

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) โดยอาศัยหลักการของ Multiplex RT-PCR และ Multiplex Real-time RT-PCR ในการตรวจสอบที่ให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ และมีความจำเพาะสูง และให้ผลการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ โดยแบ่งออกเป็น ระบบที่ 1: การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) ที่พบการติดเชื้อในคนหรือสุกร ระบบที่ 2 เป็นการตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (H1N1 & H3N2) และเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ที่พบการติดเชื้อในคน ระบบที่ 3 เป็นการตรวจวินิจฉัยติดตามการดื้อยา Oseltamivir ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) และเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (H1N1) ที่ระบาดตามฤดูกาล จากผลการทดสอบพบว่าทั้ง Multiplex RT-PCR และ Multiplex real-time RT-PCR ทั้ง 2 เทคนิค มีความจำเพาะต่อการตรวจค่อนข้างสูง เนื่องจากให้ผลลบต่อเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ

สำหรับเทคนิค Multiplex RT-PCR มีค่าความไว (Sensitivity) ในการตรวจประมาณ 10^2 copies/ μ L มีค่าความถูกต้องแม่นยำ (Accuracy) เท่ากับ 95% และใช้เวลาในการตรวจประมาณ 4-6 ชั่วโมง ส่วนเทคนิค Multiplex real-time RT-PCR มีค่าความไว (Sensitivity) ในการตรวจประมาณ 10^1 copies/ μ L มีค่าความถูกต้องแม่นยำ (Accuracy) เท่ากับ 99% และใช้เวลาในการตรวจประมาณ 2-3 ชั่วโมง ดังนั้นเทคนิค Multiplex real-time RT-PCR จึงมีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยสูงกว่า แต่ต้นทุนในการตรวจสูงกว่าเทคนิค Multiplex RT-PCR ดังนั้นจึงขึ้นกับวิจารณ์ของผู้นำไปใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยและป้องกันการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

The objective of this project was focused on the development of molecular diagnosis for emerging influenza A virus 2009 (H1N1) based on the multiplex RT-PCR and multiplex Real-time RT-PCR technique for rapid, accurate, high specific and efficient detection. The assays can be divided into 3 systems. The system 1 aimed at the diagnosis of the human pandemic flu (H1N1) in human and swine. The system 2 focused on subtyping of the influenza A viruses [human pandemic flu (H1N1), seasonal flu (H1N1 & H3N2) and avian flu (H5N1) in human]. The system 3 was developed for the detection of oseltamivir resistant strains of human pandemic flu 2009 (H1N1) and human seasonal flu (H1N1). The results revealed that both multiplex RT-PCR and multiplex real-time RT-PCR provided high specificity against the target genes due to no cross amplification with other respiratory viruses.

The multiplex RT-PCR provided approximately 10^2 copies/ μ L for the sensitivity, 95% accuracy and 4-6 hours required for the detection; whereas multiplex real-time RT-PCR provided approximately 10 copies/ μ L for the sensitivity, 99% accuracy and 2-3 hours required for the detection. In conclusion, the multiplex real-time RT-PCR provided higher detection efficiency but more expensive than the multiplex RT-PCR assay. Therefore, application of each technique should depend on the objective of the user for efficient diagnosis of the human influenza A viruses.