หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการเพาะเชื้อและการตรวจหา serotype

จาก nasopharyngeal secretion ที่ส่งมาตรวจยังห้องปฏิบัติการบัคเตรีภาควิชาจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 770 ตัวอย่าง ได้ผลการเพาะเชื้อเป็น *S.pneumoniae* 18 สายพันธุ์ จากสิ่งส่งตรวจ 200 ตัวอย่างและเมื่อนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้นี้ไปตรวจหา serotype โดยใช้แอนติเซรุ่มที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ *S.pneumoniae* type 1,5,6,19 และ 23 ที่ซื้อมาจาก Statens Seruminstitut ด้วยวิธี CIE พบว่าเป็น type 6 จำนวน 8 สายพันธุ์, type 19 จำนวน 2 สายพันธุ์ ส่วน type 5 และ type 23 พบอย่างละ 1 สายพันธุ์และเป็น type อื่นๆ 6 สายพันธุ์ อัตราส่วนของแต่ละ serotype ที่ตรวจพบแสดงผลด้วยกราฟวงกลม(รูปที่ 13)จะเห็นว่า serotype ที่พบมากที่สุดเรียงตามลำดับ 1 ถึง 5 คือ 6 (44.44%), 19 (11.11%), 5 และ 23 ซึ่งพบเท่ากัน (5.56%) โดยไม่พบ type 1 ส่วนที่เหลืออีก 33.3% เป็น type อื่นๆ ซึ่งไม่ได้ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้

ส่วน nasopharyngeal secretion อีก 570 ตัวอย่าง ได้ผลบวกจากการเพาะเชื้อเป็น *H.influenzae* 54 สายพันธุ์ และเมื่อรวมกับเชื้อซึ่งเพาะเลี้ยงจากหอผู้ป่วยอีก 84 สายพันธุ์ เป็นจำนวนรวมทั้งสิ้น 138 สายพันธุ์ นำมาตรวจหา serotype ด้วยวิธี SG โดยใช้แอนติเซรุ่มอ้างอิงที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ *H.influenzae* type a,b,c,d,e และ f ที่ซื้อมาจาก Wellcome พบ type b มากที่สุดคือ 70 สายพันธุ์ type a,c,d อย่างละ 1 สายพันธุ์ อัตราส่วนของแต่ละ serotype ที่ตรวจพบได้แสดงผลด้วยกราฟวงกลม (รูปที่ 14) จะเห็นว่า serotype ที่พบมากที่สุด คือ type b (51.85%) รองลงมาคือ สายพันธุ์ที่ไม่ให้ผลบวกกับแอนติเซรุ่มอ้างอิงทั้ง 6 ชนิดเรียกว่า nontypable (45.93%) ส่วน type a,c และ d พบเท่ากัน (0.74%) และไม่พบ type e และ f จากการทดลองครั้งนี้

2. ผลการเตรียมแอนติเซรุ่ม

2.1. ผลการตรวจหาการเจริญของเชื้อ *S.pneumoniae* ที่เหมาะสมในการเตรียมวัคซีน

เมื่อนำเชื้อ *S.pneumoniae* ที่เพาะเลี้ยงไว้ที่ 37 °ซ.เป็นเวลา 4, 5,6,และ 7 ชั่วโมง ไปวัดความขุ่นที่ OD_{550} (ตารางที่ 3) พบว่าที่เวลาอบ 6 ชั่วโมง มีความเข้มข้นมากที่สุดเพราะมีความขุ่นที่ OD_{550} สูงที่สุด (0.25) ในทำนองเดียวกันเมื่อนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงในเวลาต่างๆ นี้ไปนับจำนานเชื้อโดยวิธี colony counting technique พบว่าที่ความเข้มข้น 10^2 เวลาที่ใช้อบ 6 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยมากที่สุด 93 โคโลนี ซึ่งช่วยยืนยันว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S.pneumoniae* โดยอบไว้ที่ 37 °ซ. นาน 6 ชั่วโมง จะให้เชื้อปริมาณมากที่สุด และยังอยู่ในช่วงการเจริญของ exponential phase (รูปที่ 15)เหมาะสมที่จะใช้เตรียมเป็นวัคซีน

2.2. การคำนวณหาความเข้มข้นของ *S.pneumoniae* วัคซีน

เชื้อ *S.pneumoniae* และ *H.influenzae* ที่เพาะเลี้ยงไว้ที่ 37 °ซ. นาน 6 ชั่วโมง เมื่อนำมาเจือจางลงเรื่อยๆ จนกระทั่งสามารถนับจำนานเชื้อได้โดยวิธี colony counting technique พบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^2,10^3 มีจำนานโคโลนีเฉลี่ยของ *S.pneumoniae* และ *H.influenzae* 93,92 โคโลนี ตามลำดับ(ตารางที่ 4) และเมื่อคำนานกลับไปสู่ความเข้มข้นเริ่มต้นได้ผลดังต่อไปนี้

ที่ความเข้มข้น 10^2 เวลาที่ใช้อบ 6 ชั่วโมง มีจำนานเชื้อ *S.pneumoniae* 93 โคโลนี โดยความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 มล. โดยถือว่า 1 โคโลนีเทียบเท่ากับ 1 เซลล์

0.1 มล. มีจำนานเชื้อ 93 เซลล์

1 มล. "————" $\frac{93 \times 1}{0.1}$ = 93 (ประมาณ 10^3)เซลล์ต่อมล.

เมื่อเทียบกลับไปสู่ความเข้มข้นเริ่มต้น ($1x10^7$ เซลล์ต่อมล.)

ที่ความเข้มข้น 10^2 มีจำนวนเชื้อ 10^3 เซลล์ต่อมล.

"_____" 10^7 "_____" $\frac{10^3 \times 10^7}{10^2} = 10^8$ เซลล์ต่อมล.

จะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 37° ซ. นาน 6 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อประมาณเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland No.1 คือ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมล.

$$\frac{OD_1}{OD_2} = \frac{C_1}{C_2}$$

OD_1 คือ ค่า OD_{550} ของ 0.5 McFarland No.1 = 0.1

OD_2 คือ ค่า OD_{550} ของ เชื้อที่จะใช้เป็นวัคซีน

C_1 คือ ค่าความเข้มข้นของ 0.5 McFarland No.1

C_2 คือ ค่าความเข้มข้นของเชื้อที่จะใช้เป็นวัคซีน (2×10^9 เซลล์ต่อมล.)

ดังนั้น $OD_2 = \frac{0.1 \times 2 \times 10^9}{1.5 \times 10^8} = 0.8$

การเตรียมเชื้อ *S.pneumoniae* เพื่อใช้เป็นวัคซีน ควรเจือจางเชื้อด้วย Sorensen buffer solution จนกระทั่งได้ความขุ่น OD_{550} เท่ากับ 0.8 จึงจะประมาณได้ว่าในวัคซีนที่เตรียมได้นี้ มีจำนวนเชื้อ 2×10^9 เซลล์ต่อมล.ตามต้องการ

ในทำนองเดียวกัน *H.influenzae* 92 โคโลนี ที่ความเข้มข้น 10^3 ใช้เวลาอบ 6 ชั่วโมง คำนวณได้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{10} เซลล์ต่อมล. หรือมีค่า OD_{490} เท่ากับ 0.3 ซึ่งเป็นปริมาณวัคซีนที่จะใช้ฉีด

2.3. ผลการทดสอบแอนติบอดีจำเพาะ type

เมื่อฉีดกระต่ายจนครบกำหนด นำแอนติเซรุ่มที่เตรียมได้มาตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะ type โดยทดสอบปฏิกริยา Quellung กับเชื้อ *S.pneumoniae* สายพันธุ์อ้างอิง และทดสอบด้วยวิธี SG กับเชื้อ *H.influenzae* type b สายพันธุ์อ้างอิง (GB 3291) พบว่าแอนติเซรุ่มที่เตรียมได้แต่ละชนิดจะให้ผลบวกกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงที่เป็น type เดียวกัน และไม่พบผลบวกข้ามกลุ่มระหว่าง type

2.4. titer ของแอนติเซรุ่มที่เตรียมได้

แอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* ที่เตรียมได้มี titer อยู่ในช่วง 8 ถึง 16,384 โดยแอนติเซรุ่มที่มีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตของ titer สูงสุดเรียงตามลำดับ 1 ถึง 5 คือ type 5 (2435.5), type 19 (1024), type 1 และ type 23 มีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตเท่ากัน(194)และ type 6 (55) สำหรับแอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* type b ที่เตรียมได้ พบว่ามี titer ค่อนข้างสูงอยู่ในช่วง 16384 ถึง 32768 และมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตเท่ากับ 23021 (ตารางที่ 5) การทดลองครั้งนี้มีกระต่ายตายในระหว่างการฉีดวัคซีน 2 ตัว

2.5. ผลการทดสอบปฏิกริยาข้ามกลุ่มของแอนติเซรุ่ม

โดยนำแอนติเซรุ่มที่ได้มาทดสอบปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่าง type กันและเชื้อต่างชนิดกันที่พบมีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกันได้เสมอ เช่น *E.coli* และ Klebsiellae sp.ด้วยวิธี Microagglutination (ตารางที่ 6)จะเห็นว่าแอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* type 5 และ type 23 ไม่มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับ type อื่นๆ ในขณะที่แอนติเซรุ่มต่อ type 1 มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับ type 6, แอนติเซรุ่มต่อ type 6 มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับ type 1 และ type 19 และแอนติเซรุ่มต่อ type 19 มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับ type 6 และแอนติเซรุ่มต่อ type 19 จากกระต่ายเพียง 2 ใน 5 ตัวที่มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับ type 23 ส่วนปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อต่างชนิดกันนั้นพบว่าแอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* type b จากกระต่าย 2 ใน 5 ตัว มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *S.pneumoniae* type 6 และ type 19 และแอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* type 1, type 6 และ type 23 มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *E.coli* ส่วนแอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* type 5 จากกระต่าย 2 ใน 5 ตัวเท่านั้นที่มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *E.coli* และไม่พบปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับ Klebsiellae sp. ในการศึกษาครั้งนี้

3. ผลการนำแอนติเซรุ่มไปใช้เตรียมชุดทดสอบ

3.1. ผลการเตรียมชุดทดสอบ COA เพื่อตรวจหา serotype ของ *S.pneumoniae*

เมื่อนำแอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* ทั้ง 5 ชนิดมาเตรียมชุดทดสอบ COA เพื่อตรวจหาการกระจายของ serotype ต่างๆ ของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ เปรียบเทียบผลกับวิธี CIE ด้วยแอนติเซรุ่มที่ซื้อจากต่างประเทศ (ตารางที่ 7) พบว่ามีเพียง 1 ใน 18 สายพันธุ์ที่วิธี CIE พบ type 6 ในขณะที่ชุดทดสอบ COA พบ type 19 และเมื่อเปรียบเทียบเป็นค่าสถิติ(ตารางที่ 8)พบว่าความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ COA เท่ากับ 100% และ 85.7% ตามลำดับ ส่วนความถูกต้องในการทำนายผลบวกและผลลบเท่ากับ 91.6% และ 100% ตามลำดับ และชุดทดสอบ COA ที่เตรียมขึ้นเพื่อการตรวจหา serotype ของ *S.pneumoniae* มีประสิทธิภาพ 94.4%

3.2. ผลการตรวจหา type b ของ *H.influenzae* ด้วยวิธี SG

เมื่อนำเชื้อ *H.influenzae* ที่แยกได้จากการเพาะเชื้อทั้งหมด 138 สายพันธุ์ (ตารางที่ 9) มาทดสอบด้วยวิธี SG โดยใช้แอนติเซรุ่มที่เตรียมเองและที่ซื้อจากต่างประเทศ พบ type b 63 และ 70 สายพันธุ์ ตามลำดับ เมื่อเทียบค่าสถิติ(ตารางที่ 10) พบว่าความไวและความจำเพาะของวิธี SG ซึ่งใช้แอนติเซรุ่มเตรียมเองเท่ากับ 88.5% และ 98.5% ตามลำดับ ส่วนความถูกต้องในการทำนายผลบวกและผลลบเท่ากับ 98.4% และ 89.3% ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการตรวจหา type b ของ *H.influenzae* 93.4%

3.3. ผลการแยกสกัด IgG จากแอนติเซรุ่มที่เตรียมได้

จากตารางที่ 11 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบ titer ของแอนติเซรุ่มก่อนและหลังการแยกสกัด IgG พบว่าเมื่อแอนติเซรุ่มผ่านขบวนการแยกสกัด IgG ดังกล่าวมีผลทำให้ titer ลดลงโดยเฉพาะแอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* type b ลดลงจาก 16384 เหลือเพียง 512 เท่านั้น ส่วนแอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* type 1,5,6,19, 23 ลดลงเหลือ 64128,256,512 และ 64 ตามลำดับ

เมื่อนำ IgG ที่แยกสกัดได้มาเพิ่มความเข้มข้นด้วย Amicon ultrafiltration แล้วตรวจหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry โดยคำนวณปริมาณโปรตีนของ IgG จากกราฟมาตราฐาน (ตารางที่ 12)พบว่า IgG ต่อ *S.pneumoniae* type 19 มีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ 5.80 มก.ต่อมล. ส่วน IgG ต่อ *S.pneumoniae* type 23 มีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดคือ 0.68 มก.ต่อมล. และ IgG ของกระต่ายปรกติมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 2.79 มก.ต่อมล.

ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยปฏิกริยา Immunodiffusion กับแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่าย และแอนติบอดีต่อเซรุ่มของกระต่ายปรกติที่เจือจางลง 10 เท่าด้วย0.85% saline (รูปที่ 16) พบว่าทั้ง IgG ต่อ *S.pneumoniae* และ *H.influenzae* ที่เตรียมได้จากการทดลองครั้งนี้ต่างก็ให้เส้นตะกอนที่ต่อเป็นเส้นเดียวกันระหว่างแอนติบอดีต่อ IgG และเซรุ่มของกระต่ายปรกติ แสดงว่า IgG ที่แยกสกัดได้นี้เป็น IgG บริสุทธิ์

ผลการตรวจหาความเข้มข้นของ IgG ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในเตรียมชุดทดสอบ LA (ตารางที่ 13) พบว่า IgG ต่อ *S.pneumoniae* type 1, type 5, type 23 และ *H.influenzae* type b สามารถนำไปใช้เตรียมชุดทดสอบ LA ได้โดยไม่ต้องเจือจาง ส่วน IgG ต่อ *S.pneumoniae* type 6 และ type 19 สามารถเจือจางด้วย GBS pH 8.2 ลง 2 และ 4 เท่า ตามลำดับ เพื่อประหยัดแอนิเซรุ่ม โดย IgG ต่อ *S.pneumoniae* type 1,5,6,19,23 และ *H.influenzae* type b ความเข้มข้นดังกล่าวมีปริมาณโปรตีน 1.88,1.26,1.6,1.46,1.8 และ 2.60 มก.ต่อมล. ตามลำดับ ซึ่งในการเตรียมน้ำยาสำหรับชุดทดสอบควบคุมต้องใช้ IgG ที่แยกได้จากเซรุ่มกระต่ายปรกติแล้วเจือจางให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับโปรตีนของ IgG ที่ใช้เตรียมน้ำยาสำหรับชุดทดสอบ LA แต่ละชนิด

3.4. การตรวจหาความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ LA

เมื่อเตรียมชุดทดสอบ LA ได้เรียบร้อยแล้วนำมาทดสอบดูความสามารถในการตรวจหาแอนติเจนปริมาณน้อยที่สุดซึ่งคือความไวของชุดทดสอบแต่ละชุด (ตารางที่ 14)

พบว่าความไวของชุดทดสอบ LA สำหรับการตรวจหาแอนติเจนของ *S.pneumoniae* type 1, 5,6,19,23 คือ 10^8, 10^7, 10^4, 10^4 และ 10^8 เซลล์ต่อมล.ตามลำดับ ส่วนชุดทดสอบ LA สำหรับการตรวจหาแอนติเจนของ *H.influenzae* type b มีความไวเท่ากับ 10^5 เซลล์ต่อมล.

ความจำเพาะของชุดทดสอบ LA ที่เตรียมได้คือการทดสอบปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อชนิดเดียวกันและเชื้อต่างชนิดกันที่มักแยกได้จาก nasopharyngeal secretion ด้วยการเพาะเชื้อ ได้แก่ Klebsiellae sp.,Pseudomonas sp.,*Ps.aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Acinetobacter sp., *A. anitratus*, *Escherichia coli*, Proteus sp.,Neisseria sp.,L-Streptococcus, β-Streptococcus group A,B,C,G,F,และ *H.parainfluenzae* เป็นต้น ซึ่งไม่พบปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับชุดทดสอบ LA ทั้งหมดที่เตรียมได้จากการทดลองครั้งนี้ ส่วนมีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกันในระหว่างเชื้อ *S.pneumoniae* (ตารางที่ 15) ดังนี้ชุดทดสอบ LA สำหรับ *S.pneumoniae* type 5 มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับ type 1, type 19 และ type 23 และชุดทดสอบ LA สำหรับ *S.pneumoniae* type 19 ก็มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับ type 5 ด้วยเช่นกัน ส่วนชุดทดสอบ LA สำหรับ *S.pneumoniae* type 1,6,23 ไม่มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับ type อื่นเช่นเดียวกับชุดทดสอบ LA สำหรับ *H.infleunzae* type b ก็ไม่พบปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *S.pneumoniae* ทั้ง 5 type และในทางกลับกันชุดทดสอบ LA สำหรับ *S.pneumoniae* ทั้ง 5 ชุด ก็ไม่มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *H.influenzae* type b ด้วย

3.5. ผลการตรวจหาแอนติเจนของชุดทดสอบ LA ที่เตรียมได้

จาก nasopharyngeal secretion 200 ตัวอย่าง ชุดทดสอบ LA ที่เตรียมได้สามารถตรวจพบแอนติเจนของ *S.pneumoniae* type 1,5,6,19,23 ได้ 21 ตัวอย่าง โดยพบ type 6 มากที่สุด 13 ตัวอย่าง รองลงมาคือ type 5 และ type 23 พบเท่ากัน คือ 2 ตัวอย่าง ส่วน type 19 พบ 1 ตัวอย่าง และสามารถตรวจพบทั้งแอนติเจนของ type 6 และ type 19 อีก 1 ตัวอย่าง โดยไม่พบแอนติเจนของ type 1 เลย และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติเจนด้วยชุดทดสอบ LA กับการเพาะเชื้อ

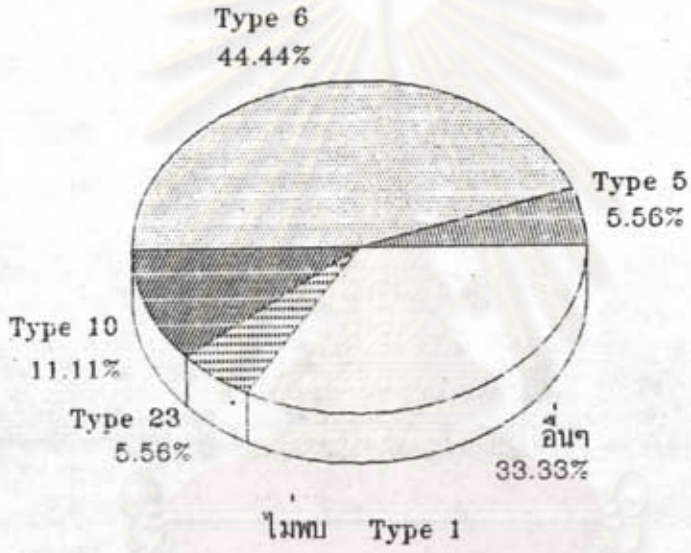
เป็นค่าสถิติ(ตารางที่ 16)พบว่าชุดทดสอบ LA มีความไวและความจำเพาะในการตรวจหาแอนติเจนของ *S.pneumoniae* เท่ากับ 66.6% และ 93.0% ตามลำดับ ส่วนความถูกต้องในการทำนายผลบวกและผลลบเท่ากับ 38.0% และ 97.7% ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพเท่ากับ 91.5%

ผลการตรวจหาแอนติเจนของ *H. influenzae* type b ใน nasopharyngeal secretion 570 ตัวอย่าง ด้วยชุดทดสอบ LA ที่เตรียมได้ (ตารางที่ 17) มีค่าสถิติเปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อดังนี้ ความไวและความจำเพาะในการตรวจหาแอนติเจนของ *H.influenzae* type b เท่ากับ 89.2% และ 91.3% ตามลำดับ ส่วนความถูกต้องในการทำนายผลบวก 41.0% และผลลบ 99.1% และชุดทดสอบ LA มีประสิทธิภาพในการตรวจหาแอนติเจนของ *H.influenzae* type b เท่ากับ 91.2%

ตารางที่ 18 เป็นการสรุปค่าสถิติเปรียบเทียบระหว่างชุดทดสอบ COA และ SG ที่เตรียมขึ้นเองกับการตรวจหา serotype โดยใช้แอนติเซรุ่มที่ซื้อจากต่างประเทศ และการตรวจหาแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจด้วยชุดทดสอบ LA กับการเพาะเชื้อ พบว่าชุดทดสอบ COA สำหรับการตรวจหา serotype ของ *S.pneumoniae* มีความไวสูงสุดคือ 100% และมีค่าสถิติอื่นๆ ที่ศึกษามากกว่า 50% ยกเว้นความถูกต้องในการทำนายผลบวกของชุดทดสอบ LA เท่านั้นที่มีค่าน้อยกว่า 50% อย่างไรก็ดีชุดทดสอบ COA ที่เตรียมขึ้นเองทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการนำไปใช้มากกว่า 90 %

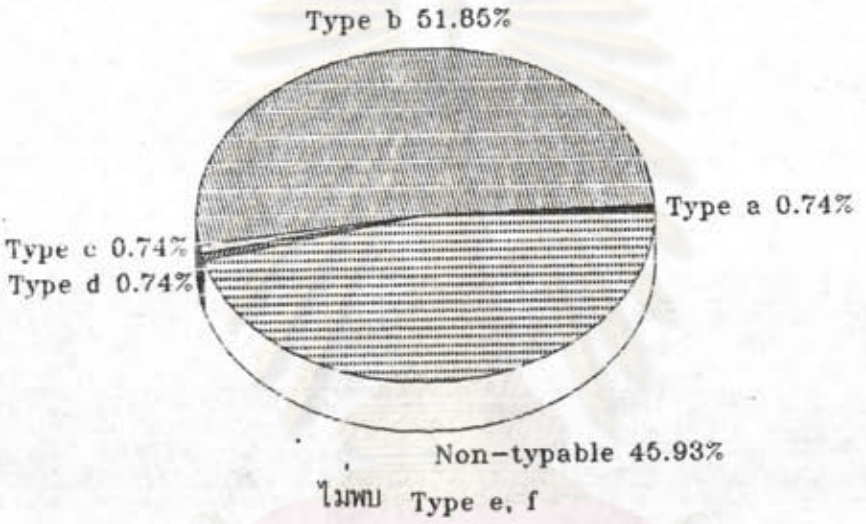
4. ผลการเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายของแอนติเซรุ่มและชุดทดสอบที่เตรียมเองกับที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด

ค่าใช้จ่ายในการเตรียมแอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* และ *H.influenzae* เท่ากับ 125 และ 184 บาทต่อมล.ตามลำดับ (ตารางที่ 19) ซึ่งถูกกว่าแอนติเซรุ่มที่ซื้อจากต่างประเทศประมาณ 16 และ 6.5 เท่า ตามลำดับ และเมื่อนำแอนติเซรุ่มไปเตรียมชุดทดสอบต่างๆ พบว่ามีราคาต่อ 1 การทดสอบถูกกว่าชุดทดสอบที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด 1.5 ถึง 5 เท่า (ตารางที่ 20)



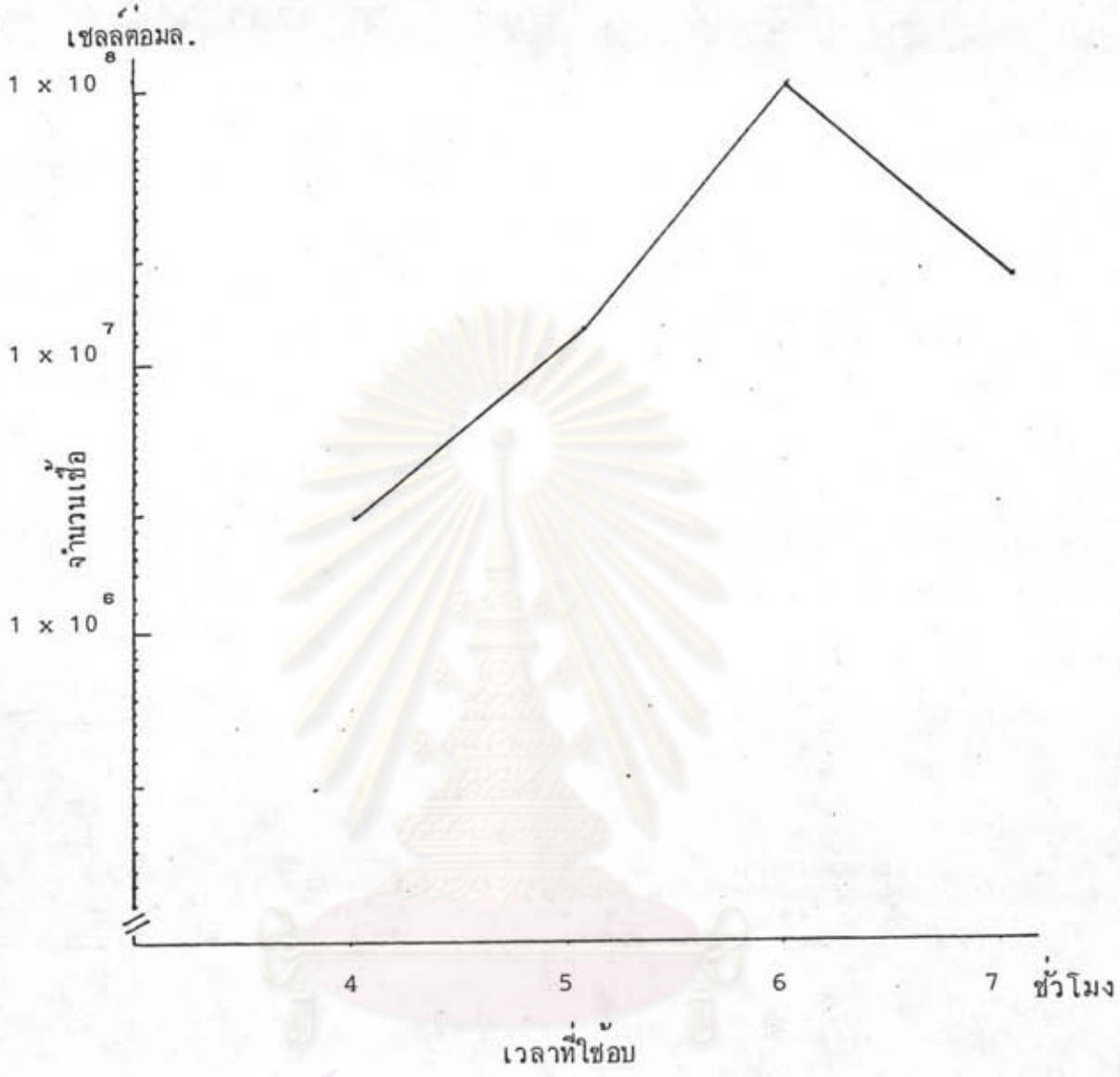
รูปที่ 13 กราฟวงกลมแสดงการกระจายของ serotype ต่างๆ ของ *S.pneumoniae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 กราฟวงกลมแสดงการกระจายของ serotype ต่างๆ ของ *H.influenzae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 กราฟแสดงช่วงการเจริญสูงสุดของเชื้อ *S.pneumoniae* (exponential phase)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลาที่ใช้อบ (ชั่วโมง)	OD_{550}	จำนวนโคโลนี			ค่าเฉลี่ย
4	0.06	8	9	4	7
5	0.18	29	31	12	24
6	0.25	100	87	95	93
7	0.22	33	16	30	26

ตารางที่ 3 ค่า OD_{550} และจำนวนเชื้อ *S.pneumoniae* อบไว้ที่เวลาต่างกัน

ชนิดของเชื้อ	ความเข้มข้น	จำนวนโคโลนี			เฉลี่ย
S.pneumoniae	10^2	100	87	95	93
H.influenzae	10^3	106	78	91	92

ตารางที่ 4 จำนวนเชื้อ *S.pneumoniae* และ *H.influenzae* ที่ความเข้มข้น 10^2 และ 10^3 โดยอบไว้ที่ 37 °ซ.นาน 6 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอนติเซรุ่มต่อ	titer	ค่าพิสัย	ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต
Pn1	512,512,256,64,64	64-512	194
Pn5	4096,8192,512,2048,-*	512-8192	2435.5
Pn6	256,32,512,16,8	8-512	55
Pn19	256,1024,256,1024,16384	256-16384	1024
Pn23	256,256,128,128,256	128-256	194
Hib	16384,16384,32768,32768 ,-*	16384-32768	23021

* กระต่ายตาย

ตารางที่ 5 การกระจายของ titer ของแอนติเซรุ่มที่เตรียมได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดของแอนติเจน	แอนติเซรุ่มต่อ					
	Pn1	Pn5	Pn6	Pn19	Pn23	Hib
ก. ชนิดเดียวกัน						
Pn 1	+	-	+	-	-	-
Pn 5	-	+	-	-	-	-
Pn 6	+	-	+	+	-	+/-*
Pn 19	-	-	+	+	-	+/-*
Pn 23	-	-	-	+/-*	+	-
Hib	-	-	+	-	-	+
ข. ต่างชนิดกัน						
E.coli	+	+/-*	+	-	+	-
Klebsiellae sp.	-	-	-	-	-	-

* ; ปฏิกริยาข้ามกลุ่มด้วยแอนติเซรุ่มจากกระต่าย 2/5 ตัว

ตารางที่ 6 ปฏิกริยาข้ามกลุ่มในเชื้อชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

S.pneumoniae serotype	จำนวนผลบวก	
	CIE (สายพันธุ์)	COA (สายพันธุ์)
1	-	-
5	1	1
6	8	7*
19	2	3*
23	1	1
อื่นๆ	6	6
รวม	18	18

* ; มี 1 สายพันธุ์ ที่ CIE ได้ type 6 และ COA ได้ type 19

ตารางที่ 7 ผลการตรวจหา serotype ของ *S. pneumoniae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี CIE และ ชุดทดสอบ COA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COA ด้วยแอนติเซรุ่มที่เตรียมเอง	CIE ด้วยแอนติเซรุ่มอ้างอิง		
	จำนวนผลบวก (สายพันธุ์)	จำนวนผลลบ (สายพันธุ์)	รวม
จำนวนผลบวก (สายพันธุ์)	11	1	12
จำนวนผลลบ (สายพันธุ์)	0	6	6
รวม	11	7	18

ตารางที่ 8 ผลเปรียบเทียบการตรวจหา serotype ของ *S.pneumoniae* ด้วยชุดทดสอบ COA และวิธี CIE

ความไวของชุดทดสอบ COA/CIE = 100 %

ความจำเพาะของชุดทดสอบ COA/CIE = 85.7 %

ความถูกต้องในการทำนายผลบวกของชุดทดสอบ COA = 91.6 %

ความถูกต้องในการทำนายผลลบของชุดทดสอบ COA = 100 %

ประสิทธิภาพของชุดทดสอบ COA = 94.4 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวนเชื้อ *H. influenzae* (สายพันธุ์)	แอนติเซรุ่มอ้างอิง							เตรียมเอง	
	a	b	c	d	e	f	nt*	b	nt-b@
54!	-	37	-	-	-	-	17	29	25
84#	1	33	1	1	-	-	48	34	50
รวม 138	1	70	1	1	-	-	65	63	75

! ; แยกเชื้อได้จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง

; แยกเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อจากหอผู้ป่วย

* nt; nontypable

@ nt-b; nontype-b

ตารางที่ 9 ผลการตรวจหา serotype ของ *H. influenzae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี SG โดยใช้แอนติเซรุ่มอ้างอิงและเตรียมเอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอนติเซรุ่มเตรียมเอง	แอนติเซรุ่มอ้างอิง		
	จำนวนผลบวก (สายพันธุ์)	จำนวนผลลบ (สายพันธุ์)	รวม
จำนวนผลบวก (สายพันธุ์)	62	1	63
จำนวนผลลบ (สายพันธุ์)	8	67	75
รวม	70	68	138

ตารางที่ 10 ผลเปรียบเทียบการตรวจหา serotype ของ *H. influenzae* โดยวิธี SG ด้วยแอนติเซรุ่มที่เตรียมเองกับแอนติเซรุ่มอ้างอิง

ความไวของวิธี SG ด้วยแอนติเซรุ่มเตรียมเอง/แอนติเซรุ่มอ้างอิง = 88.5%

ความจำเพาะของวิธี SG ด้วยแอนติเซรุ่มเตรียมเอง/แอนติเซรุ่มอ้างอิง = 98.5%

ความถูกต้องในการทำนายผลบวกของวิธี SG ด้วยแอนติเซรุ่มเตรียมเอง = 98.4%

ความถูกต้องในการทำนายผลลบของวิธี SG ด้วยแอนติเซรุ่มเตรียมเอง = 89.3%

ประสิทธิภาพของวิธี SG ด้วยแอนติเซรุ่มเตรียมเอง = 93.4%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

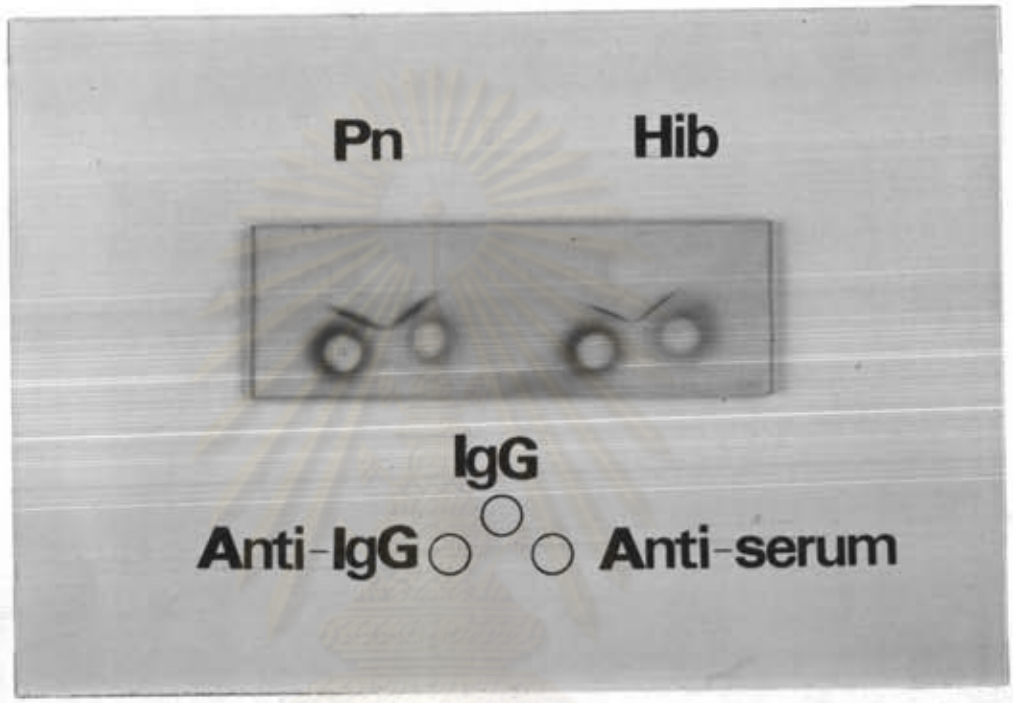
แอนติเซรุ่มต่อ	ก่อนแยกสกัด IgG	หลังแยกสกัด IgG
Pn 1	256	64
Pn 5	1024	128
Pn 6	512	256
Pn 19	2048	512
Pn 23	256	64
Hib	16384	512

ตารางที่ 11 titer ของแอนติเซรุ่มก่อนและหลังการแยกสกัด IgG

IgG ต่อ	ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อ มล.)
Pn 1	1.88
Pn 5	1.26
Pn 6	3.20
Pn 19	5.80
Pn 23	0.68
Hib	2.60
กระต่ายปรกติ	2.79

ตารางที่ 12 ปริมาณโปรตีนของ IgG หลังเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธี Lowry

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยวิธี Immunodiffusion

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IgG ต่อ	ความเข้มข้น	titer	ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบ (เซลล์ต่อมล.)
Pn 1	1:1	64	1×10^8
Pn 5	1:1	128	1×10^7
Pn 6	1:2	128	1×10^4
Pn 19	1:4	128	1×10^4
Pn 23	1:1	64	1×10^8
Hib	1:1	256	1×10^5

ตารางที่ 13 ความเข้มข้นของ IgG ที่เหมาะสมสำหรับเตรียมชุดทดสอบ LA และปริมาณเชื้อที่สามารถตรวจพบได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอนติเจน 10^n (เซลล์ต่อมล.)	ชุดทดสอบ LA สำหรับ					
	Pn1	Pn5	Pn6	Pn19	Pn23	Hib
10	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
7	-	+	+	+	-	+
6	-	-	+	+	-	+
5	-	-	+	+	-	+
4	-	-	+	+	-	-
3	-	-	-	-	-	-
ความไว (เซลล์ต่อมล.)	10^8	10^7	10^4	10^4	10^8	10^5

ตารางที่ 14 ความไวของชุดทดสอบ LA ที่เตรียมได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอนติเจน	ชุดทดสอบ LA สำหรับ					
	Pn1	Pn5	Pn6	Pn19	Pn23	Hib
Pn 1	+	+	-	-	-	-
Pn 5	-	+	-	+	-	-
Pn 6	-	-	+	+	-	-
Pn 19	-	+	-	+	-	-
Pn 23	-	+	-	-	+	-
Hib	-	-	-	-	-	+

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบปฏิกริยาข้ามกลุ่มของชุดทดสอบ LA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุดทดสอบ LA สำหรับ *S. pneumoniae*	การเพาะเชื้อ		
	จำนวนผลบวก (ตัวอย่าง)	จำนวนผลลบ (ตัวอย่าง)	รวม
จำนวนผลบวก (ตัวอย่าง)	8	13	21
จำนวนผลลบ (ตัวอย่าง)	4	175	179
รวม	12	188	200

ตารางที่ 16 ผลเปรียบเทียบการตรวจพบเชื้อ *S.pneumoniae* ด้วยชุดทดสอบ LA กับการเพาะเชื้อ

ความไวของชุดทดสอบ LA/การเพาะเชื้อ = 66.6%

ความจำเพาะของชุดทดสอบ LA/การเพาะเชื้อ = 93.0%

ความถูกต้องในการทำนายผลบวกของชุดทดสอบ LA = 38.0%

ความถูกต้องในการทำนายผลลบของชุดทดสอบ LA = 97.7%

ประสิทธิภาพของชุดทดสอบ LA = 91.5%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุดทดสอบ LA สำหรับ *H.influenzae* type b	การเพาะเชื้อ		
	จำนวนผลบวก (ตัวอย่าง)	จำนวนผลลบ (ตัวอย่าง)	รวม
จำนวนผลบวก (ตัวอย่าง)	33	46	79
จำนวนผลลบ (ตัวอย่าง)	4	487	491
รวม	37	533	570

ตารางที่ 17 ผลเปรียบเทียบการตรวจพบเชื้อ *H.influenzae* ด้วยชุดทดสอบ LA กับการเพาะเชื้อ

ความไวของชุดทดสอบ LA/การเพาะเชื้อ = 89.2%

ความจำเพาะของชุดทดสอบ LA/การเพาะเชื้อ = 91.3%

ความถูกต้องในการทำนายผลบวกของชุดทดสอบ LA = 41.0%

ความถูกต้องในการทำนายผลลบของชุดทดสอบ LA = 99.1%

ประสิทธิภาพของชุดทดสอบ LA = 91.2%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าสถิติ	*S. pneumoniae*		*H. influenzae*	
	LA/C* %	COA/CIE@ %	LA/C* %	LOCAL/COM! %
ความไว	66.6	100	89.2	88.5
ความจำเพาะ	93.0	85.7	91.3	98.5
ความถูกต้องในการทำนายผลบวก	38.0	91.6	41.0	98.4
ความถูกต้องในการทำนายผลลบ	97.7	100	99.1	89.3
ประสิทธิภาพของชุดทดสอบ	91.5	94.4	91.2	93.4

*;เปรียบเทียบชุดทดสอบ LA/การเพาะเชื้อ

@;เปรียบเทียบชุดทดสอบ COA/วิธี CIE

!;เปรียบเทียบวิธี SG ด้วยแอนติเซรุ่มเตรียมเอง/แอนติเซรุ่มอ้างอิง

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบค่าสถิติของการตรวจหา serotype และการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอนติเซรุ่มต่อ	เตรียมเอง (บาท/มล.)	อ้างอิง (บาท/มล.)
S.pneumoniae	125	2000
H.influenzae	184	1200

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในการเตรียมแอนติเซรุ่มกับราคาแอนติเซรุ่มที่ซื้อจากต่างประเทศ

ชุดทดสอบ	ราคา (บาทต่อ 1 การทดสอบ)	
	เตรียมเอง	ซื้อจากท้องตลาด
สำหรับ *S.pneumoniae*		
COA	12	60
LA	17	70
สำหรับ *H.influenzae*		
SG	34	52
LA	43	70

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบราคาของชุดทดสอบที่เตรียมเองกับที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย