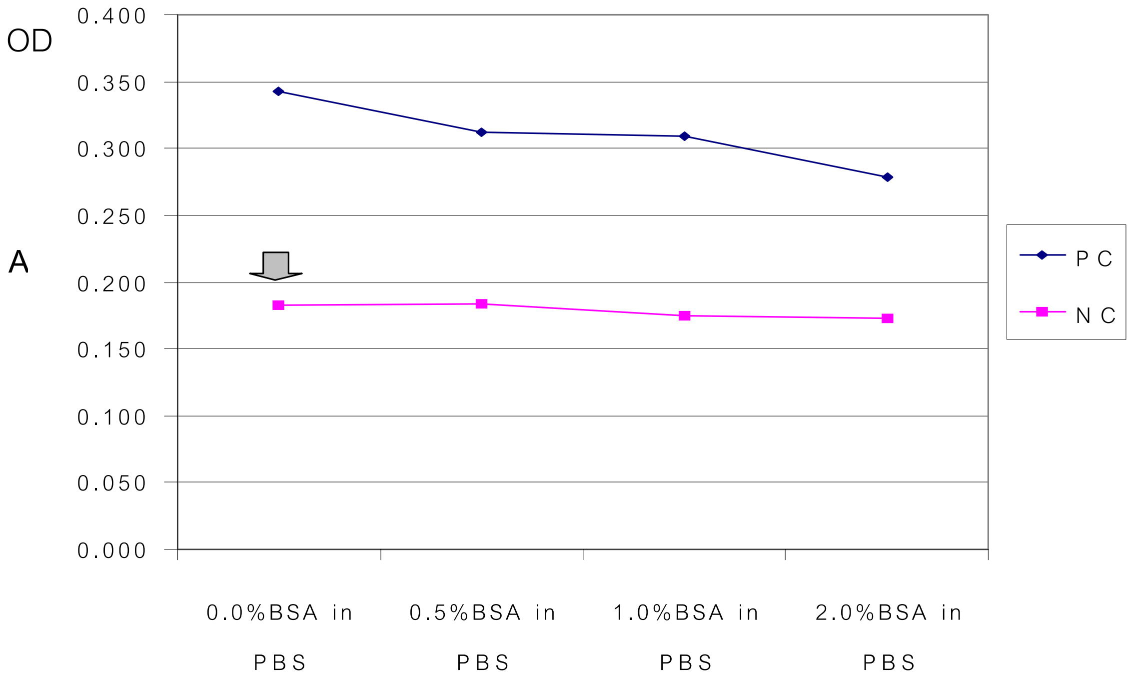


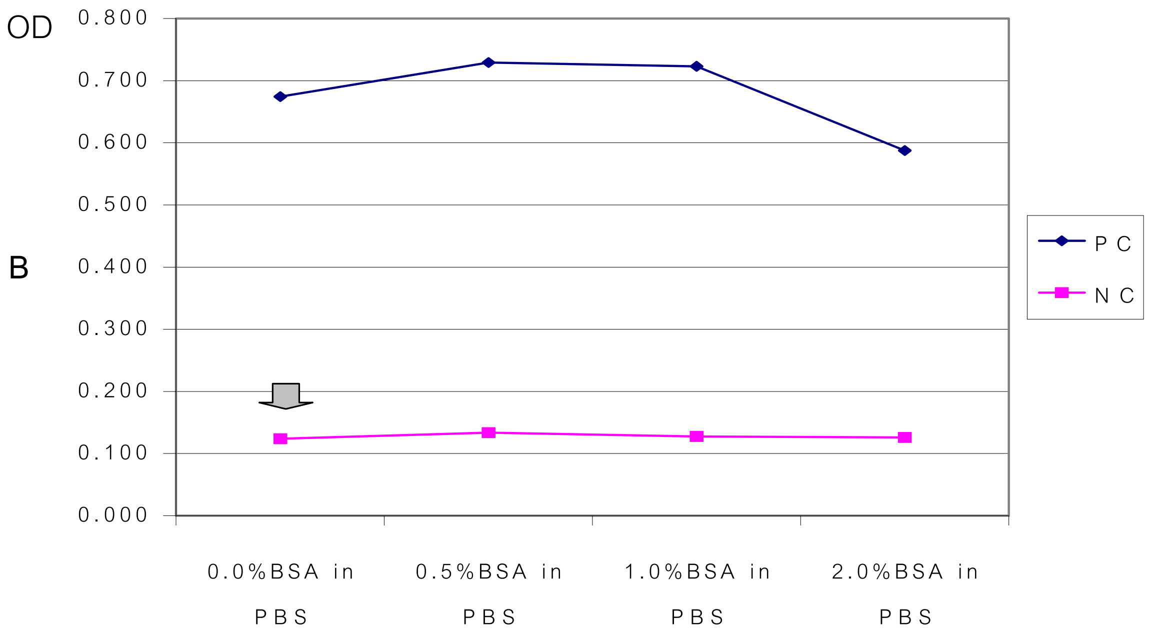
ภาพประกอบ 6 ผลของการใช้สาร polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween-20) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารเจือจางตัวอย่างตรวจ สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจนชนิด DEA

A) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM B) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG

3.1.1.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ blocking reagent

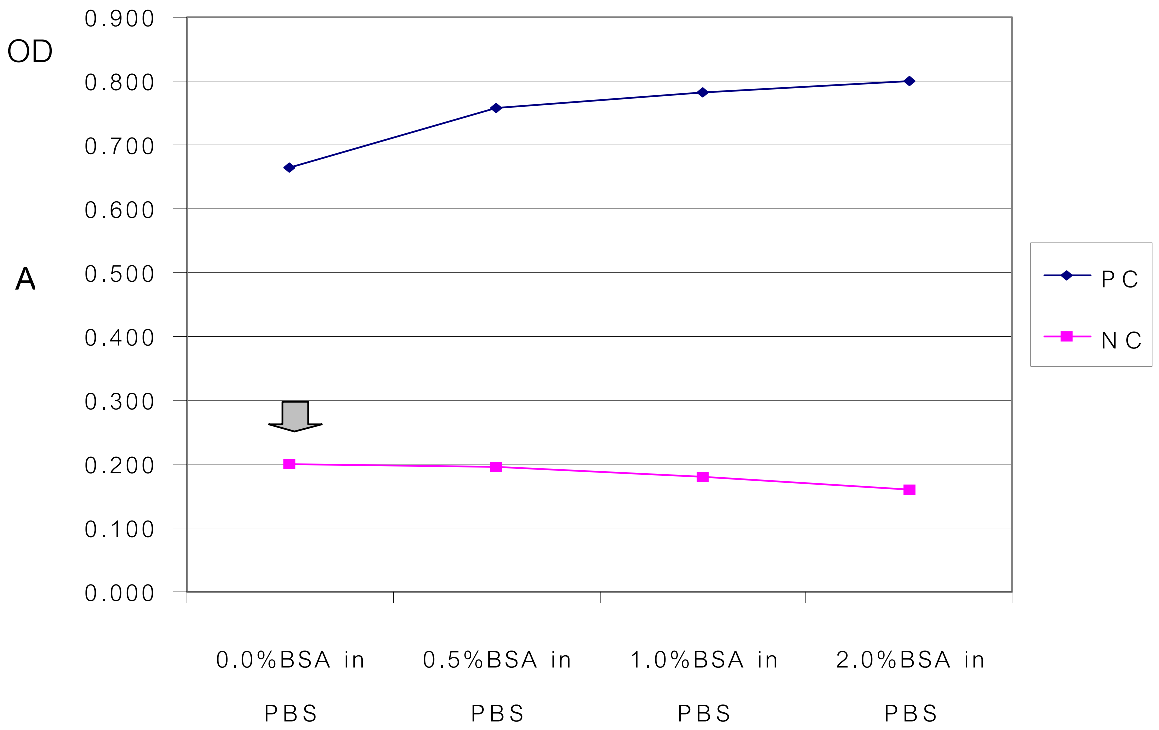
เมื่อทดลองใช้สาร bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0%, 0.5%, 1.0% และ 2.0% เป็น blocking reagent เพื่อป้องกันการเกิดพื้นหลังสูง (high background) จะเห็นว่าการใช้ BSA เป็น blocking reagent ไม่ช่วยให้ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบลดลงมากนัก (ภาพประกอบ 7-9) เมื่อคำนึงถึงความประหยัดและความสะดวกในการทดลองแล้ว จึงเลือกที่จะไม่ใช้สาร BSA เป็น blocking reagent

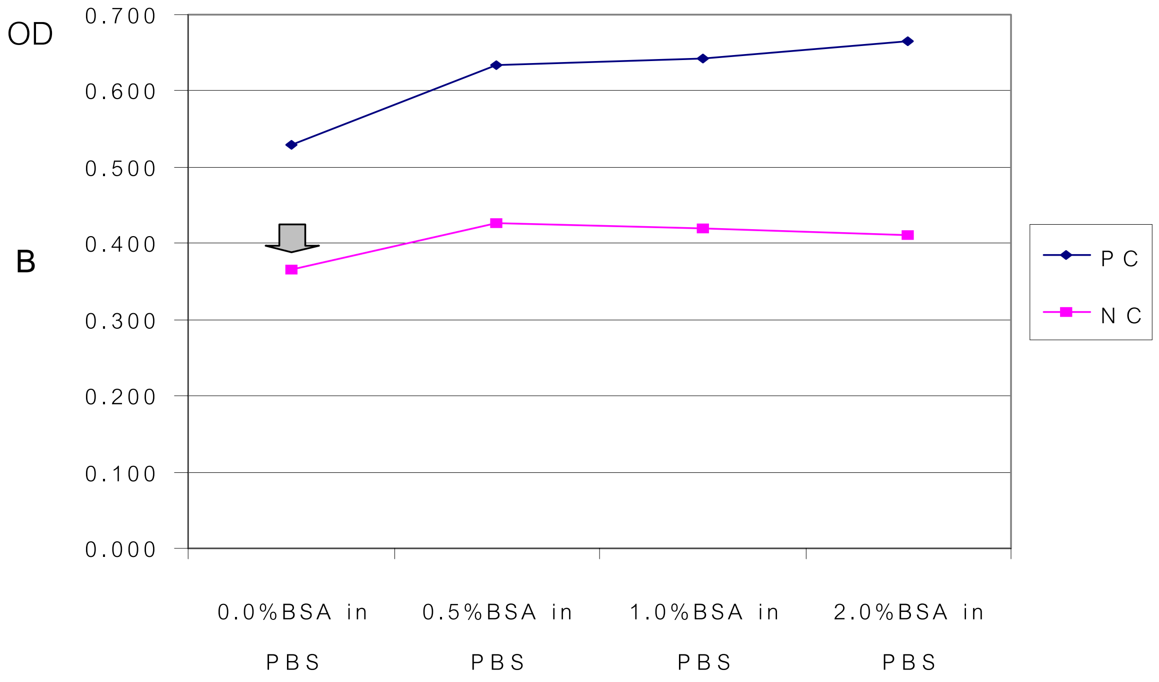




ภาพประกอบ 7 ผลของการใช้สาร BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็น blocking reagent สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจนชนิด HEA

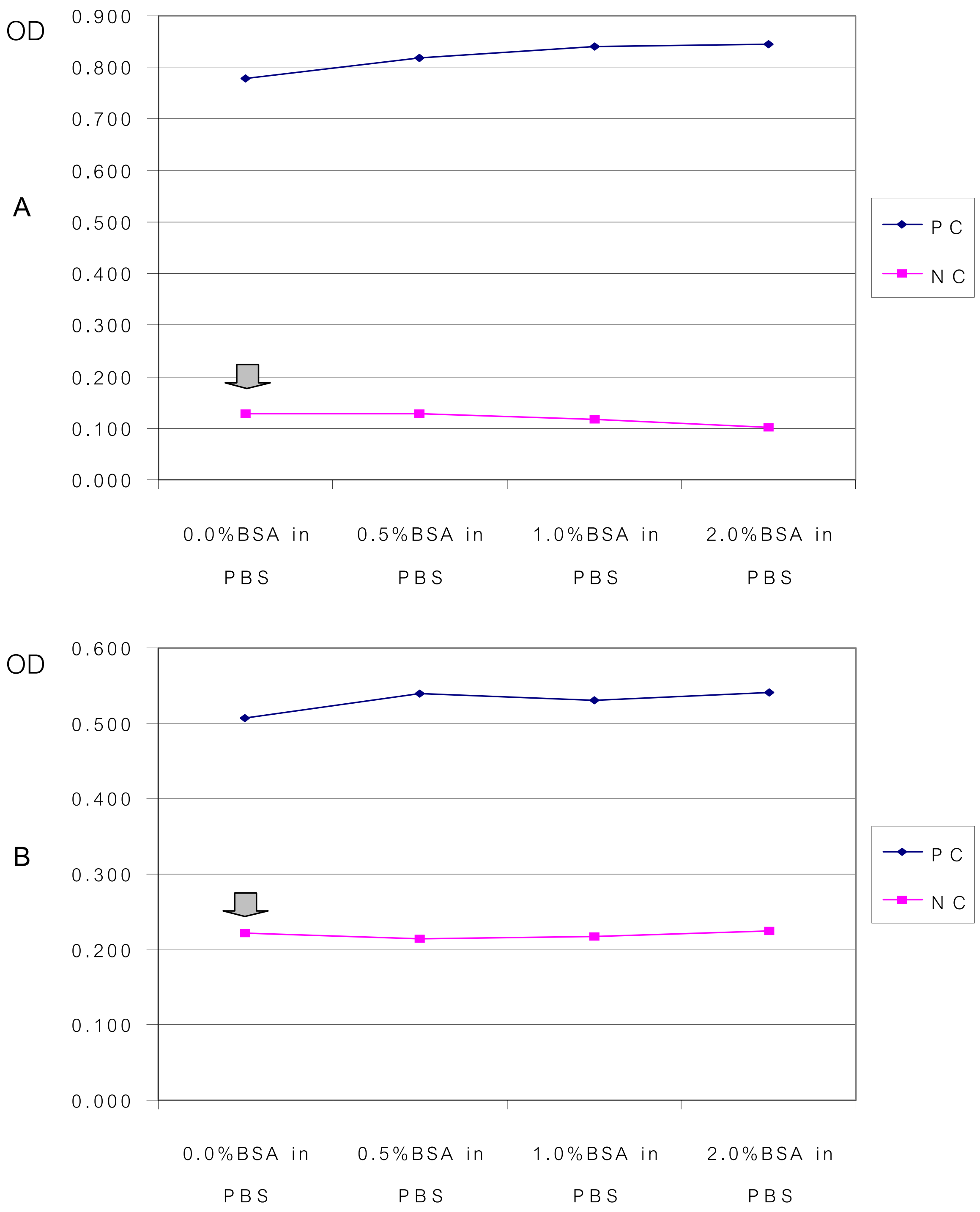
A) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM B) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG





ภาพประกอบ 8 ผลของการใช้สาร BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็น blocking reagent สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจนชนิด SA

A) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM B) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG



ภาพประกอบ 9 ผลของการใช้สาร BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็น blocking reagent สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจนชนิด DEA

A) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM B) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG

3.1.1.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแอนติเจนแต่ละชนิดและความเข้มข้นของคอนจูเกตแต่ละชนิด

เมื่อทดลองเจือจางแอนติเจนแต่ละชนิดเป็น 1:100 1:200 และ 1:400 แล้วเคลือบในหลุมไมโครไตเตอร์เพลต อบไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และเจือจางคอนจูเกตสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิดดังนี้ แอนติเจน HEA เจือจางคอนจูเกตทั้งชนิด IgM และ IgG เป็น 1:250 1:500 1:1,000 และ 1:2,000 ส่วนแอนติเจน SA และ DEA เจือจางคอนจูเกตทั้งชนิด IgM และ IgG เป็น 1:500 1:1,000 1:2,000 และ 1:4,000 หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว ใช้เกณฑ์การเลือกค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกให้อยู่ในช่วง 0.9 ถึง 1.5 โดยพยายามเลือกค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบให้ต่ำกว่า 0.2 เพื่อให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงในการทำการทดสอบแต่ละครั้งได้สะดวก

แอนติเจน HEA สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM เลือกความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับเคลือบเพลตที่ 1:100 และความเข้มข้นของคอนจูเกต IgM ที่ความเข้มข้น 1:250 (ตาราง 9 โดยค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกเท่ากับ 1.022 และค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบเท่ากับ 0.344 ขณะที่การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG เลือกความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับเคลือบเพลตที่ 1:100 และความเข้มข้นของคอนจูเกต IgG ที่ความเข้มข้น 1:250 (ตาราง 10) โดยค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกเท่ากับ 0.946 และค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบเท่ากับ 0.338

แอนติเจน SA สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM เลือกความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับเคลือบเพลตที่ 1:200 และความเข้มข้นของคอนจูเกต IgM ที่ความเข้มข้น 1:4,000 (ตาราง 11) โดยค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกเท่ากับ 1.239 และค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบเท่ากับ 0.162 ขณะที่การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG เลือกความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับเคลือบเพลตที่ 1:200 และความเข้มข้นของคอนจูเกต IgG ที่ความเข้มข้น 1:4,000 (ตาราง 12) โดยค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกเท่ากับ 1.198 และค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบเท่ากับ 0.507

แอนติเจน DEA สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM เลือกความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับเคลือบเพลตที่ 1:200 และความเข้มข้นของคอนจูเกต IgM ที่ความเข้มข้น 1:2,000 (ตาราง 13) โดยค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกเท่ากับ 1.441 และค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบเท่ากับ 0.109 ขณะที่การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG เลือกความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับเคลือบเพลตที่ 1:200 และความเข้มข้นของคอนจูเกต IgG ที่ความเข้มข้น

1:1,000 (ตาราง 14) โดยค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกเท่ากับ 0.939 และค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบเท่ากับ 0.095

ตาราง 9 ค่าการดูดกลืนแสงของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน HEA และคอนจูเกตชนิด IgM สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA

ความเข้มข้นของแอนติเจน HEA	$OD_{ตัวควบคุมบวก}$	$OD_{ตัวควบคุมลบ}$	**ความเข้มข้นของคอนจูเกต IgM**
1:100*	1.022	0.344	1:250**
	0.768	0.293	1:500
	0.687	0.245	1:1,000
	0.665	0.198	1:2,000
1:200	0.678	0.302	1:250
	0.553	0.258	1:500
	0.450	0.210	1:1,000
	0.357	0.169	1:2,000
1:400	0.558	0.285	1:250
	0.414	0.257	1:500
	0.340	0.203	1:1,000
	0.270	0.214	1:2,000

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ตาราง 10 ค่าการดูดกลืนแสงของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน HEA และคอนจูเกตชนิด IgG สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA

ความเข้มข้นของแอนติเจน HEA	$OD_{ตัวควบคุมบวก}$	$OD_{ตัวควบคุมลบ}$	**ความเข้มข้นของคอนจูเกต IgG**
1:100*	0.946	0.338	1:250**
	0.754	0.261	1:500
	0.897	0.229	1:1,000
	0.528	0.183	1:2,000
1:200	0.679	0.288	1:250
	0.608	0.278	1:500
	0.532	0.247	1:1,000
	0.435	0.182	1:2,000
1:400	0.568	0.182	1:250
	0.460	0.207	1:500
	0.530	0.191	1:1,000
	0.328	0.130	1:2,000

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ตาราง 11 ค่าการดูดกลืนแสงของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน SA และคอนจูเกตชนิด IgM สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA

ความเข้มข้นของแอนติเจน SA	$OD_{ตัวควบคุมบวก}$	$OD_{ตัวควบคุมลบ}$	**ความเข้มข้นของคอนจูเกต IgM**
1:100	2.747	0.332	1:500
	2.669	0.281	1:1,000
	2.265	0.207	1:2,000
	1.516	0.171	1:4,000
1:200*	2.654	0.355	1:500
	2.438	0.278	1:1,000
	1.968	0.219	1:2,000
	1.239	0.162	1:4,000**
1:400	1.083	0.308	1:500
	0.993	0.246	1:1,000
	0.735	0.188	1:2,000
	0.475	0.131	1:4,000

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ตาราง 12 ค่าการดูดกลืนแสงของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน SA และคอนจูเกตชนิด IgG สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA

ความเข้มข้นของแอนติเจน SA	$OD_{ตัวควบคุมบวก}$	$OD_{ตัวควบคุมลบ}$	**ความเข้มข้นของคอนจูเกต IgG**
1:100	2.394	0.918	1:500
	2.013	0.776	1:1,000
	1.653	0.712	1:2,000
	1.190	0.523	1:4,000
1:200*	2.263	0.932	1:500
	1.971	0.826	1:1,000
	1.609	0.661	1:2,000
	1.198	0.507	1:4,000**
1:400	1.123	0.644	1:500
	0.970	0.554	1:1,000
	0.781	0.460	1:2,000
	0.588	0.357	1:4,000

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ตาราง 13 ค่าการดูดกลืนแสงของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน DEA และคอนจูเกตชนิด IgM สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA

ความเข้มข้นของแอนติเจน DEA	$OD_{ตัวควบคุมบวก}$	$OD_{ตัวควบคุมลบ}$	**ความเข้มข้นของคอนจูเกต IgM**
1:100	2.755	0.478	1:500
	2.653	0.310	1:1,000
	2.160	0.150	1:2,000
	1.363	0.124	1:4,000
1:200*	2.148	0.158	1:500
	1.845	0.129	1:1,000
	1.441	0.109	1:2,000**
	0.928	0.108	1:4,000
1:400	1.432	0.334	1:500
	1.090	0.193	1:1,000
	0.790	0.145	1:2,000
	0.599	0.124	1:4,000

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ตาราง 14 ค่าการดูดกลืนแสงของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน DEA และคอนจูเกตชนิด IgG สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA

ความเข้มข้นของแอนติเจน DEA	$OD_{ตัวควบคุมบวก}$	$OD_{ตัวควบคุมลบ}$	**ความเข้มข้นของคอนจูเกต IgG**
1:100	1.751	0.121	1:500
	1.425	0.113	1:1,000
	1.167	0.100	1:2,000
	0.884	0.090	1:4,000
1:200*	1.107	0.099	1:500
	0.939	0.095	1:1,000**
	0.760	0.084	1:2,000
	0.522	0.075	1:4,000
1:400	0.609	0.120	1:500
	0.540	0.099	1:1,000
	0.439	0.078	1:2,000
	0.304	0.069	1:4,000

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

3.1.2 วิธี IHA

3.1.2.1 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมในการเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะ

แอนติเจน HEA จากการทดลองโดยไม่เจือจางแอนติเจนหรือเจือจางแอนติเจนเป็น 1:2 1:4 และ 1:8 แล้วนำไปเคลือบบนผิวเม็ดเลือดแดงแกะ โดยใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร พบว่าค่าไตเตอร์ของตัวควบคุมบวก <1:50 แสดงว่าแอนติเจน HEA มีปริมาณน้อยเกินไปที่จะเคลือบบนผิวเม็ดเลือดแดงแกะ ดังนั้นจึงได้ทดลองเพิ่มปริมาณแอนติเจนในการเคลือบผิวเม็ดเลือดแดงเป็น 100 และ 200 ไมโครลิตร ค่าไตเตอร์ของตัวควบคุมบวก ยังคงมีค่า <1:50 แม้ว่าจะทดลองใช้แอนติเจน HEA 300 ไมโครลิตรใส่ลงในเม็ดเลือดแดงแกะอัดแน่น (packed fixed SRBC) แล้วก็ตาม ค่าไตเตอร์ของตัวควบคุมบวกก็ยังมีค่า <1:50 ส่วนตัวควบคุมลบให้ค่าไตเตอร์ <1:50 ที่ทุกระดับความเจือจาง (ตาราง 15) ดังนั้นจึงไม่สามารถศึกษาประสิทธิภาพของการเคลือบผิวเม็ดเลือดแดงแกะด้วยแอนติเจนชนิด HEA ได้

แอนติเจน SA เมื่อไม่เจือจางแอนติเจนหรือเจือจางแอนติเจนเป็น 1:2 1:4 และ 1:8 แล้วนำไปเคลือบบนผิวเม็ดเลือดแดงแกะด้วยปริมาตร 50 ไมโครลิตร ได้ผลดังแสดงในตาราง 15 ความเข้มข้นของแอนติเจน SA ที่เหมาะสมในการเคลือบผิวเม็ดเลือดแดงแกะ เท่ากับ 1:4

แอนติเจน DEA เมื่อไม่เจือจางแอนติเจนหรือเจือจางแอนติเจนเป็น 1:2 1:4 และ 1:8 แล้วนำไปเคลือบบนผิวเม็ดเลือดแดงแกะด้วยปริมาตร 50 ไมโครลิตร พบว่าการไม่เจือจางแอนติเจน ได้ค่าไตเตอร์ของตัวควบคุมบวก เท่ากับ 1:100 ขณะที่การเจือจางแอนติเจน ได้ค่าไตเตอร์ของตัวควบคุมบวก <1:50 โดยที่ค่าไตเตอร์ของตัวควบคุมลบ <1:50 ทุกระดับความเจือจาง ดังนั้นจึงทดลองเพิ่มปริมาตรของแอนติเจน DEA แบบไม่เจือจาง เป็น 100 และ 200 ไมโครลิตร พบว่าที่แอนติเจนแบบไม่เจือจาง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ให้ค่าไตเตอร์ของตัวควบคุมบวกเท่ากับ 1:800 (ตาราง 15) จึงเลือกความเข้มข้นของแอนติเจน DEA แบบไม่เจือจาง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเคลือบผิวเม็ดเลือดแดงแกะ

ตาราง 15 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนแต่ละชนิดในการเคลือบบนผิวเม็ดเลือดแดงแกะ สำหรับใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี IHA

การเจือจาง	**ปริมาตร (μl)**	**ตัวควบคุม**	**ค่าไตเตอร์**		
			HEA	SA	DEA
ไม่เจือจาง	200	ตัวควบคุมบวก	<1:50	NA	1:800
		ตัวควบคุมลบ	<1:50	NA	<1:50
ไม่เจือจาง	100	ตัวควบคุมบวก	<1:50	NA	1:400
		ตัวควบคุมลบ	<1:50	NA	<1:50
ไม่เจือจาง	50	ตัวควบคุมบวก	<1:50	1:6,400	1:100
		ตัวควบคุมลบ	<1:50	<1:50	<1:50
1:2	50	ตัวควบคุมบวก	<1:50	1:6,400	<1:50
		ตัวควบคุมลบ	<1:50	<1:50	<1:50
1:4	50	ตัวควบคุมบวก	<1:50	1:6,400	<1:50
		ตัวควบคุมลบ	<1:50	<1:50	<1:50
1:8	50	ตัวควบคุมบวก	<1:50	1:3,200	<1:50
		ตัวควบคุมลบ	<1:50	<1:50	<1:50

หมายเหตุ NA = not available

3.2 การศึกษาถึงความแม่นยำ

ศึกษาความแม่นยำของการทดสอบทั้งแบบชนิด within-run precision โดยการตรวจตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบซ้ำอย่างละ 20 หลุม ในการทดสอบคราวเดียวกัน โดยใช้สภาวะต่างๆ และความเจือจางของน้ำยาที่เหมาะสม และความแม่นยำของการทดสอบแบบ between-run precision โดยการตรวจตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบซ้ำอย่างละ 20 ครั้ง ในการทดสอบที่เวลาต่างกัน โดยใช้สภาวะต่างๆ และความเจือจางของน้ำยาที่เหมาะสม ได้ผลดังตาราง 16

ตาราง 16 ความแม่นยำของการทดสอบ ชนิด within-run precision และ between-run precision สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี ELISA เมื่อเคลือบไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจนชนิดต่างๆ

ชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดี	Between-run (%CV)		Within-run (%CV)	
	ตัวควบคุมบวก	**ตัวควบคุมลบ**	**ตัวควบคุมบวก**	**ตัวควบคุมลบ**
HEA-ELISA-IgM	13.4	12.0	7.4	10.3
SA-ELISA-IgM	8.1	9.8	2.5	6.9
DEA-ELISA-IgM	5.6	13.3	4.8	4.6
HEA-ELISA-IgG	10.7	15.9	9.8	11.7
SA-ELISA-IgG	9.1	11.4	7.3	8.8
DEA-ELISA-IgG	15.1	14.7	7.6	11.0

สำหรับการทดสอบด้วยวิธี IHA การวัดความแม่นยำของการทดสอบแบบ within-run precision โดยการทดสอบตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบ ซ้ำ 20 ครั้งในการทดสอบคราวเดียวกันพบว่าค่าไตเตอร์ของทั้งตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบ สำหรับวิธี IHA ที่เคลือบด้วยแอนติเจน SA และ DEA มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนความแม่นยำแบบ between-run precision

โดยการตรวจตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบ วันละ 1 ครั้ง นาน 20 วัน พบว่า วิธี IHA ที่เคลือบด้วยแอนติเจน SA และ DEA มีค่าไตเตอร์ไม่เปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน แต่เมื่อทดสอบตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบเป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ พบว่าการเคลือบเม็ดเลือดแดงด้วยแอนติเจน SA มีค่าไตเตอร์ของตัวควบคุมบวกไม่เปลี่ยนแปลงจนถึงสัปดาห์ที่4 จากนั้นค่าไตเตอร์ของตัวควบคุมบวกลดลงเหลือ 1:3200 ขณะที่ไตเตอร์ของตัวควบคุมลบไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนการเคลือบเม็ดเลือดแดงด้วยแอนติเจน DEA มีค่าไตเตอร์ไม่เปลี่ยนแปลงทั้ง 6 สัปดาห์ (ไตเตอร์ 1:800) แสดงถึงความเสถียรของการเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะด้วยแอนติเจน SA อยู่ได้นาน 4 สัปดาห์ ขณะที่การเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะด้วยแอนติเจน DEA อยู่ได้นานไม่น้อยกว่า 6 สัปดาห์

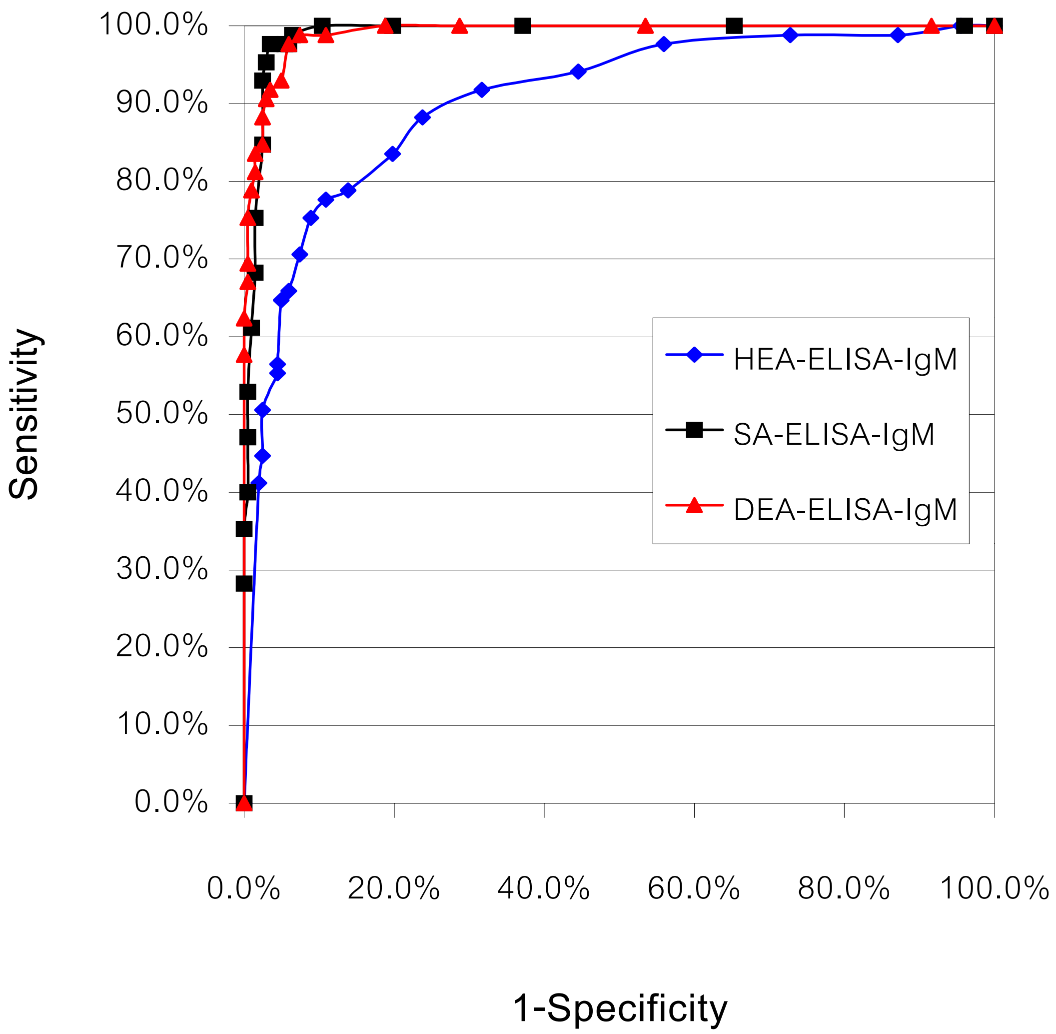
3.3 ผลการตรวจหาแอนติบอดีในกลุ่มควบคุม

จากการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี ELISA โดยเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจน HEA SA และ DEA เมื่อวิเคราะห์ผลดังกล่าวโดยการนำไปเขียนกราฟ receiver operating characteristic (ROC) โดยแกน Y เป็นค่าความไวของการทดสอบ และแกน X เป็นค่า 1-ความจำเพาะของการทดสอบ หรือค่าผลบวกลวง พบว่าแอนติเจน SA และ DEA มีพื้นที่ใต้กราฟ ROC มากที่สุด 0.99 และ 0.99 (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99, p-value น้อยกว่า 0.001) ขณะที่แอนติเจน HEA มีพื้นที่ใต้กราฟเพียง 0.90 (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99, p-value น้อยกว่า 0.001) ดังแสดงในภาพประกอบ 10 อย่างไรก็ตามการคัดเลือกจุดตัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ค่าความไวและความจำเพาะของการทดสอบสูงสุด พบว่า แม้ว่าแอนติเจน SA และ DEA จะมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากัน แต่การเลือกจุดตัดของค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.9 ทำให้การทดสอบหาแอนติบอดีชนิด IgM โดยการใช้แอนติเจน SA มีค่าความไวร้อยละ 97.6 และความจำเพาะร้อยละ 96.5 ขณะที่การเลือกจุดตัดของค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.7 ทำให้การทดสอบโดยการใช้แอนติเจน DEA มีค่าความไวร้อยละ 97.6 เท่ากัน แต่มีความจำเพาะต่ำกว่าเล็กร้อย (ร้อยละ 94.1) ส่วนแอนติเจน HEA เมื่อเลือกจุดตัดที่ 0.9 พบว่ามีความไวร้อยละ 83.5 และความจำเพาะร้อยละ 80.2 (ตาราง 17)

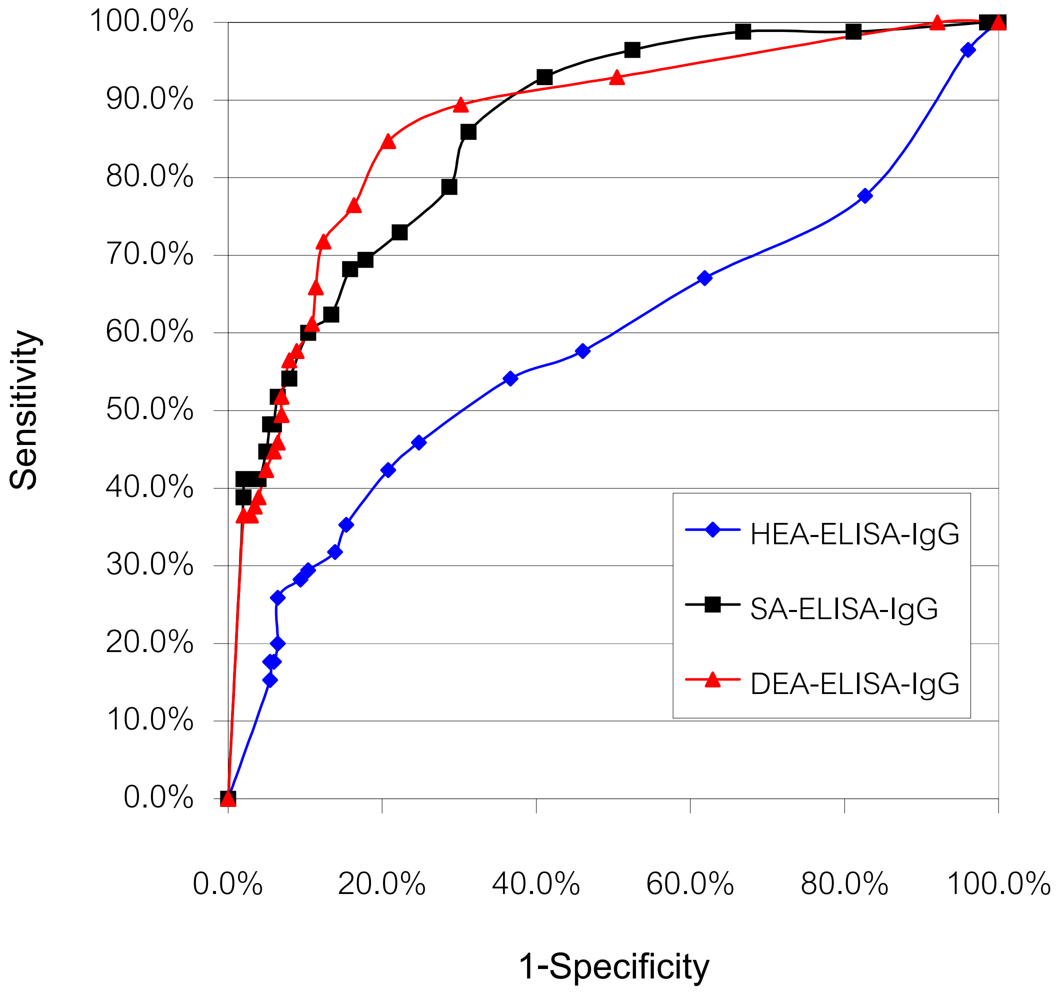
สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธี ELISA โดยการเคลือบหลุมไมโคร ไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจน HEA SA และ DEA เมื่อวิเคราะห์ผลดังกล่าวด้วยกราฟ ROC พบว่าแอนติเจน DEA มีพื้นที่ใต้กราฟสูงสุด 0.87 (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, p-value น้อยกว่า 0.05) รองลงมาคือแอนติเจน SA มีพื้นที่ใต้กราฟ 0.86 (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, p-value น้อยกว่า 0.05) และแอนติเจน HEA มีพื้นที่ใต้กราฟน้อยที่สุด 0.59 (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95,

p-value น้อยกว่า 0.05) ดังแสดงในภาพประกอบ 11 เมื่อเลือกจุดตัดของค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมพบว่า การเลือกจุดตัดของค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.4 ทำให้การทดสอบหาแอนติบอดีชนิด IgG โดยการใช้แอนติเจน DEA มีค่าความไวร้อยละ 84.7 และความจำเพาะร้อยละ 79.2 ขณะที่การเลือกจุดตัดของค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.7 ทำให้การทดสอบโดยการใช้แอนติเจน SA มีความไวร้อยละ 78.8 และความจำเพาะร้อยละ 71.3 ส่วนแอนติเจน HEA เมื่อเลือกจุดตัดที่ 0.6 พบว่ามีความไวและความจำเพาะต่ำสุด คือ ร้อยละ 54.1 และ 63.4 ตามลำดับ (ตาราง 17)

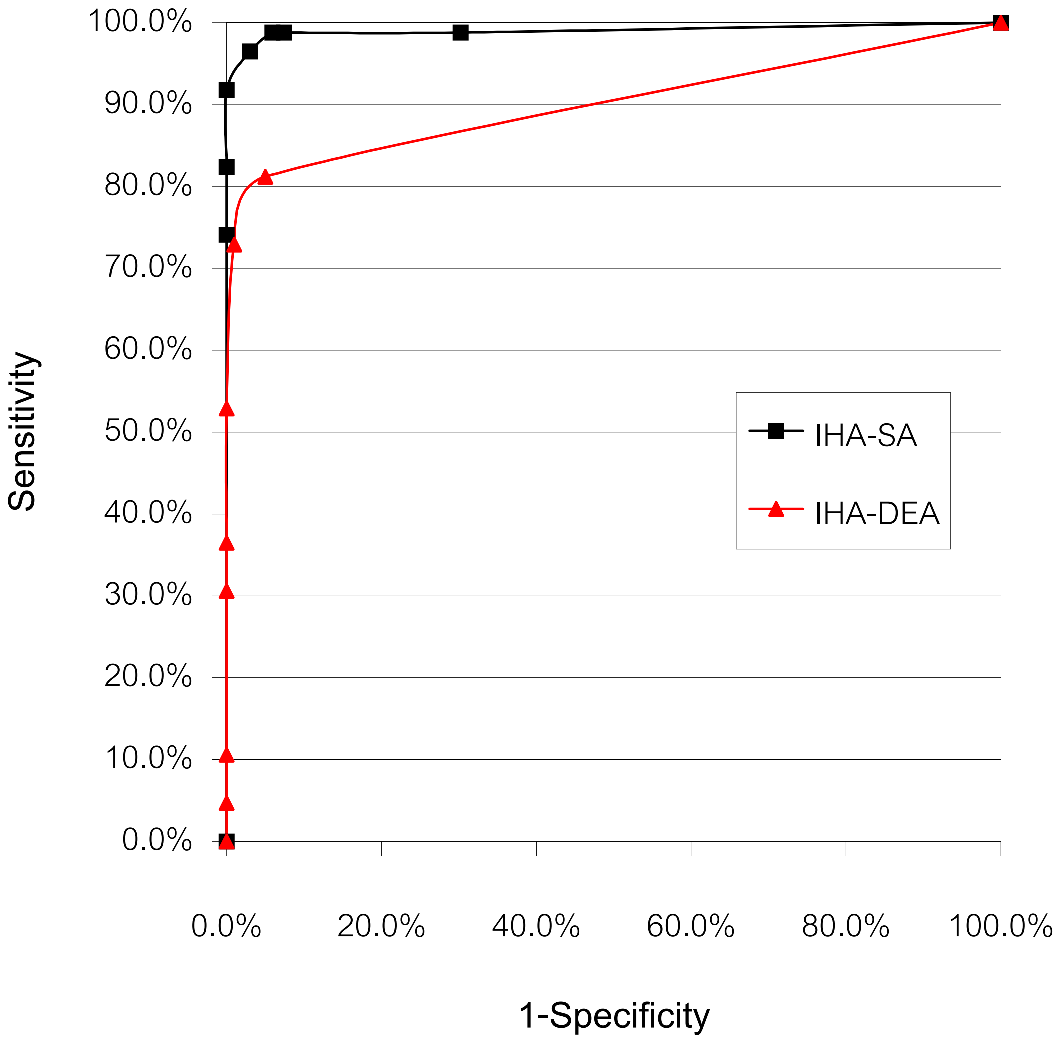
การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี IHA โดยการเคลือบผิวเม็ดเลือดแดงด้วยแอนติเจน SA และ DEA เมื่อวิเคราะห์ด้วยกราฟ ROC พบว่า แอนติเจน SA มีพื้นที่ใต้กราฟสูงสุด 0.99 (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99, p-value น้อยกว่า 0.001) ขณะที่แอนติเจน DEA ให้พื้นที่ใต้กราฟน้อยกว่า คือ 0.90 (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99, p-value น้อยกว่า 0.001) ดังแสดงในภาพประกอบ 12 อย่างไรก็ตาม การเลือกจุดตัดที่เหมาะสมของแอนติเจน SA ที่ไตเตอร์ 1:200 พบว่ามีความไวร้อยละ 98.8 และความจำเพาะร้อยละ 94.1 ขณะที่การเลือกจุดตัดที่เหมาะสมของแอนติเจน DEA ที่ไตเตอร์ 1:50 มีความไวเพียงร้อยละ 81.2 และความจำเพาะร้อยละ 95.0 ดังแสดงในตาราง 17



ภาพประกอบ10 กราฟ reciever operating characteristic (ROC) แสดงการวิเคราะห์การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ด้วยวิธี ELISA โดยการใช้แอนติเจนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด พื้นที่ใต้กราฟของ HEA IgM, SA IgM และ DEA IgM เท่ากับ 0.90, 0.99 และ 0.99 ตามลำดับ (ระดับความเชื่อมั่น 99%, P<0.001)



ภาพประกอบ 11 กราฟ reciever operating characteristic (ROC) แสดงการวิเคราะห์การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธี ELISA โดยการใช้แอนติเจนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด พื้นที่ใต้กราฟของ HEA IgG, SA IgG และ DEA IgG เท่ากับ 0.59, 0.86 และ 0.87 ตามลำดับ (ระดับความเชื่อมั่น 95%, P<0.05)



ภาพประกอบ12 กราฟ reciever operating characteristic (ROC) แสดงการวิเคราะห์การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี IHA โดยการใช้แอนติเจนที่แตกต่างกัน 2 ชนิด พื้นที่ใต้กราฟของ IHA SA และ IHA DEA เท่ากับ 0.99 และ 0.90 ตามลำดับ (ระดับความเชื่อมั่น 99%, P<0.001)

ตาราง 17 ผลการประเมินการตรวจด้วยวิธี ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG และวิธี IHA เมื่อใช้แอนติเจนที่แตกต่างกันในกลุ่มควบคุมบวก 85 รายและกลุ่มควบคุมลบ 202 ราย

ชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดี	**ความไว** (%)	**ความจำเพาะ** (%)	**อัตราผลบวกลวง** (%)	**อัตราผลลบลวง** (%)	OD
HEA-ELISA-IgM	83.5	80.2	19.8	16.5	0.9
SA-ELISA-IgM	97.6	96.5	3.5	2.4	0.9
DEA-ELISA-IgM	97.6	94.1	5.9	2.4	0.7
HEA-ELISA-IgG	54.1	63.4	36.6	45.9	0.6
SA-ELISA-IgG	78.8	71.3	28.7	21.2	0.7
DEA-ELISA-IgG	84.7	79.2	20.8	15.3	0.4
IHA-HEA	NA	NA	NA	NA	NA
IHA-SA	98.8	94.1	5.9	1.2	200
IHA-DEA	81.2	95.0	5.0	18.8	50

หมายเหตุ NA = ไม่สามารถศึกษาได้เนื่องจากแอนติเจนมีปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะใช้เคลือบผิวเม็ดเลือดแดงได้

เมื่อพิจารณาเฉพาะซีรั่มที่เก็บครั้งแรก (acute sera) สำหรับการทดสอบหาแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อเชื้อเลปโตสไปราในกลุ่มควบคุมบวกจำนวน 85 ตัวอย่าง พบว่ามีความไวค่อนข้างต่ำ กล่าวคือความไวของการทดสอบหาแอนติบอดีชนิด IgM โดยการใช้แอนติเจน HEA SA และ DEA เท่ากับร้อยละ 20.0 20.0 และ 22.4 ตามลำดับ ขณะที่ความไวของการทดสอบหาแอนติบอดีชนิด IgG โดยการใช้แอนติเจน HEA SA และ DEA เท่ากับร้อยละ 10.6 17.6 และ 32.9 ตามลำดับ ส่วนความไวของการทดสอบด้วยวิธี IHA โดยการเคลือบผิวเม็ดเลือดแดงด้วยแอนติเจน SA และ DEA เท่ากับร้อยละ 22.4 และ 10.6 ตามลำดับ (ตาราง 18)

ตาราง 18 ความไวของการทดสอบด้วยวิธี ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG และวิธี IHA เมื่อใช้แอนติเจนที่แตกต่างกัน โดยประเมินในซีรั่มครั้งแรกจำนวน 85 ตัวอย่าง

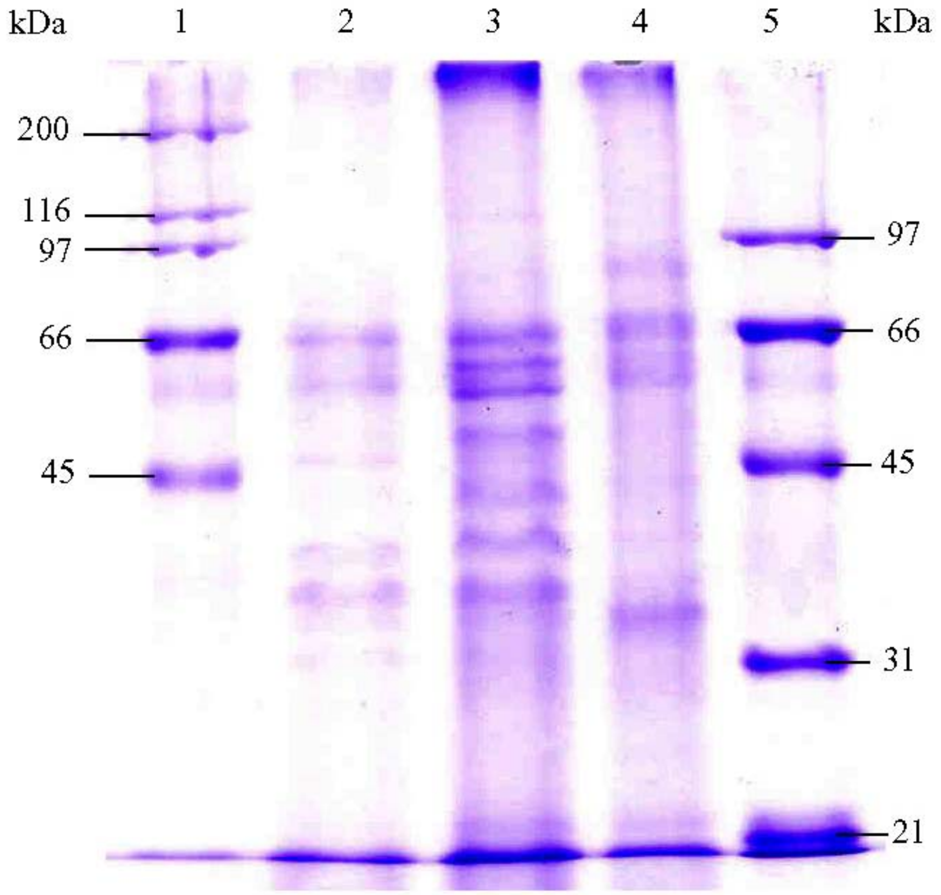
ชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดี	**ผลบวก**	**ความไว (%)**
HEA-ELISA-IgM	17	20.0
SA-ELISA-IgM	17	20.0
DEA-ELISA-IgM	19	22.4
HEA-ELISA-IgG	9	10.6
SA-ELISA-IgG	15	17.6
DEA-ELISA-IgG	28	32.9
IHA-HEA	NA	NA
IHA-SA	19	22.4
IHA-DEA	9	10.6
MAT	1	1.2

3.4 การศึกษาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนในแอนติเจน HEA SA และ DEA ที่เตรียมในครั้งแรกสำหรับศึกษา ELISA เท่ากับ 0.019 0.728 และ 0.028 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ ส่วนแอนติเจน HEA SA และ DEA ที่เตรียมขึ้นใหม่ในคราวหลังเพื่อใช้ในการศึกษา IHA และ แบบแผนโปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสมีปริมาณโปรตีนในแอนติเจน เท่ากับ 0.117 0.510 และ 0.030 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

3.5 การศึกษาแบบแผนโปรตีนของแอนติเจนต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธีอิเลคโทรฟอรีซิส

เมื่อนำแอนติเจนต่อเชื้อเลปโตสไปราทั้งสามชนิดมาศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอรีซิสพบว่าแอนติเจน HEA ปรากฏแถบโปรตีน 5 แถบมีน้ำหนักโมเลกุล 68 60 50 41 และ 36 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แอนติเจน SA ปรากฏแถบโปรตีน 7 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 68 62 60 52 45 41 และ 36 กิโลดาลตันตามลำดับ และแอนติเจน DEA ปรากฏแถบโปรตีน 4 แถบ น้ำหนักโมเลกุล 87 68 60 และ 34 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพประกอบ 13)



ภาพประกอบ 13 แบบแผนโปรตีนของแอนติเจนต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธีอิเลคโตรฟอรีซิส โดยใช้ 12% เอส ดี เอส โพลิอะคริลาไมด์เจล ย้อมด้วยสี คูมาซี บริลเลี่ยนบลู

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน ชนิด น้ำหนักโมเลกุลมาก

ช่องที่ 2 โปรตีนจากแอนติเจน HEA

ช่องที่ 3 โปรตีนจากแอนติเจน SA

ช่องที่ 4 โปรตีนจากแอนติเจน DEA

ช่องที่ 5 โปรตีนมาตรฐาน ชนิด น้ำหนักโมเลกุลน้อย