

การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1 H3 และ H5 ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR

นางสาวปิติรัตน์ บุญสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 4 7 5 4 6 3 0

๐๘๑๘๕๐๖๕

MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) FOR
DETECTION OF H1, H3 AND H5 INFLUENZA A VIRUS IN HUMAN CLINICAL SPECIMENS

Miss Pitirat Boonsuk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University


Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492270

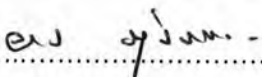
| | |
|----------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1 H3 และ H5 ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR |
| โดย | นางสาวปิตรีรัตน์ บุญสุข |
| สาขาวิชา | วิทยาศาสตร์การแพทย์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล |

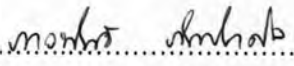
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์วินเล่า กุลวิฑิต)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.อลงกร อมรศิลป์)

ปิตรีรัตน์ บุญสุข : การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1 H3 และ H5 ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR (MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) FOR DETECTION OF H1, H3 AND H5 INFLUENZA A VIRUS IN HUMAN CLINICAL SPECIMENS) อ. ที่ปรึกษา : ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล, 68 หน้า

การระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่คุกคามชีวิตและทรัพย์สิน ซึ่งการตรวจที่สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อ Influenza A virus ได้รวดเร็ว มีผลต่อประสิทธิภาพในการรักษาและลดการแพร่กระจายเชื้อ เทคนิค Multiplex RT-PCR ที่สามารถตรวจหาเชื้อ Influenza A virus พร้อมทั้งแยกว่าเป็นสายพันธุ์ H1 H3 หรือ H5 ในเวลาเดียวกันจึงถูกพัฒนาขึ้น โดยการพัฒนา ระบบ Multiplex M GAPDH เพื่อคัดกรองว่ามีการติดเชื้อ Influenza ชนิดเอ พร้อมยืนยันว่าสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างได้ มีขนาด PCR product เท่ากับ 214 และ 107 bp ตามลำดับ มีความไวในการตรวจ 10^3 copies/ μ l และการพัฒนา ระบบ Multiplex H1 H3 และ H5 เพื่อแยกสายพันธุ์ มีขนาด PCR product เท่ากับ 362, 112 และ 191 bp ตามลำดับ มีความไวในการตรวจ 10^4 copies/ μ l และทำการทดสอบ Multiplex RT-PCR ด้วย RNA จาก Nasopharyngeal suction จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1(N=8), H3N2(N=11) cDNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากสัตว์(N=16) พบว่าสามารถแยกสายพันธุ์ได้ถูกต้อง และไม่มีการเพิ่มจำนวน cDNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์อื่น ได้แก่ สายพันธุ์ H2, H4 และ H6-H16 และ Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human parainfluenza viruses (HPIVs), Human metapneumovirus (hMPV) (ทุกชนิด n=1) ในขณะที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจได้ขนาดจำเพาะ ได้แก่ เชื้อ *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (ทุกชนิด n=1) รวมถึงไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่พบการติดเชื้อดังกล่าวข้างต้น(N=4)

สาขาวิชา..วิทยาศาสตร์การแพทย์...ลายมือชื่อนิสิต..... *ปิตรีรัตน์ บุญสุข*
 ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *ยง ภู่วรรณ*
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *ภาวพันธ์ ภัทรโกศล*

4874754630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: Influenza A virus / Multiplex RT-PCR H1 H3 H5

PITIRAT BOONSUK : MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) FOR DETECTION OF H1, H3 AND H5 INFLUENZA A VIRUS IN HUMAN CLINICAL SPECIMENS. THESIS ADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. PARVAPAN BHATTARAKOSOL, 68 pp.

Both human and avian influenza infections are the important health and economic lost. Subtyping diagnosis of influenza virus can help guide clinical management of patient with suspected avian influenza. The multiplex reverse transcription polymerase chain reaction was developed for simultaneous detection of type and subtyping H1 H3 and H5 of influenza A virus. The mRT-PCR M and GAPDH products consist of segment 214 and 107 bp and the sensitivity of mRT-PCR M and GAPDH is 10^3 copies/ μ l. The mRT-PCR H1, H3 and H5 for subtyping of human influenza subtypes that products consist of segment 362, 112 and 191 bp respectively and the sensitivity of mRT-PCR H1, H3 and H5 is 10^4 copies/ μ l. No specific amplification bands of same size (362, 112 and 191 bp) could be amplified for RNA of other influenza subtypes and for other respiratory viruses such as Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human parainfluenza viruses (HPIVs), Human metapneumovirus (hMPV) (each n=1), nor specific amplification bands of both mRT-PCR (214, 107, 362, 112 and 191 bp) for other bacteria in respiratory tracts such as *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (each n=1) or human that no have all above infections (N=4).

Field of studyMedical Science..... Student's signature..... Pitirat Boonsuk.....

Academic year.....2006..... Advisor's signature..... Yong Poovorawan.....

Co-advisor's signature..... Parvapan Bhattarakosol.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียบพร้อม รวมถึงความเอาใจใส่เป็นอย่างดี และกรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำในการทำการวิจัย และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งอย่างที่ไม่มีอาจารย์ท่านใดเสมอเหมือน

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้อย่างละเอียดถี่ถ้วน ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความรู้และความคิดในการเป็นนักวิทยาศาสตร์ที่ดีจนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาจัดเตรียมเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ เพื่อใช้ทดสอบระบบ Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้น

ขอขอบคุณดร. สัญชัย พยุงพร น.ส. สลิล ชูตินิมิตรกุล นายทวีศักดิ์ เชี่ยวชาญศิลป์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญพิเศษด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัว เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษานี้

สารบัญ

| | |
|--|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ๖ |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ๗ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ๘ |
| สารบัญ..... | ๙ |
| สารบัญตาราง..... | ๑๐ |
| สารบัญภาพ..... | ๑๑ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| - ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| - วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 3 |
| - ขอบเขตของการวิจัย..... | 3 |
| - ข้อจำกัดของการวิจัย..... | 3 |
| - คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..... | 3 |
| - ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 4 |
| - วิธีดำเนินการวิจัย..... | 4 |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 5 |
| - แนวคิดและทฤษฎี..... | 5 |
| - หลักการของ PCR..... | 6 |
| - หลักการของ Multiplex PCR..... | 7 |
| - เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 8 |
| - อนุกรมวิธานของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่..... | 8 |
| - การเพิ่มจำนวนของไวรัส..... | 9 |
| - การกลายพันธุ์..... | 10 |
| - การระบาด..... | 10 |
| - ลักษณะทางคลินิก..... | 11 |
| - การตรวจวินิจฉัยไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกทางห้องปฏิบัติการ..... | 12 |
| - การแยกและการพิสูจน์เชื้อไวรัส..... | 12 |
| - การตรวจหาแอนติเจน..... | 13 |
| - การตรวจหาจีโนมในส่วนน้ำจากผู้ป่วย..... | 14 |

| | |
|---|----|
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... | 15 |
| - รูปแบบการวิจัย..... | 15 |
| - ประชากรศึกษา..... | 15 |
| - การเก็บตัวอย่าง..... | 16 |
| - เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย..... | 16 |
| - สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... | 18 |
| - วิธีการดำเนินการวิจัย..... | 19 |
| Positive control..... | 19 |
| Negative control..... | 19 |
| Internal control..... | 20 |
| - การออกแบบไพรเมอร์..... | 20 |
| - แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัด RNA..... | 22 |
| - ขั้นตอนการทำ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)..... | 23 |
| - การทำ Reverse transcription..... | 23 |
| - การทำ Polymerase chain reaction (PCR)..... | 24 |
| - การทำ Positive control..... | 26 |
| - การทำโคลนนิ่ง และการเตรียมพลาสมิดเพื่อการทำ Positive control..... | 26 |
| - การทำ Ligation..... | 26 |
| - การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)..... | 28 |
| - การพัฒนาระบบ Multiplex PCR..... | 28 |
| - การทดสอบความไว Sensitivity..... | 29 |
| - การทดสอบความจำเพาะ Specificity..... | 30 |
| - การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)..... | 31 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง..... | 32 |
| - ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยวิธี in silico PCR..... | 32 |
| - ผลการทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ด้วย monoplex PCR..... | 32 |
| - ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ใช้เป็น positive control..... | 34 |
| - ผลการปรับคอนดิชัน multiplex PCR ด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด..... | 36 |

| | |
|---|----|
| - ผลการทดสอบความไว (Sensitivity)..... | 38 |
| - ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity)..... | 40 |
| - การทดสอบด้วยไวรัสในระบบหายใจ..... | 42 |
| - การทดสอบด้วยแบคทีเรียในระบบหายใจ..... | 43 |
| - ผลการทดสอบด้วย Nasopharyngeal suction จากผู้ป่วย..... | 44 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 1. แสดงขนาด PCR product ของไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ในการทำ multiplex PCR..... | 21 |
| 2. ปริมาณไพรเมอร์ และสารต่างๆที่ใช้ในการทำ reverse transcription..... | 24 |
| 3. ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน cDNA..... | 25 |
| 4. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR..... | 25 |
| 5. ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็น positive control..... | 26 |
| 6. สารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation..... | 27 |

สารบัญญภาพ

ฉ

| | |
|--|----|
| 1. รูปจำลองอนุภาคไวรัสใช้หัดใหญ่..... | 8 |
| 2. ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส..... | 9 |
| 3. ขั้นตอนการพัฒนา ระบบ multiplex PCR..... | 29 |
| 4. ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ MF5/MR276..... | 32 |
| 5. ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ GAPDHF85/ GAPDHR191..... | 33 |
| 6. ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ H1F266/H1R627, H3F3/H3R2, H5F3, H5R2++..... | 33 |
| 7. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน GAPDH ที่ แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ GAPDHF85..... | 34 |
| 8. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน M ที่แทรกในรี คอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ MF5..... | 34 |
| 9. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H1 ที่แทรกในรี คอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ H1F266..... | 35 |
| 10. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H3 ที่แทรกในรี คอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ H3F3..... | 35 |
| 11. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 ที่แทรกในรี คอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ H5F3..... | 36 |
| 12. ผลการเพิ่มจำนวนพลาสมิด โดยการทำให้ multiplex PCR M GAPDH..... | 37 |
| 13. ผลการเพิ่มจำนวนพลาสมิด โดยการทำให้ multiplex PCR H1 H3 H5..... | 37 |
| 14. ผลการทดสอบความไวของ multiplex M GAPDH โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน M GAPDH รวมกัน..... | 38 |
| 15. ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1..... | 39 |
| 16. ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H3..... | 39 |
| 17. ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H5..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 18. ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 H3 H5 รวมกัน..... | 40 |
| 19. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15..... | 41 |
| 20. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15..... | 41 |
| 21. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ cDNA/DNA จากเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ..... | 42 |
| 22. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ cDNA/DNA จากเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ..... | 42 |
| 23. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ..... | 43 |
| 24. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ..... | 44 |
| 25. ตัวอย่างการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้จากผู้ป่วยด้วย multiplex M GAPDH | 44 |
| 26. ตัวอย่างการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้จากผู้ป่วยด้วย multiplex H1 H3 H5..... | 45 |