บทที่ ๓

อุปกรณ์และวิธีการ

๑. สัตว์ทดลอง

๑.๑ หนูถีบจักร (mice)

ลูกหนูถีบจักรอายุ ๕-๖ วัน strain CD-1 (ICR) สำหรับการทำ Mouse Protection test ได้รับความช่วยเหลือจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กรุงเทพฯ

๑.๒ กระต่าย

ใช้กระต่ายที่มีน้ำหนักประมาณ ๒-๓ กิโลกรัม ไม่จำกัดเพศ กระต่ายนี้ใช้สำหรับการผลิต hyperimmune sera และ normal rabbit serum (NRS) เลือกซื้อกระต่ายที่ร่างกายสมบูรณ์จากแหล่งขาย นำมาดูแลรักษาที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี่ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

๑.๓ หนูตะเภา

ใช้หนูตะเภา Strain Hartley จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร เพื่อเตรียม complement สำหรับใช้ใน Vibriocidal assay โดยเจาะเลือดจากหัวใจของหนูตะเภา และแยกซีรั่มนำไปกำจัด natural antibody ต่ออหิวาต์ โดยการ absorb ด้วย glutaraldehyde fixed V.cholerae

๒. เชื้ออหิวาต์ที่ใช้ในการทดลอง (Bacterial strain)

Vibrio cholerae biotype El Tor, Serotype Ogawa, strain streptomycin resistant O_{17} (O_{17SR}) เชื้อนี้ในการเตรียม Lipo-polysaccharide (LPS) ได้นำเชื้อนี้มาจาก Department of Microbiology and Immunology, The University of Adelaide, Adelaide, South Australia นำเชื้ออหิวาต์ O_{17SR} ที่ทำให้แห้ง (Lyophilized) แล้วมาเลี้ยงให้เจริญใน nutrient broth แล้ว stab เข้าไปใน trypticase soy agar เก็บในอุณหภูมิห้อง เชื้ออหิวาต์ O_{17SR} นี้เคยได้รับการ passaged ผ่านหนูถีบจักรอายุ ๕-๖ วัน ๑๖ ครั้ง จนมีฤทธิ์เต็มที่ (virulent) เมื่อต้องการใช้ก็ streak ลงบน streptomycin nutrient agar (100 mcg. ของ streptomycin/มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ) นำอาหารเลี้ยงเชื้อไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง แล้วจึงใช้เชื้ออหิวาต์ 1 loop ต่อ nutrient broth ๑๐ มล. นำไป shake ใน wath bath 37 องศาเซลเซียส นาน ๔-๖ ชั่วโมง (log-phase ของเชื้อ) แล้วจึงนำไปใช้ใน Mouse Protection test หรือ Vibriocidal test หรือนำไป inoculate ใน Roux bottle ซึ่งมี Trypticase soy agar เพื่อเตรียม LPS

๓. อาหารเลี้ยงเชื้อ

๓.๑ Trypticase soy agar (TSA)

ใช้ TSA ของบริษัท Difco (๔๐ กรัมของ TSA ในน้ำกลั่น ๑๐๐๐ มล.) ปรับ pH 7.8 ใช้สำหรับเก็บ stock culture และเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อต้องการเชื้อ O_{17SR} จำนวนมากที่จะใช้ในการเตรียม lipo-polysaccharide (LPS)

๓.๒ Streptomycin nutrient agar

ละลาย nutrient agar (Difco) ๒๓ กรัมในน้ำกลั่น ๑๐๐๐ มล. ปรับ PH 7.8 ละลาย streptomycin sulfate (Dumex) ในน้ำกลั่นที่ steriled เติมลงใน nutrient agar ที่ไม่ร้อนมากนัก (50 องศาเซลเซียส) ให้ได้ความเข้มข้นของ streptomycin 100 mcg. ต่อ ๑ มิลลิลิตรของ agar

๓.๓ 0.1% peptone saline solution

Sodium-chloride	8.5	กรัม
Bacto-peptone	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน นำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน ๑๕ ปอนด์ นาน ๑๕ นาที

๔. เลือดแกะ

เจาะเลือดแกะจากหลอดเลือดดำที่คอ ๕๐ มล. ใส่ในน้ำยา Alsever ๕๐ มล. ได้รับความช่วยเหลือในเรื่องเลือดแกะจากแผนกสัตว์ทดลอง องค์การเภสัช-กรรม กรุงเทพฯ

๕. น้ำยา Alsever (Anti-coaggulant)

Glucose	24.6	กรัม
Tri-sodium citrate, $2H_2O$	9.6	กรัม
Sodium chloride	5.04	กรัม
Deionized distrilled water	1200	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วปรับ pH เป็น ๖.๑ ด้วย 1 M citric acid กรองผ่าน millipore membrane เก็บในห้องเย็น 4 องศาเซลเซียส

๖. สารเคมีสำหรับการหาโปรตีน

๖.๑ Folin reagent

ใช้ Folin and Ciocalteu's phenol reagent 2 normal (SIGMA) 4 มล. ผสมน้ำกลั่น 8 มล.

๖.๒ 0.1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ เตรียมจาก ารละลาย

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	500 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	500 มิลลิกรัม

๖.๓ 12.5% Na_2CO_3 เตรียมจาก ารละลาย

anhydrous Na_2CO_3 62.5 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง

การหาโปรตีนใน LPS ที่เตรียมได้ หาโดยวิธี Folin-Ciocalteu (Kabat and Mayer, 1961) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นตัวมาตรฐาน

๗. Anti-human immunoglobulin (specific class)

ใช้ของบริษัท Kallestad, Chaska, Minn. 55318 ซึ่งเป็น rabbit antisera to human immunoglobulin (various classes)

๘. 25% glutaraldehyde fixative

เตรียมตามวิธีของ Cruickshank (1965)

Glutaraldehyde	5	มิลลิลิตร
Phosphate buffer saline	20	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน แล้วปรับ pH เป็น 7.4

สารนี้ใช้สำหรับนำไป fix ตัวเชื้ออหิวาต์ ซึ่งใช้ในการ absorb natural antibody ออกจากซีรั่มของหนูตะเภา (complement source)

๙. วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์

เป็นวัคซีน heat-killed ขององค์การเภสัชกรรม กรุงเทพฯ ใน ๑ มล. ของวัคซีนประกอบไปด้วยเชื้ออหิวาต์จำนวน ๘๐๐๐ ล้านตัว คือ

- ชนิด Classical Inaba 45920 4000 ล้านตัว
- ชนิด Classical Ogawa 41B 4000 ล้านตัว

๑๐. การเตรียม anti-live O_{17SR} (hyperimmune serum)

ฉีด V.cholerae O_{17SR} จำนวน ๑ มล. เข้าเส้นเลือดดำที่ใบหูของกระต่าย ตามตารางต่อไปนี้

วันที่	จำนวนเชื้อที่ฉีด/มล.
1	10^5
3	10^6
8	10^7
10	10^8
15	10^8
17	10^9

เจาะเลือดกระต่ายจากหัวใจในวันที่ ๒๔ ปั่นเอาซีรั่มไป heat ที่ ๕๖ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ นาที ก่อนเก็บไว้ที่ -๗๐ องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้เมื่อต้องการ

๑๑. การเก็บซีรั่ม

๑๑.๑ เก็บซีรั่มจากนักโทษชาย เรือนจำพิเศษกรุงเทพฯ ก่อนทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ เป็นซีรั่มที่ ๑ แล้วจึงทำการฉีดวัคซีนขององค์การเภสัชกรรม จำนวน ๑ มล. เข้าใต้ผิวหนังในวันเดียวกันนั้น แล้วเก็บซีรั่มในวันที่ ๗ ๑ เดือน ๓ เดือน ๔ เดือน และ ๖ เดือน (ภายหลังฉีดวัคซีนแล้ว) เป็นซีรั่มที่ ๒, ๓, ๔, ๕, ๖ ตามลำดับ ซีรั่มพวกที่ฉีดวัคซีน ถือเป็นซีรั่มประเภท ก.

๑๑.๒ เป็นซีรั่มจากนักโทษชาย เรือนจำพิเศษกรุงเทพฯ ก่อนทำการฉีดน้ำกลั่น เป็นซีรั่มที่ ๑ แล้วจึงทำการฉีดน้ำกลั่นจำนวน ๑ มล. เข้าใต้ผิวหนัง เก็บซีรั่มเช่นเดียวกับพวกฉีดวัคซีน ถือเป็นซีรั่มประเภท ข.

๑๑.๓ เก็บซีรั่มของผู้ป่วยด้วยโรคอหิวาต์ จากโรงพยาบาลบำราศนราดูร นนทบุรี ในวันแรกที่คนไข้มาถึงโรงพยาบาลฯ ๗ วัน และ ๓ เดือน หลังจากนั้น

๑๒. การเตรียม inactivated sera

ซีรั่มที่จะทำการทดลอง ต้องผ่านการทำลาย complement และ non-specific substances ต่าง ๆ ที่ ๕๖ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ นาที

๑๓. PASSIVE HAEMAGGLUTINATION TEST (HA TEST)

๑๓.๑ การเตรียม Lipo-polysaccharide (LPS)

ตามวิธีของ Westphal et al, (1965)

นำเชื้ออหิวาต์ซึ่งได้จากการเลี้ยงบน Trypticase soy agar pH 7.8 ในขวด roux เป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง มาล้างด้วยน้ำเกลือปกติ ๓ ครั้ง แล้วจึงเติมน้ำเกลือให้มีความเข้มข้นของเชื้อ ๑๐-๒๐ มก./มล. เติม 90% phenol ลงไปในเชื้ออหิวาต์ในปริมาตรเท่าตัว นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ ๖๕-๖๘ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๕ นาที ทำให้เย็นถึง ๐ องศาเซลเซียส ใน ice bath เพื่อให้ชั้นของ phenol และน้ำแยกออกจากกัน นำไปปั่นเพื่อให้แยกจากกันดีขึ้น เก็บและวัดปริมาตรของชั้นน้ำ

ซึ่งมี LPS อยู่ มาตกตะกอนด้วย absolute ethanol ด้วยปริมาตรเท่า ๆ กันที่ ๔ องศาเซลเซียส เพื่อกำจัด Deoxyribo และ Ribo-nucleic acid ของเชื้อ อหิวาต์ เก็บ mixture ที่ได้ไว้ที่ ๔ องศาเซลเซียส นาน ๑-๒ ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเกิดการตกตะกอนขึ้น หลังการกรองผ่านใยแก้ว (glass wool) แล้วจึงเติม absolute ethanol อีก ๔ ปริมาตร เก็บไว้ที่ ๔ องศาเซลเซียส อย่างน้อย ๑๔ ชั่วโมง LPS จะตกตะกอน นำไปปั่นที่ 2000 rpm., ๔ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที เก็บตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นจำนวนน้อย ๆ นำไป dialysis ด้วยน้ำกลั่น ค้างคืนที่ ๔ องศาเซลเซียส ปั่นที่ 10,000 rpm., ๔ องศาเซลเซียส นาน ๑๕-๒๐ นาที เพื่อกำจัดส่วนอื่น ๆ ของเชื้ออหิวาต์ที่อาจจะมีปนอยู่ จากนั้นนำไปปั่นที่ 35,000-40,000 rpm., ๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓ ชั่วโมง ตะกอนที่ได้จะเป็น endotoxin หรือคือ LPS นำ LPS ที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นจำนวนน้อย ๆ นำไปหา dry weight ของ LPS ที่เตรียมไว้ และหาจำนวนโปรตีนที่อาจจะมีเหลืออยู่ใน LPS ที่เตรียมได้ (rpm. หมายถึง รอบต่อนาที)

๑๓.๒ Alkaline treatment of LPS

ตามวิธีของ Auzins, 1968 โดยนำ LPS ที่ได้มาทำให้มีความเข้มข้น ๑ มก./มล. เติม NaOH ลงไปให้ได้ 0.02 N NaOH นำไปอบที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๕ ชั่วโมง แล้วจึงปรับ pH ของ LPS เป็น 7.4 ด้วย 1N HCl

๑๓.๓ การเตรียม LPS coated red blood cells

ล้างเม็ดเลือดแดงของแกะที่เก็บไว้ในน้ำยา Alsever ด้วยน้ำเกลือปกติ ๓ ครั้ง เตรียมเม็ดเลือดแดงเป็น ๕% ในน้ำเกลือ (5% SRBC)

ผสม alkaline treated LPS (100 mcg./ml.) จำนวนเท่า ๆ กันกับ 5% SRBC นำขวดบรรจุของผสมนี้ไปวางบน rotator ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๑ ชั่วโมงครึ่ง จากนั้นปั่นล้างด้วยน้ำเกลือเย็น ๓ ครั้ง เพื่อกำจัด alkaline treated LPS ที่ไม่ได้เกาะติดที่ผิวของเม็ดเลือดแดงออก เมื่อล้างแล้วให้เติมน้ำเกลือปกติ เพื่อให้ได้ความเข้มข้น ๒.๕% ของเม็ดเลือดแดงที่เคลือบแล้วด้วย

LPS (2.5% LPS sensitized cells)

๑๓.๔ Haemagglutination test

ตามวิธีของ Chaicumpa และ Atthasishtha (1977) โดยนำแต่ละซีรั่มมาทำ two-fold serial dilutions ใน haemagglutination tray เติม 2.5% LPS sensitized cells ลงไปในปริมาตรเท่ากับซีรั่ม แล้ว incubate ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ๑ ชั่วโมง นำมาอ่านผล

Haemagglutinating titres ของแต่ละซีรั่ม ถือเอา dilution สูงสุดของซีรั่มที่ทำให้ sensitized cells เกิด agglutination ได้ ๕๐%

๑๔. Vibriocidal assay

๑๔.๑ การกำจัด natural antibody ใน guinea pig serum

ซีรั่มของหนูตะเภา ซึ่งใช้เป็น source ของ complement อาจมี natural antibody ต่ออหิวาต์อยู่ จึงต้องกำจัดออกโดยวิธีต่อไปนี้

๑๔.๑.๑ การเตรียม glutaraldehyde fixed Vibrio cells

ปั่นล้างเชื้ออหิวาต์ที่เลี้ยงบน TSA ในขวด Roux ๒ ขวด ด้วยน้ำเกลือปกติ ๓ ครั้ง นำ packed cells ที่ได้มา resuspend ในน้ำเกลือ ๔๐ มล. เติม 25% glutaraldehyde fixative 10 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง ๑ ชั่วโมง ปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ ๓ ครั้ง แล้ว resuspend เชื้อในน้ำเกลือ ๑๐๐ มล. จะได้ glutaraldehyde fixed vibrio cells เก็บในตู้เย็น เพื่อใช้ในขั้นต่อไป

๑๔.๑.๒ การ absorp natural antibody จากซีรั่มหนู-ตะเภา

นำ glutaraldehyde fixed vibrio cells จากข้อ ๑๔.๑.๑ ใส่ tube สำหรับปั่น ๓ หลอด หลอดละ ๑๕ มล. นำไปปั่น 7000 rpm. เอาแต่ packed cells ไว้ เติมซีรั่มหนูตะเภาจำนวน ๕๐ มล. ลงในหลอดที่ ๑ ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อคนให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง ๑๕ นาที นำไปปั่นเอา packed cells ออก ส่วนน้ำ (supernatant) คือส่วนของซีรั่มหนูตะเภา นำไป resuspend ใน vibrio fixed cells ในหลอดที่ ๒, ๓ ต่อไป สุดท้ายจะได้ซีรั่มหนูตะเภาที่กำจัด natural antibody ออก

๑๔.๑.๓ การตรวจสอบการกำจัด natural antibody ในซีรั่มหนูตะเภา

ตรวจสอบว่าภายหลัง absorp เอา natural antibody ตามข้อ ๑๔.๑.๒ โดยใช้ ๐.๘ มล. ของ 0.1% peptone saline ผสมกับ ๐.๘ มล. ซีรั่มหนูตะเภาภายหลัง absorp แล้ว ซึ่งทำให้เจือจาง 1:10 และมี V.cholerae อยู่ 2×10^3-2×10^4 ตัว/มล. incubate ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๑ ชั่วโมง แล้วนำส่วนผสมนี้ไปหยดบน streptomycin agar plate โดยใช้ ๑ หยดของ Standard pastur pipette นำไป incubate ๓๗ องศาเซลเซียสค้างคืน ถ้าปรากฏว่ามี colonies ของ V.cholerae ปรากฏอยู่อย่างหนาแน่นบน Streptomycin agar plate แสดงว่าสามารถกำจัด natural antibody ในซีรั่มหนูตะเภาได้หมด

๑๔.๒ การทำ vibriocidal assay

นำ inactivated sera ทั้งหมดมาหา vibriocidal titre ตามวิธีของ Steel, et al, (1974) โดยนำซีรั่มมาทำ five fold serial dilutions ด้วย 0.1% peptone saline solution ทำ control ๑ หลอด

โดยใช้เฉพาะ 0.1% pentone saline solution แล้วจึงเติม complement dilution 1:10 ปริมาตร/ปริมาตร ซึ่งมี V.cholerae อยู่จำนวน 2×10^3-2×10^4 ตัว/มล. ลงไปในแต่ละ dilution ในปริมาตรที่เท่ากัน incubate ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ๑ ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแต่ละ dilution มาหยดลงบน streptomycin agar plate incubate ค้างคืนที่ ๓๗ องศาเซลเซียส vibriocidal titre ของซีรั่ม คือ dilution สูงสุดที่สามารถฆ่าเชื้ออหิวาต์ที่เติมลงไปได้ ๕๐% โดยดูจำนวน colonies ที่ขึ้นบน streptomycin agar plate เปรียบเทียบกับ colonies ที่ได้จากหลอด control ซึ่งไม่มี antibody อยู่เลย ดังภาพที่ ๑ หน้า ๓๕

๑๕. Mouse protection test

นำซีรั่มมาทำ ten-fold dilutions ในน้ำเกลือปกติ เติมเชื้ออหิวาต์ 2×10^9 ตัว/มล. (log phase broth culture) จำนวน ๐.๒ มล. ลงไปในทุก ๑.๘ มล. ของ serial dilution ภายหลัง incubate ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที ป้อน ๐.๑ มล. ให้แก่ลูกหนูถีบจักร อายุ ๕-๖ วัน โดยมีลูกหนูถีบจักรอย่างน้อยกลุ่มละ ๑๐ ตัว ต่อหนึ่ง dilution ทำ control ควบคู่ไปด้วยกันทั้ง control บวก และลบ ใช้ anti-live O_{17SR} (hyperimmune serum) เจือจาง 1:10 เป็น control บวก และใช้น้ำเกลือปกติ หรือ normal rabbit serum เป็น control ลบ เติมเชื้ออหิวาต์ในขนาดความเข้มข้นเท่ากับที่ใช้ในการทดลอง

เมื่อครบ ๔๘ ชั่วโมง ลูกหนูในกลุ่ม control ลบ ซึ่งไม่มีแอนติบอดี้จะตายด้วยโรคอหิวาต์หมด ในขณะที่กลุ่ม control บวก ซึ่งได้รับ hyperimmune serum จะมีชีวิตรอดอยู่ ๔๐-๑๐๐% สำหรับลูกหนูในกลุ่มของซีรั่มที่นำมาทดสอบ ถ้าได้รับแอนติบอดี้เพียงพอ ก็จะยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ คำนวณหา PD_{50} (Protection Dose 50) (โดยใช้วิธีการคำนวณของ Reed and Muench, 1938) ซึ่งหมายความถึง antibody dilution ซึ่งจะป้องกันหนู ๕๐ ตัวจากหนูทั้งหมด ๑๐๐ ตัว ให้รอด

จากการตายด้วยโรคอหิวาต์ภายใน ๔๘ ชั่วโมง ภายหลังป้อนเชื้อ

๑๖. การหาชนิดของ Immunoglobulin

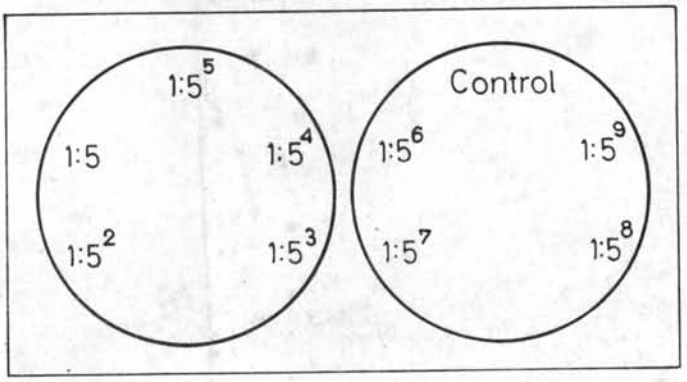
โดยวิธี Anti-immunoglobulin enhancement of haemagglutination (Chaicumpa, 1974)

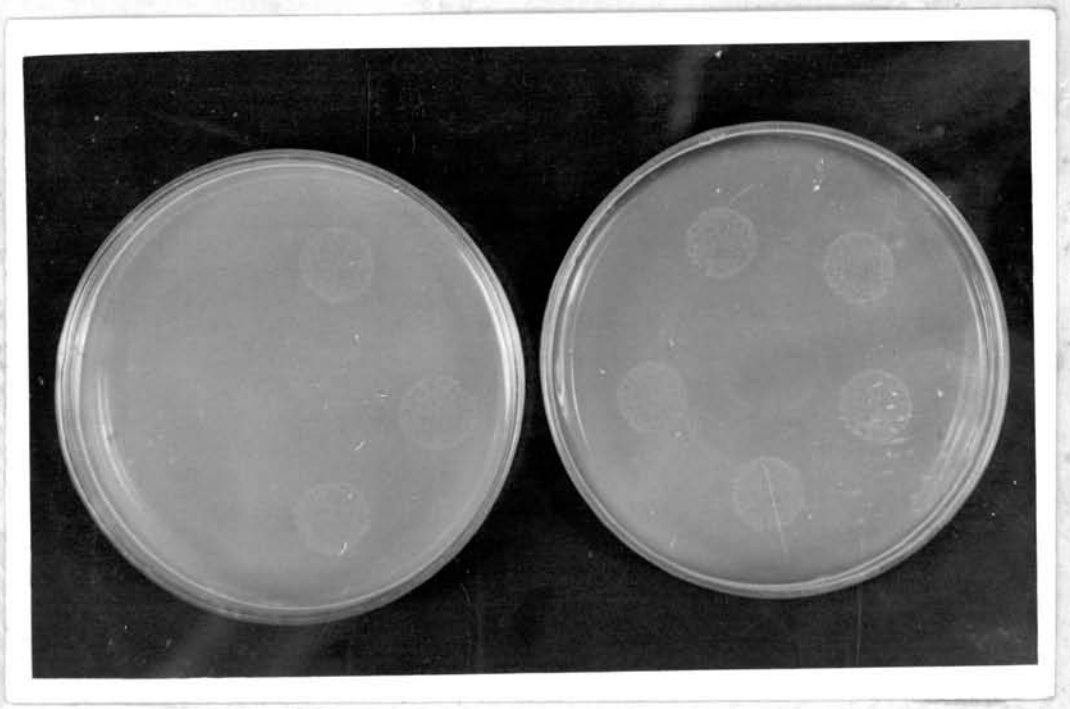
นำซีรั่มมาทำ two-fold serial dilution ให้มากกว่า haemagglutinating titre ในหลอดแก้วขนาด 15 x 100 มม. เติม 2.5% LPS-Sensitized cells (ข้อ ๑๓.๓) ลงไปในแต่ละหลอดในปริมาตรที่เท่ากัน incubate ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ๑ ชั่วโมง นำ cells มาปั่นล้าง ๓ ครั้ง ที่ ๔ องศาเซลเซียส ด้วยน้ำเกลือปกติเย็น แล้วทำให้เป็น 2.5% เช่นเดิม ด้วยน้ำเกลือปกติ ใช้ ๐.๑ มล. ของแต่ละ dilution มาหยอดใน haemagglutination tray เติม ๐.๑ มล. ของ Anti-human immunoglobulin M (เจือจาง 1:2000 ด้วยน้ำเกลือปกติ) ทำเช่นเดียวกันนี้สำหรับ Anti-human IgG และ Anti-human IgA ทำ control โดยใช้น้ำเกลือปกติแทน Anti-human immunoglobulin incubate ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ๑ ชั่วโมง แล้วจึงเก็บไว้ที่ ๔ องศาเซลเซียส ค้างคืน นำมาอ่าน haemagglutinating titre

ถ้าแอนติบอดี้เป็น class ใด ก็จะถูก enhance ด้วย Anti-human immunoglobulin ใน class นั้น ให้มี haemagglutinating titre สูงขึ้นจากเดิมอย่างน้อย ๔ เท่า ดังภาพที่ ๓ หน้า ๓๙

การที่ใช้ anti-human immunoglobulin ใน dilution 1:2000 เพราะได้มีการ titrate anti-human immunoglobulin ทั้งหมด 3 dilutions คือ 1:500, 1:1000 และ 1:2000 พบว่าให้ผลดีเท่ากัน ดังภาพที่ ๒ หน้า ๓๖

ภาพที่ ๑ แสดง pattern ของ growth and dead ของเชื้ออหิวาต์ ใน Vibriocidal antibody assay





ภาพที่ ๒ แสดงการ titrate ของ anti-immunoglobulin specific สำหรับ IgA, IgG และ IgM ตามลำดับ

Anti-immunoglobulin specific for	dilution of Anti-immunoglobulin
A	
G	1:500
M	
A	
G	1:1000
M	
A	
G	1:2000
M	

ภาพที่ ๓ แสดง folds-increase ใน HA titres เมื่อ enhance ด้วย anti-immunoglobulin