การเลือกหาวัสดุเพื่อใช้แทนเม็ดลาเท็ค

โดย

ปกรณ์ ไทยานันท์

คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ.2536

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

การเลือกหาวัสดุอื่นเพื่อใช้แทนเม็ดลาเท็ค*

ปกรณ์ ไทยานันท์ วท.ม **

งานวิจัยนี้ได้ทดลองนำวัสดุบางชนิดมาทดแทนเม็ดลาเท็คเพื่อใช้ทำ agglutination test วัสดุที่นำมาศึกษา 13 ชนิด ได้แก่ ถ่านหุงข้าว, ถ่านกะลา, ถ่านแกลบ, ถ่านกัมมันต์, ถ่านกระดูก, ปูนขาว, ปูนปลาสเตอร์, แป้งฝุ่น, kaolin, ดินสอพอง, ทราย, ถ่านเม็ดถั่วเหลือง และเม็ดพลาสติก นำวัสดุแต่ละชนิดมาบดด้วยครกจนละเอียดเป็นอนุภาค (1-3 ไมครอน) แล้วเคลือบด้วยแอนติเจน 3 ชนิด คือ globulin, polysaccharide และ DNA หลังจากเคลือบแล้วนำไปทดสอบกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ เพื่อทดสอบว่ามีแอนติเจนติดอยู่บนอนุภาคของวัสดุเหล่านั้นหรือไม่ พบว่าอนุภาคของวัสดุที่เคลือบติดได้ดีกับทั้ง 3 แอนติเจน ได้แก่ ถ่านหุงข้าว, ถ่านกะลา, ถ่านแกลบ, และถ่านกัมมันต์ นอกจากนี้ polysaccharide ยังเคลือบติดได้เล็กน้อยกับปูนขาว, kaolin, ดินสอพอง และถ่านกระดูก เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของแอนติเจนที่เคลือบติดอยู่บนอนุภาคของวัสดุแต่ละชนิด พบว่า globulin เคลือบติดได้ดีมากกับอนุภาคของถ่านหุงข้าว และถ่านกะลา polysaccharide เคลือบติดได้ดีมากกับถ่านแกลบและถ่านกัมมันต์ และ DNA เคลือบติดได้ดีมากกับอนุภาคของถ่านกัมมันต์

ในการศึกษาถึงความไว, ความจำเพาะ และความคงตัวของ globulin ที่เคลือบบนอนุภาคของถ่านหุงข้าว, polysaccharide ที่เคลือบบนอนุภาคถ่านหุงข้าว และ DNA ที่เคลือบบนอนุภาคถ่านกัมมันต์โดยนำไปทดสอบกับซีรัมของคนที่เป็นโรคต่างๆ จำนวนทั้งหมด 134 ราย ประกอบด้วย โรครูมาตอยด์ 13 ราย, โรคไทฟอยด์ 20 ราย, โรค SLE 10 ราย, โรคซิฟิลิส 20 ราย, โรคติดเชื้อ E.histolytica 6 ราย และไวรัสตับอักเสบชนิดบี 15 ราย และซีรัมของคนปกติอีก 50 ราย พบว่า globulin-ถ่านหุงข้าว ให้ผลบวกทั้งหมดกับซีรัมของคนที่เป็นโรครูมาตอยด์ (13 ราย) และอีก 1 ราย (บวกน้อยๆ) กับซีรัมของคนปกติ ที่เหลือให้ผลลบทั้งหมด (120 ราย) polysaccharide-ถ่านหุงข้าว ให้ผลบวกทั้งหมดกับซีรัมของที่เป็นโรคไทฟอยด์ (20 ราย) และให้ผลลบทั้งหมดกับซีรัมที่เหลือ (114 ราย) DNA-ถ่านกัมมันต์ ให้ผลบวกทั้งหมดกับซีรัมของคนที่เป็นโรค SLE

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(10 ราย) และอีก 1 ราย (2+) กับคนที่เป็นโรครูมาตอยด์ ที่เหลือให้ผลลบทั้งหมด (123 ราย) ซึ่งเมื่อคำนวณหาค่าความจำเพาะได้เท่ากับ 99%, 100% และ 99% ตามลำดับ ส่วนค่าความไวได้เท่ากับ 100% ทั้งหมด และความคงตัวของ globulin-ด่านหุงข้าว, polysaccharide-ด่านหุงข้าวและ DNA-ด่านกัมมันต์ เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นอยู่ได้นาน 5 เดือน, มากกว่า 7 เดือน และ 4 เดือน ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

---

* ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2535

** ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ABSTRACT

Using of other materials for substitution of latex particle*

Pakorn Thaiyanan, M.Sc**

This study proposed to select other materials for substitution of latex particle in agglutination test. Thirteen materials were studied i.e. wood charcoal, coconut shell charcoal, rice shell charcoal, activated charcoal, bone charcoal, rock ash, pasteur clay, perfumed powder, kaolin, white clay, sand bead, soy bean charcoal and plastic bead. Each material was ground by mortar for very small particle approximately 1-3 microns in diameter and then coated with three antigens (globulin, polysaccharide and DNA). The antigen-coated particles were tested for coating efficiency with corresponding antibodies i.e. antiglobulin from rheumatoid arthritis sera, anti-polysaccharide (anti-O antigen) from typhoid sera and anti-DNA from SLE sera, respectively. It was found that the three antigens were able to coat on wood, coconut shell, rice shell and activated charcoals and small amount of polysaccharide on rock ash, kaolin, white clay and bone charcoal. The globulin was best coated on wood and coconut charcoals, whereas polysaccharide best on rice shell and activated charcoals and DNA best on activated charcoal.

In the studies of sensitivity, specificity and stability of globulin coated on wood charcoal, polysaccharide coated on wood charcoal and DNA coated on activated charcoal, they were tested against 13 rheumatoid sera, 20 typhoid sera, 10 SLE sera, 20 syphilis sera, 6 E.histolytica infection sera and 15 viral

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

hepatitis B infection sera and 50 normal sera. It was found that globulin-wood charcoal gave positive reaction with all rheumatoid sera (13 cases) only one weakly positive with normal sera and all negative with other non-specific sera (120 cases). The polysaccharide-wood charcoal was positive with all typhoid sera (20 cases) and negative for all other sera (114 cases). The DNA-activated charcoal was positive with all SLE sera (10 cases), 1 positive (2^+) with rheumatoid serum but all negative with other non-specific sera (123 cases). With statistical calculation, the specificity of globulin-wood charcoal, polysaccharide-wood charcoal and DNA-activated charcoal were 99%, 100% and 99%, respectively and 100% sensitivity for all materials. Finally, the globulin-wood charcoal, polysaccharide-wood charcoal and DNA-activated charcoal stored in refrigerator (4^oC) were stable for 5 months, more than 7 months and 4 months, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

---

* This work was supported by a research grant from Chiang Mai University, year 1992.

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

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้จัดสรรทุนให้เพื่อการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา หน่วยปฏิบัติการกลาง และเจ้าหน้าที่หน่วยธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้เอื้อเฟื้อซีรัมเพื่อใช้ทำวิจัยในครั้งนี้ คุณนีลุบล ชมภูธิราช ที่ได้ช่วยพิมพ์งานตั้งแต่เริ่มขอทุนวิจัยจนถึงรายงานฉบับสมบูรณ์และนายวิสูตร ไชยวรศิลป์ ที่ได้ช่วยธรเนียวและเข้าเล่มรายงานฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายขอขอบคุณภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
ชื่อเรื่อง	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ง
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
รายการตารางประกอบ	ซ
บทนำ	1
วัสดุและวิธีการ	3
ผลการทดลอง	8
วิจารณ์	18
สรุป	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	26
ประวัติการศึกษาและประสบการณ์	27

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการและตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงผลการเคลือบ globulin, polysaccharide และ DNA บนวัสดุชนิดต่างๆ	11
ตารางที่ 2	แสดงผลของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ globulin สำหรับเคลือบบนอนุภาคถ่านหุงข้าว, ถ่านกะลา, ถ่านแกลบและถ่านกัมมันต์ โดยทำการทดสอบกับ RA positive serum (4^+)	12
ตารางที่ 3	แสดงผลของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ polysaccharide สำหรับเคลือบบนอนุภาคต่างๆ โดยทดสอบกับ anti-*salmonella typhi* (O-Ab = 80)	13
ตารางที่ 4	แสดงผลของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DNA สำหรับเคลือบบนอนุภาคของถ่าน 4 ชนิด โดยทดสอบกับ anti-DNA serum	14
ตารางที่ 5	แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของอนุภาคถ่านหุงข้าวที่เคลือบด้วย globulin, polysaccharide และถ่านกัมมันต์ที่เคลือบด้วย DNA	15
ตารางที่ 6	แสดงการเปรียบเทียบค่าความจำเพาะและความไวของ globulin ที่เคลือบบนอนุภาคถ่านหุงข้าว, polysaccharide ที่เคลือบบนถ่านหุงข้าว และ DNA ที่เคลือบบนถ่านกัมมันต์	16
ตารางที่ 7	แสดงค่าความไว (แบบ quantitative) ของ globulin, polysaccharide และ DNA ที่เคลือบบนอนุภาคถ่าน	17

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทนำ

การวินิจฉัยโรคโดยอาศัยวิธีทางภูมิคุ้มกันนั้นมีอยู่หลายวิธี เช่นวิธี precipitation, agglutination, complement-fixation, immunofluorescence, enzyme-linked immunoassay (ELISA), radioimmunoassay (RIA)[1,2,3] แต่ละวิธีก็มีข้อเด่นข้อด้อยอยู่ในตัว ยกตัวอย่างเช่น วิธี RIA มีข้อเด่นคือ มีความไว (sensitivity) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีที่กล่าวมาทั้งหมด (2) แต่มีข้อด้อยคือ ต้องใช้สารรังสีซึ่งอาจมีอันตรายต่อสุขภาพได้ และยังต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง วิธี ELISA มีความไวสูงใกล้เคียงกับวิธี RIA[4] ใช้ enzyme แทนสารรังสีซึ่งไม่มีอันตราย แต่วิธีทำยุ่งยาก และต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญสูงจึงจะให้ผลที่ถูกต้องแน่นอน และก็ยังมีราคาแพงเช่นเดียวกัน วิธีที่ทำได้ง่าย เครื่องมือราคาถูก และอ่านผลได้เร็วที่สุดคือ วิธี agglutination วิธีนี้ถึงแม้จะมีความไวไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับวิธี ELISA และ RIA แต่ก็เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน

ในห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา วิธี agglutination ที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ latex agglutination โดยอาจจะใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีก็ได้ไปเคลือบไว้บนเม็ดลาเท็ค (latex particle) เพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดี และแอนติเจนตามลำดับ เช่น การตรวจหา HCG เพื่อการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ ใช้วิธี latex agglutination inhibition[5] การตรวจหา rheumatoid factor ใช้วิธี passive latex agglutination[6] เป็นต้น การใช้ latex agglutination นั้นทำการทดลองบนแผ่นสไลด์ เพียงแต่หยดซีรัมที่ต้องการตรวจ 1 หยด และเติมลาเท็คที่เคลือบด้วยแอนติเจน 1 หยด คนด้วยไม้จิ้มฟัน 2 นาที ก็อ่านผลได้แล้ว จะเห็นได้ว่าวิธี latex agglutination นั้นมีข้อดีอยู่หลายประการ มีข้อเสียอยู่เพียงอย่างเดียวคือ ราคาแพง โดยประมาณแล้ว 1 หยดของลาเท็คที่เคลือบไว้ด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดีจะมีราคาไม่ต่ำกว่า 20 บาท ฉะนั้นวิธี latex agglutination จึงถูกจำกัดอยู่แค่เพียงการตรวจหาแบบคุณภาพ (qualitative) คือตรวจหาเพียงเพื่อต้องการผลว่าบวกหรือลบเท่านั้น อันที่จริงจะใช้ตรวจแบบปริมาณ (quantitative) คือการตรวจเพื่อหา titer ก็ทำได้ แต่จะต้องใช้ลาเท็คประมาณ 10 หยดต่อรายจึงทำให้ต้นทุนต่อ test สูงไม่น้อยกว่า 200 บาท

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะเลือกหาวัสดุอื่นๆ อะไรก็ได้ที่สามารถนำมาทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้เป็นอนุภาคเล็กๆ ขนาดประมาณ 1-3 ไมครอนได้ แล้วทดลองเคลือบด้วยแอนติเจนที่เป็นโปรตีน (human gamma globulin), คาร์โบไฮเดรต (polysaccharide จากเชื้อ salmonella typhi) และ DNA (จากเม็ดเลือดขาวของม้ามหมู) แล้วนำไปทดสอบกับแอนติบอดีต่อแอนติเจนนั้นๆ โดยศึกษาว่าอนุภาคของวัสดุใดสามารถจับกับแอนติเจนที่กล่าวมาแล้วได้ดี เมื่อทดสอบกับแอนติบอดีก็จะให้ไตเตอร์ (titer) สูง นั่นคือมีความไวสูงนั่นเอง และศึกษาความจำเพาะของแต่ละแอนติเจนที่นำมาเคลือบ โดยทดสอบกับซีรัมของคนที่เป็นโรคอื่นที่ไม่ใช่ rheumatoid arthritis, typhoid และ systemic lupus erythematosus (SLE) ตามลำดับ รวมทั้งทดสอบกับซีรัมของคนปกติด้วย สุดท้ายทดสอบความคงตัว (stability) โดยทดสอบว่าจะสามารถเก็บไว้ได้นานเท่าไรโดยไม่เสียความไว และความจำเพาะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัสดุและวิธีการ

ซีรัม

ซีรัมของผู้ที่เป็นโรค rheumatoid arthritis 13 ราย เลือกจากซีรัมของผู้ที่ให้ผลบวกต่อ rheumatoid factor test ตั้งแต่ 1+ ขึ้นไป ตรวจโดยวิธี passive latex agglutination

ซีรัมของผู้ที่เป็นโรคไทฟอยด์ 20 ราย เลือกจากซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ Widal test, O-titer ตั้งแต่ 80 ขึ้นไป

ซีรัมของผู้ที่เป็นโรค SLE 10 ราย เลือกจากซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ antinuclear antibodies (ANA) โดยวิธี indirect immunofluorescence

ซีรัมของผู้ที่เป็นโรคซิฟิลิส 20 ราย เลือกได้จากซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ VDRL test ไตเตอร์ตั้งแต่ 8 ขึ้นไป

ซีรัมทั้ง 4 รายการนี้ได้จากหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา งานปฏิบัติการกลาง คณะแพทย-ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ซีรัมของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี 15 ราย ซึ่งให้ผลบวกต่อ HBsAg โดยวิธี ELISA และซีรัมของคนปกติ 50 ราย ได้รับจากหน่วยธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ซีรัมของผู้ที่ติดเชื้อ E.histolytica 6 ราย ซึ่งให้ผลบวกต่อวิธี passive hemagglutination ไตเตอร์ตั้งแต่ 640 ขึ้นไป ได้รับจากภาควิชาปาราสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัสดุ

วัสดุที่นามาศึกษาได้แก่ ถ่านหุงข้าว, ถ่านแกลบ, ถ่านกะลามะพร้าว, ถ่านกัมมันต์ (activated charcoal), ถ่านกระดูก, ปูนขาว, ปูนพลาสเตอร์, ดินสอพอง, kaolin, แป้งทาตัว, ทราย, ถ่านจากเม็ดถั่วเหลืองและเม็ดพลาสติก

วิธีบดวัสดุให้เป็นอนุภาคเล็กๆ

นาวัสดุแต่ละชนิดมาตาในครกหิน (ครกอ่างศิลา) จนละเอียดเป็นผง เติมน้ากลั่นลงไป 2 ส่วน เพื่อกันการเป็นฝุ่นละออง บดในครกต่อไปจนมีขนาดเล็กที่สุดเท่าที่จะทาได้ นาอนุภาคที่ได้ไปละลายในน้ากลั่นปริมาตรประมาณ 10 เท่า คนให้เข้ากันให้ดี ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที เทน้าส่วนบนเก็บรวมไว้ในภาชนะใบที่สอง นาอนุภาคด้านในภาชนะใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่สองนี้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้ได้ขนาดประมาณ 1-3 ไมครอน (1 ไมครอน ขนาดประมาณ 1 เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียชนิดกลม) ถ้าได้ขนาดใหญ่เกินไปให้นำไปบดใหม่ทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆ จนได้อนุภาคขนาดประมาณ 1-3 ไมครอน เมื่อได้อนุภาคขนาดตามที่ต้องการแล้ว นำมาละลายในน้ำกลั่นอีกครั้งให้ได้ปริมาตรประมาณ 10 เท่าหรือมากกว่าก็ได้ ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วเทน้ำส่วนบนทิ้งไปเพื่อกำจัดวัสดุที่มีอนุภาคเล็กเกินไป (ที่ไม่ตกตะกอน) เติมน้ำกลั่นลงไปอีกประมาณ 10 เท่า คนให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 1,500 rpm นาน 5 นาที ดูดน้ำใสๆ ส่วนบนทิ้งไป สุดท้ายนำอนุภาคที่ได้มาละลายให้เป็น 10% ใน glycine buffer pH 8.2 (ภาคผนวก 1)

การเตรียม gamma globulin[7]

ใช้ซีรัมของคนปกติ (จากผู้บริจาคเลือด) หลายๆ คนมารวมกันให้ได้ 50 มล. นำมาตกตะกอน gamma globulin ด้วย Na_2SO_4 จำนวน 9 กรัม (18%) คนด้วยเครื่อง magnatic stirrer จนกระทั่งเกลือละลายหมดแล้วคนต่อไปอีก 30 นาที เพื่อให้ globulin ตกตะกอนสมบูรณ์ นำไปปั่นที่ 1000 g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทน้ำใสส่วนบนทิ้งไป นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น 30 มล. แล้วตกตะกอนซ้ำอีกด้วย 4.2 กรัม (14%) Na_2SO_4 ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง สุดท้ายนำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น 30 มล.

นำ globulin ที่เตรียมได้มากำจัด albumin ออกด้วย DEAE-cellulose โดยใช้ DEAE-cellulose 65 กรัม (dry weight) ละลายในน้ำกลั่น 350 มล. คนให้เข้ากัน แช่ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ดูดน้ำใสๆ ส่วนบนทิ้งไป ชั่ง DEAE-cellulose มา 250 กรัม (wet weight) ผสมกับ globulin 30 มล. คนทุก 10 นาที เป็นเวลานาน 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.1) จะได้ globulin ตามต้องการ

การเตรียม polysaccharide[8]

นำเชื้อ salmonella typhi มาเลี้ยงบน trypticase soy agar จำนวน 20 plate อบไว้ที่ 37°ซ นาน 24 ชม. เติมน้ำเกลือปกติลงใน plate ละ 2-3 มล. แล้วใช้สำลีพันปลายไม้ขูดเชื้อให้หลุดออกจากผิว agar แล้วใช้ pipette ดูดเชื้อมารวมกันไว้ใน flask นำเชื้อทั้งหมดที่ได้ไป autoclave ที่ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว, 121°ซ, นาน 15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อและทำลายโปรตีน แล้วนำมาปั่นที่ 3000 rpm, 15 นาที เก็บน้ำส่วนบนซึ่งเป็น polysaccharide ไว้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียม DNA(9)

นำม้ามหมูสดๆ จากตลาด 150 กรัม ตัดไขมันและพังผืดออกให้หมด ใช้กรรไกรตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ไว้ในบีกเกอร์ เติม citrate buffer pH 7.4 (ภาคผนวก 2) จำนวน 350 มล. นำไปปั่นใน blender นาน 5 นาที นำมากรองผ่านผ้าก๊อซ 3-4 ชั้น เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อออกไป แล้วนำไปปั่นที่ 3,000 rpm, 15 นาที นำเซลล์มาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือปกติ 3 ครั้ง เติม lysis buffer (ภาคผนวก 3) ประมาณ 250 มล. เพื่อทำลายเม็ดเลือดแดง ผสมให้เข้ากัน ปั่นแล้วนำเซลล์มาใส่ lysis buffer อีก ทำ 3 ครั้ง สุดท้ายจะได้เฉพาะเม็ดเลือดขาว เติม 2.6 M NaCl (ภาคผนวก 4) จำนวน 200 มล. และเติม 5% SDS-45% EtOH (ภาคผนวก 5) จำนวน 5 มล. คนให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น 1 คืน เพื่อให้เม็ดเลือดขาวแตก เมื่อครบเวลานำออกมาปั่นที่ 3,000 rpm, 45 นาที นำน้ำใสส่วนบนมาตกตะกอน DNA ด้วย 95% ethyl alcohol (แช่เย็น) โดยเติมลงไปอย่างช้าๆ พร้อมกับคนไปด้วยแท่งแก้วจนได้เส้นตะกอน DNA พันติดแท่งแก้ว ล้างตะกอนใน 75% ethyl alcohol (แช่เย็น) 2 ครั้ง นำตะกอน DNA มาละลายในน้ำเกลือปกติ (แช่เย็น) จำนวน 100 มล. นำไปปั่นใน blender อีกครั้งนาน 5 นาที เพื่อให้ตะกอนละลายสมบูรณ์ หลังจากนั้นนำไปปั่นในเครื่องปั่น 3,000 rpm. นาน 15 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนไว้ที่ -80°ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้

การเคลือบ globulin บนอนุภาค(10)

นำ 10% ของอนุภาควัสดุแต่ละชนิดใน glycine buffer, pH 8.2 ใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1 มล. เติม globulin solution ลงในแต่ละหลอดปริมาตร 1 มล. และเติม glycine buffer อีกหลอดละ 1 มล. ปิดฝาหลอดทดลองแล้วนำไปเขย่านาน 1 ชม. เมื่อครบเวลาแล้วนำมาปั่นล้างด้วย glycine buffer, pH 8.2 3 ครั้ง สุดท้ายนำมาทำเป็น 10% suspension ใน phosphate buffer, pH 8.0 (ภาคผนวก 6) วิธีทดสอบว่ามี globulin ติดอยู่บนอนุภาคของวัสดุเหล่านี้มากน้อยเพียงใดโดยนำมาทดสอบกับ rheumatoid arthritis (RA) positive serum

สำหรับการเคลือบ polysaccharide และ DNA บนอนุภาคแต่ละชนิดกระทำเช่นเดียวกับการเคลือบ globulin ดังที่กล่าวมาแล้ว

การทดสอบ activity ของอนุภาคที่เคลือบด้วย globulin

นำซีรัมที่ให้ผลบวก (4+) ต่อ rheumatoid factor มาทำเป็น dilution 1:6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยน้ำเกลือปกติ แล้วหยดลงบนแผ่นสไลด์ 1หยด หยดอนุภาคแต่ละชนิดที่เคลือบด้วย globulin แล้วลงไปชนิดละ 1 หยด ผสมให้เข้ากันแล้วเอียงสไลด์ไปมานาน 2 นาที อ่านผลโดยการจับกลุ่มกันของอนุภาคดังนี้

4+ ทุกอนุภาคจับกลุ่มกันหมดเป็นก้อนใหญ่เห็นชัดเจน solution ใส

3+ ส่วนใหญ่ของอนุภาค (3/4) จับกลุ่มกันเป็นก้อนใหญ่ชัดเจน solution ขุ่นเล็กน้อย

2+ ครึ่งหนึ่ง (1/2) ของอนุภาคจับกลุ่มกัน ขนาดของกลุ่มก้อนไม่ใหญ่นัก มีขอบขึ้นชัดเจน solution ค่อนข้างขุ่น

1+ อนุภาคจับกลุ่มขนาดเล็กๆ (1/4) ส่วนใหญ่ของอนุภาคไม่จับกลุ่ม ไม่ขึ้นขอบ solution ขุ่นมาก

negative ไม่เกิดการจับกลุ่มของอนุภาคเลย

อนุภาคที่เกิดการจับกลุ่มตั้งแต่ 1+ ขึ้นไปถือว่าให้ผลบวก (positive) อนุภาคใดให้ผลบวกตั้งแต่ 1+ ขึ้นไปให้นำมาทำ titration เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป

วิธี titration เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ globulin

นำ globulin ที่มีอยู่มาเจือจางด้วย glycine buffer, pH 8.2 ให้เป็น 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 แล้วนำแต่ละ dilution รวมทั้ง undilute ด้วย มาเคลือบบน 10% suspension ของอนุภาคของวัสดุที่ให้ผลบวก 1+ ขึ้นไป หลังจากเคลือบแล้วนำมาทดสอบกับ RA positive serum (4+) ที่ความเข้มข้นใดให้ผลบวก 4+ ถือว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด

สำหรับการเคลือบและการ titration เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ polysaccharide และ DNA กระทำเหมือนกับวิธีของ globulin ต่างกันตรงที่ positive serum ที่ใช้ คือ anti-salmonella typhi; O-titer = 80 และ antinuclear antibody, titer = 40 ตามลำดับ

การทดสอบการเคลือบที่อุณหภูมิห้องกับที่ 37°ซ

นำ globulin ที่เตรียมได้มาเจือจาง 1:4 ด้วย glycine buffer, pH 8.2 นำมา 1 ส่วนผสมกับ 10% suspension ของถ่านหุงข้าว 1 ส่วน ทำใน 2 หลอดทดลอง หลอดหนึ่งนำไปเขย่า 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้องบน rotator อีกหลอดหนึ่งนำไปเขย่าใน shaker bath 37°ซ เวลา 1 ชม. เท่ากัน เมื่อครบเวลานำมาล้าง 3 ครั้งด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

glycine buffer แล้วนำมาทดสอบกับ positive RA serum (4+) เปรียบเทียบดูความแรงของปฏิกิริยาและขนาดของกลุ่มที่เกิด

การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

นำถ่านหุงข้าวที่เคลือบด้วย globulin เรียบร้อยแล้วมาทดสอบกับซีรัมของคนปกติ 20 ราย, VDRL positive serum 6 ราย, E.histolytica positive serum 6 ราย และ RA positive serum 3 ราย

ส่วนการทดสอบความคงตัวของ polysaccharide และ DNA ที่เคลือบบนถ่านหุงข้าว ก็กระทำเช่นเดียวกับ globulin

การทดสอบความไว (sensitivity)

นำ RA positive serum (4+) 3 ราย มาเจือจาง 1:2 ถึง 1:32 แล้วนำแต่ละความเข้มข้นของแต่ละรายมาทดสอบกับอนุภาคของถ่านหุงข้าว,ถ่านแกลบและถ่านกัมมันต์ที่เคลือบไว้ด้วย globulin ดูว่าอนุภาคของวัสดุใดให้ผลบวกสูงที่สุด

สำหรับการทดสอบความไวของ polysaccharide และ DNA ที่เคลือบบนอนุภาคนั้น กระทำเช่นเดียวกับของ globulin เพียงแต่นำมาทดสอบกับ typhoid positive serum 3 ราย (O-titer = 80,160,320) และทดสอบกับ SLE positive serum 3 ราย (4+) ตามลำดับ

การทดสอบความคงตัว (stability)

นำ anti-globulin titer 16, anti salmonella typhi titer 64 และ anti-DNA titer 8 มาแบ่งใส่หลอดทดลองไว้หลอดละ 0.3 มล. แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (-20°ซ) ในแต่ละสัปดาห์นำ antisera ของแต่ละชนิดมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามลำดับ แล้วนำมาทดสอบกับอนุภาคถ่านหุงข้าวที่เคลือบด้วย globulin, polysaccharide ของเชื้อ Salmonella typhi และ DNA ทั้งหมดนี้เก็บไว้ในตู้เย็น (4°ซ) เพื่อดูว่า titer จะลดลงเมื่อใด ถ้า titer ลดลง 2 dilution ถือว่าน้ำยานั้นเสียแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง

จากการเลือกหาวัสดุต่างๆ มาทำการศึกษาครั้งนี้ 13 ชนิด หลังจากได้บดให้มีขนาดเล็กมากๆ จนเป็นอนุภาค ประมาณ 1-3 ไมครอน แล้วเคลือบด้วยสารที่เป็นแอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ โปรตีน (globulin), polysaccharide (จากเชื้อ Salmonella typhi; O-antigen) และ DNA (จากเม็ดเลือดขาว) เมื่อนำไปทดสอบกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ พบว่าอนุภาคของถ่าน 4 ชนิดได้แก่ ถ่านหุงข้าว, ถ่านแกลบ, ถ่านกะลามะพร้าวและถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) สามารถเคลือบแอนติเจนทั้ง 3 ชนิดได้ โดยเฉพาะถ่านหุงข้าวน่าจะนำมาใช้แทนลาเท็คได้

ผลการเคลือบ globulin บนอนุภาคต่างๆ

จากการเคลือบ globulin บนอนุภาคของถ่านหุงข้าว, ถ่านกะลามะพร้าว, ถ่านแกลบ, ถ่านกัมมันต์, ปูนขาว, ปูนพลาสเตอร์, kaolin, ดินสอพอง, ถ่านกระดูก, แป้งฝุ่น, ทราย, ถ่านจากเมล็ดถั่วเหลืองและเม็ดพลาสติกบ่น เมื่อนำไปทดสอบกับ anti-human globulin พบว่ามีวัสดุ 4 ชนิดที่ให้ผลบวก ได้แก่ ถ่านหุงข้าว, ถ่านแกลบ, ถ่านกะลามะพร้าวและถ่านกัมมันต์ (ตารางที่ 1) และพบว่าถ่านหุงข้าว และถ่านกะลามะพร้าวเกิดปฏิกิริยา agglutination ชัดเจนและรวดเร็วที่สุด

ผลการเคลือบ polysaccharide บนอนุภาคต่างๆ

จากการเคลือบ polysaccharide บนอนุภาคของวัสดุต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำไปทดสอบกับ anti-salmonella typhi (anti-O antigen) พบว่าวัสดุที่ให้ผลบวกได้แก่ ถ่านหุงข้าว, ถ่านกะลามะพร้าว, ถ่านแกลบ, ถ่านกัมมันต์, ปูนขาว, kaolin, ดินสอพอง, ถ่านกระดูก นอกนั้นให้ผลลบทั้งหมด (ตารางที่ 1) และยังพบว่าถ่านกัมมันต์เกิดปฏิกิริยา agglutination ได้ชัดเจนและเร็วที่สุด

ผลการเคลือบ DNA บนอนุภาคต่างๆ

จากการเคลือบ DNA บนอนุภาคของวัสดุต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำไปทดสอบกับ anti-DNA serum พบว่าวัสดุที่ให้ผลบวกได้แก่ ถ่านหุงข้าว, ถ่านกะลามะพร้าว, ถ่านแกลบและถ่านกัมมันต์ (ตารางที่ 1) นอกนั้นให้ผลลบทั้งหมด และยังพบว่าถ่านกัมมันต์เกิดปฏิกิริยา agglutination ได้ชัดเจนและรวดเร็วที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการเคลือบวัสดุที่อุณหภูมิห้องและที่ 37°ซ

จากการเคลือบ globulin, polysaccharide และ DNA บนถ่านทุงข้าวที่อุณหภูมิห้องและที่ 37°ซ (shaker bath) แล้วนำไปทดสอบกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนทั้ง 3 นั้น พบว่าการเกิดปฏิกิริยา agglutination ไม่ต่างกันไม่ว่าจะที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 37°ซ แต่ที่ 37°ซ เห็นปฏิกิริยาได้เร็วกว่าเล็กน้อย (ไม่ได้แสดงตาราง)

ผลการหาความเข้มข้นของ globulin ที่เหมาะสมสำหรับเคลือบบนอนุภาค

ได้เจือจาง globulin ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 แล้วนำแต่ละความเข้มข้นไปเคลือบบน 10% suspension ของถ่านทุงข้าว, ถ่านกะลามะพร้าว, ถ่านแกลบและถ่านกัมมันต์แล้วนำไปทดสอบกับ RA positive serum(4+) พบว่าที่ความเข้มข้น 1:2 ให้ความแรงของปฏิกิริยาสูงสุดกับถ่านทุงข้าว, ถ่านกะลามะพร้าว และถ่านแกลบ ส่วนถ่านกัมมันต์ให้ปฏิกิริยาสูงสุดกับ globulin ที่ความเข้มข้น 1:4 (ตารางที่ 2)

ผลการหาความเข้มข้นของpolysaccharide ที่เหมาะสมสำหรับเคลือบบนอนุภาค

ได้เจือจาง polysaccharide ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:2 ถึง 1:32 แล้วนำไปเคลือบบนถ่านทุงข้าว, ถ่านกะลามะพร้าว, ถ่านแกลบ, ถ่านกัมมันต์, ถ่านกระดูก, ปูนขาว, kaolin และดินสอพอง แล้วนำไปทดสอบกับ anti-salmonella typhi (O-Ab = 80) พบว่าถ่าน 4 ชนิด คือ ถ่านทุงข้าว, ถ่านกะลา, ถ่านแกลบ และ ถ่านกัมมันต์ ให้ปฏิกิริยาสูงสุด(3+) ที่ความเข้มข้นของ polysaccharide 1:8 (ตารางที่ 3) ปูนขาวและดินสอพอง เกิดปฏิกิริยาสูงสุด(2+) และ kaolin เกิดสูงสุดที่ 1:4(3+)

ผลการหาความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมสำหรับเคลือบบนอนุภาค

ได้เจือจาง DNA ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:2 ถึง 1:128 แล้วนำแต่ละความเข้มข้นไปเคลือบบนอนุภาคของถ่านทุงข้าว, ถ่านกะลามะพร้าว, ถ่านแกลบและถ่านกัมมันต์ แล้วนำไปทดสอบกับ anti-DNA serum พบว่าที่ความเข้มข้นของ DNA 1:64 ให้ปฏิกิริยาสูงสุดเมื่อเคลือบบนถ่านทุงข้าวและถ่านกะลา และที่ความเข้มข้น 1:8 เกิดได้ดีที่สุดเมื่อเคลือบบนถ่านแกลบและถ่านกัมมันต์ (ตารางที่ 4)

ผลการทดสอบความจำเพาะ

จากการนำ globulin ที่เคลือบบนอนุภาคของถ่านทุงข้าวไปทดสอบกับซีรัมของคนที่เป็นโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่ rheumatoid arthritis ได้แก่ typhoid 20 ราย, SLE 10 ราย, syphilis 20 ราย, E.histolytica infection 6 ราย, viral

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

hepatitis 18 ราย และซีรัมของคนปกติ 50 ราย พบว่า globulin-ถ่านหุงข้าวให้ผลบวกปลอม (false positive) กับซีรัมของคนปกติ 1 ราย นอกนั้นให้ผลลบทั้งหมด (ตารางที่ 5,6) คำนวณค่าความจำเพาะได้เท่ากับ 99% และ เมื่อทดสอบกับซีรัมของคนที่เป็นโรค rheumatoid arthritis 13 ราย ก็ให้ผลบวกทั้งหมด

สำหรับ polysaccharide ที่เคลือบกับอนุภาคของถ่านหุงข้าว เมื่อนำไปทดสอบกับซีรัมของคนที่เป็นโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่ typhoid ดังที่กล่าวมาแล้ว พบว่าให้ผลลบทั้งหมด (114 ราย) ได้ค่าความจำเพาะเป็น 100% และเมื่อทดสอบกับซีรัมของคนที่เป็นโรค typhoid (anti-O Ag = 80) ให้ผลบวกทั้งหมด (ตารางที่ 5,6)

สำหรับ DNA ที่เคลือบบนอนุภาคของถ่านกัมมันต์ เมื่อนำไปทดสอบกับซีรัมของคนที่เป็นโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่ SLE รวมกับซีรัมคนปกติด้วยเป็น 124 ราย ให้ผลลบ 123 ราย ให้ผลบวก 1 รายกับซีรัมของคนที่เป็นโรค rheumatoid arthritis ได้ค่าความจำเพาะเท่ากับ 99% และเมื่อทดสอบกับซีรัมของคนที่เป็นโรค SLE 10 ราย ให้ผลบวกทั้งหมด (ตารางที่ 5,6)

ผลการทดสอบความไว

จากการนำ globulin, polysaccharide และ DNA ไปเคลือบบนอนุภาคของถ่านหุงข้าวและถ่านกัมมันต์ตามลำดับ แล้วนำไปทดสอบหา titer กับซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ rheumatoid, typhoid และ SLE อย่างละ 3 ราย พบว่า globulin-ถ่านหุงข้าวให้ผลบวกกับ rheumatoid serum ที่ titer 16,16 และ 8 polysaccharide-ถ่านหุงข้าว ให้ผลบวกกับ typhoid serum ที่ titer 80,80 และ 160 และ DNA-ถ่านกัมมันต์ให้ผลบวกกับ SLE serum ที่ titer 2,8,4 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ผลการทดสอบความคงตัว

จากการเก็บอนุภาคของถ่านที่เคลือบด้วย globulin, polysaccharide และ DNA ไว้ในตู้เย็น ในแต่ละสัปดาห์ได้นำออกมาทดสอบหา titer กับซีรัม positive ที่แบ่งเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (-20°ซ) ผลปรากฏว่า globulin ที่เคลือบบนอนุภาคถ่านหุงข้าวสามารถเก็บไว้ได้นาน 5 เดือน โดยที่ค่า titer ไม่เปลี่ยนแปลง, polysaccharide-ถ่านหุงข้าวเก็บได้นานมากกว่า 7 เดือน และ DNA ถ่านกัมมันต์เก็บได้นาน 4 เดือน (ไม่ได้แสดงตาราง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 แสดงผลการเคลือบ globulin, polysaccharide และ DNA บนวัสดุชนิดต่างๆ

ชนิดของวัสดุ	ปฏิกิริยา agglutination		
	globulin	polysaccharide	DNA
ถ่านหุงข้าว	+	+	+
ถ่านกะลา	+	+	+
ถ่านแกลบ	+	+	+
ถ่านกัมมันต์	+	+	+
ปูนขาว	-	+	-
ปูนพลาสเตอร์	-	-	-
kaolin	-	+	-
ดินสอพอง	-	+	-
ถ่านกระดูก	-	+	-
แป้งทาตัว	-	-	-
ทราย*	ND	ND	ND
ถ่านเม็ดถั่วเหลือง*	ND	ND	ND
เม็ดพลาสติก*	ND	ND	ND

ND = not done

* วัสดุทั้ง 3 ชนิดไม่กระจายตัวใน buffer จึงไม่นำมาทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 แสดงผลของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ globulin สำหรับเคลือบบนอนุภาคถ่านหุงข้าว, ถ่านกะลา, ถ่านแกลบและถ่านกัมมันต์ โดยทำการทดสอบกับ RA positive serum(4+)

ความเข้มข้นของ globulin (800 mg/dl)	ปฏิกิริยา agglutination			
	ถ่านหุงข้าว	ถ่านกะลา	ถ่านแกลบ	ถ่านกัมมันต์
Undilute	3+	3+	1+	2+
1:2	4+	4+	3+	3+
1:4	3+	3+	2+	4+
1:8	2+	2+	2+	1+
1:16	1+	1+	1+	AA
1:32	AA	AA	AA	AA

AA = autoagglutination

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 แสดงผลของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ polysaccharide สำหรับเคลือบบนอนุภาคต่างๆ โดยทดสอบกับ anti-*Salmonella typhi* (O-Ab = 80)

อนุภาคของวัสดุที่ใช้	ปฏิกิริยาของ polysaccharide ที่ความเข้มข้น					
	Undil	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
ถ่านหุงข้าว	1+	1+	2+	3+	1+	neg
ถ่านกะลา	1+	1+	2+	3+	1+	neg
ถ่านแกลบ	1+	1+	3+	3+	3+	neg
ถ่านกัมมันต์	1+	1+	2+	3+	3+	neg
ถ่านกระดูก	1+	2+	1+	1+	wk	neg
ปูนขาว	2+	1+	1+	1+	1+	neg
kaolin	1+	1+	2+	1+	1+	neg
ดินสอพอง	2+	1+	wk	wk	neg	neg

wk = weakly positive

neg = negative

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 แสดงผลของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DNA สำหรับเคลือบบนอนุภาค ของถ่าน 4 ชนิด โดยทดสอบกับ anti-DNA serum

ความเข้มข้นของ DNA	ปฏิกิริยา agglutination			
	ถ่านหุงข้าว	ถ่านกะลา	ถ่านแกลบ	ถ่านกัมมันต์
Undilute	1+	1+	1+	3+
1:2	1+	1+	1+	3+
1:4	1+	1+	2+	3+
1:8	1+	1+	2+	4+
1:16	2+	2+	1+	AA
1:32	2+	2+	AA	AA
1:64	3+	3+	AA	AA
1:128	2+	2+	AA	AA

AA = autoagglutination เพราะเกิดการจับกลุ่มของอนุภาคหลังเคลือบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของอนุภาคถ่านหุงข้าวที่เคลือบด้วย globulin, polysaccharide และถ่านกัมมันต์เคลือบด้วย DNA

Tested sera	จำนวน	ปฏิกิริยา agglutination					
		globulin		polysacc.		DNA	
		Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
RA positive(4+)	13	13	0	0	13	1*	12
typhoid positive (1:80)	20	0	20	20	0	0	20
SLE positive	10	0	10	0	10	10	0
Normal serum	50	1**	49	0	50	0	50
VDRL positive	20	0	20	0	20	0	20
E.histolytica positive	6	0	6	0	6	0	6
HBsAg positive	15	0	15	0	15	0	15
รวม	134	14	120	20	114	11	123

* positive 2+

** weakly positive

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบค่าความจำเพาะและความไวของ globulin ที่เคลือบอนุภาคถ่านหุงข้าว, polysaccharide ที่เคลือบถ่านหุงข้าวและ DNA ที่เคลือบถ่านกัมมันต์

Reagent	ความจำเพาะ (%)	ความไว (%)
globulin-ถ่านหุงข้าว	100	100
polysacc-ถ่านหุงข้าว	100	100
DNA-ถ่านกัมมันต์	99	100

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 7 แสดงค่าความไว (แบบ quantitative) ของ globulin, polysaccharide และ DNA ที่เคลือบบนอนุภาคของถ่าน

ความเข้มข้นของ DNA	รายที่	ปฏิกิริยา agglutination		
		globulin	polysaccharide	DNA
Rheumatoid	1(4+)	16		
	2(4+)	16		
	3(4+)	8		
Typhoid	1(80)		80	
	2(160)		80	
	3(320)		160	
SLE	1(4+)			2
	2(4+)			8
	3(4+)			4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิจารณ์

ผู้วิจัยมีความสนใจทางด้าน serodiagnosis และชอบวิธี agglutination เป็นพิเศษ เพราะทำได้ง่าย ให้ผลรวดเร็ว และไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง ปัจจุบันวิธี latex agglutination นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง แต่ test ทั้งหมดต้องสั่งซื้อมาจากต่างประเทศเพราะเราทำ latex เองไม่ได้ และมีราคาแพง ผู้วิจัยจึงศึกษาและทดลองเตรียม latex ขึ้นเองและทำได้สำเร็จเป็นที่น่าพอใจ(9,10) แต่วิธีการเตรียม latex ยังต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก เช่น เครื่องกลั่น เครื่องสำหรับการทำ polymerization และต้องใช้ก๊าซไนโตรเจน ฉะนั้นห้องทดลองเล็กๆ จึงไม่สามารถทำเองได้ จึงมีความคิดที่จะหาวัสดุอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ latex คือ สามารถจับกับสารพวก protein, carbohydrate หรือ DNA ได้ จึงมุ่งความสนใจไปที่ถ่าน ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถจับกับสารต่างๆ ได้ ทำอย่างไรถึงจะทำให้ถ่านเป็นผงขนาดเล็กประมาณ 1-3 ไมครอนได้ นี่คือปัญหาที่ตามมา จึงได้ทดลองนำถ่านหุงข้าวมาตำในครกหินจนคิดว่าได้ขนาดเล็กที่สุดแล้ว จึงนำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ดู พบว่ามีผงถ่านขนาดต่างๆ กัน และมีขนาดประมาณ 1-3 ไมครอนอยู่ด้วย ปัญหาต่อมาคือทำอย่างไรจึงจะแยกผงหรืออนุภาคขนาดที่ต้องการ (1-3 ไมครอน) ออกมาได้ จึงได้ทดลองเอาผงถ่านที่ตำละเอียดแล้วไปละลายน้ำกลั่นแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ผงถ่านที่มีขนาดใหญ่ๆ ตกลงมาอยู่ข้างล่างก่อนแล้วแยกส่วนข้างบนออกมาส่องกล้องดูว่าได้ขนาดตามที่ต้องการหรือไม่ พบว่าการตั้งไว้ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง จะได้ผงที่ลอยอยู่ข้างบนมีขนาดเล็กตามที่ต้องการ แต่ก็ยังมีผงถ่านที่มีขนาดที่เล็กเกินไปปนอยู่ด้วย จึงต้องหาทางกำจัดออกไปอีก จึงใช้วิธีตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วเทส่วนที่ขุ่นๆ ข้างบนทิ้งไปก็จะได้อนุภาคของถ่านขนาดประมาณ 1-3 ไมครอนตามที่ต้องการ

อนึ่งการประมาณขนาดของผงถ่านให้ได้ประมาณ 1-3 ไมครอนนั้น อาศัยการเปรียบเทียบกับขนาดของเซลล์ของ staphylococcus โดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่ถ้าไม่มีกล้องจุลทรรศน์ก็ประมาณได้โดยหยด suspension ของผงถ่านลงบนแผ่นสไลด์กระจกอย่าให้ข้นเกินไปนัก สังเกตดูขนาดของผงถ่านให้ได้ขนาดเท่ากันสม่ำเสมอ เมื่อเอียงแผ่นสไลด์จะไม่เห็นเม็ดผงถ่านเป็นก้อนใหญ่ๆ เท่านี้ก็ใช้ได้แล้ว

จะเห็นว่าการเตรียมผงถ่านตามวิธีนี้ทำได้ง่าย เครื่องมือก็มีแต่เพียงครกหิน และถ้วยแก้วเท่านั้น จึงน่าจะเป็นวิธีที่นำไปใช้กับห้องแลบทั่วๆ ไปได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากวัสดุที่เลือกมาทำการทดลอง 13 ชนิด มี 3 ชนิดที่ไม่สามารถนำมาใช้ทำการทดลองได้ (ตารางที่ 1) ได้แก่ ทราย, ถ่านจากเม็ดถั่วเหลืองและเม็ดพลาสติก ทรายเมื่อบดละเอียดได้ขนาดตามที่ต้องการแล้ว เมื่อนำมาทำเป็น suspension แล้วหยดลงบนแผ่นสไลด์เอาไม้จิ้มฟันเกลี่ยให้เป็นวงกลม เวลาเอียงไปมาอนุภาคของเม็ดทรายจะไม่กระจายตัว แต่จะมารวมตัวกันเป็นจุดอยู่ตรงกลางหลุม เนื่องจากทรายมีน้ำหนักมากเกินไป สำหรับถ่านจากเม็ดถั่วเหลืองและเม็ดพลาสติกเมื่อบดมากเข้าๆ แทนที่จะเป็นผงละเอียดกลับมารวมตัวกันเป็นแผ่นๆ จึงนำไปใช้ทดลองไม่ได้

แป้งทาตัว (talcum) ไม่ต้องบดนำมาใช้เลยแต่มีปัญหาที่ไม่ยอมเป็น suspension ในน้ำ จะลอยตัวอยู่บนผิวน้ำ จึงได้ผสมผงซักฟอก (detergent) ลงไปในน้ำเล็กน้อยช่วยให้ผงแป้งเป็น suspension ดีขึ้น อาจจะเป็นด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผงแป้งไม่จับกับแอนติเจนใดๆ เลย (ตารางที่ 1) เนื่องจากผงซักฟอกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการจับกันของสารต่างๆ ปกติจะใช้ detergent (tween 80) เป็นตัว block plate ในการทำ ELISA(11)

วัตถุประสงค์ของการทดลองในตารางที่ 1 นี้ก็เพื่อทดสอบอย่างคร่าวๆ ดูว่ามีวัสดุใดสามารถเคลือบแอนติเจนชนิดใดได้บ้าง เมื่อนำไปทดสอบกับแอนติบอดีที่จำเพาะแล้ว ถ้าให้ผลบวกก็แปลว่าวัสดุนั้นสามารถเคลือบด้วยแอนติเจนได้ วัสดุใดที่สามารถเคลือบด้วยแอนติเจนได้จะมาก หรือน้อยก็ตามจะนำไปทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบต่อไป

จากผลของการหาปริมาณที่เหมาะสมของ globulin สำหรับเคลือบบนอนุภาคของถ่านหุงข้าว, ถ่านแกลบ, ถ่านกะลา และถ่านกัมมันต์ ถ่านแกลบเคลือบได้น้อยที่สุด (ตารางที่ 2) สำหรับถ่านอีก 3 ชนิด ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่ถ่านหุงข้าวน่าจะเลือกใช้มากที่สุด เนื่องจากหาง่าย และราคาถูกเมื่อเทียบกับถ่านกัมมันต์ ที่ความเข้มข้นของ globulin 1:32 หลังจากเคลือบแล้วเกิดการจับกลุ่มกันเอง (autoagglutination) ซึ่งอาจจะเกิดเนื่องจาก globulin หนึ่งโมเลกุลจับกับอนุภาคของถ่านได้มากกว่า 1 อนุภาคแล้วจับสานต่อกันเป็นกลุ่มก้อนขึ้นจนมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ในทางตรงกันข้ามถ้า globulin มากเกินไปการเคลือบก็เกิดขึ้นได้ไม่ค่อยดี อาจเนื่องจากโมเลกุลของ globulin ที่มากเกินไปเกิดการ block ซึ่งกันและกัน จึงทำให้ globulin ไปจับบนอนุภาคของถ่านได้น้อย

ส.ร.
616.0795
ป117ก
เลขหมู่.....
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะเห็นว่า polysaccharide เคลือบติดบนวัสดุได้มากชนิดกว่า globulin และ DNA (ตารางที่ 3) โดยปกติแล้ว polysaccharide นั้นเคลือบติดบนอนุภาคต่างๆ ได้ง่าย เช่นการเคลือบ polysaccharide บนเม็ดเลือดแดง ถ้าเป็น protein หรือ DNA เคลือบบนเม็ดเลือดแดง จะต้องใช้สารเคมี treat เม็ดเลือดแดงก่อนจึงจะเคลือบติด (12,13) แต่สำหรับ polysaccharide เคลือบติดได้โดยตรงไม่ต้อง treat เม็ดเลือดแดงเลย(14) สำหรับถ่านกระดูก, ปูนขาว, kaolin และดินสอพอง ถึงแม้จะเคลือบ polysaccharide ติดแต่ก็ติดเพียงเล็กน้อย (ให้ปฏิกิริยาเพียง 1+-2+) จึงไม่สามารถนำไปใช้ทดลองต่อไปได้ จากตารางที่ 3 นี้จะเห็นว่าถ่านแกลบและถ่านกัมมันต์ให้ผลดีที่สุด (ที่ polysaccharide 1:16 ให้ปฏิกิริยา 3+ เท่ากัน) แต่การเตรียมอนุภาคของถ่านแกลบเพื่อให้ได้ปริมาณมากๆ เตรียมยาก เพราะว่าอนุภาคส่วนใหญ่จะเป็นอนุภาคที่ลอยน้ำ เหลือที่จมน้ำที่นำมาใช้ได้น้อย ส่วนถ่านกัมมันต์หายากจึงแนะนำให้เลือกใช้ถ่านทุงข้าวน่าจะดีที่สุด

ถ่านกัมมันต์เคลือบติดดีมากกับ DNA (ตารางที่ 1) เมื่อทดสอบกับ anti-DNA ให้ปฏิกิริยารวดเร็ว อ่านผลง่าย ชัดเจน ส่วนถ่านทุงข้าวและถ่านกะลา ให้ผลพอๆ กันและเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าถ่านกัมมันต์ สำหรับถ่านแกลบเกิดปฏิกิริยาช้าและเห็นกลุ่มตะกอนได้ไม่ชัดเจนเท่ากับของถ่านกัมมันต์ สรุปแล้ว DNA จับได้ดีที่สุดกับถ่านกัมมันต์

จากผลของการหาค่าความจำเพาะของถ่านทุงข้าวที่เคลือบด้วย globulin, polysaccharide และถ่านกัมมันต์เคลือบด้วย DNA จากการคำนวณได้ค่าความจำเพาะเท่ากับ 99%,100% และ 99% ตามลำดับ (ตารางที่ 5,6) จะเห็นได้ว่าความจำเพาะสูงมาก ถ่านทุงข้าวที่เคลือบด้วย globulin ให้ผลบวกปลอม (false positive) 1 รายกับซีรัมของคนปกติ ซึ่งซีรัมนี้จากผู้บริจาคโลหิตและผู้ขายโลหิต โดยปกติแล้วคนปกติก็ให้ผลบวกกับ rheumatoid factor test ได้(15) และมีอีก 1 รายที่ให้ผลบวกปลอมกับ DNA-ถ่านกัมมันต์ ซึ่งเป็นซีรัมของคนที่ให้ผลบวกต่อ rheumatoid factor test ส่วนใหญ่ของคนที่เป็นโรค autoimmune มักจะมีแอนติบอดีต่อ tissue ของหลายๆ อวัยวะ เช่น คนที่เป็นโรค SLE ในซีรัมจะพบว่ามีแอนติบอดีที่นอกเหนือจาก antinuclear factor แล้วยังพบว่ามีแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดง, เม็ดเลือดขาว, เกล็ดเลือด และอื่นๆ ได้อีกด้วย(16) จึงเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยรายนี้อาจจะเป็นโรค SLE แล้วมีแอนติบอดีที่ให้ผลบวก rheumatoid factor หรือผู้ป่วยเป็นโรค rheumatoid factor ที่มีแอนติบอดีต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

DNA ด้วย ในส่วนของผงถ่านเองไม่น่าจะมีแอนติเจนใด ๆ เหลืออยู่ เนื่องจากก่อนจะมาเป็นถ่านนั้นได้ถูกเผาจนสุกแอนติเจนที่อาจจะมีอยู่ในส่วนของเนื้อไม้ (polysaccharide) น่าจะถูกทำลายไปด้วยความร้อนแล้ว ส่วนแอนติเจนอื่นๆ เช่นพวกโปรตีนและ DNA นั้นถูกทำลายได้ง่ายกว่า polysaccharide จึงน่าจะถูกทำลายไปก่อนแล้ว สรุปแล้วบนผงถ่านไม่น่าจะมีแอนติเจนชนิดใด ๆ เหลืออยู่เลย ฉะนั้นผลที่ได้ผลบวกบลอมจึงน่าจะเกิดจากแอนติเจนที่นำไปติดไว้ใหม่เกิด cross-reaction กับแอนติบอดีอื่นๆ ได้

เมื่อพิจารณาถึงค่าของความไวที่คำนวณได้ 100% ทั้งหมด (ตารางที่ 5,6) ซึ่งน่าจะสูงเกินความจริงไปบ้างเนื่องจาก positive serum ที่เลือกนำมาทดสอบนั้นได้เลือกเฉพาะซีรัมที่ให้ผลบวก titer สูงๆ เช่น typhoid positive serum ได้เลือกเฉพาะที่ให้ผลบวก titer ตั้งแต่ 80 ขึ้นไป (O-titer) ที่เลือกเช่นนี้เพราะว่าเราถือว่าคนที่เป็นโรค typhoid จะมี titer เท่ากับ 80 หรือมากกว่า นอกจากนี้แล้วการปรับความไวได้กระทำมาตั้งแต่ตอนเคลือบแอนติเจนบนผงถ่านมาแล้ว หลังจากเคลือบแอนติจนเสร็จแล้ว จะต้องนำมาทดสอบกับซีรัมของคนปกติและคนที่เป็นโรค ผลจะต้องเป็นลบและบวกตามลำดับจึงจะถือว่าการเคลือบนั้นใช้ได้ ดังนั้นเมื่อทดสอบค่าความไวในตอนหลังผลจึงได้ 100%

การทดสอบความไวโดยการเปรียบเทียบ titer นั้น การทดสอบแอนติบอดีต่อ polysaccharide จะเปรียบเทียบผลได้ดีกว่าของ globulin และ DNA เนื่องจากเป็นการเปรียบเทียบแบบ quantitative เหมือนกัน ส่วนของ globulin และ DNA เป็นการเปรียบเทียบแบบ qualitative กับ quantitative ผลที่ได้จึงไม่ค่อยแน่นอน จะเห็นว่า titer ของ typhoid antibody ค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่โดยวิธี carbon agglutination ได้ต่ำกว่า bacterial cell agglutination (ตารางที่ 7) ทั้งนี้เนื่องจาก carbon agglutination นั้นเป็นวิธี slide agglutination จึงมีความไวต่ำกว่าวิธี tube agglutination

จากการทดสอบความคงตัวของแอนติเจนทั้ง 3 ชนิดที่เคลือบไว้บนผงถ่าน สำหรับ globulin และ DNA นั้นเก็บไว้ได้นาน 5 และ 4 เดือนตามลำดับซึ่งยังถือว่าน้อยเกินไป น่าจะเก็บได้นานอย่างน้อย 6 เดือนหรือ 1 ปี จึงต้องศึกษาหาสารถนอม (preservative) ที่เหมาะสมต่อไป สำหรับ polysaccharide เก็บไว้ 7 เดือนก็ยังคงมี activity เท่าเดิม เนื่องจากเวลาสำหรับการทำวิจัยสิ้นสุดลงจึงกระทำได้เท่านี้ เคยทดลองใช้ polysaccharide ของเชื้อวัณโรค (tubercle bacilli) เคลือบบน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผงถ่านสามารถเก็บไว้ได้นานถึง 2 ปี จึงเชื่อว่า polysaccharide ของ salmonella ก็น่าจะเก็บไว้ได้นานกว่า 7 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุป

จากการศึกษาเพื่อเลือกหาวัสดุอื่นๆ มาใช้แทนลาเท็คสำหรับเคลือบด้วยแอนติเจน 3 ชนิด คือ globulin, polysaccharide และ DNA พบว่าถ่านหุงข้าว, ถ่านกะลา และถ่านกัมมันต์ สามารถเคลือบแอนติเจนดังกล่าวได้ดีพอที่จะนำมาใช้แทนลาเท็คได้ ถ่านกัมมันต์เคลือบติดแอนติเจนได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับถ่านด้วยกัน แต่ถ้าไม่มีถ่านกัมมันต์ ถ่านหุงข้าว ก็ใช้แทนได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

1. Ravel R. Clinical Laboratory Medicine. 5th ed. Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago 1989; 562-5.
2. Sacher RA and McPherson RA. Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Tests. 10th ed. F.A.David Company, Philadelphia 1991; p.257-262.
3. Bryant NJ. Laboratory Immunology and Serology. 3rd ed. W.B. Saunder Company, Philadelphia. 1992.
4. Stites DP and Terr AI. Basic and Clinical Immunology. 7th ed. Lang Medical Publications. U.S.A. 1991; 259.
5. Leaflet. Pregnancy Slide Test (Roche). Basle, Switzerland. 1982.
6. Leaflet. Rapitex RF. Behringwerke AG. Marburg. Germany. February 1993.
7. ปกรณ์ ไทยานันท์. การผลิตน้ำยารูมาตอยด์แฟคเตอร์เทสต์เพื่อใช้เอง. รายงานการวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2533 หน้า 8.
8. Kwapinski JBG. Methodology of Immunochemical and Immunological Research. John Wiley and Son, Inc., New York. 1972. p.175.
9. ปกรณ์ ไทยานันท์ และ ยุพิน สุศิริวัฒนานนท์. การเตรียมน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาแอนตินิวเคลียแอนติบอดี. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2534; 24(2):73-80.
10. ปกรณ์ ไทยานันท์. การผลิตน้ำยารูมาตอยด์แฟคเตอร์เทสต์เพื่อใช้เอง. รายงานการวิจัยคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2533 หน้า 9.
11. Gardas A and Lewartowska C. Coating of protein to polystyrene ELISA plates in the present of detergents. J. Immunol. Methods. 1988;106:251-5.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. Onkelink E, Meuldermans W, Jonian M and Lantil R. Glutaladehyde as a coupling reagent in passive hemagglutination. Immunology. 1969;16:35-43.

13. Loftager MK, Koch C, Hellung-Larsen P and Anderson V. Conjugation of DNA to erythrocytes. J. Immunol. Methods. 1987;102:65-9.

14. Hudson L and Hay FC. Practical Immunology. 1st ed. Black Well Scientific. Publications. Philadelphia. 1976 ; 128.

15. Plotz CM and Singer JM. The latex fixation test II, Results in rheumatoid arthritis. Am. J. Med. 1956;22:893-6.

16. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigen (ANA) : Their Immunobiology and Medicine. Adv. Immunol. 1982;167-240.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก

1. 0.1 M Glycine buffer saline, pH 8.2

Glycine	7.51	g
NaCl	8.5	g
NaN_3	1.0	g

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 800 มล. ปรับ pH ให้ได้ 8.2 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 มล.

2. Citrate buffer saline, pH 7.4

Sodium citrate	2.94	g
Sodium chloride	8.14	g
distilled water to	1000	ml

adjust pH to 7.2-7.4 with HCl or NaOH.

3. Lysis buffer, pH 7.2

NH_4Cl	8.3	g
$KHCO_3$	1.0	g
EDTA	0.2	g
distilled water to	1000	ml.

adjust pH to 7.2-7.4 with HCl or NaOH

4. 2.6 M NaCl

NaCl	76	g
distilled water to	500	ml

5. 5% SDS-45% EtOH

Sodium dodexyl sulfate (SDS)	5 g
45% Ethyl alcohol	100 g

6. 0.1 M Phosphate buffer, pH 8.0

Solution A	=	0.1 M Na_2HPO_4
Solution B	=	0.1 M NaH_2PO_4

ใช้ solution A 945 มล. ผสมกับ solution B 55 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติและประสบการณ์ของผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปกรณ์ ไทยานันท์

เกิด วันที่ 4 ตุลาคม 2483

ที่ทำงาน ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษา วท.ม. ปี 2519 คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

วท.บ. ปี 2517 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประสบการณ์การทำงาน

อาจารย์ประจำภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2519 จนถึงปัจจุบัน

อาจารย์พิเศษภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาจารย์พิเศษคณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาจารย์พิเศษวิทยาลัยพลศึกษาเชียงใหม่

ประสบการณ์ทางวิชาการ

ได้รับรางวัลชมเชยในการประกวดงานวิจัยของสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2521 งานวิจัยที่ส่งเข้าประกวด เรื่อง "รรคพิษสุนัขบ้า"

ปัจจุบันทำงานวิจัยด้าน Serodiagnosis โดยเฉพาะทางด้าน Passive agglutination

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved