คู่มือใช้งานสำหรับชุดตรวจวินิจฉัยพยาธิโรคเท้าช้าง

ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระบาดใหม่

(Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Diseases; RCEID)

1. บทนำ

วูเชอรีเรีย แบนครอฟไต เป็นพยาธิตัวกลมที่ก่อให้เกิดโรคพยาธิเท้าช้างโดยมียุงเป็นพาหะ ซึ่งโรคดังกล่าวเป็นปัญหาทางสาธารณสุขในเขตร้อนและกึ่งร้อน มีประชากรหลายล้านคนทั่วโลกเป็นโรคชนิดนี้ อาการของโรคในระยะเรื้อรัง ทำให้เกิดอาการแขนขา อวัยวะเพศ และเต้านม บวมโต เสียรูปร่างและพิการได้

2. จุดประสงค์

เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อหนอนพยาธิเท้าช้าง วูเชอรีเรีย แบนคอฟไต

3. หลักการ

ใช้หลักการของวิธี Real time polymerase chain reaction คือ การตรวจวัดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยการตรวจผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำ PCR

4. ชุดตรวจวินิจฉัย ประกอบด้วย

หลอด	ติดฉลาก	บรรจุ (96 reaction)	หน้าที่
(1a) ฝาสีขาว	Enzyme	1 × vial 1a	เป็นน้ำยาทดสอบที่ประกอบด้วย *Taq* DNA polymerase, reaction buffer, $MgCl_2$, and dNTP mix
(1b) ฝาสีแดง	PCR Reaction mix	3 × vial 1b	
(2) ฝาสีน้ำเงิน	RCEID Primers mix	1 × 400 µl	สำหรับเพิ่มปริมาณ Positive control และ sample DNA
(3) ฝาสีเขียว	RCEID Probes mix	1 × 250 µl	สำหรับจับกับ PCR product ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Wuchereria bancrofti* และ human genome
(4) ฝาสีเหลือง	RCEID Positive control	1 × 500 µl	ประกอบด้วย *Wuchereria bancrofti* plasmid และ human genome
(5) ฝาใส	Water (PCR grade)	2 × 1 ml	สำหรับปรับปริมาตรและใช้เป็น negative control

5. ชุด Color compensation control (CCC)

หลอดที่	ติดฉลาก	บรรจุ
1	Blank	1 × 25 µl
2	Fluorescence calibration	1 × 25 µl
3	LC Red 640 calibration	1 × 25 µl
4	LC Red 670 calibration	1 × 25 µl

6. การเก็บรักษา

เก็บรักษาชุดตรวจวินิจฉัยที่ -15 °C ถึง -25 °C และควรเก็บหลอดที่ 3 และชุด color compensation control
ให้พ้นแสง

7. การเก็บรักษาตัวอย่างส่งตรวจ

ตัวอย่างเลือดควรเก็บที่อุณหภูมิ -15 °C ถึง -25 °C

8. การเตรียม CCC file object

8.1 ดูดสารละลายในข้อ 2 ทุกหลอด หลอดละ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแก้ว ปิดฝาด้วย stopper แล้วนำไป spin down

8.2 เลือก analysis mode เป็น color compensation แล้วกำหนดค่า detection channel ให้ตรงกับ sample ที่ทำการทดสอบ

8.3 Save ใน Special Data/Color compensation

8.4 ทำการ run เครื่องโดยใช้โปรแกรมในข้อ 10

8.5 Save เป็น CCC file object ใน Special data/Color compensation

9. การเตรียมน้ำยาทดสอบ (Master mix)

ก่อนใช้เตรียม PCR Reaction Mix Hybridization Probe โดยการเติม 10 ไมโครลิตร ของ Enzyme (หลอด 1a) ลงใน PCR Reaction Mix (หลอด 1b) จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้น-ลง ห้าม Vortex ติดฉลาก หลอด 1a ใหม่เป็น หลอด 1 แล้วนำไป spin down จากนั้นนำไปเตรียมน้ำยาทดสอบตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบการเตรียมน้ำยาทดสอบ

ลำดับที่	หลอด	ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น
1	2	Water (PCR grade)	7.0	
2	1	PCR Reaction Mix Hybridization Probe (10x)	4.0	1X
3	3	RCEID Primers Mix (10X)	2.0	1X
4	4	RCEID Probes Mix (10X)	2.0	1X
ปริมาตรรวม			15.0	

จากตารางเป็นการเตรียมน้ำยาทดสอบสำหรับ 1 ตัวอย่าง ถ้าต้องการเตรียมมากกว่านี้ให้คูณปริมาตรด้วยจำนวน reaction ที่ต้องการบวกเพิ่มอีก 1 reaction

ดูดสารละลาย PCR master mix เติมลงในหลอดแก้ว หลอดละ 15 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 5 ไมโครลิตร ของ DNA template ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเติม DNA templates

ส่วนประกอบ	Negative control	Positive control	Sample
PCR Master mix (ตาราง 1)	15	15	15
Water (หลอด 5)	5	-	-
RCEID Positive control DNA (หลอด 4)	-	5	-
Sample DNA	-	-	5
ปริมาตรรวม (ไมโครลิตร)	20	20	20

10. Real time PCR Program

โปรแกรม 1 : Pre-incubation ; 95°C, 10 นาที

โปรแกรม 2 : Amplicfication; Denaturation ที่ 95 °C, 5 วินาที, Annealing 60°C, 30 วินาที และ Extension 72 °C, 25 วินาที โดยทำซ้ำทั้งหมด 45 Cycles และกำหนดค่า Temperature transition rate เป็น 20 °C/วินาที

โปรแกรม 3 : Melting curve analysis ; เพิ่มความร้อนถึง 95 °C, 10 วินาที โดยใช้ Temperature transition rate 20 °C/วินาที แล้วลดอุณหภูมิลงถึง 62 °C, 30 วินาที จากนั้นค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 85 °C (Temperature transition rate 0.1 °C/วินาที)

โปรแกรม 4 : Cooling ; ลดอุณหภูมิลงจนถึง 40 °C เป็นเวลา 30 วินาที โดยใช้ Temperature transition rate 20 °C/วินาที

11. การวิเคราะห์ผลการทดสอบ

11.1 color compensation

เพื่อแก้ไขการรบกวนของสีฟลูออเรสเซนส์ที่มีมากกกว่า 1 สีในปฏิกิริยาเดียวกัน สามารถทำได้โดยการเลือก Color compension แล้วเลือก CCC file object (ข้อ 4) ที่จำเพาะกับการทดสอบ

11.2 Qualitative detection

คลิกเลือกแถบสีรายการที่ทำการทดสอบทั้งหมด กดปุ่ม Analysis บนแถบเมนูแล้วเลือก qualitative detection

11.3 Melting curve analysis

คลิกเลือกแถบสีรายการที่ทำการทดสอบทั้งหมด กดปุ่ม Analysis บนแถบเมนูแล้วเลือก Tm calling ค่า Tm ที่จำเพาะของ Positive control DNA แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่า Tm ของ Positive control

Positive control DNA	Detection Channel	ค่า Tm (°C)
Wuchereria bancrofti	640/Back 530	56-57
Human genome	670/Back 530	58-59

12. อุปกรณ์เพิ่มเติม

12.1 เครื่อง real time-PCR (LightCycler®2.0)

12.2 หลอดแก้ว (Capillaries) ขนาด 20 ไมโครลิตร

12.3 Adapter cooling box

12.4 Filter tip

12.5 Stopper สำหรับปิดฝา Capillaries

12.6 เครื่อง LC Carousel centrifuge หรือ เครื่องปั่นเหวี่ยงตั้งโต๊ะ (Microcentrifuge)

12.7 หลอดพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 2.0 มิลลิลิตร

12.8 ชุดสกัดสารพันธุกรรมจากเลือด