การเตรียมน้ำยาสำเร็จรูป เพื่อใช้วินิจฉัยโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่า

โดย

ปกรณ์ ไทยานันท์

คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ.2532

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

การเตรียมน้ำยาสำเร็จรูป เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่า*

ปกรณ์ ไทยานันท์ ^ วท.ม.**

งานวิจัยนี้ได้ทดลองเตรียม M.pneumoniae latex agglutination (LA) kit ขึ้นเอง โดยศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี Cold hemagglutination (CHA) และ enyzme-linked immunosorbent assay (ELISA) strip ในการหาแอนติบอดีในซีรั่มของผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่า จำนวน 100 ราย ผลที่ได้เป็นที่น่าพอใจ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธี LA กับ CHA ปรากฏว่าให้ผลตรงกันทั้งบวกและลบ 76 ราย LA ให้ผลลบ แต่ CHA ให้ผลบวก 19 ราย ซึ่งคำนวณความไวได้ 79.2% เมื่อเปรียบเทียบวิธี LA กับ ELISA strip ปรากฏว่าให้ผลตรงกันทั้งบวกและลบ 84 ราย. LA ให้ผลบวกแต่ ELISA strip ให้ผลลบ 2 ราย และ LA ให้ผลลบ แต่ ELISA strip ให้ผลบวก 14 ราย เมื่อคำนวณความไวได้ 68.9% และผลของการศึกษาความจำเพาะของวิธี LA ในคนเป็นโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช้มัยโคพลาสม่าได้แก่ ไทฟอยด์ 50 ราย, ซิฟิลิส 30 ราย, โรคบิดจากเชื้อ E.histolytica 20 ราย และในผู้บริจาคเลือด 50 ราย ปรากฏว่าวิธี LA มีความจำเพาะ 100% ในขณะที่วิธี CHA และ ELISA strip มีความจำเพาะ 94.7% และ 98.3% ตามลำดับ ฉะนั้นวิธี LA ที่เตรียมขึ้นเองนี้น่าจะนำไปใช้วินิจฉัยโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่าในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทั่ว ๆ ไปได้

---

*ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมูลนิธิสุจิณโณ พ.ศ.2530

**ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ABSTRACT

Preparation of latex kit for diagnosis of mycoplasma infection*

Pakorn Thaiyanan M.Sc**

The building up of latex agglutination (LA) kit by using M.pneumoniae antigen coated on latex particles for diagnosis of mycoplasma infection was described. The method of LA, Cold hemagglutination (CHA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) strip were used to detect mycoplasma antibody in 100 suspected mycoplasma infection sera. It was found that the LA test was highly comparative result with CHA and ELISA strip. When compared LA with CHA test, the results were agreed 76 in 100 cases while LA positive, CHA negative were 5 cases and LA negative, CHA positive were 19 cases. The sensitivity of LA test, compared with CHA, was 79.2%. In the same suspected sera, LA test was agreed with ELISA strip in 84 cases while LA positive, ELISA strip negative were 2 cases and LA negative,

---

*This work was supported by a research grant from the Sujinno Foundation.

**Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ELISA strip positive were 14 cases. The sensitivity of LA test, compared with ELISA strip, was 68.9%. In addition, the specificity of LA test was 100% when studied in non-mycoplasma infection sera; 50 salmonellosis, 30 syphilis, 20 *E.histolytica* infection and 50 blood donor. The sensitivity of CHA and ELISA strip were 94.7% and 98.3% respectively. So conclusion that mycoplasma latex kit test is one of the more sensitive and practical method used for the *in vitro* detection of specific mycoplasma antibody.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมูลนิธิสุจิณโณ ที่ได้จัดสรรทุนเพื่อการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณบุคคลต่อไปนี้ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้งานวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คุณยุพิน สุคิริวัฒนนนท์ เป็นผู้ช่วยทำงานวิจัยและเก็บตัวอย่างซีรั่มอีกเป็นจำนวนมาก

ผศ.ดร.สุวณี สุภเวชย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้เอื้อเฟื้อตัวเชื้อ M.pneumoniae และสอนเทคนิคการเลี้ยงเชื้อให้ด้วย

อ.ดร.นิมิตร มรกต ภาควิชาปาราสิต ที่ได้เอื้อเฟื้อซีรั่มของผู้ป่วย E.histolytica infection

นายสมทบ พาจรทิศ ที่ได้ช่วยพิมพ์งานตั้งแต่เริ่มขอทุนวิจัยจนถึงรายงานฉบับสมบูรณ์

สุดท้ายขอขอบคุณ คณะเทคนิคการแพทย์ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัยตลอดจนสารเคมีอีกหลายชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
ชื่อเรื่อง	ก
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
รายการรูปและตารางประกอบ	ช
บทนำ	1
วัสดุและวิธีการ	7
ผลการทดลอง	12
วิจารณ์	24
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก (Appendix)	32
ประวัติการศึกษาและประสบการณ์	37

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการรูปและตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 การ titration เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ M.pneumoniae antigen สำหรับเคลือบเม็ด latex 15

ตารางที่ 2 แสดงความไวของ LA เทียบกับ ELISA strip 16

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะของ LA กับซีรั่มโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ mycoplasma infection 16

ตารางที่ 4 แสดงความคงตัวของ M.pneumoniae coated latex 17

ตารางที่ 5 แสดงความเชื่อถือได้ของ M.pneumoniae coated latex 17

ตารางที่ 6 M.pneumoniae antigen titration สำหรับ ELISA strip 18

ตารางที่ 7 Peroxidase conjugated antihuman gamma globulin titration 18

ตารางที่ 8 Tested serum titration 19

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบวิธี CHA กับ LA 19

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบวิธี CHA กับ ELISA strip 20

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบวิธี LA กับ ELISA strip 20

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบวิธี CHA, LA และ ELISA strip 21

รูปที่ 1 แสดงการเกิดและไม่เกิด agglutination 22

รูปที่ 2 แสดงความเข้มข้นของสีที่เกิดจาก ELISA strip 23

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทนำ

โรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่า (mycoplasma infection) หรือชื่อเดิมเรียกว่าโรค primary atypical pneumonia สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ Mycoplasma pneumoniae เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่ง ซึ่งมีขนาดเล็กมาก จนสามารถผ่านกระดาษกรองที่ใช้กรองเชื้อแบคทีเรียทั่ว ๆ ไปได้ ในกลุ่มของเชื้อ mycoplasma มีอยู่ด้วยกันมากกว่า 60 ชนิด ทำให้เกิดโรคได้ทั้งในคน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก แมลง และพืช บางชนิดก็ไม่ทำให้เกิดโรคเลย ดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างอิสระ ทั้งในน้ำและในดิน ลักษณะเฉพาะของเชื้อมัยโคพลาสม่าคือ ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) มีขนาดเล็กกว่าแบคทีเรียเล็กน้อย ขนาดยาว 0.1-0.3 um เนื่องจากเป็นเชื้อที่ไม่มีผนังเซลล์นี้เองจึงทำให้มีรูปร่างไม่แน่นอน(pleomorphic) สามารถเจริญได้บนอาหารสังเคราะห์ ให้ colony ขนาดเล็ก 0.05-2 มม. เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า จะเห็น colony เหมือนกับไข่ดาว (fried egg). Colony บางที่จมลึกเข้าไปในเนื้อวุ้นด้วย การเจริญเติบโตช้ากว่าเชื้อแบคทีเรียมาก 7-10 วัน จึงจะมองเห็นรูปร่างของ colony มีสารเคมีอยู่หลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมัยโคพลาสม่า แต่มันก็สามารถเจริญได้ในอาหารที่มียา penicillin, amphotericin B และ thallium acetate ซึ่งมักจะใช้ยาเหล่านี้ยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่น ๆ เนื่องจากเชื้อมัยโคพลาสม่าเป็นเชื้อที่เจริญได้ยาก (fastidious) จึงต้องการอาหารที่อุดมสมบูรณ์มาก เช่นต้องมีโปรตีนรวมทั้ง amino acid และ peptide เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงยังต้องควบคุมความเป็นกรด-ด่าง, บรรยากาศ และอุณหภูมิอีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>รูปร่างลักษณะ (morphology)</u>

เชื้อมัยโคพลาสม่ามีรูปร่างค่อนข้างยาวเล็กน้อย (filament) ขนาด 0.1-2.0 um (1) มีความสามารถเคลื่อนที่ได้ มี neuraminic acid receptor ที่จะจับกับ host cell membrane ได้ การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ต้องการซีรั่มและส่วนประกอบของยีสท์ทำขนมปังชนิดที่ทนต่อความร้อนเลี้ยงไว้ ที่อุณหภูมิ 35°-37°ซ ภายใน 7-10 วัน จะให้ colony ขนาด 10-100 um. รูปร่างเหมือนไข่ดาว ถ้าเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว จะไม่เห็นความขุ่นของอาหารทั้ง ๆ ที่มีเชื้อเจริญอยู่ ต้องสังเกตจากการเปลี่ยนสีของ indicator (จากแดงเป็นเหลือง)

<u>อาการทางคลินิค</u>

อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ <u>M.pneumoniae</u> ไม่ค่อยแน่นอน อาจจะไม่แสดงอาการเลย หรือมีอาการเพียงเล็กน้อยของทางเดินของลมหายใจส่วนบน จนกระทั่งถึงอาการปอดบวม อาการของโรคจะค่อยเป็นค่อยไปตามลำดับ เป็นเล็กน้อย ปานกลาง และรุนแรง คนไข้จะมาหาแพทย์ด้วยอาการของหลอดลมส่วนล่าง เนื่องจากจะพบจุดในปอดด้วย X-ray ก่อนจะแสดงอาการอื่น ๆ หลังจากได้รับเชื้อ 2-4 สัปดาห์ คนไข้จะเริ่มมีอาการคอแห้ง ไอแห้ง ๆ ปวดศีรษะ คลั่นเนื้อคลั่นตัว เมื่อเป็นนาน ๆ ไอมีเสมหะด้วย อาการของปอดบวมจะเป็นอยู่ประมาณ 4-6 สัปดาห์ แล้วจะค่อย ๆ หายไป โรคมักจะไม่ลุกลามไปยังอวัยวะอื่น ๆ โอกาสที่จะทำให้ถึงตายมีน้อยมาก ส่วนใหญ่มักจะเป็นในเด็กอายุระหว่าง 5-15 ปี (1)

<u>ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น</u>

Membrane glycolipid เป็น antigenic determinant ที่สำคัญที่กระตุ้นร่างกายให้สร้างแอนติบอดี แอนติบอดีชนิด IgM เกิดขึ้นก่อนแล้วตามด้วย IgG ซึ่งตรวจพบได้ด้วยวิธี Complement Fixation (CF), Growth Inhibi-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

tion (GI) หรือ Cell lysis เมื่อมี complement แต่แอนติบอดีในซีรั่มนี้ไม่สามารถป้องกันร่างกายต่อการติดเชื้อได้ ถึงแม้ว่าจะตรวจพบแอนติบอดีอยู่ในร่างกายก็ตาม แต่ก็ยังติดเชื้อได้ แอนติบอดีชนิด IgA สามารถตรวจพบได้ใน respiratory secretion และดูเหมือนว่าจะมีความสำคัญต่อการป้องกันการติดเชื้อนี้ นอกจากนี้ยังตรวจพบ cell-mediated immunity ด้วย เช่น skin test, lymphocyte transformation, inhibition ของ macrophage migration (2)

<u>การระบาด</u>

โรคปอดบวมที่เกิดจากเชื้อ <u>M.pnemoniae</u> มีการระบาดทั้งแบบ endemic และ epidemic และเกิดได้ทุกฤดูกาล แต่จะมีระบาดมากในช่วงฤดูฝน การติดต่อจากคนหนึ่งไปอีกคนหนึ่งโดยฝอยน้ำลาย (drop-let infection) มักเกิดกับเด็กอายุ 5-15 ปี และพบน้อยในเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี (3) และมักระบาดในโรงเรียน แล้วติดต่อมาระบาดในครอบครัวอีกทีหนึ่ง

<u>การรักษาและการป้องกัน</u>

ยา tetracycline และ erythromycin ใช้ได้ผลดีมากในการรักษาโรคปอดบวมจากเชื้อ <u>M.pneumoniae</u> การป้องกันโรคโดยการฉีดวัคซีนก็ใช้ได้ค่อนข้างดี จากการทดลองฉีดวัคซีนชนิด inactivated <u>M.pneumoniae</u> สามารถป้องกันได้ 45-67% ถ้าฉีดด้วยวัคซีนชนิดตัวเป็นน่าจะให้ผลดีกว่านี้ แต่อย่างไรก็ตาม ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นอาจจะไปมีผลต่อร่างกายของเราเองก็ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ</u>

การวินิจฉัยการติดเชื้อมัยโคพลาสม่าอาจทำได้โดยการแยกเชื้อจาก nasopharyngeal secretion และโดยการหาแอนติบอดี การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารชนิดแข็ง เพื่อดูลักษณะ fried egg colony นั้น อาจเกิดการผิดพลาดได้ เนื่องจากเชื้อชนิดอื่นที่เป็น L-form ก็ให้ fried egg colony เหมือนกัน ถ้าจะให้ได้ผลที่ specific ขึ้นต้องทำวิธี growth inhibition โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง แล้วแปะติดด้วย paper disk ที่มี specific antibody อยู่ด้วย จะเห็นลักษณะ clear zone รอบ ๆ disk แต่ถ้าต้องการให้ได้ผลเร็วขึ้น ทำได้ด้วยวิธี direct immunofluorescence โดยย้อมด้วย specific antibody ที่ conjugate กับสีเรืองแสง fluorescein การวินิจฉัยโดยอาศัยวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา โดยตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้นนั้นอาจทำได้หลายวิธีดังนี้

1. Cold hemagglutination (CHA) เป็นวิธีเริ่มแรกที่ใช้วินิจฉัยโรค primary atypical pneumonia ที่เกิดจากเชื้อ M.pneumoniae (1) โดยการเจือจางซีรั่มผู้ป่วยแล้วผสมกับเม็ดเลือดแดงของคน เก็บไว้ที่ 4°ซ ข้ามคืน ดูการเกิด hemagglutination และการเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงนี้จะแยกออกจากกันเมื่อนำไปอบไว้ที่ 37°ซ ปรากฏการณ์นี้เกิดจากแอนติบอดีชนิด IgM (4) ทำปฏิกิริยากับ I-antigen บนผิวของเม็ดเลือดแดง (5,6) การหาระดับแอนติบอดีได้สูงขึ้นระหว่าง onset และ convalescent เป็น 4 เท่า ถือว่ามีนัยสำคัญ (significant) การตรวจหาแอนติบอดีเพียงครั้งเดียวถ้าได้ระดับ titer 32 ก็คือว่ามีนัยสำคัญ (7)

การหาระดับ cold hemagglutinins ช่วยในการวินิจฉัยโรคได้มาก เพราะจะได้ titer สูงในช่วง 1-2 สัปดาห์แรกของการเป็นโรคและจะหายไปในราวสัปดาห์ที่ 6 อย่างไรก็ตาม cold hemagglutinins จะสูงเพียง 50% ของผู้ป่วยติดเชื้อมัยโคพลาสม่าเท่านั้น การที่ไม่พบ cold hemagglutinins ไม่ได้หมายความว่าไม่เป็นโรค นอกจากนั้นยังพบ cold hemagglutinins ได้ในคน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นโรคชนิดอื่น ๆ อีกด้วยเช่น adenovirus, RS virus และ parainfluenza virus เป็นต้น (8) แต่ส่วนใหญ่แล้ว cold hemagglutinins ที่เกิดจากเชื้อชนิดอื่น ๆ มักมี titer ต่ำกว่า 32

2. Complement fixation (CF) เป็นวิธีมาตรฐานและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง (9) โดยการเจือจางซีรั่มแล้วผสมกับ 2 หน่วยของคอมพลีเมนต์ และ 4 หน่วยของแอนติเจน เก็บไว้ที่ 4°ซ ข้ามคืน แล้วจึงเติม hemolytic system หลังจากแสดงอาการของโรคได้ 2-3 สัปดาห์ ก็จะตรวจพบ CF antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีทั้งชนิด IgG และ IgM แอนติบอดีนี้จะคงอยู่ต่อไปได้อีก 6-12 เดือน (10) เช่นเดียวกับวิธีทางน้ำเหลืองวิทยาอื่น ๆ การหา rising titer ได้ 4 เท่าหรือมากกว่านับว่ามีความสำคัญมาก ถ้าเป็น single serum ต้องได้ titer มากกว่า 32 จึงจะถือว่ามีนัยสำคัญหรืออาจจะหา IgM antibody ก็ได้ การ treat serum ก่อนด้วย 2-mercaptoethanol (2-ME) แล้วดูว่ามีระดับแอนติบอดีลดลงเท่าไร (11) วิธี CF นี้ถ้าใช้แอนติเจนที่เป็น glycolipid ของตัวเชื้อ M.pneumoniae ซึ่งเตรียมได้โดยการต้มตัวเชื้อที่ 100°ซ 10 นาที ในน้ำเกลือปกติ จะช่วยลดปัญหาของ anticomplementary ลงไปได้ ถ้าเตรียมแอนติเจนด้วยวิธี chloroform-methanol extraction จะได้แอนติเจนที่ specific มากยิ่งขึ้น (12)

3. Indirect hemagglutination (13) โดยใช้สารเคมีเป็นตัวช่วยจับแอนติเจนให้ติดบนเม็ดเลือดแดง เช่น glutaraldehyde, tannic acid, bis-diazotized benzidene เป็นต้น วิธีนี้มีความไวสูงกว่าวิธี CF แต่ยังมีข้อเสียที่เม็ดเลือดแดงนั้นเก็บได้ไม่นาน และยังมีแอนติเจนอื่น ๆ บนเม็ดเลือดแดงด้วย เช่น heterophile antigen เป็นต้น ใช้เวลาอย่างน้อย 2 ชม. จึงจะอ่านผลการทดลองได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. Latex agglutination (14) การเตรียมแอนติเจนโดยการ extract ตัวเชื้อแล้วนำมาเคลือบบน polystyrene latex particle แล้วนำไปหาระดับของแอนติบอดีในซีรั่มของผู้ป่วย วิธีนี้มีความไวกว่าวิธี CF และมีความจำเพาะ (specificity) สูงกว่าวิธี indirect hemagglutination เนื่องจากบนเม็ด latex ไม่มีแอนติเจนอื่นใดอยู่เลยและคงตัวดีกว่าเม็ดเลือดแดง วิธีนี้นับวันก็จะมีการพัฒนาให้มีคุณภาพสูงขึ้นเรื่อย ๆ เพราะทำได้ง่าย และอ่านผลได้เร็วเพียง 2 นาทีก็อ่านผลได้สำหรับวิธี slide agglutination

นอกจาก 4 วิธีที่กล่าวมาแล้วนี้ ยังมีวิธีทางน้ำเหลืองวิทยาอีกหลายวิธีที่ใช้วินิจฉัยโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่า เช่น growth inhibition, indirect immunofluorescence, counter immunodiffusion (15) ปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคมัยโคพลาสม่า คือวิธี cold hemagglutination และ CF test โดยเฉพาะวิธี cold hemagglutination จะเป็น screening test และ CF เป็น confirm test ทั้ง 2 วิธีนี้ก็มีข้อเสียอยู่ในตัวของมัน เช่นวิธี cold hemagglutination มีความจำเพาะต่ำ ในคนเป็นโรคอื่น ๆ ก็ให้ titer สูงได้ สำหรับวิธี CF นั้น วิธีทำยุ่งยากมาก แอนติเจนและซีรั่มคนไข้บางครั้งมี anticomplementary ทำให้ผลที่ได้ผิดพลาดได้ และยังมีความไวต่ำอีกด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะพัฒนาวิธีที่ทำได้ง่าย ๆ และมีความไวสูงอันได้แก่วิธี ELISA strip และ latex agglutination โดยทำเปรียบเทียบกับวิธี cold hemagglutination

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัสดุและวิธีการ

ซีรั่ม

ได้จากผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่าที่ส่งมาตรวจ cold hemagglutinins ยังห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 100 ราย ปั่นแยกซีรั่มหลังจากเลือดแข็งตัวดีแล้ว ซีรั่มถ้ายังไม่ได้ตรวจในวันนั้นก็เก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ หลังจากตรวจ cold hemagglutinins แล้วเก็บซีรั่มไว้ที่ -20°ซ จนกว่าจะนำออกมาทดสอบด้วยวิธี latex agglutination และ ELISA strip

ซีรั่มของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อ Widal test (titer O ≥ 80, H ≥ 160) จำนวน 50 ราย ซีรั่มของผู้ป่วยโรคซิฟิลิส titer > 8 จำนวน 30 ราย จากหน่วยปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซีรั่มของผู้ป่วยที่เป็นโรค E.histolytica infection, titer ≥ 640 จำนวน 20 ราย จากภาควิชาปาราสิต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซีรั่มของคนปกติที่มาบริจาคเลือดที่หน่วยธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 50 ราย

ซีรั่มทั้งหมดนี้เก็บไว้ที่ -20°ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้

การเตรียม M.pneumoniae antigen (20)

เชื้อ M.pneumoniae ได้รับจาก ผศ.ดร.สุวณี สุภเวชย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เลี้ยงเชื้อใน mycoplasma broth (Gibco Laboratories Cat. No.M39600) (Appendix 1) อบไว้ที่ 37°ซ ใน CO_2 incubator เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว ใช้ sterile swab จุ่มเชื้อจาก broth ไป streak ลงบน mycoplasma agar (Gibco Laboratories Cat. No.M 39600) (Appendix 2,3) อบเชื้อไว้ที่ 37°ซ ใน CO_2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

incubator นาน 14 วัน เมื่อครบเวลาใช้ sterile normal saline ใส่ลงใน agar plate 2-3 มล. แล้วใช้ swab ขูด colony ของเชื้อออกมารวมกันไว้ แล้วนำไป sonicate ด้วยเครื่อง sonicator (B.Braun Melsungen AG, Model 1510, USA) ที่ 400 W นาน 2 นาที 3 ครั้ง นำไป dialyse กับน้ำเกลือปกติ แล้วนำไปทำให้เข้มข้นด้วยวิธี lyophilization แบ่งเก็บไว้ที่ -20°ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้

<u>วิธีเคลือบ M.pneumoniae แอนติเจนบนเม็ด latex</u>

จากแอนติเจนที่เตรียมได้นำมาเจือจางด้วย glycine buffer pH 8.2 (Appendix 4) แล้วนำมาผสมกับ latex และ glycine buffer pH 8.2 ในปริมาตรที่เท่ากัน นำไป rotate ที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง rotator ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. นำมาปั่นล้างด้วย glycine buffer 2 ครั้ง สุดท้ายละลายใน glycine buffer pH 8.2 ที่มี 0.5% bovine serum albumin (BSA) ผสมอยู่ด้วย ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ latex ประมาณ 10% suspension

<u>วิธีทำ Slide latex agglutination</u>

หยดซีรั่มที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่นสไลด์พื้นดำที่ใช้ทำ rheumatoid factor test 1 หยด แล้วหยด antigen coated latex ลงไป 1 หยด ควนให้ผสมกันด้วยไม้จิ้มฟัน พร้อมกับขยายวงกลมออกไปให้เกือบเต็มหลุม แล้วยกแผ่นสไลด์ขึ้นมาเอียงไปมาอีกเป็นเวลา 2 นาที อ่านผลโดยดูการจับกลุ่มของ latex particle แล้วเกรดเป็น 1^+, 2^+, 3^+ และ 4^+ ตามขนาดของการจับกลุ่ม ต้องเกิด agglutination 1^+ จึงจะถือว่าให้ผลบวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบความไว (sensitivity) ของ latex agglutination

Antigen coated latex ที่เตรียมได้นำไปทดสอบความไว โดยการเจือจางซีรั่มที่ให้ผลบวกต่อ cold hemagglutinins เป็น 1:10, 1:20, 1:40.....1:1280 นำแต่ละ dilution มาทดสอบด้วยวิธี latex agglutination และ ELISA strip

การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ latex agglutination

โดยนำ antigen coated latex ที่เตรียมได้ไปทดสอบกับซีรั่มอื่น ๆ ที่ไม่ใช่โรค mycoplasma infection อันได้แก่ salmonellosis, syphilis, E.histolytica infection และซีรั่มคนปกติจากธนาคารเลือด

การทดสอบความคงตัว (stability) ของ latex agglutination

โดยนำ antigen coated latex เก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ ในแต่ละสัปดาห์นำออกมาทดสอบกับซีรั่มที่ให้ผลบวกและลบ โดยแบ่งเก็บซีรั่มไว้ที่ -80°ซ

การทดสอบความเชื่อถือ (reliability or reproducibility)

โดยเก็บซีรั่มที่ให้ผลบวก (3+) แบ่งใส่หลอดเล็ก ๆ เก็บไว้ที่ -80°ซ ในวันที่ 0, 3 และ 7 นำออกมาทดสอบกับ antigen coated latex ครั้งละ 5 หลอด

วิธีทำ ELISA strip

จากแอนติเจนของเชื้อ M.pneumoniae ที่เตรียมได้ นำมาเจือจางใน coating buffer ทำ titration จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว จึงนำมาหยดบนแผ่นพลาสติกที่ใช้ label ชื่อต้นกุหลาบหรือกล้วยไม้ โดยใช้ดินสอ wax เขียนวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มม. 7 วง ต่อหนึ่งแผ่น strip ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอนติเจน 10 ul หยดลงในแต่ละวงกลม ปล่อยให้แห้ง เก็บไว้ที่ -20°ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้

เจือจางซีรั่มที่ต้องการทดสอบ 160 เท่า ด้วย phosphate buffer (PBS) 0.15 M, pH 7.2 (Appendix 5) ใช้ 10 ul. หยดลงในหลุมบน strip กระจายให้เต็มหลุม อบไว้ในที่ชื้น 37°ซ นาน 30 นาที แล้วนำออกมาล้างด้วยน้ำก๊อก และ PBS ที่มี tween 0.05% ซับขอบ ๆ หลุมให้แห้งด้วยกระดาษทิสชู ใส่ 10 ul ของ antihuman gamma globulin ที่ conjugate ด้วย peroxidase enzyme (1:2,000) อบไว้ในที่ชื้น 37°ซ นาน 30 นาที นำออกมาล้างเหมือนที่กล่าวมา แล้วเติม O-phenylene diamine (OPD) ลงไปในทุกหลุม ๆ ละ 10 ul. อ่านผลเมื่อครบเวลา 3 นาที โดยดูสีเหลืองแดงที่เกิดขึ้น เกรดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็น 1^+, 2^+, 3^+ และ 4^+ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสี 1^+ จึงจะถือว่าให้ผลบวก

<u>วิธีทำ cold hemagglutination (16)</u>

เตรียมหลอดแก้วขนาด 10 x 75 มม. 10 หลอด เรียงไว้ใน rack ใส่น้ำเกลือปกติในหลอดแรก 1.5 มล. และ 1.0 มล. ในหลอดที่ 2 ถึง 10 เติม 0.5 มล. ของซีรั่มผู้ป่วยลงในหลอดแรก ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดมา 1.0 มล. ใส่ในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน ดูดมาใส่ในหลอดที่ 3, 1.0 มล. และทำต่อ ๆ ไปจนถึงหลอดที่ 9 และดูทิ้งไป 1.0 มล. ส่วนหลอดที่ 10 ไม่ต้องใส่ซีรั่ม ซึ่งใช้เป็นหลอดควบคุม จากวิธีการเจือจางซีรั่มแบบนี้จะได้ dilution 1:4 จนถึง 1:1024 แล้วเติม 0.1 มล. ของ 2% human O-cell ลงในทุก ๆ หลอด ยก rack ขึ้นมาเขย่าแรง ๆ แล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4°ซ ข้ามคืน การอ่านผลอ่านทันทีหลังนำ rack ออกจากตู้เย็น โดยยกหลอดแก้วหลอดที่ 1 เขย่าเบา ๆ ให้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดอยู่ที่ก้นหลอดหลุดลอยขึ้นมา ถ้าเม็ดเลือดแดงเกาะติดกันเป็นก้อนเขย่าไม่แตก แสดงว่าให้ผลบวก เขย่าอย่างนี้กับหลอดต่อ ๆ ไปจนถึงหลอดสุดท้ายที่ยังให้ผลบวกถือเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

end-point จดค่า titer ที่ได้ไว้ แล้วนำ rack ไปไว้ที่อ่างน้ำอุ่น 37°ซ, 2 ชม. แล้วนำมาอ่านผลอีกครั้ง ถ้าเป็น cold hemagglutinins จริง ค่า titer จะกลับกลายเป็นศูนย์ ถ้า titer ไม่หายไป แสดงว่าไม่ใช่ cold hemagglutinins

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ M.pneumoniae antigen สำหรับเคลือบบนเม็ด latex โดยเจือจางแอนติเจนให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่าที่ไม่เจือจางเลย เกิดปฏิกิริยา agglutination กับ standard positive serum และ positive serum ได้ดีที่สุด และไม่เกิดปฏิกิริยากับซีรั่มลบ และ buffer (ตารางที่ 1) และได้ใช้ที่ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาต่อ ๆ ไป

การทดสอบความไวของ M.pneumoniae antigen coated latex โดยทดสอบเทียบกับ ELISA strip โดยเจือจาง standard positive serum เป็น 1:10, 1:20, 1:40.....1:1280 แล้วนำแต่ละ dilution มาทดสอบกับ latex และ ELISA ผลปรากฏว่า latex agglutination (LA) ให้ผลบวกที่ 1:10 เท่านั้น นอกนั้นให้ผลลบทั้งหมด ส่วน ELISA strip ให้ผลบวกถึงที่ 1:320 (ตารางที่ 2) ในขณะที่ CHA ให้ผลบวกที่ 1:80

การทดสอบความจำเพาะของ M.pneumoniae antigen coated latex โดยทดสอบกับซีรั่มของผู้ป่วย Salmonellosis 50 ราย, syphilis 30 ราย, E.histolytica 20 ราย และซีรั่มจากผู้บริจาคเลือด 50 ราย ผลปรากฏว่าให้ผลลบ ทั้งหมด (ตารางที่ 3)

การทดสอบความคงตัวของ M.pneumoniae antigen coated latex โดยทดสอบกับซีรั่มบวกและลบ ที่เก็บไว้ที่ -80°ซ ผลปรากฏว่าในช่วงเวลา 5 สัปดาห์ ผลยังไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเลย

ผลการทดสอบความเชื้อถือของวิธีทดลอง โดยนำซีรั่มที่เก็บไว้ที่ -80°ซ มาทดสอบกับ antigen coated latex ครั้งละ 5 หลอด ผลปรากฏว่าในวันที่ 0, 3 และ 7 ให้ผล 3+ เท่ากันทั้งหมด (ตารางที่ 5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการ titration M.pneumoniae antigen สำหรับ ELISA strip ได้ความเข้มข้นที่ 1:20 ที่ใช้แอนติเจนน้อยที่สุด และให้ความเข้มของสีสูงสุด (ตารางที่ 6) และได้ใช้ความเข้มข้นนี้สำหรับการ titration ครั้งต่อ ๆ ไป

ผลการ titration เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ peroxidase conjugated antihuman gamma globulin ได้ความเข้มข้นที่ 1:2,000 ให้ความเข้มของสีที่เห็นได้ชัดเจน และไม่เกิด false positive (ตารางที่ 7) และได้ใช้ที่ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาต่อ ๆ ไป

ผลการ titration เพื่อหาความเหมาะสมของ tested serum โดยทดสอบกับซีรั่มที่ positive ต่อ CHA test ที่ titer ต่าง ๆ กัน ผลปรากฏว่า serum dilution 1:160 ให้ผลบวกต่อ positive serum (titer > 160) และให้ผลลบต่อ negative serum (titer < 16) (ตารางที่ 8) จึงเลือกใช้ที่ serum dilution 1:160 สำหรับทำการทดลองต่อไป

การเปรียบเทียบระหว่างวิธี CHA กับวิธี LA ในการตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่มผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่า จำนวน 100 ราย ปรากฏว่าให้ผลตรงกันทั้งบวกและลบ ($CHA^{+,-}/LA^{+,-}$) 76 ราย, CHA ให้ผลบวก แต่ LA ให้ผลลบ (CHA^{+}/LA^{-}) จำนวน 19 ราย และ CHA ให้ผลลบ ในขณะที่ LA ให้ผลบวก (CHA^{-}/LA^{+}) จำนวน 5 ราย (ตารางที่ 9, รูปที่ 1) เมื่อคำนวณหาค่าความไวของวิธี LA เทียบกับ CHA ได้ 79.2% (Appendix 7)

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธี CHA กับวิธี ELISA strip ในการตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่มผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่า จำนวน 100 ราย ปรากฏว่าให้ผลตรงกัน 89 ราย CHA ให้ผลบวกในขณะที่ ELISA ให้ผลลบ 6 ราย และ CHA ให้ผลลบ ในขณะที่ ELISA ให้ผลบวก 5 ราย (ตารางที่ 10) เมื่อคำนวณหาค่าความไวของวิธี ELISA เทียบกับ CHA ได้ 91.2%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเปรียบเทียบระหว่างวิธี LA กับวิธี ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่มผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่า จำนวน 100 ราย ปรากฏว่าให้ผลตรงกัน 84 ราย LA ให้ผลบวก ส่วน ELISA ให้ผลลบ 2 ราย และ LA ให้ผลลบ ในขณะที่ ELISA ให้ผลบวก 14 ราย (ตารางที่ 11, รูปที่ 2) เมื่อคำนวณหาค่าความไวของวิธี LA เทียบกับวิธี ELISA ได้ 68.9%

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธี CHA, LA และ ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ M.pneumoniae ในซีรั่มของคนที่เป็นโรคอื่น ๆ นอกเหนือจาก mycoplasma infection ปรากฏว่าวิธี CHA ให้ผลบวกปลอม (false positive) 5 ราย กับ Salmonellosis 1 ราย กับโรคซิฟิลิส และ 2 ราย กับผู้ที่มาบริจาคเลือด คิดเป็น 5.3% วิธี ELISA ให้ผลบวกปลอมกับ Salmonelle 1 ราย กับผู้บริจาคเลือดอีก 1 ราย คิดเป็น 1.3% สำหรับวิธี LA ไม่ให้ผลบวกปลอมเลย (ตารางที่ 12) เมื่อคำนวณหาค่าความจำเพาะ (Appendix 7) ของวิธี CHA, ELISA strip และ LA ได้ดังนี้ 94.7%, 98.7% และ 100% ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 การ titration เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *M.pneumoniae* antigen สำหรับเคลือบบนเม็ด latex

ความเข้มข้นของแอนติเจน (dilution)	Standard positive serum*	CHA positive serum (1:256)	CHA negative serum	Glycine buffer
1	3+	3+	0	0
1:2	2+	2+	0	0
1:4	wp	1+	0	0
1:8	0	0	0	0
1:16	0	0	0	0

* ซื้อจากบริษัท Wellcome, England, titer = 32

wp = weakly positive

3+, 2+, 1+ = ความแรงของปฏิกิริยา agglutination

0 = negative agglutination

CHA = cold hemagglutinins

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 แสดงความไวของ latex agglutination (LA) เทียบกับ ELISA strip

test	dilution of standard positive serum							
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
La	+	-	-	-	-	-	-	-
ELISA strip	+	+	+	+	+	+	-	-
CHA	+	+	+	+	-	-	-	-

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะของ latex agglutination (LA) กับซีรั่มโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ mycoplasma infection

Other diseases	จำนวน	latex agglutination (LA)	
		Positive	Negative
Salmonellosis	50	0	50
Syphilis	30	0	30
E.hist	20	0	20
Normal blood bank	50	0	50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 แสดงความคงตัวของ M.pneumoniae coated latex โดยเก็บไว้ที่ 4°ซ

Serum	สัปดาห์ที่					
	0	1	2	3	4	5
Positive	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Negative	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 5 แสดงความเชื่อถือได้ของ M.pneumoniae coated latex

Tested Serum 5 ตัวอย่าง	วันที่		
	0	3	7
Positive 3+	5/5	5/5	5/5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 M.pneumoniae antigen titration สำหรับ ELISA strip โดยคงที่ซีรั่มที่ 1:10 และ conjugated antiglobulin ที่ 1:2,000

Serum	Ag dilution					
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Positive	4+	4+	3+	2+	1+	0
Negative	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 Peroxidase conjugated antihuman gamma globulin titration โดยคงที่แอนติเจนที่ 1:20 และ tested serum ที่ 1:10

Tested Serum	Conjugated antiglobulin dilution				
	1:500	1:1000	1:2000	1:3000	1:4000
Positive	4+	4+	3+	2+	1+
Negative	2+	1+	0	0	0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 Tested serum titration โดยคงที่แอนติเจนที่ 1:20 และ conjugated antiglobulin ที่ 1:2,000

CHA positive serum		tested serum dilution					
No.	titer	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
1	4	3+	2+	1+	wp	wp	0
2	8	3+	2+	1+	wp	0	0
3	16	3+	3+	2+	1+	wp	0
4	16	3+	2+	1+	wp	wp	0
5	32	4+	4+	4+	4+	3+	2+
6	128	4+	4+	4+	4+	3+	3+

wp = weakly positive

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบวิธี CHA กับ LA ในการตรวจซีรั่มผู้ที่สงสัยว่าจะติดเชื้อมัยโคพลาสม่า

Total	CHA−/LA+	CHA+,−/LA+,−	CHA+/LA−
100	5	76	19

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบวิธี CHA กับ ELISA ในการตรวจชีรั่มผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่า

Total	$CHA^-/ELISA^+$	$CHA^{+,-}/ELISA^{+,-}$	$CHA^+/ELISA^-$
100	8	89	3

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบวิธี LA กับ ELISA ในการตรวจชีรั่มผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่า

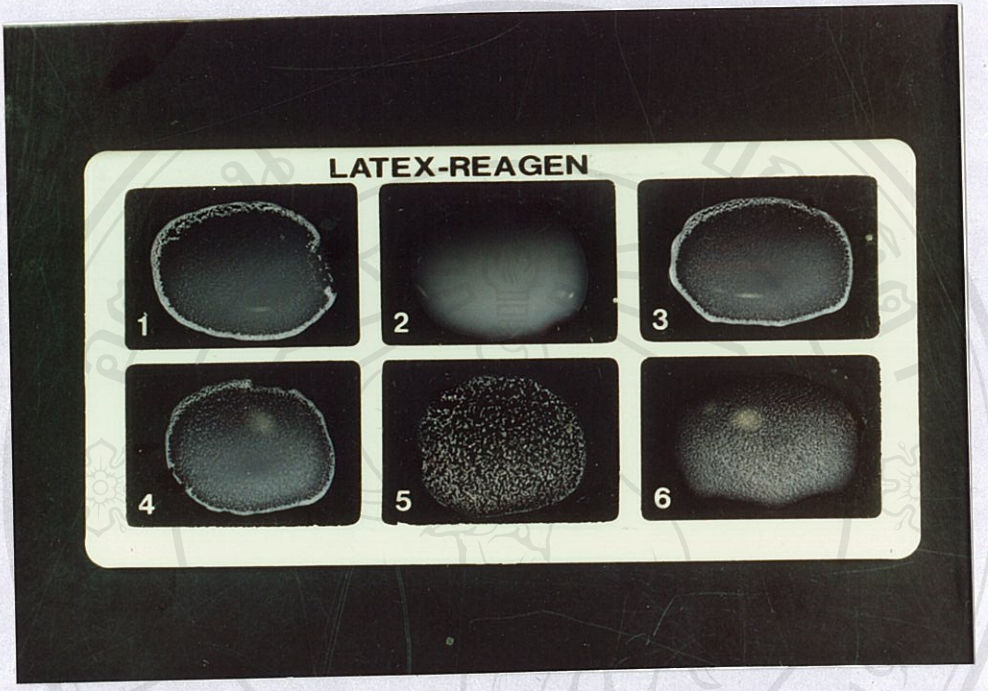
Total	$LA^-/ELISA^+$	$LA^{+,-}/ELISA^{+,-}$	$LA^+/ELISA^-$
100	14	84	2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบวิธี CHA, LA และ ELISA ในการตรวจรีรัมของผู้ที่เป็นโรคอื่น ๆ และคนปกติ

Other diseases	Total	No. of false positive reaction		
		CHA	LA	ELISA
Salmonellosis	50	5	0	1
Syphilis	30	1	0	0
E.histolyฯica	20	0	0	0
Blood Donor	50	2	0	1
Total	150	8	0	2
%	-	5.3	0	1.3

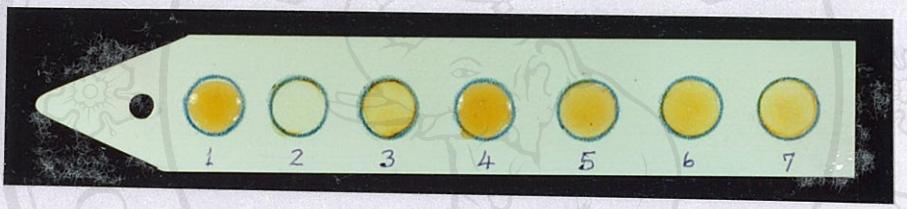
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1 แสดงการเกิดและไม่เกิด agglutination

1. positive control
2. negative control
3. 4^+ agglutination
4. 3^+ agglutination
5. 2^+ agglutination
6. 1^+ agglutination

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



<u>รูปที่</u> 2 แสดงความเข้มของสีที่เกิดจาก ELISA strip

1. positive control
2. negative control
3. reading control (1+)
4. unknown serum positive 4+
5. unknown serum positive 3+
6. unknown serum positive 2+
7. unknown serum positive 1+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิจารณ์

วิธี latex agglutination (LA) เป็นวิธีที่พัฒนามาเพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจนที่เป็นสารละลาย (soluble) หรือสารที่มีขนาดเล็กมาก ๆ และหาปริมาณของแอนติบอดีก็ได้ นับว่าวิธี LA จะถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการมากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีวิธีทำที่ง่ายมาก โดยเฉพาะวิธี slide test ใช้เวลาแค่ 2-3 นาที เท่านั้น และ latex เป็นสารที่ inert มากเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดง และมีความไวสูงกว่าวิธี agar-gell diffusion, complement fixation (CF) และ growth inhibition test สำหรับวินิจฉัยการติดเชื้อมัยโคพลาสม่า (14) และน่าจะให้ความจำเพาะสูงกว่าวิธี cold hemagglutination (CHA) เนื่องจากแอนติเจนที่นำมาเคลือบบนเม็ด latex particle (LP) นั้นเป็นส่วนประกอบของตัวเชื้อ M.pneumoniae จริง ๆ ในขณะที่วิธี CHA นั้นเป็นการหา cold hemagglutinins ซึ่งเป็นการหา non-specific antibodies ต่อ I-antigen บนเม็ดเลือดแดง (5,6)

สำหรับวิธี ELISA strip นั้นเป็นวิธีที่ดัดแปลงวิธี ELISA โดยทั่ว ๆ ไปเพียงเล็กน้อย เพื่อให้เหมาะสมกับหน่วยงานที่มีเครื่องมือไม่เพียงพอ ไม่ต้องใช้เครื่องวัดแสง (spectophotometer) อ่านด้วยตาเปล่าได้เลย แน่นอนความแม่นยำนั้นสู้อ่านด้วยเครื่องไม่ได้ จึงถือว่าวิธี ELISA strip นั้นเป็น screening test

การทำ M.pneumoniae titration เพื่อใช้เคลือบบนเม็ดลาเทคนั้นจริง ๆ แล้วต้องทำ titration สำหรับ reagent ชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น pH ของบัฟเฟอร์, อุณหภูมิ, เวลา เป็นต้น แต่เนื่องจาก M.pneumoniae antigen ที่เตรียมได้นี้มีปริมาณน้อยมาก และมีค่าใช้จ่ายสูง ในการเตรียมจึงต้องอาศัยความรู้ที่ได้จากการเคลือบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (pseudomonas) มาใช้เคลือบในครั้งนี้ ผลของการ titration จึงได้ปฏิกิริยายังไม่สูงสุด คือเมื่อทดสอบกับซีรั่มมาตร-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฐานให้ปฏิกิริยาสูงสุดเพียง 3+ (ตารางที่ 1) ถ้าจะให้ได้ reaction สูงกว่านี้ ต้องเพิ่มความเข้มข้นของแอนติเจนให้มากกว่านี้ หรือหา condition ที่เหมาะสมอื่น ๆ ด้วย

การปั่นล้าง coated LP ผู้วิจัยคิดว่ามีความจำเป็นมาก เพราะเป็นการกำจัดแอนติเจนส่วนเกินออกไป ซึ่งจะทำให้มีความไวสูงขึ้น แต่ Morton H.E. (14) บอกว่าการปั่นล้างไม่มีความจำเป็น ล้างหรือไม่ล้างความไวเท่ากัน ตามความเห็นของผู้วิจัยถ้าไม่ปั่นล้างก็ต้อง titrate แอนติเจนให้พอเหมาะเมื่อเคลือบบนเม็ดลาเทคแล้วต้องไม่เหลือส่วนเกินเลย สำหรับการทดลองครั้งนี้ได้ปั่นล้าง 2 ครั้ง ซึ่งก็เพียงพอแล้ว และได้ใส่ bovine serum albumin (BSA) ลงไปด้วย เพื่อรักษาความคงตัว และป้องกันการเกิด autoagglutination แต่ถ้าใส่ BSA มากเกินไปก็จะไปลดความไวลงได้ หรืออาจจะไม่เกิดปฏิกิริยาให้เห็นเลย

การทดสอบเพื่อหาความไวของวิธี LA เทียบกับ ELISA และ CHA จากซีรั่มเดียวกัน ได้ไตเตอร์ 10, 320 และ 80 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) นั่นหมายความว่าวิธี ELISA มีความไวสูงสุด หรือคิดเป็น 32 เท่าของ LA และ CHA มีความไว 8 เท่า ของ LA (ตารางที่ 2) ซึ่งก็ใกล้เคียงกับการตรวจหาแอนติบอดีชนิดอื่นที่วิธี hemagglutination มีความไวสูงกว่าวิธี agglutination ประมาณ 10 เท่า (17) อย่างไรก็ตามวิธี agglutination ก็ยังมีความไวสูงกว่าวิธี CF 10 เท่า (17)

จากการหาความจำเพาะ (specificity) ของ LA ที่เตรียมขึ้นมานั้น พบว่าวิธี LA ไม่ทำปฏิกิริยากับซีรั่มของผู้ที่เป็นโรคอื่น ๆ เลย นั่นคือมีความจำเพาะ 100% (ตารางที่ 3) แต่ทั้งนี้อาจเกิดจาก LA ที่เตรียมได้ยังมี potency ต่ำไป จึงไม่เกิดปฏิกิริยาให้เห็นกับโรคอื่น ๆ จากการทดลองของ Morton H.E. (14) บอกว่า latex particle suspension เปล่า ๆ ไม่ได้เคลือบด้วยแอนติเจน สามารถเกิด agglutination กับซีรั่มของผู้ป่วย rheumatoid arthritis ได้ถึง 10%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลของการหาความคงตัวของ coated latex particle โดยเก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ ในช่วงเวลา 5 สัปดาห์ activity ยังไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากมีเวลาจำกัดจึงเก็บไว้ได้นานเท่านี้ คิดว่าจริง ๆ แล้วน่าจะเก็บไว้ได้นานกว่านี้ Morton H.E. (14) เก็บ PPLO-latex particle ไว้ที่ 4°ซ นาน 70 วัน โดย activity ไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Magwood (18) แต่ถ้าเก็บไว้นานถึง 127 วัน จะเกิด autogagglutination

การทดสอบความเชื่อถือได้ (reliability or reproducibility) ของ coated latex particle ที่เตรียมได้ โดยทดสอบ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 ตัวอย่าง ผลได้เท่ากันทั้งหมด แสดงว่าในการทำการทดลองแต่ละครั้งของวิธี LA ไม่มี variation แต่ถ้าจะให้ได้ผลน่าเชื่อถือมากกว่านี้ต้องทำจำนวนครั้งให้มากกว่านี้

การทำ titration เพื่อหาความเข้มข้นที่พอเหมาะของแอนติเจนสำหรับทำ ELISA strip นั้น เลือกใช้ที่ความเข้มข้น 1:20 เพราะเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่เกิดปฏิกิริยาชัดเจนที่สุด (4+) (ตารางที่ 6) ส่วนความเข้มข้นของ peroxidase conjugated นั้นเลือกใช้ที่ 1:2000 เพราะที่ 1:1000 negative serum ให้ผล 1+ จึงใช้ไม่ได้ หรือที่ 1:3000 ก็เกิดปฏิกิริยาน้อยเกินไป (2+) (ตารางที่ 7) ในตารางที่ 8 เป็นการ titration เพื่อความเหมาะสมของ tested serum โดยเลือกซีรั่มที่ให้ผลบวกต่อ CHA ระดับต่าง ๆ กันไทเตอร์ระหว่าง 4-128 ที่ serum dilution 1:160 (แถวตั้งที่ 2 จากขวามือ) ให้ผลที่สามารถแยกซีรั่มลบ (titer < 16) กับซีรั่มบวก (titer > 32) ออกจากกันได้ชัดเจน จึงเลือกใช้การเจือจางซีรั่ม 160 เท่า ตลอดการทดลองครั้งนี้

การทำ ELISA strip นั้นจำเป็นต้องมี control ร่วมด้วยเสมอ ทั้ง positive, reading (1+) และ negative control โดยเฉพาะ reading control โดยใช้ซีรั่มที่ให้ผล end point ที่ 1+ ซึ่งจะใช้เป็นตัวเทียบสี ถ้าซีรั่มรายใดให้สีที่เข้มเท่าหรือมากกว่า reading control ถือว่าให้ผลบวก ถ้ารายใด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้สีน้อยกว่าหรือไม่เกิดสีเลยถือว่าให้ผลลบ ข้อเสียอย่างหนึ่งของ ELISA strip คือต้องอ่านผลภายใน 2-3 นาที หลังจากใส่ substrate เพราะเวลานานกว่า 3 นาที แล้วสีจะเข้มขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้อ่านผลผิดได้ ฉะนั้นในการทำครั้งละมากๆ ก่อนใส่ substrate ควรแบ่งเป็นชุดๆ ละประมาณ 3-4 strip หลังใส่ substrate แล้ว อ่านผล แล้วค่อยไปทำชุดต่อไป

จากผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธี CHA และ LA ปรากฏว่าวิธี LA ให้ผลตรงกับ CHA หรือเหนือกว่า 81% มีอยู่ 19 ราย ที่ LA ให้ผลต่ำกว่า CHA (ตารางที่ 9) ในจำนวนนี้อาจมีบางรายที่มีระดับแอนติบอดีสูง ๆ แต่เกิดปฏิกิริยาต่ำหรือไม่เกิดเลยก็ได้ ซึ่งเป็นผลมาจาก prozone effect (19) และวิธี CHA นั้นให้ผลที่จำเพาะสำหรับ M.pneumoniae infection เพียง 55% (5) ฉะนั้นวิธี LA ให้ผล 81% เมื่อเทียบกับ CHA ก็นับเป็นที่น่าพอใจแล้ว

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธี CHA กับ ELISA strip ปรากฏว่าวิธี ELISA strip ให้ผลตรงกันหรือเหนือกว่าวิธี CHA 97% (ตารางที่ 10) แสดงว่าวิธี ELISA strip มีความไวสูงกว่าวิธี CHA เพราะว่าวิธี CHA$^-$ แต่ ELISA$^+$ มี 8 ราย ในขณะที่ CHA$^+$ แต่ ELISA$^-$ มี 3 ราย อย่างไรก็ตามถือผลของทั้งสองวิธีนี้ใกล้เคียงกันมาก จริง ๆ แล้ววิธี ELISA น่าจะให้ผลบวกมากกว่านี้ แต่เนื่องจากซีรั่มที่เก็บไว้ที่ -20°ซ นั้นได้ freeze-thaw หลายครั้ง อาจทำให้ซีรั่มบางรายให้ผลลบทั้ง ๆ ที่น่าจะให้ผลบวก

เมื่อเปรียบเทียบวิธี LA กับ ELISA strip แสดงว่าวิธี ELISA strip มีความไวสูงกว่าวิธี LA โดยพิจารณาที่ ELISA$^+$/LA$^-$ มี 14 ราย ในขณะที่ LA$^+$/ELISA$^-$ มี 2 ราย (ตารางที่ 11)

ในการทดลองซีรั่มของผู้ป่วยที่เป็นโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เกิดจากการติดเชื้อมัยโคพลาสม่า และในคนปกติ จะเห็นว่าวิธี CHA มีผลบวกปลอม (false positive) มากที่สุด (5.3%) รองลงมาได้แก่วิธี ELISA ให้ผลบวกปลอม 1.3% ส่วนวิธี LA ไม่มีผลบวกปลอมเลย (ตารางที่ 12) ทั้งนี้อาจเนื่องจากวิธี LA ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมขึ้นมาครั้งนี้มีความไวต่ำไปจึงไม่สามารถตรวจพบผลบวกปลอม อย่างไรก็ตาม แอนติบอดีต่อเชื้อมัยโคพลาสม่าในคนปกติก็พบได้เช่นกัน (21)

กล่าวโดยสรุปแล้วทั้งวิธี LA และ ELISA strip สามารถนำไปทดสอบ เพื่อการวินิจฉัยโรคได้ สำหรับวิธี LA ยังต้องศึกษาต่อไปในเรื่องของความคงตัว จะเก็บไว้ได้นานเท่าไรโดยที่ activity ไม่ลดและไม่เกิด autoagglutination สำหรับวิธี ELISA strip นั้น สิ่งที่น่าจะต้องปรับปรุงต่อไปคือการหยุดปฏิกิริยาการเกิดสี หลังใส่ substrate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

1. Balows, A and Hansler, W. : Diagnostic procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic infections. 6th. ed. American Public Health Association, Inc. New York. USA. 511-526, 1981.
2. Davis, B.D., Dulbeco, T., Eisen, H.N., and Ginsberg, H.S., : Microbiology 3rd. ed. Harper Internation Edition. Pennsylvania. USA. 791-793, 1980.
3. Chanock, R.M., Hayflick, L., and Barile, M.F. : Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and it identification as PPLO. Proc. Natl. Acad. Sci. 48 : 41-49, 1962.
4. Moffet, H.L. : Clinical Microbiology. 2nd. ed. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. USA. 155-159, 1980.
5. Vyas, G.N., Stites, D.N., and Brecher, G. : Laboratory Diagnosis of Immunologic Disorders. Grune & Strattion. New York. USA. p. 148, 1974.
6. Janney, F.A., Lu, L.T., and Howe, C. : Cold agglutinin cross-reaction with Mycoplasma pneumoniae. Infect. Immun, 22:29-32, 1978.
7. Davidsohn, I., and Henry, J.B. : Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. 15th. ed. W.B. Suanders Company. Philadelphia. USA. p.1228, 1974.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8. Sussman, S.J., Magoffin, R.L., Lennette, E.H., and Schieble, J. : Cold hemagglutinins, Eaton agent, and respiratory infections of children. Pediatrics, 38 : 571-577, 1966.

9. Foy, H.M. : Epidemiology of Mycoplasma pneumoniae infection families J.A.M.A., 197 : 859, 1966.

10. Fernald, G.W., Clyde, W.A.Jr., and Denny, F.W. : Nature of the immune response to Mycoplasma pneumoniae. J. Immunol, 98 : 1028-1038, 1967.

11. Emmons, J., Schluederberg, A., and Cordero, L. : An aid to the rapid diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections. J. Infect. Dis, 119 : 650-653, 1969.

12. Kenney, G.E., and Grayston, J.T. : Eaton PPLO (Mycoplasma pneumoniae) complement fixing antigen; extraction with organic solvents. J.Immunol. 95 : 19-25, 1965.

13. Lam, G.T., and Morton, H.E. : Stable mycoplasma antigen preparations for indirect hemagglutination tests. Am. Soc. Microbiol., 27 : 356-359, 1974.

14. Morton, H.E., : Mycoplasma-latex agglutination reaction. J. Bacteriol., 92 : 1196-1205, 1966.

15. Menonna, J., Chmel, H., Menegus, M., Dowling, P., and Cook, S. : Precipitating antibodies in mycoplasma infection. J. Clin. Microbiol., 5 : 610-612, 1977.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16. Bryant, N.J. : Laboratory immunology and serology revised ed. W.B. Suanders Company, Philadelphia, USA. p.116-118, 1979.

17. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., and Wood, W.B. Jr. : Microbiology. 2nd ed. Harper & How, Publishers, Inc. Maryland. USA. p.394, 1973.

18. Magwood, S.E., and Annau, E. : The adsorption of somatic antigens of sallonella by polystyrene latex particles. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci, 25 : 69-73, 1961.

19. Singer, J.M., Altmann, G., Oreskes, I., and Plotz, C.M. : The mechanism of particulate carrier reactions III. The stabilizing effect of serum proteins. Am. J. Med., 30 : 772-778, 1961.

20. Neimark, H. : Glutaraldehyde-fixed erythrocytes for indirect hemagglutination with mycoplasma. Nature. 219 : 293-294, 1968.

21. Millian, S.J., and Spigland, I. : Antibodies for mycoplasmas in normal individuals and patients with neoplasias. Cancer 19 : 1820-1824, 1966.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Appendix

1. Mycoplasma Broth

Mycoplasma broth W/O crystal violet	17	g
Distilled water	350	ml.

boil to dissolve, adjust pH to 6.0, autoclave, let stand to cool and then add..

Horse serum	100	ml.
25% yeast extract	50	ml.
Penicillin G 100,000 u/ml	5	ml.
Amphotericin B 5,000 ug/ml	0.5	ml.
0.1% phenol red	10	ml.
10% Glucose	5	ml.

2. Mycoplasma Agar

Mycoplasma agar	17	g
Distilled water	350	ml.

boil to dissolve, autoclave, let stand to coll to 50°C and then add....

Horse serum	100	ml.
25% yeast extract	50	ml.
Penicillin G 100,000 u/ml	5	ml.
Amphotericin B 5,000 ug/ml	0.5	ml.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. Yeast extract

Dry yeast	125	g
Deminerized H_2O	500	ml.

ต้มน้ำให้เดือด แล้วค่อย ๆ โรยผงยีสท์ลงไป ต้มต่อไปอีก 3-5 นาที ปล่อยให้เย็น แล้วนำไป freeze-thaw 3 ครั้ง ปั่นเอา supernatant มาปรับ pH ให้ได้ 7.6-7.8, autoclave ที่ 110 p/10 min

4. 0.1 M Glycine buffer, pH 8.2

Glycine	7.51	g
NaCl	8.5	g
NaH_3	1.0	g

ปรับ pH ให้ได้ 8.2 ด้วย 1N NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml

5. 0.15 M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2

NaCl	8.0	g
KCl	0.2	g
KH_2PO_4	0.2	g
Na_2HPO_4	1.15	g
H_2O to	1000	ml.

6. ELISA strip reagents

Stock OPD

OPD	800	mg.
Absolute ethanol	100	ml.

ใส่ในขวดสีชา ใช้ได้ภายใน 5 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Working OPD

Stock OPD	1	ml.
Citrate Buffer	19	ml.
30% H_2O_2	10	ml.

Citrate buffer, pH 5.2

Citric acid. H_2O	4.9	g
Na_2HPO_4	7.3	g
H_2O to	1,000	ml.

Coating buffer, pH 9.6

Na_2CO_3	15.9	g
$NaHCO_3$	29.5	g
NaN_3	2.0	g
H_2O to	1,000	ml.

7. วิธีคำนวณเพื่อหาค่าความไว (Sensitivity)

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{True positive}}{\text{Total disease present}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{\# Sensitivity of LA vs CHA} = \frac{48-10}{48} \times 100$$

$$= \frac{38}{48} \times 100$$

$$= 79.2\%$$

$$\text{\# Sensitivity of LA vs ELISA} = \frac{61-19}{61} \times 100$$

$$= \frac{42}{61} \times 100$$

$$= 68.9\%$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{\# Sensitivity of ELISA vs CHA} = \frac{57-5}{57} \times 100$$

$$= \frac{52}{57} \times 100$$

$$= 91.2\%$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติและประสบการณ์ของผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปกรณ์ ไทยานันท์

เกิด วันที่ 4 ตุลาคม 2493

ที่ทำงาน ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษา วท.ม. ปี 2519 คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

วท.บ. ปี 2517 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประสบการณ์การทำงาน

อาจารย์ประจำภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2519 จนถึงปัจจุบัน

อาจารย์พิเศษภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาจารย์พิเศษคณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาจารย์พิเศษวิทยาลัยพลศึกษาเชียงใหม่

ประสบการณ์ทางวิชาการ

ได้รับรางวัลชมเชยในการประกวดงานวิจัยของสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2521 งานวิจัยที่ส่งเข้าประกวด เรื่อง "ไรคพิษสุนัขบ้า"

ปัจจุบันทำงานวิจัยด้าน Serodiagnosis โดยเฉพาะทางด้าน latex egglutination

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved