บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research)

3.2 แผนการวิจัย

แผนการวิจัย แบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1

แบ่งขั้นตอนการทดลองเป็น

1.1 การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา

1.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา

1.3 การตรวจพิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสที่เตรียม

1.4 จดบันทึกผลการทดลอง และรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่ 2 การทดสอบความคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1

แบ่งขั้นตอนการทดลองเป็น

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการผสมน้ำยาฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 0, 5, 7 และ 14 วันต่อการทำลายเชื้อไวรัส

2.2 การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่ออุณหภูมิต่าง ๆ

2.3 การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ

2.4 จดบันทึกผลการทดลอง วิเคราะห์และรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่1. การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1

1.1 การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา

การเตรียมเชื้อไวรัสจากตัวอย่าง ซึ่งเก็บมาจากแหล่งที่พบการระบาดในประเทศไทย ช่วงเดือนมกราคม 2547 จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยมีวิธีการเตรียมเชื้อไวรัสซึ่งดัดแปลงมาจาก Swayne และคณะ 1998 มีขั้นตอนอย่างย่อ ๆ ดังนี้

1.1.1 เตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาจากชิ้นเนื้อตัวอย่างไก่ได้แก่ ปอด ลำไส้ และตับที่ติดเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา โดยนำชิ้นเนื้อตัวอย่างมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม แล้วนำมาใส่ในโกร่งบด เติมทราย (Sigma®) ลงไปเพื่อบดให้เซลล์ของโฮสต์แตก จากนั้นเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไล (phosphate buffer saline หรือ PBS) ที่มี pH 7.0 ลงไปประมาณ 9 มิลลิลิตร คนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

1.1.2 เทใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 1000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.1.3 เก็บส่วนใส (supernatant) และลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพโดยนำมากรองด้วยกระดาษกรอง ที่ขนาด 0.22 ไมครอน เติมยาปฏิชีวนะลงไป ได้แก่ เจนตามัยซิน (gentamicin) 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

1.1.4 เก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสก่อนนำไปฉีดไข่ไก่ฟัก

1.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา

การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสโดยใช้วิธีการฉีดเชื้อไวรัสเข้าสู่ไข่ไก่ฟัก ดัดแปลงมาจาก Swayne และคณะ 1998 มีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 นำเชื้อไวรัสที่เก็บและรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสมาละลายด้วยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และทำให้เจือจางลงเป็น 10 เท่า (ten fold dilution) ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-10}

1.2.2 ฉีดเชื้อไวรัสที่เตรียมไว้ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้ไข่ไก่ฟักที่อายุ 9-11 วัน เข้าทาง allantoic cavity จำนวน 6 ฟอง/1 ความเข้มข้น

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.3 นำไข่ไก่ฟักที่ผ่านการฉีดเชื้อไวรัสย้ายเข้าสู่ตู้ฟักไข่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคัดตัวอ่อนที่เสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสทิ้ง โดยถือว่าเป็นการตายเนื่องจากสาเหตุอื่น ๆ (non specific cause) เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย หรือ จากการกระทบกระเทือน (trauma) เป็นต้น

1.2.4 ส่องตรวจไข่ไก่ฟักทุกวันอย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง เพื่อดูว่าไข่ไก่ฟักมีชีวิตหรือไม่ เป็นระยะเวลา 7วัน

1.2.5 เมื่อครบกำหนดหรือพบว่ามีไข่ไก่ฟักเสียชีวิตในช่วงเวลาที่กำหนด เก็บ allantoic fluid ที่มีเชื้อไวรัสที่ –80 องศาเซลเซียส และคำนวณหาปริมาณและความรุนแรงของเชื้อไวรัส (50% embryonated lethal dose/ml; ELD_{50}/ml) ตามวิธีการของ Reed และ Munch (1938)

1.2.6 คัดเลือกเชื้อไวรัสที่มีความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) ที่รุนแรงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 การตรวจพิสูจน์ยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่เตรียม

เพื่อเป็นการตรวจพิสูจน์ว่าเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้น ซึ่งได้มาจากการเก็บตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่าง จากแหล่งที่เกิดการระบาดในประเทศไทย ช่วงเดือน มกราคม 2547 ว่าเป็นเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1

1.3.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาด้วยวิธีการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination หรือ HA)

วิธีการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงเป็นการทดสอบคุณสมบัติการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงของเชื้อไวรัส (Office International des Epizooties, 2000) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.3.1.1 เติมสารละลาย PBS ลงในถาดหลุม (microtiter plate) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทุกหลุม

1.3.1.2 เติม allantoic fluid ที่มีเชื้อไวรัสลงในหลุมแรกปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดของเหลวจากหลุมแรกปริมาตร

25 ไมโครลิตรสู่หลุมที่ 2 และดำเนินการต่อจนถึงหลุมที่ 10 เป็นการทำเจือจาง 2 เท่า (serial 2 fold dilution)

1.3.1.3 เติมสารละลาย PBS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทุกหลุมเพื่อให้สารละลายในแต่ละหลุมมีปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.3.1.4 เติมเม็ดเลือดแดงไก่เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมและเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 40 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงที่ก้นหลุม

1.3.2 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (multiplex RT-PCR)

1.3.2.1 ขั้นตอนสกัด RNA

ทำการแยกสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาออกจาก allantoic fluid โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAamp® viral Mini kit (QIAGEN, USA) ตามคำแนะนำของบริษัท

1.3.2.2 ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (multiplex RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี one step multiplex RT-PCR โดยใช้ ACCessQuick™ RT-PCR system (Promega, USA) และใช้ตัวตั้งต้น (primer set) และขั้นตอนโดยอ้างอิงมาจาก Poddar (2002) มีขั้นตอนดังนี้

Primer name	Primer sequence	Amplicon size (bp)
H5 forward	5'-ACTCCAATGGGGGCGATAAA-3'	351 bp
H5 reverse	5'-CAACGGCCTCAAACTTAGGATCC-3'	
N1 forward	5'-AAGGGGTTTTCATACAGGTATGGT-3'	106 bp
N1 reverse	5'-TCTGTCCATCCATTAGGATCC-3'	

Reverse transcription	48 องศาเซลเซียส 45 นาที	1 รอบ
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส 15 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส 15 วินาที	ทั้งหมด 40 รอบ
Annealing	55 องศาเซลเซียส 15 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส 10 นาที	

1.3.2.3 นำผลผลิตที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตรมาแยกวิเคราะห์ด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ใน 1.5% agarose gel ย้อมด้วยเอทธีเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 15 นาที และดูผลโดยใช้เครื่องมองภาพผ่านแสงยูวี และบันทึกภาพ

1.3.3 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

1.3.3.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

ทำการแยกแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ใน 1.5% agarose gel เตรียมให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Wizzard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega, USA)

1.3.3.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการเตรียมให้บริสุทธิ์ ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ โดยวิธี ABI Prism™ Bigdye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Appiled Biosystems Inc., Foster City, CA)

ตามวิธีที่ระบุไว้ในเอกสารผู้ผลิตจากนั้นอ่านผลด้วย ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer

1.3.3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 ที่เตรียมขึ้นจากตัวอย่าง 8 ตัวอย่างด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 (Hall, 1999) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์

1.4 จดบันทึกผลการทดลอง และรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่ 2. การทดสอบความคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการผสมน้ำยาฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 0, 5, 7 และ 14 วันต่อการทำลายเชื้อไวรัส

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อการคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา โดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อในการทดสอบทั้งหมด 4 ชนิด ความเข้มข้นตามคำแนะนำของบริษัทคือ น้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้น 0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อฟีนอล (phenol) ความเข้มข้น 0.4% น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มควอเตอนารีแอมโมเนียม (quaternary ammonium compounds) ความเข้มข้น 0.5% และน้ำยาฆ่าเชื้อฟอร์มาลีน (formalin) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (Favero, 1985) และดัดแปลงวิธีการทดสอบมาจาก Suarez และคณะ 2003 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 เตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นตามที่กำหนด

2.1.2 แบ่งน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิดลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร

2.1.3 นำน้ำไข่ไก่ฟักที่เตรียมไว้ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส มาละลายด้วยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาประมาณ 10^9 ELD_{50}/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยาฆ่าเชื้ออยู่ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

2.1.4 เมื่อครบ 10 นาที แบ่งสารละลายฉีดลงในไข่ไก่ฟัก ฟองละ 0.1 มิลลิลิตร อย่างละ 6 ฟอง ต่อหนึ่งชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อ ส่วนกลุ่มควบคุมบวกจะฉีดเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาซึ่งผสมกับสารละลาย PBS ในอัตราส่วน 1:1 โดยจะฉีดลงในไข่ไก่ฟักจำนวน 3 ฟอง ส่วนกลุ่มควบคุมลบจะใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่เตรียมขึ้นผสมกับสารละลาย PBS ในอัตราส่วน 1:1 โดยจะฉีดลงในไข่ไก่ฟักจำนวน 3 ฟอง

2.1.5 คอยสังเกตดูไข่ไก่ฟักเป็นเวลา 7 วัน หากพบว่าไข่ไก่ฟักเสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมงหลังทำการฉีดเชื้อไวรัส แสดงว่าไม่ได้มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส แต่หากพบว่าไข่ไก่ฟักเสียชีวิตหลังจาก 24 ชั่วโมงที่ฉีดเชื้อไป แสดงว่าเป็นผลมาจากเชื้อไวรัส โดยจะเก็บ allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักที่ตายไปตรวจด้วยวิธี HA ต่อไป

2.1.6 ทำการทดลองซ้ำหลังจากเก็บน้ำยาฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 5, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันดังนี้คือ เก็บรักษาในภาชนะที่มีฝาปิดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส

2.2 การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่ออุณหภูมิต่าง ๆ

ขั้นตอนการทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาโดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Swayne และ Beck 2004 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 ตั้งอุณหภูมิอ่างต้มน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิต่างๆกันดังนี้ 55 60 65 70 และ 75 องศาเซลเซียสตามลำดับ

2.2.2 นำน้ำไข่ไก่ฟักที่เตรียมไว้ซึ่งมีเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาอยู่ 10^9 ELD_{50}/1 ml แบ่งลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอดต่อหนึ่งช่วงอุณหภูมิ ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิลม์ (parafilm)

2.2.3 นำหลอดทดลองวางลงใน water bath ที่แต่ละอุณหภูมิเป็นเวลา 10 15 30 45 และ 60 นาทีตามลำดับ

2.2.4 แบ่งฉีดลงในไข่ไก่ฟักโดยจะใช้ไข่ไก่ฟัก 6 ฟอง/หนึ่งช่วงอุณหภูมิ/ต่อหนึ่งช่วงเวลา โดยฉีดไข่ไก่ฟักฟองละ 0.1 มิลลิลิตร สังเกตเป็นเวลา 7 วัน จำนวน 6 ฟอง

2.2.5 ส่วนกลุ่มควบคุมลบจะใช้สารละลาย PBS แทนน้ำไข่ไก่ฟักที่มีเชื้อไวรัส โดยจะทำการทดลองดังที่กล่าวมา

2.2.6 หากพบว่าไข่ไก่ฟักเสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมงหลังทำการฉีดเชื้อไวรัส แสดงว่าไม่ได้มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส แต่หากพบว่าไข่ไก่ฟักเสียชีวิตหลังจาก 24 ชั่วโมงที่ฉีดเชื้อไป แสดงว่าเป็นผลมาจากเชื้อไวรัส โดยจะเก็บ allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักที่ตายไปตรวจด้วยวิธี HA ต่อไป

2.3 การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ

วิธีการทดสอบผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา ได้ดัดแปลงวิธีการมาจาก Stallknecht และคณะ 1990 โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 นำน้ำไข่ไก่ฟักที่เตรียมไว้ซึ่งมีเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาอยู่ 10^9 ELD_{50}/ml แบ่งลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร

2.3.2 จากนั้นนำสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ซึ่งมีค่า pH คือ 3 5 7 9 และ 12 มาใส่หลอดทดลองอย่างละ 1 มิลลิตร จากนั้นเติมน้ำไข่ไก่ฟักที่มีเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาลงไป 1 มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดแบ่งฉีดลงในไข่ไก่ฟักจำนวน 6 ฟอง ต่อหนึ่งช่วงค่า pH โดยฉีดฟองละ 0.1 มิลลิลิตร และทำการทดลองดังที่กล่าวมาแล้วซ้ำอีกครั้ง แต่เปลี่ยนระยะเวลาที่สารละลายบัฟเฟอร์สัมผัสกับเชื้อไวรัสจาก 5 นาที เพิ่มเป็น 10 นาที สังเกตไข่ไก่ฟักเป็นเวลา 7 วัน

2.3.3 ส่วนกลุ่มควบคุมลบให้ทำการทดลองดังที่กล่าวมา แต่เปลี่ยนมาใช้สารละลาย PBS แทนน้ำไข่ไก่ฟัก

2.3.4 หากพบว่าไข่ไก่ฟักเสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมงหลังทำการฉีดเชื้อไวรัส แสดงว่าไม่ได้มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส แต่หากพบว่าไข่ไก่ฟักเสียชีวิตหลังจาก 24 ชั่วโมงที่ฉีดเชื้อไป แสดงว่าเป็นผลมาจากเชื้อไวรัส โดยจะเก็บ allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักที่ตายไปตรวจด้วยวิธี HA ต่อไป

2.4 จดบันทึกผลการทดลอง วิเคราะห์และรายงานผลการทดลอง