การพัฒนาทักษะของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ในการฝึกการตรวจภาวะการติดเชื้อ *Salmonella* Typhi ด้วยชุดตรวจ indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นเอง

Development of Medical Technology students' skill in diagnosis of *Salmonella* Typhi by using in hourse indirect ELISA test

โดย

วิมล ซอบชื่นชม

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สนับสนุนทุนวิจัยโดย
ศูนย์สนับสนุนและพัฒนาการเรียนการสอน
มหาวิทยาลัยรังสิต ปีการศึกษา 2548
ISBN : 978-974-7167-59-7

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดีเป็นผลมาจากความร่วมมืออย่างดียิ่งของนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ในการฝึกการตรวจภาวะการติดเชื้อ *Salmonella* Typhi ด้วยชุดตรวจ indirect ELISA จำนวน 19 คน ที่ตั้งใจฝึกปฏิบัติอย่างเต็มความสามารถ ขอบคุณนักศึกษาที่ร่วมทำโครงงานปริญญานิพนธ์การพัฒนาชุดตรวจนี้จนลุล่วง ได้แก่ นางสาวสุรสา ลิมาคม, นางสาวขนิษฐา เลี้ยงบำรุง, นางสาวศรินธร รักษ์มณี และนายสุรสิทธิ์ สุวรรณสินธุ์

ขอขอบพระคุณศูนย์สนับสนุนและพัฒนาการเรียนการสอนและมหาวิทยาลัยรังสิตที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยทั้งหมดสำหรับการทำวิจัยเรื่องนี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความสนับสนุนที่ได้รับที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

รศ.ดร.วิมล ชอบชื่นชม

ธันวาคม 2549

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การพัฒนาทักษะของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ในการฝึกการตรวจภาวะการติดเชื้อ *Salmonella* Typhi ด้วยชุดตรวจ indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นเอง

Development of Medical Technology students' skill in diagnosis of *Salmonella* Typhi by using in house indirect ELISA test

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.วิมล ชอบชื่นชม, นางสาวสุรสา ลิมาคม, นางสาวชนิษฐา เลี้ยงบำรุง, นางสาวศรินธร รักษ์มณี และนายสุรสิทธิ์ สุวรรณสินธุ์

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

ผู้วิจัยได้ดำเนินการสร้างสื่อการสอนสำหรับวิชา Clinical Immunology เรื่อง การตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ *Salmonella* Typhi คือ ชุดตรวจ indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นเอง จากนั้นนำชุดทดสอบดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาทักษะการตรวจ indirect ELISA ของนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ จำนวน 19 คน เมื่อทำการเปรียบเทียบ ความรู้ ความเข้าใจด้วยแบบทดสอบและประเมินทักษะด้วยการสังเกตเพื่อวัดความสามารถด้านกระบวนการทำการทดสอบ ก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติด้วยตนเองของนักศึกษาพบว่าด้านความรู้ ความเข้าใจของนักศึกษาหลังการฝึกปฏิบัติจริงด้วยตนเองมีคะแนนสูงกว่าก่อนการปฏิบัติจริง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการประเมินทักษะความสามารถด้านกระบวนการทดสอบหลังการฝึกปฏิบัติจริงมีค่าคะแนนมากกว่าก่อนการฝึกปฏิบัติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 (p-value <0.05) แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาชุดตรวจ indirect ELISA เพื่อให้นักศึกษาได้มีโอกาสฝึกปฏิบัติจริงสามารถช่วยพัฒนาทักษะ ความรู้ และความเข้าใจของนักศึกษาเกี่ยวกับการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Abstract

We have developed the in-house indirect ELISA for serological diagnosis of recent *Salmonella* Typhi infection. These materials were used for the study of improvement of the indirect ELISA testing skill of nineteen medical technology students. These students were tested their knowledge and skill in indirect ELISA testing before and after laboratory training by using the developed teaching materials. The comparative study of knowledge and testing skill which evaluated by using examination paper and skill evaluation form, respectively were conducted by comparing their pre- and post- test scores. And it was found that the students' post- test scores of knowledge and skill in indirect ELISA testing after training by using the developed indirect ELISA were significant higher than the pre-test score at 95% confidence level (p-value < 0.05). This result revealed that the students' knowledge and skills in indirect ELISA testing could be improved by using the developed indirect ELISA as teaching materials.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	ง
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 จุดมุ่งหมายทางการศึกษาด้านต่างๆ	1
1.2 การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ	3
1.3 ที่มาของปัญหา	13
1.4 วัตถุประสงค์	13
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	
2.1 การเตรียมชุดตรวจ	14
2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	14
2.1.2 ตัวอย่างการทดลอง	16
2.1.3 การเตรียมแอนติเจน	18
2.1.4 วิธี indirect ELISA ที่เตรียมขึ้นเองสำหรับตรวจหา anti-*Salmonella* Typhi	19
- การทดสอบเพื่อหา coating buffer ที่เหมาะสม	20
- การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antigen ที่ใช้ coat plate	21
- การทดสอบหาเวลาในการ incubate serum ที่เหมาะสม	22
- การหาเวลาในการ incubate conjugate ที่เหมาะสม	23
- การทดสอบหา blocking solution ที่เหมาะสม	24
- การทดสอบหาการเจือจาง serum ที่เหมาะสม	25
- การหาการเจือจาง conjugate ที่ใช้ทดสอบที่เหมาะสม	26
- การทดสอบหา anti-*Salmonella* Typhi IgM ด้วยวิธี indirect ELISA ที่เตรียมขึ้น	27

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.1.5 Quality control สำหรับวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง 28
- การทดสอบ Sample แบบ duplicate 28
- การทดสอบเพื่อควบคุมผลของ conjugate 28
- การทดสอบเพื่อควบคุมผลของ substrate 28
2.1.6 การคำนวณผลการตรวจหา anti-*Salmonella* Typhi ด้วยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง 29
2.2 การสร้างเครื่องมือวัดภาคปฏิบัติ 29
- แบบสังเกตเพื่อวัดความสามารถด้านกระบวนการทำแบบทดสอบการตรวจวินิจฉัยภาวการณ์ติดเชื้อ *S.* Typhi แบบเฉียบพลันด้วยวิธี indirect ELISA 31
- แบบทดสอบความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับการตรวจวินิจฉัยภาวการณ์ติดเชื้อ *S.* Typhi แบบเฉียบพลันด้วยวิธี indirect ELISA 32
2.3 สถิติ 33
บทที่ 3 ผลการทดลอง
3.1 ผลการสร้างชุดทดสอบ indirect ELISA สำหรับการตรวจโรคติดเชื้อ S.typhi 34
3.2 ผลการพัฒนาทักษะของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ในการฝึกการตรวจภาวการณ์ติดเชื้อ *S.* Typhi ด้วยชุดตรวจ indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นเอง 35
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง
4.1 การสร้างชุดทดสอบ indirect ELISA สำหรับการติดเชื้อโรค *S.* Typhi 38
4.2 การพัฒนาทักษะของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ในการตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ *S.* Typhi ด้วยวิธี indirect ELISA 40
บรรณานุกรม 41
ภาคผนวก ก 42
ภาคผนวก ข 47
ภาคผนวก ค 52

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงค่าคะแนนของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์จำนวน 19 คน ก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติเมื่อทำแบบทดสอบวัดความรู้และความเข้าใจ 36

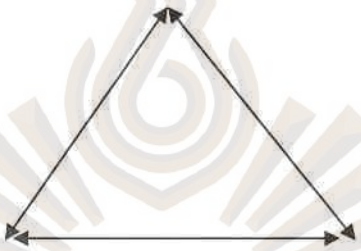
ตารางที่ 2 แสดงค่าคะแนนของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์จำนวน 19 คน ก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติเมื่อทำการประเมินทักษะ 37

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

1. จุดมุ่งหมายทางการศึกษาด้านต่าง ๆ (อุทุมพร, 2531)

จุดมุ่งหมายทางการศึกษา (educational objectives) หรือวัตถุประสงค์ทางการศึกษา เป็นสิ่งสำคัญในการเรียนการสอนเพราะจุดมุ่งหมายทางการศึกษาเปรียบเสมือนเข็มทิศชี้ทางให้ครูหรืออาจารย์หรือผู้สอนเลือกวิธีสอนที่เหมาะสมกับผู้เรียน ดังแสดงในรูป



จุดมุ่งหมายทางการศึกษามี 3 ส่วนคือ ส่วนที่เกี่ยวกับสมอง (พุทธิ, cognitive) ส่วนที่เกี่ยวกับจิต (จิตต, affective) และส่วนที่เกี่ยวกับทักษะการปฏิบัติ (พลังทักษะ, psycho-motor) โดยระบุความแตกต่างดังนี้

1) พุทธิ จุดมุ่งหมายที่เกี่ยวกับการพัฒนาสมองของผู้เรียนเริ่มตั้งแต่การจำ การสะสมความรู้ การพินิจพิจารณาจนเห็นความสัมพันธ์ของความรู้
2) จิตต จุดมุ่งหมายที่เกี่ยวกับการพัฒนาความรู้สึก อารมณ์ ทัศนคติ ค่านิยม ความเชื่อ
3) พลังทักษะ จุดมุ่งหมายที่เกี่ยวกับการประเมินงานกล้ามเนื้อกับประสาทกล้ามเนื้อ

ปริเขต (domain) ที่เกี่ยวข้องกับเรื่องนี้คือ พลังทักษะปริเขต (psycho-motor domain) ซึ่งมี 7 ขั้น คือ

1) การรับรู้
2) การเตรียมพร้อม
3) การตอบสนองตามแนวทางที่ให้

4) การสร้างกลไก

5) การตอบสนองที่ซับซ้อน

6) การดัดแปลง

7) การริเริ่มสิ่งใหม่

<u>รายละเอียดมีดังนี้</u>

1. **การรับรู้** (perception)

ขั้นต้นของการเริ่มกิจกรรมใดก็ตาม มักเกี่ยวข้องกับการรับรู้ ซึ่งแบ่งเป็น 3 อย่างย่อยๆ คือ

1.1 การเร้าความรู้สึก (sensory stimulation) เป็นการกระตุ้นต่อโสตประสาทความรู้สึกอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างคือ

1.1.1 ทางหู การได้ยิน

1.1.2 ทางตา การเห็นภาพ หรือเกิดภาพในสมอง

1.1.3 ทางมือ จากการสัมผัส

1.1.4 ทางลิ้น การกระตุ้นให้ได้รส

1.1.5 ทางจมูก การกระตุ้นให้ได้กลิ่น

1.1.6 ทางกล้ามเนื้อ การกระตุ้นที่กล้ามเนื้อ เอ็น ข้อต่อ

1.2 ทางเลือกตัวแนะ (cue selection)

เป็นการตัดสินว่าจะเลือกสิ่งเร้าใดที่ตนจะตอบสนอง

1.3 การแปลความหมาย (translation)

เป็นการแปลความเกี่ยวข้องของสิ่งเร้า และแสดงอาการตอบสนองออกมา

2. **การเตรียมพร้อม** (set)

เป็นการปรับตัวทั้งทางร่างกาย อารมณ์ จิตใจ และสมอง ให้พร้อมที่จะทำการอย่างใดอย่างหนึ่ง

2.1 การพร้อมทางสมอง เป็นการพร้อมในเชิงความคิดที่ต้องมีมาก่อนอาศัยความรู้ที่มีมาก่อนประกอบด้วย

2.2 การพร้อมทางร่างกาย เป็นการจัดท่าของร่างกายให้พร้อม

2.3 การพร้อมทางอารมณ์ เป็นการปรับทัศนคติให้เกิดความตั้งใจตอบสนอง

3. **การตอบสนองตามแนวทางที่ให้** (guided response) ได้แก่

3.1 การเลียนแบบ เป็นการตอบสนองตามแบบที่ให้ เช่น การแสดงให้ดูแล้วให้ทำตาม

3.2 การลองผิดลองถูก เป็นความพยายามที่จะตอบสนองในรูปแบบต่างๆ

4. **กลไก** (mechanism)

การสร้างระบบ วิธีการ จากประสบการณ์ ความรู้ที่สะสมไว้แล้วแสดงการตอบสนองอย่างมีความเชื่อมั่น

5. **การตอบสนองที่ซับซ้อน** (complex overt response)

การตอบสนองนี้ในระดับนี้ต้องมีทักษะ มีการกระทำที่มีประสิทธิภาพจำแนกได้ 2 แบบคือ

5.1 การตอบสนองโดยไม่ลังเลใจ เป็นการตอบสนองอย่างเด็ดเดี่ยว

5.2 การตอบสนองแบบอัตโนมัติ เป็นการตอบสนองที่ประสานระหว่างพลังภายในทักษะและกล้ามเนื้อ

6. **การดัดแปลงให้เหมาะสม** (adaptation)

เป็นการเปลี่ยนกิจกรรมทางมอเตอร์ในสมองให้สอดคล้องกับความต้องการในปัญหาแบบใหม่ที่สอดคล้องกับความต้องการทางกาย

7. **การริเริ่มสิ่งใหม่** (origination)

เป็นการหาวิธีการแบบใหม่มาจัดกระทำกับวัตถุประสงค์ โดยไม่เคยทำมาก่อน

2. การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ *Salmonella Typhi*

ไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever)

ไข้ไทฟอยด์เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า *Salmonella* Typhi เชื้อนี้จะอยู่ในน้ำและอาหาร หากการสาธารณะสุขดีการระบาดของเชื้อนี้จะลดลงคนจะรับเชื้อนี้จากการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนเชื้อโรค คนที่เป็นโรคจะขับถ่ายเชื้อออกทางอุจาระ เชื้อนี้อาจจะปนเปื้อนในน้ำตามธรรมชาติ หรืออาจจะปนเปื้อนอาหาร ผู้ป่วยบางคนจะมีเชื้อในร่างกายที่เรียก carrier ซึ่งสามารถขับเชื้อออกสิ่งแวดล้อมได้ตลอดเวลาโดยที่ไม่มีอาการเมื่อคนได้รับเชื้อ เชื้อจะเข้าสู่ลำไส้ ต่อมน้ำเหลือง ตับ ม้าม โดยทางกระแสเลือด

ลักษณะโรค

เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียรุกล้ำเข้ากระแสเลือดไปยังอวัยวะต่าง ๆ ทำให้เกิดอาการไข้เฉียบพลัน โดยไข้จะสูงอยู่เป็นระยะเวลานาน ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ม้ามโต ชีพจรเต้นช้า เมื่อเทียบกับอุณหภูมิร่างกายที่สูงขึ้นจากไข้ (relative bradycardia) จุดแดง (rose spots) ตามลำตัว ไอแห้งๆ ในระยะเริ่มแรกอาการคล้ายท้องผูกหลายวันถึงจะถ่ายครั้งแต่อุจจาระเหลวมีกลิ่น

เหม็นพบมากกว่าอาการอุจจาระร่วง และอาการของระบบเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid tissues) พบผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรง หรือมีอาการที่ไม่ชัดเจนได้บ่อย การมีแผลที่ต่อมน้ำเหลือง Payer's patches ที่ลำไส้เล็กส่วนกลาง (ileum) ซึ่งทำให้มีเลือดออกในลำไส้หรือลำไส้ทะลุได้ โดยพบประมาณ ร้อยละ 1 โดยเฉพาะในระยะท้ายของผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาจะพบว่าผู้ป่วยมีอาการไข้ที่ไม่มีเหงื่อออก ชีพจรช้า ซึม ความไวของประสาทรับเสียงลดลง และอาจมีต่อมน้ำลายหน้าหูอักเสบ อัตราป่วยตายมีประมาณร้อยละ 10 – 20 แต่ลดลงได้ถึงน้อยกว่าร้อยละ 1 ถ้าให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้พบว่าร้อยละ 15 - 20 ของผู้ป่วยอาจกลับมีอาการใหม่หลังจากหายแล้ว (แต่โดยทั่วไปจะมีอาการไม่ค่อยรุนแรงเท่ากับการป่วยครั้งแรก) ผู้ป่วยในท้องถิ่นที่เกิดโรคเป็นประจำ ผู้ที่ติดเชื้ออาจมีอาการน้อยหรือไม่มีอาการเลยก็ได้ สำหรับไข้พาราทัยฟอยด์ มีอาการทางคลินิกคล้ายกับไข้ทัยฟอยด์ แต่อาการน้อยกว่า อัตราป่วย- ตาย ก็ต่ำกว่ามาก อัตราส่วนการเกิดโรคระหว่าง *S.* Typhi กับ *S.*Paratyphi A และ *S.* Paratyphi B ประมาณ 10 : 1 การกลับเป็นโรคซ้ำอีกมีประมาณร้อยละ 3 – 4 การวินิจฉัยโรค สามารถเพาะเชื้อทัยฟอยด์ได้จากเลือดในระยะเริ่มป่วย แม้ว่าระยะหลังจากมีอาการแล้ว 1 สัปดาห์จะเพาะเชื้อได้จากปัสสาวะและอุจจาระ ในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับยาปฏิชีวนะแล้วการเพาะเชื้อจากไขกระดูกจะช่วยยืนยัน (พบร้อยละ 90 – 95) การตรวจเลือดด้วยวิธี agglutination reaction (Widal's test) จะได้ผลบวกในระยะสัปดาห์ที่ 2 โดยให้การวินิจฉัยเมื่อมีค่าเพิ่มขึ้นเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากตัวอย่างเลือดที่เจาะครั้งแรก แต่ไม่ค่อยใช้ในการวินิจฉัยเนื่องจากมีข้อจำกัดของความไวและความจำเพาะ (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

<u>เชื้อก่อโรค</u>

ไข้ทัยฟอยด์เกิดจากเชื้อ *Salmonella* Typhi ไข้พาราทัยฟอยด์เกิดจากเชื้อ *S.* Paratyphi A , *S.* Paratyphi B และ *S.* Paratyphi C สามารถแยกเชื้อได้โดยนำตัวอย่าง เช่น เลือด อุจจาระ น้ำไขสันหลัง ปัสสาวะมาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการทดสอบยืนยันด้วยวิธีชีวเคมีร่วมกับวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา ในกรณีที่ต้องการศึกษาทางระบาดวิทยาจะทำ phage typing และวิธี pulsed - field gel electrophoresis (นางประภาวดี ติษยาธิคม , สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข)

การติดต่อ

โดยการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อปนเปื้อนมาจากอุจจาระหรือปัสสาวะของผู้ป่วยหรือผู้เป็นพาหะ อาจพบเชื้อในหอยที่จับได้ในแถบชายฝั่งที่มีท่อน้ำเสียระบายลงทะเล ผลไม้ ผักดิบ นม และผลิตภัณฑ์จากนม ซึ่งอาจเป็นตัวกลางแพร่เชื้อ ส่วนมากเชื้อจะติดมาจากมือของผู้ที่เป็นพาหะ แมลงวันอาจเป็นตัวแพร่เชื้อมาสู่อาหาร ตัวเชื้อจะเจริญจนได้จำนวนมากพอที่จะก่อให้เกิดโรคในคนได้ (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

ระยะติดต่อ

สามารถติดต่อได้ตลอดเวลาที่ยังคงพบเชื้อในอุจจาระและปัสสาวะ ตั้งแต่สัปดาห์แรกจนกระทั่งหาย (ปกติ 1 - 2 สัปดาห์สำหรับ para typhoid) ประมาณร้อยละ 10 ของผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาจะยังคงมีเชื้อในอุจจาระเป็นเวลา 3 เดือนหลังจากเริ่มป่วย ร้อยละ 2 - 5 จะกลายเป็นพาหะเรื้อรัง ผู้ติดเชื้อ *S.* Paratyphi มีจำนวนน้อยที่อาจจะเป็นพาหะเรื้อรัง (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์ , สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

ระยะฟักตัว

ขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อ จาก 3 วันถึง 1 เดือน โดยปกติประมาณ 8 - 14 วัน สำหรับ paratyphoid gastroenteritis มีระยะฟักตัว 1 - 10 วัน (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

เกณฑ์ทางคลินิก (clinical criteria)

ไข้สูงลอยนานกว่า 1 สัปดาห์ ร่วมกับอาการอื่นอย่างน้อยสองอาการดังต่อไปนี้

- ปวดศีรษะ
- เบื่ออาหาร
- หัวใจอาจเต้นช้ากว่าปกติ (โดยยังมีไข้สูง)
- ท้องอืด ท้องผูก ปวดท้อง อาจมีท้องเสียได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

- บางรายอาจมีอาการรุนแรง โดยถ่ายเป็นเลือด , ช็อคเนื่องจากภาวะที่มีเลือดแข็งตัวกระจายไปทั่วร่างกาย (disseminated intravascular coagulopathy shock) , เยื่อบุช่องท้องอักเสบจากลำไส้ทะลุ

- อาจพบตับโต ม้ามโต (เล็กน้อย) อาการของไข้ทัยฟอยด์และไข้พาราทัยฟอยด์จะคล้ายกัน แต่อาการของไข้ทัยฟอยด์จะรุนแรงกว่า

(Enteric fever , สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

เกณฑ์ทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory Criteria)

- ตรวจเลือด CBC พบ WBC ต่ำกว่า 7,000 /ลบ.มม.

- Widal test ให้ผลบวก (ควรตรวจหลังจากเริ่มมีอาการ 10 วัน) แต่การตรวจ Widal test อย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัย

- เพาะเชื้อจากอุจจาระ ปัสสาวะ หรือเลือด พบเชื้อ *Salmonella* Typhi หรือ *S.* Paratyphi A หรือ *S.* Paratyphi B หรือ *S.* Paratyphi C.

(Enteric fever , สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

ระบาดวิทยาของโรค

Salmonella Typhi , *S.* Paratyphi A , *S.* Paratyphi B และ *S.* Paratyphi C มีเพียงมนุษย์เป็น host แพร่กระจายจากคนไปสู่คนโดยไม่มี intermediate host จึงไม่มีรายงานการตรวจพบในสัตว์ หรืออาหารสัตว์โดยทั่วไป *Salmonella* Typhi จะถูกปลดปล่อยออกมากับอุจจาระคนและปนเปื้อนอยู่ในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น น้ำ หรือมือของผู้ที่ปล่อยเชื้อนั้นออกมาและนำไปสู่การปนเปื้อนอาหารหรือเครื่องมือเครื่องใช้อื่น ๆ จึงได้รับเชื้อ *Salmonella* Typhi เข้าไปทางน้ำหรืออาหารที่มีการปนเปื้อนจากอุจจาระของคนเท่านั้น ในการติดเชื้อจาก *S.* Typhi ทั่วๆ ไปมักบอกไม่ได้ว่าได้รับเชื้อเข้าไปอย่างไร แต่ในการระบาดจาก *S.* Typhi ในต่างประเทศมีการดำเนินการสอบสวนโรคอย่างรัดกุม ทำให้สามารถบอกได้ว่าเกิดเนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อจากอุจจาระไปยังอาหารต่างๆ ในแต่ละปีประมาณว่ามีผู้ป่วยใหม่จำนวน 17 ล้านราย ตายประมาณ 600,000 ราย มีหลายสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ chloramphenicol และยาปฏิชีวนะตัวอื่น ๆ ในหลายพื้นที่ของโลก โดยส่วนใหญ่จะแยกได้จากแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตะวันออกกลางและตะวันออกเฉียงเหนือของ

แอฟริกา ในปี 2533 มีสายพันธุ์ที่มี R factor plasmid ซึ่งมีพันธุกรรมการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่สำคัญในการให้ผู้ป่วยกินเพื่อการรักษารวมทั้งยา chloramphenicol amoxicillin และ trimethoprim/sulfamethoxazole ไข้พาราทัยฟอยด์ เกิดประปรายหรือเกิดการระบาดและหยุดเร็ว (limited outbreaks) จะพบในเด็กที่อายุน้อยกว่า 1 ปี (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

การรักษา

รักษาตามอาการ ปัจจุบันเชื้อ *S.*Typhi มีการดื้อต่อยาที่กำหนดไว้ในการรักษาเพิ่มมากขึ้น สำหรับผู้ป่วยในแถบเอเชีย มีการรายงานว่า Asian strains มีความไวต่อยาลดน้อยลงเมื่อเชื้ออยู่ในร่างกาย เมื่อตรวจพบเชื้อ *Salmonella* Typhi หรือ *Salmonella* Paratyphi (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์ , สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

กรณีอาการไม่รุนแรง

ผู้ใหญ่ใช้ cotrimoxazole 160/800 มก. วันละ 2 ครั้ง นาน 3 วัน

เด็กใช้ cotrimoxazole 10 มก .(trimetroprim) วันละ 2 ครั้ง นาน 3 วัน

กรณีอาการรุนแรง

ผู้ใหญ่ใช้ ciprofloxacin 500 มก. วันละ 2 ครั้ง นาน 3 วัน

เด็กใช้ ciprofloxacin 10-20 มก. วันละ 2 ครั้ง นาน 3 วัน

หากพบเชื้อที่ดื้อยาดังกล่าวจึงพิจารณาใช้ ceftrixone หรือ ofloxacin ไม่ควรดูอาการว่า ไข้ลงเร็วหรือช้าว่าเป็น response ต่อยาหรือไม่ เพราะไข้จะลงช้า แต่ผู้ป่วยจะรู้สึกสบายขึ้น

วิธีการป้องกันและควบคุมโรค

มาตรการป้องกัน (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1. ให้สุขศึกษาแก่ประชาชนทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ประกอบการเกี่ยวกับอาหารและผู้ดูแลผู้ป่วยและเด็กในเรื่องสุขนิสัยในการรักษาความสะอาด เน้นความสำคัญของการล้างมือ จัดให้มีอ่างล้างมือ

2. จัดให้มีการสุขาภิบาล ในเรื่องการกำจัดอุจจาระ และการป้องกันแมลงวัน ในกรณีที่ไม่มีส้วมควรกำจัดอุจจาระด้วยการฝัง และที่ฝังจะต้องห่างจากแหล่งน้ำดื่ม

3. จัดทำให้แหล่งน้ำสะอาดและใส่คลอรีน รวมทั้งการไหลย้อนกลับของระบบน้ำทิ้งซึ่งอาจปนเปื้อนกับแหล่งน้ำสะอาด สำหรับการป้องกันส่วนบุคคลหรือในชุมชนย่อยนั้น น้ำดื่มน้ำใช้ควรได้รับการต้มหรือใส่คลอรีน

4. การควบคุมแมลงวัน โดยใช้มุ้งลวด พ่นยาฆ่าแมลงหรือใช้กับดัก ควบคุมการขยายพันธุ์ด้วยการเก็บและทำลายขยะโดยวิธีที่เหมาะสม

5. ระมัดระวังเรื่องความสะอาดในการเตรียม การขนส่ง และการเก็บรักษาอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเก็บรักษาอาหารจำพวกสลัดหรืออาหารอื่นๆ ที่ต้องอาศัย การแช่เย็น พึงระมัดระวังไม่ว่าจะเป็นการประกอบอาหารในบ้านหรือที่สาธารณะ ในกรณีที่ไม่แน่ใจในเรื่องความสะอาดของอาหารนั้น ควรเลือกรับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่และร้อน

6. นมหรือผลิตภัณฑ์นมควรผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ หรือการต้มก่อน ให้คำแนะนำเรื่องการควบคุมการผลิต การเก็บรักษา และการจัดจำหน่ายให้ถูกสุขลักษณะ

7. ควบคุมการผลิตอาหารและเครื่องดื่มให้เหมาะสม ให้ใช้น้ำผสมคลอรีนในโรงงานผลิตอาหารและเครื่องดื่มให้ปรุงอาหารทุกชนิดจากสัตว์ให้สุกจริงๆ โดยเฉพาะเป็ดไก่ที่แช่แข็ง ผลิตภัณฑ์จากไข่และเนื้อ หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนในครัว การกินไข่ดิบ ไข่ผสมเหล้าหรือไอสครีมที่ทำโดยใช้มือและการใช้ไข่ที่สกปรกหรือแตกร้าว นมทุกชนิดและผลิตภัณฑ์จากไข่ควรจะต้องได้รับการพาสเจอร์ไรซ์มาก่อน

8. จำกัดการเก็บและการจัดจำหน่ายอาหารทะเลจากแหล่งที่ได้รับการรับรองว่าสะอาดและควรได้รับการปรุงโดยการต้มหรือนึ่งด้วยไอน้ำอย่างน้อย 10 นาที ก่อนรับประทาน

9. ผู้ที่ติดเชื้อหรือพาหะควรหลีกเลี่ยงจากการประกอบอาหารและการดูแลผู้ป่วย และให้คำแนะนำแก่ผู้เป็นพาหะควรพักการทำงานเกี่ยวกับอาหารจนกว่าจะตรวจไม่พบเชื้อจากอุจจาระหรือปัสสาวะ ติดต่อกัน 3 ครั้ง ห่างกันอย่างน้อย 1 เดือนและหลังหยุดยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ตัวอย่างอุจจาระนิยมเก็บจากอุจจาระสด (fresh stool) คนที่เป็นพาหะเรื้อรัง มักพบนิ่วในถุงน้ำดีหรือภาพถ่ายรังสีพบความผิดปกติของท่อทางเดินน้ำดี ปัจจุบันมีหลายการศึกษาพบว่ายากลุ่ม

quinolone ตัวใหม่ ให้ผลในการรักษาผู้เป็นพาหะได้อย่างดีเยี่ยม แม้ว่ายังมีโรคเกี่ยวกับทางเดินน้ำดีหรือถุงน้ำดี การติดตามผลการเพาะเชื้อ ยังมีความจำเป็นเพื่อยันยันผลการรักษา

10. การให้วัคซีนแก่ผู้ที่มีโอกาสสัมผัสเชื้อจากหน้าที่ เช่น นักเทคนิคการแพทย์ สมาชิกของครอบครัวผู้เป็นพาหะ หรือผู้ที่เดินทางไปยังพื้นที่ที่มีความชุกของโรคสูง หรือพื้นที่ที่การสุขาภิบาลไม่ดี วัคซีนที่ใช้เป็นวัคซีนตัวเป็นชนิดให้ทางปากใช้เชื้อ *S.*Typhi strain Ty21a (ใช้ 3 - 4 dose ห่างกัน 2 วัน) สำหรับชนิดฉีด มี polysaccharide Vi antigen (ให้ครั้งเดียว) วัคซีนทั้งชนิดกินและฉีดนี้ให้การป้องกันโรคได้เช่นเดียวกับวัคซีนชนิดที่ใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ (whole cell bacteria vaccine) และมีปฏิกิริยาข้างเคียงน้อยมาก ซึ่งเป็นทางเลือกการใช้วัคซีน อย่างไรก็ดี วัคซีนชนิดกิน Ty21a และชนิด whole cell ไม่ควรให้ในผู้ได้รับยาปฏิชีวนะ หรือยารักษามาเลเรีย mefloquine เพราะเกิดปฏิกริยาข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง การให้วัคซีนกระตุ้น เพื่อป้องกันความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ช่วงการให้วัคซีนกระตุ้น 2 - 5 ปี ขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีน สำหรับการให้วัคซีนในไข้พาราทัยฟอยด์ ในการทดลองภาคสนาม พบว่าวัคซีนทัยฟอยด์ชนิดกิน (Ty 21 a) ช่วยป้องกัน paratyphoid B แต่ไม่ดีเท่าป้องกัน typhoid

<u>การควบคุมผู้ป่วย ผู้สัมผัส และสิ่งแวดล้อม:</u>

<u>การแยกผู้ป่วย</u>:- การแยกแยะผู้ติดเชื้อไม่มีอาการเป็นสิ่งจำเป็น ควรระมัดระวังเรื่องอาหาร น้ำ และการถ่ายของผู้ป่วย การป่วยในระยะเฉียบพลันควรได้รับการดูแลที่โรงพยาบาล ควรติดตามผู้ป่วยจนกว่าการเพาะเชื้อจากอุจจาระหรือปัสสาวะได้ผลลบติดต่อกัน 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งห่างกันไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมงและอย่างน้อย 48 ชั่วโมงหลังได้รับยาปฏิชีวนะ และไม่ควรเร็วกว่า 1 เดือนหลังเริ่มเกิดอาการ ถ้ามีผลเพาะเชื้อครั้งใดครั้งหนึ่งได้ผลบวก ให้ติดตามเพาะเชื้อทุก ๆ 1 เดือน ระหว่างระยะเวลา 12 เดือนหลังเกิดอาการจนกว่าจะพบว่าการเพาะเชื้อให้ผลลบติดต่อกัน 3 ครั้ง (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

<u>การทำลายเชื้อ</u>:- สำหรับอุจจาระและสิ่งของที่ปนเปื้อนในชุมชนซึ่งมีระบบการกำจัดของเสียที่ทันสมัยและดีพอ อุจจาระสามารถที่จะปล่อยโดยตรงลงในภาชนะที่เก็บโดยไม่ต้องมีการฆ่าเชื้อเบื้องต้นใด ๆ

แต่ต้องทำความสะอาดขั้นสุดท้าย (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

การแยกผู้ต้องสงสัย: ไม่จำเป็น (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

การให้ภูมิคุ้มกันแก่ผู้สัมผัส: ฉีดวัคซีนป้องกันโรคทัยฟอยด์ให้แก่สมาชิกในบ้าน ผู้ดูแลผู้ป่วย ซึ่งอาจติดเชื้อจากผู้ป่วยหรือพาหะได้ สำหรับกรณี paratyphoid A การให้วัคซีนไม่มีผลต่อการป้องกัน (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

การสอบสวนผู้สัมผัส : ควรตรวจหาแหล่งที่มีโอกาสแพร่เชื้อ สอบสวนหาผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับรายงาน ผู้เป็นพาหะ ตรวจสอบอาหาร น้ำ นม หรืออาหารทะเลที่อาจปนเปื้อนเชื้อโรค กลุ่มผู้เดินทางสมาชิกในบ้านและผู้สัมผัสใกล้ชิดผู้ป่วยไม่ควรให้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับอาหาร จนกว่าจะมีผลการเพาะเชื้อจากอุจจาระหรือปัสสาวะไม่พบเชื้ออย่างน้อย 2 ครั้ง โดยทำห่างกันอย่างน้อย 24 ชั่วโมง (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

มาตรการในระยะระบาด:

ทบทวนรายงานผู้ป่วย เพื่อพิจารณาเวลาและสถานที่สัมผัสโรคและประชากรกลุ่มเสี่ยง ดำเนินการตรวจเช็ครายชื่ออาหารที่รับประทานและอาหารที่แช่เหลือไว้ในตู้เย็น การซักถามอาการทางคลินิคร่วมกับการประมาณเวลาของระยะฟักตัวจะช่วยในการตั้งสมมติฐานของเชื้อสาเหตุ ให้เก็บตัวอย่างอาเจียน อุจจาระส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ พร้อมกับการวินิจฉัยเบื้องต้นประกอบไปด้วย สัมภาษณ์ผู้ป่วยโดยการสุ่มมาจำนวนหนึ่ง เปรียบเทียบอัตราป่วยตามชนิดอาหารในกลุ่มที่รับประทานและไม่ได้รับประทาน อาหารที่สงสัยคือ ชนิดอาหารที่มีความแตกต่างของอัตราป่วยทั้ง 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่รับประทานจะมีอัตราป่วยที่สูงกว่า ซักถามแหล่งที่มาของอาหารที่สงสัย และวิธีการปรุง และการเก็บถนอมอาหารก่อนนำไปบริโภค ตรวจหาแหล่งที่อาจมีการปนเปื้อน และช่วงเวลาของการแช่ในตู้เย็นและการอุ่นอาหาร เพื่อคำนวณเวลาที่เชื้อแบ่งตัวพร้อมตรวจสอบตัวกลางนำโรค เช่น น้ำและอาหารอย่างถูกต้อง จัดส่งอาหาร (ที่เหลือ) ที่สงสัยตรวจทางห้องปฏิบัติการ การตรวจแยกเชื้อไม่พบไม่ได้เป็นการแยกโรค ถ้าอาหารนั้นมีการอุ่นเพราะสารพิษทนทานต่อความร้อนได้ดีควรค้นหาผู้ป่วยหรือพาหะ ซึ่งจะเป็นแหล่งแพร่เชื้อ แหล่งน้ำที่สงสัยว่าอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อควรใส่คลอรีน หรือ

หลีกเลี่ยงไม่ใช้ น้ำดื่มต้องใส่คลอรีนหรือต้มก่อน (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

โอกาสที่จะเกิดการระบาดใหญ่:

กรณีที่มีปัญหาการขาดแคลนน้ำ มีการสุขาภิบาลไม่ดีพอการควบคุมสิ่งปฏิกูล และการควบคุมเรื่องอาหารและน้ำดื่ม หากมีผู้ป่วยหรือมีพาหะในกลุ่มผู้อพยพเคลื่อนย้ายอาจจะทำให้มีโอกาสเกิดการแพร่ระบาดของโรคได้ อย่างไรก็ตาม การเกิดการระบาดจากกรณีนี้พบได้ไม่บ่อยนัก การจัดหาน้ำดื่มที่สะอาด และควบคุมการกำจัดสิ่งปฏิกูลเป็นสิ่งที่จำเป็นมากกว่า การให้วัคซีนจะเลือกเฉพาะรายที่มีข้อบ่งชี้เป็นพิเศษ เช่น กลุ่มเด็กนักเรียน นักโทษ บุคลากรในโรงพยาบาลเป็นต้น (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

มาตรการระหว่างประเทศ

สำหรับไข้ทัยฟอยด์แนะนำให้ฉีดวัคซีนให้แก่ผู้ที่จะเดินทางไปยังพื้นที่ที่มีความชุกของโรคสูง และโดยเฉพาะถ้าจะต้องบริโภคอาหารหรือน้ำจากพื้นที่นั้น แต่ทั้งนี้ไม่เป็นข้อบังคับตามกฎหมายระหว่างประเทศทั้งไข้ทัยฟอยด์ และไข้พาราทัยฟอยด์ (ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับภาวะการติดเชื้อ Salmonella Typhi

1. จำนวนเม็ดเลือดขาว มักจะต่ำและมี relatively lymphocytosis ในรายที่มีภาวะแทรกซ้อน เช่น ลำไส้ทะลุ อาจมีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงได้

2. ปฏิกิริยาทางซีโรโลยี่ย์ ใช้ Widal reaction ซึ่งเป็น agglutination test วัด H (IgG) และ O (IgM) agglutination แพทย์หญิงเบญจวรรณ รุ่งปิตะรังสีศึกษา Widal reaction พบว่า agglutination titer ของเชื้อ Typhoid และ Paratyphoid A,B และ C ในคนไทยปรกติ 500 คน มี H agglutination สูงขึ้นเป็น 1:400 ถือว่า " สงสัยว่าเป็น Typhoid " ถ้า O agglutination ขึ้นเกิน 1: 80 และ H agglutination ก็สูงกว่าปรกติด้วย ถือว่า "ควรจะเป็น Typhoid " เมื่อเจาะซ้ำอีก 7-10 วันต่อมามี titer เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า ถือว่าเป็นโรคนี้แน่ O agglutination นี้มักขึ้นสูงราวสัปดาห์ที่ 2 ของโรค

สำหรับ H agglutinin นั้น ขึ้นเร็วและอยู่นาน ส่วน O agglutinin ขึ้นช้าและลงเร็ว ในรายที่ฉีด TAB vaccine ไตเต้อร์ของทั้ง 2 อย่างจะขึ้นได้ แต่ถ้าฉีดวัคซีนดังกล่าวมาเกิน 6 เดือน แล้ว O agglutinin จะลดลง ส่วน H agglutinin จะยังสูงอยู่ ถ้าหลัง 6 เดือน แล้ว O agglutinin ยังสูงกว่า 1: 100 อาจถือว่ากำลังเป็นโรคนี้อยู่

อย่างไรก็ตามต้องนึกไว้ด้วยว่า ในรายที่มีไข้จากโรคอื่นก็อาจทำให้มี anamnestic reaction ทำให้มี titer ทั้งสองอย่างสูงขึ้นได้ในระยะหนึ่ง

สำหรับ Vi agglutinin ในคนไทยนั้น ค่อนข้างแปลผลยาก เพราะประเทศไทยเป็น endemic area ของโรค Typhoid เท่าที่แพทย์หญิงเบญจวรรณ รุ่งปิตะรังสี ศึกษาในคนไทยพบว่า haemagglutinotion test สำหรับ Vi agglutinin ให้ผลบวกถึงร้อยละ 80 ซึ่งทำให้ตรวจหาผู้เป็นพาหะของเชื้อได้ยาก นอกจากจะเพาะเชื้อได้จากอุจจาระของคนที่ไม่มีอาการจึงจะบอกได้ว่าผู้นั้นเป็นพาหะของเชื้อ

3. การเพาะเชื้อ เพาะได้จากอุจจาระ ปัสสาวะ เลือด ไขกระดูกและน้ำดี

- การเพาะเชื้อจากเลือด มักพบเชื้อได้ใน 7-21 วันแรก

- การเพาะเชื้อจากอุจจาระ ตรวจพบเชื้อได้ตลอดระยะเวลาที่ป่วย แต่มักพบได้ง่ายในสัปดาห์ที่ 2-3 ของไข้อย่างไรก็ตามสำหรับที่ศิริราชเพาะเชื้อในเลือดได้บ่อยกว่าในอุจจาระ ส่วนผู้เป็นพาหะของเชื้อนั้นพบได้จากอุจจาระเป็นส่วนใหญ่

- การเพาะเชื้อจากปัสสาวะ จะพบเชื้อในราวสัปดาห์ที่ 3 ของโรค แต่พบได้ค่อนข้างยาก

- การเพาะเชื้อจากน้ำดี อาจเพาะเชื้อจากน้ำดีซึ่งดูดจากสายสวนลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenal intubation) มีประโยชน์ในรายที่เป็นพาหะของเชื้อ หรือในรายที่เป็นมานานกว่า 3-4 สัปดาห์

4. การตรวจทางอณูชีววิทยา ซึ่งมีความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ Salmonellae ในอาหารและผู้ป่วย คือวิธีใช้ตัวตรวจสอบ (probe) , PCR และ ELISA ซึ่งเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูป สามารถตรวจเชื้อได้ภายใน 1 วัน และสามารถตรวจหาเชื้อจำนวนน้อยได้ ส่วนลักษณะการดื้อยา phage typing และเทคนิคที่ใหม่เช่น วิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) หรือ pulsed-field gel electrophoresis ก็เป็นวิธีที่เป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโดยเฉพาะทางวิทยาการระบาด Salmonella บางครั้งอาจอยู่ในสภาวะที่เพาะไม่ขึ้นแต่ยังไม่ตาย (non-culturable

but viable) จะใช้วิธี DNA hybridization และ PCR มาช่วยวิเคราะห์ควบคู่ไปกับวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ

ที่มาของปัญหา

โดยที่คณะเทคนิคการแพทย์ได้เปิดการสอน วิชา Clinical Immunology โดยมีนักศึกษาลงทะเบียนเรียนเป็นจำนวนมาก (ประมาณ 100 คนต่อชั้นเรียน) แต่งบประมาณในการจัดซื้อวัสดุการศึกษามีจำนวนจำกัด ในปัจจุบันจึงไม่สามารถทำการฝึกปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี indirect ELISA ได้เลย เนื่องจากเป็นชุดทดสอบที่มีราคาแพง

ดังนั้นผู้วิจัยจึง มีแนวความคิดที่จะพัฒนาชุดตรวจ indirect ELISA เพื่อตรวจหา antibody ต่อเชื้อ S.Typhi class IgM ขึ้นเพื่อสามารถตรวจ recent infection โดยสามารถนำการทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้สอนร่วมกับการใช้เทคนิค Widal test ที่มีความไวและความจำเฉพาะต่ำ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชุดทดสอบสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ S.Typhi ที่มีประสิทธิภาพดี ราคาถูก สามารถแยกภาวะ recent infection ได้

2. เป็นการพัฒนาชุดทดสอบเพื่อใช้เป็นอุปกรณ์การศึกษาในวิชา Clinical Immunology นักศึกษาทุกคนจะได้มีโอกาสฝึกปฏิบัติโดยใช้ชุดตรวจที่สามารถตรวจหา recent infection ได้จริง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2
วิธีการวิจัย

1. การเตรียมชุดตรวจ indirect ELISA สำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *S.* Typhi

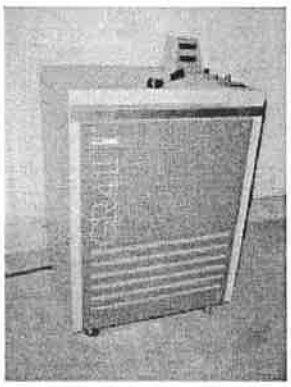
1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- ELISA reader (Bio-Rad , Microplate reader Model 550)

- Incubator (Memmert , Germany)

- Autopipette
- Loop,needle
- Refrigerated Centrifuge (Jouan , GR4.11 , America)

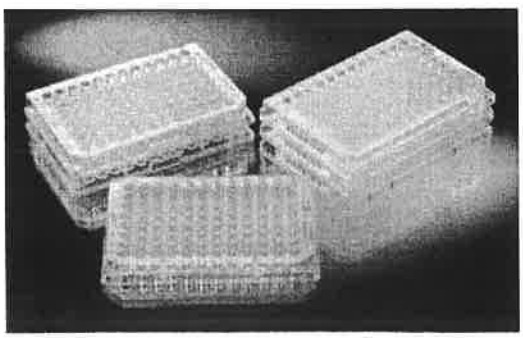
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



- Sonicator (Sonicator , XL)

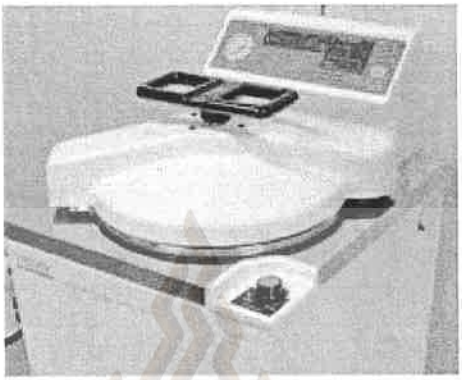
- Microcentrifuge (Boeco , M-24 , Germany)

- Microplate (Flat plate , Nunc , Denmark)



มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

- Autoclave (Tomy , Es315 , Japan)



- Spectrophotometer (Genesys , Geneys 10 VIS , USA)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1.2 ตัวอย่างการทดลอง

1.2.1 positive serum หมายถึง serum ที่ทำการตรวจโดยวิธี Widal's test แล้วให้ผล titer มากกว่า 80 จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้รับจาก ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี โดยให้รหัสดังนี้

3.1.1 Anti-O titer 160 Anti-H titer 320

3.1.2 Anti-O titer 160 Anti-H titer 320

3.1.3 Anti-O titer 160 Anti-H titer 320

3.1.4 Anti-O titer 160 Anti-H titer 320

3.1.5 Anti-O titer 320 Anti-H titer 1280

3.1.6 Anti-O titer 160 Anti-H titer 320

3.1.7 Anti-O titer 160 Anti-H titer 320

3.1.8 Anti-O titer 320 Anti-H titer 1280

โดยมีอาการทางคลินิกที่สอดคล้องกับไข้ไทฟอยด์

ไข้สูงลอยนานกว่า 1 สัปดาห์ ร่วมกับอาการอื่นอย่างน้อยสองอาการดังต่อไปนี้

- ปวดศีรษะ
- เบื่ออาหาร
- หัวใจอาจเต้นช้ากว่าปกติ (โดยยังมีไข้สูง)
- ท้องอืด ท้องผูก ปวดท้อง อาจมีท้องเสียได้
- บางรายอาจมีอาการรุนแรง โดยถ่ายเป็นเลือด , ช็อคเนื่องจากภาวะที่มีเลือดแข็งตัวกระจายไปทั่วร่างกาย (Disseminated Intravascular Coagulopathy Shock) , เยื่อบุช่องท้องอักเสบจากลำไส้ทะลุ
- อาจพบตับโต ม้ามโต (เล็กน้อย)

(Enteric fever , สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

1.2.2 negative serum หมายถึง serum ที่ได้รับจาก นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ทำการตรวจโดยวิธี Widal's test แล้วให้ผล titer น้อยกว่า 80 จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยให้รหัสดังนี้

3.2.1 Anti-O titer 20 Anti-H titer 20

3.2.2 Anti-O titer 20 Anti-H titer 20

3.2.3 Anti-O titer 20 Anti-H titer 20

3.2.4 Anti-O titer 20 Anti-H titer 20

3.2.5 Anti-O titer 20 Anti-H titer 20

3.2.6 Anti-O titer 20 Anti-H titer 20

3.2.7 Anti-O titer 20 Anti-H titer 20

3.2.8 Anti-O titer 20 Anti-H titer 20

1.3 การเตรียมแอนติเจน

- นำเชื้อ *Salmonella* Typhi เป็นสายพันธ์ที่ได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ผ่านการทดสอบโดยการย้อมแกรม และ biochemical test แล้วว่าเป็น *Salmonella* Typhi มาเพาะเลี้ยงบน nutrient agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37°C

- ทำการ harvest เชื้อจาก agar แล้วทำเป็น cell suspension ในอัตราส่วนประมาณ 1:1 ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไป autoclave เป็นเวลา 15 นาที ที่ ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 ° C

- นำไป sonicate ที่ 20 kHz และ 125 w เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นปั่นตะกอนเซลทิ้งไป โดยปั่นที่ 20,000 g เป็นเวลา 10 นาที

- นำ supernatant หรือ crude extract ที่ได้มาแบ่งเป็น aliquot ละ 0.5 ml เก็บไว้ที่ -20° C เพื่อใช้เป็นแอนติเจนต่อไป

การตรวจสอบความเข้มข้นของ crude extract ที่ใช้เตรียมเป็นแอนติเจนด้วยวิธี Lowry's method

หลักการ การตรวจวัดโปรตีนโดยวิธี Lowry's method เป็นการวัดความเข้มข้นของโปรตีน โดยให้ทำปฏิกิริยากับ peptide nitrogen [S] ร่วมกับ copper [II] ions ภายใต้สภาวะ alkaline และริดิวส์ด้วย Folin-Ciocalteu วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยความยาวคลื่น 500 ถึง 750 nm สามารถวัดความเข้มข้นของโปรตีนได้ตั้งแต่ 2-200 µg (O.H. Lowry, 1951)

วิธีทำ

1. นำ antigen มาใส่ tube ๆ ละ 1 mL
2. เติม 5 mL ของ Lowry's Reagent ผสมให้เข้ากัน
3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
4. เติม 0.5 mL ของ Folin-Ciocalteu ผสมให้เข้ากัน
5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm

* หมายเหตุ ใช้น้ำกลั่นเป็น blank ถ้าได้ความเข้มข้นเกินค่าที่สามารถตรวจวัดได้ต้องทำการเจือจางตัวอย่างก่อนการตรวจวัด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1.4 วิธี indirect ELISA ที่เตรียมขึ้นเองสำหรับตรวจหา anti-*Salmonella typhi*

หลักการ

เป็นการทดสอบหา anti-*Salmonella* Typhi ที่มีอยู่ใน serum ของผู้ป่วย โดยทำปฏิกิริยากับ antigen (*Salmonella* Typhi antigen) ที่ตรึงอยู่บนผิวของ microtiter plate เมื่อเติม goat anti-human lgM peroxidase conjugate ก็จะไปเกิดปฏิกิริยา Ag-Ab complex เมื่อเติม substrate คือ O-phenylenediamine (OPD) ลงไปก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสี จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm โดยปริมาณความเข้มข้นของสีจะแปรผันโดยตรง กับปริมาณของ anti-*Salmonella* Typhi ใน serum ของผู้ป่วย

น้ำยาและสารเคมี

- Carbonate buffer pH 9.6
- Washing buffer PBS-0.05% Tween 20 (PBST)
- Blocking solution (BSA in PBS)
- Serum , conjugate diluent (1% BSA in PBS)
- Goat anti-human lgM peroxidase conjugtate (Zymed laboratories , South San Francisco)
- O-phenylenediamine (OPD) substrate solution (Zymed laboratories , South San Francisco)
- 3 N NaOH

วิธีทำ

การทดสอบหา anti-*Salmonella* Typhi โดยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำ checkerboard titration เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณ antigen ที่ใช้ coat plate การเจือจาง serum และการเจือจาง conjugate รวมทั้งความเหมาะสมของเวลา สำหรับการทดสอบแต่ละขั้นตอน ใช้อุณหภูมิในการทดสอบเป็น 37°C โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี indirect ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง โดยใช้ *Salmonella* Typhi เป็น antigen มีขั้นตอนดังนี้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1.4.1 การทดสอบเพื่อหา coating buffer ที่เหมาะสม

การยึดติด antigen บน microtiter plate สามารถใช้ coating buffer ต่าง ๆ เช่น TBS , carbonate buffer , PBS และ citric acid จึงต้องทำการทดสอบหา coating buffer ที่เหมาะสมในการเคลือบ *Salmonella* Typhi antigen ให้ติดกับ microtiter plate ได้ดี

Coat plate ด้วย *Salmonella* Typhi antigen ที่เจือจางใน coating buffer ต่าง ๆ ดังนี้ คือ TBS pH 7.5 , PBS pH 7. 1 , carbonate buffer pH 9.8 และ citric acid pH 4.2 ให้มีความเข้มข้นเป็น 15 µg/ml incubate ที่ 4 ° C นาน 16 – 24 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

Block non-specific binding โดยการเติม 4 % BSA ลงไปจำนวน 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม positive serum (3.1.8) และ negative serum (3.2.1) ที่dilute 1:200 ด้วย serum diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม conjugate (goat anti-human lgM peroxidase) ที่ dilute 1:1000 ด้วย conjugate diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม substrate O-phenylenediamine(OPD) 200 µL ที่อุณหภูมิห้อง, 30 นาที

↓

หยุดปฏิกิริยาด้วยด่าง 3 N NaOH 50 µL

↓

วัด OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA – READER

1.4.2 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antigen ที่ใช้ coat plate

จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 1.4.1 พบว่าในการ coat plate ควรใช้ carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer จากนั้นเป็นการหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมในการ coat plate ดังนี้

Coat plate ด้วย *Salmonella* antigen

โดยเจือจางใน carbonate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 , 40 µg / ml ที่ 4 °C นาน 16-24 ชั่งโมง หลุมละ 200 µL

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

Block non-specific binding โดยการเติม 4 % BSA ลงไปจำนวน 200 µL

incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม positive serum และ negative serum ที่dilute 1:200 ด้วย serum diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม conjugate (goat anti-human lgM peroxidase) ที่ dilute 1:1000 ด้วย conjugate diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม substrate O-phenylenediamine(OPD) 200 µL ที่อุณหภูมิห้อง, 30 นาที

↓

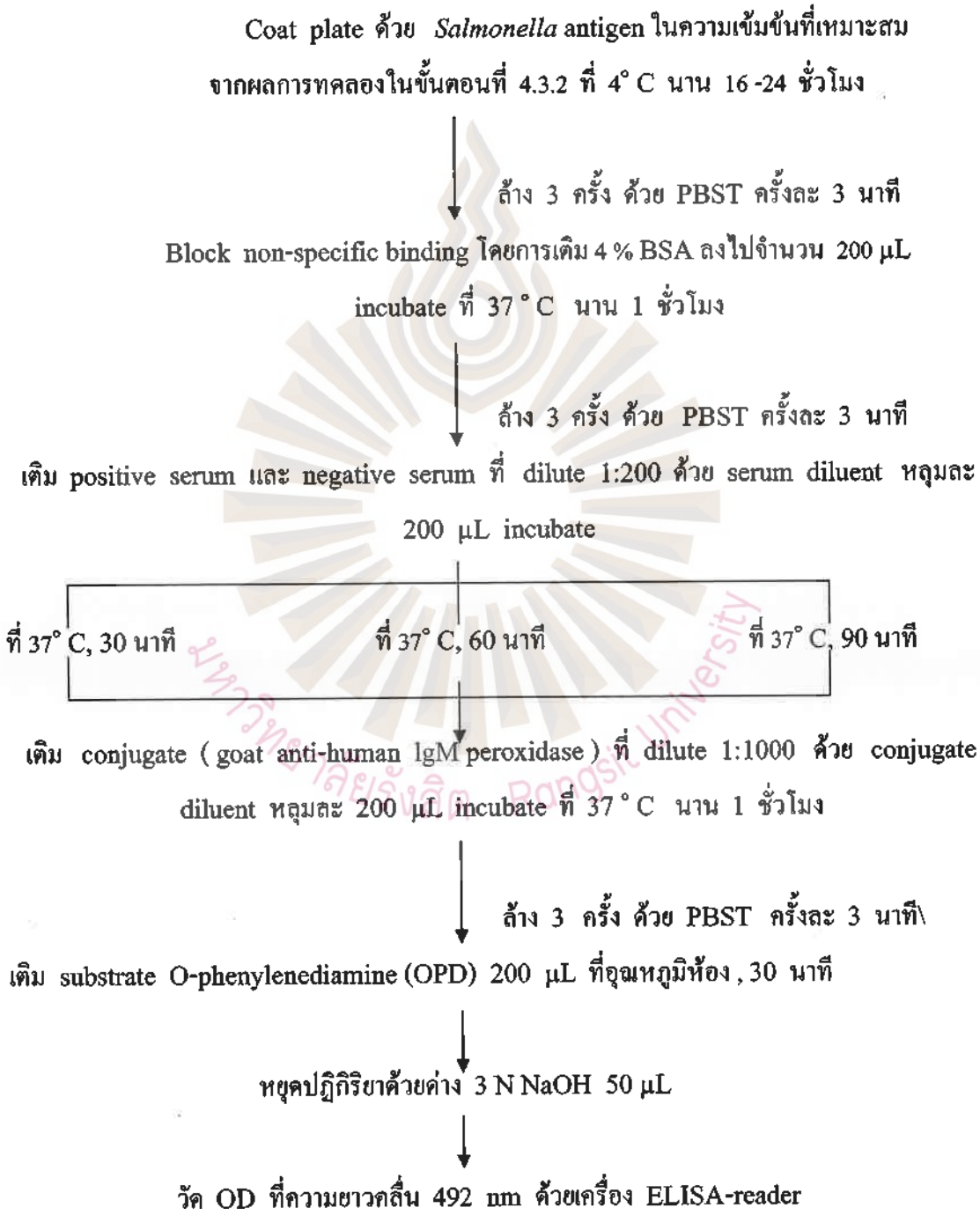
หยุดปฏิกิริยาด้วยด่าง 3 N NaOH 50 µL

↓

วัด OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA – READER

1.4.3 การทดสอบหาเวลาในการ incubate serum ที่เหมาะสม

เมื่อเลือก antigen ในการ coat plate ที่เหมาะสม จากผลในข้อ 1.4.2 ได้แล้ว ทำการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antigen ที่ใช้ coat plate



1.4.4 การหาเวลาในการ incubate conjugate ที่เหมาะสม

เมื่อเลือกเวลาในการ incubate serum ที่เหมาะสม จากผลการทดลองในข้อ 1.4.3 ได้แล้ว ทำการทดสอบหาเวลาในการ incubate conjugate ที่เหมาะสมโดยทำการทดสอบตามลำดับดังนี้

Coat plate ด้วย *Salmonella* antigen ในความเข้มข้นที่เหมาะสม
จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 4.3.2 ที่ 4° C นาน 16 -24 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

Block non-specific binding โดยการเติม 4 % BSA ลงไปจำนวน 200 µLincubate ที่ 37 ° C
นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม positive serum และ negative serum ที่ dilution 1:200 และเวลาที่เหมาะสม
จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 4.3.3

↓

เติม conjugate (goat anti-human lgM peroxidase)
ที่ dilute 1:1000 ด้วย diluent หลุมละ 200 µL

ที่ 37° C, 30 นาที	ที่ 37° C, 60 นาที	ที่ 37° C, 90 นาที

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 min

เติม substrate O-phenylenediamine (OPD) 200 µL ที่อุณหภูมิห้อง , 30 นาที

↓

หยุดปฏิกิริยาด้วยด่าง 3 N NaOH 50 µL

↓

วัด OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA-reader

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1.4.5 การทดสอบหา blocking solution ที่เหมาะสม

เมื่อทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 1.4.1, 1.4.2 ,1.4.3 และ 1.4.4 ได้เรียบร้อยแล้ว นำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวทำการทดสอบหา blocking solution ที่เหมาะสม

Coat plate ด้วย *Salmonella* antigen ในความเข้มข้นที่เหมาะสม
จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 4.3.2 ที่ 4° C นาน 16-24 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

Block non-specific binding โดยการเติม 2 % BSA , 4 % BSA และ 10% BSA ลงไป
จำนวน200 µl incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม positive serum และ negative serum ที่dilute 1:200 ด้วย serum diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม conjugate (goat anti-human lgM peroxidase) ที่ dilute 1:1000 ด้วย conjugate diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม substrate O-phenylenediamine(OPD) 200 µL ที่อุณหภูมิห้อง, 30 นาที

↓

หยุดปฏิกิริยาด้วยด่าง 3 N NaOH 50 µL

↓

วัด OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA – READER

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1.4.6 การทดสอบหาการเจือจาง serum ที่เหมาะสม

เมื่อเลือก antigen ในการ coat plate ที่เหมาะสม จากผลในข้อ 1.4.2 ได้แล้ว ในที่นี้คือ 30 μg/ml ทำการทดสอบการเจือจาง serum โดยทดสอบตามขั้นตอนต่อไปนี้

Coat plate ด้วย *Salmonella* antigen ในความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ 4° C นาน 16 -24 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

Block non-specific binding โดยการเติม 10 % BSA ลงไปจำนวน 200 μL

incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม positive serum และ negative serum ที่ dilute 1:50 , 1:100 , 1:200, 1:400, 1:800 ด้วย serum diluent หลุมละ 200 μL

↓

Incubate ที่ 37° C, 60 นาที

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม conjugate (goat anti-human lgM peroxidase) ที่ dilute 1:1000 ด้วย conjugate diluent หลุมละ 200 μL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม substrate O-phenylenediamine (OPD) 200 μL ที่อุณหภูมิห้อง , 30 นาที

↓

หยุดปฏิกิริยาด้วยด่าง 3 N NaOH 50 μL

↓

วัด OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA-reader

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.4.7 การหาการเจือจาง conjugate ที่ใช้ทดสอบที่เหมาะสม

เมื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสม จากผลการทดลองในข้อ 1.4.6 ได้แล้ว ทำการทดสอบขั้นตอนการเติม conjugate โดยทำการทดสอบตามลำดับดังนี้

Coat plate ด้วย *Salmonella* antigen ในความเข้มข้นที่เหมาะสม
ที่ 4° C นาน 16 -24 ชั่วโมง

↓ ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

Block non-specific binding โดยการเติม 10 % BSA ลงไปจำนวน 200 µl incubate ที่ 37 ° C
นาน 1 ชั่วโมง

↓ ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม positive serum และ negative serum ที่ dilution และเวลาที่เหมาะสม

↓

เติม conjugate (goat anti-human lgM peroxidase)
ที่ dilute 1:500 , 1:1000 , 1:2000 ด้วย diluent หลุมละ 200 µL

↓ Incubate ที่ 37° C, 60 นาที

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 min

↓

เติม substrate O-phenylenediamine (OPD) 200 µL ที่อุณหภูมิห้อง , 30 นาที

↓

หยุดปฏิกิริยาด้วยด่าง 3 N NaOH 50 µL

↓

วัด OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA-reader

1.4.8 การทดสอบหา Anti-*Salmonella* Typhi IgM ด้วยวิธี indirect ELISA ที่เตรียมขึ้น

เมื่อทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 1.4.1-1.4.6 ได้เรียบร้อยแล้ว นำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวทำการทดสอบกับ serum ต่าง ๆ ทั้งหมดรวม 16 ราย โดยมีขั้นตอนของการทำ ELISA สำหรับการใช้ *Salmonella* Typhi เป็น antigen ในการตรวจหา anti-*Salmonella* Typhi ดังต่อไปนี้

Coat plate ด้วย *Salmonella* Typhi antigen ที่เจือจางใน carbonate buffer pH 9.8 ให้มีความเข้มข้นเป็น 30 µg/ml incubate ที่ 4 °C นาน 16 – 24 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

Block non-specific binding โดยการเติม 10 % BSA ลงไปจำนวน 200 µL incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม positive serum และ negative serum ที่dilute 1:100 ด้วย serum diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม conjugate (goat anti-human IgM peroxidase) ที่ dilute 1:500 ด้วย conjugate diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม substrate O-phenylenediamine(OPD) 200 µL ที่อุณหภูมิห้อง , 30 นาที

หยุดปฏิกิริยาด้วยด่าง 3 N NaOH 50 µL

↓

วัด OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA – READER

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

หมายเหตุ

ในการทดสอบ จะทำการทดสอบ direct conjugate control (DCC) คือทำในหลุมที่ coat Salmonella antigen แต่ไม่ต้องทำการเติม serum แล้วทำขั้นตอนต่าง ๆ ตามปกติ และทำการทดสอบ substrate control คือทำในหลุมที่ coat Salmonella antigen แต่ไม่ต้องทำการเติม serum และ conjugate แล้วทำขั้นตอนต่าง ๆ ตามปกติ

1.5 Quality control สำหรับวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการควบคุมคุณภาพของการทดสอบแต่ละครั้งโดยการทำการทดสอบดังนี้

1.5.1 การทดสอบ sample แบบ duplicate

ในการตรวจหา anti-*Salmonella* Typhi ใน sample ต่าง ๆ ด้วยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง จะทำการทดสอบแต่ละ sample แบบ duplicate และทำการหาค่าเฉลี่ย OD เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในขั้นตอนต่อไป การทดสอบ sample แบบ duplicate จะเป็นการลดความคลาดเคลื่อน (error) ทำให้ค่าที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

1.5.2 การทดสอบเพื่อควบคุมผลของ conjugate

ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเองทุกครั้ง จะทำการทดสอบ direct comjugate control (DCC) เพื่อเป็นการควบคุม non specific binding ที่เกิดจาก conjugate ทำปฏิกิริยากับ antigen (*Salmonella* Typhi) หรือ solid phase (micrototer plate) โดยตรง และเพื่อบอกความผิดปกติของ conjugate ซึ่งทำการทดสอบ ในขั้นตอนการเติม serum จะเติม buffer แทน ส่วนขั้นตอนอื่นทำตามปกติ โดยทั่วไปค่า OD ของ DCC ของวิธี ELISA จะให้ค่าไม่เกิน 0.100 แสดงให้เห็นว่า การทดสอบครั้งนั้นไม่มี non specific binding ของ conjugate หากค่า OD ของ DCC สูงเกิน 0.100 ต้องทำการทดสอบใหม่ จากการทดสอบในครั้งนี้ไม่พบค่าสูงกว่า 0.100

1.5.3 การทดสอบเพื่อควบคุมผลของ substrate

ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเองทุกครั้ง จะทำการควบคุมผลของ substrate ซึ่งทำการทดสอบโดย หลุมที่เป็น substrate control (substrate blank) จะเติม buffer แทนขั้นตอนการเติม serum และ conjugate ส่วนขั้นตอนอื่น ๆ ทำตามปกติ การทดสอบ control

ชนิดนี้สามารถบอกความผิดปกติของการทดสอบได้ เช่น ถ้าพบว่า conjugate control ได้ค่า OD สูงขึ้น อาจเนื่องมาจากการมี non specific binding ของ conjugate จริง ๆ หรือเพราะ substrate มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเอง เมื่อเทียบผลที่เกิดจาก substrate control

1.6 การคำนวณผลการตรวจหา anti-*Salmonella* Typhi ด้วยวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง

ทำการคำนวณค่า OD ของการตรวจหา anti-*Salmonella* Typhi โดยวิธี ELISA ใน sample ต่าง ๆ ดังนี้

$$\text{ODของการตรวจหา anti-}\textit{Salmonella}\text{ Typhi} = \frac{\text{OD sample หลุมที่ 1} + \text{OD serum หลุมที่ 2}}{2}$$

ค่า OD ที่คำนวณได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ผลต่าง ๆ ต่อไป

2. **การสร้างเครื่องมือวัดภาคปฏิบัติ** (อุทุมพร, 2541)

เนื่องจากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เป็นการเปรียบเทียบ ทักษะความสามารถภาคปฏิบัติการของนักศึกษาที่ได้เรียนรู้จากสื่อการสอนที่สร้างขึ้น กับกลุ่มที่ยังไม่ได้เรียนรู้ จึงต้องมีการสร้างเครื่องมือวัดผลภาคปฏิบัติการ (performance test) ซึ่งมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

ขั้นตอนการสร้างเครื่องมือวัดภาคปฏิบัติ

ขั้นที่ 1 กำหนดขอบเขต

งานวิจัยนี้ต้องการสร้างเครื่องมือวัดผลสัมฤทธิ์ในการเรียนหัวข้อ การตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับภาวการณ์ติดเชื้อ *Salmonella* Typhi แบบเฉียบพลันของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ที่ลงเรียนวิชา clinical immunology โดยวัดความสามารถในด้านกระบวนการทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตลอดจนความรู้และความเข้าใจกระบวนการทดสอบดังกล่าว จึงจะดำเนินการสร้างเครื่องมือที่วัดความรู้ ความเข้าใจ และความสามารถด้านกระบวนการทำการทดสอบโดยการสังเกตของอาจารย์

ขั้นที่ 2 กำหนดวัตถุประสงค์ในการวัด

- แบบทดสอบ เพื่อวัดความรู้และความเข้าใจเทคนิค indirect ELISA
- แบบวัดผลภาคปฏิบัติการเป็นแบบสังเกต เพื่อวัดการเลียนแบบตามการสาธิต

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ขั้นที่ 3 กำหนดเนื้อหา

เนื้อหาที่ทำการวัดผลเป็นเรื่อง การตรวจวินิจฉัยภาวการณ์ติดเชื้อ *S. Typhi* แบบเฉียบพลันด้วยวิธี indirect ELISA

ขั้นที่ 4 กำหนดตารางโครงสร้าง ดังนี้

เนื้อหา	จุดมุ่งหมายการเลียนแบบตามการสาธิต (%)	คะแนน
Coating of antigen	10	1
Washing Step	10	1
Blocking of nonspecific binding	10	1
Incubation with serum	10	1
Incubation with conjugate	10	1
Substrate control	10	1
Conjugate control	10	1
Substrate	10	1
Stop reaction	10	1
Reading the results	10	1
	รวม 100%	10

ขั้นที่ 5 สร้างแบบทดสอบและแบบสังเกต ได้ดังนี้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

แบบสังเกตเพื่อวัดความสามารถด้านกระบวนการทำแบบทดสอบ

การตรวจวินิจฉัยภาวการณ์ติดเชื้อ *S.* Typhi แบบเฉียบพลันด้วยวิธี indirect ELISA

(ก่อน)

เนื้อหา	ใช่	ไม่ใช่
1. นักศึกษาสามารถ coat plate ได้		
2. นักศึกษาสามารถ wash plate ได้		
3. นักศึกษาสามารถ block nonspecific binding ได้		
4. นักศึกษาเตรียม serum และนำไปทดสอบได้		
5. นักศึกษาเตรียม conjugate และนำไปทดสอบได้		
6. นักศึกษาทำ substrate control ได้		
7. นักศึกษาทำ conjugate control ได้		
8. นักศึกษาเติม substrate และทดสอบได้		
9. นักศึกษาเติม stop reagent ได้		
10. นักศึกษาอ่านผลด้วย ELISA reader ได้		

(หลัง)

เนื้อหา	ใช่	ไม่ใช่
1. นักศึกษาสามารถ coat plate ได้		
2. นักศึกษาสามารถ wash plate ได้		
3. นักศึกษาสามารถ block nonspecific binding ได้		
4. นักศึกษาเตรียม serum และนำไปทดสอบได้		
5. นักศึกษาเตรียม conjugate และนำไปทดสอบได้		
6. นักศึกษาทำ substrate control ได้		
7. นักศึกษาทำ conjugate control ได้		
8. นักศึกษาเติม substrate และทดสอบได้		
9. นักศึกษาเติม stop reagent ได้		
10. นักศึกษาอ่านผลด้วย ELISA reader ได้		

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

แบบทดสอบวัดความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับ

การตรวจวินิจฉัยภาวการณ์ติดเชื้อ *S. Typhi* แบบเฉียบพลันด้วยวิธี indirect ELISA

(ก่อน)

1. สิ่งที่ coat ไปบน plate คือ.....
2. การทดสอบนี้เป็นการตรวจหา.....ในซีรั่มของผู้ป่วย
3. ขั้นตอนการเติม 10% BSA ใน PBS ทำเพื่ออะไร.....
4. ขั้นตอน Washing ทำเพื่อ.....
5. Conjugate ที่ใช้คือ.....
6. Substrate control ควรให้ผลเป็นสีเข้มหรือสีขาว.....
7. Conjugate control ควรให้ผลเป็นสีเข้มหรือสีขาว.....
8. น้ำยาที่ใช้เป็น substrate คือ.....
9. น้ำยาที่ใช้เป็น stop reagent คือ.....
10. ผลที่เกิดขึ้นเป็นสีอะไร.....และอ่านผลด้วยเครื่องมือ.....

(หลัง)

1. สิ่งที่ coat ไปบน plate คือ.....
2. การทดสอบนี้เป็นการตรวจหา.....ในซีรั่มของผู้ป่วย
3. ขั้นตอนการเติม 10% BSA ใน PBS ทำเพื่ออะไร.....
4. ขั้นตอน Washing ทำเพื่อ.....
5. Conjugate ที่ใช้คือ.....
6. Substrate control ควรให้ผลเป็นสีเข้มหรือสีขาว.....
7. Conjugate control ควรให้ผลเป็นสีเข้มหรือสีขาว.....
8. น้ำยาที่ใช้เป็น substrate คือ.....
9. น้ำยาที่ใช้เป็น stop reagent คือ.....
10. ผลที่เกิดขึ้นเป็นสีอะไร.....และอ่านผลด้วยเครื่องมือ.....

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3. สถิติ

งานวิจัยนี้ใช้ pair t test ในการเปรียบเทียบคะแนนของผู้เรียนก่อนและหลังการชมการสาธิตและฝึกการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แบบทดสอบความรู้และความเข้าใจ 1 แบบ (10 ข้อ) และแบบสังเกตทักษะกระบวนการทำการทดสอบเพื่อวัดการเลียนแบบ 1 แบบ (10 ข้อ)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3
ผลการทดลอง

1. **ผลการสร้างชุดทดสอบ** indirect ELISA **สำหรับการตรวจโรคติดเชื้อ** *S.* **Typhi**

เมื่อทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 1.4.1-1.4.6 ได้เรียบร้อยแล้ว จะได้ สภาวะที่เหมาะสมในการทำการทดสอบกับ serum ต่าง ๆ โดยมีขั้นตอนของการทำ indirect ELISA ในการตรวจหา anti-*Salmonella* Typhi เป็นดังนี้

Coat plate ด้วย *Salmonella* Typhi antigen ที่เจือจางใน carbonate buffer pH 9.8 ให้มีความเข้มข้นเป็น 30 µg/ml incubate ที่ 4 ° C นาน 16 – 24 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

Block non-specific binding โดยการเติม 10 % BSA ลงไปจำนวน 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม positive serum และ negative serum ที่dilute 1:100 ด้วย serum diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม conjugate (goat anti-human lgM peroxidase) ที่ dilute 1:500 ด้วย conjugate diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 ° C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม substrate O-phenylenediamine(OPD) 200 µL ที่อุณหภูมิห้อง , 30 นาที

หยุดปฏิกิริยาด้วยด่าง 3 N NaOH 50 µL

↓

วัด OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA – READER

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2. ผลการพัฒนาทักษะของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ในการฝึกการตรวจภาวะการติดเชื้อ *S.* Typhi ด้วยชุดตรวจ indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นเอง

ภายหลังจากการบรรยายเรื่อง การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ *S.* Typhi และให้นักศึกษาเทคนิคการแพทย์จำนวน 19 คน ได้ศึกษาจากคู่มือการทำแบบทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA จากนั้นให้นักศึกษาทำแบบทดสอบวัดความรู้ และประเมินตนเองด้านทักษะตรวจและบันทึกผลคะแนนที่ได้รับ

จากนั้นให้นักศึกษาลงมือปฏิบัติการตรวจ *S.* Typhi ด้วยวิธี indirect ELISA ด้วยตนเองโดยมีอาจารย์ให้คำแนะนำ และอาจมีการสาธิตวิธีการทำประกอบด้วยในบางขั้นตอน เช่น การล้าง plate, การอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader เป็นต้น จากนั้นให้นักศึกษาทำแบบทดสอบวัดความรู้และให้อาจารย์ประเมินทักษะการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA โดยการสังเกต ตรวจและบันทึกผลคะแนนที่ได้รับ

นักศึกษาได้คะแนนเฉลี่ยด้านความรู้ความเข้าใจก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติเป็น 3.6 คะแนน และ 9.2 คะแนน จากคะแนนเต็ม 10 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับคะแนนเฉลี่ยด้านทักษะก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติมีค่าเป็น 3.4 คะแนน และ 9.8 คะแนน จากคะแนนเต็ม 10 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อทำการเปรียบเทียบคะแนนก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติของนักศึกษาด้านความรู้ความเข้าใจและด้านทักษะ ด้วยวิธี pair t test พบว่าหลังการฝึกปฏิบัตินักศึกษามีความรู้ความเข้าใจมากกว่าก่อนการฝึกปฏิบัติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p น้อยกว่า 0.05 ดังตารางที่ 1 และ 2

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 1 แสดงค่าคะแนนของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์จำนวน 19 คน ก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติเมื่อทำแบบทดสอบวัดความรู้และความเข้าใจ

นักศึกษาคนที่	คะแนนก่อนฝึก	คะแนนหลังฝึก
1	5	10
2	3.5	9
3	4.5	8.5
4	3.5	9.5
5	4	10
6	2.5	8.5
7	3	9.5
8	4	8
9	3.5	8.5
10	3.5	9.5
11	5	9
12	3.5	9.5
13	5	9.5
14	4	10
15	2.5	9.5
16	3	9
17	3	9
18	4	10
19	2	8
ค่าเฉลี่ย	**3.6**	**9.2**
ค่า p-value	**1.9×10^{-16}**	

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 2 แสดงค่าคะแนนของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์จำนวน 19 คน ก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติเมื่อทำการประเมินทักษะ

นักศึกษาคนที่	คะแนนก่อนฝึก	คะแนนหลังฝึก
1	5	10
2	0	10
3	4	10
4	5	10
5	4	10
6	3	10
7	4	10
8	3	10
9	4	10
10	5	10
11	2	10
12	5	10
13	1	10
14	4	7
15	5	10
16	4	10
17	0	9
18	3	10
19	3	10
ค่าฉลี่ย	**3.4**	**9.8**
ค่า p-value	**1.5×10^{-12}**	

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสร้างชุดทดสอบ indirect ELISA สำหรับการตรวจโรคติดเชื้อ *S.* Typhi

สภาวะที่เหมาะสมของการการพัฒนาชุดตรวจ indirect ELISA สำหรับการตรวจภาวะการติดเชื้อ *Salmonella* Typhi โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ที่ให้ผลสูงสุด

4.1.1 Coating buffer 4 ชนิด ได้แก่ TBS , carbonate buffer , PBS และ citric acid เมื่อนำ Antigenไปเจือจาง เป็น 15 µg/ml แล้วเมื่อทดสอบด้วย positive serum และ negative serum ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:200 จะพบว่าค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm มีความต่างของ positive serum และ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer นอกจากนี้ยังพบว่าค่าของ substrate control และ conjugate control มีค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ไม่เกิน 0.100

4.1.2 ทำการเจือจาง antigen ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 , 40 µg / ml ด้วย carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer แล้วเมื่อทดสอบด้วย positive serum และ negative serum ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:200 จะพบว่าค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm มีความต่างของ positive serum และ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้น antigen ที่ 30µg / ml นอกจากนี้ยังพบว่าค่าของ substrate control และ conjugate control มีค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ไม่เกิน 0.100

4.1.3 เวลาในการ incubate หลังขั้นตอนการเติม serum ที่ 37 °C เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้คือ 30 , 60 และ 90 นาที และเมื่อใช้ carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer ด้วยความเข้มข้น antigenที่ 30 µg / ml แล้วเมื่อทดสอบด้วย positive serum และ negative serum ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:200 จะพบว่าค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm มีความต่างของ positive serum และ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อใช้เวลาในการ Incubate เป็น 90 นาทีแต่เวลาในการ Incubate ที่ 90 นาที และ 60 นาทีมีค่าไม่แตกต่างกันมากนักเราจึงเลือกใช้เวลาในการ Incubateที่60 นาทีเพื่อเป็นการประหยัดเวลานอกจากนี้ยังพบว่าค่าของ substrate control และ conjugate control มีค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ไม่เกิน 0.100

4.1.4 เวลาในการ incubate หลังขั้นตอนการเติม conjugateที่ 37 °C เป็นเวลาต่างๆดังนี้คือ 30,60 และ 90 นาที และเมื่อใช้ carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer ด้วยความเข้มข้น antigen ที่ 30µg / ml แล้วเมื่อทดสอบด้วย positive serum และ negative serum ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:200 เมื่อใช้เวลาในการ incubate หลังขั้นตอนการเติม serum เป็น 60 นาที ที่ 37 °C จะพบว่าค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm มีความต่างของ positive serum และ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อใช้เวลาในการ incubate หลังขั้นตอนการเติม conjugate ที่ 37 °C เป็น 90 นาทีแต่เวลาในการ incubateที่ 90 นาที และ60 นาที มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักเราจึงเลือกใช้เวลาในการ incubate ที่60 นาทีเพื่อเป็นการประหยัดเวลานอกจากนี้ยังพบว่าค่าของ substrate control และ conjugate control มีค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ไม่เกิน 0.100

4.1.5 Blocking solution ที่ทดสอบมี 3 ชนิดได้แก่ 2%BSA, 4%BSA, 10%BSA และเมื่อใช้ Carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer ด้วยความเข้มข้น antigen ที่ 30µg / ml แล้วเมื่อทดสอบด้วย positive serum และ negative serum ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:200 เมื่อใช้เวลาในการ incubate หลังขั้นตอนการเติม serum เป็น 60 นาที และ incubate หลังขั้นตอนการเติม conjugate ที่ 37 °C เป็น 60 นาที จะพบว่าค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm มีความต่างของ positive serum และ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ 10% BSA เป็น blocking solution นอกจากนี้ยังพบว่าค่าของ substrate control และ conjugate control มีค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ไม่เกิน 0.100

4.1.6 ทำการเจือจาง serum ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1:50 , 1:100 , 1:200 , 1:400 ใช้ carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer ด้วยความเข้มข้น antigenที่ 30µg / ml ใช้เวลาในการ incubate หลังขั้นตอนการเติม serum เป็น 60 นาที และ incubate หลังขั้นตอนการเติม conjugate ที่ 37 °C เป็น 60 นาทีใช้ 10% BSA เป็น blocking solution จะพบว่าค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm มีความต่างของ positive serum และ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ serum ทำการเจือจางที่ความเข้มข้นที่ 1:50 และค่าที่มีค่าสูงรองลงมาคือ 1:100 ดังนั้นเราจึงเลือกใช้ serum ทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 1:100 เนื่องจาก serum ทำการเจือจางที่ความเข้มข้นที่ 1:50 จะมีปัญหาในกรณีที่ผู้ป่วยมีค่าของ IgM สูงจะทำให้ค่าที่ได้เกินค่าที่ทำการทดสอบ เพื่อ

เป็นการตัดปัญหานี้จึงเลือกที่จะเจือจาง serum ที่ความเข้มข้น 1:100 นอกจากนี้ยังพบว่าค่าของ substrate control และ conjugate control มีค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ไม่เกิน 0.100

4.1.7 ทำการเจือจาง conjugate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1:500 , 1:1000 , 1:2000 ใช้ carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer ด้วยความเข้มข้น antigen ที่ 30µg / ml ใช้เวลาในการ incubate หลังขั้นตอนการเติม serum เป็น 60 นาที และ incubate หลังขั้นตอนการเติม conjugate ที่ 37 °C เป็น 60 นาทีใช้ 10%BSA เป็น blocking solution เจือจาง serum ที่ความเข้มข้น 1:100 จะพบว่าค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm มีความต่างของ positive serum และ negative serum มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ conjugate ทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 1:500 นอกจากนี้ยังพบว่าค่าของ substrate control และ conjugate control มีค่าของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ไม่เกิน 0.100

4.2 การพัฒนาทักษะของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ในการตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ *S. Typhi* ด้วยวิธี indirect ELISA

ภายหลังจากการบรรยายเรื่อง การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ *S. Typhi* และให้นักศึกษาเทคนิคการแพทย์จำนวน 19 คน ได้ศึกษาจากคู่มือการทำแบบทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA จากนั้นให้นักศึกษาทำแบบทดสอบวัดความรู้ และประเมินตนเองด้านทักษะตรวจและบันทึกผลคะแนนที่ได้รับ จากนั้นให้นักศึกษาลงมือปฏิบัติการตรวจ *S. Typhi* ด้วยวิธี indirect ELISA ด้วยตนเองโดยมีอาจารย์ให้คำแนะนำ และอาจมีการสาธิตวิธีการทำประกอบด้วยในบางขั้นตอน เช่น การล้าง plate, การอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader เป็นต้น จากนั้นให้นักศึกษาทำแบบทดสอบวัดความรู้ และให้อาจารย์ประเมินทักษะการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA โดยการสังเกต ตรวจและบันทึกผลคะแนนที่ได้รับนั้น พบว่านักศึกษามีความรู้ความเข้าใจมากขึ้นหลังจากได้ฝึกปฏิบัติจริงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ p value น้อยกว่า 0.05 โดยนักศึกษาได้คะแนนเฉลี่ยด้านความรู้ความเข้าใจก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติเป็น 3.6 คะแนน และ 9.2 คะแนน ตามลำดับ

นอกจากนี้พบว่านักศึกษามีทักษะในการทำการทดสอบดีมากขึ้นหลังจากได้ฝึกปฏิบัติจริงในทุกขั้นตอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value น้อยกว่า 0.05 โดยคะแนนเฉลี่ยด้านทักษะก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติมีค่าเป็น 3.4 คะแนน และ 9.2 คะแนน ตามลำดับ

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าการฝึกนักศึกษาด้วยชุดตรวจจริงโดยนักศึกษาได้มีโอกาสทำในทุกขั้นตอนทำให้นักศึกษาเกิดความเข้าใจและเกิดทักษะมากขึ้น

บรรณานุกรม

อุทุมพร จามรมาน. จุดมุ่งหมายของการศึกษา. ห้างหุ้นส่วนจำกัด พัชนีพับบลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ. 2531.

อุทุมพร จามรมาน. การสร้างและพัฒนาเครื่องมือวัดลักษณะผู้เรียน, ห้างหุ้นส่วนจำกัด พัชนีพับบลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ. 2541.

กนก ศิริพานิชกร และคณะ . โรคติดเชื้อ Infectious Disease . กรุงเทพ.2541:246-254

ความรู้เรื่องโรคไข้ไทฟอยด์, สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

นิภา จรูญเวสม์ และคณะ . โรคเขตร้อน . โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ ฯ . 2532 ;315-316

เบญจวรรณ รุ่งปีตะรังสี , วิชัย รุ่งปีตะรังสี . ซัลโมแนลลาแอกกลูตินินในคนไทย . สารศิริราช 2519;28:1384.

ประภาวดี ดิษยาธิคม.โรคไข้ทัยฟอยด์ และ พาราทัยฟอยด์ (Enteric Fever) .สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข งาน Phage Typing กลุ่มงานบักเตรีทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ศรีลักษณ์ สิมะเสถียร . รายงานผู้ป่วยโรคไข้รากสาดน้อยของแผนกกุมาร ฯ โรงพยาบาลพระมงกุฎ ในระยะเวลา 3 ปี . วิทยาสารเสนารักษ์ 2517;27:24

Enteric fever , สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวก ก
น้ำยาและสารเคมี

1.วิธีเตรียมสารละลายสำหรับการตรวจหาความเข้มข้นแอนติเจน Lowry's method

Reagent A

$CuSO_4$*5 H_2O	0.50	gm.
Na-tartrate	1.00	gm.
Na_2CO_3	10.0	gm.

วิธีเตรียม

1. ละลาย $CuSO_4$*5 H_2O และ Na-tartrate ในน้ำกลั่นปริมาตรรวม 500 mL
2. ละลาย Na_2CO_3 ในน้ำกลั่นปริมาตรรวม 500 mL
3. ค่อย ๆ เติมสารละลาย Na_2CO_3 ลงในส่วนผสมของ $CuSO_4$*5 H_2O และ Na-tartrate
4. เก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 1 ปี

Reagent $A_{activated}$ (working Reagent A)

Reagent A	1	ปริมาตร
5 % SDS	2	ปริมาตร
0.8 M NaOH	1	ปริมาตร

เตรียมแล้วเก็บไว้ได้นาน 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง

Reagent B

2 N Folin-Ciocalteu Phenol reagent	1	ปริมาตร
น้ำกลั่น	5	ปริมาตร

วิธีเตรียม

1. เจือจาง standard BSA ให้เป็น 10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 60 , 70 , 80 , 90 , 100 µg/ml เพื่อใช้เป็น Working BSA
2. นำ Working BSA มาใส่ tube ๆ ละ 1 mL

3. เติม 5 ml ของ Reagent $A_{activated}$ (working Reagent A)ผสมให้เข้ากัน

4 .ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

5. เติม 0.5 mL ของ Reagent B ผสมให้เข้ากัน

6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm

2. การเตรียมน้ำยาสำหรับ ELISA

Coating buffer

Carbonate - bicarbonate buffer , pH 9.6

Na_2CO_3	1.59	gm.
$NaHCO_3$	2.93	gm.

วิธีเตรียม

1. ละลายส่วนประกอบทั้งสองชนิดตามลำดับในน้ำกลั่นปริมาตร 800 mL
2. ปรับ pH เป็น 9.6 ด้วย 1N HCL หรือ 1 N NaOH
3. ปรับปริมาตรสุดท้ายในน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร
4. เก็บที่อุณหภูมิ 4 ° C

Blocking solution

4 % BSA-PBS

NaH_2PO_4 anhydrous	0.23	gm.
$NaHPO_4$ anhydrous	1.15	gm.
NaCl	9.00	gm.
BSA	4.00	gm.

วิธีเตรียม

1. ละลายส่วนประกอบทั้งสามชนิดแรกตามลำดับในน้ำกลั่นปริมาตร 800 mL

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2. ปรับ pH เป็น 7.2 (หรือ 7.4 ตามต้องการ) ด้วย 1N HCL หรือ 1 N NaOH
3. ปรับปริมาตรสุดท้ายในน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร
4. นำ BSA 4 กรัม มาละลายใน PBS ที่เตรียมได้จากข้อ 3. ปริมาตร 80 mL จนละลายหมด
5. ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย PBS ที่เตรียมได้จากข้อ 3 เป็น 100 mL
6. เก็บที่อุณหภูมิ 4 ° C

Diluent solution

1 % BSA-PBS

NaH_2PO_4 anhydrous	0.23	gm.
$NaHPO_4$ anhydrous	1.15	gm.
NaCl	9.00	gm.
BSA	1.00	gm.

วิธีเตรียม

1. ละลายส่วนประกอบทั้งสามชนิดแรกตามลำดับในน้ำกลั่นปริมาตร 800 mL
2. ปรับ pH เป็น 7.2 (หรือ 7.4 ตามต้องการ) ด้วย 1N HCL หรือ 1 N NaOH
3. ปรับปริมาตรสุดท้ายในน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร
4. นำ BSA 1 กรัม มาละลายใน PBS ที่เตรียมได้จากข้อ 3. ปริมาตร 80 mL จนละลายหมด
5. ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย PBS ที่เตรียมได้จากข้อ 3 เป็น 100 mL
6. เก็บที่อุณหภูมิ 4 ° C

Washing buffer

PBST (PBS tween 20)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

NaH_2PO_4 anhydrous	0.23	gm.
$NaHPO_4$ anhydrous	1.15	gm.
NaCl	9.00	gm.
Tween 20	0.50	mL

วิธีเตรียม

1. ละลายส่วนประกอบทั้งสามชนิดแรกตามลำดับในน้ำกลั่นปริมาตร 800 mL
2. ปรับ pH เป็น 7.2 (หรือ 7.4 ตามต้องการ) ด้วย 1N HCl หรือ 1 N NaOH
3. ปรับปริมาตรสุดท้ายในน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร
4. เติม Tween 20 ลงไป 0.50 mL
5. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Sustrate

OPD (O-phenylene diamine)

OPD	30.0	gm.
0.05 M Citrate buffer pH 5.0	30.0	mL
30 % H_2O_2	50.0	µL

หมายเหตุ

1. การเติม 30 % H_2O_2 ให้ทำเมื่อจะเริ่มทำปฏิกิริยาเท่านั้น
2. สีที่เกิดขึ้นเป็นสีน้ำตาล เมื่อหยุดปฏิกิริยาด้วย 3 N NaOH อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 492 nm

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Stop solution

3 N NaOH

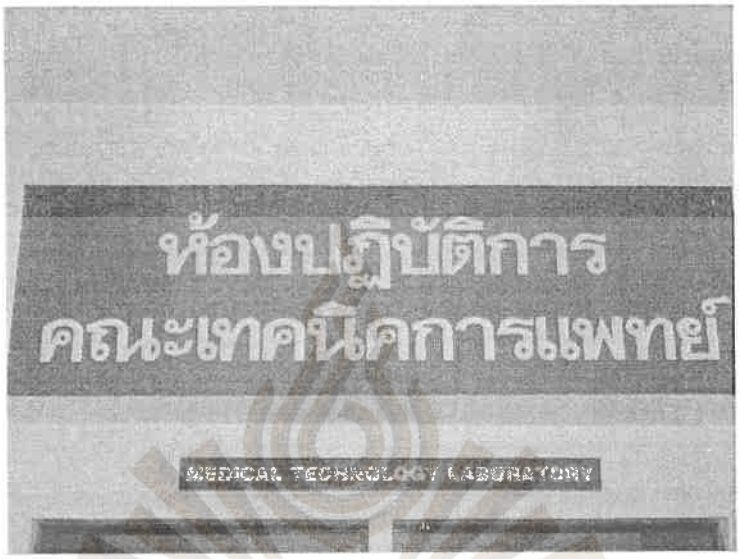
6 N NaOH	1 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน

วิธีเตรียม

นำส่วนผสมทั้งสองชนิดผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

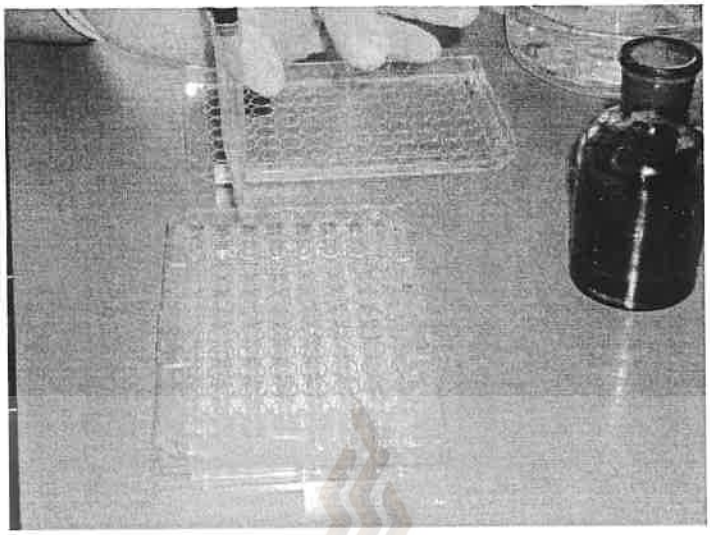
ภาคผนวก ข
ภาพแสดงขั้นตอนต่าง ๆ ในการทดสอบ



แสดงสถานที่ทำการทดลอง

แสดงน้ำยาและสารเคมีต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

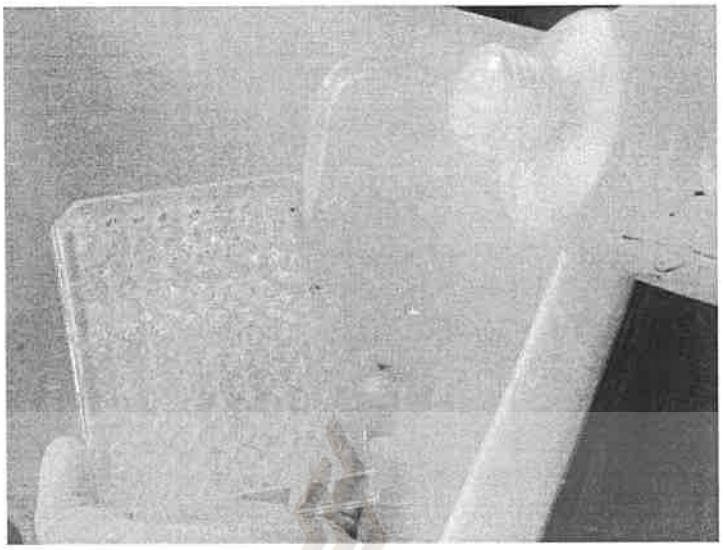
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



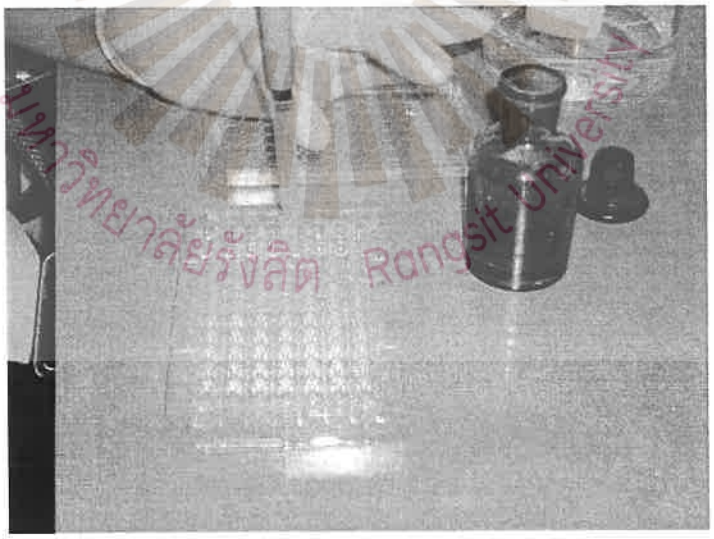
แสดงขั้นตอนการ coat antigen

แสดงขั้นตอน incubate plate

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



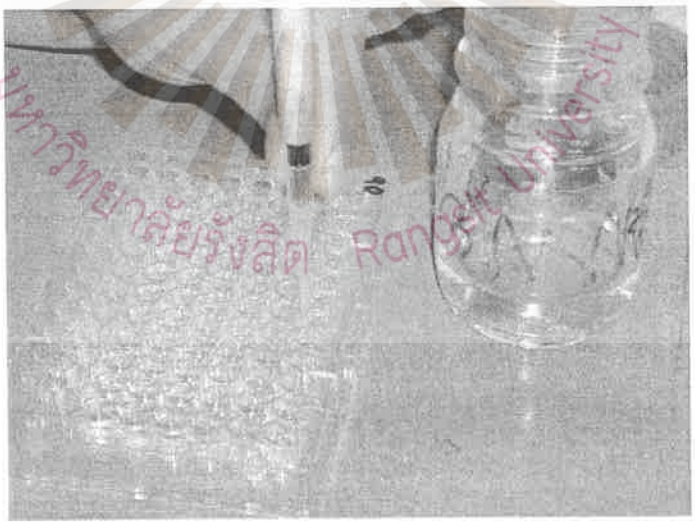
แสดงขั้นตอนการล้าง plate ด้วย PBST



แสดงขั้นตอนการเติม conjugate

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

แสดงขั้นตอนการเติม substrate



แสดงขั้นตอนการ stop reaction

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

แสดงขั้นตอนการวัดโดยเครื่อง ELISA reader

ภาพแสดงผลการทดลอง

ห้องสมุดวิทยาลัย Rangsit University

ภาคผนวก ค

สรุปย่องานวิจัย

ชื่อโครงการ การพัฒนาทักษะของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ในการฝึกการตรวจภาวะการติดเชื้อ *Salmonella typhi* ด้วยชุดตรวจ indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นเอง

Development of Medical Technology students' skill in diagnosis of *Salmonella* Typhi by using in house indirect ELISA test

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.วิมล ขอบชื่นชม, นางสาวสุรสา ลิมาคม, นางสาวชนิษฐา เลี้ยงบำรุง, นางสาวศรินธร รักษ์มณี และนายสุรสิทธิ์ สุวรรณสินธุ์

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยได้ดำเนินการสร้างสื่อการสอนสำหรับวิชา Clinical Immunology เรื่อง การตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ *Salmonella* Typhi คือ ชุดตรวจ Indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นเอง จากนั้นนำชุดทดสอบดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาทักษะการตรวจ Indirect ELISA ของนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ จำนวน 19 คน เมื่อทำการเปรียบเทียบ ความรู้ ความเข้าใจ ด้วยแบบทดสอบ และประเมินทักษะด้วยการสังเกตเพื่อวัดความสามารถด้านกระบวนการทำการทดสอบ ก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติด้วยตนเองของนักศึกษาพบว่าด้านความรู้ ความเข้าใจของนักศึกษาหลังการฝึกปฏิบัติจริงด้วยตนเองมีคะแนนสูงกว่าก่อนการปฏิบัติจริง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการประเมินทักษะความสามารถด้านกระบวนการทดสอบหลังการฝึกปฏิบัติจริง มีค่าคะแนนมากกว่าก่อนการฝึกปฏิบัติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 (p-value <0.05) แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาชุดตรวจ Indirect ELISA เพื่อให้นักศึกษาได้มีโอกาสฝึกปฏิบัติจริงสามารถช่วยพัฒนาทักษะความรู้ และความเข้าใจของนักศึกษาเกี่ยวกับการตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA

Abstract

We have developed the in-house indirect ELISA for serological diagnosis of recent *Salmonella* Typhi infection. These materials were used for the study of improvement of the indirect ELISA testing skill of nineteen medical technology students. These students were tested their knowledge and skill in indirect ELISA testing before and after laboratory training by using the developed teaching materials. The comparative study of knowledge and testing skill which evaluated by using examination paper and skill evaluation form, respectively were conducted by comparing their pre- and post- test scores. And it was found that the students' post- test scores of knowledge and skill in indirect ELISA testing after training by using the developed indirect ELISA were significant higher than the pre-test score at 95% confidence level (p-value < 0.05). This result revealed that the students' knowledge and skills in indirect ELISA testing could be improved by using the developed indirect ELISA as teaching materials.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

คำรหัส

นักศึกษาเทคนิคการแพทย์

Salmonella Typhi

indirect ELISA

บทนำ

โดยที่คณะเทคนิคการแพทย์ได้เปิดการสอน วิชา Clinical Immunology โดยมีนักศึกษาลงทะเบียนเรียนเป็นจำนวนมาก (ประมาณ 100 คนต่อชั้นเรียน) แต่งบประมาณในการจัดซื้อวัสดุการศึกษามีจำนวนจำกัด ในปัจจุบันจึงไม่สามารถทำการฝึกปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี indirect ELISA ได้เลย เนื่องจากเป็นชุดทดสอบที่มีราคาแพง

ไข้ไทฟอยด์เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า *Salmonella* Typhi เชื้อนี้จะอยู่ในน้ำและอาหาร หากการสาธารณะสุขดีการระบาดของเชื้อนี้จะลดลงคนจะรับเชื้อนี้จากการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนเชื้อโรค คนที่เป็นโรคจะขับถ่ายเชื้อออกทางอุจาระ เชื้อนี้อาจจะปนเปื้อนในน้ำตามธรรมชาติ หรืออาจจะปนเปื้อนอาหาร ผู้ป่วยบางคนจะมีเชื้อในร่างกายที่เรียก carrier ซึ่งสามารถขับเชื้อออกสิ่งแวดล้อมได้ตลอดเวลาโดยที่ไม่มีอาการเมื่อคนได้รับเชื้อ เชื้อจะเข้าสู่ลำไส้ ต่อมน้ำเหลือง ตับ ม้าม โดยทางกระแสเลือด (นิภา จรูญเวสม์ และคณะ 2532)ดังนั้นการตรวจหาว่าเป็นโรคไทฟอยด์หรือไม่ คือการตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิต แต่เนื่องจากโอกาสที่จะตรวจพบตัวเชื้อเป็นไปได้ยาก ปัจจุบันจึงนิยมใช้การตรวจหา antibody ต่อเชื้อ *S.* Typhi แทนแต่เนื่องจากโดยปกติอาจพบ antibody ต่อเชื้อ *S.* Typhi แบบ total ได้ ดังนั้นการตรวจหาการติดเชื้อจึงต้องเป็นการตรวจหา antibody ต่อเชื้อ *S.* Typhi class IgM (กนก ศิริพานิชกร และคณะ 2541)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะพัฒนาชุดตรวจ indirect ELISA เพื่อตรวจหา antibody ต่อเชื้อ *S.* Typhi class IgM ขึ้นเพื่อสามารถตรวจ recent infection โดยสามารถนำการทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้สอนร่วมกับการใช้เทคนิค Widal test ที่มีความไวและความจำเพาะต่ำ (เบญจวรรณ 2519) โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชุดทดสอบสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *S.* Typhi ที่มีประสิทธิภาพดี ราคาถูก สามารถแยกภาวะ recent infection ได้ สามารถใช้เป็นอุปกรณ์การศึกษาในวิชา Clinical Immunology นักศึกษาทุกคนจะได้มีโอกาสฝึกปฏิบัติโดยใช้ชุดตรวจที่สามารถตรวจหา recent infection ได้จริง โดยภายหลังจากการสร้างชุดทดสอบแล้ว จะได้มีการนำไปใช้ฝึกปฏิบัติให้กับนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ เพื่อวัดความสามารถด้านความรู้ความเข้าใจ และทักษะในเรื่องการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี indirect ELISA ว่านักศึกษามีความรู้ความเข้าใจและทักษะมากขึ้นหรือไม่

วิธีการดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง ประชากรคือ นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 3 มีจำนวน 115 คน กลุ่มตัวอย่าง เป็นนักศึกษาที่มีความประสงค์ในการฝึกเพิ่มเติมจำนวน 19 คน

วิธีการวิจัย

1. **การเตรียมชุดตรวจ indirect ELISA สำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *S.* Typhi**

ทดสอบหา สภาวะที่เหมาะสมสำหรับ indirect ELISA ในการตรวจหา anti-*Salmonella* Typhi ได้ดังนี้

Coat plate ด้วย *Salmonella* Typhi antigen ที่เจือจางใน carbonate buffer pH 9.8 ให้มีความเข้มข้นเป็น 30 µg/ml incubate ที่ 4 °C นาน 16 – 24 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

Block non-specific binding โดยการเติม 10 % BSA ลงไปจำนวน 200 µL incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม positive serum และ negative serum ที่dilute 1:100 ด้วย serum diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม conjugate (goat anti-human IgM peroxidase) ที่ dilute 1:500 ด้วย conjugate diluent หลุมละ 200 µL incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง

↓

ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST ครั้งละ 3 นาที

เติม substrate O-phenylenediamine(OPD) 200 µL ที่อุณหภูมิห้อง , 30 นาที

↓

หยุดปฏิกิริยาด้วยด่าง 3 N NaOH 50 µL

↓

วัด OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA – READER

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2. **การสร้างเครื่องมือวัดภาคปฏิบัติ** (อุทุมพร, 2531, อุทุมพร, 2541)

เนื่องจากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เป็นการเปรียบเทียบ ทักษะความสามารถภาคปฏิบัติการของนักศึกษาที่ได้เรียนรู้จากสื่อการสอนที่สร้างขึ้น กับกลุ่มที่ยังไม่ได้เรียนรู้ จึงต้องมีการสร้างเครื่องมือวัดผลภาคปฏิบัติการ (Performance test) ซึ่งมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

ขั้นที่ 1 กำหนดขอบเขต

งานวิจัยนี้ต้องการสร้างเครื่องมือวัดผลสัมฤทธิ์ในการเรียนหัวข้อ การตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับภาวการณ์ติดเชื้อ *Salmonella* **Typhi** แบบเฉียบพลันของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ที่ลงเรียนวิชา Clinical Immunology โดยวัดความสามารถในด้านกระบวนการทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตลอดจนความรู้และความเข้าใจกระบวนการทดสอบดังกล่าว จึงจะดำเนินการสร้างเครื่องมือที่วัดความรู้ ความเข้าใจ และความสามารถด้านกระบวนการทำการทดสอบโดยการสังเกตของอาจารย์

ขั้นที่ 2 กำหนดวัตถุประสงค์ในการวัด

- แบบทดสอบ เพื่อวัดความรู้และความเข้าใจเทคนิค indirect ELISA
- แบบวัดผลภาคปฏิบัติการเป็นแบบสังเกต เพื่อวัดการเลียนแบบตามการสาธิต

ขั้นที่ 3 กำหนดเนื้อหา

เนื้อหาที่ทำการวัดผลเป็นเรื่อง การตรวจวินิจฉัยภาวการณ์ติดเชื้อ *S.* **Typhi** แบบเฉียบพลันด้วยวิธี indirect ELISA

ขั้นที่ 4 กำหนดตารางโครงสร้าง ดังนี้

เนื้อหา	จุดมุ่งหมายการเลียนแบบตามการสาธิต (%)	คะแนน
Coating of antigen	10	1
Washing Step	10	1
Blocking of nonspecific binding	10	1
Incubation with serum	10	1
Incubation with conjugate	10	1
Substrate control	10	1
Conjugate control	10	1
Substrate	10	1
Stop reaction	10	1
Reading the results	10	1
	รวม 100%	10

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ขั้นที่ 5 สร้างแบบทดสอบและแบบสังเกต ได้ดังนี้

แบบสังเกตเพื่อวัดความสามารถด้านกระบวนการทำแบบทดสอบ

การตรวจวินิจฉัยภาวการณ์ติดเชื้อ *S.* Typhi แบบเฉียบพลันด้วยวิธี Indirect ELISA

(ก่อน)

เนื้อหา	ใช่	ไม่ใช่
1. นักศึกษาสามารถ coat plate ได้		
2. นักศึกษาสามารถ wash plate ได้		
3. นักศึกษาสามารถ block nonspecific binding ได้		
4. นักศึกษาเตรียม serum และนำไปทดสอบได้		
5. นักศึกษาเตรียม conjugate และนำไปทดสอบได้		
6. นักศึกษาทำ substrate control ได้		
7. นักศึกษาทำ conjugate control ได้		
8. นักศึกษาเติม substrate และทดสอบได้		
9. นักศึกษาเติม stop reagent ได้		
10. นักศึกษาอ่านผลด้วย ELISA reader ได้		

(หลัง)

เนื้อหา	ใช่	ไม่ใช่
1. นักศึกษาสามารถ coat plate ได้		
2. นักศึกษาสามารถ wash plate ได้		
3. นักศึกษาสามารถ block nonspecific binding ได้		
4. นักศึกษาเตรียม serum และนำไปทดสอบได้		
5. นักศึกษาเตรียม conjugate และนำไปทดสอบได้		
6. นักศึกษาทำ substrate control ได้		
7. นักศึกษาทำ conjugate control ได้		
8. นักศึกษาเติม substrate และทดสอบได้		
9. นักศึกษาเติม stop reagent ได้		
10. นักศึกษาอ่านผลด้วย ELISA reader ได้		

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

แบบทดสอบวัดความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับ

การตรวจวินิจฉัยภาวการณ์ติดเชื้อ *S. Typhi* แบบเฉียบพลันด้วยวิธี Indirect ELISA

(ก่อน)

1. สิ่งที่ coat ไปบน plate คือ.....
2. การทดสอบนี้เป็นการตรวจหา.....ในซีรั่มของผู้ป่วย
3. ขั้นตอนการเติม 10% BSA ใน PBS ทำเพื่ออะไร.....
4. ขั้นตอน Washing ทำเพื่อ.....
5. Conjugate ที่ใช้คือ.....
6. Substrate control ควรให้ผลเป็นสีเข้มหรือสีขาว.....
7. Conjugate control ควรให้ผลเป็นสีเข้มหรือสีขาว.....
8. น้ำยาที่ใช้เป็น substrate คือ.....
9. น้ำยาที่ใช้เป็น stop reagent คือ.....
10. ผลที่เกิดขึ้นเป็นสีอะไร.....และอ่านผลด้วยเครื่องมือ.....

(หลัง)

1. สิ่งที่ coat ไปบน plate คือ.....
2. การทดสอบนี้เป็นการตรวจหา.....ในซีรั่มของผู้ป่วย
3. ขั้นตอนการเติม 10% BSA ใน PBS ทำเพื่ออะไร.....
4. ขั้นตอน Washing ทำเพื่อ.....
5. Conjugate ที่ใช้คือ.....
6. Substrate control ควรให้ผลเป็นสีเข้มหรือสีขาว.....
7. Conjugate control ควรให้ผลเป็นสีเข้มหรือสีขาว.....
8. น้ำยาที่ใช้เป็น substrate คือ.....
9. น้ำยาที่ใช้เป็น stop reagent คือ.....
10. ผลที่เกิดขึ้นเป็นสีอะไร.....และอ่านผลด้วยเครื่องมือ.....

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3. **สถิติ**

งานวิจัยนี้ใช้ pair t test ในการเปรียบเทียบคะแนนของผู้เรียนก่อนและหลังการชมการสาธิตและฝึกการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แบบทดสอบความรู้และความเข้าใจ 1 แบบ (10 ข้อ10 คะแนน) และแบบสังเกตทักษะกระบวนการทำการทดสอบเพื่อวัดการเลียนแบบ 1 แบบ (10 ข้อ 10 คะแนน)

ผลการวิจัย

ผลการพัฒนาทักษะของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ในการฝึกการตรวจภาวะการติดเชื้อ *S.* Typhi ด้วยชุดตรวจ indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นเอง

ภายหลังจากการบรรยายเรื่อง การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ *S.* Typhi และให้นักศึกษาเทคนิคการแพทย์จำนวน 19 คน ได้ศึกษาจากคู่มือการทำแบบทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA จากนั้นให้นักศึกษาทำแบบทดสอบวัดความรู้ และประเมินตนเองด้านทักษะตรวจและบันทึกผลคะแนนที่ได้รับ

จากนั้นให้นักศึกษาลงมือปฏิบัติการตรวจ *S.* Typhi ด้วยวิธี indirect ELISA ด้วยตนเองโดยมีอาจารย์ให้คำแนะนำ และอาจมีการสาธิตวิธีการทำประกอบด้วยในบางขั้นตอน เช่น การล้าง plate, การอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader เป็นต้น จากนั้นให้นักศึกษาทำแบบทดสอบวัดความรู้และให้อาจารย์ประเมินทักษะการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA โดยการสังเกต ตรวจและบันทึกผลคะแนนที่ได้รับ

นักศึกษาได้คะแนนเฉลี่ยด้านความรู้ความเข้าใจก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติเป็น 3.6 คะแนน และ 9.2 คะแนน จากคะแนนเต็ม 10 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับคะแนนเฉลี่ยด้านทักษะก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติมีค่าเป็น 3.4 คะแนน และ 9.8 คะแนน จากคะแนนเต็ม 10 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อทำการเปรียบเทียบคะแนนก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติของนักศึกษาด้านความรู้ความเข้าใจและด้านทักษะ ด้วยวิธี pair t test พบว่าหลังการฝึกปฏิบัตินักศึกษามีความรู้ความเข้าใจมากกว่าก่อนการฝึกปฏิบัติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p น้อยกว่า 0.05 ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 แสดงค่าคะแนนของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์จำนวน 19 คน ก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติเมื่อทำแบบทดสอบวัดความรู้และความเข้าใจ

นักศึกษาคนที่	คะแนนก่อนฝึก	คะแนนหลังฝึก
1	5	10
2	3.5	9
3	4.5	8.5
4	3.5	9.5
5	4	10
6	2.5	8.5
7	3	9.5
8	4	8
9	3.5	8.5
10	3.5	9.5
11	5	9
12	3.5	9.5
13	5	9.5
14	4	10
15	2.5	9.5
16	3	9
17	3	9
18	4	10
19	2	8
ค่าเฉลี่ย	**3.6**	**9.2**
ค่า p-value	**1.9×10^{-16}**	

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 2 แสดงค่าคะแนนของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์จำนวน 19 คน ก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติเมื่อทำการประเมินทักษะ

นักศึกษาคนที่	คะแนนก่อนฝึก	คะแนนหลังฝึก
1	5	10
2	0	10
3	4	10
4	5	10
5	4	10
6	3	10
7	4	10
8	3	10
9	4	10
10	5	10
11	2	10
12	5	10
13	1	10
14	4	7
15	5	10
16	4	10
17	0	9
18	3	10
19	3	10
ค่าฉลี่ย	**3.4**	**9.8**
ค่า p-value	1.5×10^{-12}	

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วิจารณ์ผลการทดลอง

1 การสร้างชุดทดสอบ indirect ELISA **สำหรับการตรวจโรคติดเชื้อ** *S.typhi*

สภาวะที่เหมาะสมของการการพัฒนาชุดตรวจ indirect ELISA สำหรับการตรวจภาวะการติดเชื้อ *Salmonella* Typhi โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ที่มีความต่างของ positive serum และ negative serum สูงสุด พบว่าควรใช้ Carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer เจือจาง antigen ที่ความเข้มข้น 30 µg / ml ด้วย Carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer ทดสอบด้วย positive serum และ negative serum ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:100 เวลาในการ Incubate หลังขั้นตอนการเติม serum และ หลังขั้นตอนการเติม conjugateที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที ควรใช้ 10% BSA เป็น blocking solution และใช้ conjugate เจือจางที่ความเข้มข้น 1:500

2. การพัฒนาทักษะของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ในการตรวจวินิจฉัยทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ *S.* **Typhi ด้วยวิธี** indirect ELISA

ภายหลังจากการบรรยายเรื่อง การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคติดเชื้อ *S.typhi* และให้นักศึกษาเทคนิคการแพทย์จำนวน 19 คน ได้ศึกษาจากคู่มือการทำแบบทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA จากนั้นให้นักศึกษาทำแบบทดสอบวัดความรู้ และประเมินตนเองด้านทักษะตรวจและบันทึกผลคะแนนที่ได้รับ จากนั้นให้นักศึกษาลงมือปฏิบัติการตรวจ *S.* Typhi ด้วยวิธี indirect ELISA ด้วยตนเองโดยมีอาจารย์ให้คำแนะนำ และอาจมีการสาธิตวิธีการทำประกอบด้วยในบางขั้นตอน เช่น การล้าง plate, การอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader เป็นต้น จากนั้นให้นักศึกษาทำแบบทดสอบวัดความรู้ และให้อาจารย์ประเมินทักษะการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA โดยการสังเกต ตรวจและบันทึกผลคะแนนที่ได้รับนั้น พบว่านักศึกษามีความรู้ความเข้าใจมากขึ้นหลังจากได้ฝึกปฏิบัติจริงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ p value น้อยกว่า 0.05 โดยนักศึกษาได้คะแนนเฉลี่ยด้านความรู้ความเข้าใจก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติเป็น 3.6 คะแนน และ 9.2 คะแนน ตามลำดับ

นอกจากนี้พบว่านักศึกษามีทักษะในการทำการทดสอบดีมากขึ้นหลังจากได้ฝึกปฏิบัติจริงในทุกขั้นตอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p value น้อยกว่า 0.05 โดยคะแนนเฉลี่ยด้านทักษะก่อนและหลังการฝึกปฏิบัติมีค่าเป็น 3.4 คะแนน และ 9.2 คะแนน ตามลำดับ

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าการฝึกนักศึกษาด้วยชุดตรวจจริงโดยนักศึกษาได้มีโอกาสทำในทุกขั้นตอนทำให้นักศึกษาเกิดความเข้าใจและเกิดทักษะมากขึ้น

บรรณานุกรม

อุทุมพร จามรมาน. จุดมุ่งหมายของการศึกษา. ห้างหุ้นส่วนจำกัด พัชนีพับบลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ. 2531.

อุทุมพร จามรมาน. การสร้างและพัฒนาเครื่องมือวัดลักษณะผู้เรียน, ห้างหุ้นส่วนจำกัด พัชนีพับบลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ. 2541.

กนก ศิริพานิชกร และคณะ . โรคติดเชื้อ Infectious Disease . กรุงเทพ.2541:246-254

นิภา จรูญเวสม์ และคณะ . โรคเขตร้อน . โครงการตำราศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ ฯ . 2532 ;315-316

เบญจวรรณ รุ่งปิตะรังสี , วิชัย รุ่งปิตะรังสี . ซัลโมแนลลาแอกกลูตินินในคนไทย . สารศิริราช 2519;28:1384.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University