บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การสกัด RNA ด้วยวิธี AGPC (107, 108) นี้ เนื้อเยื่อสมองจะถูกบดให้แยกออกจากกันใน denaturing solution หรือ solution D โดยใช้ homogenizer ซึ่ง solution D มีสารเคมีที่สำคัญคือ 4 M guanidium thiocyanate สารนี้มีคุณสมบัติทำให้เซลล์แตก และทำลาย secondary structure ของ nucleoprotein พร้อมทั้งทำให้โปรตีนเสียสภาพและแยกตัวออกจากกรดนิวคลีอิก ยิ่งไปกว่านั้นสารนี้ยังมีคุณสมบัติเหมือนกับ β-mercaptoethanol ซึ่งเป็น reducing agent คือสามารถ inactivate เอนไซม์ ribonuclease ได้ (111) การสกัดโปรตีนออกจาก RNA โดยใช้ phenol และ chloroform นั้น ต้องปรับ pH ให้เหมาะสมซึ่งกระทำได้โดยการเติม 2 M Sodium acetate pH 4.0 ทำให้สารละลาย phenol-chloroform มี pH เป็นกรดคือ pH ประมาณ 5.2 ในสภาวะเช่นนี้จะทำให้ DNA ตกตะกอนได้ (112)

phenol เป็นสารที่มีคุณสมบัติทำลายโปรตีนให้เสียสภาพ รวมทั้งสลายโปรตีนที่เสียสภาพแล้ว ส่วน chloroform ทำให้โปรตีนเสียสภาพได้เช่นเดียวกับ phenol แต่มีคุณสมบัติแยกตัวออกจาก aqueous phase หรือชั้นที่มีสารละลายกรดนิวคลีอิกได้ดีกว่า phenol สำหรับ Isoamylalcohol นั้น สามารถป้องกันการเกิดฟองระหว่างขั้นตอนการสกัดได้ หลังสกัดด้วย

phenol-chloroform-isoamylalcohol แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง RNA จะอยู่ใน aqueous phase ส่วน DNA และโปรตีนจะอยู่ในชั้น interphase และ phenol phase ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อสมอง รวมทั้งการสกัด virus specific RNA จาก TCM โดยใช้วิธี AGPC นั้นเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูงสามารถกำจัดการปนเปื้อนจากเอนไซม์ RNAse ได้

ประสิทธิภาพของการสกัดโปรตีนออกจาก RNA พิจารณาจากอัตราส่วนระหว่าง OD 260/OD 280 ซึ่งจากการสกัดสมอง 120 ตัวอย่าง ให้ค่าประมาณ 1.3-2.0 ถ้าสกัด virus RNA จาก TCM จะให้อัตราส่วนสูงถึง 1.8-2.0 ถ้าผลการสกัด RNA มีความบริสุทธิ์สูง จะให้อัตราส่วนของ OD 260/OD 280 เท่ากับ 2.0 แต่อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปแล้วความบริสุทธิ์ในการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อต่างๆ จะให้อัตราส่วนของ OD 260/OD 280 เกิน 1.2

การศึกษานี้เป็นการประเมินเทคนิค nested PCR ในการวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าจากตัวอย่างที่ส่งตรวจประจำวัน และตัวอย่างที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-33^{o}C) ที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยเปรียบเทียบกับ FAT และ MIT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

เมื่อแรกเริ่มเทคนิค PCR นำมาใช้เพื่อขยายตัวอย่างที่เป็น DNA เท่านั้น ต่อมาได้นำมาใช้ตรวจ rhinovirus ที่มี genome เป็น single-strand RNA (112) และ Rotavirus ซึ่งมี genome เป็น double-strand RNA (113) โดยอาศัยปฏิกิริยา reverse transcription เปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ก่อนที่จะนำไปเพิ่มขยาย gene ด้วยเทคนิค PCR

ซึ่งโดยหลักการแล้วเทคนิคนี้จะมีความไวสูงมากที่สุด เนื่องจากแม้มี DNA เพียง copy เดียว ก็สามารถเพิ่มจำนวนเป็นหลายพันล้านโมเลกุล (101) แต่อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติแล้วประสิทธิผลของปฏิกิริยาจะไม่ถึง 100% เนื่องจากเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า plateua effect กล่าวคือ ในรอบหลัง ๆ ประสิทธิภาพของเอนไซม์ Taq DNA polymerase นั้นลดลง ขณะเดียวกันก็มีสภาวะของ substrate excess และ product reassociation อีกด้วย (100)

จากผลการศึกษา sensitivity ของ first step amplification โดยการอ่าน product ขนาด 1,354 bp จาก gel electrophoresis พบว่ามีความไวเพียงร้อยละ 37 ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณ DNA มีน้อยเกินกว่าจะ detect ได้ด้วยการ run gel electrophoresis ซึ่งย้อมด้วย ethidium bromide นอกจากนี้การเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ในขั้นตอนของ reverse transcription ยังมีส่วนกำหนดความไว (limiting step) ของ first step amplification ประกอบกับปริมาณ virus RNA เริ่มต้นของแต่ละตัวอย่างนั้นมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันด้วย

เทคนิค nested PCR ไม่เพียงแต่ใช้เป็นวิธีตรวจยืนยัน product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ในครั้งแรก แต่ยังเพิ่มความไวของวิธีอีกด้วย จากการทดลองพบว่า nested PCR มีความไวเทียบเท่าวิธีมาตรฐานคือ MIT ในการตรวจสิ่งส่งตรวจประจำวันและที่สำคัญวิธีนี้ไม่เกิด false positive กับ RNA ของสมองสุนัข ซึ่งทราบได้จากตัวอย่างลบจำนวน 276 ตัวอย่าง ซึ่งวิธีมาตรฐานก็ให้ผลลบเช่นกัน

จากข้อดีดังกล่าวของ nested PCR ซึ่งนอกจากจะเป็นการยืนยันความจำเพาะและเพิ่มความไวแล้ว ยังไม่ต้องใช้ isotope ในการทำ

hybridization ซึ่งเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายทั้งยังมีความปลอดภัยต่อผู้บฏิบัติอีกด้วย

สำหรับปริมาณ total RNA ที่น้อยที่สุดที่วิธี nested PCR สามารถตรวจได้คือ 0.5 ng ซึ่ง total RNA หมายถึง RNA ของสมองที่มีปริมาณมากรวมกับ RNA ของไวรัสที่มีปริมาณน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามเราไม่ทราบว่ามี RNA ของสมองปะปนอยู่กับ virus RNA ในปริมาณมากน้อยเพียงใด เพื่อหาปริมาณ RNA ของไวรัสที่น้อยที่สุดที่วิธีนี้สามารถ detect ได้จริง ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงนำ TCM ซึ่งเก็บจาก CVS-11 infected baby hamster kidney cells 0.5 ml รวมกับเนื้อสมองปกติ 0.5 g แล้วสกัดออกมาเป็น total RNA เปรียบเทียบกับ virus RNA ที่สกัดจาก TCM 0.5 ml แต่เพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณ virus RNA ที่สกัดได้ทั้งหมดจาก TCM คือ 6.4 ug (0.16 ug/ul) และปริมาณ total RNA ที่สกัดได้ทั้งหมดเป็น 103.68 ug (1.296 ug/ul) นั่นคือ มีปริมาณ RNA ของสมองปนอยู่กับ virus RNA ถึง 15 เท่า จากการทดลองพบว่า เทคนิค nested PCR นี้สามารถตรวจสอบไวรัสได้ที่ระดับ titer เดียวกัน กล่าวคือระดับที่มีปริมาณ virus RNA เพียง 8 pg ซึ่งจะเห็นได้ว่า แม้มีปริมาณ RNA ของสมองปะปนอยู่ก็ไม่มีผลต่อความไวของวิธี nested PCR

เนื่องจากระยะเวลาที่ผู้สัมผัสโรคพิษสุนัขบ้า หรือคาดว่าสัมผัสโรคนำสมองสัตว์ส่งตรวจหน่วยชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้ามักจะอยู่ในช่วงเวลา 6-24 ชม. ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วประมาณ 9 ชม. ดังนั้นการทดลองนี้จึงพิจารณาถึงระยะเวลานานที่สุดที่วิธี nested PCR จะยังสามารถตรวจไวรัสในสมองสุนัขซึ่งพิสูจน์แล้วว่ามีเชื้อจริงจาก fluorescent antibody test โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 28-33 ^{o}C เป็นเวลา 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชม.

จากการทดลองพบว่าวิธี nested PCR นี้สามารถตรวจสมองบวกได้ครบทุกช่วงเวลา แม้จะทิ้งไว้นานถึง 72 ชม.ก็ตาม ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Ermine ที่สามารถตรวจ virus RNA จากสมองหนู mice ซึ่งวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประเทศฝรั่งเศส) ได้ถึง 168 ชม. หลังจากหนูตาย (23)

จากตัวอย่างส่งตรวจที่เป็นบวก 224 ตัวอย่าง ในจำนวนตัวอย่างดังกล่าวนี้มี 49 ตัวอย่างที่ใช้เวลานำส่ง 20-24 ชม. หลังสัตว์ตาย ทั้งนี้เนื่องจากสถานให้บริการชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าอยู่ไกล หรือเวลาที่ถูกสัตว์กัดเป็นเวลาค่ำทำให้การเดินทางจากชนบทเข้าสู่กรุงเทพนั้นลำบาก จึงรอนำส่งในวันต่อมา

จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่า nested PCR อาจสามารถตรวจสมองที่มีไวรัสพิษสุนัขบ้าได้หลังจากสัตว์ตายแล้วถึง 90-95 ชม.

สมองสัตว์ที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกิน 48 ชม. จะมีผลต่อการตรวจด้วย FAT ดังตารางที่ 3 เนื่องจากเนื้อเยื่อสมองเละแล้วมีผลต่อการทำ impression smear ซึ่งจะให้ smear ที่หนาเกินไป เวลาย้อมจะทำให้เกิดการดูดซับ (absorb) ของ conjugate ที่ไม่สามารถล้างออกได้หมด และเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงจะทำให้เห็น non-specific มาก เป็นการรบกวนการอ่านผล และทำให้เกิดการผิดพลาดในการอ่านได้

สำหรับสมองสัตว์ที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 24 ชม. (ตารางที่ 3) จะมีผลต่อการตรวจด้วย MIT เนื่องจากมีการบนเปื้อนของแบคทีเรีย และเกิดมี viral inhibitors ทำให้ไวรัสตาย ซึ่งจะทำให้เกิดผลลบเทียมได้

Nested PCR สามารถตรวจไวรัสจากสมองสุนัขที่ตั้งทิ้งไว้นานถึง 72 ชม.ได้โดยความจำเพาะและความไวไม่แตกต่างจากช่วงเวลาอื่น กล่าวคือ สามารถ detect ได้ในปริมาณ 0.5 ng (ดังรูปที่ 8) ซึ่งแสดงว่า RNA ไม่ถูกทำลายไปทั้งหมดโดย RNAse ในเนื้อสมอง ทั้งนี้เนื่องจาก positive และ negative template มี N protein ห่อหุ้ม อย่างไรก็ตาม RNA คงต้องถูกทำลายไปบ้าง แต่เนื่องจาก nested PCR เป็นการทดสอบที่มีคุณสมบัติเด่น คือ มีความไวสูงมาก และนอกจากนี้ในขั้นตอนการสกัด RNA นั้นใส่ guanidium thiocyanate ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น RNAse inhibitor ดังนั้นจึงสามารถคงสภาพ RNA ก่อนที่จะนำไปทำการทดลองขั้นอื่น ๆ ต่อไป

product จากการทำ PCR ครั้งแรก ยังมีประโยชน์สามารถนำมาศึกษาระบาดวิทยาของไวรัสได้โดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งเอนไซม์นี้จับและตัด double-strand DNA อย่างจำเพาะและได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดแน่นอน ถ้า DNA นั้นแตกต่างกันจะให้แบบแผน (pattern) การตัดที่ต่างกันไป (114) ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์สายพันธุ์ต่าง ๆ ของ street virus ได้

จากการทดลองตัด DNA product 3 ตัวอย่าง ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ Hinf I และ Dde I พบว่า 2 ตัวอย่างมีแบบแผนการตัดที่เหมือนกันและให้ชิ้น DNA ที่มีขนาดเท่ากัน ส่วนอีก 1 ตัวอย่างนั้นให้แบบแผนการตัดที่ต่างออกไป แต่อย่างไรก็ตามคงต้องทำการศึกษาต่อไป ทั้งในแง่ของจำนวนตัวอย่าง และชนิดของ host ที่นำมาศึกษา

นอกจากนี้ product จาก first amplification ซึ่งเป็น sequence ของ N gene ทั้งหมดยังมีประโยชน์ในการนำไป clone ต่อใน vector ที่เหมาะสมเพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

สำหรับการตรวจไวรัสพิษสุนัขบ้าด้วยเทคนิค nested PCR นี้มีข้อควรระวังที่สำคัญคือ การปนเปื้อนจากเอนไซม์ RNAse จากเครื่องใช้ เช่น พลาสติกและเครื่องแก้วรวมทั้งจากมือของผู้ทำการทดสอบ

เอนไซม์ RNAse มีความทนทานสูงมาก การทำลายเอนไซม์นี้จะต้องอบที่อุณหภูมิสูงถึง 250 ^{o}C เป็นเวลานาน 4 ชม. หรือ treat เครื่องแก้วที่ใช้ด้วย 0.1% DEPC ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น RNAse inhibitor แล้วนำไป autoclave

ผู้ทำการทดสอบจะต้องสวมถุงมือทุกครั้ง แม้แต่ขั้นตอนการเตรียมวัสดุต่าง ๆ เช่น tip หรือ eppendorf และขั้นตอนการเตรียมน้ำยาต่าง ๆ ด้วย

จากคุณสมบัติของ nested PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและ ความจำเพาะสูง สามารถตรวจในตัวอย่างที่เน่าเสีย หรือตัวอย่างที่เก็บไว้หลังสัตว์ตาย 72 ชั่วโมงได้ จึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่จะใช้เป็นเครื่องช่วยแพทย์ตัดสินใจในการให้การรักษา โดยนำมาใช้ตรวจยืนยันตัวอย่างที่ FAT ให้ผลลบ นอกจากนั้น ในอนาคตอาจนำมาใช้ในการตรวจน้ำลายในสัตว์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และได้กัดคนไปแล้ว เพื่อเป็นเครื่องช่วยตัดสินใจในการให้การรักษาต่อไป

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย