การตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส
โดยวิธีการตรวจทางซีรั่มวิทยา

Indirect Hemagglutination (IHA)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในซีรั่มของสัตว์ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส ด้วยวิธี IHA นี้ ใช้วิธีทดสอบของ ศาสตราจารย์นายแพทย์เบญจะ เพชรคล้าย ที่ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Alexander และคณะ

หลักการ

การทดสอบด้วยวิธี IHA นี้ใช้แอนติเจนจากการเลี้ยงเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เคลือบบนเม็ดเลือดแดงแกะแล้วนำไปทำปฏิกิริยากับซีรั่มซึ่งถูก inactivate ที่ 56^0 c และ absorbed เอา heterophile antibody ออกแล้ว นำมาเจือจางเป็น serial dilution ดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแกะ

วัสดุอุปกรณ์และการทดสอบ

1. **เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei*** ที่ให้โคโลนีเรียบซึ่งแยกได้จากสัตว์ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส เพาะเลี้ยงเชื้อบน Blood agar ที่อุณหภูมิ 37^0 c นาน 24-48 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงใน Homma medium เพื่อเตรียมเป็นแอนติเจนต่อไป

2. **การเตรียม melioidin Ag** เตรียม Melioidin Ag จากการเลี้ยงเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ใน Homma medium ที่ 37^0c เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ แล้วนำไป autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^0c เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นที่ 1000 x G นาน 1 ชั่วโมง เพื่อแยกเอา supernate แล้วเติม phenal 0.5% โดยปริมาตร เก็บไว้ที่ 4^0c

3. **เม็ดเลือดแดงแกะ (Sheep red blood cell = SRBC)** เจาะเลือดแกะใส่ใน Alsever's solution ในอัตราส่วน 1:1 เก็บที่ 4^0c

4. **การเตรียม treated SRBC ด้วย glutaraldehyde**
   - 4.1 ล้าง SRBC 3 ครั้งด้วย NSS
   - 4.2 Suspensed SRBC ใน 0.15 M PBS pH 7.2 ในอัตราส่วน 1:9
   - 4.3 เติม 2.5% glutaraldehyde ลงใน SRBC Suspension ในอัตราส่วน 1:5 ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าบนเครื่อง rotator ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง (132 รอบ/นาที)
   - 4.4 ล้าง SRBC 3 ครั้งด้วย PBS (1500 รอบ/นาที)
   - 4.5 เตรียมเป็น 0.5%, 1% และ 5% SRBC suspension ใน PBS ที่มี 0.1% NaN_3 เก็บไว้ที่ 4^0c

5. **การเคลือบ melioidin Ag บน SRBC**

5.1 เจือจาง melioidin Ag ด้วย PBS ในอัตราส่วนที่พอเหมาะซึ่งหาได้จากการทำ block titration โดยการทดลองเคลือบ melioidin Ag ที่เจือจาง 1:2, 1:4, 1:8……..ตามลำดับ แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับซีรั่มที่ทราบว่าให้ผลบวกและผลลบ(positive and negative control) เลือกใช้ melioidin Ag ที่เจือจางสูงที่สุดที่ให้ titer สูงสุดกับซีรั่มที่ให้ผลบวกและแยกจากผลลบได้ชัดเจน ดังแสดงตามรูปที่ 1

Antibody dilution

Melioidin dilution		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:1024	Contro
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:2	A	✪	✪	✪	✪	✪	✪	◎	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
1:4	B	✪	✪	✪	✪	✪	✪	◎	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
1:8	C	✪	✪	✪	✪	✪	✪	◎	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
1:16	D	✪	✪	✪	✪	✪	✪	◎	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
1:32	E	✪	✪	✪	✪	✪	✪	✪		⊙	⊙	⊙	⊙
	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

5.2 ผสม 1% SRBC treated Glutaraldehyde ใน PBS กับ Melioidin Ag ที่เจือจางพอเหมาะใน PBS ในอัตราส่วน 1:1

5.3 Incubate ที่ 37^0c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (เขย่า)

5.4 ปั่นล้าง SRBC ที่เคลือบ melioidin แล้ว 3 ครั้งด้วย PBS (1,500 รอบ/ นาที)

5.5 นำ packed SRBC มาเตรียมเป็น 0.5% SRBC coated melioidin ใน PBS เก็บที่ 4^0c

6. **การเก็บตัวอย่างเลือด** เจาะเลือดจากผู้ป่วยจำนวน 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว แล้วนำไปปั่นแยกซีรั่มและเก็บไว้ที่ -20^0c จนกว่าจะนำมาทำการตรวจหาระดับแอนติบอดี

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ IHA

1. Microplate (U shape) 96 well
2. Autopipett 50 µl
3. Autopipett 500 µl
4. Multisteper 50 µl
5. Microdilutor 50 µl
6. Test tube
7. Water bath
8. Centrifuge

น้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ

1. Diluent : 0.15 M PBS pH 7.2 ที่มี 0.5% BSA และ 0.1% NaN_3
2. 5% SRBC treated glutaraldehyde
3. 0.5% SRBC treated glutaraldehyde
4. 0.5% SRBC coated melioidin Ag
5. Positive และ Negative control serum

วิธีการทดสอบแบบ IHA

1. ใส่ซีรั่ม 0.05 ml (50 µl) ในหลอดทดสอบขนาด 12x75 ml แล้วนำหลอดทดสอบไปใส่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 56^0c นาน 30 นาที
2. ใส่ 5 % SRBC 0.45 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 2000 rmp นาน 5 นาที แยกเอา supernate
3. นำ absorb serum มาเจือจางเป็น two-fold serial dilution ใน microplate โดยหยดdiluent 50 µl ลงตั้งแต่หลุมที่ 2 จนถึงหลุมที่ 11 ของทุกแถว และใส่ absorb serum 50 µl ลงในหลุมที่ 1, 2 และ 12 ของทุกแถว ดัง diagram ในรูปที่ 2
4. ใส่ 0.5% SRBC coated melioidin 50 µl ลงทุกหลุมยกเว้นหลุมที่ 12
5. ใส่ 0.5% SRBC treated glutaraldehyde 50 µl ลงในหลุมที่ 12 ของทุกแถว
6. เขย่า micro plate เพื่อผสมให้สารเข้ากัน ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วจึงอ่านผล ในการทดสอบ ต้องทำ control positive serum และ control negative serum ควบคู่กันไปด้วย

การอ่านผล

อ่านผลหลุมสุดท้ายที่มีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) ชัดเจน เป็น titer ของแต่ละซีรั่มทดสอบ และต้องดูว่าหลุมสุดท้าย (หลุม 12) ของแต่ละแถวซึ่งเป็นหลุม control ว่าไม่มีการรบกวนจาก heterophile antibody นั้น ไม่มีการกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง รวมทั้งค่า titer ของ control positive และ control negative จะต้องเท่ากันทุกครั้งที่ทำการทดสอบ

Reagen(µl) Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Diluent	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	-
2. Absorbed serum	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	-	50
3. 0.5% SRBC coated melioid	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	-
4. 0.5% SRBC treated glutaral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10	1:10

Discard