ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248590

การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1 H3 และ H5 ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR

นางสาวบี่ดีรัตน์ บุญธุช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248590
b00253553

การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1 H3 และ H5 ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

นางสาวปิติรัตน์ บุญสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 8 7 4 7 5 4 6 3 0

MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) FOR DETECTION OF H1, H3 AND H5 INFLUENZA A VIRUS IN HUMAN CLINICAL SPECIMENS

Miss Pitirat Boonsuk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1 H3 และ H5 ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR
โดย	นางสาวปิติรัตน์ บุญสุข
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์วันล่า กุลวิชิต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.อลงกร อมรศิลป์)

ปิติรัตน์ บุญสุข : การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1 H3 และ H5 ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR (MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) FOR DETECTION OF H1, H3 AND H5 INFLUENZA A VIRUS IN HUMAN CLINICAL SPECIMENS) อ. ที่ปรึกษา : ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล, 68 หน้า

248590

การระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่คุกคามชีวิตและทรัพย์สิน ซึ่งการตรวจที่สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อ Influenza A virus ได้รวดเร็ว มีผลต่อประสิทธิภาพในการรักษาและลดการแพร่กระจายเชื้อ เทคนิค Multiplex RT-PCR ที่สามารถตรวจหาเชื้อ Influenza A virus พร้อมทั้งแยกว่าเป็นสายพันธุ์ H1 H3 หรือ H5 ในเวลาเดียวกันจึงถูกพัฒนาขึ้น โดยการพัฒนาระบบ Multiplex M GAPDH เพื่อคัดกรองว่ามีการติดเชื้อ Influenza ชนิดเอ พร้อมยืนยันว่าสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างได้ มีขนาด PCR product เท่ากับ 214 และ 107 bp ตามลำดับ มีความไวในการตรวจ 10^3 copies/µl และการพัฒนาระบบ Multiplex H1 H3 และ H5 เพื่อแยกสายพันธุ์ มีขนาด PCR product เท่ากับ 362, 112 และ 191 bp ตามลำดับ 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 ได้แก่ เชื้อ *Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus* (ทุกชนิด n=1) รวมถึงไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่พบการติดเชื้อดังกล่าวข้างต้น(N=4)

สาขาวิชา..วิทยาศาสตร์การแพทย์....ลายมือชื่อนิสิต.....ปิติรัตน์ บุญสุข.....

ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ทีปรึกษาร่วม.....

4874754630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: Influenza A virus / Multiplex RT-PCR H1 H3 H5

248590

PITIRAT BOONSUK : MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) FOR DETECTION OF H1, H3 AND H5 INFLUENZA A VIRUS IN HUMAN CLINICAL SPECIMENS. THESIS ADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. PARVAPAN BHATTARAKOSOL, 68 pp.

Both human and avian influenza infections are the important health and economic lost. Subtyping diagnosis of influenza virus can help guide clinical management of patient with suspected avian influenza. The multiplex reverse transcription polymerase chain reaction was develope for simultaneously detection of type and subtyping H1 H3 and H5 of influenza A virus. The mRT-PCR M and GAPDH products consist of segment 214 and 107 bp and the sensitivity of mRT-PCR M and GAPDH is 10^3 copies/µl. The mRT-PCR H1, H3 and H5 for subtyping of human influenza subtypes that products consist of segment 362, 112 and 191 bp respectively and the sensitivity of mRT-PCR H1, H3 and H5 is 10^4 copies/µl. No specific amplification bands of same size (362, 112 and 191 bp) could be amplified for RNA of other influenza subtypes and for other respiratory viruses such as Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human parainfluenza viruses (HPIVs), Human metapneumovirus (hMPV) (each n=1), nor specific amplification bands of both mRT-PCR (214, 107, 362, 112 and 191 bp) for other bacteria in respiratory tracts such as *Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus* (each n=1) or human that no have all above infections (N=4).

Field of study .....Medical Science..... Student's signature.....Pitirat Boonsuk.....

Academic year.....2006.....Advisor's signature.....Yong Poovorawan.....

Co-advisor's signature.....Parvapan Bhattarakosol.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอบคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียบพร้อม รวมถึงความเอาใจใส่เป็นอย่างดี และกรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำในการทำการวิจัย และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งอย่างที่ไม่มีอาจารย์ท่านใดเสมอเหมือน

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้อย่างละเอียดถี่ถ้วน ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความรู้และความคิดในการเป็นนักวิทยาศาสตร์ที่ดีจนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาจัดเตรียมเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ เพื่อใช้ทดสอบระบบ Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้น

ขอขอบคุณดร.สัญชัย พยุงพร น.ส.สลิล ชุตินิมิตรกุล นายทวีศักดิ์ เชี่ยวชาญศิลป์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญพิเศษด้านไวรัสวิทยาคลินิค คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัว เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
- ขอบเขตของการวิจัย 3
- ข้อจำกัดของการวิจัย 3
- คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย 3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
- วิธีดำเนินการวิจัย 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

- แนวคิดและทฤษฎี 5
- หลักการของ PCR 6
- หลักการของ Multiplex PCR 7
- เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8
- อนุกรมวิธานของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 8
- การเพิ่มจำนวนของไวรัส 9
- การกลายพันธุ์ 10
- การระบาด 10
- ลักษณะทางคลินิค 11
- การตรวจวินิจฉัยไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกทางห้องปฏิบัติการ 12
- การแยกและการพิสูจน์เชื้อไวรัส 12
- การตรวจหาแอนติเจน 13
- การตรวจหาจีโนมในส่วนน้ำจากผู้ป่วย 14

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 15
- รูปแบบการวิจัย 15
- ประชากรศึกษา 15
- การเก็บตัวอย่าง 16
- เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย 16
- สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 18
- วิธีการดำเนินการวิจัย 19
    Positive control 19
    Negative control 19
    Internal control 20
- การออกแบบไพรเมอร์ 20
- แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัด RNA 22
- ขั้นตอนการทำ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 23
- การทำ Reverse transcription 23
- การทำ Polymerase chain reaction (PCR) 24
- การทำ Positive control 26
- การทำโคลนนิ่ง และการเตรียมพลาสมิดเพื่อการทำ Positive control 26
- การทำ Ligation 26
- การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) 28
- การพัฒนาระบบ Multiplex PCR 28
- การทดสอบความไว Sensitivity 29
- การทดสอบความจำเพาะ Specificity 30
- การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) 31

บทที่ 4 ผลการทดลอง 32
- ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยวิธี in silico PCR 32
- ผลการทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ด้วย monoplex PCR 32
- ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ใช้เป็น positive control 34
- ผลการปรับคอนดิชั่น multiplex PCR ด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 36

- ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) 38
- ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) 40
- การทดสอบด้วยไวรัสในระบบหายใจ 42
- การทดสอบด้วยแบคทีเรียในระบบหายใจ 43
- ผลการทดสอบด้วย Nasopharyngeal suction จากผู้ป่วย 44

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล 46

สารบัญตาราง

1. แสดงขนาด PCR product ของไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ในการทำ multiplex PCR 21
2. ปริมาณไพรเมอร์ และสารต่างๆที่ใช้ในการทำ reverse transcription 24
3. ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน cDNA 25
4. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR 25
5. ไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็น positive control 26
6. สารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation 27

สารบัญภาพ

1. รูปจำลองอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ 8
2. ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส 9
3. ขั้นตอนการพัฒนาระบบ multiplex PCR 29
4. ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ MF5/MR276 32
5. ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ GAPDHF85/ GAPDHR191 33
6. ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ H1F266/H1R627, H3F3/H3R2, H5F3, H5R2++ 33
7. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน GAPDH ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ GAPDHF85 34
8. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน M ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ MF5 34
9. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H1 ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ H1F266 35
10. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H3 ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ H3F3 35
11. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ H5F3 36
12. ผลการเพิ่มจำนวนพลาสมิด โดยการทำ multiplex PCR M GAPDH 37
13. ผลการเพิ่มจำนวนพลาสมิด โดยการทำ multiplex PCR H1 H3 H5 37
14. ผลการทดสอบความไวของ multiplex M GAPDH โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน M GAPDH รวมกัน 38
15. ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 39
16. ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H3 39
17. ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H5 40

18. ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 H3 H5 รวมกัน 40
19. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15 41
20. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15 41
21. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ cDNA/DNA จากเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ 42
22. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ cDNA/DNA จากเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ 42
23. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ 43
24. ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ 44
25. ตัวอย่างการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้จากผู้ป่วยด้วย multiplex M GAPDH 44
26. ตัวอย่างการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้จากผู้ป่วยด้วย multiplex H1 H3 H5 45