การพัฒนาชุดตรวจ indirect ELLSA สำหรับการตรวจภาวะการติดเชื้อ *Salmonella* Typhi แบบเฉียบพลัน

DEVELOPMENT OF INDIRECT ELISA FOR DIAGNOSIS OF ACUTE *SALMONELLA* TYPHI INFECTION

วิมล ชอบชื่นชม[1] ขนิษฐา เลี้ยงบำรุง[2] ศรินธร รักษ์มณี[3] สุรสา ลิมาคม[4] สุรสิทธิ์ สุวรรณสินธุ์[5]

[1,2,3,4,5]คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ต.หลักหก อ.เมือง จ.ปทุมธานี

บทคัดย่อ: ไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Typhi ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยไข้ไทฟอยด์ ทางน้ำเหลืองวิทยา นิยมใช้ Widal test กันอย่างแพร่หลายแต่วิธี Widal test มีความไวและความจำเพาะต่ำ นอกจากนี้ชุดตรวจด้วยวิธี ELISA ที่มีจำหน่ายทางการค้าเป็นการพัฒนาจาก *S.*Typhi สายพันธุ์จากต่างประเทศ ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับการติดเชื้อในประเทศไทยนัก ผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาชุดตรวจ indirect ELISA สำหรับตรวจภาวะการติดเชื้อ *S.*Typhi แบบเฉียบพลันขึ้น โดยพบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับชุดทดสอบ เป็นดังนี้ สารละลายบัพเฟอร์ที่ใช้เป็น coating buffer คือ carbonate buffer pH 9.6 แอนติเจนที่ใช้คือส่วน lipopolysacharide ของ *S.*Typhi โดยการเตรียมเป็น crude extract ของ *S.*Typhi โดยนึ่งภายใต้แรงดันก่อนทำให้เซลล์ของ *S.*Typhi แตกด้วยวิธี sonication ความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมคือ 30 µg/ml เคลือบแอนติเจนที่ 4°C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง โดยใช้ 10% BSA เป็น blocking solution การเจือจางซีรั่มทดสอบที่เหมาะสมคือ 1:100 ด้วยสารละลาย 1%BSA-PBST ทำปฏิกิริยาที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สาร conjugate ที่ใช้คือ anti-Human IgM ที่ติดฉลากด้วย peroxidase การเจือจางที่เหมาะสมคือ 1:500 ทำปฏิกิริยาที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใช้ O-phenylenediamine (OPD) เป็นสารตั้งต้นและวัดสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

ABSTRACTS: Typhoid fever is the disease caused by *Salmonella* Typhi infection. Although the serological test routinely used for diagnosis of typhoid fever is Widal test, its sensitivity and specificity are seem to be very low. Moreover, the commercial ELISA test kits are developed by using *S.*Typhi which isolated mainly from their area. Unless specified otherwise, these test kits may not appropriate for diagnosis of the strain of *S.*Typhi which spreading in Thailand. Therefore, we have developed the indirect ELISA for diagnosis of acute *S.*Typhi infection. And it was found that the optimum condition for the estabilished test are as the followings. Coating buffer is carbonate buffer, pH 9.6, *S.*Typhi lipopolysacharide antigen is prepared as autoclaved crude extract by using sonication technique. For antigen coating, the concentration of antigen is 30 µg/ml and the plates are incubate at 4°C for 16-24 hr. Blocking solution used in this test is 10%BSA. The dilutions of serum and conjugate anti-human IgM with peroxidase are 1:100 and 1:500, respectively. The incubation times of serum and conjugate are at 37°C for one hour. Substrate used for

detection of the enzyme activity is O-phenylenediamine(OPD). And the absorbance of color of the reactions were measured at 492 nm.

KEYWORDS: Typhoid fever, *Salmonella* Typhi, Indirect ELISA

1. บทนำ

ไข้ไทฟอยด์ (Typhoid fever) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ชื่อว่า *Salmonella* Typhi พบการปนเปื้อนเชื้อ *S.*Typhi อยู่ในเนื้อสัตว์เป็นส่วนใหญ่ เชื้อไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ แต่ทนต่อสภาพแห้งแล้งหรือเย็นจัดได้ (1) ติดต่อโดยการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อปนเปื้อนมาจากอุจจาระหรือปัสสาวะของผู้ป่วยหรือผู้เป็นพาหะ อาจพบเชื้อในหอยที่จับได้ในแถบชายฝั่งที่มีท่อน้ำเสียระบายลงทะเล ผลไม้ ผักดิบ นม และผลิตภัณฑ์จากนม ซึ่งอาจเป็นตัวกลางแพร่เชื้อ ส่วนมากเชื้อจะติดมาจากมือของผู้ที่เป็นพาหะ ผู้ติดเชื้อจะมีอาการไข้สูงลอย ปวดศีรษะและหนาวสั่นเป็นอยู่หลายวัน อาการระบบทางเดินอาหารคือ เบื่ออาหาร ท้องอืดมาก ปวดท้องหลายวันจึงจะถ่าย ลักษณะอุจจาระเหลว มีกลิ่นเหม็น ม้ามโต ชีพจรเต้นช้าเมื่อเทียบกับอุณหภูมิร่างกายที่สูงขึ้นจากไข้ (Relative bradycardia) อาจมี DIC shock (Disseminated Intravascular Coagulopathy Shock) อาการต่างๆ นั้นจะหายไปในเวลาไม่นาน ที่สำคัญคือถ้าไม่ได้รับการรักษา ผู้ป่วยอาจกลับมาเป็นไข้อีกได้ และจะทำให้ผู้ป่วยป่วยเรื้อรัง และเป็นพาหะของโรคสามารถแพร่เชื้อสู่ผู้อื่นทางอุจจาระได้ บางรายพบว่าเป็นพาหะเรื้อรัง คือมีเชื้อในอุจจาระนานเป็นปี โรคแทรกซ้อน คือ เลือดออกทางเดินอาหาร, ลำไส้ทะลุ, ไตวาย, ช่องท้องอักเสบ ระบาดวิทยาของโรค ในแต่ละปีประมาณว่าจากประชากรโลกทั้งหมดมีผู้ป่วยใหม่จำนวน 17 ล้านราย ตายประมาณ 600,000 ราย มีหลายสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ Chloramphenicol และยาปฏิชีวนะตัวอื่น ๆ ในหลายพื้นที่ของโลก โดยส่วนใหญ่จะแยกเชื้อได้ในแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตะวันออกกลาง และตะวันออกเฉียงเหนือของแอฟริกา (2)

2. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

2.1 การเพาะเชื้อ เพาะได้จากอุจจาระ ปัสสาวะ เลือด ไขกระดูกและน้ำดี แต่เนื่องจากการตรวจหาเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ มักจะมีผลลบปลอมได้ เนื่องจากเชื้ออาจมีปริมาณน้อย แต่วิธีการเพาะเชื้อจากเลือดจัดเป็น definite diagnosis แต่จะต้องใช้เวลาทดสอบนาน (3)

2.2 ปฏิกิริยาทางซีโรโลยีย์ ใช้ Widal reaction ซึ่งเป็น agglutination test วัด anti-H (IgG) และ anti-O (IgM) วิธี Widal test นี้จัดเป็นวิธีที่ใช้กันแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่อาจจะเกิด cross-reactivity กับ *Salmonella* สายพันธุ์อื่นได้ (WHO/V&B/03.07) ทำให้เกิด false-positive หรืออาจพบ *Salmonella* Typhi antibody titers endemic area สูงกว่าพื้นที่อื่น ทำให้แปลผลยาก(4,5)

นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันอื่นๆและอณูชีววิทยา ซึ่งปัจจุบัน (6,7) ได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธีใหม่ๆ มากมาย อย่างไร ก็ตาม แม้ว่าบางวิธีจะมีความไวและความจำเพาะสูงแต่ไม่มีชุดสำเร็จรูปจำหน่าย หรือมีจำหน่ายแต่ราคาค่อนข้างสูง อีกทั้งวิธีดังกล่าวส่วนใหญ่ถูกคิดค้นและพัฒนาขึ้นในต่างประเทศ(8) จึงทำให้ antigen ทดสอบนั้นเป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยในต่างประเทศซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับการติดเชื้อในประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึง มีแนวความคิดที่จะพัฒนาชุดตรวจ indirect ELISA เพื่อตรวจหา antibody ต่อเชื้อ *Salmonella* Typhi class IgM ขึ้นเพื่อสามารถตรวจ recent infection และเป็นแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อที่แยกได้ภายใน ประเทศไทย

3. เครื่องมือและวิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่าง(samples)

positive serum หมายถึง serum ของผู้ป่วยที่มีข้อมูลทางคลินิกบ่งชี้ลักษณะของผู้ป่วย typhoid fever และเมื่อทำการตรวจโดยวิธี Widal test แล้วให้ผล anti-O titer ตั้งแต่ 160 ขึ้นไป จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้รับจากห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี หมายเลข 3.1.1-3.1.8 **negative serum** หมายถึง serum ของผู้ป่วยที่มีสุขภาพปกติ ไม่มีลักษณะบ่งชี้ภาวะการเป็น typhoid fever และทำการตรวจโดยวิธี Widal test แล้วให้ผล anti-O titer น้อยกว่า 80 จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้รับจาก นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่4 มหาวิทยาลัยรังสิต หมายเลย 3.2.1 - 3.2.8

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเตรียมแอนติเจน

นำเชื้อ *Salmonella* Typhi ที่ผ่านการทดสอบโดยการย้อมแกรม และ biochemical test แล้วว่าเป็น *Salmonella* Typhi มาเพาะเลี้ยงบน nutrient agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37^0 C harvest เชื้อจาก agar แล้วทำเป็น cell suspension ในอัตราส่วนประมาณ 1:1 ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไป autoclave เป็นเวลา 15 นาที ที่ ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 ° C จากนั้นนำไป sonicate ที่ 20 kHz และ 125 w เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปั่นตะกอนเซลทิ้งไป โดยปั่นที่ 20,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำ supernatant ซึ่งคือ crude extract ที่ได้มาแบ่งเป็น aliquot aliquot ละ 0.5 ml เก็บไว้ที่ -20^0 C เพื่อใช้เป็นแอนติเจนต่อไป โดย **การตรวจวัดความเข้มข้นแอนติเจน** วิธีการตรวจวัดโปรตีนโดยวิธี Lowry's method จะวัดความเข้มข้นของโปรตีนใน crude extract ที่เตรียมขึ้น

4.2 วิธี ELISA เตรียมขึ้นเองสำหรับตรวจหา anti-Salmonella Typhi IgM

อาศัยหลักการ indirect ELISA โดย anti-*Salmonella* Typhi ที่มีอยู่ใน serum ของผู้ป่วย จะทำปฏิกิริยากับ antigen (*Salmonella* Typhi antigen) ที่ตรึงอยู่บนผิวของ microtiter plate เมื่อเติม Goat Anti-Human lgM peroxidase conjugate ก็จะไปเกิดปฏิกิริยา Ag-Ab complex ดังกล่าว เมื่อเติม substrate คือ O-phenylenediamine(OPD) ลงไปก็จะเกิดสีของสารผลิตภัณฑ์ จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm โดยปริมาณความเข้มข้นของสีจะแปรผันโดยตรง กับปริมาณของ anti-*Salmonella* Typhi IgM ใน serum ของผู้ป่วย ทำ checkerboard titration เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณ antigen ที่ใช้ coat plate การเจือจาง serum และการเจือจาง conjugate รวมทั้งความเหมาะสมของเวลา สำหรับการทดสอบแต่ละขั้นตอน

4.2.1 การทดสอบเพื่อหา coating buffer ที่เหมาะสม Coat plate ด้วย *Salmonella* Typhi antigen ที่เจือจางใน coating buffer ต่าง ๆ ดังนี้ คือ TBS pH 7.5 , phosphate buffer solution(PBS) pH 7. 1 , carbonate buffer pH 9.8และ incubate ที่ 4 ° C เป็นเวลา 16 – 24 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที จากนั้น Block non-specific binding โดยการเติม 4 % BSA ลงไปจำนวน 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมงล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที เติม Positive serum (หมายเลข 3.1.8) และ Negative serum (หมายเลข 3.2.8) ที่ เจือจางเป็น 1:200 ด้วย serum diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 ° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที เติม conjugate (Goat Anti-Human lgM peroxidase) ที่ เจือจางเป็น 1:1000 ด้วย conjugate diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที เติมสารตั้งต้น O-phenylenediamine(OPD) 200 µL ที่อุณหภูมิห้อง, 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยด่าง 3 N NaOH 50 µL วัด OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA – READER

4.2.2 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antigen ที่ใช้ coat plate จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 1 พบว่าในการ coat plate ควรใช้ carbonate buffer pH

9.6 เป็น coating buffer จากนั้นเป็นการหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมในการ coat plate โดยทำการ coat plate ด้วย *Salmonella* antigenโดยเจือจางใน carbonate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 , 40 µg / ml ที่ 4 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง หลุมละ 200 µL แล้วทำการทดสอบต่อไปดังขั้นตอนที่ 1

4.2.3 การทดสอบหาเวลาในการ incubate serum ที่เหมาะสม เมื่อได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antigen ในการ coat plate จากข้อ 2 ได้แล้ว ทำการทดสอบดังข้อ2โดยใช้เวลาในการ incubate serum เป็น 30, 60 และ 90 นาที

4.2.4 การหาเวลาในการ incubate conjugate ที่เหมาะสม เมื่อทราบเวลาในการ incubate serum ที่เหมาะสม จากผลการทดลองในข้อ 3 แล้วทำการทดสอบหาเวลาในการ incubate conjugate ที่เหมาะสมโดยทำการทดสอบดังข้อ2และใช้เวลาในการ incubate conjugate ที่แตกต่างกันเป็น30, 60 และ 90 นาที

4.2.5 การทดสอบหา blocking solution ที่เหมาะสม เมื่อทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 1 , 2 , 3 และ 4 ได้เรียบร้อยแล้ว นำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวทำการทดสอบหา blocking solution ที่เหมาะสม โดยใช้ blocking solution เป็น 2 % BSA , 4 % BSA และ 10% BSA

4.2.6 การทดสอบหาการเจือจาง serum ที่เหมาะสม จากผลในข้อ 1-5 ได้แล้ว ทำการทดสอบหาการเจือจาง serum ที่เหมาะสม โดยใช้ Positive serum และ Negative serum ที่ เจือจางเป็น 1:50 , 1:100 , 1:200, 1:400 และ 1:800 ด้วย serum diluent

4.2.7 การหาการเจือจาง conjugate ที่ใช้ทดสอบที่เหมาะสม เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสม จากผลการทดลองในข้อ 1-6 แล้วทำการทดสอบหาการเจือจาง conjugate ตาม ลำดับ โดยใช้ cojnjugate (Goat Anti-Human lgM peroxidase)ที่ dilute 1:500, 1:1000 เป็น 1:2000 ด้วย diluent

4.2.8 การทดสอบหา Anti-Salmonella Typhi IgM ด้วยวิธี indirect ELISA ที่เตรียมขึ้น เมื่อทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 1 ,2 ,3 , 4, 5, 6 และ7 ได้เรียบร้อยแล้ว นำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวทำการทดสอบกับ serum ต่าง ๆ ได้แก่ serum หมายเลข 3.1.1-3.1.8 และ 3.2.1-3.2.8 ตามขั้นตอนในการทดสอบ

4.3 Quality control สำหรับวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง

4.3.1 การทดสอบ sample แบบ duplicateในการตรวจหา anti-Salmonella Typhi ใน sample ต่าง ๆ ด้วยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง จะทำการทดสอบแต่ละ sample แบบ duplicate และทำการหาค่าเฉลี่ย OD เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในขั้นตอนต่อไป

4.3.2 การทดสอบเพื่อควบคุมผลของ conjugate ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นทุกครั้ง จะทำการทดสอบ direct conjugate control (DCC) เพื่อเป็นการควบคุม non specific binding ที่เกิดจาก conjugate ทำปฏิกิริยากับ antigen (*Salmonella* Typhi) หรือ solid phase (micro titer plate) โดยตรง และเพื่อบอกความผิดปกติของ conjugate ซึ่งทำการทดสอบ ในขั้นตอนการเติม serum จะเติม buffer แทนส่วนขั้นตอนอื่นทำตามปกติ

4.3.3 การทดสอบเพื่อควบคุมผลของ substrate ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นทุกครั้ง จะทำการควบคุมผลของ substrate ซึ่งทำการทดสอบโดยหลุมที่เป็น substrate control (substrate blank) จะเติม buffer แทนขั้นตอนการเติม serum และ conjugate ส่วนขั้นตอนอื่น ๆ ทำตามปกติ

4.4 การคำนวณผลการตรวจหา anti-Salmonella Typhi ด้วยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง

ทำการคำนวณค่า OD ของการตรวจหา anti-*Salmonella* Typhi โดยวิธี ELISA ใน sample ต่าง ๆ ดังนี้

OD ของการตรวจหา anti-*Salmonella* Typhi = (OD sample หลุมที่ 1 + OD serum หลุมที่ 2)/2

ค่าODที่คำนวณได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ผลต่างๆ ต่อไป

5. ผลการทดลอง

5.1 การทดสอบเพื่อหา coating buffer ที่เหมาะสม 12

นำแอนติเจนไปเจือจางด้วย coating buffer ต่างๆ ดังตารางที่ 1 ให้มีความเข้มข้นเป็น 15 µg/ml แล้วนำมาทดสอบโดยใช้ positive serum (เจือจาง 1:200) , negative serum (เจือจาง 1:200) และทำ control 2 ชนิด คือ substrate control และ conjugate control พบว่าค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum เปรียบเทียบกับ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer นอกจากนี้พบว่า ค่า substrate control และ conjugate control ไม่เกิน 0.100 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของ positive serum, negative serum, substrate control และ conjugate control ในการหา coating buffer ที่เหมาะสมในการ coat plate

ชนิดของ coating buffer	ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง ที่ 492 นาโนเมตร			
	positive serum	negative serum	substrate control	conjugate control
PBS	0.093	0.064	0.036	0.031
TBS	0.104	0.097	0.052	0.044
Carbonate buffer	***0.283***	***0.243***	***0.074***	***0.056***
Citric buffer	0.045	0.052	0.033	0.042

5.2 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antigen ที่ใช้ coat plate

จากนั้นนำแอนติเจนไปเจือจางด้วย carbonate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 2 แล้วนำมาทดสอบโดยใช้ positive serum (เจือจาง1:200) , negative serum (เจือจาง 1:200) และทำ control 2 ชนิด คือ substrate control และ conjugate control พบว่าค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum เปรียบเทียบกับ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของ antigen ที่ใช้coat plate เป็น 30 µg/mlนอกจากนี้พบว่า ค่า substrate control และ conjugate control ไม่เกิน 0.100 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum, negative serum, substrate control และconjugate control ในการหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับ coat plate

ความเข้มข้นของ antigen (µg/ml)	ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร			
	positive serum	negative serum	substrate control	conjugate control
1	0.217	0.398	0.081	0.096
5	0.295	0.390	0.076	0.097
10	0.248	0.338	0.095	0.076
15	0.349	0.243	0.074	0.056
20	0.317	0.214	0.067	0.063
25	0.314	0.277	0.078	0.070
30	***0.348***	***0.158***	***0.080***	***0.062***
35	0.273	0.130	0.066	0.061
40	0.254	0.108	0.032	0.061

5.3 การทดสอบหาเวลาในการ incubate serum ที่เหมาะสม

นำแอนติเจนไปเจือจางด้วย carbonate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml แล้วนำมาทดสอบโดยใช้ positive serum (เจือจาง1:200), negative serum (เจือจาง 1:200) เพื่อทดสอบหาเวลาในการ incubate serum ที่เหมาะสมดังตารางที่ 3 และทำ control 2 ชนิด คือ substrate control และ conjugate control พบว่าค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum เปรียบเทียบกับ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อเวลาในการ incubate serum เป็น 1 ชั่วโมง

นอกจากนี้พบว่า ค่า substrate control และ conjugate control ไม่เกิน 0.100 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum , negative serum , substrate control และ conjugate control ในการ incubate serum ที่เหมาะสม สำหรับ coat plate

เวลาในการ incubate serum	ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร			
	positive serum	negative serum	substrate control	conjugate control
30 นาที	0.178	0.108	0.078	0.069
60 นาที	***0.324***	***0.158***	***0.080***	***0.062***
90 นาที	0.326	0.164	0.076	0.068

5.4 การทดสอบหาเวลาในการincubate conjugate ที่เหมาะสม

นำแอนติเจนไปเจือจางด้วย carbonate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml แล้วนำมาทดสอบโดยใช้ positive serum (เจือจาง1:200) , negative serum (เจือจาง 1:200) เพื่อทดสอบหาเวลาในการ incubate conjugate ที่เหมาะสมดังตารางที่ 4 และทำ control 2 ชนิด คือ substrate control และ conjugate control พบว่าค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum เปรียบเทียบกับ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อเวลาในการ incubate conjugate เป็น 1 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่า ค่า substrate control และ conjugate control ไม่เกิน 0.100 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum, negative serum, substrate control และ conjugate control ในการ incubate conjugate ที่เหมาะสมสำหรับ coat plate

เวลาในการ incubate conjugate	ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร			
	positive serum	negative serum	substrate control	conjugate control
30 นาที	0.178	0.110	0.078	0.069
60 นาที	***0.326***	***0.163***	***0.080***	***0.062***
90 นาที	0.325	0.160	0.075	0.065

5.5 การทดสอบหา blocking solution ที่เหมาะสม

นำแอนติเจนไปเจือจางด้วย carbonate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml แล้วทดสอบหา blocking solution ที่เหมาะสมดังตารางที่ 5 มาทดสอบโดยใช้ positive serum (เจือจาง1:200), negative serum (เจือจาง 1:200) และทำ control 2 ชนิด คือ substrate control และ conjugate control พบว่าค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum เปรียบเทียบกับ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ blocking solution เป็น 10%BSA นอกจากนี้พบว่า ค่า substrate control และ conjugate control ไม่เกิน 0.100 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum, negative serum, substrate control และ conjugate control ในหา blocking solution ที่เหมาะสม สำหรับ coat plate

blocking solution	ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร			
	positive serum	negative serum	substrate control	conjugate control
2%BSA	0.156	0.116	0.085	0.073
4%BSA	0.202	0.158	0.080	0.064
10%BSA	***0.382***	***0.261***	***0.445***	***0.066***

5.6 การทดสอบหาการเจือจาง serum ที่เหมาะสม

นำแอนติเจนไปเจือจางด้วย carbonate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml มาทดสอบโดยใช้ positive serum และ negative serum ที่ทำการเจือจางตามความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 6 และทำ control 2 ชนิด คือ substrate control และ conjugate control พบว่าค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum เปรียบเทียบกับ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อเจือจาง serum 1:100 นอกจากนี้พบว่า ค่า

substrate control และ conjugate control ไม่เกิน 0.100 ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum, negative serum, substrate control และ conjugate control ในหาการเจือจาง serum ที่เหมาะสม สำหรับ coat plate 14

การเจือจาง serum	ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร			
	positive serum	negative serum	substrate control	conjugate control
1:50	0.779	0.232	0.091	0.067
1:100	***0.492***	***0.155***	***0.093***	***0.073***
1:200	0.349	0.152	0.096	0.081
1:400	0.226	0.130	0.088	0.082

5.7 การทดสอบหาการเจือจาง conjugate ที่เหมาะสม

นำแอนติเจนไปเจือจางด้วย carbonate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml มาทดสอบโดยใช้ positive serum และ negative serum ที่ทำการเจือจาง 1:100 และทำ control 2 ชนิด คือ substrate control และ conjugate control พบว่าค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum เปรียบเทียบกับ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อเจือจาง conjugate 1:500 นอกจากนี้ พบว่า ค่า substrate control และ conjugate control ต่างกันไม่เกิน 0.100 ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum, negative serum, substrate control และ conjugate control ในหาการเจือจาง conjugate ที่เหมาะสม สำหรับ coat plate

การเจือจาง conjugate	ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร			
	positive serum	negative serum	substrate control	conjugate control
1:500	***0.766***	***0.220***	***0.088***	***0.067***
1:1000	0.513	0.127	0.096	0.068
1:2000	0.166	0.102	0.089	0.071

5.8 การทดสอบหา Anti-Salmonella Typhi IgM ด้วยวิธี indirect ELISA ที่เตรียมขึ้น

นำแอนติเจนไปเจือจางด้วย carbonate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml มาทดสอบโดยใช้ positive serum และ negative serum ที่ทำการเจือจาง 1:100 และทำ control 2 ชนิด คือ substrate control และ conjugate control พบว่าค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum เปรียบเทียบกับ negative serum มีค่าดังตารางที่ 8 นอกจากนี้พบว่า ค่า substrate control มีค่า 0.093 และ conjugate control มีค่า 0.082 ซึ่งไม่เกิน 0.100 ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของ positive serum, negative serum, substrate control และ conjugate control ในหา Anti-*Salmonella* Typhi IgM ด้วยวิธี indirect ELISA ที่เตรียมขึ้น

ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร			
NO.	**positive serum**	**NO.**	**negative serum**
3.1.1	0.632	**3.2.1**	0.147
3.1.2	0.532	**3.2.2**	0.225
3.1.3	0.435	**3.2.3**	0.132
3.1.4	0.698	**3.2.4**	0.112
3.1.5	0.736	**3.2.5**	0.325
3.1.6	0.351	**3.2.6**	0.229
3.1.7	0.699	**3.2.7**	0.148
3.1.8	***0.743***	***3.2.8***	***0.208***
Mean	0.603	**Mean**	0.202
SD	0.14	**SD**	0.06

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

6.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาชุดตรวจ indirect ELISA สำหรับการตรวจภาวะการติดเชื้อ *Salmonella* Typhi แบบเฉียบพลัน โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ระหว่าง positive และnegative serum ที่ให้ผลสูงสุดโ ดยค่าของ

substrate control และ conjugate control มีค่าความดูดกลืนแสงที่ 492 nm ต่างกันเกิน 0.100 เป็นดังนี้

6.1.1 coating buffer ที่เหมาะสมคือ Carbonate buffer pH 9.6

6.1.2 antigen ใช้ความเข้มข้น antigen ที่เหมาะสมเป็น 30µg / ml

6.1.3 เวลาในการ Incubate หลังขั้นตอนการเติม serum ที่ 37 °C ควรใช้เวลาในการ Incubateที่60 นาที

6.1.4 เวลาในการ Incubate หลังขั้นตอนการเติม conjugateที่ 37 °C ใช้เวลาในการ Incubateที่60 นาที

6.1.5 blocking solution ที่เหมาะสม คือ 10%BSA

6.1.6 การเจือจาง serum ที่เหมาะสม คือ ทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 1:100

6.1.7 การเจือจาง conjugate ที่เหมาะสม คือ ทำการเจือจางที่ความเข้มข้น1:500

6.2 เมื่อใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น ทำตรวจ positive serum จำนวน 8 ราย และ negative serum จำนวน 8 ราย นำมาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานได้เป็นดังนี้ positive serum จะมีค่าเฉลี่ย 0.603 และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.14 negative serum จะมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.202 และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.06

6.3 การศึกษาขั้นต่อไปจะเป็นการประเมินคุณภาพของชุดทดสอบที่เตรียมขึ้นนี้

7. เอกสารอ้างอิง

[1] กนกรัตน์ ศิริพานิชกร และคณะ. โรคติดเชื้อ Infectious Disease. กรุงเทพ: 246-254.

[2] ศรีลักษณ์ สิมะเสถียร, 2517. รายงานผู้ป่วยโรคไข้รากสาดน้อยของแผนกกุมาร ฯ โรงพยาบาลพระมงกุฎ ในระยะเวลา 3 ปี. วิทยาสารเสนารักษ์. :27,24

[3] นิภา จรูญเวสม์ และคณะ, 2532. โรคเขตร้อน. โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราช พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ ฯ: 315-316

[4] เบญจวรรณ รุ่งปิตะรังสี, วิชัย รุ่งปิตะรังสี, 2519. ซัลโมแนลลาแอกกลูตินินในคนไทย. สารศิริราช :28:1384.

[5] World Health Organization. Background document: The diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever. Original:English 2(13) , 03/07

[6] Quiroga T ; Goycoolea M ; Tagle R ; Gonzalez F ; Rodriquez L ; Villarroel L., 1992. Diagnosis of typhoid fever by two serologic methods. Enzyme-linked immunosorbent assay of antilipopolysacchalide of Salmo*nella typhi* antobodies and Widal test. Diagn Microbiol Infect Dis ;15(8):651-6

[7] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. J. Biol. Chem. 193: 265. (The original method)

[8] The Bio-Quant Inc. (BQ). Salmonella typhi IgM ELISA.Catalog No.BQ084M