จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันวิทยบริการ

บทที่ 2

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. เซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ในการศึกษานี้ได้ใช้เซลล์ HEp-2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของหลอดลม (carcinoma of larynx) มีแหล่งที่มาจากคน (human heteroploid cell line) เซลล์นี้ได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. ไวรัสเร็สไปราทอรี ซินไซเทียล (Respiratory Syncytial Virus: RSV: long strain) ซึ่งได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3. ตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วย (clinical specimen) ใช้ nasopharyngeal secretion จากเด็กที่เข้ารับการรักษาที่ภาควิชากุมารเวชศาสตร์คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจช่วงล่างอักเสบจำนวน 133 ราย การเก็บตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยนี้จะกระทำโดยแพทย์หรือพยาบาลที่ชำนาญ โดยเก็บใส่มาในหลอดที่มีน้ำยาสำหรับขนถ่าย (transport media) โดยใส่เข่มาในน้ำแข็ง แล้วรีบนำส่งมายังห้องปฏิบัติการไวรัสทันที

4. น้ำยาสำหรับเลี้ยงเซลล์

Minimun Essential Medium (MEM) (GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.)

Fetal bovine serum (Flow, North Ryde, Australia)

HEPES (N-2-hydroxyethlpiperazine-N-2-ethansulfonic) (Sigma, Mo, U.S.A.)

Amphotericin B (Squibb & Sons, Inc., U.S.A.)

Gentamycin (as sulphate) (General Drugs House Co., Ltd, Bangkok, Thailand)

015282

Penicillin (Dumex, Bangkok, Thailand)

Streptomycin (Thai meiji, Bangkok, Thailand)

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (BDH, England)

Trypsin (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

5. น้ำยาสำหรับวิธี indirect immunofluorescence และวิธี biotin-avidin-ELISA

5.1 แอนติบอดี

Anti - Respiratory Syncytial Virus, rabbit IgG fraction (B344) (Dako, Glostrup, Denmark)

Biotinylated Anti - Respiratory Syncytial Virus (E346) (Dako, Glostrup, Denmark)

Fluorescein conjugated swine immunoglobulin to rabbit immunoglobulin (F205) (Dako, Glostrup, Denmark)

Normal rabbit immunoglobulin fraction (x 903) (Dako, Glostrup, Denmark)

Peroxidase conjugated avidin (egg white) for ELISA (P347) (Dako, Blostrup, Denmark)

5.2 สารเคมี

Acetone, AR grade (BDH, England)

Bovine serum albumin (Sigma, Mo, U.S.A.)

Citric acid ($H_3C_6H_5O_7 . H_2O$) (Mallinckrodt Inc., Mo, U.S.A.)

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

Evan's blue (Sigma, Mo, U.S.A.)

Glycerol ($CH_2OHCHOHCH_2OH$)(Farmitalia Carlo Erba, Milan, Italy)

Ortho-phenylenediamine (OPD) (Sigma, Mo, U.S.A.)

Potassium Chloride (KCl) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (BDH, England)

Sodium carbonate (Na_2CO_3 (J.T.Baker Chemical Co., NY, U.S.A.)

Sodium Chloride (NaCl) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

Sodium hydroxide (NaOH) (E.Merck, Darmsladt, W.Germany)

Sulfuric acid (H_2SO_4) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

Tween 20 (Sigma, Mo, U.S.A.)

6. เครื่องแก้วและพลาสติก

Beaker (Pyrex, Corning, Ny, U.S.A.)

Cylinder (Witeg, W.Germany)

Erlenmayer flask (Pyrex, Corning, NY, U.S.A.)

Glass tube (Pyrex, Corning, NY, U.S.A.)

Microscope glass cover slips 13 mm Dia (Chancepropper, Australia)

Polystryrene microtiter plate (Maxisorp F 16unframed) (Nune-Immuno Module, Denmark)

Plastic container (Vial)

Tissue culture tube (Pyrex, Corning, NY, U.S.A.)

7. เครื่องมือ

Analytical balance(Mettler PC 440,Zurich,Switzerland)

Automatic pipette (EFLAB OY, Helsinki, Finland)

Biohazade (Gelaire Flow, Helsinki, U.S.A.)

Centrifuge (IEC CENTRA-7R, Needham Hts., MA 02194, U.S.A.) (swinging head rotor)

ELISA reader, Titertek Multiscan (Flow, Helsinki, U.S.A.)

Incubator (Memmert, W.Germany)

Inverted microscopy (Olympus, Japan)

Microplate Washer S8/12 Titertek (Flow, Helsinki, U.S.A.)

PH meter, PHM 83 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)

Pipet-Aid (Drummond Scientific Co, Japan)

Waterbath, Julabo TWB 12 (Seelbach, W.Germany)

วิธีการ

การศึกษานี้แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

I. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง และ seed virus

II. การพัฒนาการตรวจด้วยวิธี

1. อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์
2. การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีเซลล์ไวอัล
3. ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา

II. การตรวจตัวอย่างจากผู้ป่วยด้วยวิธี

1. การเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธีธรรมดา
2. การเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธีเซลล์ไวอัล
3. อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์
4. ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I) การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงและ seed virus

1. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เพื่อใช้สำหรับเพาะเลี้ยงไวรัส และเก็บไว้ใช้ตลอดการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- เมื่อเซลล์ HEp-2 เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) เต็มพื้นที่ผิวของขวดเลี้ยงเซลล์แล้วดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งไป ล้างเซลล์ด้วย PBS โดยเติม PBS pH 7.4 ลงไป 10 มล. พลิกขวดไปมาให้ทั่วผิวหน้าเซลล์แล้วดูดเอา PBS นี้ทิ้งไป ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

- เติมน้ำยา trypsin-versene (TV) ลงไปแล้วสังเกตดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทัศน์ จนเห็นเซลล์หดตัวมีลักษณะกลมขึ้นจนเกือบหลุดออกจากผิวแก้ว จึงดูดน้ำยา TV นี้ทิ้งไป

- ตบขวดเบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวแก้วแล้วเติม growth-media ลงไป นำไปนับจำนวนแล้วปรับให้ได้เซลล์จำนวน 3.5 X 10^5 เซลล์/มล.

- ถ่ายเซลล์นี้ไปใส่ในขวดสำหรับเลี้ยงเซลล์ขวดใหม่ อบไว้ที่ 37°ซ. เซลล์จะเจริญเติบโตเป็นเซลล์ชั้นเดียวบนผิวแก้วภายในเวลา 24 ชม. ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งเซลล์นี้สามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงไวรัสได้

- ถ้าต้องการเก็บเซลล์นี้เพื่อใช้ในคราวต่อไป ให้นำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เซลล์เจริญช้าลง เซลล์จะอยู่ได้ประมาณ 2-3 วัน ซึ่งต้องนำมาเพาะเลี้ยงใหม่ (passage cell) ซึ่งดำเนินการดังกล่าวข้างต้น ควรทำสัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง

2. การเตรียม seed virus

เมื่อได้ RSV (long strain) มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ แล้วจะนำมาเพิ่มจำนวนและเก็บเป็น seed virus เพื่อใช้ตลอดการทดลองนี้ ทำได้ดังต่อไปนี้

- เตรียมเซลล์ให้เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวในขวด 8 ออนซ์ ดังวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

- เจือจางไวรัสเป็น 1:10 ด้วย maintenance media จากนั้นจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง แล้วเติมไวรัสที่เจือจางแล้วนี้ลงไป 2 มล. นำไปอบที่

37°ซ. เป็นเวลา 2 ชม. นำออกมาพลิกขวดไปมาเพื่อให้ไวรัสกระจายได้ทั่ว นำออกมาทำทุก ๆ 30 นาที

- เมื่อครบเวลาดูดเอาส่วนที่เป็นน้ำทิ้งไปแล้วเติม maintenance media ใหม่ลงไป 6 มล. นำไปอบที่ 37°ซ.

- สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect: CPE) ซึ่งจะเห็นเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ดังแสดงในรูปที่ 2 ทุกวันจนเห็นว่าเกือบทุกเซลล์ติดเชื้อหมด นำเอาเซลล์นี้ไปแช่แข็งที่ -70°ซ. แล้วนำออกมาละลายทันทีที่ 37°ซ. (waterbath) ทำเช่นนี้ซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์เตกไวรัสออกมานอกเซลล์

- นำไปปั่นที่ 2500 rpm. ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บเฉพาะน้ำใสส่วนบนแบ่งใส่หลอดเล็ก ๆ เก็บไว้ที่ -70°ซ.

II. การพัฒนาวิธีการตรวจ

1. การตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (indirect immunofluorescence : IFA) เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันอยู่เป็นประจำ ดังนั้นการพัฒนาวิธีจึงเป็นแต่เพียงการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำยาที่ใช้ในการตรวจดังมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1. การเตรียมแอนติเจนของ RSV

- เพาะเลี้ยงไวรัส RSV ในเซลล์ HEp-2 ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการเตรียม seed virus แต่รอให้เซลล์เกิดติดเชื้อได้ประมาณ 70-80% ทำให้เซลล์หลุดจากผิวแก้วโดยตบข้างขวดเบา ๆ

- นำเซลล์ที่ได้นี้มาปั่นที่ 2500 rpm ที่ 4°ซ. เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง แล้วเติม PBS PH 7.4 ลงไปประมาณ 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเช่นเดิม ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 1 ครั้ง

- นำตะกอนครั้งสุดท้ายที่ได้ซึ่งจะเป็นเซลล์ที่ติดเชื้อ RSV มาหยดลงบน slide ซึ่งมีหลุมอยู่ 2 แถว แถวละ 4 หลุม ปล่อยให้แห้งนำไป fix ใน acetone เย็นที่อุณหภูมิ -20°ซ. เป็นเวลา 10 นาที ผึ่งให้แห้ง เก็บใส่กล่องแล้วนำไปเก็บที่ -20°ซ.

1.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำยา

- นำ slide ออกจาก -20°ซ.มาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

- เจือจาง rabbit anti-RSV เป็น 1:10, 1:20, 1:30 และ 1:40 ด้วย PBS pH 7.4 แล้วหยดลงบนหลุมของ RSV antigen โดยใช้ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ความเจือจางละ 1 slide ซึ่งมีแอนติเจนอยู่ slide ละ 8 หลุม นำไปอบที่ 37°ซ. ในกล่องความชื้นเป็นเวลา 1 ชม.

- เมื่อครบเวลานำ slide ออกมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง โดยจุ่ม slide แช่ทิ้งไว้ครั้งละ 5 นาที แล้วผึ่ง slide ให้แห้งเช็ดรอบ ๆ หลุมของแอนติเจน

- เจือจาง swine anti-rabbit immuno-globulin conjugated FITC เป็น 1:10, 1:20, 1:30 และ 1:40 แล้วหยดลงบนหลุมของแอนติเจน โดยให้ความเจือจางที่ 1:10 หยดลงในหลุมที่ 1 และ 5 ของ slide ทุกแผ่น และความเจือจางที่ 1:20 หยดลงในหลุมที่ 2 และ 6, 1:30 ลงในหลุมที่ 3 และ 7 และ 1:40 ลงในหลุมที่ 4 และ 8 โดยใช้ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในกล่องความชื้น เป็นเวลา 1 ชม.

- เมื่อครบเวลานำ slide ออกมาล้างเช่นเดิม แต่ครั้งสุดท้ายจะจุ่ม slide ลงในขวดที่มีสี Evan's blue ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วล้างสีออกด้วยการจุ่มลงในน้ำกลั่นนาน 1 นาที

- ผึ่งให้แห้งแล้ว mount ด้วย buffer glycerine นำไปดูด้วยกล้อง Fluorescence

- การอ่านผล จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อ RSV เรืองแสงสีเขียว-เหลืองในส่วนของ cytoplasm ของเซลล์ โดยดูความเข้มของการเรืองแสง (intensity) และให้คะแนนเป็น 4+ จนถึง 0 โดยที่คะแนน 4+ จะหมายถึงการเรืองแสงที่สว่างมากและลดหลั่นกันลงมาจนเป็น 0 คะแนน คือไม่มีการเรืองแสงเลย

2. การแยกเชื้อด้วยวิธีเชลล์ไวอัล (shell vial technique)

2.1 การเตรียมเซลล์

การเพาะเลี้ยงไวรัสด้วยวิธีนี้ จะเลี้ยงเซลล์ลงในหลอดพลาสติกก้นแบนขนาด 14 X 40 มม. ภายในจะมีแผ่นแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มม. เพื่อเป็นที่เกาะเจริญของเซลล์ วิธีการเตรียมเซลล์ดำเนินการดังกล่าวแล้วข้างต้น แล้วปรับเซลล์ HEp-2 ให้ได้ 1.2 X 10^5 เซลล์/มล. ถ่ายใส่หลอดหลอดละ 1 มล. นำไปอบที่ 37°ซ. จะได้เซลล์เจริญเป็นชั้นเดียวบนแผ่นแก้วภายในเวลา 24 ชม.

2.2 การพัฒนาวิธีการตรวจ

2.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปั่น

2.2.1.1 ความแรงของการปั่น

- เลี้ยงเซลล์ HEp-2 ในหลอดพลาสติกก้นแบนให้เซลล์เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวบนผิวแผ่นแก้ว จำนวน 14 หลอด ต่อ 1 ชุดของความแรง
- เจือจางไวรัสจาก seed virus เป็น 10^1-10^6 เท่าด้วย maintenance media
- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง แล้วเติมไวรัสลงไปโดยใช้ความเจือจางละ 2 หลอด หลอดละ 1 มล. ส่วน 2 หลอดสุดท้ายเติม maintenance media 1 มล.
- นำหลอดทั้งหมดไปปั่น ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 1 ชม. โดยแบ่งการทดลองเป็น 6 ชุด คือปั่นที่ความแรง 0 (ไม่ปั่น), 50, 210, 700, 1,300, 1,900 g. ตามลำดับ
- เมื่อครบเวลาดูดเอาน้ำใสส่วนบนทิ้งไป แล้วเติม maintenance media ลงไปจำนวน 0.5 มล. นำไปอบที่ 37°ซ. นาน 24 ชม.
- เท maintenance media ทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วจึงเติม acctone ลงไป 1 มล. ทิ้งไว้ 15 นาที นำแผ่นแก้วมาติดบน slide แล้วนำไปย้อมหาแอนติเจนของ RSV ด้วยวิธี IFA

2.2.1.2 อุณหภูมิที่ใช้การปั่น

ดำเนินการเช่นเดียวกับ 2.2.1.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แต่ใช้ความเร็วของการปั่นที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.1.1 เป็นเวลา 1 ชม. แยกการทดลองเป็น 2 ชุด โดยที่ชุดแรกปั่นที่อุณหภูมิ 25°ซ. อีกชุดจะปั่นที่อุณหภูมิ 4°ซ.

2.2.1.3 เวลาที่ใช้ในการปั่น

ดำเนินการเช่นเดียวกับ 2.2.1.1 โดยใช้ความเร็วของการปั่นที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.1.1 และอุณหภูมิในการปั่นที่เหมาะสมจากข้อ 2.1.2 แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ตามเวลาที่ใช้ในการปั่น โดยจะใช้เวลาในการปั่นนาน 30 นาที 60 นาที 90 นาที และ 120 นาที ตามลำดับ

2.2.2 ศึกษาถึงระยะเวลาในการตรวจพบไวรัส ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ดำเนินการเช่นเดียวกับ 2.2.1.1 แต่ใช้ไวรัสที่เจือจางเป็น 10^2 เท่า เพียงความเจือจางเดียว และปั่นโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปั่นที่ได้จากข้อ 2.2.1 นำไปอบที่ 37°ซ. แล้วนำแผ่นแก้วออกมาย้อม IFA เมื่อเวลา 0, 4, 8, 12, 18, 24, 36 และ 72 ชม. ตามลำดับ

2.2.3 การตรวจหา RSV ในเซลล์ที่ติดเชื้อบนแผ่นแก้วด้วยวิธี IFA

ดำเนินการเช่นเดียวกับการย้อม IFA ดังได้กล่าวมาแล้ว โดยใช้ปริมาณของน้ำยาเป็น 25 ไมโครลิตร

3. การตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา (Biotin-avidin ELISA) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1. การเตรียมแอนติเจนของ RSV สำหรับใช้ในการพัฒนาการตรวจและเป็นตัวควบคุมคุณภาพ (positive control) ของวิธีนี้ ทำได้โดยดำเนินขั้นตอนต่าง ๆ เช่นเดียวกับการเตรียม seed virus ที่กล่าวในข้างต้นจนได้น้ำใสส่วนบนที่มีไวรัสอยู่ นำไป inactivate ที่ 56°ซ. เป็นเวลา 2 ชม. เมื่อครบเวลาแบ่งใส่หลอดเก็บไว้ที่ -20°ซ.

ความเข้มข้นของแอนติเจนที่จะนำไปใช้นี้ หาได้จากการเจือจางแอนติเจนนี้เป็น 10เท่าเป็นลำดับ (serial ten fold dilution) แล้วตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา โดยทำพร้อมไปกับตัวอย่างตรวจของเด็กที่ให้ผลบวก ด้วยวิธี IFA ซึ่งทำเป็นประจำในห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วเลือกค่าความเจือจางของแอนติเจนที่ให้ค่า optical density (OD) ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากตัวอย่างตรวจของผู้ป่วย จะเป็นความเข้มข้นที่จะนำไปใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีนี้ต่อไป

3.2 การเตรียม RSV negative control สำหรับใช้เป็นค่าผลลบในการพัฒนาการตรวจและใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพ (negative control) ของวิธีนี้ โดยใช้ nasopharyngeal secretion ของเด็กที่ไม่ได้ติดเชื้อ RSV ด้วยวิธี IFA และเก็บในช่วงนอกฤดูการระบาด นำมารวมกันแล้วแบ่งใส่หลอดเก็บไว้ที่ -20°ซ.

3.3 การศึกษาถึงความเจือจางที่เหมาะสมของน้ำยา ที่ใช้สำหรับศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา

3.3.1 ความเจือจางของ biotinylated anti-RSV และ avidin conjugated peroxidase

- เคลือบ plate (maxisorp F 16 unframed, Nunc-Immuno Module, ซึ่งเป็น plate ที่สามารถแยกออกมาเป็น strip ได้โดยที่ 1 strip จะมี 2 แถว แถวละ 8 หลุม) ด้วย rabbit anti-respiratory syncytial virus (a-RSV) ในแถวที่ 1, 3, 5 และ 7 และเคลือบด้วย normal rabbit immunoglobulin (NRI) ในแถวที่ 2, 4, 6 และ 8 โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 10 ไมโครกรัม/มล. ใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเท่ากัน ใส่ในกล่องความชื้น นำไปไว้ที่ 4°ซ.(ในตู้เย็น) ทิ้งไว้ข้ามคืน (ประมาณ 18-24 ชม.)

- ล้างด้วย 0.1% Tween 20 ใน PBS pH 7.2 โดยล้างทั้งหมด 5 ครั้งด้วยเครื่อง ELISA washer model S8/12 โดยเลือกใช้ mode 01 ผักแต่ละครั้งของการล้างนาน 1 นาที ปริมาตรที่ใช้ล้างแต่ละครั้งใช้ 0.270 มล.

- เติม RSV antigen ในความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จาก 3.1.1 ลงในหลุมแถวนอนโดยใส่ 1 แถวเว้น 1 แถว นั่นคือเติมลงในแถวที่ A ,C, E และ G แล้วเติม RSV negative control ลงในหลุมแถวนอนแถวที่เหลือ นั่นคือหลุม B, D, F และ H ตามลำดับ นำไปไว้ที่ 4°ซ.(ตู้เย็น)ในกล่องความชื้นทิ้งไว้ข้ามคืนเช่นกัน

- เมื่อครบเวลานำออกมาล้างเช่นเดิม

- เจือจาง biotinylated anti-RSV เป็น 1:2,000, 1:3,000, 1:4,000 และ 1:6,000 ด้วย diluting buffer สำหรับเจือจาง biotinytated anti-RSV แล้วเติมลงในหลุมแถวตั้ง โดยความเจือจาง 1 ค่าจะเติมลงไป 2 แถว นั่นคือ แถวที่ 1 และ 2 เติม biotinylated anti-RSV ที่เจือจางเป็น 1:2,000 แถวที่ 3 และ 4 เติมที่เจือจางเป็น 1:3,000 ตามลำดับ จนครบทุกความเข้มข้น นำไปใส่ในกล่องที่มีความชื้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) นาน 1 ชม.

- เมื่อครบเวลานำออกมาล้าง

- เจือจาง avidin conjugated peroxidase เป็น 1:3,000, 1:5,000, 1:7,000 และ 1:10,000 แล้วเติมลงในหลุมแถวนอน ความเจือจางละ 2 แถวตามลำดับ ใส่กล่องที่มีความชื้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) นาน 1 ชม.

- เมื่อครบเวลานำออกมาล้าง

- เติม substrate (OPD) ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) นาน 15 นาที

- เติม 4N H_2SO_4 แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 492 nm บันทึกผลลงในตาราง

3.3.2 ความเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดี ที่ใช้เคลือบ plate

เจือจาง a-RSV และ NRI ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 20,10,5 และ 2.5 ไมโครกรัม/มล. แล้วใช้เคลือบ plate โดยใช้

ความเจือจางละ 4 หลุม ใส่ในกล่องความชื้น นำไปไว้ที่ 4°ซ. (ตู้เย็น) นาน 18-24 ชม. นำออกมาล้างจากนั้นเติม RSV positive control และ RSV negative control ลงไป โดยใช้ความเจือจางละ 2 หลุม จากนั้นดำเนินการตาม 3.1.3.1 โดยเลือกใช้ความเจือจางของ biotinylated-anti-RSV และ avidin conjugated peroxidase ที่เหมาะสมมาใช้ในปฏิกริยา

3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบหลุม

3.4.1 ศึกษาถึงอุณหภูมิที่ใช้เคลือบ

- เคลือบหลุมด้วย a-RSV และ NRI โดยปรับให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 10 ไมโครกรัม/มล. โดยเคลือบ a-RSV ในแถวแรกของ strip และ NRI ในแถวที่ 2 เคลือบทั้งหมด 4 ชุด (4 strip) ใส่ในกล่องความชื้นแล้วแยกไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.), 37°ซ., 37°ซ. (waterbath) เป็นเวลา 2 ชม. และที่อุณหภูมิ 4°ซ.(ตู้เย็น) ข้ามคืน (18-24 ชม.) อุณหภูมิละ 1 strip เมื่อครบเวลานำ plate ออกมาล้าง

- เติม RSV positive control ลงในหลุม A ถึง D ทั้ง 2 แถว และเติม RSV negative control ลงในหลุมที่ E ถึง H ทั้ง 2 แถวเช่นกัน ใส่กล่องความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ.(ตู้เย็น) ข้ามคืน เมื่อครบเวลานำออกมาล้าง

- เติม biotinylated anti-RSV ที่เจือจางเป็น 1:4,000 ลงทุกหลุม ใส่กล่องความชื้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) นาน 1 ชม. เมื่อครบเวลานำออกมาล้าง

- เติม avidin conjugated peroxidase ที่เจือจางเป็น 1:7,000 ลงทุกหลุม ใส่กล่องความชื้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) นาน 1 ชม. เมื่อครบเวลานำออกมาล้าง

- เติม substrate (OPD) ลงทุกหลุม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที

- เติม 4 N H_2SO_4 นำไปวัดค่า OD ที่ 492 nm. บันทึกผลลงในตาราง

3.4.2 ศึกษาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบ plate

โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด เช่นเดียวกับ 3.1.4.1 โดยเคลือบ plate ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่เลือกมาจากข้อ 3.1.4.1 ในกล่องที่มีความชื้น เป็นเวลา 30 นาที 1 ชม. 2 ชม. และ 3 ชม. ตามลำดับ แล้วดำเนินขั้นตอนต่าง ๆ เช่นเดียวกับ 3.1.4.1

3.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการทำปฏิกริยาของ RSV antigen

3.5.1 ศึกษาถึงอุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกริยา

- เคลือบหลุมด้วย a-RSV และ NRI จำนวน 4 strip โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.1.4

- เติม RSV positive control และ RSV negative control ลงไปเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.4.1 ใส่กล่องความชื้นแล้วแยกไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.), 37°ซ., 37°ซ.(waterbath) เป็นเวลา 2 ชม. และที่ 4°ซ.(ตู้เย็น) ข้ามคืน อุณหภูมิละ 1 strip เมื่อครบเวลาดำเนินขั้นตอนต่อไปเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4.1

3.5.2 ศึกษาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกริยาของ RSV antigen

แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด เช่นเดียวกันโดยอบแอนติเจนให้ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่เลือกได้จาก 3.1.5.1 ในกล่องที่มีความชื้นเป็นเวลา 30 นาที 1 ชม. 2 ชม. และ 3 ชม. ตามลำดับ แล้วดำเนินขั้นตอนตาม 3.4.1

3.6 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการทำปฏิกริยาของ biotinylated anti-RSV

3.6.1 ศึกษาถึงอุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกริยา

หลังจากเคลือบ plate ด้วย a-RSV

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ NRI แล้วทำปฏิกริยากับแอนติเจนในสภาวะที่เหมาะสมที่เลือกไว้แล้วนั้น หลังจากล้างแล้วเติม biotinylated anti-RSV ที่เจือจางเป็น 1:4,000 ลงไปทุกหลุม แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด โดยแยกไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.), 37°ซ., 37°ซ.(waterbath) นาน 1 ชม. และที่ 4°ซ.(ตู้เย็น) ข้ามคืน อุณหภูมิละ 1 strip เมื่อครบเวลาแล้วจึงดำเนินขั้นตอนต่อไปเช่นเดียวกับ 3.4.1

3.6.2 ศึกษาถึงระยะเวลาในการทำปฏิกริยา

ดำเนินการเช่นเดียวกับ 3.6.1โดยให้ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจาก 3.6.1 เป็นเวลา 30 นาที, 1 ชม. 2 ชม. และ 3 ชม. ตามลำดับ

3.7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการทำปฏิกริยาของ avidin conjugated peroxidase

ดำเนินการคล้ายกับ 3.6 โดยใช้ avidin conjugated peroxidase ที่เจือจางเป็น 1:7,000

3.8 ศึกษาถึงระยะเวลาในการทำปฏิกริยาของการเกิดสี

ดำเนินขั้นตอนเช่นเดียวกับ 3.4.1 โดยในแต่ละขั้นตอนให้ทำปฏิกริยาในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง จนถึงการเติม substrate (OPD) ทิ้งให้ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) ในที่มืดนาน 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ

3.9 การศึกษาถึงความเจือจางที่เหมาะสมของน้ำยาต่าง ๆ สำหรับใช้ในการตรวจหา RSV ในตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วย

ดำเนินการเช่นเดียวกับ 3.1.3 แต่ขั้นตอนต่าง ๆ จะใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้างต้น

3.10 ศึกษาถึงความเที่ยงตรง (precision)

โดยทำการตรวจหา RSV antigen ด้วยวิธีนี้ที่สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมซ้ำ 20 ครั้ง พร้อมกัน

3.11 ศึกษาถึงความเชื่อถือได้ของการทดสอบ (reproducibility)

โดยทำการตรวจหา RSV antigen ซ้ำกัน 20 ครั้งในการทดสอบที่ทำ 10 การทดสอบที่ทำการตรวจหาในเวลาที่ต่างกัน โดยใช้สภาวะและความเจือจางของน้ำยาที่เหมาะสม

III. การตรวจในตัวอย่างจากผู้ป่วย

nasopharyngeal secretion ที่ใช้สำหรับตรวจนี้ได้จากการ suction โดยการสอดสาย polyethylene catheter ซึ่งปลายอีกข้างหนึ่งจะต่อเข้ากับหลอดเก็บตัวอย่างที่ต่อเข้ากับเครื่อง suction เข้าไปในช่องจมูกของเด็กประมาณว่าปลายของสายยางนี้อยู่บริเวณ nasopharynx ดูดเก็บเซลล์บริเวณนี้ออกมา แล้วดูดล้างสาย catheter นี้ด้วย transport media ใส่ลงในหลอดซึ่งต่อกันอยู่แล้ว นำหลอดแช่ลงในน้ำแข็ง นำส่งห้องปฏิบัติการ แล้วดำเนินการตรวจด้วยวิธีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การแยกและวิเคราะห์เชื้อไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงในเซลล์

สำหรับวิธีนี้ได้ดำเนินขั้นตอนตามวิธีของ Lennette E.H.(4) ซึ่งเป็นวิธีที่มีแบบแผนเป็นอย่างดีแล้ว มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 การเตรียมเซลล์

การเพาะเลี้ยงไวรัสวิธีนี้ จะเพาะเลี้ยงลงในหลอดทดลองดังนั้นจึงต้องเตรียมเซลล์ให้เจริญเติบโตอยู่บนผิวแก้วของหลอดทดลอง โดยดำเนินการเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยปรับเซลล์ให้ได้เป็น 2.5 X 10^5 เซลล์/มล. ถ่ายใส่หลอดเลี้ยงเซลล์ขนาด 16 X 125 ซม. ซึ่งมีฝาปิดเรียบร้อย จากนั้นนำหลอดเลี้ยงเซลล์นี้ไปวางเอียงใน rack นำไปไว้ที่ 37°ซ. เซลล์ HEp-2 นี้จะเจริญบนผิวแก้วของหลอดเลี้ยงเซลล์ได้ประมาณ 70-80% ของพื้นที่ ภายในเวลา 24 ชม.

1.2 การตรวจตัวอย่างจากผู้ป่วย

1.2.1 การเตรียมตัวอย่างตรวจ เมื่อได้ nasopharyngeal secretion มาแล้วใช้ pasture pipette ที่ปราศจากเชื้อดูดขึ้นมาแล้วถ่ายไปใส่ในหลอดก้นแหลมสำหรับปั่น (centrifuge tube) ดูดขึ้นเป่าลงหลาย ๆ ครั้งติดกันเพื่อทำให้ส่วนที่เป็นเซลล์หลุดออกจากก้อนเสมหะ และตัวอย่างตรวจนี้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นที่ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปใช้ในการเพาะแยกเชื้อไวรัส

1.2.2. การแยกเชื้อไวรัส RSV จากตัวอย่างตรวจของผู้ป่วย ทำได้ดังนี้

- เลี้ยงเซลล์ HEp-2 ในหลอดทดลอง
- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมน้ำใสส่วนบนของตัวอย่างตรวจที่ได้จากการปั่นลงไปจำนวน 0.2 มล. แล้วนำไปอบไว้ที่ 37°ซ. โดยให้น้ำใสส่วนบนนี้คลุมอยู่ทั่วผิวหน้าเซลล์ เอียงหลอดไปมาทุก ๆ 30 นาที
- เมื่อครบเวลาเทน้ำใสส่วนบนนี้ทิ้งไปแล้วเติม maintenance media ลงไปจำนวน 1 มล. เอียงหลอดไปมา แล้วเททิ้ง ทำซ้ำอีกครั้งเพื่อล้างที่ไม่ต้องการทิ้งไป แล้วจึงเติม maintenance media ลงไป 1 มล. นำไปอบไว้ที่ 33°ซ. นำออกมาตรวจดู CPE ทุกวัน เป็นเวลา 8-10 วัน โดยเปลี่ยน maintenance media ทุก ๆ 3-4 วัน
- ในรายที่ไม่เห็น CPE ในวันที่ 10 ก็จะทำการผ่านไวรัสไปสู่เซลล์ชุดใหม่ (passage ที่ 2) คือนำเซลล์นี้ไปแช่แข็งที่ -70°ซ. แล้วนำมาละลายที่ 37°ซ. (waterbath) ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้งเพื่อให้ไวรัสหลุดออกจากเซลล์ นำไปปั่นเอาน้ำใสส่วนบนไปใส่ในเซลล์ชุดใหม่แล้วดำเนินการเช่นเดิม

1.2.3 การวิเคราะห์เชื้อ RSV

เมื่อเซลล์เกิด CPE นำเซลล์นี้ไปย้อม IFA กับ rabbit anti-RSV เพื่อพิสูจน์ยืนยันว่าเป็น RSV จริง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.4 การแปลผล

ผลบวก จะถือในรายที่พบไวรัส RSV ในเซลล์ HEp-2 ซึ่งทำให้เกิด CPE และ นำไปย้อม IFA แล้วให้ผลยืนยัน

ผลลบ คือรายที่ไม่พบไวรัส RSV ทั้งใน passage ที่ 1 และ passage ที่ 2

2. การตรวจด้วยวิธีเซลล์ไวอัล

2.1 การเตรียมตัวอย่าง มีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสำหรับเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ดังกล่าวในข้อ 1.2.1 จนได้น้ำใสส่วนบนที่ได้จากการปั่น

2.2 การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างของผู้ป่วยมีขั้นตอนดังนี้

- เตรียมเซลล์ HEp-2 ในหลอดพลาสติกก้นแบนดังกล่าวแล้วข้างต้น
- เทอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง แล้วเติมน้ำใสส่วนบนของตัวอย่างตรวจที่เตรียมไว้ลงไปหลอดละ 0.2 มล. ดำเนินขั้นตอนต่าง ๆ โดยใช้สภาวะเหมาะสม ที่ทำได้จากการทดลองข้างต้น

2.3.3 การแปรผล

ผลบวก เมื่อย้อมด้วยวิธี IFA แล้วจะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อ RSV เรืองแสงสีเหลืองอยู่ในส่วนของ cytoplasm ของเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4

ผลลบ เมื่อย้อมด้วย IFA แล้วไม่พบเซลล์ที่ติดเชื้อ RSV ดังแสดงในรูปที่ 3

3. การตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์

3.1 การเตรียมตัวอย่างตรวจ จะดำเนินการเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างสำหรับเพาะแยกเชื้อไวรัสดังกล่าวแล้วข้างต้น แต่จะใช้ส่วนที่เป็น

ตะกอนหลังจากการปั่น โดยจะนำเอาตะกอนซึ่งจะเป็นส่วนที่มีเซลล์อยู่นี้มาปั่นล้างต่อด้วย PBS pH 7.4 อีก 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเมื่อได้ตะกอนจะนำมาหยดบนแผ่น slide หลุมที่มี 8 หลุม โดยคนไข้ 1 ราย จะหยด 2 หลุม ที่อยู่ใกล้กัน โดยให้ได้เซลล์กระจายตัวสม่ำเสมอ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทิ้งให้แห้ง แล้วนำไป fix ใน acetone เย็นที่ -20°ซ. เป็นเวลา 10 นาที ผึ่งให้แห้ง แล้วเก็บใส่กล่องเก็บที่ -20°ซ. เพื่อนำไปย้อม IFA ต่อไป

3.2. การย้อม IFA นำ slide ออกมาจาก -20°ซ. ผึ่งให้แห้ง จากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนดังกล่าวในข้อ 3.1.2 โดยเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำยาที่เลือกไว้แล้วในขั้นตอนของการเติม rabbit anti-RSV นั้น จะหยด normal rabbit immunoglobulin ในความเข้มข้นที่เท่ากันลงไปในหลุมของตัวอย่างตรวจอีกหลุมที่อยู่ใกล้กัน เพื่อดูปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะที่อาจเกิดขึ้นได้

3.3 การอ่านผลและการแปรผล

ผลบวก จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อ RSV นี้เรืองแสงขึ้นมาในส่วนของ cytoplasm เมื่อย้อมด้วย rabbit anti-RSV ดังแสดงในรูปที่ 5 และไม่เห็นเซลล์นี้เรืองแสง เมื่อย้อมด้วย normal rabbit immunoglobulin

ผลลบ ไม่มีเซลล์ใดเรืองแสง ดังแสดงในรูปที่ 6

4. การตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา

4.1 การเตรียมตัวอย่างตรวจ วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสำหรับเพาะแยกเชื้อไวรัสดังกล่าวข้างต้นในข้อ 1.2.1 เมื่อได้น้ำใสส่วนบนที่ได้จากการปั่นตัวอย่างตรวจ เก็บไว้ที่ -20°ซ. หรือนำมาใช้ตรวจหาทันที

4.2 การตรวจหา RSV จากตัวอย่าง จะดำเนินขั้นตอนการตรวจเช่นเดียวกับขั้นตอนของการพัฒนาวิธี โดยใช้สภาวะและความเข้มข้นของน้ำยาที่เหมาะสมมาใช้ในการตรวจ

4.3 การแปรผล จะถือค่าผลต่างของ OD จากหลุมที่วัดได้จากการเคลือบด้วย rabbit a-RSV กับหลุมที่เคลือบด้วย normal rabbit immunoglobulin ที่มีค่ามากกว่า 0.200 ขึ้นไปเป็นผลบวก ถ้าน้อยลงมาจะเป็นผลลบ

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

ค่าเฉลี่ย (mean; $\bar{X}$) $= EX / n$

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

$$= \sqrt{E (X-X)^2 / n}$$

สัมประสิทธิ์ของการกระจาย (% coefficient of variation; %CV)

$$= \frac{\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน X 100}}{\text{ค่าเฉลี่ย}}$$

ความไว (sensitivity) $= \frac{\text{ผลบวกจริงที่อ่านได้ X 100}}{\text{ผลบวกจริงทั้งหมด}}$

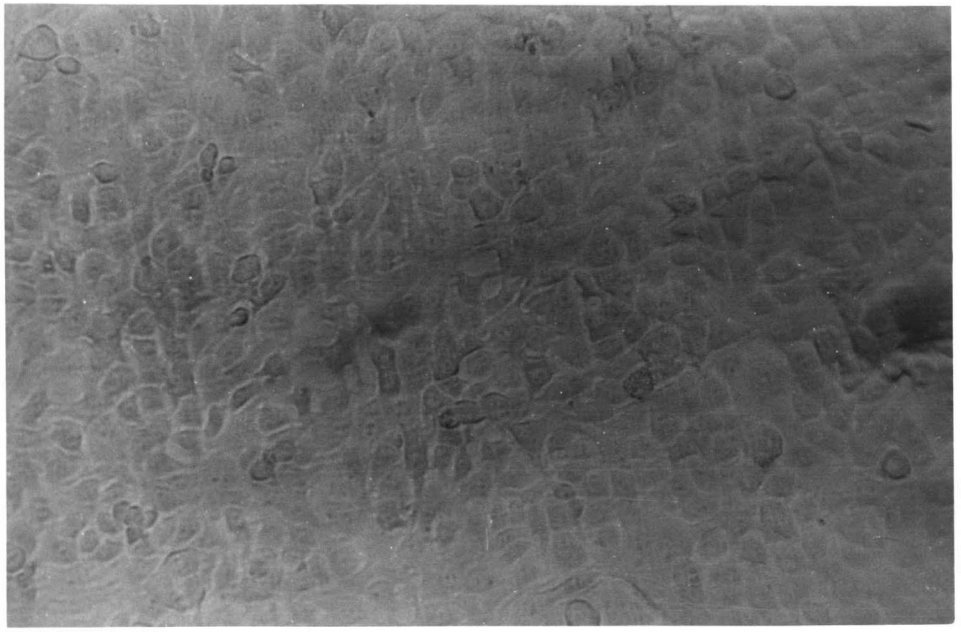
ความจำเพาะ (specificity) $= \frac{\text{ผลลบจริงที่อ่านได้ X 100}}{\text{ผลลบจริงทั้งหมด}}$

ความสามารถของการทำนาย เมื่อผลการทดสอบเป็นบวก (positive predictive value)

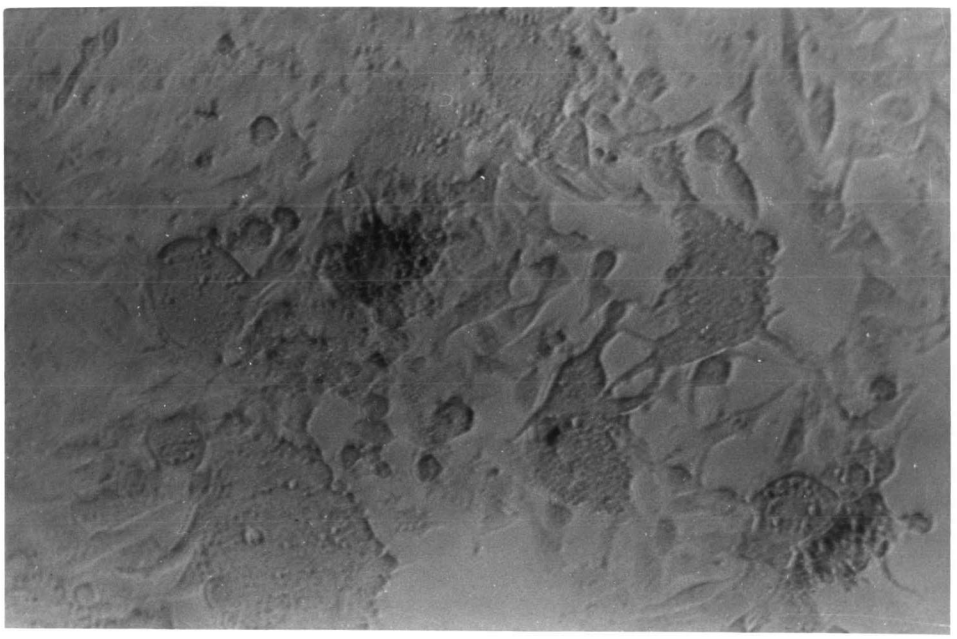
$$= \frac{\text{ผลบวกจริงที่อ่านได้ X 100}}{\text{ผลบวกที่อ่านได้ทั้งหมด}}$$

ความสามารถของการทำนาย เมื่อผลการทดสอบเป็นลบ (negative predictive value)

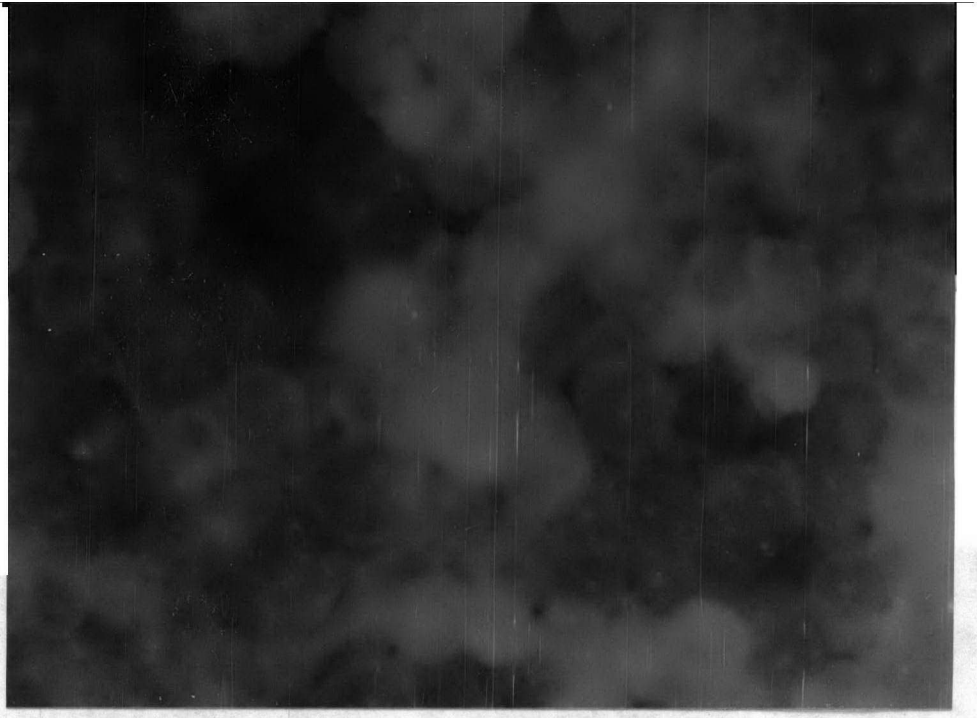
$$= \frac{\text{ผลลบจริงที่อ่านได้ X 100}}{\text{ผลลบที่อ่านได้ทั้งหมด}}$$



รูปที่ 1 แสดงเซลล์ HEp-2 ปกติ จะเห็นเซลล์ขนาดใกล้เคียงกันเรียงตัวติดกันเป็นเซลล์ชั้นเดียว (กำลังขยาย 200 เท่า)

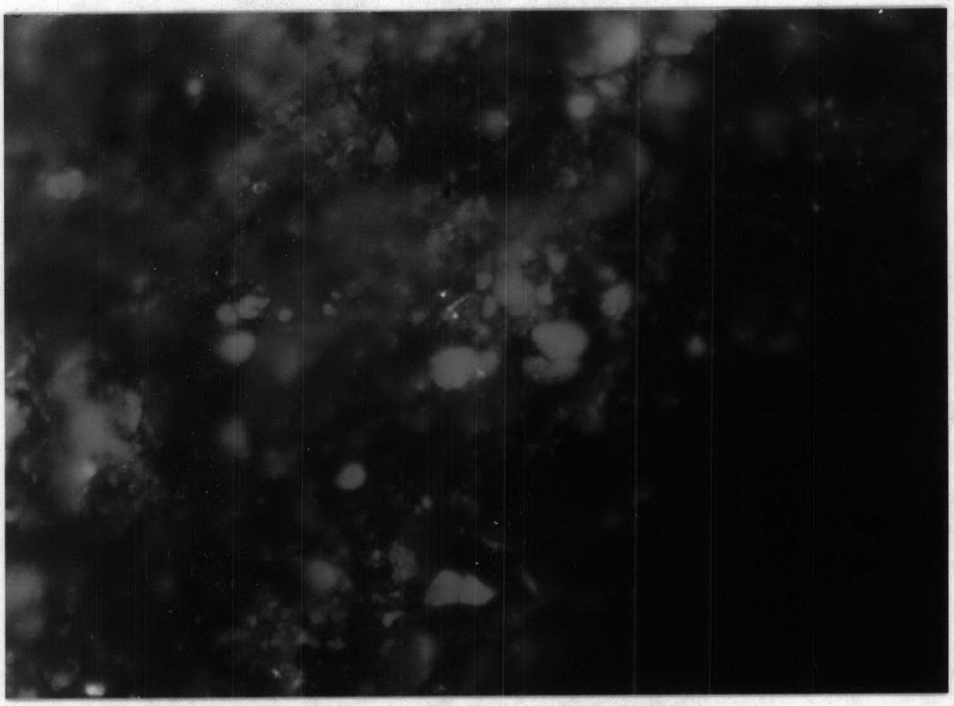


รูปที่ 2 แสดงการเกิด cytopathic effect (CPE) ของเซลล์ HEp-2 ที่เกิดจาก Respiratory Syncytial virus จะเห็นเซลล์ขนาดใหญ่ ขนาดแตกต่างกัน (กำลังขยาย 200 เท่า)

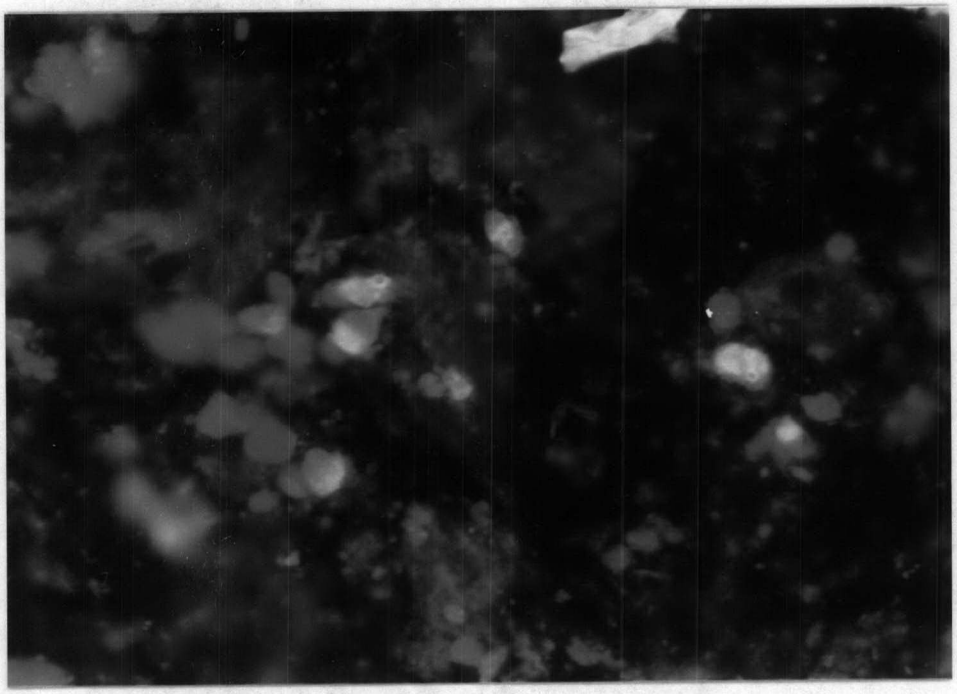


รูปที่ 3 แสดงผลลบของการตรวจด้วยวิธี เชลล์ไวอัล (shell vial technique) ซึ่งจะเห็นเซลล์ทั้งหมดติดสีแดงของ Evan's blue (กำลังขยาย 400 เท่า)

รูปที่ 4 แสดงผลบวกของการตรวจด้วยวิธีเชลล์ไวอัล (Shell vial technique) จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อเรืองแสงสีเหลืองในส่วนของ cytoplasm อยู่ท่ามกลางเซลล์ปกติที่ติดสีแดงของ Evan's blue (กำลังขยาย 400 เท่า)



รูปที่ 5 แสดงผลลบของการตรวจด้วย วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (indirect immunofluorescence) จะไม่เห็นมีเซลล์ใดเรืองแสง (กำลังขยาย 400 เท่า)



รูปที่ 6 แสดงผลบวกของการตรวจด้วย วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (indirect immunofluorescence) จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อเรืองแสงสีเหลือง อยู่ในส่วนของ cytoplasm (กำลังขยาย 400 เท่า)