ภาคผนวก
ปฏิบัติการเกี่ยวกับไวรัสพีอาร์อาร์เอส
(PRRS laboratory techniques)

เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immuno-histochemistry) (พรทิพย์ และคณะ, 2547)

การย้อมสีอิมมูโนฮิสโตเคมี ด้วยวิธี Peroxidase-anti-peroxidase (PAP)

1. ขจัดพาราฟินและเอาน้ำออกจากเนื้อเยื่อตามขั้นตอน

2. ทำการเปิดเผยแอนติเจน (Antigen retrieval treatment) ด้วย Trypsin ความเข้มข้น 0.1% ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วล้างด้วย Phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3. ทำการหยุดผลของปฏิกิริยาจาก Non-specific endogenous peroxidase binding ด้วยH_2O_2 ความเข้มข้น 0.3% ในเมธานอลสัมบูรณ์ (Absolute methanol) ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

4. ระงับผลของปฏิกิริยาจากการติดสีที่ไม่จำเพาะอื่นๆ โดยการใช้ 10% ของแอลบูมินจากซีรัมวัว (Bovine serum albumin) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

5. ทำปฏิกิริยาต่อกับ แอนติบอดีต่อโรคพีอาร์อาร์เอส อาจใช้ Monoclonal antibody หรือ Polyclonal antibodies ตามความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ ในที่นี้แนะนำให้ใช้ SDOW-17 (South Dakota State University, USA) เนื่องจากมีความจำเพาะต่อทั้งสองสายพันธุ์ของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (สายพันธุ์อเมริกาและสายพันธุ์ยุโรป) ที่ระดับความเข้มข้น 1:1000 ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-14 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยดสารละลาย PAP (MAX-PO, Nichirei, Japan) 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

6. ทำให้เกิดสีโดยจุ่มใน 0.05% DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6, Sigma, USA) ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วย้อมทับด้วยสี Meyer's hematoxylin นาน 35 วินาที

7. ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง เซลล์ที่ให้ผลบวกในแต่ละชิ้นเนื้อซึ่งหมายถึงเซลล์ที่พบแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (PRRSV-positive cells) จะติดสีน้ำตาลเข้มที่ไซโทพลาซึม โดยเฉพาะเซลล์กลืนกินชนิดมาโครฟาจ (รูปที่ 5.2) การทดสอบควรใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากสุกรที่ไม่ติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส เป็นตัวควบคุมลบ ส่วนตัวควบคุมบวกใช้เนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลืองจากสุกรที่ทราบว่ามีแอนติเจนต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

สารเคมีที่ใช้

1. Monoclonal Antibody (ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละสายพันธุ์)
2. Anti - Mouse IgG Conjugate (Dako, USA)
3. 4 % Formaldehyde (40% Formaldehyde 0.4 มิลลิลิตร : PBST 9.6 มิลลิลิตร)
4. Amino acid-9-Ethyl-carbazole (AEC)
5. 30% Hydrogen peroxide (H_2O_2)
6. Acetate buffer

การเตรียมสารละลาย

1. .สารละลาย Phosphate buffer saline-Tween 0.5% (0.5% PBST)

1.1 เจือจาง 20 x PBS. 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 2 ลิตร

1.2 เติม Tween 20 (Polyoxyethylene 20 sorbitan monolauratal) 10 มิลลิลิตร

1.3 ผสมให้เข้ากัน

2. สารละลาย Acetate buffer

2.1 Stock A 0.1 M. Acetic acid Glacial acetic acid 5.75 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.2 Stock B 0.1 M. Sodium acetate Sodium acetate 13.161 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.3 นำ Solution A 21 มิลลิลิตร Solution B 79 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. สารละลาย Amino acid-9-Ethyl-carbazole (AEC)

3.1 AEC 4 กรัม

3.2 Dimethyl formalin 100 มิลลิลิตร ละลายเข้ากัน ใส่ในขวดทึบแสง เก็บที่ตู้แช่ -20°C

การเพาะแยกเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

(Thanawongnuwech et al., 2004)

1. เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงจากไตลิง African green monkey ชนิด MA-104 หรือ MARC 145 มาเพาะเลี้ยงใน Tissue cell disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร หรือจานเลี้ยงเซลล์ชนิดหกหลุม (6-well-plate) โดยใช้ ความเข้มข้นของเซลล์ประมาน 106 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากคัพภะลูกวัว (Fetal bovine serum) ความเข้มข้น 5%

2. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 48 ชั่วโมง หรือจนเซลล์โตเต็มที่และมีการเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (Monolayer cells)

3. นำสิ่งส่งตรวจ (ซีรัม น้ำล้างปอด หรือส่วนใสของชิ้นเนื้อบด) มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่เย็น 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1:2

4. นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ (จากข้อ 2) มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วเติมตัวอย่างส่งตรวจที่เจือจางแล้ว ให้ท่วมผิวหน้าของเซลล์เพาะเลี้ยงระวังอย่าให้แห้ง

5. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 1 ชั่วโมง

6. นำออกมาดูดตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เติมไว้ออก จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากคัพภะลูกวัวความเข้มข้น 2% ตามความเหมาะสม

7. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 48 ชั่วโมง หรือเมื่อสังเกตพบพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงหรือ ซีพีอี (Cytopathic effect, CPE) เก็บโดยหุ้มด้วยกระดาษพาราฟิน แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำออกมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำเช่นนี้สลับกัน 3 รอบ ก่อนที่จะเก็บแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ทดสอบต่อไป อาจทำซ้ำข้อที่ 4-7 อย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อความมั่นใจก่อนการทดสอบตรวจหาแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ด้วยวิธีไอเอฟเอ (Indirect immunofluorescent test) (รูปที่ 5.1a) หรือวิธีไอพีเอ็มเอ (Immunoperoxidase monolayer assay) (รูปที่ 5.1b) และตอบผลการแยกเชื้อว่าเป็นลบ ในกรณีที่ไม่สามารถแยกเชื้อได้ในขั้นต้น

8. เตรียมเซลล์ MARC-145 มาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well-plate) เช่นเดียวกับข้อ 1-2 โดยเติมปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 106 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากคัพภะลูกวัว ความเข้มข้น 5% รอจนเซลล์เรียงตัวเป็นชั้นเดียว

9. นำสารละลายที่เพาะเชื้อไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจไว้ (จากข้อ 7) ออกมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. ดูดส่วนที่ละลายแล้วทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส (Supernatant) ไว้ทดสอบตรวจหาเชื้อไวรัส

11. นำจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จากข้อ 8 มาดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าทิ้ง

12. เติมส่วนใสของตัวอย่างส่งตรวจ (จากข้อ 10) ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร

13. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 1 ชั่วโมง

14. นำจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมนี้ ออกมาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากคัพภะลูกวัวความเข้มข้น 2% หลุมละ 100 ไมโครลิตร ได้ปริมาตรสุทธิ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม

15. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะมีพยาธิสภาพของเซลล์ไม่ต่ำกว่า 80 %

16. นำไปตรวจหาแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยการย้อมสีด้วยวิธีไอพีเอ็มเอ

การย้อมสีโดยวิธีไอพีเอ็มเอ (Immunoperoxidase monolayer assay, IPMA) (ศศิวิมล และคณะ, 2547)

1. นำจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่พร้อมจะตรวจหาแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส มาสะบัดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้หมด ทำการตรึงสภาพเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย 4% ฟอร์มาลิน ที่ทำการเจือจางโดยใช้ 0.5% PBST ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20-30 นาที

2. สะบัดฟอร์มาลิน ออกให้หมดจนแห้งด้วยกระดาษซับ แล้วล้างด้วย 0.5% PBST ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ต่อหลุมทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งที่ 3 ให้แช่ทิ้งไว้ 3 - 5 นาที

3. เติมแอนติบอดีปฐมภูมิ (Primary antibody) ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส อาจใช้ Monoclonal antibody หรือ Polyclonal antibody อัตราส่วน 1:300 หรือตามความเหมาะสมที่ได้ทำการทดสอบแล้ว กับแอนติบอดีนั้นๆ โดยเจือจางด้วย 0.5% PBST ที่มีแอลบูมินจากซีรัมวัวความเข้มข้น 1% ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง ใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง

4. สะบัดจานเลี้ยงเชื้อชนิด 96 หลุมให้แห้งแล้วล้างด้วย 0.5% PBST เหมือนข้อ 2

5. เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (Secondary antibody) ซึ่งอาจใช้ Antimouse IgG Conjugate (Dako, USA) ในอัตราส่วน 1:300 หรือที่เหมาะสม โดยเจือจางด้วย 0.5% PBST ที่มี 1% BSA ใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ในกรณีที่ใช้ Polyclonal antibodies เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ ควรเลือกใช้ชนิดของแอนติบอดีทุติยภูมิต่ออิมมูโนกลอบูลินของสัตว์ที่เป็นตัวให้แอนติบอดีปฐมภูมิ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

6. สะบัดจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมให้แห้ง แล้วล้างด้วย 0.5% PBST เหมือนข้อ 2

7. เติมซับสเตรต (Substrate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่มีส่วนประกอบดังนี้

AEC : acetate buffer : 30% H_2O_2 ในอัตราส่วน 1 มล. : 19 มล. : 20 ไมโครลิตร (ปริมาตรนี้ใช้กับตัวอย่างทั้งหมดในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม 2 จาน) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

8. ล้างด้วยน้ำ 1 ครั้ง จึงสะบัดให้แห้ง รออ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทุกครั้งที่ทำการย้อมสีไอพีเอ็มเอ จำเป็นต้องมีหลุมที่เป็นตัวควบคุมบวกและหลุมที่เป็นตัวควบคุมลบเสมอ

การอ่านผล

ผลบวก ติดสีน้ำตาลแดงภายในไซโทพลาซึมของเซลล์

ผลลบ ไม่ติดสีภายในไซโทพลาซึมของเซลล์

การตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยวิธี Virus Titration

1. เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง MA-104 หรือ MARC-145 มาเพิ่มจำนวน ตามปริมาตรที่ต้องการให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 106 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากคัพภะลูกวัวความเข้มข้น 5%

2. นำมาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ใส่หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำเข้าบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 48 ชั่วโมง หรือจนเซลล์โตเต็มที่มีการเรียงตัวเป็นชั้นเดียว

3. นำสารละลายที่เพาะเชื้อไวรัสที่ต้องการตรวจความเข้มข้นออกมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนที่ละลายแล้วทั้งหมดไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสไว้ทดสอบ

4. นำไวรัสที่ละลายแล้ว มาทำการเจือจางตามลำดับแบบ10 เท่า (10-flow dilution) ตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} จนถึงความเข้มข้น 10^{-8} ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MEM ที่ 4 องศาเซลเซียส ในหลอดทดลองหรืออาจใช้จานเลี้ยงเชื้อชนิด 48 หลุม

5. นำเซลล์เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จากข้อ 2 มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง

6. เติมไวรัสที่ได้เจือจางแล้วแต่ละความเข้มข้นลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำ 6 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเกาะและผ่านเข้าเซลล์

7. จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากคัพภะลูกวัว 2% หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 48-72 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสไม่น้อยกว่า 80%

8. นำไปตรวจหาแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยการย้อมสีด้วยวิธีไอพีเอ็มเอ

9. นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของไวรัส คำนวณความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธีของ Reed and Muench (1938) ซึ่งมีหน่วยเป็น $TCID_{50}$ (Tissue culture infective dose)/มิลลิลิตร

การคำนวณความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธี Reed and Muench

วิธีคำนวณค่าระดับความเข้มข้นของไวรัสโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์หรือ ซีพีอี (Cytopathic effect, CPE) หรือจากการย้อมดูแอนติเจนของไวรัส โดยวิธีย้อมสีไอเอฟเอ หรือวิธีย้อมสีไอพีเอ็มเอ การคำนวณมีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้คือ วิธีของ Reed and Muench (1938) ดังตัวอย่าง

ความเจือจางของไวรัส	หลุมที่ 1	2	3	4	5	6
10^{-1}	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	-	+	+	+	+
10^{-6}	-	+	-	-	+	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	

\+ = เกิดซีพีอี - = ไม่เกิดซีพีอี

จากตัวอย่างการทดสอบข้างต้น เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในแต่ละหลุม ของไวรัสแต่ละความเจือจางแล้ว นำผลการทดสอบของแต่ละความเจือจาง ที่ให้ซีพีอี 100% จนถึงความเจือจางที่ไม่ให้ซีพีอีเลย ทำตารางการคำนวณ ทั้งค่าที่สังเกตเห็นจริง และค่าสะสม ดังตัวอย่าง

ความเจือจางของไวรัส	ค่าที่สังเกตเห็น				ค่าสะสม			
	ซีพีอี	ไม่มีซีพีอี	อัตราส่วน	%	ซีพีอี	ไม่มีซีพีอี	อัตราส่วน	%
10^{-4}	6	0	6/6	100	13	0	13/13	100
10^{-5}	5	1	5/6	83	7	1	7/8	88
10^{-6}	2	4	2/6	33	2	5	2/7	29
10^{-7}	0	6	0/6	0	0	11	0/11	0

การคำนวณจะเป็นการหาค่า 50% ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งก็คือความเจือจางของไวรัสที่ให้ค่าความเข้มข้นของไวรัส มีหน่วยเป็น $TCID_{50}$/100 ไมโครลิตรของไวรัสเผื่อใช้ (Stock virus) เมื่อได้ค่านี้แล้ว สามารถคำนวณย้อนกลับไปหาความเข้มข้นของไวรัสเผื่อใช้ในหน่วยของ $TCID_{50}$ ต่อปริมาตรของสารละลาย โดยทั่วไปจะใช้ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร

วิธีนี้จะคำนวณจากค่าสะสม ซึ่งพบว่า ค่า 50% ของค่าสะสมจะอยู่ระหว่างความเจือจางที่ที่ 10^{-5} กับ 10^{-6} การคำนวณหาค่า $TCID_{50}$ ซึ่งอยู่ระหว่างความเจือจางทั้ง 2 ทำได้โดยการหาค่า Proportionate distance (PD) โดยกำหนดให้

A = % สะสม ค่าแรกที่มากกว่า 50%

B = % สะสม ค่าแรกที่น้อยกว่า 50%

C = ความเจือจางของไวรัสที่ให้ค่า A

D = ลำดับการเจือจางไวรัส (Dilution factor) ในที่นี้ คือ 10 เท่า

แทนค่าในสูตร

$$PD = \frac{A - 50}{A - B} = \frac{88 - 50}{88 - 29} = \frac{38}{59}$$

$$= 0.64$$

เมื่อได้ค่า PD แล้วนำมาคำนวณต่อตามสูตร

Log of 50% end point

= (log C) - (PD x Log D)

= (log 10^{-5}) - (0.64 x log 10^{1})

= (-5) - (0.64 x 1)

= -5.64

แสดงว่าที่ความเจือจาง $10^{-5.64}$ ไวรัสจะมีความเข้มข้น $10^{5.64}$ $TCID_{50}$/100 ไมโครลิตร ดังนั้นไวรัสเผื่อใช้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ $10^{5.64}$ $TCID_{50}$/100 ไมโครลิตร หรือในสารละลาย 1 มิลลิลิตรจะมีไวรัสอยู่ $10^{1} \times 10^{5.64}$ หรือมีค่าเท่ากับ $10^{6.64}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร

การตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันไวรัสพีอาร์อาร์เอส โดยวิธีซีรัมนิวทรัลไลเซชั่น (Serum Neutralization) (ระพี, 2547)

1. การเตรียมเซลล์

1.1 เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง MA-104 หรือ MARC 145 มาเพิ่มจำนวน ตามปริมาตรที่ต้องการให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาน 10^{6} เซลล์ ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากคัพภะลูกวัวความเข้มข้น 5%

1.2 นำมาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ใส่หลุมละ 200 ไมโครลิตรนำเข้าบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 48 ชั่วโมง หรือจนเซลล์โตเต็มที่มีการเรียงตัวเป็นชั้นเดียว

2. การเตรียมไวรัสมาตรฐาน

2.1 เพาะเลี้ยงไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์อเมริกาและสายพันธุ์ยุโรป หรือสายพันธุ์ที่ต้องการตรวจสอบ ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MA-104 หรือ MARC 145 ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากคัพภะลูกวัวความเข้มข้น 2% เพื่อเก็บไว้เป็นไวรัสเผื่อใช้

2.2 นำมาคำนวณให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของไวรัสที่ใช้ในการทดสอบ 10^{3} $TCID_{50}$/มิลลิลิตร

3. ขั้นตอนการทดสอบนิวทรัลไลเซชั่น

3.1 นำตัวอย่างซีรัมสุกรมาอุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อการกำจัด คอมพลีเมนต์ จากนั้นจึงทำการเจือจางซีรัมตามลำดับแบบ 2 เท่า (2-fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากคัพภะลูกวัว 2% โดยใส่ในจานเลี้ยงเชื้อชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร และใส่ตัวอย่างซีรัม 100 ไมโครลิตร ในหลุมที่ 1 จากนั้น ใช้ ปิเปตต์ ดูดมา 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจางเป็นลำดับอีก 11 หลุมโดยดูดทิ้งในหลุมที่ 12

3.2 เติมไวรัสที่ต้องการทดสอบที่มีความเข้มข้น 10^3 $TCID_{50}$/มิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 1 ชั่วโมง

3.3 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง MARC- 145 ที่โตเต็มที่ทิ้ง ใช้ปิเปตต์ระบบหลายช่อง (Multichannel pipette) ดูดสารละลายที่มีส่วนผสมข้อ 3.1 (ทั้งหมด 200 ไมโครลิตร) จากจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่ทำนิวทรัลไลเซชั่นมาใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ของเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 ที่เตรียมไว้บ่มในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ความเข้มข้น 5% นาน 48 ชั่วโมง

3.4 นำไปตรวจหาแอนติเจนของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ตามขั้นตอนการย้อมด้วยวิธีไอพีเอ็มเอ

3.5 อ่านผลจากแต่ละหลุมที่เจือจางตามลำดับ เป็นค่าความต้านทานโรค ที่ไตเตอร์ 1:2, 1: 4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 และ 1:256 โดยอ่านที่หลุมสุดท้ายที่ให้ผลลบ

การตรวจแยกสายพันธุ์ไวรัสพีอาร์อาร์เอส ส่วน ORF 1b โดยวิธี Nested Multiplex RT-PCR (Thanawongnuwech et al., 2002)

การสกัด RNA โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp Viral RNA Mini Spin

1. ละลาย Carrier RNA 1 หลอดลงใน Buffer AVL 1 ขวด (Buffer AVL ที่ผสม Carrier RNA เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

2. เตรียม 1.5 ml Appendorf (DNAse free, RNAse free) ตามจำนวนตัวอย่าง โดยบันทึกหมายเลขตัวอย่างไว้ข้างหลอด

3. ดูด Buffer AVL 560 ไมโครลิตร ใส่ใน Appendorf ที่เตรียมไว้

4. เติมตัวอย่างส่งตรวจ 140 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

5. นำไปปั่นให้หยดของสารละลายรวมกันที่ก้นหลอด

6. เติม 100% Ethanol 560 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน 15 วินาที

7. นำไปปั่นให้หยดของสารละลายรวมกันที่ก้นหลอด

8. เตรียมชุด QIAamp Spin column บันทึกหมายเลขตัวอย่างไว้ด้านบนของฝาปิด Spin column

9. ดูดสารละลาย (จากข้อ 7) 630 ไมโครลิตร ใส่ใน QIAamp Spin column (ให้หมายเลขตัวอย่างถูกต้องตรงกัน) แล้วนำไปปั่น ที่ 8000 รอบต่อนาที 1 นาที

10. เทส่วนสารละลายก้นหลอดที่ผ่าน Spin column ทิ้งไป

11. ทำซ้ำข้อ 9-10 อีกรอบ จนสารละลายข้อ 7 หมดพอดี

12. เปลี่ยนหลอด 2 มิลลิลิตรของชุด QIAamp Spin column

13. เติม AW1 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที 1 นาที

14. เปลี่ยนหลอด 2 มิลลิลิตรของชุด QIAamp Spin column

15. เติม AW2 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที 3 นาที

16. เตรียม 1.5 ml Appendorf พร้อมบันทึกหมายเลขตัวอย่างให้ตรงกับหลอดข้างต้น

17. นำส่วนของ Spin column มาวางบน Appendorf ที่เตรียมไว้

18. เติม Buffer AVE 60 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

19. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที 1 นาที

20. เก็บส่วนของ Pure viral nucleic acid สำหรับไปทำ RT-PCR หรืออาจเก็บไว้ที่ -20 หรือ -70 องศาเซลเซียส

การทำ Nested Multiplex RT-PCR

1. เตรียม Master mix จากชุด Qiagen One step RT-PCR ตามสูตรดังนี้

5xQIAGEN buffer	10 ไมโครลิตร
10mM. DNTP mix	2 ไมโครลิตร
Q-solution	10 ไมโครลิตร
Primer ED (50pmol / ul)	1 ไมโครลิตร
Primer EU (50pmol / ul)	1 ไมโครลิตร
QIAGEN enz. Mix	2 ไมโครลิตร
RNAse free water	19 ไมโครลิตร

หมายเหตุ สูตรนี้สำหรับ 1 ตัวอย่าง โดยทำในน้ำแข็งตลอดเวลา

2. แบ่ง Master mix ใส่ PCR tube หลอดละ 45 ไมโครลิตร

3. เติม Pure viral nucleic acid จากขั้นตอนการสกัด ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร

4. ปิดฝาหลอด PCR ให้แน่น บันทึกหมายเลขให้ชัดเจนทุกหลอด

5. นำไปใส่เครื่อง PCR โดยมีโปรแกรมดังนี้

Reverse transcription	50°C 30 นาที	
Initial PCR activation	95°C 15 นาที	
Denaturation	94°C 20 วินาที	
Annealing	50°C30 วินาที	35 รอบ
Extension	72°C 30 วินาที	
Final extension	72°C 15 นาที	

6. เมื่อเครื่อง PCR ทำงานสิ้นสุด จะได้เป็น cDNA นำไปทำขั้นตอน Multiplex PCR ต่อไป

7. เตรียม Master mix ซึ่งใช้ในการทำ Multiplex PCR ดังนี้

10 X Buffer PCR	4.0 ไมโครลิตร
10mM. dNTP mix	0.8 ไมโครลิตร
Primer U1 (50pmol / ul)	0.5 ไมโครลิตร
Primer U2 (50pmol / ul)	0.5 ไมโครลิตร
Primer D1 (50pmol / ul)	0.25 ไมโครลิตร
Primer D2 (50pmol / ul)	0.25 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	2.5 ไมโครลิตร
Taq polymerase (5U/ul)	0.5 ไมโครลิตร
RNAse free water	38.2 ไมโครลิตร

หมายเหตุ สูตรนี้สำหรับ 1 ตัวอย่าง โดยทำในน้ำแข็งตลอดเวลา

8. แบ่ง Master mix ที่เตรียมไว้ใส่ใน PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 48 ไมโครลิตร

9. เติม cDNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

10. ปิดฝาหลอดให้สนิท บันทึกหมายเลขตัวอย่างข้างหลอดให้ถูกต้อง

11. นำไปใส่เครื่อง PCR โดยมีโปรแกรมดังนี้

Initial PCR activation	94°C3 นาที	
Denaturation	94°C 20 วินาที	
Annealing	48°C 30 วินาที	35 รอบ
Extension	72°C 30 วินาที	
Final extension	72°C 15 นาที	

12. ระหว่างเครื่อง PCR กำลังทำงาน ให้เตรียม 2% Agarose gel ใน TBE buffer โดยใช้อัตราส่วนดังนี้

Agarose gel 1 g ใน TBE 50 ml สำหรับ gel ขนาดใหญ่

Agarose gel 0.5 g ใน TBE 25 ml สำหรับ gel ขนาดเล็ก

ให้ความร้อนจน Gel ละลายดี จึงเทใส่ถาดพิมพ์ รอจน Gel เย็นและแข็งดี จึงนำไปวางบนเครื่อง

Electrophoresis chamber ที่มี TBE buffer อยู่ในระดับที่ท่วมแผ่น Gel

13. นำ PCR Product (จาก ข้อ 11) มาหยอดใน 2% Agarose gel ที่เตรียมไว้ โดยใช้ 6 x Loading dye 2 ไมโครลิตรผสมกับ PCR product 10 ไมโครลิตร โดยใช้แถวแรกของ Gel เป็น DNA marker (kb)

14. เปิดเครื่อง Gel Electrophoresis กำลังไฟ 100 volts นานประมาณ 1 ชั่วโมง

15. ปิดเครื่องแล้วนำแผ่น Gel ย้อมด้วย 1% Ethidium Bromide Solution (10 mg/ml.) ในน้ำกลั่น 15 นาที

16. ล้างแผ่น Gel ด้วยน้ำประปา และนำไปอ่านด้วยเครื่อง Visible - UV Gel Transmission

การอ่านผล (รูปที่ 5.3)

ไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์อเมริกา ปรากฏ Band 107 bp.

ไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ยุโรป ปรากฏ Band 186 bp.

ตัวควบคุมลบ ไม่ปรากฏ Band