บทที่ 3

ผลการทดลอง

จะรายงานเป็น 2 ส่วนดังนี้

I. ผลของการพัฒนาวิธีการตรวจ

II. ผลของการตรวจตัวอย่างจากผู้ป่วย

I. ผลของการพัฒนาวิธีการตรวจ

1. การตรวจด้วยวิธีอิมมูนฟลูออเรสเซนท์

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำยาที่ใช้ในการย้อมได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 จากตารางจะเห็นว่าที่ความเจือจางของ a-RSV เป็น 1:10 และของ conjugate เป็น 1:10 และที่ a-RSV เป็น 1:20 และ conjugate เป็น 1:10 นั้น การเรืองแสงของเซลล์ที่ติดสีจะมีความเข้มสูง (4+) แต่ก็พบว่าการเรืองแสงของพื้น (background) จะสูงด้วยเช่นกัน ซึ่งอาจทำให้รบกวนการอ่านผลได้ แต่เมื่อเจือจาง conjugate ลงก็จะพบว่าการเรืองแสงของพื้นก็ลดลงด้วยตามลำดับ และที่ความเจือจางของ a-RSV เป็น 1:10 และ conjugate เป็น 1:30 พบว่าความเข้มของการเรืองแสงของเซลล์ที่ติดเชื้อยังคงสูงอยู่ในขณะที่การเรืองแสงจากพื้นน้อยมาก ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเด่นชัดมาก ส่วนในความเข้มข้นอื่นแม้ค่าการเรืองแสงจากพื้นจะน้อยแต่ความเข้มของการเรืองแสงของเซลล์ที่ติดเชื้อก็น้อยตามไปด้วย ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ a-RSV คือที่เจือจางเป็น 1:10 และของ conjugate ที่เจือจางเป็น 1:30

2. การตรวจด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงโดยวิธีเชลล์ไวอัล (shell vial technique)

2.1 ศึกษาถึงความแรงของการปั่น

การศึกษาความแรงของการปั่นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 จากตารางจะเห็นว่าเมื่อไม่ปั่นจะสามารถตรวจพบไวรัสได้ที่

dilution 10^{-3} แต่เมื่อเพิ่มแรงปั่นเข้าไปเป็น 50 g การตรวจพบไวรัสนั้นแม้จะพบที่ dilution เดียวกัน แต่จำนวนที่พบไวรัสจะมีมากกว่าคือ O-1/LPF และ O-1/HPF ตามลำดับ เมื่อเพิ่มแรงปั่นก็จะพบไวรัสได้มากขึ้นคือพบได้ใน dilution ที่สูงขึ้นเช่นกัน นั่นคือที่ 210 g พบที่ 10^{-4} ส่วนที่ 700 g, 1,300 g และ 1,900 g นั้น จะพบไวรัสที่ dilution เดียวกันคือที่ 10^{-5} แต่ปริมาณที่พบจะแตกต่างกันเล็กน้อย นั่นคือที่ 700 g จะพบจำนวนน้อยกว่าที่ 1,300 g และที่ 1,900 g ส่วนที่ความแรง 2 ค่าสุดท้ายนั้นจะพบว่าปริมาณการพบไวรัสไม่แตกต่างกัน ดังนั้นความแรงที่เหมาะสมสำหรับการทำการตรวจนี้จึงเลือกใช้ที่ 1,300 g

2.2 ศึกษาถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการปั่น

เมื่อทดลองเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในการปั่นที่ 4°ซ. และที่ 25°ซ. นั้นผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งจะเห็นว่าการตรวจพบไวรัส ไม่แตกต่างกัน นั่นคือตรวจพบไวรัสที่ dilution 10^{-5} เช่นกัน ดังนั้นจึงสามารถที่จะปั่นได้ทั้งที่ 4°ซ. และที่ 25°ซ. แต่เมื่อพิจารณาถึงความสะดวกของการใช้งานแล้วการปั่นที่อุณหภูมิ 25°ซ. นี้จะสะดวกมากกว่า ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการตรวจนี้จึงเลือกใช้ที่ 25°ซ.

2.3 ศึกษาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการปั่น

โดยทำการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการปั่นเป็น 30 นาที, 60 นาที , 90 นาที และ 120 นาที ตามลำดับ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 5 จากตารางจะเห็นว่าเมื่อปั่นนาน 30 นาทีจะตรวจพบไวรัสที่ dilution 10^{-4} แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 60 นาทีจะพบไวรัสที่ 10^{-5} และไม่เพิ่มขึ้นอีกเลยแม้จะใช้เวลาเพิ่มขึ้นเป็น 90 นาที หรือ 120 นาที ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการปั่นที่เลือกใช้คือปั่นนาน 1 ชม.

2.4 ศึกษาถึงระยะเวลาที่จะตรวจพบแอนติเจนของไวรัสในเซลล์

เมื่อทำการปั่นเพื่อให้ไวรัส adsorp เข้าสู่เซลล์แล้วได้ทดลองนำแผ่นแก้วออกมาย้อม IFA เพื่อดูการปรากฏมีแอนติเจนของไวรัสในเซลล์ที่เวลา 0, 4, 8, 10, 14, 18, 24, 36 และ 72 ชม. ตามลำดับ พบว่าที่เวลา 0, 4 และ 8 ชม. นั้นไม่ปรากฏว่ามีไวรัสในเซลล์เลย จะเริ่มพบไวรัสที่เวลา 10 ชม.หลัง การ

adsorp โดยจะพบการเรืองแสงของเซลล์เห็นเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ กระจายอยู่ทั่ว ๆ ไป เช่นเดียวกับการพบที่เวลา 14, 18 และ 24 ชม. แต่เมื่อใช้เวลาเป็น 36 ชม. จะเริ่มเห็นมีการเรืองแสงของเซลล์เป็นกลุ่ม ๆ เช่นเดียวกับที่ 72 ชม. ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาไวรัสเลือกใช้เป็นช่วง 18-24 ชม. คือ incubate ข้ามคืนนั่นเอง

จากผลที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ พอสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา RSV ด้วยการเพาะเลี้ยงโดยวิธีเซลล์ไวอัล คือ การ adsorpเข้าสู่เซลล์ของไวรัสจะอาศัยการปั่นที่ความแรง 1,300 g อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้น incubate ที่ 37°ซ. เป็นเวลา 18-24 ชม. แล้วนำเอาแผ่นแก้วออกมาย้อม IFA เพื่อตรวจหาแอนติเจนไวรัส

3. การตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

3.1 ความเข้มข้นของน้ำยาที่ใช้ จากการทดลองเจือจางน้ำยาให้มีความเข้มข้นที่ต่างกัน เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมมาใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจด้วยวิธีนี้ต่อไป ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7 ซึ่งควรเลือกเคลือบ plate ที่ปริมาณโปรตีนเป็น 10 ไมโครกรัม/มล. และเจือจาง biotinylated-anti-RSV เป็น 1:4,000 ส่วน avidin conjugated peroxidase เจือจางเป็น 1:7,000 เป็นความเข้มข้นของน้ำยาที่เหมาะสมที่เลือกใช้

3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบ plate

3.2.1 อุณหภูมิที่ใช้เคลือบ เมื่อทดลองเคลือบ plate ที่อุณหภูมิต่างๆกัน นั่นคือเคลือบที่ 4°ซ.(ตู้เย็น) นาน 18-24 ชม. อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ). 37°ซ. และ 37°ซ. (waterbath) นาน 2 ชม. ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 8 จะเห็นว่าค่าผลต่างของ OD (ΔOD) ของ RSV positive control เมื่อเคลือบที่อุณหภูมิห้องจะให้ค่าน้อยสุดคือได้ 0.946 ที่ 37°ซ.(waterbath) ได้ค่า 1.036 ส่วนที่อุณหภูมิ 4°ซ. และที่ 37°ซ. จะให้ค่าที่ใกล้เคียงกันคือ 1.051 และ 1.046 สำหรับค่าผลต่างของ OD ของ RSV negative control นั้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน จากผลที่ได้นี้แม้ว่าค่า ΔOD ที่อุณหภูมิ 4°ซ. จะมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 37°ซ. เล็กน้อย แต่เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้

แล้วนั้น จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 4°ซ. ใช้เวลานานกว่ามากดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบ plate คืออุณหภูมิ 37°ซ.

3.2.2 เวลาที่ใช้เมื่อเคลือบ plate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. โดยทดลองเคลือบ plate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลานาน 30 นาที 1 ชม. 2 ชม. และ 3 ชม. ตามลำดับ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 9 จะเห็นว่าค่าผลต่างของ OD ที่ได้จาก RSV negative control นั้นให้ค่าที่ไม่แตกต่างกัน แต่ค่าผลต่างของ OD ที่ได้จาก RSV positive control นั่นมีค่าเรียงลำดับดังนี้ 0.960, 1.055, 1.066 และ 1.113 เมื่อนำค่าเหล่านี้ไปเขียนกราฟจะได้ดังกราฟรูปที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าค่าผลต่างของ OD เมื่อเคลือบ plate นาน 1 ชม. 2 ชม. และ 3 ชม. ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมนี้เลือกใช้ที่ เวลา 1 ชม.

3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม RSV antigen

3.3.1 อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา เมื่อทดลองใช้อุณหภูมิและเวลาสำหรับทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 ซึ่งจะเห็นว่าค่าผลต่างของ OD ของ RSV negative control ให้ค่าไม่แตกต่างกัน ส่วนค่าผลต่างของ OD ของ RSV positive control มีค่าดังนี้คือที่ อุณหภูมิ 37°ซ. และ 37°ซ. (waterbath) มีค่าใกล้เคียงกันคือ 1.299 และ 1.273 ตามลำดับ ที่ 4°ซ. และอุณหภูมิห้องมีค่า 1.601 และ 1.593 ตามลำดับ จากค่าที่ได้นี้ พอสรุปได้ว่าอุณหภูมิที่ดีสำหรับปฏิกิริยาในขั้นนี้คือที่ 4°ซ. และที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ) แต่เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาแล้วพบว่าที่อุณหภูมิห้องจะใช้เวลาน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 4°ซ. มาก ดังนั้นจึงเลือกให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 เวลาที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา เมื่อให้ปฏิกิริยาทำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที 1 ชม. 2 ชม. และ 3 ชม. ตามลำดับ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11 ซึ่งค่าผลต่างของ OD ของ RSV negative control นี้ไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนค่าผลต่างของ OD ของ RSV positive control มีค่าเป็น 0.817,

1.300, 1.612 และ 1.699 ตามลำดับ และเมื่อนำค่าเหล่านี้ไปเขียนกราฟ จะได้ดังกราฟรูปที่ 2 จากกราฟจะเห็นว่าเวลา 2 ชม. และ 3 ชม. กราฟจะเข้าสู่เนวระนาบ คือมีความแตกต่างกันของค่าผลต่างของ OD น้อย ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมที่เลือกใช้คือที่เวลานาน 2 ชม.

3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม biotinylated anti-RSV

3.4.1 อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา เมื่อทดลองให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°ซ. นาน 18-24 ชม. ส่วนที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.), 37°ซ. และ 37°ซ.(waterbath) ให้ทำปฏิกิริยานาน 1 ชม.เท่ากัน ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งจะเห็นว่าค่าผลต่างของ OD ของ RSV negative control ที่ได้จากปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°ซ. และ 37°ซ.(waterbath) จะมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ4°ซ. และอุณหภูมิห้อง สำหรับค่าผลต่างของ OD ของ RSV positive control นั้น ค่าที่ได้จากอุณหภูมิห้องและ 37°ซ.(waterbath) มีค่าใกล้เคียงกันคือ 1.427 และ 1.421 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37°ซ.มีค่า 1.305 ส่วนที่อุณหภูมิ 4°ซ. ค่า OD ที่ได้มีค่าสูงมากซึ่งสูงเกิน 2.000 ซึ่งเครื่องไม่สามารถอ่านได้ จากผลที่ได้นี้แสดงว่าปฏิกิริยาในขั้นนี้จะเกิดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 4°ซ. ซึ่งถ้าเลือกใช้ที่อุณหภูมินี้ต้องเจือจางน้ำยาลงมาเพื่อให้ได้ค่า OD ที่สามารถอ่านค่าได้ทำให้ประหยัดน้ำยาลงได้ แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาพบว่าจะต้องใช้เวลานาน 18-24 ชม. ในขณะที่ถ้าใช้อุณหภูมิอื่นจะใช้เวลาเพียง 1 ชม. และเมื่อพิจารณาถึงความเจือจางของ biotinylated anti-RSV ที่ใช้นี้ (1:4,000) ก็เป็นความเจือจางที่สูงอยู่แล้ว ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมจึงควรจะเลือกที่ใช้เวลาน้อย ซึ่งมีที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 37°ซ.(waterbath) ซึ่งให้ค่าผลต่างของ OD ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อคำนึงถึงความสะดวกในการทำการทดลองแล้ว อุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับปฏิกิริยาในขั้นนี้เลือกใช้ที่อุณหภูมิห้อง

3.4.2 เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา โดยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที 1 ชม. 2 ชม. และ 3 ชม. ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 13 โดยที่ค่าผลต่างของ OD ของ RSV negative control มีค่าไม่แตกต่าง

กัน ส่วนค่าผลต่างของ OD ของ RSV positive control มีค่า 0.754, 1.180, 1.373 และ 1.801 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเหล่านี้ไปเขียนกราฟจะได้ดังกราฟรูปที่ 3 ซึ่งเมื่อพิจารณาจากกราฟแล้วจะเห็นว่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาในขั้นนี้คือใช้เวลานาน 1 ชม.

3.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม avidin conjugated peroxidase

3.5.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เมื่อทดลองใช้อุณหภูมิและเวลาสำหรับทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 14 ซึ่งค่าผลต่างของ OD ของ RSV negative control นั้นได้ไม่แตกต่างกัน สำหรับค่าของผลต่างของ OD ของ RSV positive control ได้ผลคล้ายกับปฏิกิริยาในขั้นตอนของ biotinylated anti-RSV ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาในขั้นนี้จึงเลือกใช้ที่อุณหภูมิห้อง

3.5.2 เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา ทดลองทำปฏิกิริยานาน 30 นาที 1 ชม. 2 ชม. และ 3 ชม. ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 15 ซึ่งค่าผลต่างของ OD ของ RSV negative control ให้ค่าที่ไม่แตกต่างกัน และค่าผลต่างของ OD ของ RSV positive control มีค่าเป็น 0.788, 1.045, 1.212 และ 1.362 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเหล่านี้ไปเขียนกราฟจะได้ดังกราฟรูปที่ 4 ซึ่งจะเห็นว่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาในขั้นนี้คือใช้เวลานาน 1 ชม.

3.6 ศึกษาถึงเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยาการเกิดสี

เมื่อทดลองทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ และ substrate ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดนาน 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 4N H_2SO_4 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 16 เมื่อพิจารณาค่าจากตารางจะเห็นว่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาในขั้นนี้คือใช้เวลานาน 15 นาที เนื่องจากเป็นเวลาที่ผลบวกและผลลบ แตกต่างกันอย่างชัดเจน และค่าการจับแบบไม่จำเพาะ (background) มีค่าต่ำ

3.7 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำยาต่าง ๆ ที่ใช้ทำปฏิกิริยา

เมื่อทำการเจือจางน้ำยาให้มีความเข้มข้นที่ต่าง ๆ กันแล้วนำ มาทำปฏิกิริยากันตามขั้นตอนต่างๆโดยแต่ละขั้นตอนจะทำในสภาวะที่เหมาะสมที่หาได้แล้วนั้น เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทำการทดสอบต่อไป ซึ่งได้ผลดังแสดงใน ตารางที่ 17 และ 18

สำหรับตารางที่ 19 จะเป็นตารางที่แสดงถึงสภาวะ และความ เข้มข้นของน้ำยาที่เหมาะสมในการตรวจหาRSV antigen ด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา สำหรับการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งมีความเที่ยงตรง (precision) และมีความเชื่อถือได้ (reproducibility) สูง ดังแสดงในตารางที่ 20 และ 21 ตามลำดับ

II. ผลของการตรวจหา RSV จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย

จากการเพาะแยกเชื้อ RSV ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในเซลล์ ด้วยวิธี ธรรมดา พบว่าสามารถตรวจพบ CPE ได้ในวันที่ 3 หลังการเพาะเลี้ยง โดยเฉลี่ยแล้ว จะตรวจพบในราววันที่ 5-6 หลังการเพาะเลี้ยง

จากการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ในคนไข้เด็กจำนวน 133 ราย โดยทำการตรวจด้วยวิธี indirect immunofluorescence,biotin-avidin-ELISA, การเพาะแยกเชื้อด้วยวิธี cell culture และ วิธี shell vial technique ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 22 โดยที่วิธี IFA ให้ผลบวก 36 ราย ผลลบ 97 ราย, biotin-avidin ELISA ให้ผลบวก 40 ราย ลบ 93 ราย, cell culutre ให้ผลบวก 32 ราย ผลลบ 101 รายและวิธี shell vial ให้ผลบวก 45 ราย และผลลบ 88 ราย ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธี shell vial นี้ให้ผลบวกมากที่สุด รองลงมาคือวิธี biotin-avidin-ELISA, IFA และ cell culture เป็นวิธีที่ให้ผลบวกน้อยสุด โดยที่ผลบวกที่ได้จากวิธี หลังทั้ง 3 วิธีนี้ ทุกรายจะให้ผลบวกกับวิธี shell vial ซึ่งสามารถถือได้ว่าเป็นผลบวก จริง เนื่องจากเป็นวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัสแล้ววิเคราะห์ยืนยันด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับ RSV

เมื่อเปรียบเทียบการแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธีธรรมดา และวิธี shell vial พบว่าให้ผลบวกตรงกัน 32 ราย และวิธี shell vial ให้ผลบวกมากกว่าวิธีเพาะ

เลี้ยงธรรมดา 13 ราย ไม่มีคนไข้รายใดที่ให้ผลลบด้วยวิธี shell vial แล้วให้ผลบวกด้วยวิธีเพาะเลี้ยงแบบธรรมดาเลยดังแสดงในตารางที่ 23 ซึ่งแสดงว่าวิธี shell vial นี้เป็นวิธีที่ไม่ปรากฏว่ามีผลลบปลอม และเมื่อเทียบกับการเพาะแยกเชื้อด้วยวิธี shell vial แล้ว การเพาะแยกเชื้อด้วยวิธีธรรมดาจะมีความไว 71.0 % ความจำเพาะ 100 %

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจด้วยวิธี biotin-avidin-ELISA กับวิธี shell vial พบว่าให้ผลบวกตรงกัน 40 ราย และวิธี biotin-avidin-ELISA ให้ผลบวกน้อยกว่าวิธี shell vial 5 ราย และไม่มีคนไข้รายใดที่ให้ผลบวกกับวิธี biotin-avidin-ELISA แล้วให้ผลลบกับวิธี shell vial เลย ดังนั้นเมื่อเทียบกับวิธี shell vial วิธี biotin-avidin-ELISA จะมีความไวเป็น 88.89% (32 ใน 45 ราย) และมีความจำเพาะเป็น 100% ดังแสดงในตารางที่ 24

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจด้วยวิธี IFA กับวิธี shell vial พบว่าให้ผลบวกตรงกัน 36 ราย และวิธี IFA ให้ผลบวกน้อยกว่าวิธี shell vial 9 ราย ไม่มีคนไข้รายใดที่ให้ผลบวกกับ IFA แล้วให้ผลลบกับ shell vial เลย ดังนั้นวิธี IFA จะมีความไวเป็น 80% แต่มีความจำเพาะสูงถึง 100% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี shell vial ดังแสดงในตารางที่ 25

เมื่อเปรียบเทียบวิธี IFA กับวิธี biotin-avidin-ELISA พบว่าให้ผลไปด้วยกัน 123 ราย คิดเป็น 92.0 % โดยมีผลบวกตรงกัน 30 ราย ผลลบตรงกัน 90 ราย และให้ผลขัดแย้งกัน 10 ราย โดยแยกเป็นให้ผลบวกกับ IFA แต่ให้ผลลบกับ biotin-avidin-ELISA 3 ราย และให้ผลบวกกับ biotin-avidin-ELISA แต่ให้ผลลบ IFA มีจำนวน 7 ราย ซึ่งเมื่อใช้ 2 วิธีร่วมกันในการวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV แล้วจะมีผลบวกรวมกันเป็น 43 ราย ซึ่งเมื่อเทียบกับ shell vial แล้วจะทำให้มีความไวในการตรวจพบ RSV เป็น 95.6%

ตารางที่ 2 แสดงความเข้ม ของการเรืองแสง ของเซลล์ที่ติดเชื้อ RSV เมื่อย้อมด้วย anti-RSV และ swine anti-rabbit immunoglobulin conjugated FITC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สำหรับการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (indirect immunofluorescence)

a-RSV / conjugate	1:10	1:20	1:30	1:40
1:10	4^{+}**	4^{+}**	3^{+}	2^{+}
1:20	4^{+}	3^{+}	2^{+}	1^{+}
1:30	3^{+}-4^{+} **	2^{+}-3^{+}	2^{+}	1^{+}
1:40	3^{+}	2^{+}	1^{+}	1^{+}

4^{+} - 1^{+} = คะแนนของการเรืองแสงที่มีความเข้มลดหลั่นกันลงมา

* = พบมีการเรืองแสงที่ไม่เฉพาะร่วมด้วย

** = เป็นค่าความเข้มข้นของน้ำยาที่เลือกใช้

ตารางที่ 3 แสดงความแรงของการบั่นต่อการพบ foci ของ RSV จากการตรวจด้วยวิธีเชลล์ไวอัล (shell vial technique)

g \ ไวรัส*	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
0	3-5/HPF	0-1/HPF	0-1/LPF	-	-	-
50	many	3-5/HPF	0-1/HPF	-	-	-
210	many	5-7/HPF	1-2/HPF	0-1/LPF	-	-
700	many	many	5-7/HPF	0-1/HPF	0-1/LPF	-
1,300 **	many	many	5-7/HPF	1-2/HPF	1-2/LPF	-
1,900	many	many	5-7/HPF	1-2/HPF	1-2/LPF	-

HPF = จำนวนของ foci ของ RSV ที่พบต่อ 1 พื้นที่ของกำลังขยาย 400 เท่า

LPF = จำนวนของ foci ของ RSV ที่พบต่อ 1 พื้นที่ของกำลังขยาย 100 เท่า

* = ความเจือจางของไวรัส

** = ความแรงที่เหมาะสมของการบั่นสำหรับการตรวจด้วยวิธีเชลล์ไวอัล

ตารางที่ 4 แสดงผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มต่อการพบ foci ของ RSV สำหรับการตรวจด้วยวิธีเชลล์ไวอัล (shell vial technique)

ไวรัส* / อุณหภูมิ	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
4°ซ	many	many	5-7/HPF	1-2/HPF	1-2/LPF	-
25°ซ**	many	many	5-7/HPF	1-2/HPF	1-2/LPF	-

HPF = จำนวนของ foci ของ RSV ที่พบต่อ 1 พื้นที่ของกำลังขยาย 400 เท่า

LPF = จำนวนของ foci ของ RSV ที่พบต่อ 1 พื้นที่ของกำลังขยาย 100 เท่า

* = ความเจือจางของไวรัส

** = เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการบ่มในการตรวจด้วยวิธีเชลล์ไวอัล

ตารางที่ 5 แสดงระยะเวลาที่ใช้ในการปั่นต่อการพบ foci ของ RSV สำหรับการตรวจด้วยวิธีเชลล์ไวอัล (shell vial technique)

ไวรัส* / เวลา (นาที)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
30	many	many	3-5/HPF	0-1/HPF	-	-
60 **	many	many	5-7/HPF	1-2/HPF	1-2/LPL	-
90	many	many	5-7/HPF	1-2/HPF	1-2/LPF	-
120	many	many	5-7/HPF	1-2/HPF	1-2/LPF	-

HPF = จำนวน foci ของ RSV ที่พบต่อ 1 พื้นที่กำลังขยาย 400 เท่า

LPF = จำนวน foci ของ RSV ที่พบต่อ 1 พื้นที่กำลังขยาย 100 เท่า

* = ความเจือจางของไวรัส

** = เป็นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการปั่นที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความแรง 1,300 g สำหรับการตรวจด้วยวิธีเชลล์ไวอัล

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density ที่ความเข้มข้นต่าง ๆกันของ biotinylated anti-RSV และ avidin conjuated peroxidase เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

biotinylated anti-RSV	RSV positive control			RSV negative control			avidin conjugated peroxidase
	a-RSV	NRI	Δ OD	a-RSV	NRI	Δ OD	
1:2,000	over 2	0.516	***	0.511	0.509	0.003	1:3,000
	over 2	0.408	***	0.504	0.501	0.003	1:5,000
	1.986	0.331	1.655	0.431	0.427	0.004	1:7,000
	1:881	0.281	1.600	0.314	0.310	0.004	1:10,000
1:3,000	1:935	0.309	1.626	0.306	0.305	0.001	1:3,000
	1:897	0.260	1.637	0.280	0.277	0.003	1:5,000
	1:677	0.230	1.447	0.230	0.226	0.004	1:7,000
	1:583	0.173	1.410	0.225	0.222	0.003	1:10,000
1:4,000 *	1.742	0.223	1.519	0.188	0.182	0.006	1:3,000
	1.519	0.205	1.314	0.164	0.161	0.003	1:5,000
	1.441	0.162	1.279	0.151	0.147	0.004	1:7,000 *
	1.335	0.158	1.177	0.150	0.147	0.003	1:10,000
1:6,000	1.408	0.178	1.230	0.159	0.152	0.007	1:3,000
	1.366	0.161	1.205	0.149	0.145	0.004	1:5,000
	1.250	0.145	1.105	0.148	0.145	0.003	1:7,000
	1.170	0.144	1.026	0.148	0.146	0.002	1;10,000

a-RSV = ค่า OD ที่ได้จากหลุมที่เคลือบด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD ที่ได้จากหลุมที่เคลือบด้วย normal rabbit immunoglobulin

Δ OD = เป็นผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ biotinylated anti-RSV และ avidin conjuated peroxidase ที่เลือกใช้

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของโปรตีนของ rabbit anti-RSV (a-RSV) และ normal rabbit immunoglobulin (NRI) ที่ใช้เคลือบ plate เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ของการตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

ความเข้มข้นของโปรตีน	RSV positive control			RSV negative control		
(ไมโครกรัม/มล.)	a-RSV	NRI	Δ OD	a-RSV	NRI	Δ OD
20	1.540	0.197	1.343	0.154	0.149	0.005
10 *	1.360	0.154	1.206	0.152	0.147	0.005
5	1.288	0.144	1.144	0.150	0.146	0.004
2.5	1.159	0.143	1.016	0.151	0.147	0.004

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

Δ OD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่เลือกใช้ในการเคลือบ plate

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density เมื่อเคลือบ plate ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

อุณหภูมิ	RSV positive control			RSV negative control		
	a-RSV	NRI	ΔOD	a-RSV	NRI	Δ OD
4°ซ.	1.221	0.169	1.051	0.148	0.143	0.005
อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.)	1.107	0.156	0.946	0.161	0.152	0.009
37°ซ.*	1.216	0.169	1.046	0.161	0.152	0.009
37°ซ. (waterbath)	1.215	0.179	1.036	0.162	0.154	0.008

a-RSV = ค่า OD จากหลุมที่เคลือบด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD จากหลุมที่เคลือบด้วย normal rabbit immunoglobulin

ΔOD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นค่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเคลือบ plate ที่เหมาะสม

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density ของการเคลือบ plate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เมื่อเวลาต่าง ๆ กันในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-ELISA (biotin-avidin-ELISA)

เวลา(นาที)	RSV positive control			RSV negative control		
	a-RSV	NRI	ΔOD	a-RSV	NRI	ΔOD
30	1.128	0.167	0.960	0.145	0.136	0.004
60*	1.224	0.169	1.055	0.156	0.150	0.006
120	1.243	0.177	1.066	0.157	0.153	0.004
180	1.312	0.199	1.113	0.160	0.155	0.005

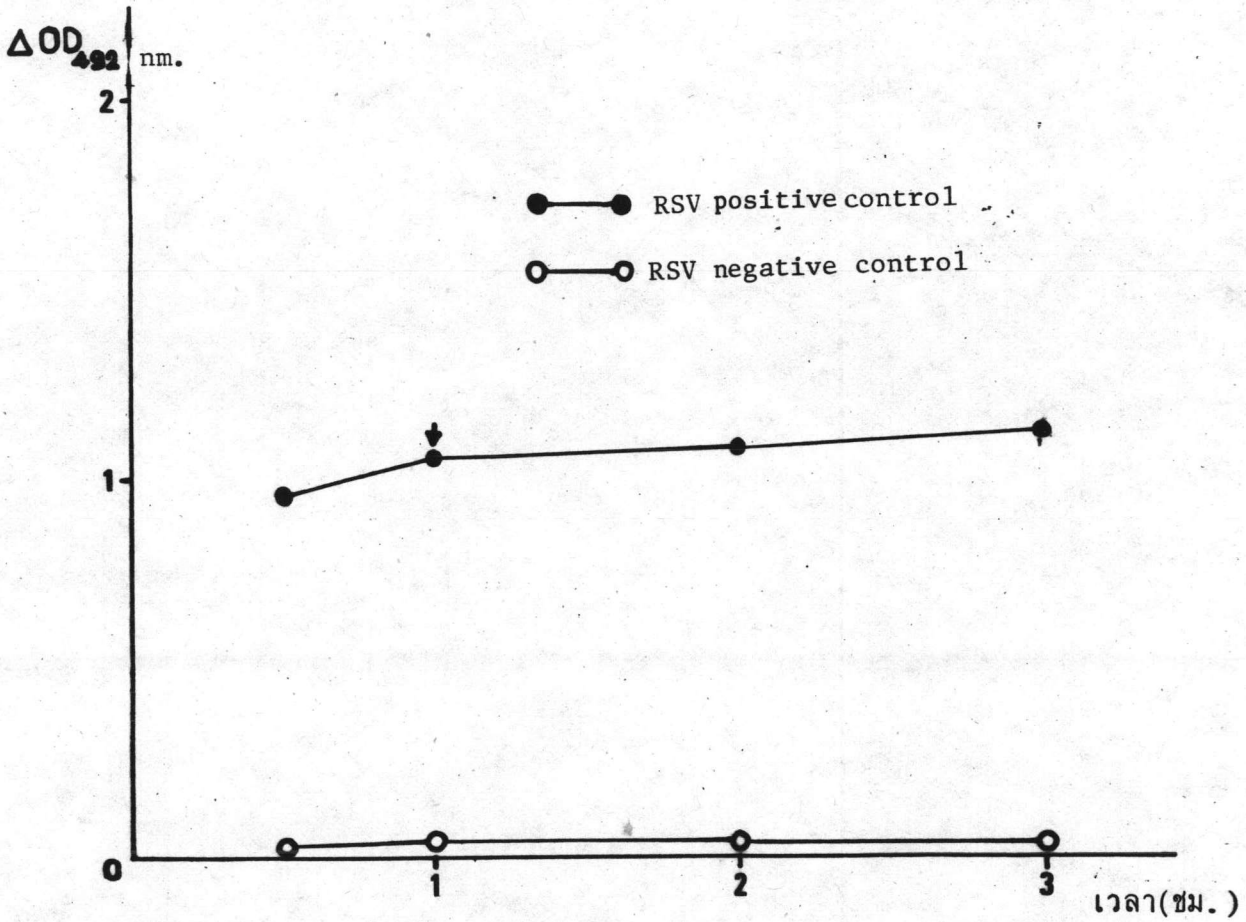
a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

ΔOD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นเวลาที่เหมาะสมที่เลือกใช้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟรูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของผลต่างของ OD เมื่อเคลือบ plate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ที่เวลาต่าง ๆ กันในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)
ลูกศรชี้ แสดงถึงเวลาที่เหมาะสมที่เลือกใช้

ตารางที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนการเติม RSV-antigen ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

อุณหภูมิ	RSV positive control			RSV negative control		
	a-RSV	NRI	ΔOD	a-RSV	NRI	ΔOD
4°ซ.	1.816	0.215	1.601	0.167	0.162	0.005
อุณหภูมิห้อง * (22-25°ซ.)	1.795	0.202	1.593	0.172	0.169	0.003
37°ซ.	1.544	0.245	1.299	0.198	0.190	0.008
37°ซ. (waterbath)	1.592	0.319	1.273	0.239	0.231	0.008

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

ΔOD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เลือกใช้

ตารางที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม RSV antigen ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) ในเวลาต่าง ๆ กันในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

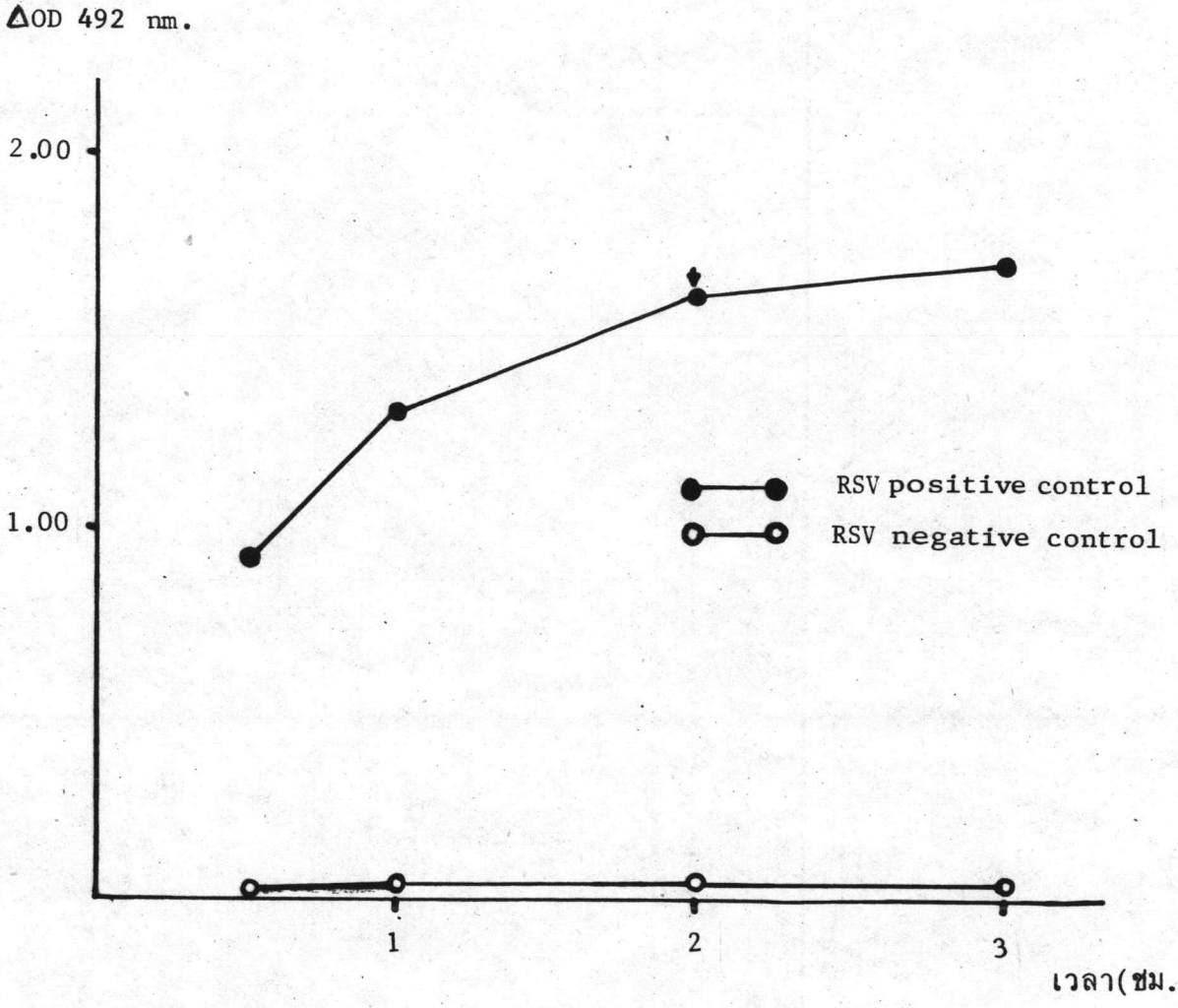
เวลา(นาที)	RSV positive control			RSV negative control		
	a-RSV	NRI	Δ OD	a-RSV	NRI	Δ OD
30	1.079	0.162	0.917	0.155	0.150	0.005
60	1.468	0.168	1.300	0.161	0.156	0.005
120 *	1.782	0.170	1.612	0.166	0.160	0.006
180	1.868	0.169	1.699	0.167	0.161	0.006

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

ΔOD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นเวลาที่เหมาะสมที่เลือกใช้



กราฟรูปที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของผลต่างของ OD สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม RSV antigen ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) ที่เวลาต่าง ๆ กัน ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

ลูกศรชี้ แสดงเวลาที่เหมาะสม

ตารางที่ 12 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม biotinylated anti-RSV ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ การตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin ELISA)

อุณหภูมิ	RSV positive control			RSV negative control		
	a-RSV	NRI	ΔOD	a-RSV	NRI	ΔOD
4°ซ.	over 2	0.189	***	0.155	0.149	0.006
อุณหภูมิห้อง * (22-25°ซ.)	1.572	0.145	1.427	0.147	0.142	0.005
37°ซ.	1.481	0.176	1.305	0.165	0.155	0.010
37°ซ. (waterbath)	1.600	0.179	1.420	0.172	0.161	0.011

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

ΔOD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เลือกใช้

ตารางที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม biotinylated anti-RSV ที่อุณหภูมิห้องในเวลาต่าง ๆ กันในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

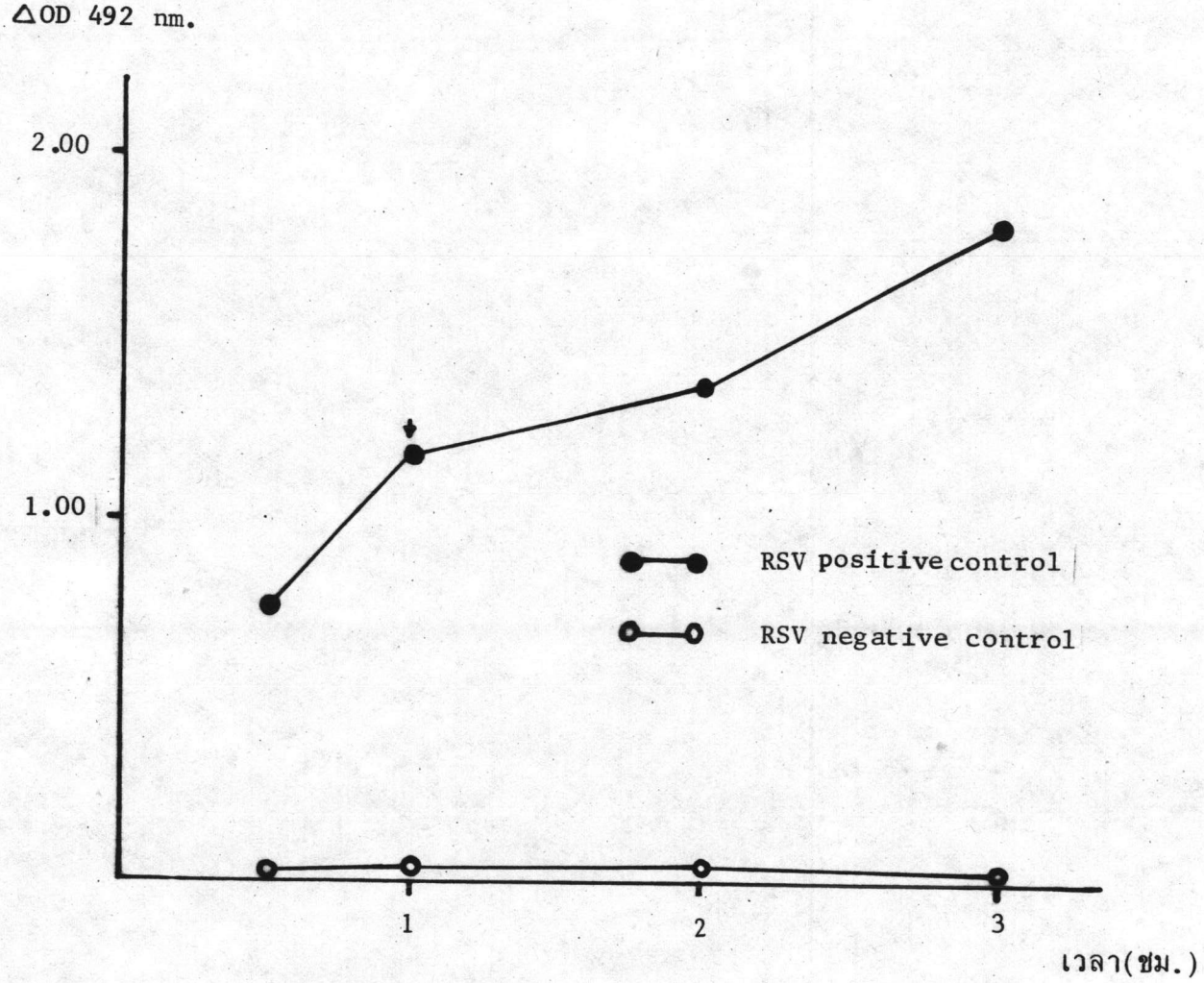
เวลา(นาที)	RSV positive control			RSV negative control		
	a-RSV	NRI	Δ OD	a-RSV	NRI	Δ OD
30	0.850	0.096	0.754	0.110	0.106	0.004
60 *	1.293	0.113	0.180	0.132	0.127	0.005
120	1.522	0.149	1.373	0.141	0.135	0.006
180	1.985	0.184	1.801	0.166	0.161	0.005

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

Δ OD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นเวลาที่เหมาะสมที่เลือกใช้



กราฟรูปที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของค่า optical density สำหรับในขั้นตอนของการเติม biotinylated anti-RSV ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) ในเวลาต่าง ๆ กันในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA) ลูกศรชี้เวลาที่เหมาะสม

ตารางที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม avidin conjugated peroxidase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

อุณหภูมิ	RSV positive control			RSV negative control		
	a-RSV	NRI	Δ OD	a-RSV	NRI	Δ OD
4°ซ	1.995	0.282	1.713	0.282	0.227	0.005
อุณหภูมิห้อง * (22-25°ซ.)	1.384	0.141	1.243	0.134	0.132	0.002
37°ซ.	1.272	0.147	1.125	0.158	0.152	0.006
37°ซ. (waterbath)	1.285	0.146	1.139	0.155	0.151	0.004

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

Δ OD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เลือกใช้

ตารางที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม avidin conjugated peroxidase ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ) ในเวลาต่าง ๆ กัน ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

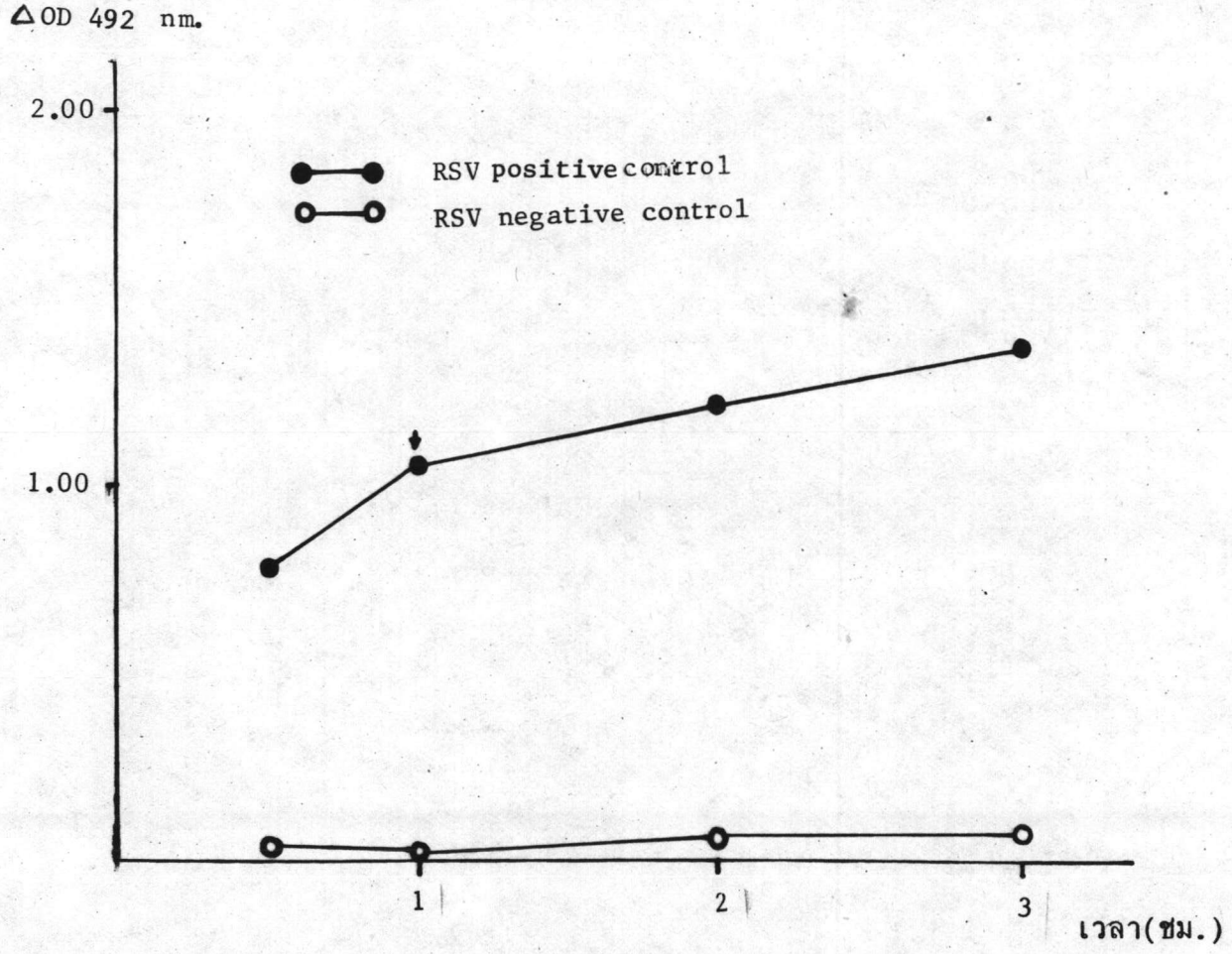
เวลา(นาที)	RSV positive control			RSV negative control		
	a-RSV	NRI	ΔOD	a-RSV	NRI	ΔOD
30	0.873	0.085	0.788	0.108	0.101	0.007
60 *	1.156	0.111	0.045	0.136	0.132	0.004
120	1.351	0.139	1.212	0.149	0.141	0.011
180	1.532	0.170	1.362	0.174	0.163	0.011

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

ΔOD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นเวลาที่เหมาะสมที่เลือกใช้



กราฟรูปที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม avidin conjugated peroxidase ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) ในเวลาต่าง ๆ กัน ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

ลูกศรชี้ เวลาที่เหมาะสม

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density ของการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate ที่เวลาต่าง ๆ ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

เวลา(นาที)	RSV positive control			RSV negative control		
	a-RSV	NRI	△OD	a-RSV	NRI	△OD
10	1.122	0.120	1.002	0.128	0.120	0.008
15 *	1.365	0.154	1.211	0.154	0.148	0.006
30	1.898	0.172	1.126	0.226	0.209	0.017
60	over 2	0.222	***	0.248	0.220	0.028

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti.RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

△OD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นเวลาที่เหมาะสมที่เลือกใช้

ตารางที่ 17 แสดงค่า optical density ของการ titrate หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ biotinytated anti-RSV และ avidin conjuatedperoxidase เมื่อทำปฏิกิริยากันในสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

ความเข้มข้นของ biotinylated a-RSV	RSV positive control			RSV negative control			ความเข้มข้นของ avidin-peroxidase
	a-RSV	NRI	ΔOD	a-RSV	NRI	ΔOD	
1:2,000	over 2	0.361	***	0.358	0.345	0.013	1:3,000
	over 2	0.297	***	0.293	0.282	0.011	1:5,000
	1.988	0.271	1.717	0.265	0.255	0.010	1:7,000
	1.867	0.234	1.633	0.212	0.194	0.018	1:10,000
1:3,000 *	1.793	0.324	1.469	0.231	0.220	0.011	1:3,000
	1.565	0.268	1.297	0.196	0.189	0.007	1:5,000
	1.363	0.198	1.165	0.151	0.146	0.005	1:7,000*
	1.188	0.197	0.991	0.148	0.144	0.004	1:10,000
1:4,000	1.563	0.269	1.294	0.235	0.227	0.008	1:3,000
	1.325	0.248	1.077	0.201	0.189	0.011	1:5,000
	1.198	0.201	0.997	0.150	0.144	0.006	1:7,000
	1.004	0.177	0.827	0.146	0.140	0.006	1:10,000
1:60,000	1.250	0.265	0.985	0.210	0.198	0.012	1:3,000
	1.170	0.211	0.959	0.189	0.185	0.006	1:5,000
	1.095	0.181	0.914	0.148	0.142	0.006	1:7,000
	0.998	0.172	0.826	0.146	0.139	0.009	1:10,000

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

ΔOD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่เลือกใช้

ตารางที่ 18 แสดงค่าเฉลี่ยของ optical density ของการ titrate หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ rabbit anti-RSV และ normal rabbit immunoglobulin ที่ใช้ในการเคลือบ plate เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา สำหรับการตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

ความเข้มข้นของ a-RSV และ NRI	RSV positive control			RSV negative control		
	a-RSV	NRI	Δ OD	a-RSV	NRI	Δ OD
20 ug/ml	1.545	0.208	1.337	0.180	0.172	0.008
10 ug/ml*	1.430	0.151	1.275	0.154	0.147	0.007
5 ug/ml	1.212	0.133	1.079	0.137	0.128	0.009
2.5 ug/ml	1.124	0.131	0.993	0.135	0.130	0.005

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

Δ OD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

* = เป็นค่าความเข้มข้นของโปรตีนสำหรับการเคลือบ plate

ตารางที่ 19 แสดงสภาวะและความเข้มข้นของน้ำยาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจหา RSV antigen ด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA)

ขั้นตอนของการทดสอบ	ความเข้มข้นของน้ำยา	อุณหภูมิ	เวลาในการทำปฏิกิริยา (นาที)
การเคลือบ plate	10 ug/ml	37°ซ.	60
ปฏิกิริยาของแอนติเจน	-	อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.)	120
ปฏิกิริยาของ biotinylated anti-RSV	1:3,000	อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.)	60
ปฏิกิริยาของ avidin conjugated peroxidase	1:7,000	อุณหภูมิห้อง (22-25° ซ)	60
ปฏิกิริยาของการเกิดสี	8 mg(OPD)+5 ul ของ 30% H_2O_2 ใน 15 ml buffer	อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.)	15

ตารางที่ 20 แสดงผลของการทดสอบความเที่ยงตรง (precision) ของการตรวจหา RSV antigen ด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin-ELISA) เมื่อทำ 20 ครั้ง พร้อมกัน

	a-RSV	NRI	Δ OD
Mean ($\bar{X}$)	1.179	0.145	1.034
SD	0.062	0.006	0.057
%CV	5.3	4.1	5.5
X ± 3 SD	0.993-1.365	0.127-0.163	0.863-1.205

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบ plate ด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบ plate ด้วย normal rabbit immunoglobulin

ΔOD = ค่าผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

ตารางที่ 21 แสดงผลของการทดสอบความเชื่อถือได้ (reproducibility) ของการตรวจหา RSV antigen ด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (biotin-avidin ELISA) เมื่อทำการทดลองซ้ำกัน 20 ครั้งในเวลาต่างกัน

	a-RSV	NRI	ΔOD
Mean ($\bar{X}$)	1.275	0.176	1.118
SD	0.119	0.025	0.114
%CV	9.4	14.20	10.27
$X \pm 3$ SD	0.918-1.632	0.101-0.251	0.776-1.460

a-RSV = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV

NRI = ค่า OD เมื่อเคลือบหลุมด้วย normal rabbit immunoglobulin

ΔOD = ผลต่างระหว่าง OD ของ a-RSV และ NRI

ตารางที่ 22 แสดงผลการตรวจหา RSV จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้เด็กจำนวน 133 ราย ด้วย วิธี IFA , biotin-avidin-ELISA , shell vial technique และวิธีเพาะเลี้ยงแบบธรรมดา (conventional cell culture)

วิธี / ผล	IFA (%)	biotin-avidin ELISA (%)	cell culture (%)	shell vial technique (%)
บวก	36(27.0)	40(30.0)	32(24.0)	45(33.3)
ลบ	97(73.0)	93(70.0)	101(76.0)	88(66.7)

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบผลการตรวจหา RSV จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้จำนวน 133 ราย ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงแบบธรรมดา (conventional cell culture) กับวิธีการเพาะแยกเชื้อด้วยวิธี shell vial technique.

		cell culture by shell vial technique +	cell culture by shell vial technique −
conventional cell culture	+	32	0
	−	13	88

วิธี conventional cell culture มี sensitivity = 71.0 %

specificity = 100 %

ตารางที่ 24 เปรียบเทียบผลการตรวจหา RSV จากสิ่งส่งตรวจจากคนไข้เด็กจำนวน 133 ราย ด้วยวิธี biotin-avidin-ELISA กับ วิธีเพาะแยกเชื้อด้วยวิธี shell vial technique

		cell culture by shell vial technique	
		+	-
biotin-avidin ELISA	+	40	0
	-	5	88

วิธี biotin-avidin ELISA มี sensitivity = 88.9 %

specificity = 100 %

ตารางที่ 25 เปรียบเทียบผลการตรวจหา RSV จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้จำนวน 133 ราย ด้วยวิธี IFA กับวิธีเพาะแยกเชื้อด้วย วิธี shell vial technique

		cell culture by shell vial technique	
		+	-
IFA	+	36	0
	-	9	88

วิธี IFA มี sensitivity = 80.0 %

specificity = 100 %