บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

1. แอนติเจนที่ใช้ในการศึกษา

แอนติเจนที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยแอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ แอนติเจนของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*, *Leptospira interrogans* และ *Orientia tsutsugamushi* แสดงวิธีการเตรียมแอนติเจนแต่ละชนิดดังนี้

การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

1. Streak เชื้อลงบน blood agar นำไป incubate ที่ 37°C นาน 24-48 ชั่วโมง

2. ใช้ loop แตะเชื้อจาก blood agar นำไป inoculate ลงใน TSB แล้ว incubate ที่ 37°C 24-48 ชั่วโมง

3. ปั่นตกตะกอนเชื้อด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 4,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง

4. ล้างเชื้อด้วย 0.85% NSS 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 4,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป ทำซ้ำเช่นเดิม 3 ครั้ง

5. เจือจางเชื้อ โดยเติม 0.85% NSS ให้มีความขุ่นเท่ากับ Macfarland No. 0.5

6. เติม 20% yolk sac 2 µl ต่อ 1 ml ของเชื้อที่เจือจางแล้ว ในข้อ 5 แล้วผสมให้เข้ากัน

7. เก็บเชื้อไว้ที่ -20°C ถึง -70°C ได้นาน 1 ปี

การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira interrogans*

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar *Sejroe*, *Bratislavar*, *Louisiana* และ *Autumnalis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Ellinghausen and McCullough, modified by Johnson and Harris) EMJH medium ที่อุณหภูมิ 28-30°C ในที่มืดเป็นเวลา 5-7 วัน

2. ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ปริมาณ 200 Leptospiras/40x เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

3. ดูดส่วนบนของเชื้อแต่ละซีโรวาร์มาผสมอัตราส่วน 1:1:1:1 ผสมให้เข้ากัน และเติม 20% yolk sac ปริมาณ 2 µl ต่อส่วนผสมของเชื้อ 1 ml ผสมให้เข้ากัน

4. เก็บเชื้อไว้ที่ -20°C ถึง -70°C ได้นาน 1 ปี

การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *Orientia tsutsugamushi*

1. นำเชื้อ *O. tsutugamushsi* แต่ละ strain (*Kato, Gilliam และ Karp*) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัย Mahidol – Oxford Tropical Research Unit : MORU) คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล มาผสมในอัตราส่วน 1:1:1

2. เก็บเชื้อไว้ที่ -20˚C ถึง -70˚C ได้นาน 1 ปี

การเตรียมสไลด์สำหรับการตรวจด้วยวิธี IgM IFA

1. เตรียมสไลด์หลุมปราศจากเชื้อ โดยแช่สไลด์หลุมด้วยแอลกอฮอล์ 30 นาที แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง

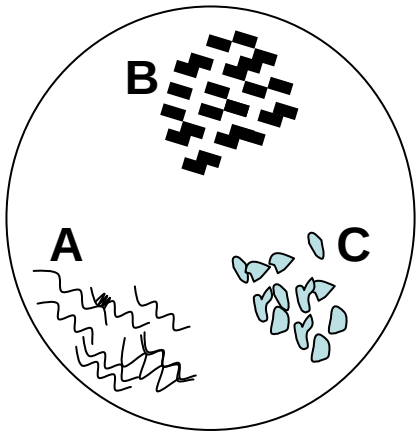
2. นำแอนติเจนแต่ละชนิดที่ผสมแล้วมาละลาย (thaw) หรือทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง

3. ใช้ autopipette ดูดเชื้อ *L. interrogans* 0.5 µl เริ่มหยดลงเบาๆทางด้านซ้ายค่อนไปทางด้านล่างของหลุม ผึ่งให้แห้งสนิท นาน 30 นาที สังเกตจะเห็นเป็นวงฝ้าสีขาวที่ขอบหลุม

4. ใช้ autopipette ดูดเชื้อ *B. pseudomallei* 0.5 µl หยดลงเบาๆ ทางด้านบนของหลุมเหนือเชื้อ *L. interrogans* ผึ่งให้แห้งสนิท 30 นาที

5. ใช้ autopipette ดูดเชื้อ *O. tsutsugamushi* 0.5 µl หยดลงเบาๆทางด้านขวาค่อนไปทางด้านล่างของหลุม ระวังอย่าให้เชื้อไหลมารวมกันผึ่งให้แห้งสนิท 30 นาที แอนติเจนที่เคลือบแล้วแสดงดังรูปที่ 1

6. เก็บสไลด์ที่เคลือบเชื้อแล้วที่ -20˚C ถึง -70˚C



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งการเคลือบแอนติเจนลงบนหลุมของสไลด์ A; *Leptospira interrogans* B; *Burkholderia pseudomallei* C; *Orientia tsutsugamushi*

2. วิธีการดำเนินการ

2.1 ขั้นตอนการทำ screening test

2.1.1 นำสไลด์ที่เคลือบด้วยแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *L. interrogans*, *B. pseudomallei* และ *O. tsutsugamushi* จาก -70°C มาผึ่งให้แห้ง

2.1.2 เจือจาง serum ลงใน microtiter U plate ให้ได้อัตราส่วน 1:50 (serum 4 µl + PBS pH 7.4 196 µl), 1:100 (diluted serum 1:50 จำนวน 50 µl + PBS pH 7.4 50 µl), 1:200, 1:400, 1:800 และ 1:1,600

2.1.3 หยด PBS pH 7.4 ปริมาตร 10 µl ลงบนสไลด์หลุมที่ 1 เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control)

2.1.4 หยด diluted serum 1:1,600, 1:800, 1:400, 1:200, 1:100 และ 1:50 ปริมาตร 10 µl ลงบนสไลด์หลุมที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ แล้ววางลงใน moist chamber จากนั้นนำไป incubate ที่ 37°C นาน 45 นาที

2.1.5 ล้างแอนติเจนและแอนติบอดีส่วนเกิน โดยนำสไลด์วางใน Coplin jar ที่เติม PBS pH 7.4 จนท่วมสไลด์ แล้วนำไปเขย่าล้างด้วยเครื่อง rotator ที่ความเร็ว 100 rpm นาน 5 นาที ค่อย ๆ ริน PBS ออกจาก Coplin jar จนหมด ทำเช่นเดิม 3 ครั้งแล้วผึ่งสไลด์ให้แห้ง

2.1.6 เจือจาง IgM conjugate ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC 1:40 (เตรียมในปริมาณที่ต้องการในแต่ละครั้ง)

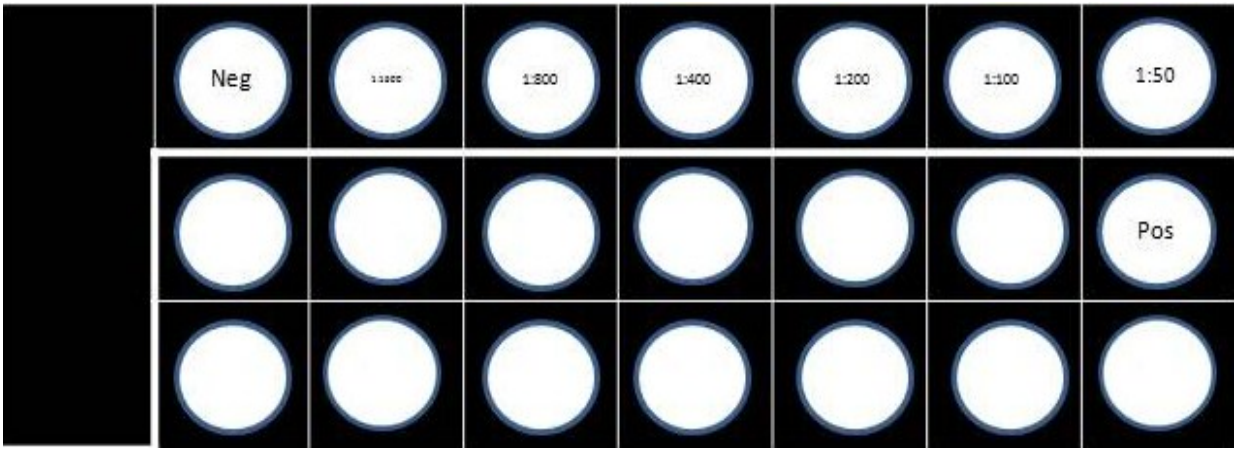
2.1.7 เจือจาง Evan blue ในอัตราส่วน 1 : 8 ด้วย PBS pH 7.4 โดยผสม Evan blue ที่เจือจางแล้ว ในอัตราส่วน 2 µl ต่อ diluted conjugate 1 ml.

2.1.8 หยด conjugate ที่ผสมกับ Evan blue ลงในหลุมที่เคลือบแอนติเจนแล้วหลุมละ 10 µl

2.1.9 นำสไลด์ที่หยด conjugate แล้ว วางใน moist chamber นำไป incubate 37°C นาน 45 นาที

2.1.10 ล้าง conjugate ส่วนเกินออกโดยนำสไลด์วางใน Coplin jar ที่เติม PBS pH 7.4 จนท่วมสไลด์ แล้วนำไปเขย่าล้างด้วย rotator ที่ความเร็ว 100 rpm นาน 5 นาที ค่อยๆ ริน PBS ออกจาก Coplin jar จนหมด ทำเช่นเดิม 3 ครั้งแล้วผึ่งสไลด์ให้แห้ง

2.1.11 Mount slide โดยหยด glycerine buffer pH 8.0-9.0 จำนวน 2 หยด แล้วปิดทับด้วย cover slip ขนาด 24 x 60 mm นำไปอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์



รูปที่ 2 ตำแหน่งการหยด diluted serum ลงบนสไลด์หลุม

3. การอ่านผล

อ่านผลการเรืองแสงเมื่อเติม conjugate ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ซึ่งเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออร์เรสเซนต์โดยใช้เลนส์ขนาด 20x การอ่านผลบวกจะดูการเรืองแสงที่ค่อยจางลงจนกลายเป็นผลลบจากระดับ dilution ต่างๆ อ่านผล dilution สุดท้ายของหลุมที่เห็นการเรืองแสงเป็นค่า titer ของการทดสอบ ซึ่งแสดงลักษณะผลบวกดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 วิธีการอ่านผล positive และ negative ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออร์เรสเซนต์

เชื้อ	**Positive**	**Negative**
L. interrogans	ตัวเชื้อบิดเป็นเกลียวถี่สม่ำเสมอเรืองแสงสีเขียวคล้ายเส้นด้าย	ไม่พบการเรืองแสง
B. pseudomallei	ตัวเชื้อลักษณะ coccobacilli เรืองแสงสีเขียว	ไม่พบการเรืองแสงเรืองแสงสีเขียว
O. tsutsugamushi	ตัวเชื้อมีลักษณะเกาะกลุ่มเรืองแสงสีเขียวเหลืองในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน จะเห็นตัวเซลล์ติดสีแดงของ Evan blue	ไม่พบการเรืองแสงของเชื้อแต่เห็นเซลล์ติดสีแดงของ Evan blue

4. การแปลผล

ผลการทดสอบจะได้ค่าตัดสินผลบวกและลบ (cut off) แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การแปลผล positive และ negative จากค่า cut off

โรค	Positive (titer)	Negative (titer)
เลปโตสไปโรซิส	$\geq$ 1:100	< 1:100
เมลิออยโดซิส	$\geq$ 1:200	< 1:200
สครัปไทฟัส	$\geq$ 1:400	< 1: 400

5. ตัวอย่างซีรัมทดสอบ

ตัวอย่างซีรัมทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 จำนวนซีรัมทดสอบทั้งกลุ่ม case และกลุ่ม control

ซีรัม	จำนวน (ตัวอย่าง)
กลุ่ม Case รวม 93 ตัวอย่าง	
โรคเลปโตสไปโรซิส	35
โรคเมลิออยโดซิส	30
โรคสครัปไทฟัส	28
กลุ่ม Control รวม 107 ตัวอย่าง	
ผู้ป่วยโรคอื่นๆที่ไม่ใช่โรคกลุ่ม case	72
ผู้มีสุขภาพดี	21
ผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาด	14
รวมทั้งสิ้น	200

6. สถิติการวิจัย

ศึกษาความไว ความจำเพาะ ประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ IgM indirect immunofluorescence assay (IgM-IFA) ของแอนติเจน 3 ชนิดเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่านการวินิจฉัยว่าเป็นกลุ่ม case และกลุ่ม control โดยใช้สถิติไคสแควร์ (χ^2) และสถิติแคปปา (κ) (ดุสิต สุจิรารัตน์. 2539)