หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ ๒

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การวินิจฉัยทางน้ำเหลืองของโรคซิฟิลิส น้ำเหลืองทั้งหมดได้มาจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยแยกเป็นน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิคว่าเป็น primary syphiiis ๓๒ ราย, secondary syphilis ๖๔ ราย, late syphilis ๓ ราย จากน้ำเหลืองของคนปกติ ๕๐ ราย และจากน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการทางคลินิคว่าเป็นโรคซิฟิลิส แต่ให้ผล VDRL reactive จำนวน ๑๔ ราย โดยนำน้ำเหลืองทั้งหมดมา freeze ที่ -๒๐°C ก่อนนำมาทำการทดสอบ

๑. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับวิธี Indirect microplate ELISA

๑.๑ Treponema pallidum antigen

Lyophilized T.pallidum Nichots strain for FTA-ABS test (Beckman, U.S.A.)

๑.๒ Enzyme labeled antihuman γ-globulin conjugate

Antiserum : Goat antiserum to human γ-globulin (Hyland, England)

Alkaline phosphatase enzyme : Calf mucosa (Sigma type VII 5 mg/ml)

๑.๓ Carrier surface

Disposable polystyrene microhemagglutination plate (Cooke M 29 AR, Dynatech Laboratories)

๑.๔ Coating buffer (Carbonate-bicarbonate pH 9.6)

Na_2CO_3 1.5 g, $NaHCO_3$ 2.9 g, NaN_3 0.29, D.W. 1 liter

๑.๕ PBS Tween buffer

KH_2PO_4 0.29 g, Na_2HPO_4 2.9 g, KCl 0.29, NaCl 8 g, NaN_3 0.2 g, Tween 20 0.5 ml, D.W. 1 liter

๑.๖ Diethanolamine buffer (10%)

Diethanolamine 97 ml, NaN_3 0.2 g, $MgCl_2$ $6H_2O$ 100 mg,

D.W. 800 ml

ปรับ pH ให้ได้ 9.8 ด้วย 1 M HCl แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

Substrate solution (p.nitrophenyl phosphate 1 mg/ml) sigma 104

๑.๗ Phosphate substrate 1 tablet (5 mg) ละลายใน5 ml diethanolamine buffer

๑.๘ Tris (hydroxymethyl) aminomethane HCl (Tris HCl) buffer

Stock solution

Solution A : 0.2 M solution of Tris (hydroxymethyl aminomethane) (24.2 g in D.W. 1 liter)

Solution B : 1 M HCl

Working solution

นำsolution A 250 ml ผสมกับ solution B 26.8 ml แล้วเติม D.W. ให้ครบ 1 liter

๑.๙ Reaction stopping solution : 3 M NaOH

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I15977079

๒. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับวิธี Fluoreseent Treponemal Antibodies-Absorption(FTA-ABS)

๒.๑ Treponema pallidum antigen

Lyophilized T.pallidum Nichols strain (Beckman, U.S.A.)

๒.๒ Antihuman γ -globulin fluorescein labeled (conjugate)

Lyophilized antihuman γ -globulin labeled with fluorescein isothiocyanate (BBL,Division of Becton, Dickinson and Company,U.S.A.)

๒.๓ FTA-ABS Test Sorbent

An aqueous solution contain antigen from Reiter Treponemes (BBL,Division of Becton,Dickinson and Company, U.S.A.)

๒.๔ Phosphate buffer saline pH 7.2

Na_2HPO_4 0.724 g, KH_2PO_4 0.21 g, NaCl 7.65 g., D.W.to 1 liter

๒.๕ 2% Tween 80 in buffer

๒.๖ Acetone

๒.๗ Buffer glycerol mounting medium

๓. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับวิธี Treponema Pallidum Hemagglutination (TPHA)

๓.๑ น้ำยาสำเร็จรูปของ Fujizoki Phamaceuticol Co.Ltd.,Tokyo,Japan)

๓.๑.๑ Absorbing diluent ประกอบด้วย

- Sheep RBC
- Sonicated Reiter Treponemes

๓.๑.๒ Treponema pallidum sensitized sheep RBC

๓.๑.๓ Unsensitized Sheep RBC

๓.๑.๔ Saline solution

๓.๒ Disposable microhemagglutination plate

๓.๓ Syringe and needle No.23

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

นำน้ำเหลืองที่เก็บได้ทั้งหมดมาทดลองด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

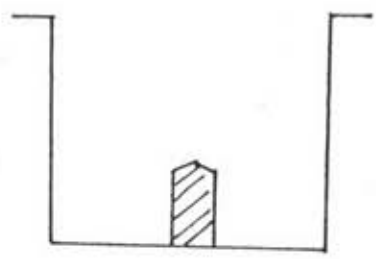
I Indirect microplate ELISA test

II Fluorescent treponemal antibody absorption test (FTA-ABS)

III Treponema pallidum hemagglutination test (TPHA)

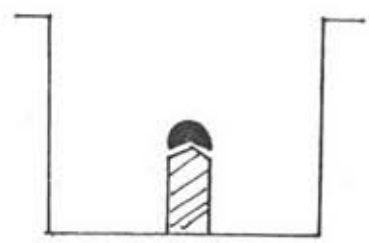
I Indirect microplate ELISA

1. Treponema pallidum antigen adsorbed to plate



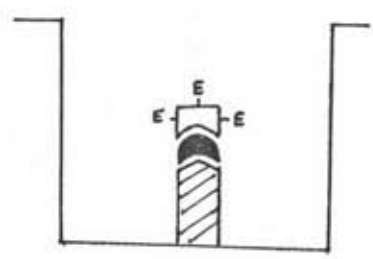
Wash

2. Add serum any specific antibody attaches to Treponema pallidum



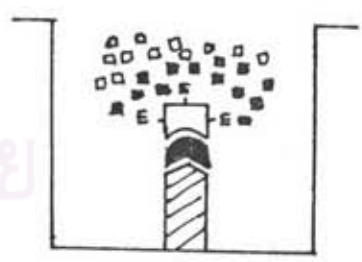
Wash

3. Add enzyme labeled antiglobulin which attaches to antibody



Wash

4. Add substrates



Wash

Amount hydrolysed = Amount antibody present

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากขั้นตอนในการทดลองดังกล่าวจึงต้องมีการเตรียมสิ่งต่าง ๆ เพื่อใช้ในการทดลอง ดังนี้คือ

๑. การเตรียม Treponema pallidum antigen

ความรู้เกี่ยวกับ antigenic structureของ virulent T.palliduมนั้นได้มาจากการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่เป็นโรคซิฟิลิสกับ avirulent T.pallidum Reiter strain ที่เพาะเลี้ยงได้ โดยใช้ T.pallidum Reiter strain ละลายในสารผสมของ phenol saline เป็น antigen ให้ชื่อว่า "pallida" antigen D'Allessandro[๔๓] พบว่าปฏิกิริยา Wassermann นั้นไม่ได้เป็นปฏิกิริยาเฉพาะกับ antitreponema antibody แต่เฉพาะส่วน lipid component ของ pallida antigen เท่านั้นที่ทำปฏิกิริยา ต่อมา De Bruijn[๔๔,๔๕,๔๖] ได้ศึกษา antigenic structure จากส่วนต่าง ๆ ของ T.pallidum Nichols strain ที่เตรียมได้จากการฉีด T.pallidum Nichols strain เข้าอัณฑะของกระต่าย พบว่าคุณสมบัติของ T.pallidum ทาง serology นั้น เฉพาะส่วน protein antigen เท่านั้นที่จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับ antitreponema antibody ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคซิฟิลิส ดังนั้นจึงต้องเตรียม T.pallidum protein antigen[๔๔] เพื่อใช้ในการทดลองดังนี้

๑.๑ การเตรียม T.pallidum

ฉีดเชื้อ T.pallidum Nichols strain เข้าอัณฑะของกระต่าย หลังจากนั้น ๗-๑๐ วัน ฆ่ากระต่ายด้วยวิธี cardiac puncture แล้วตัดอัณฑะของกระต่ายมาแล่เป็นชิ้นบาง ๆ ล้างด้วย ๑๐ ml chilled $\frac{๑}{๗}$ M saline เพื่อเอาเม็ดเลือดแดง น้ำเหลือง และเนื้อเยื่อบางส่วนที่ติดอยู่ออก

จากนั้นนำมาใส่ใน extracting medium (น้ำเหลืองกระต่าย + $\frac{๑}{๗}$ M saline) นำไปเขย่าที่ ๔°C ๖๐ นาที แล้วปั่นด้วย ๒๐๐ G ๑๐ นาที เพื่อแยกเอาเนื้อเยื่อที่ติดอยู่ออกไป นำ supernatant ที่ได้ไปปั่น ๑๔,๐๐๐ G ๔๐ นาที ที่ ๔°C นำ sediment ที่ได้มาล้างด้วย ๒๐ ml chilled ๐.๗๕ M sodium citrate ๓ ครั้ง แล้วนำมา homogenized ด้วย syringe ใน $\frac{๑}{๗}$ M saline จากนั้นนำไป disintegrate

๑.๒ การ disintegrate T.pallidum

สำหรับในวิทยานิพนธ์นี้ใช้ lyophilized T.pallidum Nichols strain สำหรับ FTA-ABS test (Beckman,U.S.A.)นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ๑ ml/ขวด ใช้ทั้งหมด ๕ ขวด แล้วนำไป disintegrate ดังนี้

๑.๒.๑ นำมา treated ด้วย ultrasonic wave โดยใช้ disintegrator (sonicator) ของ MSE.Ltd.,London,England ที่ความถี่ ๑๐ KH_z ๒๕๐ w เป็นเวลา ๒๐ นาที โดยแบ่งการ disintegrate เป็นครั้ง ๆ ละ ๒ นาที และต้อง cool รอบ ๆ sample tube ด้วย

น้ำแข็งเพื่อป้องกันความร้อนที่เกิดขึ้นขณะที่ทำการ disintegrate ด้วย

๑.๒.๒ เมื่อทำจนครบ ๒๐ นาทีแล้ว นำ suspension ที่ได้มาส่องดูด้วย dark field microscope ถ้ายังเห็นมี fragment บางส่วนของ T.pallidum เหลืออยู่ต้อง disintegrate ต่ออีกจนไม่เห็น fragment อีกเลย

๑.๒.๓ นำ suspension ที่ได้มาปั่น ๓,๐๐๐ rpm, เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง

๑.๒.๔ ทิ้ง sediment แล้วนำ supernate ที่ได้ไปตกตะกอนเอา protein antigen ต่อไป

๑.๓ การตกตะกอน T.pallidum protein antigen

ใช้วิธี salting out โดย ammonium sulfate solution ดังนี้

๑.๓.๑ นำ supernate ที่ได้มาเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร ๒๐ ml

๑.๓.๒ นำไปใส่ใน ๖๐ ml. saturated $(NH_4)_2SO_4$ pH ๗.๔ (ปรับ pH ด้วย NH_4OH) โดยกวนตลอดเวลาในตู้เย็นเป็นเวลา ๑ ชั่วโมง

๑.๓.๓ นำ mixture ที่ได้มาปั่น ๓,๐๐๐ rpm, ๑ ชั่วโมง แล้วทิ้ง supernate

๑.๓.๔ นำ precipitate ที่ได้มาละลายใน ๑๐ ml ๐.๑ M glycine-saline buffer pH ๗.๔ สารละลายที่ได้จะขุ่นเล็กน้อย แล้วนำไป dialyzed ด้วย ๐.๑ M glycine-saline buffer หลาย ๆ ครั้ง จนไม่มี $(NH_4)_2SO_4$

๑.๓.๕ นำ dialyzed ที่ได้มาปั่น ๔,๐๐๐ g. ๓๐ นาที

๑.๓.๖ ทิ้ง sediment แล้วเก็บ supernate ไว้ใช้เป็น protein antigen โดยใส่ ๐.๔% gelatin แล้วนำไปหาจำนวน protein โดยวิธี Lowry's ได้จำนวน protein = ๖.๖ mg/m

T.pallidum protein antigen ที่เตรียมได้นั้นสามารถ attached ได้ดีกับ solid phase support คือ disposable polystyrene hemagglutination plate โดยนำไป incubate ที่ ๓๗°C ๓ ชั่วโมง และสามารถเก็บ plate ที่ coated แล้วนี้ไว้ได้โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ โดย sealed plate ด้วย foil polyester paper ไม่ให้อากาศเข้าไปโดยเก็บไว้ที่ ๔°C จะรักษาคุณสมบัติของ T.pallidum protein antigen ไว้ได้อย่างน้อย ๑ ปี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒. การเตรียม enzyme-labeled antihuman γ -globulin conjugates

๑. เจือจาง Goat antiserum to human γ-globulin ด้วย PBS buffer ให้ได้ dilution ๑:๕๐ แล้วนำไปหาค่า immunoglobulin โดยนำไปวัด optical density ด้วย spectrophotometer ที่ wave length ๒๘๐ um (Miller F., ๑๙๖๔) (๔๗) ได้ O.D.= ๒.๐๐๔ ดังนั้นจำนวน immunoglobulin = ๑.๔ mg/ml

๒. ดูด Goat antiserum to human γ-globulin ๐.๓ ml (๐.๔ mg/ml) ผสมกับ ๐.๓ ml alkaline phosphatase enzyme (๑.๔ mg/ml)โดยเขย่าขวดค่อย ๆ ตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง

๓. นำไป dialyze ทันทีด้วย PBS buffer ที่ ๔° ๑๘ ชั่วโมง ใช้ PBS buffer ๒ lits และเปลี่ยน PBS buffer ๒ ครั้ง แล้วเติม PBS buffer ให้ได้ปริมาตร ๑ ml

๔. เติม ๒๕% glutaraldehyde ให้ได้ final concentration ๐.๒% โดยเจือจางด้วย PBS buffer เขย่าขวดค่อย ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๒ ชั่วโมง

๕. นำไป dialyze ด้วย PBS buffer ที่ ๑๔°C ทิ้งไว้ค้างคืน โดยเปลี่ยน PBS buffer หลาย ๆ ครั้ง

๖. นำไป dialyze ต่อด้วย ๐.๕ M Tris buffer pH ๘.๐ ที่ ๔°C ทิ้งไว้ค้างคืนโดยเปลี่ยน Tris buffer หลาย ๆ ครั้ง

๗. เติม Tris buffer ลงไปใน conjugate ให้ได้ปริมาตร ๔ ml และเติม ๑% bovine serum albumin และ ๐.๐๒% NaN_3 เกบไว้ในที่มืดที่ ๔°C จากนั้นนำไปหาค่า working strength ของ conjugate ที่เตรียมได้นี้ต่อไป (conjugate ที่เตรียมได้นี้จะยังคงรักษาคุณสมบัติไว้ได้อย่างน้อย ๒ ปี)

วิธีการหาค่า working strengthของ conjugate

๑. ใส่ ๐.๒ ml (๑๐๐ ng/ml) human γ -globulin ลงใน disposable polystyrene hemagglutination plate นำไป incubate ที่ ๔°C ทิ้งไว้ค้างคืนใน humid chamber

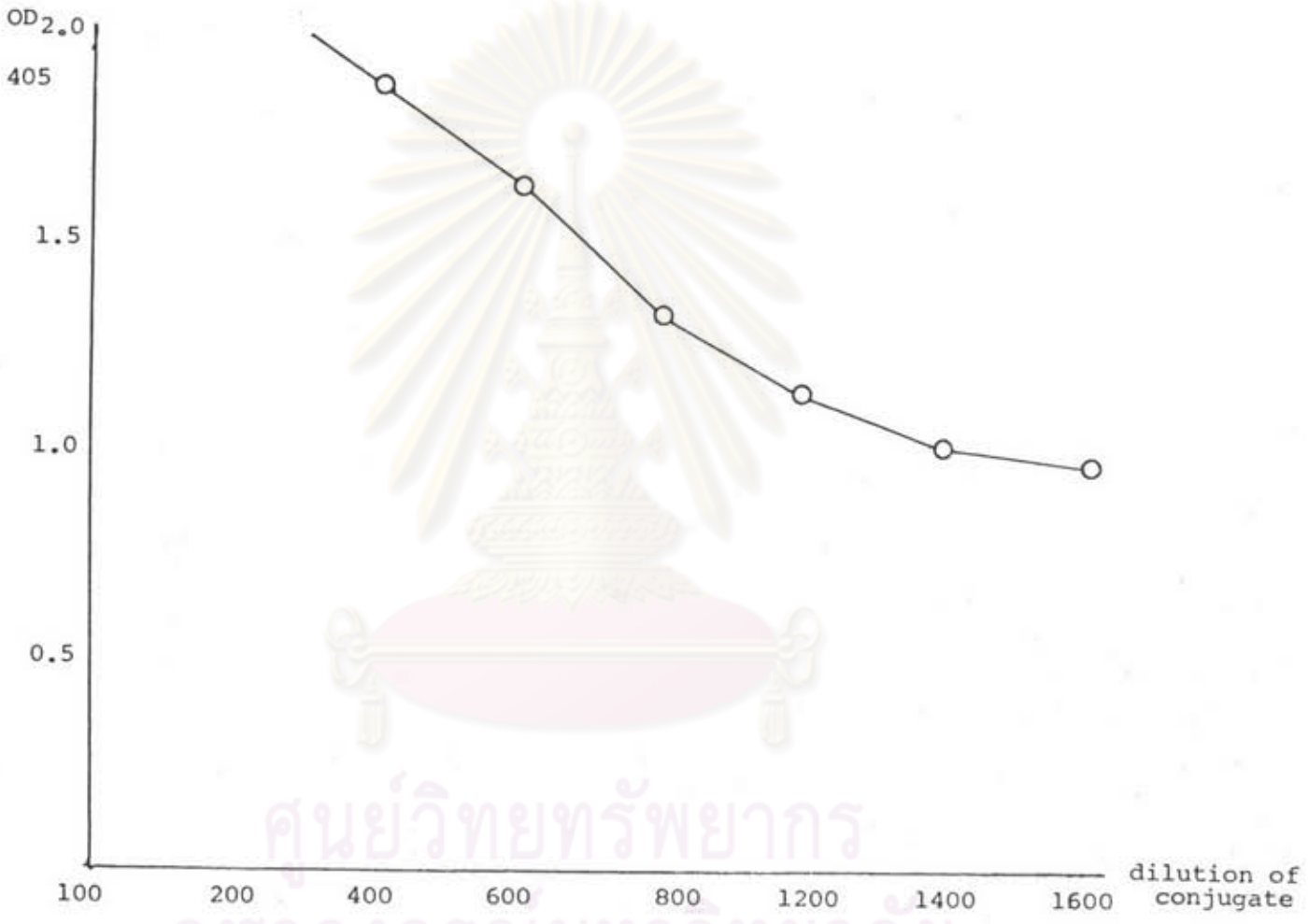
๒. ล้าง ๓ ครั้งด้วย PBS Tween buffer

๓. เจือจาง stock conjugate ด้วย PBS Tween buffer ให้ได้ dilution ๑:๑๐๐, ๑:๒๐๐, ๑:๔๐๐, ๑:๖๐๐, ๑:๘๐๐, ๑:๑๒๐๐, ๑:๑๔๐๐, และ ๑:๑๖๐๐

๔. ใส่ ๐.๒ ml ของ conjugate แต่ละ dilution ลงในหลุมที่ใส่ human γ -globulin (Coated Well) และที่ไม่ได้ใส่ human γ -globulin (uncoated well) แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง ๓ ชั่วโมง

๕. ล้าง ๓ ครั้งด้วย PBS Tween buffer

๖. ใส่ ๐.๒ ml p-nitrophenylphosphate substrate solution ลงในหลุมที่ coated และ uncoated ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องประมาณ ๓๐ นาที จากนั้น stop ปฏิกิริยาโดยใส่ ๐.๐๕ ml ๓ M NaOH ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปวัด O.D. ด้วย spectrophotometer ที่ ๔๐๕ nm



รูปที่ ๑๒ แสดงผลการวัด OD ในการหา working strengthของ conjugate

ผลจากวัด OD ที่ ๔๐๕ nm.พบว่า dilution ของ conjugate ที่เหมาะสมที่สุดคือ 1:400 (OD = 1.9)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๓. ทำ checkerboard titration ระหว่าง T.pallidum protein antigen, น้ำเหลืองของผู้ป่วย และน้ำเหลืองของคนปกติ กับ conjugate เพื่อให้ได้ concentration และ dilution ที่เหมาะสมที่สุดของ antigen และน้ำเหลือง เพื่อจะนำมาใช้ในการทดสอบกับ sample ต่อไป โดยใช้วิธี indirect microplate ELISA ดังนี้

๑. เจือจาง T.pallidum protein antigen ด้วย PBS Tween buffer ให้ได้ concentration 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml และ 200 µg/ml

๒. เจือจางน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ให้ผลบวก และน้ำเหลืองของคนปกติที่ให้ผลลบด้วย absrobing diluent (Fujizoki Phamacentical Co. Ltd., Tokyo, Japan) ให้ได้ dilution ๑:๑๐๐,๑:๒๐๐, ๑:๔๐๐, ๑:๖๐๐, ๑:๘๐๐ และ ๑:๑,๖๐๐ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๓๐ นาที

๓. ใส่ ๐.๒ ml T.pallidum protein antigen concentration ต่าง ๆ ลงไปในแต่ละหลุมของ disposable polystyrene hemagglutination plate แล้ว incubate ที่ ๓๗°C ๓ ชั่วโมง

๔. ล้าง ๓ ครั้งด้วย PBS Tween buffer

๕. ใส่ ๐.๒ ml น้ำเหลือง dilution ต่าง ๆ ในแต่ละหลุมแล้ว incubate ๓๗°C ๑ ชั่วโมง

๖. ล้าง ๓ ครั้งด้วย PBS Tween buffer

๗. ใส่ ๐.๒ ml conjugate dilution ๑:๔๐๐ ลงในแต่ละหลุม แล้ว incubate ที่ ๓๗°C ๑ ชั่วโมง

๘. ล้าง ๓ ครั้งด้วย PBS Tween buffer

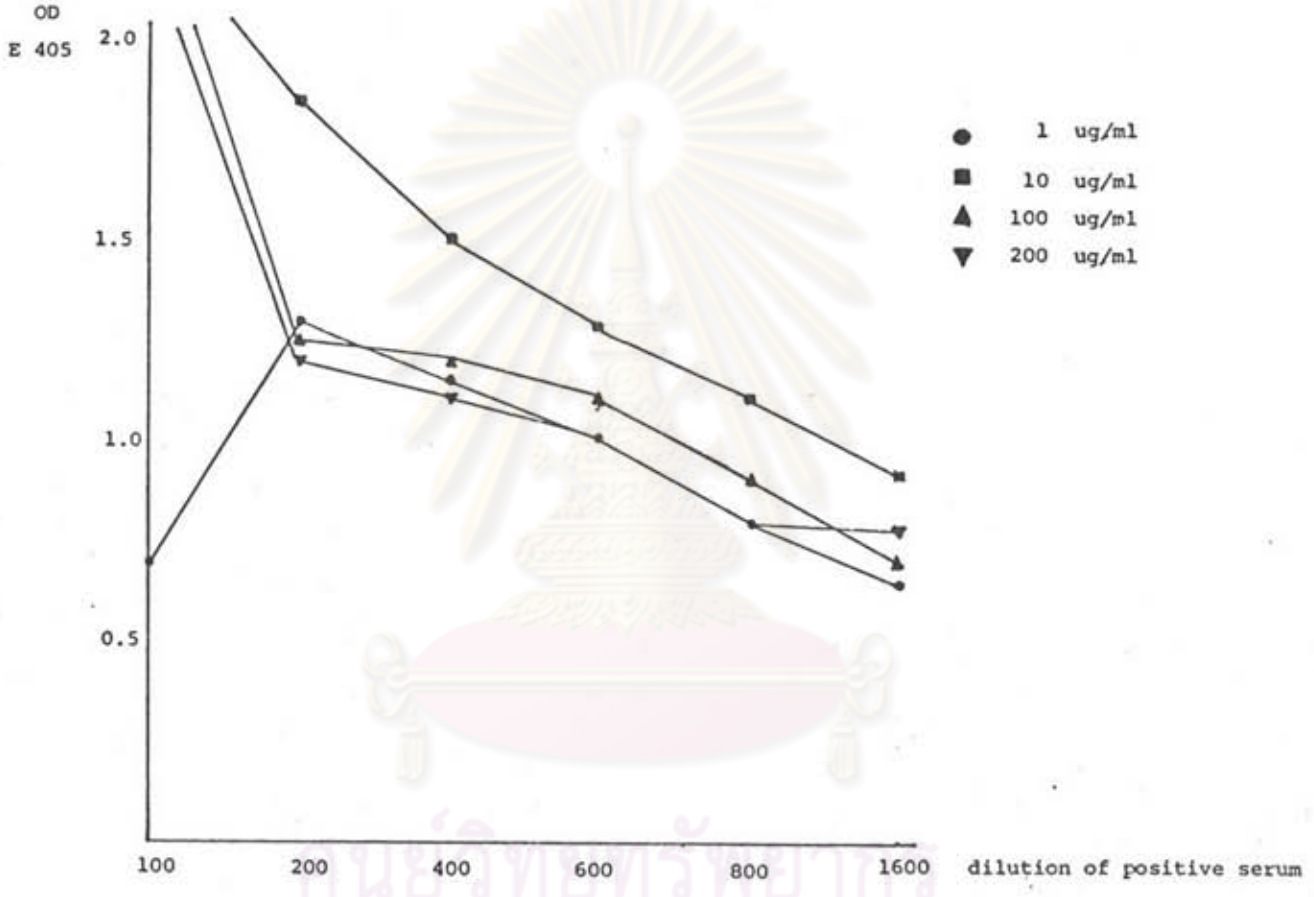
๙. ใส่ ๐.๒ ml p-nitrophenyl phosphate substrate buffer ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิห้องประมาณ ๓๐ นาที จากนั้น stop ปฏิกิริยาด้วย ๐.๐๕ ml 3M NaOH แล้วนำไปวัด O.D. ด้วย spectrophotometer ที่ ๔๐๕ nm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แสดง Results of checkerboard titration using treponemal antigen and reference sera

The values represent spectrophotometer reading (E 405)

Antigen conc. (ug/mg)	Positive serum diluted						Negative serum diluted						Buffer control
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1600	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1600	
1	0.7	1.3	1.15	1.0	0.8	0.65	0.15	0.1	0.14	0.00	0.07	0.07	0.04
10	> 2.0	1.85	1.5	1.3	1.1	0.9	0.2	0.15	0.1	0.08	0.08	0.08	0.03
100	> 2.0	1.25	1.2	1.1	0.9	0.7	0.12	0.10	0.09	0.09	0.07	0.06	0.03
200	> 2.0	1.2	1.1	1.0	0.8	0.8	0.14	0.08	0.09	0.07	0.06	0.06	0.03



รูปที่ ๑๓ แสดงผลการวัด OD ในการทำ checkerboard titration ระหว่าง treponemal antigen และ reference sera

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทำ checkerboard titration พบว่า

- concentration ของ T.pallidum protein antigen ที่เหมาะสมคือ ๑๐ µg/ml
- dilution ของน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่เหมาะสมคือ ๑:๒๐๐
- dilution ของ conjugate ที่เหมาะสมคือ ๑:๔๐๐

ดังนั้นจึงนำ concentration และ dilution ที่เหมาะสมเหล่านี้มาใช้ในการทดสอบกับ sample ต่อไปดังนี้

๑. ใส่ ๐.๒ ml. T.pallidum protein antigen (๑๐ µg/ml) ลงในหลุมของ disposable polystyrene hemagglutination plate แล้ว incubate ที่ ๓๗°C ๓ ชั่วโมง

๒. ล้าง ๓ ครั้งด้วย PBS Tween buffer

๓. ใส่ ๐.๒ ml. น้ำเหลืองของผู้ป่วยและของคนปกติ (๑:๒๐๐ โดย dilute ด้วย absorbing diluent แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๓๐ นาที ก่อนนำมาทดสอบ) ลงในแต่ละหลุม แล้ว incubate ที่ ๓๗°C ๑ ชั่วโมง

๔. ล้าง ๓ ครั้งด้วย PBS Tween buffer

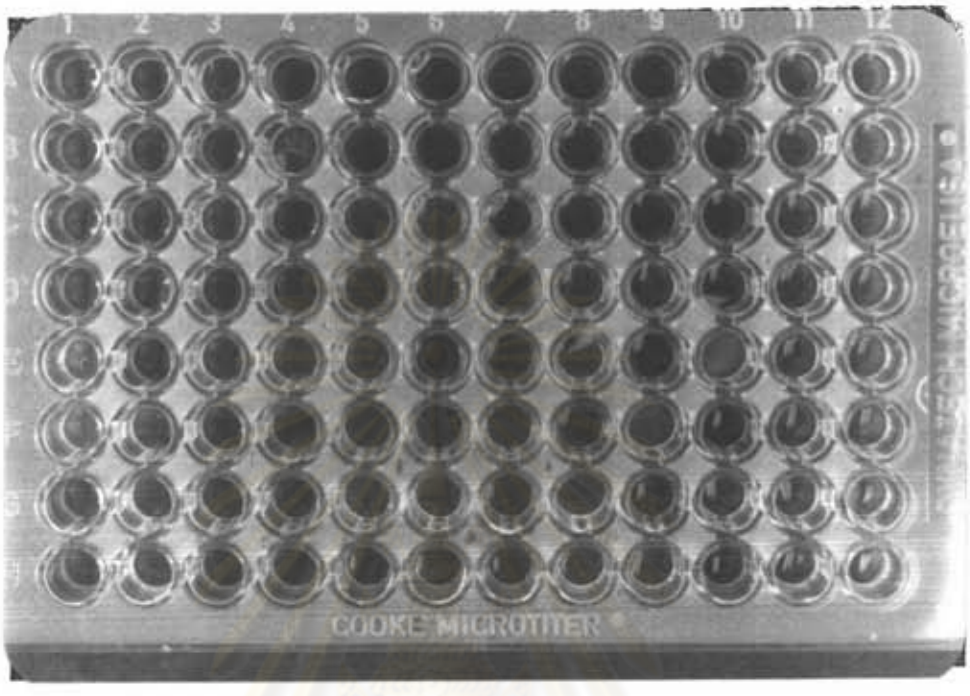
๕. ใส่ ๐.๒ ml. conjugate (๑:๔๐๐) ลงในแต่ละหลุม แล้ว incubate ที่ ๓๗°C ๑ ชั่วโมง

๖. ล้าง ๓ ครั้งด้วย PBS Tween buffer

๗. ใส่ ๐.๒ ml. p-nitrophenylphosphate substrate solution (1 mg/ml) ลงในแต่ละหลุม ตั้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ๓๐ นาที จากนั้น stop ปฏิกิริยาด้วย ๐.๐๕ ml 3M NaOH แล้วนำไปวัดค่า O.D. ด้วย spectrophotometer ที่ ๔๐๕ nm.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ๑๔ แสดงผลการทดลองโดยวิธี Indirect ELISA น้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกจะเกิดสีเหลือง ส่วนน้ำเหลืองที่ให้ผลลบจะไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

II. Fluorescent Treponemal Antibodies Abosroption Test (FTA-ABS)

วิธีเตรียม slide สำหรับ antigen

๑. ล้าง slide ให้สะอาดด้วย alcohol วงกลาง slide เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ ๐.๕ cm ด้วย diamond point pencil

๒. ละลาย antigen (T.pallidum Nichol's strain) ด้วย sterile D.W. ๑ ml โดยเขย่าค่อย ๆ จนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน(ทำโดย Aseptic technic)

๓. smear ๑ loop ของ antigen ในวงที่เขียนบน slide ด้วย standard platinum wire loop (2 mm, 26 gauge)

๔. ทิ้งไว้ให้แห้งในที่มีลมพัด ๑๕ นาที

๕. แช่ใน acetone ๑๐ นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง เก็บ acetone-fixed smear slide ไว้ที่ -๒๐°C

วิธีทดสอบ

นำน้ำเหลืองของผู้ป่วย,ของคนปกติและ control บวกและลบมา inactivated ใน water-bath ที่ ๕๖°C ๓๐ นาที

๑. ใช้ FTA sorbent ๐.๒ ml ผสมกับน้ำเหลือง ๐.๐๕ ml

๒. หยดส่วนผสมของ FTA sorbent กับน้ำเหลืองลงบนวง antigen บน slide ๐.๐๓ ml

๓. นำไปวางในกล่องที่มีความชื้น ๓๐ นาที

๔. นำออกมาล้างด้วย running PBS ประมาณ ๕ วินาที แล้วล้างด้วย PBS อีก ๒ ครั้ง และน้ำกลั่น ๑ ครั้งภายใน ๑๐ นาที

๕. หยด ๐.๐๓ ml ของ diluted conjugate (๑:๘๐)

๖. นำไปวางไว้ในกล่องที่มีความชื้น ๓๐ นาที

๗. ล้าง slide ด้วย running PBS ประมาณ ๕ วินาที แล้วล้างด้วย PBS อีก ๒ ครั้ง และน้ำกลั่น ๑ ครั้ง ภายใน ๑๐ นาที

๘. เช็ดรอบ ๆ ให้แห้งแล้ว mount slide ด้วย buffered glycerine mounting medium ๑ หยด แล้วปิดด้วย cover slip โดยไม่ให้มีฟองอากาศ

(ต้องทำทั้ง control บวก และลบไปพร้อม ๆ กัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๔. นำไปอ่านผลทันที โดยดู dark groundก่อนเพื่อหาตัว Treponemes เมื่อพบตัวแล้วจึงปรับดู

<u>การอ่านผล</u>

ผลบวกจะเห็น Treponemes เรืองแสง

ผลลบไม่เห็น Treponemes เรืองแสง

รูปที่ ๑๕ แสดง <u>T.pallidum</u> ที่เรืองแสงเมื่อดูด้วยกล้อง Fluorescence โดยวิธี FTA-ABS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

III. Treponema Pallidum Hemagglutination Test (TPHA)

วิธีทดสอบ

นำน้ำเหลืองของผู้ป่วย,ของคนปกติและ control บวกและลบมา inactivated ใน water bath ที่ ๕๖°C ๓๐ นาที

๑. นำน้ำเหลืองมาเจือจางด้วย absorbing diluent ให้ได้ dilution ๑:๘๐ โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๓๐ นาที

๒. นำน้ำเหลือง (๑:๘๐) ใส่ในหลุมของ hemagglutination plate ๒ หลุม ๆ ละ ๐.๑ ml. ต่อน้ำเหลือง ๑ ราย

หลุมหน้าสำหรับดูปฏิกิริยาของน้ำเหลืองและ antigen

หลุมหลังสำหรับดูปฏิกิริยาของน้ำเหลืองกับ sheep RBC

๓. ใส่ sensitized cells ๑ หยดจาก syringe ใช้เข็ม No.23 (โดยหยดในลักษณะปลายเข็มตั้งตรง ๑ หยด = ๑/๑๐๐ ml.)ลงในหลุมหน้า

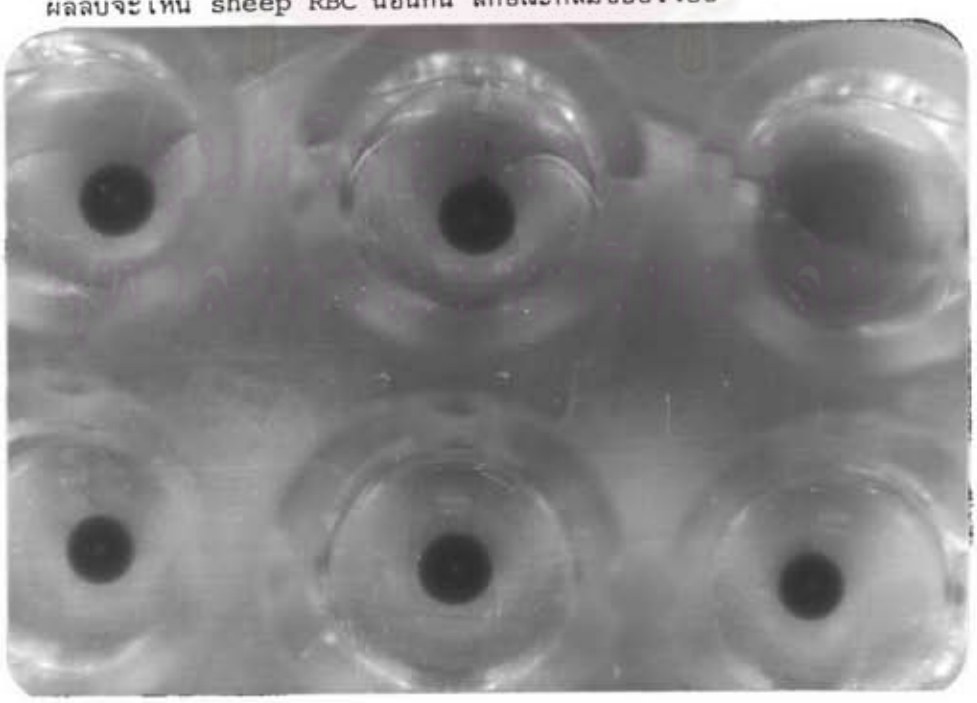
๔. ใส่ unsensitized sheep RBC ๑ หยด จาก syringe ใช้เข็ม No.23 ลงในหลุมหลัง

๕. เขย่า plate ให้น้ำเหลืองและ antigen ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านผลหลังจาก ๓ ชั่วโมง และ ๑๘ ชั่วโมง ตามลำดับ

การอ่านผล

ผลบวกจะเห็น sheep RBC agglutinate กระจายทั่วก้นหลุม

ผลลบจะเห็น sheep RBC นอนก้น ลักษณะกลมขอบเรียบ



รูปที่ ๑๖ แสดงการเกิด agglutinate ของ Sheep RBC โดยวิธี TPHA