

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 ผลการเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ จากตัวอย่าง throat swab ของผู้ป่วย

นำตัวอย่างน้ำก๊วคและการป้ายเชื้อจากคอของผู้ป่วย มาปั่นแยกส่วนน้ำใส ซึ่งมีไวรัสอยู่ด้วย ความเร็ว 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที (ข้อ 2.6.2) ลงเพาะในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MDCK (ข้อ 2.2) ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ๆ ละ 1 มล. หลังจากบ่มเซลล์ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ออกมาตรวจหาการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect) โดยเชื้อไวรัส ภายใต้กล้องอินเวอร์ตเทต ไมโครสโคป (inverted microscope) (2.4.2)ควบคู่ไปกับการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส โดยการทดสอบปฏิกิริยาฮีมาคกกลูตินเนชันด้วยเม็ดเลือดแดงไก่เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (2.4.1) จะเห็นได้ว่าเชื้อที่ทำให้ผลบวกในปฏิกิริยา การจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระจายอยู่ที่กันหลุม (shield) สามารถสังเกตการเกิด CPE ของเซลล์เพาะเลี้ยงได้ภายใน 3 วัน โดยลักษณะที่เกิดขึ้น เริ่มจากขอบเซลล์จะกลม (round up) และมีขนาดใหญ่ขึ้น (swelling) การเรียงตัวอยู่กันเป็นกลุ่ม ๆ อย่างหลวม ๆ ไม่หนาแน่นเหมือนเซลล์ปกติ เนื่องจากไวรัสมีการเจริญ และมีการเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ และผลสุดท้ายทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงแตกและหลุดออก (necrosis) ทำให้มองเห็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังคงเหลือเกาะอยู่ที่ผิวของกันหลุมมีจำนวนน้อยลง (36, 37) เลือกลำหมายเลขของตัวอย่างเชื้อส่งตรวจที่ได้ผลบวกในการทดสอบทั้ง 2 วิธีดังกล่าวมาทำการเพาะเชื้อครั้งที่สอง (second inoculation) และตรวจหาระดับหรือกำลังของความเข้มข้นของไวรัสที่ทำให้ปฏิกิริยาฮีมาคกกลูตินิน (HA titer)

(ตามวิธีในข้อ 2.4.2) และพบตัวอย่างเชื้อส่งตรวจที่เก็บได้ในระหว่างเดือน มิถุนายนถึงเดือนกันยายน ปี พ.ศ.2532 ให้ผลการหาระดับความเข้มข้น ของ HA titer > 1:64 มีทั้งสิ้น 72 ตัวอย่างจากทั้งหมด 255 ตัวอย่าง คิด เป็นอัตราป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ 28% (ตารางที่ 4) และตัวอย่าง specimen ที่เก็บได้ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม ปี พ.ศ.2533 ที่ให้ผลบวกในการเกิด CPE และมี HA titer > 1:64 มีทั้งสิ้น 64 ตัวอย่างจากทั้งหมด 456 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5) คิดเป็นอัตราป่วยด้วยไข้หวัดใหญ่ 10% รายงาน ผู้ป่วยพบน้อยในช่วงต้นปี โดยเฉพาะเริ่ม เข้าสู่ฤดูร้อนคือเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือน เมษายน และเริ่มเพิ่มสูงขึ้นในระยะเดือน พฤษภาคม และเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ สูงสุดในเดือนกันยายน ซึ่งเป็นระยะฤดูฝน จากนั้นผู้ป่วยเริ่มลดน้อยลงเมื่อเริ่ม เข้าสู่ฤดูหนาว คือเดือนพฤศจิกายน ลักษณะการกระจายของผู้ป่วยรายเดือนคล้าย กับของผู้ป่วยในปี 2532 ซึ่งพบผู้ป่วยสูงสุดในเดือนกรกฎาคม (รูปที่ 1)

3.2 ผลการตรวจแยกชนิด (type) และชนิดย่อย (subtype) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่

3.2.1 ผลการตรวจแยกชนิด และชนิดย่อย โดยการทดสอบปฏิกิริยา ฮีมแอกกลูตินินอินฮิบิชัน

ได้นำตัวอย่างเชื้อส่งตรวจที่ให้ผลบวกในการเกิด CPE และมี HA titer ในการเพาะเชื้อครั้งที่สอง > 1:64 จากข้อ 3.1 มาตรวจแยก ชนิดและชนิดย่อยของไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยการทดสอบปฏิกิริยาฮีมแอกกลูตินินอินฮิบิชัน โดยมีเชื้อไข้หวัดใหญ่อ้างอิงชนิดเอ ชนิดย่อยทั้ง A/H1N1 และ A/H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่อ้างอิงชนิดบี ดังนี้ A/Yamagata/32/89 (H1N1), A/Taiwan/1/86 (H1N1), A/Hokkaido/20/89 (H3N2), A/Sichuan/2/87 (H3N2), A/shanghi/11/87 (H3N2), B/Victoria/2/87 และ B/Yamagata/16/88 (ข้อ 2.1.3.3) ตามวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา (ข้อ 2.5) ผลการแยกเชื้อในปี 2532 จำนวนทั้งสิ้น 72 ตัวอย่าง แยกไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2 ชนิด คือ ชนิดเอ และชนิดบี สำหรับชนิดเอ พบชนิดย่อยทั้ง 2 แบบ คือ A/H1N1

และ A/H3N2 โดยแยกได้ชนิด A/H1N1 ในเดือนมิถุนายน 1 ตัวอย่าง และ เดือนกรกฎาคมแยกได้ 5 ตัวอย่าง หลังจากนั้นไม่พบว่ามี การแยกได้ไวรัส ไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ชนิดย่อย H1N1 อีกในเดือนกรกฎาคมแยกได้ชนิด A/H3N2 จำนวน 17 ตัวอย่าง ชนิดบี 16 ตัวอย่าง เดือนสิงหาคมแยกได้ชนิด A/H3N2 11 ตัวอย่าง ชนิดบี 8 ตัวอย่าง และเดือนกันยายนแยกได้ชนิด A/H3N2 9 ตัวอย่าง ชนิดบี 5 ตัวอย่าง ซึ่งชนิดเอ ช่วงหลังที่แยกได้ทั้งหมดนี้มีชนิดย่อยเป็น H3N2

ผลการทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา พบว่าในเชื้อไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ ชนิดย่อย H1N1 นั้นมีความคล้ายคลึงกับไวรัสไข้หวัดใหญ่อ้างอิง A/Taiwan/1/86 (H1N1) ที่ใช้ทดสอบ ให้ผลการอ่านค่า HI titer เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มเชื้อส่งตรวจ หมายเลข 218-225 และ 239 ที่แยกได้ในเดือนมิถุนายน ถึงต้นเดือนกรกฎาคมให้ titer > 1:640 และกลุ่มเชื้อส่งตรวจ หมายเลข 256 และ 260 ที่แยกได้ในกลางเดือนกรกฎาคมให้ไตเตอร์ต่ำกว่ากลุ่มแรก คืออยู่ ระหว่าง 160-320 แสดงถึงความแตกต่างในความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่อาจ เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งจะได้ทำการทดสอบต่อไป โดยการหาฟิงเกอร์ ปริ้นติงและให้ชื่อตัวอย่างไวรัสไข้หวัดใหญ่นี้เป็น A/Bangkok/1/89 (H1N1) และ A/Bangkok/2/89 (H1N1) ตามลำดับ ส่วนไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ชนิดย่อย H3N2 ที่แยกได้ตั้งแต่เดือนกรกฎาคมเป็นต้นมา ให้ผลการอ่านค่า HI titer > 1:640 กับไวรัสไข้หวัดใหญ่อ้างอิง A/Hokkaido/20/89 (H3N2) ให้ชื่อตัวอย่างไวรัสไข้หวัดใหญ่นี้เป็น A/Bangkok/3/89 (H3N2)

สำหรับผลการจำแนกชนิดและชนิดย่อยของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ที่แยกได้ใน ปี 2533 ตั้งแต่เดือนมกราคม เรื่อยมาจนถึงเดือนธันวาคม พบว่า เป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี และชนิดเอ ชนิดย่อย H3N2 ทั้งหมด ดังแสดงใน ตารางที่ 8, 9 และ 10 พบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี นั้นมีความคล้ายคลึงกับ ไวรัสไข้หวัดใหญ่อ้างอิง B/Yamagata/16/88 สำหรับไวรัสไข้หวัดใหญ่เอ ชนิด ย่อย H3N2 จะให้ผลการอ่านค่า HI titer เป็น 2 กลุ่มโดยกลุ่มแรกให้ผล HI titer > 1:640 กับไวรัสไข้หวัดใหญ่อ้างอิง A/Hokkaido/20/89 (H3N2) และกลุ่มหลังให้ผล HI titer > 1:640 กับไวรัสไข้หวัดใหญ่อ้างอิง A/Sichuan/2/89 (H3N2) จึงตั้งชื่อไวรัสทั้งสองตัวอย่างดังกล่าวเป็น

A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) เพื่อตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมโดยการหาฟิงเกอร์พริ้นติงต่อไป

3.2.2 ผลการจำแนกชนิดย่อยโดยการทดสอบปฏิกิริยานิวรามิเนสอินฮิบิชัน

ได้ทำการจำแนกชนิดของแอนติเจน นิวรามิเนส บนอนุภาคของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่รวบรวมได้ทั้ง 4 ตัวอย่างข้างต้นโดยการทดสอบนิวรามิเนสอินฮิบิชันเพื่อยืนยันผลการจำแนกชนิดย่อยในการทำปฏิกิริยาฮีแมกกลูตินินชัน อินฮิบิชันของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่จำแนกไว้ มีความแตกต่างของแอนติเจนนิวรามิเนส 2 ชนิดคือ N1 และ N2 ตามวิธีข้อ 2.5.2 โดยมีไวรัสไข้หวัดใหญ่อ้างอิงที่มีชนิดของแอนติเจนนิวรามิเนสต่างกันเป็น N1 และ N2 มาทำการทดสอบคือ A/Yamagata/32/89 (H1N1) และ A/Hokkaido/20/89 (H3N2) ตามลำดับพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ทั้ง 4 ตัวอย่างที่แยกได้ ให้ผลการจำแนกชนิดย่อยคือ A/Bangkok/1/89 (H1N1) และ A/Bangkok/2/89 (H1N1) มีชนิดของแอนติเจนเอนไซม์นิวรามิเนสเป็น N1 ส่วน A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) มีชนิดของแอนติเจนเอนไซม์นิวรามิเนสเป็น N2 ดังแสดงในตารางที่ 10

3.3 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสและการทำหับริสุทธ์

ได้จัดตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้ทั้งหมดออกเป็น 4 ตัวอย่างคือ A/Bangkok/1/89 (H1N1) และ A/Bangkok/2/89 (H1N1) ซึ่งแยกได้ในปี 2532 เป็นตัวอย่างที่ 1 และ 2 ตามลำดับ และเชื้อไวรัสที่แยกได้ในปี 2533 คือ A/Bangkok/3/90 (H3N2) เป็นตัวอย่างที่ 3 และเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/4/90 (H3N2) ที่แยกได้ในปี 2533 เป็นตัวอย่างที่ 4 โดยพิจารณาจากเชื้อไวรัสตัวอย่างที่ให้ผลการอ่าน HI titer สูงสุด (> 1: 640) มาเพาะเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ขนาดขวดใหญ่ 125 มล. และฉีดลงถูงอัลแลนโรตอริคาน่าช่วงวัย 10-11 วัน บ่มานต์อบอุณหภูมิตั้งที่ 35 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 3 วัน (ตามวิธีข้อ 2.7.1) นำมาเก็บเกี่ยว (harvest) ส่วนน้ำใสที่มีการติดเชื้อไวรัส (infected culture fluid) ออกมารวมกันในแต่ละตัวอย่าง โดยมีปริมาตรตัวอย่างละ 100 มล. แบ่งบางส่วนมาทดสอบปฏิกิริยาฮีโมแอกกลูตินเนชัน ซึ่งให้ผล HA titer > 1:128 ส่วนที่เหลือเก็บที่ตู้อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือนำมาทำให้บริสุทธิ์ทันที โดยปั่นเหวี่ยงตกตะกอนโปรตีนปนเปื้อนและเศษเซลล์ (cell debris) ออกและนำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนไวรัส หลังจากนั้นนำตะกอนออกมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อนำไปแยกไวรัสออกโดยวิธี Sucrose density gradient centrifugation เพื่อแยกเก็บเฉพาะชั้น (band) ของไวรัสและนำมาปั่นอีกครั้งเพื่อเก็บตะกอน (ตามวิธีข้อ 2.7.2) ก่อนจะนำไปเก็บไว้ที่ตู้อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือนำไปสกัดแยกอาร์เอ็นเอ ไวรัสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เมื่อทดสอบปฏิกิริยาฮีโมแอกกลูตินเนชันพบว่าทั้ง 4 ตัวอย่างให้ผลการอ่านค่า HA titer \geq 1:1024 ทั้งหมดดังนี้ A/Bangkok/1/89 (H1N1) ให้ HA titer 1:1024, A/Bangkok/2/89 (H1N1) ให้ HA titer 1:1024, A/Bangkok/3/90 (H3N2) ให้ HA titer 1:2048 และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) ให้ HA titer เป็น 1:1024

3.4 ผลการสกัดแยกอาร์เอ็นเอ

นำไวรัสที่บริสุทธิ์ทั้ง 4 ตัวอย่างมาย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K เพื่อทำลายชั้น matrix protein และสกัดแยกโปรตีนอื่นๆ ด้วยฟีนอลตามด้วยการแยกอาร์เอ็นเอในสารละลายคลอโรฟอร์มานไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ 3% และตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเอทานอล 95% ที่เย็นตามวิธีข้อ 2.8 ผลการสกัดแยกอาร์เอ็นเอทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อนำมาหาความเข้มข้น โดยเทียบจากค่า optical density = 1 ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD 260:OD 280) เพื่อแสดงความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/1/89 (H1N1), A/Bangkok/2/89 (H1N1), A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) มีความเข้มข้น

ของอาร์เอ็นเอ เป็น 0.46, 0.55, 0.72 และ 0.78 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ และค่าการดูดกลืนแสง 260:280 นาโนเมตร จะอยู่ในช่วง 1.75-1.85 (ตารางที่ 11)

3.5 ผลการย่อยตัดและติดฉลากโพลีนิวคลีโอไทด์

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาผ่านการย่อยตัดด้วยเอนไซม์ RNase T1 และติดฉลากด้วยสารเรดิโอแอคทีฟ แกมมา- ^{32}P อาร์เอ็นเอมีกัมมันตภาพรังสี 250 ยูซีไอโดยมีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ ตัวอย่าง A/Bangkok/1/89 (H1N1), A/Bangkok/2/89 (H1N1), A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H1N1) และอาร์เอ็นเอไวรัสไข้หวัดใหญ่ อ้างอิง A/Shanghi/11/87 (H3N2) A/Sichuan/2/87 (H3N2), A/Hokkaido/20/89(H3N2) และ A/Nevada/101/82 (H3N2) ตัวอย่างละ 0.3 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (ตามวิธีข้อ 2.9) มาวิเคราะห์รูปแบบของโพลีเปปไทด์ที่เกิดขึ้นโดยการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโพรสิส 10% ใน 6M ยูเรียอิเล็กโตรโพรส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังเสร็จสิ้นการรัน นำแผ่นเจลไปทำออโตเรดิโอกราฟี แอ็บสตราที่ปรากฏแสดงถึงตำแหน่งของอาร์เอ็นเอ เซกเมนต์ในขนาดที่แตกต่างกัน จำนวน 8 แถบ แทนด้วยตัวเลข 1-8 ดังแสดงในรูปที่ 3 และรูปที่ 4

3.6 ผลการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโพรสิสสองทิศทาง

หลังจากการทำโพลีนิวคลีโอไทด์ ที่ติดฉลากในโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโพรสิสสองทิศทาง (ตามวิธีข้อ 2.10) ได้สิ้นสุดลง และได้้นำแผ่นเจลทิศทางที่สองวางทับลงบนแผ่นเอกซ์เรย์ฟิล์ม เก็บในห้องมืดตามวิธีออโตเรดิโอกราฟี (ข้อ 2.11) ซึ่งในงานวิจัยนี้ ขั้นตอนดังกล่าวมิได้ใช้สายพันธุอ้างอิงที่ใช้ในการจำแนกชนิด และชนิดย่อยมาเปรียบเทียบ ดังนั้นจึงเป็นการเปรียบเทียบเองระหว่างสายพันธุของตัวอย่าง ซึ่งกำลังมีการระบาดแยกได้ในขณะนั้นทั้ง 4 ชนิดว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมไปบ้างหรือไม่ มากน้อยเพียงใด โดยการคำนวณ

หาเปอร์เซ็นต์ การเปลี่ยนแปลงของเบส จากสูตรเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของเบส

= จุดที่เพิ่มขึ้น x 1.5 + |จุดที่เพิ่มขึ้น - จุดที่หายไป| (ตามวิธีการแปรผลข้อ 2.11) โดยการลอกจุดที่เกิดขึ้นบนกระดาษลอกลาย ซึ่งวางทาบอยู่บนแผ่นเอกซ์เรย์ฟิล์ม ซึ่งวางอยู่บนไลท์ บอกซ์ โดยใช้วงกลมทาบสำหรับรูปแบบลายนิ้วมือของตัวอย่างทั้งสองที่จะนำมาเปรียบเทียบกัน และเมื่อนำมาซ้อนกัน จุดที่มีการเปลี่ยนแปลงจะแทนด้วยวงกลมประ ในขณะที่ยุบรวมที่เหมือนกันแทนด้วยวงกลมทาบ

จากการเปรียบเทียบแนวโน้มของไวรัสโดยการหาแผนที่โพลิโนมิวคัล-โพลิโนมิวคัลของเชื้อไวรัส ใช้หัตถ์ใหญ่ที่แยกได้ทั้ง 4 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นการเปรียบเทียบระหว่าง A/Bangkok/1/89 (H1N1) และ A/Bangkok/2/89 (H1N1) และกลุ่มที่ 2 เป็นการเปรียบเทียบระหว่าง A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) ให้ผลเป็นดังรูปที่ 5-10

3.6.1 ผลการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ A/H1N1 ในกลุ่มที่ 1

A/Bangkok/1/89 (H1N1) และ A/Bangkok/2/89 (H1N1) มี total spot ที่เหมือนกันทั้งสิ้น 144 spot และเมื่อใช้รูปแบบลายนิ้วมือของ A/Bangkok/1/89/ (H1N1) เป็นรูปแบบอ้างอิง (รูปที่ 5) พบว่า spot ที่กระจายบนแบบพิมพ์ลายนิ้วมือของ A/Bangkok/2/89 (H1N1) (รูปที่ 6) มีความแตกต่างถึง 2 ตำแหน่ง คือไม่พบ spot ที่ 11 ในขณะที่มี spot ที่ 146 เกินมาอีก 1 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูปที่ 7 มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของเบส = $1 \times 1.5 + 0 = 1.5$

3.6.2 ผลการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ A/H3N2 ในกลุ่มที่ 2

A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) มี total spot ที่เหมือนกันทั้งสิ้น 140 spot และเมื่อใช้รูปแบบลายนิ้วมือของ A/Bangkok/3/90 (H3N2) เป็นรูปแบบอ้างอิง (รูปที่ 8) พบว่า spot ที่กระจายบนแผ่นพิมพ์ลายนิ้วมือของ A/Bangkok/4/90 (H3N2) (รูปที่ 9) มี 5 spot ที่เพิ่มขึ้นมาในตำแหน่งที่ 141-145 ดังแสดงในรูปที่ 10 มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของเบส

$$= 5 \times 1.5 + 5 = 12.5$$

ตารางที่ 5 แสดงชนิดและอัตราผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในปี พ.ศ.2532 จากจำนวนผู้ป่วยที่มีอาการนำของโรคไข้หวัดใหญ่ 255 ราย

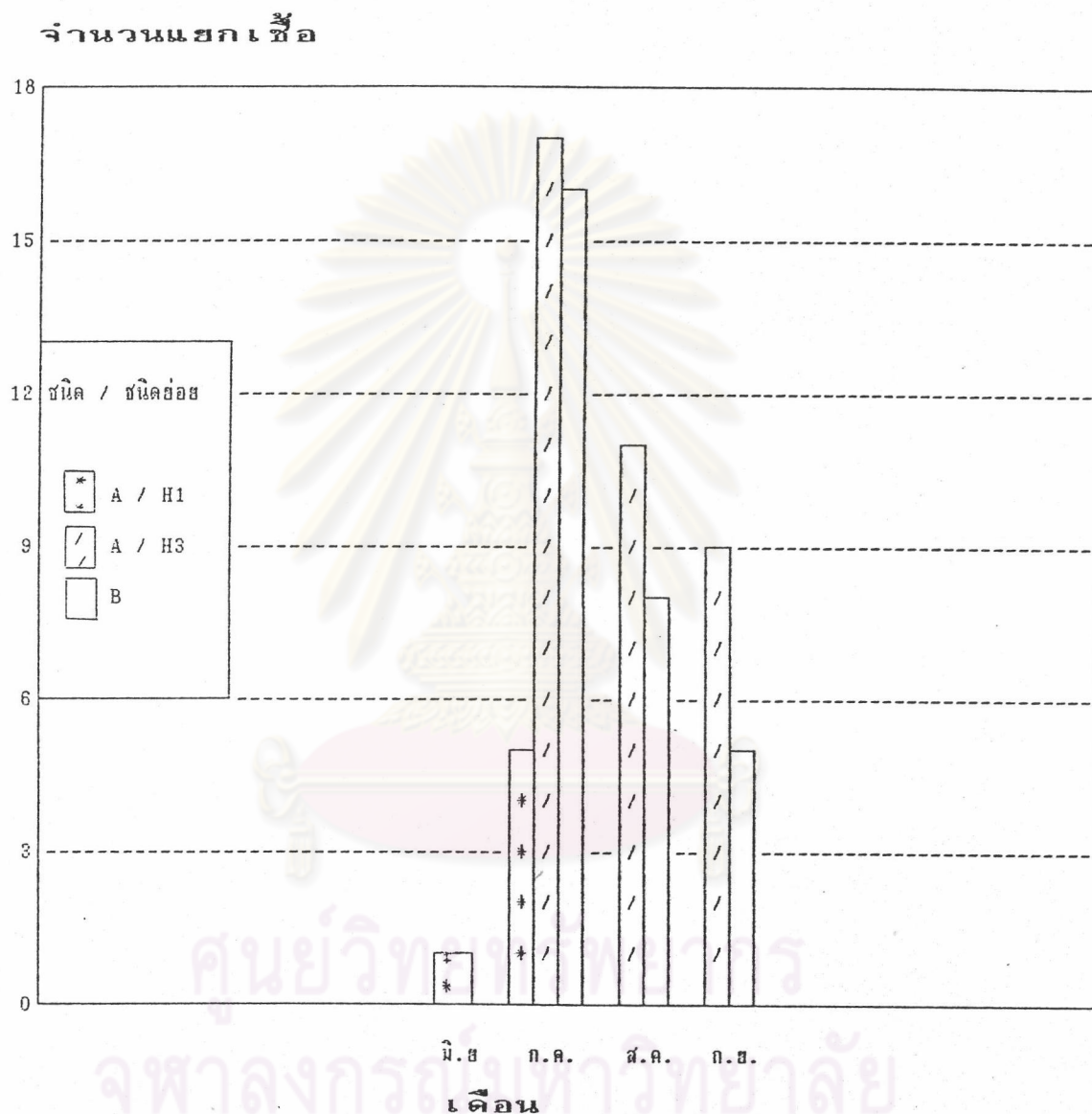
เดือน	จำนวนผู้ป่วยที่มีอาการของระบบทางเดินหายใจอีกเสบ	จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่	เปอร์เซ็นต์ของการแยกเชื้อได้	ชนิดของเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้		
				A/H1	A/H3	B
มิ.ย.	18	1	5.6	1	-	-
ก.ค.	116	38	32.8	5	17	16
ส.ค.	71	19	26.8	-	11	8
ก.ย.	50	14	28.0	-	9	5

ตารางที่ 6 แสดงชนิดและอัตราผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในปี พ.ศ.
2533 จากจำนวนผู้ป่วยที่มีอาการนำของโรคไข้หวัดใหญ่ 456 ราย

เดือน	จำนวนผู้ป่วย ที่มีอาการของ ระบบทางเดิน หายใจอักเสบ	จำนวนผู้ป่วย ด้วยโรคไข้- หวัดใหญ่	เปอร์เซ็นต์ ของการแยก เชื้อได้	ชนิดของเชื้อไข้- หวัดใหญ่ที่แยกได้	
				A/H3	B
ม.ค.	20	4	20.0	2	2
ก.พ.	42	1	2.4	-	1
มี.ค.	18	3	16.7	-	3
เม.ย.	3	-	-	-	-
พ.ค.	27	3	11.1	3*	-
มิ.ย.	16	1	6.3	1*	-
ก.ค.	77	7	9.1	3*	4
ส.ค.	64	7	10.1	5*	2
ก.ย.	84	11	13.1	10	1
ต.ค.	71	7	9.9	4	3
พ.ย.	21	1	4.8	-	1
ธ.ค.	13	1	7.7	-	1

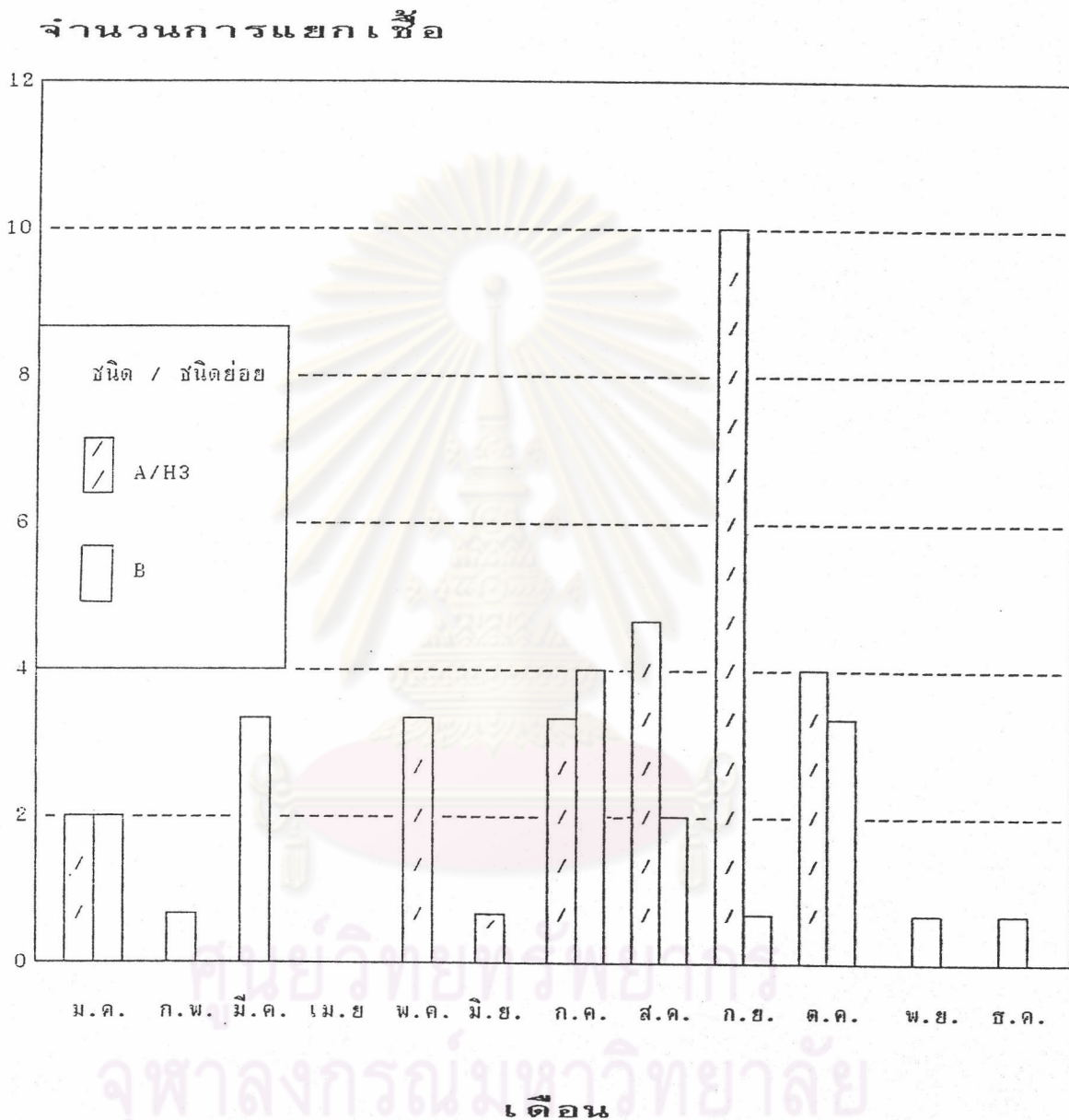
* แยกได้เชื้อไข้หวัดใหญ่ ชนิด A subtype H3N2 คล้ายสายพันธุ์ Hokkaido 3 ตัวอย่าง และคล้ายสายพันธุ์ Sichuan 9 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 6

รูปที่ 1 ชนิดและจำนวนของผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้ในแต่ละเดือน ระหว่างเดือนมิถุนายน - กันยายน พ.ศ.2532 จากจำนวนผู้ป่วยที่มีอาการของระบบทางเดินหายใจอักเสบ 255 ราย



ไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีการระบาดในปี พ.ศ.2532 ตรวจพบทั้งชนิด A และชนิด B สำหรับชนิด A พบชนิดย่อยทั้ง A/H1 และ A/H3 โดยแยกได้ A/H1 ในเดือน มิ.ย. 1 ราย, เดือน ก.ค.แยกได้ A/H1 5 ราย, A/H3 17 ราย และ B 16 ราย, เดือน ส.ค.แยกได้ A/H3 11 ราย, B 8 ราย และเดือน ก.ย.แยกได้ A/H3 9 ราย และ B 5 ราย

รูปที่ 2 ชนิดและจำนวนของผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ ที่แยกได้ในแต่ละเดือน ระหว่างเดือน มกราคม-ธันวาคม พ.ศ.2533 จากจำนวน ผู้ป่วยที่มี อาการของระบบทางเดินหายใจอีกเสบ 456 ราย



ไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีการระบาดในปี พ.ศ.2533 ตรวจพบทั้งชนิด A และชนิด B สำหรับชนิด A พบเฉพาะชนิดย่อย A/H3 โดยเชื้อไวรัสที่แยกได้ในเดือน ม.ค. เป็นชนิด A/H3 2 ราย, ชนิด B 2 ราย, เดือน ก.พ.แยกได้ชนิด B 1 ราย, เดือน มี.ค. แยกได้ชนิด B 3 ราย, เดือน พ.ค.แยกได้ชนิด A/H3 3 ราย, เดือน มิ.ย.แยกได้ชนิด A/H3 1 ราย, เดือน ก.ค. แยกได้ชนิด A/H3 3

ราย, ชนิด B 4 ราย, เดือน ส.ค.แยกได้ชนิด A/H3 5 ราย, ชนิด B 2 ราย, เดือน ก.ย.แยกได้ชนิด A/H3 10 ราย, ชนิด B 1 ราย, เดือน ต.ค.แยกได้ชนิด A/H3 4 ราย, ชนิด B 3 ราย, เดือน พ.ย.และ ธ.ค. แยกได้ชนิด B เดือนละ 1 ราย

ตารางที่ 7 แสดงพันธุ์ของไข้หวัดใหญ่ชนิด A ชนิดย่อย H3N2 ที่แยกได้ในเดือน พฤษภาคม-สิงหาคม ปี พ.ศ.2533

เดือน	A/H3N2		
	A/HOKKAIDO	A/SICHUAN	
พ.ค.	3	-	3
มิ.ย.	1	-	1
ก.ค.	3	-	3
ส.ค.	5	3	2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบปฏิกิริยาฮีมากกลูตินเนชัน อินฮิบิชันของเชื้อไวรัส
ไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในปี พ.ศ. 2532

		HI titer with the following antibodies: Antisera			
Virus Antigens		A/Taiwan	A/Hokkaido	A/Sichuan	B/Yamagata
		/1/86	/20/89	/2/89	/16/88
Reference Strains					
A/Taiwan/1/86 (H1N1)		<u>2048</u>	128	1024	32
A/Hokkaido/20/89 (H3N2)		512	<u>1024</u>	256	32
A/Sichuan /2/89 (H3N2)		1024	256	<u>4096</u>	32
B/Yamagata/16/88		64	32	32	<u>2048</u>
Influenza isolates sample No					
June	218	<u>>1:640</u>	<1:10	<1:10	<1:10
July	220, 221, 225	<u>>1:640</u>	<1:10	<1:10	<1:10
	234, 235	<1:10	<u>>1:640</u>	<1:10	<1:10
	238	<1:10	<u>1:40</u>	1:20	<1:10
	239	<u>>1:640</u>	<1:10	<1:10	<1:10
	240, 245, 246	<1:10	<u>1:320</u>	1:40	<1:10
	247, 249, 251	<1:10	<u>>1:640</u>	1:80	<1:10
	254	<1:10	<u>1:40</u>	1:20	<1:10
	255	<1:10	<1:10	<1:10	<u>>1:640</u>
	256	<u>1:320</u>	<1:10	<1:10	<1:10
	258	<1:10	<1:10	<1:10	<u>>1:640</u>

ตารางที่ 8 (ต่อ)

		HI titer with the following antibodies:Antisera			
Virus Antigens		A/Taiwan	A/Hokkaido	A/Sichuan	B/Yamagata
		/1/86	/20/89	/2/89	/16/88
Reference Strains					
A/Taiwan/1/86 (H1N1)		<u>2048</u>	128	1024	32
A/Hokkaido/20/89 (H3N2)		512	<u>1024</u>	256	32
A/Sichuan /2/89 (H3N2)		1024	256	<u>4096</u>	32
B/Yamagata/16/88		64	32	32	<u>2048</u>
June	260,	<u>1:160</u>	<1:10	<1:10	<1:10
July	261,262	>1:10	<1:10	<1:10	<u>1:320</u>
	264,265,266,267	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:640</u>
	268	<1:10	<u>1:40</u>	1:20	<1:10
	269,270,271	<1:10	<1:10	<1:10	<u><1:320</u>
	272	<1:10	<u>1:40</u>	<1:10	<1:10
	273,274,275	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:40</u>
	298,299	<1:10	<u>1:80</u>	1:20	<1:10
	302, 303	<1:10	<u>>1:640</u>	1:80	<1:10
	306	<1:10	<u>>1:640</u>	1:40	<1:10
	308,309	<1:10	<1:10	<1:10	<u>>1:640</u>
Aug	353	<1:10	<u>1:80</u>	1:20	<1:10
	354	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:640</u>
	356	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:640</u>
	359	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:640</u>

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Virus Antigens	HI titer with the following antibodies:Antisera			
	A/Taiwan /1/86	A/Hokkaido /20/89	A/Sichuan /2/89	B/Yamagata /16/88
Reference Strains				
A/Taiwan/1/86 (H1N1)	<u>2048</u>	128	1024	32
A/Hokkaido/20/89 (H3N2)	512	<u>1024</u>	256	32
A/Sichuan /2/89 (H3N2)	1024	256	<u>4096</u>	32
B/Yamagata/16/88	64	32	32	<u>2048</u>
363,364	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:320</u>
365	<1:10	<u>1:320</u>	1:20	<1:10
367	<1:10	<u>1:640</u>	1:20	<1:10
369	<1:10	1:80	1:80	<u>1:320</u>
371	<1:10	<u>1:40</u>	<1:10	<1:10
372	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:320</u>
382,	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:640</u>
396	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:40</u>
397,400,401	<1:10	<u>1:320</u>	1:20	<1:10
405, 410	<1:10	<u>1:320</u>	<1:20	<1:10
Sep 409, 413	<1:10	<u>1:640</u>	<1:10	<1:10
415	<1:10	<u>1:640</u>	1:20	<1:10
423,424	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:640</u>
425,426	<1:10	<u>1:320</u>	1:20	<1:10
429	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:640</u>
430	<1:10	<u>1:40</u>	<1:10	<1:10

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Virus Antigens	HI titer with the following antibodies:Antisera			
	A/Taiwan /1/86	A/Hokkaido /20/89	A/Sichuan /2/89	B/Yamagata /16/88
Reference Strains				
A/Taiwan/1/86 (HINI)	<u>2048</u>	128	1024	32
A/Hokkaido/20/89 (H3N2)	512	<u>1024</u>	256	32
A/Sichuan /2/89 (H3N2)	1024	256	<u>4096</u>	32
B/Yamagata/16/88	64	32	32	<u>2048</u>
431	<1:10	<u>1:80</u>	<1:10	1:10
447	<1:10	<u>1:40</u>	<1:10	<1:10
455	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:320</u>
456	<1:10	<u>1:640</u>	1:20	<1:10
460	<1:10	<1:10	<1:10	<u>1:640</u>
463,464,465	<1:10	<u>1:640</u>	1:40	<1:10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบปฏิกิริยาฮีโมแอกกลูตินเนชัน อินฮิบิชัน ของเชื้อไวรัส
ไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในปี พ.ศ.2533

		HI titer with the following antibodies:Antisera			
Virus Antigens		A/Taiwan /1/86	A/Hokkaido /20/89	A/Sichuan /2/89	B/Yamagata /16/88
Reference Strains					
A/Taiwan/1/86 (H1N1)		<u>2048</u>	128	1024	32
A/Hokkaido/20/89 (H3N2)		512	<u>1024</u>	256	32
A/Sichuan /2/89 (H3N2)		1024	256	<u>4096</u>	32
B/Yamagata/16/88		64	32	32	<u>2048</u>
Influenza isolates Sample No					
Jan	10	<1:10	<u>>1:640</u>	<1:10	<1:10
	11	<1:10	<u>>1:640</u>	1:40	<1:10
	13	<1:10	<1:10	1:20	<u>>1:640</u>
	14	<1:10	<1:10	1:20	<u>>1:640</u>
Feb	48	<1:10	<1:10	<1:10	<u>>1:640</u>
Mar	72	<1:10	1:10	<1:10	<u>>1:640</u>
	76	<1:10	<1:10	<1:10	<u>>1:640</u>
	80	<1:10	<1:10	<1:10	<u>>1:640</u>

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Virus Antigens		HI titer with the following antibodies:Antisera				
		A/Taiwan /1/86	A/Hokkaido /20/89	A/Sanghi/ /11/87	A/Sichuan /2/89	B/Yamagata /16/88
Reference Strains						
A/Taiwan/1/86 (H1N1)		<u>2048</u>	128	1024	256	32
A/Hokkaido/20/89(H3N2)		512	<u>1024</u>	512	128	32
A/Sanghi/11/87 (H3N2)		1024	512	<u>2048</u>	256	32
A/Sichuan /2/89 (H3N2)		1024	256	128	<u>2048</u>	32
B/Vicloria/2/87		32	32	32	4029	<u>2048</u>
Influenza isolates Semple No						
May	5,16,20	a	b	a	<u>>1:640</u>	a
June	34	a	b	a	<u>>1:640</u>	a
July	48	a	a	a	a	<u>>1:640</u>
	72	a	b	a	<u>>1:640</u>	a
Aug	78,83,84	a	a	a	a	<u>>1:640</u>
	110,116	a	b	a	<u>>1:640</u>	a
	123,163	a	b	a	<u>>1:640</u>	a
Aug	135,154,173	a	<u>>1:640</u>	a	a	a
	153,172	a	a	b	a	<u>>1:640</u>

a: HI titer less than 40 b: HI titer between 80-320

ตารางที่ 9 (ต่อ)

		HI titer with the following antibodies: Antiscra			
Virus Antigens		A/Yamagata	A/Hokkaido	A/Sichuan	B/Yamagata
		/32/89	/20/89	/2/89	/16/88
Reference Strains					
A/Yamagata/32/89(H1N1)		<u>2048</u>	128	128	32
A/Hokkaido/20/89(H3N2)		256	<u>1024</u>	256	32
A/Sichuan /2/89 (H3N2)		128	256	<u>4096</u>	32
B/Yamagata/16/88		32	32	32	<u>2048</u>
Influenza isolates Sample No					
Sep	196,197,199	a	<u>>1:640</u>	b	a
	202,204,205,				
	211,235,240,				
	252	a	<u>1:640</u>	a	a
	237	a	a	a	<u>>1:640</u>
Oct	281,282,323	a	<u>>1:640</u>	b	a
	325	a	<u>1:640</u>	a	a
	296,302,328	a	a	a	<u>1:640</u>
Nov	343	a	a	a	<u>>1:640</u>
Dec	357	a	a	a	<u>>1:640</u>

a: Hi titer less than 40 b: HI titer between 80-320

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบปฏิกิริยานิวรามิเนส อินฮิบิชั่น ของเชื้อไวรัส
ไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้ 4 ตัวอย่าง

Virus Antigens	NI titer with the following antibodies:	
	Antisera	
	A/Yamagata/32/89	A/Hokkaido/20/89
Reference Strains		
A/Yamagata/20/89 (H1N1)	<u>512</u>	32
A/Hokkaido/20/89 (H3N2)	4	<u>8,192</u>
Isolates		
A/Bangkok/1/89	1:64	-
A/Bangkok/2/89	1:128	-
A/Bangkok/3/90	-	1:2048
A/Bangkok/4/90	-	1:2048

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ และค่าการดูดกลืนแสง 260 :
280 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้ 4 ตัวอย่าง

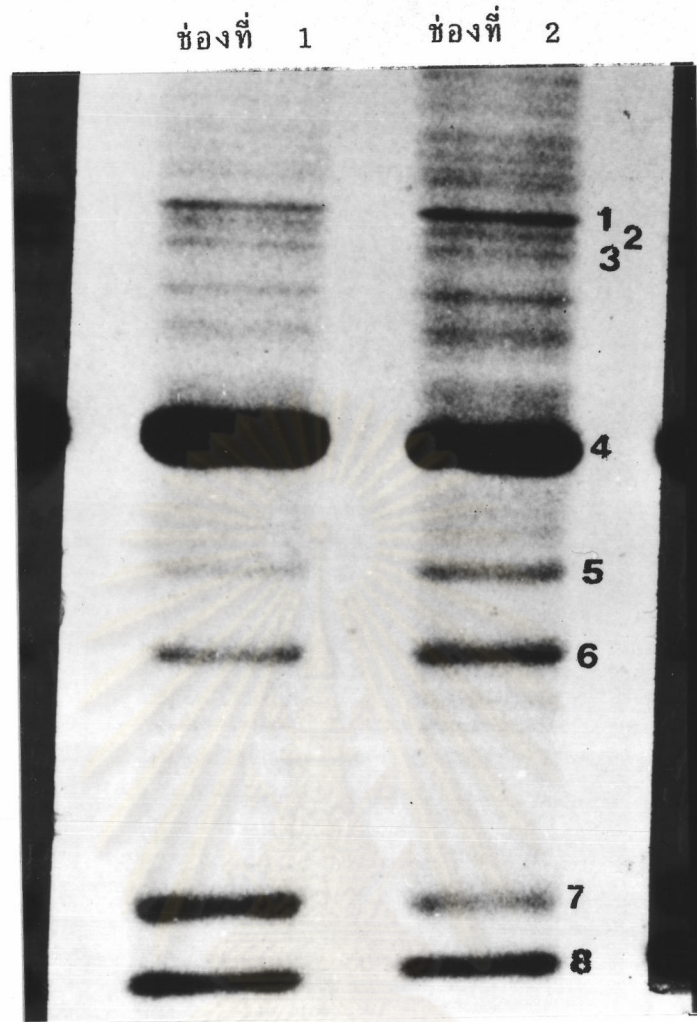
สายพันธุ์	ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 260:280
A/Bangkok/1/89 (H1N1)	0.46	1.80
A/Bangkok/2/89 (H1N1)	0.55	1.75
A/Bangkok/3/90 (H3N2)	0.72	1.82
A/Bangkok/4/90 (H3N2)	0.78	1.85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบพิมพ์ลายนิ้วมือของโพลิโนคลิกโรโทไวรัสไข้หวัดใหญ่
ตัวอย่างหลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสทางที่สอง

สายพันธุ์	จุดที่หาย	จุดที่เพิ่ม	จำนวนจุด ที่เหมือนกัน
A/Bangkok/1/89 (H1N1)	-	-	144
A/Bangkok/2/89 (H1N1)	11	145	144
A/Bangkok/3/90 (H3N2)	-	-	140
A/Bangkok/4/90 (H3N2)	-	141, 142, 143 141, 145	140

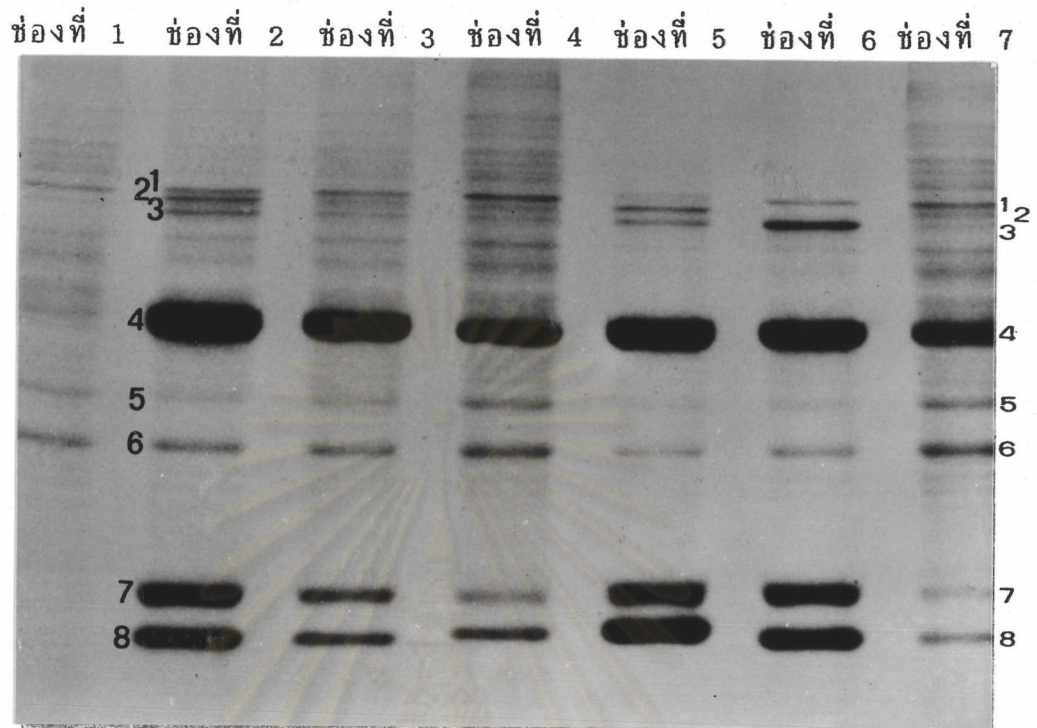
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 รูปแบบโพลีเปปไทด์ จากการย่อยอาร์เอ็นเอไวรัสไข้หวัดใหญ่ตัวอย่าง
กลุ่ม A/H1 ด้วยเอนไซม์ RNase T1 ใน 10% โพลีอะคริลามัดเจล

ช่องที่ 1 A/Bangkok/1/89 (H1N1)

ช่องที่ 2 A/Bangkok/2/89 (H1N1)



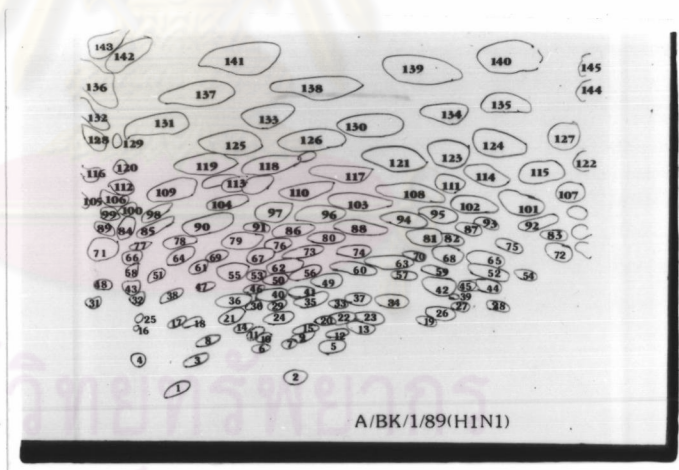
รูปที่ 4 รูปแบบโพลีเปปไทด์ จากการย่อยอาร์เอ็นเอไวรัสไข้หวัดใหญ่ตัวอย่างกลุ่ม A/H3 ด้วยเอนไซม์ RNase T1 ใน 10% โพลีอะคริลาไมเจล อีเลกโตรโฟรีซิส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

- ช่องที่ 1 MOCK
- ช่องที่ 2 A/Bangkok/3/90 (H3N2)
- ช่องที่ 3 A/Bangkok/4/90 (H3N2)
- ช่องที่ 4 A/Shanghai/11/87 (H3N2)
- ช่องที่ 5 A/Sichuan/2/89 (H3N2)
- ช่องที่ 6 A/Hokkaido/20/89 (H3N2)
- ช่องที่ 7 A/Nevada/101/82 (H3N2)

ก.



ข.



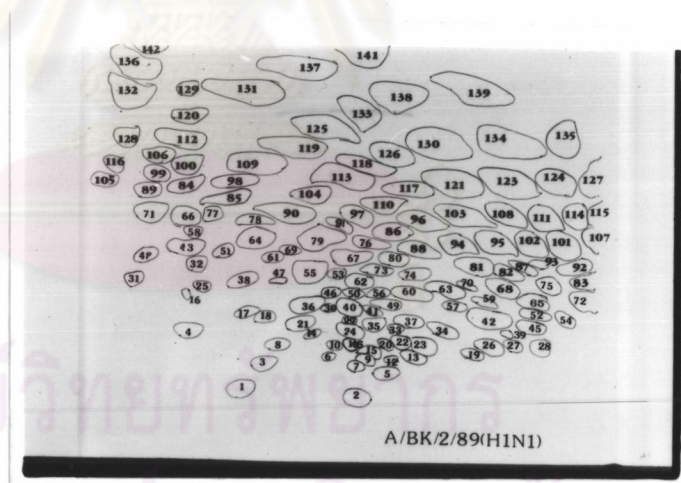
รูปที่ 5 แผนที่รอลิกรณิวคลีรอาทด์ไวรัสฯหัดใหญ่ A/Bangkok/1/89 (H1N1)

- ก. จากการท้ออเตรดิรกรรฟ บนแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์หลังเสร์จลีน การรันน 21.8% ีพลีอะคลิลำมด์เจล อีเลคโตรรพรีชิส ทิศทง ที่สอง
- ข. จากการลอกจุดที่เก็ดขึ้นท้งหมดบนกระดษลอกกลย

ก.



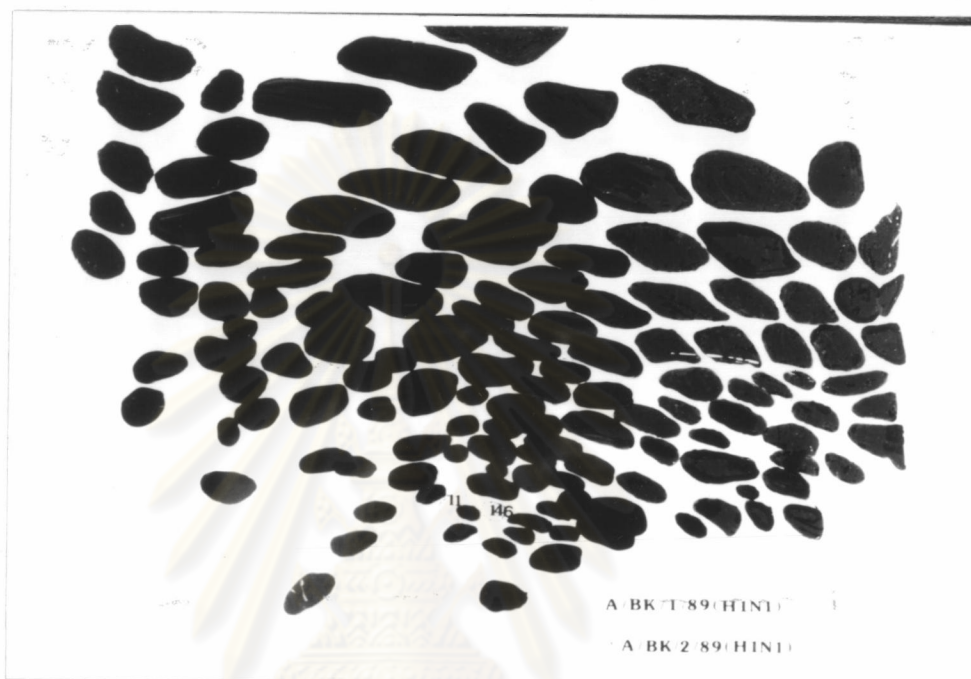
ข.



รูปที่ 6 แผนที่โรลิโกนิวคลีโอโปรตีนไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/2/89 (H1N1)

ก. จากการทาออตเรดิรอกกราฟ บนแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์หลังเสร็จสิ้นการรันใน 21.8% โพลีอะคลิลาไมด์เจล อิเล็กโตรไฟริซิส ที่สทางที่สอง

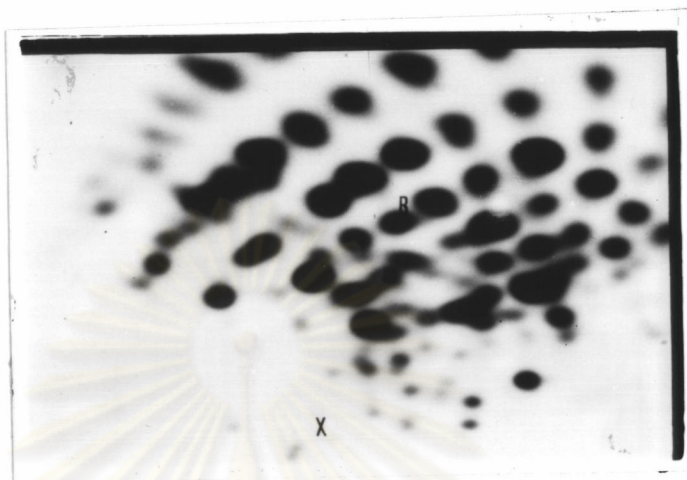
ข. จากการลอกจุดที่เกิดขึ้นทั้งหมดบนกระดาษลอกกลาย



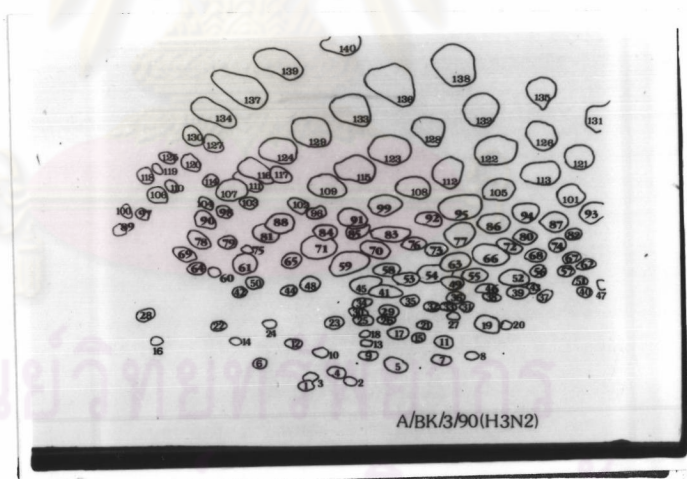
รูปที่ 7 แผนที่รอลิรณินวคสีรอโทด์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/1/89 (H1N1) และ A/Bangkok/2/89 (H1N1) ที่วางซ้อนกัน แสดงจุดที่มีตำแหน่งร่วมกันด้วยวงกลมทึบ และจุดที่มีการเปลี่ยนแปลงด้วยวงกลมประ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.



ข.

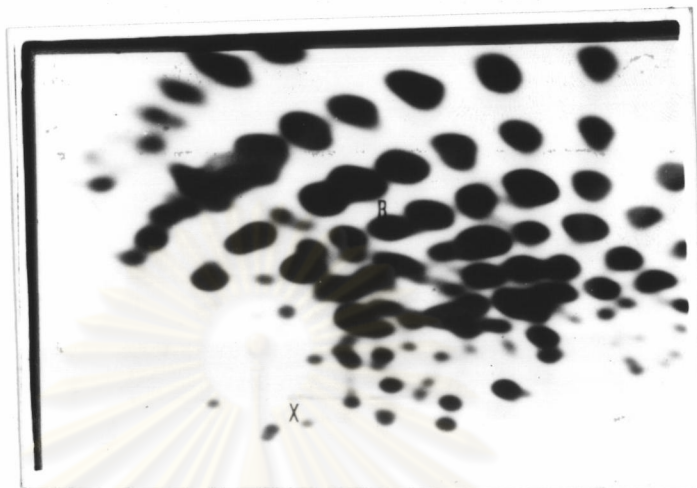


รูปที่ 8 แผนที่โรลิกนิวคลีโอโปรตีนไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/3/90 (H3N2)

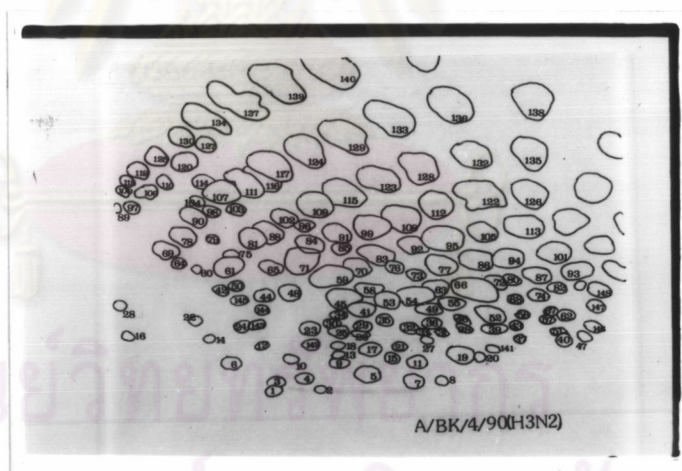
ก. จากการทาบออตเรดิโอกราฟ บนแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์หลังเสร็จสิ้น
การรันใน 21.8% โพลีอะคลิลาไมด์เจล อิเลคโตรเพริซิส ทิศทาง
ที่สอง

ข. จากการลอกจุดที่เกิดขึ้นทั้งหมดบนกระดาษลอกกลาย

ก.



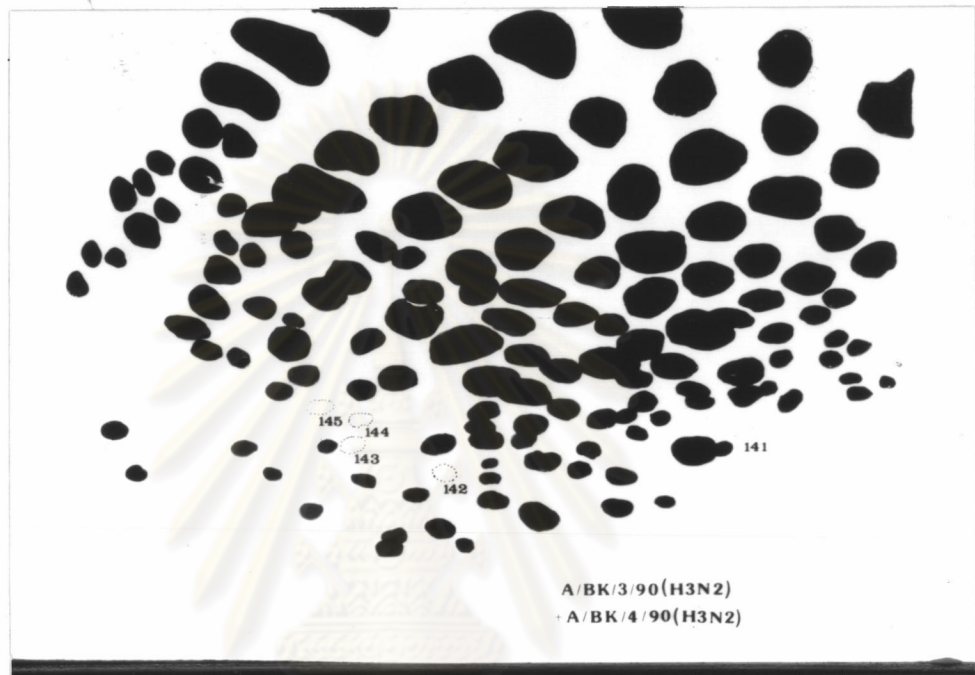
ข.



รูปที่ 9 แผนที่รอลิกรณิวคลีโรเทต์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/4/90 (H3N2)

ก. จากการท้ออเตรดิรอกกราฟ บนแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์หลังเสร็จสิ้นการรันใน 21.8% โพลีอะคลิลามด์เจล อิเลคโตรไฟริซิส ทิศทางที่สอง

ข. จากการลอกจุดที่เกิดขึ้นทั้งหมดบนกระดาษลอกลาย



รูปที่ 10 แผนทีโวลีโรคนิวคลีโอโพรอโตไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) ที่วางซ้อนกัน แสดงจุดที่มีตำแหน่งร่วมกันด้วยวงกลมทึบ และจุดที่มีการเปลี่ยนแปลงด้วยวงกลมประ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย