บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

3.1 สถานที่ศึกษา

3.1.1 สถานเสาวภา กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย

3.1.1.1 หน่วยวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า : เป็นสถานที่เก็บสมองสุนัขและตรวจสมองด้วย FAT และ MIT

3.1.1.2 หน่วยวิจัยและพัฒนา : เป็นสถานที่สกัด RNA จากเนื้อสมองและจาก tissue culture medium (TCM) ที่เก็บจาก rabies virus infected baby hamster kidney cells (BHK-21 cells) และเป็นสถานที่สังเคราะห์ cDNA เพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR และตรวจสอบ DNA ที่ได้โดยวิธี nested PCR

3.1.2 ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย :
เป็นสถานที่สังเคราะห์ cDNA เพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR และตรวจสอบ DNA ที่ได้โดยวิธี Nested PCR

3.2 วัสดุ

3.2.1 Tissue culture medium ที่เก็บจาก CVS-11 infected baby hamster kidney cells titer เท่ากับ 10^4

3.2.2 เครื่องมือ, น้ำยา และสารเคมี
(ดูรายละเอียดในภาคผนวก)

3.2.3 สัตว์ทดลอง
หนูขาวพันธุ์ swiss albino ไม่จำกัดเพศ อายุประมาณ 21-31 วัน ขนาด 9-15 กรัม จำนวน 1,188 ตัว

3.2.4 สิ่งส่งตรวจ
สมองสุนัข จำนวน 520 ตัวอย่าง

3.3 วิธีการ

3.3.1 วิธีเก็บตัวอย่าง

ใช้มีดกรีดแยกผิวหนัง และเลื่อยเปิดกระโหลกสัตว์ที่ต้องการตรวจ เก็บสมองใส่ภาชนะที่สะอาด เช่น petridish ทำ impression smear จากสมองบริเวณ cerebellum, brainstem และ hippocampus เพื่อทดสอบด้วย FAT

3.3.1.1 เก็บสมองสุนัข 20 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากตัวอย่างที่เป็นบวกและลบด้วย FAT อย่างละ 10 ตัวอย่าง

สมองจากทั้ง 3 บริเวณ ได้แก่ cerebellum, brainstem และ hippocampus จะถูกแบ่งออกบริเวณละ 6 ส่วนเท่า ๆ กัน โดยแต่ละส่วนตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28-33 ^{o}C ที่เวลาต่าง ๆ กัน 6 ช่วงเวลา กล่าวคือ 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชม. โดยเมื่อครบเวลาใด ๆ แล้วจะเก็บสมองแต่ละส่วนใส่ขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C เพื่อรอการสกัด RNA และทดสอบด้วย MIT ต่อไป

3.3.1.2 เก็บสมองสุนัข 500 ตัวอย่าง

เก็บสมองจากทั้ง 3 บริเวณดังกล่าวข้างต้น ใส่ขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ นำไปแช่แข็งที่ -20^{o}C

3.3.2 การตรวจหาไวรัสพิษสุนัขบ้าด้วย FAT (84)

FAT เป็นวิธีที่กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทยใช้ชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้า โดยนำสมองที่ต้องการตรวจมาละเลงหรือ smear ลงบนสไลด์ ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้ว fix ด้วยอะซิโตนเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นย้อมด้วย fluorescent-rabies antibody conjugate แล้วใส่ลงใน humid chamber นาน 10 นาที เพื่อป้องกันการระเหยและตกตะกอนของ conjugate เมื่อครบเวลาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ทิ้งให้แห้งแล้วหยด mounting medium (90% glycerine buffered saline solution, pH 7.5-8.0) ปิดด้วย cover slip แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงใช้ excitation light HBO 200 mercury vapour lamp ซึ่งจะให้แสงที่มีความยาวคลื่น 7600 ^{o}A หลังจากผ่าน filter UG2

สมองที่ให้ผลบวกและย้อมได้ดี จะเห็นแอนติเจนของไวรัสติดสีเขียวอมเหลืองมีขนาดประมาณ 1-10 um. รูปร่างกลมรีและอาจพบลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ คล้ายเม็ดทรายอยู่ในซัยโตปลาสม บางครั้งพบอยู่นอกเซลล์ได้เนื่องจากเซลล์แตก

การอ่านผล อ่านได้ 4 ระดับตั้งแต่ +1 ถึง +3 สำหรับการแปรผลนั้น มี 2 แบบคือ ผลลบและผลบวก

3.3.3 การตรวจหาไวรัสพิษสุนัขบ้าด้วย MIT (87)

MIT เป็นวิธีตรวจไวรัสพิษสุนัขบ้าโดยฉีดเข้าสมองหนูขาวพันธุ์ swiss albino ที่แข็งแรงสมบูรณ์ มีอายุประมาณ 21-31 วัน

ขนาดน้ำหนัก 9-15 กรัม การฉีดเข้าสมองหนูขาวกระทำได้โดยบดสมองที่ต้องการทดสอบแล้วทำเป็น 10% suspension เติมยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ streptomycin และ penicillin เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย ปั่นเอาส่วนใส แล้วใช้กระบอกฉีดทูเบอร์คูลินและเข็มหมายเลข 27 ฉีดเข้าสมองตัวละ 0.02 มล. จำนวน 3 ตัว หลังจากนั้นเฝ้าดูอาการของหนูขาว ซึ่งส่วนใหญ่จะปรากฏอาการให้เห็นในวันที่ 7-20 หลังฉีด แต่ก็มีบ้างที่ใช้เวลานานถึง 28 วัน จึงปรากฏอาการ หลังจากที่หนูตายต้องตรวจสมองยืนยันอีกครั้งโดยใช้ FAT

3.3.4 <u>การสกัด RNA</u>

การสกัด RNA จากสมองสุนัข, TCM และสมองสุนัขผสมกับ TCM โดยใช้วิธี acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction หรือ AGPC (107, 108) โดยสกัดจากสมองประมาณ 0.5 กรัม หรือ TCM 0.5 มล.ใน denaturing solution 1 มล. หรือสมอง 0.5 กรัม ผสมกับ TCM 0.5 มล.ใน denaturing solution 2 มล.,homogenize ด้วยความเร็ว 13,500 g หลังจากนั้นเติม 2 M sodium acetate pH 4.0, phenol, chloroform:isoamylalcohol 49:1 ปริมาตร 0.1, 1.0, 0.2 มล. ตามลำดับ สำหรับสมองผสมกับ TCM นั้นจะต้องเติมสารข้างต้นที่มีปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารที่เติมลงในสมองหรือ TCM เพียงอย่างเดียว, vortex ประมาณ 20-60 วินาที, ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 20-30 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4^{o}C เพื่อแยกชั้นน้ำ (aqeous phase) ออกจาก organic phase แล้วตกตะกอนส่วนใสด้วย isopropanol ที่ -20^{o}C เป็นเวลา 1 ชม. ปั่น 10 นาทีที่ 4^{o}C ด้วยความเร็ว 14,000 g เมื่อได้ RNA pellet แล้วล้างด้วย 70% ethanol 500 ul 1 ครั้ง ทำให้แห้ง ก่อนใช้ทดสอบควรละลายใน 0.1% diethylpirocarbonate water (DEPC·H_2O) 20 ul

3.3.5 การทำ RNA dilution

ผสม RNA ที่สกัดได้จากสมอง 10 ul กับ 990 ul 0.1% DEPC·H_2O หรือ ผสม 10 ul RNA ที่สกัดได้จาก TCM ซึ่งเก็บจาก CVS-11 infected baby hamster kidney cells กับ 990 ul 0.1 % DEPC·H_2O แล้วนำไปวัด OD_{260} ด้วย spectrophotometer เพื่อหาปริมาณของ RNA เริ่มต้น สำหรับ RNA ที่สกัดจากสมองนั้นปรับความเข้มข้นเป็น 1 ug/ul แล้วเจือจางลง 10 เท่าหรือ ten fold dilutionเช่นเดียวกับ RNA ที่สกัดได้จาก TCM

3.3.6 การคำนวณปริมาณ RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่าง (109)

หาปริมาณ RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่าง โดยวัดความสามารถดูดแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 nm. เนื่องจากกรดนิวคลีอิกสามารถดูดแสงในช่วงดังกล่าว

โดยที่ 1 OD_{260} มีค่าเท่ากับ RNA 40 ug/ml

ดังนั้น Z OD_{260} "----------" 40Zxdilution factor

40Zx100 ug/ml หรือ

4Z ug/ul

3.3.7 การสร้าง complementary DNA หรือ cDNA

การสร้าง cDNA จาก RNA กระทำในหลอด eppendorf ที่บราศจากเชื้อ ขนาด 600 ul โดยใส่ RNA 5 ug, primer TH1 และ primer TH2 อย่างละ 1 uM นำไป incubate 5 นาที ที่ 65°C จากนั้นใส่ลงในน้ำแข็งทันที เติม reaction mixture ของ

dNTP 0.8 mM, RNAse inhibitor 20 unit, เอนไซม์ reverse transcriptase จาก avian myeloblastosis virus 5 unit และ 5xRT buffer 2.5 ul นำ total reaction mixture 12.5 ul นี้ไป incubate ที่ 42^{o}C เป็นเวลา 1 ชม.

3.3.8 First step PCR amplification

หลังจากสร้าง cDNA จาก RNA แล้ว สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ใน reaction mixture 50 ul ที่มีส่วนผสมของ 10x buffer ซึ่งประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 9.0 (ที่ 25^{o}C), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 0.01% gelatin และ Taq DNA polymerase 1.25 unit, dNTP 62.5 uM หลังผสมให้เข้ากันดีแล้ว ป้องกันการระเหยด้วยการเติม mineral oil 50 ul นำเข้าเครื่อง DNA thermal cycler ให้ความร้อนที่ 94 ^{o}C, 2 นาที และเพิ่มปริมาณ DNA อีก 30 รอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ denature ที่ 94^{o}C 1 นาที แล้ว anneal ที่ 45 ^{o}C 2 นาที และ extension ที่ 72 ^{o}C 2.30 นาที

3.3.9 Second step PCR

ใส่ DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในขั้นตอนแรก 2 ul ลงใน reaction mixture ที่มีปริมาตร 23 ul ซึ่งประกอบด้วย primer TT3 และ primer TT5 อย่างละ 0.8 uM, dNTP 250 uM, Taq DNA polymerase 1 unit, $MgCl_2$ 1.5 mM และ 10x buffer 2.5 ul เติม mineral oil ประมาณ 50 ul ให้ความร้อนที่ 94^{o}C 2 นาที ก่อนที่จะเข้าขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA เหมือนกับ first step PCR amplification

3.3.10 Agarose gel electrophoresis

ผสม PCR product 10 ul กับ 6x gel loading buffer type I 2 ul จากนั้นหยอดหรือ load ลงช่องของ 1.2% agarose gel ที่มี ethidium bromide 50 ug/ml จากนั้นต่อขั้วอิเลคโทรดเข้ากับ power supply ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่คือ 120 mA, gel ขนาด 20x25 ซม. นี้จะใช้เวลา run ประมาณ 2.30 ชม. ใน 1xTAE buffer เมื่อครบเวลานำ gel ไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ตำแหน่งของ DNA fragment นั้น ทราบได้โดยเทียบกับ λ/Hind III size marker ซึ่ง product จาก first step PCR และ nested PCR มีขนาด 1,354 bp และ 524 bp ตามลำดับ

3.3.11 การวิเคราะห์ข้อมูล (110)

ลักษณะของการตรวจเพื่อการวินิจฉัยนั้นต้องพิจารณาค่าต่าง ๆ เหล่านี้คือ ความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), ความสามารถในการทำนายโรค (predictive value)

ความไว หมายถึง โอกาสที่การทดสอบจะให้ผลบวกจากตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

ความจำเพาะ หมายถึง โอกาสที่การทดสอบจะให้ผลลบ จากตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

คำจำกัดความที่กล่าวข้างต้น สามารถแสดงเป็นตารางดังนี้

โดยกำหนดให้

a = ผลการทดสอบเป็นบวก จากตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัส

b = ผลการทดสอบเป็นบวก จากตัวอย่างปกติ

c = ผลการทดสอบเป็นลบ จากตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัส

d = ผลการทดสอบเป็นลบ จากตัวอย่างปกติ

การทดสอบ	ผลการทดสอบ	วิธีมาตรฐาน (MIT)		
		+	-	รวม
FAT หรือ PCR	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
	รวม	a+c	b+d	a+b+c+d

Percentage sensitivity

$$= \frac{a}{a+c} \times 100$$

Percentage specificity

$$= \frac{d}{b+d} \times 100$$