การตรวจหาเชื้อ Herpes Simplex Virus ในน้ำไข้สัตว์
ของผู้ป่วยนอกด้วยการทางสมอง โดยวิธีPolymerase Chain Reaction*

ศิริรัตน์ ท่านสัตว์ศึก**
วานิลา ศิริวัชรี**

บทอธิบาย
การตรวจหา Herpes Simplex Virus (HSV) ตีเอ็นเอ ในน้ำไข้สัตว์ของผู้ป่วยนอกด้วยการทางสมอง เพื่อวินิจฉัยโรค Herpes encephalitis โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เมื่อใช้ Thymidine kinase (TK) gene primers สามารถตรวจพบ HSV ตีเอ็นเอ ในปริมาณต่ำสุด 7,000 pg โดยใช้วิธีการต่อไปนี้ในการตรวจหา และ 10 μL ของน้ำไข้สัตว์ที่พบสารบัญผ่านปฏิวัติการ PCR จะมีปริมาณเท่ากันไขสัตว์หลังปล่อยคือ 0 μL จากผลการตรวจโดยวิธี PCR สามารถยืนยันได้ว่า Amplified product ที่เกิดขึ้นเป็น HSV ตีเอ็นเอ จริง เมื่อนำวิธี Agarose gel electrophoresis ร่วมกับ Southern blotting และ Hybridization ตัวHSV TK gene specific probe นอกจากนี้ยังพบว่าความไวของการตรวจโดยวิธี PCR ยังมีผลดีด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis จะทำให้ความไวในการตรวจด้วยวิธี PCR ร่วมกับ Southern blotting และ Hybridization แต่ถ้าผลดีด้วย colorimetric method ตัวต้านการตรวจโดยวิธี PCR โดยไม่ต้องทำ Hybridization ที่มีความไวและความง่ายเพียงพอที่จะนำไปตรวจหา HSV ตีเอ็นเอ ในน้ำไข้สัตว์ได้ จากการทดลองวิธีการตัดสินใจไปตรวจหา HSV ตีเอ็นเอ ในน้ำไข้สัตว์ของผู้ป่วยนอกด้วยการทางสมอง จำนวน 29 ราย พบว่าผลตอบ 1 ราย ตีเอ็นเอได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในโรคนี้ปฏิวัติการประจวบ เพื่อช่วยวิจัยการตัดสิน HSV ในระบบประสาทได้ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ทำได้ง่าย และให้ผลรวดเร็ว

ที่มาที่สิง : Herpes simplex virus, Polymerase chain reaction, น้ำไข้สัตว์

* เป็นส่วนหนึ่งของภาคีนิสิตวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2538-2539
** ภาควิชาจุลชีพวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Abstract: Detection of Herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of AIDS patients by polymerase chain reaction*

Hansumrit S.** Sirirungsi W**

Detection of Herpes Simplex Virus (HSV) DNA in cerebrospinal fluid (CSF) of AIDS patients attending Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital for diagnosis of herpes encephalitis was carried out by using PCR technique. The HSV-specific primers were selected from viral thymidine kinase gene (TK gene). The sensitivity of TK gene primers for detection of HSV-DNA was found to be 7.995 pg. The volume of CSF sample using in the PCR reaction was 10 µL. If the PCR inhibitor was found, the maximum volume of CSF using in 50 µL PCR reaction mixture should not exceed 8 µL. Southern blotting and hybridization by HSV-TK gene specific probe were performed to identify and confirm the amplified product of HSV DNA from PCR reaction. The sensitivity of PCR technique with agarose gel electrophoresis and PCR technique with Southern blotting and hybridization was found to be indifferent. The detection of HSV-DNA in CSF of 29 AIDS patients revealed that 1 of 29 samples was positive. Therefore, the PCR technique following with the agarose gel electrophoresis was proved to be suitable for the routine diagnosis of Herpes encephalitis due to its sensitivity and could give an advantage of early diagnosis.

Key words: Herpes simplex virus, Polymerase chain reaction, Cerebrospinal fluid.

* Term paper in partial fulfillment of the requirements for the degree of Bachelor of Science in Medical Technology (1995–1996), Chiang Mai University.
** Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

บทนำ

โดยทั่วไปคนที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติหรือเกิดการติดเชื้อไวรัส Herpes simplex virus (HSV) จะแสดงอาการแบบไม่รุนแรง แต่ในผู้ป่วยที่มีการจุกเกิดแบบชัดเจน เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ ซึ่งมีภูมิคุ้มกันต่ำ การติดเชื้อ HSV มักแสดงอาการรุนแรง มีการติดเชื้อซ้ำซ้อนสะสม (viremia) และอาจทำให้เกิดสมองอักเสบที่สูง (Herpes encephalitis) ได้ ซึ่งการวินิจฉัยโรค Herpes encephalitis ทางห้องปฏิบัติการด้วยการมีการไม่ประสานผลลัพธ์ ดังนั้น การหาผลลัพธ์ เช็คจากการใช้สองหลัก มักให้ผลลบ เนื่องจากไม่
น้ำชีสัณห์ของผู้ป่วยจะมี antibody ที่เจาะกับตัวซึ่งเกิดเป็น Immune complex ก้าวหน้าจึงไม่สามารถเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้ ทำให้การตรวจ antigen ของตัวชี้ หรือ antibody ต้องใช้โดยวิธีการที่มีผู้ทันทิพลาะ เทพในอย่างไร (sensitivity) ในการตรวจต้านภูมิ และยังตรวจพบได้ชัดเจนยิ่ง1 ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีผู้ใช้วิธีการตรวจ Nucleic acid ของตัวชี้ โดยอาศัยเทคนิคเพื่อเรียกว่า Polymerase chain reaction (PCR) เข้ามาใช้ในการวินิจฉัยโรคทางจุดปฏิกิริยาหลายไกล เช่น โรคอวสัต โรคติดเชื้อลูกม้ายีดี เลยต้น ส่วนการตรวจวิธีจิตรีโรค Herpes encephalitis โดยวิธีนี้ พบว่าสามารถทำได้ดีด้วยผู้ใช้รีมองสารออกทางตรงมกิจในระยะดี

2. วิธีการตรวจ

2.1 การเตรียมตัวส่งตรวจ

ก่อนการตรวจ นำน้ำชีสัณห์ส่งไปต้มที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส 10 นาทีแล้วนองแข็งในน้ำแข็งทันที โดยวิธีนี้ก็จะทำให้สอบลงอยู่ในสารละลายเพื่อจะได้น้ำไปทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR ต่อไป

2.2 การตรวจหา HSV ตียนและโดยวิธีPolymerase chain reaction (PCR)

เตรียมปฏิกิริยา PCR โดยให้มีส่วนประกอบด้วย 25 pmole ของตัวชี้ TK gene primer ซึ่งประกอบด้วย primer 2 และคือ TK1 : 5’ACG GTG CTG CGG GTT TAT AT 3’ (20 mers) และ TK2 : 5’ TGC TGA TTG TTA TCT GGC CG 3’ (20 mers), 20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 2.5 mM MgCl₂, 1% glycerol, 10 pmole ชนิด dATP, dCTP, dGTP, dTTP และ 1.25 units ของ DNA polymerase สำหรับมะเร็ง รวมกับดัวอย่างตรวจโดยปริมาณสูตรที่เป็น 50 μL ไปเข้าเครื่อง Thermal cycler (Coy Laboratory Product, Inc.) โดยทันทีก่อนการใช้ให้มีการควบคุมอุณหภูมิตั้งค่าที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 60 องศาเซลเซียส 1 นาที, และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที ทำก่อนจะน้ำ 40 รอบ สุดท้ายปรับอุณหภูมิให้เป็น 72 องศาเซลเซียส 7 นาที แล้วให้เตรียมเองอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส 1 นาที จนกว่าจะน้ำทดลองออกจากเครื่อง

นำ PCR mixture ที่ได้ไปตรวจด้วย PCR product โดยวิธี Agarose gel electrophoresis เลือกชิ้นเล็ก Ethidium bromide เมื่อตรวจดูแล้วจะเริ่มติดต่อกัน ทำให้ DNA band เรียงมันเป็นขนาด 250 base pair

2.3 การตรวจยืนยันผล PCR product
การตรวจพื้นฐาน PCR product ทำโดยวิธี Southern blotting และ Hybridization แล้วตรวจสอบโดยวิธี Colorimetric method ซึ่งมีวิธีการโดยอิทธิพล่นผ่าน agarose gel ที่มี PCR product ไปทำ Alkaline denaturation ตามด้วย Neutralization แล้วเปื่อยน้ำปั้นผีสีเอโอโดยทำ Southern blotting ลงบนแผ่น Nylon membrane 1 แผ่น หลังจากนั้นแผ่น Nylon membrane ไป fix ด้วย UV-crosslink ที่ 0.51 J/cm² ทั้ง 2 แผ่น เพื่อให้คั่วเย็นติดกับแผ่น membrane แผ่นอื่น ต่อจากนั้นแผ่น membrane ไปทำ Prehybridization ที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงทำ Hybridization กับ Oligonucleotide HSV–TK gene probe ที่ติดตัวด้วย Alkaline phosphatase ที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หลังจากทำ Hybridization ให้ล้าง membrane แล้วจึงนำไปตรวจโดยใช้ substrate คือ Nitroblue tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyolphosphate (NBT/BCIP) ตรวจสอบกอนด้านท้ายแผ่น membrane

ผลการทดลอง

ความไวของตารางหาHSV ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR เมื่อใช้ TK gene primers

จากการทดลองสืบค้นพบ Purified HSV ดีเอ็นเอที่มีปริมาณ 2.865 μg/mL แบบ 10-fold dilution ตั้งแต่ 10⁻¹ ถึง 10⁻⁹ แล้วนำไปทำตารางHV Amplified product ด้วยวิธี PCR (ในสภาวะที่อ่อนแสงแล้วเข้มแสง) โดยทำควบคู่กับ Negative control ซึ่งใช้น้ำแทน HSV ดีเอ็นเอและ 1 Kb Ladder DNA marker ผลปรากฏว่าโดยวิธีนี้สังเขปจากนั้น Amplified product นำไปแพร่กระจายกรอบการ electrophoresis และย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วสามารถตรวจหา HSV ดีเอ็นเอ ในปริมาณที่น้อยที่สุดที่ dilution 10⁻⁶ ซึ่งค่าน้ำแปรปริมาณ HSV ดีเอ็นเอได้เท่ากับ 7.995 pg/reaction ดังแสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 1 แสดงผลการทดสอบความไวของ TK gene primers ในการตรวจหา HSV ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR. Lane 1: DNA marker, Lane 2: Undiluted HSV–DNA, Lane 3–11: 10⁻¹ – 10⁻⁹ HSV–DNA, Lane 12: negative control.
การตรวจยืนยันผล PCR Amplified product และเปรียบเทียบความกว้างของการตรวจหา HSV ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR กับวิธี PCR ร่วมกัน เทคนิค Hybridization

ผลการนำ Amplified product จากการทำ PCR ของ purified HSV ดีเอ็นเอที่รวมเข้าด้วยกันในรูปที่ 1 มาควบคุมกระบวนการ Southern blotting และ Hybridization กับ TK gene probe แล้วตรวจโดยวิธี Colorimetric method พบว่า Amplified product ที่ได้นั้นเป็น HSV TK gene จริง เพราะสามารถ hybridize กับ HSV TK gene probe ได้โดยที่วิธี Hybridization สามารถตรวจหา HSV ดีเอ็นเอได้น้อยที่สุดเท่ากับ 7.095 pg ซึ่งเท่ากับการตรวจโดยวิธี PCR เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 2
รูปที่ 3 แสดงการตรวจพิษสุนัขว่าเป็น HSV-PCR product ชั้นและการตรวจโดยวิธี PCR ร่วมกับ Hybridization ทำความไว้ในการตรวจหา HSV DNA เพิ่มกับวิธี PCR เพื่ออย่างเดียว Lane 1 : DNA marker, Lane 2: Undiluted HSV DNA, Lane 3-11: 10^{-1} - 10^{-9} HSV DNA, Lane 12: negative control.

การตรวจหา HSV ดีเอ็นเอในน้ำไขสันหลัง (CSF) ของผู้ป่วยอัลซีคีSEEฝักหวั่นการทางสมองโดยวิธี PCR

จากการนำ CSF ของผู้ป่วยละ 10 μLไปทำการตรวจหา HSV ดีเอ็นเอ โดยวิธี PCRโดยทำพร้อม control ดังนี้

Positive control มีส่วน HSV ดีเอ็นเอ 7.995 pg (ความตรวจพบดีเอ็นเอ)

Negative control ไม่มีส่วน HSV ดีเอ็นเอ และ CSF (ความหดลง)

Inhibition control มีส่วน HSV ดีเอ็นเอ (7.995 pg) และ CSF (ความตรวจพบดีเอ็นเอ)

เมื่อผลการตรวจพบว่า รายใดแสดงผลการยืนยันปฏิเสธ PCR โดย CSF จะทำการตรวจหาโดยดัดแปลง CSF ลงเหลือ 6 μL ผลการทดลองพบว่า การตรวจ CSF ของผู้ป่วยอัลซีคีSEEฝักหวั่นการทางสมองจำนวน 29 ราย พบ HSV ดีเอ็นเอ 1 ราย (เมื่อใช้ CSF 10 μL) และเมื่อ CSF ของผู้ป่วยอัลซีคีSEEฝักหวั่นการทางสมองจำนวน 10 ราย ที่มีการยืนยันปฏิเสธ PCR เมื่อใช้ CSF เพียง 10 μL แต่ไม่มีผล negative เมื่อผลวิ่งแถบ CSF ลงเป็น 6 μL ทำให้ผลการตรวจพิษสุนัขว่า Ampilfied product ของ HSV ดีเอ็นเอ ใน CSF ผู้ป่วยรายที่ให้ผลลบก็ให้ผลลบยืนยันตรงกัน

วิธีการ

การตรวจหา HSV DNA ในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยอัลซีคีSEEฝักหวั่นการทางสมองโดยวิธี PCR เป็นวิธีที่มีความไว้ (Sensitivity) และความจังหวะ (Specificity) สูง สามารถตรวจพบเชื้อเมื่อมีการติดเชื้อระยะเริ่มแรกได้และยังสามารถแก้ปัญหาในการตรวจวินิจฉัย Herpes simplex encephalitis (HSE) ซึ่งมีวิธีที่ไม่กำหนดได้ดีการเตรียมน้ำไขสันหลังเพื่อปิภัศบะ PCR มีผู้ใช้แก่ไขวิธีวิชาวิธีสกัด CSF ด้วย Phenol-Chloroform หารือ Heat and Cooling หรือ Ethanol หรือ Heat and Cooling ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้เก็บ สะดวก สะดวก และให้ผลคดีได้ยืนยัน การตรวจหา HSV DNA ในน้ำไขสันหลัง ผู้ป่วยอัลซีคีSEEฝักหวั่นการทางสมองโดยวิธี PCR สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อ HSV ได้
สรรพสิ่งมีการพัฒนาได้โดยใช้ปีเตอร์ PCR ที่เหมาะสม ซึ่งเรื่องนี้สามารถแก้ไขได้โดยการปรับปรุงการทดลองที่เหมาะสมที่ไม่มีผลต่อการปฏิรูปปีเตอร์ PCR

สำหรับการตรวจหา HSV DNA ใน CSF ได้มีผู้พัฒนาวิธีการต่างๆ มากมายโดยเลือกใช้ primers จากตำแหน่งของ HSV DNA ที่ต่างกันไป เช่น Thymidine kinase gene, Glycoprotein B gene, DNA polymerase gene เป็นต้น สำหรับการทดลองนี้ใช้ Thymidine kinase gene primers ซึ่งสามารถจับกับ HSV DNA ได้ทั้ง HSV-1 และ HSV-2 ซึ่ง Amplified product ที่ได้จะมีขนาดเท่านั้น ไม่สามารถแยกชนิดของ HSV ได้อ่อยไรก็ตามการแยกชนิดของ HSV อาจไม่จำเป็นสำหรับการรักษาเพราะ HSV ทั้งสองชนิด รักษาด้วยยาชนิดเดียวกันแต่ต่างกันทางยาที่ใช้ของ HSV เพื่อเป็นแนวทางทางการศึกษาด้านระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถกระทำได้เนื่องจาก amplified product ที่ได้จาก HSV-1 มี restriction site สำหรับเชื่อมโดย Enzyme BamH I ในขณะที่ amplified product ของ HSV-2 ไม่มี สำหรับ sensitivities ของ TK gene primers ในการตรวจหา HSV DNA อยู่ในระดับที่น่าพอใจ คือสามารถตรวจหา HSV DNA ได้ในปริมาณน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ 7.995 pg และเมื่อเปรียบเทียบกับยีนอื่นผู้ Amplified product โดยวิธี Southern blotting และ Hybridization กับ HSV TK gene Oligoprobe พบว่า Amplified product ที่ได้จากการทำ PCR เป็น Amplified product ของ HSV DNA จริงและ sensitivities ในการตรวจหา HSV DNA ทั้ง 2 วิธีนี้เท่ากัน คือสามารถตรวจหา HSV ได้โดยมีปริมาณน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ 7.995 pg ฉะนั้นในการตรวจหา HSV ดีเยี่ยม ในทำงทดลองนี้ได้ใช้วิธี PCR เพื่อจะขับเคลื่อนเชื้อที่ วางอยู่บนเพียงพอ โดยที่ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจแต่แต่ละครั้ง CSF จะมีอันดับโดยการตรวจสู่ DNA band ของ amplified product ที่ได้จากการทำ agarose gel electrophoresis ใช้วิธีประมาณ 7 ขั้นไม่ซ้ำกันว่าให้ผลได้ภายในเวลา 1-2 วันไม่จำเป็นที่จะใช้ในการตรวจในห้องปฏิบัติการประจำวันได้ แต่ถ้าอย่างไรก็ตาม การตรวจโดยวิธี PCR มีข้อดีคือขั้นตอนหลายประการคือ เพื่อจากวิธีการนี้มีความไวสูง ซึ่งควรระมัดระวังการเกิด Contamination อาจเป็น Cross contamination ระหว่างสิ่งส่งตรวจ หรือเป็น Carry over contamination จาก amplified product ที่ได้จากการทำ PCR ถ้าล้มและที่ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการขับเคลื่อนเพื่อให้ผลสัมพันธ์สำหรับการซักหล่ม อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำ PCR เนื่องจากมีราคาแพง ถ้าพูด ถึงการที่ปฏิบัติงานต้องเป็นผู้มีความรู้ที่จะแปลผลการทดลองได้

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เมื่อทำการศึกษาในผู้ป่วย 20 ราย โดยใช้ปริมาณ CSF ที่เก็บ 10 μL ในการตรวจพบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 10 ราย มีการยืนยันปฏิรูปปีเตอร์ PCR แต่ไม่ตรวจพบ CSF แสงหลีอ 0 μL พบว่าให้ผล Negative แต่ส่วนใหญ่ใน CSF ของแต่ละจะมีการยืนยันปฏิรูปปีเตอร์ PCR ได้ไม่เท่านั้น ทั้งนี้นั่นเป็นผลจากการที่มีการตรวจหาปีเตอร์ PCR ถ้าไม่ทราบว่าเป็นสาหร่ายหรือไม่คงจะยากที่จะต้องมาศึกษาด้วยจะเกิดกับปีเตอร์ได้หากพบกับปีเตอร์เพียงปีเตอร์ PCR 10 ราย พบครั้ง Cryptococcus neoformans ใน CSF ดังนั้นในการเลือกใช้ปริมาณ CSF ในปฏิรูปปีเตอร์ PCR ควรเลือกใช้ปริมาณที่ไม่ทำให้เกิดการยืดขึ้น

