บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไข้หวัดใหญ่เป็นโรคในระบบทางเดินหายใจที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของทั่วโลก เป็นโรคที่ติดต่อกันได้ง่าย และแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ในช่วงศตวรรษที่ผ่านมา 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) การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์มีอาการแสดงของโรคที่กว้าง ตั้งแต่ไม่แสดงอาการ มีอาการของไข้ ไอเจ็บคอที่สามารถหายได้เอง ไปจนถึงมีอาการปอดบวมและถึงแก่ชีวิต (3)

โรคไข้หวัดใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อ Influenza virus ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชนิด (type) คือ A B และ C โดยชนิด A เป็นชนิดสำคัญที่ก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ปีก สามารถแบ่ง Influenza ชนิด A เป็นสายพันธุ์ (subtype) ตามความแตกต่างของแอนติเจนบนผิวของไวรัส Hemagglutinin 16 สายพันธุ์ (H1-H16) และ Nuraminidase 9 สายพันธุ์ (N1-N9) โดยทุกสายพันธุ์สามารถพบได้ในสัตว์ปีก (1, 4) พบว่าเชื้อ Influenza A virus ที่ก่อโรคไข้หวัดใหญ่ในคนปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 จนกระทั่งใน พ.ศ. 2540 มีรายงานการติดต่อของเชื้อ Influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 จากสัตว์ปีกมาสู่คนโดยตรงเป็นครั้งแรกที่ประเทศฮ่องกง หลังจากมีการระบาดในสัตว์ปีกมาก่อน ทำให้มีผู้เสียชีวิตถึง 6 คน จากผู้ติดเชื้อทั้งสิ้น 18 คน หลังจากมีการฆ่าไก่ในฟาร์มเป็นจำนวนมากการระบาดก็ได้หยุดลง จากนั้นก็มีการกลับมาระบาดในสัตว์ปีกอีกในปี พ.ศ. 2544 และใน พ.ศ. 2545 แต่ไม่พบติดเชื้อในมนุษย์ จนกระทั่งใน พ.ศ. 2546 มีรายงานการติดเชื้อในมนุษย์อีกครั้งในฮ่องกง (3, 5) และในหลายประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ เวียดนาม ไทย กัมพูชา อินโดนีเซีย และจีน (5, 6) รวมทั้งเชื้อดังกล่าวได้ระบาดเข้าสู่ประเทศทางยุโรป เอเชียตะวันออกกลาง และแอฟริกา และยังคงมีการรายงานการระบาดของเชื้อ H5N1 อย่างต่อเนื่อง ปัจจุบัน มีผู้ป่วยในคนทั้งสิ้น 291 ราย เสียชีวิต 172 ราย (7: **รายงานขององค์การอนามัยโลก วันที่ 11 เมษายน 2550)** และมีรายงานการติดเชื้อไข้หวัดนกจากสัตว์ปีกสายพันธุ์ H7N7 H7N3 และ H9N2 มาสู่คน แต่ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่อาการไม่รุนแรง (3, 5)

การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในประเทศไทย มีรายงานการศึกษาของ James Mark Simmerman (8) ในปี พ.ศ. 2549 พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ influenza A virus ในผู้ป่วยที่มีอาการปอดบวมของโรงพยาบาล ได้ร้อยละ 11 และพบเชื้อ ในผู้ป่วยนอกที่มาพบแพทย์ด้วยอาการ

คล้ายการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ (influenza-like illness) ได้ร้อยละ 23 และล่าสุดเมื่อต้นปี พ.ศ. 2550 มีรายงานการระบาดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H3 จนทำให้มีผู้เสียชีวิตจำนวน 2 คน ในจังหวัดหนองคายและประจวบคีรีขันธ์ (9) ส่วนการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในประเทศไทยนั้น มีการระบาดในสัตว์ปีกเป็นครั้งแรกเมื่อต้นปี พ.ศ. 2547 ส่งผลให้มีความเสียหายต่อเศรษฐกิจการเลี้ยงสัตว์ปีกจำนวนมาก มีผู้เสียชีวิตสูงถึง 8 คนจากจำนวนผู้ติดเชื้อทั้งหมด 12 คนจากการระบาดรอบแรก (10) และมีการกลับมาระบาดซ้ำอีก 3 รอบคือในปลายปี พ.ศ. 2547 ปลายปี พ.ศ.2548 และระบาดอีกครั้งปลายปี พ.ศ. 2549 รวมถึงปัจจุบันในประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตทั้งสิ้น 17 ราย จากผู้ติดเชื้อทั้งสิ้น 25 ราย (7: **รายงานขององค์การอนามัยโลก ถึงวันที่ 11 เมษายน 2550**)

ปัญหาในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยจากการติดเชื้อ influenza A virus คือการวินิจฉัยทางคลินิคเพียงอย่างเดียวนั้น มีความผิดพลาดได้สูง เนื่องจากเป็นการยากที่จะทำการแบ่งแยกผู้ป่วยจากการติดเชื้อ influenza A virus ออกจากการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นหรือแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในระบบทางเดินหายใจ ที่มีอาการคล้ายการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ (influenza-like illness) ได้ ซึ่งการตรวจวินิจฉัยไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกต้องมีความถูกต้อง มีคุณภาพ และลดระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจให้มากที่สุด เพื่อการจัดการดูแลผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ (11, 12, 13, 14) การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงเป็นสิ่งจำเป็นโดยเฉพาะในขณะที่มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดนก ที่นอกจากจะต้องวินิจฉัยแยกผู้ป่วยที่ติดเชื้อ influenza A virus แล้ว ยังต้องสามารถระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์ใด เพื่อแยกผู้ป่วยติดเชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 ออกจากผู้ป่วยติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 เพื่อการดูแลรักษาได้อย่างถูกต้องรวดเร็ว ซึ่งการวินิจฉัยผู้ป่วยติดเชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 ทางคลินิคนั้นต้องอาศัยการสอบประวัติว่าผู้ป่วยอาศัยอยู่ในพื้นที่เสี่ยงต่อเชื้อไข้หวัดนก มีประวัติสัมผัสสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ หรือประวัติการเดินทางไปพื้นที่การระบาดร่วมกับการตรวจหาเชื้อและการเอกซ์เรย์ปอด

ปัจจุบันวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อ influenza A virus ทางห้องปฏิบัติการได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อ (viral culture; MDCK cells) และการตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี Immunofluorescence assay (IFA) อย่างไรก็ดี ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อมีความไวสูง แต่ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญและใช้เวลานานเป็นสัปดาห์ ในขณะที่ Immunofluorescence assay ใช้เวลาในการตรวจหาเชื้อน้อยเพียงไม่กี่ชั่วโมงแต่มีความไวต่ำกว่าวิธีแรกมาก ดังนั้น การพัฒนาการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูงและใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่าวิธีมาตรฐาน และเริ่มใช้กันอย่าง

กว้างขวาง จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ถูกพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ influenza A virus และแยกสายพันธุ์ของเชื้อในผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อไข้หวัดนก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

พัฒนาการตรวจหาเชื้อ influenza A virus โดยใช้เทคนิค multiplex RT-PCR ที่สามารถระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์ H1 H3 หรือ H5 ไปพร้อมกับการตรวจหายีน GAPDH ของคนเพื่อใช้เป็น internal control ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจหาหลายยีนพร้อมๆกัน โดยแบ่งเป็น 2 ระบบ ได้แก่ multiplex M GAPDH และ multiplex H1 H3 H5

ขอบเขตของการวิจัย

ออกแบบชุดไพรเมอร์ สำหรับ multiplex RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน M H1 H3 H5 ของเชื้อ influenza A virus ที่ติดเชื้อในมนุษย์ และยีน GAPDH ของคน โดยแบ่งเป็น 2 ระบบ ได้แก่ multiplex M GAPDH เพื่อทำการคัดกรองว่ามีการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอหรือไม่ หากพบว่าติดเชื้อจึงทำการแยกว่าเป็นสายพันธุ์ใดด้วยการทำ multiplex H1 H3 H5 ต่อไป

ข้อจำกัดของการวิจัย

อาจพบผู้ป่วยติดเชื้อ influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 ในประเทศไทยได้น้อย แก้ปัญหาโดยการใช้เชื้อไข้หวัดนกที่สกัดได้จากสัตว์ เช่น เป็ด ไก่ เนื่องจากไวรัสสายพันธุ์ H5N1 ในคนและสัตว์มีรหัสพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Monoplex PCR คือ การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่ต้องการตรวจ 1 เป้าหมาย โดยการใช้ ไพรเมอร์ 1 คู่ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการในการทำปฏิกิริยา PCR 1 ครั้ง

Multiplex PCR คือ การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่ต้องการตรวจหลายๆ เป้าหมายโดยการใช้ไพรเมอร์ ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการมากกว่า 1 คู่พร้อมกันในการทำปฏิกิริยา PCR เดียวกัน

Specificity test คือ การทดสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ ที่ออกแบบเพื่อใช้ในระบบ multiplex RT-PCR ว่าสามารถเพิ่มจำนวน cDNA ได้ถูกต้อง ไม่เกิดการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ไม่จำเพาะกับไพรเมอร์

Sensitivity test คือ การทดสอบความไวของระบบ multiplex RT-PCR ว่าปริมาณ cDNA ที่น้อยที่สุดที่ระบบ multiplex RT-PCR สามารถตรวจพบได้เป็นเท่าไร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุของโรคที่มีความถูกต้องและรวดเร็ว โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือจำเพาะที่มีราคาแพง ช่วยให้รักษาผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็ว หลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่จำเป็น และเพื่อลดโอกาสการแพร่เชื้อไปสู่กลุ่มเสี่ยง ลดแพร่กระจายของเชื้อเป็นวงกว้าง รวมถึงสามารถใช้เพื่อเฝ้าระวังการเกิดการระบาดใหญ่ที่อาจเกิดขึ้นต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการ Multiplex RT-PCR ที่จำเพาะกับยีน M H1 H3 H5 ของ influenza A virus และยีน GAPDH ของคน

↓

ทดสอบประสิทธิภาพ หาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยการทำ Monoplex- PCR

↓

ทำ positive control โดยการโคลนนิ่งชิ้นส่วนของยีน M GAPDH H1 H3 H5 เพื่อใช้ในการพัฒนาระบบ Multiplex RT-PCR

↓

นำไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ผ่านการทดสอบมาทำ PCR ร่วมกัน ปรับอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมของการทำ Multiplex RT-PCR โดยใช้ template เป็นพลาสมิด

↓

ทดสอบ Specificity และ Sensitivity ของระบบ Multiplex RT-PCR

↓

เก็บตัวอย่าง Nasopharyngeal suction ที่เหลือจากผู้ป่วยที่เข้ารับบริการตรวจวินิจฉัยไวรัสในระบบทางเดินหายใจ จากภาควิชาจุลชีววิทยาและพบว่าติดเชื้อ influenza A virus สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 เพื่อใช้ทดสอบระบบ Multiplex RT-PCR

↓

ทำการสกัด RNA ของเชื้อ influenza A virus จาก nasopharyngeal suction ของผู้ป่วยและนำมาทดสอบความถูกต้องแม่นยำของระบบ Multiplex RT-PCR ต่อไป