การศึกษาความไวและความจำเพาะของวิธี Nested Polymerase Chain Reaction ในการตรวจไวรัสพิษสุนัขบ้า

นางสาวราตรี รัตนศิวรมกษ์

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-582-862-9

ลิขสิทธิ์บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019239 เ๑๖๗๓๖๖

The study of sensitivity and specificity in Rabies virus detection by using the Nested Polymerase Chain Reaction

Miss Ratree Rattanasiwamoke

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1993

ISBN 974-582-862-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความไวและความจำเพาะของวิธี Nested Polymerase Chain Reaction ในการตรวจไวรัสพิษสุนัขบ้า
โดย	นางสาวราตรี รัตนศิวรมกษ์
สหสาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวลทิพย์ กมลวารินทร์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวลทิพย์ กมลวารินทร์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ราตรี รัตนศิวรมกษ์ : การศึกษาความไวและความจำเพาะของวิธี NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION ในการตรวจไวรัสพิษสุนัขบ้า (THE STUDY OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY IN RABIES VIRUS DETECTION BY USING THE NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION) อ.ที่ปรึกษา : ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. นวลทิพย์ กมลวารินทร์, 99 หน้า. ISBN 974-582-862-9

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อประเมินวิธี nested PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า ทั้งในแง่ความไวและความจำเพาะของวิธีโดยนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจมาสกัด RNA และเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA โดยอาศัยปฏิกิริยา reverse transcription ซึ่ง cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR 2 ขั้นตอนต่อไปซึ่งเป็นการเพิ่มความไวมากกว่า PCR เพียงขั้นตอนเดียว และเป็นการยืนยันความจำเพาะโดยไม่อาศัย hybridization

สิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ สมองสุนัข ที่นำมาตรวจหาไวรัสพิษสุนัขบ้าที่สถานเสาวภา สภากาชาดไทย จำนวน 500 ตัวอย่าง และสมองสุนัขจำนวน 20 ตัวอย่างซึ่งเป็นสมองบวก 10 และลบ 10 ตัวอย่าง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง(28-33^{o}C) ที่เวลาต่าง ๆ กันในระยะตั้งแต่ 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชม.โดยเปรียบเทียบผลการตรวจของ nested PCR กับวิธีที่ใช้ตรวจประจำวันคือ Fluorescent Antibody Test (FAT) และ Mouse Inoculation Test (MIT)

จากผลการตรวจสมอง 500 ตัวอย่าง พบว่า nested PCR มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่ากับ MIT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจยืนยันการวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าทางห้องปฏิบัติการ โดยที่ FAT ให้ผลลบปลอม 1 ตัวอย่าง นอกจากนี้ nested PCR ยังสามารถตรวจไวรัสในสมองสุนัขแม้ว่าจะทิ้งไว้นานถึง 72 ชม. ก็ตาม ซึ่งการตรวจด้วย FAT และ MIT จะเริ่มให้ผลลบปลอมตั้งแต่ช่วงเวลา 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ

สำหรับปริมาณ virus specific RNA และ total RNA (brain RNA และ specific virus RNA) ที่น้อยที่สุดที่วิธี nested PCR สามารถตรวจได้คือ 8 pg และ 0.5 ng ตามลำดับ

วิธี nested PCR สามารถนำมาใช้เป็นวิธีตรวจยืนยันในกรณีที่ FAT ให้ผลลบได้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สัตวศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต ราตรี รัตนศิวรมกษ์

สาขาวิชา อุตสาหกรรมการเกษตร ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C346723 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD:
: RABIES VIRUS / NESTED PCR / SENSITIVITY / SPECIFICITY

RATREE RATTANASIWAMOKE : THE STUDY OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY IN RABIES VIRUS DETECTION BY USING THE NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION, THESIS ADVISOR : PROF. THIRAVAT HEMACHUDHA, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASS. PROF. NUANTHIP KAMOLVARIN, PhD. 99 PP. ISBN 974-582-862-9

The objective of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of nested PCR technique for rabies diagnosis. RNA was extracted from animal brain samples and then amplified in a two-step PCR after reverse transcription step. The used of the second amplification increases the sensitivity and avoids the confirmatory hybridization step.

Dog brain tissue was collected from samples submitted to rabies diagnostic unit at Queen Saovabha Memorial Institute. Ten rabies-positive and 10 rabies-negative samples were left at room temperature (28-33^{o}C) for different intervals (2,6,12,24,48 and 72 hrs). These were examined for the presence of rabies by FAT, MIT and nested PCR.

Of 500 consecutive dog brain samples, nested PCR was positive for all MIT proven rabies samples. One FAT-negative MIT-positive brain sample was positive by nested PCR. Rabies viral genome could still be detected in all samples left at room temperature for different intervals to 72 hrs.

As little as 8 pg of rabies virus specific RNA and 0.5 ng of total RNA (brain RNA and rabies virus specific RNA) could be detected. This technique can replace MIT as a confirmatory test for FAT-negative samples.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต รัตรี รัตนศิวโมกข์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณและขอขอบคุณทุกท่านที่มีรายนามต่อไปนี้

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์ คณบดีคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบพร้อมทั้งให้คำแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและแนะแนวทางในการวิจัย ตลอดจนช่วยแก้ไขอุปสรรคและปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นด้วยความเอาใจใส่และเต็มใจเสมอมา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวลทิพย์ กมลวารินทร์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยทางห้องปฏิบัติการ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์ หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาอนุญาตให้ใช้สถานที่และให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือต่างๆ

สัตวแพทย์บุญเลิศ สำเลิศเดชา หน่วยชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้า กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่กรุณาช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และให้ข้อมูลของ fluorescent antibody test และ mouse inoculation test

คุณนฤมล พักมณี นักวิทยาศาสตร์ หัวหน้าหน่วยวิจัยและพัฒนา กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่และเครื่องมือต่างๆ

คุณผกามาศ ขาวปลอด นักวิทยาศาสตร์ หน่วยวิจัยและพัฒนา กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่กรุณาให้ rabies virus สายพันธุ์ CVS-11 เพื่อการศึกษาวิจัย

คุณวินิตา ประเสริฐกุล ที่ได้กรุณาพิมพ์ต้นฉบับวิทยานิพนธ์

คุณประภัสสร คงเจริญ, คุณรักศล ยงวานิช และ คุณบรรยง ดันธวะ ที่กรุณาช่วยเหลือในการถ่ายภาพสไลด์ และตรวจแก้คำผิด

กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัย

สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณ นายแพทย์วิชัย ลีละวงศ์เทวัญ ที่ให้ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดมา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
รายการตารางประกอบ ..... ช
รายการรูปประกอบ ..... ซ
คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์ ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1
วัตถุประสงค์ 8

2. สำรวจเอกสาร
ประวัติความเป็นมาของโรคพิษสุนัขบ้า ... 9
ชีววิทยาของไวรัสพิษสุนัขบ้า 11
Rabies virus genome 15
วงชีวิต 17
Molecular basis of viral
pathogenesis 20
การติดต่อ 24
Laboratory diagnosis 25

3. วัสดุและวิธีการ

สถานศึกษา.....37

วัสดุ.....38

วิธีการ.....39

การวิเคราะห์ข้อมูล.....44

4. ผลการทดลอง

ผลการสกัด RNA.....46

ผลการหา sensitivity 47

ผลการทดสอบความจำเพาะและความไว
ของวิธี nested PCR.....50

ผลการเปรียบเทียบ stability
ของวิธี nested PCR.....55

ผลการเปรียบเทียบการหาปริมาณ RNA
ที่ 6 ช่วงเวลา.....57

5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง.....58

เอกสารอ้างอิง.....64

ภาคผนวก ก. 90

ภาคผนวก ข. 94

ประวัติผู้เขียน.....99

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

1. แสดงจำนวนผลลบเทียม ของ
Fluorescent Antibody Test..... 7
2. ผลการตรวจสมอง 500 ตัวอย่างด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่
MIT, FAT และ nested PCR 54
3. ผลการตรวจสมองบวก 10 ตัวอย่าง ทั้ง 6 ช่วงเวลา
2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชม. ด้วยวิธี nested PCR,
FAT และ MIT..... 56

รายการรูปประกอบ

รูปที่ หน้า

1. แสดง Rabies virus genome 16
2. แสดง model ของการ transcription และ replication ของ negative stranded RNA virus..... 18
3. แสดงการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี nested PCR..... 32
4. แสดง nucleotide sequence ของ N gene ของ rabies virus สายพันธุ์ Pasteur..... 34
5. ปริมาณ total RNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี nested PCR..... 48
6. ปริมาณ virus specific RNA และ virus specific RNA รวมกับเนื้อสมองปกติ ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี nested PCR..... 51
7. ตัวอย่างที่เป็นบวกด้วย nested PCR ซึ่งให้ DNA fragment ขนาด 524 bp..... 53
8. การหาปริมาณ RNA ที่น้อยที่สุดจากสมองสัตว์ที่ตั้งทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชม. ด้วยวิธี nested PCR..... 57

คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์

Nested PCR	=	Nested Polymerase Chain Reaction
FAT	=	Fluorescent Antibody Test
MIT	=	Mouse Inoculation Test
TCM	=	Tissue Culture Medium
^{o}c	=	องศาเซลเซียส
ซ.ม.	=	เซนติเมตร
g	=	กรัม
ml	=	มิลลิลิตร
ul	=	ไมโครลิตร
ug	=	ไมโครกรัม
ng	=	นาโนกรัม
pg	=	พิโครกรัม
r.p.m.	=	รอบต่อนาที
%	=	ร้อยละ
OD	=	optical density
nm	=	นาโนมิเตอร์
ug/ul	=	ไมโครกรัม ต่อ ไมโครลิตร