บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

กระต่ายสีขาวพันธุ์ New Zealand ไม่จำกัดเพศ อายุระหว่าง 2-4 เดือน น้ำหนัก 2.5-3 กิโลกรัม ใช้กระต่าย 2 ตัว ต่อการเตรียมแอนติซีรั่ม 1 ชนิด ก่อนที่จะนำไปใช้ เจาะเลือดกระต่ายตัวละประมาณ 30 มล. เพื่อทดสอบว่าไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อที่ศึกษา และใช้เป็นซีรั่มควบคุมในการทดลองหาซีโรทัยป์

2. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

Lyophilized *U.urealyticum* serotype 1 ถึง 9 จาก Statens Seruminstitut, Compenhagen, Denmark

018356

3. กลุ่มศึกษา

ผู้ป่วยชาย อายุระหว่าง 17-50 ปี จำนวน 300 ราย โดยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค NGU หรือ GU หรือไม่ได้เป็นทั้ง NGU และ GU แต่มารับการรักษาด้วยอาการอื่น เช่น เป็นแผลบริเวณภายนอกอวัยวะสืบพันธุ์, ซิฟิลิส และอื่นๆ กลุ่มละ 100 ราย ซึ่งเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และศูนย์กามโรคราชดำริระหว่าง เดือนมิถุนายน 2530 ถึง ธันวาคม 2531

ผู้ป่วยโรค NGU[31]: ผู้ป่วยมีอาการปวดขัดในท่อปัสสาวะ มีหนองไหล ตรวจวินิจฉัยด้วยการ smear หนอง ย้อม gram stain ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเม็ดเลือดขาวมากกว่า 10 cells/field (X1000) ไม่พบ gonococci และยีสต์ และ จากการทำ wet preparation จากหนองของผู้ป่วย ไม่พบ *T.vaginalis*

ผู้ป่วยโรค GU : ผู้ป่วยมีอาการปวดขัดท่อปัสสาวะ และมีหนองไหลตรวจวินิจฉัยด้วยการ smear หนองย้อม gram stain พบแบคทีเรียรูปกลมอยู่เป็นคู่ติดสีแกรมลบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *N.gonorrhoeae* และตรวจพิสูจน์โดยการเพาะเชื้อขึ้นบน Thayer-Martin medium

ผู้ป่วย Non urethritis : ผู้ป่วยไม่มีอาการอักเสบในท่อปัสสาวะ ไม่มีหนอง แต่มีแผลบริเวณภายนอกอวัยวะสืบพันธุ์ เป็นเนื้องอก หรือ ซิฟิลิส เมื่อ smear ดูไม่พบเม็ดเลือดขาว *T.vaginalis* และ *N. gonorrhoeae*

4. สิ่งส่งตรวจ

Urethral swab จากผู้ป่วยชายที่เป็นโรค NGU, GU และ Non urethritis

5. เครื่องมืออาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำยาและสารเคมี
(ดูรายละเอียดอยู่ในภาคผนวก)

วิธีการ

1. วิธีเก็บตัวอย่าง[31]

ใช้ Nasopharyngeal swab สอดเข้าไปในท่อปัสสาวะของผู้ป่วยลึกประมาณ 1-2 ซม. ป้าย swab ลงบน slide เพื่อย้อม gram stain และทำ wet preparation ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. วิธีการเพาะ และพิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย[49,50,51]

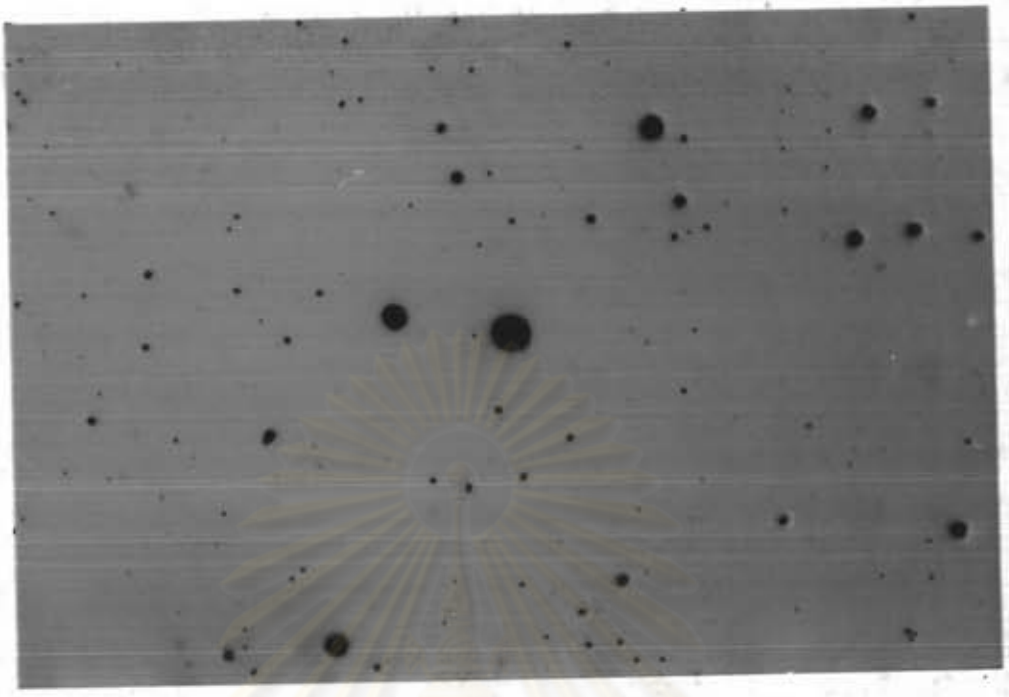
ป้ายตัวอย่างจาก swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ A7B agar และใส่ใน U9 broth นำไปอบที่อุณหภูมิ 37°ซ ใน candle jar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

U.urealyticum เป็นแบคทีเรียที่ให้โคโลนีบนอาหารแข็งมีขนาดเล็กมาก ต้องส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (x40) จึงจะมองเห็นโคโลนีค่อนข้างกลมแต่ขอบไม่เรียบ บริเวณตรงกลางจะฝังลึกลงไปในอาหารแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ และมีสีน้ำตาลเข้ม เนื่องจากปฏิกิริยาของ Urea-mangnese reagent ทำให้เกิดตะกอนสีน้ำตาลเข้มของ Manganese dioxide บนโคโลนีของ *U.urealyticum* (รูปที่ 1) ซึ่งแตกต่างจาก *Mycoplasmas* (รูปที่ 2) โดย *Mycoplasmas* จะไม่ให้โคโลนีสีน้ำตาลเข้มบน A7B agar มีลักษณะเป็นรูปไข่ดาวชัดเจน และขนาดใหญ่กว่า *U. urealyticum* (รูปที่ 3)

วิธีการเพื่อตรวจยืนยันว่าเป็น *U.urealyticum* จริงทำโดย นำเชื้อที่เพาะได้บน A7B agar ใส่ใน U9 broth เพื่อดูการ hydrolyze urea ซึ่งจะทำให้เกิดแอมโมเนีย เป็นเหตุให้สีของ U9 broth เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มอ่อน เนื่องจากมีสภาวะเป็นด่างสูงขึ้น pH จะเพิ่มขึ้นจากเดิม pH 6.0 เป็น pH 8 หรือ 9 U9 broth ที่มี *U.urealyticum* เจริญอยู่จะมีลักษณะใส ไม่ขุ่นเหมือนการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไป (รูปที่ 4)

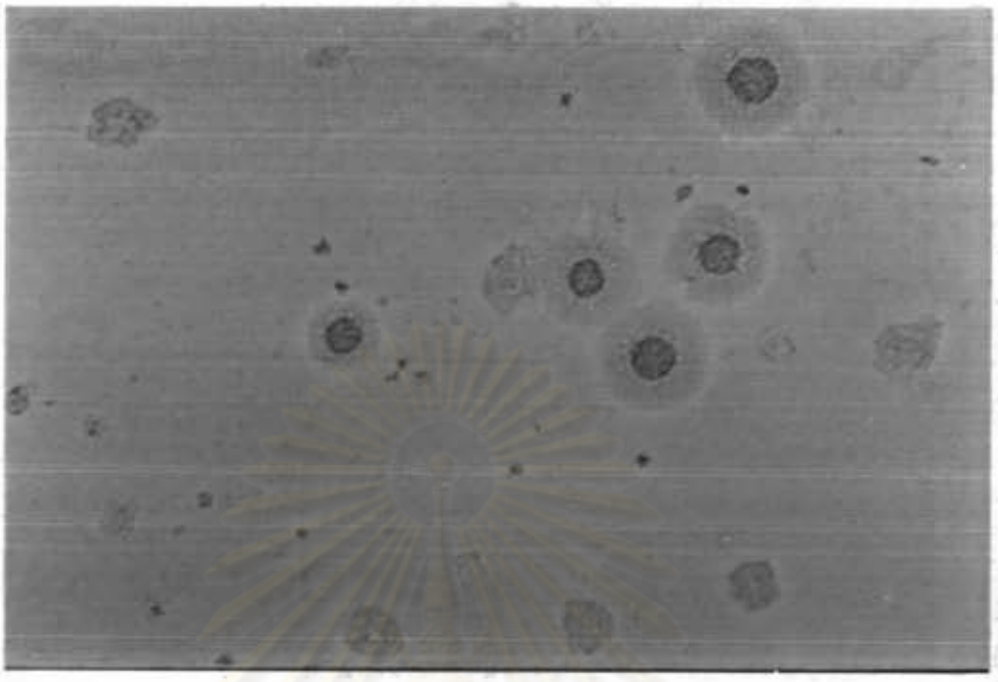
สำหรับตัวอย่างที่ใส่ใน U9 broth เมื่ออบได้เวลาแล้วอ่านผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มอ่อน แสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ *U.urealyticum* ทดสอบอีกครั้งด้วยการเพาะเชื้อจาก U9 broth ลงบน A7B agar อบที่ 37°ซ ใน candle jar, 24-48 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจดูลักษณะโคโลนีที่เพาะขึ้นได้

เพาะเชื้อ *U.urealyticum* ที่ได้ใน U10B[33] อบที่ 37°ซ, 24-48 ชั่วโมง เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มอ่อน จึงนำเชื้อไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ เพื่อใช้หาชีโรทัยป์ และทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ



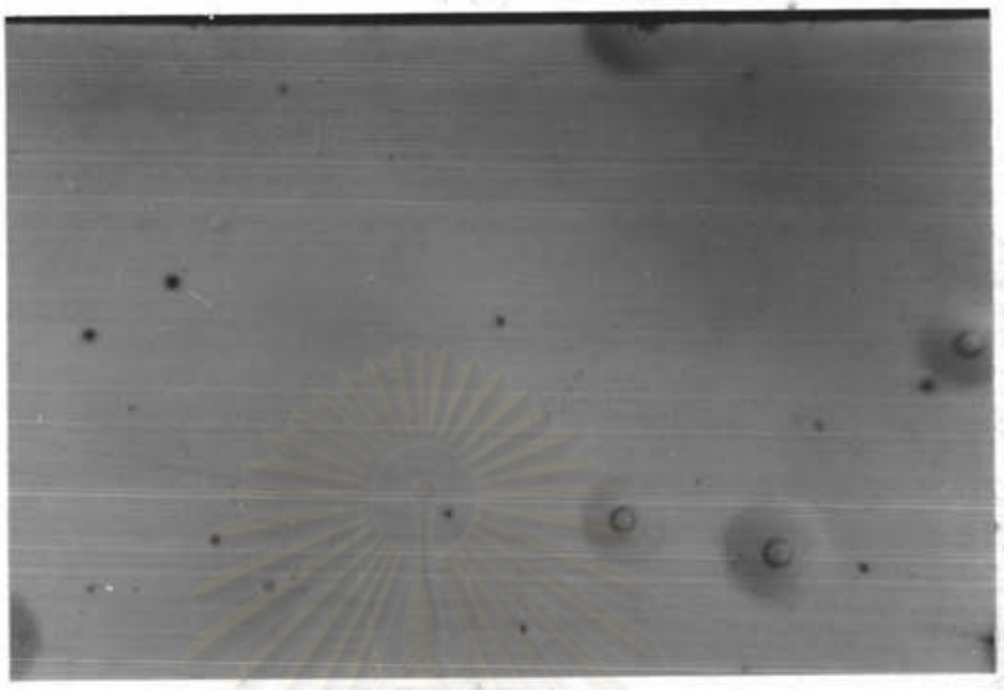
รูปที่ 1 ภาพโคโลนีของ *U.urealyticum* บน A7B agar (X40)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



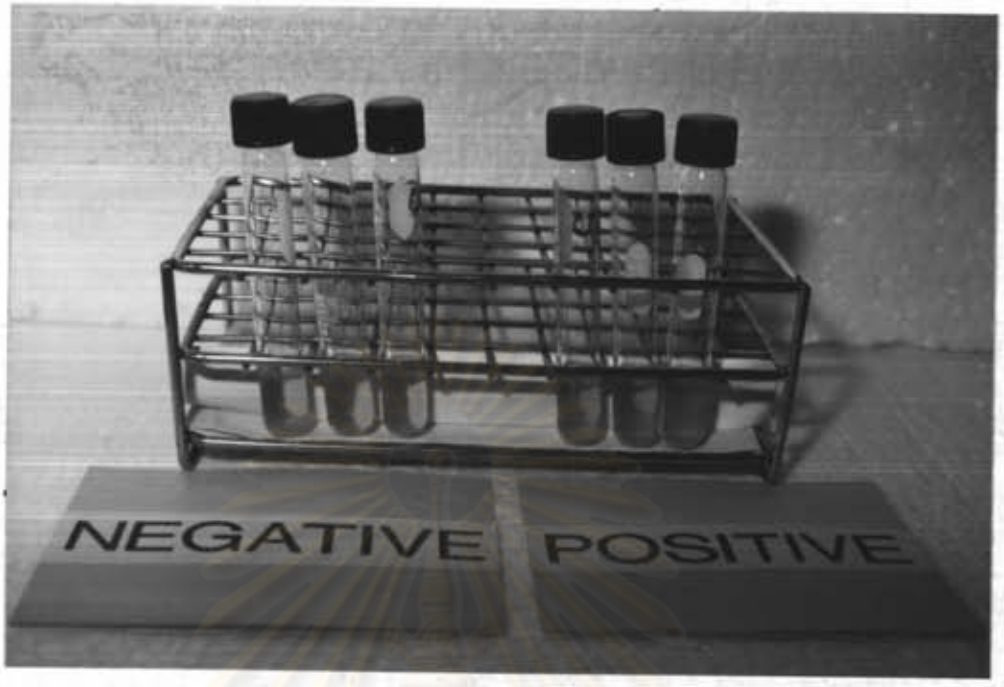
รูปที่ 2 ภาพโคโลนีของ *M.hominis* บน A7B agar (X40)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ภาพโคโลนีของ *U. urealyticum* ขึ้นปนกับ *Mycoplasma* บน A7B agar (X40)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ปฏิกริยาการสลาย urea ใน U9 broth ผลบวกจะเปลี่ยนสี indicator จากเหลืองเป็นส้มอ่อน (ใส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การเตรียมแอนติซีรั่มต่อเชื้ออ้างอิง

3.1 การเตรียมแอนติเจน ใช้วิธีของ Shepard[33] (1978) เพาะเชื้ออ้างอิงซีโรทัยป์ 1 ถึง 9 สายพันธุ์ๆ ละ 3 ลิตร ใน U9 broth อบไว้ที่ 37°ซ ประมาณ 24-48 ชั่วโมง หรือเมื่อสังเกตจน U9 broth เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มอ่อน นำมาปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 40 นาที ด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge, Tomy Seiko, ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วย PBS pH7.2 ปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 25 นาที ละลายตะกอนด้วย PBS pH 7.2 ให้ได้ปริมาตร 3 มล. นำไป Sonicate เป็นเวลา 1 นาทีด้วย Sonicator (Heat system ultrasonic processor) จากนั้นเจือจาง Sonicated antigen ด้วย PBS pH 7.2 วัดให้ได้ความขุ่น 50% T ที่ 450 นาโนมิเตอร์ แบ่งใส่ขวดเก็บไว้ที่ -70°ซ เพื่อใช้ในการเตรียมแอนติซีรั่ม

3.2 การเตรียมแอนติซีรั่มใช้วิธีของ Shepard[33] (1978) โดยนำกระต่ายสีขาวพันธุ์ New-Zealand ไม่จำกัดเพศ น้ำหนัก 2.5-3 กิโลกรัม จำนวน 2 ตัวต่อเชื้ออ้างอิง 1 สายพันธุ์ นำมาฉีดด้วยแอนติเจนที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1 ตามตารางการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่าย (ตารางที่ 2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่2 ตารางการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่าย เพื่อเตรียมแอนติซีรั่มต่อเชื้อ อ้างอิง *U.urealyticum* ซีโรทัยป์ 1 ถึง 9

วันที่	ขั้นตอน
0	เจาะเลือดกระต่ายก่อนฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จำนวน 30 มล.
1	เตรียมแอนติเจนจำนวน 5 มล. โดยผสมกับ complete Freund adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ฉีดเข้าหลังคอ 1 มล. สะโพกข้างละ 0.5 มล. ฉีดเข้าช่องท้องข้างละ 1 มล. ฝาเท้าทั้ง 4 ข้างละ 0.25 มล.
4	ฉีดแอนติเจน 1 มล. เข้าเส้นเลือดดำ, ไม่ผสม adjuvant
5	ฉีดแอนติเจน 2 มล. เข้าเส้นเลือดดำ, ไม่ผสม adjuvant
6	ฉีดแอนติเจน 3 มล. เข้าเส้นเลือดดำ, ไม่ผสม adjuvant
7	ฉีดแอนติเจน 3 มล. เข้าเส้นเลือดดำ, ไม่ผสม adjuvant
8	ฉีดแอนติเจน 4 มล. เข้าเส้นเลือดดำ, ไม่ผสม adjuvant
11	ฉีดแอนติเจน 4 มล. เข้าเส้นเลือดดำ, ไม่ผสม adjuvant
13	ฉีดแอนติเจน 4 มล. เข้าเส้นเลือดดำ, ไม่ผสม adjuvant
25	เจาะเลือดนำซีรั่มไปหาแอนติบอดีไตเตอร์

เมื่อครบเวลาตามตารางการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้ว เจาะเลือดปั่นแยกซีรั่ม แล้วนำไปทดสอบหาแอนติบอดีจำเพาะชนิด และไตเตอร์ของแอนติบอดี กรณีที่ไตเตอร์ไม่สูงพอให้ฉีดต่อด้วยแอนติเจนปริมาณ 4 มล. เข้าเส้นเลือดดำ อีก 1 สัปดาห์ เมื่อได้ไตเตอร์ตามต้องการแล้วจึงเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ หรือจากหัวใจกระต่าย ให้ได้มากที่สุด ปั่นแยกซีรั่ม เก็บไว้ที่ -20°ซ.

4. การทดสอบหาไตเตอร์ของแอนติซีรั่ม

ทดสอบด้วยวิธี MI ตามวิธีของ Robertson และคณะ[88] (1979)

แอนติเจนที่ใช้คือ *U.urealyticum* ซีโรทัยป์ 1 ถึง 9 ที่มีปริมาณ 100 CCU (CCU คือ dilution สุดท้ายของเชื้อที่เปลี่ยนสี indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อ)[81]

แอนติบอดีที่ใช้ คือแอนติซีรั่มต่อ *U.urealyticum* ทั้ง 9 ซีโรทัยป์ ซึ่งนำมา inactivate ที่ 56°ซ, 30 นาที ก่อนนำมาใช้

วิธีทำ

1. ใส่ B-broth 25 ul ลงในหลุมที่ 2-15 ใน microtiter plate
2. ใส่ 25 ul ของแอนติซีรั่มที่เจือจางเป็น 1 : 10 แล้วลงในหลุมที่ 1 และ 2
3. เจือจางแอนติซีรั่มเป็น 2-fold dilution จากหลุมที่ 2 จนถึงหลุมที่ 13
4. ใส่แอนติเจน 25 ul ทุกหลุมยกเว้นหลุมที่ 15
5. ใส่ B-broth + 10% ซีรั่มหนูตะเภา 15 ul ทุกหลุมดังภาพ
6. อบ microtiter plate ที่ 37°ซ, 18-24 ชั่วโมง หรืออ่านผลเมื่อสีของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมควบคุมที่ใส่แอนติเจนกับ B-broth เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียว

ผลบวกควบคุม คือ หลุมที่ใส่แอนติเจนกับ B-broth
ผลลบควบคุม คือ หลุมที่ใส่ B-broth เพียงอย่างเดียว

น้ำยาที่ใช้	หลุมที่ 1	2	3	4	5	6	7	8	14	15
B-broth		<----------25 ul---------->							25ul	25ul
แอนติบอดี	25 ul	25 ul							-	-
แอนติเจน	<----------25 ul---------->								25ul	-
B-broth+ 10% ซีรั่ม หนูตะเภา	<----------150 ul---------->								150ul	150ul
ความเข้มข้น	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	+ve	-ve

+ve : ผลบวกควบคุม

-ve : ผลลบควบคุม

การอ่านผล

ผลบวก : มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากเหลืองเป็นเขียว

ผลลบ : ไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากเหลืองเป็นสีเขียว

การแปลผล

ไตเตอร์ของแอนติบอดี คือ ความเข้มข้นสูงสุดที่ให้ผลลบในหลุมทดสอบ เมื่อหลุมผลบวกควบคุมให้ผลบวกด้วย

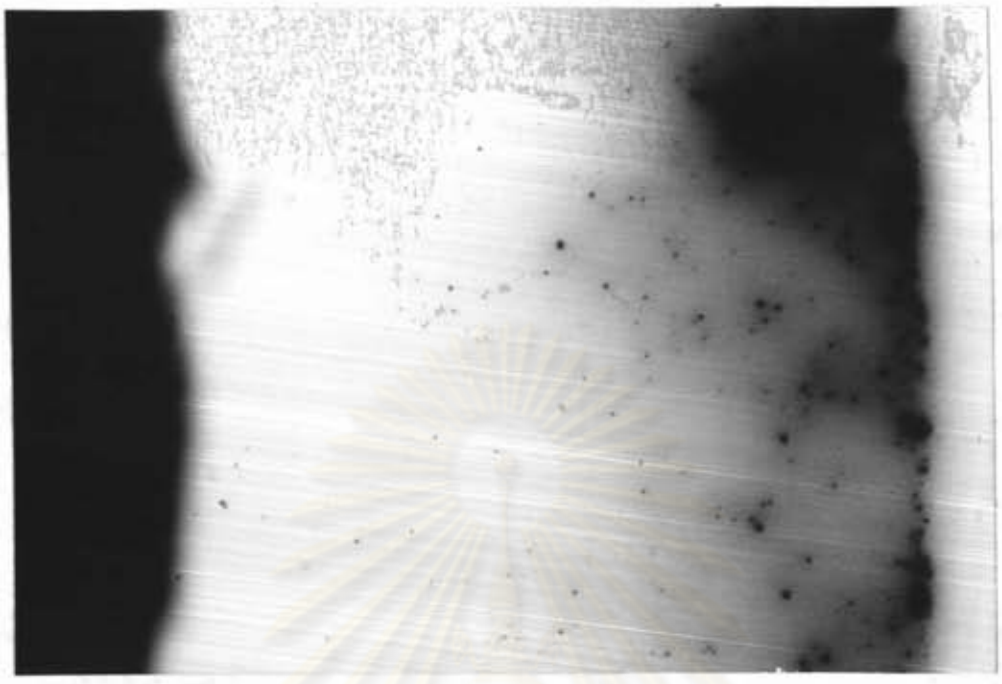
5. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่ม

ทดสอบโดยวิธี GI ตามวิธีของ Black[32] (1973) ใช้เชื้ออ้างอิง *U.urealyticum* ทั้ง 9 serotype เตรียมเชื้อให้ได้ปริมาณ 10^{4}-10^{5} CFU/ml หยดเชื้อ 0.01 มล. ลงบน A7B agar ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง วางกระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 มม. ที่ชุบแอนติซีรั่มที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.025 มล. ลงบน A7B agar ที่หยดเชื้อแห้งแล้วนำไปอบที่ 37°ซ ใน candle jar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจดูผลด้วยตาเปล่าหรือดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (X40)

การอ่านผล

ผลบวก : จะเห็น zone ใสเกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกรองที่ชุบแอนติซีรั่มไว้ ซึ่งแสดงว่ามีการยับยั้งการเจริญของเชื้อ วัดขนาดของ zone ที่เกิดขึ้นจากขอบกระดาษกรองจนถึงบริเวณที่มีการเจริญของเชื้อ inhibition zone ควรมีขนาด $\geq$ 0.5 มม. (รูปที่ 5)

ผลลบ : จะไม่เห็น zone ใสเกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกรอง แต่จะมีเชื้อขึ้นได้โดยรอบ (รูปที่ 6)



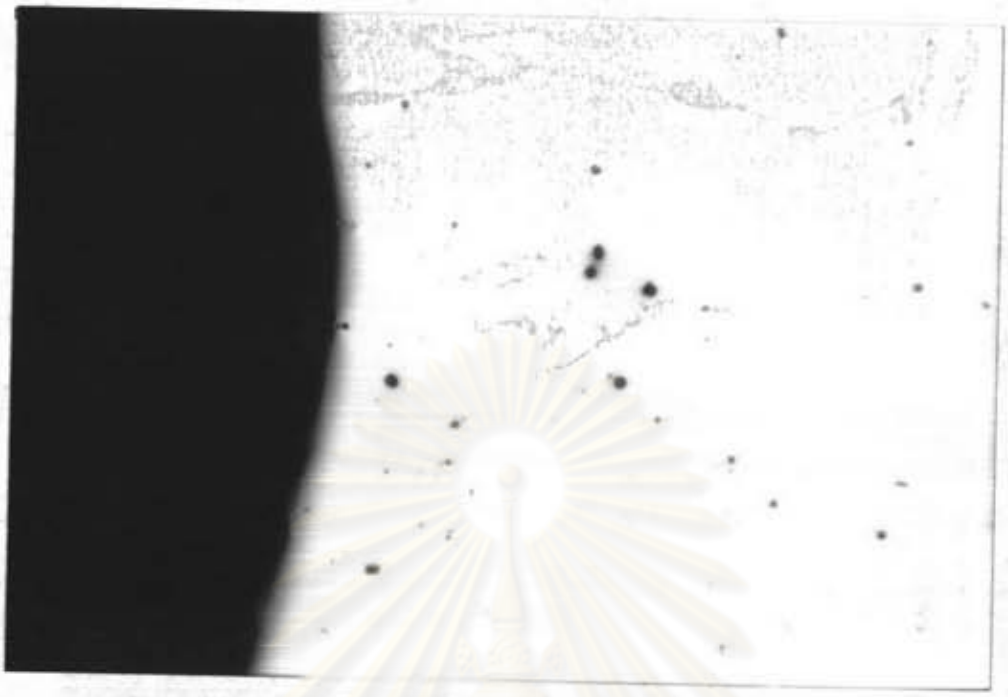
กระดาษชุบ
แอนติซีรั่ม

inhibition zone

U.urealyticum

รูปที่ 5 ภาพแสดงการหาซีโรทัยป์ของเชื้อ *U.urealyticum* โดยวิธี GI จากภาพให้ผลบวกต่อซีโรทัยป์ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 ภาพแสดงการหาซีโรทัยป์ให้ผลบวกต่อซีโรทัยป์ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อชนิดอื่น

น่าแอนติซีรั่มที่เตรียมได้ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับ *U. urealyticum* อ้างอิง ซึ่งเป็นซีโรทัยป์ที่ต่างกันกับแอนติซีรั่ม และเชื้อ *M.hominis, M.pneumoniae* สำหรับในกลุ่ม *U.urealyticum* ด้วยกัน มีรายงานว่าพบมีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกันได้[32,82] มีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกันระหว่างแอนติซีรั่มต่อซีโรทัยป์ 2 กับ *U.urealyticum* ซีโรทัยป์ 5 แต่ไม่มีรายงานว่ามีปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น

7. การทดสอบหาซีโรทัยป์ของ *U.urealyticum* ที่แยกได้จากกลุ่มศึกษา

ทดสอบโดยวิธี GI ของ Black [32] (1973)

วิธีทำ

7.1 เตรียมกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ชุบด้วยแอนติซีรั่มปริมาณ 0.025 มล. โดยนำกระดาษกรองไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ, 15 ปอนด์, 15 นาที อบให้แห้ง แล้วจึงนำมาชุบแอนติซีรั่ม จากนั้นนำไปอบที่ 37°ซ. จนกระดาษกรองแห้งเก็บใส่ขวดปิดฝาให้แน่นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ. จนกว่าจะใช้

7.2 เตรียมเชื้อ *U.urealyticum* ที่แยกได้จากตัวอย่างให้มีปริมาณ 10^4-10^5 CFU/ml แล้วจึงนำไปทดสอบหาซีโรทัยป์ด้วยวิธี GI เช่นเดียวกับข้อ 5

8. การทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อ *U.urealyticum*

ใช้วิธี Tube dilution method (macro method) ตามวิธีของ Robertson และคณะ[83] (1981) ยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบ คือ ด๊อกซิซัยคลิน, อีริธ์โธรมัยซิน, มิโนซัยคลิน และเตตราซัยคลิน

8.1 เตรียม stock ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบให้ได้ความเข้มข้น 1280 ไมโครกรัม/มล. โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{น้ำหนักยาแต่ละชนิด (g)} = \frac{1280 \times \text{ปริมาตรที่ต้องการ}}{\text{potency ของยาชนิดนั้น}}$$

เก็บ stock ยาต้านจุลชีพไว้ที่ -20° ซ จนกว่าจะใช้ในการทดสอบ

8.2 การเตรียม *U.urealyticum* เตรียมเชื้อที่ต้องการทดสอบให้ได้เชื้อ 1 CCU โดยทำ ten-fold dilution 10 หลอด ใน B-broth นำไปอบที่ 37°ซ, 18-24 ชั่วโมง หลอดที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเปลี่ยนสี B-broth จากเหลืองเป็นเขียวคือเชื้อ 1 CCU ที่ต้องการใช้ในการทดสอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีทำ

1. เตรียม antibiotic solution ความเข้มข้นตั้งแต่ 256-0.125 ug/ml จาก stock solution 1280 ug/ml นำมา dilute ด้วย B-broth ในอัตราส่วน 1 : 4 จะได้ antibiotic solution 256 ug/ml แล้วทำ two-fold dilution 12 หลอด ใน B-broth ที่มีปริมาตร 2 มล. และหลอดที่ 13 เป็นหลอดควบคุมโดยใส่ B-broth เพียงอย่างเดียวไม่ใส่ยาต้านจุลชีพ

2. ใส่ *U.urealyticum* 1 CCU ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ในทุกความเข้มข้น ของยาต้านสารจุลชีพและหลอดควบคุมด้วย ผสมให้เข้ากัน อบที่ 37°ซ อ่านผล MIC ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

การอ่านผล

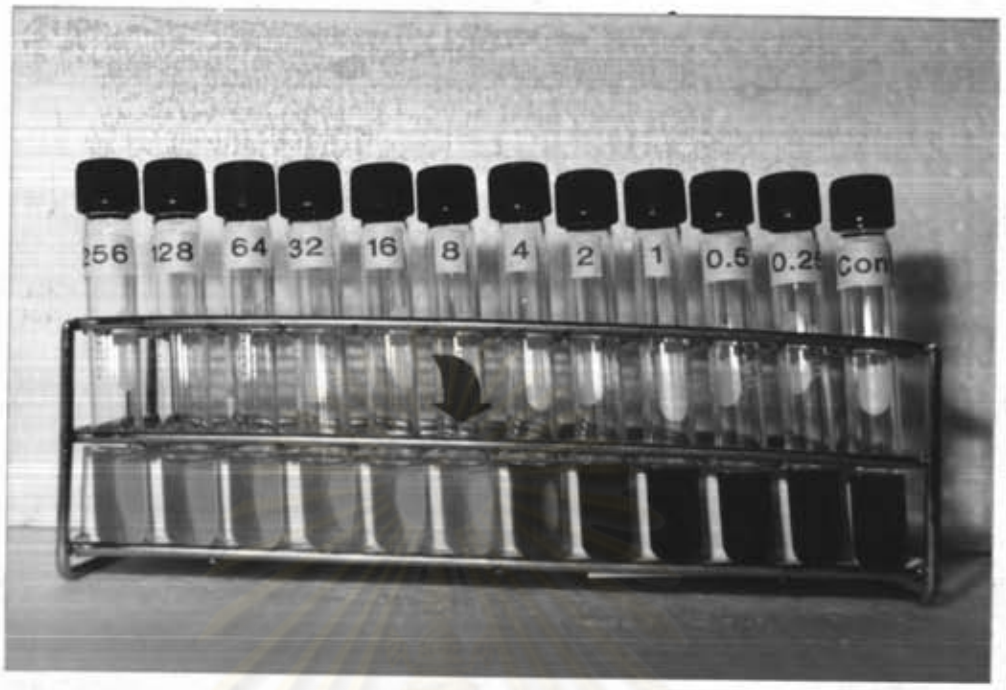
ค่า MIC ของเชื้อคือค่าที่หลอดซึ่งมีความเข้มข้นสูงสุดที่ยังคงเป็นสีเหลืองอยู่ (รูปที่ 7)

9. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การพบ *U.urealyticum* ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 3 กลุ่ม

2. เปรียบเทียบปริมาณเชื้อ *U.urealyticum* ที่พบในกลุ่ม NGU, GU และ Non urethritis โดยใช้การทดสอบ Chi-square เพื่อดูว่าปริมาณเชื้อที่พบมีความแตกต่างกันหรือไม่

3. ทดสอบความสัมพันธ์ของ *U.urealtyicum* แต่ละซีโรทัยป์ในกลุ่ม NGU, GU และ Non urethritis โดยใช้การทดสอบ Fisher's exact test เพื่อดูว่าซีโรทัยป์ใดมีบทบาทในการก่อให้เกิดโรค NGU มากที่สุด



รูปที่ 7 ภาพแสดงการอ่านผลค่า MIC จากภาพค่า MIC เท่ากับ 8 ug/ml

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย