บทที่ 4

วัสดุและวิธีการ

1. เกณฑ์การคัดเลือกประชากร

1.1 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือก

เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการส่งตรวจ Pleural fluids และ ascitic fluids มายังห้องปฏิบัติการ หน่วยทางเดินอาหารและหน่วยโรคปอด โรงพยาบาลจุฬา รวมทั้งกรณีเจาะเพื่อการตรวจวินิจฉัยในตึกผู้ป่วยโดยมีเกณฑ์ในการวินิจฉัยวัณโรคดังนี้

ก) ย้อมพบเชื้อ Acid fast bacilli จากน้ำเยื่อบุช่องท้อง หรือ ช่องปอด

ข) เพาะเชื้อวัณโรคขึ้นจากน้ำเยื่อบุช่องท้องหรือ ช่องปอด

ค) การทำ Peritoneoscope และ ตัดชิ้นเนื้อจากเยื่อบุช่องท้อง หรือได้จากการทำ pleural biopsy ตรวจทางพยาธิวิทยาพบลักษณะของ Granuloma และ ย้อมพบเชื้อ Acid fast bacilli

ง) กรณี (ค) พบ Granuloma โดยย้อมไม่พบเชื้อ AFB แต่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยารักษาวัณโรค

1.2 เกณฑ์ในการคัดออก

ก) น้ำเยื่อบุช่องท้องจากการทำ Peritoneal Dialysis ทั้งกรณี intermittent และ continuous peritoneal dialysis

ข) ผู้ป่วยติดเชื้อ HIV

2. การคำนวณขนาดตัวอย่าง

วัณโรคเยื่อบุช่องท้องเป็นโรคที่ใช้เวลาในการรักษานานอย่างน้อย 6 เดือน และเสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนของยา จึงพิจารณาจากค่า Specificity ซึ่งมีรายงานในต่างประเทศ ตั้งแต่ 90 % ขึ้นไป ส่วนPrevalence ใน ร.พ. จุฬายังไม่มีการศึกษาในขณะนี้ โดยประมาณน้อยกว่า 10 %สำหรับวัณโรคเยื่อบุช่องท้องและช่องปอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สูตร $N = Z^2PQ / E^2$ โดย Z = 1.96

P (specificity) = 0.9 , Q = o.1 , E (ความคลาดเคลื่อน) = 0.05

N (จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด) = 138

ผู้ป่วยวัณโรคเยื่อบุช่องท้องและช่องปอดควรมีอย่างน้อย (10%) = 14 คน

3. ขั้นตอนการรวบรวมข้อมูลและวิธีการวิเคราะห์ค่า ADA activity

ก. Pleuroperitoneal fluid ที่ได้จากห้องปฏิบัติการหน่วยทางเดินอาหารและหน่วยโรคปอด จะได้รับการตรวจสิ่งต่อไปนี้ โดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหน่วยคนเดียวกัน

a) Ascitic fluid : Protein , cell count และ differentiation, culture for AFB, cytology และอื่นๆ กรณีจำเป็นเพื่อการวินิจฉัย เช่น amylase

b) Pleural fluid : Protein , cell count และ differentiation, culture for AFB , cytology และอื่นๆ กรณีจำเป็นเพื่อการวินิจฉัย เช่น pH , sugar

ข. สิ่งที่ส่งห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมีดังนี้

a) Pleuroperitoneal fluid: ส่งในทันทีหรือเก็บแช่ที่ อุณหภูมิ -20 ^{0}C ก่อนส่งภาควิชาชีวเคมีในเวลาที่กำหนด

b) EDTA whole blood 10 ml และ clotted blood 5 ml ส่งห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี ภายในเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อปั่นแยก เม็ดเลือดขาวและ serum

4. หลักเกณฑ์ในการวินิจฉัยโรคมีดังนี้

4.1 วัณโรคเยื่อบุช่องท้องและช่องปอด

ก) ย้อมพบเชื้อ Acid fast bacilli จากน้ำเยื่อบุช่องท้อง หรือ ช่องปอด

ข) เพาะเชื้อวัณโรคขึ้นจากน้ำเยื่อบุช่องท้องหรือ ช่องปอด

ค) การทำ Peritoneoscope และ ตัดชิ้นเนื้อจากเยื่อบุช่องท้อง หรือได้จากการทำ pleural biopsy ตรวจทางพยาธิวิทยาพบลักษณะของ Granuloma และ ย้อมพบเชื้อ Acid fast bacilli

ง) กรณี (ค) พบ Granuloma โดยย้อมไม่พบเชื้อ AFB แต่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยารักษาวัณโรค

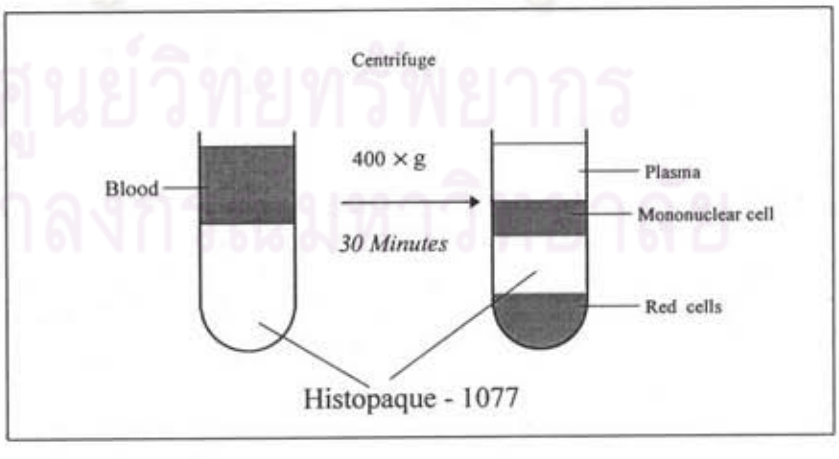
4.2 โรคอื่นที่เป็นสาเหตุของ น้ำในเยื่อบุช่องท้องและช่องปอด จะได้รับการวินิจฉัยตามหลักเกณฑ์มาตรฐานทางคลินิค

5. ขั้นตอนการแยก mononuclear cell ออกจาก Whole blood และ วิเคราะห์ ADA activity

5.1 การแยก Mononuclear cell ออกจาก whole blood (ภาพที่ 2)

1) ใช้ Venous whole blood 10 ml ที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA
2) เท whole blood ลงบน centrifuge tube ที่ใส่ 3 ml Histopaque® 1077 จากนั้นปั่นแยกโดยความเร็ว 400 ×g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เม็ดเลือดและสารละลายจะแยกเป็นชั้นดังภาพ
3) ใช้ Pipet aspirate สารละลายส่วนบนทิ้ง จากนั้น - ดูดแยก ชั้น mononuclear cell ดังภาพ
4) ผสมส่วน mononucler cell จากขั้นตอนที่ 3 ด้วย 10 ml Phosphate buffered saline solition ใน Cetrifuge tube ใหม่ จากนั้นปั่นแยกโดยความเร็ว 200 ×g 10 นาที
5) Aspirate ส่วน supernatant ทิ้ง
6) ผสม 5 ml Phosphate buffered saline solution จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 250 × g 10 นาที
7) ทำซ้ำขั้นตอน 5 , 6 อีก 1 ครั้ง จากนั้น aspirate ส่วน supernatant ผสม Phosphate Buffered Saline solution 0.5 ml กับ mononuclear cell ใน Tube เดิม นำไปวิเคราะห์หา ADA activity ต่อไป

ภาพที่ 2 ภาพแสดงการแยกชั้นของ mononuclear cells ออกจาก Plasma และ RBC โดย Histopaque-1077 หลังจาก centrifuse



Ref. : Sigma Diagnostics.; Histopague ® - 1077 Procedure No 1077 July 1991.

5.2 Clotted blood 5 ml นำมาปั่นเพื่อแยก serum ส่วนบน นำไปวิเคราะห์ ADA activity ต่อไป

5.3 การวิเคราะห์หา ADA activity โดย kinetic method (Ellis,1970 ,1973)

Kinetic method (enzymatic method) ใช้หลักการของ (couple reaction) ดังภาพ

$$\text{Adenosine} \xrightarrow{\text{ADA}} \text{Inosine} + NH_3$$

$$NH_3 + \text{2-Oxoglutarate} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GDH}} \text{L - Glutamate} + \text{NAD}$$

โดยวัดการลดลงของ absorbance ที่ 340 nm.

วิธีการวิเคราะห์ ADA activity

Solutions	Preparation of solutions	Volume(ml)
Phosphate buffer	0.25 M	1.2
alpha-ketoglutarate	0.2 M	0.02
NADH	13 mM in 10 mg Disodium salt	0.05
ADP	18 mM in 9 mg Trisodium salt	0.01
GDH	10 mg/ml in 50% glyceral	0.06
sample		0.1
Mix, after 20 min in 37 C read the absorbances of the solution (OD1)		
Adenosine	400 mM in conc.HCl (3.2ml/100ml)	0.1
Mix,read the absorbances of the solution (OD2)		
After 10 min at room temp.,read the absorbances of the solution (OD3)		
Calculate the ADA activity from the absorbances difference (OD2 - OD3)		

หน่วยที่ใช้วัด ADA activity

a) ADA activity จาก fluids และ serum วัดออกมาเป็น U/L

1 UNIT = ปริมาณ enzyme ที่เปลี่ยน 1 mmol ของ adenosine เป็น inosine และ ammonia ที่ pH 7.1 , 37 $^{\circ}$c ใน 1 นาที

b) ADA activity ของ mononuclear cell วัดออกมาเป็น unit / 10^6 wbc