บทที่ ๓

อุปกรณ์และวิธีการ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาแบ่งออกเป็น ๒ ทาง

๑. การศึกษาทางคลีนิค

๒. การศึกษาทางห้องปฏิบัติการ

ระยะเวลาการศึกษาเริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๒๑ จนถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๒๒

๑. การศึกษาทางคลีนิค

๑.๑ อุปกรณ์

๑.๑. กลุ่มตัวอย่างเป็นเด็กนักเรียนชายอายุ ๗-๑๔ ปี จำนวน ๑๘๙ คน ที่สถานสงเคราะห์เด็กชายบ้านปากเกร็ด นนทบุรี เคยได้รับการฉีดวัคซีนไทฟอยด์ครั้งสุดท้ายก่อนเริ่มทำการศึกษาเป็นเวลาประมาณ ๑ ปี ๗ เดือน

๑.๑.๒ วัคซีนไทฟอยด์ เป็นวัคซีนที่ผลิตโดยองค์การเภสัชกรรม เลขที่ ๒ หมดอายุเดือนกรกฎาคม พ.ศ ๒๕๒๒ เป็นวัคซีนของเชื้อ Salmonella typhi ชนิดตัวตาย คือ heat-killed phenolised vaccine ใน ๑ มล ของวัคซีนประกอบด้วย ๑๐๐๐ ล้านตัวของเชื้อ

๑.๑.๓ น้ำยา diluent ของวัคซีนไทฟอยด์ประกอบด้วย ๐.๔% phenol ในน้ำเกลือธรรมดา (normal saline) น้ำยานี้เตรียมโดยองค์การเภสัชกรรมพร้อมกับการเตรียมวัคซีนไทฟอยด์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

๑.๑.๔ ยาเม็ดแอสไพริน ๕ เกรน และยาคลอเฟนนิรามีน ๔ มก ผลิตโดยองค์การเภสัชกรรม

๑.๑.๕ ประตวักทางปาก

๑.๑.๖ เครื่องชั่งน้ำหนักและเครื่องวัดส่วนสูง

๑.๑.๗ เครื่องฟังปอดและหัวใจ (stethoscope) ไฟฉายและไม้กดลิ้น

๑.๑.๘ กระบอกฉีดยา ๑ มล, ๑๐ มล เข็มฉีดยาเบอร์ ๒๓ และเข็มเจาะเลือดเบอร์ ๒๑ $\frac{๑}{๒}$

๑.๑.๙ สำลี และแอลกอฮอล์ ๗๐%

๑.๑.๑๐ แบบฟอร์มการบันทึกประวัติการเจ็บป่วย

๑.๑.๑๑ แบบฟอร์มบันทึกการตรวจร่างกาย

๑.๑.๑๒ แบบฟอร์มบันทึกผลของปฏิกิริยาหลังฉีดวัคซีน

๑.๒ วิธีการ

๑.๒.๑ สุ่มตัวอย่างเด็กจำนวน ๑๘๙ คน แบ่งเด็กออกเป็น ๔ กลุ่ม ให้เด็กแต่ละกลุ่มมีจำนวนใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ ๑ (หน้า ๒๐)

๑.๒.๒ บันทึกประวัติการเจ็บป่วยในปัจจุบัน ประวัติการเจ็บป่วยในอดีต ประวัติการรับภูมิคุ้มกัน

๑.๒.๓ ชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูงของเด็กทั้ง ๔ กลุ่มก่อนทำการฉีดวัคซีน

๑.๒.๔ ตรวจร่างกายเด็กทั้ง ๔ กลุ่มโดยแพทย์

๑.๒.๕ เจาะเลือดทั้ง ๔ กลุ่มก่อนฉีดวัคซีนไทฟอยด์ (ครั้งที่ ๑) เพื่อตรวจหา O และ H agglutinin titer

๑.๒.๖ วัดอุณหภูมิทางปากก่อนฉีดวัคซีนทั้ง ๔ กลุ่ม

๑.๒.๗ ฉีดวัคซีนไทฟอยด์ ให้ยาเม็ดแอสไพรินและยาคลอเฟนนีรามีนแต่ละกลุ่ม ดังตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ จำนวนเด็กที่ได้รับวัคซีนและยาที่ใช้

กลุ่มที่	จำนวน	วัคซีนและชนิดของยาที่ใช้
๑	๔๘	วัคซีนไทฟอยด์
๒	๔๗	วัคซีนไทฟอยด์และยาเม็ดแอสไพริน
๓	๔๗	วัคซีนไทฟอยด์ ยาเม็ดแอสไพริน และยาคลอเฟนนีรามีน
๔	๔๗	๐.๔% ของ phenol ในน้ำเกลือธรรมดา (normal saline)

ขนาดและวิธีให้ยาและวัคซีน

วัคซีนไทฟอยด์

เด็กอายุต่ำกว่า ๑๒ ปี ให้ ๐.๒๕ มล ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (Subcutaneous tissue) บริเวณต้นแขน

เด็กอายุเกิน ๑๒ ปี ให้ ๐.๕ มล

ยาเม็ดแอสไพริน ขนาด ๕ เกรน

เด็กอายุต่ำกว่า ๑๐ ปี ให้รับประทานครั้งละ ๑ เม็ด

เด็กอายุเกิน ๑๐ ปี ให้รับประทานครั้งละ ๒ เม็ด

ยาคลอเฟนนีรามีน ขนาด ๔ มก

ให้รับประทานครั้งละ ๑ เม็ดทุกราย

๑.๒.๘ วัดอุณหภูมิของร่างกายภายหลังฉีดวัคซีน ๓ ชม ๖ ชม ๒๔ ชม และ ๔๘ ชม

๑.๒.๙ สามอาการหลังฉีดวัคซีนและตรวจดูปฏิกิริยาเฉพาะที่หลังฉีดวัคซีน ๒๔ ชม

๑.๒.๑๐ ชั่งน้ำหนักเด็กทั้ง ๔ กลุ่มหลังฉีดวัคซีน ๗ วัน

๑.๒.๑๑ ถามและตรวจการเกิดมีหรือไม่มี delayed reaction หลังฉีดวัคซีน ๗ วัน

๑.๒.๑๒ เจาะเลือดเด็กทั้ง ๔ กลุ่มหลังฉีดวัคซีนครั้งแรก ๑ เดือน (ครั้งที่ ๒)

๑.๒.๑๓ ฉีดวัคซีนไทฟอยด์ครั้งที่ ๒ หลังจากฉีดครั้งแรกห่างกัน ๑ เดือน ให้เด็กกลุ่มที่ ๔ จำนวน ๕๔ คน ซึ่งเป็นเด็กที่อาสาสมัครฉีดครั้งที่ ๒ เป็นเด็กมาจากกลุ่มที่ ๑, ๒ และ ๓

๑.๒.๑๔ หลังฉีดวัคซีนครั้งที่ ๒ ให้แก่เด็กกลุ่มที่ ๕ แล้วศึกษาปฏิกิริยาหลังฉีดวัคซีนเหมือนกับการฉีดวัคซีนครั้งแรก

๑.๒.๑๕ เจาะเลือดเด็กทั้ง ๕ กลุ่ม หลังฉีดวัคซีนครั้งแรกห่างกัน ๓ เดือน (ครั้งที่ ๓)

๑.๒.๑๖ เจาะเลือดเด็กทั้ง ๕ กลุ่มหลังฉีดวัคซีนครั้งแรกห่างกัน ๖ เดือน (ครั้งที่ ๔)

๒. <u>การศึกษาทางห้องปฏิบัติการ</u>

มีการทดสอบ ๓ อย่าง คือ

๒.๑ Microagglutination test (๘)

๒.๒ Rapid slide test (๕๙)

๒.๓ Nitroblue Tetazolium Dye (NBT) test (๖๐)

๒.๑ <u>Microagglutination test</u>

๒.๑.๑ <u>อุปกรณ์</u>

๒.๑.๑.๑ Microtiter plates

๒.๑.๑.๒ 0.05 ml Microdilutors

๒.๑.๑.๓ 0.05 ml Pipette droppers

๒.๑.๑.๔ 0.1 ml/1 ml pipette

๒.๑.๑.๕ Test tube 13 x 100 mm

๒.๑.๑.๖ Flask 25 ml

๒.๑.๒ น้ำยา

๒.๑.๒.๑ Antigen solution

๒.๑.๒.๑.๑ Salmonell O group D antigen (Typhoid O somatic) Gamma Diagnostics Division, Gamma Biological Houston, Tx 77092, Lot. No. 334-17

๒.๑.๒.๑.๒ Salmonella H group D antigen (Typhoid H flagellar) Gamma Diagnostic Division, Gamma Biologicals Houston, Tx 77092, Lot. No. 334-17, 337-15, 337-17, 337-18

๒.๑.๒.๒ 0.9% Sodium chloride solution, (normal saline solution)

๒.๑.๓ วิธีการ

๒.๑.๓.๑ นำเลือดที่เจาะได้มาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว ๒๕๐๐ รอบต่อนาที นาน ๑๐ นาที เพื่อแยกเอาน้ำเหลือง (serum) ไปตรวจ

๒.๑.๓.๒ เขย่าขวด antigen O และ H เพื่อให้น้ำยาผสมกันดีแล้วทำให้เจือจางเป็น 1:100 ด้วยน้ำเกลือธรรมดา (normal saline solution)

๒.๑.๓.๓ นำน้ำเหลืองที่แยกได้มาทำให้เจือจางเป็น 1:5 ด้วยน้ำเกลือธรรมดาในหลอดทดลองแล้วผสมให้เข้ากัน

๒.๑.๓.๔ น้ำเหลืองที่เตรียมไว้ในข้อ ๒.๑.๓.๓ นำมาเตรียม two fold dilution ๒ ชุด โดยเริ่มตั้งแต่ 1:20 จนถึง 1:10240 ชุดหนึ่งสำหรับตรวจ

หา anti O antibody และอีกชุดหนึ่งสำหรับตรวจหา anti H antibody

๒.๑.๓.๕ ใช้ pipette droppers ดูดน้ำเกลือธรรมดาเป็น diluent หยดใส่หลุมทุกหลุมของ microtiter plates จำนวน ๐.๐๕ มล ทุกหลุม

๒.๑.๓.๖ ใช้ microdilutors ดูดน้ำเหลืองที่เตรียมไว้ตามข้อ ๒.๑.๓.๓ จำนวน ๐.๐๕ มล ผสมในหลุมแรก (เจือจาง 1:20) ของ microtiter plate ที่มี ๐.๐๕ มล ของน้ำเกลือธรรมดาไว้แล้ว โดยหมุน microdilutors ไปมาประมาณ ๓๐ ครั้ง ในแต่ละหลุม จากนั้นทำ dilution ในหลุมต่อไปเช่นเดียวกันจนถึงหลุมของแถวสุดท้าย (เจือจาง 1:10240) จึงยก microdilutor ออก

๒.๑.๓.๗ หยด ๐.๐๕ มล antigen O โดยใช้ pipette dropper ใส่ลงใน serum dilution ของทุกหลุมของแถว anti O ดูด antigen H โดยใช้ pipette dropper คนละอันหยดใส่ในหลุมของแถว Anti "H" เช่นกัน

๒.๑.๓.๘ ทำ positive control โดยใช้น้ำเหลืองของเด็กที่ทราบ titer แน่นอนแล้วทำควบคู่กันทุกครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งผลจะได้ titer เท่าเดิมทั้ง anti O และ "H"

๒.๑.๓.๙ ทำ negative control ใช้น้ำเกลือธรรมดาแทนน้ำเหลือง ทำทั้ง anti "O" และ anti "H"

๒.๑.๓.๑๐ ผสมให้เข้ากันโดยวิธีเคาะข้าง microtiter plate นั้น ๆ

๒.๑.๓.๑๑ นำ microtiter platesที่ทำไว้มาใส่ลงในกล่องพลาสติคที่รองด้วยผ้าก๊อส ซึ่งทำให้ชื้นด้วยน้ำ เพื่อกันการระเหยแห้งของส่วนผสมใน microtiter plate

๒.๑.๓.๑๒ อ่านผลภายหลัง incubate ที่มีอุณหภูมิ ๓๗°ซ นาน ๑๘ ชั่วโมง

๒.๑.๓.๑๓ บันทึกค่าเจือจางของน้ำเหลืองที่เจือจางมากที่สุดซึ่งให้ agglutination ได้เป็น titer ที่ใช้รายงานผล antiserum ของเด็กแต่ละคน

๒.๒ Rapid slide test

๒.๒.๑ อุปกรณ์

๒.๒.๑.๑ Pipette

๒.๒.๑.๒ Glass slide

๒.๒.๑.๓ Mechanical rotator

๒.๒.๑.๔ Applicator stick

๒.๒.๒ น้ำยา

ใช้ antigen solution ของ Salmonella O และ H group D ของ Gamma Diagnostics Division, Gamma Biologicals, Houston, Tx 77092, Lot. No. 334-17, 337-15.

๒.๒.๓ วิธีการ

๒.๒.๓.๑ เช็ด glass slide ให้สะอาด แบ่ง slide เป็น ๒ ส่วนด้วยดินสอเขียนแก้ว

๒.๒.๓.๒ ใช้ pipette ดูดน้ำเหลืองที่ต้องการทดสอบ ๐.๐๔ มล หยดใส่ลงบน glass slide ทั้งสองข้างที่แบ่งไว้

๒.๒.๓.๓ หยด ๑ หยดของ Antigen "O" และ "H" ลงบนหยดน้ำเหลืองข้างละหยด ใช้ applicator stickผสมน้ำเหลืองกับแอนติเจนให้เข้ากัน

๒.๒.๓.๔ วาง slide ลงบน mechanical rotator นาน ๑ นาที ถ้าไม่มีเครื่องนี้ อาจใช้วิธีตะแคง slide เพื่อให้ antigen ผสมกับน้ำเหลือง

๒.๒.๓.๕ อ่านผล agglutination การทำ slide test titer ที่ได้จะเป็นค่าประมาณจากการทำ tube test dilution ดังนี้ (๕๙)

Serum volume (ml)	Approximate tube dilution
0.08	1:20
0.04	1:40
0.02	1:80*
0.01	1:160
0.005	1:320

*Significant in non-vaccinated individuals

ถ้าผล slide test เป็นบวก (positive) ที่ 1:40 ให้ทำการทดสอบ titer ต่อไป คือ 1:80 ว่าให้ผลบวก(positive)หรือไม่

๒.๓ Nitroblue Tetazolium Dye (NBT) test

๒.๓.๑ อุปกรณ์

๒.๓.๑.๑ Siliconized concave microslide

๒.๓.๑.๒ Cover slip

๒.๓.๑.๓ Glass slide

๒.๓.๑.๔ Small cappillary pipette

๒.๓.๑.๕ Rotating incubator

๒.๓.๑.๖ Microscope

๒.๓.๒ น้ำยา

Wright's stain solution

NBT solution ใช้สี NBT grade III (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) ละลายใน sterile physiological saline solution เพื่อทำเป็น stock solution มีความเข้มข้น ๐.๒๕% การเตรียม NBT solution โดยผสม ๐.๒% NBT dye ใน physiological saline (๐.๙%) กับ

๐.๑๕ M. phosphate-buffered saline solution pH ๗.๒ เก็บในตู้เย็นช่องแข็ง โดยหุ้มขวดด้วยกระดาษตะกั่วเพื่อป้องกันแสง ก่อนใช้ให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ละลาย

๒.๓.๓ วิธีการ

๒.๓.๓.๑ ผสมเลือดที่ต้องการตรวจกับ EDTA (ethylene diamine tetraacetate) ๑.๐ มล ใส่ใน plastic tube ที่มี EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด

๒.๓.๓.๒ ใช้หยดเลือดที่เตรียมไว้ข้อ ๒.๓.๓.๑ ใส่ลงใน siliconized concave microslide

๒.๓.๓.๓ ดูด NBT solution ๐.๑ มล ใส่ลงบนหยดเลือดบน concave microslide แล้วผสมให้เข้ากัน โดยใช้ cappillary tube

๒.๓.๓.๔ นำ microslide วางลงใน petridish ซึ่งมีผ้าก๊อสที่ชื้นรองไว้ ปิดฝา

๒.๓.๓.๕ นำไป incubate ใน rotating incubator ที่มีอุณหภูมิ ๓๗°ซ นาน ๑๕ นาที

๒.๓.๓.๖ นำออกจาก incubator มาไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก ๑๕ นาที โดยใช้ small capillary pipette ผสมทุก ๆ ๕ นาที

๒.๓.๓.๗ smear เป็น film บางบน cover slip การทำต้องทำอย่างระมัดระวังมาก เพื่อป้องกันไม่ให้เม็ดเลือดขาวถูกทำลาย ปล่อย cover slip ไว้ให้แห้ง

๒.๓.๓.๘ ย้อมด้วย Wright's stain เสร็จแล้วล้างด้วยน้ำ แล้วปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry)

๒.๓.๓.๙ นำ cover slip เอาด้านที่ย้อมวางคว่ำลงบน glass slide โดยใช้ permout

๒.๓.๓.๑๐ อ่านผลโดยดูด้วยกล้องจุลทัศน์ นับจำนวน

neutrophil ให้ครบ ๑๐๐ ตัว จะมี polymorphonuclear leukocytes เท่านั้นที่ติดสี formazan เป็นสีดำหรือน้ำเงินเข้ม ถือว่าเป็น NBT positive

๒.๓.๓.๑๑ คำนวณจำนวนร้อยละของ NBT positive PMN cell