บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมงและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการทำ agarose gel electrophoresis เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเจาะจง โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน และใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยาในเกือบทุกแห่ง และได้รับการปรับปรุงและพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อในผู้ป่วย โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมของเชื้อที่ต้องการจะตรวจหา ในขณะที่การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ Influenza A virus ในผู้ป่วยที่ต้องการแยกว่าเป็นสายพันธุ์ใด ต้องใช้ไพร์เมอร์หลายคู่ที่จำเพาะกับแต่ละสายพันธุ์ จึงมีการนำเทคนิค Multiplex PCR มาใช้ โดยการใส่ไพรเมอร์หลายคู่ใน PCR หลอดเดียวกัน เพื่อลดเวลาและค่าใช้จ่าย ให้มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้คัดกรองผู้ป่วย หากเกิดการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่หรือไข้หวัดนกครั้งต่อไป

การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการพัฒนาการตรวจหาเชื้อ influenza A virus โดยการใช้เทคนิค multiplex RT-PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ matrix gene (M) ที่มีความ conserve ต่อ influenza A virus ทุกสายพันธุ์ (subtype) พร้อมกับแยกว่าเป็นสายพันธุ์ H1 H3 H5 โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ Hemagglutinin ของไวรัส ร่วมกับการตรวจหายีน GAPDH ซึ่งเป็น housekeeping gene ในเวลาเดียวกัน เพื่อเป็นการตรวจสอบว่ามีสาร RNA และสามารถเก็บตัวอย่างได้ถูกต้อง ช่วยในการวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้องแม่นยำลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น

หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA poloymerase โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ และสารเคมีดังต่อไปนี้

- DNA Polymerase เช่น Taq polymerase
- PCR buffer
- dNTP ได้แก่ dATP dTTP dCTP dGTP
- Forward ไพรเมอร์
- Reverse ไพรเมอร์
- Distilled water
- ดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มจำนวน

การทำปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนทั้ง 3 ขั้นตอนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรก เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดี เอ็น เอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95° C

ขั้นที่สอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง ทำให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดี เอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 20-25 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเข้าจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 55-60° C ขึ้นอยู่กับแต่ละไพรเมอร์

ขั้นที่ 3 เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ ตามลำดับเบสบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75° C

หลักการของ Multiplex PCR

การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละยีนที่ต้องการ หลายๆ คู่ในการทำปฏิกิริยา PCR เดียวกัน โดยมีข้อจำกัด ดังนี้

1. ไพรเมอร์ที่ใช้ใน Multiplex PCR ระบบเดียวกัน ต้องไม่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์ตัวอื่นๆ โดยเฉพาะด้านปลาย 3' ซึ่งจะทำให้ไพรเมอร์จับกันเอง ทำให้ความไว (sensitivity) หรือความสามารถในการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบลดลง

2. ไพรเมอร์ทุกตัวควรมีอุณหภูมิสำหรับขั้น annealing ใกล้เคียงกัน

3. PCR product ของไพรเมอร์แต่ละคู่ต้องมีขนาดที่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เมื่อทำ agarose gel electrophoresis โดยควรมีขนาดต่างกันอย่างน้อย 50 bp หรือมากกว่า

แต่ในขณะเดียวกัน วิธีการตรวจโดยใช้ molecular technique ต่างๆ รวมทั้ง PCR คงไม่สามารถมาทดแทนวิธีการเพาะเชื้อแบบดั้งเดิมได้ทั้งหมด ซึ่งยังมีความจำเป็นในหลายๆ กรณี เช่น การนำเชื้อมาทดสอบความไวต่อยา ไม่ว่าจะเป็นยาที่ใช้ในปัจจุบัน หรือยาที่เพิ่งได้รับการพัฒนาใหม่ๆ การนำเชื้อมาใช้ในกรณีอื่นๆ เช่น การศึกษาสายพันธุ์ การค้นหากลไกการดื้อยาใหม่ๆ หรือการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรค เป็นต้น

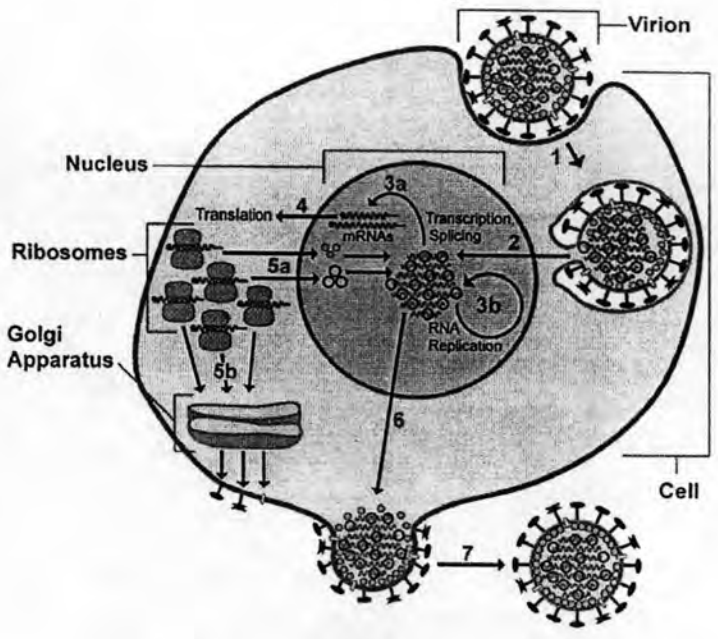
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

ภาพที่ 1 รูปจำลองอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ (15)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) จัดอยู่ใน family *Orthomyxoviridae* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80-120 nm เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้มเป็น lipid membrane ที่ได้จาก host cell สามารถแบ่งตามความแตกต่างของ nucleoprotein (NP) และ matrix protein (M1) ได้เป็น 3 ชนิด (type) คือ A B และ C โดยชนิด A เป็นสาเหตุในการก่อโรคในมนุษย์มากที่สุด สามารถแบ่งย่อย Influenza A virus เป็นสายพันธุ์ (subtype) ตามความแตกต่างของแอนติเจนบนผิวของไวรัสได้จาก Hemagglutinin 16 ชนิด (H1-H16) และ Nuraminidase 9 ชนิด (N1-N9) (1, 4, 5) Influenza A virus มีสารพันธุกรรมเป็น RNA segments สายลบ จำนวน 8 ยีน ได้แก่ PB2 PB1 PA HA NP NA M และ NS ซึ่งสร้างโปรตีน 11 ชนิด ได้แก่ polymerase proteins (PB2, PB1, PA, PB1-F2), nucleocapsid protein, hemagglutinin, neuraminidase, matrix proteins (M1, M2) และ nonstructural proteins (NS1, NS2) (5) Influenza A virus พบได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น มนุษย์ สุกร ม้า สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในทะเลและสัตว์ปีก จากการศึกษาทางพันธุกรรมโดยการศึกษา Phylogenetic พบว่า Influenza virus ในนกน้ำเป็นต้นกำเนิดของสายพันธุ์ที่พบในสัตว์ชนิดอื่น ซึ่ง Influenza A virus ไม่ก่อโรคในนกเป็ดน้ำป่า แสดงให้เห็นถึงการวิวัฒนาการอยู่ร่วมกันอย่างเหมาะสมของการเป็น natural reservoir โดยสามารถพบทั้ง HA 16 subtype และ NA 9 subtype ได้ในประชากรนกน้ำ โดยเฉพาะเป็ด นกทะเล และนกนางนวล (1)

การเพิ่มจำนวนของไวรัส



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส (16)

Influenza virus ใช้ส่วน hemagglutinin เกาะติดกับตัวรับซึ่งเป็น sialic acid residue บนผิวเซลล์ (หมายเลข1) แล้วเข้าสู่เซลล์โดยวิธีที่เรียกว่า receptor mediated endocytosis เข้าไปอยู่ใน endosome เมื่อ endosome หลอมเชื่อมกับ lysosome จะทำให้ pH ภายใน endosome กลายเป็น acid pH และ M2 channel ของอนุภาคไวรัส ก็จะทำให้ภายในอนุภาคกลายเป็น acid pH ด้วย acid pH จะเปลี่ยน conformation ของ hemagglutinin molecule ทำให้ HA2 เกิด fusion activity หลอมเชื่อม envelope ของไวรัสเข้ากับ endosomal membrane (หมายเลข 2) จากนั้น nucleocapsid ซึ่งมีเอนไซม์ polymerase อยู่ภายในก็จะถูกปล่อยเข้าไปใน cytoplasm Nucleocapsid ของไวรัสจะเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสทาง nuclear pore และ RNA genome จะทำหน้าที่เป็น template ให้เอนไซม์ polymerase (transcriptase) ของไวรัสใช้ในการสร้าง mRNA (หมายเลข 3) เหตุผลที่ influenza virus ต้องเพิ่มจำนวนในนิวเคลียส เนื่องมาจากการสังเคราะห์ Viral mRNA ต้องการ RNA ไพรเมอร์ เป็นตัวตั้งต้น และ RNA ไพรเมอร์นี้ได้มาจาก cellular capped RNA ซึ่งอยู่ในนิวเคลียส Viral mRNA ที่ถูกสร้างเสร็จแล้วจะออกจากนิวเคลียสเข้าสู่ cytoplasm เพื่อ translate เป็นโปรตีน (หมายเลข 4) แล้วส่งกลับเข้ามาที่นิวเคลียสอีก (หมายเลข 5a) แต่โปรตีนที่อยู่บนผิวของอนุภาคไวรัส ได้แก่ hemagglutinin, neuraminidase และ matrix proteins (M2) จะถูกส่งไปที่ golgi network เพื่อไปฝังตัวอยู่บนเซลล์เมมเบรน (หมายเลข 5b) ในขณะเดียวกัน parental (-) RNA genome จะถูกใช้เป็น template ใน

การสร้าง (+) RNA antigenome ซึ่งมีความยาวสมบูรณ์โดยใช้เอนไซม์ polymerase ของไวรัสด้วย จากนั้น (+) RNA จะเป็น template ในการสร้าง progeny viral RNA (หมายเลข 3b) ต่อไป การ assembly เป็น nucleocapsid เกิดขึ้นในนิวเคลียส และจะออกจากนิวเคลียส (หมายเลข 6) เพื่อ budding เอา envelope จาก plasma membrane เกิดเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ (หมายเลข 7) (16)

การกลายพันธุ์

จากการที่ Influenza A virus มีสารพันธุกรรมเป็น RNA 8 ท่อน ส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก ซึ่งอาจส่งผลให้ไวรัสมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นหรือลดลง ขึ้นอยู่กับว่าความหลากหลายที่เกิดขึ้นมีความเหมาะสม (fitness) กับ host หรือไม่ (20) ด้วยสาเหตุสองประการ ได้แก่ ไวรัสใช้เอนไซม์ RNA polymerase ในการเพิ่มสารพันธุกรรมเพื่อเพิ่มจำนวนและขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีคุณสมบัติ proof-reading ทำให้การต่อสาย RNA มีความผิดพลาดได้สูง เกิดเป็น point mutation เรียกกระบวนการนี้ว่า genetic drift และเนื่องด้วยไวรัสมียีนเป็นชิ้นส่วน หากเกิดการติดเชื้อมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ใน host เดียวกัน (co-infection) เมื่อไวรัสเพิ่มจำนวนอาจทำให้เกิดไวรัสลูกผสมที่ได้ยีน Hemagglutinin และ Nuraminidase แบบคละกัน (reassortment) จากไวรัสสองสายพันธุ์ รวมอยู่ในไวรัสลูกหลาน เกิดเป็นสายพันธุ์ใหม่ กระบวนการนี้ว่า genetic shift หากไวรัสลูกผสมเกิดการติดเชื้อในประชากรมนุษย์ที่ไม่มี immunity อาจนำไปสู่การระบาดใหญ่ระดับโลกได้ (5)

การระบาด

การระบาดใหญ่ที่เคยเกิดขึ้นในอดีตมีสาเหตุเกิดจาก Influenza A virus ทั้งสิ้น ได้แก่ มีการระบาดใหญ่ทั่วโลกถึง 3 ครั้ง ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2461 (ค.ศ. 1918) มีการระบาดของ Spanish influenza (H1N1) โดยมีผู้เสียชีวิตประมาณ 40 ล้านคน และครั้งที่สองในปี พ.ศ. 2500 (ค.ศ.1957) เรียกว่า Asian influenza (H2N2) และครั้งที่สามปี พ.ศ. 2511 (ค.ศ.1968) เรียกว่า Hong Kong influenza (H3N2) (1, 2) อย่างไรก็ดี อาจเป็นไปได้ว่าการระบาดใหญ่ทั่วโลกอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนกแล้วสามารถติดต่อสู่มนุษย์โดยไม่มีการเกิด genetic reassortment อย่างที่พบใน H5N1 ก็เป็นได้หากมีการสัมผัสเชื้อปริมาณมาก (1) จากการระบาดของไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากสัตว์ปีกมาสู่คนโดยตรงครั้งแรกในปี พ.ศ. 2540 ที่ประเทศฮ่องกงพบว่า H5N1 ยังคงมี receptor binding site จำเพาะกับ receptor ของสัตว์ปีก เช่นเดียวกับไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากสัตว์ปีกในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2546-2547 (1, 16) ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อไข้หวัดในสัตว์ปีกนั้นจะชอบจับกับ receptor ชนิด sialic acid (SA)–α-2, -3Gal–

terminated saccharide ที่พบในระบบทางเดินอาหารในสัตว์ปีก ซึ่งแตกต่างจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่พบโดยทั่วไปในมนุษย์ที่จะเข้าจับกับ receptor ชนิดที่เป็น sialic acid (SA)–α-2, -6Gal–terminated saccharide ซึ่งพบบนเซลล์ที่มี cilia ในส่วนบนของระบบทางเดินหายใจของมนุษย์ ในขณะที่พบ receptor ชนิด sialic acid (SA)–α-2, -3Gal–terminated saccharide บนเซลล์ที่ไม่มี cilia โดยพบมากที่ alveolar cells (pneumocyte type 2) ในส่วนล่างของระบบทางเดินหายใจของมนุษย์ (18, 19) ซึ่งเป็นเหตุผลว่าทำไมไข้หวัดนกติดต่อจากสัตว์ปีกมาสู่คนได้ยากกว่าไข้หวัดใหญ่คน และยังพบการแพร่กระจายของไข้หวัดนกจากคนไปสู่คนได้น้อยในขณะนี้ เนื่องจากไวรัสเพิ่มจำนวนอยู่ในส่วนล่างของระบบทางเดินหายใจ ที่ทำให้การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสโดยการจามหรือไอจากคนสู่คนมีโอกาสเกิดขึ้นยากกว่าการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่พบโดยทั่วไปในมนุษย์ (20)

ลักษณะทางคลินิค

ไข้หวัดใหญ่

ลักษณะอาการของคลินิกของไข้หวัดใหญ่ในผู้ที่ไม่มีภาวะแทรกซ้อน มักไม่ค่อยรุนแรงโดยมีระยะฟักตัวประมาณ 1-2 วัน ผู้ป่วยมักมีไข้ ซึ่งอาจสูงได้มากๆ ถึงมากกว่า 40 องศาเซลเซียส บางรายอาจหนาวสั่น มีอ่อนเพลีย ปวดเมื่อย ปวดกล้ามเนื้อ มักปวดกล้ามเนื้อบริเวณน่อง ปวดศีรษะ และเบื่ออาหาร เป็นอาการเด่น ซึ่งมักสัมพันธ์กับอาการไข้ในเด็ก นอกจากนี้อาจมีอาการปวดกระบอกตา ตาแดงได้

อาการทางเดินระบบหายใจมักมีพร้อมๆ กับอาการไข้ และปวดเมื่อยดังข้างต้น ประกอบด้วย อาการไอแห้งๆ เจ็บหน้าอกเวลาไอ เจ็บคอ คอแห้ง คัดจมูก น้ำมูกไหล บางครั้งอาจมีอาการเสียงแหบตามมา ผู้ป่วยบางรายโดยเฉพาะผู้สูงอายุ อาจมีอาการไข้ปวดเมื่อย อ่อนเพลีย โดยไม่มีอาการระบบทางเดินหายใจเลยก็ได้ นับว่าโรคไข้หวัดใหญ่เป็นโรคของระบบทางเดินหายใจ ที่มีอาการไข้ และอ่อนเพลีย ปวดเมื่อยมากกว่าโรคระบบทางเดินหายใจจากเชื้ออื่นๆ (21, 22)

ไข้หวัดนก

ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 มีความคล้ายกับไข้หวัดใหญ่ แต่รุนแรงกว่า ไข้หวัดนก H5N1 ที่มีรายงานในเด็กอายุน้อยสุดคือ 1 ปี และอายุมากสุดคือ 60 ปี ส่วนใหญ่มีประวัติสัมผัสกับสัตว์ปีกที่ป่วยหรือตาย มีระยะฟักตัวประมาณ 2-5 วัน แต่อาจนานได้ถึง 8-17 วัน อาการส่วนใหญ่มาด้วยไข้สูงกว่า 38 องศาเซลเซียส และมีอาการเหมือนไข้หวัดใหญ่ทั่วไปคือ ปวดเมื่อย อ่อนเพลีย ร่วมกับระบบทางเดินหายใจ ซึ่งส่วนใหญ่มักมี ไอ และหอบ ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการระบบทางเดินอาหารค่อนข้างมาก ซึ่งได้แก่ปวดท้อง ท้องเดิน

คลื่นไส้ อาเจียน และอาจนำมาก่อนอาการของระบบทางเดินหายใจจนทำให้แพทย์ไม่คิดถึงโรคนี้ในเบื้องต้น โดยส่วนใหญ่มักไม่มีตาแดง และเคยมีรายงานผู้ป่วยที่มีอาการทางสมองร่วมกับท้องเดิน เป็นแบบ encephalitis นำมาโดยไม่มีอาการระบบทางเดินหายใจในเบื้องต้นเลย (5, 21, 22)

อาการของระบบทางเดินหายใจโดยทั่วไปมักพบตั้งแต่เริ่มต้น บางรายอาจมีอาการเจ็บคอ มีน้ำมูกไหล แต่โดยส่วนใหญ่จะมีอาการไอ และเริ่มหอบภายในเวลาประมาณ 5 วัน โดยอาการหอบ หายใจลำบากในระยะแรก จะเหมือนกับผู้ป่วยปอดอักเสบทั่วไปจากนั้นการดำเนินโรคจะรวดเร็ว ผู้ป่วยจะหอบมากจนต้องอาศัยออกซิเจน ลักษณะภาพรังสีปอด มักเริ่มเห็นความผิดปกติภายใน 7 วัน อาจเริ่มเป็น focal หรือ multifocal infiltration หรือ consolidation ก็ได้ จากนั้นจะลุกลามอย่างรวดเร็วไปยังปอดทั้งสองข้างจนหนาทึบ (ground-glass) กลายเป็น Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) จากรายงานของไทย พบว่า ARDS เกิดภายในเวลา 4-13 วัน (21, 22)

ถึงแม้ว่าการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์ส่วนใหญ่จะก่อโรคไม่รุนแรงและหายได้เองภายใน 1-2 สัปดาห์ แต่ก็พบว่าไข้หวัดใหญ่และเชื้อไข้หวัดนกติดเชื้อได้ทั้งทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง และอาจทำให้เสียชีวิตได้ ซึ่งการวินิจฉัยการติดเชื้อ influenza A virus เป็นเรื่องที่ทำได้ยาก เนื่องจากมีเชื้อที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจหลายชนิด และมีอาการของโรคคล้ายการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ (influenza-like illness) เช่น respiratory syncytial virus(RSV) Human parainfluenza viruses(HPIVs) Human metapneumovirus (hMPV) Adenovirus และ Human bocavirus (HBoV) รวมถึงการใช้ยารักษา influenza A virus ที่เป็น nuraminidase inhibitor 2 ชนิด ได้แก่ oseltamivir และ zanamivir โดยควรให้ยาทันทีภายหลังการติดเชื้อ 48 ชั่วโมงเพื่อประสิทธิภาพในการรักษาสูงที่สุด ดังนั้น การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคที่มีความถูกต้องและรวดเร็ว จึงมีประโยชน์ต่อการดูแลรักษาผู้ป่วย (11, 12, 13, 14)

การตรวจวินิจฉัยไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกทางห้องปฏิบัติการ

การแยกและการพิสูจน์เชื้อไวรัส

แยกเชื้อไวรัสด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง ถือว่าเป็นวิธี gold standard หรือใช้เทคนิคของ shell vial ช่วย ช่วยให้ได้ผลการทดสอบภายใน 2-10 วัน เซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไข้หวัดนกนิยมใช้ MDCK (Madin Darby Canine Kidney) สามารถตรวจดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัส แต่เชื้อไข้หวัดใหญ่อาจไม่แสดง CPE

ชัดเจน จึงใช้การตรวจหา hemagglutinin ที่เชื้อสร้างไว้บนผิวเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี hemadsorption กับเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภา หรือพิสูจน์ดูการติดเชื้อด้วยสารเรืองแสงซึ่งให้ความไวและแม่นยำกว่า หลังจากนั้นตรวจสอบไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์โดยการทดสอบหา hemagglutinin ของเชื้อด้วยเม็ดเลือดแดงของสัตว์ปีก หรือตรวจกรองแอนติเจนในน้ำเพาะเลี้ยงแยกเชื้อ วิธีที่ได้กล่าวมาแล้วบอกได้แต่เพียงว่ามีไวรัสไข้หวัดใหญ่ ต้องทำการยืนยันทดสอบต่อไปด้วยการตรวจทาง genome ของเชื้อจึงจะสรุปได้ว่าติดเชื้อไข้หวัดนก การแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่ยังสามารถใช้ไข่ไก่ฟักแทนการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง โดยขั้นตอนแรกจะฉีดเข้าช่องทาง amniotic cavity ก่อนเพื่อให้เชื้อไข้หวัดใหญ่ปรับตัวก่อน หลังจากนั้นจึงฉีดเข้า allantonic cavity เพื่อเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น อบไว้ที่อุณหภูมิ 33-35 องศาเซลเซียส ซึ่งถ้าหากเป็นเชื้อไข้หวัดนกต้องปฏิบัติงานในห้องชีวนิรภัยระดับ 3 หรือห้องที่จัดเตรียมขึ้นเป็นพิเศษเท่านั้น เนื่องจากมีความรุนแรงสูง และที่สำคัญตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากมนุษย์ไม่ควรทดสอบร่วมกับตัวอย่างจากสัตว์ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน

การตรวจหาแอนติเจน

ตรวจหาแอนติเจนในเซลล์ติดเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจโดยตรงด้วยวิธีย้อมด้วยสารเรืองแสง (immunofluorescence) ทราบผลภายใน 2-3 ชั่วโมง ยังไม่สามารถบ่งบอกถึงการติดเชื้อไข้หวัดนกได้ในขณะนี้ วิธีนี้สามารถทดสอบหาเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจในตัวอย่างด้วยแอนติบอดีจำเพาะหลายๆชนิด พร้อมๆกัน เพื่อค้นหาเชื้อไวรัสต้นเหตุที่ก่อโรคระบบทางเดินหายใจในการทดสอบขั้นต้นได้ผลทันที

การตรวจหาแอนติเจนในส่วนน้ำด้วยวิธี Rapid test ซึ่งห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถทำได้ เทคนิคในการทดสอบง่ายและสะดวก ให้ผลได้ทันทีภายใน 30 นาที การทราบผลในเวลารวดเร็ว ให้ประโยชน์ในแง่ระบาดวิทยา การค้นหาการติดเชื้อในสัตว์ หรือทดสอบข้างเตียงผู้ป่วยโดยบุคลากรทางการแพทย์ อาจจำเป็นต้องทราบทันที เพื่อประโยชน์ในการติดตามเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่/ไข้หวัดนกในขณะที่มีการระบาดอยู่ วิธี Rapid test ช่วยในการวินิจฉัยเบื้องต้นได้เป็นอย่างดี หรือใช้สำหรับคัดกรองผู้ป่วย แต่ไม่สามารถใช้ยืนยันการติดเชื้อได้เนื่องจากมีความไวค่อนข้างต่ำ หากตรวจได้ผลลบต้องทำการตรวจยืนยันผลด้วยวิธีอื่นอีกครั้งหนึ่ง

การตรวจหาจีโนมในส่วนน้ำจากผู้ป่วย

การตรวจหา genome ในส่วนน้ำจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจและเซลล์ติดเชื้อ โดยการเพิ่มขยายยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ใช้ไพรเมอร์จำเพาะทั้งไข้หวัดใหญ่ของคน (H1N1 และ H3N2) และไข้หวัดนก (H5N1) ในปัจจุบันได้มีการใช้วิธี real time PCR ซึ่งเพิ่มขยายยีนพร้อมๆกับการใช้ตัวบ่งชี้เพื่อตรวจสอบในเวลาเดียวกัน ทำให้ได้ผลการทดสอบเร็วขึ้นภายใน 2-3 ชั่วโมง โดยวิธีนี้สามารถแยก subtype และทำจัดกลุ่มโดย phylogenic tree ได้หากนำไปถอดรหัสพันธุกรรม โดยมีรายงานการใช้เทคนิค hemi-nasted PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอและบี (23) การแยกสายพันธุ์เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ หลายสายพันธุ์โดยการใช้ไพรเมอร์เพียงคู่เดียว แต่ต้องร่วมกับการถอดรหัสพันธุกรรม (24, 25)

เทคนิค multiplex RT-PCR ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ influenza A virus อย่างแพร่หลายมากขึ้น มีรายงานการใช้เทคนิค Multiplex RT-PCR เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจหลายชนิด พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (26-28) และใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดนก โดยการตรวจหายีน M H5 และ N1 ในการทำ PCR หลอดเดียวกัน (10) และแยกสายพันธุ์เชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5 H7 H9 ในเวลาเดียวกัน (29, 30) และใช้ในการแยกสายพันธุ์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ H1N1 H3N2 และไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี (31) และใช้ในการแยกสายพันธุ์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ H1N1 H3N2 และ H5N1 (32) และพัฒนาเพื่อใช้เฝ้าระวังการเกิดการแลกชิ้นส่วนยีนของไวรัสไข้หวัดนกทั้ง 8 ยีน (33) ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนาการตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR assays (34) ที่ใช้เวลาน้อยกว่า แต่ต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีราคาแพงกว่า RT-PCR ธรรมดา ในขณะที่เครื่อง conventional PCR และสารเคมีสำหรับ RT-PCR มีราคาถูกกว่าและมีใช้ในห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยาทั่วไป จึงมีประโยชน์ในการตรวจหาเชื้อในขณะที่มีการระบาดและต้องการคัดกรองผู้ป่วยเป็นจำนวนมากในพื้นที่ที่ไม่มีเครื่อง Real-time PCR