วิธีการหาค่า Serum Titers (Quantitative)

นำซีรัมที่อ่านได้ผลบวกที่ค่า titer 1:50 มาทำให้เจือจางต่อให้ได้ serial dilute serum (2-fold) ดังนี้คือ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 และ 1: 3200 แล้วดำเนินการตามวิธี screening test

การอ่านผล

ผลบวก (Positive) : พบเชื้อริคเค็ทเซียติดสีฟลูออเรสเซนต์ในซัยโตพลาสซึมของเซลล์

ผลลบ (Negative) : ไม่พบเชื้อริคเค็ทเซียติดสีฟลูออเรสเซนต์ในซัยโตพลาสซึมของเซลล์เลย แต่พบเซลล์ติดสีแดงของ Evans blue แทน

การแปลผล

1. กรณี single serum

1.1 IgM หรือ IgG<1:50 :- ไม่พบการติดเชื้อริคเค็ทเซีย (ควรขอซีรัมที่ 2)

1.2 IgM หรือ IgG > 1:50 แต่ < 1:400 :- recent infection (ควรขอซีรัมที่ 2)

1.3 IgM หรือ IgG > 1:400 :- active infection (ควรขอซีรัมที่ 2)

2. กรณี paired sera

2.1 Four-fold rising titer ถึง ≥ 1:200 :- active infection

2.2 IgM หรือ IgG ของทั้ง 2 ซีรัม ≥ 1:400 :- active infection

2.3 ไม่พบทั้งข้อ 2.1 และ 2.2 :- ไม่พบการติดเชื้อริคเค็ทเซีย

หมายเหตุ

1. ซีรัมที่ 2 ให้เก็บห่างจากวันเริ่มป่วยประมาณ 10-21 วัน หรือเก็บห่างจากซีรัมที่ 1 ประมาณ 7-14 วัน

2. การแปลผล ให้แปลร่วมกับการวินิจฉัยทางคลินิค

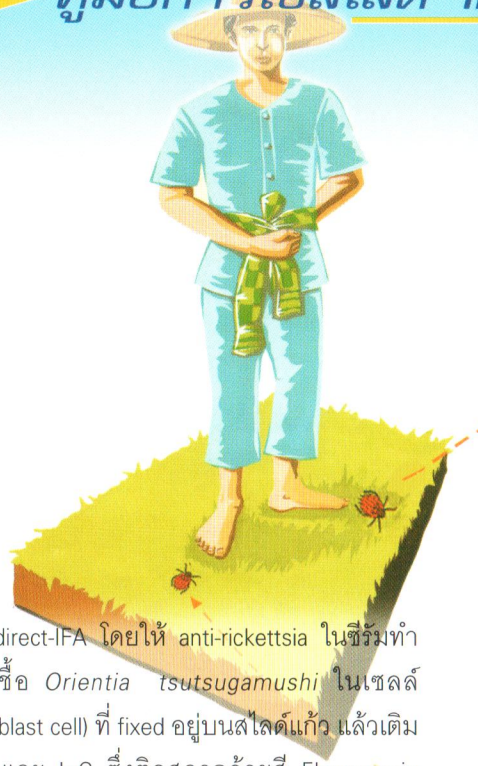
3. พลาสม่าสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยได้เช่นเดียวกับซีรัม

คู่มือการใช้สไลด์ IFA เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัส

ฝ่ายริคเค็ทเซีย
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

โทร. 0-2589-9850-8, 0-2951-0000-11
โทรสาร. 0-2591-5449

คู่มือการใช้สไลด์ IFA เพื่อการตรวจวินิจฉัย โรคสครับไทฟัส



หลักการ

เป็นวิธี Indirect-IFA โดยให้ anti-rickettsia ในซีรัมทำปฏิกิริยากับตัวเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* ในเซลล์ L929 (mouse fibroblast cell) ที่ fixed อยู่บนสไลด์แก้ว แล้วเติม anti-human IgM และ IgG ซึ่งติดสลากด้วยสี Fluorescein เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อริคเค็ทเซียติดสีฟลูออเรสเซนต์

วัสดุที่เตรียมให้

1. สไลด์แก้วที่เคลือบด้วยเซลล์ L929 ที่ติดเชื้อ *O. tsutsugamushi* จำนวน 25 แผ่น (เก็บที่-20° C)

2. FITC-conjugated rabbit anti-human IgM และ IgG (Dako, Denmark) ชนิดละ 1 ขวด (1:40 in PBS (-) ที่เติม Evans blue) เก็บในที่มืดอุณหภูมิ 4° C

3. Anti-rickettsia positive and negative control sera ชนิดละ 1 ขวด

วัสดุอุปกรณ์ที่ต้องจัดเตรียมเอง

1. Phosphate buffer saline (PBS (-)) pH 7.4

Ingredients :

NaCl	8	gm
KCl	0.20	gm
Na_2HPO_4	1.15	gm
KH_2PO_4	0.20	gm
Distilled water	1	litre

2. Automatic micropipettes ขนาด 20, 100 µl และ tips
3. Incubator, 37° C
4. กล่องพลาสติกที่มีความชื้น (moist chamber)
5. นาฬิกาจับเวลา
6. Staining Jars 0.2 M Na
7. Coverslips ขนาด 24x60 mm.
8. Microplate mixer
9. Buffered-glycerol Mounting Fluid, pH 9.0

Glycerol	90	ml
HPO_4	10	ml

วิธีการทำ Screening test (Qualitative)

1. นำสไลด์ IFA จากตู้ -20° C ผึ่งให้แห้งด้วยลมเย็น
2. เจือจางซีรัมที่ต้องการตรวจสอบด้วย PBS (-) ให้ได้ค่าไตเตอร์เท่ากับ 1:50
3. นำซีรัมที่เจือจางแล้วจากข้อ 2 หยดลงบนสไลด์ จำนวน 2 หลุม ๆ ละ 5 µl (สไลด์ 1 แผ่นมี 21 หลุม สามารถตรวจตัวอย่างได้ 8 ตัวอย่าง (16 หลุม) จำนวนที่เหลือใช้ทำ positive control serum 2 หลุม และ negative control serum 2 หลุม)
4. นำสไลด์ที่หยดซีรัมแล้ว วางในกล่องพลาสติกที่มีความชื้น นำไปบ่มที่ 37° C นาน 40 นาที
5. นำสไลด์มาล้างด้วย PBS (-) จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 3-5 นาที
6. ผึ่งสไลด์ให้แห้งด้วยลมเย็น
7. หยด FITC-conjugated anti-human IgM และ IgG ลงในหลุมที่ 1 และ 2 ตามลำดับ
8. นำสไลด์ที่หยด conjugated แล้ว วางในกล่องพลาสติกที่มีความชื้น นำไปบ่มที่ 37° C นาน 40 นาที
9. นำสไลด์มาล้างด้วย PBS (-) จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที
10. ผึ่งสไลด์ให้แห้งด้วยลมเย็น
11. หยด Buffered Glycerol Mounting Fluid ลงบนสไลด์แล้วปิดทับด้วยcoverslips
12. นำสไลด์อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์