บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

การระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกยังคงเป็นปัญหาสำคัญต่อชีวิตและทรัพย์สิน ซึ่งการตรวจที่สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อ Influenza A virus ที่ใช้เวลาน้อยที่สุด เพื่อการดูแลรักษาผู้ป่วยได้ทันท่วงที หากผู้ป่วยเกิดการติดเชื้อไข้หวัดนก ซึ่งการให้ยารักษาต้องทำอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตสูง การแยกสายพันธุ์จึงมีผลต่อประสิทธิภาพในการรักษาและลดการแพร่กระจายเชื้อ

การเลือกวิธีตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกจำเป็นต้องมีความถูกต้อง มีความไวสูง ค่าใช้จ่ายต่ำ และใช้เวลาน้อย ทั้งยังต้องขึ้นกับความสามารถของห้องปฏิบัติการและบุคคลากร วิธีการแยกเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ข้อดีคือเป็นวิธีที่มีความถูกต้องสูงและมีประโยชน์ในการนำเชื้อไปศึกษาต่อ แต่มีข้อจำกัดหลายอย่าง ได้แก่ ต้องมีการเก็บและส่งตัวอย่างตรวจที่ดี เพื่อรักษาเชื้อให้มีชีวิต และต้องใช้เวลาในการเพาะเชื้อ 5-10 วัน ทำให้ได้ผลการตรวจไม่ทันกับการจัดการดูแลรักษาผู้ป่วย และจำเป็นต้องใช้ห้องชีวนิรภัยระดับ 3 (Biosafety Level-3) ในการแยกเชื้อไข้หวัดนก ทำให้การใช้วิธีการแยกเชื้อเพื่อการตรวจวินิจฉัยสามารถทำได้ยาก การตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธีย้อมด้วยสารเรืองแสง (immunofluorescence) เป็นวิธีมาตรฐานอีกวิธีหนึ่งที่มีความไวสูงและใช้เวลาในการตรวจเพียง 2-3 ชั่วโมง แต่ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซน (Fiuorescence microscope) ที่มีอยู่เฉพาะในห้องปฏิบัติการใหญ่ๆ เท่านั้น และต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญในการวิเคราะห์ผลการตรวจ และไม่สามารถแยกสายพันธุ์ได้ ทำให้อาจเกิดข้อจำกัดเมื่อเกิดการระบาดใหญ่ และการตรวจหาแอนติเจนอีกวิธีหนึ่ง ได้แก่ Rapid test เป็นเทคนิคที่ไม่ต้องใช้บุคคลากรที่มีความชำนาญ และใช้เวลาตรวจเพียง 30 นาที แต่เป็นวิธีที่มีความไวต่ำ จึงมีประโยชน์ในการคัดกรองการติดเชื้อในเบื้องต้นเท่านั้น ดังนั้น การตรวจหาจีโนมของเชื้อ โดยเทคนิค RT-PCR เป็นวิธีหนึ่งที่ถูกพัฒนาขึ้นอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยาไม่จำเป็นต้องมีเชื้อที่มีชีวิตในสิ่งส่งตรวจ ใช้เวลาในการตรวจ 1-2 วัน และสามารถแยกสายพันธุ์ได้ และถึงแม้จะมีการนำเทคนิค real-time PCR ที่ใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่า แต่เครื่อง real-time PCR ก็ยังมีอยู่น้อย และสารเคมีที่ใช้ มีราคาสูงกว่าวิธี RT-PCR ธรรมดา

เทคนิค Multiplex RT-PCR ที่สามารถตรวจหาเชื้อ Influenza A virus พร้อมทั้งแยกว่าเป็นสายพันธุ์ H1 H3 หรือ H5 ในเวลาเดียวกันจึงถูกพัฒนาขึ้น โดยการออกแบบไพรเมอร์

ในระบบ Multiplex M และ GAPDH สามารถคัดกรองว่ามีการติดเชื้อ Influenza ชนิดเอ ทุกสายพันธุ์ มีขนาด PCR product เท่ากับ 214 และ 107 bp ตามลำดับ มีความไวในการตรวจ 10^3 copies/µl ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน M สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไข้หวัดใหญ่ชนิดเอได้ทุกสายพันธุ์ จึงมีประโยชน์ในการตรวจหาเชื้อสายพันธุ์อื่นที่อาจเกิดการระบาดที่เกิดขึ้นใหม่ได้ แต่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน GAPDH ออกแบบจากยีนของคนเท่านั้น เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อใช้กับสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย แต่ GAPDH เป็นยีนที่มีในทุกสิ่งมีชีวิตที่มีกระบวนการไกลโคไลสิส ในการทดสอบกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียจึงสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ ในเชื้อ *H.influenzae* และ *S. aureus* และมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเออย่างไม่จำเพาะในเชื้อ *H.influenzae* จึงอาจเป็นการรบกวนการเพิ่มจำนวนของยีน GAPDH ทำให้ได้ PCR product น้อยลง เนื่องจาก PCR product ที่ได้ขนาดต่างจากที่ออกแบบจึงไม่ทำให้การวิเคราะห์ผลผิดไป และสามารถยืนยันผลด้วย Multiplex H1 H3 H5

การพัฒนาระบบ Multiplex H1 H3 และ H5 โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน hemagglutinin ของแต่ละสายพันธุ์ มีขนาด PCR product เท่ากับ 362, 112 และ 191 bp ตามลำดับ เพื่อแยกสายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกในการ PCR ครั้งเดียว มีความไวในการตรวจ 10^4 copies/µl 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) .ในขณะที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจที่ได้ขนาดจำเพาะ แต่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเออย่างไม่จำเพาะในเชื้อ *S. aureus* เนื่องจาก PCR product ที่ได้ขนาดต่างจากที่ออกแบบจึงไม่ทำให้การวิเคราะห์ผลผิดไป และสามารถยืนยันผลด้วย Multiplex M GAPDH

เมื่อเปรียบเทียบระบบ Multiplex RT-PCR H1 H3 H5 ในการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Payungporn S (10) โดยการศึกษาก่อนหน้าเป็น multiplex M H5 N1 เพื่อตรวจหาเชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 เพียงอย่างเดียว แต่การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1 H3 และการติดเชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 ได้ในเวลาเดียวกัน และมีการศึกษาของ Poddar S. K. (32) ที่แยกการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1 H3

และการติดเชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 เช่นกัน แต่ยังไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ชัดเจนเนื่องจากมีบางยีนที่มีขนาดใกล้เคียงกัน

ดังนั้นการพัฒนาระบบ multiplex PCR ในการศึกษานี้ จึงมีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย และแยกสายพันธุ์ในผู้ป่วยติดเชื้อไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกไปพร้อมกัน เพื่อประโยชน์ในการจัดการและรักษาผู้ป่วย พร้อมทั้งสามารถตรวจพบหากมีการติดเชื้อร่วมกัน (co-infection) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนก เพื่อเป็นการเฝ้าระวังไม่ให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีนระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนก ที่อาจทำให้เชื้อไข้หวัดนกมีความสามารถในการติดเชื้อได้ดีขึ้น เนื่องจากเชื้อไข้หวัดนกมีความรุนแรงสูง หากมีความสามารถในการติดต่อจากคนสู่คนได้ง่ายเช่นเดียวกับเชื้อไข้หวัดใหญ่แล้ว อาจจะทำให้เกิดการระบาดใหญ่ได้ หากเกิดการระบาดไปสู่กลุ่มประชากรที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน ดังที่เคยเกิดการระบาดใหญ่ในอดีต