การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค Multiplex RT-PCR

นายวิทยา ภูมิภักดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF MOLECULAR DETECTION AND SUBTYPING OF HUMAN INFLUENZA A VIRUSES BASED ON MULTIPLEX RT-PCR ASSAY

MR. WITTHAYA POOMIPAK

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2010
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค Multiplex RT-PCR

โดย นายวิทยา ภูมิภักดิ์

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. รุ่งรัตน์ จิตวโรภาส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยา ภูมิภักดิ์: การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค Multiplex RT-PCR. (Development of molecular detection and subtyping of human influenza A viruses based on multiplex RT-PCR assay) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. สัญชัย พยุงภร, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ, 80 หน้า.

การติดเชื้อและการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทำให้เกิดความตื่นตระหนกและส่งผลกระทบทางด้านสาธารณสุขของประชากรในหลายประเทศทั่วโลก การป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสและการดูแลรักษาผู้ป่วยติดเชื้อจึงมีความสำคัญ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีเทคนิคการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้อง รวดเร็ว และแม่นยำ ในงานวิจัยครั้งนี้มุ่งพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค Multiplex RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพเนื่องจากให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ และมีความจำเพาะสูง ในการศึกษาได้แบ่งการพัฒนาออกเป็น 2 ระบบ คือ ระบบที่ใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ประกอบด้วยการตรวจหายีน GAPDH (491 bp), ยีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 H1N1 (368 bp), ยีน Matrix ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A (125 bp) และ B (295 bp) ในส่วนของระบบที่ใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยจำแนกสายพันธุ์ประกอบด้วยการตรวจหายีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 H1N1 (210 bp), เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลสายพันธุ์ H1N1 (362 bp), เชื้อไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลสายพันธุ์ H3N2 (183 bp) และ เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 (127 bp) ผลที่ได้จากการทดสอบพบว่า วิธี multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อการตรวจเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สูงมาก เนื่องจากให้ผลลบต่อเชื้อไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจชนิดอื่นและเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์อื่น ๆ (H2, H4, H6-H15) โดยมีความสามารถในการตรวจสอบอยู่ในช่วง 10^4-10 copies/µL ขึ้นกับชนิดของยีนเป้าหมาย นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของวิธี Multiplex RT-PCR โดยใช้ Multiplex real-time RT-PCR เป็นวิธีอ้างอิง พบว่า Multiplex RT-PCR มีค่าความจำเพาะ ค่าความไว และค่าความแม่นยำเท่ากับ 100%, 91% และ 95% ตามลำดับ ดังนั้นผลงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า วิธี multiplex RT-PCR เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือและยอมรับได้ทั้งในด้านความจำเพาะ ความไว ความถูกต้องแม่นยำ ราคาไม่แพง สามารถตรวจตัวอย่างได้ทีละปริมาณมากๆ ดังนั้น multiplex RT-PCR จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการณ์ทั่วไปในการวินิจฉัยการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้อย่างรวดเร็ว เพื่อการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อและการดูแลรักษาผู้ติดเชื้อได้อย่างทันท่วงที

ภาควิชา ชีวเคมี..............................ลายมือชื่อนิสิต วิทยา ภูมิภักดิ์ ....

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์.........ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..............

ปีการศึกษา 2553.........................ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..............

#5274815030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : INFLUENZA VIRUS / MULTIPLEX RT-PCR/ DETECTION/ SUBTYPING

WITTHAYA POOMIPAK: DEVELOPMENT OF MOLECULAR DETECTION AND SUBTYPING OF HUMAN INFLUENZA A VIRUSES BASED ON MULTIPLEX RT-PCR ASSAY. ADVISOR: SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., 80 pp.

Influenza virus infections have been causing major public health concerns worldwide. Therefore, rapid and accurate diagnostic methods for detection and subtyping of influenza virus are crucial both for patient management and to limit dissemination. In this study, multiplex RT-PCR assays were developed, optimized and evaluated for detection and subtyping of influenza viruses. The detection assay consisted of specific primers for GAPDH (491 bp), HA gene of pandemic H1-2009 (368 bp), matrix gene of influenza A (125 bp) and matrix gene of influenza B (295 bp). The subtyping assay included specific primers for HA gene of each subtype of influenza A virus including pandemic H1-2009 (210 bp), H1-seasonal (362 bp), H3-seasonal (183 bp) and H5-avian (127 bp). The multiplex RT-PCR assay yielded acceptable detection ranged from $10\text{-}10^4$ copies/μl depending on each gene and highly specific detection without any cross amplification to other respiratory viruses or other subtypes of influenza A virus (H2, H4, H6-H15). Moreover, this assay provided 100% specificity, 91% sensitivity and 95% accuracy compared to the real-time RT-PCR assay described previously. In conclusion, this multiplex RT-PCR is acceptable for valuable detection because of its efficiency in terms of rapidity, specificity, sensitivity, accuracy and cost-effectiveness. Therefore, it would be feasible and attractive for large scale detection and subtyping of influenza virus in patients with respiratory diseases.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department : Biochemistry
Field of Study : Medical Biochemistry
Academic Year : 2010

Student's Signature Witthaya Poomipak
Advisor's Signature Sunchai Payungporn
Co-advisor's Signature Yong Poo-

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพรียบพร้อม กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และเอื้อเฟื้อสถานที่ห้องปฏิบัติการสำหรับดำเนินงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้และแก้ไขเนื้อหาในโครงร่างวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตครั้งที่ 2 ปีงบประมาณ 2554, the CU Centenary Academic Development Project, the National Research University project of CHE, กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, The MK Restaurant Company Limited, Thailand และ NIAID, NIH, Department of Health and Human Services สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลีนิก และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ และญาติพี่น้องเป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย..	ง
บทคัดย่อภาอังกฤษ..	จ
กิตติกรรมประกาศ..	ฉ
สารบัญ..	ช
สารบัญตาราง..	ซ
สารบัญภาพ..	ฌ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..	ฎ
บทที่ 1 บทนำ..	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..	30
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..	49
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..	60
รายการอ้างอิง..	64
ภาคผนวก..	69
- ภาคผนวก ก..	70
- ภาคผนวก ข..	72
- ภาคผนวก ค..	76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..	80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงสารพันธุกรรมโปรตีนที่ได้จากการแปลรหัสของสารพันธุกรรมและหน้าที่ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ.................... 6
2. แสดงจานวนนิวคลีโอไทด์ที่นำมาจากฐานข้อมูล NCBI 37
3. แสดงไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Typing)... 39
4. แสดงไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับตรวจวินิจฉัยจัดจาแนกสายพันธุ์เชื้อไวรัสไข้หวัด ใหญ่ชนิดเอ (subtyping).. 40
5. แสดงชุดของไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือกสำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (typing) 41
6. แสดงชุดของไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือกสำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (subtyping) 42
7. แสดงสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR 43
8. แสดงรายละเอียดแต่ละขั้นตอนของโปรแกรม Multiplex RT-PCR................ 44
9. แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Multiple RT-PCR amplification สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 49
10. แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Multiple RT-PCR amplification สำหรับจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ................................... 49
11. แสดงส่วนผสมของสารเคมีที่ใช้สาหรับทำ multiplex RT-PCR ที่ผ่านการปรับความเหมาะสมแล้ว... 50
12. แสดงรายละเอียดแต่ละขั้นตอนของโปรแกรม multiplex RT-PCR ที่ผ่านการปรับความเหมาะสมแล้ว.. 51
13. แสดงสรุปผลของเทคนิค multiplex real-time RT-PCR, multiplex RT-PCR และ rapid test ที่ในงานวิจัย... 58
14. แสดงค่าทางสถิติที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค multiplex RT-PCR และ rapid test 59

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	แสดงลักษณะโครงสร้าง (ซ้าย) และ polymerase complex (ขวา) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ........	6
2.	แสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เมื่อมีการติดเชื้อในเซลล์โฮสต์...	9
3.	แสดงสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ที่มีการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ........	10
4.	แสดงการเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ	11
5.	แสดงการระบาดครั้งใหญ่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ........	12
6.	แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใหม่ 2009........	14
7.	แสดง MDCK cell (ซ้าย) และchicken embryonic egg (ขวา) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่........	15
8.	แสดงหลักการของเทคนิค Hemagglutination และ Hemagglutination inhibition........	17
9.	แสดงหลักการของเทคนิค Neutralization (NT)........	17
10.	แสดงหลักการของเทคนิค ELISA	18
11.	แสดงหลักการของเทคนิค Rapid test........	19
12.	แสดงหลักการของเทคนิค Reverse Transcription (RT)........	19
13.	แสดงหลักการของเทคนิค PCR........	20
14.	แสดงลักษณะของกราฟของเทคนิค real-time PCR ที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงของปฏิกิริยา	22
15.	แสดงการทำงานของ SYBR Green Dye........	23
16.	แสดงการทำงานของ Hybridization probe........	24
17.	แสดงการทำงานของ Hydrolysis probe........	25
18.	แสดงการทำงานของ Hairpin probe........	26
19.	แสดงหลักการของเทคนิค NASBA........	27
20.	แสดงหลักการของเทคนิค DNA microarray........	28
21.	แสดงหลักการของเทคนิค Pyrosequencing และการแปลผล........	29

ภาพที่ หน้า

22. แสดงฐานข้อมูลของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่………………………………………….. 37
23. แสดงโปรแกรมที่ใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์... 38
24. แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค Rapid test ของ Influenza Ag A/B A (H1N1) Pandemic rapid test อย่างย่อ……………………………………………... 45
25. แสดงตัวอย่างแถบของ DNA ที่ได้จากการทำ multiplex RT-PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (typing detection)…………………. 52
26. แสดงตัวอย่างแถบของ DNA ที่ได้จากการทำ multiplex RT-PCR สำหรับจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (subtyping detection)... 53
27. แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ใช้กับไวรัสชนิดอื่น...... 54
28. แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ใช้กับเชื้อ Influenza A virus สายพันธุ์ต่างๆ... 55
29. แสดงระดับความไวที่เทคนิค Multiplex RT-PCR ที่สามารถตรวจสอบได้.......... 56
30. แสดงผลที่ได้จากการทดสอบด้วย Rapid test………………………………….. 57
31. แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.1, 0.2 และ 0.3 μM (Typing)……………… 72
32. แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.1, 0.2 และ 0.3 μM (Subtyping)………….. 73
33. แสดงความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 2.5, 5, 7.5 และ 10.0 μM (Typing)... 74
34. แสดงความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 2.5, 5, 7.5 และ 10 μM (Subtyping)………………………………………………………………… 75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

(List of Abbreviations)

µL	=	Microliter
µM	=	Micromolar
BLAST	=	Basic Local Alignment Search Tool
bp	=	Base pair
BSL-2	=	Biosafety Level 2
BSL-3	=	Biosafety Level 3
cDNA	=	Complementary Deoxyribonucleic acid
DEPC	=	Diethyl pyrocarbonate
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
HA	=	Hemagglutinin
kDa	=	Kilo Dalton
M	=	Matrix protein
$MgCl_2$	=	Magnesium Chloride
mL	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
NA	=	Neuraminidase
NP	=	Nucleoprotein
NS	=	Non-structural protein
PA	=	Polymerase Acid protein
PB1	=	Polymerase Basic protein 1
PB2	=	Polymerase Basic protein 2
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PPi	=	Pyrophosphate
RNA	=	Ribonucleic acid
RT-PCR	=	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในช่วงเดือนเมษายนของปี พ.ศ. 2552 ที่ผ่านมาพบว่ามีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (Human pandemic Influenza A virus(pH1N1)) สายพันธุ์ H1N1 ในประเทศเม็กซิโก และสหรัฐอเมริกา ซึ่งต่อมาแพร่กระจายไป 74 ประเทศทั่วโลกอย่างรวดเร็ว (1, 2) ในปัจจุบันพบว่ามีการระบาดไปทั่วโลกมากกว่า 241 ประเทศ (25) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (Influenza A virus) สายพันธุ์ H1N1 ที่ระบาดในครั้งนี้เป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดตามฤดูกาล ซึ่งเมื่อนำสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1N1) มาทำการศึกษาวิเคราะห์ในส่วนของยีนทั้ง 8 ท่อน เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีการระบาดตามฤดูกาล พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1N1) เป็นเชื้อไวรัสลูกผสม (Reassortant virus) ที่เกิดมาจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ในสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีการระบาดในมนุษย์ สัตว์ปีก และสุกร (3)

การที่เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีการกลายพันธุ์เปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ได้ง่าย ด้วยเหตุนี้เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีการระบาดตามฤดูกาลสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 จึงมีการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์อยู่ตลอดเวลา การใช้วัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จึงต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์วัคซีนให้มีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีการระบาดในปัจจุบันจึงจะสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีการระบาดอยู่ได้และเมื่อมีการเปรียบเทียบสายพันธุ์ของวัคซีน(A/Brisbane/59/2007-like virus) ที่ใช้ป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดตามฤดูกาลในปัจจุบันกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1N1) พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของสายพันธุ์น้อยกว่า 80 % แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ของวัคซีนที่ใช้ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1N1) ที่มีการระบาดในปัจจุบันได้ ดังนั้นผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลหรือผู้ที่เคยได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดตามฤดูกาลนั้น จะไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1N1)ได้ การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ เพื่อช่วยให้แพทย์สามารถทำการรักษาได้อย่างถูกต้อง เหมาะสม และสามารถป้องกันการแพร่กระจายเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จากผู้ป่วยไปสู่บุคคลรอบข้างได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

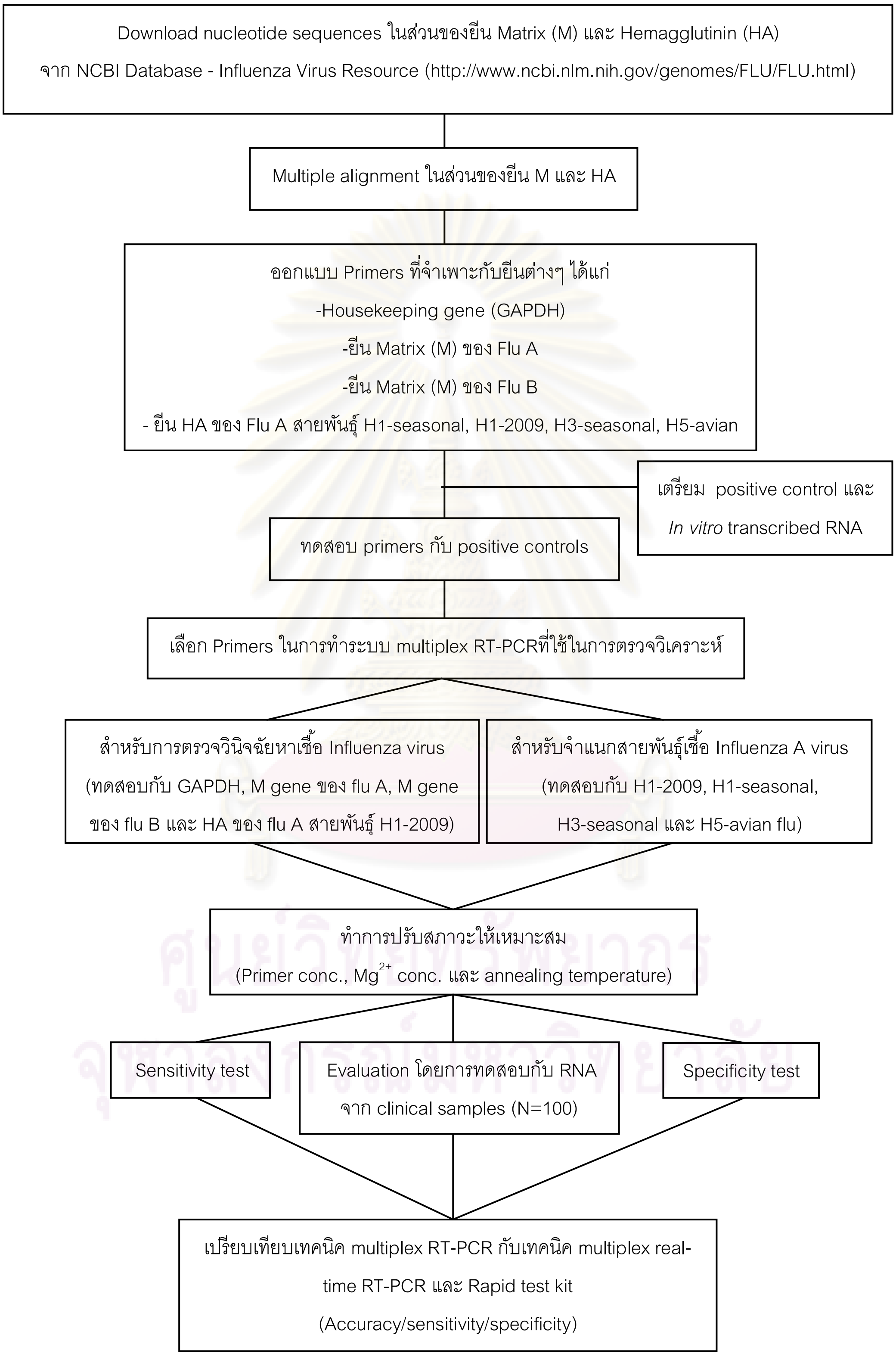
การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ในปัจจุบันมีหลายวิธี ซึ่งเทคนิคส่วนใหญ่อาศัยหลักการของ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส อาทิเช่น เทคนิค real-time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว มีความแม่นยำสูง แต่มีต้นทุนในการตรวจที่สูง singleplex RT-PCR เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 เทคนิคนี้จะใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ที่มีความจำเพาะกับ RNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจะให้ผลการตรวจได้อย่างรวดเร็วภายในไม่กี่ชั่วโมง และมีความน่าเชื่อถือ อีกทั้งมีราคาไม่แพงมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ แต่ข้อจำกัดของเทคนิค singleplex RT-PCR นั้นคือเนื่องจากมีการใช้ไพรเมอร์เพียง 1 คู่ ทำให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่จำเพาะกับไพรเมอร์ที่ใช้ ได้เพียง 1 ชนิดเท่านั้น เทคนิคนี้จึงบอกผลได้เพียงว่ามีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่หรือไม่ ไม่สามารถจำแนกหรือบอกว่าติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์อื่นได้ นอกจากนี้หากพบว่ามีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ จะไม่สามารถบอกได้ว่าติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใด

ดังนั้นโครงการวิจัยในครั้งนี้จึงได้มุ่งเน้นในการพัฒนาเทคนิคในการตรวจวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจะใช้ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ โดยไพรเมอร์ที่ใช้นั้นจะถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ต้องการตรวจหา ผลของเทคนิค multiplex RT-PCR จะทำให้สามารถทราบได้ว่าติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ หรือไม่ ถ้ามีการติดเชื้อไวรัสแล้วติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใด ซึ่งเทคนิคนี้สามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็วจากการตรวจเพียงครั้งเดียว เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในด้านความแม่นยำ (Accuracy) ระดับความไว (Sensitivity) และเวลาที่ใช้ในการตรวจ (Detection time) ระหว่างเทคนิค multiplex RT-PCR, multiplex real-time RT-PCR และ rapid test kit

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค multiplex RT-PCR ที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยและแยกสายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในผู้ป่วยที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในด้านความแม่นยำ (Accuracy) ระดับความไว (Sensitivity) และเวลาที่ใช้ในการตรวจ (Detection time) ระหว่างเทคนิค multiplex RT-PCR, multiplex real-time RT-PCR และ rapid test kit

ขอบเขตของการวิจัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากปริมาตรของสารตัวอย่างมีจำนวนจำกัดจึงอาจไม่สามารถทำการทดลองซ้ำหรือทำการทดลองเพิ่มเติมในบางส่วนที่ต้องการศึกษาได้

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Subtype คือ สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ซึ่งจำแนกโดยการตรวจทาง serology test (antigen-antibody) แต่ในปัจจุบันนิยมการถอดรหัสพันธุกรรมในส่วนของยีน hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) แล้วเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับ และสะดวกกว่าการทดสอบด้วยวิธี serology test

Multiplex PCR คือ เทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยอาศัยไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ ที่มีความจำเพาะกับสารพันธุกรรม ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจะให้ผลการตรวจหลายๆ ยีนพร้อมกันในหลอดทดลองเดียวกัน ทำให้สามารถตรวจได้อย่างรวดเร็วภายในไม่กี่ชั่วโมง และประหยัดค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำเทคนิค multiplex RT-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นไปใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ในผู้ป่วยที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ เพื่อให้ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว
2. สามารถวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิคในด้านความแม่นยำ (accuracy) ระดับความไว (sensitivity) และเวลาที่ใช้ในการตรวจ (detection time) ของเทคนิค multiplex RT-PCR กับเทคนิค multiplex real-time RT-PCR และ rapid test kit เพื่อที่จะสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยและแยกสายพันธุ์การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่
3. ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง โดยตีพิมพ์ในวารสารที่เกี่ยวกับด้านไวรัสวิทยา หรือการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ในการตรวจหาเชื้อไวรัส เช่น International Research Journal of Biotechnology

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

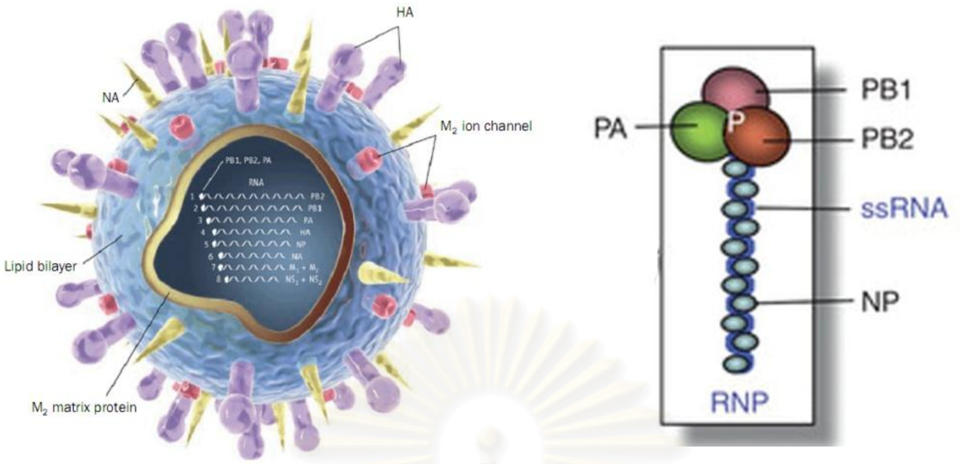
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไวรัสวิทยาของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus)

Influenza virus หรือเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ จัดอยู่ใน family *Orthomyxoviridae* และสามารถแบ่งได้ 3 ชนิดคือ A, B และ C โดยอาศัยความแตกต่างกันของโปรตีนของเชื้อไวรัส (viral proteins) คือ nucleoprotein (NP) และ matrix protein (M) ที่อยู่บริเวณผิวของอนุภาคไวรัส เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และ B พบว่ามีการระบาดในมนุษย์ ส่วนชนิด C นั้นพบว่ามีการระบาดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น (28, 29)

Influenza A virus เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) มีลักษณะกลม หรือวงรี ไวรัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 80-120 นาโนเมตร ด้านนอกของอนุภาคไวรัสถูกห่อหุ้มด้วยลิปิด (lipid bilayer) ซึ่งเป็นส่วนที่อนุภาคของไวรัสได้รับมาจาก plasma membrane ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส ถัดมาจากชั้นที่ห่อหุ้มด้วยไขมันเป็นชั้นของโปรตีนที่เรียกว่า Matrix (M) เรียงตัวอยู่ ซึ่งจะแบ่งออกเป็น M1 ทำหน้าที่เป็น matrix protein สร้างความแข็งแรงให้กับชั้นไขมันของอนุภาคไวรัส และ M2 ทำหน้าที่เป็น ion channel ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างชั้นของไขมัน ผิวด้านนอกของอนุภาคไวรัส มีลักษณะเป็นปุ่ม (spike) ยื่นออกมาประมาณ 500 ปุ่ม โดยแบ่งออกเป็น hemagglutitnin (HA) มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped spike) และ neuraminidase (NA) มีรูปร่างคล้ายดอกเห็ด (mushroom-shaped spike) กระจายอยู่โดยรอบดังแสดงในภาพที่ 1 (ซ้าย) ปริมาณสัดส่วนระว่าง HA และ NA เท่ากับ 4:1 หรือ 5:1 สารพันธุกรรมของไวรัสเป็น negative single-stranded RNA (-ssRNA) ลักษณะเป็น segments ทั้งหมด 8 ท่อน แต่สามารถแปลรหัสสารพันธุกรรมได้เป็นโปรตีนทั้งหมด 10 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1: แสดงลักษณะโครงสร้าง (ซ้าย) และ Polymerase complex (ขวา)

ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

(ภาพจาก : www.sciencemag.org/cgi/reprint/312/5772/380.pdf)

ตารางที่ 1: แสดงสารพันธุกรรม โปรตีนที่ได้จากการแปลรหัสของสารพันธุกรรม และหน้าที่ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

RNA Segment	Length	โปรตีน	ขนาดโปรตีน	หน้าที่
1	2350 bp	Polymerase basic protein 2 (PB2)	759 a.a.	Cap binding, endonuclease
2	2350 bp	Polymerase basic protein 1 (PB1)	757 a.a.	RNA polymerase
3	2250 bp	Polymerase acid protein (PA)	716 a.a.	RNA polymerase subunit, proteolysis
4	1780 bp	Hemagglutinin (HA)	560 a.a.	Attachment to sialic acid, membrane fusion
5	1575 bp	Nucleoprotein (NP)	498 a.a.	Encapsidates RNAs, nuclear import of RNA
6	1420 bp	Neuraminidase (NA)	450 a.a.	Sialidase activity, release of virus
7	1050 bp	Matrix protein (M1)	252 a.a.	Major structural protein, virus assembly
		Ion channel (M2)	96 a.a.	Proton ion channel, viral uncoating
8	900 bp	Nonstructural protein 1 (NS1)	230 a.a.	Down-regulate anti-viral response
		Nuclear export protein (NEP)	121 a.a.	Nuclear export of RNPs

–Hemagglutinin (HA) เป็นไกลโคโปรตีนที่อยู่บนผิวของอนุภาคไวรัส ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับ sialic acid receptor ที่อยู่บนผิวของเซลล์ การจับระหว่างโปรตีน HA กับ sialic acid receptor จะมีความจำเพาะค่อนข้างสูง ดังนั้นลักษณะของความจำเพาะนี้จึงเป็นตัวกำหนดการ

ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิดที่แตกต่างกัน เช่น มนุษย์ สัตว์ปีก สุกร เสือ แมว หรือสุนัข เป็นต้น (30, 31, 32, 33)

–M protein แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ M1 matrix protein ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเปลือกของอนุภาคไวรัสและ M2 ion channel จะทำหน้าที่เป็น transmembrane protein ขนาดเล็กซึ่งทำหน้าที่ขนส่งโปรตอน (H^+) เข้าสู่อนุภาคของไวรัสทำให้ภายในอนุภาคของไวรัสมีความเป็นกรดมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเกิดการแตกตัวของอนุภาคของ เชื้อไวรัส (uncoating) เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ภายในเซลล์

–Nucleoprotein (NP) เป็นโปรตีนที่อยู่กับ RNA ของเชื้อไวรัส ซึ่งจะถูกเรียกรวมกันว่า ribonucleoproteins (RNPs) เพื่อทำให้ RNA ของเชื้อไวรัสมีความเสถียรมากขึ้น นอกจากนี้ NP ยังช่วยในการขนส่ง RNA ของเชื้อไวรัสจากไซโตพลาสซึม (cytoplasm) เข้าสู่นิวเคลียส (Nucleus) ของเซลล์ และยังช่วยให้ polymerase complex ของเชื้อไวรัสสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง RNA ของเชื้อไวรัสและ RNA ของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell)

–Polymerase complex เป็นโปรตีนที่จับบริเวณส่วนปลายของ RNA ของเชื้อไวรัส ซึ่งจะประกอบไปด้วยโปรตีน 3 ชนิดคือ PB2, PB1 และ PA ดังภาพที่ 1 (ขวา) ทำหน้าที่ในการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) เพื่อสร้าง messenger RNA (mRNA) ซึ่งจะถูกแปลรหัสพันธุกรรม (translation) สร้างโปรตีนของเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ต่อไป

–Nuclear export protein (NEP หรือ NS2) ทำหน้าที่ขนส่งและเหนี่ยวนำ RNA ของเชื้อไวรัสที่อยู่ในรูป Ribonucleoproteins (RNPs) ซึ่งถูกสร้างขึ้นใหม่จากนิวเคลียสออกสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน

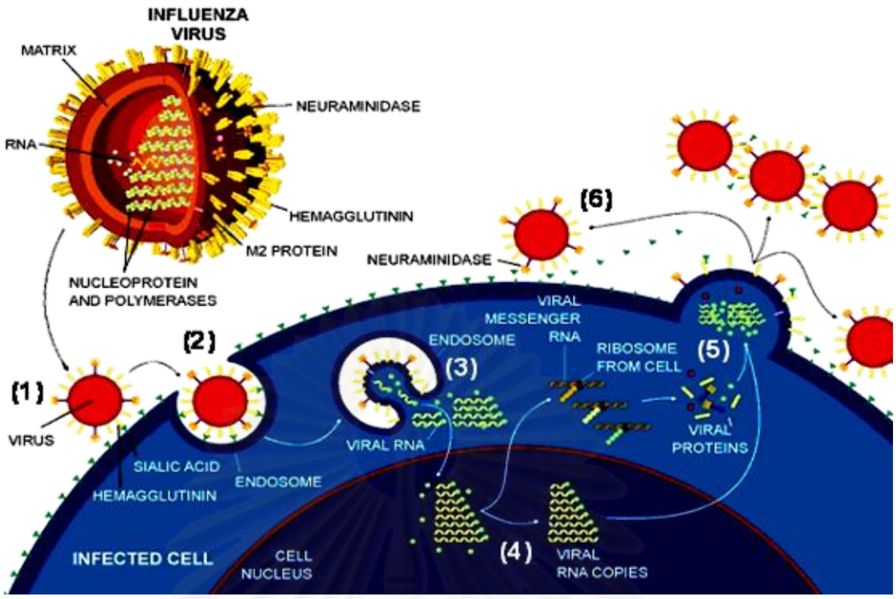
–Neuraminidase (NA) หรือเรียกว่าเอนไซม์ sialidase ทำหน้าเป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัด sialic acid ซึ่งยึดอนุภาคไวรัสไว้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ จึงมีผลทำให้มีการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสตัวใหม่ (Budding) ออกจากเซลล์ตั้งต้น และแพร่กระจายไปติดเชื้อสู่เซลล์ข้างเคียงต่อไป

–Non-structural protein 1 (NS1) เป็นโปรตีนที่ไม่ปรากฏอยู่ในโครงสร้างของอนุภาคของเชื้อไวรัส แต่จะพบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีหน้าที่หลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับ การควบคุมกระบวนการ RNA splicing และ translation นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งระบบ interferon response ซึ่งเป็นกลไกต้านการติดเชื้อไวรัสของเซลล์อีกด้วย

การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่ชนิด เอ

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ก่อให้เกิดโรคระบบเดินหายใจ โดยผู้ป่วยจะมีอาการอ่อนเพลียอย่างฉับพลัน เบื่ออาหาร คลื่นไส้ ปวดศีรษะอย่างรุนแรง ปวดตามแขนขา ปวดข้อ ปวดรอบตา ไข้สูง 39-40 °C เจ็บคอ คอแดง มีน้ำมูกใส และไอแห้ง ๆ หรือมีภาวะติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย (7) เชื้อไวรัสสามารถแพร่กระจายจากคนหนึ่งสู่อีกคนหนึ่งผ่านทางการไอ จาม การสัมผัสกับผู้ป่วยหรือของใช้ของผู้ป่วย เชื้อไวรัสสามารถผ่านเข้าสู่ร่างกายผ่านทางเยื่อบุตา จมูก หรือปาก เมื่ออนุภาคของเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกาย เชื้อไวรัสจะใช้ส่วนของ hemagglutinin ซึ่งเป็น glycoprotein ที่อยู่บนผิวของอนุภาคไวรัส ในการจับกับ receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ host (sialic acid receptor) sialic acid ที่พบว่าสามารถจับกับอนุภาคของเชื้อไวรัสได้มี 2 ลักษณะ คือ แบบ alpha-2,3-linkage และ alpha-2,6-linkage ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี receptor-mediated endocytosis เกิดเป็น endosome จากนั้นจะใช้ส่วนของ M2 ion channel ในการขนส่งโปรตอน (H^+) เข้าสู่อนุภาคของเชื้อไวรัสทำให้ภายในอนุภาคของไวรัสมีความเป็นกรดมากขึ้นเรื่อยๆ ทำให้เกิดกระบวนการ disassembly ของ virus viral RNA จะถูกส่งเข้าไปในส่วนของ nucleus (8) แล้วเกิดกระบวนการ transcription ของไวรัสโดยอาศัยเอนไซม์ polymerase จาก viral mRNA เนื่องจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ มีสารพันธุกรรมเป็น (-) RNA ดังนั้นเชื้อไวรัสจึงมีการสร้าง (+) RNA intermediate ส่วนหนึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสร้างโปรตีนของเชื้อไวรัสและอีกส่วนหนึ่งถูกนำกลับไปเป็นแม่แบบในการสร้างสารพันธุกรรม เมื่อไวรัสสร้างสารพันธุกรรมและโปรตีนของเชื้อไวรัสแล้ว จะถูกส่งออกมายังส่วนของไซโตพลาสซึม แล้วเกิดกระบวนการ assembly และ budding ของไวรัส ในการ budding จะอาศัยส่วนของ neuraminidase ในการตัด sialic acid receptor ที่ผิวเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน ดังแสดงในภาพที่ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



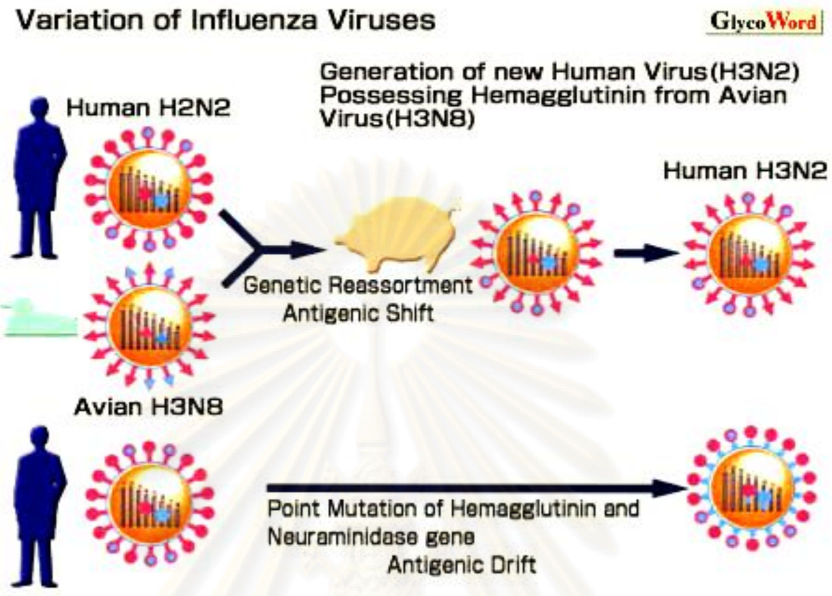
ภาพที่ 2: แสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เมื่อมีการติดเชื้อในเซลล์โฮสต์
(ภาพจาก Thai-AI-Database: http://www.thai-ai-database.org/new_th.asp)

การจัดจำแนกและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

ในปัจจุบันการจัดจำแนก subtype ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ จะใช้ส่วนของ glycoprotein 2 ชนิดที่อยู่บริเวณผิวของอนุภาคเชื้อไวรัสนั้นคือ hemagglutinin ซึ่งปัจจุบันสามารถจำแนกได้ทั้งหมด 16 สายพันธุ์ (H1-H16) และ neuraminidase สามารถจัดจำแนกได้ทั้งหมด 9 สายพพันธุ์ (N1-N9) (34, 35) ดังแสดงในภาพที่ 3 การระบุสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ นิยมระบุชนิดของ HA และ NA ควบคู่กัน เช่น H5N1, H3N2, H1N1 เป็นต้น นอกจากนี้สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ แต่ละชนิดก็มีความจำเพาะต่อการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ มีความสามารถในการกลายพันธุ์และการวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสที่ค่อนข้างรวดเร็ว ด้วยเหตุนี้ความจำเพาะต่อการติดเชื้อไวรัสในสิ่งมีชีวิตอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ไม่มีประสิทธิภาพในการที่จะป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (10)



ภาพที่ 4: แสดงการเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

(ภาพจาก : http://www.dld.go.th/region4/gard/web_pongun/disease/avflu/avflu_5_files /gd-a06e.jpg)

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

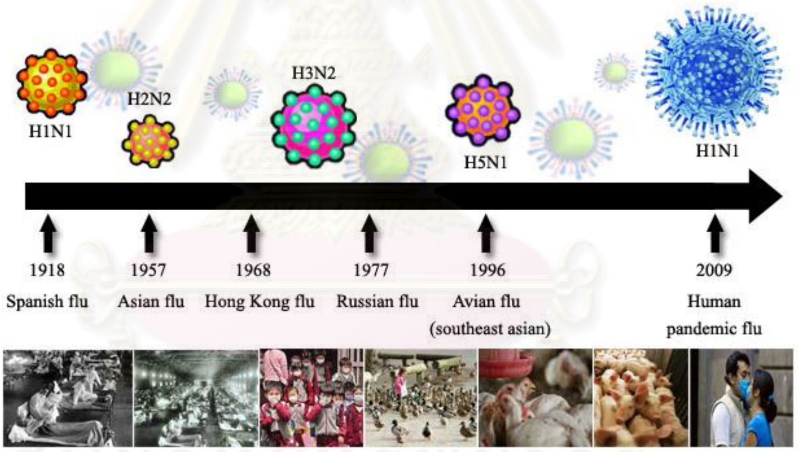
เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ก่อให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ ซึ่งสามารถพบได้ในคนทุกเพศทุกวัย และระบาดได้ตลอดทั้งปี แต่พบการระบาดมากในช่วงฤดูฝนของประเทศไทย การระบาดของเชื้อไวรัสจะมีการระบาดเพียงไม่กี่สายพันธุ์ในแต่ละครั้งตามฤดูกาล การที่เชื้อไวรัสมีการระบาดผลัดเปลี่ยนหมุนเวียนกันอาจจะทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ขึ้นและอาจเป็นการแพร่ระบาดครั้งใหญ่ได้ การระบาดครั้งใหญ่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใหม่แสดงในภาพที่ 5 และมีรายละเอียดของข้อมูลดังต่อไปนี้

ในค.ศ. 1918-1919 มีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H1N1 โดยมีการเรียกชื่อว่า Spanish flu ซึ่งการระบาดในครั้งนี้เป็นการระบาดครั้งแรกจึงมีความรุนแรงมากที่สุด ทำให้มีผู้เสียชีวิตไปประมาณ 50 ล้านคน

ในค.ศ. 1957-1958 มีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H2N2 มีชื่อเรียกว่า Asian flu เชื้อเริ่มมีการระบาดในแถบทวีปเอเชียก่อนและระบาดไปทั่วโลก ในสหรัฐอเมริกามีผู้เสียชีวิตไปประมาณ 700,000 คน แต่การระบาดครั้งนี้สามารถจำแนกเชื้อได้อย่างรวดเร็ว และสามารถผลิตวัคซีนเพื่อใช้ป้องกันได้อย่างรวดเร็ว จึงมีผู้เสียชีวิตไม่มาก

ในค.ศ. 1968-1969 มีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H3N2 มีชื่อเรียกว่า Hong Kong flu ซึ่งผู้ป่วยรายแรกเป็นชาวฮ่องกง การระบาดในครั้งนี้มีผู้เสียชีวิตไปประมาณ 34,000 คน เชื้อ Hong Kong flu ที่มีการระบาดนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกับเชื้อ Asian flu ที่มีการระบาดมาก่อนหน้านี้ จึงทำให้มีผู้เสียชีวิตไม่มากนัก เนื่องจากผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันอยู่แล้ว

ในค.ศ. 1977-1978 มีการกลับมาระบาดใหม่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H3N2 มีชื่อเรียกว่า Russian flu ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เคยมีการระบาดแล้วเมื่อ ค.ศ. 1957 ด้วยเหตุนี้ผู้ที่มีอายุเกิน 23 ปีในขณะนั้นจึงมีภูมิต้านทานเชื้อไวรัส (36)



ภาพที่ 5 : แสดงการระบาดครั้งใหญ่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

ในค.ศ. 2009 มีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H1N1 มีชื่อเรียกหลายชื่อว่า Mexican flu, swine flu ทางองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) จึงให้ชื่อเรียกว่า Human pandemic influenza A virus (pH1N1) เป็นเชื้อไวรัสที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ที่มีการระบาดในสัตว์ปีก สุกร และในมนุษย์ และช่วงเดือนเมษายนของปี ค.ศ. 2009 พบว่ามีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H1N1 ซึ่งการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจากคนหนึ่งสู่อีกคนหนึ่ง จนกระทั่งเดือนมิถุนายนในปีเดียวกัน ทาง องค์การอนามัยโลก (World Health

Organization, WHO) ได้ประกาศให้เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H1N1 เป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ที่มีการระบาดไปทั่วโลก (pandemic) ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการศึกษาถึงวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H1N1 โดยการศึกษาของ Smith GJ และคณะ (19) พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H1N1 เมื่อปี ค.ศ. 1998 เกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ที่มีการระบาดในสุกร (classical swine H1N1 Influenza) กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ที่มีการระบาดในสัตว์ปีกทางแถบตอนเหนือของอเมริกา (north American avian Influenza) และเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ที่มีการระบาดในมนุษย์สายพันธุ์ H3N2 เกิดเป็นเชื้อไวรัสลูกผสมสายพันธุ์ H3N2 (triple reassortant H3N2 virus) และได้มีรายงานว่าเชื้อไวรัสลูกผสมดังกล่าวมีการแพร่ระบาดในสุกรทางตอนเหนือของอเมริกา (11,12) ต่อมาเชื้อไวรัสลูกผสมสายพันธุ์ H3N2 (Triple reassortant H3N2 virus) ได้มีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ที่มีการระบาดในสุกร (classical swine H1N1 Influenza) เกิดเป็นเชื้อไวรัสลูกผสมอีก 2 สายพันธุ์ คือ H1N1 reassortant swine viruses และ H1N2 reassortant swine viruses (13,14,15,16,17) โดยเชื้อไวรัสลูกผสมนี้มีการระบาดในสุกรในแถบอเมริกาเหนือและเอเชีย หลังจากนั้นได้มีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสลูกผสมนี้จนเกิดเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H1N1 ในที่สุด และเมื่อนำสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง 8 ท่อนมาทำการวิเคราะห์ทางด้าน phylogenetic พบว่า hemagglutinin (HA), nucleoprotein (NP) และ nonstructural protein genesได้มาจาก เชื้อ classical swine H1N1 Influenza ส่วนของ polymerase complex genes ได้แก่ PB2, PB1, PA ได้มาจาก เชื้อ triple reassortant H3N2 virus และในส่วนของ neuraminidase (NA) และ matrix (M) protein genes ได้มาจาก Eurasian swine Influenza virus (3,19,20,21,22) ดังแสดงในภาพที่ 6

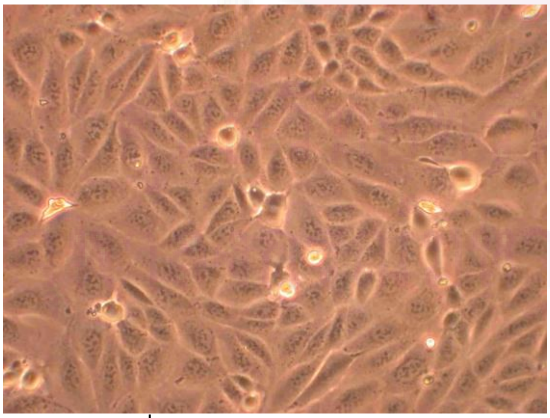
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

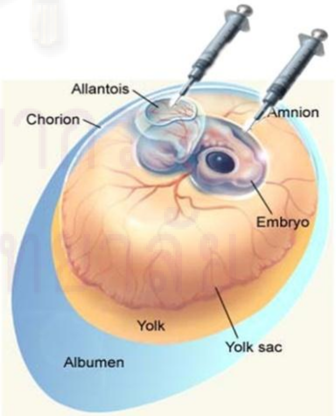
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

subtyping assay (37, 38, 39, 40, 41, 42) วิธีเหล่านี้สามารถให้ผลที่แม่นยำและรวดเร็วในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

cell culture เป็นเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่อาจจะมีอยู่ในสิ่งส่งตรวจที่ได้มาจากผู้ป่วย การแยกเพาะเชื้อไวรัสต้องทำอย่างระมัดระวังและทำตามข้อปฏิบัติอย่างเคร่งครัด ในการปฏิบัตินั้นต้องทำภายในห้องปฏิบัติการแยกเพาะเชื้อไวรัสเท่านั้น ซึ่งได้มาตรฐานตามหลักสากล โดยการแยกเพาะเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ นั้นจะใช้ห้องปฏิบัติการแยกเพาะเชื้อไวรัส ระดับ 2 หรือ 3 (biosefety level 2 (BSL2), level 3 (BSL3)) ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เซลล์ที่เหมาะสมและนิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ คือ MDCK (Mardin-Darby canine kidney cell) เชื้อไวรัสที่ได้จากสัตว์ปีกจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงในไข่ไก่ฟักดังแสดงในภาพที่ 7 ส่วนเชื้อไวรัสที่ได้จากสุกรและมนุษย์จะถูกเพาะเลี้ยงในเซลล์ดังกล่าว การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์ MDCK นั้นจะติดตามผลโดยสังเกตลักษณะของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเรียกว่า cytopathic effect (CPE) และเมื่อพบว่าเกิด CPE ขึ้นก็จะทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปทดสอบหาเชื้อไวรัสและเก็บไว้ศึกษาต่อไป ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟักนั้นจะทำการฉีดเชื้อไวรัสเข้าไปในส่วนของ amniotic sac หรือ allantoic sac หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้ฟักไข่เป็นเวลา 2-3 วัน เมื่อครบกำหนดจะทำการเปิดเปลือกไข่แล้วดูดน้ำที่อยู่ในชั้นของ amniotic sac หรือ allantoic sac ออกมาเพื่อทำการทดสอบหาเชื้อไวรัสต่อไป





ภาพที่ 7: แสดง MDCK cell (ซ้าย) และchicken embryonic egg (ขวา)
ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

(ภาพจาก: http://www.mpi-magdeburg.mpg.de/research/groups/bpt/และตกแต่งรูปจาก http://chickscope.beckman.uiuc.edu/explore/embryology/day04/4Focuson_1.html)

ในการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสทำได้ด้วยกันหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมนำมาใช้คือ การทดสอบ Hemagglutination assay ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติของ Hemagglutinin ที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ซึ่งจะสามารถบอกได้ว่ามีอนุภาคของเชื้อไวรัสหรือไม่ นอกจากนี้วิธีนี้ยังสามารถบอกถึงปริมาณของเชื้อไวรัสโดยการทำ end point titration

เทคนิคนี้มีข้อดีคือสามารถเก็บเชื้อไวรัสไว้ได้ (Virus recoverable) แต่มีข้อเสียเนื่องจากต้องเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส จึงทำให้ต้องใช้เวลานานในการที่จะทราบผลตรวจ และเทคนิคนี้ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญของผู้ตรวจ และมี sensitivity ต่ำ

Immunofluorescence (IF) เป็นการทดสอบหาเชื้อไวรัสอีกหนึ่งวิธี โดยใช้ specific monoclonal antibody ที่ติดฉลากด้วย fluorescence ซึ่งเป็นสารเรืองแสงยึดไว้บนแผ่นกระจก เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสที่อยู่ในเซลล์ที่ติดเชื้อ หรือ antigen ที่อยู่ในสภาพของเหลว (solubilized infected cells) ทำให้เกิดปฏิกิริยา antigen-antibody complex ดังนั้นเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) ก็จะเห็นการเรืองแสงที่เกิด เทคนิคนี้มีข้อดีคือ ให้ผลการตรวจภายใน 2 ชั่วโมง ถึง 1 วัน แต่ก็มีข้อเสียคือต้องรักษาสภาพของเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่ดีก่อนนำมาทำการตรวจหาเชื้อไวรัส และผู้ตรวจต้องมีความชำนาญ นอกจากนี้ยังต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะนั้นคือ fluorescence microscope

เทคนิคการตรวจวินิจฉัยหาแอนติบอดี (Antibody) ต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

วินิจฉัยการติดเชื้อด้วยการตรวจหาแอนติบอดี นอกจากจะใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่แล้ว ยังสามารถใช้วินิจฉัยการติดเชื้อที่ผ่านมาและวัดการตอบสนองต่อการให้วัคซีน ในการตรวจหาแอนติบอดีจะพิจารณาระดับของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นต่อแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่งดังนี้ M, NP, NA และ HA การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ที่นิยมใช้คือ Hemagglutination inhibition (HI) และ Neutralization (NT)

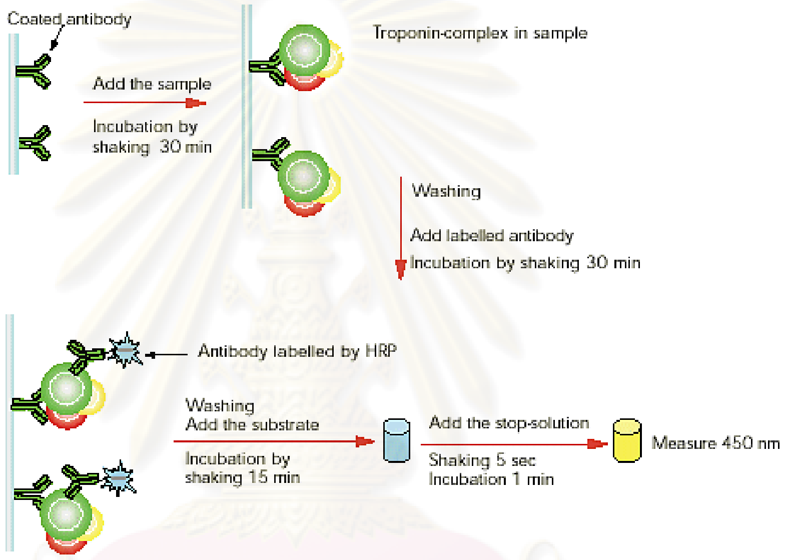
เทคนิค Hemagglutination inhibition (HI)

เป็นวิธีที่ใช้ในการวัดระดับของแอนติบอดีต่อ HA แอนติบอดีที่ตรวจพบนั้นจะจำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่มีการระบาดอยู่ในช่วงนั้นซึ่งสามารถบ่งบอกถึงสภาวะภูมิคุ้มกันได้ เทคนิค HI สามารถทำได้โดยผสมซีรัมกับแอนติเจนของไวรัส (HA) จากนั้นนำไปบ่ม แล้วเติมเม็ดเลือดแดงลงไปแล้วนำไปบ่ม จากนั้นทำการอ่านผล หลักการอ่านผลคือ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ จะใช้ส่วนของ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เทคนิค Enzyme Immunoassay หรือ Enzyme Linked Immunoassay

Enzyme-immunoassay (EIA) เป็นเทคนิคที่ตรวจหาเชื้อไวรัสโดยอาศัยความจำเพาะระหว่าง antigen และ antibody แสดงผลโดยอาศัย immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วย enzyme แล้วตรวจสอบผลด้วย substrate ดังแสดงในภาพที่ 10 เทคนิคนี้มีข้อดีคือสามารถทราบผลตรวจได้อย่างรวดเร็วภายใน 15 นาที ถึง 1 วัน และผู้ป่วยยังสามารถตรวจได้ด้วยตัวเอง แต่ก็มีข้อเสียคือการตรวจแต่ละครั้งมีราคาแพง และไม่สามารถเก็บเชื้อไวรัสไว้ได้ (no virus recoverable)

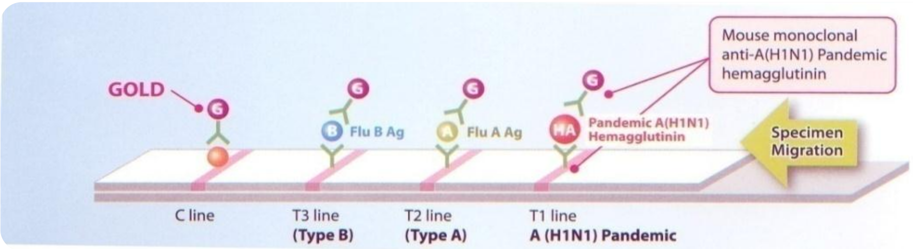


ภาพที่ 10 : แสดงหลักการของเทคนิค ELISA

(ภาพจาก : http://www.labmaster.fi/products/elisakits/troponin-i.htm)

เทคนิคการตรวจหาแอนติเจนต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยวิธี rapid test

การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Rapid test ภายในเวลาไม่กี่นาที อาจเป็นการช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยและช่วยให้แพทย์พิจารณาการรักษาได้ทันที โดยอาจจะใช้หลักการของ immunochromatography โดยอาศัยการวิ่งของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจไปพบกับแถบของแอนติบอดีที่จำเพาะที่ถูกตรึงอยู่ แล้วสังเกตแถบสีที่เกิดขึ้น หรืออาจจะอาศัยหลักการของ membrane absorption enzyme immunoassay (EIA) โดยอาศัยการซึมผ่านของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจไปกับแอนติบอดีที่จำเพาะ ทำให้เกิดจุดสีหลังจากเติมน้ำยาและสารที่ทำให้เกิดสีดังแสดงในภาพที่ 11 เทคนิคนี้มีข้อดีคือ สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อได้อย่างรวดเร็ว แต่มีของเสียในเรื่องของความจำเพาะเจาะจง



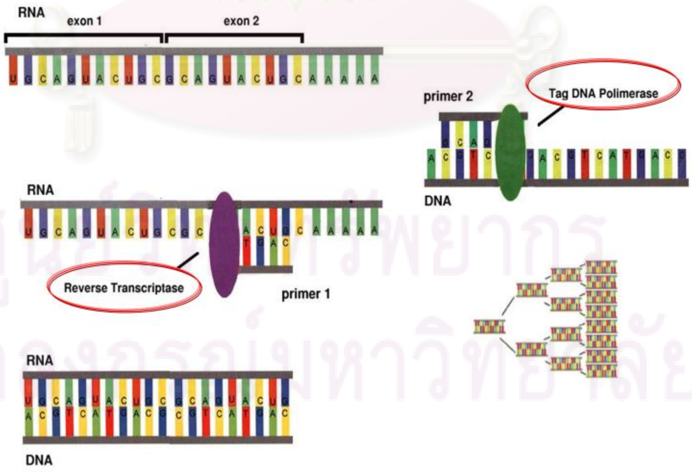
ภาพที่ 11 : แสดงหลักการของเทคนิค rapid test

(ภาพจาก : STANDARD DIAGNOSTICS, INC (Korea))

เทคนิคการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular method)

เทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี Reverse transcription (RT) **และ** Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิคนี้ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1985 เพื่อใช้วินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส โดยอาศัยหลักการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ในขั้นตอนของวิธี reverse transcription (RT) จะเป็นขั้นตอนของการเปลี่ยนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจาก RNA ให้กลายเป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase



ภาพที่ 12 : แสดงหลักการของเทคนิค Reverse Transcription (RT)

(ภาพจาก : http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/ikc/molekularbiologie/rt-pcr.jpg)

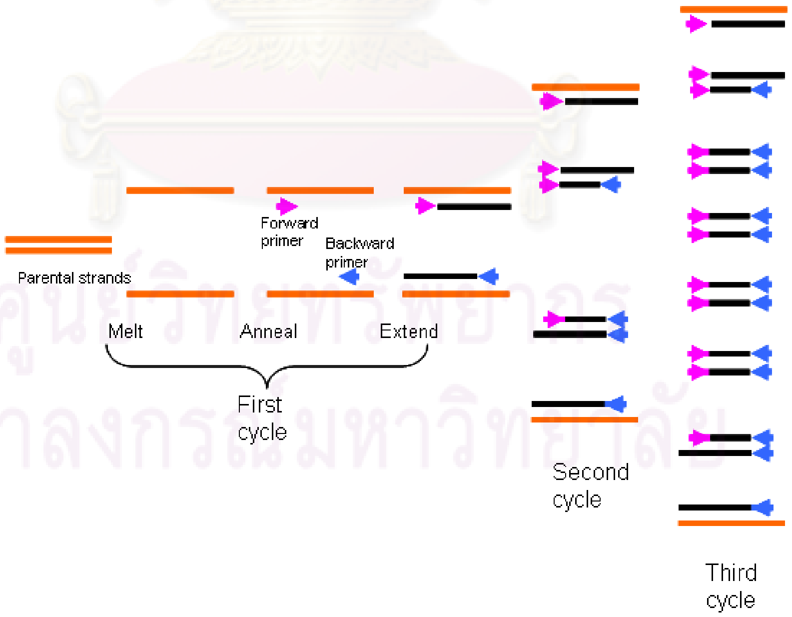
ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อได้ cDNA เรียบร้อยแล้วก็จะนำไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดยอาศัยเอนไซม์ DNA Polymerase ดังแสดงในภาพที่ 12 นอกจากนี้ในการทำ PCR จะต้องอาศัยสารต่างๆ เช่น Deoxy nucleotide triphosphate (dNTP), สารละลายบัฟเฟอร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$), น้ำ และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (forward และ reverse primers) กับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ใช้ในปฏิกิริยา ขั้นตอนของการทำ PCR นั้นจะประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 13 ได้แก่

ขั้นตอนของการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation) จะใช้อุณหภูมิประมาณ 94 °C ทำให้พันธะไฮโดรเจนที่อยู่ระหว่างคู่เบส (Base) ของ DNA ถูกทำลาย ส่งผลให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน

ขั้นตอนของการที่ไพรเมอร์จับกับ DNA แม่แบบ (Annealing) ใช้อุณหภูมิประมาณ 40-62 °C เพื่อให้ไพร์เมอร์ (Primer) เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน เพื่อให้เกิดขั้นตอนของการสร้างสาย DNA ต่อไป

ขั้นตอนของการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) ใช้อุณหภูมิ ประมาณ 68-72 °C ขั้นตอนนี้จะอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase โดยมีทิศทางในการสร้างจากปลายด้าน 5′ ไปยังด้านปลาย 3′



ภาพที่ 13 : แสดงหลักการของเทคนิค PCR

(ภาพจาก: http://www.thomassci.com/_resources/_global/media/resized /00007/ihwx.fe0e8de2-8433-43e9-ae0a-475f624d1f11.218.218.jpg)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากขั้นตอนที่ได้กล่าวมาข้างต้น สามารถทำได้ในครั้งเดียวซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า One step RT-PCR เทคนิคนี้มีข้อดีคือมี sensitivity และ specificity ดี แต่เทคนิคนี้อาจจะไม่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ วิธีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT-PCR นี้ยังถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัย อาทิเช่น

เทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี Multiplex RT-PCR

เทคนิคนี้จะอาศัยหลักการของ RT-PCR แต่จะมีส่วนที่แตกต่างคือ เทคนิคนี้อาศัยการใช้ไพรเมอร์หลายคู่ ซึ่งแต่ละคู่มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่แต่ละสายพันธุ์ เมื่อเข้าสู่ขั้นตอนของปฏิกิริยา RT-PCR ไพร์เมอร์จะช่วยในการสร้างสาย DNA ของเชื้อไวรัส การวิเคราะห์ผลจะพิจารณาจากขนาดของ PCR product ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยขนาดของ PCR product ควรมีขนาดต่างกันอย่างน้อย 40 bp เทคนิค multiplex RT-PCR มีข้อดีที่สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้หลายสายพันธุ์ในการตรวจเพียงครั้งเดียว และยังช่วยประหยัดเวลาในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มี sensitivity และ specificity ดี และยังมีราคาที่ไม่แพงมากนัก แต่ก็มีข้อเสียคือ ต้องมีการปรับความเหมาะสมของปฏิกิริยาให้มีประสิทธิภาพ และยังอาจจะต้องถูกจำกัดความสามารถในการวิเคราะห์ผลจากขนาดของ PCR product (25)

เทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time RT-PCR

เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส โดยที่สามารถตรวจหาระดับของ PCR product ในระหว่างที่เกิดปฏิกิริยาได้ทันที โดยอาศัยสารเคมีที่เรืองแสง (fluorescence) ดังนั้นในการทำ real-time RT-PCR จึงเป็นการเพิ่มจำนวนปริมาณ DNA โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณ PCR products ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ ซึ่งต่างจาก conventional PCR ซึ่งการตรวจ PCR products จะกระทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุดแล้ว เทคนิค real-time RT-PCR จะประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนหลักๆคือ

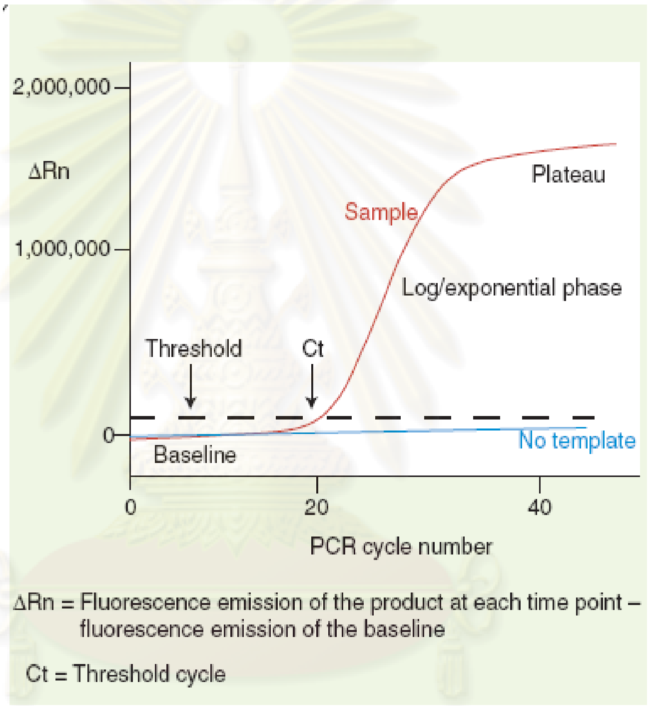
Linear ground phase เป็นช่วงเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา และสัญญาณเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์ ยังเพิ่มไม่สูงนัก (10-15 รอบแรก) ในช่วงนี้เครื่องจะทำการคำนวณ baseline ของแสงฟลูออเรสเซนต์

Early exponential phase เป็นช่วงที่ระดับพลังงานของแสงฟลูออเรสเซนต์เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าระดับ background การเกิดสัญญาณการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์ในแต่ละรอบของ

ปฏิกิริยาจะถูกเรียกว่า ค่า Cycle threshold (Ct) ซึ่งค่านี้สามารถที่จะนำมาคำนวณเป็นจำนวนของสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา

Log-linear phase เป็นช่วงที่มีการสร้างสารพันธุกรรมที่ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยตามหลักทฤษฎีของ PCR

Plateau phase เป็นช่วงสุดท้ายของปฏิกิริยา PCR ในช่วงนี้สารเคมีต่างๆ ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาเริ่มเหลือน้อยลง จนไม่สามารถที่จะนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาจำนวนของสารพันธุกรรมได้

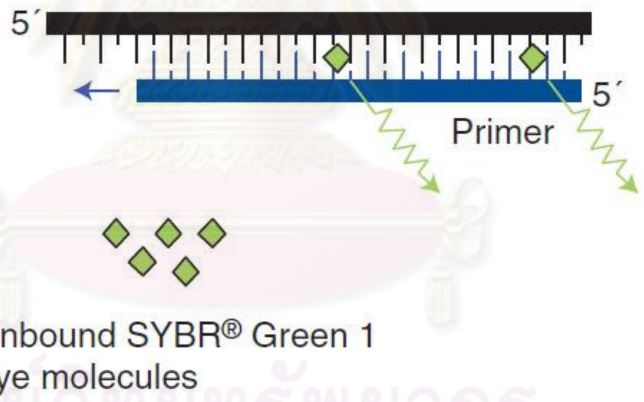


ภาพที่ 14 : แสดงลักษณะของกราฟของเทคนิค real-time PCR ที่เกิดขึ้น
ในแต่ละช่วงของปฏิกิริยา
[ภาพจาก: Basic principles of real-time quantitative PCR (43)]

ผลของเทคนิค Real-time PCR ที่ได้จะอยู่ในของกราฟดังแสดงในภาพที่ 14 เทคนิค real time สามารถตรวจวัด PCR product ที่เกิดขึ้นจากการจับสัญญาณการเรืองแสง ปัจจุบันการทำให้เกิดการเรืองแสงนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

การใช้ SYBR Green Dye

SYBR Green Dye เป็นสารเรืองแสง (Fluorochrome) ที่สามารถจับกับ DNA บริเวณ minor groove ได้ SYBR Green สามารถถูกกระตุ้น (excited) ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ทำให้เกิดการคายพลังงาน (emission) ออกมาในรูปของพลังงานแสงที่มีช่วงของความยาวคลื่นที่สามารถตรวจจับสัญญาณได้ด้วยตัวรับสัญญาณที่ติดตั้งอยู่ในเครื่อง real-time thermocycler ดังแสดงในภาพที่ 15 การใช้ SYBR Green Dye อาจจะพบว่ามีการจับกับสาย DNA แบบไม่จำเพาะ แต่ก็สามารถแยกสัญญาณการเรืองแสงที่เกิดจาก primer-dimer หรือ non-specific products ได้โดยทำการเปรียบเทียบค่า Tm ซึ่งค่า Tm เป็นค่าจำเพาะของ DNA แต่ละสาย ที่แปรผันตรงกับ %GC content และความยาวของสาย DNA ในการหาค่า Tm นั้นสามารถวิเคราะห์ได้จาก melting curve โดยที่จะพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น สัญญาณการเรืองแสงของ primer-dimer หรือ non-specific products จะลดลง ทำให้ค่า Tm ของ primer-dimer หรือ non-specific products จะมีค่าที่ต่ำกว่า เนื่องจากมีขนาดสั้น ซึ่งต่างจาก specific product ซึ่งมีขนาดยาวกว่าและมีค่า Tm ที่สูงกว่า



ภาพที่ 15 : แสดงการทำงานของ SYBR Green Dye

[ภาพจาก: Basic principles of real-time quantitative PCR (43)]

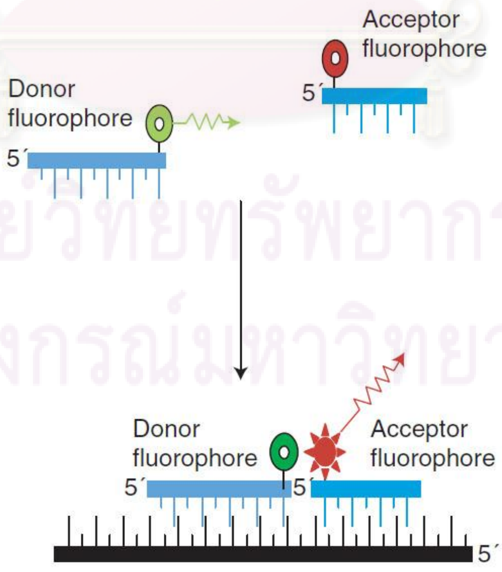
การใช้ Hybridization probe

การใช้ Hybridization probe มี 2 แบบคือ ใช้ oligonucleotide 4 เส้น หรือ 3 เส้น ในการใช้ oligonucleotide 4 เส้นนั้นประกอบไปด้วยไพรเมอร์ 2 สาย และ probes 2 สาย ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้โดยที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้นจะจับกับ DNA เป้าหมาย บริเวณปลาย 3' และ 5' ส่วน probes อีก 2 เส้นจะจับด้านในของ DNA เป้าหมาย บริเวณที่จำเพาะ probes จะอยู่ในตำแหน่งที่

เรียงถัดกัน โดยด้าน upstream probe ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่ปลาย 3' เรียกว่า donor dye และด้าน downstream probe ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่ปลาย 5' เรียกว่า acceptor dye เมื่อ probe ทั้งสอง เกิดปฏิกิริยา hybridize กับ DNA เป้าหมาย หลังจากนั้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยา Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) คือ เมื่อมีการถูกกระตุ้นด้วยแสงที่มีพลังงานสูง donor dye จะมีการถ่ายทอดพลังงานไปให้กับ acceptor dye จากนั้น acceptor dye จะปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมา ทำให้สามารถตรวจจับสัญญาณได้ดังแสดงในภาพที่ 16

ส่วนการตรวจแบบ oligonucleotide 3 เส้น มีหลักการคล้ายกับวิธีแรก แต่มีส่วนที่ต่างกัน คือ ใช้ probe เพียงเส้นเดียว ซึ่งจะถูกติดฉลากด้วย donor dye และ quencher dye (สารที่ใช้ดูดซับพลังงานแสงจาก donor dye) เรียงต่อกัน เมื่อ probe จับกับ DNA target ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสามารถทำให้เกิดสัญญาณการเรืองแสงเกิดขึ้น

Hybridization probe สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบ PCR product เพื่อวิเคราะห์การกลายพันธุ์แบบ point mutation หรือการเกิด single nucleotide polymorphism (SNP) โดยระหว่างที่เกิดปฏิกิริยาหากมีเบสบางตำแหน่งที่ไม่จับกับคู่สมบน probe (mismatch) probeก็จะทำให้หลุดออกมาในช่วงของอุณหภูมิที่ต่ำ ซึ่งต่างกับ probe ที่สามารถจับกับเบสบน DNA ได้อย่างสมบูรณ์ (perfect match) probe ก็จะหลุดออกจาก DNA เป้าหมายในช่วงอุณหภูมิที่สูง

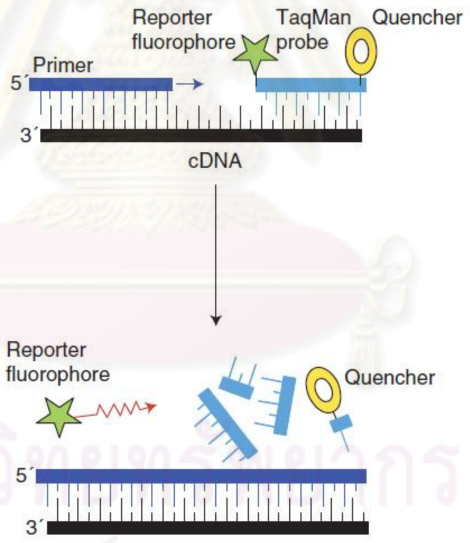


ภาพที่ 16 : แสดงการทำงานของ Hybridization probe

[ภาพจาก: Basic principles of real-time quantitative PCR (43)]

การใช้ Hydrolysis probe

hydrolysis probe หรือ *Taqman* probe หรือเรียกวิธีนี้ว่า 5' nuclease assay วิธีนี้จะมีการใช้ probe เพียงเส้นเดียว โดยที่ปลายด้าน 5' ติดฉลากด้วย receptor dye ส่วนด้าน 3' ติดฉลากด้วย quencher dye ทั้งสองจะห่างกันไม่เกิน 5 bp เมื่อเกิดปฏิกิริยา hydrolysis แล้ว receptor dye จะถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสง จากนั้นจะมีการถ่ายทอดพลังงานผ่านไปให้กับ quencher dye ตัว quencher dye จะทำการดูดซับพลังงานแสงที่เกิดขึ้นแล้วคายออกมาให้รูปของความยาวคลื่นแสง เมื่อเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ช่วงของการสร้าง DNA สายใหม่ (Extension step) probe จะถูกย่อยโดยปฏิกิริยา 5' exonuclease ของเอนไซม์ DNA polymerase ส่งผลให้ receptor dye หลุดออกจาก quencher dye จึงสามารถปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนต์ดังแสดงในภาพที่ 17 เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (45)

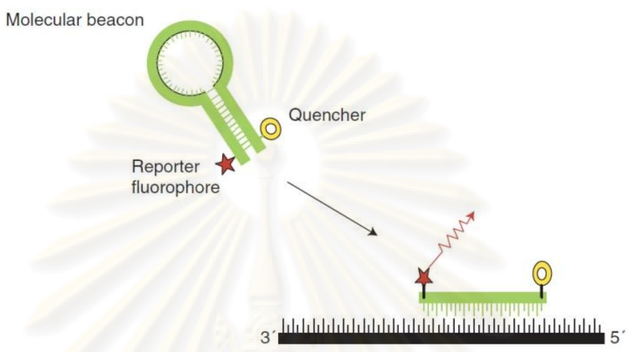


ภาพที่ 17 : แสดงการทำงานของ Hydrolysis probe
[ภาพจาก: Basic principles of real-time quantitative PCR (43)]

การใช้ Hairpin probe

hairpin probe หรือ molecular beacon probes เป็น oligonucleotide probe ที่มีลักษณะโค้งงอเป็น loop คล้ายกิ๊บหนีบผม (Hairpin) โดย probe จะมีส่วนที่ยึดกันด้วยพันธะ hydrogen bond ประมาณ 5-7 นิวคลีโอไทด์ ทำให้ปลาย 5' และ 3' ที่ติดฉลากด้วย receptor dye

และ quencher dye อยู่ใกล้กันจน quencher dye สามารถดูดซับพลังงานจาก receptor dye ได้ molecular beacon จะอยู่ในรูป hairpin ในสารละลายบัฟเฟอร์ และเมื่อ molecular beacon จับกับ DNA เป้าหมายทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกิดขึ้น สามารถเปล่งสัญญาณแสงออกมาได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูงดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 : แสดงการทำงานของ hairpin probe

[ภาพจาก: Basic principles of real-time quantitative PCR (43)]

เทคนิค Real-time PCR ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณของสารพันธุกรรมเริ่มต้นได้ โดยในปัจจุบันการวัดปริมาณสารพันธุกรรมสามารถทำได้ 2 แบบ คือ การวัดแบบ Relative และ การวัดแบบ Absolute

การวัดเชิงปริมาณของสารพันธุกรรมแบบ Relative ของวิธี Real-time RT-PCR

เป็นการวัดปริมาณของสารพันธุกรรมที่มีการเปลี่ยนแปลงไป นำมาเปรียบเทียบกับระดับของสารพันธุกรรมที่มีการปนเปื้อนอยู่ใน Matrix การวัดด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายไม่ยุ่งยาก แต่วิธีนี้ค่า Ct ที่ได้จะเป็นค่าประมาณเพียงคร่าวๆ

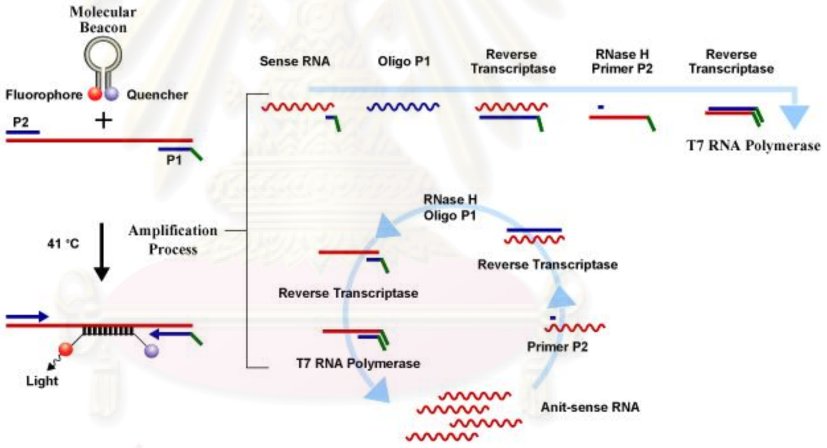
การวัดเชิงปริมาณของสารพันธุกรรมแบบ Absolute ของวิธี Real-time RT-PCR

เป็นการวัดจำนวนสารพันธุกรรมที่มีอยู่จริงในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจติดตามการดำเนินของโรคเมื่อมีการติดเชื้อ โดยการวัดแบบ Absolute นั้น หากต้องการให้ผลที่ทำการทดสอบมีค่าที่คงที่ควรจะต้องมีการสร้าง standard curve ซึ่งจะแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างค่า Ct กับจำนวนของสารพันธุกรรม

เทคนิคการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular method) **โดยอาศัยลำดับเบสของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส** (Nucleic acid sequence-based method)

การใช้เทคนิค Nucleic acid sequencing-based amplification method (NASBA)

เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส โดยใช้อุณหภูมิเดียวตลอดทุกขั้นตอนของปฏิกิริยา (Isothermal-based method) ที่อุณหภูมิ 41 °C ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต้องอาศัยเอนไซม์ 3 ชนิดคือ AMV reverse transcriptase, T7 RNA polymerase และ RNAse H ควบคู่ไปกับการตรวจจับสัญญาณการเรืองแสงดังแสดงในภาพที่ 19 ในปี 2004 Lau และคณะ (44) ได้นำเอาเทคนิค NASBA มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H5 และ H7 ปัจจุบันเทคนิค NASBA ถูกพัฒนาให้สามารถตรวจจับสัญญาณได้ระหว่างที่มีการเกิดปฏิกิริยา (real-time) ทำให้สามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็ว ภายในเวลาไม่ถึงชั่วโมง



ภาพที่ 19 : แสดงหลักการของเทคนิค NASBA

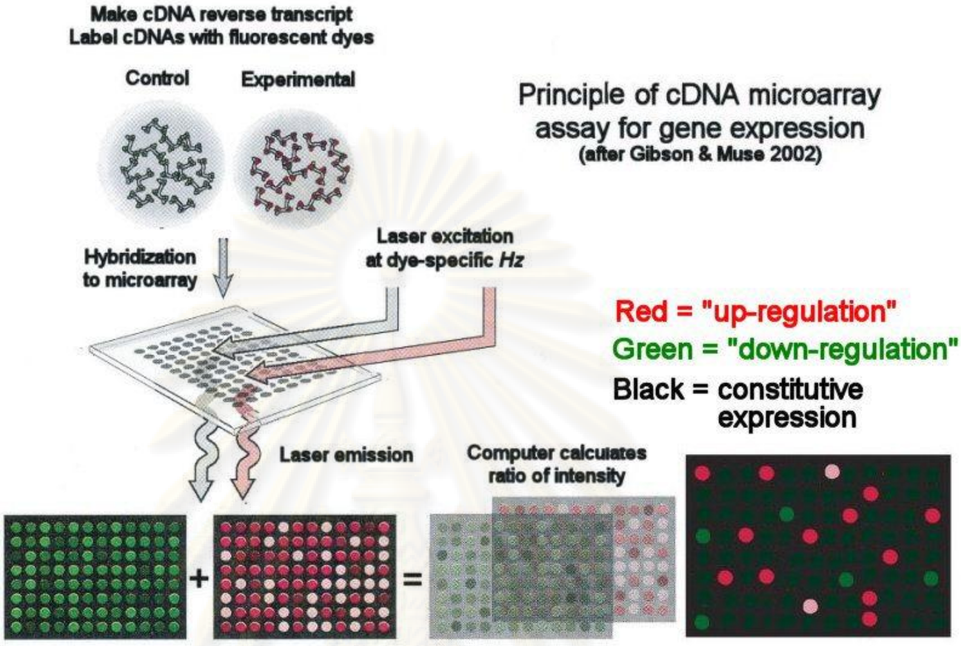
(ภาพจาก : http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/NASBA.html)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การใช้เทคนิค DNA microarray

เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) จึงถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจหาชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (46, 47) เทคนิคนี้อาศัยหลักการการจับกันระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกันโดยที่จะมีการเคลือบนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบลงบน solid support (แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นไนลอน หรือแผ่นซิลิโคน) จากนั้นนำสิ่งส่งตรวจมาใส่ลงบน solid support แล้วนำเข้าเครื่องเพื่อทำการ

ตรวจจับสัญญาณดังแสดงในภาพที่ 20 ในปี ค.ศ. 2009 Huang และคณะ (48) ได้นำเทคนิค DNA microarray มาประยุกต์ใช้กับเทคนิค two-step RT-PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ และ บี



ภาพที่ 20 : แสดงหลักการของเทคนิค DNA microarray

(ภาพจาก: http://www.mun.ca/biology/scarr/cDNA_microarray_Assay_of_Gene_Expression.html)

การใช้เทคนิค pyrosequencing

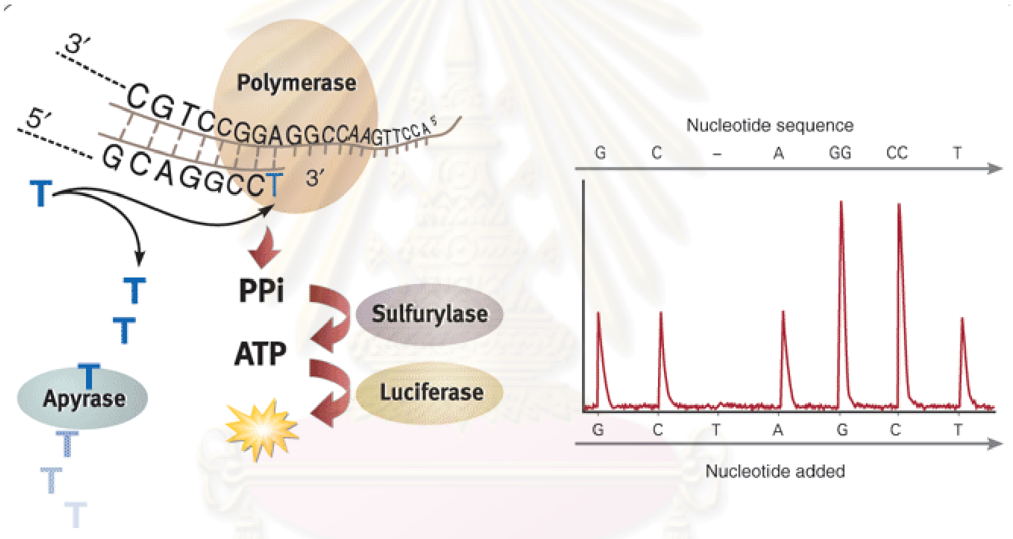
เทคนิคนี้เป็นการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยเอนไซม์ 4 ชนิดคือ

- เอนไซม์ DNA polymerase จะนำเอา dNTP นั้นๆ เข้าต่อกับสายดีเอ็นเอ และปลดปล่อย pyrophosphate (PPi) ในปริมาณที่เท่ากับจำนวน nucleotide ที่ต่อเข้าไป
- เอนไซม์ ATP sulfurylase จะเปลี่ยน PPi เป็น ATP โดยจะรวมเข้ากับ APS
- เอนไซม์ luciferase จะใช้ ATP ที่ได้ในการ เปลี่ยน luciferin เป็น oxyluciferin และปล่อยแสงออกมาในปริมาณที่เป็นสัดส่วนกับ ปริมาณ ของ ATP สามารถตรวจจับแสงที่ปลดปล่อยออกมาโดยใช้กล้อง CCD โดยแสดงออกมาเป็น peak (pyrogram) ความสูงของ peak ก็เป็นสัดส่วนกับจำนวน nucleotide ที่ DNA polymerase ต่อสายดีเอ็นเอ

- เอนไซม์ apyrase จะย่อย ATP และ nucleotide ที่ไม่ถูกนำไปต่อสาย ทำให้หยุดปฏิกิริยาปลดปล่อยแสง

หลักการของเทคนิค pyrosequencing และผลดังแสดงในภาพที่ 21

เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสได้ หรืออาจนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการดื้อยาของเชื้อได้ แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดคือสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียงสั้นๆ Duwe S. และคณะ (49) ได้นำ pyrosequencing มาประยุกต์ใช้กับ RT-PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาการดื้อยาของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H1N1, H3N2 และ H5N1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 21 : แสดงหลักการของเทคนิค pyrosequencing และการแปลผล
(ภาพจาก: http://www.nature.com/app_notes/nmeth/2005/050929/Fig_tab/nmeth800_F1.html)

การใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

เทคนิคนี้มีความจำเพาะ มีประสิทธิภาพและความไวพอๆ กับเทคนิค PCR แต่เทคนิค LAMP จะทำภายในอุณหภูมิเดียว (Isothermal method) เทคนิค LAMP จะต้องใช้ primer ทั้งหมด 4 เส้น ที่สามารถจับกับสาย DNA เป้าหมายได้ 6 ตำแหน่ง จึงทำให้มีความจำเพาะสูง RT-PCR ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับเทคนิค LAMP เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H5N1 (50)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็น RNA จาก clinical samples ที่เหลือมาจากงานบริการโรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ จำนวน 100 ตัวอย่างซึ่งได้ทำการเก็บสิ่งส่งตรวจและทำการสกัดเป็น RNA โดยผู้เชี่ยวชาญเพื่อการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์และมีนาคมในปี พ.ศ. 2553 ซึ่งตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้รับอนุญาตจากกรรมการผู้อำนวยการโรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนลแล้ว ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมคณะแพทยศาสตร์ในการประชุมครั้งที่ 29/2553

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.สารเคมีสำหรับการสกัด Nucleic acid

- Viral Nucleic Acid Extraction kit (RBC Bioscience, Cat no.YVN100)

2.สารเคมีสำหรับการตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนด้วยวิธี one-step Multiplex RT-PCR (Invitrogen, cat no.10928-034)

- 2X Reaction Mix (a buffer containing 0.4 mM of each dNTP, 2.4 mM MgSO4)
- SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System
- Distill water (DW)
- Specific primers: forward primers และ reverse primers
- Magnesium chloride ($MgCl_2$)

3.สารเคมีสำหรับการทำ Agarose gel electrophoresis

- GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas, Cat no. SM0321)
- Agarose, Low EEO, Molecular Biology grade (Reserch Organics, Cat no. 1170A)
- 1× Tris borate buffer (1×TBE)
- Ethidium Bromide (SIGMA, Cat no.E-1510)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.สารเคมีสำหรับทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

- HiYield™ Gel/ PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan)

5.สารเคมีสำหรับการ cloning และ transformation ใน *E. coli*

- One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Cat no.C4040-03)
- pGEM-T Easy Vector System for T/A cloning strategy (Promega, Cat no. A1360)
- X-Gal (Promega, Cat no. V3941)
- IPTG (Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside) (Eppendrof, Cat no. 0032006.353)
- Tryptone powder (BIO BASIC INC., Cat no.G211)
- Yeast Extract (GIBGO, Cat no. 20047-056)
- Agar Bacteriological (GIBGO, Cat no. 20001-020)
- FastPlasmid Mini (Eppendrof, Cat no. 955150601)
- Ampicillin (Phamacia, Hong Kong)

6.สารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิด

- HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan)

7.สารเคมีสำหรับ RNA มาตรฐานด้วยวิธี *in vitro* transcription

- SP6/T7 Transcription Kit ของ บริษัท Roche, Germany (Cat no.10 999 644 001)

7.โปรแกรมสำหรับ Bioinformatics

- CLUSTAL X program (version 1.8)
- OLIGO primer design software (version 9.1)
- BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1)
- Chromas Lite (version 2.01)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8.วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย

- MicroAmp PCR tube (perkin Elemer)
- Microcentrifuge tube: 0.5 µL ,1.5 µL and 2.0 µL (AxyGen® Scientific)
- Polypropylene conical tube: 15 ml and 50 ml (AxyGen® Scientific)
- Pipette tip: 10 µL, 200 µL and 1000 µL (AxyGen® Scientific)
- Glassware: Beaker, Flask, Cylinder and regent bottle (Pyrex)
- Centrifuge (Beckman GS-6R)
- Refrigerated microcentrifuge (Universal 16R Hettich)
- - 70 °C freezer (Forma Scientific)
- - 20 °C freezer (Philco)
- Mastercycler personal (Eppendrof)
- Power supply model 250 (Giboco BRL,USA)
- Gel Doc 1000 UV transilluminator (Biorad)
- Bio Photometer (Eppendrof)
- Class II Microbiological Safety Cabinet (Envair)
- PCR Cabinet (Augusta)
- Orbital incubator (Stuart)
- Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey)
- Multi-block heater (Lab-line)
- Vortex mixer (Scientific industry)
- Microwave oven (Sanyo)
- Electrophoresis chamber set (Bio-RAD)
- Parafilm (American Nation Can)
- Plastic wrap
- Stirring-magnetic bar

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัด RNA ของเชื้อไวรัสด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction **ของบริษัท** RBC Bioscience

- นำสิ่งส่งตรวจ (nasal swab) 200 µL
- เติม 400 µL ของ VB buffer แล้วนำไป Vortex
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- นำสารละลายใส่ลงใน column 2 mL
- เติม 500 µL ของ 95% ethanol แล้วนำไป Vortex
- ปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 60 วินาที
- ทิ้งส่วนของ filtrate
- เติม 400 µL ของ W1 buffer ลงใน column
- ปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 30 วินาที
- ทิ้งส่วนของ filtrate
- เติม 600 µL ของ Wash buffer (ที่ถูกเติมด้วย ethanol แล้ว) ลงใน column
- ปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 30 วินาที
- ทิ้งส่วนของ filtrate
- ปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 3 นาที
- เปลี่ยน collection tube
- เติม 50 µL RNAse-free water
- ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
- ปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 60 วินาที
- Filtrate ที่ออกมาคือ RNA ที่สกัดได้ จะถูกเก็บไว้ที่ -20 °C

การเตรียม Positive control **จากตัวอย่างที่ทราบสายพันธุ์ด้วยวิธี** cloning

1. Ligation ระหว่าง GAPDH gene, M gene of influenza A virus, M gene of influenza B virus, HA gene of pH1-2009, HA gene of seasonal-H1, HA gene of seasonal-H3 และ HA gene of avian-H5 กับ plasmid (pGEM-T easy) เตรียม mixture โดยใช้สารเคมีดังต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

• 2x buffer	5 μL
• T4 DNA ligase (3 weiss units/ul)	1 μL
• pGEM-T	1 μL
• PCR product	3 μL
Total	10 μL

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 16 °C ข้ามคืน หรือที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2. Transformation

- เตรียม competent cells ปริมาตร 50 μL ในหลอด
- นำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้ competent cell ละลาย
- เติมสารละลาย ligation 2 μL
- นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที แล้วกลับมาแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที
- เติม SOC medium ปริมาตร 950 μL ลงในหลอด
- เขย่าที่ความเร็วประมาณ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง
- จากนั้นนำหลอดไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือ pellet ประมาณ 45 μL
- เติม x-gal 15 μL และ IPGL 5 μL ผสมให้เข้ากัน
- Spread ลงบน LB agar plate และนำ LB agar plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน

3. Colony selection

- สังเกตดู colony ที่ขึ้นบน LB agar plate โดยจะเลือก colony ที่มีสีขาว
- เลือก colony สีขาวใส่ลงใน LB broth เขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์

4. Plasmid extraction

- นำแบคทีเรียจาก LB broth 1.5 mL มาใส่ลงในหลอด 2 mL
- นำหลอดปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือ pellet

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เติม lysis solution (แช่เย็น) ปริมาตร 400 µL
- Vortex 30 วินาที
- บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที
- นำสารละลาย lysate ลงใน spin column
- นำ spin column ไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
- เติม diluted wash buffer ปริมาตร 400 µL
- นำ spin column ไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
- เทส่วน filtrate ทิ้ง และนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
- จากนั้นนำ spin column ลงใน collection tube
- เติม elution buffer ปริมาตร 50 µL
- ปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
- ได้สารละลาย positive control ที่มีปริมาตร 50 µL

การเตรียม RNA มาตรฐานด้วยวิธี *in vitro* transcription **โดยใช้** SP6/T7 Transcription Kit **ของ บริษัท** Roche, Germany

In vitro transcription

- เตรียม mixture สำหรับทำ *in vitro* transcription โดยใช้สารเคมีดังนี้

1 µg ของ linearized DNA plasmid	4	µL
ATP, GTP, CTP และ UTP mixture	8	µL
10X buffer	2	µL
Dilution water	4	µL
SP6 หรือ T7	2	µL
ToTal	20	µL

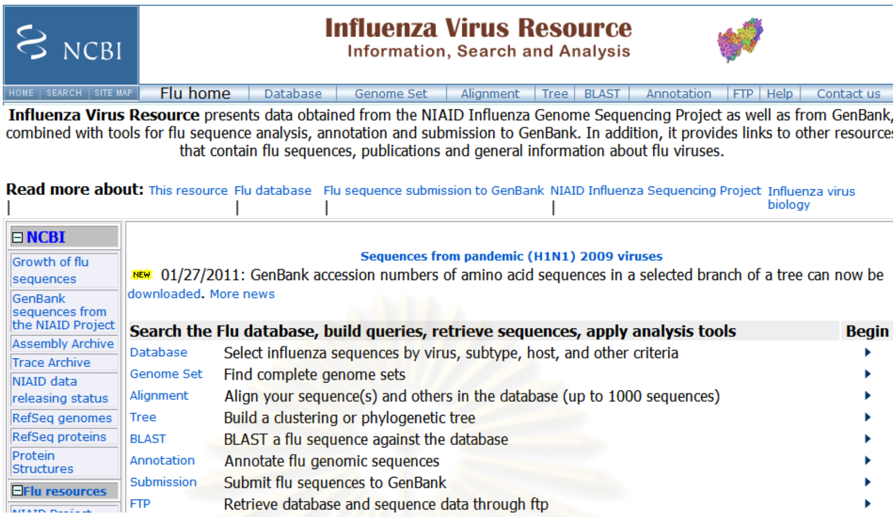
- จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- เติม DNase I และ RNase-free water
- บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน
- หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที

การตรวจสอบ DNA ที่หลงเหลือโดยการนำเอา mixture ที่ได้จากการทำ *in vitro* transcribed RNA มาเป็นแม่แบบ สำหรับทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่ต้องการตรวจสอบ (GAPDH gene, M gene of influenza A virus, M gene of influenza B virus, HA gene of pH1-2009, HA gene of seasonal-H1, HA gene of seasonal-H3 และ HA gene of avian-H5) จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis การวิเคราะห์ผลถ้าหากมีแถบ DNA เกิดขึ้น แสดงว่า ยังมี DNA หลงเหลืออยู่ อาจจะต้องเติม DNase I และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C ทดสอบจนกว่าไม่มีแถบ DNA เกิดขึ้น จึงจะได้ RNA ที่ต้องการ

การออกแบบไพรเมอร์ (Primer)

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิจัยในครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค Multiplex RT-PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการได้มากกว่า 1 ยีนต่อ 1 ปฏิกิริยา เทคนิคนี้จะอาศัยการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะมากกว่า 1 คู่ในการทำปฏิกิริยา

ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกนำมาจากฐานข้อมูล Genbank เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ โดยการออกแบบไพรเมอร์จะเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด, มีค่า GC content ประมาณ 50-60% และมีค่า melting temperature (Tm) ของไพรเมอร์ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 55-75 °C ไพรเมอร์แต่ละคู่ควรมีค่า Tm เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน โดยค่า Tm ของไพรเมอร์คำนวณได้จากสูตรดังนี้ Tm = 4 °C (G+C) +2 °C (A+T) และเนื่องจากเทคนิค multiplex PCR ต้องมีการใช้ primers ที่มากกว่า 1 คู่ ดังนั้นควรคำนึงถึงขนาดของ PCR product ที่เกิดขึ้น เพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ผล โดยขนาดของ PCR product ควรมีขนาดต่างกันอย่างน้อย 40 base pairs และในงานวิจัยในครั้งนี้ได้นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Matrix gene หรือ Hemagglutinin gene ของเชื้อ Influenza virus จาก The Influenza Virus Resource of NCBI database ดังแสดงไว้ในภาพที่ 22 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ genomes /FLU/ FLU.html) และได้ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Software version 7.0 (http://www.mbio.ncsu.edu/ BioEdit/bioedit.html) และ OLIGOS Version 9.1 by Ruslan Kalendar, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland ดังแสดงไว้ในภาพที่ 23



ภาพที่ 22: แสดงฐานข้อมูลของเชื้อ Influenza virus

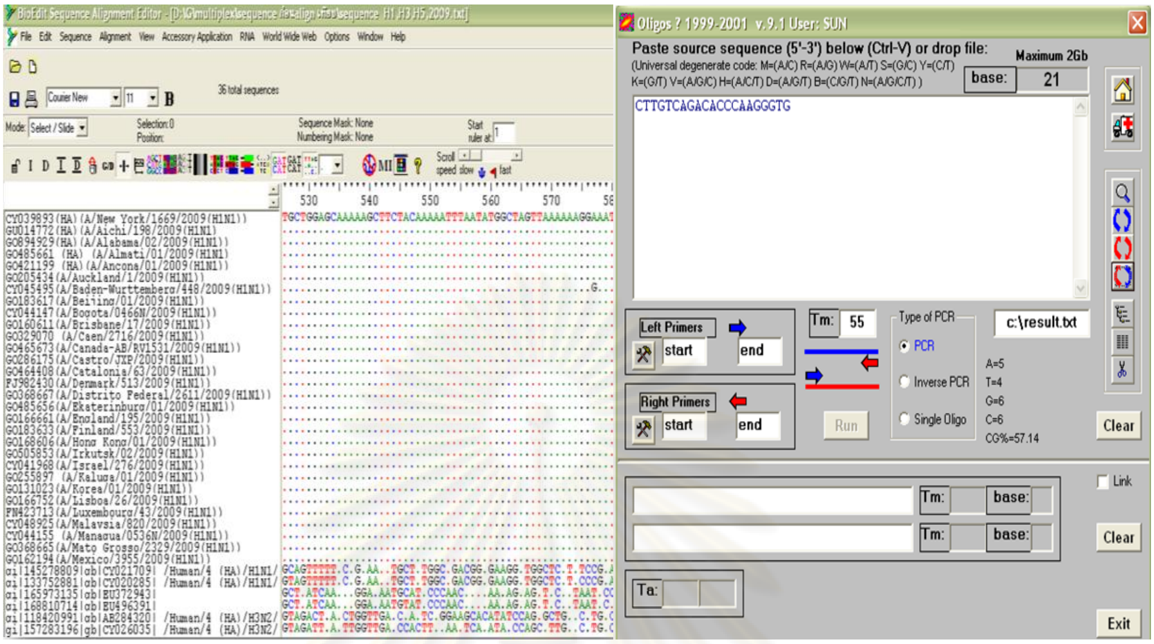
(ภาพจาก: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/)

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้นำข้อมูลของนิวคลีโอไทด์จาก NCBI database โดยแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2: แสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่นำมาจากฐานข้อมูล NCBI

Viruses	Target gene	Sequences
Influenza A	M gene	50
Influenza B	M gene	50
Influenza A (pandemic H1)	HA gene	50
Influenza A (seasonal H1)	HA gene	50
Influenza A (seasonal H3)	HA gene	50
Influenza A (avian H5)	HA gene	50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 23 : แสดงโปรแกรมที่ใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์

1. ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบสำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (typing)

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จากตัวอย่างด้วยเทคนิค Multiplex RT-PCR โดยในการตรวจวินิจฉัยนี้จะเป็นการจำแนกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ติดในผู้ป่วย ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ออกเป็นทั้งหมด 4 คู่ ซึ่งไพรเมอร์แต่ละคู่จะมีความจำเพาะกับยีนต่างๆดังนี้

- ยีน Housekeeping gene (GAPDH) ของมนุษย์
- ยีน Matrix (M) gene ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ ชนิด A (influenza A virus)
- ยีน Matrix (M) gene ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ ชนิด B (influenza B virus)
- ยีน Hemagglutinin (HA) gene ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1)

Housekeeping gene เป็นยีนที่มีความสำคัญต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยมีการแสดงออกในปริมาณคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อม ในการศึกษาครั้งนี้จึง เลือกใช้ยีน GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) ซึ่งเป็นยีนสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการ Glycolysis และในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ไพร์เมอร์ต่อ GAPDH gene ที่ถูกออกแบบ

โดย Boonsuk และคณะ (51) ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (typing) แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3: แสดงไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Typing)

Primers		Sequence 5'-3'*	Position	Tm
pH1 HA gene	SWF_H1_ F758	GAGAATGAACTATTACTGGACACTA	758-782	68
	SWF_H1_F916	CTTGTCAGACACCCAAGGGTG	916-936	66
	SWF_H1_R1126	CATCCATCTACCATCCCTGTCCA	1126-1104	70
Housekeeping genes (GAPDH)	GAPDH_F85	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	85-104	64
	GAPDH_R603	GTTGTCATGGATGACCTTGGC	603-582	64
	GAPDH_R191	TCAATGAAGGGGTCATTGATGG	191-170	64
Flu A M gene	FluA_MF151	CATGGARTGGCTAAAGACAAGACC	151-175	68
	FluA_MF5	TCAGGCCCCCTCAAAGCCG	63-81	64
	FluA_MR276	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA	276-253	68
Flu B M gene	FluB_MF25	ATGTCGCTGTTTGGAGACACAAT	25-47	66
	FluB_MF439	CTCTGTGCTTTRTGCGARAAAC	439-460	60
	FluB_MR671	CCTTCYCCATTCTTTTGACTTGC	671-649	64
	FluB_MR320	TCAGCTAGAATCAGRCCYTTCTT	320-298	60

*K: (G/T); R: (A/G); Y: (C/T)

2. ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบสำหรับจำแนกสายพันธุ์เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (subtyping)

   การออกแบบไพรเมอร์เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ หลังจากทราบว่ามีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ จากตัวอย่างด้วยเทคนิค Multiplex RT-PCR โดยในการจัดจำแนกสายพันธุ์นี้จะเป็นการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่มีการระบาดในมนุษย์ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ออกเป็นทั้งหมด 4 คู่ ซึ่งไพรเมอร์แต่ละคู่จะมีความจำเพาะกับยีนต่างๆดังนี้

- ยีน Hemagglutinin (HA) gene ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1)
- ยีน Hemagglutinin (HA) gene ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H1 ที่มีการระบาดตามฤดูกาล
- ยีน Hemagglutinin (HA) gene ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H3 ที่มีการระบาดตามฤดูกาล

– ยีน Hemagglutinin (HA) gene ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับตรวจวินิจฉัยจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (subtyping) แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4: แสดงไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับตรวจวินิจฉัยจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (subtyping)

Primers		Sequence 5'-3'	Position	Tm
pH1 HA gene	SWF_H1_F758	GAGAATGAACTATTACTGGACACTA	758-782	68
	SWF_H1_F916	CTTGTCAGACACCCAAGGGTG	916-936	66
	SWF_H1_R1126	CATCCATCTACCATCCCTGTCCA	1126-1104	70
H1 seasonal HA gene	H1_F266	CTTAGGAAACCCAGAATGCG	266-285	60
	H1_R627	ACGGGTGATGAACACCCCA	627-609	60
H3 seasonal HA gene	H3_F194	TGCTACTGAGCTGGTTCAGAGT	194-215	66
	H3_F1013	CACTCTGAAATTGGCAACAGG	1013-1033	62
	H3_R1292	TCTCCCTTCTACTTCTGARAAT	1271-1292	62
	H3_R377	AGGGTAACAGTTGCTGTRGGC	377-357	64
H5 Avian HA gene	H5_F2	TGAGAAAATTCAGATCATCCCC	393-416	62
	H5_F3+	AACAGATTAGTCCTTGCGACTG	1001–1026	64
	H5_F3	ACTCCAATGGGGGCGATAAAC	886-906	64
	H5_R1	GCTCCTCTTTATTGTTGGGTATG	551-529	66
	H5_R2+	CATCTACCATTCCCTGCCATCC	1128–1108	68
	H5_R2++	CCCTCTATAAAACCTGCTATAG	1073-1052	62

การคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR

ไพรเมอร์ที่ถูกเลือกมาใช้นั้น ควรมีขนาดของ PCR product ที่แตกต่างกันอย่างน้อย 40 bp ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบสำหรับการตรวจวินิจฉัยและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็นดังที่แสดงในตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 แสดงชุดของไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือก
สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่(typing)

No.	GAPDH gene	M gene of Flu A	M gene of Flu B	HA gene of pH1
1	GAPDH_F112/GAPDH_R191 [107 bp]	FluA_MF5/FluA_MR151 [214 bp]	FluB_MF25/Flu_BMR320 [295 bp]	SWF_H1_F758/SWF_H1_R1126 [368 bp]
2	GAPDH_F112/GAPDH_R603 [491 bp]	FluA_MF5/FluA_MR276 [214 bp]	FluB_MF25/Flu_BMR320 [295 bp]	SWF_H1_F758/SWF_H1_R1126 [368 bp]
3	GAPDH_F112/GAPDH_R603 [491 bp]	FluA_MF151/FluA_MR276 [125 bp]	FluB_MF25/Flu_BMR320 [295 bp]	SWF_H1_F758/SWF_H1_R1126 [368 bp]
4	GAPDH_F112/GAPDH_R603 [491 bp]	FluA_MF151/FluA_MR276 [125 bp]	FluB_MF439/FluB_MR671 [215 bp]	SWF_H1_F758/SWF_H1_R1126 [368 bp]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

41

ตารางที่ 6 แสดงชุดของไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือก
สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (subtyping)

No.	HA gene of H1-seasonal	HA gene of H3-seasonal	HA gene of H5-avian	HA gene of pH1
1	H1_F266/H1_R627 [361 bp]	H3_F1013/H3_R1292 [235 bp]	H5_F2/H5_R1 [156 bp]	SWF_H1_F758/SWF_H1_R1126 [368 bp]
2	H1_F266/H1_R627 [361 bp]	H3_F194/H3_R377 [183 bp]	H5_F3+/H5_R2+ [127 bp]	SWF_H1_F758/SWF_H1_R1126 [368 bp]
3	H1_F266/H1_R627 [361 bp]	H3_F194/H3_R377 [183 bp]	H5_F3+/H5_R2+ [127 bp]	SWF_H1_F916/SWF_H1_R1126 [210 bp]
4	H1_F266/H1_R627 [361 bp]	H3_F1013/H3_R1292 [235 bp]	H5_F3/H5_R2++ [188 bp]	SWF_H1_F758/SWF_H1_R1126 [368 bp]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี Multiplex RT-PCR amplification

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการปรับความเหมาะสมของสารเคมีที่ใช้ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยได้ทำการปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ (Primer concentration) และความเข้มข้นของแมกนีเซียม (magnesium concentration) นอกจากนี้ยังได้ปรับความเหมาะสมของอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยา multiplex RT-PCR ความเหมาะสมของสารเคมีและอุณหภูมิที่ใช้นั้นจะมีการพิจารณาจากความคมชัดของแถบ cDNA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา multiplex RT-PCR

สารเคมีสำหรับใช้เป็นส่วนผสมสำหรับทำ Multiplex RT-PCR ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR

Reagents	Final concentration (µM)
Diethylpyrocarbonate water (DEPC treated water)	-
2X Reaction Mix	1X
Mg^{2+} (50 mM)(Additional)	Ranging from 2.5-10
Super scrip III® RT/*Taq*	2 Unit
Forward primer (10 µM) /each primer	Ranging from 0.1-0.3
Reverse primer (10 µM) /each primer	
RNA template	-

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler (Mastercycler personal®, Eppendorf, Germany.) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 : แสดงรายละเอียดแต่ละขั้นตอนของโปรแกรม Multiplex RT-PCR

Step	Temperature(ºC)	Time
1.Reverse transcription	50	30 min
2.Initial denaturation	94	10 min
3.Denature	94	30 sec
4.Annealing	Ranging from 58-62	30 sec
5.Extension	72	1 min
Repeat step 3-5 for 40 cycles		
6.Final extension	72	7 min
7. Hold	25	5 min

ตรวจสอบผลของวิธี Multiplex RT-PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

วิเคราะห์ผลการทำ Multiplex RT-PCR ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel หลังจากนั้นย้อมด้วย 10% ethidium bromide วิเคราะห์ขนาดของ PCR Product ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) ด้วยวิธี Rapid test

ในการทำวิจัยในครั้งนี้เทคนิค Rapid test ได้ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Influenza Ag A/B A (H1N1) Pandemic Rapid test (Korea) ของบริษัท STANDARD DIAGNOSTICS, INC. เทคนิค rapid test ที่ใช้ถูกติดฉลากด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ hemagglutinin และ nucleoprotein ของเชื้อ influenza virus โดยมีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

-นำสารละลาย diluents ปริมาตร 300 µL ใส่ลงใน test tube

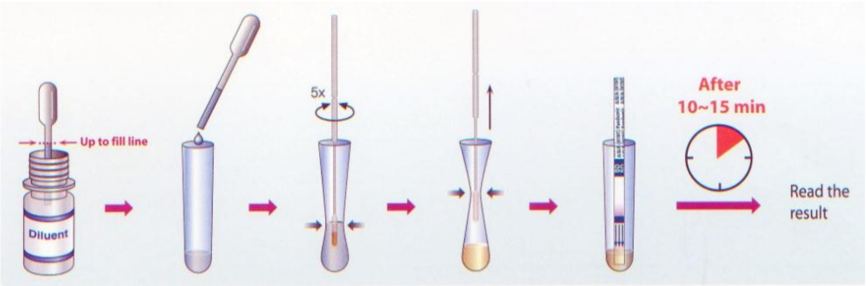
-นำ clinical specimen ที่ได้จากการ swab จุ่มลงในสารละลาย diluents

-ทำการหมุนไม้ swab 5 รอบ

-ดึงไม้ swab ออกโดยที่ขณะดึงต้องบีบ test tube

-นำ test strip มาจุ่มลงใน test tube

-ตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาทีแล้วทำการอ่านผล



ภาพที่ 24 : แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค rapid test ของ influenza Ag A/B A (H1N1) pandemic rapid test อย่างย่อ (ภาพจาก STANDARD DIAGNOSTICS, INC. (Korea))

การตรวจสอบ Specificity ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค multiplex RT-PCR

ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค Multiplex RT-PCR เพื่อทดสอบการเกิด cross amplification กับไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจหรือเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์อื่น (H2, H4, H6-H15)

(1) การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ถูกแบ่งออกเป็น Positive specificity ซึ่งจะเป็นการทดสอบความจำเพาะกับเชื้อ Influenza virus ที่ทราบชนิดและสายพันธุ์ ได้แก่ influenza B virus (N=10), H1N1 seasonal human influenza A virus (N=20), H3N2 seasonal influenza A virus (N=20), H1N1-2009 human pandemic influenza A virus (N=40) และ H5N1 avian influenza A virus (N=20). ส่วน Negative specificity จะทดสอบกับไวรัสชนิดอื่นที่สามารถก่อให้เกิดโรคทางระบบทางเดินหายใจในมนุษย์ได้ เช่น Human rhinovirus (HRV) (N=1), Metapneunovirus (MPV) (N=1), Bocavirus (BoCV) (N=4), Adenovirus (ADV) (N=2), Respiratory syncytial virus (RSV) (N=6), WU/KI polyomavirus(N=4) และ Parainfluenzavirus (PIV) (N=1) นอกจากนี้ยังทดสอบกับ human RNA ด้วย

(2) การจำแนกสายพันธุ์เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (Influenza A virus) จะทดสอบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่เป็น positive specificity คือ สายพันธุ์ใหม่ 2009 (Human pandemic H1N1-2009 Influenza A virus) สายพันธุ์ที่มีการระบาดตามฤดูกาลคือ H1 และ H3 (H1 และ H3 Seasonal Influenza A virus) และเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5 avian Influenza A virus) นอกจากนี้ยังทดสอบกับ negative specificity ที่เป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์H2, H4 และ H6-H15 และทดสอบกับRNA ของมนุษย์ด้วย

การตรวจสอบ Limit of detection ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค multiplex RT-PCR

การหาค่า Limit of detection จากการทำ serial dilution โดยวิธีนี้จะต้องทราบจำนวนโมเลกุลที่แน่นอนของ RNA มาตรฐาน โดยสามารถคำนวณได้จากค่าความเข้มข้น ซึ่งวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ RNA มาตรฐาน โดยหาค่าความบริสุทธิ์ของ RNA มาตรฐาน จากความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-2.0

$$\text{RNA Purity} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

กำหนดให้ A_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดของ RNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm

A_{280} = ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm

คำนวณหาความเข้มข้นของ RNA มาตรฐานในหน่วย µg/mL

$$[\text{RNA}]\ \mu g/mL = (A_{260}) \times \text{dilution factor} \times 40$$

กำหนดให้ 1 หน่วยของ A_{260} = 40 µg/mL ของสารละลาย RNA

คำนวณความเข้มข้นของ RNA ในหน่วย copy/ µL

$$[\text{RNA}]\ copy/\ \mu L = \frac{[\text{RNA}]\ (g/\ \mu L) \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{Length of RNA (nt)} \times 340}$$

6.02×10^{23} เท่ากับค่าคงที่ของ Avogadro

340 เท่ากับน้ำหนักโดยประมาณของนิวคลีโอไทด์ 1 ตัว

เมื่อทราบค่าความเข้มข้นของสารละลาย RNA มาตรฐานแล้ว จึงนำมาทำ serial dilution โดยกำหนดให้ dilution factor เท่ากับ 10 เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของ RNA อยู่ระหว่าง 10^{10} - 1 copies/ µL เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบ ในการทำ RT-PCR โดยค่า sensitivity คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยังคงให้ PCR product ที่มองเห็นได้ ซึ่งค่า sensitivity ที่ยอมรับได้สำหรับการทำ RT-PCR มีค่าประมาณ 10^{2}- 10^{3} copies/ µL

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบ Evaluation ของเทคนิค multiplex RT-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้น

ในการทดสอบ Evaluation จะเป็นการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR โดย RNA ที่นำมาตรวจนั้น เป็น RNA ที่สกัดจาก clinical specimen จำนวน 100 ตัวอย่าง เมื่อนำผลของเทคนิค multiplex RT-PCR มาเปรียบเทียบกับผลของเทคนิค multiplex real time RT-PCR และเทคนิค rapid test ที่ใช้ทดสอบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

หลักทางสถิติที่นำมาใช้ในการวิจัย

การหาค่าความจำเพาะ (Specificity) จากเทคนิคที่นำมาใช้วิจัย

ค่า Relative specificity สามารถใช้บ่งบอกว่าเทคนิคที่ใช้นี้มีความจำเพาะต่อเชื้อที่ต้องการตรวจสอบมากน้อยเท่าใด ถ้าหากมีค่ามากก็มีความจำเพาะสูง เหมาะที่จะนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อที่ต้องการตรวจสอบ

ในการหาค่า Specificity นั้นจะใช้สูตรคำนวณค่าทางสถิติ (27) ดังนี้

$$\text{Relative specificity: SP} = \frac{NA}{N-} \times 100\ \%$$

- NA: จำนวนผล negative ของเทคนิคที่นำมาใช้ (Multiplex RT-PCR หรือ Rapid test) ซึ่งได้ผลเหมือนกับเทคนิคอ้างอิง (Real-time multiplex RT-PCR)
- N-: จำนวนของผล negative ทั้งหมดที่ได้จากเทคนิคอ้างอิง (Real-time multiplex RT-PCR) หาได้จากค่า NA+PD
- PD: false positive ของเทคนิค PCR

การหาค่าความไว (Sensitivity) จากเทคนิคที่นำมาใช้วิจัย

ค่า Relative sensitivity สามารถใช้บ่งบอกว่าเทคนิคที่ใช้นี้มีระดับความไวในการตรวจหาเชื้อที่ต้องการมากน้อยเท่าใด ถ้าหากมีค่าสูงแสดงว่ามีความไวสูงที่สามารถตรวจหาเชื้อที่ต้องการได้

ในการหาค่า Sensitivity นั้นจะใช้สูตรคำนวณค่าทางสถิติ (27) ดังนี้

$$\text{Relative sensitivity: SE} = \frac{PA}{N+} \times 100\ \%$$

- PA: จำนวนผล positive ของเทคนิคที่นำมาใช้ (multiplex RT-PCR หรือ rapid test) ซึ่งได้ผลเหมือนกับเทคนิคอ้างอิง (real-time multiplex RT-PCR)

- N+: จำนวนของผล positive ทั้งหมดที่ได้จากเทคนิคอ้างอิง (real-time multiplex RT-PCR) หาได้จากค่า PA+ND
- ND: false negative ของเทคนิค PCR

การหาค่าของความแม่นยำ (Accuracy) ของ Primers ที่ใช้ในเทคนิคที่นำมาใช้วิจัย

ค่า Relative accuracy สามารถใช้บ่งบอกว่าเทคนิคที่ใช้มีความแม่นยำในการตรวจหาเชื้อที่ต้องการมากน้อยเท่าใด ถ้าหากมีค่าที่สูงแสดงว่าเทคนิคที่ใช้มีความแม่นยำต่อเชื้อที่ต้องการตรวจมาก

ในการหาค่าความแม่นยำ (Accuracy) จะใช้สูตรคำนวณค่าทางสถิติ (27) ดังนี้

$$\text{Relative accuracy: AC} = \frac{(PA+NA)}{N} \times 100\ \%$$

- PA: จำนวนผล positive ของเทคนิคที่นำมาใช้ (multiplex RT-PCR หรือ rapid test) ซึ่งได้ผลเหมือนกับเทคนิคอ้างอิง (real-time multiplex RT-PCR)
- NA: จำนวนผล negative ของเทคนิคที่นำมาใช้ (multiplex RT-PCR หรือ rapid test) ซึ่งได้ผลเหมือนกับเทคนิคอ้างอิง (real-time multiplex RT-PCR)
- N: จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

การเก็บรวบรวมข้อมูล

รวบรวมและเก็บบันทึกข้อมูลบน Datasheets เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

- วิเคราะห์ผลจากการทำ multiplex RT-PCR จากการใช้ไพรเมอร์แต่ละชุด โดยวิเคราะห์จากขนาดของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นผลจาก multiplex RT-PCR เพื่อให้ได้ชุดของ ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการพัฒนาเทคนิค multiplex RT-PCR สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ
- วิเคราะห์ผลจากการทำ evaluation ใน clinical sample เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพในด้านความแม่นยำ (Accuracy) ระดับความไว (Sensitivity) และเวลาที่ใช้ในการตรวจ (Detection time) ของเทคนิค multiplex RT-PCR กับเทคนิค multiplex real-time RT-PCR และ rapid test kit โดยดูจากค่าความน่าเชื่อถือในการตรวจวินิจฉัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

ผลการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค Multiplex RT-PCR

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่ใช้นั้นจะพิจารณาจากผลที่ได้จากการทำ Multiplex RT-PCR โดยพิจารณาความคมชัดของแถบ DNA ที่เกิดขึ้น ซึ่งไพรเมอร์ที่คัดเลือกมานั้นแสดงในตารางที่ 9 และ 10

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus)

ตารางที่ 9: แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Multiple RT-PCR amplification สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

System	Target	Primer	Sequence (5'⟶3')	Nucleotide position	Size (bp)
GABH (Typing)	GAPDH	GAPDH_F112	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	112-132	491
		GAPDH_R603	GTTGTCATGGATGACCTTGGC	603-582	
	Flu A M gene	FluA_M_F151	CATGGARTGGCTAAAGACAAGACC	151-175	125
		FluA_M_R276	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA	276-253	
	Flu B M gene	FluB_M_F25	ATGTCGCTGTTTGGAGACACAAT	25-47	295
		FluB_M_R320	TCAGCTAGAATCAGRCCYTTCTT	320-298	
	pH1 HA gene	SWF_H1_ F758	GAGAATGAACTATTACTGGACACTA	758-782	368
		SWF_H1_R1126	CATCCATCTACCATCCCTGTCCA	1126-1104	

การจำแนกสายพันธุ์เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (Influenza A virus)

ตารางที่ 10: แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Multiple RT-PCR amplification สำหรับจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

System	HA gene Target	Primer	Sequence (5'⟶3')	Nucleotide position	Size (bp)
H135 (Subtyping)	pH1	SWF_H1_F916	CTTGTCAGACACCCAAGGGTG	916-936	210
		SWF_H1_R1126	CATCCATCTACCATCCCTGTCCA	1126-1104	
	seasonal H1	H1_F266	CTTAGGAAACCCAGAATGCG	266-285	361
		H1_R627	ACGGGTGATGAACACCCCA	627-609	
	seasonal H3	H3_F194	TGCTACTGAGCTGGTTCAGAGT	194-215	183
		H3_R377	AGGGTAACAGTTGCTGTRGGC	377-357	
	avian H5	H5_F3+	AACAGATTAGTCCTTGCGACTG	1001–1026	127
		H5_R2+	CATCTACCATTCCCTGCCATCC	1128–1108	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของการปรับความเหมาะสมของสารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบและอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ของการทำ multiplex RT-PCR

- ความเข้มข้นของไพรเมอร์ (primer concentration) และความเข้มข้นของแมกนีเซียม (Mg^{2+} concentration)

ในระหว่างการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR ได้ทำการปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์และแมกนีเซียม เพื่อให้ได้สภาวะในการทำ PCR ที่เหมาะสม โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของไพรเมอร์ระหว่าง 0.1-3.0 μM และความเข้มข้นของแมกนีเซียมระหว่าง 2.5-10 mM พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์และแมกนีเซียมคือ 0.25 μM และ 7.5 mM ตามลำดับ

- อุณหภูมิของขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยา multiplex RT-PCR

จากงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ของปฏิกิริยา multiplex RT-PCR เพื่อให้มีความเหมาะสม โดยมีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 55, 58, 60 และ 62 °C

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์, แมกนีเซียม และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ได้พิจารณาจากแถบของ DNA ที่เกิดขึ้นว่ามีลักษณะที่ชัดเจนสามารถตรวจสอบได้ จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing คือ 60 °C ส่วนประกอบที่ใช้ใน multiplex RT-PCR และ อุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex RT-PCR เป็นดังที่แสดงในตารางที่ 11 และ 12

ตารางที่ 11: แสดงส่วนผสมของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำ multiplex RT-PCR ที่ผ่านการปรับความเหมาะสมแล้ว

Reagents	Final concentration	Volume (μl)
Diethylpyrocarbonate water (DEPC treated water)	-	0.3
2X Reaction Mix	1X	5
Additional Mg^{2+} (50 mM)	7.5 mM	1.5
Super scrip III®RT/Taq	2 Unit	0.2
Forward primer (10 μM)/ 1 primer	0.25 mM	0.25
Reverse primer (10 μM) / 1 primer	0.25 mM	0.25
RNA template	-	1
Total volume		**10**

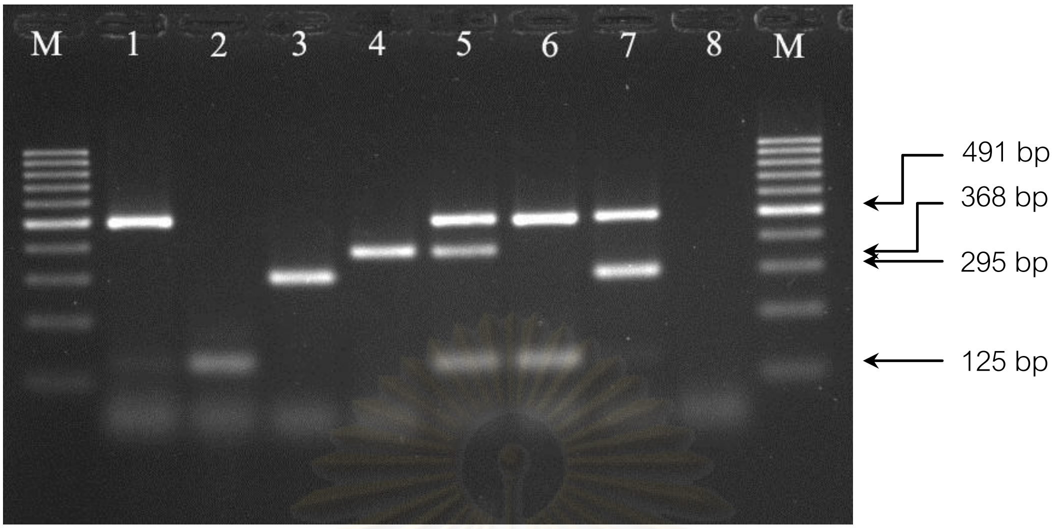
ตารางที่ 12 : แสดงรายละเอียดแต่ละขั้นตอนของโปรแกรม multiplex RT-PCR ที่ผ่านการปรับความเหมาะสมแล้ว

Step	Temperature(ºC)	Time
1.Reverse transcription	50	30 min
2.Initial denaturation	94	10 min
3.Denaturation	94	30 sec
4.Annealing	60	30 sec
5.Extension	72	1 min
Repeat step 3-5 for 40 cycles		
6.Final extension	72	7 min
7. Hold	25	5 min

การพิจารณาผลิตภัณฑ์ (PCR product) **ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา** multiplex RT-PCR

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR แล้ว ผลผลิต (PCR product) จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2% ทำใช้เวลาในการรัน gel electrophoresis ประมาณ 45 นาที หลังนั้นนำ agarose gel ไปแช่ใน 10% ethidium bromide แล้วทำการวิเคราะห์ผลโดยดูจากขนาดแถบของ cDNA ที่เกิดขึ้น สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (typing detection) ควรมีขนาดแถบของ cDNA ดังนี้ (แสดงในภาพที่ 25)

- ยีน GAPDH มีขนาดของ PCR product เป็น 491 bp
- ยีน matrix ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ มีขนาดของ PCR product เป็น 125 bp
- ยีน matrix ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด บีมีขนาดของ PCR product เป็น 295 bp
- ยีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1)
  มีขนาดของ PCR product เป็น 368 bp

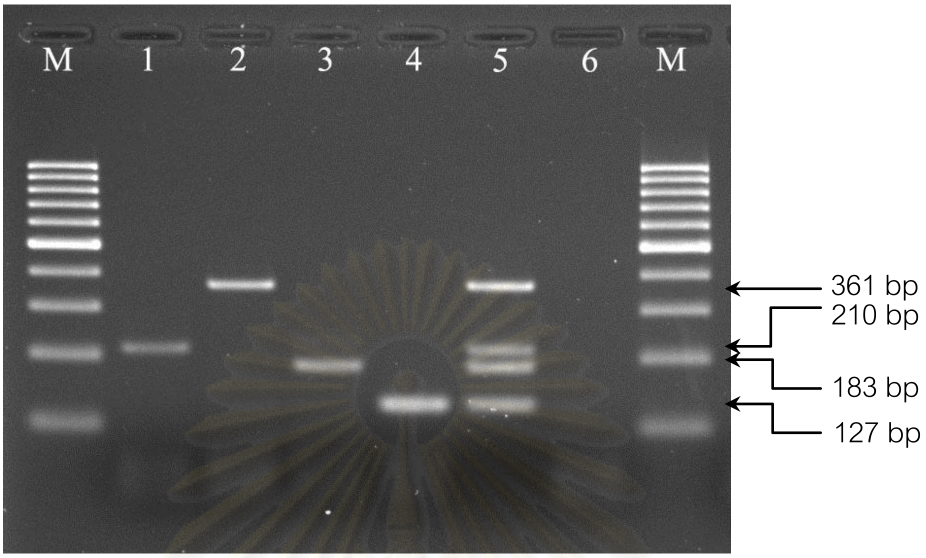


ภาพที่ 25: แสดงตัวอย่าง PCR product ที่ได้จากการทำ multiplex RT-PCR สำหรับ Typing detection

M: 100 bp DNA Marker   1: GAPDH (491 bp)
2: Flu A (125 bp)   3: Flu B (295 bp)
4: pH1-2009 (368 bp)   5: เมื่อมีการติดเชื้อ pH1-2009
6: เมื่อมีการติดเชื้อ Flu A   7: เมื่อมีการติดเชื้อ Flu B
8: No template control

สำหรับการตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อ Influenza A virus (subtyping detection) ควรมีขนาดแถบของ cDNA ดังนี้ (แสดงในภาพที่ 26)

- ยีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1) มีขนาดของ PCR product เป็น 210 bp
- ยีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H1 ที่มีการระบาดตามฤดูกาล มีขนาดของ PCR product เป็น 361 bp
- ยีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H3 ที่มีการระบาดตามฤดูกาล มีขนาดของ PCR product เป็น 183 bp
- ยีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5-avian) มีขนาดของ PCR product เป็น 127 bp

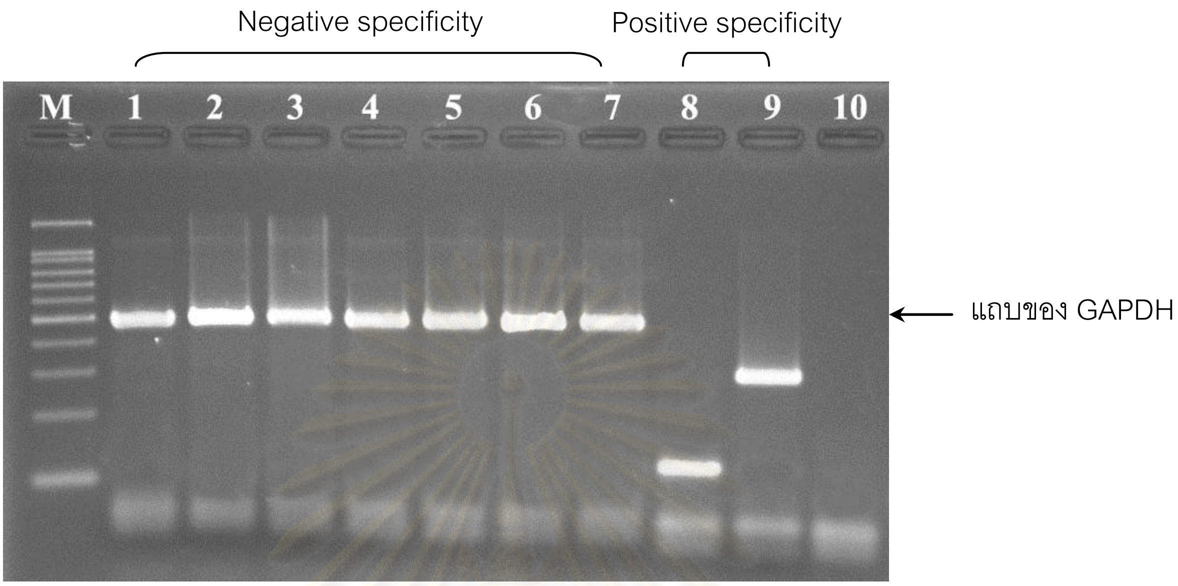


ภาพที่ 26: แสดงตัวอย่าง PCR product ที่ได้จากการทำ multiplex RT-PCR สำหรับ subtyping detection

M: 100 bp DNA Marker 1: pH1 (210 bp)
2: H1-seasonal (361 bp) 3: H3-seasonal (183 bp)
4: H5-avian (127 bp) 5: Co-infection
6: No template control

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ของเทคนิค multiplex RT-PCR

สำหรับ typing detection ได้แบ่งการทดสอบออกเป็น negative specificity ซึ่งจะทำการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้เพื่อทดสอบการเกิด cross amplification กับไวรัสชนิดอื่นๆที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ เช่น Human rhinovirus (HRV), Metapneumovirus (MPV), Bocavirus (BoCV), Adenovirus (ADV), Respiratory syncytial virus (RSV), WU/KI polyomavirus และ Parainfluenzavirus (PIV) นอกจากนี้ยังได้ทดสอบกับ human RNA ด้วย ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เท่านั้นและในเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ จะมีการแสดงผลของยีน GAPDH เท่านั้น ผลที่ได้แสดงในภาพที่ 27 ส่วนการทดสอบ positive specificity ได้ทำการทดสอบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ทราบสายพันธุ์



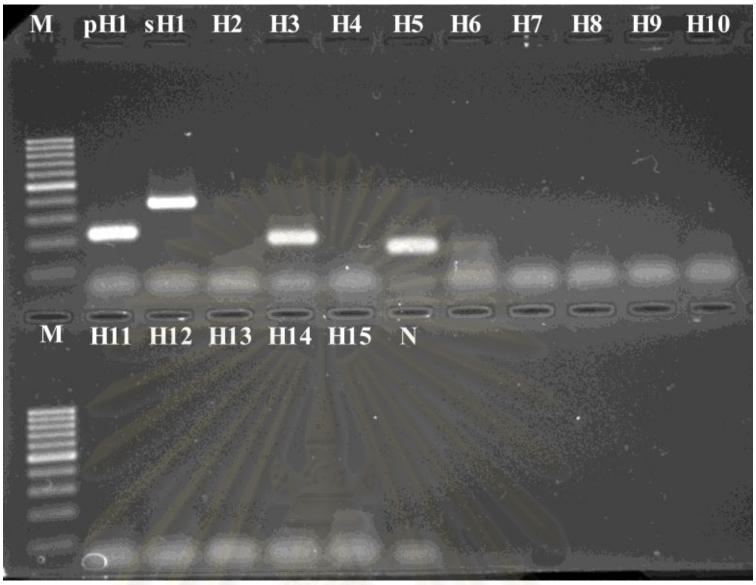
ภาพที่ 27: แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ใช้กับไวรัสชนิดอื่น

M: 100 bp DNA Marker
1: human rhinovirus
2: human metapneumovirus
3: human bocavirus
4: polyomavirus
5: parainfluenza virus
6: adenovirus
7: GAPDH gene (491 bp)
8: influenza A virus
9: influenza B virus
10: No template control

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับ subtyping detection ได้ทำการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็น Positive control คือ สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1) และสายพันธุ์ที่มีการระบาดตามฤดูกาลคือ H1 และ H3 (H1 และ H3 seasonal) และเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5 avian) นอกจากนี้ยังได้ทดสอบกับ negative controls ที่เป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ H2, H4 และ H6-H15 และทดสอบกับ RNA ของมนุษย์ด้วย จากผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ที่ใช้จำเพาะกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1), เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (H1 และ

H3) และ เชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5) เท่านั้น ส่วนเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์อื่นไม่มีการแสดงผลของแถบ DNA ดังแสดงในภาพที่ 28



ภาพที่ 28: แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ใช้กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ต่างๆ

M: 100 bp DNA marker

pH1: Human pandemic H1N1 influenza A virus

sH1: H1-Seasonal influenza A virus

H2-H15: สายพันธุ์ของเชื้อ influenza A virus

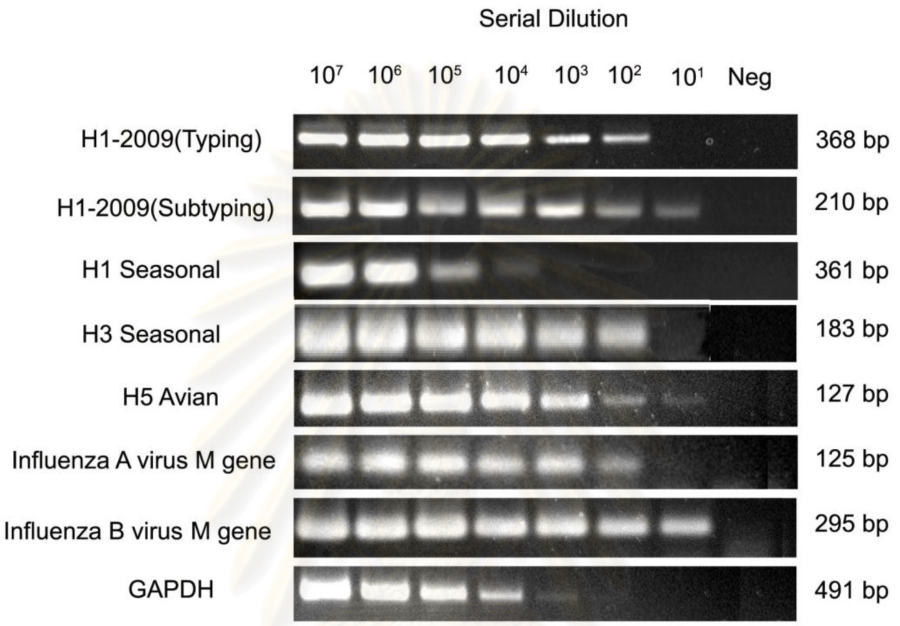
N: No template control

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบความไว (Limit of detection) **ของเทคนิค** multiplex RT-PCR

การทดสอบความไวของไพเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR โดยการทดสอบกับ *in vitro* transcribed RNA ซึ่งเป็น RNA มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 nm แล้วจึงนำมาทำ serial dilution โดยกำหนดให้ dilution factor เท่ากับ 10 เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของ RNA อยู่ระหว่าง 10^7-10^1 copies/ µL

เพื่อนำมาใช้เป็น template ในการทำ RT-PCR โดยค่า limit of detection คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยังคงให้ PCR product ที่มองเห็นได้ ซึ่งค่าที่ยอมรับได้สำหรับการทำ RT-PCR มีค่าประมาณ 10^3- 10^2 copies/μL และผลจากการทดสอบพบว่าค่าความไวในการตรวจหายีนต่างๆ เป็นดังภาพที่ 29



ภาพที่ 29 : แสดงระดับความไว (Limit of detection) ที่เทคนิค multiplex RT-PCR ที่สามารถตรวจสอบได้

ความไวในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Multiplex RT-PCR สำหรับ typing

- ความไวในการตรวจ GAPDH เท่ากับ 10^3 copies/μL
- ความไวในการตรวจ influenza A virus สายพันธุ์ pH1 เท่ากับ 10^2 copies/μL
- ความไวในการตรวจ influenza A virus (M gene) เท่ากับ 10^2 copies/μL
- ความไวในการตรวจ influenza B virus (M gene) เท่ากับ 10 copies/μL

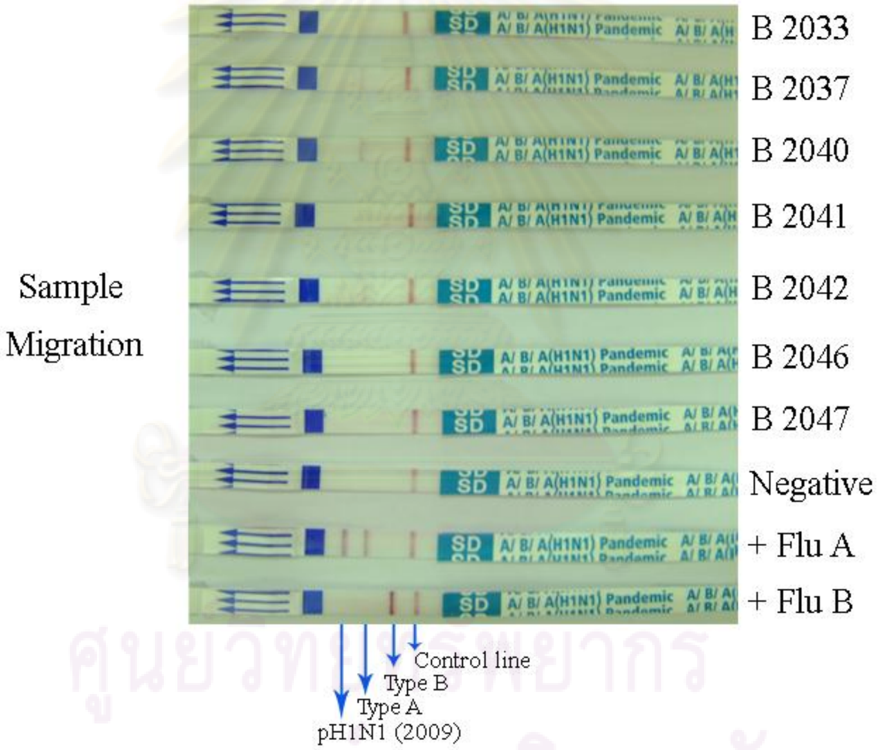
ความไวในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Multiplex RT-PCR สำหรับ subtyping

- ความไวในการตรวจ influenza A virus สายพันธุ์ pH1 เท่ากับ 10 copies/μL
- ความไวในการตรวจ influenza A virus สายพันธุ์ H1-seasonal เท่ากับ 10^4 copies/μL
- ความไวในการตรวจ influenza A virus สายพันธุ์ H3-seasonal เท่ากับ 10^2 copies/μL
- ความไวในการตรวจ Avian influenza A virus เท่ากับ 10 copies/μL

การทดสอบกับสิ่งส่งตรวจตัวอย่างที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการ (Evaluation of the assay)

การตรวจสิ่งส่งตรวจด้วยเทคนิค Rapid test

ในการวิจัยครั้งนี้จะทดสอบกับ RNA ที่สกัดมาจาก nasal swab ของผู้ป่วยที่มีอาการเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ จำนวนทั้งหมด 100 ตัวอย่าง โดยจะทำการทดสอบด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR เทคนิค rapid test และเทคนิค multiplex real-time RT-PCR ในส่วนของเทคนิค rapid test จะพิจารณาจากแถบสีที่เกิดขึ้น โดย rapid test ที่ใช้ในครั้งนี้ targeting site อยู่ที่ hemagglutinin และ nucleroprotein ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 30



ภาพที่ 30: แสดงผลที่ได้จากการทดสอบด้วย rapid test

ผลจากเทคนิค multiplex real-time RT-PCR ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับอ้างอิง, เทคนิค multiplex RT-PCR และ rapid test ได้นำมาเปรียบเทียบกัน โดยผลที่เกิดขึ้นเมื่อเทียบผลของเทคนิค multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น, เทคนิค rapid test กับเทคนิค multiplex real-time RT-PCR ที่ถูกใช้เป็นเทคนิคอ้างอิง พบว่า เทคนิค multiplex RT-PCR เกิดผล false negative จำนวน

5 ตัวอย่าง ส่วนเทคนิค rapid test เกิดผล false negative จำนวน 21 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13: แสดงสรุปผลของเทคนิค multiplex real-time RT-PCR, multiplex RT-PCR และ rapid test ที่ในงานวิจัย

Method	Negative	Influenza B virus	Influenza A virus				Total
			pH1	H1-seasonal	H3-seasonal	H5-avian	
Multiplex real-time RT-PCR	44	9	46	0	1	0	100
Multiplex RT-PCR	49	9	41	0	1	0	100
Rapid test	65	9	7	19			100

ผลการเปรียบเทียบ

จากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับเทคนิค multiplex Real-time RT-PCR ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในด้านของความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ความไวในการตรวจ (Sensitivity) และความแม่นยำในการตรวจ (Accuracy) โดยใช้หลักทางสถิติ ผลที่ได้พบว่าเทคนิค multiplex RT-PCR ค่าความแม่นยำ (accuracy), ค่าความจำเพาะ (specificity) และค่าความไว (sensitivity) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 95%, 100% และ 91% ตามลำดับ ส่วนเทคนิค rapid test ค่าต่างๆ ดังที่กล่าวในข้างต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 57%, 95% และ 26% ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14: แสดงค่าทางสถิติที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค multiplex RT-PCR และ rapid test

Methods	PA	NA	ND	PD	Sum	AC%	N+	SE%	N-	SP%
Multiplex RT-PCR	51	44	5	0	100	95	56	91	44	100
Rapid test	15	42	41	2	100	57	56	26	44	95

- PA: จำนวนผล positive ของเทคนิคที่นำมาใช้ (multiplex RT-PCR หรือ Rapid test) ซึ่งได้ผลเหมือนกับเทคนิคอ้างอิง (real-time multiplex RT-PCR)
- NA: จำนวนผล negative ของเทคนิคที่นำมาใช้ (multiplex RT-PCR หรือ Rapid test) ซึ่งได้ผลเหมือนกับเทคนิคอ้างอิง (real-time multiplex RT-PCR)
- ND: false negative ของเทคนิค PCR
- PD: false positive ของเทคนิค PCR
- N-: จำนวนของผล negative ทั้งหมดที่ได้จากเทคนิคอ้างอิง (real-time multiplex RT-PCR) หาได้จากค่า NA+PD
- N+: จำนวนของผล positive ทั้งหมดที่ได้จากเทคนิคอ้างอิง (real-time multiplex RT-PCR) หาได้จากค่า PA+ND
- N: จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ เทคนิค multiplex RT-PCR เป็นเทคนิคที่มีพื้นฐานมาจากเทคนิค PCR โดยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่สนใจ เทคนิค multiplex RT-PCR มีข้อดีคือสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมที่สนใจได้มากกว่า 1 ยีนเป้าหมาย ภายใน 1 ปฏิกิริยา เนื่องจากใช้ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ ต่อ 1 ปฏิกิริยา ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบและนำมาใช้ในงานวิจัยในครั้งมีความจำเพาะเจาะจงกับยีน Matrix ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอและบี, ยีน Hemagglutinin ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1N1), สายพันธุ์ที่มีการระบาดตามฤดูกาล (H1-seasonal และ H3-seasonal) และเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5-avian) ไพรเมอร์ที่ได้ได้คำนึงถึงผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา multiplex RT-PCR (PCR product) ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยแถบของ PCR product ที่เกิดขึ้นของแต่ละยีนควรมีขนาดที่ต่างกันประมาณ 40 bp เพื่อที่จะสามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างถูกต้อง

เทคนิค multiplex RT-PCR ได้มีการปรับความเหมาะสมของสารเคมีที่ใช้ อาทิ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ (primer concentration), ความเข้มข้นของแมกนีเซียม (magnesium concentration) และต้องมีการปรับความเหมาะสมของอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ในการพิจารณาความเหมาะสมของสิ่งต่างๆ ที่กล่าวมานี้ จะอาศัยการสังเกตจากแถบ DNA ที่เกิดขึ้นว่ามีความเข้มและคมชัดหรือไม่ ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบจะต้องทดสอบ specificity เพื่อดูว่าไม่มีการเกิด cross amplification กับเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่ไม่ต้องการตรวจ (negative specificity) ซึ่งในงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทดสอบกับไวรัสที่สามารถติดต่อได้ในระบบทางเดินหายใจ เช่น Human rhinovirus (HRV), Metapneumovirus (MPV), Bocavirus (BoCV), Adenovirus (ADV), Respiratory syncytial virus (RSV), WU/KI polyomavirus และ Parainfluenzavirus (PIV) จากผลการทดลองพบว่า เกิด PCR product ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เท่านั้น ส่วนตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น พบว่ามีเฉพาะแถบ DNA ของยีน GAPDH gene ที่เกิดขึ้นยีน GAPDH เป็น housekeeping gene ชนิดหนึ่งซึ่งพบได้ในเซลล์ทุกเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยการที่นำ GAPDH gene มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อที่จะใช้ในการพิจารณาในขั้นตอนของการสกัดเชื้อไวรัส ซึ่งถ้าหากมีแถบของ GAPDH เกิดขึ้นแสดงว่าสามารถสกัดสารพันธุกรรมออกมาจากเซลล์ได้ นอกจากนี้

ยังทดสอบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ทราบชนิดและสายพันธุ์ (positive specificity) โดยผลจากการทดสอบพบว่า ไม่มีการเกิด cross amplification ของไพรเมอร์

นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบ limit of detection ของไพรเมอร์ เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการตรวจหาปริมาณของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเตรียมสารพันธุกรรมที่เป็น RNA เพื่อใช้เป็นแม่แบบของปฏิกิริยา multiplex RT-PCR โดยใช้เทคนิค *In vitro* transcription RNA ที่ได้ถูกนำมาเจือจางด้วยวิธี serial dilution โดยกำหนดให้ dilution factor เท่ากับ 10 เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของ RNA อยู่ระหว่าง 10^1-10^7 copies/µL จากผลการทดสอบพบว่า limit of detection ของแต่ละไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 10-10^4 copies/µL ซึ่งอยู่ในระหว่างค่าที่สามารถยอมรับได้ เนื่องจากระดับของ limit of detection ที่สามารถยอมรับได้อยู่ในช่วง 10^2-10^3 copies/µL ซึ่งค่าที่ได้อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ด้วย ได้แก่ ประสิทธิภาพของไพรเมอร์, ประสิทธิภาพของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้ และขนาดความยาวของ PCR product เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Boonsuk และคณะ (51) ได้ทำการพัฒนาเทคนิค multiplex RT-PCRสำหรับตรวจหาเชื้อ influenza virus และมีค่า limit of detection ประมาณ 10^4 copies/µL ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลกับเทคนิค multiplex RT-PCR ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่าเทคนิค multiplex RT-PCR ที่ใช้ในงานวิจัย มีค่า limit of detection อยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้และสามารถใช้กับปริมาณ template น้อยกว่า10^4 copies/µL

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้นำเทคนิค rapid test มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ซึ่ง rapid test ที่นำมาใช้คือ SP6/T7 Transcription Kit ของ บริษัท Roche, Germany โดยอาศัยหลักการของเทคนิค ELISA สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ, บี และเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ใหม่ 2009 เทคนิค multiplex RT-PCR และ rapid test ถูกนำมาใช้ทดสอบกับสิ่งส่งตรวจ (Evaluation test) ที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการณ์ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค multiplex RT-PCR พบว่ามีสิ่งส่งตรวจ 5 ตัวอย่างที่ให้ผลลบจากการทดลอง (negative) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่สิ่งส่งตรวจมีปริมาณของไวรัสที่น้อยมาก (Low viral concentration) จนเทคนิค multiplex RT-PCR ไม่สามารถตรวจสอบได้ และเมื่อวิเคราะห์ค่า Ct ที่ได้จากเทคนิค multiplex real-time RT-PCR พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 25-30 ซึ่งการที่ค่า Ct มีค่าสูงแสดงให้เห็นว่าในสิ่งส่งตรวจมีปริมาณของเชื้อไวรัสที่ต่ำ เพราะสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นผ่านไปแล้วหลายรอบ นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบทั้งด้านของความจำเพาะเจาะจง (Specificity), ความไวในการตรวจ (sensitivity) และความแม่นยำในการตรวจ (Accuracy) กับเทคนิค rapid test และ multiplex real-time RT-PCR ซึ่งใช้เป็นวิธี

มาตรฐานสำหรับอ้างอิง (Gold standard) จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค multiplex RT-PCR ให้ค่าความจำเพาะเจาะจง (Specificity), ค่าความไวในการตรวจ (sensitivity) และค่าความแม่นยำ (Accuracy) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 100%, 91%, 95% ตามลำดับ การที่ค่าความแม่นยำ (Accuracy) ไม่เท่ากับ 100% อาจเป็นผลมาจากการที่สิ่งส่งตรวจนั้นมีปริมาณของเชื้อไวรัสที่ต่ำมากๆ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค multiplex real-time RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและมีความแม่นยำสูง จึงส่งผลให้เทคนิค multiplex RT-PCR มีค่าความแม่นยำที่คลาดเคลื่อนไป ส่วนเทคนิค Rapid test มีค่าความจำเพาะเจาะจง (Specificity), ค่าความไวในการตรวจ (sensitivity) และค่าความแม่นยำ (Accuracy) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 95%, 26%, 57% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาด้านความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของทั้ง 2 เทคนิค พบว่า multiplex RT-PCR มีความจำเพาะที่สูงกว่า Rapid test ด้านความไวในการตรวจ (sensitivity) พบว่า multiplex RT-PCR มีค่าของระดับความไวที่สูงกว่า และในด้านความแม่นยำพบว่าเทคนิค multiplex RT-PCR มีความแม่นยำมากกว่า rapid test เนื่องจากเทคนิค rapid test ให้ผล false negative ซึ่งส่งผลให้การวินิจฉัยเกิดความผิดพลาด เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบทั้งหมดพบว่าเทคนิค multiplex RT-PCR ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Rapid test จากการศึกษาที่ผ่านมาเทคนิค multiplex RT-PCR ถูกนำมาใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสที่สามารถติดต่อผ่านทางระบบทางเดินหายใจ อาทิเช่น ในปี ค.ศ. 2002 Poddar และคณะได้นำเทคนิค multiplex RT-PCR มาใช้ในการตรวจหาวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอและบี นอกจากนั้นยังนำมาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ H1N1, H3N2, H5N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ได้อีกด้วย (52) ในช่วงที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) เทคนิค multiplex RT-PCR ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสเพื่อใช้วินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (53, 54) และ ในปี ค.ศ. 2007 Mahony และคณะ (55) ได้นำเทคนิค multiplex RT-PCR ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ 20 ชนิด ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสทางระบบทางเดินหายใจได้ นอกจากนี้ Chaharaein และคณะ ได้นำเอาเทคนิค multiplex RT-PCR มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ H5, H7 และ H9 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (Avian flu) (56)

เทคนิค multiplex RT-PCR ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสหลายชนิดและเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัย นอกจากนี้เทคนิค multiplex RT-PCR มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity), ความไวในการตรวจ (Sensitivity) และสามารถทราบผลการตรวจได้อย่างรวดเร็ว (rapid) ภายในเวลาไม่นานประมาณ 4-5 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเทียบกับเทคนิค culture ซึ่งอาจจะต้องใช้เวลานานถึง 1 สัปดาห์ เทคนิค multiplex RT-PCR สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการณ์ทั่วไป

โดยการตรวจสิ่งส่งตรวจ 1 ตัวอย่าง มีค่าใช้จ่ายประมาณ 400-600 บาท และต้องใช้เครื่อง PCR ที่มีราคาประมาณ 100,000 บาท ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค multiplex real-time RT-PCR ที่มีค่าใช้จ่ายในการตรวจสิ่งส่งตรวจ 1 ตัวอย่าง ประมาณ 800-1,200 บาท และต้องใช้เครื่อง real-time thermocycler ที่มีราคาประมาณเครื่องละ 2,000,000 บาท ด้วยเหตุนี้เทคนิค multiplex RT-PCR จึงเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ไม่ยุ่งยากและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงก็สามารถวิเคราะห์ผลการตรวจได้ ซึ่งจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกเพื่อประหยัดต้นทุนและนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสในสิ่งส่งตรวจจำนวนมากได้ ในงานวิจัยครั้งนี้ได้นำเทคนิค multiplex RT-PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิเคราะห์ถึงชนิด (เอและบี) และสายพันธุ์ (สายพันธุ์ใหม่ 2009 (pH1), สายพันธุ์ที่มีการระบาดตามฤดูกาล (H1 และ H3) และเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5) ผลที่ได้จากงานวิจัยสามารถนำมาวินิจฉัยการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ การที่ทราบถึงชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสได้อย่างรวดเร็ว จะทำให้สามารถรักษาผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็ว และสามารถป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสสู่สิ่งแวดล้อม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] Dawood, FS. *et al*. (2009) Emergence of a novel swine-origin Influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 360: 2605-2615.

[2] CDC (2009) Swine Influenza A (H1N1) infection in two children-Southern California, arch–April 2009. MMWR 58:402.

[3] Garten, RJ. *et al*. (2009) Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325:196-201.

[4] Fouchier, RA. *et al*. (2005) Characterization of a novel Influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black- headed gulls. *J Virol* 79: 2814-2822.

[5] Pappas, C. *et al*. (2007) Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *PNAS* 105(8): 3064–3069.

[6] Bastien, N. *et al*. (2010) Human Infection with a Triple-Reassortant Swine Influenza A (H1N1) Virus Containing the Hemagglutinin and Neuraminidase Genes of Seasonal Influenza Virus. *Emerg Infect Dis* 201(8):1178-1182. .

[7] Nicholson, KG., Wood, JM., and Zambon, M. (2003) Influenza. *Lancet*, 362: 1733-1745.

[8] Palese, P., and Shaw, ML. (2006) Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. *FieldsVirology*, Knipe DM, Howley PM, eds. 5th Ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.1648–1689.

[9] Mandell, GL., Bennett, JE., and Dolin, R. (2005) Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, Inc.

[10] Boni, MF. (2008) Vaccination and antigenic drift in influenza. *Vaccine* 18:26

[11] Brown, IH., Harris, PA., McCauley, JW., and Alexander, DJ. (1998) Multiple genetic reassortment of avian and human Influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *J Gen Virol* 79:2947–2955.

[12] Webby, RJ. *et al*. (2000) Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol* 74(18):8243-8251.

[13] Young, JF.,and Palese, P. (1979) Evolution of human Influenza A viruses in nature: Recombination contributes to genetic variation of H1N1 isolates. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6547–6551.

[14] Xu, X., Rocha, EP., Regenery, HL., Kendal, AP., and Cox, NJ. (1993) Genetic and antigenic analyses of Influenza A (H1N1) viruses, 1986–1991. *Virus Res* 28:37–55.

[15] Guo, Y., Xu, X., and Cox, NJ. (1992) Human Influenza A (H1N2) viruses isolated from China. *J Gen Virol* 73:383–388.

[16] Newman, AP. *et al*. (2008) Human case of swine Influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 14:1470–1472.

[17] Shinde, V. *et al*. (2009) Triple-reassortant swine Influenza A (H1) in humans in the United States, 2005–2009. *N Engl J Med* 360(25):2616-2625.

[18] Smith, GJ. *et al*. (2009) Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459(25):1122-5.

[19] Itoh, Y. *et al*.(2009) *In vitro* and *In vivo* *characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. Nature 460(20):1021–1025.*

[20] Miller, MA., Viboud, C., Balinska, M., and Simonsen, L. (2009) The signature features of influenza pandemics–implications for policy. *N Engl J Med* 360: 2595–2598

[21] Trifonov V, Khiabanian H, Greenbaum B, Rabadan R. (2009) The origin of the recent swine Influenza A (H1N1) virus infecting humans. *Euro Surveill* 14:19193.

[22] Tumpey, TM. *et al*. (2005) Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 310:77–80.

[23] Choi, YJ. *et al*. (2010) Evaluation of new rapid antigen test for the detection pandemic Influenza A/H1N1 2009 Virus. *J Clin Microbiol* 10

[24] World Health Organization (WHO). [online].available from:http://www.who.int/csr /don/2010_06_11/ en/index.html [2010, MAY]

[25] Henegariu, O., Heerema, NA., Dlouhy, SR., Vance, GH., and Vogt, PH. (1997) Multiplex PCR: Critical parameter and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23 (3):504-511.

[26] Anonymous: Microbiology of food and animal feeding stuffs-protocol for the validation of alternative methods (ISO 16140: 2003) European Committee for Standardization; 2003.

[27] Munster, VJ., Veen, J., Olsen, B., Vogel, R., Osterhaus, AD., and Fouchier, RA. (2006) Towards improved influenza A virus surveillance in migrating birds. *Vaccine* 24:6729–6733.

[28] Williams, RA., and Peterson, AT. (2009) Ecology and geography of avian influenza (HPAI H5N1) transmission in the Middle East and northeastern Africa. *Int J Health Geogr* 8:47.

[29] Tiensin, T. *et al*. (2005) Highly pathogenic avian influenza H5N1, Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis* 11:1664-1672.

[30] Chutinimitkul, S. *et al*. (2006) H5N1 influenza A virus and infected human plasma. *Emerg Infect Dis* 6:1041-1043.

[31] Keawcharoen, J. *et al*. (2004) Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis* :2189-2191.

[32] Thanawongnuwech, R. *et al*. (2005) Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerg Infect Dis* 5:699-701.

[33] Webster, RG., Bean, WJ., Gorman, OT., Chambers, TM., and Kawaoka, Y.(1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56(1):152-179.

[34] Krauss, S. *et al*. (2004) Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America.*Vector Borne Zoonotic Dis* 4(3):177-189.

[35] Fouchier, RA. *et al*. (2005) Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79:2814–2822.

[36] Johnson, NP., and Mueller, J. (2002) Updating the accounts: Global mortality of the 1918-20 “Spanish”influenza pandemic. *Bull Hist Med* 76: 105-115.

[37] Coiras, MT., Pérez-Breña, P., García, ML., and Casas, I. (2003) Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol* 69 (1):132-144.

[38] Coiras, MT., Aguilar, JC., García, ML., Casas, I., and Pérez-Breña, P. (2004) Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 72 (3):484-495.

[39] Fan, J., Henrickson, KJ., and Savatski, LL. (1998) Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses A and B, and

human parainfluenza virus types 1, 2, and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridization assay (Hexaplex). *Clin Infect Dis* 26 (6):1397-1402.

[40] Monto, AS. (2002) Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med* 22:112

[41] Stockton, J., Ellis, JS., Saville, M., Clewley, JP., and Zambon, MC. (1998) Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 36 (10):2990-2995.

[42] Strålin, K., Bäckman, A., Holmberg, H., Fredlund, H., and Olcén, P. (2005) Design of a multiplex PCR for Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae and Chlamydophila pneumoniae to be used on sputum samples. *APMIS* 113 (2):99-111.

[43] Arya, M., Shergill, IS., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., and Patel, HR. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 5 (2):209-219.

[44] Lau, LT. *et al*. (2004) Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem Biophys Res Commun* 313 (2):336-342.

[45] Whiley, DM. *et al*. (2009) Detection of novel influenza A (H1N1) virus by real-time RT-PCR. *J Clin Virol* 45 (3):203-204.

[46] Li, J., Chen, S., and Evans, DH. (2001) Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 39 (2):696-704.

[47] Townsend, MB. *et al*. (2006) Experimental Evaluation of the FluChip Diagnostic Microarray for Influenza Virus Surveillance. *J Clin Microbiol* 8(44): 2863-2871

[48] Huang, Y. *et al*. (2009) Multiplex assay for simultaneously typing and subtyping influenza viruses by use of an electronic microarray. *J Clin Microbiol* 47(2):390-396.

[49] Duwe, S., and Schweiger, B. (2008) A new and rapid genotypic assay for the detection of neuraminidase inhibitor resistant influenza A viruses of subtype H1N1, H3N2, and H5N1. *J Virol Methods* 153 (2):134-141.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[50] Imai, M. *et al*. (2007) Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *J Virol Methods* 141 (2):173-180.

[51] Boonsuk, P. *et al*. (2008) Detection of influenza virus types A and B and type A subtypes (H1, H3, and H5) by multiplex polymerase chain reaction. *Tohoku J Exp Med* 215(3):247-255.

[52] Poddar, SK. (2002) Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J Virol Methods* 99 (1-2):63-70.

[53] Payungporn, S. *et al*. (2004) Single step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RTPCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. *Viral Immunol* 17:588–593.

[54] Thontiravong, A. *et al*. (2007) The single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detecting H5 and H7 avian influenza A viruses. *Tohoku J Exp Med* 211 (1):75-79.

[55] Mahony, J. *et al*. (2007) Development of a Respiratory Virus Panel Test for Detection of Twenty Human Respiratory Viruses by Use of Multiplex PCR and a Fluid Microbead-Based Assay. *J Clin Microbiol* 45(9): 2965–2970.

[56] Chaharaein, B., Omar, AR., Aini, I., Yusoff, K., and Hassan, SS. (2009) Detection of H5, H7 and H9 subtypes of avian influenza viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Microbiol Res* 164 (2):174-179.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับการทำ Cloning

LB agar 100 mL

ส่วนประกอบ Agar 1.5 g, Yeast extract 0.5 g, Peptone 1 g และ NaCl 0.5 g

วิธีเตรียม ชั่งสารทั้งหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 100 mL นำสารที่ได้ไปผ่านการ autoclave จากนั้นรอให้อุณหภูมิของสารลดลง เติม ampicilin 100 µg/mL เตรียมเท LB agar ลงใน plate ที่เตรียมไว้ประมาณ 35 mL ต่อ 1 plate

LB broth 50 mL

ส่วนประกอบ Yeast extract 0.25 g, Peptone 0.5 g และ NaCl 0.25 g

วิธีเตรียม ชั่งสารทั้งหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 50 mL นำสารที่ได้ไปผ่านการ autoclave

SOC medium 100 mL

ส่วนประกอบ Yeast extract 0.5 g, Peptone 2 g, NaCl 1 mL และ KCl 0.25 mK

วิธีเตรียม ชั่งสารทั้งหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 100 mL จากนั้นเติมกลูโคสปริมาตร 100 µL และ Mg^{2+} ปริมาตร 100 µL

การเตรียมสารเคมีสำหรับทำ Agarose gel elctrophoresis

5 × Tris borate buffer (5×TBE)

ส่วนประกอบ Tris-base 54 g, Boric acid 27.5 g, EDTA (pH 8.0) 20 mL

วิธีเตรียม ชั่งสารทั้งหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 1,000 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2% (w/v) agarose gel

ส่วนประกอบ Agarose gel 4 g, 1×TBE 200 mL

วิธีเตรียม ชั่งสารทั้งหมด ผสมให้เข้ากันแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

10% Ethidium bromide

ส่วนประกอบ Ethidium bromide 30 μL, น้ำกลั่น 300 mL

วิธีเตรียม ผสมสารทั้ง 2 ชนิดให้เข้ากัน เก็บไว้ในภาชนะทึบแสง

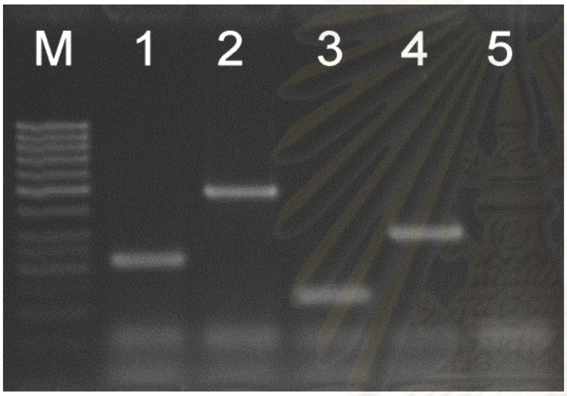
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

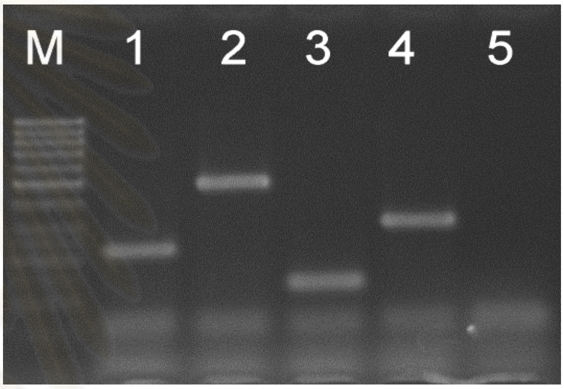
ภาพของ PCR product ที่ได้จากการปรับความเหมาะสมของความเข้มข้นของไพรเมอร์ (Primer concentration) โดยคงที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 7.5 mM แสดงในภาพที่ 31 และ 32

สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Typing)

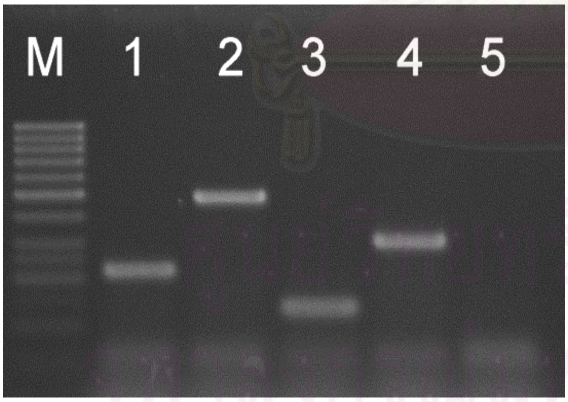
A



B



C



ภาพที่ 31 : แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.1, 0.2 และ 0.3 μM (A, B และ C ตามลำดับ)

M: 100 bp DNA marker

1: HA gene ของ pH1 (2009)

2: GAPDH gene

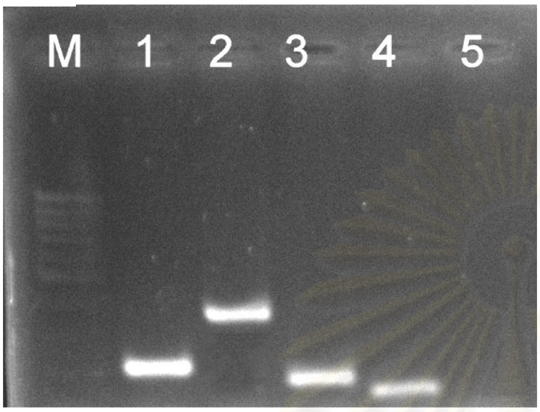
3: M gene ของ Flu A

4: M gene ของ Flu B

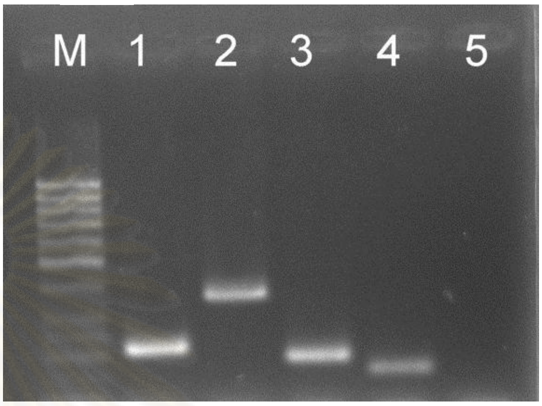
5: No template control

สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (Subtyping)

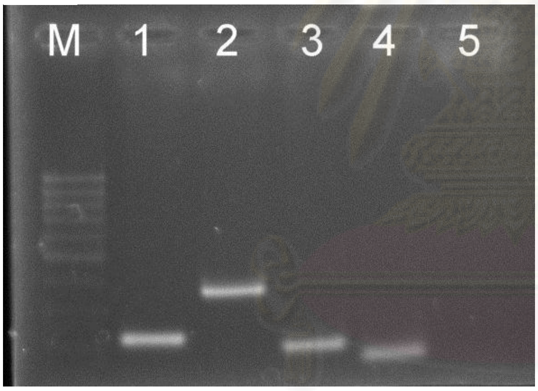
A



B



C



ภาพที่ 32 : แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.1, 0.2 และ 0.3 μM (A, B และ C ตามลำดับ)

M: 100 bp DNA marker

1: HA gene ของ pH1 (2009)

2: HA gene ของ sH1

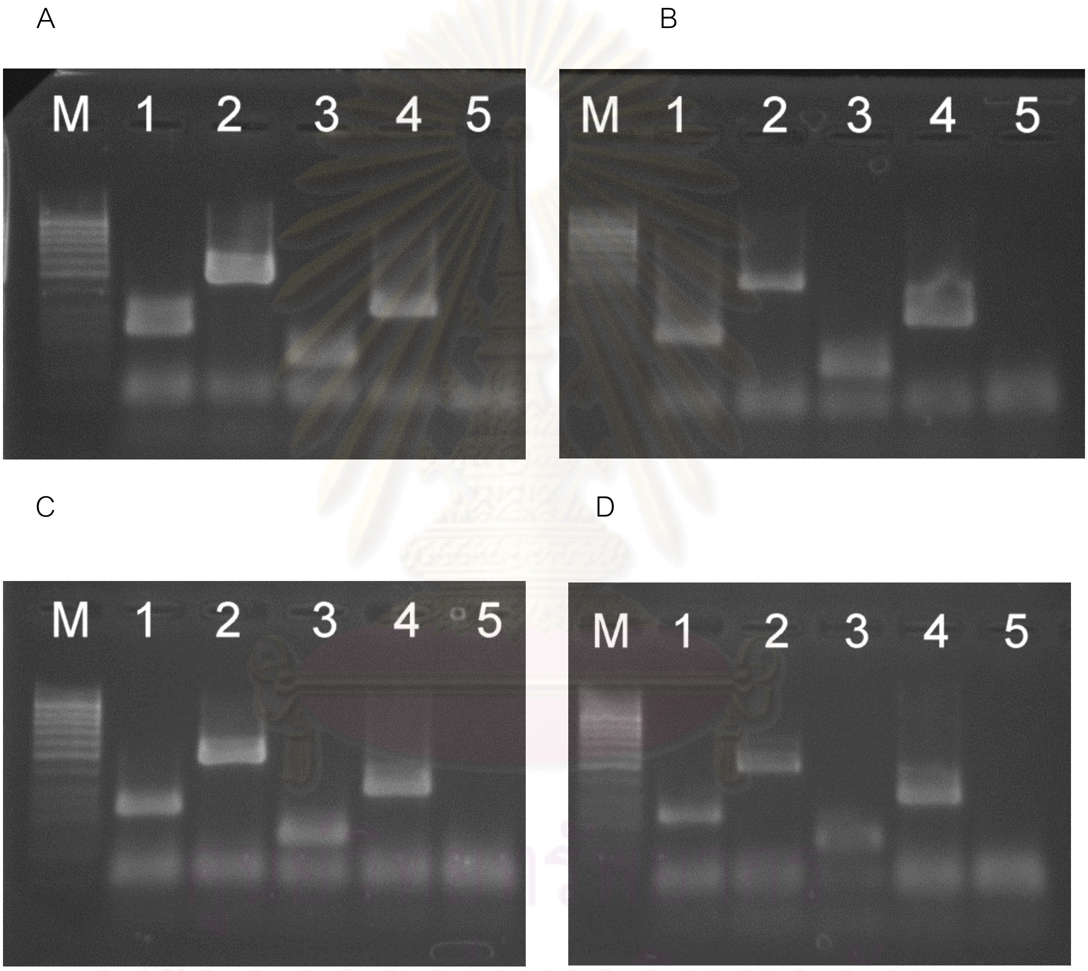
3: HA gene ของ H3

4: HA gene ของ H5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพของ PCR product ที่ได้จากการปรับความเหมาะสมของความเข้มข้นของแมกนีเซียม (Magnesium concentration) โดยคงที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากับ 0.25 μM แสดงในภาพที่ 33 และ 34

สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Typing)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

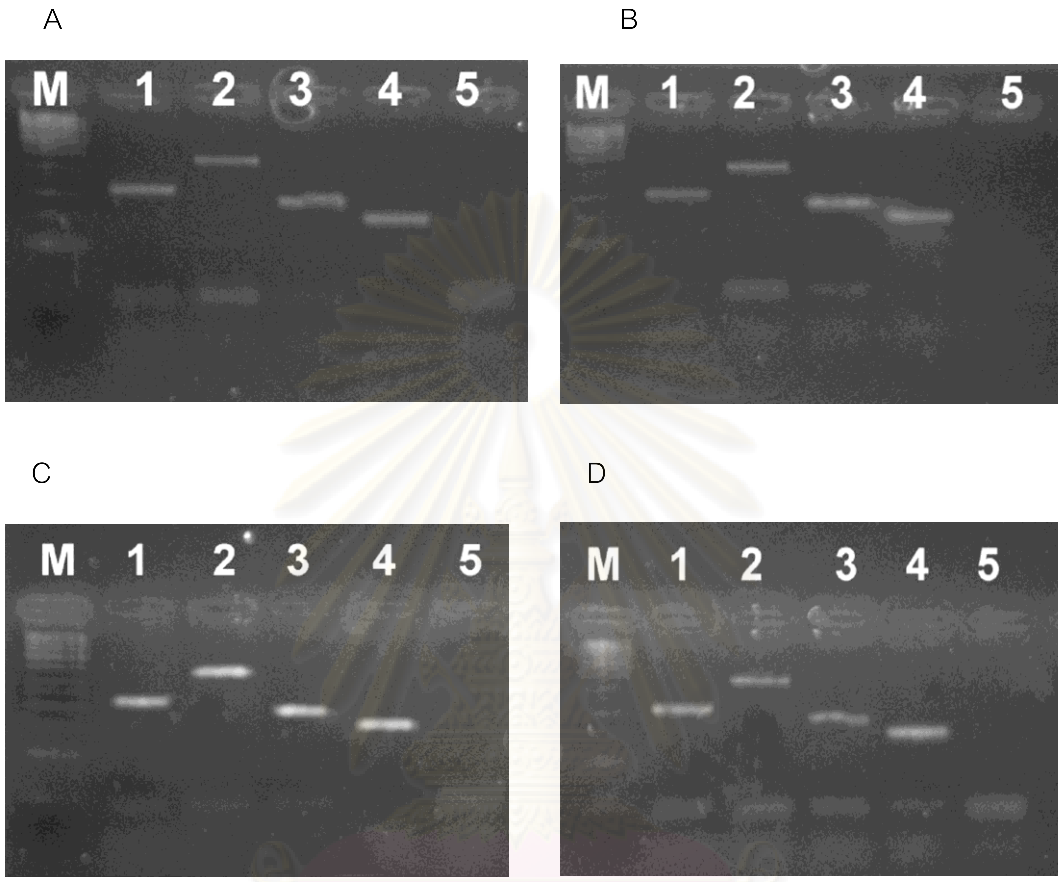
ภาพที่ 33 : แสดงความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 2.5, 5, 7.5 และ 10 mM (A, B, C และ D ตามลำดับ)

M: 100 bp DNA marker　1: HA gene ของ pH1 (2009)

2: GAPDH gene　3: M gene ของ Flu A

4: M gene ของ Flu B　5: No template control

สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (Subtyping)



ภาพที่ 34 : แสดงความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 2.5, 5, 7.5 และ 10 mM (A, B, C และ D ตามลำดับ)

M: 100 bp DNA marker 1: HA gene ของ pH1 (2009)

2: HA gene ของ sH1 3: HA gene ของ H3

4: HA gene ของ H5 5: No template control

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ผลการตรวจวินิจฉัยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค Multiplex RT-PCR, rapid test และ multiplex real-time RT-PCR ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานในงานวิจัยครั้งนี้

ตารางที่ 21: ผลการตรวจวินิจฉัยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคต่าง ๆ

Sample	Multiplex RT-PCR	Rapid test	Multiplex real-time RT-PCR Confirmed Result	Ct value
B1949	H1-2009	H1-2009	H1-2009	20
B1951	negative	negative	negative	-
B1952	H3-seasonal	Flu A	H3-seasonal	26
B1953	negative	negative	negative	-
B1954	H1-2009	negative	H1-2009	28
B1955	negative	negative	negative	-
B1956	H1-2009	negative	H1-2009	25
B1957	negative	negative	negative	-
B1959	H1-2009	negative	H1-2009	23
B1961	H1-2009	negative	H1-2009	32
B1962	H1-2009	Flu A	H1-2009	19
B1963	negative	negative	negative	-
B1964	negative	negative	negative	-
B1967	H1-2009	Flu A	H1-2009	24
B1968	H1-2009	Flu A	H1-2009	22
B1978	H1-2009	Flu A	H1-2009	18
B1982	negative	negative	negative	-
B1983	H1-2009	Flu A	H1-2009	21
B1985	negative	negative	negative	-
B1988	negative	negative	negative	-
B1989	H1-2009	negative	H1-2009	23

Sample	Multiplex RT-PCR	Rapid test	Multiplex real-time RT-PCR Confirmed Result	Ct value
B1990	negative	negative	negative	-
B1995	negative	negative	negative	-
B1996	negative	negative	negative	-
B2016	H1-2009	negative	H1-2009	23
B2018	H1-2009	negative	H1-2009	30
B2019	Flu B	Flu B	Flu B	38
B2021	negative	negative	negative	-
B2022	Flu B	Flu B	Flu B	25
B2023	H1-2009	H1-2009	H1-2009	25
B2025	negative	negative	negative	-
B2028	negative	negative	negative	-
B2033	H1-2009	H1-2009	H1-2009	21
B2037	negative	negative	negative	-
B2040	Flu B	negative	Flu B	31
B2041	negative	negative	negative	-
B2042	negative	Flu B	negative	-
B2046	negative	negative	negative	-
B2047	H1-2009	negative	H1-2009	26
B2056	negative	negative	negative	-
B2057	Flu B	Flu B	Flu B	19
B2058	negative	negative	negative	-
B2063	negative	negative	negative	-
B2069	negative	negative	negative	-
B2072	H1-2009	Flu A	H1-2009	29
B2075	H1-2009	Flu A	H1-2009	25
B2079	H1-2009	H1-2009	H1-2009	26
B2080	H1-2009	negative	H1-2009	25

Sample	Multiplex RT-PCR	Rapid test	Multiplex real-time RT-PCR Confirmed Result	Ct value
B2081	negative	negative	negative	-
B2084	Flu B	Flu B	Flu B	29
B2085	H1-2009	negative	H1-2009	26
B2087	negative	negative	negative	-
B2088	H1-2009	H1-2009	H1-2009	21
B2090	H1-2009	Flu A	H1-2009	18
B2091	H1-2009	Flu A	H1-2009	25
B2092	H1-2009	Flu A	H1-2009	23
B2093	negative	negative	negative	-
B2094	H1-2009	negative	H1-2009	25
B2095	H1-2009	negative	H1-2009	23
B2097	H1-2009	Flu A	H1-2009	23
B2098	negative	negative	negative	-
B2101	H1-2009	negative	H1-2009	27
B2103	negative	negative	negative	-
B2105	negative	negative	H1-2009	26
B2106	Flu B	Flu B	Flu B	29
B2107	negative	negative	negative	-
B2109	negative	negative	H1-2009	30
B2110	negative	Flu B	negative	-
B2112	H1-2009	negative	H1-2009	23
B2113	negative	negative	negative	-
B2115	H1-2009	negative	H1-2009	23
B2117	negative	Flu A	H1-2009	24
B2118	H1-2009	negative	H1-2009	30
B2120	negative	negative	negative	19
B2122	negative	negative	negative	-

Sample	Multiplex RT-PCR	Rapid test	Multiplex real-time RT-PCR Confirmed Result	Ct value
B2126	H1-2009	Flu A	H1-2009	26
B2127	negative	negative	negative	-
B2153	H1-2009	negative	H1-2009	28
B2154	negative	negative	negative	-
B2155	H1-2009	Flu A	H1-2009	24
B2156	negative	negative	H1-2009	27
B2157	H1-2009	H1-2009	H1-2009	25
B2159	negative	negative	H1-2009	28
B2161	negative	negative	negative	-
B2162	negative	negative	negative	-
B2163	H1-2009	Flu A	H1-2009	27
B2164	negative	negative	negative	-
B2166	H1-2009	Flu A	H1-2009	28
B2167	negative	negative	negative	-
B2169	H1-2009	Flu A	H1-2009	26
B2171	H1-2009	Flu A	H1-2009	29
B2173	negative	negative	negative	-
B2176	negative	negative	negative	-
B2178	Flu B	negative	Flu B	23
B2183	negative	negative	negative	-
B2184	H1-2009	H1-2009	H1-2009	27
B2186	negative	negative	negative	-
B2187	negative	negative	negative	-
B2207	Flu B	Flu B	Flu B	25
B2218	Flu B	Flu B	Flu B	21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายวิทยา ภูมิภักดิ์

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Witthaya Poomipak

เกิดวันที่ 13 กันยายน 2529 อายุ 24 ปี สถานภาพ โสด

สัญชาติไทย เชื้อชาติ ไทย ศาสนา พุทธ

ที่อยู่ปัจจุบัน 32/8 หมู่ 3 ตำบลบางกระสอ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

Email address: …nucler_13@hotmail.com…………

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี

สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 2548-2551

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย