บทที่ 2

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. กลุ่มควบคุม

1.1 คนปกติ : ใช้เลือดผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย อายุระหว่าง 18-49 ปี VDRL และ TPHA ให้ผลลบ 111 ราย

1.2 ซีรั่มคนไข้ multiple myeloma : เป็นซีรั่มคนไข้ที่ได้รับการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการยืนยันว่าเป็น multiple myeloma 4 ราย เป็นชนิด IgG myeloma 2 ราย IgA myeloma 1 รายและ IgM myeloma 1 ราย

2. กลุ่มคนไข้

2.1 คนไข้ systemic lupus erythrematosus (SLE)

2.1.1 ซีรั่มได้จากภาควิชาจุลชีววิทยา เป็นซีรั่มซึ่งได้การวินิจฉัยทางคลินิกว่าเป็น SLE ส่งตรวจ antinuclear antibody ให้ผลบวก titer > 1:320 จำนวน 46 ราย

2.1.2 คนไข้ที่ได้จากหน่วยประสาทวิทยาและหน่วยโรคข้อ ซึ่งทราบประวัติแน่นอนว่าเป็น SLE ตามหลักเกณฑ์ของ American Rheumatism Association (ARA) 100 ราย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม

2.1.2.1 เป็นคนไข้ SLE ที่มาติดตามการรักษาที่แผนกผู้ป่วยนอกจำนวน

81 ราย

2.1.2.2 เป็นคนไข้ SLE ที่กำลังเข้ารับการรักษาใน หน่วยโรคข้อและ /หรือหน่วยประสาทวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 19 ราย

2.2 ผู้ป่วยที่ได้รับการฉีด Rabies Semple Vaccine 82 ราย กลุ่มคนไข้กลุ่มนี้มีอาการแทรกซ้อนภายหลังได้รับ Rabies Semple Vaccine โดยแบ่งกลุ่มตามอาการอาการแสดงทางระบบประสาท (neurological sign) และการตรวจน้ำไขสันหลัง โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนมาก (Major complication) และกลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนเพียงเล็กน้อย(Minor complication) Hemachuda และคณะ 1987 (16)

2.2.1 กลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนภายหลังได้รับ Semple vaccine มาก (major complication): ได้แก่คนไข้ที่มีอาการสมองอักเสบ (encephalitis), ไขสันหลังอักเสบ (myelitis),รากประสาทอักเสบ (polyradiculitis) หรือ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) จำนวน 25 ราย กลุ่มนี้ได้รับการเจาะเลือดตั้งแต่วันแรกที่เข้ารักษาในโรงพยาบาล และต่อมาทุก 3 วัน ในจำนวน 25 ราย มีตัวอย่างทั้งหมด 66 ตัวอย่าง

2.2.2 กลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนภายหลังได้รับ Semple vaccine(Minor complication) : ได้แก่คนไข้ที่มีอาการปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว หรือปวดหลัง มีไข้ร่วมกับการอักเสบตรงบริเวณที่ฉีด คนไข้กลุ่มนี้ผลการตรวจน้ำไขสันหลังปกติ มีจำนวน 21 ราย

2.2.3 กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่ได้รับวัคซีนแต่ไม่มีอาการแทรกซ้อน ทั้งหมด 36 ราย 12 รายได้รับวัคซีนถึงวันที่ 7 14 รายได้รับวัคซีนถึงวันที่ 14 และ 10 ราย เจาะเลือดก่อนที่จะฉีดวัคซีน

2.3 ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางระบบประสาทอื่นๆ ได้แก่ โรคที่มี Immuno-pathogenic basis จำนวน 43 ราย CNS infection 31 ราย Degenerative disease 22 ราย และ Miscellaneous 31 ราย รายละเอียดแสดงไว้ในตารางที่ 7

2.4 ผู้ป่วย syphilis ที่มีผลทางห้องปฏิบัติการยืนยันด้วย FTA-ABS จำนวน 21 ราย

เก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมดโดยไม่ใส่สารกันเลือดแข็ง แยกน้ำเหลืองในวันเดียวกับวันที่เจาะเลือด เก็บไว้ที่ -70 °C จนกว่าจะนำมาตรวจวิเคราะห์

3. วัสดุและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจ ELISA

3.1 Microtiter plates

ถาดหลุมพลาสติก ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ เป็นถาดหลุมพลาสติกชนิด polystyrene microtiter plates (Costa.MO,USA) ใช้สำหรับเคลือบแอนติเจนในการตรวจวิเคราะห์ ACAs และ VDRL โดยวิธี ELISA

3.2 Cardiolipin (Sigma chemical Co.St. Louis,MO,USA)

3.3 Adult bovine serum (ABS) เลือดวัวจากฟาร์มของคณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เจาะไม่ใส่สารกันเลือดแข็ง ปั่นแยกเม็ดเลือดแดงทิ้งไป กรองด้วยกระดาษกรอง nitrocellulose acetate ขนาด 1, 0.8 และ 0.4 nm ตามลำดับ แบ่งใส่ขวดปราศจากเชื้อ ขวดละ 20 ซีซี เก็บที่ -20 °C

3.4 Peroxidase conjugate antihuman IgG, IgA , IgM polyvalent และ monovalent (Dakopatts, Denmark)

3.5 O-phenylenediamine (OPD) (Sigma Chemical Co. St.Louis,MO,USA)

วิธีการ

I. การตรวจ ACAs ด้วยวิธี ELISA มีขั้นตอนต่างๆดังนี้

1. ตรวจซีรั่มผู้ป่วยที่ให้ผล ANA positive > 1:320

เพื่อหาน้ำเหลืองที่ให้ผลบวกมาใช้หาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ โดย modify วิธีของ Gharavi และคณะ (36) ตามขั้นตอนต่างๆดังนี้ :-

1.1 เจือจาง cardiolipin ด้วย absolute ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร นำสารละลาย cardiolipin นี้ไปเคลือบหลุมใน microtiter plate หลุมละ 60 ไมโครลิตร ทิ้งให้ระเหยแห้งในตู้ 4 °C ทิ้งไว้ข้ามคืนหรือ 18-24 ชั่วโมง

1.2 ล้าง 3 ครั้งด้วย PBS pH 7.4 200 ไมโครลิตร/ หลุม ล้างแต่ละครั้งพักไว้ 2 นาที ครั้งสุดท้ายสลัดให้แห้ง

1.3 เติม 10% ABS-PBS 150 ไมโครลิตร / หลุม อบไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25° C) 1 ชั่วโมง

1.4 ล้าง 1 ครั้งด้วย PBS pH 7.4 200 ไมโครลิตร/ หลุม

1.5 เติมซีรั่มซึ่งเจือจาง 1:50 ด้วย 10% ABS-PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 หลุม อบไว้ที่อุณหภูมิห้องในกล่องความชื้น 3 ชั่วโมง

1.6 ล้าง 3 ครั้งด้วย PBS pH 7.4 200 ไมโครลิตร/หลุม ล้างแต่ละครั้งพักไว้ครั้งละ 2 นาที ครั้งสุดท้ายสลัดให้แห้ง

1.7 เติม conjugate คือ peroxidase conjugated goat anti-human IgG,IgA,IgM เจือจาง 1:1000 ด้วย 10% ABS-PBS ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในกล่องความชื้น 90 นาที

1.8 ล้าง 4 ครั้งด้วย PBS pH 7.4 ล้างแต่ละครั้งพักไว้ครั้งละ 2 นาที

1.9 เติม substrate คือ O-phenylenediamine (OPD) ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน citrate buffer pH 5 และมี 30% H_2O_2 1ไมโครลิตรต่อ 1 มิลลิลิตร ของ substrate solution โดยใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตรทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืด

1.10 อ่านความเข้มของสีที่เกิด ด้วยเครื่อง ELISA reader, Titertek Multiscan (Flow,Helsinki ,USA) wavelength 450 เริ่มอ่าน OD ตั้งแต่ 10,15 20,25,30,40,50 นาทีตามลำดับ

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ ACAs

วิธีการทดสอบใช้วิธีการเดียวกับข้อ 1

เลือกปริมาณคาดิโอไลปินที่จะใช้เคลือบ หลุมระหว่าง 45 และ 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเคลือบหลุมในแถว 1-6 และ 7-12 ด้วยคาดิโอไลปิน ความเข้มข้น 45และ 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ขั้นตอนที่ 1.3 ใช้ 10% ABS-PBS ในแถว A B C และ D และใช้ 5% ABS-PBS ในแถว E,F,G และ H positive serum จากข้อ 1 และ ซีรั่มคนปกติซึ่ง VDRL,TPHA และ FTA-ABS non-reactive อย่างละ 1 ราย เจือจางด้วย 5% และ 10% ABS-PBS ให้มีความเจือจาง 1:50 และ 1:100 ในขั้นตอนที่ 1.7 ใช้ conjugate เจือจาง 1:500, 1:1000 และ 1:1500 ด้วย 5% ABS-PBS และ 10% ABS-PBS การใส่ reagent และ ซีรั่มในหลุมต่างๆ ตามรูปที่ 6

3. ตรวจ ACAs ในซีรั่มคนปกติ

แบ่งซีรั่มส่วนหนึ่งส่งตรวจ VDRL และ TPHA ที่หน่วยวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ รายที่ให้ผลบวกอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้ง 2 อย่าง ส่งตรวจ FTA-ABS ซีรั่มที่ให้ผลบวก TPHA หรือ FTA-ABS จะไม่นำมาตรวจ ACAs

ตรวจหา ACAs ในซีรั่มผู้บริจาคโรคหัดที่ TPHA และ FTA-ABS ให้ผลลบโดยใช้ peroxidase conjugated antihuman IgG,IgA,และ IgM (polyvalent) 111 ราย และตรวจโดยใช้ conjugate monovalent 24 ราย นำค่า OD มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ในการหา isotype specific ACAs นั้น ใช้ cardiolipin 45 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เคลือบหลุม มี 5% ABS-PBS เป็นตัวยับยั้ง non-specific binding และใช้เป็น diluent สำหรับ normal serum และ positive serum ซึ่งเป็นชุดเดียวกับข้อ 2 โดยใช้ dilution 1:50 หา dilution ที่เหมาะสมของ peroxidase conjugated antihuman IgG และ IgM ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็น 1:1000 สำหรับ IgG และ IgM ส่วนIgA ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็น 1:500

4. ศึกษาความจำเพาะของการทดสอบ (specificity)

4.1 Inhibition test

นำซีรั่มที่ต้องการทดสอบมาเจือจาง 1:50 ด้วย 5% ABS-PBS โดยใช้ ซีรั่ม 40 ไมโครลิตร เติม 5% ABS-PBS 2 มิลลิลิตร ใน micro-centrifuge tube เมื่อผสมเข้ากันดีแล้วแบ่งไปใส่ micro-centrifuge tube อีกหลอดหนึ่ง 1 มิลลิลิตร หลอดหนึ่งเป็นหลอดทดสอบใส่ cardiolipin ความเข้มข้น 4.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 30 ไมโครลิตร ซึ่งเท่ากับ 135 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของซีรั่มที่เจือจาง 1:50 อีกหลอดเป็น control เติม absolute ethanol 35 ไมโครลิตรเท่ากัน การเติม cardiolpin

และ absolute ethanol ในซีรั่มที่เจือจางต้องเติมอย่างระมัดระวัง เพราะ absolute ethanol อาจจะไปตกตะกอนโปรตีนในซีรั่ม โดยค่อยๆ เติมทีละน้อยและผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ตลอดเวลา จากนั้นนำไปอุ่นที่ 37 °C 1 ชั่วโมง นำออกมาเขย่า 3-4 ครั้ง เมื่อครบ 1 ชั่วโมง นำไปอบที่ 4 °C โดยเขย่าบนเครื่องเขย่า (180 รอบ/นาที) (SARSTEDT, Germany) ตลอดเวลา นานประมาณ 18 ชั่วโมงหรือข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่น ความเร็วรอบ 11,500 rpm. นาน 15 นาที (Eppendof,Eppendork Geratebau,West Germany) ดูดน้ำใสส่วนบนมาตรวจหา ACAs โดยใช้ conjugated antihuman IgG,IgA,IgM (polyvalent) โดยทำซ้ำหลอดละ 2 หลุม ทั้ง 2 หลอด การทำ inhibition test เลือกสุ่มมาทำเพียงบางราย ไม่ได้ทำทุกรายที่ positive

4.2 ตรวจหา ACAs ในคนไข้ multiple myeloma 4 ราย เป็น IgG myeloma 2 ราย IgA myeloma 1 ราย และ IgM myeloma 1 ราย

5. การศึกษาความเที่ยงตรงของการทดสอบ (Precision) และความเชื่อถือได้ (Reproducibility)

เตรียม pooled serum 3 ชุด pool I เป็น normal pool (ประกอบด้วยซีรั่มคนปกติ 8 ราย) pool II เป็น weakly positive (ประกอบด้วยซีรั่มคนไข้ 3 ราย) และ pool III เป็น strongly positive (ประกอบด้วยซีรั่มคนไข้ 2 ราย) แต่ละ pool นำมาทำการทดสอบซ้ำ 26 ครั้ง ในการทดสอบครั้งเดียว คละกันไปทั้ง plate สำหรับการหา precision ส่วนการหา Reproducibility ใช้ pooled serum ชุดเดียวกันทำการทดสอบในเวลาต่างๆกัน 21 ครั้ง ในช่วงเวลา 5 เดือน นำค่าที่ได้ มาคำนวณสัมประสิทธิ์ของการกระจาย [coefficient of variation (CV)] จากสูตร

$$\%CV = \frac{S.D. \times 100}{mean}$$

II การตรวจ VDRL โดยวิธี ELISA (VDRL-E)

(ปรับปรุงจากวิธีของ Harris และคณะ(58))

I17495981

1. หาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ VDRL โดยวิธี ELISA

1.1 เตรียม antigen suspension โดยใช้ VDRL-Ag.(Behringwerke, Germany) ซึ่งประกอบด้วย cardiolipin 0.03%,cholesterol 0.9% และ lecithin 0.21 % การเตรียม antigen suspension ใช้ขวดแก้วก้นแบนขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร ใส่ PBS pH 7.4 0.4 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นแบนก่อน ค่อยๆหยด VDRL-Ag. 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดทีละหยด โดยเขย่าขวดตลอดเวลาจนหมด เติม PBS อีก 4.1 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดเขย่าอย่างแรง

เพื่อจะนำมาใช้เคลือบหลุมเติม buffer อีก 0.5 มล. เพื่อให้ cardiolipin ใน VDRL antigen suspension นี้ 100 ไมโครลิตร ซึ่งใช้เคลือบหลุมใน VDRL-E เท่ากับ cardiolipin ที่ใช้เคลือบหลุมในการตรวจ ACAs (เท่ากับ cardiolipin หลุมละ 2.7 ug.) ความเจือจางของ antigen suspension นี้เท่ากับ 1:55 จากนั้นเจือจาง 2 เท่า ด้วย PBS pH 7.4 ได้ antigen suspension ความเข้มข้น 1:110 นำ antigen suspension ทั้ง 2 ความเข้มข้นเคลือบหลุมตามแนวนอน ความเข้มข้นละ 2 แถวตามตาราง ที่ 2 . ปิดฝาถาดหลุม ใส่ในกล่องความชื้น เก็บในตู้ 4 °C 24 ชั่วโมง

1.2 ล้าง 3 ครั้งด้วย PBS pH 7.4 การล้างพักไว้ครั้งละ 2 นาที แล้วหา ปริมาณ ABS-PBS ที่พอเหมาะ โดยใช้ ABS-PBS 5%,10% ดังนี้ แถวตั้งแถวที่ 1-6 อบกับ 5% ABS แถวที่ 7-12 อบกับ 10% ABS หลุมละ 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

1.3 ล้าง 1 ครั้งด้วย PBS หลุมละ 200 ไมโครลิตร ล้างแต่ละครั้งพักไว้ 2 นาที

1.4 ใช้ซีรั่มคนปกติ (VDRL, TPHA และ FTA-ABS ให้ผลลบ) เป็น negative control และซีรั่มคนไข้ syphilis 2 ราย ซึ่ง VDRL ให้ผลบวก 1:1 และ 1:16 (TPHA และ FTA-ABS positive)เป็น positive control เจือจาง 1:50 ด้วย 5% และ 10% ABS-PBS ใส่ในหลุมต่างๆ (ตามรูปที่ 7) หลุมละ 100 ไมโครลิตร อบไว้ที่

อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 °C) 3 ชั่วโมง

1.5 ล้าง 3 ครั้งด้วย PBS pH 7.4 แล้วเติม peroxidase conjugated antihuman IgG,และ peroxidase conjugated antihuman IgM เจือจางเป็น 1:800 และ 1:1000 ด้วย 5% และ 10% ABS-PBS ตามลำดับหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที

1.6 ล้าง 4 ครั้งด้วย PBS pH 7.4เติม substrate solution คือ OPD (ละลายใน citrate buffer pH 5 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเติม 30% H_2O_2 1 ไมโครลิตร/1 มิลลิลิตร (buffer) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปอ่านค่า OD ด้วยเครื่อง ELISA reader,Titertek Multiscan (Flow,Helsinki, USA) wavelength 450 nm. (รายละเอียด การทำ Checkerboard titration ตามรูปที่ 7)

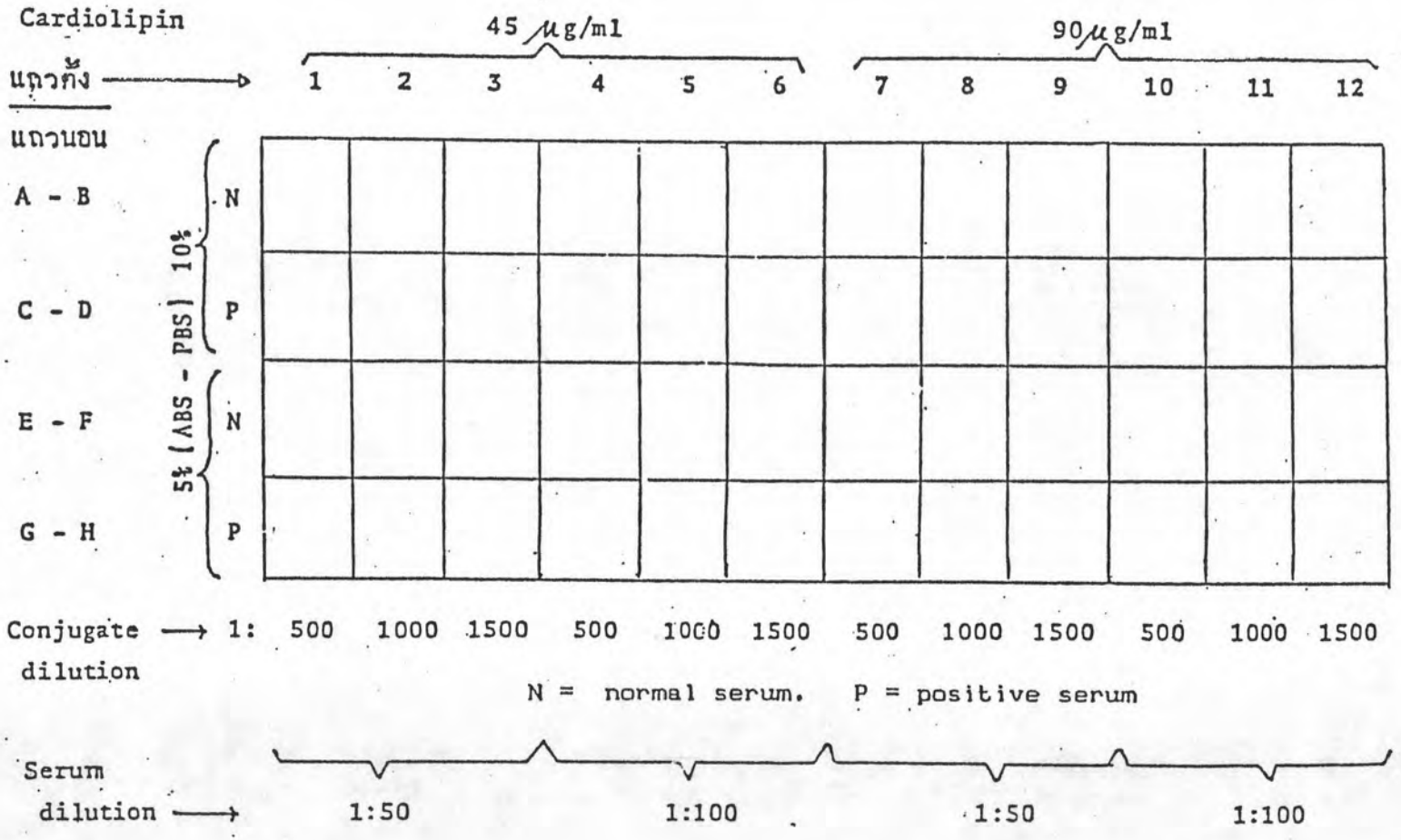
2. ตรวจ VDRL-E ซีรั่มคนไข้

ซีรั่มคนไข้ syphilis 20 ราย และคนไข้ SLE (ACAs positive) 15 ราย ตรวจหาทั้ง ACAs และ VDRL-E โดยใช้ peroxidase conjugated antihuman IgG และ IgM

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

โดยเหตุที่การกระจายของข้อมูลเป็น nonparametric distribution จึงเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มคนไข้ โดยใช้ Mann-Whitney-Wilcoxon rank test (wr) (U test)

รูปที่ 6 Checkerboard titration สำหรับ ACAs ELISA



รูปที่ 7 การทำ Checkerboard titration ของ VDRL โดยวิธี ELISA