213733

ในปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกชนิด H5N1 จำเป็นต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญ ห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพสูง และ/หรือเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่มีราคาแพง จึงเป็นอุปสรรคสำคัญในการพัฒนาศักยภาพในการเฝ้าระวังโรคของประเทศ ที่ผ่านมามีเคยรายงานการนำเทคนิค PCR-ELISA มาประยุกต์ใช้ เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวก และรวดเร็ว โดยมีข้อมูลที่แสดงให้เห็นได้ว่าเทคนิค PCR-ELISA มีความไวในการตรวจวินิจฉัยไม่ด้อยกว่าวิธีแยกเชื้อไวรัส อีกทั้งวิธีดังกล่าวยังมีความได้เปรียบในแง่ความต้องการใช้เพียงอุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ทั่วไปและสามารถทราบผลได้ภายใน 1 วัน

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบเพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากสิ่งส่งตรวจ โดยใช้วิธีที่มีหลักการพื้นฐานมาจากเทคนิค multiplex PCR (mPCR)-ELISA ซึ่งอาศัยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน hemagglutinin (H5), neuraminidase (N1) และ matrix (M) ของเชื้อไข้หวัดนกในคราวเดียวกันโดยวิธี mPCR และตรวจหาผลผลิตจากปฏิกิริยาดังกล่าวโดยวิธี hybridization-ELISA ผลจากโครงการวิจัยที่มีระยะเวลาดำเนินงานรวมทั้งสิ้น 2 ปีนี้ คณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาชุดตรวจสอบเพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดนกชนิด H5N1 จากสิ่งส่งตรวจ (cloacal และ tracheal swab) โดยตรงได้เป็นผลสำเร็จ โดยชุดตรวจสอบดังกล่าวมีความจำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดนก H5N1 สูง สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดนก H5N1 ที่เคยมีรายงานในประเทศไทยได้ทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์ (clade) อย่างถูกต้อง ภายในระยะเวลา 1 วันทำการ โดยไม่จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในเซลล์ไข่ฟักก่อน หรือพึ่งอุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการที่มีราคาสูง นอกจากนี้การปรับปรุงชุดตรวจสอบในส่วนของการตรวจหา M gene ขึ้นใหม่ ยังช่วยให้สามารถนำชุดตรวจสอบมาใช้ตรวจหาเชื้อไข้หวัดใหญ่ (influenza A) ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นได้ดีขึ้นอีกด้วย โดยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อไข้หวัดนก H5N1 (clade 1) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ELD_{50}/ml ขึ้นไป และสามารถตรวจหาเชื้อไข้หวัดนก H5N1 (clade 2) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ELD_{50}/ml ขึ้นไป โดยชุดตรวจสอบนี้มีความไวมากกว่าการใช้วิธี RT-mPCR เพียงอย่างเดียวในการศึกษาเดียวกัน 10-100 เท่า ชุดตรวจสอบ mPCR-ELISA มีค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 เท่ากับ 93.88% และ 96.43% ตามลำดับ และมีค่า sensitivity และ specificity เมื่อนำมาใช้ทดสอบกับเชื้อ influenza A ทั้งหมดที่นำมาศึกษา เท่ากับ 77.69% และ 94.74% ตามลำดับ คณะผู้วิจัยมีความเชื่อมั่นว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ จะสามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดนกได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวก และรวดเร็ว อีกทั้งยังมีศักยภาพในการที่จะพัฒนาต่อไปเป็นชุดตรวจสอบในเชิงพาณิชย์ได้

Isolation and identification of the H5N1 avian influenza virus (AI) required well-trained personnel and highly biosecured laboratory or highly expensive equipments. These limitations have become a major obstacle for developing of an effective AI surveillance system in the country. Previously, there have been reports using PCR-ELISA for diagnosis of several viruses, including the AI viruses, directly from collected samples. It was also demonstrated that PCR-ELISA was as sensitive as the OIE standard method for avian influenza isolation and identification. In addition, the assay can be easily performed in conventional biomedical laboratories and the result could be obtained within a day.

The objective of this project is to establish the diagnostic test, based on multiplex-PCR (mPCR)-ELISA, for detection of the AI H5N1 viruses from collected samples. The assay is based on simultaneous amplification of the target genes; hemagglutinin (H5), neuraminidase (N1) and matrix (M), by the mPCR reaction. Subsequently, the existences of the amplified gene products were visualized by a hybridization-ELISA assay. At the end of the 2-year-long project, we have successfully developed the mPCR-ELISA assay for detection of the AI H5N1, directly from the cloacal and tracheal swabs. The assay could correctly identified the Thai AI isolated since 2004 (both clade 1 and 2) within 1 working day, without the need of viral amplification or highly expensive equipments. Furthermore, the newly designed system for detection of the M gene considerably improved the detection of M gene of influenza A viruses from other mammals. The detection limits of the assay for detection of the AI H5N1 clade 1 and clade 2 were from 10^{-1} and 1 ELD_{50}/ml, respectively. These detection levels were 10-100 times more sensitive than those obtained from the mPCR assay, in the same study. The sensitivity and specificity values of the assay for detection of the AI H5N1 were 93.88% and 96.43%, respectively. The sensitivity and specificity values, when analyzing the influenza A samples used in the study, were 77.69% and 94.74%, respectively. In summary, the mPCR-ELISA assay is a convenient, rapid, and sensitive assay for detection of AI H5N1. In addition, the test has good potential for development of a commercial diagnostic test kit in the future.