บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

เชื้อเลปโตสไปรา

เชื้อเลปโตสไปรา ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณพิมพ์ใจ นัยโกวิท สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี และคุณเยาวมาล สูติวิจิตร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เขต 12 สงขลา รวม 23 ซีโรวาร์ (ตาราง 6) ซึ่งเป็นซีโรวาร์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขแนะนำให้ใช้ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคนี้ในประเทศไทย (พิมพ์ใจ นัยโกวิท และดวงพร พูลสุขสมบัติ, 2543)

ตาราง 6 เชื้อเลปโตสไปรา 23 ซีโรวาร์ที่ใช้ในการทดสอบ

ลำดับที่	ซีโรวาร์	ลำดับที่	ซีโรวาร์
1.	Akayami	13.	Hyos
2.	Australis	14.	Icterohemorrhagiae
3.	Ballico	15.	Javanica
4.	Bataviae	16.	Pomona
5.	Bratislava	17.	Pyrogenes
6.	Canicola	18.	Rachamati
7.	Cellidoni	19.	Saigon
8.	Copenhageni	20.	Sejroe
9.	Djasiman	21.	Tarassovi
10.	Grippotyphosa	22.	Wolffi
11.	Hardjo	23.	Andamana
12.	Hebdomadis		

การศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อเลปโตสไปราทั้ง 23 ซีโรวาร์ในการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี MAT แต่ใช้เชื้อซีโรวาร์ Bataviae เป็นแหล่งในการเตรียมแอนติเจน เนื่องจากการศึกษาการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสในผู้ป่วยในจังหวัดสงขลาเมื่อปี พ.ศ. 2543 พบว่าเชื้อสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากซีโรวาร์ Bataviae สูงถึงร้อยละ 80.8 (Pradutkanchana *et al*., 2002) และการศึกษาในหนูพบว่ามีแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราซีโรวาร์ Bataviae สูงถึงร้อยละ 51.9 (วลัยลักษณ์ กาญจนพิน, 2544)

อาหารเลี้ยงเชื้อ (พิมพ์ใจ นัยโกวิทและ ดวงพร พูลสุขสมบัติ,2543)

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Fletcher

ชั่ง Fetcher's medium base 0.25 กรัม เติมน้ำกลั่น 92 มิลลิลิตร ต้มให้ละลายแล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งให้อาหารเย็นลง เติมซีรั่มกระต่ายที่ inactivate แล้ว 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ นำไป inactivate ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงอีกครั้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ หากไม่พบการปนเปื้อนเชื้อใดๆ เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ neopeptone

ชั่ง neopeptone 0.2 กรัม sodium chloride 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายปรับ pH ให้ได้ 7.2 นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งให้อาหารเย็นลง แล้วเติมซีรั่มกระต่ายที่ inactivate แล้ว 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ นำไป inactivate ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงอีกครั้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1 คืน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ หากไม่พบการปนเปื้อนเชื้อใดๆ เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างตรวจ

1. กลุ่มควบคุมบวก

ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์และโรงพยาบาลหาดใหญ่ ด้วยอาการไข้สูงเฉียบพลัน มากกว่า 38 องศาเซลเซียส นานกว่า 1 วันแต่ไม่เกิน 3 สัปดาห์ โดยผู้ป่วยต้องไม่มีอาการ น้ำมูกไหล เจ็บคอ ปอดอักเสบ ระบบทางเดินปัสสาวะอักเสบ หรือท้องเสีย เจาะเลือดเก็บซีรั่มผู้ป่วยอย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกัน 1-2 สัปดาห์ นำมาตรวจด้วยวิธี MAT โดยใช้เกณฑ์การวินิจฉัยจากผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีในซีรั่มคู่ต่างกัน $\geq$ 4 เท่า จากการทดสอบพบว่ามีผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 85 ราย เก็บซีรั่มผู้ป่วยได้ 178 ตัวอย่าง

2. กลุ่มควบคุมลบ

- ศึกษาหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในคนปกติ โดยศึกษาในผู้บริจาคโลหิตจำนวน 100 ราย

- ศึกษาหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในกลุ่มโรคที่มีอาการใกล้เคียงกับโรคเลปโตสไปโรซิส รวม 62 ราย ได้แก่

- ผู้ป่วยโรค scrub typhus จำนวน 20 ราย โดยใช้เกณฑ์การวินิจฉัยจากผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *Orientia tsutsugamuchi* ด้วยวิธี IFA ไตเตอร์ $\geq$ 1:400 (Pradutkanchana *et al*., 1997)

- ผู้ป่วยโรค murine typhus จำนวน 22 ราย โดยใช้เกณฑ์การวินิจฉัยจากผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *Rickettsia typhi* ด้วยวิธี IFA ไตเตอร์ $\geq$ 1:400 (Silpapojakul *et al*., 1995)

- ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก จำนวน 20 ราย โดยใช้เกณฑ์การวินิจฉัยจาก ผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้เลือดออก ด้วยวิธี hemagglutination inhibition ไตเตอร์ $\geq$ 1:2,560 (Clarke and Casals, 1958)

- ศึกษาหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในผู้ป่วยโรคซิฟิลิส ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากแบคทีเรียรูปเกลียวเช่นเดียวกับเชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 20 ราย โดยใช้เกณฑ์การวินิจฉัยจากผู้ป่วยที่ให้ผลบวก 3+ หรือ 4+ ด้วยวิธี fluorescent treponema antibody-absorption (FTA-ABS)

- ศึกษาหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในผู้ป่วยกลุ่มโรคภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อเนื้อเยื่อตนเอง จำนวน 20 ราย โดยใช้เกณฑ์การวินิจฉัยจากผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีในการทดสอบหา anti nuclear antibody ด้วยวิธี IFA ไตเตอร์ $\geq$ 1:1,280

น้ำยา

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปรา

- Fletcher's medium (Difco, USA)
- Neopeptone medium (Difco, USA)
- Rabbit serum (Biochrome AG, Germany)

2. การทดสอบ ELISA

ก. แอนติบอดี

- Peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG (code P0214, Dako A/S, Denmark)
- Peroxidase conjugated rabbit anti-human IgM (code P0215, Dako A/S, Denmark)

ข. น้ำยา

- Coating buffer (carbonate buffer pH 9.6)
- Washing buffer (0.05% Tween-20 ใน PBS pH 7.4)
- Blocking reagent (1% BSA ใน PBS pH 7.4)
- Sample diluent (1% Tween-20 ใน PBS pH 7.4)
- Conjugate diluent (0.5% BSA ใน PBS pH 7.4)
- Substrate diluent (citric acid buffer phosphate)
- Stop reagent (4N sulfuric acid)

3. การทดสอบ indirect hemagglutination assay

- PBS pH 7.2
- PBS pH 6.4
- 0.5% BSA ใน PBS pH 7.2
- 0.5% BSA ใน PBS pH 7.2 ผสม 0.1% Sodium azide
- Tannic acid อัตราส่วน 1:20,000 ใน PBS pH 7.2

4. การทดสอบโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอรีซิสแบบเอสดีเอส

- 30% acylamide/bis
- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
- 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

- 10% sodium dodecyl sulfate
- Sample buffer
- SDS reducing buffer
- 10x-electrode (Running) buffer, pH 8.3

สารเคมี

- Sodium carbonate (BDH, England)
- Sodium azide (RDH, Germany)
- Sodium hydrogen carbonate (BDH, England)
- Sodium hydroxide (BDH, England)
- Sodium chloride (BDH, England)
- Potassium chloride (BDH, England)
- Disodium hydrogen phosphate anhydrous (BDH, England)
- Potassium dihydrogen phosphate (BDH, England)
- Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (tween-20) (Sigma, USA)
- Bovine serum albumin fraction V (Sigma, USA)
- Citric acid (Sigma, USA)
- Ortho-phenylenediamine (Sigma, USA)
- Hydrogen peroxide (Fluka, Germany)
- Sulphuric acid (Lab-Scan Analytical Science)
- Deoxycholic acid (BDH, England)
- Tannic acid (BDH, England)
- Sodium azide (BDH, England)
- Glutaraldyhe (Sigma, USA)
- Acylamide (Merck, Germany)
- Bis-acrylamide (Merck, Germany)
- Ammomium persulfate (Sigma, USA)
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Promega, USA)
- Bromophenol blue (Fluka, Germany)

- N, N',N',N, tetramethylenediamine (TEMED) (Promega, USA)
- Glycine (Fluka, Germany)
- Ammonium persulfate (Sigma, USA)
- Coomassie brilliant blue G250 (Merck, Germany)

อุปกรณ์

เครื่องแก้วและพลาสติค

- หลอดทดลอง (Pyrex, USA; Corning, USA)
- กระบอกตวง (Witeg, Germany)
- ขวดชมพู่ (Pyrex, USA)
- บีกเกอร์ (Pyrex, USA)
- ไมโครไตเตอร์เพลตชนิดโพลีสไตรีน (Nunc, Denmark)
- ไมโครไตเตอร์เพลต (Nunc, Denmark)
- Pipette tips
- กระดาษกรอง Whatman No 1
- VacuCap™ 60 pore size 0.2 μm (Gelman Sciences, USA)
- สไลด์แก้ว
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Falcon, USA)
- ขวดสำหรับกรอง (Pyrex, USA)
- Serological pipettes (HBG, West Germany)
- transferpettes

เครื่องมือ

- Incubator (Gallenkamp, UK)
- ELISA reader (model Elx808, Bio-Tek Instruments Inc, USA)
- Analytical balance (Satorius, USA)
- Automatic pipette (Pipetemen, Eppendorf, Biohit)
- Multichannel pipette (Finnpipette)
- Centrifuge (Kokusan, Japan)
- pH meter (Scientific Industries Inc, USA)
- Waterbath (Eyela, Japan)

- Electrophoresis set including power supply (Biorad, USA)
- Vacuum pump (Gelman Sciences, USA)
- Dark field microscope (model BH-2, Olympus, Japan)
- High speed refrigerated centrifuge (Sorval, USA)
- Sonicator (Brandson Sonifier, USA)
- Rotator (Stovall, USA)

วิธีการ

2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปรา

เชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 23 ซีโรวาร์ เก็บรักษาในห้องปฏิบัติการโดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fletcher มีการถ่ายเชื้อลงสู่หลอดใหม่ทุกเดือน สำหรับการทดสอบจะเปลี่ยนจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fletcher เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Neopeptone ซึ่งจะทำให้ได้เชื้อที่สมบูรณ์และมีปริมาณมากขึ้น

2.1.1 การเพาะลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fletcher

ตรวจสอบการปนเปื้อนจุลชีพอื่นในเชื้อเลปโตสไปราแต่ละซีโรวาร์ โดยดูดเชื้อ 3 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์แก้วที่สะอาด นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด หากไม่พบการปนเปื้อนเชื้ออื่น ดูดเชื้อเลปโตสไปราแต่ละซีโรวาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรถ่ายใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ Fletcher หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ได้ประมาณ 1 เดือน

2.1.2 การเพาะลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Neopeptone

ตรวจสอบการปนเปื้อนจุลชีพอื่นในเชื้อเลปโตสไปราแต่ละซีโรวาร์ โดยดูดเชื้อ 3 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์แก้วที่สะอาด นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด หากไม่พบการปนเปื้อนเชื้ออื่น ดูดเชื้อเลปโตสไปราแต่ละซีโรวาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรถ่ายใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ Neopeptone หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน เชื้อที่เหมาะสำหรับนำไปใช้ในการทดสอบต่างๆ หรือนำไปสกัดแอนติเจนควรมีปริมาณ 3+ ถึง 4+ เคลื่อนไหวรวดเร็ว และไม่มีการเกาะกลุ่มเป็นก้อน (พิมพ์ใจ นัยโกวิทและดวงพร พูลสุขสมบัติ, 2543)

2.2 การสกัดแอนติเจน

2.2.1 Heat extracted antigen (Henk *et al*., 2000)

นำเชื้อเลปโตสไปราอายุ 7-14 วัน ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ neopeptone ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาปั่นล้างด้วย PBS pH 7.4 ที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซียลเซียส เป็น

เวลา 10 นาที ละลายตะกอนที่ได้ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์ เก็บน้ำใสส่วนบนใส่หลอดเล็กๆ แช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

2.2.2 Sonicated antigen (Adler *et al*., 1980)

นำเชื้อเลปโตสไปราอายุ 7-14 วัน ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ neopeptone ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาปั่นล้างด้วย PBS pH 7.4 ที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนที่ได้ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงที่ความถี่ 20 kHz ช่วงละ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที แบ่งใส่หลอดเล็กๆ แช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

2.2.3 Deoxycholate extracted antigen (Petchclai *et al*., 1992)

นำเชื้อเลปโตสไปราอายุ 7-14 วัน ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ neopeptone มาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% 1 ครั้ง ที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ละลายตะกอนที่ได้ในน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 1 ใน 80 ส่วนของปริมาณเชื้อเริ่มต้น เติม 2% deoxycholate ในปริมาณเท่ากันลงไป ผสมให้เข้ากัน อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน แล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนใส่หลอดเล็กๆ แช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

2.3 การทดสอบ MAT และการพัฒนาวิธีการตรวจ ELISA และ IHA

2.3.1 การทดสอบ MAT (Galton *et al*., 1958)

ใช้เชื้อเลปโตสไปรา 23 ซีโรวาร์เป็นแอนติเจน ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรั่มผู้ป่วยเริ่มต้นตรวจคัดกรองที่ไตเตอร์ 1:100 โดยการเจือจางซีรั่มผู้ป่วยเป็น 1:50 ใน PBS pH 7.2 นำซีรั่มที่เจือจางแล้วใส่ในไมโครไตเตอร์เพลต 23 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติมเชื้อเลปโตสไปราที่เลี้ยงไว้แต่ละซีโรวาร์ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 ชั่วโมง ดูดสารผสมที่ได้ 3 ไมโครลิตรหยดลงบนสไลด์ นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดกำลังขยาย 100 เท่า สังเกตุการเกิดการเกาะกลุ่ม ซีรั่มใดที่ให้ผลบวกกับเชื้อซีโรวาร์ใด ต้องนำซีรั่มนั้นกลับมาหาไตเตอร์ต่อเชื้อซีโรวาร์นั้น โดยอ่านผลที่ระดับความเจือจางสุดท้ายที่ให้ผลการเกาะกลุ่มของตัวเชื้อร้อยละ 50 เป็นค่าไตเตอร์

2.3.2 การพัฒนาการตรวจวิธี ELISA

2.3.2.1 สุ่มเลือกสภาวะต่างๆ เพื่อทดสอบระบบ

เจือจางแอนติเจนทั้งสามชนิดด้วย coating buffer เป็น 1:500 แล้วนำมาใส่ในไมโครไตเตอร์เพลต หลุมละ 100 ไมโครลิตร อบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เติม blocking reagent (1% BSA ใน PBS pH 7.4) ลงในทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เจือจางตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบด้วย สารเจือจางตัวอย่างตรวจเป็น 1:200 เติมตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบหลุมละ 100 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลตที่เคลือบด้วยแอนติเจนแต่ละชนิด นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เติมคอนจูเกต ชนิด IgM หรือ IgG ที่เจือจางด้วย conjugate diluent เป็น 1:2000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เติม substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตรลงในทุกหลุม ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop reagent หลุมละ 100 ไมโครลิตรลงในทุกหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

2.3.2.2 ศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการทดสอบ

ก. สารเจือจางตัวอย่างตรวจ

เจือจางแอนติเจน HEA เป็น 1:200 แอนติเจน SA เป็น 1:500 และแอนติเจน DEA เป็น 1:500 แล้วเคลือบในไมโครไตเตอร์เพลต หลุมละ 100 ไมโครลิตร อบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เติม blocking reagent (1% BSA ใน PBS pH 7.4) ลงในทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เตรียมสารเจือจางตัวอย่างตรวจ โดยละลาย tween-20 ที่ความเข้มข้น 0%, 0.05%, 0.1% และ 0.2% เจือจางตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบด้วยสารเจือจางตัวอย่างตรวจเป็น 1:200 เติมตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบที่เจือจางแล้วลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลตที่เคลือบด้วยแอนติเจนแต่ละชนิดหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM สำหรับแอนติเจน HEA เติมคอนจูเกตที่เจือจาง 1:1,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนแอนติเจน SA และ DEA เติมคอนจูเกตที่เจือจาง 1:2,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG สำหรับแอนติเจน HEA เติมคอนจูเกตที่เจือจาง 1:1,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนแอนติเจน SA และ DEA เติมคอนจูเกตที่เจือจาง 1:2,000 หลุมละ 100

ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เติม substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตรลงในทุกหลุม ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม stop reagent หลุมละ 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ข. blocking reagent

เจือจางแอนติเจน HEA เป็น 1:200 แอนติเจน SA เป็น 1:500 และแอนติเจน DEA เป็น 1:500 แล้วเคลือบในไมโครไตเตอร์เพลต หลุมละ 100 ไมโครลิตร อบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เติม blocking reagent โดยละลาย BSA ใน PBS pH 7.4 ที่ความเข้มข้น 0%, 1%, 3% และ 5% เติม blocking reagent ที่แต่ละความเข้มข้นลงในหลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจนแต่ละชนิด หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เจือจางตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบด้วยสารเจือจางตัวอย่างตรวจเป็น 1:200 เติมตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบที่เจือจางแล้วลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลตที่เคลือบด้วยแอนติเจนแต่ละชนิดหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM สำหรับแอนติเจน HEA เติมคอนจูเกตที่เจือจาง 1:1,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนแอนติเจน SA และ DEA เติมคอนจูเกตที่เจือจาง 1:2,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG สำหรับแอนติเจน HEA เติมคอนจูเกตที่เจือจาง 1:1,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนแอนติเจน SA และ DEA เติมคอนจูเกตที่เจือจาง 1:2,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วนำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เติม substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตรลงในทุกหลุม ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม stop reagent หลุมละ 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ค. ความเข้มข้นของแอนติเจนแต่ละชนิดและความเข้มข้นของคอนจูเกตแต่ละชนิด

เจือจางแอนติเจนแต่ละชนิดเป็น 1:100 1:200 และ 1:400 แล้วเคลือบในไมโครไตเตอร์เพลต หลุมละ 100 ไมโครลิตร อบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง สำหรับแอนติเจน HEAเจือจางตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบเป็น 1:200 ด้วย PBS pH 7.4 ส่วนแอนติเจน SA และ DEA เจือจางเป็น 1:200 ด้วย 0.05% tween-20 ใน PBS pH 7.4 เติมตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบที่เจือจางแล้วลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลตที่เคลือบด้วย

แอนติเจนแต่ละชนิดหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง สำหรับแอนติเจน HEA เติมคอนจูเกตชนิด IgM และ IgG ที่เจือจาง 1:250 1:500 1:1,000 และ 1:2,000 แอนติเจนชนิด SA และ DEA เติมคอนจูเกตชนิด IgM และ IgG ที่เจือจาง 1:1,000 1:2,000 1:4,000 และ 1:8,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วนำมาล้างด้วย washing buffer 5 ครั้ง เติม substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตรลงในทุกหลุม ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม stop reagent หลุมละ 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

2.3.2.2 ศึกษาถึงความแม่นยำ

ตรวจหาค่า within-run precision โดยการตรวจตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบซ้ำอย่างละ 20 หลุม ในการทดสอบคราวเดียวกัน โดยใช้สภาวะต่างๆ และความเจือจางของน้ำยาที่เหมาะสม และตรวจหาค่า between-run precision โดยการตรวจตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบซ้ำอย่างละ 20 ครั้ง ในการทดสอบที่เวลาต่างกัน โดยใช้สภาวะต่างๆ และความเจือจางของน้ำยาที่เหมาะสม

2.3.3 การพัฒนาการตรวจวิธี IHA

2.3.3.1 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมในการเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะ (เบญจะ เพชรคล้าย, 2525)

ใช้เม็ดเลือดแดงแกะอายุ 2-14 วัน ที่เก็บใน Alsever's solution ล้างด้วย NSS 3 ครั้ง ปรับความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็น 10% ด้วย PBS pH 7.2 แล้วเติม 2.5% glutaraldyhye ปริมาตรหนึ่งในสี่ของ PBS pH 7.2 ที่เติมลงไป ผสมลงไปช้าๆ นำไปวางบนเครื่องหมุน (rotator) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย NSS 3 ครั้ง แล้วปรับให้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10%ด้วย PBS pH 7.2 ที่มี 0.1% sodium azide เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นานเป็นปี

นำ 10% เม็ดเลือดแดงแกะที่เคลือบด้วย glutaraldehyde มา 300 ไมโครลิตร ปั่นล้าง 1 ครั้ง ด้วย PBS pH 7.2 แล้วเติม PBS pH 7.2 ลงไปให้มีปริมาตรเท่าเดิม เติม tannic acid 1:20,000 ในปริมาตรเท่ากัน ผสมให้เข้ากัน นำไปอบในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วย PBS pH 6.4 แล้วปรับความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10% ด้วย PBS pH 6.4 สำหรับแอนติเจน SA เติมแอนติเจน SA ที่ไม่เจือจางหรือเจือจางเป็น 1:2 1:4 และ 1:8 ลงไปหลอดละ 50 ไมโครลิตร ส่วนแอนติเจน HEA และ DEA เติมแอนติเจนที่ไม่เจือจางลงไปหลอดละ 200 100 และ 50 ไมโครลิตร นำไปอบในอ่างน้ำ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

นาน 30 นาที ปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย PBS pH 7.2 แล้ว ปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงเป็น 0.5% ด้วย 0.5% BSA ใน PBS pH 7.2 ที่มี 0.1% sodium azide

เติม PBS pH 7.2 ปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลตหลุมที่ 3-8 เติมตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบที่เจือจางเป็น 1:25 ลงไปในหลุมที่ 1-3 หลุมละ 25 ไมโครลิตร ใช้ autopipette ผสมซีรั่มและ PBS ในหลุมที่ 3 ให้เข้ากัน แล้วถ่ายไปใส่ในหลุมที่ 4 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายไปใส่ในหลุมต่อไป ทำเช่นนี้ไปจนถึงหลุมที่ 8 จากนั้นจึงทิ้งซีรั่มที่เจือจางแล้วในหลุมที่ 8 ไป 25 ไมโครลิตร เติมเม็ดเลือดแดงที่เคลือบแอนติเจนแต่ละชนิดแล้วลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลต หลุมที่ 2-8 หลุมละ 25 ไมโครลิตร สำหรับในหลุมที่ 1 เติม 0.5% เม็ดเลือดแดงแกะที่ไม่ได้เคลือบแอนติเจน ลงไป 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเคาะเบาๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตุการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแกะ ให้คะแนน 1 ถึง 4 ตามความแรงของการจับกลุ่มของเม็ดเลือด อ่านค่าความเจือจางของหลุมสุดท้ายที่ยังมีความแรง 2+ เป็นค่าไตเตอร์

2.4 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนแต่ละชนิดด้วยวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดแอนติเจน 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมไมโครไตเตอร์เพลตชนิดโพลีสไตรีน โดยทำควบคู่กับ BSA ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ที่เจือจางให้มีปริมาณโปรตีน 0-9 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Bradford reagent 200 ไมโครลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้นาน 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัด ELISA reader เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีน คำนวณปริมาณโปรตีนในแอนติเจนแต่ละชนิดจากกราฟมาตรฐาน หากค่าการดูดกลืนแสงของแอนติเจนสูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงของค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐานในกราฟ จะต้องทำการเจือจางแอนติเจนแล้วทำการทดสอบใหม่อีกครั้ง

2.5 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacylamide Gel Electrophoresis : SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบบเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10x12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือเจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร ใช้ปริมาณเจล 4 เปอร์เซ็นต์ และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงประมาณ 7 เซนติเมตร ใช้ปริมาณเจล 12 เปอร์เซ็นต์

เตรียมแอนติเจนให้พร้อมสำหรับการทำอิเลคโตรฟอรีซิสโดยผสมแอนติเจน HEA และ SA 5 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ขณะที่ผสมแอนติเจน DEA 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 1 ส่วน และผสมโปรตีนมาตรฐานชนิดน้ำหนักโมเลกุลสูงและชนิดน้ำหนักโมเลกุลต่ำ 1 ส่วนกับกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 19 ส่วน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที หยอดโปรตีนมาตรฐานชนิดน้ำหนักโมเลกุลสูงและชนิดน้ำหนักโมเลกุลต่ำและแอนติเจนแต่ละชนิดที่ต้มแล้วลงในช่องเจล ช่องละ 20 ไมโครลิตร เปิดกระแสไฟฟ้าที่ 250 โวลต์ 15 มิลลิแอมป์ นานประมาณ 1 ชั่วโมง 20 นาที เมื่อสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่จนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟ นำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสี coomassie blue นาน 3 ชั่วโมง เทสีทิ้ง แช่เจลในน้ำยา destain I นาน 30 นาที จากนั้นแช่ในน้ำยา destain II จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน และพื้นหลังใสหรือมีสีน้อยที่สุด วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐาน แอนติเจนแต่ละชนิด และแถบสีโบรโมฟีนอลบลูในบัฟเฟอร์ตัวอย่าง คำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, Rf) ของโปรตีนมาตรฐานและแอนติเจนแต่ละชนิดจากความสัมพันธ์นี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของสีโบรโมฟีนอลบลู}}$$

เขียนกราฟระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ที่คำนวณได้ กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานบนกระดาษ semilog โดยให้น้ำหนักโมเลกุลอยู่บนแกน log และค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์อยู่บนแกน linear หาค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในแอนติเจนแต่ละชนิดจากกราฟที่เขียนได้

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ค่าเฉลี่ย (mean) $= \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n}$

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) $= \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} (X_i - \bar{X})^2}}{n}$

สัมประสิทธิ์การกระจาย (% coefficient of variant; %CV)

$= \frac{\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \times 100$

ความไว (sensitivity) $= \frac{\text{ผลบวกจริงที่อ่านได้}}{\text{ผลบวกจริงทั้งหมด}} \times 100$

ความจำเพาะ (specificity) $= \frac{\text{ผลลบจริงที่อ่านได้}}{\text{ผลลบจริงทั้งหมด}} \times 100$

ผลบวกลวง (false positive rate) $= \frac{\text{ผลบวกลวงที่อ่านได้}}{\text{ผลลบจริงทั้งหมด}} \times 100$

ผลลบลวง (false negative rate) $= \frac{\text{ผลลบลวงที่อ่านได้}}{\text{ผลบวกจริงทั้งหมด}} \times 100$

พื้นที่ใต้กราฟ receiver operating characteristic (ROC) ใช้ในการหาจุดตัดที่เหมาะสมของแต่ละการทดสอบ

หมายเหตุ

ค่าทางสถิติต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คำนวณโดยใช้โปรแกรม Statistical Packages for the Social Science release 9.05 (SPSS, Chicago, USA)