บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

1.1 กระต่าย

น้ำหนัก 2-3 กิโลกรัม พันธุ์ New Zealand White จำนวน 18 ตัว ไม่จำกัดเพศ

1.2 หนูถีบจักร

น้ำหนัก 18-20 กรัม พันธุ์ Swiss จำนวน 700 ตัว ไม่จำกัดเพศ

2. เชื้อ Pseudomonas aeruginosa

เชื้อ P. aeruginosa immunotype 1, 2 และ 4 ได้จาก stock culture ของ ดร.เกรียงศักดิ์ สายธนู หน่วยจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ รายละเอียดแหล่งที่มาโปรดดูตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงแหล่งที่มาของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ที่ใช้ในการทดลอง

Strain No.	Immunotype	แหล่งที่มา	โรคที่เกิดและสิ่งส่งตรวจ
RM 9	1	รพ.รามาธิบดี	Urinary tract infection, urine
RM 66	2	"	Pneumonia, sputum
RM 63	4	"	Infected burn wound, pus swab

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Blood agar

3.2 MacConkey agar + 3% (V/V) glycerol

3.3 Plate count agar (PCA)

4. เลือดแกะ

เจาะเลือดแกะจากหลอดเลือดดำที่คอ 50 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำยา Alsever 50 มิลลิลิตร

5. สารเคมี

5.1 Absolute ethanol (E.Merck Co., Germany)

5.2 Ammonium sulfate (May and Baker Ltd., England)

5.3 Barium chloride (E. Merck Co., Germany)

5.4 Citric acid (May and Baker Ltd., England)

5.5 Dextrose (May and Baker Ltd., England)

5.6 Disodium hydrogen phosphate (May and Baker Ltd., England)

5.7 Hydrochloric acid (E. Merck Co., Germany)

5.8 Phenol (May and Baker Ltd., England)

5.9 Sodium chloride (E. Merck Co., Germany)

5.10 Sodium citrate (E. Merck Co., Germany)

5.11 Sodium dihydrogen phosphate (E. Merck Co., Germany)

5.12 Sodium hydroxide (E. Merck Co., Germany)

6. เครื่องแก้ว

6.1 Beakers

6.2 Buret

6.3 Erlenmeyer flasks

6.4 Glass funnels

6.5 Glass rods

6.6 Measuring cylinders

6.7 Petri dishs

6.8 Pipettes

6.9 Test tubes

7. เครื่องมือ

7.1 Analytical balance Mettler H 31

7.2 Autoclave

7.3 Centrifuge

7.4 Colony counter

7.5 Hot plate

7.6 Incubator, Thermak

7.7 Lyophilizer

7.8 Magnetic stirrer

7.9 Mixer, Vortex

7.10 Oven, Thermak

7.11 Refrigerated centrifuge

7.12 Spectrophotometer, Spectronic 20

7.13 Ultracentrifuge

7.14 Water bath

8. อื่น ๆ

dialysis tubing, glass wool, กระดาษ litmus, เข็ม no.21, เข็ม no.27, syringe, สำลี

วิธีการ

1. การเตรียม Antigen

1.1 Whole cell vaccine

เลี้ยงเชื้อ P. aeruginosa ใน MacConkey agar + 3 % (V/V) glycerol (ดูบทแทรกที่ 1) นาน 3 วัน ที่ 25°C (83) เขี่ยเชื้อเก็บรวบรวมไว้ในหลอดแก้ว แล้วล้างด้วย NS 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มา dilute ด้วย NS เตรียมเชื้อให้ได้ 6 x 10^9 cells/ml แล้วเติม phenol ลงไปให้เป็น 0.5 % เก็บในตู้เย็น 4° C เมื่อจะนำไปใช้ฉีดกระต่ายให้เตรียมดังนี้

1.1.1 Monovalent whole cell vaccine ใช้ whole cell ที่เตรียมเก็บไว้มา dilute 1:3 เก็บในตู้เย็น 4° C

1.1.2 Trivalent whole cell vaccine ผสม stock suspension ของทั้ง 3 immunotype ในอัตรา 1:1:1 เก็บในตู้เย็น 4° C

1.2 Agglutinogen

นำเชื้อที่ปั่นล้างแล้วจาก 1.1 มาทำ suspension ด้วย NS ให้มีความขุ่นของเชื้อเทียบเท่ากับ McFarland tube 3 แล้วเติม phenol ลงไปให้เป็น 0.5 % เก็บในตู้เย็น 4° C

1.3 Lipopolysaccharide vaccine (84)

นำเชื้อที่ปั่นล้างเสร็จแล้วจาก 1.1 ไปทำให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 50-100 mg wet weight/ml ด้วย NS เติม 90 % phenol ซึ่งทำให้มีอุณหภูมิ 68-70° C แล้วลงไปใน suspension ของเชื้อโดยใช้ปริมาตร 1:1 นำไปอุ่นที่ 68-70° C คนให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นทิ้งให้

เย็น 40° C ในห้องปฏิบัติการ แล้วทำให้เย็นถึง 4° C ใน ice bath นำไปปั่นที่ 7,000 rpm 10 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและชั้น phenol ออกจากกัน ดูดแยกชั้นน้ำซึ่งอยู่ข้างบน ออกจากชั้นของ phenol ซึ่งอยู่ข้างล่าง วัดปริมาตรชั้นน้ำที่แยกได้ใส่ Erlenmeyer flask แล้วเติม absolute ethanol ในปริมาตรเท่ากัน เขย่าให้เข้ากันเก็บที่ 4° C นาน 1-2 ชั่วโมง จะเกิดตะกอนขึ้น ตะกอนนี้จะเป็นพวก deoxyribo และ ribo nucleic acid ของเชื้อ กรองตะกอนที่ได้ผ่าน glass wool นำ filtrate ที่กรองได้ไปเติม absolute ethanol อีก 4 เท่าตัว เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ 4° C อย่างน้อย 14 ชั่วโมง LPS จะตกตะกอน แล้วนำไปปั่นที่ 2,000 rpm 4° C 15 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นจำนวนน้อย ๆ แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 rpm 4° C นาน 15-20 นาที เอาส่วนน้ำใสไป dialyse ด้วยน้ำกลั่น ค้างคืนที่ 4° C แล้วนำไปปั่น 35,000-40,000 rpm 4° C นาน 3 ชั่วโมง ตะกอนที่ได้จะเป็น LPS ละลายด้วยน้ำกลั่นจำนวนน้อย ๆ แล้วนำไป lyophilize เก็บ LPS ที่ได้ไว้ในขวดปิดสนิท ในช่อง freeze ของตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ -10° C เมื่อจะนำไปใช้ฉีดกระต่ายให้เตรียมดังนี้

1.3.1 Monovalent LPS vaccine ให้เอา LPS ที่เก็บไว้มาละลายใน LS ให้มีความเข้มข้น 50 μg/ml เติม phenol ให้เป็น 0.5 % เก็บในตู้เย็น 4° C

1.3.2 Trivalent LPS vaccine ละลาย LPS ของแต่ละ immunotype ให้เป็น 150 μg/ml แล้วนำมาผสมกัน อัตราส่วน 1:1:1 เติม phenol ให้เป็น 0.5 % เก็บในตู้เย็น 4° C

1.4 <u>เม็ดเลือดแดงแกะเคลือบด้วย LPS (sensitized SRBC)</u>

ต้องเตรียมก่อนใช้ โดยทำดังนี้คือ

1.4.1 เตรียม Alkaline treatment of LPS

นำ LPS ที่ได้มาทำให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml เติม NaOH ลงไปให้เป็น 0.02 N NaOH นำไปอบที่ 37° C นาน 5 ชั่วโมง แล้วจึงปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย N HCl

1.4.2 เตรียม LPS coated red blood cells

ล้างเม็ดเลือดแดงแกะที่เก็บไว้ในน้ำยา Alsever ด้วย NS 3 ครั้ง เตรียมเม็ดเลือดแดงเป็น 5 % ใน NS (5 % SRBC) ผสม alkaline treated LPS (100 μg/ml) กับ 5 % SRBC ในปริมาตรที่เท่ากัน นำขวดบรรจุของผสมนี้ไปวางบนเครื่องเขย่าที่ 37° C นาน $1\frac{1}{2}$ ชั่วโมง จากนั้นปั่นล้างที่ 2500 rpm 5 นาที ด้วยน้ำเกลือเย็น 3 ครั้ง เพื่อกำจัด alkaline treated LPS ที่ไม่ได้เกาะติดที่ผิวของเม็ดเลือดแดงออก เสร็จแล้วเติม NS ลงไปจนความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่เคลือบด้วย LPS เป็น 2.5 % (2.5 % sensitized SRBC)

2. <u>การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในกระต่าย</u>

2.1 <u>วิธีฉีดกระต่าย</u>

2.1.1 <u>การฉีด whole cell vaccine</u>

2.1.1.1 Monovalent whole cell vaccine

ใช้ vaccine ฉีดเข้าเส้นเลือดดำใบหูกระต่าย immunotype ละ 2 ตัว ฉีดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ครั้งละ 1 ml. รวม 6 ครั้ง เจาะเลือดจากหูกระต่ายก่อนฉีดทุกครั้ง แล้วเอา serum กระต่ายทั้ง 2 ตัวมารวมกัน เพื่อนำไปหา titer ของ antibody ที่เกิดขึ้นในแต่ละครั้งด้วยวิธี agglutination โดยใช้ homologous antigen อย่างเดียว หลังฉีดครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ เจาะเลือดจากหัวใจกระต่ายให้ได้เลือดมากที่สุด นำ serum กระต่ายที่ฉีด type เดียวกันทั้ง 2 ตัวมารวมกันเพื่อตรวจหา titer ด้วยวิธี agglutination และ passive hemagglutination (PHA) โดยใช้ทั้ง homologous และ heterologous antigen และ serum ที่เหลือนำไปแยกเอา

immunoglobulin เพื่อใช้ทำ passive immunization ในหนูถีบจักร

2.1.1.2 Trivalent whole cell vaccine ปฏิบัติเช่นเดียวกับการฉีดกระต่ายด้วย monovalent whole cell vaccine ทุกประการ ยกเว้น vaccine ชนิดนี้จะฉีดเข้าเส้นเลือดดำในหูกระต่ายเพียง 2 ตัวเท่านั้น

2.1.2 การฉีด LPS vaccine

2.1.2.1 Monovalent LPS vaccine ปฏิบัติเช่นเดียวกับการฉีดกระต่ายด้วย monovalent whole cell vaccine ทุกประการ ยกเว้นการตรวจ titer ทั้ง 6 ครั้งด้วย homologous antigen ใช้วิธี PHA แทนวิธี agglutination

2.1.2.2 Trivalent LPS vaccine ปฏิบัติเช่นเดียวกับการฉีดกระต่ายด้วย monomalent LPS vaccine ทุกประการ ยกเว้น vaccine ชนิดนี้จะฉีดเข้าเส้นเลือดดำในหูกระต่ายเพียง 2 ตัวเท่านั้น

2.2 วิธีตรวจ titer ของ antiserum

2.2.1 Agglutination

ทำ serial twofold dilution ของ serum โดยใส่ NS 0.5 ml ลงใน test tube ขนาด 12 x 75 mm 15 tubes เติม serum ที่จะตรวจหา titer ลงไปใน tube ที่ 1 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ดูดจาก tube ที่ 1 0.5 ml ใส่ใน tube ที่ 2 เขย่าเข้ากัน และดูดจาก tube ที่ 2 ใส่ tube ที่ 3 ทำเช่นนี้ไปจนถึง tube สุดท้าย จาก tube สุดท้ายดูดทิ้งไป 0.5 ml ทำ control 1 tube ใส่ NS 0.5 ml เติม agglutinogen ลงไปในทุก tube tube ละ 0.5 ml เขย่าเข้ากัน incubate 37° C 18-24 ชั่วโมง นำมาอ่านผล โดย titer ของ serum จะเป็น dilution สูงสุดที่เกิด complete agglutination

2.2.2 Passive hemagglutination (PHA)

โดยทำ serial twofold dilution ของ serum เช่นเดียวกับวิธี agglutinationแต่ antigen ใช้ 2.5 % sensitized SRBC แทน agglutinogen โดยใส่ tube ละ 0.5 ml เขย่าเข้ากัน ทำ control 3 tubes ดังนี้คือ control sensitized SRBC ใช้ NS 0.5 ml + 2.5 % sensitized SRBC 0.5 ml, control NS ใช้ NS 0.5 ml + unsensitized SRBC 0.5ml และ control nonspecific reaction ใน antiserum ใช้ NS 0.25 ml + antiserum 0.25 ml + unsensitized SRBC 0.5 ml. นำไป incubate 37° c อ่านผล ภายใน 1-1$\frac{1}{2}$ ชั่วโมง control ทั้ง 3 tubes ต้องให้ผล negative จึง จะอ่าน titer ได้ การอ่านผลโดย titer ของ serum จะเป็น dilution สูงสุดที่เกิด complete hemagglutination

3. การเตรียม Immunoglobulin (86)

ปรับ pH ของ saturated $(NH_4)_2SO_4$ (ดูบทแทรกที่ 2) ให้ เป็น 7.8 ด้วย 2N NaOH ควรปรับ pH ก่อนที่จะนำไปใช้ทุกครั้ง เพราะถ้า ตั้งทิ้งไว้ NH_3 จะระเหยขึ้นมา ทำให้ pH เปลี่ยนแปลงค่อย ๆ หยด $(NH_4)_2SO_4$ ที่ปรับ pH แล้วลงไปใน serum ให้ได้ปริมาตรครึ่งหนึ่งของ serum โดย เขย่าสม่ำเสมอ เมื่อใส่ $(NH_4)_2SO_4$ จนหมดแล้ว เขย่าต่ออีก 2-3 ชั่วโมง ปั่นที่ 3000 rpm 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตะกอนที่ได้ในครั้งแรกจะมีทั้งส่วนของ γ-globulin และ globulins อื่น ๆ รวมทั้ง albumin อีกเล็ก น้อย ละลายตะกอนที่ได้ใน NS ให้ได้ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของ serum เริ่มต้น เพื่อแยกให้ได้เฉพาะส่วนของ γ-globulin ต้องตกตะกอนอีก 2 ครั้ง ในการตกตะกอนครั้งที่ 2 และ 3 ทำเช่นเดียวกับการตกตะกอนครั้งแรก ตะกอน ครั้งที่ 3 นำไปละลายใน PBS pH 7.4 (ดูบทแทรกที่ 2) ให้ได้ปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตร serum เริ่มต้น กำจัด $(NH_4)_2SO_4$ จากตะกอน

โดย dialyse ใน PBS pH 7.4 เป็นเวลา 3-4 วันที่ 4°C โดยเปลี่ยน PBS ทุกเช้าและเย็น dialyse จนตรวจไม่พบ $SO_4^=$ ซึ่งตรวจได้โดยใช้ dialysate ประมาณ 1-2 ml เติม 2N HCl 1 หยด แล้วเติม 10 % $BaCl_2$ (ดูบทแทรกที่ 2) 2-3 หยด ถ้ามี $SO_4^=$ อยู่จะเกิดตะกอนขุ่นขาวของ $BaSO_4$ ขึ้น เมื่อ dialyse จนหมด $SO_4^=$ แล้วนำไป lyophilizeเก็บในช่อง freeze ของตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ -10°C เวลาจะนำไปใช้ให้ชั่งน้ำหนักตามที่ต้องการแล้วละลายใน NS

4. การหา LD_{50}

เลี้ยงเชื้อ P. aeruginosa บน blood agar (ดูบทแทรกที่ 1) incubate 37°C นาน 18 ชั่วโมง เขี่ยเอาโคโลนีมาทำ suspension ใน NS ปรับความขุ่นของ suspension ของเชื้อให้ได้ OD 0.6 โดยวัดด้วย Spectrophotometer Spectronic 20 ที่ wavelength 540 nm. แล้วทำ serial tenfold dilution ใน NS จนถึง 10^{-5} นำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูถีบจักรกลุ่มละ 5 ตัว ตัวละ 0.5 ml ทำกลุ่ม control อีก 5 ตัว โดยฉีด NS แทนเชื้อ P. aeruginosa ตรวจนับจำนวนสัตว์ที่ตายภายใน 3 วัน แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า LD_{50} โดยวิธี Reed-Muench (87)

ตัวอย่างการคำนวณหาค่า LD_{50} โดยวิธี Reed-Muench

			Accumulative data			
Dose	Death	Survival	D	S	T	% Mortality
9.2×10^{24}	5	0	7	0	7	100
9.2×10^{23}	2	3	2	3	5	40
9.2×10^{22}	0	5	0	8	8	0
9.2×10^{21}	0	5	0	13	13	0

$$\text{Proportionate distance (PD)} = \frac{(\%\text{Mortality above 50\%} - 50) \times \log \text{ in dilution}}{(\%\text{Mortality above 50\%} - \%\text{Mortality below 50\%})}$$

$$= \frac{100 - 50}{100 - 40} \times \log 10$$

$$= \frac{50}{60} \times 1 = 0.8333$$

$\log LD_{50}$ = log of dilution above 50% Mortality - PD

= $\log 9.2 \times 10^{24} - 0.8333$

= $24.9638 - 0.8333$

= 24.1305

Antilog 24.1305 = 1351×10^{21}

LD_{50} = 1.4×10^{24}

การหาจำนวนเชื้อ

นำ stock suspension ของเชื้อที่เตรียม เพื่อหา LD_{50} มาทำ tenfold dilution จนถึง 10^{-26} แล้วทำ plate count จาก dilution ที่ $10^{-22} - 10^{-26}$ ใน PCA (ดูบทเตรกที่ 1) incubate 37° C 24 ชั่วโมง อ่านผล

5. การทดสอบ passive immunity

5.1 Whole cell immunoglobulin

เตรียม immunoglobulin ทั้งแบบ monovalent และ trivalent ให้มีความเข้มข้น 26, 16, 10, 4 mg/ml ใน NS แล้วนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนูถีบจักร ความเข้มข้นละ 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว โดย

ฉีดตัวละ 0.5 ml และฉีด NS แทน immunoglobulin ให้แก่หนูถีบจักร อีก 3 กลุ่ม หลังจากนั้น 3 ชั่วโมง challenge ด้วยเชื้อ P. aeruginosa 3 immunotypes โดยใช้กลุ่มละ 1 immunotype ใน 3 กลุ่มของแต่ละความเข้มข้น กลุ่ม control ก็เช่นเดียวกัน โดยใช้เชื้อจำนวน 5-7 LD_{50} เข้าช่องท้อง ตรวจนับจำนวนสัตว์ที่ตายภายใน 7 วัน คำนวณ percent protective ของ immunoglobulin ดังนี้คือ ถ้าหนูถีบจักรที่ใช้ทดลองใน 1 กลุ่มคือ 5 ตัว รอดตายทั้งหมดให้คิดเป็น 100 % protective แล้วเทียบจำนวนที่ตายในแต่ละกลุ่มว่ามี percent protective เท่าไร

5.2 LPS immunoglobulin

ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดสอบ passive immunity ของ whole cell immunoglobulin ทุกประการ ยกเว้นต้องใช้ LPS immunoglobulin ความเข้มข้น 50, 40 และ 30 mg/ml แทน