หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

กระต่ายสีขาวพันธุ์ New Zealand ไม่จำกัดเพศ อายุระหว่าง 2-4 เดือน น้ำหนัก 2-2.5 กิโลกรัม โดยใช้กระต่าย 5 ตัวต่อการเตรียมแอนติเซรุ่ม 1 ชนิด และก่อนที่จะนำไปใช้ ได้เจาะเลือดกระต่ายประมาณตัวละ 5 มล. เพื่อทดสอบว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อที่ศึกษา

2. เชื้อบัคเตรีที่ใช้ศึกษา

lyophilized *S.pneumoniae* serotype 1,5,6,19,23 ที่ได้รับจาก Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark.

lyophilized *H.influenzae* type b strain GB 3291 ที่ได้รับจาก Centers for Disease Control, Atlanta, USA. (CDC)

3. แอนติเซรุ่มอ้างอิง

แอนติเซรุ่มจำเพาะ type 1,5,6,19,23 ของ *S.pneumoniae* ซื้อจาก Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark.

แอนติเซรุ่มจำเพาะ type ของ *H.influenzae* ซื้อจาก Wellcome Diagnostic, Research Triangle Park, NC.

4. กลุ่มศึกษา

เป็นผู้ป่วยเด็กอายุแรกเกิดจนถึง 14 ปี ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคปอดบวม และรับเข้ารักษาในภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และโรงพยาบาลเด็ก ระหว่างเดือน มิถุนายน ถึง ธันวาคม พ. ศ. 2531

5. สิ่งส่งตรวจ

nasopharyngeal secretion 770 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยเด็กโรคปอดบวม นำมาเพาะแยกเชื้อและทดสอบ Latex agglutination (LA) ควบคู่ไปด้วย โดยตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *S.pneumoniae* และ *H.influenzae* 200 ตัวอย่าง และ 570 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในกรณีที่ได้รับ nasopharyngeal secretion ที่เพาะแยกเชื้อจากหอผู้ป่วยก็จะไม่มีตัวอย่างสำหรับตรวจหาแอนติเจนของเชื้อด้วยวิธี LA

6. เครื่องมือ, สารเคมี และน้ำยา
(รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก)

<u>วิธีการ</u>

1. วิธีการเพาะเชื้อและพิเคราะห์บัคเตรี(42,71)

S.pneumoniae สามารถเจริญได้ในอาหารวุ้นเลือดที่อุณหภูมิ 35-37 °ซ. เวลา 36-48 ชั่วโมง จึงจะเห็นโคโลนีชัดเจน ลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารวุ้นเลือดจะเป็นแบบ α-hemolysis รอบโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำตาลซึ่งเป็นสีของสารชนิดหนึ่งที่สลายมาจากฮีโมโกลบิน ในการพิสูจน์เชื้อจำเป็นต้องแยกจากเชื้อ *Streptococcus viridans* โดยที่ *S.pneumoniae* จะมีความไวต่อ ethylhydrocupreine hydrochloride (optochin) โดยใช้แผ่นกระดาษกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ชุบ optochin ในความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมล.(optochin disc) วางบนอาหารวุ้นเลือด จะพบบริเวณที่เชื้อไม่ขึ้นเป็นวงกลมล้อมรอบ optochin disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 15 มม.

H.influenzae สามารถเจริญได้ในอาหารเพาะเชื้อซึ่งมี X-factor และ V-factor เป็นส่วนประกอบที่สำคัญซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เตรียม X-,V-factor disc ตามวิธีของ Marshall(1974)[72] ขึ้นใช้เองเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก)นอกจากนี้ Staphylococcus บางสายพันธุ์ก็ยังสามารถสร้าง V-factor ได้ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสองชนิดนี้ร่วมกันจะพบโคโลนีของ *H.influenzae* ที่ต้องการ factor นี้อยู่ชิดกับโคโลนีของ Staphylococcus เชื้อ *H.influenzae* ต้องการทั้ง X-,V-factor ในการเจริญ และให้ผลลบด้วยปฏิกริยา prophyrin ทำให้สามารถจำแนกจาก Haemophilus sp. อื่นๆได้

2. การตรวจหา serotype ของ *S.pneumoniae*

ด้วยวิธี Counter-immunoelectrophoresis (CIE)ตามวิธีของ Coonrod (1973)[73] และไหม รัตนวารารักษ์(2527)[74] มีหลักการดังนี้แอนติบอดีในแอนติเซรุ่มที่จำเพาะต่อแอนติเจน type 1,5,6,19,23 ของ *S.pneumoniae* และแอนติเจนของเชื้อ *S.pneumoniae* ที่จำเพาะต่อกันจะวิ่งเข้าหากันบนวุ้นที่ผ่านกระแสไฟฟ้า เมื่อแอนติบอดีและแอนติเจนพบกันในสัดส่วนที่เหมาะสมจะเกิดเส้นตะกอนให้เห็น ในกรณีเช่นนี้แอนติบอดีจะต้องวิ่งไปทางขั้วลบ และแอนติเจนวิ่งไปทางขั้วบวก ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้

เตรียม 0.05 M Veronal buffer pH 8.2 สำหรับ electrophoresis เตรียมวุ้น (agarose) 1% โดยใช้วุ้น 1 กรัมกับ Veronal buffer pH 8.2 ปริมาณ 100 มล. ต้มให้ละลายดีก่อนเทวุ้นควรเคลือบกระจกสไลด์ด้วยวุ้น 1% ที่ละลายด้วยน้ำกลั่นรอให้แห้งแล้วเทวุ้น 2 มล.บนกระจกสไลด์ 1 แผ่น เมื่อวุ้นแข็งตัวบนกระจกสไลด์ดีแล้วให้เจาะรูในวุ้นแผ่นละ 10 หลุม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม.และ 3 มม.ห่างกันคู่ละ 5 มม. ดังรูปขนาดเท่าของจริง(รูปที่ 4) นำโคโลนี *S.pneumoniae* ที่แยกได้จากจานเลี้ยงเชื้อมาละลายใน 0.85% saline ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland No.1 เพื่อเตรียมเป็นแอนติเจน จากนั้นใส่แอนติเจนที่เตรียมได้ลงในหลุมขนาดใหญ่ทางขั้วลบและแอนติเซรุ่มที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ *S.pneumoniae* ทั้ง 5 type ในหลุมขนาดเล็กทางขั้วบวก ส่วนผลบวกควบคุมของการทดสอบทำเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ข้างต้นแต่เปลี่ยนเป็นใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *S.pneumoniae* ที่ทราบ serotype แล้ว วางแผ่นกระจกสไลด์ลงใน

เครื่อง electrophoresis ที่มี buffer ในอ่างเรียบร้อยใช้กระดาษกรองที่เปียก buffer ต่อให้กระแสไฟฟ้า 250 Volt ผ่านเป็นเวลา 60 นาที ตรวจดูเส้นตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างหลุมที่ใส่แอนติเซรุ่มและแอนติเจน (รูปที่ 5) อ่านผลซ้ำอีกครั้งหลังการย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant blue และเก็บกระจกสไลด์ไว้ดูภายหลังได้

3. การตรวจหา serotype ของ *H.influenzae*

ด้วยวิธี Slide agglutination (SG) ตามวิธีของ Carol(1973)[75] มีหลักการดังนี้แอนติบอดีในแอนติเซรุ่มอ้างอิงจะทำปฏิกริยาจำเพาะกับเชื้อ *H.influenzae* ที่มีแอนติเจนเป็น type เดียวกัน ทำให้เห็นเป็นเม็ดตะกอนบนแผ่นกระจกสไลด์ได้ ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้

หยด 0.85% saline 1 หยด คนละข้างของกระจกสไลด์ ใช้ loop เขี่ยเชื้อ *H.influenzae* ที่แยกได้จากจานเลี้ยงเชื้อมาละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันใน 0.85% saline ทั้งสองข้างของกระจกสไลด์ ใส่แอนติเซรุ่มอ้างอิงของ *H.influenzae* 20 µl ลงในข้างหนึ่งของกระจกสไลด์เป็นวงทดสอบ และ 0.85% saline 20 µl ในอีกข้างหนึ่งเป็นวงควบคุม (autoagglutination control) เอียงกระจกสไลด์ไปมาประมาณ 1 นาที อ่านผลโดยดูการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นเม็ดตะกอน น้ำใส ในวงทดสอบ และไม่เกิดการรวมกลุ่มเป็นเม็ดตะกอนในวงควบคุม (รูปที่ 6)

4. การเตรียมวัคซีน

4.1. การตรวจหาการเจริญที่เหมาะสมของเชื้อเพื่อเตรียมวัคซีน

ละลายเชื้อ *S.pneumoniae* ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน sheep blood agar ด้วย 0.85% saline ที่ปราศจากเชื้อเทียบความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland No.1 ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมล.วัด OD_{550} โดยใช้ Sorensen buffer solution เป็น blank เนื่องจาก 0.5 McFarland No.1 มี $OD_{550} = 0.1$ ดังนั้นสารละลายของเชื้อ *S.pneumoniae* ควรมี $OD_{550} = 0.1$ ด้วย จากนั้นใส่สารละลายของเชื้อ *S.pneumoniae* 0.1 มล.ลงใน 5% horse serum broth 5 มล.

จำนวน 4 หลอด ดังนั้นความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นในแต่ละหลอดคือ $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมล. อบและเขย่าหลอดที่ 37 °ซ.เป็นเวลา 4,5,6 และ 7 ชั่วโมง จากนั้นให้นำแต่ละหลอดที่ครบเวลาไปนับจำนวนเชื้อและความขุ่นที่ OD_{550}

การเจริญที่เหมาะสมของเชื้อ *H.influenzae* เพื่อเตรียมวัคซีนใช้ 6 ชั่วโมงตามวิธีของ CDC

4.2. การเตรียม *S.pneumoniae* วัคซีน ตามวิธีของ Lund (1960)[76]

นำเชื้อ *S.pneumoniae* ที่ได้รับจาก Statens Seruminstitut ในรูป lyophilized form ละลายใน brain heart infusion broth แล้วใส่ลงใน sheep blood agar นำไปอบที่ 37 °ซ.5% CO_2 24 ชั่วโมง เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว เลี้ยงเชื้อที่แยกได้นี้ใน 5% horse serum broth อบที่ 37 °ซ.18 ชั่วโมง แล้วใส่ส่วนนี้ 10 มล.ลงใน 5% horse serum broth 1500 มล.อบที่ 37 °ซ.โดยเขย่าตลอดเวลา ตรวจสอบความบริสุทธิ์ และการเจริญของเชื้อโดยนำเชื้อมาย้อมสีกรัมและเพาะเลี้ยงใน sheep blood agar ทุกๆ ชั่วโมง และตรวจสอบการสร้าง capsule ของเชื้อด้วยปฏิกริยา Quellung [77] กับแอนติเซรุ่มอ้างอิงที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อ *S.pneumoniae* type ที่ใช้เตรียมวัคซีน เมื่อได้การเจริญของเชื้อที่เหมาะสมแล้ว (6 ชั่วโมง) ใส่ 2% formalin เพื่อหยุดการเจริญของเชื้อ แล้วอบต่อที่ 37 °ซ.ค้างคืน จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3000 g 30 นาที ละลายตะกอนด้วย Sorensen buffer solution จนกระทั่งได้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ $2x10^9$ เซลล์ต่อมล.แบ่งใส่หลอดๆละ 2.5 มล. เก็บไว้ที่ -30 °ซ. จนกว่าจะนำมาใช้

4.3. การเตรียม *H.influenzae* วัคซีน ตามวิธีของ CDC[78]

นำเชื้อ *H.influenzae* type b strain GB 3291 ที่ได้รับจาก CDC ในรูป lyophilized form มาละลายใน Muller Hinton broth แล้วใส่ลงใน chocolate agar เพื่อแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นนำโคโลนีที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงใน Levinthal broth อบที่ 37 °ซ. 18 ชั่วโมง แล้วใส่ส่วนนี้ 0.3 มล.ลงใน Levinthal agar อบที่ 37 °ซ. 6 ชั่วโมง จะได้การเจริญของเชื้อที่เหมาะสม ทดสอบ

ความบริสุทธิ์ของเชื้อด้วยการย้อมสีกรัม และตรวจสอบการสร้าง capsule ของเชื้อด้วยวิธี SG กับแอนติเซรุ่มอ้างอิง จากนั้นเติม 0.5% formalin 6 มล. ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland No.2 ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ.เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของ capsule และเตรียมวัคซีนใหม่ทุกสัปดาห์ที่ฉีด

4.4. การหาความเข้มข้นของวัคซีน

โดยทำ colony counting technique ดังนี้ เจือจางเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมล.ลงครั้งละ 10 เท่าไปเรื่อยๆ ด้วย 0.85% saline ที่ปราศจากเชื้อจนได้ความเข้มข้น 10 เซลล์ต่อมล.หยดสารละลายของเชื้อ *S.pneumoniae* และ *H.influenzae* 0.1 มล.ลงใน sheep blood agar และ chocolate agar ตามลำดับ โดยทำซ้ำ 3 ครั้งต่อ 1 ความเข้มข้น เกลี่ยสารละลายให้กระจายทั่วทั้งจานเพาะเชื้อด้วยแท่งพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ นำไปอบที่ 37 °ซ.5% CO_2 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อจำนวน 30-300 โคโลนี

5. การฉีดกระต่ายเพื่อผลิตแอนติเซรุ่ม

ฉีด *S.pneumoniae* วัคซีนความเข้มข้น $2x10^9$ เซลล์ต่อมล.เข้าทางเส้นเลือดดำที่หู วันเว้นวันติดต่อกัน 5 สัปดาห์ ด้วยปริมาณดังนี้

สัปดาห์ที่ 1 : 0.25, 0.5, 0.5 มล.
สัปดาห์ที่ 2 : 1.0, 1.0, 1.0 มล.
สัปดาห์ที่ 3 : 1.5, 1.5, 1.5 มล.
สัปดาห์ที่ 4 : 2.0, 2.0, 2.0 มล.
สัปดาห์ที่ 5 : 2.0, 2.0, 2.0 มล.

หลังจากฉีดครบแล้ว 1 สัปดาห์ เจาะเลือดปั่นแยกเซรุ่มแล้วนำไปทดสอบหาแอนติบอดีจำเพาะ type และ titer ของแอนติบอดี กรณีที่ titer ไม่สูงพอให้ฉีดต่อด้วยปริมาณ 2.0 มล.อีก 1 สัปดาห์ เมื่อได้ titer ตามต้องการแล้วจึงเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำหรือจากหัวใจกระต่ายให้ได้ตัวละ 30 มล.ปั่นแยกเซรุ่ม เก็บไว้ที่ -30 °ซ.

ฉีด *H.influenzae* วัคซีนความเข้มข้น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมล. เข้าทางเส้นเลือดดำที่หู วันเว้นวันติดต่อกัน 4 สัปดาห์ ด้วยปริมาณดังนี้

สัปดาห์ที่ 1 : 0.1, 0.2, 0.3 มล.
สัปดาห์ที่ 2 : 0.3, 0.4, 0.5 มล.
สัปดาห์ที่ 3 : 0.5, 1.0, 1.0 มล.
สัปดาห์ที่ 4 : 1.0, 1.0*, 1.0* มล.

* วัคซีนความเข้มข้น 2 $x10^{10}$ เซลล์ต่อมล.

เมื่อฉีดครบตามเวลาแล้วเจาะเลือดปั่นแยกเซรุ่มมาทดสอบหาแอนติบอดีจำเพาะ type และ titer ของแอนติบอดี ในกรณีที่ titer ไม่สูงพอ ให้พักกระต่ายไว้ 1 เดือน และฉีดซ้ำด้วยวัคซีนความเข้มข้น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมล. ทางเส้นเลือดดำที่หู วันเว้นวันติดต่อกันอีก 3 สัปดาห์ ด้วยปริมาณดังนี้

สัปดาห์ที่ 1 : 0.2, 0.3, 0.5 มล.
สัปดาห์ที่ 2 : 0.5, 1.0, 1.0* มล.
สัปดาห์ที่ 3 : 1.0*, 1.0*, 1.0* มล.

* วัคซีนความเข้มข้น $2x10^{10}$ เซลล์ต่อมล.

หนึ่งสัปดาห์ต่อมาเจาะเลือดปั่นแยกเซรุ่มและทดสอบหา titer อีกครั้ง เมื่อได้ titer ตามต้องการแล้วจึงเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำหรือจากหัวใจกระต่ายให้ได้ตัวละ 30 มล. ปั่นแยกเซรุ่ม เก็บไว้ที่ -30 °ซ.

6. การทดสอบหา titer ด้วยวิธี Microagglutination[79]

แอนติเจนที่ใช้คือ *S.pneumoniae* วัคซีนความเข้มข้น $1x10^{8}$ เซลล์ต่อมล. และ *H.influenzae* วัคซีนความเข้มข้น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมล. ใส่สี 10% methylene blue ลงไป 1-2 หยด เพื่อให้การอ่านผลง่ายขึ้น

แอนติบอดีที่ใช้คือ แอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* ทั้ง 5 type และแอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* type b ที่เตรียมได้นำมาเจือจางด้วย 0.85% saline โดยใช้ microtiter plate

ผลบวกควบคุมคือ หลุมที่ใส่แอนติเจนกับแอนติเซรุ่มอ้างอิงที่เป็น type เดียวกับแอนติเจน

ผลลบควบคุมคือ หลุมที่ใส่แอนติเจนกับ 0.85% saline เพื่อป้องกันการเกิด autoagglutination

<u>วิธีทำ</u> ให้ใส่แอนติเจน, แอนติบอดี และ 0.85% saline ปริมาณดังนี้

น้ำยาที่ใช้	หลุมที่ 1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.85% Saline	-	<----------50 µl---------->							50µl
แอนติบอดี	100µl							50µl	-
แอนติเจน	<----------50 µl---------->								50µl
ความเข้มข้น	1	2	4	8	16	32	64	128	-ve

-ve ; หลุมควบคุม

<u>การอ่านผล</u>

ผลบวก : เห็นการเกาะกลุ่มของเชื้อแผ่กระจายที่ก้นหลุม

ผลลบ : เห็นการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุม

<u>การแปลผล</u>

titer ของแอนติบอดีคือ ความเข้มข้นสูงสุดที่ให้ผลบวกในหลุม

ทดสอบ และให้ผลลบในหลุมควบคุมด้วย

7. การทดสอบแอนติบอดีจำเพาะ type

7.1. แอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* ใช้ปฏิกริยา Quellung ตามวิธีของ Finegold(1986)[77] มีหลักการดังนี้ เมื่อแอนติบอดีทำปฏิกริยากับ capsule ของเชื้อที่มีแอนติเจนเป็น type เดียวกัน ทำให้เกิดการบวมของ capsule ให้เห็นได้ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้

เพาะเลี้ยงเชื้อ *S.pneumoniae* ใน 5% horse serum broth ที่ 37°ซ. 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว นำ broth culture ที่ได้มาเกลี่ยให้เป็นฟิล์มบางๆ บนกระจกสไลด์ 2 แผ่น ใส่แอนติเซรุ่ม 10 µl ลงบนแผ่นทดสอบและใส่ 0.85% saline 10 µl ในแผ่นควบคุมและใส่สี 1% methylene blue เล็กน้อย เพื่อให้เห็นปฏิกริยาง่าย ขึ้นปิดด้วย coverglass แล้วตรวจดูการบวมของ capsule เทียบกับแผ่นควบคุม ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า (รูปที่ 7,8)

7.2. แอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* ใช้วิธี SG ดังที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3

8. การทดสอบปฏิกริยาข้ามกลุ่ม

8.1. ปฏิกริยาข้ามกลุ่มระหว่าง type

นำแอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* ที่เตรียมได้ มาทดสอบปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อชนิดเดียวกัน แต่มีแอนติเจนต่าง type กันด้วยปฏิกริยา Quellung และ Microagglutination

8.2. ปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อชนิดอื่น

นำแอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* ที่เตรียมได้ทดสอบปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อบัคเตรีชนิดอื่น ที่มีรายงานว่าสามารถมีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกัน[58,80] ได้แก่ *Escherichia coli*, Klebsiellae sp. และ *H.influenzae* type b ด้วยปฏิกริยา Quellung และ Microagglutination ในทำนองเดียวกันแอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae*

type b ที่เตรียมได้ก็นำมาทดสอบปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *S.pneumoniae* ทั้ง 5 type, *Escherichia coli* และ Klebsiellae sp. ด้วยวิธี SG และ Microagglutination

9. การประยุกต์นำแอนติเซรุ่มไปใช้เตรียมชุดทดสอบ

9.1. ชุดทดสอบ Co-agglutination (COA)เพื่อตรวจหา serotype ของ *S.pneumoniae* มีหลักการดังนี้คือ *Staphylococcus aureus* Cowan I เป็นสายพันธุ์ที่มี Protein A อยู่ที่ผิวสามารถเกาะจับกับส่วน Fc ของแอนติบอดีในแอนติเซรุ่มได้ และเหลือส่วน Fab ของแอนติบอดีเป็นอิสระ ดังนั้นเมื่อนำเชื้อ Staphylococci ซึ่งมีแอนติบอดีเกาะจับอยู่กับส่วน Protein A นี้ไปทำปฏิกริยากับเชื้อที่มีแอนติเจนที่จำเพาะกันก็จะเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อให้เห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้

การเตรียม Protein A ตามวิธีของ Kronvall (1973)[81]

โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus* Cowan I ใน trypticase soy broth แล้วอบไว้ที่ 37 °ซ. 24 ชั่วโมง เพื่อให้สร้าง Protein A ฆ่าเชื้อด้วยน้ำยา 10% formaldehyde นาน 3 ชั่วโมง นำไปปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 แล้วอบ 80 °ซ. นาน 5 นาที เพื่อกระตุ้นการเกาะจับของ Protein A ให้ดีขึ้น จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้น 10% โดยปริมาตรด้วย PBS pH 7.2 แล้วใส่ 0.005% NaN_3 เล็กน้อย เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อรา เก็บไว้ที่ 4 °ซ.

การเตรียมน้ำยาสำหรับชุดทดสอบ COA ตามวิธีของ Smart(1986)[82]

โดยผสม 10% Protein A กับแอนติเซรุ่มที่เตรียมได้ในอัตราส่วน 10:1 อบไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง โดยเขย่าทุกครึ่งชั่วโมงเพื่อให้เกิดการเกาะจับของ Protein A กับแอนติบอดีในแอนติเซรุ่มแล้วนำไปปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย PBS pH 7.2 ปรับให้มีความเข้มข้น 10% ด้วย PBS pH 7.2 ก็จะได้น้ำยาสำหรับชุดทดสอบ COA และเพื่อให้สังเกตปฏิกริยาง่ายขึ้น จึงใส่ 2% methylene blue ลงไป 0.5 มล. ส่วนน้ำยาสำหรับชุดทดสอบควบคุมเตรียมได้ในทำนองเดียวกันโดยใช้เซรุ่มที่ได้จากกระต่ายปรกติ เก็บไว้ที่ 4 °ซ.

วิธีทดสอบ COA โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อ *S.pneumoniae* 1-2 โคโลนี ป้ายลงบนแผ่นกระดาษผิวมันสีขาว ใส่น้ำยาสำหรับชุดทดสอบ COA 10 µl ข้างหนึ่งและน้ำยาสำหรับชุดทดสอบควบคุม 10 µl อีกข้างหนึ่ง เอียงแผ่นกระดาษไปมา อ่านผลภายในเวลาไม่เกิน 2 นาที โดยสังเกตการเกาะกลุ่มของเชื้อในวงทดสอบ เทียบกับวงควบคุมที่ไม่เกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อ (รูปที่ 9)

9.2. วิธี SG เพื่อตรวจหา type b ของ *H.influenzae* ด้วยแอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* type b ที่เตรียมได้ ทำตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3

10. การแยกสกัด IgG

ใช้วิธี Affinity chromatography บน Protein A-sepharose CL-4B ตามวิธีของ Goding (1976)[83] โดยที่ Protein A จะ cross-linked กับ sepharose CL-4B ด้าย covalent bond แยกสกัด IgG โดยผ่านแอนติเซรุ่มที่เตรียมได้ไปบน Protein A ที่อิ่มตัวอยู่ใน Tris-NaCl pH 8.6 ในขั้นแรกจะเก็บโปรตีนต่างๆที่ไม่ได้เกาะจับอยู่กับ Protein A ออกมาก่อน จากนั้นจึงล้างโปรตีน IgG ออกจาก Protein A ด้วย acetate-NaCl pH 4.3 ตรวจโปรตีนที่แยกได้ด้วยการวัดความขุ่นที่ OD_{280} (รูปที่ 10)

11. การเพิ่มความเข้มข้นของ IgG

ใช้วิธี Amicon ultrafiltration โดยผ่าน IgG ลงบนแผ่นกรองชนิด YM 100 ที่มีรูขนาดเล็กกว่าขนาดของ IgG กรองจนกระทั่งเหลือปริมาตรของ IgG เท่ากับปริมาตรแอนติเซรุ่มก่อนแยกสกัด

12. การทดสอบความบริสุทธิ์ของ IgG

ด้วยวิธี Immunodiffusion[84] กับแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่าย (Anti-rabbit IgG) และแอนติบอดีต่อเซรุ่มของกระต่าย (Anti-rabbit serum) ที่เจือจางลง 10 เท่าด้วย 0.85% saline

13. การตรวจหาปริมาณโปรตีนของ IgG

ตามวิธีของ Lowry (1951)[85] โดยอ่านค่าปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตราฐานของโปรตีนที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว (รูปที่ 11)

14. การตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG เพื่อเตรียมชุดทดสอบ LA

ด้วยการทำ checkerboard titration เพื่อตรวจหาความเข้มข้นน้อยที่สุดของ IgG ในชุดทดสอบ LA ที่ยังสามารถตรวจพบแอนติเจนของเชื้อได้

15. การเตรียมชุดทดสอบเพื่อตรวจหาแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ

15.1. การเตรียมชุดทดสอบ LA ตามวิธีของ Richard (1986)[86] มีขั้นตอนการทำดังนี้ ผสม IgG ความเข้มข้นที่เหมาะสม 25 µl กับ glycine buffer saline (GBS) pH 8.2, 525 µl และเม็ด latex (Difco) 50 µl อบไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง โดยเขย่าทุก 10 นาที เพื่อให้เกิดการเกาะจับของ IgG กับเม็ด latex เมื่อครบเวลาแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 g นาน 5 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำใส จากนั้นนำไปปั่นล้างสองครั้งด้วย 0.1% bovine serum albumin (BSA) ใน GBS ปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05% ด้วย 2.5% เซรุ่มของกระต่ายปรกติที่ละลายใน GBS ก็จะได้น้ำยาสำหรับชุดทดสอบ LA ส่วนน้ำยาสำหรับชุดทดสอบควบคุม เตรียมได้ในทำนองเดียวกัน โดยใช้ IgG ที่แยกสกัดจากเซรุ่มของกระต่ายปรกติ เก็บไว้ที่ 4 °ซ.

วิธีทดสอบ LA โดยใส่สิ่งส่งตรวจ 40 µl ลงบนกระจกสไลด์ทั้งสองข้างห่างกันพอสมควร ผสมกับน้ำยาสำหรับชุดทดสอบ LA 10 µl ข้างหนึ่งของกระจกสไลด์ และน้ำยาสำหรับชุดทดสอบควบคุม 10 µl อีกข้างหนึ่ง เอียงกระจกสไลด์ไปมา โดยถือกระจกสไลด์ห่างจากสายตา ประมาณ 25-35 เซนติเมตร ภายใต้แสงจากดวงไฟ อ่านผลภายใน 3 นาที โดยสังเกตการเกาะกลุ่มของเม็ด latex น้ำใสในวงทดสอบ และไม่มีการเกาะกลุ่มของเม็ด latex น้ำขุ่นในวงควบคุม (รูปที่ 12)

ในกรณีที่มีปฏิกริยาเกาะกลุ่มทั้งในวงทดสอบและวงควบคุม หรือสิ่งส่งตรวจมีเสมหะปนอยู่มาก ทำให้ไม่สามารถแปลผลได้ ให้นำสิ่งส่งตรวจไปผ่านขบวนการย่อยสลายตามวิธีของ Heikkila (1987)[69] โดยจุ่มสำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อในสิ่งส่งตรวจให้ชุ่ม จากนั้นนำไปแช่ไว้ใน PBS pH 7.4, 5 มล. นาน 5 นาที เขย่าแรงๆ ให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 100 °ซ.นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 2000 g นาน 10 นาที ดูดเอาส่วนที่เป็นน้ำใสมาตรวจหาแอนติเจนด้วยชุดทดสอบ LA

16. การประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่เตรียมได้

16.1. การตรวจหา serotype

เปรียบเทียบผลการตรวจหา type 1,5,6,19,23 ของเชื้อ *S.pneumoniae* ที่แยกได้จากจานเพาะเชื้อด้วยชุดทดสอบ COA ที่เตรียมขึ้นเองกับวิธี CIE ซึ่งใช้แอนติเซรุ่มที่ซื้อจากต่างประเทศ

เปรียบเทียบการตรวจหา type b ของเชื้อ *H.influenzae* ที่แยกได้จากจานเพาะเชื้อด้วยวิธี SG โดยใช้แอนติเซรุ่มที่เตรียมขึ้นเองกับแอนติเซรุ่มที่ซื้อจากต่างประเทศ

16.2. การตรวจหาแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ

ความไวของชุดทดสอบ LA คือความเข้มข้นของแอนติเจนปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ โดยเจือจางเชื้อ *S.pneumoniae* type 1,5,6,19,23 และ *H.influenzae* type b ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมล.ลงครั้งละ 10 เท่าไปเรื่อยๆ ด้วย 0.85% saline ที่ปราศจากเชื้อจนได้ความเข้มข้น 10 เซลล์ต่อมล.จากนั้นนำชุดทดสอบ LA ที่เตรียมได้มาตรวจหาแอนติเจนของเชื้อในทุกความเข้มข้น และรายงานเป็นความเข้มข้นสุดท้ายที่ชุดทดสอบ LA สามารถตรวจพบได้

ส่วนความจำเพาะของชุดทดสอบ LA ทำได้โดยการทดสอบปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococus aureus*, β-Streptococcus ตลอดจนเชื้อบัคเตรีที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคปอดบวมและสามารถตรวจพบได้จาก nasopharyngeal secretion ด้วยการเพาะเชื้อ

เปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อในสิ่งส่งตรวจด้วยชุดทดสอบ LA กับการเพาะเชื้อ

17. การเปรียบเทียบค่าใช้จ่าย

คำนวณค่าใช้จ่ายในการเตรียมแอนติเซรุ่มเปรียบเทียบกับราคาของแอนติเซรุ่มที่ซื้อจากต่างประเทศ และค่าใช้จ่ายของชุดทดสอบต่างๆ ที่เตรียมได้กับราคาของชุดทดสอบที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก)

18. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

1. ความไวของชุดทดสอบ เมื่อเทียบกับวิธีมาตราฐานเปรียบเทียบ

$$\text{(sensitivity)} = \frac{\text{ผลบวกจริงที่อ่านได้จากชุดทดสอบ} \times 100}{\text{ผลบวกจริงทั้งหมด}}$$

2. ความจำเพาะของชุดทดสอบ เมื่อเทียบกับวิธีมาตราฐานเปรียบเทียบ

$$\text{(specificity)} = \frac{\text{ผลลบจริงที่อ่านได้จากชุดทดสอบ} \times 100}{\text{ผลลบจริงทั้งหมด}}$$

3. ความถูกต้องในการทำนายผลเมื่อชุดทดสอบได้ผลบวก

$$\text{(positive predictive value)} = \frac{\text{ผลบวกจริงที่อ่านได้จากชุดทดสอบ} \times 100}{\text{ผลบวกทั้งหมดที่อ่านได้จากชุดทดสอบ}}$$

4. ความถูกต้องในการทำนายผลเมื่อชุดทดสอบได้ผลลบ

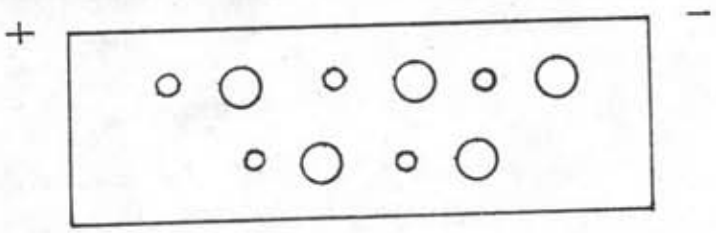
$$\text{(negative predictive value)} = \frac{\text{ผลลบจริงที่อ่านได้จากชุดทดสอบ} \times 100}{\text{ผลลบทั้งหมดที่อ่านได้จากชุดทดสอบ}}$$

5. ประสิทธิภาพของชุดทดสอบเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานเปรียบเทียบ

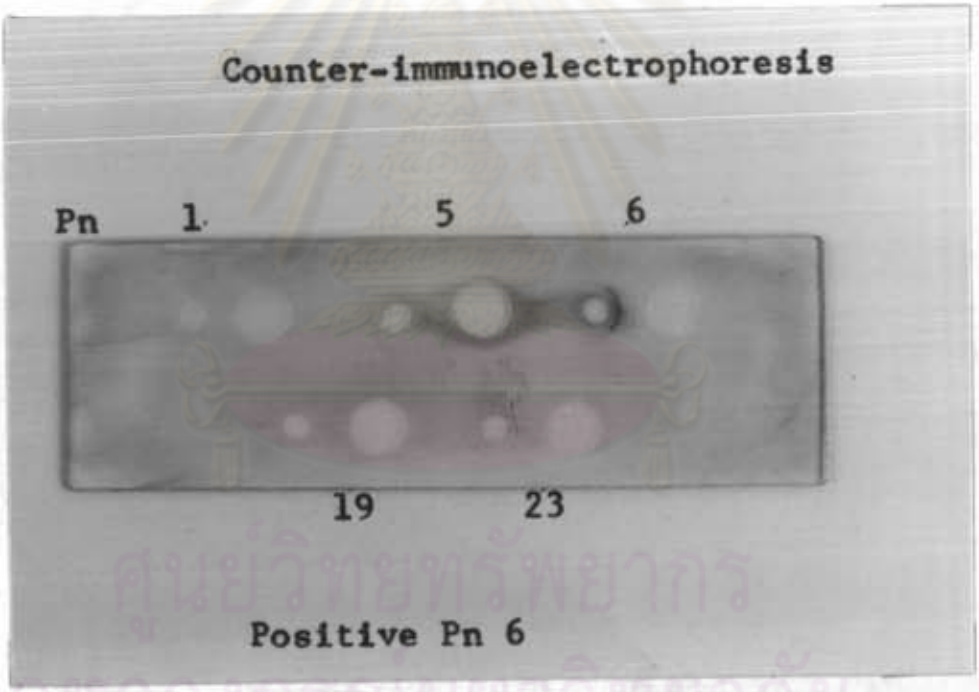
(efficiency of test) = $\frac{\text{ผลบวกจริงและผลลบจริงที่อ่านได้จากชุดทดสอบ} \times 100}{\text{จำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษา}}$

ถ้าชุดทดสอบใด มีความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพสูง ชุดทดสอบนั้นสามารถจะวินิจฉัยโรคได้ถูกต้อง และเป็นที่เชื่อถือได้[87]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



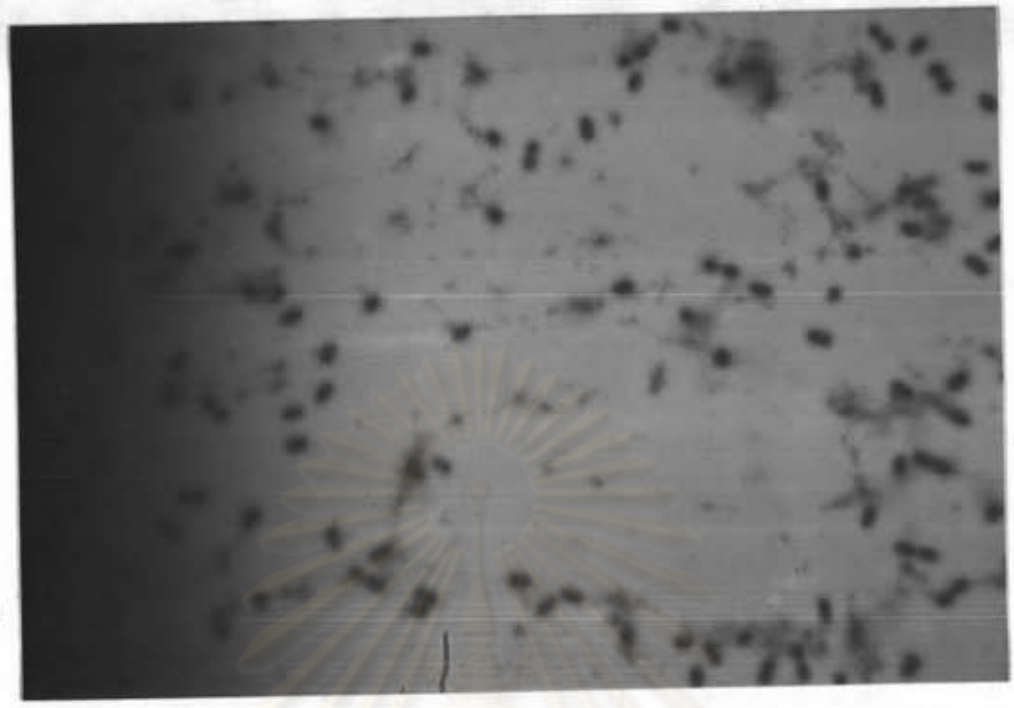
รูปที่ 4 ขนาดของกระจกสไลด์ที่มีวุ้นเท่าของจริง



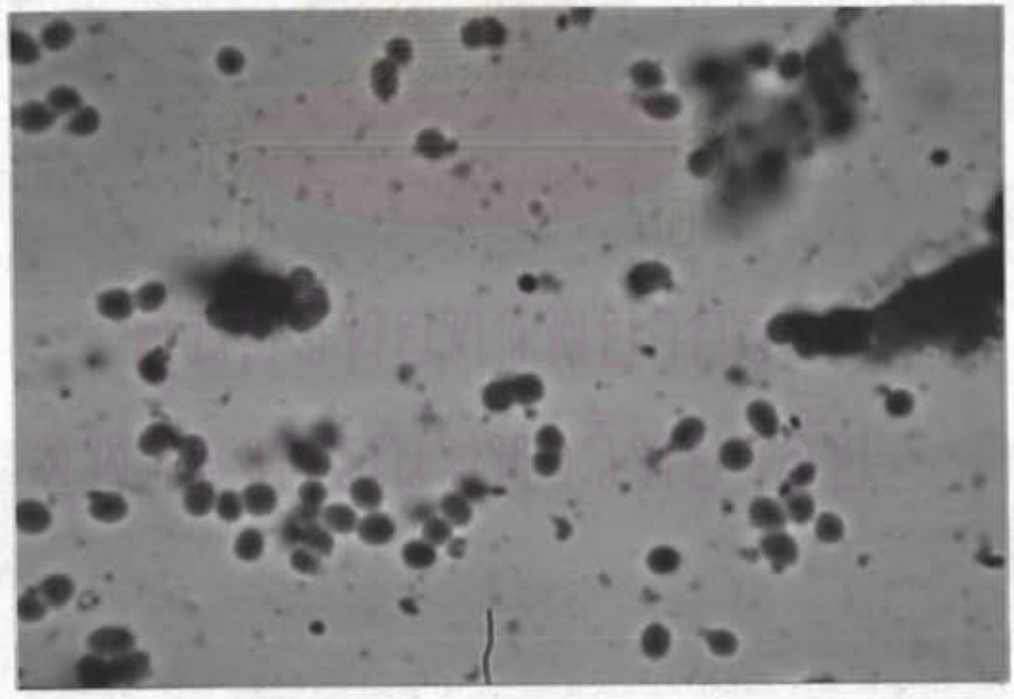
รูปที่ 5 ผลการตรวจหา serotype ของ *S.pneumoniae* ด้วยวิธี CIE

รูปที่ 6 ผลการตรวจหา serotype ของ *H. influenzae* ด้วยวิธี SG

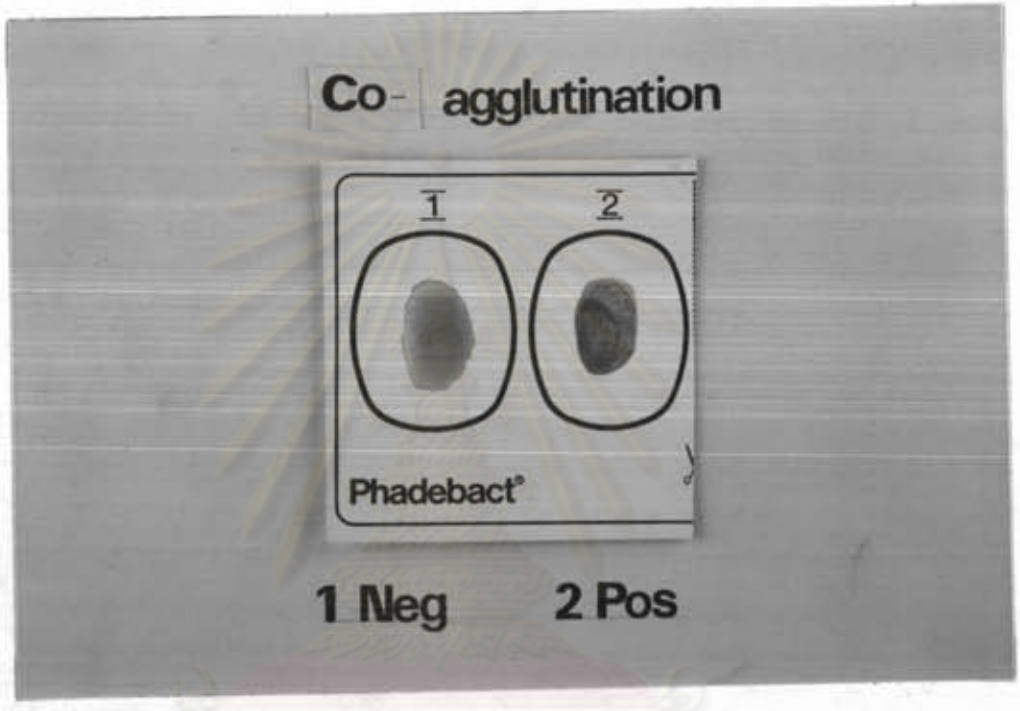
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 ผลลบจากการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะ type ของ *S.pneumoniae* ด้วยปฏิกริยา Quellung



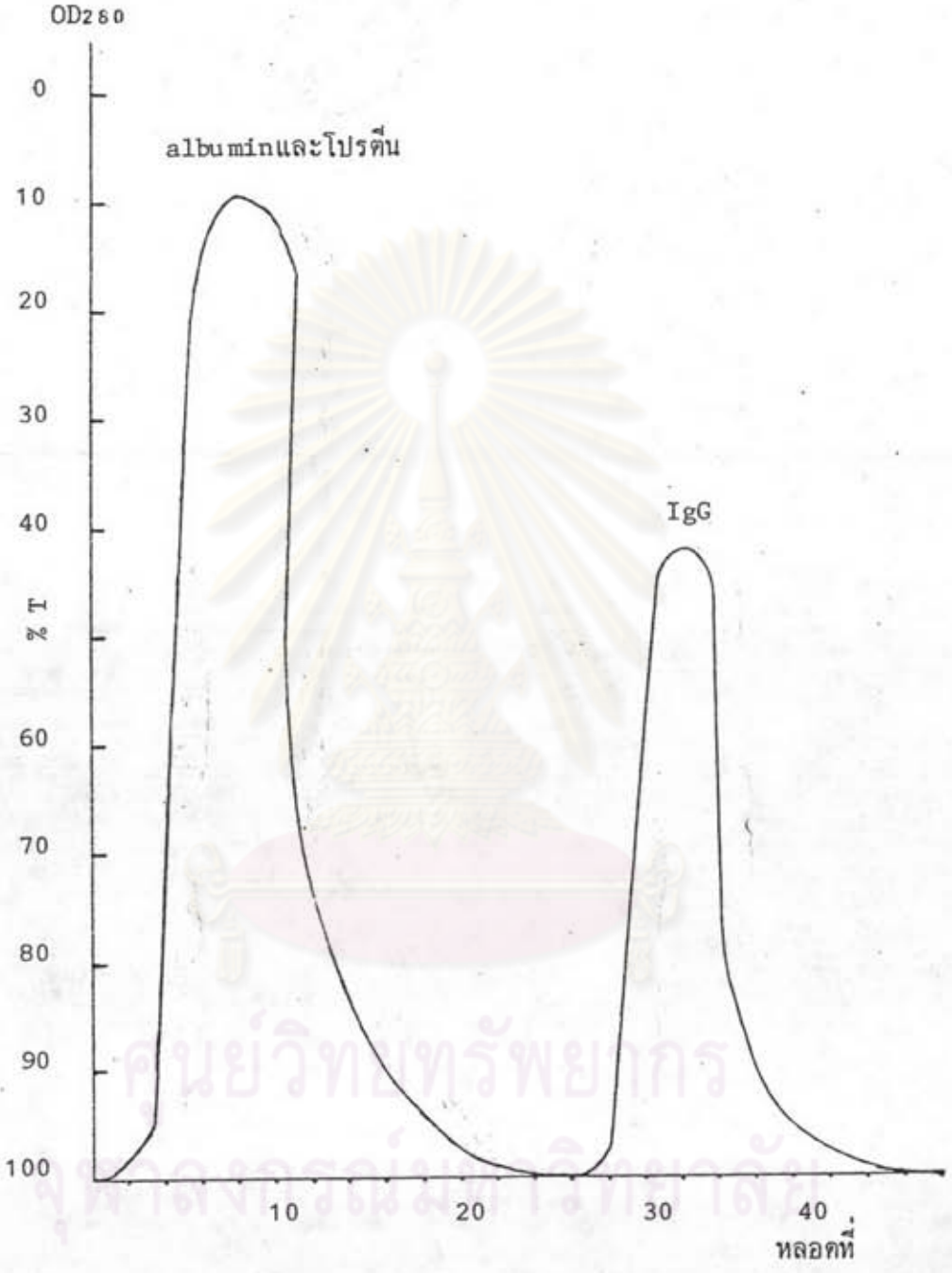
รูปที่ 8 ผลบวกจากการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะ type ของ *S.pneumoniae* ด้วยปฏิกริยา Quellung



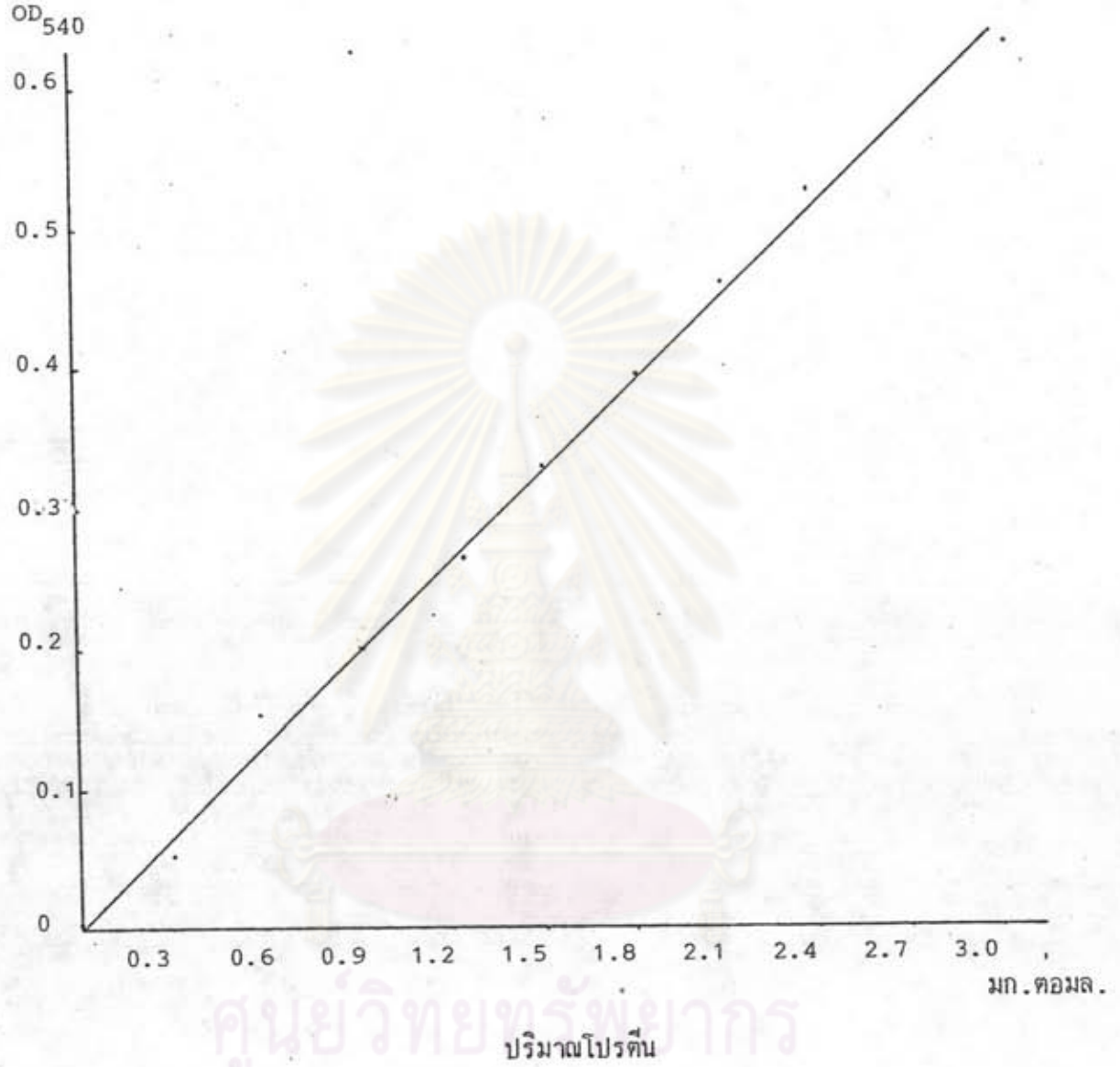
รูปที่ 9 ผลการตรวจหา serotype ของ *S.pneumoniae* ด้วยชุดทดสอบ COA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I1030A629.

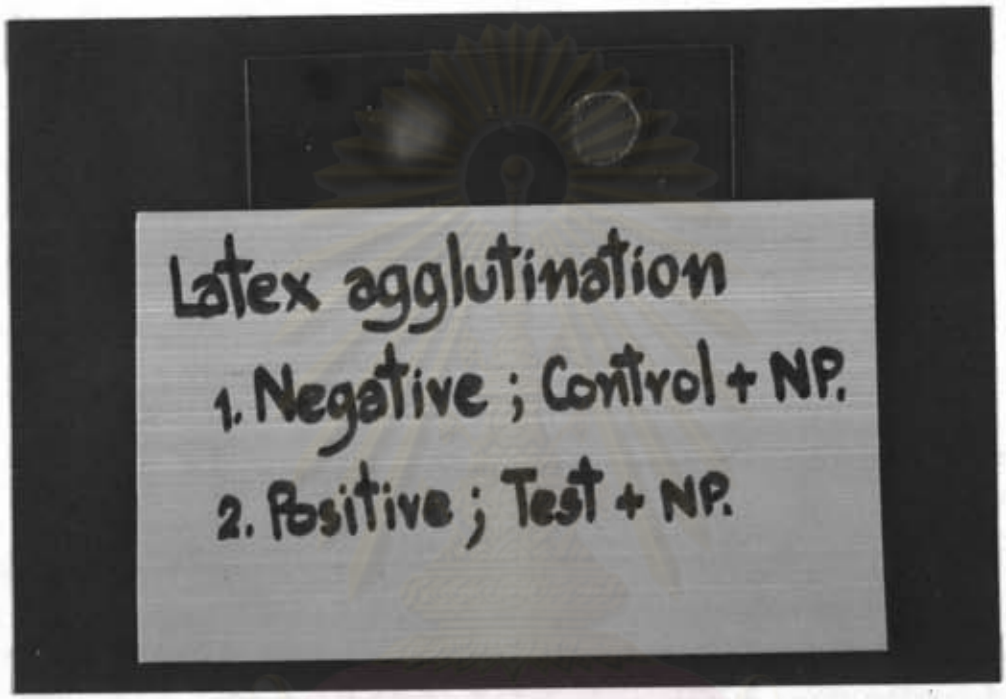


รูปที่ 10 กราฟแสดงค่า OD_{280} ของโปรตีนที่แยกสกัดได้ด้วยวิธี Affinity chromatography บน Protein A-sepharose CL-4B



รูปที่ 11 กราฟมาตราฐานสำหรับตรวจหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 ผลการตรวจหาแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจด้วยชุดทดสอบ LA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย