

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการทดสอบ Enzyme-Linked Immunospot เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ผลิตสารอินเตอร์เฟียร์รอนแกมมา

จิราวรรณ มหาวันตั้ง^{1,2 #}, ดวงจันทร์ สุวรรณแสน^{1,2 **}, วิภาวี แสงวงษา³,
กาญจนา เลิศมิ่งกลชัย²

บทคัดย่อ

Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) เป็นวิธีการทดสอบที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ผลิตสารอินเตอร์เฟียร์รอนแกมมาที่มีความไวมากที่สุด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการทดสอบ ELISPOT เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ผลิตสารอินเตอร์เฟียร์รอนแกมมา (IFN- γ) ต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และ dengue virus ในอาสาสมัครสุขภาพดี โดยได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต IFN- γ ได้แก่ ปริมาณ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ระยะเวลาการกระตุ้นเซลล์ และความเข้มข้นของเชื้อโรคที่ใช้ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อกระตุ้น PBMCs ปริมาณ 2.5×10^4 เซลล์ ด้วย phytohemagglutinin ที่ความเข้มข้น 3 $\mu\text{g/ml}$ จะทำให้มีปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ จำนวนมากและอยู่ในช่วงเหมาะสมที่สามารถตรวจนับจำนวนด้วยกล้อง Stereomicroscope ส่วนการกระตุ้นด้วยเชื้อโรคนั้นพบว่าต้องเพิ่มจำนวน PBMCs เป็น 5×10^5 เซลล์ และกระตุ้นด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ความเข้มข้น 3×10^6 cfu/ml หรือ dengue virus ที่การเจือจางระดับ 1:2,700 จึงจะสามารถตรวจพบปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ได้มากที่สุดแต่ยังเหมาะสมสำหรับการตรวจนับจำนวน ผู้วิจัยได้นำสภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ทั้งหมดไปทดสอบในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 8 ราย พบว่าเชื้อโรค *B. pseudomallei* และ dengue virus สามารถกระตุ้นเซลล์ PBMCs ให้ผลิต IFN- γ เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ medium control แต่ปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ต่อเชื้อโรคแต่ละชนิดในแต่ละบุคคลแตกต่างกัน โดยปริมาณเซลล์ที่ผลิตสาร IFN- γ เมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* สัมพันธ์กับการกระตุ้นด้วย dengue virus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานของการผลิต IFN- γ เพื่อตอบสนองต่อเชื้อ *B. pseudomallei* และ dengue virus ที่สามารถนำไปใช้ในการคัดกรองเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการกระตุ้นการผลิต IFN- γ เพื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีน

คำสำคัญ: IFN- γ , ELISPOT, *Burkholderia pseudomallei*, Dengue virus

¹หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³สำนักงานป้องกันและควบคุมโรคเขต 7 อ. เมือง จ.อุบลราชธานี

ผู้วิจัยมีส่วนร่วมงานนี้เท่ากัน

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Optimization of Enzyme-Linked Immunospot Assay for quantitative analysis of interferon gamma producing cells

Jirawan Mahawantung^{1,2 #}, Duangchan Suwannasaen^{1,2 # *}, Wipawee Saenwongsa³,
Ganjana Lertmemongkolchai²

Abstract

Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) is the most sensitive assay for the enumeration of IFN- γ producing cells at single cell level. This study aimed to optimize the ELISPOT assay to study the IFN- γ production in response to *B. pseudomallei* and dengue virus in healthy individuals. The optimal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) concentrations, incubation time and concentration of each stimulator to maximize IFN- γ production were examined. The results showed that using PBMCs at 2.5×10^4 cells and stimulating with a positive control stimulator, phytohemagglutinin (PHA), at 3 $\mu\text{g/ml}$ was the optimal condition for IFN- γ responses. The number of IFN- γ -Spot Forming Cell (IFN- γ -SFC) was appropriate for enumeration by Stereomicroscope. In contrast, incubation of 5×10^5 PBMCs with 3×10^6 cfu/ml heat-killed *B. pseudomallei* or dengue virus at a dilution of 1:2,700 was the optimal condition. These optimal conditions were then used to study the IFN- γ production in 8 healthy volunteers. The results clearly showed that *B. pseudomallei* and dengue virus could stimulate all healthy PBMCs to produce IFN- γ at higher levels than those of medium control. However, the degree of IFN- γ responses was different for each individual. Moreover, linear regression analysis showed that the number of IFN- γ -SFC obtained from *B. pseudomallei* stimulation was correlated with the dengue virus stimulation. In conclusion, in this study, the ELISPOT for IFN- γ production using *B. pseudomallei* and dengue virus stimulations have been optimized. Our results of IFN- γ production in response to *B. pseudomallei* and dengue virus provides basic information for further study on the ability of *B. pseudomallei* or dengue's peptides in IFN- γ induction in screening for vaccine candidate.

Keywords: IFN- γ , ELISPOT, *Burkholderia pseudomallei*, Dengue virus

¹Biomedical Sciences program, Graduated School,

²Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

³Department of Diseases Prevention and Control Region 7, Ubonratchathani, Thailand

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author: (e-mail: duangchan.ciu@gmail.com)

บทนำ

ภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (Cell-Mediated Immunity) เป็นภูมิคุ้มกันของร่างกายที่อาศัยเซลล์ T lymphocytes ในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยและแบ่งตัวภายในเซลล์ โดยการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ดังกล่าวเกิดขึ้นได้สองทางตามลักษณะของเชื้อที่หลบอยู่ในเซลล์ คือ หากเชื้อถูกจับกินและอยู่ใน phagosome ของ phagocytic cells เซลล์ที่ติดเชื้อมีแนวโน้มเสนอเปปไทด์ของเชื้อผ่านทางโมเลกุล MHC-class II ให้รับรู้จำเพาะกับ T cell receptor ของ CD4+T cells หรือ หากจุลินทรีย์หนีออกจาก phagosome เข้าไปอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ เซลล์ที่จับกินจะนำเสนอเปปไทด์ผ่านทาง MHC-class I ให้รับรู้จำเพาะกับ CD8+T cells เมื่อเกิดการรับรู้จำเพาะระหว่างสัญญาณ MHC กับ TCR CD4+ หรือ CD8+T cells จะถูกกระตุ้นให้หลั่ง cytokines เช่น IFN- γ , TNF- γ เพื่อกระตุ้นเซลล์ที่จับกินเชื้อให้มีความสามารถในการทำลายเชื้อมากขึ้น หรือ CD8+T cells บางกลุ่มจะสามารถทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อโดยการหลั่งสาร perforin หรือ Granzyme เพื่อย่อยสลายเซลล์ที่ติดเชื้อได้โดยตรง⁽¹⁾ การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อจุลินทรีย์หรือโปรตีนส่วนประกอบของเชื้อจะช่วยให้การประเมินสภาพการทำงานของเซลล์ในภาวะติดเชื้อและหรือการประเมินศักยภาพของเชื้อหรือโปรตีนของเชื้อในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันด้านเซลล์

การตรวจวัดระดับการสร้างไซโตไคน์ที่เกิดจากการตอบสนองของ T cells ต่อแอนติเจนที่จำเพาะสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การวัดปริมาณของไซโตไคน์ทั้งหมดที่หลั่งออกมาในส่วนไอทีที่ได้จากการกระตุ้นเซลล์ร่วมกับเชื้อที่ต้องการศึกษาโดยใช้วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) การตรวจนับจำนวนเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISPOT การตรวจวัดการสร้างไซโตไคน์ภายในเซลล์และบ่งบอกชนิดของเซลล์ที่ผลิตด้วยวิธี Flow cytometry และตรวจวัดการแสดงออกของ mRNA ของไซโตไคน์ด้วยวิธี Real-time PCR⁽²⁾ อย่างไรก็ตาม Tassinon J และคณะได้ศึกษาเปรียบเทียบผลการวัดการสร้าง IFN- γ ทั้ง 4 วิธีจากเซลล์ของอาสาสมัครสุขภาพดีที่ถูกกระตุ้นด้วย tetanus toxoid antigen ในหลอดทดลองช่วงก่อนและหลังการได้รับวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยัก พบว่า ELISPOT สามารถตรวจวัดการสร้าง IFN- γ ได้ผลบวกถึงร้อยละ 93 ดังนั้น

ELISPOT จึงเป็นวิธีที่ให้ความไวในการติดตามการทำงานของเซลล์มากที่สุด⁽³⁾

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และ dengue virus เป็นกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถหลบซ่อนและเพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์ การติดเชื้อ *B. pseudomallei* เป็นสาเหตุของโรคmelioidosis ส่วนการติดเชื้อ dengue virus เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคทั้งสอง การตรวจวัดแอนติบอดีต่อเชื้อในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าประชากรมากกว่าร้อยละ 80 มีแอนติบอดีต่อเชื้อ dengue virus หรือ *B. pseudomallei* แสดงให้เห็นว่าประชากรในพื้นที่มีการติดเชื้อตามธรรมชาติแต่ไม่แสดงอาการ^(4,5) แม้ประชากรส่วนใหญ่ในพื้นที่ระบาดมีการสร้างภูมิคุ้มกันด้านแอนติบอดีต่อเชื้อแต่ประสิทธิภาพของโรคมะลิออยโดสิสหรือไข้เลือดออกยังคงสูงอยู่ ซึ่งให้เห็นถึงระบบภูมิคุ้มกันด้านแอนติบอดีอาจไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกหลักในการต้านเชื้อที่หลบซ่อนภายในเซลล์ อาจจะเป็นแนวทางในการประเมินประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อของกลุ่มประชากรในพื้นที่ระบาดได้

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค ELISPOT เพื่อศึกษาการสร้าง IFN- γ ในการตอบสนองต่อเชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาเพื่อค้นหาโปรตีนและเปปไทด์จากเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นวัคซีนต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. กลุ่มประชากร

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ศึกษาทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากอาสาสมัครสุขภาพดีอายุ 18 ปีขึ้นไป ที่เข้ามาบริจาคเลือดที่คลังเลือดกลาง โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE470506

2. การเก็บตัวอย่างเลือดและการเตรียม Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

ตัวอย่างเลือดรวมจากอาสาสมัครสุขภาพดีปริมาตร 12 มิลลิลิตร เจาะเก็บใส่หลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง heparin

จากนั้นปั่นแยกชั้นด้วย Ficoll-Histopaque เพื่อเก็บเฉพาะเซลล์ชนิด PBMCs นำไปล้าง 2 ครั้งด้วย phosphate buffered saline (PBS) และปรับปริมาณเซลล์ PBMCs ให้ได้ตามปริมาตรที่ต้องการด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่มีส่วนผสม 10 % fetal bovine serum (10% RPMI)

3. ตัวกระตุ้นและเชื้อที่ใช้ในการศึกษา

3.1 ตัวกระตุ้นควบคุม (Control stimuli)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% RPMI เป็น negative control หรือ medium control และใช้ phytohemagglutinin (PHA) เป็น positive control เนื่องจาก PHA เป็นสารไมโตเจนที่สามารถกระตุ้น T cells ใน PBMCs ให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและผลิต IFN- γ ⁽⁶⁾

3.2 เชื้อโรคที่ใช้ในการศึกษา

3.2.1 Heat-killed *B. pseudomallei* strain K96243

นำเชื้อที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงใน LB broth agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเชื้อออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยการนำเชื้อไปเพลทลงบน LB agar บ่มเพาะข้ามคืนแล้วนำไปนับจำนวนโคโลนี เพื่อคำนวณเป็นปริมาณเชื้อต่อมิลลิลิตร (cfu/ml) ส่วนที่สองนำเชื้อที่ได้ไปทำให้ตายโดยใช้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเชื้อที่ตายแล้วบางส่วนเพลทลง LB agar เพื่อทดสอบว่าเชื้อตายและไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน

3.2.2 Dengue virus serotype 1

เชื้อไวรัสได้รับความอนุเคราะห์จาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข การเตรียมไวรัสทำได้โดยฉีดไวรัสเข้าไปในหนูตัวอ่อน ประมาณ 3-7 วันเพื่อให้หนูเกิดการติดเชื้อในสมอง จากนั้นสกัดไวรัสจากสมองหนูโดยบดสมองหนูแล้วปั่นให้ sediment ตกพร้อมกับ sucrose เก็บส่วนใสซึ่งมีไวรัสอยู่แล้วทำให้แห้งทันที⁽⁷⁾

4. การทดสอบการสร้าง IFN- γ จากเซลล์ PBMCs ด้วยเทคนิค ELISPOT

การทดสอบ ELISPOT ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เพลทชนิดที่กันหลุมเป็นแบบ nitrocellulose (polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane plates, Millipore) ก่อนนำไปใช้ต้องปรับสภาพเพลทให้เปียกด้วยการเติม 15 % Alcohol หลุมละ 15 μ l เป็นเวลา 1 นาที และล้างออกด้วย PBS

2 ครั้ง ก่อนเคลือบเพลทด้วยแอนติบอดีต่อ IFN- γ ของมนุษย์โดยใช้ 1-D1K anti-human IFN- γ monoclonal antibody (Mabtech) ความเข้มข้น 15 μ g/ml ปริมาณ 50 μ l ต่อหลุม แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นล้างเพลทเอาแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย PBS แล้วเติม 10 % RPMI หลุมละ 200 μ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเพลท 6 ครั้งด้วย PBS จากนั้นเติม PBMCs ที่ปรับปริมาตรเซลล์ตามต้องการปริมาตร 100 μ l ต่อหลุม และเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวร่วมกันกับตัวกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำเพลทไปอบเพาะใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C ตามระยะเวลาที่ต้องการศึกษา เมื่อครบเวลาตามที่ต้องการ ล้างเซลล์ออกด้วย PBS 7 ครั้งแล้วเติม Biotinylated anti-human IFN- γ mAb (Mabtech) ความเข้มข้น 1 μ g/ml หลุมละ 200 μ l วางเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBS อีก 7 ครั้งตามด้วย Streptavidin-alkaline phosphatase (Mabtech) ความเข้มข้น 1 μ g/ml หลุมละ 200 μ l เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินออก 7 ครั้ง เติม TMB peroxidase substrate (Bio-Rad) ปริมาตร 100 μ l นาน 10-15 นาที เพื่อให้เกิดสี ขั้นตอนสุดท้ายเติมน้ำกลั่น 100 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยา ซึ่งสีจะเกิดขึ้นรอบเซลล์ที่เกิดปฏิกิริยาโดยหนึ่งจุดแทนหนึ่งเซลล์ที่สร้าง IFN- γ (Spot Forming Cell/SFC) จากนั้นล้างเพลทอีก 2 รอบด้วยน้ำกลั่น ตากเพลทให้แห้งในที่มืด ขั้นตอนสุดท้ายนำเพลทที่ได้ตรวจนับจำนวนจุด (spot) ด้วยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereomicroscope) จำนวน spot ที่นับได้นำไปวิเคราะห์และแสดงผลในหน่วยต่อ 10⁶ PBMCs (IFN- γ -SFC/10⁶ PBMCs)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

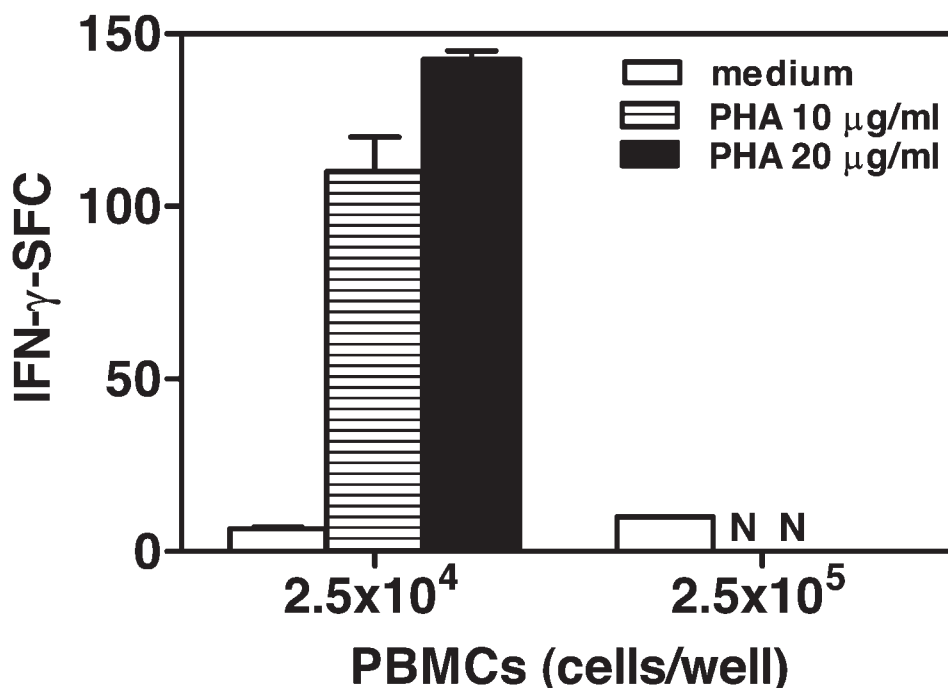
การเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยเชื้อและ medium control ใช้สถิติ Mann-Whitney t test ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ จากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* และ Dengue virus serotype 1 ใช้การทดสอบ linear regression กราฟและข้อมูลทางสถิติจัดทำโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ GraphPad Prism จากประเทศสหรัฐอเมริกา

ผลการศึกษา

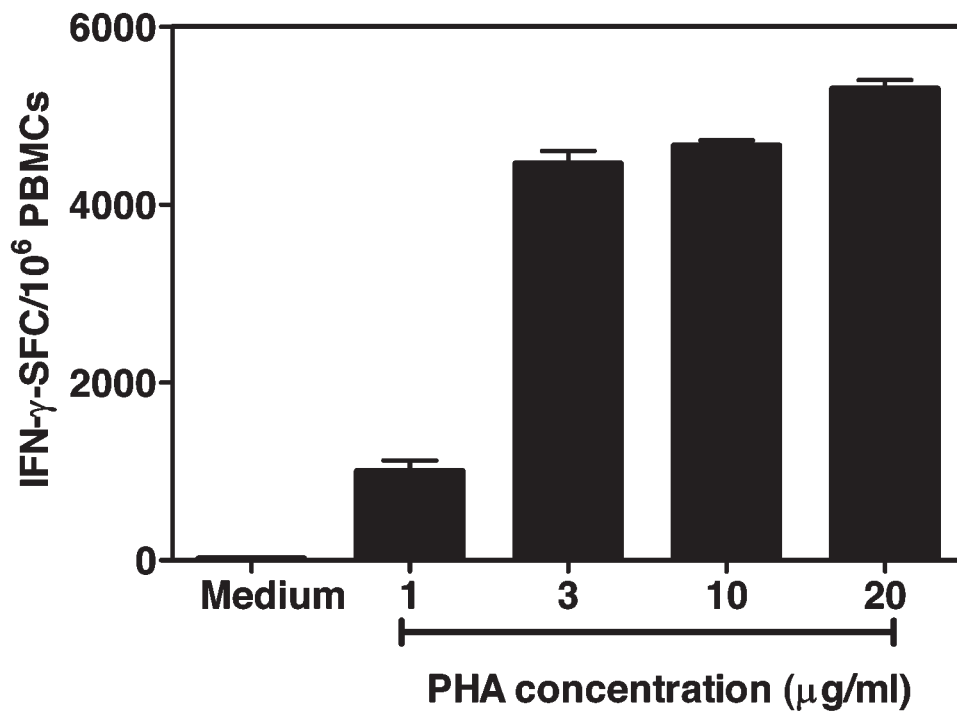
การศึกษาภาวะที่เหมาะสมเพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ เมื่อกระตุ้นด้วยสาร PHA

เพื่อให้การปรับมาตรฐาน ELISPOT มีความน่าเชื่อถือ ได้นำ PHA ซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้น T cells ให้สร้าง IFN- γ มาใช้ในการศึกษา โดยศึกษาปริมาณ PBMCs ตั้งต้นและความเข้มข้นของ PHA ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ เหมาะสมสำหรับการนับจำนวนโดยการใช้อุปกรณ์ Stereomicroscope ในการทดลองได้เปรียบเทียบ PBMCs ปริมาณ 2.5×10^4 และ 2.5×10^5 เซลล์ต่อหลุมและกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 10 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เกิดการกระตุ้นการผลิต IFN- γ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยการทดสอบจะทำซ้ำสองหลุม (duplicate) จากนั้นตรวจนับจำนวนเซลล์ที่สร้าง IFN- γ ด้วยกล้อง Stereomicroscope ผลการทดลองพบว่า สาร PHA สามารถกระตุ้น PBMCs ให้ผลิต IFN- γ เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ medium control และเมื่อกระตุ้น PBMCs 2.5

$\times 10^4$ เซลล์ ด้วย PHA ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ได้ แต่การใช้ PBMCs 2.5×10^5 เซลล์ จะทำให้มีจำนวน spot มากเกินไป จนไม่สามารถนับจำนวนได้ การกระตุ้นเซลล์ด้วย PHA ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้มีปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ มากกว่าที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 1) และเมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของ PHA โดยศึกษาความเข้มข้นที่ 1, 3, 10 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ กระตุ้น PBMCs 2.5×10^4 เซลล์ ผลการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ PHA (รูปที่ 2) โดยความเข้มข้น 3 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นให้มีจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ใกล้เคียงกับการกระตุ้นที่ความเข้มข้น 10 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นในการศึกษาในลำดับต่อไป จึงเลือกใช้ PBMCs ปริมาณ 2.5×10^4 เซลล์ กระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 3 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อเป็น positive control และใช้ศึกษาควบคุมไปกับการกระตุ้นด้วยเชื้อที่สนใจทุกครั้ง



รูปที่ 1 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ PBMCs ที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นด้วย PHA เพื่อให้มีปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ เหมาะสมสำหรับตรวจนับจำนวนด้วยกล้อง Stereomicroscope ด้วยวิธี ELISPOT. PBMCs ปริมาณ 2.5×10^4 และ 2.5×10^5 เซลล์กระตุ้นด้วย medium control และ PHA ความเข้มข้น 10 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ ระยะเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ (IFN- γ -Spot Forming Cells; IFN- γ -SFC) หรือจำนวนจุด (spot) ด้วยกล้อง stereomicroscope. N (Numerous) หมายถึง จำนวนจุดมากจนไม่สามารถตรวจนับจำนวนได้

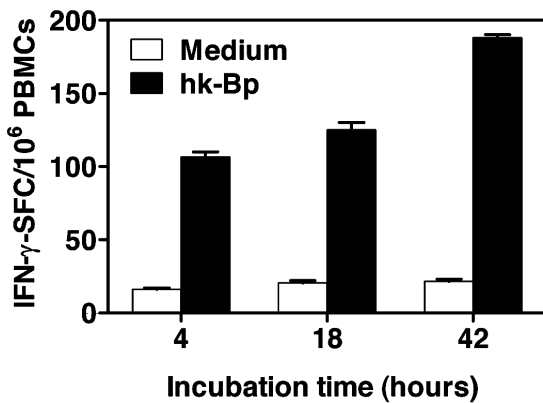
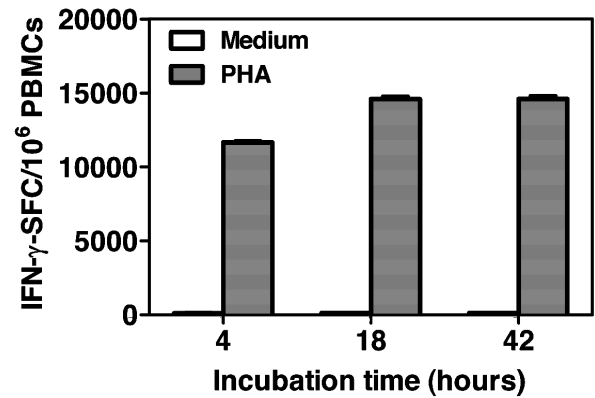


รูปที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นของ PHA ที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นการผลิต IFN- γ . PBMCs ปริมาณ 2.5×10^4 เซลล์ กระตุ้นด้วย medium control และ PHA ความเข้มข้น 1, 3, 10 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ ระยะเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวน spot ที่เกิดขึ้น ปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ แสดงในหน่วย IFN- γ -SFC/ 10^6 PBMCs

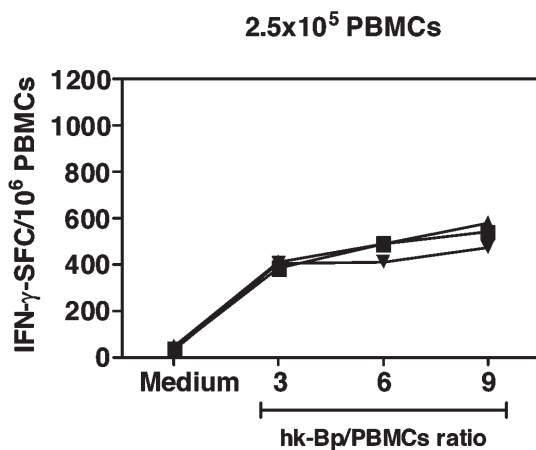
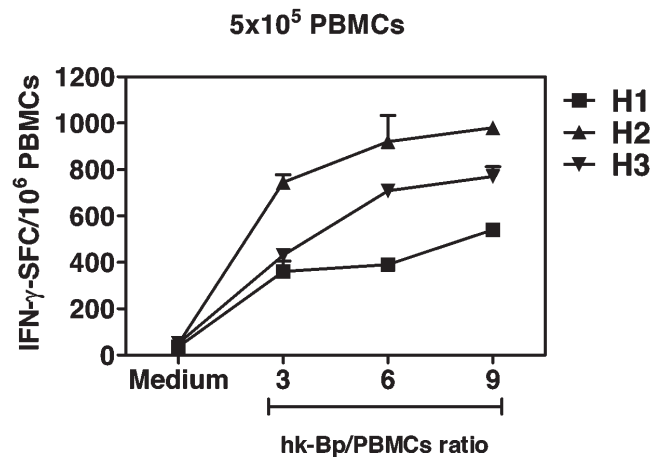
การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง IFN- γ เพื่อตอบสนองต่อเชื้อ heat killed *B. pseudomallei* และ Dengue virus
นำเชื้อสองชนิด ได้แก่ *B. pseudomallei* และ dengue virus มาศึกษา โดยการศึกษาประกอบด้วยการศึกษาปัจจัยด้านระยะเวลา จำนวน PBMCs และ ความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิต IFN- γ

ในการศึกษาเชื้อ hk-Bp เริ่มแรกได้เลือกใช้ PBMCs ปริมาณ 2.5×10^5 เซลล์ กระตุ้นด้วยเชื้อในอัตราส่วน 3 เท่า ของจำนวน PBMCs เป็นเวลา 4, 18, และ 42 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเชื้อ hk-Bp สามารถกระตุ้น PBMCs ของคนสุขภาพดีให้ผลิต IFN- γ ได้ตั้งแต่ 4 ชั่วโมงและจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้กระตุ้นเซลล์ ปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ มากที่สุดเมื่อกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 42 ชั่วโมง (**รูปที่ 3**) แม้การกระตุ้นเซลล์ 42 ชั่วโมง จะทำให้ตรวจพบจำนวน spot มากขึ้น แต่จำนวนเซลล์ที่ผลิต

IFN- γ ที่นับได้จริงยังมีจำนวนน้อยมาก ผู้วิจัยจึงได้ทดลองเพิ่มปริมาณ PBMCs เป็น 5×10^5 และทดสอบการกระตุ้น PBMCs ปริมาณดังกล่าวโดยใช้อัตราส่วนระหว่างจำนวน PBMCs กับความเข้มข้นของ hk-Bp 3, 6 และ 9 เท่า ในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 3 ราย พบว่าเมื่อใช้ PBMCs ปริมาณ 5×10^5 (**รูปที่ 4B**) จะทำให้มีจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ มากขึ้น และทำให้เห็นการผลิต IFN- γ ได้แตกต่างกันในแต่ละคนอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ PBMCs ปริมาณ 2.5×10^5 (**รูปที่ 4A**) และการใช้ความเข้มข้นของ hk-Bp 6 เท่า สามารถกระตุ้นเซลล์ให้ผลิต IFN- γ มากกว่าการใช้เชื้อ 3 เท่าแต่ใกล้เคียงกับการใช้เชื้อ 9 เท่า ดังนั้นการใช้ PBMCs 5×10^5 เซลล์ กระตุ้นด้วยเชื้อ 6 เท่า นาน 42 ชั่วโมงจึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ศึกษาการสร้าง IFN- γ เพื่อตอบสนองต่อ hk-Bp

A**B**

รูปที่ 3 การศึกษาการผลิต IFN- γ จากการกระตุ้นด้วยเชื้อ heat killed *Burkholderia pseudomallei* (hk-Bp) และ PHA ที่ เวลา 4, 18 และ 42 ชั่วโมง ด้วยวิธี ELISPOT A) PBMCs ปริมาณ 2.5×10^5 เซลล์บ่มเพาะเลี้ยงกับเชื้อ hk-Bp 7.5×10^5 cfu/ml เปรียบเทียบกับ Medium B) PBMCs ปริมาณ 2.5×10^4 เซลล์กระตุ้นด้วย PHA 3 μ g/ml ในตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 1 ราย

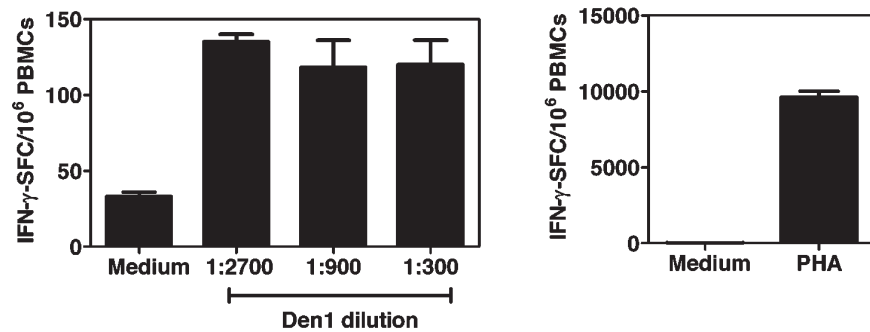
A**B**

รูปที่ 4 การศึกษาผลของปริมาณ PBMCs และความเข้มข้นของเชื้อ hk-Bp ต่อการผลิต IFN- γ ในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 3 ราย. กระตุ้น PBMCs ปริมาณ 2.5×10^5 (A) และ 5×10^5 cells (B) ด้วย hk-Bp โดยใช้อัตราส่วนของปริมาตรเชื้อต่อจำนวน PBMCs 3, 6 และ 9 เท่า เป็นเวลา 42 ชั่วโมง จากนั้นนับปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ด้วยวิธี ELISPOT. H1-3 แสดงถึงอาสาสมัครสุขภาพดีรายที่ 1-3

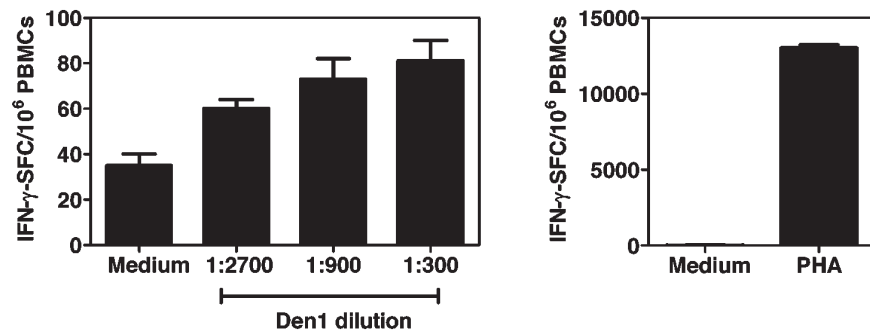
ส่วนการศึกษา dengue virus นั้นได้เลือกใช้ PBMCs ปริมาณ 5×10^5 กระตุ้นด้วยเชื้อเป็นเวลา 42 ชั่วโมงเช่นเดียวกันกับ hk-Bp และได้เลือก dengue serotype 1 (Den1) เป็นตัวแทนในการศึกษา โดยได้ศึกษาความเข้มข้นของเชื้อที่ระดับการเจือจาง 1:300, 1:900 และ 1:2,700 ต่อการสร้าง IFN- γ ในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 2 ราย พบว่ารายแรกการใช้เชื้อที่ 1:2,700 ทำให้เกิดการสร้าง IFN- γ ได้มาก

ที่สุด (รูป 5A) ส่วนรายที่สอง กลับกระตุ้นการสร้าง IFN- γ ได้น้อยที่สุด (รูป 5B) ส่วนการตอบสนองต่อ PHA พบว่าสูงทั้งสองราย ทำให้สรุปได้ว่าไม่ว่าจะเลือกความเข้มข้นใดก็สามารถกระตุ้นเซลล์ให้สร้าง IFN- γ ได้มากกว่า medium control และปริมาณเซลล์ที่สร้างไม่ต่างกันมากนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกความเข้มข้น 1:2,700 ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อที่น้อยที่สุด

A Donor 1



B Donor 2

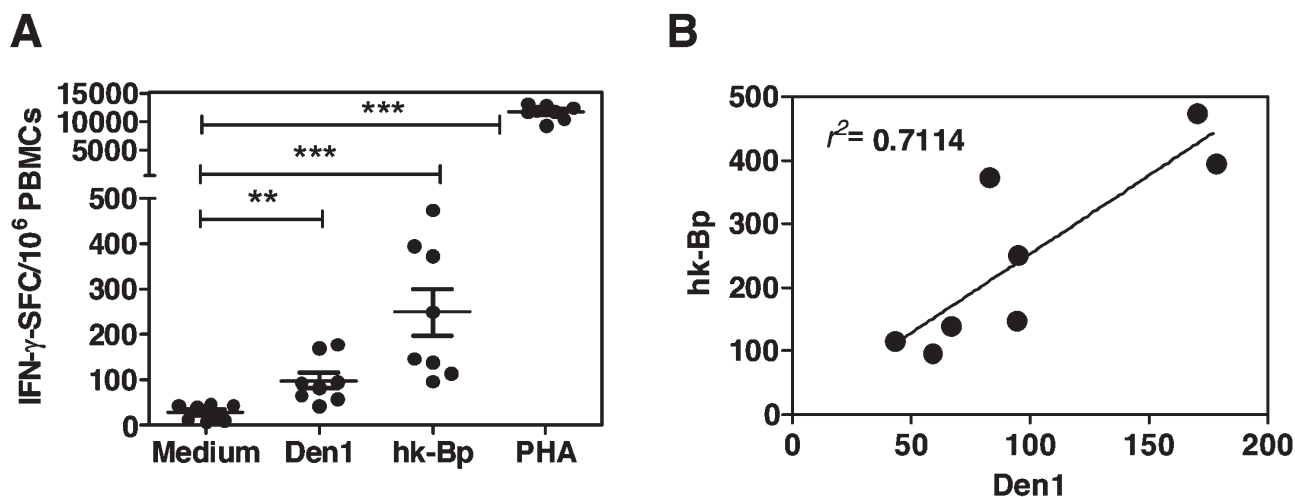


รูปที่ 5 การศึกษาความเข้มข้นของเชื้อไวรัสเด็งกีที่เหมาะสมสำหรับการผลิต IFN- γ ในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 2 ราย (A และ B). กระตุ้น PBMCs ปริมาณ 5×10^5 เซลล์ ด้วยเชื้อไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 1 (Den 1) เจือจาง 1:300, 1:900 และ 1:2,700 และ PBMCs 2.5×10^4 เซลล์กระตุ้น ด้วย PHA 3 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 42 ชั่วโมง

การสร้าง IFN- γ ตอบสนองต่อเชื้อ heat killed *B. pseudomallei* และ Dengue virus serotype 1 ของอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 8 ราย

ได้นำสภาวะที่เหมาะสมของการกระตุ้นของเชื้อทั้งสองชนิดมาทดสอบในกลุ่มประชากรจำนวน 8 คน โดยใช้ PBMCs ปริมาณ 5×10^5 เซลล์มากระตุ้นด้วยเชื้อ hk-Bp เข้มข้น 3×10^6 cfu/ml และ Den1 เจือจาง 1:2,700 ส่วน positive control ใช้ PBMCs ปริมาณ 2.5×10^4 เซลล์กระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 3 $\mu\text{g/ml}$ ใช้เวลาบ่มเพาะเลี้ยงเซลล์กับตัวกระตุ้นในเพลทที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อ IFN- γ เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่า PHA และเชื้อทั้ง

สองชนิดสามารถกระตุ้น PBMCs จากอาสาสมัครทั้ง 8 ราย ให้สร้าง IFN- γ ได้มากกว่า medium control อย่างมีนัยสำคัญ โดยแต่ละรายสามารถตอบสนองต่อเชื้อที่กระตุ้นได้แตกต่างกัน อาสาสมัครทุกรายมีปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ตอบสนองต่อ Den1 ต่ำกว่า *B. pseudomallei* (รูปที่ 6A) อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ต่อเชื้อทั้งสองชนิดในอาสาสมัครแต่ละรายโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ linear regression ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการสร้าง IFN- γ ในการตอบสนองต่อเชื้อทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($r^2 = 0.7$) (รูปที่ 6B)



รูปที่ 6 การศึกษาการสร้าง IFN- γ ตอบสนองต่อ hk-Bp และ Den1 ของอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 8 ราย. A) เลือกรวมจากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 8 ราย นำมาแยก PBMCs และปรับ PBMCs ปริมาณ 5×10^5 เซลล์ กระตุ้นด้วย hk-Bp 3×10^6 cfu/ml และ Den1 เจือจาง 1:2,700 และ PBMCs 2.5×10^4 เซลล์ กระตุ้นด้วย PHA $3 \mu\text{g/ml}$ ระยะเวลา 42 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ เปรียบเทียบกับ medium control ด้วยวิธี ELISPOT. ** และ *** แสดงถึงค่า P-value < 0.01 และ $P < 0.001$ จากการเปรียบเทียบโดยใช้ Mann-Whitney t test. B) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ตอบสนองต่อเชื้อ hk-Bp และ Den 1 ด้วยการใช้สถิติ linear regression

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ELISPOT เป็นวิธีมาตรฐานที่นิยมนำมาใช้ติดตามการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ต่อโปรตีนของเชื้อในคนไข้หรืออาสาสมัครหลังจากได้รับวัคซีน⁽⁸⁾ การศึกษานี้ได้ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของวิธี ELISPOT เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์กับห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยศึกษาการสร้าง IFN- γ ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* และ dengue virus เริ่มแรกได้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง IFN- γ และผลต่อการนับจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ โดยใช้กล้อง Stereomicroscope ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ผลการทดลองพบว่าการใช้ PBMCs เริ่มต้นแค่ 2.5×10^4 เซลล์ กระตุ้นด้วย PHA $3 \mu\text{g/ml}$ ก็สามารถตรวจพบปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ได้สูงและอยู่ในช่วงที่สามารถนับจำนวนโดยใช้กล้องได้ ส่วนการกระตุ้นด้วยเชือนั้นต้องเพิ่ม PBMCs เป็น 5×10^5 เซลล์ ถึงจะตรวจพบการสร้าง IFN- γ ทั้งนี้เนื่องจาก PHA เป็นโปรตีนที่สามารถกระตุ้น T cell ให้แบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยไม่ต้องอาศัยการรับรู้จำเพาะ ส่วนการใช้เชื้อต้องอาศัยความจำเพาะระหว่าง T cells กับ antigen presenting cells ดังนั้นการใช้ PBMCs เพิ่มขึ้นจึงเป็นการเพิ่มโอกาสให้ตรวจพบ T cell ที่จำเพาะกับเชื้อ ปัจจัยอื่นที่

มีผลต่อระดับการสร้าง IFN- γ ได้แก่ ระยะเวลา และ ความเข้มข้นของเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการเพิ่มเชื้อเชื่อกับเซลล์นานขึ้นทำให้ตรวจพบเซลล์ที่ผลิต IFN- γ และระยะเวลา 42 ชั่วโมงจะทำให้เซลล์ผลิต IFN- γ มากที่สุด ส่วนความเข้มข้นของเชื้อ การศึกษาพบว่าใช้ hk-Bp เข้มข้น 6 เท่าของ PBMCs จะทำให้เกิดการสร้าง IFN- γ สูงแตกต่างจากการใช้เชื้อ 3 เท่าและจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ มีปริมาณใกล้เคียงกับการใช้เชื้อ 9 เท่า ส่วนการใช้เชื้อไวรัสเด็งกีผลจากการศึกษาในตัวอย่างของอาสาสมัคร 2 รายพบว่ามีแนวโน้มไม่เหมือนกัน คือ รายแรกผลการกระตุ้นด้วย Den 1 ที่เจือจาง 1:2,700 จะสามารถกระตุ้นเซลล์ที่ผลิต IFN- γ สูงกว่าการเจือจางระดับอื่น ส่วนรายที่สองเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย Den 1 ระดับเจือจางที่ 1:300 จะให้ผลการผลิต IFN- γ สูงที่สุด อย่างไรก็ตามหากพิจารณาระดับการผลิต IFN- γ ในรายที่สองที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย Den 1 ระดับเจือจาง 1:2,700 และ 1:300 ซึ่งใช้เชื้อต่างกันถึง 9 เท่า จะเห็นว่าปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ เพิ่มขึ้นเพียงประมาณ 20 เซลล์/ 10^6 PBMCs ซึ่งถือว่าน้อยมาก และเนื่องจากเชื้อโรคที่ใช้ในการศึกษามีปริมาณจำกัด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้การเจือจางที่ 1:2,700 การพบว่าเชื้อความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นให้

สร้าง IFN- γ ได้ใกล้เคียงกับการใช้เชื้อความเข้มข้นสูงอาจเป็นเพราะส่วนประกอบของเชื้อโรคมียามีปริมาณเหมาะสมกับ antigen presenting cells ที่อยู่ใน PBMCs แล้วจึงทำให้แม้จะเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อแต่มีการตอบสนองเท่าเดิม ดังนั้นเมื่อทราบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้น PBMCs เพื่อให้สร้าง IFN- γ ต่อ PHA และ เชื้อแล้ว จึงได้นำสถานะที่เหมาะสมนำไปทดสอบจริงในตัวอย่างอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 8 ราย

ผลการศึกษาการสร้าง IFN- γ ต่อเชื้อ hk-Bp และ Den 1 พบว่าอาสาสมัครทุกรายสามารถผลิต IFN- γ ตอบสนองต่อเชื้อทั้งสองชนิดนี้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ medium control แต่ปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ แต่ละรายมีปริมาณแตกต่างกัน ซึ่งระดับการตอบสนองต่อเชื้อที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับประวัติการสัมผัสหรือติดเชื้อตามธรรมชาติซึ่งจะส่งผลให้มีการพัฒนา memory T cells ที่จำเพาะกับเชื้อในแต่ละคนแตกต่างกัน การศึกษาที่ผ่านมาของ Tassignon J และคณะโดยใช้วิธี ELISA, ELISPOT, Flow cytometry และ real-time PCR ทดสอบการผลิต IFN- γ ต่อ tetanus toxoid antigen ของอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 14 ราย ก่อนและหลังการได้รับวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยัก 7 วัน ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้วิธี ELISPOT สามารถตรวจพบอาสาสมัครจำนวนสูงสุด คือ 13 ใน 14 ราย ที่ผลิต IFN- γ ต่อ tetanus toxoid antigen สูงขึ้นหลังจากได้รับวัคซีน คิดเป็นผลบวกร้อยละ 93⁽³⁾ หากเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบว่าการทดสอบ ELISPOT ต่อเชื้อให้ผลบวกถึงร้อยละ 100 อย่างไรก็ตามหากเพิ่มจำนวนตัวอย่างอาจจะทำให้ตรวจพบความหลากหลายของการสร้าง IFN- γ ตอบสนองต่อเชื้อมากขึ้น

ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อกระตุ้น PBMCs จากอาสาสมัครสุขภาพดีด้วย PHA พบว่าได้ปริมาณเซลล์ที่ผลิต IFN- γ อยู่ระหว่าง 5,000-15,000 เซลล์/ 10^6 PBMCs ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Makitalo B และคณะ ที่ได้ใช้ PBMCs จำนวน 1×10^5 เซลล์กระตุ้นด้วย PHA ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสามารถนับจำนวนเซลล์ที่สร้าง IFN- γ อยู่ระหว่าง 1,000-5,000 เซลล์/ 10^5 PBMCs หรือเฉลี่ย 10,000 เซลล์/ 10^6 PBMCs⁽⁹⁾ ส่วนการศึกษาของ Tippayawat P และคณะที่ใช้ PBMCs จากอาสาสมัครสุขภาพดีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย กระตุ้นด้วยเชื้อ heat-killed *B. pseudomallei* พบว่าสามารถนับจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ ได้ระหว่าง 50-1,200

เซลล์/ 10^6 PBMCs ซึ่งใกล้เคียงกับจำนวนที่ตรวจนับได้ในการศึกษานี้ ซึ่งอยู่ระหว่าง 50-500 เซลล์/ 10^6 PBMCs⁽¹⁰⁾ ส่วนการกระตุ้น PBMCs จากอาสาสมัครสุขภาพดีด้วยเชื้อ dengue virus ยังไม่มีรายงานการศึกษาอื่นที่ใช้ตัวกระตุ้นเป็นตัวเชื้อ แต่มีรายงานการศึกษาของ Imrie A และคณะที่ใช้ PBMCs จากผู้ป่วยที่หายจากไข้เลือดออกและนำมากระตุ้นด้วยเปปไทด์ส่วน Nonstructural protein 3 และ 5 (NS3 และ NS5) ของเชื้อ Den 1 ผลพบว่าจำนวนเซลล์ที่ผลิต IFN- γ อยู่ในช่วง 37-1130 เซลล์/ 10^6 PBMCs⁽¹¹⁾ สำหรับการศึกษาเบื้องต้นในครั้งนี้จากอาสาสมัครสุขภาพดี ก็พบอยู่ในช่วงดังกล่าว คือ 50-200 เซลล์/ 10^6 PBMCs ทั้งหมดนี้จึงแสดงให้เห็นว่าสถานะเหมาะสมสำหรับการทดสอบด้วยวิธี ELISPOT ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีมาตรฐานเทียบเคียงได้กับการศึกษาอื่น สมควรที่จะมีการนำไปศึกษาเพิ่มเติมจำนวนตัวอย่างหรือประยุกต์ใช้กับโรคติดเชื้ออื่นต่อไป

เชื้อแบคทีเรีย *B. pseudomallei* และไวรัสเด็งกี (dengue virus) เป็นเชื้อที่สามารถหลบซ่อนและแบ่งตัวภายในเซลล์และเป็นเชื้อที่พบบ่อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย การติดเชื้อตามธรรมชาติของคน ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาดมีการพัฒนาภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ทั้งด้านเซลล์และแอนติบอดีเพื่อป้องกันการติดเชื้อ^(12,13) อย่างไรก็ตามในแง่ภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อยังไม่กระจ่างมากนัก แต่การศึกษาในหนูที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า IFN- γ ที่ผลิตจาก T cells และ NK cells มีบทบาทสำคัญทำให้หนูรอดชีวิตจากการติดเชื้อ^(14,15) จากผลการศึกษาการผลิต IFN- γ ต่อเชื้อทั้งสองชนิดในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 8 ราย ผลการทดลองพบว่าปริมาณการสร้าง IFN- γ เพื่อตอบสนองต่อเชื้อทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าอาสาสมัครน่าจะเคยสัมผัสกับเชื้อสองชนิดจึงสามารถพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ต่อเชื้อทั้งสองชนิดได้ภายในร่างกาย ดังนั้นเพื่ออธิบายผลการทดลองเพิ่มเติมควรตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* และ dengue virus ในตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครแต่ละราย

ELISPOT เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง เนื่องจากวิธีนี้ใช้การบ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับกระตุ้นเชื้อภายในหลุมเพลทที่เคลือบแอนติบอดีต่อไซโตไคน์ที่ต้องการตรวจหาอยู่แล้ว ดังนั้นระหว่างการกระตุ้นเซลล์และมีการหลั่งไซโตไคน์ไซโตไคน์จะถูกจับด้วยแอนติบอดีที่ถูกเคลือบไว้และไม่ได้เจือ

จางในอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้วิธีนี้ยังเป็นวิธีที่มีความจำเพาะระหว่างเชื้อหรือโปรตีนจากเชื้อกับกลุ่มเซลล์ที่ตอบสนองสูง เนื่องจากการกระตุ้นเซลล์ต้องอาศัยกระบวนการรับรู้การนำเสนอแอนติเจนผ่านทางโมเลกุล MHC จำเพาะกับ T cell receptor ของ CD4+ หรือ CD8+ T cells ที่จำเพาะ และเมื่อเกิดการรับรู้ระหว่าง TCR กับ MHC peptide complex จะส่งสัญญาณให้เซลล์ผลิต IFN- γ และจะถูกจับด้วยแอนติบอดีที่เคลือบอยู่แล้ว ทำให้ IFN- γ ที่หลั่งออกมาไม่สามารถไปจับกับ IFN- γ receptor ซึ่งจะทำให้มีเซลล์อื่นที่ตอบสนองแบบไม่จำเพาะกับแอนติเจน นอกจากนี้ ELISPOT ยังเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และสามารถประยุกต์การตรวจนับจำนวน spot ด้วยการใช้กล้อง Stereomicroscope ซึ่งเป็นเครื่องมือในห้องปฏิบัติการทั่วไป อย่างไรก็ตามหากต้องการศึกษาในตัวอย่างจำนวนมาก สามารถใช้เครื่องนับอัตโนมัติ (ELISPOT reader) หรือหากต้องการตรวจวัดไซโตไคน์หลายชนิด ในปัจจุบันวิธีนี้ได้รับการพัฒนาการย้อมเซลล์ที่ผลิตไซโตไคน์สองชนิดในเซลล์เดียวซึ่งจะให้ผลที่มีความไวมากกว่า Flow cytometry⁽¹⁶⁾ นอกจากนี้หากต้องการบ่งบอกชนิดเซลล์ที่สร้าง IFN- γ สามารถนำ PBMCs ไปแยกเซลล์ผ่าน Immuno Magnetic Beads ก่อนการกระตุ้นเพื่อวิเคราะห์ชนิดของเซลล์ที่สร้าง IFN- γ ด้วยวิธี ELISPOT

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งจิราวรรณ มหาวันตัง ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และดวงจันทร์ สุวรรณแสน ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2003: 299.
2. Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, Lysterly HK, Morse MA. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. Clin Cancer Res 2001; 7: 1127-35.
3. Tassinon J, Burny W, Dahmani S, Zhou L, Stordeur P, Byl B, et al. Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid: comparison of the measurement of IFN-gamma production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR. J Immunol Methods 2005; 305: 188-98.
4. Charoenwong P, Lumbiganon P, Puapermpoonsiri S. The prevalence of the indirect hemagglutination test for melioidosis in children in an endemic area. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992; 23: 698-701.
5. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, et al. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to characterize dengue infections where Dengue and Japanese encephalitis co-circulate. Am J Trop Med Hyg 1989; 40: 418-27.
6. Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res 1960; 20: 462-6.
7. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. Am J Trop Med Hyg 1958; 7: 561-73.
8. Currier JR, Kuta EG, Turk E, Earhart LB, Loomis-Price L, Janetzki S, et al. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. J Immunol Methods 2002; 260: 157-72.
9. Makitalo B, Andersson M, Arestrom I, Karlen K, Villinger F, Ansari A, et al. ELISPOT and ELISA analysis of spontaneous, mitogen-induced and antigen-specific cytokine production in cynomolgus and rhesus macaques. J Immunol Methods 2002; 270: 85-97.
10. Tippiyawat P, Saenwongsa W, Mahawantung J, Suwannasaen D, Chetchotisakd P, Limmathurotsakul D, et al. Phenotypic and functional char-

- acterization of human memory T cell responses to *Burkholderia pseudomallei*. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3: e407.
11. Imrie A, Meeks J, Gurary A, Sukhbataar M, Kitsutani P, Effler P, et al. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. J Virol 2007; 81: 10081-91.
 12. Govan B, Ketheesan N. Exposure to *Burkholderia pseudomallei* induces cell-mediated immunity in healthy individuals. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 585-7.
 13. Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, et al. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. J Infect Dis 2002; 15: 1697-703.
 14. Lertmemongkolchai G, Cai G, Hunter CA, Bancroft GJ. Bystander activation of CD8+ T cells contributes to the rapid production of IFN-gamma in response to bacterial pathogens. J Immunol 2001; 166: 1097-105.
 15. Santanirand P, Harley VS, Dance DA, Drasar BS, Bancroft GJ. Obligatory role of gamma interferon for host survival in a murine model of infection with *Burkholderia pseudomallei*. Infect Immun 1999; 67: 3593-600.
 16. Boulet S, Ndongala ML, Peretz Y, Boisvert MP, Boulassel MR, Tremblay C, et al. A dual color ELISPOT method for the simultaneous detection of IL-2 and IFN-gamma HIV-specific immune responses. J Immunol Methods 2007; 320: 18-29.