ISOLATION OF LIVE DENGUE VIRUS FROM URINE OF ACUTELY-INFECTED PATIENTS

Miss Artikaya Sawangvaree

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

การแยกเชื้อไวรัสไข้เลือดออกที่มีชีวิตจากปัสสาวะของผู้ป่วยระยะติดเชื้อเฉียบพลัน

นางสาวอาธิกยา สว่างวารี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกเชื้อไวรัสไข้เลือดออกที่มีชีวิตจากปัสสาวะของผู้ป่วยระยะติดเชื้อเฉียบพลัน
โดย	นางสาวอาธิกยา สว่างวารี
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วันล่า กุลวิชิต

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วันล่า กุลวิชิต)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.เผด็จ สิริยะเสถียร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ปริ่มเฉนียน มุ่งการดี)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อาธิกยา สว่างวารี : การแยกเชื้อไวรัสไข้เลือดออกที่มีชีวิตจากปัสสาวะของผู้ป่วยระยะติดเชื้อเฉียบพลัน (ISOLATION OF LIVE DENGUE VIRUS FROM URINE OF ACUTELY-INFECTED PATIENTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ.วันล่า กุลวิชิต, 101 หน้า.

ไวรัสเด็งกีเป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออกที่มียุงลายเป็นพาหะนำโรค การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจหาจีโนมของไวรัสจากเลือดของผู้ป่วยระยะที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด (มีไข้สูง) และยังมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาที่มีความไวและรวดเร็วมากขึ้น เช่น Real time RT-PCR ทำให้สามารถตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกีในปัสสาวะได้ในเวลาต่อมา ดังนั้น ปัสสาวะจึงเป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยที่น่าสนใจ และเป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัย สำหรับผู้ป่วยที่ยากต่อการเจาะเลือดเช่น เด็กเล็ก และผู้ป่วยที่มีอาการเลือดออกอย่างรุนแรง และข้อดีอีกประการหนึ่ง คือ เก็บง่าย และได้ตัวอย่างครั้งละปริมาณมาก

จากการตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกีในปัสสาวะได้นั้น ทำให้เกิดคำถามว่า ไวรัสเด็งกีที่หลั่งออกมาพร้อมกับปัสสาวะ จะยังคงมีชีวิตอยู่หรือไม่ ทำให้เกิดคำถามที่น่าสนใจว่า จีโนมที่ตรวจพบได้ในปัสสาวะนั้น มาจากไวรัสเด็งกีที่ยังคงมีชีวิตอยู่หรือไม่ เนื่องจากหากปัสสาวะของผู้ป่วยมีไวรัสที่มีชีวิต ปัสสาวะดังกล่าวอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแพร่เชื้อในธรรมชาติได้

การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อไวรัสเด็งกีที่มีชีวิตจากปัสสาวะผู้ป่วย โดยทำการประเมินจากผลการตรวจหาจีโนมและโปรตีนของไวรัสในเนื้อเยื่อยุงลาย และจากเซลล์เพาะเลี้ยง โดยวิธีการแยกเชื้อ จากการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างซึ่งเป็นปัสสาวะของผู้ป่วยไข้เลือดออกในระยะติดเชื้อเฉียบพลัน จำนวน 2 กลุ่ม ได้แก่ 1. กลุ่มทดลอง คือ ปัสสาวะที่มีผลการตรวจด้วยวิธี RT-PCR และ ELISA ให้ผลบวก จำนวน 15 ตัวอย่าง ฉีดเข้าสู่ยุงลายและวิธีแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 จำนวน 40 ตัวอย่าง 2. กลุ่มควบคุมคือ ปัสสาวะที่มีผลการตรวจด้วยวิธี RT-PCR และ ELISA รายงานผลลบ อีกส่วนของการทดลองเป็นการศึกษาว่ายุงลายมีพฤติกรรมการดื่มปัสสาวะหรือไม่ โดยศึกษาในปัสสาวะที่มีผล RT-PCR และ ELISA ที่มีผลบวก จำนวน 5 ตัวอย่าง

จากการผลศึกษาพบว่า สามารถตรวจพบจีโนมของไวรัสเด็งกีจากการทำ RT-PCR ในยุงลายคิดเป็น 100% (13/13) และในเซลล์เพาะเลี้ยงคิดเป็นอัตรา 100% (5/5) ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจหาโปรตีนของไวรัสเด็งกีในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunocytochemistry สามารถตรวจพบ 70% (28/70) แต่ไม่สามารถตรวจได้ในเนื้อเยื่อหัวยุงลาย เนื่องจากปัญหาผลบวกปลอม จึงไม่สามารถแปลผลได้ สรุปการแยกเชื้อไวรัสเด็งกีที่มีชีวิตเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่าการแยกเชื้อในยุงลายโดยการตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกี มีอัตราสูงกว่าการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงจากการตรวจหาโปรตีนของไวรัสเด็งกีอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.007 เมื่อกำหนดให้ $P < 0.05$) และผลจากการให้ยุงดื่มปัสสาวะ ผลการตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกีในเนื้อเยื่อยุงลาย คือไม่พบไวรัสเด็งกี ทั้งนี้ได้ทำการเทียบผลกับ internal control ให้ผลบวกทุกตัวจากการตรวจหา defensin A ที่เป็นจีโนมของ *Aedes aegypti* (house keeping gene)

จึงสรุปได้ว่าไวรัสเด็งกีในปัสสาวะของผู้ป่วยอาจจะยังคงมีชีวิตหลงเหลืออยู่ เนื่องจากสามารถทำการเพาะเลี้ยงในยุงลายและเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ดังนั้น การตรวจพบการมีชีวิตอยู่ของไวรัสในสารคัดหลั่งเช่น ปัสสาวะ ซึ่งมีโอกาสปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนั้น จึงเป็นจุดเริ่มต้น ที่ก่อให้เกิดคำถามหลายประการในทางระบาดวิทยาและพยาธิกำเนิดของโรค ที่ต้องการการศึกษาวิจัยต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

5474198630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS: DENGUE VIRUSES / IMMUNOHISTOCHEMISTRY / VIRUS ISOLATION / IMMUNOCYTOCHEMISTRY

ARTIKAYA SAWANGVAREE: ISOLATION OF LIVE DENGUE VIRUS FROM URINE OF ACUTELY-INFECTED PATIENTS. ADVISOR: ASSOC. PROF. WANLA KULWICHIT, Ph.D., 101 pp.

Dengue fever is an infected disease, which caused by dengue virus. The transmission of this virus emenating from *Aedes aegypti* mosquito. For laboratory diagnosis, the genome of virus can be detected from blood specimen of septic stage. The evolutionary of dengue virus detection have been developed to be more rapid method and high sensitivity. Moreover, there are many molecular methods that have been detected dengue genome from urine of infected patient. Interestingly urine has been the alternative clinical specimen in case of patients with severe from hemorrhage, or pediatric patients. The advantage of urine specimen is easily collected from a patient. The patient will not suffer from venipuncture. For more question if dengue genome can be detected in urine, virus would be survival. Lived dengue virus may issue of environmental contamination.

The objective of this study to isolation of live dengue virus from urine of acutely-patients by assess dengue genome and protein of dengue virus in mosquito tissue and cell culture by isolation method. Acutely-infected patients in Chulalongkorn hospital is a group of samples. Urine has been confirmed by RT-PCR and ELISA in positive results (confirmation of dengue infection). Mosquito inoculation by 15 urine samples. And for cell culture isolation (C6/36) were inoculated by 40 urine samples in 12 wells culture plate. Urine through by microfilter for decontamination of urine from bacteria and another microorganism. For control group we use urine (negative results confirm by nested reverse transcription polymerase chain reaction and ELISA). Another part of the experiment. The feasibility study of urine sucking by mosquitoes. The five urine samples has been confirmed by nested RT-PCR and ELISA (positive results) .

In this study we found that the isolation rate of dengue genome from RT-PCR method can be detected in patients urine 100% (13/13) and in cell culture 100%(5/5) respectively. The isolation rate of dengue protein from cell culture by immunocytochemistry shows 70% (28/40).

Conclusion, percent of isolation rate were measured and showed significant of isolation rate in mosquito by genome detection is better than isolation rate in cell culture by immunocytochemistry detection (P=0.007) when significant level is smaller than 0.05. And the results from urine sucking that genome detection could not be found in mosquito tissue by RT-PCR .

Dengue virus can survive in urine of acutely-infected patients and can be detected by RT-PCR method. This is a starting point of study for dengue epidemiology and pathogenicity in the future.

Field of Study: Medical Science Student's Signature .....

Academic Year: 2014 Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้เมตตาให้ความช่วยเหลือคำแนะนำ จนวิทยานิพนธ์ชิ้นนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร ที่ได้ให้ความกรุณาทั้งในด้านความรู้ตลอดจนอุปกรณ์และเครื่องมืออำนวยความสะดวกในงานวิจัยของ ภาควิชาปรสิตวิทยาตลอดจนข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในงานวิจัยฉบับนี้ให้มีความถูกต้อง และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อ.แพทย์หญิง ดร.ศิวะพร บุญยทรัพยากร อาจารย์ประจำภาควิชา จุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ที่ได้ให้ความรู้เกี่ยวกับ การเพาะเลี้ยงเซลล์และการเพาะเลี้ยงไวรัสเด็งกี

ขอขอบพระคุณ คุณปรีชา เรืองเวชวรชัย ณ ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา และ คุณอาทิตยา แก้วเสมา ณ ห้องปฏิบัติการทางประสาทวิทยา ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความรู้ รวมทั้งอำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือตลอดเวลาที่ทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณอภิญญา บุตรลี้ เจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยอำนวยความสะดวกด้านการเรียนเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณเกื้อกูล ทรงเจริญ คุณชลนิภา บุญสนอง และ คุณวรรณา กะหวัง ที่คอยช่วยเหลือ ด้านการทำโครงงาน และคอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณ รุ่นพี่ประจำห้องปฏิบัติการโรคติดเชื้อ ดร.วรพรรณ ยิ่งศิวะพัฒน์ คุณพรสุรีย์ พงศ์สุชาติ และ ดร. เมธี ศรีประพันธ์ ที่ได้ให้ข้อมูลเพื่อประกอบงานวิจัยฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย หน่วยงานต้นสังกัดที่มอบโอกาสในการศึกษาและทำงานวิจัยชิ้นนี้ และสุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัว “สว่างวารี” ที่คอยเลี้ยงดู อบรมให้กำลังใจ มาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญรูปภาพ ..... ฎ
บทที่ 1 14
บทนำ 14
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 14
สมมติฐานงานวิจัย 17
วัตถุประสงค์งานวิจัย 17
กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework) 18
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 18
ขอบเขตงานวิจัย 18
ข้อตกลงเบื้องต้น 19
ข้อจำกัดของการวิจัย 19
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย 19
วิธีดำเนินการวิจัย 19
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 20
แนวคิดและทฤษฎี 20
1. การติดเชื้อไวรัสเด็งกี (dengue virus infection) 20
2. การแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) 25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

3. อิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) 27
4. ยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) 34
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 35
บทที่ 3 41
วิธีดำเนินการวิจัย 41
ประชากร 41
วิธีการเพาะเลี้ยงยุงลาย 42
การฉีดยุง (Mosquito inoculation technique in *Ae. aegypti* mosquitoes) 42
การเตรียมยุงลายบ้านสำหรับติดเชื้อ dengue virus (natural feeding) 45
การติดเชื้อเซลล์ในเซลล์ C6/36 46
การตรึงเซลล์บนสไลด์โดยวิธีเสมียร์ (smear) 47
การย้อมเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการติดเชื้อด้วยไวรัสเด็งกี Immunohistochemistry 48
Criteria 50
การสกัด RNA ของเด็งกีไวรัสจากเนื้อเยื่อยุงลาย (Total RNA extraction from adult mosquitoes) 51
การสกัด RNA ของเด็งกีไวรัสจากเนื้อเยื่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Total RNA extraction from cell culture) 52
การตรวจหาการแสดงออกของ RNA ของเด็งกีไวรัสโดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction แบบ One-step RT-PCR (RNA expression) 53
การตรวจหาการแสดงออกของ RNA ของ *Ae. aegypti* (gene ของยุงลาย ที่เป็น house keeping gene) สำหรับเป็น internal control ของการทดลอง โดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction แบบ Two step RT-PCR 57
การเก็บรวบรวมข้อมูล 59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

บันทึกผลการทดลอง รวบรวมข้อมูล และวิเคราะห์แปลผลข้อมูลตาม criteria ที่กำหนด จดบันทึก และถ่ายภาพเซลล์ที่ใช้วิธี immunohistochemistry ในเซลล์เพาะเลี้ยง และ เซลล์ยุงลาย (head squash) และผลการทดลอง nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction 59

การวิเคราะห์ข้อมูล 59

บทที่ 4 60

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 60

ผลการวิเคราะห์ 63

1. สรุปผลการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry จากการหาเด็งกีไวรัสที่มีชีวิตใน brain tissue ของยุงลาย 63

ผลการทดลองจากการย้อมดูเฉพาะโครงสร้างของเซลล์ brain tissue ของยุงลายด้วย วิธี H&E staining 63

สรุปผลการทดลอง การ Quenching of endogenous peroxidase 64

สรุปผลการย้อม brain tissue ของยุงลายโดยใช้การ blocking โดยวิธีใช้ความร้อนตามเทคนิคของ Miller RT. (2001) 65

2. สรุปผลการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry จากการหาเด็งกีไวรัสที่มีชีวิตในเซลล์เพาะเลี้ยง ชนิด C6/36, LLC-MK2 (cell inoculation) ด้วย DV-2 และ urine ของผู้ป่วย Code A-21/2 พบว่าจะให้ผลบวกเมื่อส่องดูใต้กล้อง light microscope พบแกรนูลสีน้ำตาลบริเวณ cytoplasm ของเซลล์ ดังภาพที่ 19 67

3. สรุปผลการสังเกตการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์เมื่อทำการ infected ด้วย DV-2 และ MOCK น้ำเลี้ยงเซลล์ (Negative control) ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-MK2 และ C6/36 68

4. สรุปผลการสังเกตการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์เมื่อทำการ infected ด้วย DV-2 และตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วย 70

5. สรุปผลการทำ One-Step RT-PCR โดยใช้ lanciotii คู่ primer คือ D1 และ D2 71

6. สรุปผลการทำ Two-step RT-PCR 72

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

7. สรุปผลการทำ RT-PCR โดยใช้ lanciotii 73

บทที่ 5 77

อภิปรายผลและ ข้อเสนอแนะ 77

รายการอ้างอิง 82

ภาคผนวก 90

ภาคผนวก 91

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย 91

อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับสำหรับงานด้านเพาะเลี้ยงเซลล์ (Tissue culture) 91

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อยุงลาย (RNA Extraction) 92

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับงานด้าน Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 93

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับงานด้าน Immunohistochemistry 96

สารเคมีและน้ำยาสำหรับงานด้าน Immunohistochemistry 96

การเตรียมน้ำยาสำหรับ Immunohistochemistry 98

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) 99

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 101

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1แสดงสารละลายที่ใช้ในการ dehydrate เนื้อเยื่อจากการทำ IHC 50

ตารางที่ 2 ตารางแสดงสัดส่วนของ master mix สำหรับทำ OneStep RT-PCR โดยใช้ D1, D2 primers 54

ตารางที่ 3 ตารางแสดง condition สำหรับการทำ amplication ใน thermocycler ของ Onestep RT-PCR ที่ใช้ D1,D2 เป็น primer 55

ตารางที่ 4 แสดง Oligonucleotide primers ที่ใช้สำหรับ amplified *Ae. aegypti* gene (defensinA) 57

ตารางที่ 5 ตารางแสดงสัดส่วนของ master mix สำหรับเตรียม cDNA โดยใช้ defensin A primers 57

ตารางที่ 6 ตารางแสดง condition สำหรับเตรียม cDNA ใน thermocycler โดยใช้ defensinA เป็น primer 58

ตารางที่ 7 ตารางแสดงสัดส่วนของ master mix สำหรับทำ TwoStep RT-PCR โดยใช้ defensinA primers 58

ตารางที่ 8 ตารางแสดง condition สำหรับทำ TwoStep RT-PCR ใน thermocycler โดยใช้ defensinA เป็น primer 59

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างวิธี immunohistochemistry และวิธี one-step PCR จากการทำ mosquito inoculation ด้วย urine ของผู้ป่วย 60

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบผลการทดลองด้วยวิธี immunohistochemistry และผลการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ CYTOPATHIC EFFECT (CPE) จากการทำ cell inoculation ด้วย urine ของผู้ป่วย 61

ตารางที่ 11 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเด็งกีในเนื้อเยื่อยุงลายเปรียบเทียบกับการตรวจหา 74

ตารางที่ 12 สรุปผลการศึกษาการมีชีวิตของเด็งกีไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง และเนื้อเยื่อยุงลาย จากการตรวจหา dengue viral RNA โดยวิธี RT-PCR 76

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของยุงลายเป็นแบบ complete metamorphosis 15
ภาพที่ 2 แสดงวงจรการแพร่เชื้อไวรัสเด็งกีโดยมียุงลายเป็นพาหะนำโรค 16
ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างทั่วไปของ Antibody 28
ภาพที่ 4 แสดงกระบวนการย้อม IHC แบบ Direct method และ Indirect Method 30
ภาพที่ 5 แสดง Indirect method : Avidin-Biotin Complex (ABC) method 31
ภาพที่ 6 แสดง Indirect method : Labelled Streptavidin-Biotin (LSAB)method 31
ภาพที่ 7 แสดงการแยกเพศของยุงลาย (*Ae. aegypti*) 34
ภาพที่ 8 แสดง อุปกรณ์สำหรับการทำ parenteral injection 43
ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งการฉีด (intrathoracic) บริเวณช่องอกของยุงลาย 44
ภาพที่ 10 แสดงการทดลองให้ยุงดื่มปัสสาวะผู้ป่วยภายในกรง เพื่อสังเกตการณ์ว่ายุงมีพฤติกรรมการดูด (Urine sucking) ปัสสาวะหรือไม่ 45
ภาพที่ 11 แสดงการใช้ hematocytometer 47
ภาพที่ 12 แสดงการนับเซลล์จากตารางcounting chamber บน slide ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ microscope 48
ภาพที่ 13 แสดงการ smear cells โดยใช้ปลายทิปบน plus slide 48
ภาพที่ 14 แสดงลำดับ Oligonucleotide primers ที่ใช้สำหรับตรวจหาการแสดงออกของ RNA 53
ภาพที่ 15 แสดงการย้อม cell & tissue morphology ของ head squash ยุงลายโดย H&E staining 63
ภาพที่ 16 แสดงความแตกต่างการขัดขวาง endogenous peroxidase ในเนื้อเยื่อหัวยุงลายที่ 3%, 0.3% ที่อุณหภูมิห้อง และ 3% โดยใช้ความร้อน 64
ภาพที่ 17 แสดงเนื้อเยื่อหัวยุงลาย (Negative control) ที่ย้อมด้วย Anti-dengue (MAB8705) primary antibody ตามลำดับ 65
ภาพที่ 18 แสดงเนื้อเยื่อหัวยุงลาย (Positive control) ที่ย้อมด้วย Anti-dengue (MAB8705) primary antibody ตามลำดับ 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 19 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงของ DV-2 และตัวอย่างปัสสาวะ code A-21/2 เมื่อตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry 67

ภาพที่ 20 แสดงการเกิด CPE ใน LLC-MK2 cells รูปแบบต่างๆ 7 วัน หลัง infection 68

ภาพที่ 21 แสดงการเกิด CPE ใน C6/36 cells รูปแบบต่างๆ 7 วันหลัง infection 69

ภาพที่ 22 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงเมื่อ infected เซลล์ C6/36 ด้วย DV-2 และตัวอย่างปัสสาวะ code A-21/2 70

ภาพที่ 23 แสดงตัวอย่าง DNA products ของเนื้อเยื่อยุงลาย (Bodies) แต่ละตัว ที่ฉีดด้วย urine code P-1 โดยใช้ D1,D2 primer 71

ภาพที่ 24 แสดงตัวอย่าง DNA products ของเนื้อเยื่อยุงลาย (Bodies) แต่ละตัว ที่ฉีดด้วย urine code P-1 โดยใช้ def-F,Def-R_2 primers 72

ภาพที่ 25 แสดงตัวอย่าง DNA products ของเนื้อเยื่อยุงลาย (Bodies) แต่ละตัว ทำการทดลอง urine sucking โดยใช้ D1,D2 primers 73

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อไวรัสเด็งกี (Dengue virus; DENV) เป็นสาเหตุของการเกิดโรคไข้เลือดออก ไวรัสเด็งกีเป็นไวรัสที่มียุงลายเป็นพาหะนำเชื้อและสามารถแพร่ไปสู่คนได้ มีคุณสมบัติเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส จีโนมเป็นสายบวก เส้นเดี่ยว และเป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (envelope) จัดอยู่ในวงศ์ (family) Flaviviridae สกุล (genus) *Flavivirus*[1, 2]

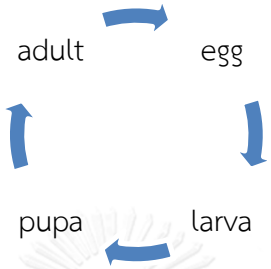
การติดเชื้อไวรัสเด็งกีก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่มีอาการแตกต่างกันหลายระดับ ตั้งแต่ติดเชื้อแต่ไม่มีอาการ (asymptomatic) โดยจะพบได้มากถึงประมาณ 80% หรือมีอาการเล็กน้อย (mild symptoms) ที่เรียกว่าไข้เด็งกี (classical symptoms; dengue fever) และมีอาการไข้เลือดออกรุนแรง (severe dengue symptoms; dengue hemorrhagic fever) และรุนแรงจนถึงภาวะช็อก (dengue shock syndrome)[3] เชื้อไวรัสเด็งกีจัดเป็นโรคที่เกิดจากแมลงซึ่งก่อโรคในมนุษย์ที่สำคัญที่สุด[4]

ไวรัสเด็งกีที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อเฉียบพลัน หากมีการแพร่ระบาดเกิดขึ้นภายในประเทศจะส่งผลเสียต่อสภาพสังคมและเศรษฐกิจ โรคนี้มักเกิดขึ้นในกลุ่มประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน [5] ลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อที่เป็นแบบโรคระบาดและโรคประจำถิ่นจะมีวัฏจักรคงที่คือ จากคนสู่ยุงและยุงสู่คน ยุงที่เป็นพาหะนำโรคเป็นยุงในสกุล Aedes. (Stegomyia) พบข้อมูลการกระจายเชื้อไวรัสเด็งกีในประเทศแถบเอเชียและแอฟริกาเกี่ยวกับการแพร่เชื้อไวรัสเด็งกีระหว่างยุงกับกลุ่ม nonhuman primates แต่ยังไม่มีหลักฐานการแพร่เชื้อที่บ่งบอกว่า nonhuman primate เป็นรังโรคสำคัญสำหรับการแพร่สู่คน[6, 7]

รายงานสถานการณ์โรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ปี 2557 จากสำนักโรคติดต่อนำเชื้อโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบจำนวนผู้ป่วยสะสม DH+DHF+DSS ณ วันที่ 29 ก.ค. 2557 (สัปดาห์ที่ 29) จำนวนผู้ป่วย 15,595 ราย จำนวนผู้ป่วยตาย 18 ราย จัดว่าเป็นปีที่มีการ

ระบาดสูง เมื่อพิจารณาข้อมูลการแพร่ระบาดของโรคไข้เลือดออกเด็งกีในประเทศไทย ไข้เลือดออกเด็งกีสามารถตรวจพบได้ทั้ง 4 ซีโรไทป์ และมีการหมุนเวียนแต่ละซีโรไทป์อย่างหลากหลายและแตกต่างกันในไปแต่ละปี[8]

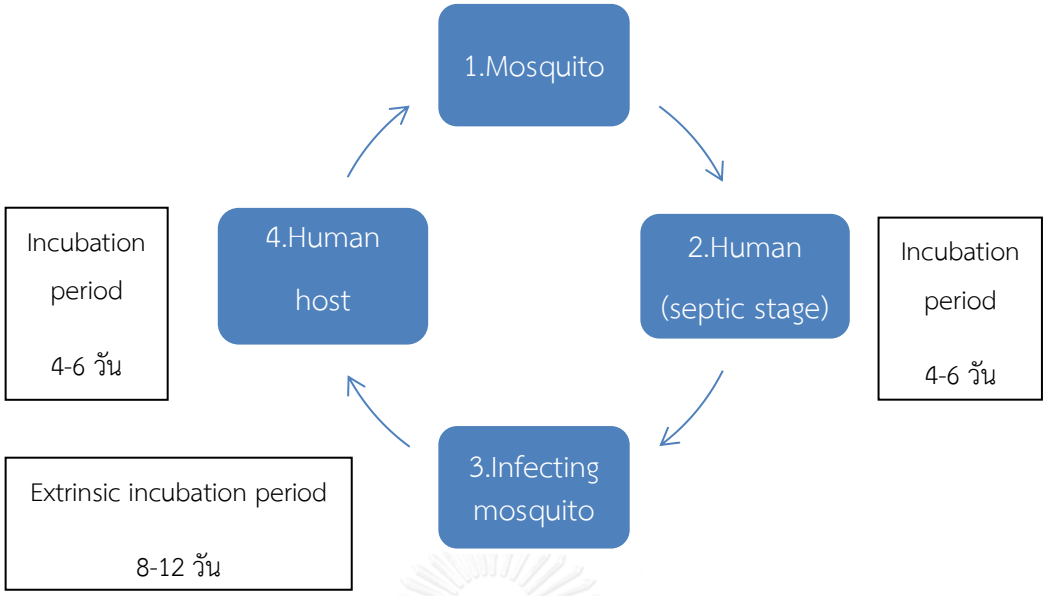
วงจรชีวิตของยุงลายเป็นแบบ complete metamorphosis ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของยุงลายเป็นแบบ complete metamorphosis

รูปแบบการแพร่กระจายเชื้อระหว่างไวรัสเด็งกีและคนคือ เมื่อยุงลายพาหะ 2 ชนิดคือ *Aedes. aegypti* (*Ae. aegypti*) หรือยุงลายบ้านและ *Ae. albopictus* หรือยุงลายสวน พาหะที่จัดเป็น primary vector ของไวรัสชนิดนี้คือ *Ae. aegypti* เพศเมียเมื่อดูดเลือดคนเป็นอาหาร ยุงจะสามารถวางไข่ เป็นการเพิ่ม vector ของเชื้อไวรัสเด็งกีทำให้โรคหมุนเวียนในสภาพแวดล้อมที่คนอาศัยอยู่ไปเรื่อยๆ [9, 10]

การแพร่เชื้อไวรัสเด็งกีและโรคไข้เลือดออกพิจารณาได้จากปัจจัยหลักๆที่มีความสัมพันธ์กัน คือ คนที่ได้รับเชื้อไวรัส (human host) , เชื้อไวรัสเด็งกี, ยุงลายที่เป็นพาหะ และสภาวะแวดล้อม[11] ยุงที่ไม่มีเชื้อจะได้รับไวรัสหลังจากกัดคนไข้ที่อยู่ในระยะที่มีเชื้อในกระแสเลือด (septic stage) หลังจากนั้นจะมีระยะบ่มเชื้อในตัวยุง (extrinsic incubation period) 8 ถึง 12 วัน ยุงจะสามารถแพร่เชื้อต่อไปยังคนได้ ทำให้เกิดไวรัสในกระแสเลือดหลังจากติดเชื้อ 4 ถึง 6 วัน ที่เรียกว่า ระยะเพาะเชื้อ (incubation period) และเชื้อยังคงอยู่จนกระทั่งไข้สร่าง โดยทั่วไปแล้วใช้เวลาประมาณ 3 ถึง 7 วัน [12, 13] ดังภาพที่ 2 เมื่อยุงมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีครั้งหนึ่งแล้ว เชื้อจะคงอยู่ในตัวยุงไปจนตลอดอายุขัยของยุงและสามารถก่อให้เกิดโรคในคนต่อได้อีกด้วย



ภาพที่ 2 แสดงวงจรการแพร่เชื้อไวรัสเด็งกีโดยมียุงลายเป็นพาหะนำโรค

การเพิ่มจำนวนของไวรัส (viral replication) เกิดขึ้นในองค์ประกอบของเซลล์ (cellular compartments) โดยไวรัสเด็งกีจะมีการยึดเกาะกับโฮสต์เซลล์ (attachment) และเกิดการรวมของ membrane protein ที่เป็นของไวรัสและโฮสต์เข้าด้วยกัน (fusion) เกิดเป็นถุงเว้าเข้าไปภายในเซลล์ เรียกว่า กระบวนการ endocytosis เมื่อไวรัสถูกปล่อยเข้าสู่ไซโตพลาสซึม จะมีการแยกอนุภาค (genome uncoating) ปล่อยจีโนมของไวรัสออกมาในไซโตพลาสซึม ส่วนที่เป็น RNA ซึ่งเป็นสายบวกของไวรัสจะทำหน้าที่เป็น mRNA ในการสร้าง polyprotien ต่างๆ (translation) ทั้งที่เป็น structural และ non structural protein และยังทำหน้าที่สังเคราะห์ negative strand intermediate เพื่อเป็น template สำหรับการสร้าง multiple copies ของ positive strand viral RNA มีการจัดเรียงอนุภาคของไวรัสตัวใหม่ ภายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลั่ม ได้เป็นไวรัสที่ยังไม่สมบูรณ์ immature virus จากนั้นถูกส่งไปยัง Trans-Golgi network เพื่อเปลี่ยนเป็นไวรัสที่สมบูรณ์ mature virus ส่งออกนอกเซลล์เพื่อ ติดเชื้อเซลล์ใหม่ต่อไป[14]

การศึกษาพบว่าในอวัยวะของคนไข้สามารถพบแอนติเจนที่บ่งบอกการเกิด viral replication โดยการใช้เทคนิคการหาโปรตีนของไวรัสเด็งกีโดยวิธี Immunohistochemistry เช่น ในตับ ม้าม ต่อมน้ำเหลือง ต่อมไทมัส ไต ปอดและ ผิวหนัง แต่หลักๆ จะพบมากในเซลล์ของระบบภูมิ

กัน (mononuclear phagocytic cells)[15] และกรณีที่มีการศึกษาในหลอดทดลอง เชื้อไวรัสเด็งกีมีความสามารถในการติดเชื้อใน immobilized cell lines ได้หลายชนิด

การทดลองในห้องปฏิบัติการ คณะวิจัยกลุ่มโรคติดเชื้อได้ทำการตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกีในปัสสาวะผู้ป่วยติดเชื้อเฉียบพลัน (acute phase) และผู้ป่วยในระยะฟื้นไข้ (late recovery) พบว่าสามารถใช้เป็นวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้โดยวิธี nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) โดยทำการทดสอบควบคู่กับ serological test (ELISA)

จากข้อมูลการแพร่ระบาดของไวรัสเด็งกีในประเทศไทย รวมทั้งข้อมูลการศึกษาไวรัสเด็งกีในปัสสาวะของผู้ป่วย ผู้วิจัยมีความสนใจการมีชีวิตรอดของไวรัสที่อาจหลงเหลืออยู่ในปัสสาวะของผู้ป่วยในระยะติดเชื้อเฉียบพลัน เพื่อศึกษาการเพิ่มจีโนม (viral replication) และการสร้างโปรตีนของไวรัส (viral protein synthesis) เพื่อตอบคำถามการมีชีวิตของไวรัสเด็งกีที่อาจมีชีวิตหลงเหลืออยู่ในปัสสาวะได้หรือไม่ อันจะทำให้เป็นประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับพยาธิสภาพการแพร่ระบาดของเชื้อต่อไป

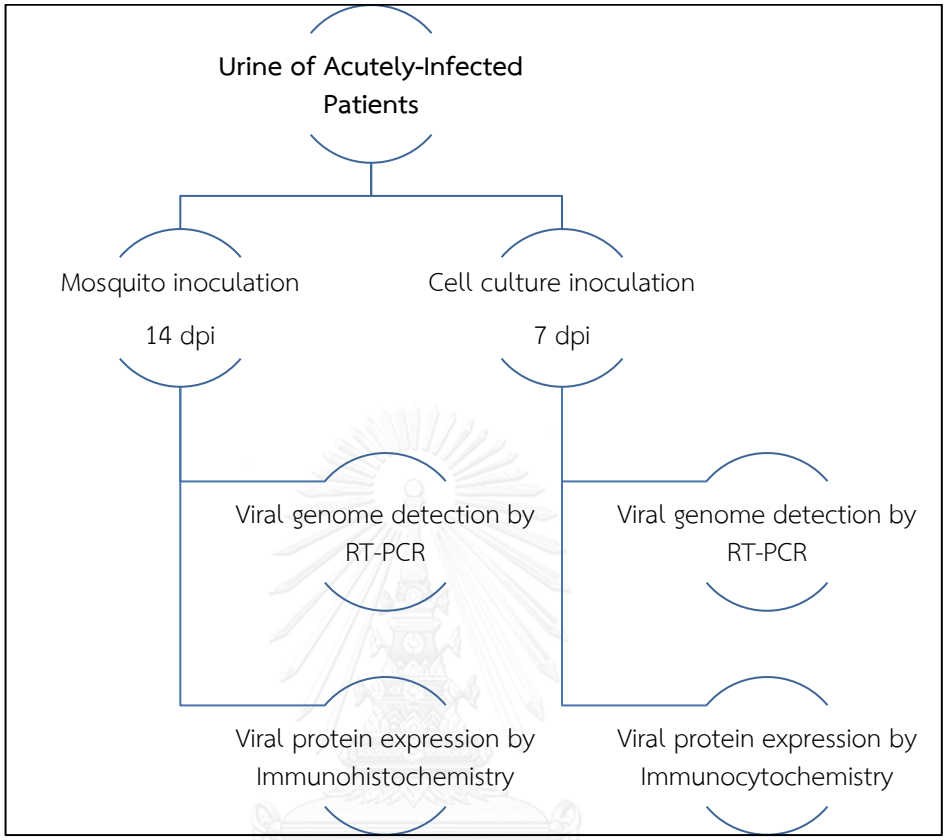
สมมติฐานงานวิจัย

ผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่า เป็นไปได้หรือไม่ว่า ไวรัสเด็งกีในปัสสาวะของผู้ป่วยไข้เลือดออกในระยะติดเชื้อเฉียบพลัน จะยังคงมีชีวิตหลงเหลืออยู่ และสามารถทำการพิสูจน์ได้โดยอาศัยคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนของไวรัสเด็งกีในยุงลายและเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 และ 7 วัน ตามลำดับ ทั้งนี้ควรสามารถตรวจหาจีโนมและโปรตีนของไวรัสเด็งกีได้

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อศึกษาและประเมินการมีชีวิตของไวรัสเด็งกีในปัสสาวะผู้ป่วยในระยะติดเชื้อเฉียบพลัน
2. เพื่อประเมินความแตกต่างระหว่างการแยกเชื้อไวรัสเด็งกีที่มีชีวิตในปัสสาวะผู้ป่วยจากการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงและในยุงลาย

กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากสามารถตรวจพบไวรัสเด็งกีที่มีชีวิตในปัสสาวะจะสามารถนำมาเป็นข้อมูลในการศึกษาพยาธิสภาพของเชื้อไวรัส และเป็นข้อมูลสำหรับป้องกันการแพร่ระบาดต่อไป

ขอบเขตงานวิจัย

ในงานวิจัยชิ้นนี้ ได้ใช้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะของผู้ป่วยที่เหลือจากงานวิจัยโรคไข้เลือดออก ของหน่วยวิจัยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้การดูแลของ รศ.นพ.วันล่า กุลวิชิต ซึ่งเป็นงานวิจัยส่วนหนึ่งที่ได้เคยผ่านการขอรับรองจริยธรรมงานวิจัยในคนมาแล้ว เมื่อปี พ.ศ. 2548-2551

ข้อตกลงเบื้องต้น

ปัสสาวะผู้ป่วยไข้เลือดออกระยะติดเชื้อเฉียบพลัน คนไข้ที่มีไข้สูงเฉียบพลันในช่วง 2-7 วัน ที่ผ่านการตรวจ nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) และ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ผลการทดสอบเป็นบวก

ข้อจำกัดของการวิจัย

ไม่มี

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

dengue virus หมายถึง เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากยุงลายเป็นพาหะนำโรค และเป็นสาเหตุให้เกิดอาการเจ็บป่วยคล้ายไข้หวัดที่รุนแรง โดยมีเชื้อไวรัส 4 ชนิด คือ ไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4 ที่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ก่อให้เกิดโรคดังกล่าวผ่านยุงลาย (*Ae. aegypti)* ทำให้ผู้ป่วยมีอาการเพียงเล็กน้อยไปจนถึงรุนแรง อาการรุนแรงดังกล่าวนี้รวมไปถึง อาการช็อก dengue shock syndrome และมีไข้เลือดออก dengue hemorrhagic fever

Immunohistochemistry หมายถึง กระบวนการตรวจหาแอนติเจนภายในเซลล์ ของชิ้นเนื้อ โดยการใช้หลักการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต

Immunocytochemistry หมายถึง เทคนิคทางห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ใช้ในการบอกตำแหน่งทางกายวิภาคของการมีโปรตีนที่มีความจำเพาะหรือแอนติเจนภายในเซลล์โดยใช้ primary antibody ที่มีความจำเพาะไปจับกัน และสามารถมองเห็นใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เมื่อถูกจับด้วย secondary antibody ที่ติดสลากกับสารเรืองแสงโดยตรง หรือ secondary antibody ที่ติดสลากด้วยเอนไซม์ เกิดการย่อยสารตั้งต้น ทำให้เกิดสีสามารถส่องดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

Virus isolation หมายถึง วิธีการในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคจากเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือ ในสัตว์ทดลอง จัดเป็น standard method ในการตรวจตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วย

วิธีดำเนินการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive study)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

ผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานการทดลองว่า ในปัสสาวะของผู้ป่วยที่ผ่านการตรวจว่าเป็นไข้เลือดออกระยะติดเชื้อเฉียบพลัน น่าจะยังมีไวรัสเด็งกีที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่ การตรวจสอบการมีชีวิตของไวรัสในตัวอย่างของผู้ป่วยสามารถทำได้โดยการนำมาเพาะเลี้ยงในเซลล์ห้องปฏิบัติการ หรือการนำไปแยกเชื้อในสัตว์ทดลอง ในที่นี้ผู้วิจัยเลือกใช้วิธีการแยกเชื้อไวรัสไข้เลือดออกจากปัสสาวะในเซลล์ C6/36 และการทดลองฉีดเข้าช่องอก (intrathoracics) ในยุงลายเพศเมีย *Ae. aegypti* โดยใช้เวลาในการบ่มเชื้อ 7 วันในเซลล์เพาะเลี้ยง และ 14 วันในยุงลาย ตามลำดับ หากไวรัสไข้เลือดออกเด็งกียังคงมีชีวิตต้องมีการเพิ่มจำนวนจีโนม (Viral genome replication) และมีการสร้างโปรตีนของไวรัส (Viral protein expression) ในช่วงเวลาดังกล่าว สามารถตรวจพบได้โดยวิธี RT-PCR และ Immunocytochemistry หรือ Immunohistochemistry

1. การติดเชื้อไวรัสเด็งกี (dengue virus infection)

ไวรัสเด็งกีจัดอยู่ในวงศ์ *Flaviviridae* สกุล *Flavivirus* ประกอบด้วย 4 ซีโรไทป์ ที่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ได้แก่ DENV-1, 2, 3 และ 4 ไวรัสชนิดนี้สามารถแพร่สู่คนได้ เริ่มต้นจากยุงลายชนิด *Ae. aeygypti* และ *Ae. albopictus*[16] ผลจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกีจะทำให้เกิดอาการป่วย ที่มีไข้เล็กน้อย หรือที่เรียกว่า classic dengue fever และสามารถพัฒนาไปสู่รูปแบบของโรคที่มีความรุนแรงได้ซึ่งเราเรียกว่า dengue hemorrhagic fever (DHF) และ dengue shock syndrome (DSS) และอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ [3] ความชุกของโรคไข้เลือดออกได้เพิ่มมากขึ้นในช่วงยี่สิบปีที่ผ่านมา ไข้เลือดออกจึงอุบัติขึ้นและจัดเป็นโรคติดต่อที่สำคัญที่สุดในคนที่เกิดจากแมลง การติดเชื้อ DENV ได้ถูกขยายออกไปในสภาพแวดล้อมของประเทศที่เป็น เขตร้อน และกึ่งเขตร้อน ลุกลามมาเป็นโรคระบาดในกลุ่มประเทศ แอฟริกา อเมริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทางฝั่งตะวันออกของแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และแปซิฟิกตะวันตก นั่นคือ พบปริมาณประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อมากเท่ากับ 2.5 พันล้านคน [17] การติดเชื้อไวรัสเด็งกีมีองค์ประกอบที่สำคัญดังนี้

1.1 ไวรัสเด็งกี จัดเป็น RNA ไวรัส สายเดี่ยวสั้นๆ ขนาด 11 kb ที่มีประจุบวก อนุภาคทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 นาโนเมตร ประกอบด้วย เยื่อหุ้มสองชั้นที่ได้จากโฮสต์ และจีโนมที่เป็น RNA สายเดี่ยวเส้นบวก 1 เส้น โดยจีโนมจะถูกทำให้แยกออกโดยเอนไซม์ชนิด protease ของโฮสต์และไวรัสที่มาจากโปรตีนโครงสร้าง 3 ชนิด คือ capsid; C, precursor of membrane; prM และ envelope; E protein และโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง 7 ชนิด คือ NS; nonstructural protein ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จะเป็นตัวระบุความแตกต่างของซีโรไทป์ แต่ละซีโรไทป์ก็จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากจึงทำให้เกิดการคัดเลือกสายพันธ์ที่บริสุทธิ์เพื่อให้เกิดการวิวัฒนาการของไวรัสเด็งกีที่เป็น dominant เกิดขึ้น แต่จะมีไวรัสเด็งกีที่สามารถคงอยู่ในโฮสต์และพาหะเท่านั้นที่จะสามารถก่อให้เกิดโรคได้ เช่นในเอเชีย เราจะพบว่ามี DENV-2 และ DENV-3 ที่ก่อโรครุนแรง สามารถส่งผลต่อการติดเชื้อซ้ำได้บ่อยที่สุด[18, 19]

1.2 พาหะ (vector) คือ ยุงลายที่ติดเชื้อผ่านการกัดทำให้เชื้อสามารถแพร่สู่คนได้ ยุงชนิดนี้จะพบในแถบเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนเท่านั้น การระบาดของไวรัสเด็งกีมีต้นกำเนิดจาก *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* และอีกหลายๆ สปีชีส์ของ *Ae. scutellaris* complex โดยก่อนหน้านี้เราพบว่า *Ae. albopictus* จากเอเชียมีการแพร่กระจายไปในแถบประเทศแอฟริกา อเมริกา และยุโรป ผ่านการค้าระหว่างประเทศ หรืออาจติดไปกับยวดยานพาหนะอาจมีไข่ยังที่ติดไปในช่วงหน้าฝน และไข่ยุงสามารถคงสภาพได้นานหลายเดือนในสภาวะที่แห้ง การป้องกันหรือลดปริมาณการแพร่กระจายเชื้อไวรัสเด็งกีคือ การควบคุมยุงพาหะ หรือต้องขัดขวางการสัมผัสโรคระหว่างยุงและคน โดย vector หลัก คือยุงลาย *Ae. aegypti* ในสภาวะที่เป็นตัวอ่อนหรือตัวเต็มวัย ยุงชนิดนี้สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วในภาชนะเก็บน้ำตามบ้านเรือน หรือ อาจพบได้ในที่ที่มีน้ำขัง โดยทั่วไปยุงลายจะบินในระยะใกล้ไม่เกิน 100 เมตรจากที่เจริญเป็นตัวเต็มวัย ดูดเลือดคนเป็นอาหารในช่วงเวลากลางวัน คนหรือ host ในที่นี้ คือผู้ป่วยหลังจากได้รับเชื้อจากไวรัสทั้ง 4 ซีโรไทป์ ในช่วง 4-10 วัน จะก่อให้เกิดช่วงของอาการป่วยได้หลากหลาย โดยส่วนใหญ่จะเป็นแบบ asymptomaic หรือไม่มีอาการ ผู้ที่เคยได้รับเชื้อหรือติดเชื้อครั้งแรก ร่างกายจะมีการชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อซีโรไทป์นั้นๆ ได้ตลอดชีวิต และพบว่าสามารถป้องกันซีโรไทป์อื่นๆ ได้ 2-3 เดือน แต่จะไม่มีภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์จากการติดเชื้อครั้งแรก[20, 21] ปัจจัยเสี่ยงจากความรุนแรงของโรคเกิดจาก การติดเชื้อครั้งที่สอง อายุ เชื้อชาติ และอาจเกิดจากโรคเรื้อรังบางชนิด เช่น โรคหืด โรคโลหิตจาง และเบาหวาน โดย

พบว่า เด็กเล็กจะมีความเสี่ยงต่อสภาวะที่มีการรั่วไหลของพลาสม่าออกจากหลอดเลือด (plasma leakage) หรือช็อก ได้มากกว่าผู้ใหญ่ จากการศึกษาซีรั่มของผู้ป่วยในคิวบาและไทย เพื่อศึกษาการแพร่ระบาด พบว่า การติดเชื้อครั้งที่สองจากต่าง ซีโรไทป์ ทำให้เกิดความรุนแรงของโรค (secondary heterotypic infection)[22, 23] ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค คือ ช่วงเวลาที่มีการติดเชื้อ และ viral sequence นั้นๆของไวรัส เช่น การศึกษาพบว่าอัตราการตายจากการติดเชื้อ DENV-2 แล้วตามด้วย DENV-1 ในช่วง 20 ปีมีความแตกต่างจากช่วง 4 ปี ความรุนแรงของโรคอาจเกิดได้ในการติดเชื้อครั้งแรก และกรณีทารกแรกเกิดที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเด็งกีจากมารดา อ้างจากทฤษฎีของ Antibody Dependent Enhancement (ADE) สามารถอธิบายรูปแบบความรุนแรงของการติดเชื้อครั้งแรกของทารกแรกเกิดและการติดเชื้อครั้งที่สองได้ว่า จากการติดเชื้อครั้งแรกจะมี non-neutralizing antibody และเกิด cross-reactive antibody เกิดขึ้นไปจับกับ epitope ที่อยู่บนพื้นผิว heterologous ของไวรัสเด็งกี ทำให้ยิ่งเพิ่มจำนวนไวรัสมากขึ้น และเข้าสู่โฮสต์โดยผ่านตัวรับที่เรียกว่า Fc- receptor การเพิ่มปริมาณเซลล์ที่ติดเชื้อทำให้ทราบว่าเกิดภาวะที่มีไวรัสในปริมาณสูง โฮสต์เซลล์จึงมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่รุนแรง คือ การหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokine) สารสื่อต่างๆ (mediator) ซึ่งสารบางตัวทำให้ผนังหลอดเลือดเกิดการรั่ว ในระหว่างที่มีการติดเชื้อครั้งที่สองจำนวนของ T cell ที่เป็นเซลล์จดจำ (cross-reactive memory T-cell) จะแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และมีการหลั่งไซโตไคน์ ทำให้เซลล์ตายเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า apoptosis ซึ่งถือเป็นการแสดงอาการที่รุนแรงของโรคอย่างหนึ่ง การติดเชื้อเริ่มจากยุงดูดเลือดที่ผิวหนัง ทำให้ป่วยมีไข้ เรียกระยะนี้ว่า acute phase ซึ่งเป็นระยะที่มีไวรัสเกิดขึ้นในเลือด และไวรัสจะทำลายตัวมันเองจาก compartment นี้ โดยทั่วไปจะเกิดไปพร้อมๆกับระยะไข้สร่าง (defervescence) ร่างกายจะมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ (cellular immune response) และสารน้ำ (Humeral immune response) วัดได้จากปริมาณของ neutralizing antibody และ CD4+ และ CD8+ T lymphocytes ซึ่งปริมาณการตอบสนองของความจำเพาะต่อซีโรไทป์ (serotype-specific) และปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างแอนติบอดี (cross reactive antibody) ดังกล่าวจะยังคงอยู่หลังจากติดเชื้อและตรวจวัดได้หลายปี การตอบสนองที่ติดตัวมาแต่กำเนิด (innate immunity) ต่อไวรัสเด็งกียังคงมีขีดจำกัด การป่วยรุนแรงจากไวรัสเด็งกีบอกด้วยการเกิด plasma leakage ซึ่งเกี่ยวกับความเข้มข้นของเลือดและการคงสภาวะของเหลวในหลอดเลือดผิดปกติ มีข้อมูลรายงานว่าการรั่วของพลาสม่าเกิดจากการที่ endothelial cell ถูกกระตุ้นจากการที่ระบบ

ภูมิคุ้มกัน เช่น monocyte และ T lymphocyte ที่ติดเชื้อ จากการสร้างสารในระบบ complement และสารสื่อ (mediator) จำพวก monokine cytokine และ soluble receptor ที่ทำให้เกิด endothelial cell dysfunction และกรณีที่เรียกว่า thrombocytopenia เกิดจากความผิดปกติของเซลล์เกล็ดเลือดมีปริมาณเกล็ดเลือดต่ำหรือการเกิดเลือดแข็งตัวขึ้นในหลอดเลือดซึ่งเป็นอาการของภาวะ hemorrhagic[24]

1.3 โฮสต์ (host) คนจัดเป็นโฮสต์ที่สำคัญสำหรับเชื้อไวรัสเด็งกี เมื่อยุงลายได้รับเชื้อไวรัสเด็งกีผ่านจากคนที่เป็นไข้เลือดออก (septic stage) ผ่านการกัด เกิดการส่งเชื้อผ่านต่อมน้ำลาย (salivary gland) และเดินทางลงสู่ลำไส้ (mid-gut) จากนั้นจะกระจายไปทั่วร่างกายของยุงภายใน 8 ถึง 12 วัน ช่วงที่ไวรัสมีการเพิ่มจำนวนในตัวยุงเรียกว่า extrinsic incubation period และหลังจากนั้นจะเป็นระยะที่ยุงมี infectivity คือ สามารถแพร่เชื้อต่อไปยังคนได้ ยุงลาย *Ae. aegypti* จัดเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเด็งกีที่สำคัญที่สุด เนื่องจากสามารถดูดเลือดคนและวางไข่ได้หลายครั้ง โรคไข้เลือดออกเป็นโรคที่เกิดขึ้นกับอวัยวะและเนื้อเยื่อ (systemic disease) การแสดงออกของโรคมีหลายระดับ หลังจากระยะที่มีการบ่มเชื้อจะเกิดอาการป่วยทันที แบ่งเป็นสามระยะ คือ febrile phase, critical phase และ recovery phase อาการในช่วง febrile ผู้ป่วยจะมีอุณหภูมิสูงอย่างรวดเร็ว เรียกว่า acute febrile phase และในช่วง 2-7 วันท้ายๆ ร่างกายจะมีอาการร่วม เช่น หน้าแดง ผื่นแดงตามผิวหนัง ปวดเมื่อย ปวดกล้ามเนื้อ ปวดข้อ และปวดศีรษะ อาการในช่วง critical phase เป็นช่วงที่อุณหภูมิร่างการลดลงประมาณ 37.5-38 ºC หรืออาจจะต่ำกว่านี้เล็กน้อย เกิดในระยะ 3-7 วันที่มีอาการป่วย หลอดเลือดขยาย และสามารถเกิด plasma leakage ได้ในช่วง 24 ถึง 48 ชม. [25, 26] ปริมาณเกล็ดเลือดลดลงอย่างรวดเร็ว ในระยะนี้เองที่ผู้ป่วยสามารถเกิดอาการช็อกได้ เนื่องจากปริมาณพลาสม่าลดลงจากการรั่วซึมของพลาสม่าออกจากหลอดเลือด โดยอุณหภูมิร่างกายจะต่ำกว่าปกติ พบว่าเมื่อมีอาการช็อกยาวนานจะทำให้เลือดสูบฉีดต่ำลงจากหัวใจไปยังอวัยวะที่เกี่ยวข้อง เกิดกรดในร่างกาย ทำให้การทำงานของอวัยวะบกพร่องหรือผิดปกติ หลอดเลือดแข็งตัวทั่วร่างกาย เกิดภาวะที่เรียกว่า severe hemorrhagic ช่วงนี้หากผู้ป่วยดีขึ้นในระยะไข้สร่าง แสดงว่าเป็น non-severe dengue ระยะถัดมา คือ recovery phase หากผู้ป่วยไม่มีอาการรุนแรงในช่วง 24 ถึง 48 ชม. น้ำหล่อเลี้ยงภายนอกหลอดเลือดจะถูกดูดซึมเข้าแทนที่ ที่เคยรั่วซึมออกมาภายใน 48 ถึง 72 ชม. อาการจะดีขึ้นตามลำดับ เนื่องจากการเฝ้าสังเกตอาการของผู้ป่วย แพทย์จะต้องทราบ

ข้อมูลการปัสสาวะของผู้ป่วย ไม่ว่าจะเป็นปริมาตรปัสสาวะ และจำนวนครั้งในการปัสสาวะ ดังนั้น มีโอกาสที่ปัสสาวะที่อาจจะปนเปื้อนเชื้อที่มีไวรัสเด็งกีที่อาจจะมีชีวิตหลงเหลืออยู่ และเกิดปนเปื้อนไปในสภาวะแวดล้อมได้ องค์การอนามัยโรคได้จัดประเภทของโรคไข้เลือดออกตามความรุนแรงของโรคออกเป็น 3 ประเภท คือ ประเภทที่ 1 โรคไข้เลือดออกที่ไม่มีอาการ มีลักษณะมีไข้ คลื่นไส้ อาเจียน เป็นผื่น ปวดเมื่อย มีการลดลงของเลือดขาว (leukopenia) นับได้น้อยกว่า 4000/µl และ tourniquet test มีผลบวก ประเภทที่ 2 ไข้เลือดออกที่มีอาการ มีภาวะเดียวกันกับประเภทแรก แต่มีอาการเพิ่มเติมคือ ปวดท้อง อาเจียนเรื้อรัง เลือดออกที่เยื่อบุอวัยวะ อ่อนเพลีย กระสับกระส่าย ตับขยายขนาดโตมากกว่า 2 เซนติเมตร ปริมาณเกล็ดเลือดลดลงอย่างรวดเร็ว ประเภทที่ 3 เกิด plasma leakage อย่างรุนแรง ช็อก น้ำคั่งในช่องปอด หายใจผิดปกติ เลือดออกรุนแรง เมื่อตรวจเอนไซม์ transaminase ที่หลั่งออกมาในกระแสเลือดกรณีที่ตับถูกทำลาย AST/ALT มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1000 อาการทางระบบประสาทส่วนกลาง ถูกทำลาย หัวใจล้มเหลว อวัยวะต่างถูกทำลาย การวินิจฉัยและการทดสอบในห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก โดยการตรวจไวรัส นิวคลีอิกแอซิดของไวรัส แอนติเจนและแอนติบอดีหรือเทคนิคเหล่านี้รวมกัน หลังจากเริ่มมีอาการป่วยในช่วง 4 ถึง 5 วัน สามารถตรวจได้ในระบบหมุนเวียนเลือดและเนื้อเยื่อในซีรั่ม พลาสม่า ในช่วงเริ่มมีอาการสามารถตรวจโดยวิธีแยกเชื้อ virus isolation ตรวจนิวคลีอิกแอซิด ตรวจโปรตีนของไวรัส เมื่อระยะท้ายของการติดเชื้อเฉียบพลันจะใช้วิธีวินิจฉัยทาง serology การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแตกต่างกันตามสภาวะของโฮสต์[27] หากผู้ป่วยไม่เคยได้รับเชื้อหรือวัคซีนป้องกันโรคกลุ่มนี้ Flavivirus vaccine เช่น yellow fever, Japanese encephalitis, tick-born encephalitis ร่างกายจะมีการสร้างแอนติบอดีตัวแรกคือ IgM เป็น immunoglobulin isotype ตัวแรกที่สามารถตรวจพบได้โดยในวันที่ 3 ถึง 5 ของช่วงมีอาการพบ 50 % ในวันที่ 5 พบ 80% ในวันที่ 7 พบได้ 99% และ IgM จะมีค่าสูงสุดในช่วง 2 สัปดาห์ของการป่วย และจะค่อยๆลดลง จนไม่สามารถตรวจวัดได้หลังจากนั้น 2 ถึง 3 เดือน สำหรับ IgG สามารถตรวจพบได้ค่าความแรงแอนติบอดี (titer) ต่ำๆ ในสัปดาห์แรก และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นช้าๆ หลังจากนั้น ยังคงตรวจพบได้เมื่อเวลาผ่านไปหลายเดือน และอาจจะตลอดชีวิต[28-30] จากการติดเชื้อครั้งที่ 2 หรือกรณีที่เคยได้รับวัคซีนหรือเคยติดเชื้อจากกลุ่ม flavivirus ที่ไม่ใช่ dengue (non-dengue flavivirus) พบว่าร่างกายจะมีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสกลุ่ม Flavivirus นานถึง 10 เดือนหรือจนตลอดชีวิต โดย dominant Immunoglobulin ที่พบได้มากที่สุดในช่วงนี้ คือ IgG และในช่วง 5 วันแรกของการมีอาการ early convalescence phase จะพบ

ปริมาณ IgM ต่ำในครั้งที่สองกว่าการติดเชื้อครั้งแรกมากอย่างมีนัยสำคัญ หรือบางรายอาจไม่สามารถตรวจพบได้เลย[31] การวินิจฉัยการติดเชื้อว่าเป็นการติดเชื้อครั้งแรกหรือครั้งที่สอง จึงใช้วิธีเปรียบเทียบสัดส่วน IgM/IgG มากกว่าวิธี haemagglutination inhibition test

การวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับว่าเราต้องการจะศึกษาอะไร เช่น การวินิจฉัยตัวอย่างผู้ป่วย การศึกษาการแพร่ระบาด หรือการพัฒนาวัคซีน ดังนั้นจึงต้องมีความสอดคล้องด้านความคุ้มค่า ราคา ทั้งเครื่องมือและผู้เชี่ยวชาญในการวินิจฉัยนั้นๆ การวินิจฉัยตัวอย่างผู้ป่วยในช่วง 5 วันแรกระหว่างป่วยมีไข้ febrile phase สามารถตรวจได้โดยวิธีการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง virus isolation , การตรวจหา RNA ของไวรัส Nucleic acid amplification test (NAAT) และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสโดยวิธี ELISA ซึ่งเป็น rapid method วิธีการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงมีความจำเป็นมากที่ตัวอย่างผู้ป่วยไม่ว่าจะเป็นเลือดที่ปั่นแยกพลาสม่า หรือซีรั่ม ,น้ำไขสันหลัง หรือปัสสาวะ ต้องมีสภาพที่เย็นอยู่ในอุณหภูมิต่ำ เพื่อรักษาการคงสภาวะของไวรัสในตัวอย่างระหว่างการขนส่งจากผู้ป่วย การแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือในยุงลาย และต้องปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการประเภท BSL-2,BSL-3 ตามลำดับ ใช้เวลา 1-2 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจหา nucleic acid ของไวรัสเพียง 1-2 วัน แต่มีความเสี่ยงต่อการให้ผลบวกปลอมเนื่องจากการปนเปื้อน contamination สูงมาก สำหรับการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส โดยวิธีการ ELISA ยังไม่สามารถยืนยันเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกของผู้ป่วยในระยะเฉียบพลันได้

2. การแยกเชื้อไวรัส (virus isolation)

การแยกเชื้อไวรัสไข้เลือดออก เป็นวิธีการวินิจฉัยการติดเชื้อของผู้ป่วยที่น่าเชื่อถือที่สุด ตัวอย่างผู้ป่วยไข้เลือดออกควรเก็บในช่วง 5 วันแรก หรือช่วงที่มีไวรัสในกระแสเลือด (viremia) สามารถนำมาวิเคราะห์ในรูปแบบของ พลาสม่า ซีรั่ม เซลล์เม็ดเลือด (Poly Blood Mononuclear cell) หรือ ใช้ชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก ไวรัสเด็งกีมีคุณสมบัติที่ไม่สามารถทนความร้อน ดังนั้นการเก็บรักษาตัวอย่างในช่วงเวลาสั้น ๆ ไม่เกิน 24 ชม. ควรเก็บใน 4-8°C แต่หากจะเก็บรักษาในระยะยาวควรเก็บที่ - 70°C หรือในถังไนโตรเจนเหลว และไม่ควรเก็บที่ -20°C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1 การแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง มักนำมาใช้ประจำห้องปฏิบัติการในการแยกเชื้อไวรัสไข้เลือดออก คือ C6/36 เป็นเซลล์ที่ได้จากยุงลายชนิด *Ae. albopictus* และ AP16 ได้จากยุง *Ae. pseudoscutellaris* สิ่งสำคัญ คือไม่ใช่ wild type ของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกทุกตัวที่จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หลังจากติดเชื้อหรือ ที่เรียกว่า cytopathic effect (CPE) ในเซลล์ยุง เซลล์เพาะเลี้ยงต้องทำการตรวจยืนยันแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสเด็งกี โดยใช้ Immunofluorescence assay เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบ goal standard method การเพาะเลี้ยงในเซลล์ที่เป็น mammalian cell line ที่นิยมนำมาแยกเชื้อไวรัสไข้เลือดออก ได้แก่ Vero cell, LLC-MK_2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จากไตลิงชนิด African green monkey และ *Macaca mulatta* ตามลำดับ รวมทั้งสามารถใช้ไตหนู Baby Hamster Kidney Cell (BHK-21) ที่ได้จาก Syrian hamster ได้อีกด้วย แต่ไม่มีประสิทธิภาพเท่าเทียมเซลล์ยุง

2.2 การแยกเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลอง สามารถฉีด intracranial เป็นการฉีดเข้าสมองหนูแรกเกิด suckling mice ทำให้หนูมีอาการทางระบบประสาทที่สามารถสังเกตได้ แต่ปัญหา คือ ไวรัสเด็งกีไม่ทุกสายพันธุ์ที่สามารถสังเกตอาการจากหนูทดลองได้ หรือฉีดเข้าช่องอกของยุงลาย (intrathoracic) และยืนยันผลการทดลองโดยการย้อมเนื้อเยื่อสมองหนู brain tissue และ head squashes ของยุงด้วย แอติบอดี้ที่ทำปฏิกิริยาต่อเชื้อไวรัสเด็งกี เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเด็งกีและยืนยันผล การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเด็งกี nucleic acid detection ที่เรียกว่า Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) จัดเป็นวิธีที่มีความไว sensitivity สูง และมีความจำเพาะ specificity สูง หลักการหลัก 3 ขั้นตอน คือ การสกัด RNA จากตัวอย่างของผู้ป่วยอาศัยการแยกชั้นของของเหลวโดยใช้สารจำพวก phenol และ chloroform เพื่อทำให้ได้ RNA ที่ต้องการ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน amplification และทำการจำแนก ผลิตภัณฑ์ amplification product ตามน้ำหนักโมเลกุลบน agarose gel ที่ย้อมด้วยสี ethidium bromide เปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของ marker จำแนกตามเส้น band ของน้ำหนักโมเลกุล วิธีการแยกเชื้อไวรัสนี้มีความไว sensitivity ประมาณ 80-100 % ซึ่งถือว่าสูงมาก ดังนั้นโอกาสที่จะเกิดผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนจึงมีสูงเช่นกัน ดังนั้นจึงมีการพัฒนามาใช้วิธีการตรวจผลการแยกเชื้อจากตัวอย่างผู้ป่วยโดยวิธี quantitative real time RT-PCR วิธีการนี้จะเป็นการใช้คู่ primer และ fluorescence probe ไปจับกับ nucleic acid serotype ที่มีความจำเพาะในแต่ละซีโรไทป์ โดยใช้เครื่องมือที่

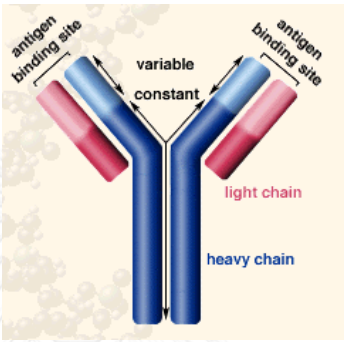
เฉพาะ ตามเวลาจริง ทำให้สามารถตรวจหาปริมาณไวรัสได้โดยไม่ต้องผ่าน agarose gel ปัจจุบันจะใช้ probe ที่เป็นแบบ SYBR green หรือ Taqman probe เป็นต้น ในการตรวจหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างคนไข้โดยวิธี multiplex quantitative real time PCR สามารถตรวจได้ทั้ง 4 ซีโรไทป์ ในครั้งเดียวกัน จึงมีความรวดเร็ว และไม่เกิดการปนเปื้อน แต่ความไวจะต่ำกว่า การใช้ วิธี nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction ดังนั้นวิธีการนี้จึงมีประโยชน์ในการศึกษา pathogenesis ของไวรัสได้[13]

3. อิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)

วิธีการตรวจหาโมเลกุลที่มีความจำเพาะในตัวอย่างที่สนใจโดยใช้แอนติบอดี มีหลายวิธีการ เช่น ELISA, western blot, Immunoprecipitation, Enzyme assays, Immunohistochemistry (IHC) สำหรับ IHC เป็นวิธีการตรวจหาโมเลกุลที่มีความจำเพาะในเนื้อเยื่อตัวอย่างหรือ เซลล์สเมียร์ Immunocytochemistry (ICC) หลักการพื้นฐาน คือ การที่แอนติบอดีไปจับกับแอนติเจนเกิดองค์ประกอบที่เรียกว่า antibody-antigen complex ที่สามารถตรวจจับได้ ข้อดีของวิธีการนี้ คือ รวดเร็ว และสามารถระบุตำแหน่งของสิ่งที่สนใจทั้งภายในและภายนอกเซลล์ได้ แต่มีความจำเป็นต้องมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน หรือ epitope ที่เราสนใจเท่านั้น

3.1 ประโยชน์ของ IHC คือ ใช้ในการวิเคราะห์การกระจาย หรือ บอกตำแหน่งความแตกต่างของโปรตีนที่แสดงออกในเนื้อเยื่อ, ตรวจหาการแสดงออกของอาณาบริเวณของโปรตีนที่สนใจในระหว่างที่มีการพัฒนา เช่น การเกิดพยาธิสภาพของไวรัส และสามารถวินิจฉัยและวิเคราะห์เซลล์ที่ผิดปกติในเซลล์มะเร็งได้ เกิดทฤษฎีเกี่ยวกับ Immunohistochemistry จากการใช้แอนติบอดี เพื่อตรวจหาโปรตีน ในปี ค.ศ. 1930 แต่เริ่มมีการศึกษาอย่างจริงจังในปี ค.ศ. 1941 โดยศาสตราจารย์ Coons แห่งมหาวิทยาลัย Harvard โดยใช้ FITC (Fluorescent Isothiocyanate ติดสลากด้วย antibody เพื่อตรวจหาแบคทีเรีย pneumococci ในเนื้อเยื่อ ตั้งแต่นั้นมาได้มีการพัฒนาโปรตีน conjugate, Enzyme labels, เช่น peroxidase และ alkaline phosphatase จากนั้นมีการค้นพบ colloidal goal label และมีการนำมาใช้กับเครื่องมือ light microscope และ electron microscope และยังมีการติดสลากด้วย radioactive element และ immunoreaction ที่มองเห็นได้โดยใช้ autoradiography สิ่งเหล่านี้ทำให้ IHC กลายเป็นเครื่องมือสำคัญในการวินิจฉัยโรคและงานวิจัย[32-36]

3.2 หลักการพิจารณาการทำ IHC คือ 1. การเลือกแอนติบอดี คือชนิดที่เป็น monoclonal antibody หรือ polyclonal antibody และต้องคำนึงถึงความเข้มข้น (dilution) ที่นำมาใช้ด้วย 2. วิธีการแบ่งได้ 5 วิธีใหญ่ๆ คือ Direct method, Indirect method, Immunoenzyme, Fluorescence, Multiple labeling 3.การเตรียมตัวอย่าง คือ การตรึง (Fixation), การตัดชิ้นเนื้อ (Sectioning), การดึง antigen (antigen retrieval), การขัดขวางปฏิกิริยาไม่จำเพาะ (blocking) 4. Control ต่างๆ



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างทั่วไปของ Antibody

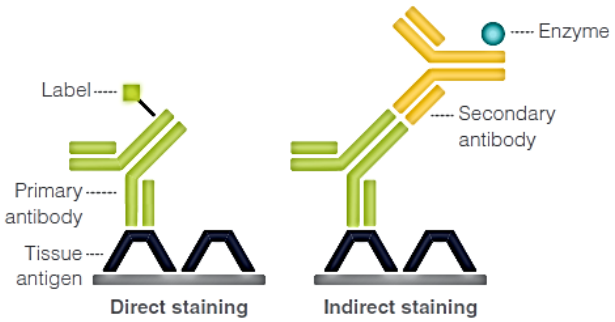
Source : www.biology.arizona.edu.

จากภาพแสดงโครงสร้างของแอนติบอดี ซึ่งจัดเป็นโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า Immunoglobulin ประกอบด้วยสาย polypeptide 4 สาย ได้แก่ heavy chain 2 สาย และ light chain 2 สาย ประกอบกันเป็นโมเลกุลรูปตัว Y ด้านปลายบนสุดเป็น amino acid sequence ที่ทำให้มีความหลากหลายของแอนติบอดี คือ 110-130 ชนิด ส่วนนี้เรียกว่า variable region ไว้จับกับแอนติเจน การเลือกแอนติบอดี มีหลักการดังนี้คือ มักใช้ class IgG ในการย้อม IHC เนื่องจากเป็น major class ของ Immunoglobulin ที่หลั่งออกมาใน ซีรั่ม, แอนติบอดี ใช้ส่วน variable region จับอย่างจำเพาะกับแอนติเจนด้วยพันธะ hydrogen, แรง Van der waals หรือจับกันแบบ hydrophobic หรือ ionic โดยค่าความแรงของการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน ที่มีความจำเพาะเรียกว่า ค่า affinity และหากเลือกใช้แอนติบอดีที่มีค่า affinity สูงๆ จะสามารถจับกับแอนติเจน ปริมาณมากในช่วงเวลาที่กำหนดดังนั้นสามารถใช้แอนติบอดีที่มี dilution สูง ๆได้ที่นำมาใช้ผลิตได้จากสัตว์ที่ถูกกระตุ้นโดยการฉีด whole protein , peptide หรือ domain ที่เรียกว่า

purified antigen ได้แอนติบอดีชนิด monoclonal หรือ polyclonal โดย polyclonal antibodies จะมีความแตกต่างของ Immunoglobulin classes จากการแบ่งตัวของ B cell clones หลายๆตัว ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับส่วนของ epitope antigen ได้อย่างหลากหลายผลิตจาก กระต่าย แพะ หนู ลา โดย polyclonal antibodies จะถูกทำให้บริสุทธิ์ จากซีรั่มโดยวิธี antigen affinity chromatography (เอา fraction ของ immunoglobulin ที่ไม่มีความจำเพาะทั้งหมดออกไป และ ทำได้โดย purified protein เมื่อเปรียบเทียบกับ monoclonal antibody พบว่า polyclonal antibody มีแนวโน้มที่จะเกิด non-specific ได้มากกว่า และเตรียมง่ายกว่า สำหรับ monoclonal antibody ผลิตได้จาก clone ของ B-cells สามารถทำปฏิกิริยาต่อ 1 epitope บน antigen ผลิตจากหนู (mouse) การผลิตใช้เวลานานและราคาสูง ไฮบริโดมาที่มีหลายร้อยชนิดต้องผ่านการตรวจสอบการนำเสนอต่อแอนติบอดี แต่มีข้อดีคือ เกิดปฏิกิริยาการจับกันอย่างไม่จำเพาะ (non-specific) ค่อนข้างต่ำ ไม่จำเป็นต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ค่า affinity มีความคงที่ แอนติบอดีที่นำมาใช้สามารถผลิตเองได้ในห้องปฏิบัติการหรืออาจเป็นรูปแบบที่มีมาตรฐานจากการผลิต titer คือ dilution สูงสุดของแอนติบอดี ที่สามารถจับกันอย่างจำเพาะและเกิด non-specific ของ background ต่ำที่สุด ดังนั้น dilution คือ สัดส่วนความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อปริมาตรทั้งหมด การหาความเข้มข้นแอนติบอดีที่เหมาะสม (optimal working dilution) ก่อนเริ่มการทดลอง จึงควรมีการ titration หรือทำ dilution series ของแอนติบอดี

3.3 กระบวนการของ IHC สามารถแบ่งได้ 2 วิธีการ คือ

3.3.1. Direct method เป็นการตรวจหา complex ที่เป็นการจับกันของโมเลกุลด้วย antibody ที่ติดสลากด้วย conjugate เช่น fluorochrome, enzyme วิธีการนี้ใช้แอนติบอดี เพียง 1 ชนิด ง่ายเร็ว แต่ค่า sensitivity จะต่ำกว่า indirect method



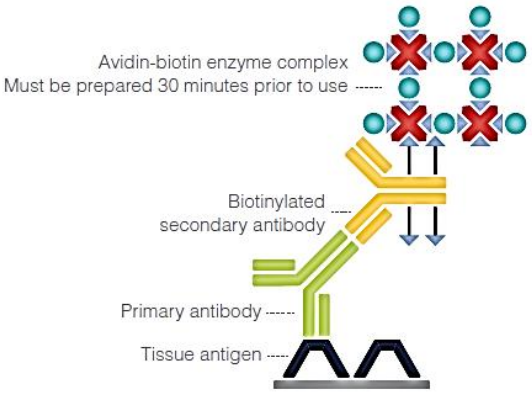
ภาพที่ 4 แสดงกระบวนการย้อม IHC แบบ Direct method และ Indirect Method

Source : ihc-guidebook-detection-methods-chapter6 หน้า 79

3.3.2.Indirect Method สามารถแบ่งได้อีก 2 วิธี คือ

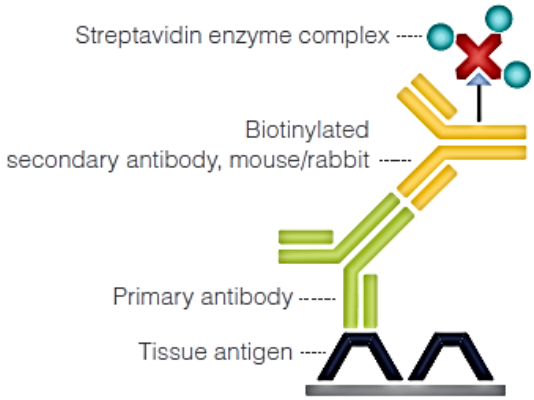
3.3.2.1 Indirect Method แบบ two antibodies ใช้แอนติบอดี 2 ชนิด คือ primary antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ไปจับแอนติเจนที่เราสนใจ และ secondary antibody ที่ติดสลากด้วยเอนไซม์ หรือสารเรืองแสง (fluorescent) ที่ไปจับกับ IgG ส่วน constant region

3.3.2.2 Indirect Method แบบ signal amplification เป็นการเพิ่มสัญญาณที่ทำให้มีการจับกันแข็งแรงขึ้น affinity สูง หลักการ คือ primary antibody จะไปจับกับ epitope ที่เราสนใจ และมี secondary antibody ที่ติดสลากด้วยโปรตีนชนิดแรกคือ avidin เป็นไกลโคโปรตีนที่ได้จากไข่ขาวไปจับกับ biotin และ streptavidin ที่ได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces avidinii* จะเกิด non-specific binding ต่ำกว่า avidin โปรตีนทั้งสองชนิดจับกับ biotin 4 โมเลกุล หากมี biotinylated secondary antibody เกิดขึ้น สัญญาณจะถูก amplified ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากบ่มด้วย avidine-biotin complex (ABC method) หรืออีกกรณี การติดสลากด้วย streptavidin-biotin (LSAB method) streptavidin ถูก conjugated ด้วย เอนไซม์ตรวจจับ เช่น horseradish peroxidase หรือ alkaline phosphatase หรือ fluorochrome การใช้ amplification ชนิดนี้ จำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการป้องกันการเกิด non-specific binding เข้าไปด้วย (34, 37, 38)



ภาพที่ 5 แสดง Indirect method : Avidin-Biotin Complex (ABC) method

Source: ihc-guidebook-detection-methods-chapter6 หน้า 79



ภาพที่ 6 แสดง Indirect method : Labelled Streptavidin-Biotin (LSAB)method

Source : ihc-guidebook-detection-methods-chapter6 หน้า 79

3.4. กระบวนการตรึง Fixation สามารถทำได้หลายวิธี พิจารณาตามประเภทและคุณสมบัติของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ทำการตรึง ได้แก่

3.4.1. การใช้สารกลุ่ม aldehyde เช่น 10% Neutral Buffered Formalin, 4% formaldehyde, 2% formaldehyde ที่มี picric acid และ PBS, glutaralddehyde เป็นวิธีตรึงที่เหมาะสมสำหรับเนื้อเยื่อที่เราต้องการศึกษาด้านโครงสร้าง

3.4.2. สารจำพวก Zinc

3.4.3. สารจำพวก Acetone หรือ methanol เป็นการตรึงเซลล์ เนื้อเยื่อโดยการทำให้เกิดรู permeabilizes หรือ coagulation ให้ antibody แทรกตัวผ่านเข้าไปได้

3.4.4.Fresh frozen กรณีที่เป็นเนื้อเยื่อสดแช่แข็งใน liquid nitrogen หรือ dry ice เหมาะสำหรับ detect antigen บริเวณ cell membrane หรือ ตรวจหา cytokine

3.4.5. วิธีอื่นๆ

การทำ fixation ตัวแปรสำคัญ คือ เวลาที่ใช้ในการตรึง เวลาที่ใช้ในการตรึงต่างกันอาจส่งผลต่อผลการย้อมอย่างมีนัยสำคัญ

3.5. Sectioning หรือ การตัดชิ้นเนื้อ มีทั้งแบบ cryosection ซึ่งเป็นการตัดชิ้นเนื้อที่เป็น fresh frozen หรือ เนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงแล้ว เหมาะสำหรับการคงสภาพ antigen ที่เราต้องการตรวจหาเก็บได้นาน ส่วนแบบ paraffin sections เหมาะกับเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงแล้วเท่านั้น เป็นกระบวนการที่ใช้ความร้อนผ่านสารจำพวก xylenes และ alcohols อาจมีผลต่อ antigen ที่เราต้องการตรวจสอบ เก็บได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์ เนื่องจากสูญเสีย antigenicity ในเวลาต่อมา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนที่เรียกว่า antigen retrieval

3.6. กระบวนการที่เรียกว่า permeabilization เป็นกระบวนการที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำให้เป็นรู เมื่อ epitope ที่เราต้องการศึกษาอยู่ภายในเซลล์ (intracellular) ใน cytoplasm หรือ nucleus การใช้สารจำพวก detergent เช่น Triton-X, Tween สารจำพวก Acetone ethanol และสารจำพวก saponin

3.7. กระบวนการขัดขวาง Blocking เป็นกระบวนการลดการเกิด Background staining สาเหตุของ specific background staining คือ การใช้ Polyclonal antibody และการตรึงเซลล์เนื้อเยื่อที่ไม่เหมาะสม ส่วน non-specific background staining เกิดจาก การจับกันแบบไม่จำเพาะไม่เป็นไปตามรูปแบบที่วางไว้, การเกิด endogenous peroxidase หรือ endogenous biotin ดังนั้นสิ่งจำเป็นในการทดลองต้องมี control ชนิดที่เป็น Positive control และ Negative control เพื่อใช้เป็นตัวที่ช่วยประเมินผลการทดลอง Positive control คือ เนื้อเยื่อ หรือ เซลล์ที่รู้ว่ามีส่วนที่

จำเพาะต่อ antibody และเมื่อย้อมด้วย antibody จะให้ผลการย้อมเป็น positive ส่วน negative control เป็น non-immunized serum จาก สปีชีส์เดียวกัน

3.8. การตรวจหา Detection เป็นการใช้ Fluorescent บ่มสารเรืองแสงที่ติดสลากกับ secondary antibody ส่องด้วยกล้อง fluorescent ส่งผลให้เกิด fading ได้ หรือ Enzyme linked เป็นการบ่มด้วย secondary antibody และ substrate ที่ถูก hydrolysed และเกิด ผลิตภัณฑ์ที่มีสี ตรวจได้โดยใช้กล้อง brightfield เก็บได้ถาวรที่อุณหภูมิห้อง การใช้ peroxidase หรือ alkaline phosphatase โดย substrate ทั่วไปสำหรับ Peroxidase คือ DAB (3, 3'-diaminobenzidine) และ substrate ทั่วไปสำหรับ alkaline phosphatase คือ NBT(nitro-blue tetrazolium), BCIP(5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate)[35, 39-44]

3.9. การแปลผลการทดลอง ใช้วิธีการ scoring ของ positive cell โดยการประเมินผล ปริมาณ quantitative โดยเทียบเป็น % positive ของ และระดับคะแนนที่มี 5 ช่วงตั้งแต่ 0,+1,+2,+3,+4 (granule ที่ติดสีใน cytoplasm หรือสีที่ติดบริเวณนิวเคลียส nuclei staining) เช่น 0 คือ ช่วงที่มีการติดสีน้อยกว่า 10% ของ positive ,+1 (10%-25%), +2 (25%-50%), +3(50%-75%), +4(75% -100%)[45] หรือการคำนวณ คะแนนแบบ Quick score โดยประเมินแบบ semi-quantitative กำหนดช่วง Intensity (I) ความเข้มของการติดสีเป็นลักษณะทางคุณภาพแบ่งเป็น 3 ช่วง 1 = ติดสีจาง (weak), 2 = ติดสีกลาง (moderate), 3= ติดสีเข้ม (strong) P คือ percent (% ที่ติดสี)

$Q = P \times I$; เมื่อ Q มีค่าไม่เกิน 300 ($0 \leq Q < 300$)

คือ จากข้อมูลพบว่าเมื่อถูกยุงลายที่ติดเชื้อกัด dengue virus จะเพิ่มจำนวนใน PBMC เมื่อ ทำการย้อม antigen staining สามารถตรวจพบเซลล์ที่ติดเชื้อได้ 1-10 เซลล์ ต่อ 10,000 เซลล์ 0.01% ถึง 0.1%)[46]

4. ยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*)

ยุงใน Genus Aedes มี 2 ชนิดคือ *Ae. aegypti* (ยุงลายบ้าน) และ *Ae. albopictus* (ยุงลายสวน) ยุงลาย *Ae. aegypti* เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเด็งกีและชิคุนกุนย่าในประเทศไทยยุงลายมีการเจริญเติบโต และเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบ complete metamorphosis คือ 4 ระยะ ได้แก่ ไข่ (egg), ลูกน้ำ (larva), ตัวโม่ง (pupa) และตัวเต็มวัย (adult) ไข่ยุงลายเพศเมียเมื่อผสมพันธ์กับตัวผู้และดูดเลือดจากสิ่งมีชีวิตจะสามารถวางไข่ โดยจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ เหนือระดับน้ำนิ่งสะอาด ที่อุณหภูมิประมาณ 28- 30 ºC และมีความชื้นสูง เมื่อไข่สัมผัสน้ำจะมีการฟักตัวเป็นลูกน้ำ ซึ่งเป็นระยะที่กินอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและลอกคราบ (instar) ทั้งหมด 4 ครั้ง ครั้งแรกเป็นการลอกคราบออกจากไข่ (first instar) มีระยะเวลาเป็นตัวอ่อนหรือลูกน้ำ (larva) ประมาณ 7- 10 วัน ลอกคราบครั้งสุดท้ายจะเปลี่ยนรูปร่างไปเป็นดักแด้หรือตัวโม่ง (pupa) ซึ่งเป็นระยะที่อยู่นิ่งๆ ไม่กินอาหาร ลำตัวโค้งงอ สีดำคล้ำลอยติดผิวน้ำ ใช้เวลา 1-2 วันเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นตัวเต็มวัย เมื่อตัวเต็มวัย (adult) อายุ 24 ชม.ตัวเมียจะดูดเลือดเป็นอาหารเพื่อวางไข่หลังจากผสมพันธุ์กับตัวผู้และสามารถวางไข่ได้หลายครั้ง ส่วนตัวผู้จะกินน้ำหวานเพื่อดำรงชีวิตอยู่โดยไม่ต้องกินเลือดคน แต่สามารถผสมพันธุ์กับตัวเมียได้หลายสิบครั้งต่อ 1 ชม. และมีอายุไขสั้นกว่าตัวเมีย ลักษณะที่สำคัญของยุงลาย คือ ด้านหลังของอก (scutum) เป็นรูปเคียวสีขาวคู่กัน 2 อัน ส่วนการเลือกเพศของยุงลายเพื่อใช้ในการทดลอง ผู้วิจัยเลือกใช้ยุงลายเพศเมีย เนื่องจากมีอายุไขยาวนานกว่าเพศผู้สามารถดูดกินน้ำหวานเพื่อการเจริญเติบโตได้ การแยกเพศของยุงสามารถสังเกตได้จากลักษณะภายนอก คือ ขนาดตัว และลักษณะหนวด หนวดของยุงลายตัวผู้จะมีลักษณะเป็นพู่ และขนาดตัวเล็กกว่าเพศเมีย

ภาพที่ 7 แสดงการแยกเพศของยุงลาย (*Ae. aegypti*)

Source : E. A. Goeldi (1905) Os Mosquitos no Pará. Memorias do Museu Goeldi. Pará, Brazil.

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผู้วิจัยได้ค้นคว้าพร้อมนำเสนองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้ การแยกเชื้อไวรัสเด็งกี (Isolation system) เป็นกระบวนการนำตัวอย่างผู้ป่วย (clinical sample) มาตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี โดยตัวอย่างผู้ป่วยที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็น ซีรั่ม หรือ พลาสมา จากผู้ป่วยในระยะที่สามารถพบเชื้อในกระแสเลือด จากรายงานของ Mizuno Y. และคณะ (2007) หญิงชาวญี่ปุ่น อายุ 28 ปี ที่ติดเชื้อไข้เลือดออกมาจากประเทศเวียดนาม วินิจฉัยโรคโดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะและน้ำลายหาจีโนมของไวรัสเด็งกีด้วยวิธี Real Time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) ในวันที่ 7 และ 14 พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสเด็งกี (DENV-1) ในปัสสาวะและเมื่อนำปัสสาวะที่เก็บได้ในวันที่ 7 มาทำการแยกเชื้อในเซลล์ C6/36 และ Vero cell พบว่า ไม่สามารถทำการแยกเชื้อได้จากตัวอย่างปัสสาวะในเซลล์เพาะเลี้ยง ดังกล่าวจากตัวอย่างที่ผ่านการยืนยันผลบวกจากการตรวจ Real-Time ได้[47] ผลการทดลองสอดคล้องกับ Paloni TR. และคณะ (2010) โดยพบว่า น้ำลายและปัสสาวะ สามารถใช้เป็นตัวอย่างทางคลีนิกของผู้ป่วยที่เป็นทางเลือกแทนซีรั่ม วิธีการวินิจฉัยเด็งกีไวรัสในตัวอย่าง 3 ชนิดเปรียบเทียบกัน ได้แก่ ซีรั่ม น้ำลาย และปัสสาวะ โดยการทำ Real-time RT-PCR สามารถตรวจพบปริมาณไวรัสได้ 2 วันหลังมีอาการ แต่เมื่อนำมาทำการวินิจฉัยโดยการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 กลับไม่สามารถทำการแยกเชื้อได้ โดย Paloni ได้ใช้วิธีนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อมาทำการตรวจหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Real-time RT-PCR ให้ผลลบ[48] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hirayami T. และคณะ (2012) โดยคณะวิจัยนี้ได้ทำในตัวอย่างปัสสาวะจำนวนมากขึ้นคือ 36 ตัวอย่าง ด้วยวิธีเดียวกันในขั้นตอนวินิจฉัยคือใช้ Real-time RT-PCR (Taqman method) และ ELISA ให้ผลบวก แต่ต่างกันที่การแยกเชื้อ Hirayama T. เลือกใช้ Vero cell มาเป็น model สำหรับแยกเชื้อ และวิธีการตรวจหาจีโนมไวรัสของน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Real-Time RT-PCR ได้ผลลบเช่นกัน ความมีชีวิตของไวรัสเด็งกีมีความน่าสนใจอย่างมาก เมื่อนักวิจัยทั้ง 3 คณะสามารถตรวจหาไวรัสเด็งกีในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยในระยะติดเชื้อเฉียบพลันได้แต่ไม่สามารถพิสูจน์การมีชีวิตของไวรัสเด็งกีในปัสสาวะได้ เมื่อผู้วิจัยได้ทำการค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับความไวในการแยกเชื้อไวรัสเด็งกีพบว่า วิธีที่เป็นวิธีมาตรฐานการแยกเชื้อที่ยอมรับ gold standard method คือ การใช้ยุงลายเป็น model สำหรับการทดลอง Rosen L. และ Gubler D. (1974) ได้ทำการแยกเชื้อไวรัสเด็งกีในยุงลายสวน *Ae. albopictus* แต่ใช้ตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วย เปรียบเทียบกับการทำในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-MK_2 พบว่าการฉีดซีรั่มเข้าช่องอกยุงลายโดยวิธี parenteral inoculation มีความไวสูงกว่าการแยกเชื้อในเซลล์

เพาะเลี้ยง จึงสรุปได้ว่า วิธีการแยกเชื้อไวรัสไข้เลือดออกที่ดีที่สุดคือ mosquito inoculation ไม่ว่าจะเป็นยุงลายสวน หรือยุงยักษ์ (*Toxorhynchite spp.*) ที่ Fagbami A.H. และคณะ (1995) ได้ทำนำมาทำการแยกเชื้อไวรัสเด็งกีควบคู่ไปกับการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 การทดลองนี้ได้ทำช่วงที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสเด็งกีในประเทศญี่ปุ่น วิธีการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเด็งกีในหัวยุงยักษ์และเซลล์เพาะเลี้ยง หัวยุงลาย (head squash) และ C6/36 ถูกนำมาเก็บเกี่ยวมาทำการย้อมด้วยวิธีที่เป็น standard method โดยใช้ dengue monoclonal antibodies ที่ได้จาก Centers for Disease Control, Fort Collins, CO, USA ย้อมแบบ direct immunofluorescence ซึ่งเป้น conjugate ที่ติดสลากด้วย FITC [(49)] การใช้ยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* ในการแยกเชื้อไวรัสเด็งกีจึงควรนำมาใช้ในการทดลอง เนื่องจากเป็นพาหะหลัก primary vector และมีความไวสูงต่อไวรัสเด็งกี Yingsiwaphat V. และคณะ (2007) ได้ทำการตรวจหาความมีชีวิตของไวรัสเด็งกีในปัสสาวะ พบว่า พบว่า สามารถอยู่รอดและเพาะเลี้ยงได้ 100% โดยการใช้ตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยสี่ตัวอย่างที่ให้ผลบวกในยุงลาย *Ae. aegypti* ทั้ง 4 ตัวอย่าง ทั้งนี้ได้ทำการทดลองในตัวอย่างที่เป็น negative เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมด้วย และพบว่าให้ผลการทดลองเหมือนกันกับ Laosakul C. และคณะ (2009) ได้ทำการพิสูจน์ว่าไวรัสเด็งกีสามารถแยกเชื้อได้จากผู้ป่วย 2 กลุ่ม คือ ผู้ป่วยช่วงหลังจากเริ่มมีอาการไข้ early phase (0-7 วัน) และหลังจากเริ่มมีไข้ ไข้สร่าง late phase 8-46 วัน ที่ได้รับการยืนยันผลทาง serology แล้วว่าเป็นบวกโดยการแยกเชื้อ โดยวิธีฉีดเข้าส่วนอกของยุงลาย และทำการตรวจโดยวิธี nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction พบว่า clinical sample ที่เป็นเลือดตรวจพบไวรัสเด็งกีโดยการแยกเชื้อในช่วง early phase ซึ่งน่าจะเป็นช่วงที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด เมื่อเทียบกับการตรวจในปัสสาวะจะพบไวรัสเด็งกีจากการแยกเชื้อช่วง late phase คิดเป็นเปอร์เซ็นต์มากกว่า early phase โดยผู้วิจัยได้นำข้อมูลที่ทำงานวิจัยนี้ เปรียบเทียบกับการแยก West Nile ซึ่งเป็น flavivirus เหมือนกันพบว่าไวรัสเด็งกีสามารถหลั่งออกมากับปัสสาวะของผู้ป่วยตั้งแต่ early จนถึง late febrile กล่าวถึงการรอดชีวิตของเด็งกีไวรัสที่หลั่งออกมากับปัสสาวะได้ระยะเวลานานเป็นเดือนหลังมีไข้ โดยงานของผู้วิจัยมีประโยชน์อย่างมากในแง่การศึกษาด้านพยาธิสภาพ[(50)] การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะสำหรับทดลองมีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาจากการวิจัยของ Yingsiwaphat V. และคณะ (2007) ได้แยกปัสสาวะออกเป็นสองส่วนจากการปั่น คือ ตะกอนปัสสาวะ ที่ก้นหลอด (pellet) และส่วนใสด้านบน (supernatants) และหา condition ที่เหมาะของ supernatants ในการนำไปแยก

เชื้อในยุงลาย *Ae. aegypti* ทดลองทั้งการผสมกับ antibiotics และกรองผ่านกระดาษกรอง (microfilter) เส้นผ่านศก. 0.2 μm เมื่อทำการตรวจด้วย nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction โดยใช้ primer 3'Untranslated region (3'UTR) พบว่า supernatantsที่กรองผ่าน microfilter ให้ผลการทดลองดีที่สุด[51] เนื่องจากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสเฉียบพลัน (acute viral infection) จะสามารถตรวจพบไวรัสได้ในเลือด สารคัดหลั่งช่องคอ อุจจาระ น้ำเลี้ยงสมองและไขสันหลัง และพบว่าอาจจะพบไวรัสได้ในปัสสาวะ แต่คุณสมบัติ sterile จากเชื้อจุลชีพที่มีขนาดใหญ่กว่าไวรัสเช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และอื่นๆ ในปัสสาวะสามารถทำให้เกิด toxic หรือ contamination ได้ เมื่อนำมาทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือ สัตว์ทดลอง ในปัสสาวะที่นำมาทดลองมีองค์ประกอบใดบ้าง จากบทความเรื่อง virus in urine ของ British Medical Journal ค.ศ. 1967 กล่าวว่า ไวรัสที่สามารถตรวจพบได้ในปัสสาวะ โดยส่องดู inclusion bodies ของเซลล์ที่ได้จากปัสสาวะจากการติดเชื้อ ได้แก่ Cytomegalovirus, Varicella-Zoster, Rubella, Measles, mumps และ herpagina และสามารถพบได้ในเด็กที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย live polio virus vaccine แต่ยังคงไม่สามารถตรวจหาแอนติเจนของไวรัสใน inclusion bodies ได้ จากการทดสอบปัสสาวะด้วยกล้อง microscope มักใช้ตะกอนปัสสาวะ (urinary sediment) ตะกอนปัสสาวะ คือ องค์ประกอบในปัสสาวะที่ถูกนำมาปั่นด้วยความแรง 1,500-1,800 rpm นาน 5 นาที ที่ 4 °C แล้วถูก concentrated ลงไปอยู่ที่ก้นหลอด เมื่อเทสารละลายด้านบน (supernatant) ออกไป ยังคงเหลือส่วนเล็กน้อยของ fluid สามารถนำมาส่องดูด้วย microscope โดยสามารถเห็น เซลล์ผลึก และ substance อื่นๆ เซลล์ที่พบได้ในตะกอนปัสสาวะของคนที่มีสุขภาพดี ได้แก่ Red blood cell, White blood cell, Epithelial cell, จุลชีพ เช่น bacteria trichomonas และ yeast , สารผิดปกติต่างๆ เป็นทรงกระบอกผลิตจากไต (Casts), และผลึกต่าง (Crystals) พบได้ในปริมาณเล็กน้อยในคนปกติ[52] ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเตรียมปัสสาวะก่อนนำมาแยกเชื้อไวรัสเด็งกีที่มีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นในยุงลาย หรือเซลล์เพาะเลี้ยงจึงควรทำการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีศูนย์กลางระดับไมโครเมตร เพื่อเป็นการคัดกรองให้ไวรัสเท่านั้นที่สามารถผ่านมากับปัสสาวะ และนำไปใช้แยกเชื้อในmodel ที่เตรียมไว้ได้ โดยไม่เกิดการปนเปื้อนและภาวะที่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง จากงานวิจัยของ Pongsuchart P. และคณะ (2009) ได้ทำการตรวจหาไวรัสเด็งกีในตะกอนปัสสาวะโดยเปรียบเทียบวิธีการย้อมด้วย immunohistochemistry (IHC) และ In situ hybridization (ISH) ผลการทดลอง โดยใช้primary antibody ชนิด mouse monoclonal antibody ต่อ dengue

virus สามารถตรวจพบโปรตีนของไวรัสเด็งกี เป็นแกรนูลสีน้ำตาลในส่วนของ inclusion bodies จากตะกอนปัสสาวะของผู้ป่วยในระยะติดเชื้อเฉียบพลันที่ยืนยันโดยวิธี RT-PCR และ ELISA ได้ผลบวก แต่การทดสอบโดย ISH ไม่สามารถแปลผลได้[53] จะเห็นว่าหลังจากที่ทำการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม หรือ ในสิ่งมีชีวิตที่เป็นยุงลาย การเพิ่มจำนวนของไวรัสใน model ดังกล่าวสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการมีชีวิตของไวรัสเด็งกีในปัสสาวะได้ การเลือกวิธีการตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกีเป็นวิธีที่น่าสนใจ และมีความไวสูง ดังนั้นจึงควรมีการทดลองการตรวจหาการเพิ่มจำนวนของไวรัสเด็งกีที่จะช่วยยืนยันการมีชีวิตที่มีน้ำหนักมากขึ้น ก่อนที่จะทำการสรุปว่ายังมีไวรัสเด็งกีที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่ในปัสสาวะบ้างหรือไม่ การตรวจหาโปรตีนของไวรัสเด็งกีด้วยวิธี IHC จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจ จากการค้นคว้าข้อมูลการตรวจหาโปรตีนของไวรัสเด็งกีในเซลล์เพาะเลี้ยงและเซลล์เนื้อเยื่อหัวยุงลาย จะใช้วิธีการย้อมแบบ indirect fluorescence antibody staining (IFA) และ PCR โดยจัดเป็น gold standard method ที่ใช้ทั่วไป[54] การใช้ MAB 8705 ที่เป็น anti dengue monoclonal primary antibody มีความเหมาะสมเนื่องจากสามารถจับกับโปรตีนของไวรัสเด็งกีได้ทุกซีโรไทป์[55-57] จากการมีการเริ่มต้นใช้ตัวอย่างปัสสาวะเพื่อการวินิจฉัยไวรัสเด็งกี วัตถุประสงค์เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ง่ายจากผู้ป่วยโดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นเด็กและไม่ทำให้ผู้ป่วยได้รับความเจ็บปวดเหมือนการตรวจหาในตัวอย่างที่เป็นเลือดหรือน้ำไขสันหลัง โดยนักวิจัย Pupaibool J. และคณะ (2005) ได้ทดสอบการวินิจฉัยไวรัสเด็งกีในปัสสาวะ โดยใช้ fresh urine ของผู้ป่วยที่มีอาการ 5 วัน และ 21 วัน มาหยดลงบน filter paper ที่ 4°C เป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน หลังจากนั้นนำปัสสาวะที่กรองผ่านมายืนยันด้วยวิธี nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction และ ELISA เปรียบเทียบกัน พบว่าค่าความจำเพาะจากการตรวจค่อนข้างสูงทั้งใน nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction และ ELISA แต่ค่าความไว ในการตรวจ RT-nested-PCR ต่ำกว่า 50 % ในขณะที่ความไวในการตรวจด้วย ELISA มีค่าสูงประมาณ 80%[58] จะเห็นว่าจีโนมของไวรัสสามารถคงสภาพได้บน filter paper ได้นานมากกว่า 10 วัน ภายนอกสิ่งมีชีวิต ปัสสาวะผู้ป่วยจัดเป็น clinical samples ที่เป็น non-blood specimen ผู้ป่วยจะไม่ได้รับความเจ็บปวดเหมือน blood specimen ดังนั้น งานวิจัยของ Suwanpimolkul G. และคณะ (2008) จึงมีประโยชน์อย่างมากที่ได้ศึกษาการวินิจฉัยไวรัสเด็งกี ในตัวอย่างที่เป็น blood และ non-blood specimen โดยใช้ nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction จับคู่กับ conserve region 3'UTR Primer พบว่า จากกลุ่มตัวอย่าง

จำนวนน้อยคือ 12 ตัวอย่าง พบว่า ค่าการวินิจฉัยใน blood specimen ให้ผลดีกว่า non-blood specimen (sensitivity = 75%) ในขณะที่ blood specimen (sensitivity = 100%) แต่เมื่อเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยกลุ่ม non blood specimen พบว่า ปัสสาวะมีค่า specificity สูงกว่าน้ำลายและเยื่อบุกระพุ้งแก้ม (specificity = 100%) งานวิจัยมีคุณค่าอย่างมากโดยเฉพาะในตัวอย่างของผู้ป่วยเด็ก pediatric patients[59] ปัสสาวะของผู้ป่วยยังคงมีความน่าสนใจในแง่การเป็น alternative method มีการใช้ปัสสาวะผู้ป่วยในระยะ acute เพื่อวินิจฉัยด้วยวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว dengue non-structural protein 1 (NS1) antigen โดยใช้ strip test เปรียบเทียบการตรวจโดยวิธี ELISA ซึ่งเป็น standard method Chuansumrit A. และคณะ (2011) เป็นนักวิจัยคนแรกที่สรุปว่าสามารถตรวจหา dengue protein NS1 antigen ได้ในปัสสาวะจากที่เคยทดสอบกันมาแล้วเมื่อปีค.ศ. 2009 ในซีรั่มโดยใช้หลักการ immunochromatography test และสมควรพัฒนาวิธีการตรวจดังกล่าวเป็น ideal rapid diagnosis test[60] Ma X. และคณะ (2014) กล่าวว่าการศึกษา ไวรัสเด็งกีในปัสสาวะจากรายงานผู้ป่วยชาวจีนที่กลับจากประเทศอินเดีย สามารถลำดับ complete genome ของ DENV-2 ได้สำเร็จเป็นคนแรกว่าเป็นไวรัสเด็งกีที่มีการระบาดในประเทศอินเดียสามารถขนส่งผ่านผู้ป่วยมายังประเทศที่ไม่มีการระบาด (non-endemic area) โดยตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้จาก report case รายนี้ ที่ทำการทดสอบโดยวิธี singleplex RT-qPCR คือ ซีรั่ม วันที่ 5 ได้ผลบวก ส่วนวันที่ 8 และ 18 ได้ผลลบ เปรียบเทียบกับปัสสาวะ วันที่ 8 และ 18 ตรวจพบผลบวก Ma X. จึงสรุปว่ากรอบเวลาในการตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกีมีช่วงที่ยาวกว่าการตรวจพบในตัวอย่างเลือด วิธีการที่สามารถตรวจหาจากปัสสาวะผู้ป่วยรายนี้คือ การ concentrated urine โดยใช้ ultracentrifuge ที่มีรอบความเร็วสูง (300,800 RCF ที่ 2 ชม. 4 ºC) Medina F. และคณะ (2012) กล่าวว่า การวินิจฉัยโรคจากตัวอย่างคนไข้มีหลายวิธี แต่วิธีที่เป็น gold standard method ยังคงเป็นการทำ virus isolation เพื่อตรวจหาและแยกซีโรไทป์ของไวรัสเด็งกี โดยสามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งใน mammalian cell และ mosquito cell หรือฉีดเข้าอกยุงลายดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยเซลล์ที่นิยมนำมาใช้มากที่สุด คือ C6/36 และ Vero cell ต่อมา Phanthanawiboon S. และคณะ (2014) บรรยายว่า มีการใช้เซลล์ชนิดอื่นๆ คือ monkey kidney LLC-MK_2 cells, Baby hamster kidney (BHK-21) cells แต่ข้อจำกัดของเซลล์เหล่านี้คือไม่มีตัวรับต่อไวรัสเด็งกีคือ dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) เป็นตัวรับของเชื้อไวรัสเด็งกีที่พบในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของคนชนิด immature dendritic cells และ monocyte หรือ macrophage มี

ผลให้ประสิทธิภาพในการแยกเชื้อหรือการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ดังกล่าวลดต่ำลง โดยผู้วิจัยได้สรุปว่า C6/36 เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมมากที่สุดในการแยกเชื้อไวรัสจาก specimen ของผู้ป่วย ข้อมูลจากการแยกจาก plasma และ buffy coat ที่ได้จากผู้ป่วย acute phase โดย isolation rate ใน C6/36 สูงถึง 84.6% (plasma) และ 92.3% (buffy coat) ในขณะที่ Vero cell และ BHK-21 ได้เพียง 23% - 31% เท่านั้น จาก ผู้ป่วย 13 คน เนื่องจากอาจไปขัดขวางการเจริญเติบโตใน mammalian cells[61] จากพฤติกรรมของยุงลายในการกินอาหารเนื่องจากยุงลายต้องการโปรตีนบางอย่างในเลือดเพื่อช่วยในการวางไข่ พฤติกรรมดังกล่าวเป็นหนึ่งในวงจรของการแพร่เชื้อไวรัสเด็งกีจากพาหะไปสู่คน เห็นว่าการศึกษาการมีชีวิตของไวรัสเด็งกีในปัสสาวะผู้ป่วยจำเป็นต้องมีการพิสูจน์เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาระมัดระวังการกระจายและแพร่ระบาดของเชื้อที่มีกับปัสสาวะและอาจส่งผ่านไปยังคนโดยมียุงลายเป็นพาหะต่อไป [62] จากการทบทวนวรรณกรรม ผู้วิจัยจึงได้ใช้วิธีการฉีดปัสสาวะเข้าสู่ยุงลายเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบกับการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 แต่ได้ใช้วิธีการตรวจหาโปรตีนของไวรัสเด็งกีในหัวยุงลายและเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี IHC ควบคู่ไปกับการหาจีโนมของไวรัสเด็งกีในเนื้อเยื่อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

งานวิจัยชิ้นนี้ใช้สิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะจากผู้ป่วยไข้เลือดออกในระยะติดเชื้อเฉียบพลัน (acute infection) ที่เหลือจากงานวิจัยภายใต้โครงการของ นพ. วันล่า กุลวิชิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับการอนุมัติจริยธรรมหมายเลขทะเบียนโครงการวิจัยเลขที่ คสท.9/2557

1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)

ผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันว่ามีการติดเชื้อไข้เลือดออกในระยะติดเชื้อเฉียบพลัน ภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

2. ประชากรตัวอย่าง

กลุ่มศึกษา คือ ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคไข้เลือดออกในระยะเฉียบพลัน จากผลการตรวจวินิจฉัยห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทาง serology เพื่อหาระดับแอนติบอดี โดยวิธี IgM/IgG ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) และ การตรวจทางโมเลกุล RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) ซึ่งให้ผลบวกทั้ง 2 การทดสอบ จำนวน 15 ราย สำหรับการทดลองในยุงลาย และ 40 ตัวอย่าง สำหรับการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง

3. กลุ่มควบคุม คือ ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีไข้สูง และวินิจฉัยว่าไม่ได้เป็นโรคไข้เลือดออกโดยผ่านการตรวจจากห้องปฏิบัติการด้วยวิธี ELISA และ RT-PCR ได้ผลลบจำนวน 1 ราย

การเลี้ยงยุง (*Mosquito rearing*) (ที่มา: ชีววิทยานิเวศวิทยาและการควบคุมยุงในประเทศไทย) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) เลี้ยงยุงลายบ้านโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 28±1^{0}C ความชื้นสัมพัทธ์ 80 ± 5% แสงสว่าง 12 : 12 (สว่าง : มืด) ชั่วโมง

วิธีการเพาะเลี้ยงยุงลาย

1) นำไข่ยุงลาย (*Ae. aegypti*) ที่เก็บไว้บนกระดาษกรอง (ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) แช่ในถาดพลาสติก ที่มีน้ำสะอาดประมาณครึ่งถาด (น้ำกลั่นที่สะอาดอุณหภูมิอุ่นเล็กน้อย) โดยกดให้ไข่จมลงไปที่ก้นภาชนะหรือท่วมไข่ยุงลาย ประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง หรืออาจแช่ค้างคืน เมื่อครบ 2 วันให้นำกระดาษกรองออกมาทิ้ง เพราะอาจทำให้น้ำเน่าเสียได้ เมื่อตัวอ่อนหรือลูกน้ำ (larva) ฟักออกจากไข่ (hatching) จนหมด ระยะเวลาขึ้นอยู่กับความใหม่ของไข่ ถ้าเป็นไข่ที่เก็บไว้นานอาจฟักออกมาได้ในปริมาณน้อย นำอาหารชนิดอัด*เม็ดสำเร็จรูป สำหรับสัตว์ทดลอง* มาบดเป็นผงและโรยลงในภาชนะเพื่อให้อาหารแก่ลูกน้ำ โดยช่วงนี้จะเป็นช่วงที่กินอาหารมากที่สุด ถ้ามีปริมาณลูกน้ำมากเกินไปให้แบ่งใส่ถาดใหม่ เนื่องจากหากมีลูกน้ำในถาดหนาแน่นมากเกินไปจะทำให้ลูกน้ำมีขนาดไม่สม่ำเสมอกัน
2) ช่วงที่เป็นลูกน้ำควรเปลี่ยนน้ำทุกวัน โดยใช้ตะแกรงกรองลูกน้ำออกมาแล้วใส่น้ำกลั่นที่สะอาดลงไปใหม่
3) เมื่อลูกน้ำมีขนาดใหญ่ขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากระยะ larva ไปเป็นตัวโม่ง (pupa) โดยช่วงการเจริญนี้จะไม่มีการกินอาหารแต่ต้องทำการแยกตัวโม่งออกจากถาดที่มี larva ไปไว้ในอีกภาชนะที่มีน้ำสะอาดเช่นกัน ยุงลายจะมีวงจรชีวิตแบบ complete metamorphosis ทั้งนี้ต้องนำตัวโม่งไปไว้ในกรงเพื่อรอให้เจริญเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลาอีก 1-2 วันจะเจริญเป็นตัวเต็มวัย
4) ช่วงที่เป็นตัวเต็มวัย (adult) สามารถแยกเพศผู้และเพศเมียได้ เช่นขนาดตัว ยุงเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ และสามารถสังเกตตรงส่วนที่เป็นจะงอยปากของยุงที่ยื่นยาวออกมาจะเรียกว่า proboscis และหนวดจะมีลักษณะแหลม เรียกว่า antenna ซึ่งเป็นส่วนที่ยื่นออกมาจากปากของยุง พบว่าของเพศเมียจะสั้นกว่าเพศผู้ และเพศผู้ตรงส่วนที่เป็นจะงอยจะมีลักษณะเป็นพู่คล้ายขนนก ในขณะที่จะงอยของยุงเพศเมียจะเรียบไม่เป็นพุ่ม
5) อาหารสำหรับตัวเต็มวัย คือ 10% ซูโครส และ 2% วิตามินซี ซึ่งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต โดยจะชุบ 10% ซูโครสด้วยก้อนสำลีที่เตรียมไว้พอประมาณ ใส่ไว้ในกรง เพื่อให้ยุงดื่มน้ำตาลได้

การฉีดยุง (Mosquito inoculation technique in *Ae. aegypti* mosquitoes)

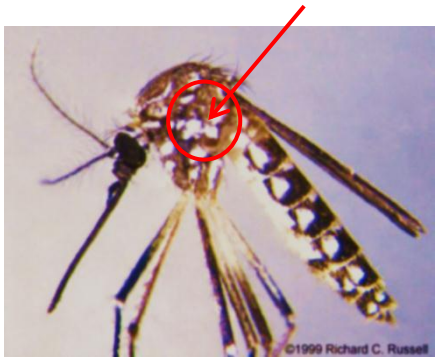
เมื่อยุงฟักเป็นตัวเต็มวัยได้อายุประมาณ 1-3 วัน สามารถดูดยุงผ่านสายยางให้มาติดที่ส่วนกรองตรงปากดูด แล้วผ่อนลมออกเพื่อปล่อยยุงเข้าสู่ภาชนะที่ใช้กักยุงก่อนทำการทดลอง

1) ก่อนฉีดยุงควรเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ โดยเตรียมสารละลาย PBS pH 7.4 ที่มี Fetal Bovine Serum 5% และ gelatin 0.5% ใช้สารละลายดังกล่าว 150 µl ผสมกับตัวอย่างปัสสาวะ 50 µl อัตราส่วน 1:4 แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองขนาดรูระดับไมโครเมตร จากนั้นทำการสลบยุง โดยวางกล่องที่ขังยุงไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10-15 นาที
2) การฉีดเชื้อเข้าสู่ตัวยุง ทำได้โดยใช้อุปกรณ์สำหรับการทำ parenteral injection ในยุงลาย (ภาพที่ 5) โดยต้องมีการปรับระดับน้ำมันในตัวเครื่อง ทำการฉีดเข้าส่วนอกของยุงลาย (intrathoracic injection) สังเกตจากสเกลเข็มระยะประมาณ 1 มิลลิเมตร ปริมาตรคำนวณได้ประมาณ 0.17µl – 0.20 µl โดยทำการฉีดภายใต้กล้อง stereoscopic microscope
3) การส่องเพื่อหาตำแหน่งภายใต้กล้องต้องปรับโฟกัสให้เห็นชัดเจน โดยกะระยะให้เข็มอยู่ ใกล้ตัวยุง แล้วใช้เข็มทิ่ม โดยไม่ให้ลึกมากไปที่หน้าอกยุงดังภาพที่ 9

ภาพที่ 8 แสดง อุปกรณ์สำหรับการทำ parenteral injection
Source : Website_ http://www.mtg-de.com/

(A) แสดง เข็ม ที่ทำจาก borosilicate ขนาดเส้นผ่านศก.ภายนอก 0.7-1.0 mm หนา 0.2 mm เส้นผ่านศก. ภายในเฉลี่ย 0.469 mm ± 0.002 mm. วัดสเกลด้วยไม้บรรทัดห่างกัน 1.0 mm ทำให้ได้ปริมาตรประมาณ 0.17 µl -0.20 µl

(B) แสดงเครื่อง microinjection ที่อาศัยแรงดันของน้ำมันในตัวเครื่อง (halocarbon oil series HC-700) เพื่อดันสารละลายที่จะฉีดเข้าสู่ยุงลาย ทำภายใต้กล้อง stereo microscope



ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งการฉีด (intrathoracic) บริเวณช่องอกของยุงลาย

Source : Richard C Russell, Domenico Otranto, Richard L Wall. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI; 2013

ค่อยๆปล่อยสารเข้าสู่ตัวยุงตามสเกลที่ทำไว้ประมาณ 0.17 µl จากนั้นปล่อยยุงในภาชนะที่เตรียมไว้

1) ยุงที่ฉีดแล้วปล่อยให้ฟื้นจากการสลบในกรงขนาด 9×9×9 นิ้ว ภายใต้เงื่อนไขการควบคุมของห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 28 ºC และค่าความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 70-80%
2) เลี้ยงยุงลายไว้ 14 วัน โดยดูแลและให้อาหารยุงโดยอาศัยหลักการ rearing *Ae. aegypti* โดย Foggi T. และ Achee N. (2009)[63] เมื่อพบว่ามียุงตายเกิดขึ้นภายหลังจากทำการฉีดช่วง 10-14 วัน เก็บซากมาทดสอบด้วย immunohistochemical technique
3) หลังจากฉีดยุงแล้วนำไปบ่มที่ 28 ºC นำยุงที่ฉีดแล้ววันที่ 10-14 หลังการฉีด เลือกเฉพาะยุงตัวที่ยังมีชีวิตอยู่มา sacrifice โดยนำไปแช่ที่ -20 ºC นาน 5 นาที ถ้ายังยังไม่ทำการย้อมสามารถเก็บแช่ -70 ºC จนกว่าจะทำการย้อมด้วย immunohistochemical technique
4) การผ่าตัดเพื่อเตรียมหัวยุงสำหรับย้อม immunohistochemical technique ทำได้โดย
    I. วางยุงลายบนสไลด์ ใช้ใบมีดผ่าตัด แยกส่วนหัวออกจากตัวก่อน ส่วนที่เป็นตัวแยกเก็บใส่ appendorf สำหรับทดสอบทางโมเลกุลโดยวิธี RT-PCR ต่อไป
    II. ส่วนหัวเที่อแยกได้ นำมาวางบนสไลด์ที่มีประจุ (plus) ตัดส่วนที่เป็นปากและหนวดออก
    III. ใช้ที่ปิดสไลด์ค่อยๆวางลงบนหัวยุงลาย
    IV. กดหัวยุงโดยใช้ปลายยางลบของดินสอ ให้เนื้อเยื่อสมองของยุงลายติดกับสไลด์
    V. ค่อยเอาที่ปิดสไลด์ออก รอจนเนื้อเยื่อแห้งประมาณ 20 นาที
    VI. นำสไลด์ของเนื้อเยื่อหัวยุงลาย ไปแช่ในอะซิโตน (cool acetone) 10 นาที
    VII. นำสไลด์มาวางที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อบนสไลด์แห้ง
    VIII. เข้าสู่กระบวนการย้อมต่อไป

การเตรียมยุงลายบ้านสำหรับติดเชื้อ dengue virus (natural feeding)

การเลือกยุงเพศเมียอายุ 2 – 3 วัน แยกใส่กรงไว้ 20 ตัว ต่อ 1 ตัวอย่างปัสสาวะ ปล่อยให้อดอาหาร 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างปัสสาวะ มาชุบสำลีให้ยุงกินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้กินน้ำหวานตามปกติ เลี้ยงต่ออีก 14 วันหลังติดเชื้อด้วยวิธีดังกล่าว นำยุงมาตัดหัวและตรวจหา ไวรัสไข้เลือดออกที่มีชีวิตในยุงโดย immunohistochemical technique ตามภาพที่ 7 และเนื่องจากการเลี้ยงเชื้อไวรัสไข้เลือดออกในยุงลายเพศเมียและอาจก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อจากยุงเข้าสู่คนได้ จึงต้องปฏิบัติงานในห้องที่มีมาตรฐานความปลอดภัยสำหรับห้องปฏิบัติการประเภท Biosafety level 2 (BSL2) ที่ตึกสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 10 แสดงการทดลองให้ยุงดื่มปัสสาวะผู้ป่วยภายในกรง เพื่อสังเกตการณ์ว่ายุงมีพฤติกรรมการดูด (Urine sucking) ปัสสาวะหรือไม่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเตรียมเซลล์สำหรับติดเชื้อ (Cell culture isolation technique in cell lines)

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองมี 2 ชนิด คือ C6/36 เป็นเซลล์ที่ได้จาก *A. albopictus* และ LLC-MK_2 (*Macaca mulatta* monkey rhesus) รูปร่างเป็น epithelial โดยมีวิธีการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันคือ LLC-MK_2 เลี้ยง 5% CO_2 incubator อุณหภูมิ 37ºC ส่วน C6/36 เลี้ยงที่ 28ºC ภายหลังการติดเชื้อโดย LLC-MK_2 ใช้ Complete Growth Medium คือ Medium 199 (ที่มี1.68g/L), 10% fetal bovine serum, ส่วน C6/36 ใช้ Complete Growth Medium คือ ATCC - formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003 ที่มี fetal bovine serum 10% สำหรับการเจริญเติบโต

การเตรียมเชื้อไวรัสเด็งกี, seed virus ; DENV-2 (16681) เพื่อนำไปทำการทดลอง สำหรับเป็น positive control [64]

1) การหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม พบว่า

- เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยุง (C6/36) ในจานเพาะเลี้ยง 12 หลุม ซึ่งมีพื้นที่ผิวเท่ากับ 4 ตารางเซนติเมตร ต้องทำการคำนวณเซลล์เริ่มต้น (ความหนาแน่นเซลล์ = 0.1×10^6 เซลล์) เพื่อให้ได้ 80-90% (ประมาณ 0.32×10^6 เซลล์) ที่มีอายุ 1 วัน ซึ่งเป็นเงื่อนไขที่เหมาะสมในการทำ DENV-2 inoculation (16681) สภาพเซลล์สมบูรณ์
- สำหรับเซลล์ไตลิง (LLC-MK_2) ในจานเพาะเลี้ยง 12 หลุม ซึ่งมีพื้นที่ผิวเท่ากับเท่ากับ 4 ตารางเซนติเมตร ต้องทำการคำนวณเซลล์เริ่มต้น (ความหนาแน่นเซลล์ = 0.15×10^6 cells) เพื่อให้ได้ 80-90%

2) หาปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง DV-2 strain 16681; Centers for disease control and prevention, Fort Collins, Colo) เป็น DHF strain ที่ได้จากประเทศไทย มีความแรง 3.5×10^6 PFU/ml โดยต้องทำการคำนวณค่า MOI (Multiplicity Of Infection) กำหนด ค่าเท่ากับ 1.0

ปริมาตรของไวรัสที่ต้องใช้ (ml) = ค่า MOI × Total cell) / (ปริมาณไวรัส $TCID_{50}$/ml)

แทนค่าดังนี้

$1 \times (0.32\times10^6 \text{ cell}) / \{(3.5\times10^6 \text{ PFU/ml})/0.5\} = 46$ µl

3) เจือจางไวรัส 46 µl ดังกล่าว ด้วย 2% MEM 954 µl ผสมให้เข้ากัน หลังจากล้างเซลล์ monolayer ด้วย PBS แล้ว inoculate ไวรัสลงไป บ่มตาม condition ที่กำหนด 2 ชม.
4) ครบกำหนด ดูดไวรัสทิ้ง ล้างด้วย PBS 2 รอบ และเติม 2% MEM ลงไปเพื่อคงสภาวะของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

การติดเชื้อเซลล์ในเซลล์ C6/36

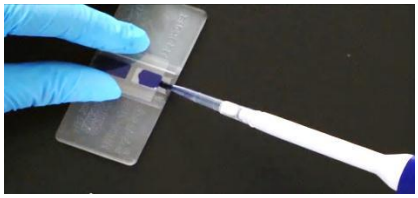
1) นำตัวอย่างปัสสาวะมาติดเชื้อเข้าสู่เซลล์โดยใช้วิธี virus inoculation ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง 12 หลุม เมื่อเซลล์เจริญเติบโตประมาณ 80-90% ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ออก
2) เริ่มล้างเซลล์ด้วย PBS pH 7.4 นำตัวอย่างปัสสาวะ 100 µl เจือจางด้วย 2% MEM 900µl เพื่อป้องกันผิวเซลล์ monolayer แห้ง ติดเชื้อลงไปในเซลล์ กลิ้งให้สารละลายสัมผัสทุกพื้นที่ภายใน

3) ปล่อยให้ไวรัสติดเชื้อเข้าสู่เซลล์โดยใช้เวลา 2 ชั่วโมง บ่มตามเงื่อนไขที่กำหนด ทำการกลิ้งทุกๆ 15 นาที ระหว่างที่ทำการติดเชื้อเมื่อครบเวลาดูด suspension ทิ้งไป
4) ล้างด้วย serum-free MEM 2 ครั้ง และใส่ maintenance media MEM ที่มี FBS 2%
5) บ่มต่อ T=37 ºC ใน CO_2 incubator สำหรับ LLC-MK_2 , C6/36 T=28ºC 7 วัน
6) เมื่อครบกำหนด ย่อยเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว ทำการตรึงเซลล์ โดยวิธี smear บนสไลด์ จากนั้นทำการตรึงด้วยอะซิโตนและย้อมต่อไป

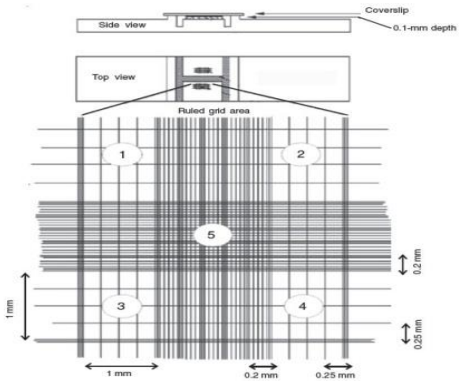
การตรึงเซลล์บนสไลด์โดยวิธีเสมียร์ (smear)

1) ล้างเซลล์ด้วย PBS 7.2 ดูดสารละลายทิ้ง ย่อยเซลล์ที่ติดเชื้อและทำให้เป็นเซลล์เดี่ยว โดยใช้ 2% MEM 1ml /well
2) ดูดใส่ eppendorf tube เพื่อนำไปปั่นที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4ºC เพื่อให้เซลล์ตกลงมา
3) ดูดสารละลายด้านบน (supernatants) ทิ้งไป จากนั้น ใช้น้ำกลั่น 0.1 ml ละลายตะกอนเซลล์ (pellet) เพื่อแขวนลอยเซลล์ (resuspened)
4) ดูดเซลล์มา 0.01 ml ลงในช่องใส่เครื่องนับเซลล์ (hematocytometer) ตามภาพที่ 8 นำไปส่องดูเพื่อนับจำนวนเซลล์ และนำไปคำนวณปริมาณเซลล์ที่มีใน 1ml ดังภาพที่ 9
5) เมื่อทราบจำนวนเซลล์ที่มี ให้เจือจางเซลล์ให้ได้ประมาณ 400,000 cell/ml
6) ดูดมาเพื่อทำการเสมียร์บน slide plus ใช้ปริมาตร 0.01 ml 3 จุดบนสไลด์ แล้วเกลี่ยเซลล์บนสไลด์ตามภาพที่ 10
7) รอให้ slide แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ (RT) 10 นาที จากนั้นนำไปตรึงเซลล์ใน โถแช่อะซิโตน (อะซิโตนแช่ที่ -20ºC) เป็นเวลา 10 นาที
8) เมื่อครบเวลา รีบนำสไลด์มาผึ่งให้แห้งที่ RT ประมาณ 20 นาทีขึ้นไปและนำไปสู่ขั้นตอนย้อมต่อไป

ควรระมัดระวังการตรึงเซลล์ที่เป็นงานด้าน immunohistochemistry สำหรับตรวจหาโปรตีนของไวรัส ควรเลือกวิธีที่ใช้อะซิโตน (เหมาะสมที่สุด) เนื่องจาก สารเคมีดังกล่าวสามารถทำให้เซลล์เกิดรูและแอนติบอดีสามารถแทรกเข้าไปจับกับโปรตีนดังกล่าวได้ดี



ภาพที่ 11 แสดงการใช้ hematocytometer



ภาพที่ 12 แสดงการนับเซลล์จากตารางcounting chamber บน slide ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ microscope

Source : จาก website http://www.biocyclopedia.com/

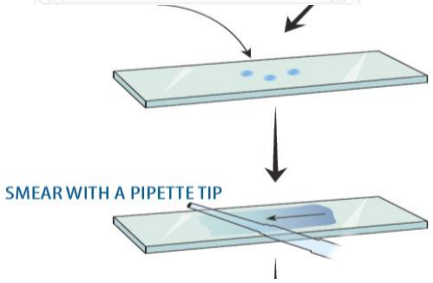
คำนวณเซลล์ จากการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 5 ช่องดังภาพที่ 9 นำมาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณตามสูตรดังนี้

ปริมาตรของช่องที่ใส่เซลล์ (volume of each square)= 1.0 mm. ×1.0 mm. × 0.1 mm

จำนวนเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ = (N÷5) mm^3

ดังนั้นจำนวนเซลล์ ต่อ cm3 คือ (N÷5)×1000 ; cm^3 = ml

ดังนั้น ปริมาณเซลล์ที่นับได้ คือ (N÷5) × 1000 × dilution factor



ภาพที่ 13 แสดงการ smear cells โดยใช้ปลายทิปบน plus slide

Source : IHC product and protocol guide, R&D System Tools for Cell Biology Research.

การย้อมเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการติดเชื้อด้วยไวรัสเด็งกี Immunohistochemistry

Head squash และ cell culture slides ถูกตรวจ viral dengue antigen ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่ผลิตโดยไวรัส ในที่นี้ใช้ Mouse monoclonal anti-dengue primary antibody (MAB8705) การย้อม cell culture slide สามารถย้อมโดยไม่ต้องมีการใช้ตัวขัดขวางที่เป็น antigen

retrieval และ endogenous peroxidase แต่ในขั้นตอนการย้อม head squash ต้องเพิ่มขั้นตอนการทำ endogenous quenching

1. ตัวอย่างที่ผ่านการตรึงเซลล์ แล้วมาล้างด้วย TBST 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
2. เมื่อครบกำหนดบ่มด้วย peroxidase blocking solution ที่เป็น 3% H_2O_2 เจือจางด้วย Distilled Water เพื่อยับยั้งการจับแบบไม่จำเพาะของ endogenous peroxidase ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อยุงลาย (30% H_2O_2 ควรเก็บไว้ที่ 4ºC เพื่อคงประสิทธิภาพสารเคมี และ ควรเตรียมให้เป็น 3%H_2O_2 ใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง)
3. หยด 3%H_2O_2 และบ่มที่ RT ใน moist chamber นาน 10 นาที แล้วรินทิ้ง ล้าง section ใน TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
4. หยด Normal Goat Serum Catalog no. S26 (100ml) โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 10%(v/v) ใน PBS 7.2 (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง) โดย Normal Serum จะใช้ serum ที่ผลิตจากสัตว์ species เดียวกันกับ secondary antibody เท่านั้น เพื่อป้องกันการเกิด non-specific reaction binding) บ่มที่ RT นาน 1.5 ชม.
5. เมื่อครบกำหนด รินทิ้ง ล้าง section slide ด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
6. หยด primary antibody ที่เป็น Anti-dengue Virus Complex IgG_2a ; Mouse monoclonal antibody: MAB 8705) ที่เตรียมตามความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 1:100 โดยหยดให้ท่วมบริเวณที่มีเซลล์หรือเนื้อเยื่อ บ่มไว้ 60 นาที ที่ RT (Optional: 1:200 ที่ 4ºC Overnight, 18 ชม.) เมื่อครบกำหนดริน primary antibody ทิ้ง ล้าง section slide ด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
7. จากนั้นหยด secondary antibody ที่เป็น Goat Anti-Mouse IgG2a(Y2a), Horseradish peroxidase conjugate ที่เตรียมตามความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 1:300 บ่มที่ RT นาน 2 ชม.
8. เมื่อครบกำหนด รินทิ้ง และล้าง slide ด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
9. เติม 3,3'-diaminobenzidine, DAB Peroxidase Substrate Cat. No. SK-4100 ลงไป (การเตรียมดูจากภาคผนวก) บ่มที่ RT นาน 5-10 นาทีโดยสังเกตการณ์จับกันของสีกับเนื้อเยื่อจากการส่องดูใต้กล้อง เป็นตะกอนสีน้ำตาล (ขั้นตอนนี้ควรระมัดระวังการสัมผัสกับสารเนื่องจาก DAB เป็น carcinogen)
10. เทสารทิ้งอย่างระมัดระวัง และล้าง section slide ด้วย running tap water 15 นาที

11. สะบัดน้ำที่ค้างอยู่ที่ section slide ออกให้หมด ทำการย้อมพื้น (counter staining) โดยใช้ hematoxylin จาก Fast H&E kit. Catalog no. W01030799 บ่มที่ RT 1 นาที รินทิ้งและล้าง section slide ด้วยน้ำประปา
12. สะบัดน้ำที่ค้างออก พึ่งให้แห้ง จากนั้นทำการ dehydrate โดยจุ่ม (dip) section slide ในสารละลาย ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1แสดงสารละลายที่ใช้ในการ dehydrate เนื้อเยื่อจากการทำ IHC

Solution	Times
95% alcohol	10 dips
95% alcohol	10 dips
absolute alcohol	10 dips
absolute alcohol	10 dips
xylene	20 dips
xylene	20 dips

ผึ่ง section slide ให้แห้ง (สารเคมีสำหรับ dehydrate ควรเปลี่ยนทุก 1 อาทิตย์ หากใช้ครั้งละหลาย section ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง)

13. Mounting slide ด้วย mounting medium (Catalog no. SP15-500) ส่องดูด้วย bright field light microscope (ควรใช้กำลังขยาย objective lens 40X)

Criteria

การกำหนดการแปลผล Positive ในตัวอย่างเนื้อเยื่อสมองของยุงลาย เมื่อส่องดูเซลล์ด้วยสไลด์ด้วย bright field light microscope เห็นเป็นสีน้ำตาลปี้น ๆ บริเวณ cytoplasm ของเซลล์เกิดรอบๆ nucleus อย่างน้อย 1 field ต่อ 1 section โดยต้องอ่านเปรียบเทียบกับ Positive control (head squash ที่ฉีดด้วย DENV-2 ที่ย้อมโดยใช้เงื่อนไขเดียวกันกับ sample section) negative control ที่ใช้ (1.head squash ที่ฉีดด้วย negative urine ของผู้ป่วย (ปัสสาวะผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มควบคุม) แต่ย้อมด้วย condition เดียวกันกับยุงลายที่ฉีดตัวอย่างผู้ป่วย ด้วยทุกครั้งที่ทำการ

ทดลอง, 2.head squash ที่ฉีดด้วย DENV-2 และใช้ primary antibody (MABC004, Mouse monoclonal IgG_2a Negative Control)

ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการทำ Immunohistochemical staining

1. ต้องมี primary antibody ที่เป็น negative control (ความเข้มข้นของ antibody ต้องเท่ากัน) และ PBS negative control ทุกครั้งที่ทำการย้อม
2. การมี enzyme peroxidase เกิดขึ้นจะทำให้มองเห็นได้โดย substrate chromogen solution โดย peroxidase จะไปย่อย substrate และ diaminobenzidin tetrachloride (DAB ไปเป็นสารตะกอนที่มีสีน้ำตาลจะเป็นบริเวณที่มี antigen sites)
3. ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ผลบวกสำหรับ head squash ดูการเกิดกลุ่มก้อนที่เป็นปื้นสีน้ำตาลบริเวณ cytoplasm ที่อยู่รอบๆ โดย nucleus จะเห็นเป็นเซลล์กลม ๆสีฟ้า และเป็นแกรนูลสีน้ำตาลบริเวณ cytoplasm ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็น single cell บน slide
4. สำหรับการปฏิบัติงานเพื่อทำการวิจัยในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสไข้เลือดออกในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อแยกเชื้อและพิสูจน์ไวรัสไข้เลือดออก การผ่านไวรัสลงสู่เซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส จึงต้องทำในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 (biosafety level 2 ; BSL-2)

การสกัด RNA ของเด็งกีไวรัสจากเนื้อเยื่อยุงลาย (Total RNA extraction from adult mosquitoes)

Reference : Imperial college London Lab of Immunogenomic

1. เนื้อเยื่อยุงลายส่วนที่เป็นตัว (ตัดหัวออกเพื่อย้อม dissection) จำนวน 1 ตัว ใส่ Trizol ปริมาตร 400 µl คิดเป็นสัดส่วน 9 volume Trizol ต่อ 1 volume ของเนื้อเยื่อยุง ซึ่งใช้ได้ตั้งแต่ 1-20 ตัว
2. ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) โดยการบดด้วย grinder ที่ sterile (* ตามprotocol การเตรียมอุปกรณ์ปราศจากเชื้อเพื่อไม่ให้ปนเปื้อนเอนไซม์ (RNase free) บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. Spin 10 นาที ที่ 12,000 rpm 4°C แล้วดูดส่วนใสมายังหลอดใหม่ (clear supernatants)
4. บ่มที่ RT 5 °C

5. เติม chloroform [$CHCl_3$] 0.2 ml ต่อ Trizol 1 ml เติม chloroform 80 µl : 400 µl trizol vortex ด้วยความแรงสูง (vigorously) แล้วบ่มที่ RT 5 นาที
6. Spin 15 นาที ที่ 4 °C 12,000 rpm แล้วดูดสารไปยังหลอดใหม่ โดยดูดเฉพาะส่วน aqueous ส่วน upper phaseการเพิ่ม final yield ทำได้โดย .... ข้อ 7
7. เติม Isopropanol สัดส่วนปริมาตร 0.8 ต่อ 1 volume ของ Trizol (Isopropanol ; C3H8O ปริมาตร 320 µl : 400 µl trizol) ผสมให้เข้ากันและทำให้เตกตะกอน โดย วางไว้ที่ FREEZER -80 °C 30 นาทีSpin 10 นาที 4 °C rpm (12,000 rpm)
   ใช้ขั้นตอนนี้ทำความสะอาดตัวอย่าง เพื่อให้เกิด ปฏิกิริยาที่ sensitive มากขึ้น :

   a. ดูด supernatant ทิ้ง แล้วละลายตะกอนด้วย ultrapure water 300 µl

   b. เติม 300 µl 3M NaOAc pH 3 (sterile)

   c. ตกตะกอนด้วย 600 µl Absolute EtOH 15 นาที ที่ -80°C

8. Spin 10 นาที 4 °C Max rpm (14,000 rpm)
9. ดูด supernatant ออก แล้วล้างตะกอนด้วย 75% Ethanol 1 ml : trizol 1 ml (400µl 75% Ethanol : 400µl trizol) แล้ว vortex
10. Spin 5 นาที ที่ 4 °C 8,000 rpm
11. Air / Speed-vac-dry pellet และละลาย RNA 50 µl ddH_2O แบ่ง RNA เก็บใน PCR tubeแล้วแบ่งบางส่วนไปวัด O.D.

* RNA ควรเก็บรักษาที่ -70°C เพื่อไม่ให้เกิด degradation *

การสกัด RNA ของเด็งกีไวรัสจากเนื้อเยื่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Total RNA extraction from cell culture)

Reference : Imperial college London Lab of Immunogenomic

1. ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างด้วย PBS 7.4 (sterile) 2 ครั้ง
   ทำการย่อยเซลล์โดยเติม 250 µl Trizol ดูดเป่าหลายๆครั้งด้วย pipet

2. ดูดใส่ 1.5 ml PCR tube บ่มที่ RT 10 นาที

3. เติม 50 µl CH3Cl (Chloroform) ต่อ 0.25 ml ของ Trizol แล้ว mix ให้เข้ากัน โดยใช้ pipet ประมาณ 15 วินาที
4. Centrifuge 12,000 rpm ที่ 4ºC 15 นาที
5. ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนไปยัง 1.5 ml PCR tube ใหม่ แล้วเติม Isopropanol 300µl
6. Mix สารละลายในหลอดให้เข้ากัน บ่มที่ RT เป็นเวลา 15 นาที
7. ดูดสารละลายด้านบน (supernatant) ทิ้งไป แล้วล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 1 ml
8. Mix ให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้ว centrifuge ที่ 14,000 rpm ที่ 4ºC 5 นาที
9. ค่อยๆ รินสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วทำให้ตะกอนแห้ง
10. ละลายหรือแขวนลอยตะกอน ด้วย ultrapure water 50 µl
11. แบ่งใส่ 0.2 ml PCR tube เก็บรักษาที่ -70ºC นำบางส่วนไปวัดค่า OD.

การตรวจหาการแสดงออกของ RNA ของเด็งกีไวรัสโดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction แบบ One-step RT-PCR (RNA expression)

1. ใช้ชุด kit สำเร็จรูปของ QIAGEN Cat.no. 210212
2. คู่ Primers ที่ใช้มีลำดับเบส ดังภาพที่ 12 (10 pmol/µl DENV primer)
   คำนวณ ปริมาณ total pmol ของ primers โดยใช้สูตร [pmol/OD]×OD purified (dried)
   a) เติม Ultrapure water (DNase, RNase-free) เพื่อทำให้ dried primer เป็น master stock ความเข้มข้น 100 หรือ 1000 pmol/µl
   b) นำ master stock มาทำการเจือจางด้วย Ultrapure water เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ primer 10 pmol/µl ใน 1.5ml PCR tube ความเข้มข้นนี้เป็น working stock ที่พร้อมใช้ (master stock และ working stock ควรเก็บไว้ที่ -20ºC)

TABLE 1. Oligonucleotide primers used to amplify and type dengue viruses

Primer	Sequence	Genome position[a]	Size, in bp, of amplified DNA product (primers)[b]
D1	5′-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3′	134–161	511
D2	5′-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3′	616–644	511

ภาพที่ 14 แสดงลำดับ Oligonucleotide primers ที่ใช้สำหรับตรวจหาการแสดงออกของ RNA
Source : Lanciotti et al. (1992)

3. RT-PCR step

1) เตรียม RT-PCR master mix โดยใช้ 1.5 ml PCR tube ดังนี้

ผสม components ตามสัดส่วนดังนี้ เมื่อ volume ที่กำหนดไว้เป็นปริมาตรต่อ 1 reaction ดังตาราง

ตารางที่ 2 ตารางแสดงสัดส่วนของ master mix สำหรับทำ OneStep RT-PCR โดยใช้ D1, D2 primers

Component	**Volume (1 reaction)**
5X_QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	4.0 µl
10 mM dNTP mix	0.8 µl
D1 primer forward (10 pmol/µl)	1.0 µl
D2 primer reverse (10 pmol/µl)	1.0 µl
RNA Inhibitor	0.2 µl
RNase-Free Water	15.8 µl
OneStep RT-PCR Enzyme mix	0.2 µl
Final buffer volume	23.0 µl

2) ผสม mixture โดยใช้ pipet ขึ้นลงหลายๆ ครั้งให้เข้ากัน และนำไป spin down
3) Aliquot ทำเป็น 23 µl ใน PCR reaction tube ที่ทำ code label ไว้
4) เติม 2 µl RNA suspension sample (RNA template) ลงใน 23 µl RT-PCR mixture ในแต่ละ PCR reaction tube แล้ว mix ด้วย pipet (pipetting) ขึ้นลงหลายๆครั้ง
5) นำ tube ใส่ใน PCR thermocycler แล้วทำการ set the file เพื่อใช้ทำงานตาม condition ด้านล่าง

ตารางที่ 3 ตารางแสดง condition สำหรับการทำ amplication ใน thermocycler ของ Onestep RT-PCR ที่ใช้ D1,D2 เป็น primer

Condition	Temperature	Time
RT	50 ºC	30 min
PCR, 40 cycles	95 ºC	15 min
	94 ºC	1 min
	55 ºC	1 min
	72 ºC	1 min
	72 ºC	10 min
Hold	4 ºC	∞

RT-PCR product สามารถนำมาทำ Semi-nested PCR step หรือ นำไปทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบ product band ในรอบแรกได้เลย ขนาดของ DNA product คือ 511 bpเมื่อเทียบกับ DNA marker [65]

<u>ขั้นตอนการทำ Gel electrophoresis เพื่อตรวจหา DNA product ของไวรัสเด็งกี</u>

1) ชั่ง agarose (2-hydroxyethyl agarose lot #100M1217v (Zigma) โดยใช้ความเข้มข้น 2% agarose gel
2) เท agarose powder ลงใน flask เติม 1 XTBE ให้ได้ปริมาตรตามที่กำหนด (2 g/100ml) ใช้ microwave เป็นตัวทำความร้อนให้ gel ละลาย วางให้อุ่นที่ RT 5 นาที
3) เทลงบน gel tray ที่มีการจัดวางตำแหน่ง comb และ comb supporter โดย gel ควรหนาประมาณ 5-6 mm โดยไม่ให้มีฟองอากาศ
4) รอให้ gel แข็งที่ RT 30-45 นาที หรือแช่ตู้เย็น 4ºC 10-15 นาที รอจน gel แข็งดี
5) ค่อย ๆ ดึง comb ออกจาก gel แล้วนำ gel ไปประกบ electrophoresis chamber ที่มี 1XTBE buffer (ความเข้มข้นเดียวกันกับ TBE ที่ใช้เตรียม gel) โดย buffer สูงกว่า ผิวหน้า gel ประมาณ 1 mm
6) Mix 1 µl 6X gel loading buffer ต่อ PCR product 9 µl (RT-PCR หรือ semi RT-PCR product)

7) ค่อย load mixture ลงใน well บน gel ที่เตรียมไว้ โดย load samples ลงช่วงกลางๆ gel
   ขนาบด้วยซ้ายมือที่ load ด้วย Positive control RT-PCR ส่วนขนาบด้านขวา load Positive extraction control ถัดจาก Positive extraction ให้ load negative extraction control และ negative RT-PCR control
8) Load 100 bp DNA ladder 10 µl เพื่อเป็น DNA size marker ที่แถวแรกสุดและท้ายสุด
9) ปิดฝา เสียบขั้วไฟฟ้า DNA จะวิ่งไปหา anode (+) charge (ขั้วสีแดง) โดยใช้ ไฟฟ้า voltage 110 volt, เวลา 40 นาที สังเกตจาก blue dye เคลื่อนที่เกือบถึงปลาย gel ประมาณ 1 cm.
10) ปิดสวิชต์ไฟฟ้า แล้วค่อยๆแกะ gel ออกจาก gel box นำ gel ไปย้อม Ethidium bromide solution เพื่อ destain
11) นำ gel ไปส่อง UV light (gel photography ด้วย gel document system)

<u>ขั้นตอนการรายงานผลแปลผลการทดลอง</u>

1) Positive ถูกแปลผลโดยการตรวจ DNA band ขนาด 511 bp บน gel ที่ load ด้วย RT-PCR product บันทึกผลเป็น (+) สำหรับ RT-PCR result ส่วน negative result รายงานผลเป็น (-) เมื่อ RT-PCR product
2) RT-PCR product ของตัวอย่างไม่เกิด band ขนาด 511 bp ผลการทดลองของตัวอย่างที่ตรวจจะถูก validation เมื่อ Positive control ทุกตัวมีผล (+) ชัดเจน และ Negative ทุกตัวมีผล (-) ชัดเจน
3) หากทำ semi-nested PCR จะแปลผลโดย ระบุจากขนาด DNA product ของตัวอย่าง DENV-1,2,3 และ 4 DNA band จะมีขนาด 482, 119, 290 และ 392 ตามลำดับ โดยผลการทดลองจะถูก validation เมื่อ Positive control ทุกตัวมีผล (+) ชัดเจน Negative control ทุกตัวมีผลลบชัดเจน

<u>ข้อควรปฏิบัติ</u>

การสกัดตัวอย่างเนื้อเยื่อยุงลาย ควรมี internal control เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของ RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อยุงลาย (นั่นคือ วิธีการสกัดดังกล่าวนั้นมีความเหมาะสม Defensin A เป็น general gene ของ *Ae.aegypti*) [66, 67]

การตรวจหาการแสดงออกของ RNA ของ *Ae. aegypti* (gene ของยุงลาย ที่เป็น house keeping gene) สำหรับเป็น internal control ของการทดลอง โดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction แบบ Two step RT-PCR

1. คู่ Primers Defensin A ที่ใช้มีลำดับเบสดังตารางที่ 1 (10 pmol/µl Def-F,Def-R_2 primer)

ตารางที่ 4 แสดง Oligonucleotide primers ที่ใช้สำหรับ amplified *Ae. aegypti* gene (defensinA)

DefensinA	Sequence	Size (bp)
Def-F Def-R_2	Def-F: 5'-ATC ACT GGT GCT TAC CCA CAG G-3' Def-R_2 : 5'-GAC GCA CAC CTT CTT GGA GTTG-3'	**302 bp**

RT-PCR step

- RT step

1) เตรียม RT master mix โดยใช้ 1.5 ml PCR tube ดังนี้

ผสม components ตามสัดส่วน ที่กำหนดไว้เป็นปริมาตรต่อ 1 reaction ดังตาราง ตารางที่ 5 ตารางแสดงสัดส่วนของ master mix สำหรับเตรียม cDNA โดยใช้ defensin A primers

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Component	Volume (1 reaction)
5X_QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	2.0 µl
10 mM dNTP mix	1.0 µl
RNA Inhibitor	0.5 µl
RNase-Free Water	11.5 µl
OneStep RT-PCR Enzyme mix	0.50 µl
Def-Fprimer forward (10 pmol/µl)	0.75 µl
DI	0.75 µl
Total buffer volume	17.0 µl
RNA template	3.0 µl

2) นำ tube ใส่ใน PCR thermocycler แล้วทำการ set the file เพื่อใช้ทำงานตาม condition ด้านล่าง

ตารางที่ 6 ตารางแสดง condition สำหรับเตรียม cDNA ใน thermocycler โดยใช้ defensinA เป็น primer

Condition	Temperature	Time
RT	25 °C	5 min
PCR, 40 cycles	48 °C 70 °C	60 min 15 min
Hold (incubation)	4 °C (CDNA)	∞

1) เตรียม RT master mix โดยใช้ 1.5 ml PCR tube ดังนี้

ผสม components ตามสัดส่วนดังนี้ เมื่อ volume ที่กำหนดไว้ตามปริมาตร

ตารางที่ 7 ตารางแสดงสัดส่วนของ master mix สำหรับทำ TwoStep RT-PCR โดยใช้ defensinA primers

Component	**Volume (1 reaction)**
10X HotStart PCR Buffer	2.5 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 µl
10 mM dNTP mix	0.5 µl
Def-F primer forward (10 pmol/µl)	0.75 µl
Def-R_2 primer forward (10 pmol/µl)	0.75 µl
Fermentas Maxima® HotStart Taq DNA Polymerase	0.5 µl
RNase-Free Water	5.0 µl
Total buffer volume	22.5 µl
cDNA	2.5 µl

นำ tube ใส่ใน PCR thermocycler แล้วทำการ set the file เพื่อใช้ทำงานตาม condition ด้านล่าง

ตารางที่ 8 ตารางแสดง condition สำหรับทำ TwoStep RT-PCR ใน thermocycler โดยใช้ defensinA เป็น primer

Condition	Temperature	Time
PCR, 40 cycles	95 ºC	15 min
	94 ºC	1 min
	50 ºC	1 min
	72 ºC	1 min
	72 ºC	7 min
Hold	4 ºC	∞

การเก็บรวบรวมข้อมูล

บันทึกผลการทดลอง รวบรวมข้อมูล และวิเคราะห์แปลผลข้อมูลตาม criteria ที่กำหนด จดบันทึก และถ่ายภาพเซลล์ที่ใช้วิธี immunohistochemistry ในเซลล์เพาะเลี้ยง และ เซลล์ยุงลาย (head squash) และผลการทดลอง nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบผลการทดลองของตัวอย่างที่สามารถตรวจพบไวรัสเด็งกีที่มีชีวิต ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด รวมทั้งในเซลล์สมองของยุงลายจากวิธี immunohistochemistry และผลการทำ RT-PCR

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างวิธี immunohistochemistry และวิธี one-step PCR จากการทำ mosquito inoculation ด้วย urine ของผู้ป่วย

No.	Code	Culture in *Ae. aegypti* mosquito (Intrathoracics)	
		by IHC (head squash)	RT-PCR (bodies)
1	A-21/2	ND	+ve
2	N-17	ND	+ve
3	N-19	ND	+ve
4	N-23	ND	+ve
5	N-24	ND	+ve
6	N-28	ND	+ve
7	N-34	ND	+ve
8	N-35	ND	+ve
9	P-1	ND	+ve
10	P-2	ND	+ve
11	N-12/3	ND	ND
12	N-8	ND	+ve
13	N-3	ND	+ve
14	N-40	ND	+ve
15	N-30/2	ND	ND
Percent (%) Of Positive			100% (13/13)

*ND จากการย้อม IHC เกิดผลบวกปลอมใน negative control ทำให้ไม่สามารถแปลผลได้

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบผลการทดลองด้วยวิธี immunohistochemistry และผลการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ CYTOPATHIC EFFECT (CPE) จากการทำ cell inoculation ด้วย urine ของผู้ป่วย

No.	Code	Culture in cell lines(C6/36)	
		IHC results	CPE Results
1	A-21/2	+ve	+ve
2	N-17	+ve	+ve
3	N-19	+ve	+ve
4	N-23	+ve	+ve
5	N-24	+ve	+ve
6	N-28	+ve	+ve
7	N-34	+ve	+ve
8	N-35	+ve	+ve
9	P-1	+ve	+ve
10	P-2	+ve	+ve
11	U-40	-ve	-ve
12	U-53	-ve	-ve
13	U-62	-ve	-ve
14	U-80	-ve	-ve
15	U-90	+ve	-ve
16	U-91	-ve	-ve
17	U-105	+ve	-ve
18	U-108	-ve	-ve
19	U-230	-ve	-ve
20	U-232	+ve	-ve
21	U-233	+ve	-ve

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

No.	Code	Culture in cell lines(C6/36)	
		IHC results	CPE Results
22	U-300	+ve	+ve
23	U-304	-ve	-ve
24	U-278	+ve	-ve
25	U-292	+ve	+ve
26	U-294/2	+ve	-ve
27	U-299	+ve	+ve
28	U-198/2	+ve	-ve
29	U-294	-ve	-ve
30	U-315/2	+ve	-ve
31	U-192	-ve	-ve
32	U-216/2	+ve	-ve
33	U-222/2	-ve	-ve
34	U-266	+ve	-ve
35	U-256	+ve	-ve
36	U-271/2	+ve	-ve
37	U-304	+ve	+ve
38	U-175	+ve	-ve
39	CH-3	+ve	+ve
40	U-309	-ve	-ve
Percent (%) Of Positive		70% (28/40)	37.5% (15/40)

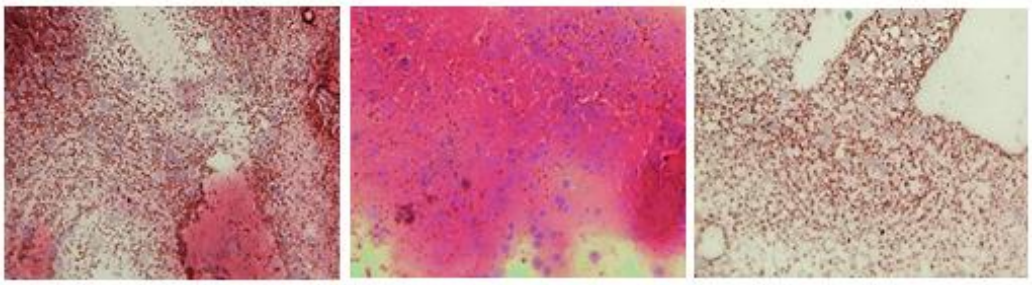
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผลการวิเคราะห์

1. สรุปผลการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry จากการหาเด็งกีไวรัสที่มีชีวิตใน brain tissue ของยุงลาย

ผลการทดลองจากการย้อมดูเฉพาะโครงสร้างของเซลล์ brain tissue ของยุงลายด้วย วิธี H&E staining

แสดงลักษณะโครงสร้างของ brain mosquito tissue ในเนื้อเยื่อสมองยุงลาย[68]ที่ไม่มีเชื้อไวรัสเด็งกี หลังจากทำ H&E staining ในสมองยุงลาย 1 section เพื่อศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อในการหาตำแหน่งที่แท้จริงของ Hematoxylin บริเวณ nucleus และ Eosin บริเวณ cytoplasm[69] ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 15



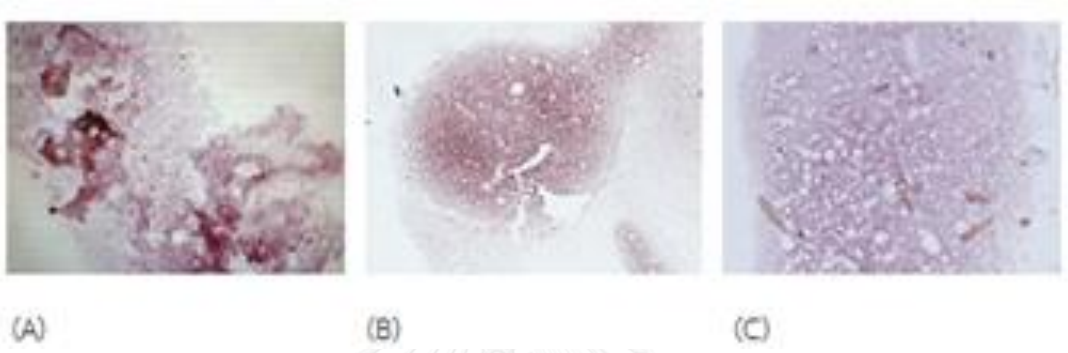
ภาพที่ 15 แสดงการย้อม cell & tissue morphology ของ head squash ยุงลายโดย H&E staining

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(A) ,(B) ,(C) แสดงภาพโครงสร้างเนื้อเยื่อสมองยุงลายที่ไม่มีเชื้อไวรัสเด็งกีโดยวิธี H&E stainning กำลังขยาย 20 X

สรุปผลการทดลอง การ Quenching of endogenous peroxidase

การทดลองการใช้ H_2O_2 ในการขัดขวาง endogenous peroxidase โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของ เวลาที่ใช้สำหรับ Quenching ใน 3% H_2O_2 โดยใช้ PBS 7.2 เป็น diluent ในเซลล์สมองของยุงลาย ในตัวอย่างที่ทำการฉีดด้วย ปัสสาวะของผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัสเด็งกี (negative control) เมื่อส่องดูด้วยกล้อง Bright field light microscope ได้ผลการทดลองตามภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แสดงความแตกต่างการขัดขวาง endogenous peroxidase ในเนื้อเยื่อหัวยุงลายที่ 3%, 0.3% ที่อุณหภูมิห้อง และ 3% โดยใช้ความร้อน

(A) Head squash ที่ blocking ด้วย 3 % H_2O_2 in PBS ที่ RT เป็นเวลา 10 นาที (กำลังขยาย 20X)

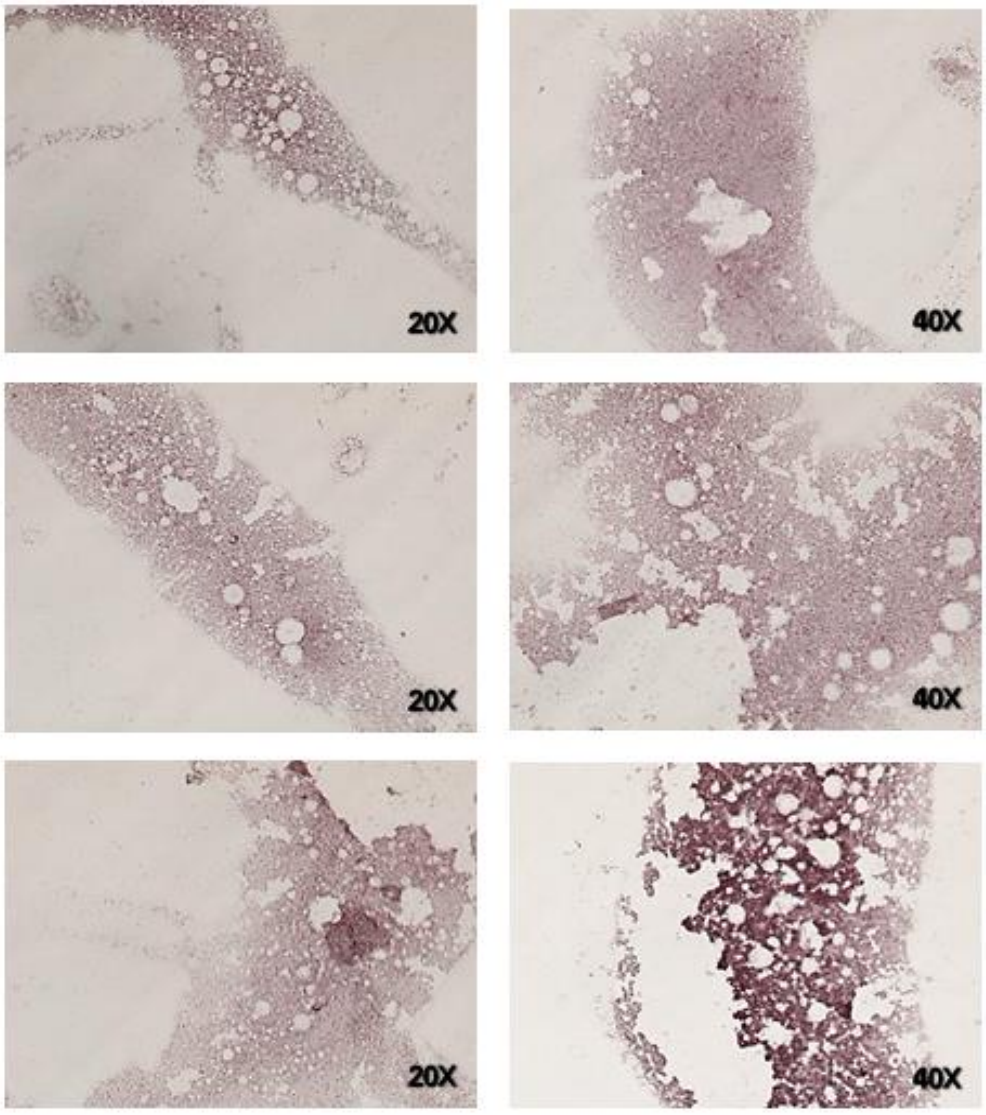
(B) Head squash ที่ blocking ด้วย 0.3 % H_2O_2 in PBS ที่ RT เป็นเวลา 10 นาที (กำลังขยาย 20X)

(C) Head squash ที่ blocking ด้วย 3 % H_2O_2 in microwave oven (50 mlของ PBS 7.2 ใช้เวลา 30 seconds on high temperature) แล้วบ่ม slide ใน solution นี้ 1 min (กำลังขยาย 20X)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

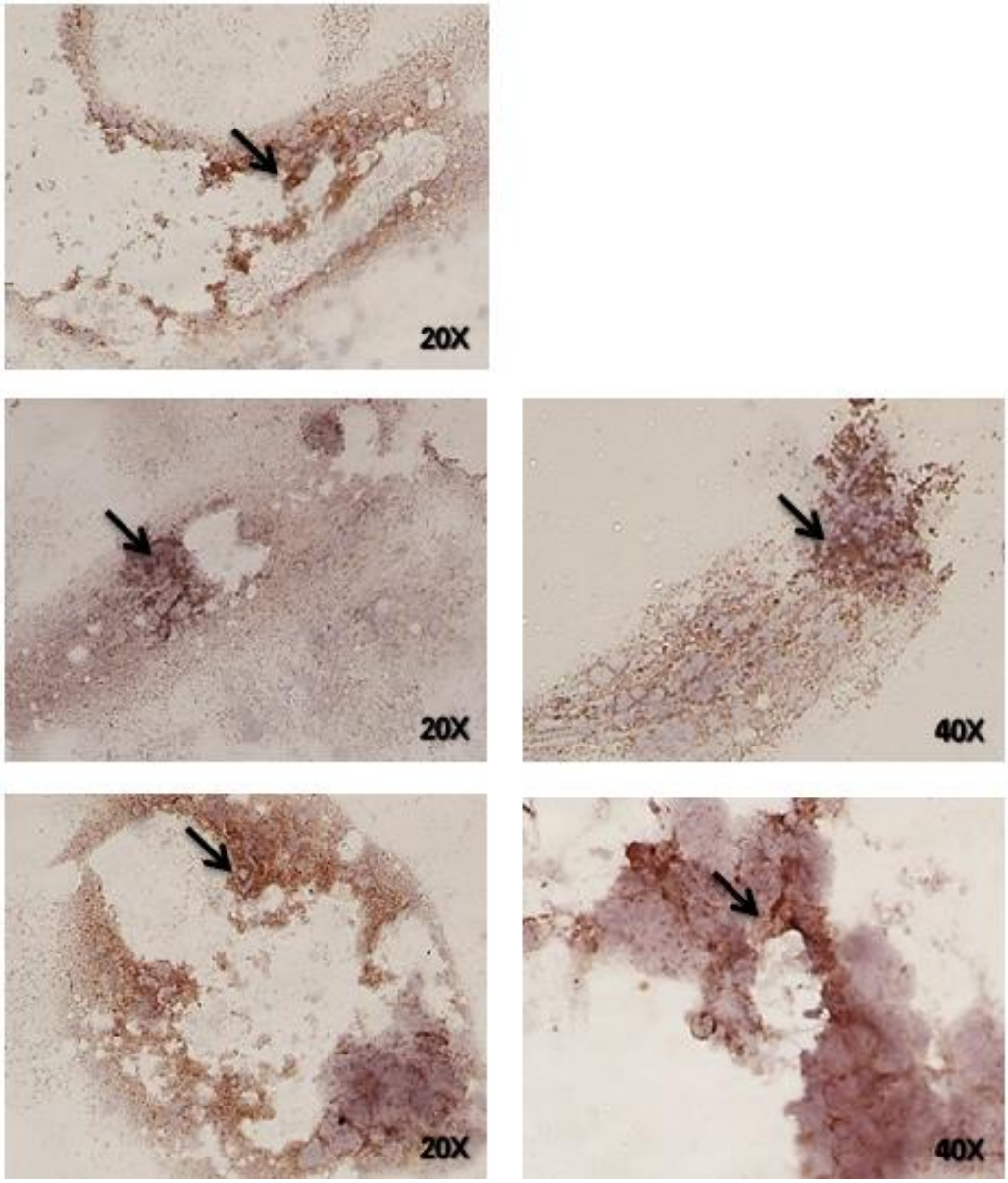
สรุปผลการย้อม brain tissue ของยุงลายโดยใช้การ blocking โดยวิธีใช้ความร้อนตามเทคนิคของ Miller RT. (2001)

เปรียบเทียบระหว่างยุงลายที่ฉีดด้วย DV2 (positive) และยุงลายที่ฉีดด้วย diluent (Negative control) เมื่อทำการย้อมด้วย MAB 8705 (anti dengue primary antibody (1:200) secondary antibody IgG_2a (1:300) ส่องดูด้วย light microscope ได้ผลการย้อมดังภาพที่ 17 ,18



(A) Head squash (Negative diluent injection)

ภาพที่ 17 แสดงเนื้อเยื่อหัวยุงลาย (Negative control) ที่ย้อมด้วย Anti-dengue (MAB8705) primary antibody ตามลำดับ

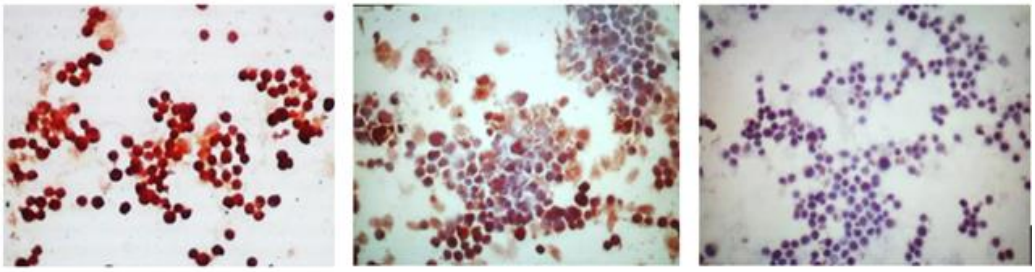


(B) Head squash (positive DV2 infection)

ภาพที่ 18 แสดงเนื้อเยื่อหัวยุงลาย (Positive control) ที่ย้อมด้วย Anti-dengue (MAB 8705) primary antibody ตามลำดับ

2. สรุปผลการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry จากการหาเด็งกีไวรัสที่มีชีวิตในเซลล์เพาะเลี้ยง ชนิด C6/36, LLC-MK2 (cell inoculation) ด้วย DV-2 และ urine ของผู้ป่วย

Code A-21/2 พบว่าจะให้ผลบวกเมื่อส่องดูใต้กล้อง light microscope พบแกรนูลสีน้ำตาลบริเวณ cytoplasm ของเซลล์ ดังภาพที่ 19



(A) (B) (C)

ภาพที่ 19 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงของ DV-2 และตัวอย่างปัสสาวะ code A-21/2 เมื่อตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry

(A) cell C6/36 ที่ถูก infected ด้วย DV-2 MOI = 1 โดยใช้ (mouse anti-dengue complex monoclonal antibody ที่มีความเจือจาง 1 : 200) MAB 8705 เป็น positive control slide

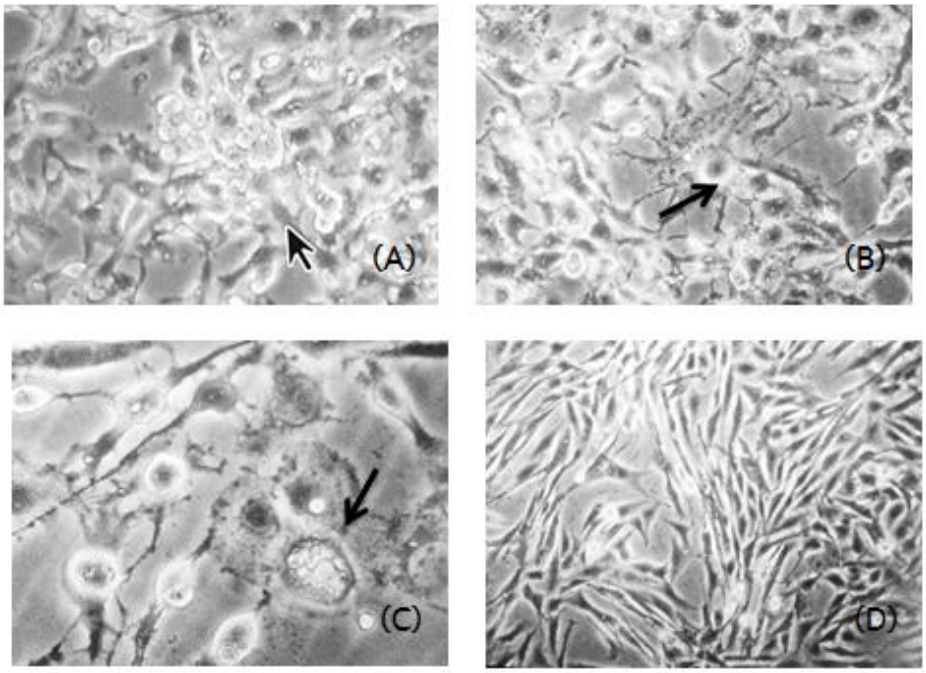
(B) cell C6/36 ที่ถูก infected ด้วย urine ของผู้ป่วย code A-21/2 โดยใช้ (mouse anti- dengue complex monoclonal antibody ที่มีความเจือจาง 1 : 200) MAB 8705

(C) cell C6/36 ที่ infected ด้วย Mock (น้ำเลี้ยงเซลล์ โดยใช้ (mouse anti-dengue complex monoclonal antibody) ที่มีความเจือจาง 1 : 200) MAB 8705 เป็น negative control slide

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. สรุปผลการสังเกตการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์เมื่อทำการ infected ด้วย DV-2 และ MOCK น้ำเลี้ยงเซลล์ (Negative control) ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-MK2 และ C6/36

ส่องดูใต้กล้อง inverted microscope เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเซลล์สังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและความแตกต่างไปจาก Negative control เรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า CYTOPATHIC EFFECT (CPE) ในช่วงเวลา 3- 8 วันหลัง infection ด้วย DENV-2 ดังภาพที่ 20 และ 21 ตามลำดับ



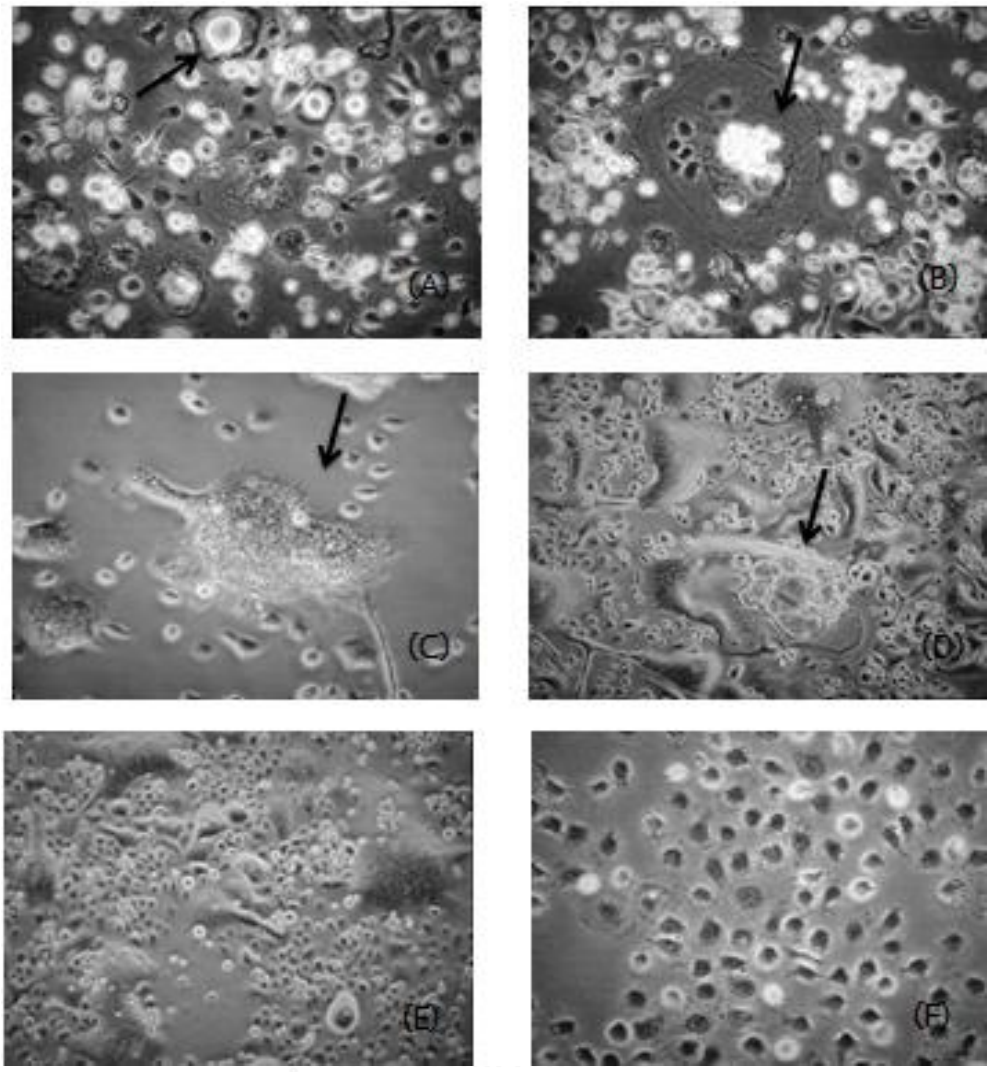
ภาพที่ 20 แสดงการเกิด CPE ใน LLC-MK2 cells รูปแบบต่างๆ 7 วัน หลัง infection

(A) CPE มีลักษณะ nuclei รวมกลุ่มกันใน cytoplasm เดียวกัน เป็น multinucleated giant cell ที่เรียกว่า syncytium

(B) CPE มีลักษณะ nucleus รูปร่างเปลี่ยนไป pyknosis

(C) CPE มีลักษณะเป็นฟองใน cytoplasm ของเซลล์ที่เรียกว่า vacuolated cell

(D) Negative control cell (Mock)



Chulalongkorn University

ภาพที่ 21 แสดงการเกิด CPE ใน C6/36 cells รูปแบบต่างๆ 7 วันหลัง infection

(A) CPE มีลักษณะ เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น rounding

(B) CPE ของเซลล์ที่มีรูปร่างกลมค่อย ๆ แยกตัวออกจากโครงสร้างที่เป็น monolayer ทำให้เกิดช่องว่างขึ้น

(C) CPE ของเซลล์เกิดการรวมตัวของนิวเคลียส เกิด syncytium

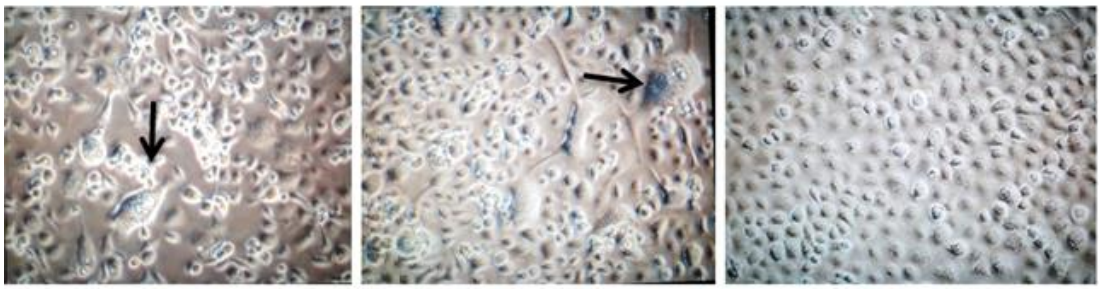
(D) CPE ของเซลล์ที่เกิด vacuolated

(E) CPE ของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลายรูปแบบ

(F) C6/36 cell ที่เป็น normal cell

4. สรุปผลการสังเกตการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์เมื่อทำการ infected ด้วย DV-2 และตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วย

ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 เมื่อส่องดูใต้กล้อง inverted microscope โดยเรียกพยาธิสภาพของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างนี้ว่า CYTOPATHIC EFFECT (CPE) ดังภาพที่ 22



(A) (B) (C)

ภาพที่ 22 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงเมื่อ infected เซลล์ C6/36 ด้วย DV-2 และตัวอย่างปัสสาวะ code A-21/2

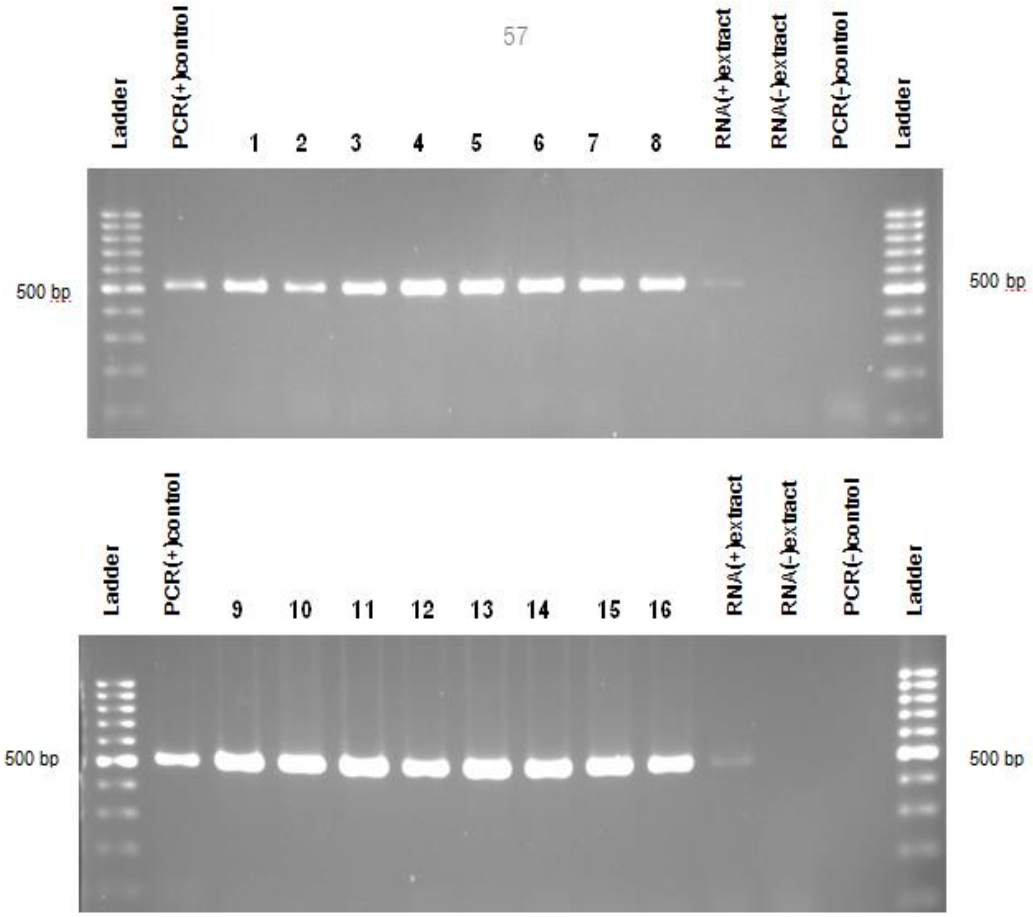
(A) cell C6/36 ที่ถูก infected ด้วย DV-2 MOI = 1 บ่มที่ 28 ºC ระยะเวลา 7 วันหลังการติดเชื้อ เป็น positive control สำหรับ CPE

(B) cell C6/36 ที่ถูก infected ด้วย urine ของผู้ป่วย code A-21/2 บ่มที่ 28ºC ระยะเวลา 7 วันหลังการติดเชื้อ

(C) cell C6/36 ที่ infected ด้วย Mock (น้ำเลี้ยงเซลล์) ระยะเวลา 7 วันหลังการติดเชื้อ

Morphology ของเซลล์ C6/36 ที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจาก infection คือ Cytopathic effect (CPE) ของ DV.2 ในเซลล์ C6/36 มีลักษณะ การแสดงออกเป็นก้อนบวมๆ และเกิดลักษณะที่ nuclei จากหลายเซลล์มารวมใน cytoplasm เดียวกัน เรียกว่า syncytium ดังที่บรรยายไว้ในงานวิจัยของ Xinwei Wu และคณะ, (2010)[70]

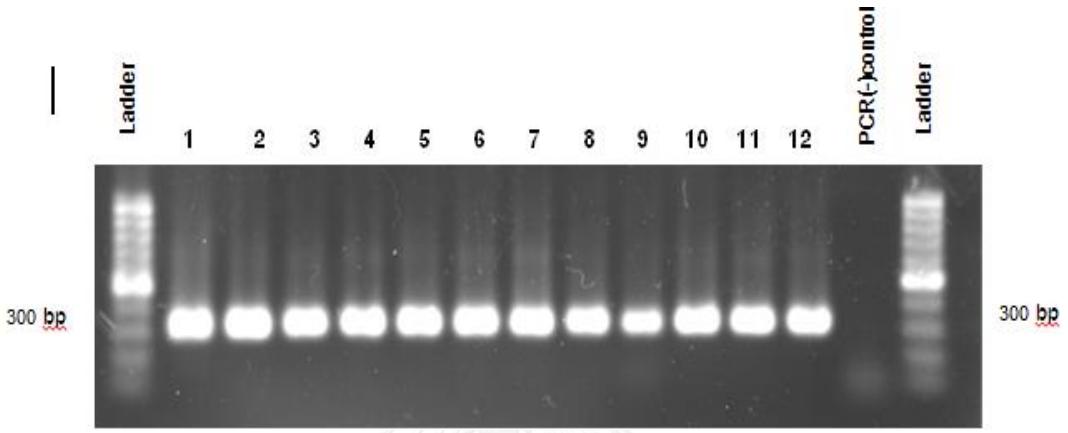
5. สรุปผลการทำ One-Step RT-PCR โดยใช้ lanciotii คู่ primer คือ D1 และ D2 จากตัวอย่างผลการทำ DNA amplification ของเนื้อเยื่อยุงที่ฉีดด้วยปัสสาวะ code P-1 (n = 16) ตัว เมื่อ run gel electrophoresis เกิด product band ขนาด 511 bp ให้ผลดังภาพที่ 23



ภาพที่ 23 แสดงตัวอย่าง DNA products ของเนื้อเยื่อยุงลาย (Bodies) แต่ละตัว ที่ฉีดด้วย urine code P-1 โดยใช้ D1,D2 primer

6. สรุปผลการทำ Two-step RT-PCR

โดยใช้คู่ primer คือ Def-F และ Def-R_2 จากตัวอย่างผลการทำ DNA amplification ของเนื้อเยื่อยุงที่ฉีดด้วยปัสสาวะ code P-1 (n = 16) ตัวเมื่อ run gel electrophoresis เกิด product band ขนาด 302 bp ให้ผลดังภาพที่ 24

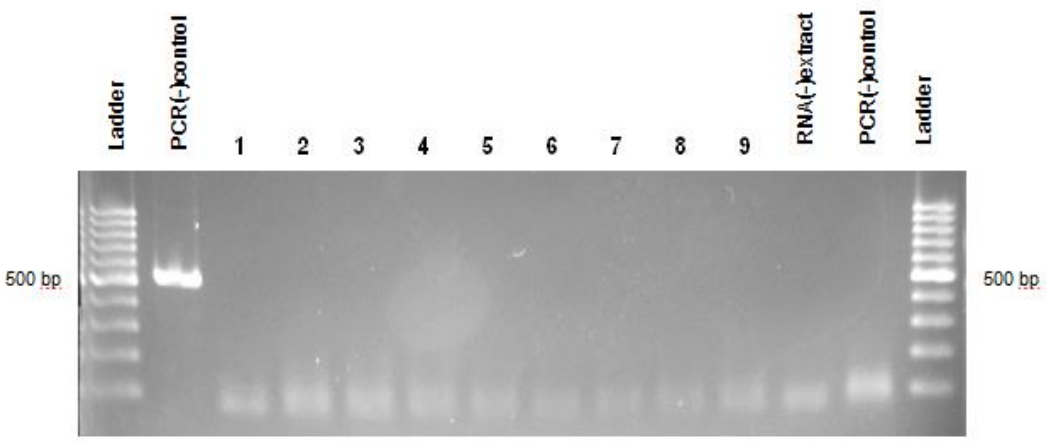


ภาพที่ 24 แสดงตัวอย่าง DNA products ของเนื้อเยื่อยุงลาย (Bodies) แต่ละตัว ที่ฉีดด้วย urine code P-1 โดยใช้ def-F,Def-R_2 primers

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

7. สรุปผลการทำ RT-PCR โดยใช้ lanciotii

คู่ primer คือ D1 และ D2 จากตัวอย่างผลการทำ DNA amplification ของเนื้อเยื่อยุงที่ทำการทดลอง urine sucking; natural infection (n =50) ตัวเมื่อ run gel electrophoresis ไม่พบการเกิด product band ขนาด 511 bp ให้ผลดังภาพที่ 25



ภาพที่ 25 แสดงตัวอย่าง DNA products ของเนื้อเยื่อยุงลาย (Bodies) แต่ละตัว ทำการทดลอง urine sucking โดยใช้ D1,D2 primers

จากการทดลองยุงดื่มปัสสาวะ เมื่อถึงระยะเวลาที่กำหนดเพื่อ sacrified ยุงลาย และนำส่วน bodies มาทำการสกัด RNA จากนั้นทำการ detect เชื้อไวรัสเด็งกีด้วยวิธี one step RT-PCR (D1,D2 primer) ตารางที่ 4

ตารางที่ 11 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเด็งกีในเนื้อเยื่อยุงลายเปรียบเทียบกับการตรวจหา (defensinA gene) *Ae. aegypti* gene ; house keeping gene ของยุงลายเปรียบเทียบกัน

No.	RT-PCR (D1,D2 primer)	RT-PCR (Def-F,Def-R_2)	Nucleic acid		Remarks
			(ng/µl)	260/280	
1	-ve	+ve	78.7	1.59	
2	-ve	+ve	210.3	1.65	
3	-ve	+ve	266.8	1.61	
4	-ve	+ve	177.9	1.67	
5	-ve	+ve	154	1.84	
6	-ve	+ve	109.4	1.62	
7	-ve	+ve	130.7	1.64	
8	-ve	+ve	125.3	1.6	
9	-ve	+ve	67.8	1.73	
10	-ve	+ve	123	1.73	
11	-ve	+ve	88.8	1.71	
12	-ve	+ve	79.3	1.63	
13	-ve	+ve	73.8	1.61	
14	-ve	+ve	229.5	1.85	
15	-ve	+ve	274.6	1.93	
16	-ve	+ve	110.9	1.62	
17	-ve	+ve	118.1	1.61	
18	-ve	+ve	94.3	1.8	
19	-ve	+ve	102.9	1.52	
20	-ve	+ve	95.6	1.58	
21	-ve	+ve	73.6	1.64	
22	-ve	+ve	63.8	1.57	
23	-ve	+ve	45.75	1.75	
24	-ve	+ve	67.4	1.77	
25	-ve	+ve	112.9	1.85	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

No.	RT-PCR (D1,D2 primer)	RT-PCR (Def-F,Def-R_2)	Nucleic acid		Remarks
			(ng/µl)	260/280	
26	-ve	+ve	101.0	1.72	
27	-ve	+ve	88.5	1.87	
28	-ve	+ve	101.0	1.91	
29	-ve	+ve	44.5	1.73	
30	-ve	+ve	19.2	1.76	
31	-ve	+ve	80.9	1.82	
37	*ND	*ND	80.6	1.57	**exclude
38	*ND	*ND	30.6	1.50	**exclude
39	*ND	*ND	71.6	1.42	**exclude
40	*ND	*ND	24	1.46	**exclude
41	*ND	*ND	18.6	1.55	**exclude
42	*ND	*ND	13.5	1.40	**exclude
43	*ND	*ND	17.8	1.44	**exclude
44	*ND	*ND	35.9	1.40	**exclude
45	*ND	*ND	36.8	1.48	**exclude
46	*ND	*ND	20	1.39	**exclude
47	-ve	+ve	102.3	1.75	
48	-ve	+ve	80.7	1.84	
49	-ve	+ve	152.5	1.62	
50	+ve	+ve	115.8	1.83	Positive extracted control

*ND คือ NOT DETECTED

** exclude คือ ค่า OD ที่ไม่เหมาะสม ; เมื่อ OD < 1.60 ไม่นำมาทำการทดสอบ

ตารางที่ 12 สรุปผลการศึกษาการมีชีวิตของเด็งกีไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง และเนื้อเยื่อยุงลาย จากการตรวจหา dengue viral RNA โดยวิธี RT-PCR

แสดงอัตราการแยกเชื้อ dengue virus ที่มีชีวิตจากปัสสาวะของผู้ป่วยในระยะติดเชื้อเฉียบพลันโดยวิธี mosquito inoculation (viral RNA detection) และ cell culture (viral protein detection)

Method of virus isolation	No. cases of live DENV from urine of acutely-patient	Isolation rate (%)	*P Value
Mosquito inoculation	13/13	100 %	0.007
Cell culture inoculation	28/40	70%	

เปรียบเทียบโดยใช้ % Isolation rate คำนวณสถิติ แทนค่า สูตรโดยใช้ Chi-Square Test

*P value = (Actual_range / Expected_range)

; เมื่อ Actual range คือ (Isolation rate) แต่ละวิธี

Expected range คือ ผลรวม (SUM) positive ทั้งหมด / จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง

คำนวณโดยใช้ Chi-Square Test จาก microsoft excel program

P value = 0.007

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

อภิปรายผลและ ข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินการมีชีวิตของไวรัสเด็งกีในปัสสาวะของผู้ป่วยระยะติดเชื้อเฉียบพลัน โดยใช้วิธีการแยกเชื้อไวรัสเด็งกีในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 (in vitro) และในยุงลาย (*Ae. aegypti*) (in vivo) จากกลุ่มตัวอย่างที่เป็นปัสสาวะของผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันผลบวกจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกีโดยวิธี RT-PCR และ ELISA มาทำการแยกเชื้อ (isolation method) หากไวรัสมีชีวิตจะมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงและในยุงลายในช่วง 7 วันและ 14 วัน ตามลำดับ กระบวนการดังกล่าว คือ การเพิ่มจำนวน (viral replication) และสร้างโปรตีนของไวรัส (viral protein expression)

เมื่อตรวจหาจีโนมของไวรัสโดยใช้วิธี RT-PCR ซึ่งจัดเป็นวิธีที่มี sensitivity สูง จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่ไวรัสสร้างขึ้นโดยวิธี การย้อม IHC , ICC ผลการทดลองที่ได้พบว่าสามารถตรวจหาไวรัสที่มีชีวิตได้ในเนื้อเยื่อยุงลาย และเซลล์ยุงลาย ผู้วิจัยได้ทำการผ่าตัดส่วนที่เป็นตัว และ หัวยุงออกจากกัน ทั้งนี้เนื่องจากช่วงระยะเวลาที่ไวรัสเด็งกีสามารถเพิ่มจำนวนในตัวยุงลายหลังจากได้รับเชื้อจะอยู่ในช่วง 10-14 วัน จากงานวิจัยของ Salazar Ma. และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ extrinsic incubation period (EPI) พบว่าหลังจากยุงลายติดเชื้อผ่านต่อมน้ำลาย เชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนในตัวยุงและสามารถตรวจพบไวรัสเด็งกีในปริมาณสูงสุดช่วง 7-10 วัน และหลังจากนั้นจะลดปริมาณลงเรื่อยๆ แต่ไวรัสจะยังคงอยู่ในส่วนกระเพาะยุงลาย หรือ midgut ดังนั้นการตรวจหา RNA ของไวรัสเด็งกีโดยวิธี RT-PCR สามารถทำได้เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีความไวสูง แม้ว่าจะมีไวรัสเพียงเล็กน้อย วิธีการดังกล่าวสามารถ amplify และใช้เป็นวิธียืนยันได้ดีวิธีหนึ่ง[71]

ผลการวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าหลังจากสกัดเนื้อเยื่อส่วนลำตัวของยุงลายพบว่าผลการทดลองให้ผลบวก 100 % จากตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 13 ตัวอย่าง (1 ตัวอย่างปัสสาวะต่อยุงลาย 20 ตัว) ผู้วิจัยได้ทำการสกัดยุงลายทุกตัว และทำการตรวจหาจีโนมให้ผลบวก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yingsiwaphat V. ที่ได้ทดสอบในเนื้อเยื่อยุงลายจากการ pool ทุกตัวที่เป็นตัวอย่างเดียวกัน มาทำการสกัด จากนั้นตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกีด้วยวิธี RT-PCR แต่ทำในตัวอย่างปัสสาวะเพียง 4

ตัวอย่าง การทดลองของเราทำในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยหลายรายกว่า รวมทั้งทำ RT-PCR เพื่อตรวจหาจีโนมของยุงลายซึ่งเป็น house keeping gene ควบคู่ไปด้วยกัน การมีชีวิตของไวรัสเด็งกีสามารถสรุปได้เมื่อ ไวรัสมีการเพิ่มจำนวนในโฮสต์ และ virus replication สามารถตรวจหาได้โดย RNA viral synthesis และ protein viral expression[72] การตรวจหา genome ของไวรัสมีโอกาสที่จะเกิด contamination ในการทดลองผู้ทดลองได้ทำการสกัด Negative control extraction ทุกครั้งที่ทำการสกัดยุงลาย

การทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงให้ผลการทดลองในการตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกีจากการสกัดเซลล์เพาะเลี้ยง (ที่ไม่ใช่น้ำเลี้ยงเซลล์) 100 % ด้วยวิธี RT-PCR แต่ผู้วิจัยได้ทำเพียง 5 ตัวอย่าง ซึ่งผลการตรวจหาจีโนมของเด็งกีไวรัสให้ผลต่างกับนักวิจัยคณะอื่นๆ คือ Mizuno Y., Paloni TR. และ Hirayama T.[47, 48, 73] นักวิจัยทั้งสามคณะได้ทำการแยกเชื้อจากปัสสาวะผู้ป่วยในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้ น้ำเลี้ยงเซลล์สกัด RNA และทำการตรวจหาโดยใช้ Real Time RT-PCR ผลการวิจัยคือ ไม่สามารถแยกเชื้อจากปัสสาวะที่มีชีวิตได้ การตรวจหาการสร้างโปรตีนของไวรัสเด็งกีในเซลล์เพาะเลี้ยง จัดว่าเป็นวิธีการที่น่าสนใจด้วยเช่นกัน การใช้ IHC โดยหลักการ chromogenic substrate ในการย้อมโปรตีนของไวรัส มีความไวน้อยกว่าการตรวจหา จีโนมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเริ่มต้นผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่า การตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกี แม้ว่าจะมีความไวสูง แต่การตรวจด้วยวิธีดังกล่าว อาจมีโอกาสที่จะเกิด contamination งานวิจัยชิ้นนี้สามารถแยกเชื้อไวรัสเด็งกีที่มีชีวิตจากปัสสาวะของผู้ป่วยไข้เลือดออกในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 ได้เป็นครั้งแรก ผลการตรวจหาโปรตีนของไวรัส IHC (70%; percent of positive) เนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะโดยผ่านการกรอง microfilter ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.2 μm ทำให้ได้ไวรัสเท่านั้นที่นำมาเพาะเลี้ยงในเซลล์ จึงช่วยตัดปัญหาจากการปนเปื้อนจากแบคทีเรียไม่ให้ไปรบกวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส และสามารถตรวจหาโปรตีนของไวรัสได้ การใช้เซลล์ C6/36 passage number 18-22 สามารถทำให้สามารถวิเคราะห์การเกิด CPE ของเซลล์จากการติดเชื้อได้ แต่ยังคงมีความไวน้อยกว่าการย้อม IHC เพื่อหาโปรตีนของไวรัสเด็งกี เนื่องจากปริมาณไวรัสเด็งกีที่มีชีวิตในตัวอย่างปัสสาวะอาจมีไม่เท่ากัน การสังเกตพยาธิสภาพดังกล่าวจึงอาจใช้เวลาไม่เท่ากันด้วย หากเพิ่มเวลาในการติดเชื้อให้นานขึ้นและลดปริมาณ fetal bovine serum ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นผลให้เซลล์ยังสามารถคงสภาพในการยึดเกาะผิวภาชนะและสามารถเกิด CPE จนมองเห็นได้

การตรวจหา โปรตีนของไวรัสในเนื้อเยื่อส่วนหัวยุงลาย พบว่า ไม่สามารถทำการตรวจหาได้ เนื่องจากมีปัญหาหรือข้อจำกัดของวิธีการทดสอบ คือ การใช้ chromogenic substrate (DAB) ในการย้อมเกิดปัญหา เกี่ยวกับ false positive เนื่องจาก endogenous peroxidase การที่เนื้อเยื่อยุงลายมี endogenous peroxidase การย้อมแบบ horseradish peroxidase base detection method ทำให้ endogenous peroxidase ในเนื้อเยื่อเกิด activity ขึ้น โดยทำปฏิกิริยา กับ DAB chromogen ทำให้เกิดการผลิตสีที่ identical ต่อ specific immunoperoxidase ผู้วิจัยได้พยายามหาวิธีการขัดขวาง endogenous peroxidase ในเนื้อเยื่อหลายวิธีดังผลการทดลองที่ได้แสดงในหน้าที่ 52 และเนื่องจากวิธีการย้อมที่เป็น gold standard method สำหรับการย้อมหัวยุงลาย เริ่มครั้งแรกโดย Rosen และ Gubler (1974) คือวิธี Direct Fluorescence Antibody test (DFAT) ผลจากการทดสอบ dengue antigen ที่ให้ผลบวกจะเห็นเป็นแกรนูลเรืองแสงสีเขียวในไซโตพลาสซึมของเซลล์สมองยุงลาย[74] ผู้วิจัยพยายามทำการศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อสมองของยุงลายจากการย้อม H&E เพื่อหานิวเคลียสแยกออกจากบริเวณไซโตพลาสซึม นิวเคลียสจะติดสี hematoxylin เป็นสีฟ้า ส่วนไซโตพลาสซึมจะเห็นเป็นสีชมพูจากการติดสี eosin และเมื่อทำการย้อม หัวยุงลายที่เป็น positive control จากการย้อมด้วย anti-dengue primary antibody พบว่า สามารถเห็นสีน้ำตาลเป็นปื้นๆ รอบๆ นิวเคลียส จากการที่ mouse anti-dengue monoclonal ที่เป็น primary antibody จับกันอย่างจำเพาะกับ antigen ของ dengue virus ในเซลล์ และ primary antibody จะไปจับกันกับ secondary antibody ซึ่ง recognized กับ secondary antibody ที่เป็นชนิดเดียวกันกับ primary antibody คือ IgG_2a เอนไซม์จะย่อยสารตั้งต้น (DAB) ทำให้เกิดสีน้ำตาล เมื่อเปรียบเทียบกับหัว negative control ที่ย้อมด้วย anti–dengue primary antibody จะไม่เกิดสีน้ำตาล เนื่องจากไม่มี dengue antigen ในเนื้อเยื่อยุงลาย การหาโปรตีนของไวรัสเด็งกีในเนื้อเยื่อหัวยุงลายนั้น หากเก็บตัวอย่างไว้ใน -70°C เป็นระยะเวลานาน ปัญหาการตรึงเนื้อเยื่อจะเกิดขึ้นนั่น คือ เนื้อเยื่อไม่ติดหรือหลุดออกจากสไลด์ รวมทั้งโอกาสการเกิด crystal ice ในเนื้อเยื่อ ทำให้ผลการย้อมเกิด artifact[75] เมื่อทำการพิสูจน์สมมติฐาน พบว่า การแยกเชื้อไวรัสเด็งกีที่มีชีวิตจากปัสสาวะผู้ป่วยในยุงลายเมื่อตรวจหาจีโนมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR มีอัตราการแยกเชื้อมากกว่าในเซลล์เพาะเลี้ยงเมื่อตรวจหาด้วยวิธี ICC มีค่านัยสำคัญ *P value* = 0.007 ; $P \leq 0.05$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในส่วนของการทำ urine sucking เป็นการศึกษา viral genome โดยตัวแปรต้นคือไวรัสเด็งกีที่มีชีวิตในปัสสาวะ ตัวแปรควบคุม คือยุงลายเพศเมียที่อดอาหารเป็นเวลา 48 ชม. (สังเกตพฤติกรรมการดื่มปัสสาวะจากสำลีที่ชุบปัสสาวะ) และเลี้ยงตามปกติ ตัวแปรตามคือ viral genome ที่สามารถตรวจได้ ในเนื้อยุงลาย ส่วนตัวแปรอิสระในการทดลอง คือ ยุงมีพฤติกรรมในการดื่มปัสสาวะหรือไม่ การตรวจหาผลการตรวจ dengue viral genome ในเนื้อเยื่อ โดยการสกัด RNA ของ dengue virus จากเนื้อเยื่อยุงแต่ละตัวโดยใช้ Trizol ตามด้วย RT-PCR method โดยใช้ OneStep QIAGEN RT-PCR method จัดว่าเป็นวิธีที่ sensitivity สูง[76] เพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้อง (accurate) การวิเคราะห์ข้อมูล จึงเก็บข้อมูลจาก การตรวจวัดผลการปฏิบัติการทางโมเลกุล (RT-PCR) ได้ผล (-ve) dengue viral genome ในเนื้อเยื่อส่วนลำตัวของยุงลายแต่ละตัว รวมทั้งทำการเปรียบเทียบกับ gene ของ *Ae. aegypti* (defensinA, house keeping gene) เป็น internal control เพื่อแสดงคุณภาพของเนื้อเยื่อและ RNA ของไวรัสเด็งกีในตัวอย่างก่อนการแปลผลให้ผลบวก (+ve) *Ae. aegypti* genome การศึกษาพฤติกรรมการดื่มปัสสาวะ (urine sucking) การเฝ้าสังเกตพบว่ายุงมีพฤติกรรมการดื่มปัสสาวะในช่วง 1 วันที่ปล่อยยุงลายเข้าสู่กรง (หลังจากอดอาหารเป็นเวลา 48 ชม.) หลังจากนั้น 14 วัน ทำการตรวจ dengue viral RNA genome (OneStep RT-PCR) D1,D2 primer พบว่าไม่สามารถตรวจหาจีโนม ของ DENV ได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบจีโนมของ DENV ด้วย conventional method ยุงลายอาจมีพฤติกรรมการดื่มปัสสาวะ แต่อาจได้รับไปในปริมาณต่ำ ทำให้ไม่สามารถตรวจหาจีโนมด้วย วิธี conventional RT-PCR ได้ จากงานวิจัยของ Haninah AU และคณะ (2010) ทำการเปรียบเทียบการตรวจหา CHIKV ในเนื้อเยื่อยุงลายโดย conventional RT-PCR กับ quantitative Real time RT-PCR พบว่า สามารถตรวจหาปริมาณไวรัสในเนื้อเยื่อยุงลายในระดับ 1.3-3.4 × 10 copies/µl แต่ไม่สามารถ amplified virus ด้วย วิธี conventional RT-PCR ได้[77] ดังนั้นผู้ทำการวิจัยควรหาวิธีตรวจหาจีโนมของไวรัสเด็งกี ในเนื้อเยื่อที่มีความ sensitive มากขึ้น เพื่อพิสูจน์โอกาสที่ยุงลายมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี จาก ปัสสาวะโดยวิธีตามธรรมชาติ (urine sucking)

จากการทดลอง หากสามารถพิสูจน์ได้ว่า ไวรัสเด็งกียังคงมีชีวิตหลงเหลืออยู่ในปัสสาวะผู้ป่วย และเมื่อเกิดการปนเปื้อนไปในสิ่งแวดล้อม โอกาสที่ยุงลายจะรับเชื้อไวรัสดังกล่าวจากการดื่มปัสสาวะที่มีเชื่อไวรัสที่มีชีวิตอยู่นั้นเข้าไป เป็นผลให้ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนภายในยุงลาย และสามารถ

แพร่กระจายต่อไปยังคนได้ ที่สำคัญกว่านั้นไวรัสเด็งกีที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมโดยไม่มีโฮสต์ให้อาศัยในช่วงระยะเวลาหนึ่ง หากสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ยุงลายและเพิ่มจำนวนได้ย่อมมีโอกาสที่จะกลายพันธุ์ได้ เป็นไปได้ที่จะเพิ่มความรุนแรงของเชื้อไวรัสได้ด้วยเช่นกัน ดังนั้นการศึกษาต่อไปในอนาคตจึงควรทำศึกษาการเปลี่ยนแปลงจีโนมในระดับยีน (gene mutation) ของเชื้อไวรัสเด็งกีที่ติดเชื้อเข้าสู่ยุงลายโดยผ่านการดื่มปัสสาวะต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. Cell Mol Life Sci 2010;67:2773-86.

2. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. Geneva: WHO; 2009.

3. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988;239:476-81.

4. Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:2395-400.

5. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. Lancet Infect Dis 2002;2:33-42.

6. Kuno G. Review of the factors modulating dengue transmission. Epidemiol Rev 1995;17:321-35.

7. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. J Virol 2000;74:3227-34.

8. Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Thisayakorn U, Scott RM, et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. Am J Trop Med Hyg 2003;68:191-202.

9. Harrington LC, Edman JD, Scott TW. Why do female Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? J Med Entomol 2001;38:411-22.

10. Scott TW, Amerasinghe PH, Morrison AC, Lorenz LH, Clark GG, Strickman D, et al. Longitudinal studies of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: blood feeding frequency. J Med Entomol 2000;37:89-101.

11. Scott TW, Morrison AC. Aedes aegypti density and the risk of dengue-virus transmission. In: Takken W, Scott TW, editors. Ecological Aspects for Application of Genetically Modified Mosquitoes. Dordrecht, The Netherland: Springer; 2003. p. 187-206.

12. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 1998;11:480-96.

13. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. J Infect Dis 1997;176:322-30.

14. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. J Virol 2006;80:11418-31.

15. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. J Infect Dis 2004;189:1411-8.

16. Gubler DJ. Dengue. In: Monath TP, editor. The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. Boca Raton, florida: CRC Press; 1988. p. 223-60.

17. Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. Med Clin North Am 2008;92:1377-90, x.

18. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. Yale J Biol Med 1970;42:311-28.

19. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. Am J Epidemiol 1984;120:653-69.

20. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. Am J Epidemiol 2000;152:793-9; discussion 804.

21. Halstead SB. Pathophysiology and pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever In: Thongcharoen P, editor. Monograph on Dengue / Dengue Hemorrhagic Fever. New Delhi, India: WHO SEARO; 1993. p. 80-103.

22. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. Rev Infect Dis 1989;11 Suppl 4:S830-9.

23. Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. Vaccine 2005;23:849-56.

24. Nimmannitya S, Halstead SB, Cohen SN, Margiotta MR. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg 1969;18:954-71.

25. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Lancet 1998;352:971-7.

26. Srikiatkhachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, Kalayanarooj S, et al. Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. Pediatr Infect Dis J 2007;26:283-90; discussion 91-2.

27. Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever. New York: CAB International; 1997. p. 313-33.

28. 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.

29. PAHO. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Washington, DC: Pan American Health Organization; 1994.

30. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1997.

31. Chanama S, Anantapreecha S, A An, Sa-gnasang A, Kurane I, Sawanpanyalert P. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. J Clin Virol 2004;31:185-9.

32. Coon AH, Creech HJ, Jone NR. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. Exp Biol Med (Maywood) 1941;47:200-2.

33. Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J Exp Med 1950;91:1-13.

34. Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. Immunochemistry 1971;8:1081-3.

35. Mason DY, Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. J Clin Pathol 1978;31:454-60.

36. Nakane PK, Pierce GB, Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. J Histochem Cytochem 1966;14:929-31.

37. Hayat A. Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas: Molecular Genetics, Gastrointestinal Carcinoma, and Ovarian Carcinoma: Elsevier Science; 2006.

38. Buchwalow IB, Böcker W. Immunohistochemistry: Basics and Methods: Springer Berlin Heidelberg; 2010.

39. Adams JC. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. J Histochem Cytochem 1992;40:1457-63.

40. Avrameas S, Uriel J. [Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application]. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 1966;262:2543-5.

41. Bondi A, Chieregatti G, Eusebi V, Fulcheri E, Bussolati G. The use of β-galactosidase as a tracer in immunocytochemistry. Histochemistry 1982;76:153-8.

42. Delves DJ, Martin SJ, D.R. B, I.M. R. Roitt's Essential Immunology, Includes Desktop Edition. 12 ed: Wiley-Blackwell; 2011.

43. Suffin SC, Muck KB, Young JC, Lewin K, Porter DD. Improvement of the glucose oxidase immunoenzyme technic. Use of a tetrazolium whose formazan is stable without heavey metal chelation. Am J Clin Pathol 1979;71:492-6.

44. Polak JM, Van Noorden S. Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology: Elsevier Science; 2014.

45. McDonald JW, Pilgram TK. Nuclear expression of p53, p21 and cyclin D1 is increased in bronchioloalveolar carcinoma. Histopathology 1999;34:439-46.

46. Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S, Farrar J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, 2nd Edition: CABI; 2014.

47. Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. Trans R Soc Trop Med Hyg 2007;101:738-9.

48. Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvao LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. Virol J 2010;7:22.

49. Fagbami AH, Mataika JU, Shrestha M, Gubler DJ. Dengue type 1 epidemic with haemorrhagic manifestations in Fiji, 1989-90. Bull World Health Organ 1995;73:291-7.

50. Laosakul C, Sriprapun M, Chaiyo K, Krajiw S, Chansinghakul D, Suwanpimolkul G, et al., editors. Prolonged survival of dengue virus in blood and excretion

in urine after clinical recovery. 19th ECCMID 2009 May 16-19, 09; Helsinki, Finland: Clinical Microbiology and Infection.

51. Yingsiwaphat V, Siriyasatien P, Arunyingmongkol K, Krajiw S, Pupaibool J, Nisalak A, et al., editors. Survival of dengue virus in the urine of acutely-infected

patients – implications for pathogenesis and for a possible unrecognized

mode of transmission for an arthropod-borne virus. The 17th ECCMID; 2007 -Mar 31-Apr-3,07; Munich, Germany.

52. Virus in urine. Br Med J 1967;1:126.

53. Pongsuchart P. Detection of dengue virus infection in buccal cells and urine sediments from acutely-infected patients by cellular and molecular [Thesis]. Bangkok: Chulalongkorn University; 2008.

54. Padmanabhan R, Vasudevan SG. Dengue: Methods and Protocols: Springer New York; 2014.

55. Goncalvez AP, Engle RE, St Claire M, Purcell RH, Lai CJ. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:9422-7.

56. Wong SS, Abd-Jamil J, Abubakar S. Antibody neutralization and viral virulence in recurring dengue virus type 2 outbreaks. Viral Immunol 2007;20:359-68.

57. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. Am J Trop Med Hyg 1982;31:830-6.

58. Pupaibool J, Jaimchariyatam N, Krajiw S, Arunyingmongkol K, Suandork P, Prommalikit O, et al., editors. Diagnosis of dengue infection by enzyme-linked

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

immunosorbent assay and reverse transcriptionnested

polymerase chain reaction from dried

urine spots on filter paper. The 15 th ECMID; 2005 April 2-5,05; Copenhagen, Denmark Clinical Microbiology and Infection.

59. G. Suwanpimolkul CP, C. Kittitrakul, S. Krajiw,, K. Arunyingmongkol CP, U. Thisyakorn, W. Kulwichit, editors. Early diagnosis of dengue infection using blood and

non-blood specimens: a pilot study. 18th ECCMID, Posters; 2008 April 19-22, 08; Barcelona, Spain.

60. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Tangnararatchakit K, Yoksan S, Flamand M, Sakuntabhai A. Dengue nonstructural protein 1 antigen in the urine as a rapid and convenient diagnostic test during the febrile stage in patients with dengue infection. Diagn Microbiol Infect Dis 2011;71:467-9.

61. Phanthanawiboon S, A An, Panngarm N, Limkittikul K, Ikuta K, Anantapreecha S, et al. Isolation and propagation of Dengue virus in Vero and BHK-21 cells expressing human DC-SIGN stably. J Virol Methods 2014;209:55-61.

62. Medina F, Medina JF, Colon C, Vergne E, Santiago GA, Munoz-Jordan JL. Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. Curr Protoc Microbiol 2012;Chapter 15:Unit 15D.2.

63. Standard operating procedures: rearing Aedes aegypti for the HITSS and Box laboratory assays [Internet]. USUHS. 2009 [cited April, 2009]. Available from: www.usuhs.mil/pmb/gsac.

64. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. J Virol 2000;74:7814-23.

65. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:545-51.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

66. Cho WL, Fu YC, Chen CC, Ho CM. Cloning and characterization of cDNAs encoding the antibacterial peptide, defensin A, from the mosquito, Aedes aegypti. Insect Biochem Mol Biol 1996;26:395-402.

67. Magalhaes T, Oliveira IF, Melo-Santos MA, Oliveira CM, Lima CA, Ayres CF. Expression of defensin, cecropin, and transferrin in Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) infected with Wuchereria bancrofti (Spirurida: Onchocercidae), and the abnormal development of nematodes in the mosquito. Exp Parasitol 2008;120:364-71.

68. Peters SR, Delia CS. Fixation, Stining and Cover Sliping of Frozen Section Slide. In: Peters SR, editor. A Practical Guide to Frozen Section Technique. New York, USA: Springer; 2010. p. 117-22.

69. Cormack DH. Essential Histology: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

70. Wu X, Hong H, Yue J, Wu Y, Li X, Jiang L, et al. Inhibitory effect of small interfering RNA on dengue virus replication in mosquito cells. Virol J 2010;7:270.

71. Salazar MI, Richardson JH, Sanchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected Aedes aegypti mosquitoes. BMC Microbiol 2007;7:9.

72. Junjhon J, Pennington JG, Edwards TJ, Perera R, Lanman J, Kuhn RJ. Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. J Virol 2014;88:4687-97.

73. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. J Clin Microbiol 2012;50:2047-52.

74. Rosen L, Gubler D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. Am J Trop Med Hyg 1974;23:1153-60.

75. Austin JR, 2nd. High-pressure freezing and freeze substitution of Arabidopsis for electron microscopy. Methods Mol Biol 2014;1062:473-86.

76. Kramer LD, Wolfe TM, Green EN, Chiles RE, Fallah H, Fang Y, et al. Detection of encephalitis viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and avian tissues. J Med Entomol 2002;39:312-23.

77. Ummul Haninah A, Vasan SS, Ravindran T, Chandru A, Lee HL, Shamala Devi S. Development and evaluation of a one-step SYBR-Green I-based real-time RT-PCR assay for the detection and quantification of Chikungunya virus in human, monkey and mosquito samples. Trop Biomed 2010;27:611-23.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับสำหรับงานด้านเพาะเลี้ยงเซลล์ (Tissue culture)

1. Autoclavable 250ml, 500ml, 1L bottles (Duran Bottles)
2. 100ml, 200ml, 1 L และ 2 L Erlenmeyer flasks
3. 25 v/c, 75 v/c Corning plastic cell culture flasks
4. Tissue culture : 6-well, 12-well and 24-well plates ,flat bottoms with lids, sterile

- ปริมาตรภายใน microplate ต่อ หลุม คือ

  6-well - 17.7ml

  12-well - 6.76ml

  24-well - 3.5ml

- พื้นที่ภายใน microplate ต่อ หลุม คือ

  6-well - 9.61cm^2

  12-well - 3.7cm^2

  24-well - 2.0cm^2

5. Hot plate stirrer และ Magnetic stirrer ขนาดใหญ่, กลาง และเล็ก
6. pH meter
7. Aerosol barrier tips for 10, 20, 100, 200 และ 1,000 µl micropipette
8. Pipette boy controller
9. 1ml, 5ml และ 10 ml Sterile disposable pipettes for pipette aid
10. Biosafety cabinet class II

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

11. Water Bath

12. Centrifuge 5804R ; eppendorf

13. Freezer (-30° C และ-70°C)

14. refrigerator

15. Mixer,Vortex; VM-10 wise mix

16. เครื่องชั่งสาร (SI-234; Denver instrument)

17. Biosafety cabinet class II

18. Incubator 28 °C และ CO_2 incubator 37°C

19. Light microscope และ inverted microscope

20. Hot air oven

21. liquid nitrogen tank สำหรับเก็บเซลล์

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อยุงลาย (RNA Extraction)

1. PureZol™ RNA Isolation Reagent (BIO-RAD) Cat.# 732-6890
2. Chloroform ($CHCl_3$), (BDH Chemical) Cat. # 102445
3. Sodium acetate (CH3COONa), (SIGMA-ALDRICH) Cat. # S2889
4. Absolute Ethanol (C_2H_5OH), (Merck Millipore) Cat. # 107017
5. 2-Propanol ($CH_3CH(OH)CH_3$), (Merck Millipore) Cat. # 109634
6. 50 ml Corning® 430829 Sterile 50mL Plastic Conical Centrifuge Tube
7. 15 ml Corning® 430790 Sterile 15mL Plastic Conical Centrifuge Tube

8. Grinder , RNase (Sterile)
9. DEPC, diethyl pyrocarbonate (Sigma)
10. Centrifuge
11. Vortex (Mixer)
12. Micro centrifuge สำหรับ spin down
13. Mechanical pipette ขนาด 1000, 200, 10 µl
14. Class II Biohazard Safety Cabinet (ตู้สำหรับสกัด RNA)
15. Spectrophotometer (Nano Drop)
16. Freezer (-70ºC) และ (-20ºC)

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับงานด้าน Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

1. RNA suspension ที่ต้องการตรวจหา และเก็บไว้ที่ -70ºC
2. dengue primers ได้แก่ primers D1, D2, TS1, TS2, TS3, TS4 แต่ละ primers ที่ใช้เป็น working primer ความเข้มข้น 10 pmol/µl เก็บที่ -30 ºC
3. HotStarTaq Plus DNA Polymerase (QIAGEN) cat. No. 203603
4. QIAGEN-One-Step RT-PCR kit (25) Lot no. 210210 ประกอบด้วยชุดน้ำยาดังนี้
    - 4.1 QIAGEN-One Step RT-PCR enzyme mix
    - 4.2 5X QIAGEN-One Step RT-PCR buffer
    - 4.3 dNTP Mix

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4 5X Q-Solution

4.5 RNase Free water

5. QIAGEN Taq DNA polymerase (250U) for standard and specialized PCR application Lot no.201203 ประกอบด้วยชุดน้ำยาดังนี้

5.1 10X PCR buffer

5.2 5X Q solution

5.3 25 mM $Mgcl_2$ solution

6. QIAGEN Hot Start taq Plus DNA Polymerase (250) lot no. 203603

7. Fermentas® Maxima Hotstart Taq DNA Polymerase #EP0601 100U

7.1 10X Hot start Taq PCR buffer

7.2 Taq DNA Enzyme Polymerase (5U/µl)

7.3 25 mM $Mgcl_2$ solution

8. UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water Catalog number: 10977-023

9. Agarose, low gelling temperature Catalog number: A-9414 (Zigma)

10. Gene Ruler 100 bp DNA Ladder ready-to-use (Thermo Scientific) Catalog # SM 0244 concentration 0.1µg/µl + 1ml (6X DNA loading gel)

11. 10X TBE Buffer (Tris, Ultra Pure, Molecular Biology Grade (Research Organics), Cat # 9680T, Lot #: B89195

12. 1.5mL Conical bottom, Screw Cap Tubes Axygen® Catalog #SCT-150-C

13. 1.5 ml clear microtubes (Axygen®) A Corning Brand , Part no. : MCT-150 , 311-08-051
14. Universal Filtered Pipet Tips, 1000 microliter, Clear PP, RNase/DNase-Free, Racked, Sterile, Axygen Catalog #TF-1000-R-S
15. Filtered Pipet Tips 200µl, Filter, Sterile, Axygen Catalog # TF-200-R-S
16. Filtered Pipet Tips 20µl, Filter, Sterile, Axygen Catalog # TF-20-R-S
17. Filtered Pipet Tips 10µl, Filter, Sterile, Axygen Catalog # TF-300-R-S
18. Disposable glove (size XS)
19. PCR Cabinet with UV light box
20. Micropipette (Calibrated) ขนาด 10, 20, 100, 200, 1000 µl)
21. Racks for transferring 0.5, 1.5 ml tubes
22. Micro centrifuge
23. Vortex
24. DNA Thermocycler
25. Microwave oven
26. Set of gel electrophoresis apparatus
27. Power supply
28. Gel documentation system (Gel imaging and analysis system)
29. Compact Digital Monochrome Printer

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับงานด้าน Immunohistochemistry

1. Plus slide หนา 1.0 mm (positive charged microscope slide, HDA)
2. Cover glass ขนาด 22×22 mm, หนา 0.17 mm (HAD)
3. Sterile surgical blades (Surgi-Cut)
4. Disposable gloves
5. Tips ขนาด 2 µl, 20 µl, 200 µl และ 1000 µl (Axygen)
6. Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml
7. Eppendorf tube ขนาด 0.2 ml
8. Centrifuge tubes ขนาด 15 ml และ 50 ml
9. Forceps
10. Coupling jar

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารเคมีและน้ำยาสำหรับงานด้าน Immunohistochemistry

1. Mouse anti-dengue monoclonal antibody complex (MAB8705 ; chemicon, Temecula, CA)

   Concentration : 1 mg/ml

   Specificity : ทำปฏิกิริยากับ dengue virus ทุก serotype (reacts with all members of dengue complex.

   Immunogen : dengue type 4 virus antigen

   : IgG2a

Application : Suggested working dilution : 1:200

2. Negative control (IgG_2a) Mouse monoclonal antibody ; purified antibody ; MABC 004 ; Chemicon, Temecula, CA) , clone : GC270, Isotype IgG_2a, Concentration : 0.5 mg/ml

   Specificity : ทำปฏิกิริยาที่ส่วน outer membrane ของแบคทีเรีย ชนิด *Neiserria gonorrhoeae* บาง strain และไม่ทำปฏิกิริยาต่อ human cell surface และ plasma component แต่อาจจับกับ Fc receptors ของ human cell ได้

   Immunogen : เตรียมได้จาก protein I ของ *Neiserria gonorrhoeae*

   : IgG2a

   Application : suggested working dilution 1 : 100

3. Secondary antibody (Goat anti-mouse IgG2a(Y2A), horseradish peroxidase conjugate

   Catalog. No.A10685 (life technologies)

4. DAB substrate (Vector Laboratory) Catalog. No. sK-4100

5. Hematoxylin (ready to use) from Bio-optica fast H&E Catalog. No. W01030799

6. Normal Goat serum Catalog. No. S26 (chemicon)

7. Absolute ethanol (histochemical grade)

8. 95% Ethanol Xylene (histochemical grade)

9. Acetone

10. Phosphate buffer saline (PBS pH 7.2 only) for diluent

11. Tris Buffer Saline + TWEEN 20 (0.05%) for washing

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

12. Distilled Water

การเตรียมน้ำยาสำหรับ Immunohistochemistry

1. Phosphate Buffer Saline (PBS 1X) pH 7.2

   ใช้ D.W. ปริมาตร 800 ml ละลายสารดังนี้

   - NaCl 8.0 g
   - KCl 0.2 g
   - Na_2HPO_4 1.44 g
   - KH_2PO_4 0.24 g

   ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 ml adjust pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 7.2

2. Tris Buffer Saline (10X Stock) pH 7.6 diluted 1: 10 ด้วย DW ก่อนใช้

   ใช้ D.W. ปริมาตร 800 ml ละลายสารดังนี้

   - Tris 60.6 g
   - NaCl 87.6 g

   ปรับ pH 7.6 และปรับปริมาตรรวม 1000 ml ด้วย D.W.

3. DAB (3,3’ diaminobenzidine) peroxidase substrate kit vector Laboratory cat. No. SK-4100 การเตรียม DAB substrate เพื่อใช้เป็น working solution

   ต้องการเตรียมจาก PBS 7.2 สัดส่วนปริมาตร 5 ml

   - หยด 2 drops (ประมาณ 84 µl) ของ Buffer Stock Solution
   - หยด 4 drops (ประมาณ 100 µl) ของ DAB Stock Solution

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- หยด 2 drops (ประมาณ 80 µl) ของ Hydrogen Peroxide

จะได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน * ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้*

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media)

สำหรับ LLC-MK_2

- เป็นเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อไตลิง สายพันธุ์ Macaca mulatta
- โครงสร้าง (Morphology) epithelial
- คุณสมบัติ (Properties) adherent
- สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete growth medium)
  - Medium 199 (Powder) Gibco® Cat. No. 31100-027

    Lot No . 1242669 (9.5g)/1 ซอง
  - Sodium bicarbonate (Na_2HCO_3) 2.2 g.
  - Distilled Water 1000 ml
  - Fetal Bovine Serum (FBS) Gibco® Cat. No. 26140-079

    Inactivated FBS ที่ 56ºC 30 นาที ก่อนใช้ (10%) 100 ml
  - Penicillin-Streptomycin Gibco® Cat. No. 15140-122

    10,000U/ml (1%) 10 ml

ละลาย Na2HCO3 ใน D.W. นึ่งฆ่าเชื้อก่อน เติม medium powder

กรองผ่านกระดาษกรอง media ขนาด 0.44 µm เก็บที่ 4 ºC shelf life 3 เดือน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สำหรับ C6/36

- เป็นเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อตัวอ่อน (larva) ของยุงลายชนิด *Aedes albopictus*
- โครงสร้าง (Morphology) epithelial
- คุณสมบัติ (Properties) adherent
- สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete growth medium)
  - MEM (powder) Gibco® Cat. No. 41500-067

    Lot No . 1301231 (9.6g)/1 ซอง
  - Distilled Water 1000 ml
  - Fetal Bovine Serum (FBS) Gibco® Cat. No. 26140-079

    Inactivated FBS ที่ 56°C 30 นาที ก่อนใช้ (10%) 100 ml
  - Sodium Pyruvate (100mM) Gibco® Cat. No. 11360-070

    10 ml
  - HEPE Gibco® Cat. No. 15630-080 10 ml
- ปรับ pH ด้วย Sodium bicarbonate (Na_2HCO_3) {10%w/v} sterile ค่อยๆ หยด สังเกตจากสี media เป็นสีส้ม เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้จะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

รายละเอียดเกี่ยวกับผู้วิจัย

ชื่อผู้วิจัยหลัก

ภาษาไทย นางสาว อาธิกยา สว่างวารี นักศึกษาปริญญาโท

ภาษาอังกฤษ ARTIKAYA SAWANGVAREE

เกิดเมื่อวันที่ 6 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2526 ณ จังหวัด ปัตตานี

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สถาบันการศึกษา	สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	คณะวิทยาศาสตร์	2548
	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University