

การใช้กระดาษกรองสำหรับเก็บเลือด เพื่อหาฮีแมกกลูทีเนชั่น-อินฮิบิชั่น แอนติบอดีสำหรับโรคเอดส์



นางสาว สุชานดา ชาวละเอียด

005695

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาพฤษศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2516

THE USE OF FILTER PAPER AS A BLOOD TRANSPORTMEDIUM
IN THE DETECTION OF DENGUE HAI-ANTIBODY

Miss Suchada Kaolaead

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Botany
Graduate School
Chulalongkorn University

1973

This thesis was submitted to the Graduate School, Chulalongkorn University
in partial fulfillment of the requirements for the Master of Science Degree.



B. Tamthai
.....

Bunliang Tamthai, Dean
Graduate School
Chulalongkorn University

Committee in Charge

Viroon Suwanakitti Head committee
Pirkorb Tuehinda Committee
Dilok Yenbutra Committee
Naline Nilubol Committee

Preceptors

Dilok Yenbutra
Naline Nilubol

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การใช้กระดาษกรองสำหรับเก็บเลือด เพื่อหาฮีแมกกลูทีเนชั่น-อินฮิบิชั่น แอนติบอดีสำหรับโรคเคงกิว

ชื่อ นางสาว สุชาดา ขาวละเอียด แผนกวิชา พฤษศาสตร์

ปีการศึกษา 2516

บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายในการวิจัยนี้คือ การประเมินผล และหามาตรฐานของการใช้กระดาษกรองสำหรับเก็บเลือดของผู้ป่วย แล้วนำไปวินิจฉัยหาแอนติบอดีของโรคเคงกิว

ในเขตที่การขนส่งไม่สะดวก และการวินิจฉัยทางห้องทดลองไม่มี หรือมีไม่เพียงพอ จำเป็นที่จะต้องส่งเลือดหรือซีรัมของผู้ป่วยมาวินิจฉัยยังห้องทดลอง สิ่งที่สำคัญก็คือเลือดหรือซีรัมนั้นจะต้องเก็บและส่งอย่างรวดเร็วมายังห้องทดลอง ด้วยวิธีที่ง่ายและเชื่อถือได้

การเจาะเลือดทางเส้นเลือดโดยใช้เข็มและกระบอกฉีดยานั้น มักจะมีอุปสรรคเสมอ โดยเฉพาะในการสำรวจเกี่ยวกับโรคระบาด เช่น การฆ่าเชื้อโรคของอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ การขนส่งเลือดโดยใส่หลอดแก้ว แขนงแข็ง มีความสิ้นเปลืองมาก และหลอดแก้วอาจแตกได้ นอกจากนี้ความล่าช้าในการขนส่ง ก็อาจทำให้เลือดหรือซีรัมเสียได้ และยังมีปัญหาในการเจาะเลือดจากเด็กด้วย

เนื่องจากเหตุเหล่านี้ ก็ได้มีการนำเอากระดาษกรองมาใช้เก็บเลือด แล้วทิ้งให้แห้ง ซึ่งมีประโยชน์หลายประการ เช่น สามารถส่งได้ง่ายๆทางไปรษณีย์ การเจาะเลือดไม่ต้องอาศัยเทคนิคมากนัก การเจาะก็ง่ายโดยเจาะที่ปลายนิ้ว หรือที่หู เพียงจำนวนเล็กน้อย และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยมาก

ในการทดลองนี้ ได้ใช้กระดาษกรองรูปร่างเป็นแผ่นยาวๆ ของบริษัทโตโยโรชิ จำกัด (ญี่ปุ่น) นำมาเก็บเลือดคนไข้เด็กที่สงสัยว่าเป็นโรคเคงกิว และนำมาหามาตรฐานของกระดาษดังนี้

1. สกัดซีรัมออกจากกระดาษ แล้วนำไปประเมินผลในทาง อิมมิวโนโลยี โดยนำมาทำอิมมิวโน-อีเล็กโทร โฟรีซิส เปรียบเทียบกับซีรัม ที่เจาะจากเส้นเลือดกว่า ซีรัมที่สกัดออกจากกระดาษ มีอิมมิวโนโกลบูลิน ครบหรือไม่

2. เปรียบเทียบ แอนติบอดีต่อโรคแดงกิว ในซีรัมที่ได้มาทั้งสองวิธี คือ สกัดจากกระแส และจากวิธีปรกติ โดยใช้การทดสอบแบบ ฮีแมกกลูทีเนชั่น-อินฮิบิชั่น ไมโคร-เทคนิค

3. ดูวาระการที่เก็บเลือดนี้ เมื่อเก็บไว้ที่สภาพแวดล้อมต่างๆในห้องทดลอง จะมีการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีหรือไม่ และถ้านำไปทดลองให้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่จะใช้จริงๆแล้ว โดยนำไปส่งที่ต่างจังหวัด ให้นำกลับมายังห้องทดลอง จะมีระดับของแอนติบอดีเป็นอย่างไร โดยใช้การทดสอบเช่นเดียวกับข้อสอง

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า จากการทดสอบด้วยวิธีอิมมิวโน-อิเล็กโทรโฟเรซิส ซีรัมที่ได้มาโดยวิธีเก็บบนกระแส และเจาะจากเส้นเลือดคนนั้น มีอิมมิวโนโกลบูลินทั้งสองชนิด คือ IgG และ IgM ไม่ว่าจะ เป็นซีรัมจากคนไข้ในระยะ acute หรือ convalescent ก็ได้ผลเช่นกัน แสดงว่า การเก็บเลือดโดยใช้กระแสชนิดนี้ จะไม่มีผลถึงระดับอิมมิวโนโกลบูลิน เพราะจะถูกสกัดออกมาได้ง่าย และจากการศึกษาระดับของแอนติบอดีในกระแส พบว่า ระดับของแอนติบอดีจะไม่เปลี่ยนแปลงถ้าเก็บกระแสที่ขับเลือดแล้วนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ. แต่ถ้าเก็บไว้นานมาก (ถึง 15 อาทิตย์) ระดับของแอนติบอดีก็จะลดลงได้ แต่ถ้าเก็บกระแสนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระดับของแอนติบอดีจะลดลงอย่างรวดเร็ว จากการทดลองส่งกระแสที่ขับเลือดแล้วนี้ ไปตามสภาพที่จะใช้จริงๆ คือส่งมาจากต่างจังหวัดทางไปรษณีย์ พบว่าระดับของแอนติบอดีจะไม่เปลี่ยนแปลงเลยถ้าการส่งกินเวลา 3-8 วัน ถ้านานถึง 12 วันระดับของแอนติบอดีก็ลดลงเพียง 2 เท่า เท่านั้น แสดงว่ากระแสที่ใช้ได้ก็ถึงแม้จะถูกกับอุณหภูมิและความชื้นสูงๆในบ้านเรา จากการเปรียบเทียบ ระดับของแอนติบอดีที่ขับไว้ด้วยกระแสและที่เจาะจากเส้นเลือด พบว่าระดับของแอนติบอดี บนกระแสสูงกว่า ซึ่งผิดจากความจริง พบว่าเป็นผลเนื่องมาจาก ความผิดพลาดเรื่องปริมาณของเลือดที่กระแสขับได้ ตามที่บริษัทแจ้งไว้นั้น น้อยกว่าความเป็นจริง ทำให้ระดับของแอนติบอดีจากกระแสสูงกว่าความเป็นจริง

จากการศึกษาครั้งนี้คาดว่าจะได้วิธีปรับปรุงการเก็บเลือด และจากการเก็บนี้ รวมกับการทดสอบแบบ ซีโรโลจิก ไมโครเทคนิค จะทำให้ได้วิธีในการหาระดับแอนติบอดีที่สะดวก รวดเร็ว เชื่อถือได้ และสามารถนำไปใช้ในจังหวัดที่อยู่ไกลออกไปได้อย่างดียิ่ง.

Thesis Title: The Use of Filter Paper as a Blood Transportmedium in the Detection of Dengue HAI-Antibody.

Name: Miss Suchada Kaolaead

Department: Botany

Academic Year: 1973

ABSTRACT

In regions where transportation is difficult and laboratory facilities are few, blood samples for serological examination must be collected and dispatched by a simple and reliable method.

Blood collection by means of venipuncture often meets with objections, particularly in epidemiological surveys. Sterilization of the necessary instruments i.e., syringes and needles, may be difficult under field condition. The transport of blood or serum in tubes by packing on ice is usually expensive. Delays in transportation may lead to deterioration of the serum. It also seems to be a problem to collect a large number of specimens of sera because of difficulties in bleeding especially in cases of young children.

It was obvious therefore, to consider the use of filter paper as a transportmedium for blood or serum; this would largely correct the above-mentioned drawbacks. Blood and serum dried on filter paper may be despatched by post. Blood samples may be obtained simply by pricking a finger or ear. This study was aimed at the practical use of filter paper strips as transportmedium of blood samples for serological examination in epidemiological survey as well as in diagnosis of dengue haemorrhagic fever in Thailand.

The filter paper, strip type, used in this study was a product of Toyo Roshi Co., Japan. The sick children suspected dengue infection were bled at both cubital vein and finger tip. Hemagglutination-inhibition (HI) antibodies against dengue virus collected by filter paper and by syringe were compared by micromethod.

This study concerned about:

- (i) Whether the filter paper strips can absorb immunoglobulin parts or not which can be tested by immunoelectrophoresis.
- (ii) The antibody titers against dengue virus, obtained by syringe and filter paper method, were compared by hemagglutination-inhibition microtechnique.
- (iii) Study the environmental effects, i.e. time, temperature and humidity on the antibody titer of storage dried blood filter paper strip both in laboratory and in field conditions.

This study was found that the filter paper strip was good enough to use because when it was eluted the immunoglobulin parts (IgG and IgM) were eluted too, by using immunoelectrophoresis study. From the study about antibody titer of the filter paper, it was found that the best condition of storing blood dried filter paper strip was at 4°C. Higher temperature (room temperature) will cause a deterioration of the antibody titers. About the effect of imitated transportation condition, it was found that the filter paper strips which took 3-8 days of transportation had no difference in titer of antibody, and those which took 11-12 days of transportation had only 2-fold dilution lower. It showed the practical value of filter paper strips that even sent in the climatic condition, exposed to both temperature and humidity, the titer of the eluates did not change much even took a long time of transportation. The filter paper method was found to have the higher titers than those of syringe method which kept at the same condition (time and temperature). This was caused from the error in absorbed volume of the absorbing part of the filter paper strip.

The absorbed volume of the filter paper which described was smaller than it should be. This made the filter paper titer higher than usual.

The combination of the filter paper blood collection method and serologic microtechnics will add a new dimension of convenience and versatility to the work of the epidemiologist and clinician in diagnosis of dengue haemorrhagic fever.

ACKNOWLEDGEMENT

I am very grateful to Dr. Dilok Yenbutra and Dr. Naline Nilubol for their supervisions, advices, guidances and encouragements. Their assistances in the preparation of this thesis were deeply appreciated.

I also gratefully acknowledges Dr. Prakorb Tuchinda and Dr. Nadhira Sangkawibha who provided filter paper strips and technical advices; Dr. Reutai Skulramrung for her advice and technical assistance on immunoelectrophoresis; Dr. Sonchai Pongsupat who provided haemorrhagic fever cases and some clinical data; Dr. Chunyo Penchat who provided the spectrophotometer; and my helpful friends, Miss Sumana Vechapasith, Miss Aree Kitidamrongcharoen, and Mr. Jira Jatikavanich who helped in some parts of the experiments, and encouraged me.

I am indebted to Prof. Viroon Suwannakitti, Head Department of Botany, for his advice and being a chairman of the committee. To Dr. Kachorn Pranich and Dr. Dilok Yenbutra, Head Department of Microbiology, Chulalongkorn Hospital Medical School, Chulalongkorn University who provides facilities and supports.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
บทคัดย่อภาษาไทย	iv
ABSTRACT	vi
ACKNOWLEDGEMENT	ix
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION	1
II. MATERIALS AND METHODS	6
A. Determination the types of immunoglobulins absorbed on filter paper strips by immunoelectrophoresis	6
B. Comparison of the HI-antibody titers against dengue virus in blood samples collected by filter paper method and syringe method at different conditions of storing	9
- Absorption by blood sampling papers (filter paper strips)	9
- Extraction and treatment of serum for diagnostic tests	10
- Red cells for arbovirus hemagglutination	11
- Standardization of RBC suspension	11
- Detection and titration of hemagglutinin	12
- HA-test	12
- Determination and preparation of antigen dilution	14
- Controls for hemagglutination-inhibition tests	14
- HI-test procedure	15
- Reading	16

C.	Correction of error on blood volumes absorbed by filter paper strips	18
-	Hematocrit determination	19
-	Collection of sample	19
-	Normal hematocrit values	20
D.	The HI-antibody titers of the dengue infection blood collected on filter paper strips sent from different parts of the country	20
III. RESULTS		
A.	Determination the types of immunoglobulins absorbed on filter paper strips by immunoelectrophoresis	22
B.	Comparison of the HI-antibody titers against dengue virus in blood samples collected by filter paper method and syringe method at different conditions of storing	23
C.	Correction of error on blood volumes absorbed by filter paper strips	30
-	Female blood sample	30
-	Male blood sample	31
D.	The HI-antibody titers of the dengue infection blood collected on filter paper strips sent from different parts of the country	33
IV.	DISCUSSION	36
V.	CONCLUSION	42
REFERENCES		45
APPENDIX		52
BIOGRAPHY		59

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1.	Comparison of the HI-antibody titers against dengue virus in blood samples collected by filter paper method and syringe method at different conditions of storing	24
2.	Comparison of the HI-titer between syringe method and filter paper method (4°C, 2 weeks)	25
3.	Comparison of the HI-titer of the filter paper method keep at 4°C and 24°C (room temperature) at different time (2-15 weeks)	26 - 28
4.	Comparison of the HI-titer of serum and disk eluates from the same person	29
5.	Correction of error on blood volumes absorbed by filter paper strips	32
6.	The HI-antibody titers of the dengue infection blood collected on filter paper strips sent from different parts of the country	34
7.	The average titers of filter papers which sent from different parts of country with different time of transportation	35

LIST OF FIGURES



FIGURE		PAGE
1.	Filter paper (strip type)	7
2.	A pattern of trough and wells	8
3.	Filter paper strip holder (specially prepared from sponge)	10
4.	Labeled microtiter V plate for HA-test	13
5.	Labeled microtiter V plate for HI-test	17
6.	IEP patterns of 1 positive paired sera	22