การพัฒนาวิธีตรวจ : การเคลือบแอนติเจน ของเชื้อไทฟอยด์บนผงถ่าน

โดย

ปกรณ์ ไทยานันท์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ.2537

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีตรวจ : การเคลือบแอนติเจนของเชื้อไทฟอยด์บนผงถ่าน*

ปกรณ์ ไทยานันท์ วท.ม**

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจโรคไทฟอยด์ขึ้นมาอีกรูปแบบหนึ่ง นอกเหนือไปจากที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยใช้แอนติเจนของเชื้อ S.typhi ทั้งชนิด O และ H ไปเคลือบบนผงถ่าน ซึ่งเตรียมขึ้นมาใช้เอง แล้วนำไปทดสอบหาแอนติบอดีในซีรัมของคนปกติ 50 ราย, คนที่สงสัยว่าจะเป็นโรคไทฟอยด์ 100 ราย และคนที่เป็นโรคอื่น ๆ อีก 100 ราย โดยทำเปรียบเทียบกับวิธี Widal test ผลปรากฏว่าวิธี slide agglutination ของ O-Ag ให้ผลบวก 36 ราย ใน 50 รายที่ให้ผลบวกโดยวิธี Widal หรือมีความไว 72% และความจำเพาะ 77% ส่วน H-Ag ให้ผลบวก 55 รายใน 89 รายที่ให้ผลบวกโดยวิธี Widal หรือมีความไว 62% และมีความจำเพาะ 83% สำหรับการทดสอบโดยวิธี microplate agglutination พบว่า O-Ag ให้ผลบวก 44 รายใน 50 ราย ที่ให้ผลบวกโดยวิธี Widal หรือมีความไว 88% ความจำเพาะ 99% ส่วน H-Ag ให้ผลบวก 66 รายใน 89 รายที่ให้ผลบวกโดยวิธี Widal หรือมีความไว 74% และความจำเพาะ 100% และได้ทดสอบความคงตัวของ O-Ag และ H-Ag ที่เคลือบไว้บนผงถ่าน โดยการนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น พบว่า O-Ag สามารถเก็บไว้ได้นาน 35 วัน ส่วน H-Ag เก็บไว้ได้นาน 15 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

---

* ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2536

** ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ABSTRACT

Test development : Coating of S.typhi antigen on carbon particles*

Pakorn Thaiyanan M.S.**

In this study, carbon agglutination test was established to determine antibodies against S.typhi for diagnosis of typhoid fever. Carbon particles, locally prepared, were coated with O-Ag and H-Ag of S.typhi and used to detect antibodies in 50 normal, 100 suspected typhoid and 100 non-typhoid sera. With slide agglutination using O-Ag-carbon, 36 sera were positive out of 50 sera positive in the Widal test. Statistically, the sensitivity and specificity were 72% and 77%, respectively. With H-Ag-Carbon 55 sera were positive whereas Widal test was positive in 89 sera giving 62% sensitivity and 83% specificity. By microplate agglutination test, O-Ag-Carbon was positive in 44 sera whereas the Widal test was positive in 50 sera and giving the sensitivity and specificity of 88% and 99%, respectively. For H-Ag-Carbon 66 sera were positive whereas Widal test was positive in 89 sera with 74% sensitivity and 100% specificity. Finally, the O-Ag-Carbon and H-Ag-Carbon stored in refrigerator (4·C) were found to be stable for up to 35 days and 15 days, respectively.

---

* This work was supported by a research grant from Chiang Mai University, year 1993.

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้จัดสรรทุนเพื่อทำการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา หน่วยปฏิบัติการกลาง โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่ช่วยเก็บซีรัมของคนที่เป็นโรคต่างๆ รวมทั้งนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 ที่บริจาคเลือดให้สำหรับเป็น normal control

ขอขอบคุณ น.ส.นีลุบล ชมภูธิราช ที่ช่วยพิมพ์งานตั้งแต่เริ่มขอทุนวิจัยจนถึงรายงานฉบับสมบูรณ์ และนายวิสูตร ไชยวรศิลป์ ที่ช่วยโรเนียว และเข้าเล่มรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายขอขอบคุณภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์ รวมทั้งเคมีภัณฑ์ที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
ชื่อเรื่อง	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
รายการตารางประกอบ	ฉ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
วัสดุและวิธีการ	4
ผลการทดลอง	9
วิจารณ์	21
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	26
ประวัติการศึกษาและประสบการณ์	28

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ O-Ag สำหรับการเคลือบบนผงถ่าน	12
ตารางที่ 2	แสดงการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H-Ag สำหรับการเคลือบบนผงถ่าน	13
ตารางที่ 3	เปรียบเทียบการใช้ coating-buffer ระหว่าง PBS กับ Glycine สำหรับการเคลือบ O-Ag บนผงถ่าน	13
ตารางที่ 4	เปรียบเทียบการใช้ coating-buffer ระหว่าง PBS กับ Glycine สำหรับการเคลือบ H-Ag บนผงถ่าน	14
ตารางที่ 5	แสดงผลการนำ O-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธี slide agglutination เปรียบเทียบกับ Widal test	15
ตารางที่ 6	แสดงผลการนำ H-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธี slide agglutination เปรียบเทียบกับ Widal test	16
ตารางที่ 7	แสดงผลการนำ O-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธี microplate agglutination เปรียบเทียบกับวิธี Widal test	17

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า

ตารางที่ 8 แสดงผลการนำ H-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธี microplate agglutination เปรียบเทียบกับวิธี Widal test 18

ตารางที่ 9 แสดงผลที่ตรงกันและไม่ตรงกันของการนำ O-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม 250 ราย โดยทำการเปรียบเทียบกับวิธี Widal test 19

ตารางที่ 9 แสดงผลที่ตรงกันและไม่ตรงกันของการนำ H-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม 250 ราย โดยทำการเปรียบเทียบกับวิธี Widal test 20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทนำ

โรคไทฟอยด์ (typhoid fever) เป็นโรคของทางเดินอาหารชนิดหนึ่ง ซึ่งยังคงมีการแพร่ระบาดอย่างสม่ำเสมอในประเทศไทย และเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการสาธารณสุขในบ้านเรา สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ Salmonella typhi เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบมีหนวด (flagella) อยู่รอบๆ ตัว

การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการกระทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือด หรืออุจจาระของผู้ป่วย และการวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยา การเพาะเลี้ยงเชื้อจะได้ผลดีในช่วงแรกๆ ของการติดเชื้อ (พบเชื้อได้ประมาณ 80% ในสัปดาห์แรกของโรค) หลังจากนั้นการพบเชื้อจะค่อยๆ ลดลง(1) ยิ่งถ้าผู้ป่วยได้รับยาปฏิชีวนะมาด้วยก็จะทำให้การเพาะเชื้อได้ผลน้อยลงไปอีก การวินิจฉัยโรคโดยอาศัยการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา หรือการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ S.typhi จะช่วยได้มากในกรณีที่การเพาะเลี้ยงกระทำไม่ได้ผล วิธีที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ S.typhi นิยมใช้วิธี Widal test โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ S.typhi ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ แอนติบอดีต่อ cell wall ของตัวเชื้อ (O-antigen) และต่อ flagella ของตัวเชื้อ (H-antigen) วิธีนี้สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการเป็นโรคและจะพบได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 3-4 ของการเป็นโรค

ปกติการตรวจด้วยวิธี Widal test จะกระทำกับสองแอนติเจน คือ O- และ H-แอนติเจน ทั้งนี้เพื่อช่วยในการบอกสภาวะของโรคเช่น ถ้าพบว่าแอนติบอดีต่อ O-แอนติเจนสูง (IgM-Ab) จะเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าผู้ป่วยติดเชื้ออยู่ในระยะเฉียบพลัน (acute infection) ถ้าแอนติบอดีต่อ H-แอนติเจนสูง (IgG-Ab) ในขณะที่แอนติบอดีต่อ O-แอนติเจนไม่สูง แสดงว่าผู้ป่วยเคยเป็นโรคนี้มานานแล้ว(2) หรือเคยฉีดวัคซีนมาก่อน อย่างไรก็ตามวิธี Widal test นี้ก็ยังให้ผลบวกปลอม (false positive) ได้ด้วย โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อจากกลุ่มเชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ด้วยกัน(3,4)

การวินิจฉัยโรคไทฟอยด์นอกจากจะใช้วิธี Widal test แล้ว ยังมีวิธีอื่นๆ อีกหลายวิธี เช่น Latex agglutination เพื่อตรวจหาตัวเชื้อใน blood culture broth โดยใช้ monoclonal antibody เคลือบบนเม็ดลาเท็ค หรือการตรวจหา endotoxin ของเชื้อ S.typhi ด้วยวิธี Latex immunoassay (on-step two- particle)(5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธี ELISA(6) ก็มีผู้พยายามนำมาทดลองใช้ พบว่ามีความไวสูงกว่าวิธี Widal agglutination ถึง 100 เท่า แต่ก็ยังเป็นเพียงงานวิจัยในห้องปฏิบัติการ ยังไม่ได้นำมาใช้ในงานประจำเนื่องจากมีความยุ่งยากในการเตรียมแอนติเจนให้บริสุทธิ์และมีราคาแพง

ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความสนใจที่จะหาวิธีใหม่ที่ทำได้ง่าย สะดวก ให้ผลรวดเร็ว และมีราคาถูก จึงได้คิดพัฒนาวิธี carbon agglutination เพื่อใช้ช่วยวินิจฉัยโรคไทฟอยด์ โดยการศึกษาความเหมาะสม การเคลือบแอนติเจนของเชื้อ S.typhi บนผงถ่าน (carbon) แล้วนำผงถ่านที่เคลือบแล้วนี้ไปตรวจหาแอนติบอดีในผู้ป่วยที่เป็นโรคไทฟอยด์ โดยทำเปรียบเทียบกับวิธี Widal test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ S.typhi ขึ้นมาใหม่ เพื่อใช้แทนวิธี Widal test โดยมีวัตถุประสงค์เป็นข้อๆ ดังนี้

1. เพื่อทดลองใช้ผงถ่านแทน latex หรือเม็ดเลือดแดงในการเคลือบด้วยแอนติเจนของเชื้อ S.typhi
2. เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับเคลือบ O และ H แอนติเจนบนผงถ่าน
3. เพื่อนำผงถ่านที่เคลือบด้วย O และ H แอนติเจนแล้วไปทดลองหาแอนติบอดีต่อเชื้อ S.typhi ในผู้ป่วยที่เป็นโรคไทฟอยด์ โดยทำเปรียบเทียบกับวิธี Widal test ในแง่ของ
   - ก. ความไว (Sensitivity)
   - ข. ความจำเพาะ (Specificity)
   - ค. ความคงตัว (Stability)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัสดุและวิธีการ

ซีรัม

Rabbit anti-S.typhi, titer = 1,280 ได้จากการฉีดกระต่ายด้วยเชื้อ S.typhi ซึ่งใช้เป็น positive serum control และใช้ทำ titration เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบ S.typhi แอนติเจนบนผงถ่าน

ซีรัมคนปกติ ได้จากนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ จำนวน 50 ราย

ซีรัมผู้ป่วยโรคต่างๆ ได้จากซีรัมของผู้ป่วยที่ส่งมาตรวจยังห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา หน่วยปฏิบัติการกลาง โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ มีดังนี้

ซีรัมของผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคไทฟอยด์	จำนวน	100 ราย
ซีรัมของผู้ที่เป็นโรคซิฟิลิส	จำนวน	20 ราย
ซีรัมของผู้ที่เป็นโรค Leptospirosis	จำนวน	14 ราย
ซีรัมของผู้ที่เป็นโรค Mycoplasma	จำนวน	5 ราย
ซีรัมของผู้ที่เป็นโรค Melioidosis	จำนวน	14 ราย
ซีรัมของผู้ที่เป็นโรค Rickettsia	จำนวน	13 ราย
ซีรัมของผู้ที่เป็นโรค Anti-streptolysin O positive	จำนวน	15 ราย
ซีรัมของผู้ที่เป็นโรคมาลาเรีย	จำนวน	19 ราย

ซีรัมทั้งหมดนี้เก็บไว้ที่ -20°ซ จนกว่าจะนำมาทดสอบต่อไป

การเตรียมผงถ่าน

นำถ่านหุงข้าวมาทำในครกหินจนมีขนาดเล็กเป็นผง เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 2 เท่าของถ่าน บดในครกต่อไปอีกจนผงถ่านมีขนาดเล็กมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ หรือนำไปหยดใส่บนแผ่นกระจก แล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ดูว่ามีผงถ่านขนาดเล็กประมาณ 1-3 ไมครอน ถ้ามีมากพอให้ตักผงถ่านจากครกมาใส่ใน beaker ที่มีน้ำกลั่นใส่อยู่ก่อนแล้วประมาณ 10 เท่า คนให้เข้ากันให้ดี ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เทน้ำส่วนบนออกใส่ beaker อีกใบหนึ่ง ผงถ่านที่ติดอยู่ที่ก้นของ beaker ใบแรกให้รวบรวมเก็บไว้เพื่อนำไปบดให้ละเอียดอีกครั้ง ผงถ่านที่เทใส่ไว้ใน beaker ใบที่สองนั้นให้ตั้งทิ้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไว้อีกประมาณ 3-5 นาที แล้วเทน้ำส่วนบนใส่ไว้ใน beaker อีกใบหนึ่ง ทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งได้ผงถ่านที่มีขนาดเท่าๆ กัน (1-3 ไมครอน) เมื่อได้ผงถ่านที่มีขนาดตามต้องการแล้วให้นำมารวบรวมไว้ใน beaker ใบเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้อีก 1 คืน เมื่อครบกำหนดแล้วให้เทน้ำส่วนบนซึ่งเป็นผงถ่านที่มีขนาดเล็กเกินไปทิ้งไป แล้วนำผงถ่านที่เตรียมได้นี้นำไปปั่นที่ 1,500 g นาน 10 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้งไป นำผงถ่านที่ตกตะกอนไปละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นประมาณ 10% ส่วนตะกอนขนาดใหญ่ที่แยกออกในตอนแรกๆ ให้นำมารวมกันแล้วนำไปบดอีกครั้งจนได้ขนาดตามต้องการ

<u>การเตรียมแอนติเจน</u>

1. การเตรียมแอนติเจนชนิด polysaccharide (O-Ag)

นำเชื้อ <u>S.typhi</u> จาก stock มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (trypticase soy broth) เป็นเวลา 18-24 ชม. เพื่อให้เชื้อเจริญ และแข็งแรงขึ้น (active) ใช้ไม้พันสำลี (swab) จุ่มเชื้อในอาหารเหลวแล้วนำมาละเลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (trypticase soy agar) นำไปอบไว้ที่ 37·ซ นาน 24-36 ชม. หลังจากเชื้อเจริญบนอาหารแข็งดีแล้ว เติมน้ำเกลือปกติที่ปราศจากเชื้อ (sterile) ลงไปบนจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 3-5 มล. ใช้ไม้พันสำลีขูดเชื้อให้หลุดออกจากอาหารแข็งแล้วใช้ Pasteur pipette ดูดเอาเชื้อมารวมกันไว้ใน flask นำเชื้อไปทำลายโปรตีนด้วยการ auto-clave ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว ความร้อน 121·ซ นาน 15 นาที นำเชื้อที่ผ่านการ autoclave ไปปั่นที่ความแรง 1,500 g นาน 15-20 นาที เก็บน้ำขุ่นขาวส่วนบนไว้ที่ -20·ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้

2. การเตรียมแอนติเจนชนิด whole Ag (H-Ag)

นำเชื้อ <u>S.typhi</u> มาเลี้ยงในอาหารเหลว (trypticase soy broth) ประมาณ 50 มล. อบไว้ที่ 37·ซ นาน 18 ชม. เพื่อเป็น seed culture นำเชื้อทั้งหมดนี้เติมลงในอาหารเหลวอีกครั้ง ปริมาตร 500 มล. เลี้ยงไว้ที่ 22-26·ซ นาน 24-36 ชม. หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 1,500 g นาน 20 นาที นำตัวเชื้อที่อยู่ข้างล่างไปล้างด้วยน้ำเกลือปกติ 3 ครั้ง แล้วทำเป็น 3-5% suspension ใน glycine buffer pH 8.2 (ภาคผนวก 1) แล้วนำตัวเชื้อไปทำให้แตกสลายด้วยเครื่อง sonicator (MSE SONIPREP 150) ที่ 400 watt นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 1,500 g นาน 20 นาที เก็บน้ำส่วนบนไว้ที่ -20·ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเคลือบ S.typhi antigen บนผงถ่าน

นำ 1 ส่วนของ 10% suspension ของผงถ่านซึ่งละลายอยู่ใน phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2 (ภาคผนวก 2) มาใส่ในหลอดทดลอง เติมแอนติเจน (O-antigen หรือ H-antigens) ลงในหลอดทดลอง 1 ส่วน เติม glycine buffer pH 8.2 ลงไปอีก 1 ส่วน นำไปเขย่าใน shaker bath 37·ซ นาน 1 ชม. เมื่อครบกำหนดแล้วนำมาปั่นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง สุดท้ายนำผงถ่านที่เคลือบแล้วมาทำเป็น 10% suspension ด้วย PBS ผสม 5% EDTA, pH 7.2 (ภาคผนวก 3) แล้วนำไปทดสอบต่อไป

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ O-Ag ที่เคลือบบนผงถ่าน

นำ polysaccharide antigen (O-Ag) มาเจือจางด้วย PBS, pH 7.2 ให้มีความเจือจางเป็น 2,4,8 และ 16 เท่าตามลำดับ จากนั้นนำแอนติเจนที่เจือจางแล้วในแต่ละความเข้มข้นมาเคลือบบนผงถ่านที่ความเข้มข้น 10% วิธีการเคลือบเหมือนกับที่กล่าวมาแล้ว หลังจากเคลือบแล้วนำมาทดสอบกับ rabbit anti-S.typhi serum (titer = 1,280) โดยเจือจางแอนติบอดีด้วย PBS, pH 7.2 เป็น 2,4,8,16,32,64 และ 128 เท่าตามลำดับ วิธีการทดสอบใช้แอนติบอดีหยดบนแผ่นสไลด์ 1 หยด เติมผงถ่านที่เคลือบด้วยแอนติเจนแล้ว 1 หยด ใช้ไม้จิ้มฟันกวนผสมให้เข้ากันแล้วยกแผ่นสไลด์เอียงไปมา นานประมาณ 2 นาที ดูว่าผงถ่านมีการจับกลุ่มกันหรือไม่ ถ้ามีการจับกลุ่มของผงถ่านเกิดขึ้นแสดงว่าผงถ่านนั้นมีแอนติเจนเคลือบติดอยู่ แต่ถ้าผงถ่านไม่มีแอนติเจนเคลือบติดอยู่ก็จะไม่เกิดการจับกลุ่มกันของผงถ่าน นอกจากนั้นขนาดของกลุ่มที่เกิดขึ้นยังแสดงถึงความมากน้อยของแอนติเจนที่ไปเคลือบบนผงถ่านด้วย ถ้าเคลือบได้มากก็จะเกิดการจับกลุ่มได้ขนาดใหญ่ ขนาดของกลุ่มแบ่งเป็นเกรดดังนี้

เกิดการจับกลุ่มของผงถ่าน 0-10% = negative agglutination

เกิดการจับกลุ่มของผงถ่าน 15-30% = 1+ agglutination

เกิดการจับกลุ่มของผงถ่าน 40-60% = 2+ agglutination

เกิดการจับกลุ่มของผงถ่าน 65-80% = 3+ agglutination

เกิดการจับกลุ่มของผงถ่าน 85-100% = 4+ agglutination

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H-Ag ที่เคลือบบนผงถ่าน

นำ whole antigen (H-Ag) มาเจือจาง และเคลือบบนผงถ่านเช่นเดียวกับการเคลือบ O-Ag แต่ใช้ coating-buffer เป็น glycine ผสมกับ 0.3% BSA, pH 8.2 (ภาคผนวก 4) แล้วทดสอบกับแอนติบอดีก็กระทำเช่นเดียวกัน

การเปรียบเทียบการใช้ coating-buffer

โดยใช้ buffer 2 ชนิดเปรียบเทียบกัน คือ glycine, pH 8.2 และ PBS, pH 7.2 สำหรับ O-Ag ใช้ glycine buffer, pH 8.2 เปรียบเทียบกับ PBS, pH 7.2 สำหรับ H-Ag ได้เปรียบเทียบกันระหว่าง PBS, pH 7.2 กับ PBS, pH 7.2 ที่มี 0.3% bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก 5) ผสมอยู่ด้วย และ glycine, pH 8.2 ที่มี 0.3% BSA ผสมอยู่ด้วย หลังจากเคลือบแอนติเจนบนผงถ่านใน buffer ที่กล่าวมาแล้ว ได้นำไปทดสอบกับ rabbit anti-S.typhi, titer 1,280 เปรียบเทียบ titer ที่ได้ ถ้า buffer ใดช่วยในการเคลือบได้ดีก็จะให้ titer ที่สูง

การนำผงถ่านที่เคลือบด้วยแอนติเจนไปทดสอบกับซีรัมของคนเป็นโรคต่างๆ

1. การทดสอบด้วยวิธี slide agglutination

นำผงถ่าน (10% suspension) ที่เคลือบด้วยแอนติเจนทั้ง O-Ag และ H-Ag มาทดสอบกับซีรัมของคนที่สงสัยว่าจะเป็นโรคไทฟอยด์, คนเป็นโรคอื่นๆ และคนปกติ โดยการเจือจางซีรัมแบบ serial two-fold dilution จาก 1:2 จนถึง 1:64 ด้วยน้ำเกลือบกติ นำซีรัมที่เจือจางแล้วนี้มา 1 หยด ใส่บนแผ่นสไลด์แก้ว แล้วเติมผงถ่านที่เคลือบด้วยแอนติเจน 1 หยด ใช้ไม้จิ้มฟันกวนแล้วยกแผ่นสไลด์เอียงไปมา ประมาณ 2 นาที อ่านผลการเกิดกลุ่มก้อนของผงถ่านดูไปจนถึง dilution สุดท้ายที่ยังเกิดการจับกลุ่ม 1+ ถือเป็น titer

2. การทดสอบด้วยวิธี microtiter set

นำซีรัมที่ต้องการทดสอบมาเจือจางใน microtiter plate (V-shape) โดยใช้ PBS เป็นตัวช่วยเจือจาง ใช้ผงถ่าน 0.3% suspension หยดใส่หลุมละ 1 หยด หลังจากเขย่าเพลทดีแล้วนำไปอบไว้ที่ 37·ซ 8-18 ชม. อ่านผลการเกิด agglutination โดยถือว่าที่ 50% agglutination เป็น end point

การตรวจหาระดับของแอนติบอดีต่อ S.typhi ด้วยวิธี Widal test

กระทำใน microtiter plate เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว แต่ใช้ U-plate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดสอบกับทั้ง O-Ag และ H-Ag การอ่านผลก็เช่นเดียวกับวิธีที่กล่าวมาแล้ว

การทดสอบ Stability test

โดยการเก็บผงถ่านที่เคลือบบนแอนติเจนแล้วไว้ในตู้เย็น (2-10 ซ) ทุกๆ 5 วัน นำออกมาทดสอบกับ positive serum control ซึ่งแบ่งเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (freezer) ทดสอบด้วยวิธี microplate agglutination ทำการทดสอบไปจนกว่า titer จะลดลง 2 dilution ติดต่อกัน 2 ครั้ง จึงถือว่าความคงตัวของแอนติเจนเสียไปแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง

จากการทดลองใช้แอนติเจนของเชื้อ S.typhi ทั้ง O-Ag และ H-Ag เคลือบบนผงถ่าน แล้วนำไปทดสอบกับแอนติบอดีต่อเชื้อดังกล่าว โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับวิธี Widal test ผลที่ได้เป็นที่น่าพอใจ ดังมีรายละเอียดของผลการทดลองดังนี้

ผลการหาปริมาณที่เหมาะสมของ O-Ag ในการเคลือบบนผงถ่าน

จากการนำแอนติเจนชนิด O-Ag ของเชื้อ S.typhi มาเจือจางด้วย PBS, pH 7.2 ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วเคลือบไว้บนผงถ่าน หลังจากนั้นนำมาทดสอบกับแอนติบอดีต่อเชื้อ S.typhi พบว่า O-Ag ที่เจือจางไป 8 เท่า (1:8) ให้ปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (agglutination) ได้สูงสุด คือเกิดปฏิกิริยา (1+) ได้สูงถึง 1:64 ของแอนติบอดี (ตารางที่ 1) จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้นนี้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

ผลการหาปริมาณที่เหมาะสมของ H-Ag ในการเคลือบผงถ่าน

จากการนำ H-Ag ของเชื้อ S.typhi มาเจือจางด้วย PBS, pH 7.2 ให้ความเข้มข้นต่างๆ กัน แล้วนำแต่ละความเข้มข้นไปเคลือบบนผงถ่าน หลังจากนั้นนำมาทดสอบกับแอนติบอดีต่อเชื้อ S.typhi พบว่า H-Ag ที่เจือจางไป 2 เท่า (1:2) ให้ปฏิกิริยาการจับกลุ่มได้สูงสุดกับแอนติบอดีที่เจือจางไปได้ถึง 64 เท่า (ตารางที่ 2) จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้นนี้ในการทดลองต่อๆ ไป

ผลการเปรียบเทียบการใช้ coating buffer

จากการเลือกใช้ PBS และ glycine buffer มาเป็นสารเพื่อช่วยในการเคลือบ O-Ag ของเชื้อ S.typhi บนผงถ่านหลังจากเคลือบแล้ว ได้นำมาทดสอบกับแอนติบอดีต่อเชื้อนี้ พบว่า coating buffer ทั้งสองชนิดสามารถช่วยเคลือบ O-Ag ได้พอ ๆ กัน (ตารางที่ 3) แต่ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ PBS, pH 7.2 เนื่องจาก PBS มีผู้ใช้กันอยู่แพร่หลายทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา

สำหรับการใช้ coating buffer กับการเคลือบ H-Ag ของเชื้อ S.typhi บนผงถ่าน พบว่าทั้ง PBS และ glycine buffer ทำให้ผงถ่านเกิดการจับกลุ่มกันเอง (autoagglutination) หลังจากการเคลือบทั้งๆ ที่ยังไม่ได้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี จึงต้องใช้ bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.3% ผสมปนไปกับ buffer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้งสองด้วย และพบว่าทั้ง PBS และ glycine ที่ผสมด้วย 0.3% BSA ให้ความแรงของปฏิกิริยาเท่าๆ กัน (ตารางที่ 4) ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ PBS ที่ผสมด้วย 0.3% BSA สำหรับการศึกษาต่อๆ ไป

ผลการนำผงถ่านที่เคลือบด้วยแอนติเจนไปทดสอบหาแอนติบอดี

ผงถ่านที่เคลือบด้วย O-Ag และ H-Ag ของเชื้อ S.typhi ได้นำไปทดสอบหาแอนติบอดีในซีรัมของคนที่สงสัยว่าจะเป็นโรคไทฟอยด์ 100 ราย คนปกติ 50 ราย และคนที่เป็นโรคอื่นๆ 100 ราย โดยการทดสอบด้วยวิธี carbon slide agglutination เปรียบเทียบกับวิธี Widal test โดยถือว่าวิธี carbon slide agglutination ให้ผลบวกที่ titer 4 หรือมากกว่า ส่วนวิธี Widal test ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานถือว่าให้ผลบวกที่ titer 80 หรือมากกว่าสำหรับ O-Ag และ titer 160 หรือมากกว่า สำหรับ H-Ag ปรากฏว่าผงถ่านที่เคลือบด้วย O-Ag ให้ผลบวกกับซีรัมของผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคไทฟอยด์ 36 รายใน 100 ราย ในขณะที่ Widal test ให้ผลบวก 45 ราย ซีรัมของคนที่เป็นโรคอื่นๆ ผงถ่าน-O-Ag ให้ผลลบทั้งหมด แต่ Widal test ให้ผลบวก 5 รายใน 100 ราย ส่วนซีรัมของคนปกติให้ผลลบทั้งสองวิธี (ตารางที่ 5) ซึ่งเมื่อรวมซีรัมทั้งหมดที่นำมาทดลอง 250 ราย ผงถ่าน-O-Ag ให้ผลบวก 36 ราย ในขณะที่ Widal test ให้ผลบวก 50 ราย ซึ่งใน 14 รายที่ให้ผลบวกต่อ Widal test ให้ผลบวกต่อ slide test ด้วย 4 ราย แต่ให้ปฏิกิริยาอ่อนๆ (weakly reactive)

สำหรับการหาแอนติบอดีต่อ H-Ag โดยถือเกณฑ์การตัดสินที่ titer 8 หรือมากกว่าเป็นบวก ปรากฏว่าซีรัมของผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคไทฟอยด์ให้ผลบวก 47 ราย ใน 100 ราย กลุ่มคนที่เป็นโรคอื่นๆ ให้ผลบวก 8 รายใน 100 ราย และซีรัมของคนปกติให้ผลลบทั้งหมด (50 ราย) ในขณะที่วิธี Widal test ให้ผลบวกกับซีรัมของผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคไทฟอยด์ 66 ราย กลุ่มคนที่เป็นโรคอื่นๆ ให้ผลบวก 17 ราย และคนปกติให้ผลบวก 6 ราย เมื่อคิดรวมทั้งหมดของซีรัม 250 ราย วิธี carbon slide agglutination ให้ผลบวก 55 ราย ส่วนวิธี Widal ให้ผลบวก 89 ราย (ตารางที่ 6)

ผลการหาความไวและความจำเพาะของแอนติเจนที่เคลือบไว้บนผงถ่าน

โดยวิธี carbon slide agglutination จากการนำแอนติเจนชนิด O-Ag ที่เคลือบบนผงถ่านไปทดสอบหาแอนติบอดีในกลุ่มคนที่สงสัยว่าจะเป็นโรคไทฟอยด์ 100 ราย คนเป็นโรคอื่นๆ 100 ราย และคนปกติ 50 ราย โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Widal test ปรากฏว่าถ้าถือว่าวิธี carbon slide agglutination ให้ผลบวกที่ซีรัมถูกเจือจางไป 2 เท่า, 4 เท่า และ 8 เท่า จะได้ค่าความไวเป็น 100%, 72% และ 27% ตามลำดับ และจะได้ค่าความจำเพาะเป็น 52%, 77% และ 100% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) สำหรับ H-Ag ที่เคลือบบนผงถ่านเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Widal test ถ้าถือผลบวกเมื่อเจือจางซีรัมไป 4 เท่า, 8 เท่า และ 16 เท่า จะได้ค่าความไวเป็น 100%, 62% และ 17% ตามลำดับ และจะได้ค่าความจำเพาะเป็น 61%, 83% และ 100% ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

โดยวิธี microplate agglutination (Widal) : จากการนำ O-Ag ที่เคลือบบนผงถ่านไปทดสอบหาแอนติบอดีในซีรัมคนดังกล่าวโดยวิธี microplate agglutination เปรียบเทียบกับวิธี Widal test ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในปัจจุบัน โดยถือว่าทั้งสองวิธีให้ผลบวกเมื่อได้ titer 80 หรือมากกว่าขึ้นไป ผลปรากฏว่าวิธี carbon microplate agglutination ให้ผลบวกในซีรัมของผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคไทฟอยด์ 41 รายใน 100 ราย ในคนเป็นโรคอื่นๆ ให้ผลบวก 3 รายใน 100 ราย และในคนปกติให้ผลลบทั้งหมด (ตารางที่ 7) ส่วนวิธี Widal ในซีรัมของผู้สงสัยไทฟอยด์ให้ผลบวก 45 ราย, ในคนเป็นโรคอื่น ๆ ให้ผลบวก 5 รายใน 100 ราย และในคนปกติให้ผลลบทั้งหมด ส่วน H-Ag ถือว่าให้ผลบวกเมื่อได้ titer 160 หรือมากกว่าขึ้นไป ผลปรากฏว่าให้ผลบวกกับซีรัมของคนที่สงสัยไทฟอยด์ 59 ราย, คนเป็นโรคอื่นๆ ให้ผลบวก 7 ราย และคนปกติให้ผลลบทั้งหมด (ตารางที่ 8) ส่วนวิธี Widal ให้ผลบวก 66 ราย, 17 ราย และ 6 ราย ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้ของทั้งสองวิธี O-Ag-carbon ให้ผลบวกตรงกับวิธี Widal 44 ราย และให้ผลลบตรงกัน 198 ราย ในขณะที่ O-Ag-carbon ให้ผลลบ 2 ราย แต่ Widal ให้ผลบวกและ Widal ให้ผลบวก 6 ราย แต่ O-Ag-carbon ให้ผลลบ (ตารางที่ 9) ซึ่งเมื่อนำตัวเลขมาคำนวณจะได้ค่า sensitivity = 88%, specificity = 99%, Positive predictive value = 95.6%, Negative predictive value = 97.1% และค่า Accuracy = 96.8%

สำหรับ H-Ag-Carbon เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Widal แล้วให้ผลบวกตรงกัน 66 ราย และผลลบตรงกัน 161 ราย มี 23 รายที่ Widal ให้ผลบวกแต่ H-Ag-Carbon ให้ผลลบ และไม่มี H-Ag-Carbon ให้ผลบวก แต่ Widal ให้ผลลบ (ตารางที่ 10) ซึ่งเมื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำนวณแล้วได้ค่า sensitivity = 74.2%, specificity = 100%, Positive predictive value = 100%, Negative predictive value = 87.5% และค่า Accuracy = 90.8%

การหาความคงตัว (stability)

จากการนำ O-Ag และ H-Ag ที่เคลือบไว้บนผงถ่านแล้วไปเก็บไว้ในตู้เย็น แล้วนำมาทดสอบหาแอนติบอดีกับ positive serum ทุกๆ 5 วัน พบว่าระดับของแอนติบอดีต่อ O-Ag ลดลงไป 2 dilution เมื่อเก็บไว้นาน 35 วัน ส่วนแอนติบอดีต่อ H-Ag ลดลง 2 dilution ตั้งแต่วันที่ 20 เป็นต้นไป จึงถือว่า O-Ag เก็บไว้ได้นาน 30 วัน ส่วน H-Ag เก็บได้นาน 15 วัน

ตารางที่ 1 แสดงการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ O-Ag สำหรับการเคลือบบนผงถ่าน

Serum dilution	O-Ag dilution				
	Und	1:2	1:4	1:6	1:16
1:2	4+	4+	4+	4+	4+
1:4	3+	3+	3+	3+	3+
1:8	2+	3+	3+	3+	3+
1:16	1+	2+	2+	2+	2+
1:32	wk	1+	1+	2+	1+
1:64	neg	wk	wk	1+	wk
1:128	neg	neg	neg	neg	neg

wk = weakly positive

neg = negative

und = undilute

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 แสดงการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H-Ag สำหรับการเคลือบบนผงถ่าน

Serum dilution	H-Ag dilution				
	Und	1:2	1:4	1:8	1:16
1:2	3+	4+	3+	2+	2+
1:4	3+	3+	3+	2+	2+
1:8	2+	2+	2+	2+	1+
1:16	2+	2+	2+	1+	wk
1:32	2+	2+	1+	1+	wk
1:64	1+	1+	wk	wk	neg
1:128	wk	wk	neg	neg	neg

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการใช้ coating-buffer ระหว่าง PBS กับ Glycine สำหรับการเคลือบ O-Ag บนผงถ่าน

Serum dilution	Coating-buffer	
	PBS	Glycine
1:8	3+	3+
1:16	2+	2+
1:32	2+	2+
1:64	1+	1+
1:128	neg	neg

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการใช้ coating-buffer ระหว่าง PBS กับ Glycine สำหรับการเคลือบ H-Ag บนผงถ่าน

Serum dilution	Coating-buffer		
	PBS	PBS + 0.3% BSA	Glycine + 0.3% BSA
1:8	aa	3+	3+
1:16	aa	3+	3+
1:32	aa	2+	2+
1:64	aa	1+	1+
1:128	aa	wk	wk

aa = autoagglutination

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 แสดงผลการนำ O-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธี slide agglutination เปรียบเทียบกับ Widal test

ซีรัม	จำนวน (ราย)	Carbon slide agg.		Widal	
		Positive (1:4)	Negative	Positive (1:80)	Negative
คนปกติ	50	0	50	0	50
สงสัยไทฟอยด์	100	36	64	45	55
Leptospirosis	14	0	14	1	13
Mycoplasma	5	0	5	0	5
Melioidosis	14	0	14	2	12
Rickettsiasis	13	0	13	1	12
ASO positive	15	0	15	0	15
มาลาเรีย	19	0	19	0	19
ซิฟิลิส	20	0	20	1	19
รวม	250	36	214	50	200

sensitivity = 72%

Specificity = 77%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 แสดงผลการนำ H-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธี slide agglutination เปรียบเทียบกับ Widal test

ซีรัม	จำนวน (ราย)	Carbon slide agg.		Widal	
		Positive (1:8)	Negative	Positive (1:160)	Negative
คนปกติ	50	0	50	6	44
สงสัยไทฟอยด์	100	47	53	66	34
Leptospirosis	14	1	13	2	12
Mycoplasma	5	0	5	0	5
Melioidosis	14	2	12	3	11
Rickettsiasis	13	2	11	4	9
ASO positive	15	1	14	2	13
มาลาเรีย	19	0	19	2	17
ซิฟิลิส	20	2	18	4	16
รวม	250	55	195	89	161

sensitivity = 62%

Specificity = 83%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 7 แสดงผลการนำ O-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี microplate agglutination เปรียบเทียบกับวิธี Widal test

ซีรัม	จำนวน (ราย)	Carbon slide agg.		Widal	
		Positive (1:80)	Negative	Positive (1:80)	Negative
คนปกติ	50	0	50	0	50
สงสัยไทฟอยด์	100	41	59	45	55
Leptospirosis	14	1	13	1	13
Mycoplasma	5	0	5	0	5
Mellioidosis	14	1	13	2	12
Rickettsiasis	13	0	13	1	12
ASO positive	15	0	15	0	15
มาลาเรีย	19	0	19	0	19
ซิฟิลิส	20	1	19	1	19
รวม	250	44	206	50	200

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 แสดงผลการนำ H-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี microplate agglutination เปรียบเทียบกับวิธี Widal test

ซีรัม	จำนวน (ราย)	Carbon slide agg.		Widal	
		Positive (1:160)	Negative	Positive (1:160)	Negative
คนปกติ	50	0	50	6	44
สงสัยไทฟอยด์	100	58	41	66	34
Leptospirosis	14	0	14	2	16
Mycoplasma	5	0	5	0	5
Melioidosis	14	2	12	3	11
Rickettsiasis	13	2	11	4	9
ASO positive	15	1	14	2	13
มาลาเรีย	19	0	19	2	17
ซิฟิลิส	20	2	18	4	16
รวม	250	66	184	89	161

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 9 แสดงผลที่ตรงกันและไม่ตรงกันของการนำ O-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม 250 ราย โดยทำการเปรียบเทียบกับวิธี Widal test

Microplate agglutination (carbon)	Widal test Positive (1:80)	Widal test Negative	Total
Positive(1:80)	44	2	46
Negative	6	198	204
Total	50	200	250

Sensitivity	=	88%
Specificity	=	99%
Positive predictive value	=	95.6%
Negative predictive value	=	97.1%
Accuracy	=	96.8%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส.ร.
616.0792
ป1179

เลขทะเบียน 131514 เลขหมู่
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตารางที่ 10 แสดงผลที่ตรงกันและไม่ตรงกันของการนำ H-Ag-Carbon ไปตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม 250 ราย โดยทำการเปรียบเทียบกับวิธี Widal test

Microplate agglutination (carbon)	Widal test Positive (1:160)	Widal test Negative	Total
Positive(1:160)	66	0	66
Negative	23	161	184
Total	89	161	250

Sensitivity	=	74.2%
Specificity	=	100%
Positive predictive value	=	100%
Negative predictive value	=	87.5%
Accuracy	=	90.8%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิจารณ์

การเตรียม O-Ag ที่ใช้ทำ Widal test นั้นเตรียมโดยการนำตัวเชื้อ S.typhi ที่เลี้ยงไว้บนอาหารแข็ง มาต้มที่ 100-ซ นาน 2 ชม. หรือนำตัวเชื้อมาเข้าเครื่อง autoclave แล้วนำตัวเชื้อมาปั่นล้างในน้ำเกลือ 3 ครั้ง ก็จะได้ O-Ag(7) ซึ่งเป็นตัวเชื้อที่ได้ทำลายส่วนของโปรตีนออกไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนของ H-Ag ฉะนั้น O-Ag จึงเป็น polysaccharide ที่อยู่บนผิว (cell wall) ของตัวเชื้อนั่นเอง ส่วนวิธีที่เตรียม O-Ag ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ใช้ส่วนของ polysaccharide ของน้ำที่อยู่ข้างบนหลังจาก autoclave ไม่ใช่ตัวเชื้อแต่เป็น polysaccharide ของตัวเชื้อแน่นอนอาจจะมีโปรตีนชนิดทนความร้อนปนอยู่ด้วยก็ได้ สำหรับ H-Ag ที่ใช้ใน Widal test นั้นเตรียมโดยการรักษาสภาพของตัวเชื้อไว้ทั้งหมดโดยการฆ่าเชื้อด้วย 95% แอลกอฮอล์ ซึ่งจะรักษาสภาพไว้ทั้งโปรตีนและ polysaccharide ส่วนการเตรียม H-Ag ที่ใช้ในการทดลองนี้หลังจากฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์แล้วนำตัวเชื้อไป sonicate แล้วปั่นแยกเอาน้ำส่วนบนมาใช้ ดังนั้น H-Ag จึงเป็นแอนติเจนรวมทั้งหมดของตัวเชื้อนั่นเอง

การไตเตรตหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ O-Ag และ H-Ag สำหรับไปเคลือบบนผงถ่าน จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นสูง ๆ (เจือจางน้อยๆ) กลับให้ปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ต่ำ (ตารางที่ 1,2) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า antigen excess zone คือ แอนติเจนเป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่และมีความยาว สมมุติว่าปกติแอนติเจนมีอยู่ 3 ส่วนที่จะจับกับผงถ่าน 1 เม็ด แต่ถ้ามีแอนติเจนมากเกินไปต้องเบียดกันกว่าจะจับกับผงถ่านได้จึงอาจจะจับได้เพียง 1 หรือ 2 ส่วนเท่านั้น เมื่อจับได้น้อยส่วนจึงจับกับผงถ่านได้ไม่แน่นพอ เมื่อแอนติบอดีมาจับกับแอนติเจนและมีการเขย่าด้วยจึงทำให้แอนติเจนหลุดออกจากผงถ่านได้ นั่นคือการเกิดการจับกลุ่มจะลดลงไปหรือไม่เกิดเลย ส่วนเมื่อเจือจางแอนติเจนไปมากๆ ก็จะเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้น้อยเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากมีแอนติเจนอยู่บนผงถ่านน้อย เมื่อแอนติบอดีเข้าไปจับจึงเกิดการจับเพื่อเชื่อมต่อ (cross-linking) ระหว่างผงถ่านต่อผงถ่านเป็นไปได้ยาก จึงเห็นการจับกลุ่มของผงถ่านได้น้อย

การทดลองนี้ไม่ได้หาปริมาณของแอนติเจนที่แน่นอนไว้ ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองแต่ละครั้งสภาวะของการเคลือบแตกต่างกันออกไป ซึ่งอาจจะมีผลต่อการเคลือบ ทางที่ดีควรทำการไตเตรตทุกครั้งของการเคลือบจะดีที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเปรียบเทียบการใช้ buffer ระหว่าง PBS กับ Glycine สำหรับเป็นสารช่วยเคลือบ (coating buffer) ที่เลือกใช้เพียงสองชนิดเท่านั้น เพราะว่าเคยศึกษาเปรียบเทียบกับ buffer ชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิดก็ดีสู้สองชนิดนี้ไม่ได้ จากผลการทดลองจะเห็นว่า buffer ทั้งสองชนิดนี้ช่วยเคลือบทั้ง O-Ag และ H-Ag ได้พอๆ กัน แต่สำหรับการเคลือบ H-Ag ถ้าไม่ผสม BSA ไว้ด้วยหลังเคลือบตอนปั่นล้างจะเกิดการจับกลุ่มกันเองของผงถ่านที่เรียกว่าเกิด autoagglutination (ตารางที่ 3,4) เป็นที่น่าสังเกตว่าการเคลือบ H-Ag ในขั้นตอนแรก คือ การไตเตรตเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้น (ตารางที่ 2) ไม่เกิดการจับกลุ่มกันเองของผงถ่าน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของ H-Ag ที่ใช้ในตารางที่ 2 และ 4 เป็นแอนติเจนที่เตรียมกันคนละครั้ง คงจะมีความเข้มข้นที่ต่างกัน ประกอบกับ H-Ag เป็นเซลล์แบคทีเรียทั้งเซลล์ที่นำมาทำให้แตกสลายเป็นชิ้นเล็กๆ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับ O-Ag ก็ยังมีขนาดใหญ่กว่ากันมากมาย H-Ag มีขนาดใหญ่จึงมีจุดหรือบริเวณ (binding site) ที่จะจับกับผงถ่านได้มาก ฉะนั้นโอกาสที่ H-Ag หนึ่งแอนติเจนจะไปจับกับผงถ่านได้มากกว่าหนึ่งจึงมีมาก เมื่อจับต่อกันไปเรื่อย ๆ ก็จะเกิดเป็นกลุ่มก้อนใหญ่ๆ ขึ้น จึงเกิด autoagglutination การที่ใส่ BSA ผสมลงไปใน buffer ที่ใช้ล้างก็เพื่อให้ BSA ไปจับกับ binding site ของผงถ่านแทนที่จะให้ H-Ag มาจับ จึงทำให้โอกาสของ H-Ag หนึ่งแอนติเจนจะไปจับกับผงถ่านได้มากกว่าหนึ่งนั้นน้อยลง หรือไม่เกิดเลย จึงทำให้ไม่เกิด autoagglutination

จากการนำ O-Ag ที่เคลือบบนผงถ่านไปทดสอบหาแอนติบอดีในซีรัมของกลุ่มคนต่างๆ กัน โดยใช้วิธี carbon slide agglutination เปรียบเทียบกับวิธี Widal test (microplate agglutination) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และยึดถือเกณฑ์การตัดสินว่าวิธี carbon agglutination นั้น ให้ถือผลบวกเมื่อซีรัมถูกเจือจางไป 4 เท่า หรือมากกว่าก็ยังให้ผลบวกอยู่ และเมื่อทดสอบกับซีรัมของคนปกติจะต้องให้ผลลบทั้งหมดหรือมีผลบวกบ้างแต่ก็ต้องน้อยที่สุด ในการทดลองนี้ถ้าถือเกณฑ์ที่เจือจางซีรัมไป 2 เท่าหรือมากกว่าเป็นบวก พบว่าซีรัมของคนปกติให้ผลบวก 8 ใน 50 รายนั่นคือมีผลบวกปลอม (flase positive) ถึง 16% แต่ถ้าเลือกที่ซีรัมเจือจาง 8 เท่าหรือมากกว่าเป็นบวก คนที่สงสัยเป็นโรคไทฟอยด์จะให้ผลบวกเพียง 21 ราย แทนที่จะเป็น 36 ราย (ตารางที่ 5) หรือมีค่าความไวเพียง 46.6% แทนที่จะเป็น 80% เมื่อเทียบกับ Widal test อย่างไรก็ตามที่เลือกเกณฑ์ตัดสินว่าผลบวกเมื่อเจือจางซีรัมไป 4 เท่า หรือมากกว่าก็ยังให้ความไวเพียง 72%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้งนี้คงเป็นเพราะวิธี slide agglutination นั้นมีความไวต่ำกว่าวิธี microplate agglutination อยู่แล้ว(8) แต่ด้วยความไว 72% นี้ถ้าไปใช้ในงานประจำวัน (routine work) เพื่อเป็นวิธีคัดกรอง (screening test) ก็พอถือว่าพอใช้ได้

แต่สำหรับ H-Ag ที่เคลือบบนผงถ่านแล้วนำไปตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้ slide agglutination เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Widal (microplate agglutination) ให้ความไวเพียง 62% ซึ่งต่ำกว่า O-Ag (72%) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะ H-Ag ที่เตรียมเป็นแอนติเจนรวมทั้งหมด ซึ่งได้จากการแตกสลายตัวเชื้อ เมื่อนำไปเคลือบบนผงถ่านจึงมีแอนติเจนอื่นๆ ไปเคลือบอยู่เป็นจำนวนมากด้วย แทนที่จะเป็น H-Ag เพียงอย่างเดียว แอนติบอดีจึงเข้าทำปฏิกิริยาได้ไม่ดีพอ(9) ทางที่ดีควรจะเตรียม H-Ag ให้บริสุทธิ์ (purification) เช่นหลังจากทำ sonication แล้ว ปั่นแยกเอาน้ำใสส่วนบนมาตกตะกอนโปรตีนแล้วผ่าน column chromatography นำเฉพาะส่วนของโปรตีน (H-Ag) ไปเคลือบบนผงถ่าน ก็น่าจะได้ H-Ag ไปเคลือบบนผงถ่านมากขึ้น

การนำ O-Ag และ H-Ag ที่เคลือบบนผงถ่านแล้วนำไปตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ S.typhi โดยวิธี microplate agglutination เปรียบเทียบกับวิธี Widal test ซึ่งก็เป็นวิธี microplate agglutination เช่นเดียวกัน ได้ความไว 88% และ 74.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 9,10) จะเห็นว่าความไวยังไม่สูงเท่าที่ควร ทั้งๆ ที่ทดสอบโดยวิธีเดียวกัน นั่นแสดงว่าการเคลือบแอนติเจนทั้งสองบนผงถ่านยังไม่ดีพอ ยังต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม ทั้งในแง่ของขบวนการเตรียมแอนติเจนเพื่อให้ได้แอนติเจนที่บริสุทธิ์และมีจำนวนมากพอ ตลอดจนวิธีการเคลือบแอนติเจนบนผงถ่าน เช่น อาจจะต้อง treat ผงถ่านก่อนด้วยกรดหรือด่างเพื่อเป็นการเพิ่มประจุบนผงถ่าน ซึ่งอาจจะช่วยให้จับกับแอนติเจนได้มากขึ้นและแน่นขึ้นหรืออาจจะต้องใช้สารที่มี bifunctional group ช่วยจับเชื่อมระหว่างผงถ่านกับแอนติเจน เช่น ใช้สาร bis-diazotized benzidine เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

1. Gilman RH, Terminal M, Levine MM, Mendosa P and Horich RB. Relative efficiency of blood, urine, rectal swab, bone marrow and rose spot culture for recovery of Salmonella typhi in typhoid fever. Lancet 1:1211-3, 1975.
2. Gerald TK. Typhoid fever : Braude AI, Davis CE, Fierer J. in Infectious disease and Medical microbiology. Philadelphia. W.B Saunder. p.1189-95, 1986.
3. Abraham G, Tekhi B, Gedebin M, Selassie GH and Azene G. Diagnosis value of the Widal test. Trop. Geogr. Med. 33 : 329-32, 1981.
4. Reynold DW, Carpenter RL and Simon WH. Diagnostic Specificity of Widal's reaction of typhoid fever. JAMA 214 : 2192-6, 1970.
5. Lim PL. A one step two particle latex immunoassay for the detection of Salmonella typhoid endotoxin. J. Immunol. Methods 135 : 257-9, 1990.
6. Mekara Y, Maneekarn N, Vithayasai V and Makonkawkeyoon S. Determination of antibody from typhoid patients against lipopolysaccharide and protein antigen of Salmonella typhi. Asia. Pac. J. Allergy Immunol. 8:95-101, 1990.
7. Kwapinsky JBG. Methodology of immunochemical and immunological research. John Wley & Son, Inc. New York, 1972.
8. Thaiyanan P and Susiriwattananon Y. Preparation of DNA-latex kit for detection of antinuclear antibodies. Bull. Chiang Mai AMS. 24(2):73-80, 1991.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. Park BA and Good RA. Principles of Modern Immunology : Basic and Clinical. Lea and Febiger. Philadelphia, p.117-118, 1974.

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	8.50 g
NaN_3	1.00 g

adjust pH to 8.2 with 1 N NaOH, distilled water to 1000 ml.

2. 0.15 M Phosphate buffer saline, pH 7.2

NaCl	8.0 g
Na_2HPO_4	1.15 g
KCl	0.2 g
KH_2PO_4	0.2 g

adjust pH to 7.2, distilled water to 1,000 ml.

3. Phosphate buffer saline + 5% EDTA, pH 7.2

NaCl	4.0 g
Na_2PHO_4	0.575 g
KCl	0.1 g
KH_2PO_4	0.1 g
EDTA	25.0 g

adjust pH to 7.2, distilled water to 500 ml.

4. Glycine buffer + 0.3% BSA, pH 8.2

Glycine	7.51 g
NaCl	8.5 g
NaN_3	1.0 g
BSA	3.0 g

adjust pH to 8.2 with 1 N NaOH, distilled water to 1,000 ml.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. Phosphate buffer saline + 0.3% BSA, pH 7.2

NaCl	8.0 g
Na_2HPO_4	1.15 g
KCl	0.2 g
KH_2PO_4	0.2 g
BSA	3.0 g

adjust pH to 7.2, distilled water to 1,000 ml.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติและประสบการณ์ของผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปกรณ์ ไทยานันท์

เกิด วันที่ 4 ตุลาคม 2493

ที่ทำงาน ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษา วท.ม. ปี 2519 คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

วท.บ. ปี 2517 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประสบการณ์การทำงาน

อาจารย์ประจำภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาจารย์พิเศษภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาจารย์พิเศษคณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาจารย์พิเศษคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาจารย์พิเศษวิทยาลัยพลศึกษาเชียงใหม่

อาจารย์พิเศษมหาวิทยาลัยพายัพ

ประสบการณ์ทางวิชาการ

ได้รับรางวัลชมเชยในการประกวดงานวิจัยของสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2521
งานวิจัยที่ส่งเข้าประกวด เรื่อง "โรคพิษสุนัขบ้า"

ปัจจุบันทำงานวิจัยด้าน Serodiagnosis โดยเฉพาะทางด้าน Passive agglutination

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved