

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

ชุดตรวจวินิจฉัยโรค Pythiosis โดยวิธี Hemagglutination

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

- 5 สาขาวิชาอิมมูโนวิทยาในส่วนที่เกี่ยวข้องกับชุดตรวจวินิจฉัยโรค Pythiosis โดยวิธี Hemagglutination

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับสิ่งประดิษฐ์

โรค Pythiosis เป็นโรคติดเชื้อชนิดพรีเรียน อินซิดิโอสัม (*Pythium insidiosum*) หรือที่เรียกว่า เชื้อรา น้ำ พบมากในแหล่งน้ำทางการเกษตร ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคในสัตว์จำพวกม้า สุนัข และแมว และ
10 มีรายงานพบการติดเชื้อในมนุษย์ ส่วนใหญ่พบติดเชื้อในหลอดเลือดแดงบริเวณขา รอบดวงตา แต่มี อาการแตกต่างกัน หากติดเชื้อบริเวณขา จะเกิดการอุดตันบริเวณเส้นเลือดแดง ทำให้เลือดไม่ไปเลี้ยง บริเวณขา หากรักษาไม่ทันจำเป็นต้องตัดขาทิ้ง ขณะที่การติดเชื้อบริเวณดวงตาจะเกิดแผลที่กระจกตา ลักษณะคล้ายคือ หากรักษาไม่ทันแผลจะลุกลามและตาบอดได้และพบว่าส่วนใหญ่เป็นชาวนาที่ต้อง
ทำงานในพื้นที่ชุ่มน้ำ ทำให้ติดเชื้อง่ายกว่าคนทั่วไป จากการศึกษาที่ผ่านมายังพบว่า ผู้ป่วยโรคธาลัสซี
15 เมียมีภาวะเสี่ยงต่อการติดเชื้อดังกล่าวมากกว่าคนปกติด้วย ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด ซึ่งการ วินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำก็เป็นอีกหนทางหนึ่งที่ทำให้ความรุนแรงของโรคลดลง โดยได้มีการ พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรค Pythiosis โดยวิธี Hemagglutination นี้ โดยมีประสิทธิภาพดี มี
ความจำเพาะสูง (spacificaty) และความไวสูง (sensitivity) สามารถใช้ตรวจหา antibodies ต่อเชื้อ
P. insidiosum ในตัวอย่างเลือดส่งตรวจ นอกจากนี้ยังสามารถอ่านผลได้ง่ายรวดเร็ว และผู้ใช้ไม่
20 จำเป็นต้องมีความชำนาญหรือมีอุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการราคาแพงก็สามารถทำการทดสอบได้ ซึ่ง ต่างจากชุดทดสอบที่มีอยู่ในปัจจุบันคือ immunodiffusion test, ELISA และ Western blot ซึ่งแต่ละวิธี มีข้อจำกัด เช่น immunodiffusion test ซึ่งมีความไวที่ต่ำมาก ก่อให้เกิดผลที่คลาดเคลื่อนได้ง่าย และยัง

ใช้ระยะเวลาในการทดสอบ ส่วน ELISA และ Western blot เป็นวิธีที่ต้องอาศัยผู้มีความชำนาญ ในการทำการทดสอบ และยังคงอาศัยอุปกรณ์ในการทดสอบที่ซับซ้อนจึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในแหล่งที่พบโรค Pythiosis ซึ่งเป็นพื้นที่ห่างไกล

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

- 5 ชุดตรวจวินิจฉัยโรค Pythiosis โดยวิธี Hemagglutination เป็นชุดทดสอบสำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค Pythiosis จากตัวอย่างเลือดได้อย่างรวดเร็วแม่นยำและมีประสิทธิภาพดีเพื่อใช้ทดแทนกับการตรวจทางอิมมูโนวิทยาที่มีอยู่ สามารถตรวจนอกพื้นที่ห้องปฏิบัติการได้

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ชุดตรวจวินิจฉัยโรค Pythiosis โดยวิธี Hemagglutination คือการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ

- 10 *P. insidiosum* ในเลือดของผู้ป่วย โดยอาศัยหลักการจับกันของแอนติเจนที่เคลือบบน sheep red blood cells กับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. insidiosum* ที่อยู่ในเลือดผู้ป่วย ทำให้สามารถเห็นการเกาะกลุ่มเรียกว่าการเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination) ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เพื่อช่วยในการวินิจฉัยผู้ป่วยโรค Pythiosis ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมชุดทดสอบมีขั้นตอนหลัก 3
- ขั้นตอนดังนี้ คือ การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* (culture filtrate antigen), การเตรียมเซลล์
- 15 เม็ดเลือดแดงแกะเพื่อใช้ในการเคลือบแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* และการเคลือบติดแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* บนเม็ดเลือดแดงแกะ โดยแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* (culture filtrate antigen)

1. ทำการเพาะเชื้อ *P. insidiosum* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น Sabouraud dextrose agar และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2-3 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ
 2. ตัดชิ้นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีส่วนของเส้นใยรา (hyphal element) เจริญอยู่เพื่อใส่
- 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Sabouraud dextrose broth แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่า Shaker incubator (150 rpm) โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 9 วัน

3. เติม Merthiolate (ความเข้มข้นสุดท้าย, 0.02 % น้ำหนัก/ปริมาตร) เพื่อนำเชื้อ
4. นำไปกรองด้วยเยื่อกรอง (filter membrane) ขนาดเยื่อเลือกผ่าน 0.22 ไมโครเมตร นำส่วนเหลืองใสที่ผ่านเยื่อกรองมาเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ EDTA (0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
5. ปรับความเข้มข้นส่วนใสให้เข้มข้นขึ้นประมาณ 80 เท่า จะได้แอนติเจนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อและผ่านการกรอง culture filtrated antigen (CFA) นำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วย spectrophotometer และเก็บส่วนโปรตีนที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ เพื่อใช้เคลือบบนเม็ดเลือดแดงแกะ sheep red blood cells ต่อไป

การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะเพื่อใช้ในการเคลือบแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum*

- 10 1. นำเม็ดเลือดแดงแกะ (Sheep red blood cells) มาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย 0.9% normal saline
2. โดยผสมเม็ดเลือดแดงแกะ, 0.15 M Phosphate buffer ที่มีค่า pH 7.2 และ 2.5% Glutaraldehyde ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 12.5 : 2.5 โดยปริมาตรตามลำดับ โดยมีขั้นตอนการผสมดังนี้คือ นำเม็ดเลือดแดงแกะผสมกับ 0.15 M Phosphate buffer pH 7.2 ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยขณะผสมตั้งมีการเขย่าอยู่ตลอดเวลาโดยการใช้ rotator แล้วค่อย
- 15 เติม 2.5% Glutaraldehyde ทีละน้อยจนครบปริมาตร
3. เขย่าประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำตาล
4. นำมาปั่นล้างด้วย 0.9% normal saline เป็นจำนวน 3 ครั้ง
5. นำเม็ดเลือดแดงแกะที่ได้จากการเตรียมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเคลือบติดแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* บนเม็ดเลือดแดงแกะ

- 20 1. นำแอนติเจนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อและผ่านการกรอง culture filtrated antigen (CFA) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมกับเม็ดเลือดแดงแกะที่ได้จากการเตรียมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

2. เติม 0.1 M Acetate buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่มีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.0 เมื่อผสมเข้ากันดี
นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
3. นำมาปั่นล้างด้วย 0.9% normal saline จำนวน 3 ครั้ง นำส่วนที่ตกตะกอนที่ได้มาละลาย
ใน 0.5% bovine serum albumin (BSA) ใน 0.15 M Phosphate buffer ปริมาตร 5
5 มิลลิลิตรและปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 0.25% จะได้เป็น sensitized sheep red
cells แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยต่อไป

วิธีการใช้งานชุดตรวจวินิจฉัยโรค Pythiosis โดยวิธี Hemagglutination

1. เจือจางซีรัมของผู้ป่วยที่ต้องการทดสอบให้ได้ titer 1:160 โดยใช้ Diluent (0.15 M
Phosphate buffer saline ที่มี 0.5% bovine serum albumine
- 10 2. นำแต่ละตัวอย่างคือ ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย, positive control และ negative control ที่ถูก
เจือจางแล้วหยดลง U-shape microtiter plate ที่ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรลงแต่ละหลุม
ตัวอย่าง
3. หยด sensitized sheep red cells ลงไปทั้ง 3 หลุมของ U-shape microtiter plate ปริมาตร
0.25 มิลลิลิตร ที่มีตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยอยู่ในหลุม U-shape microtiter plate
- 15 4. ยก U-shape microtiter plate ขึ้น เตะเบาๆ ให้น้ำยากับซีรัมนั้นเข้ากันดี วางบนพื้นที
ราบเรียบ ปิดฝา U-shape microtiter plate แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-2
ชั่วโมง

อ่านผลการทดสอบ

- หากมีการเกิด hemagglutination หลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงแผ่
กระจายเป็นวงกลมขนาดใหญ่ที่ก้นหลุม ถือว่า เป็น Positive
- 20 -ส่วนหลุมที่เม็ดเลือดแดงไม่เกาะกลุ่มจะเห็น สีแดงกองรวมเป็นจุดเล็ก ๆ อยู่กลาง
ก้นหลุม สามารถอ่านผลได้ว่าไม่เกิด agglutination ถือว่าเป็น Negative

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

5

10

15

20