บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาวิธีเตรียมแอนติเจน

เตรียมแอนติเจนจากเชื้อ *Leptospira biflexa* serovar patoc ที่เพาะเลี้ยงใน EMJH medium และนำแอนติเจนที่ได้มาหาปริมาณโปรตีน จาก 4 วิธีที่ทำการศึกษาพบว่าแอนติเจนที่เตรียมโดยวิธีที่ใช้ความร้อนเป็นเวลา 10 นาที และแช่แข็งที่ –20^{O}C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้ว sonicate 20 kHz 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เป็นจำนวน 3 รอบ (ระยะเวลาโดยรวม 24 ชั่วโมง) จะให้ปริมาณแอนติเจนมากกว่าวิธีอื่น จึงเลือกใช้วิธีดังกล่าวในการเตรียมแอนติเจนสำหรับการทดสอบ

2. ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี IgM dot-ELISA

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี IgM dot-ELISA ใช้ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAT ที่ระดับ titer 1:100 และ 1:200 และซีรัมที่ให้ผลลบโดยวิธี MAT มาทดสอบด้วยวิธีของ Tansuphasiri U และคณะ (Tansuphasiri U. 2005 : 391-7) โดยสภาวะที่เหมาะสมซึ่งต้องการศึกษาประกอบด้วย ความเข้มข้นของแอนติเจน ระดับความเจือจางของซีรัม และระดับความเจือจางของคอนจูเกต

2.1 ความเข้มข้นของแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราที่เหมาะสม

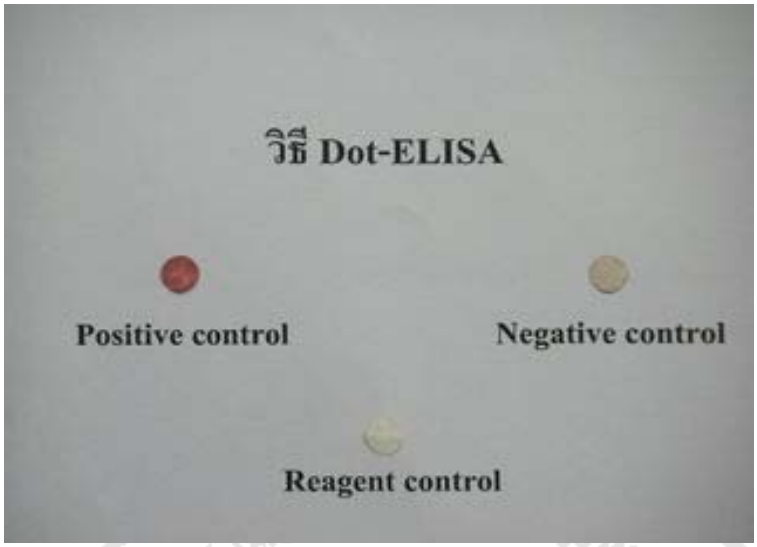
เมื่อนำแอนติเจนที่เตรียมได้มาปรับระดับความเข้มข้นต่างๆ นำไปใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leptospira* ด้วยวิธี IgM dot-ELISA ผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมคือ 0.3 μg/10 μl แสดงผลดังภาพที่ 1-3

2.2 ระดับความเจือจางที่เหมาะสมของซีรัมที่ต้องการทดสอบ

เมื่อเจือจางตัวอย่างซีรัมในระดับต่างๆแล้วนำมาทดสอบ พบว่าระดับความเจือจางของซีรัมที่เหมาะสมคือ 1:100 แสดงผลดังภาพที่ 1-3

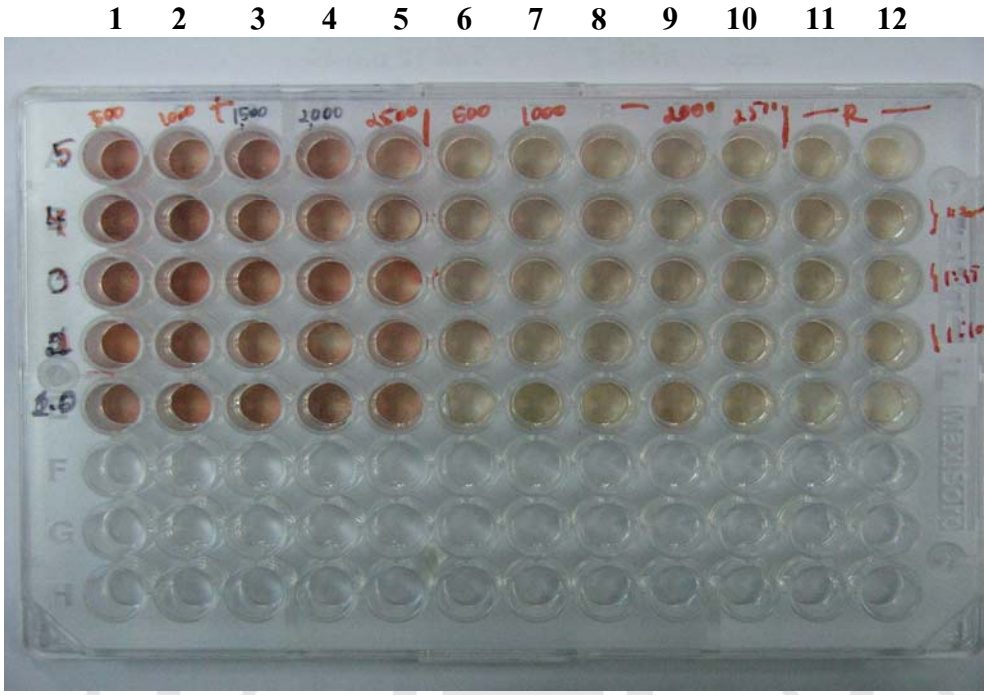
2.3 ระดับความเจือจางที่เหมาะสมของคอนจูเกต

เมื่อเจือจาง goat anti–human IgM horseradish peroxidase conjugate ที่ระดับต่างๆแล้วนำมาทดสอบ พบว่า ระดับความเจือจางของคอนจูเกตที่เหมาะสม คือ 1:1,000 แสดงผลดังภาพที่ 1-3



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบในกลุ่ม positive control, negative control และ reagent control

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี IgM dot-ELISA

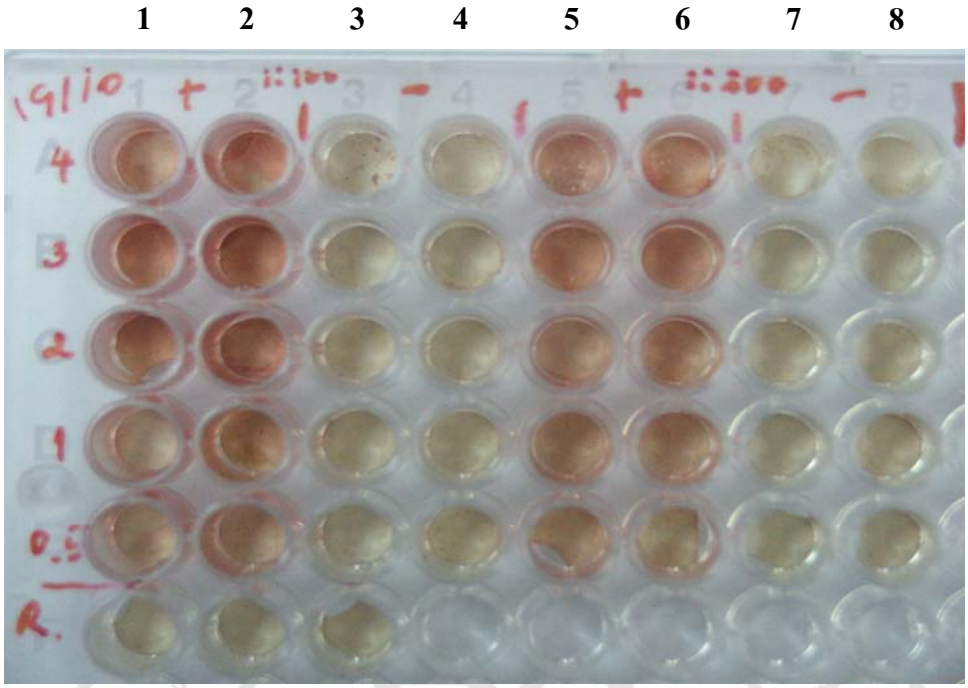
แถว 1-5 ใช้ซีรัมควบคุมผลบวก โดยเจือจางคอนจูเกตเป็น 1:500, 1:1,000, 1:1,500, 1:2,000 และ 1:2,500 ตามลำดับ

แถว 6-10 ใช้ซีรัมควบคุมผลลบ โดยเจือจางคอนจูเกตเป็น 1:500, 1:1,000, 1:1,500, 1:2,000 และ 1:2,500 ตามลำดับ

แถว 11-12 reagent blank

แถว A, B, C, D, E ใช้แอนติเจนที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 μg/10 μl ตามลำดับ

R = reagent blank



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี IgM dot-ELISA

แถวที่ 1, 2, 5, 6 ใช้ซีรัมควบคุมผลบวก

แถวที่ 3, 4, 7, 8 ใช้ซีรัมควบคุมผลลบ

แถวที่ 1-4 ระดับความเจือจางของซีรัมเป็น 1 : 100

แถวที่ 5-8 ระดับความเจือจางของซีรัมเป็น 1 : 200

แถว A, B, C, D, E ใช้ระดับความเข้มข้นแอนติเจนเป็น 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 และ 0.05 μg / 10 μl ตามลำดับ

แถว F เป็น reagent blank

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี IgM dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้น สามารถสรุปได้ดังนี้คือ นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสมาตัดเป็นวงกลม presoke ในน้ำกลั่น 5 นาที แล้วนำมาผึ่งให้แห้ง นำไปวางในไมโครเพลทชนิด flat bottom จากนั้นหยดแอนติเจนที่สกัดได้ โดยนำมาปรับความเข้มข้นให้เป็น 0.3 µg/10µl แล้วล้างด้วย PBS-T จำนวน 200 µl 3 ครั้งๆละ 5 นาที จากนั้นเติมซีรัมทดสอบที่เจือจางเป็น 1:100 จำนวน 100 µl ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS-T จำนวน 200 µl 3 ครั้งๆละ 5 นาที เติม 5%BSA เพื่อบล็อกจำนวน 100 µl ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีแล้วเติมคอนจูเกตที่เจือจาง 1:1,000 จำนวน 100 µl ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS-T จำนวน 200 µl 3 ครั้งๆละ 5 นาที จากนั้นเติม AEC substrate จำนวน 100 µl แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา ทิ้งไว้ 5 นาที นำมาผึ่งให้แห้งและอ่านผลจุดสีที่เกิดขึ้นเทียบกับจุดควบคุมผลบวกและลบ

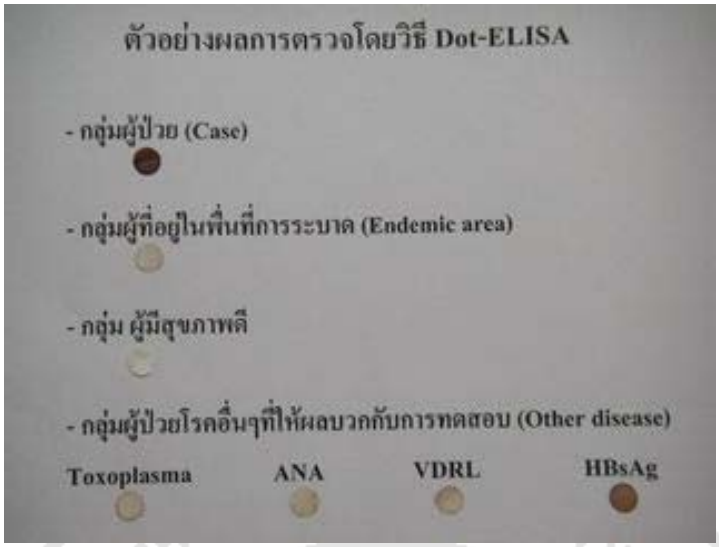
3. ผลการตรวจซีรัมกลุ่มตัวอย่างควบคุมและกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วย

แสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบซีรัมกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส

ประเภทซีรัม	จำนวน	ผลการตรวจด้วยวิธี IgM dot-ELISA	
		ผลบวก	ผลลบ
ซีรัมผู้ป่วย (Case)			
1. Acute sera	10	10	0
2. Acute + Convalescence sera (Paired sera)	40	27	13
รวม	50	37	13
ซีรัมควบคุม (Control)			
1. กลุ่มที่ผู้ในพื้นที่การระบาด	24	1	24
2. กลุ่มผู้ป่วยโรคอื่นๆ	24	4	17
3. กลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี	35	0	35
รวม	80	5	75

จากกลุ่มตัวอย่างควบคุมทั้ง 3 กลุ่ม พบว่ากลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีให้ผลลบกับวิธี IgM dot-ELISA ทั้งหมด ในขณะที่กลุ่ม endemic area ให้ผลบวกปลอมจากตัวอย่างซีรัมของผู้ที่อยู่ในพื้นที่จังหวัดชัยภูมิ 1 ตัวอย่าง กลุ่มผู้ป่วยด้วยโรคอื่นๆมีผลบวกปลอมเกิดขึ้น 4 ตัวอย่างประกอบด้วยตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับการตรวจ HBsAg, AntiHBs, AntiHCV และ βHCG รวมผลบวกปลอมที่เกิดขึ้น ทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง



ภาพที่ 4 ตัวอย่างผลการตรวจโดยวิธี IgM dot-ELISA

4. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธี IgM dot-ELISA

เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมด 130 ตัวอย่างไปทดสอบกับวิธี IgM dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้นโดยเปรียบเทียบกับลักษณะอาการทางคลินิก เพื่อคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าคาดหวังผลลบ และประสิทธิผลของวิธี IgM dot-ELISA แสดงผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์เปรียบเทียบซีรัมผู้ป่วยและซีรัมควบคุมที่ตรวจโดยวิธี IgM dot-ELISA

ผลการทดสอบโดยวิธี IgM dot-ELISA	ซีรัม		รวม
	ผู้ป่วย n = 50	ควบคุม n = 80	
Positive	37	5	42
Negative	13	75	88
รวม	50	80	130

นำผลจากตารางที่ 6 มาคำนวณเพื่อหาประสิทธิภาพของวิธี IgM dot-ELISA ได้ดังนี้

ความไว	= 37 / 50 x 100	= 74.0%
ความจำเพาะ	= 75 / 80 x 100	= 93.7%
ค่าทำนายผลบวก	= 37 / 42 x 100	= 88.1%
ค่าทำนายผลลบ	= 75 / 88 x 100	= 85.2%
ประสิทธิผล	= 37+75 / 130 x 100	= 86.1%

เมื่อทดสอบความสอดคล้องระหว่างสองวิธีด้วยสถิติทดสอบ Kappa analysis (**K**) พบว่าวิธี IgM dot-ELISA มีความสอดคล้องในระดับดี (**K** = 0.70) และมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับผลการวินิจฉัยทางคลินิก