

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. แอนติเจนที่ใช้ในการศึกษา

แอนติเจนที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยแอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ แอนติเจนของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*, *Leptospira interrogans* และ *Orientia tsutsugamushi* แสดงวิธีการเตรียมแอนติเจนแต่ละชนิดดังนี้

การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

1. Streak เชื้อลงบน blood agar นำไป incubate ที่ 37°C นาน 24-48 ชั่วโมง
2. ใช้ loop ตะเชื้อจาก blood agar นำไป inoculate ลงใน TSB แล้ว incubate ที่ 37°C 24-48 ชั่วโมง
3. ปั่นตกตะกอนเชื้อด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 4,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง
4. ล้างเชื้อด้วย 0.85% NSS 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 4,000 rpm นาน 5 นาที คูด่วนใสทิ้งไป ทำซ้ำเช่นเดิม 3 ครั้ง
5. เจือจางเชื้อ โดยเติม 0.85% NSS ให้มีความขุ่นเท่ากับ Macfarland No. 0.5
6. เติม 20% yolk sac 2 µl ต่อ 1 ml ของเชื้อที่เจือจางแล้ว ในข้อ 5 แล้วผสมให้เข้ากัน
7. เก็บเชื้อไว้ที่ -20°C ถึง -70°C ได้นาน 1 ปี

การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira interrogans*

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar *Sejroe*, *Bratislavar*, *Louisiana* และ *Autumnalis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Ellinghausen and McCullough, modified by Johnson and Harris) EMJH medium ที่อุณหภูมิ 28-30°C ในที่มืดเป็นเวลา 5-7 วัน
2. ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ปริมาณ 200 Leptospiras/40x เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด
3. คูด่วนบนของเชื้อแต่ละซีโรวาร์มาผสมอัตราส่วน 1:1:1:1 ผสมให้เข้ากัน และเติม 20% yolk sac ปริมาณ 2 µl ต่อส่วนผสมของเชื้อ 1 ml ผสมให้เข้ากัน
4. เก็บเชื้อไว้ที่ -20°C ถึง -70°C ได้นาน 1 ปี

การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *Orientia tsutsugamushi*

1. นำเชื้อ *O. tsutsugamushi* แต่ละ strain (Kato, Gilliam และ Karp) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัย Mahidol – Oxford Tropical Research Unit : MORU) คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล มาผสมในอัตราส่วน 1:1:1

2. เก็บเชื้อไว้ที่ -20°C ถึง -70°C ได้นาน 1 ปี

การเตรียมสไลด์สำหรับการตรวจด้วยวิธี IgM IFA

1. เตรียมสไลด์หลุมปราศจากเชื้อ โดยแช่สไลด์หลุมด้วยแอลกอฮอล์ 30 นาที แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง

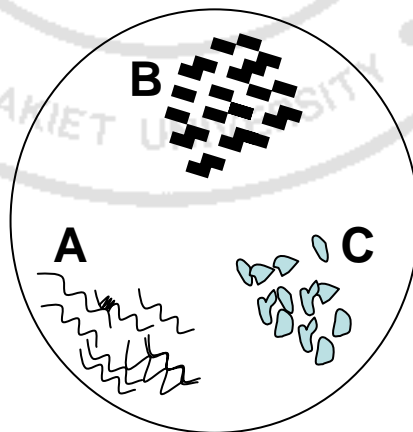
2. นำแอนติเจนแต่ละชนิดที่ผสมแล้วมาละลาย (thaw) หรือทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง

3. ใช้ autopipette ดูดเชื้อ *L. interrogans* 0.5 μl เริ่มหยดลงเบาๆ ทางด้านซ้ายก่อนไปทางด้านล่างของหลุม ผึ่งให้แห้งสนิท นาน 30 นาที สังเกตจะเห็นเป็นวงฝ้าสีขาวที่ขอบหลุม

4. ใช้ autopipette ดูดเชื้อ *B. pseudomallei* 0.5 μl หยดลงเบาๆ ทางด้านบนของหลุมเหนือเชื้อ *L. interrogans* ผึ่งให้แห้งสนิท 30 นาที

5. ใช้ autopipette ดูดเชื้อ *O. tsutsugamushi* 0.5 μl หยดลงเบาๆ ทางด้านขวาของหลุม ระมัดระวังอย่าให้เชื้อไหลมารวมกัน ผึ่งให้แห้งสนิท 30 นาที แอนติเจนที่เคลือบแล้วแสดงดังรูปที่ 1

6. เก็บสไลด์ที่เคลือบเชื้อแล้วที่ -20°C ถึง -70°C



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งการเคลือบแอนติเจนลงบนหลุมของสไลด์ A; *Leptospira interrogans*

B; *Burkholderia pseudomallei* C; *Orientia tsutsugamushi*

2. วิธีการดำเนินการ

2.1 ขั้นตอนการทำ screening test

2.1.1 นำสไลด์ที่เคลือบด้วยแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *L. interrogans*, *B. pseudomallei* และ *O. tsutsugamushi* จาก -70°C มาผึ่งให้แห้ง

2.1.2 เจือจาง serum ลงใน microtiter U plate ให้ได้อัตราส่วน 1:50 (serum 4 μl + PBS pH 7.4 196 μl), 1:100 (diluted serum 1:50 จำนวน 50 μl + PBS pH 7.4 50 μl), 1:200, 1:400, 1:800 และ 1:1,600

2.1.3 หยด PBS pH 7.4 ปริมาตร 10 μl ลงบนสไลด์หลุมที่ 1 เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control)

2.1.4 หยด diluted serum 1:1,600, 1:800, 1:400, 1:200, 1:100 และ 1:50 ปริมาตร 10 μl ลงบนสไลด์หลุมที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ แล้ววางลงใน moist chamber จากนั้นนำไป incubate ที่ 37°C นาน 45 นาที

2.1.5 ล้างแอนติเจนและแอนติบอดีส่วนเกิน โดยนำสไลด์วางใน Coplin jar ที่เติม PBS pH 7.4 จนท่วมสไลด์ แล้วนำไปเขย่าล้างด้วยเครื่อง rotator ที่ความเร็ว 100 rpm นาน 5 นาที ค่อย ๆ ริน PBS ออกจาก Coplin jar จนหมด ทำเช่นเดิม 3 ครั้งแล้วผึ่งสไลด์ให้แห้ง

2.1.6 เจือจาง IgM conjugate ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC 1:40 (เตรียมในปริมาณที่ต้องการในแต่ละครั้ง)

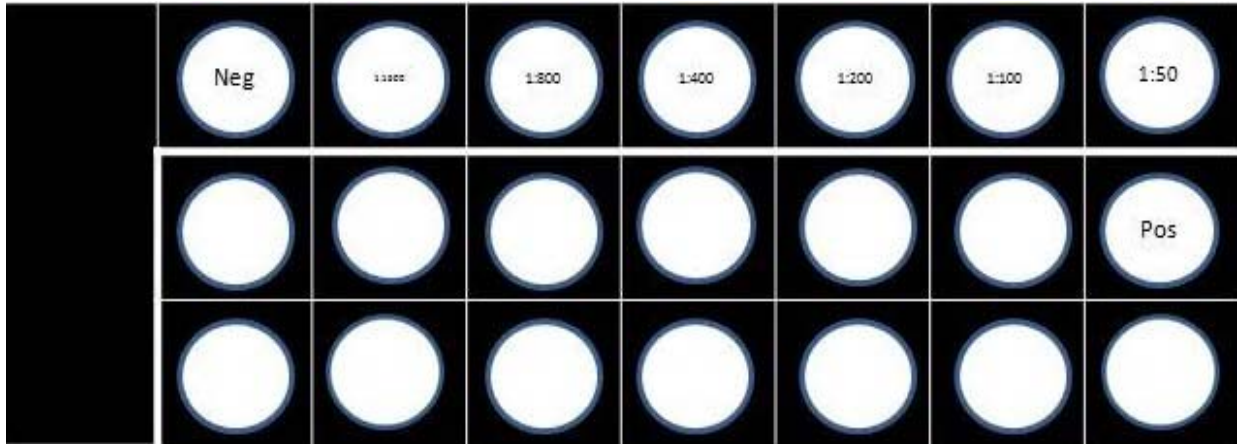
2.1.7 เจือจาง Evan blue ในอัตราส่วน 1 : 8 ด้วย PBS pH 7.4 โดยผสม Evan blue ที่เจือจางแล้ว ในอัตราส่วน 2 μl ต่อ diluted conjugate 1 ml.

2.1.8 หยด conjugate ที่ผสมกับ Evan blue ลงในหลุมที่เคลือบแอนติเจนแล้วหลุมละ 10 μl

2.1.9 นำสไลด์ที่หยด conjugate แล้ว วางใน moist chamber นำไป incubate 37°C นาน 45 นาที

2.1.10 ล้าง conjugate ส่วนเกินออกโดยนำสไลด์วางใน Coplin jar ที่เติม PBS pH 7.4 จนท่วมสไลด์ แล้วนำไปเขย่าล้างด้วย rotator ที่ความเร็ว 100 rpm นาน 5 นาที ค่อย ๆ ริน PBS ออกจาก Coplin jar จนหมด ทำเช่นเดิม 3 ครั้งแล้วผึ่งสไลด์ให้แห้ง

2.1.11 Mount slide โดยหยด glycerine buffer pH 8.0-9.0 จำนวน 2 หยด แล้วปิดทับด้วย cover slip ขนาด 24 x 60 mm นำไปอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์



รูปที่ 2 ตำแหน่งการหยด diluted serum ลงบนสไลด์หลุม

3. การอ่านผล

อ่านผลการเรืองแสงเมื่อเติม conjugate ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ซึ่งเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้เลนส์ขนาด 20x การอ่านผลบวกจะดูการเรืองแสงที่ค่อยจางลงจนกลายเป็นผลลบจากระดับ dilution ต่างๆ อ่านผล dilution สุดท้ายของหลุมที่เห็นการเรืองแสงเป็นค่า titer ของการทดสอบ ซึ่งแสดงลักษณะผลบวกดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 วิธีการอ่านผล positive และ negative ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

| เชื้อ | Positive | Negative |
|-------------------------|--|---|
| <i>L. interrogans</i> | ตัวเชื้อบิดเป็นเกลียวที่สม่่าเสมอเรืองแสงสีเขียวคล้ายเส้นด้าย | ไม่พบการเรืองแสง |
| <i>B. pseudomallei</i> | ตัวเชื้อลักษณะ coccobacilli เรืองแสงสีเขียว | ไม่พบการเรืองแสงเรืองแสงสีเขียว |
| <i>O. tsutsugamushi</i> | ตัวเชื้อมีลักษณะเกาะกลุ่มเรืองแสงสีเขียวเหลืองในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน จะเห็นตัวเซลล์ติดสีแดงของ Evan blue | ไม่พบการเรืองแสงของเชื้อแต่เห็นเซลล์ติดสีแดงของ Evan blue |

4. การแปลผล

ผลการทดสอบจะได้ค่าตัดสินผลบวกและลบ (cut off) แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การแปลผล positive และ negative จากค่า cut off

| โรค | Positive (titer) | Negative (titer) |
|---------------|------------------|------------------|
| เลปโตสไปโรซิส | $\geq 1:100$ | $< 1:100$ |
| เมลิออยโดซิส | $\geq 1:200$ | $< 1:200$ |
| สกริปไทฟัส | $\geq 1:400$ | $< 1:400$ |

5. ตัวอย่างซีรัมทดสอบ

ตัวอย่างซีรัมทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 จำนวนซีรัมทดสอบทั้งกลุ่ม case และกลุ่ม control

| ซีรัม | จำนวน (ตัวอย่าง) |
|---|------------------|
| กลุ่ม Case รวม 93 ตัวอย่าง | |
| โรคเลปโตสไปโรซิส | 35 |
| โรคเมลิออยโดซิส | 30 |
| โรคสกริปไทฟัส | 28 |
| กลุ่ม Control รวม 107 ตัวอย่าง | |
| ผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่โรคกลุ่ม case | 72 |
| ผู้มีสุขภาพดี | 21 |
| ผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาด | 14 |
| รวมทั้งสิ้น | 200 |

6. สถิติการวิจัย

ศึกษาความไว ความจำเพาะ ประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ IgM indirect immunofluorescence assay (IgM-IFA) ของแอนติเจน 3 ชนิดเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่าน การวินิจฉัยว่าเป็นกลุ่ม case และกลุ่ม control โดยใช้สถิติไคสแควร์ (χ^2) และสถิติแคปปา (K) (คู่มือสถิติการวิจัย. 2539)