บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

1. แอนติเจนที่ใช้ในการศึกษา

ใช้เชื้อ *Leptospira biflexa* serovar patoc ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก สำหรับเตรียมเป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้

การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อ *Leptospira biflexa* serovar patoc ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน EMJH (Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris) medium และนำเชื้อที่ได้มาทดสอบหาปริมาณแอนติเจน โดยผู้วิจัยได้ศึกษาวิธีการเตรียมแอนติเจน 4 วิธี เพื่อหาวิธีที่เตรียมแอนติเจนได้ปริมาณมากที่สุด ได้แก่

1.1.1 นำแอนติเจนมาผ่านความร้อน 10 นาที แล้วนำมาแช่แข็งที่ –20^{O}C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำแอนติเจนที่ได้มา sonicate 20 kHz 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที (ระยะเวลาโดยรวมประมาณ 8 ชั่วโมง)

1.1.2 นำแอนติเจนมาผ่านความร้อน 10 นาที แล้วนำมาแช่แข็งที่ –20^{O}C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำแอนติเจนที่ได้มา sonicate 20 kHz 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เป็นจำนวน 3 รอบ (ระยะเวลาโดยรวมประมาณ 24 ชั่วโมง)

1.1.3 นำแอนติเจนไปแช่แข็งที่ -20 ^{O}C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำไป sonicate 20 kHz 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที โดยไม่ผ่านความร้อน (ระยะเวลาโดยรวมประมาณ 8 ชั่วโมง)

1.1.4 นำแอนติเจนไปแช่แข็งที่ -20 ^{O}C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำไป sonicate 20 kHz 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที โดยไม่ผ่านความร้อน เป็นจำนวน 3 รอบ (ระยะเวลาโดยรวมประมาณ 24 ชั่วโมง)

นำแอนติเจนที่ได้จากทั้ง 4 วิธี มาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (Bradford MM. 1976 : 248-54)

2. ตัวอย่างซีรัมทดสอบ

คำนวณกลุ่มตัวอย่างจากสูตรการคำนวณ (อมร ลีลารัศมี. 2532 : 31-49) ดังนี้

$$N = \frac{(15.4)P(1-P)}{(R-L)^2}$$

โดยที่ N = จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ เป็น case หรือ control

R = ค่าคาดหวังสูงสุดของความไวของวิธีการ dot ELISA = 98.9% = 0.989

ค่าคาดหวังสูงสุดของความจำเพาะของวิธีการ dot ELISA = 97.5% = 0.975

L = ค่าคาดหวังต่ำสุดของความไวของวิธีการ dot ELISA = 81.3% = 0.813

ค่าคาดหวังต่ำสุดของความจำเพาะของวิธีการ dot ELISA = 81.3% = 0.813

P = ค่าเฉลี่ยความไวของวิธีทดสอบ โดยวิธี dot ELISA = 90.1% = 0.901

ค่าเฉลี่ยความจำเพาะของวิธีทดสอบ โดยวิธี dot ELISA = 89.4% = 0.894

โดยการคำนวณหาจำนวน case จะใช้ ค่าความไว และการคำนวณหาจำนวน control จะใช้ค่าความจำเพาะ จากรายงานการวิจัย (Ribeiro. 1995 : 452-6, Pappas MG. 1985 : 1015-11, Tansuphasiri U. 2005 : 391-7) ได้จำนวนตัวอย่างดังนี้

กลุ่มซีรัมผู้ป่วย $= \frac{(15.4)(0.901)(0.099)}{(0.989-0.813)^2} =$ 45 ตัวอย่าง

กลุ่มซีรัมจากบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส $= \frac{(15.4)(0.894)(0.106)}{(0.975-0.813)^2} =$ 56 ตัวอย่าง

จากนั้นผู้วิจัยจึงจัดหาและรวบรวมตัวอย่างซีรัมเพื่อใช้ในการศึกษาประกอบด้วยกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วย (case) ซึ่งเป็นตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสจำแนกเป็นซีรัมในระยะเฉียบพลันและซีรัมในระยะทุเลาจำนวน 50 ตัวอย่าง นำมาทดสอบด้วยวิธี MAT ร่วมกับการวินิจฉัยอาการทางคลินิก และ กลุ่มควบคุม (control) ซึ่งจำแนกเป็นตัวอย่างซีรัมของผู้ที่มีสุขภาพดี ตัวอย่างซีรัมของผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด และตัวอย่างซีรัมของผู้ที่ป่วยด้วยโรคอื่นๆ ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบที่เกี่ยวข้องกับโรคนั้นๆ จำนวน 80 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 130 ตัวอย่าง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มควบคุม (control) จำนวน 80 ตัวอย่าง		
ผู้มีสุขภาพดี 35 ตัวอย่าง	ผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด 24 ตัวอย่าง	ผู้ที่ป่วยด้วยโรคอื่นๆ 21 ตัวอย่าง
ตัวอย่างซีรัมของผู้ที่ไม่ได้อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดและไม่มีประวัติของการเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสมาก่อน ได้จากประชาชนในจังหวัดสมุทรปราการที่มารับการตรวจสุขภาพกับหน่วยบริการชุมชนของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	ตัวอย่างซีรัมของผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดและไม่มีอาการของโรคได้แก่ - จังหวัดสกลนคร - จังหวัดมหาสารคาม - จังหวัดชัยภูมิ - จังหวัดเลย ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลจังหวัดดังกล่าว	ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ Anti-HCV, β-hCG, Anti-HBs, HBsAg, Anti-DNA, ANA, Widal test, TPHA, VDRL, Rubella Ab, CRP, Melioidosis, Dengue IgG, Cryptococcal Ag, *E. histolytica* Ab, *Toxoplasma* Ab ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทศูนย์แล็บธนบุรีจำกัด
กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส (case) จำนวน 50 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากอาการทางคลินิกว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก		
- Paired sera 40 ตัวอย่าง (20 คู่)	- Acute serum 1 ตัวอย่าง	- Convalescence sera 9 ตัวอย่าง
รวมจำนวนตัวอย่างซีรัมทั้งสิ้น 130 ตัวอย่าง		

นอกจากนี้ยังได้จัดเตรียมซีรัมควบคุมผลบวกและซีรัมควบคุมผลลบเพื่อใช้ในการศึกษา ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

- ซีรัมควบคุมผลบวก คือตัวอย่างซีรัมระยะเฉียบพลัน ที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAT และ IFA และได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าป่วยเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 3 ตัวอย่างจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก นำมาผสมรวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง

- ซีรัมควบคุมผลลบ คือตัวอย่างซีรัมของผู้ที่มีสุขภาพดีที่ให้ผลลบต่อการทดสอบโดยวิธี MAT และ IFA จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 1 ตัวอย่าง

3. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี IgM dot-ELISA (Checkerboard titration)

3.1 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราที่เหมาะสม

นำแอนติเจนที่เตรียมได้มาคำนวณระดับความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Bradford แล้วปรับระดับความเข้มข้นโดยเจือจางใน coating buffer (0.05 M Carbonate buffer pH 9.6) เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.05 μg, 0.1 μg, 0.2 μg, 0.3 μg และ 0.4 μg/10 μl จากนั้นนำแอนติเจนความเข้มข้นต่างๆ 10 μl มา dot ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ที่ผ่านการชุบในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที

ก่อนจะนำมาซับให้แห้งแล้วนำมาวางในไมโครเพลทชนิด flat bottom เพื่อความสะดวกในขั้นตอนการทดสอบและการล้าง จากนั้นทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี IgM dot-ELISA

3.2 การตรวจหาระดับความเจือจางที่เหมาะสมของซีรัมที่ต้องการทดสอบ

เจือจางตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและซีรัมควบคุมผลลบอย่างละ 1 ตัวอย่าง ใน PBS ที่มี 1% BSA ให้เป็น 1:100 และ 1:200 แล้วนำมาทดสอบโดยใช้แอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆตามข้อ 3.1 โดยหยดซีรัมที่เจือจาง 100 µl ลงบนแอนติเจนแต่ละความเข้มข้นบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมเขย่า แล้วล้างด้วย PBS-T (0.1% Tween) โดยใช้เครื่องปั๊มสุญญากาศดูดและปล่อยบัฟเฟอร์จากหลุมไมโครเพลทซึ่งมีกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่เคลือบด้วยแอนติเจนวางอยู่

3.3 การหาระดับความเจือจางที่เหมาะสมของคอนจูเกต

เจือจาง goat anti–human IgM horseradish peroxidase conjugate ใน PBS ที่มี 5%BSA ให้เป็น 1:1,000 และ 1:2,000 นำมาทดสอบ กับแอนติเจนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆตามข้อ 3.1 และซีรัมที่เจือจางให้เป็น 1:100 และ 1:200 โดยหยดคอนจูเกตลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส จำนวน 100 µl ต่อ 1 ตัวอย่าง incubate แล้วล้างด้วย PBS-T (0.1% Tween) โดยใช้เครื่องปั๊มสุญญากาศดูดและปล่อยบัฟเฟอร์จากหลุมไมโครเพลท จากนั้นเติม AEC (3-amino-9 ethylcarbazole) substrate ซึ่งเตรียมจาก stock AEC (AEC 0.05 g ละลายใน N,N-Dimethylformamide 12.5 ml) จำนวน 1 ml ผสมกับ 0.1 M Acetate buffer pH 5.2 จำนวน 15 ml และ 3% H_2O_2 จำนวน 10 µl นำสารละลายสับสเตรทที่เตรียมได้ มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 100 µl ต่อ 1 ตัวอย่าง incubate แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น อ่านผลโดยดูสีด้วยตาเปล่า ผลบวกจะให้สีชมพูเมื่อเทียบกับสีของ reagent control และผลลบจะไม่มีสีหรือมีสีชมพูจางๆหรือติดเพียงบริเวณรอบๆวง

ดังนั้น ขั้นตอนของการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IgM dot-ELISA สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leptospira* โดยวิธี IgM dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้น

ขั้นตอน	สภาวะที่ใช้ทดสอบ
1. นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสมาตัดเป็นวงกลม presoke ในน้ำกลั่น 5 นาที แล้วนำมาผึ่งให้แห้ง นำไปวางในไมโครเพลทชนิด flat bottom	
2. หยดแอนติเจน	ความเข้มข้น 0.05 μg, 0.1 μg, 0.2 μg, 0.3 μg และ 0.4 μg/10 μl
3. ล้างด้วย PBS - T	200 μl, 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
4. เติม 5% BSA	100 μl, 30 นาที
5. เติมซีรัม	1:100, และ 1:200 จำนวน 100 μl, 30 นาที
6. ล้างด้วย PBS -T	200 μl, 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
7. เติม 5% BSA	100 μl, 30 นาที
8. เติม คอนจูเกต	1:1,000 และ 1:2,000 จำนวน 100 μl, 30 นาที
9. ล้างด้วย PBS -T	200 μl, 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
10. เติม AEC substrate	100 μl, 5 นาที
11. เติมน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา	5 นาที

4. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธี IgM dot-ELISA

4.1 ทดสอบวิธีกับซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 50 ตัวอย่าง

4.2 ทดสอบวิธีกับซีรัมผู้ที่ไม่ใช่ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 80 ตัวอย่าง

นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) และประสิทธิผลของวิธีทดสอบ (efficacy) โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้จากวิธี IgM dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับผลการตรวจวินิจฉัยทางคลินิก

5. การแปลผลข้อมูล

อ่านผลการเกิดสีบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยเปรียบเทียบกับสีที่เกิดขึ้นกับ positive control และสีที่เกิดกับ negative control

6. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ใช้สถิติเชิงพรรณนาและวิเคราะห์หาความสอดคล้องระหว่างวิธีทดสอบโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติ SPSS version 9.0