

เทคโนโลยีทางอนุชีววิทยาในงานโรคติดเชื้อ

ชญาภรณ์ ศรีณพฤณี*

บทคัดย่อ

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา วงการวิทยาศาสตร์หันมาให้ความสนใจเทคโนโลยีด้านพันธุวิศวกรรมมากขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางความคิดและวิทยาการทางอนุชีววิทยา นำไปสู่เทคโนโลยีชีวภาพยุคใหม่ เพื่อพัฒนาศักยภาพของจุลชีพและสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ให้เอื้อประโยชน์ต่อมวลมนุษยชาติ โดยอาศัยคุณสมบัติของยีนซึ่งเป็นรหัสพันธุกรรม มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันและเป็นเอกลักษณ์ และมีความสำคัญต่อการกำหนดพฤติกรรมและลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ องค์ความรู้ทางอนุชีววิทยานำมาประยุกต์ใช้ในการแพทย์ อุตสาหกรรมและงานวิจัย อาทิ งานด้านการวินิจฉัย เกษตรกรรม การผลิตวัคซีน และการตรวจจับทางชีวภาพ เทคนิคทางอนุชีววิทยานำมาพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ได้แก่ ก) การจับคู่สม ใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบจับอย่างจำเพาะกับสายนิวคลีโอไทด์ของจุลชีพก่อโรคที่ต้องการตรวจ ข) การเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลีอิก มีการพัฒนาปฏิกิริยาถูกละโซโพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์โดยเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลีอิกได้เป็นหลายล้านชุดในเวลารวดเร็ว วิธีนี้มีประโยชน์ในกรณีเชื้อในตัวอย่างส่งตรวจมีปริมาณน้อยมากหรือเชื้อที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ค) การตรวจลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความจำเพาะในจุลชีพแต่ละสายพันธุ์ เพื่อแยกแยะความใกล้เคียงของเชื้อก่อโรคลายพันธุ์ต่าง ๆ ง) การตัดกรดนิวคลีอิกด้วยเอนไซม์จำเพาะ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะสายดีเอ็นเอให้เป็นท่อนสั้น ๆ หลังจากการแยกในวันแจ้งที่ผ่านกระแสไฟฟ้า จำนวนและขนาดของสายดีเอ็นเอที่ถูกตัด มีลักษณะจำเพาะของจุลชีพหนึ่ง ๆ เทคนิคทางอนุชีววิทยานำมาพัฒนางานด้านเกษตรกรรม โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความปลอดภัยและประหยัคกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเนื้อเยื่อสัตว์ เทคนิคทางอนุชีววิทยานำมาพัฒนาการผลิตวัคซีน โดยมีการนำยีนเข้าเซลล์ยีสต์หรือแบคทีเรีย จากนั้นเซลล์ดังกล่าวสามารถผลิตโปรตีนปริมาณมากเพื่อใช้สำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เมื่อไม่นานมานี้มีการใช้วัคซีนชนิดดังกล่าวป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบี และมะเร็งปากมดลูกในมนุษย์ ส่วนเทคนิคทางอนุชีววิทยานำมาพัฒนาการตรวจจับทางชีวภาพ ได้แก่ การตรวจหาร่องรอยของการได้รับอาวุธชีวภาพซึ่งต้องอาศัยการตรวจที่มีความไวสูง

คำสำคัญ: อนุชีววิทยา โรคติดเชื้อ พันธุวิศวกรรม พีซีอาร์ สารพันธุกรรม

บทนำ

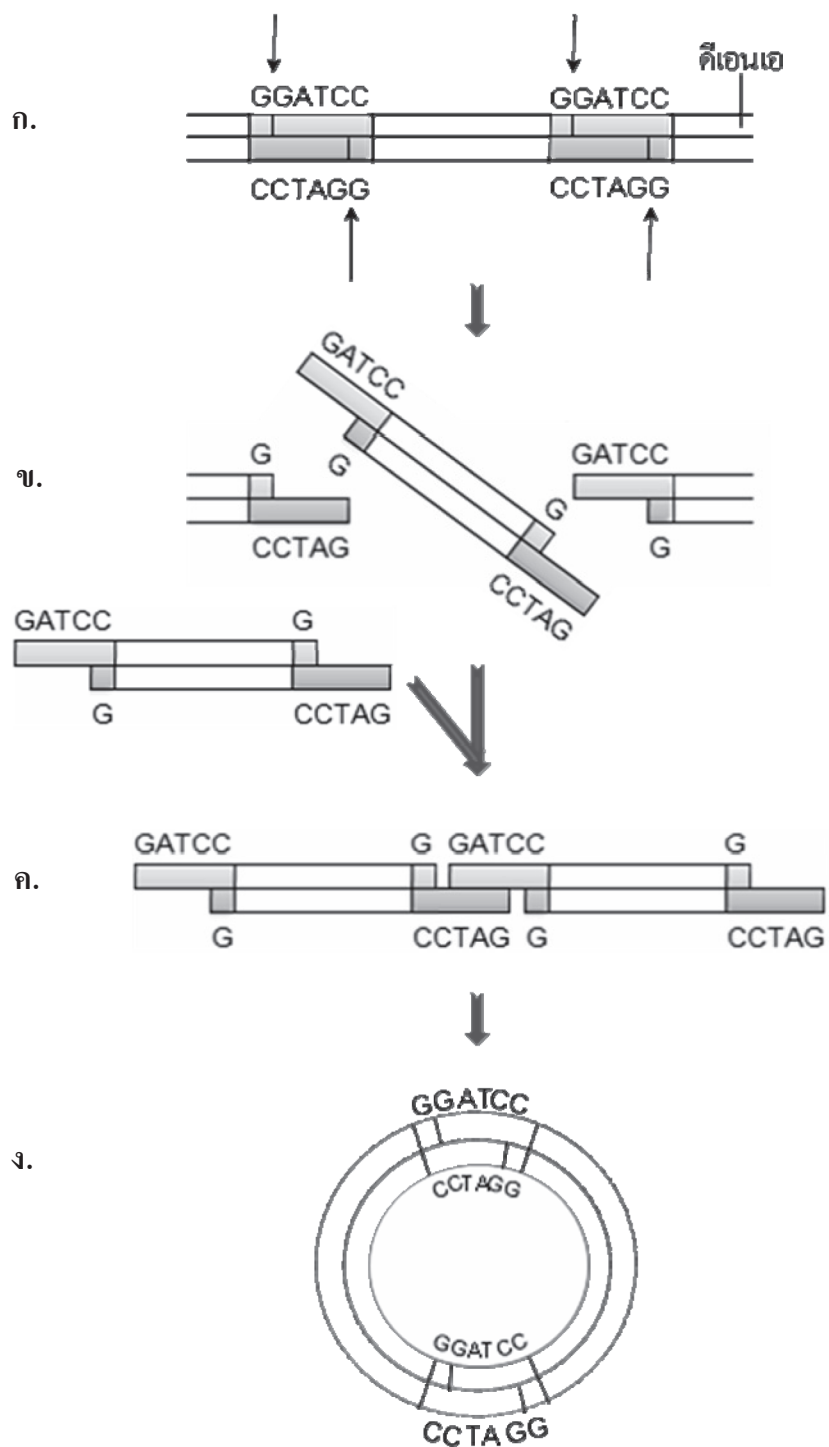
ในยุคเริ่มแรกของเทคโนโลยีชีวภาพ จุลชีพถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหาร ได้แก่ ไวน์ น้ำส้มสายชู โยเกิร์ต และยังใช้จุลชีพในการผลิตอาหารต่อมานานนับศตวรรษ จนกระทั่งเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่เริ่มพัฒนาอย่างจริงจังในช่วง 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมา ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากทางแนวความคิดและเทคนิคทางอนุชีววิทยา มีการนำเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant DNA technology) มาพัฒนาศักยภาพของแบคทีเรีย ไวรัส ยีสต์ และเชื้อราให้เป็นเสมือนโรงงานผลิตสารชีวภาพขนาดเล็ก การนำเทคโนโลยีนี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์ในพืชและสัตว์ และการผลิตโปรตีน วัคซีน และเอนไซม์ เพื่อใช้ในการแพทย์¹ และการสาธารณสุขทั้งระดับปฐมภูมิและทุติยภูมิ โดยเฉพาะการตรวจวินิจฉัยเชื้อที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและการวินิจฉัยโรคติดเชื้อในผู้ป่วยและชุมชน ในบทความนี้จะอธิบายถึงสาระสำคัญเกี่ยวกับเทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ สาธารณสุขและเภสัชกรรมโดยเน้นเกี่ยวกับโรคติดเชื้อเป็นสำคัญ

พันธุวิศวกรรม

พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) มีต้นกำเนิดจาก genetic recombination หมายถึงการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต เพื่อเปลี่ยนลักษณะหรือเพื่อให้สิ่งมีชีวิตนั้นสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ (โดยทั่วไปเป็นโปรตีน) ซึ่งเดิมก่อนมีการเปลี่ยนแปลงสิ่งมีชีวิตนั้นไม่สามารถสร้างได้²

การบุกเบิกงานด้านพันธุวิศวกรรมเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1971 เมื่อ Berg และคณะแห่งมหาวิทยาลัยสแตนฟอร์ด แคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา นำดีเอ็นเอ (DNA หรือ Deoxyribonucleic acid) ที่ได้จากไซเมียนไวรัส-40 (Simian virus-40; SV-40) มาตัดต่อเข้ากับโครโมโซมของแบคทีเรียเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสม ในช่วงเวลาเดียวกัน Boyer และคณะแห่งมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย เมืองซานฟรานซิสโก ได้แยกเอนไซม์ที่เรียกว่า restriction endonuclease ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษสามารถตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะของสายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ทำให้ส่วนปลายของสายดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวสั้นๆ เรียกว่า sticky ends ซึ่งพร้อมที่จะต่อกันใหม่อีกครั้งกับสายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกัน² (ภาพที่ 1)

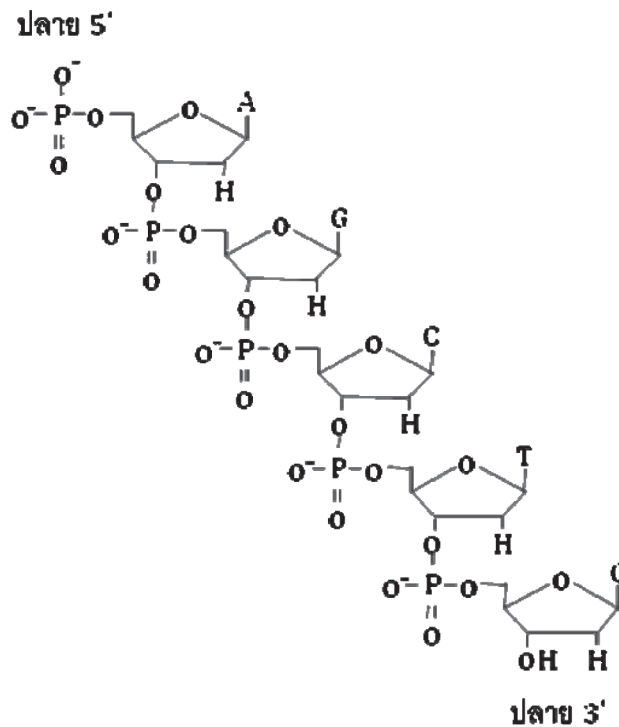
ดีเอ็นเอประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์หลายหน่วยต่อกันเป็นเส้นยาวและเป็นสายคู่ แต่ละหน่วยของนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซีไรโบสและกลุ่มฟอสเฟต เชื่อมกับเบสหนึ่งชนิด คือ อะดีนีน (A) กวานีน (G) ไซโตซีน (C) หรือไทมีน (T) (ภาพที่ 2) การเรียงลำดับเบสในสายดีเอ็นเอเหมือนกัน ไม่ว่าจะอ่านจากซ้ายไปขวาหรือขวาไปซ้าย (palindrome) เอนไซม์จึงตัดดีเอ็นเอได้ทั้งสองสาย ดังนั้นนักพันธุวิศวกรรมจึงใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเสมือนเป็นกรรไกรในการตัดสายดีเอ็นเอ และแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตอื่นโดยใช้เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) เชื่อมดีเอ็นเอทั้งสองสายเข้า ก. เอนไซม์จำเพาะตัดดีเอ็นเอสายคู่ที่ตำแหน่งจำเพาะของสายนิวคลีโอไทด์ ข. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มี sticky ends ที่ปลายทั้งสองข้าง ค. ดีเอ็นเอนั้นสามารถต่อกันใหม่อีกครั้งกับสายดีเอ็นเอ



ภาพที่ 1 เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant DNA Technology)

จากแหล่งอื่นที่จำเพาะต่อกัน ได้แก่ พลาสมิด ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เดียวกันหรือเอนไซม์ที่ตัดแล้วได้ sticky

ends เหมือนกัน. ดีเอ็นเอไลเกสเชื่อมดีเอ็นเอทั้งสองสายเข้าด้วยกันได้ดีเอ็นเอสายผสมด้วยกัน โดยปกติ



ภาพที่ 2 โครงสร้างของดีเอ็นเอ ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์หลายหน่วยต่อเป็นสายยาว

แล้วเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอในระหว่างการสร้างและการซ่อมแซมส่วนของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอยู่แล้ว

ปัจจุบันเอนไซม์สำหรับตัดสายดีเอ็นเอจำนวนมากแยกได้จากแบคทีเรียการตั้งชื่อของเอนไซม์เหล่านี้จึงตั้งตามชื่อของจุลชีพที่แยกเอนไซม์มา เช่น เอนไซม์ *EcoRI* (*Escherichia coli* Restriction enzyme I) แยกได้จากแบคทีเรีย *E. coli* เป็นต้น

เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมอีกประการหนึ่งคือการใส่ดีเอ็นเอหรือพลาสมิด (ดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่อยู่นอกโครโมโซมมีลักษณะเป็นวง) เข้าไปในเซลล์ในปี ค.ศ. 1968 Cohen แห่งมหาวิทยาลัยสแตนฟอร์ด ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับพลาสมิดของ *E. coli* แยก

พลาสมิดและนำพลาสมิดไปใส่ใน *E. coli* ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยแช่ *E. coli* ในแคลเซียมคลอไรด์และให้ความร้อนในทันทีทำให้ *E. coli* พร้อมที่จะรับพลาสมิดเข้าไปด้วยกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน (transformation process) พลาสมิดที่เข้าสู่เซลล์แล้วสามารถเพิ่มจำนวนทันทีที่เข้าไปในเซลล์ โดยพลาสมิดที่เพิ่มขึ้นจะมีลักษณะเหมือนๆ กัน ต่อมาในปี ค.ศ. 1972 Boyer และ Cohen ได้ทดลองตัดต่อยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นเข้ากับพลาสมิด โดยแยกพลาสมิดจาก *E. coli* และตัดพลาสมิดนั้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นจึงเชื่อมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นแทรกเข้าไปในพลาสมิดที่ตัดเตรียมไว้โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส แล้วใส่พลาสมิดนั้นเข้าไปใน *E. coli*²

และในปี ค.ศ. 1973 การตัดต่อยีนจาก *Staphylococcus aureus* เข้าสู่ *E. coli* ประสบความสำเร็จ ทำให้วงการวิทยาศาสตร์เห็นความสำคัญและหันมาสนใจพันธุวิศวกรรมอย่างจริงจังมากขึ้น และมีการพัฒนาเทคโนโลยีดังกล่าวจนสามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ที่สำคัญประการหนึ่งคือ การพัฒนาเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ

เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ

จุลชีพแต่ละชนิดรวมทั้งแบคทีเรียมีดีเอ็นเอหรือลำดับของนิวคลีโอไทด์จำเพาะเปรียบเสมือนเอกลักษณ์ลายนิ้วมือของคน และด้วยความแตกต่างและความเป็นเอกลักษณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างแม่นยำ การตรวจทางอณูชีววิทยาใช้เทคนิค 4 วิธีการหลัก ดังนี้

1. การจับคู่สม (Hybridization) เป็นการจับคู่ของเบสบนกรดนิวคลีอิกสองเส้นอย่างเหมาะสม ซึ่งจะดีนินจะจับกับไซมีน และกวานีนจะจับกับไซโตซีนเสมอ การที่กรดนิวคลีอิกสองเส้นจะจับเข้าคู่กันได้พอดีจำเป็นต้องมีลำดับการเรียงตัวของเบสที่เป็นคู่สมกันเท่านั้น ด้วยหลักการนี้จึงนำมาใช้เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุ โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ (DNA probes) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้นๆ สามารถจับ (hybridize) อย่างจำเพาะกับสายนิวคลีโอไทด์ของจุลชีพก่อโรคที่ต้องการตรวจ การผลิตดีเอ็นเอตรวจสอบต้องทราบก่อนว่าดีเอ็นเอส่วนใดหรือยีนใดที่เป็นเป้าหมายจำเพาะของตัวตรวจสอบ จากนั้นจึงใช้ข้อมูลดังกล่าวสร้างดีเอ็นเอตรวจสอบสายเดี่ยวขึ้นมา แล้วจึงนำมาทดสอบกับดีเอ็นเอที่เตรียมจากเชื้อจุลชีพที่ต้องการตรวจวินิจฉัย ถ้าสองเส้นสามารถจับกันได้แสดงว่าเชื้อจุลชีพที่สงสัยเป็นเชื้อชนิดเดียวกับเชื้อจุลชีพที่นำมาเป็นตัวตรวจสอบ วิธีการจับคู่สมนี้

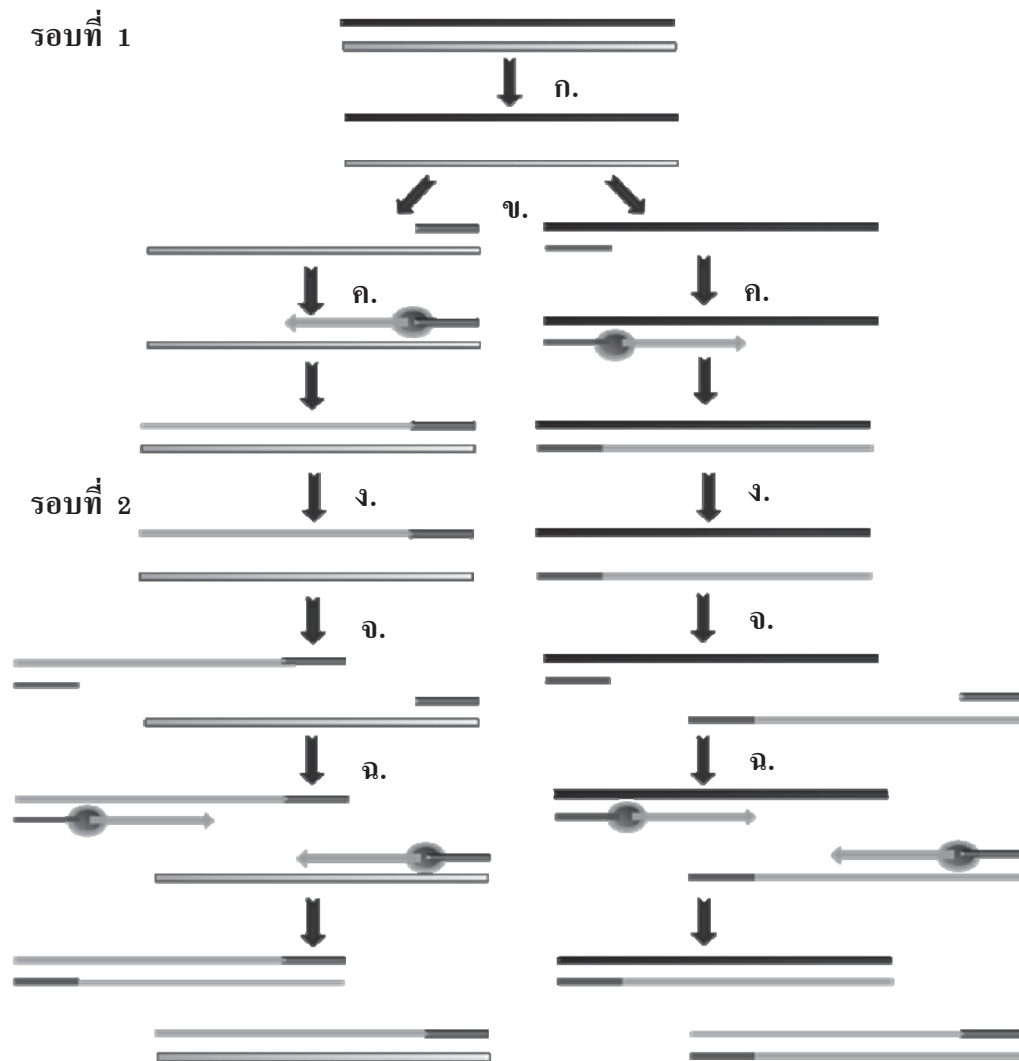
นอกจากจะเป็นการจับในลักษณะดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ อาจเป็นการจับในลักษณะอื่นได้ ได้แก่ อาร์เอ็นเอ-อาร์เอ็นเอ หรือดีเอ็นเอ-อาร์เอ็นเอก็ได้ เมื่อมีการจับคู่สมของสองเส้นแล้ว เรายังไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ถ้าเช่นนั้นแล้วจะทราบได้อย่างไรว่าเกิดการจับคู่แล้ว? ในอดีตนิยมใช้สารกัมมันตภาพรังสี (^{32}P , ^{125}I หรือ ^{35}S) นำมาติดฉลากกับดีเอ็นเอตรวจสอบและอ่านผลด้วยฟิล์มเอกซเรย์ การใช้สารกัมมันตภาพรังสีมีอันตราย ในปัจจุบันจึงนิยมใช้สารเคมี เช่น biotin หรือ digoxigenin ติดฉลากกับดีเอ็นเอตรวจสอบแทน การอ่านผลได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์ที่เชื่อมต่อกับสารเคมีเหล่านี้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำให้เกิดสีหรือการเรืองแสงได้ การเปลี่ยนแปลงของสีหรือการเรืองแสงสามารถวัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer หรือเครื่องวัดการเรืองแสง ได้แก่ fluorometer, luminometer และ flow cytometer เป็นต้น

วิธีการจับคู่สม สามารถทำได้ 3 รูปแบบ คือ solid-phase hybridization, liquid-phase hybridization และ *in situ* hybridization การทำ solid-phase hybridization กรดนิวคลีอิกเป้าหมายถูกตรึงอยู่บนแผ่นไมลอนหรือไนโตรเซลลูโลส การทำ liquid-phase hybridization กรดนิวคลีอิกเป้าหมายและตัวตรวจสอบอยู่ในสารละลาย ส่วนการทำ *in situ* hybridization เป็นการตรวจหากรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่อยู่ภายในเซลล์ และสามารถประยุกต์ในสิ่งส่งตรวจหรือเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยได้ โดยทั่วไปเซลล์เหล่านั้นถูกตรึงอยู่บนแผ่นกระจกสไลด์ และสามารถตรวจดูผลจากการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า fluorescent *in situ* hybridization (FISH) ปัจจุบันการพัฒนาดีเอ็นเอตรวจสอบสำหรับตรวจหาจุลชีพก่อโรคมียากกว่า 100 ชนิด จึงนับว่าการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบเป็นวิธีที่เชื่อถือได้และรวดเร็วในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อในคน ตัวอย่างการประยุกต์เทคนิคการจับคู่สมในงานวินิจฉัยโรคติด

เชื้อ ได้แก่ การตรวจอย่างรวดเร็วและการจแน้นแบคทีเรียมีชีวิตในแหล่งน้ำ โดยใช้ peptide nucleic acid probe³ การตรวจหา *Helicobacter pylori* ในสิ่งส่งตรวจโดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization⁴ และการตรวจหา *Legionella* ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมโดยใช้เทคนิค FISH³ วิธีการจับคู่สมมีข้อดีในเรื่องระดับความจำเพาะที่สูง แต่ยังมีข้อจำกัดด้านความไว (ต้องมีดีเอ็นเอเป้าหมาย > 10⁴ ไมเลกุล) ดังนั้นในบางกรณีจึงต้องทำการตรวจร่วมกับเทคนิคทางอณูชีววิทยาอื่นๆ เพื่อยืนยันผลการตรวจด้วย

2. การเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิก (Amplification) การเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิกที่มีจำนวนน้อยให้มากขึ้น สามารถทำได้และมีประโยชน์อย่างมากในกรณีที่เชื้อในตัวอย่างส่งตรวจมีปริมาณน้อยเกินไปที่จะตรวจพบได้โดยวิธีการจับคู่สม การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกนี้อาจเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมาย หรือตัวตรวจสอบ หรือสัญญาณก็ได้ โดยใช้วิธีการที่เรียกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลีอิกจาก 1 ชุดเป็นสิบล้านชุดได้ในเวลารวดเร็ว ผลผลิตของพีซีอาร์เรียกว่าแอมพลิคอน (amplicon) ขั้นตอนการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก (ภาพที่ 3) ขั้นตอนแรก เรียกว่า การแยกสายดีเอ็นเอด้วยความร้อน (heat denaturation) เป็นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (melting temperature) โดยดีเอ็นเอตั้งต้น (DNA template หรือ DNA target) ทำหน้าที่เป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์สายดีเอ็น

เอใหม่ต่อไป ขั้นตอนที่สอง เรียกว่า การเชื่อมไพรเมอร์เข้ากับสายดีเอ็นเอ (primer annealing) ใช้ไพรเมอร์ (primers) ซึ่งเป็นกรดนิวคลีอิกสายสั้นจับคู่สมที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบ และขั้นตอนที่สาม เรียกว่า การสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสทำหน้าที่เชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เข้ากับไพรเมอร์ตามลำดับสอดคล้องกับดีเอ็นเอต้นแบบ จนได้ดีเอ็นเอสายใหม่ (complementary strands) ในปฏิกิริยาใช้ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟส (dNTP) แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) และบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นเหมาะสม หลังจากการสังเคราะห์แต่ละรอบดีเอ็นเอสายใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นจะเป็นต้นแบบสำหรับสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ในรอบถัดไปด้วย ดังนั้นจำนวนรอบที่มากขึ้น ทำให้ได้แอมพลิคอนที่มากขึ้นแบบทวีคูณตามไปด้วย การทำพีซีอาร์โดยทั่วไปใช้ 25-30 รอบทำในหลอดทดลองขนาดเล็ก และใช้เครื่อง thermalcycler แบบอัตโนมัติ ซึ่งสามารถตั้งอุณหภูมิเวลา และจำนวนรอบของการทำพีซีอาร์ได้ เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่นำมาใช้ได้จากแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่ในน้ำพุร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส เช่น *Thermus aquaticus* ประสิทธิภาพของเอนไซม์จึงไม่ถูกทำลายในเวลารวดเร็วเมื่อใช้อุณหภูมิสูงขณะทำพีซีอาร์ ก. และ จ. บ่มดีเอ็นเอเป้าหมายที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยว ข. และ จ. บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์สายสั้นๆ 2 เส้น จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว ค. และ ฉ. บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อไป



ภาพที่ 3 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์

ในปัจจุบันเทคนิคพีซีอาร์ได้รับการพัฒนาในรูปแบบต่างๆ เพื่อให้มีความจำเพาะและความไวมากขึ้นสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ได้แก่

ก. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้อาร์เอ็นเอตั้งต้น เพื่อเป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเตส (reverse transcriptase) หรือ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเตส⁵ ก่อนเริ่มกระบวนการพีซีอาร์ตามปกติ

ข. Nested PCR เป็นการทำให้พีซีอาร์ 2 ครั้ง และใช้ไพรเมอร์ครั้งที่ 1 คู่ โดยออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ครั้งแรกให้จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ส่วนไพรเมอร์ที่ใช้ในพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ออกแบบให้อยู่ในส่วนของแอมพลิคอนที่ได้จากการทำพีซีอาร์ในครั้งแรก และใช้แอมพลิคอนจากพีซีอาร์ครั้งแรกนั้นเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ซึ่งวิธีนี้ช่วยเพิ่มความจำเพาะของเทคนิคพีซีอาร์

ค. Multiplex PCR เป็นการทำให้พีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ตั้งแต่ 2 คู่ขึ้นไปในแต่ละปฏิกิริยา โดยต้องเลือกคุณสมบัติให้เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่นำมาใช้ทั้งหมด โดยไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ต้องได้รับการออกแบบให้จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่แตกต่างกันไป เทคนิคนี้จึงเป็นประโยชน์ในการตรวจคุณภาพตัวอย่างที่มีจุลชีพหรือดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป

ง. Real-time PCR สามารถตรวจดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในขณะที่ทำพีซีอาร์ได้ โดยมี 2 หลักการในการตรวจแอมพลิคอนที่เพิ่มขึ้น คือการใช้ดีเอ็นเอซึ่งติดสารเรืองแสง (DNA-binding fluorophores) เช่น SYBR Green, ethidium bromide และ YO-PRO-1 และการใช้ตัวตรวจสอบจำเพาะ (specific oligoprobes) ที่มี fluorescence reporter (R) และ quencher (Q) ซึ่งวิธี real-time PCR ช่วยเพิ่มความรวดเร็วในการตรวจสอบโดยบอกทั้งปริมาณ

และคุณภาพ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของเครื่องมือที่ยังคงมีราคาสูง

ตัวอย่างการประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์ในงานวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ได้แก่ การตรวจคัดกรองผู้เป็นพาหะ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) อย่างรวดเร็วโดยวิธีพีซีอาร์⁶, การตรวจหา *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* และ *Haemophilus influenzae* ในเลือดและน้ำไขสันหลังโดยใช้เทคนิค fluorescence-based PCR³, การตรวจหา *Legionella* ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม โดยใช้เทคนิค nested PCR⁷, การตรวจหาอินทรีย์วัตถุพิษ VT1 และ VT2 ใน *E. coli* O157:H7 ในเนื้อบดโดยใช้เทคนิค real-time PCR³, การตรวจหา *Burkholderia pseudomallei* ในดินโดยวิธี real-time PCR⁸, การตรวจหา *Helicobacter pylori* ในสิ่งส่งตรวจโดยใช้เทคนิค real-time RT-PCR⁴ และการตรวจหา MRSA โดยใช้ hybridization probe ในการทำ real-time PCR³

วิธีพีซีอาร์มีข้อจำกัดและข้อควรระวัง เนื่องจากการตรวจหาเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหารอาจมีสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), ฮีม (heme), ฟีนอล (phenol) และสารที่มีประจุไฟฟ้า (cations)⁵ การลดปริมาณสารยับยั้งจะช่วยป้องกันการเกิดผลปลอม นอกจากนี้ในการทำพีซีอาร์ควรมีตัวอย่างที่ทราบแล้วว่าให้ผลบวกหรือผลลบเพื่อเป็นตัวควบคุม โดยทำควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่างทุกครั้ง ซึ่งจะทำให้ผลตรวจตัวอย่างมีความน่าเชื่อถือ การเกิดผลบวกปลอมเป็นสิ่งที่ต้องระวังเช่นกัน เนื่องจากอาจเกิดขึ้นได้ง่ายจากการปนเปื้อนจากหลอดหนึ่งไปอีกหลอดหนึ่งในระหว่างการปฏิบัติงาน

นอกจากเทคนิคพีซีอาร์แล้ว ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้หลักของการแทนที่ (strand

displacement) ซึ่งไฟเบอร์ถูกออกแบบเป็นพิเศษ อย่างน้อย 4 เส้น (2 คู่) และใช้เอนไซม์บีเอสทีดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Bst* DNA polymerase) ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำให้เกิดการแทนที่ของดีเอ็นเอทำให้แอมพลิคอนสามารถแยกออกจากกันได้ โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูงในขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงสามารถใช้เพียงอุณหภูมิเดียวตลอดปฏิกิริยาได้ (65 องศาเซลเซียส) มีรายงานการใช้เทคนิค LAMP เพื่อตรวจการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ (Herpes Simplex Virus)⁹ ปัจจุบันบริษัทไอเคน (Eiken) ได้พัฒนาเป็นชุดตรวจสำเร็จรูป¹⁰ ด้วยวิธี LAMP สำหรับตรวจ *Legionella*, *Salmonella*, verotoxin-producing *E. coli*, *E. coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* และ Norovirus GI/GII

3. การตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ในการตรวจลำดับการเรียงตัวของเบสบนสายดีเอ็นเอหรือยีนซึ่งมีความจำเพาะในจุลชีพแต่ละสายพันธุ์ สามารถแยกแยะความใกล้เคียงของสายพันธุ์ต่างๆ ได้ ในปัจจุบันมีเครื่องตรวจระบบอัตโนมัติทำให้ง่ายและสะดวกในการปฏิบัติงานตัวอย่างการประยุกต์เทคนิคนี้ในงานวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ได้แก่ การตรวจหา *Legionella* ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม¹¹ และการตรวจหาโปรตีนเพื่อการตรวจวินิจฉัย *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* โดยการวิเคราะห์ยีนทั้งหมด (whole genome analysis)³ เป็นต้น

4. การตัดกรดนิวคลีอิกด้วยเอนไซม์ (Enzymatic digestion) วิธีนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งของกรดนิวคลีอิกที่มีการเรียงตัวที่จำเพาะ (ขนาดประมาณ 4-6 นิวคลีโอไทด์) ให้เป็นท่อนสั้นๆ แล้วนำไปแยกในวุ้นแข็งที่ผ่านกระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอจะวิ่งตามกระแส

ไฟฟ้าด้วยความเร็วต่างกันตามขนาดของสายดีเอ็นเอที่ถูกตัด เมื่อย้อมด้วยสาร ethidium bromide จะมองเห็นแถบดีเอ็นเอได้เมื่อส่องกับแสงอัลตราไวโอเลต จำนวนและขนาดของสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดมีลักษณะจำเพาะของจุลชีพหนึ่งๆ และต่างจากจุลชีพชนิดอื่นๆ วิธีนี้นิยมใช้วิเคราะห์แยกความแตกต่างของจุลชีพที่มีความใกล้เคียงกันของสายพันธุ์ของเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง ตัวอย่างการประยุกต์เทคนิคนี้ในงานโรคติดเชื้อ ได้แก่ การศึกษาวิทยาการระบาดของไวรัสตับอักเสบบชนิดบี¹²

การวิจัยโดยใช้เทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาเพื่อการตรวจวินิจฉัย นับว่ามีความสำคัญต่อวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ในประเทศไทยอย่างมาก อาทิ ดร.แพทย์หญิงปณิธิ อภิวิธานนท์ จากหน่วยอณูชีววิทยาการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ร่วมกับ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ได้พัฒนาการตรวจและการพยากรณ์การเกิดโรคไขเลือดออกชนิดรุนแรง ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการรักษาพยาบาลได้ทันเวลาที่ ช่วยลดภาวะเสี่ยงต่อการหมดสติ และเสียชีวิตในรายที่ป่วยหนัก ชุดตรวจนี้ได้รับสิทธิบัตรการประดิษฐ์ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาและเยอรมัน และขณะนี้อยู่ระหว่างการพัฒนาแบบการทดสอบให้ง่ายและรวดเร็วขึ้นไบโอเทคและมหาวิทยาลัยมหิดล สนับสนุนรองศาสตราจารย์ ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยวัณโรคแบบทราบผลเร็ว โดยตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจเพื่อทราบชนิดของเชื้อมัยโคแบคทีเรียในเวลาอันรวดเร็ว นอกจากนี้ไบโอเทคสนับสนุนรองศาสตราจารย์ ดร.ศรีสุรางค์ ต้นติมาวานิช คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ออกแบบตัว

ตรวจจับจำเพาะในการเพิ่มจำนวนขึ้น และศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราที่เป็นสาเหตุของโรคนี้หนู เพื่อสามารถบ่งบอก serovar และวินิจฉัยแยกสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งมีประโยชน์ในการหาแหล่งต้นตอการแพร่ระบาดของเชื้อในงานด้านระบาดวิทยา

ซึ่งการเลือกใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาชนิดใดเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ขึ้นอยู่กับรายละเอียดและข้อมูลของจุลชีพก่อโรคที่ต้องการตรวจวินิจฉัย ว่ามีความเหมาะสมกับเทคนิคดังกล่าวมากน้อยเพียงไร นอกจากนี้ควรคำนึงถึงความสะดวกรวดเร็ว ไม่ซับซ้อน และงบประมาณที่ใช้ จึงจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์ การพัฒนาเทคนิคทางอนุชีววิทยาหรือเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ในภาคสนามเป็นอีกประเด็นหนึ่งที่นำจับตามองและควรได้รับการสนับสนุนอย่างยิ่ง

เทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่องานทางเภสัชกรรม

ปัจจุบันการใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อมีปริมาณสูงมาก ยาปฏิชีวนะที่มีจำหน่ายหลายชนิดผลิตขึ้นโดยตรงจากจุลชีพตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียหรือเชื้อราสร้างยาปฏิชีวนะได้ในปริมาณน้อยมาก ในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมาการพัฒนา ยาปฏิชีวนะให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น แต่ไม่มีการค้นพบยาปฏิชีวนะประเภทใหม่² ปัจจุบันจึงมีการดัดแปลงพันธุกรรมของจุลชีพ เพื่อให้ผลิตยาปฏิชีวนะในปริมาณที่มากขึ้น หรือดัดแปลงยาปฏิชีวนะเพื่อใช้กับจุลชีพก่อโรคที่ดื้อยาได้ ผลิตภัณฑ์ทางด้านเภสัชกรรมที่ใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมในการผลิตมีหลากหลาย¹ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย *E. coli* ได้แก่ Epidermal growth factor (EGF) - ใช้เพื่อรักษาบาดแผล แผลไฟไหม้ และแผลเนื่องจากฝี, Human growth hormone (hGH) - ใช้เพื่อแก้ไขการเจริญเติบโตบกพร่องในเด็ก, Human insulin - ใช้เพื่อ

รักษาโรคเบาหวาน, Interleukins - ใช้เพื่อควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน และรักษาริดะเร็ง, Relaxin - ใช้เพื่อช่วยให้ทารกคลอดง่ายขึ้น, Taxol - ใช้เพื่อรักษามะเร็งรังไข่, Tumor necrosis factor (TNF) - ใช้เพื่อให้เซลล์มะเร็งแยกตัวออกจากกัน เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย *E. coli* และยีสต์ ได้แก่ Interferon- α - ใช้เพื่อต้านการติดเชื้อไวรัส โดยใช้ร่วมกับสารต้านไวรัสชนิดอื่น, Colony-stimulating factor (CSF) - ใช้เพื่อกระตุ้นการผลิตเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยเอดส์ รักษาภูมิแพ้, Prourokinase - ใช้เพื่อรักษาอาการหัวใจวาย เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย mammalian cell culture ได้แก่ Monoclonal antibodies - ใช้เพื่อรักษามะเร็ง การปฏิเสธอวัยวะปลูกถ่าย และใช้ในการตรวจวินิจฉัย, Bone morphogenic proteins - ใช้เพื่อกระตุ้นการสร้างกระดูกใหม่ และช่วยในการศัลยกรรม, Tissue plasminogen activator (Activase) - ใช้เพื่อละลาย fibrin ในก้อนเลือด และรักษาอาการหัวใจวาย เป็นต้น

ในประเทศไทยมีการจัดตั้งศูนย์วิจัยเภสัชพันธุศาสตร์ โดยความร่วมมือของศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิทยาศาสตร์ของประเทศไทยและโรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล โดยได้ดำเนินการศึกษาวิจัยทางเภสัชพันธุศาสตร์ในโรคติดเชื้อเอชไอวี โรคธาลัสซีเมีย โรคเบาหวาน โรคภูมิแพ้ในเด็ก โรคระบบหลอดเลือดหัวใจ และภาวะแพ้ยาหรือภาวะไวเกินต่อยา การวิจัยโดยใช้เทคโนโลยีทางอนุชีววิทยาเพื่องานทางเภสัชกรรมในประเทศไทย เริ่มพัฒนาเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับได้แก่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) นำโดยศาสตราจารย์ ดร.ยงยุทธ ยุทธวงศ์ ร่วมกับคณะวิทยาศาสตร์และคณะเวชศาสตร์เขตร้อนมหาวิทยาลัยมหิดล และมหาวิทยาลัยเอเดนเบิร์ก สหราชอาณาจักร คิดค้นยาต้านมาลาเรียชนิดใหม่ เภสัชภัณฑ์บางชนิด เช่น อิรีโทรพอยเอทิน (Erythropoietin) ซึ่งอายุของสิทธิบัตรหมดลงแล้ว จึงมีการสร้างโรงงานเพื่อ

ผลิตสารดังกล่าว โดยความร่วมมือของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี นอกจากนี้ยังมีความร่วมมือของอินเดียร่วมกับหน่วยงานวิจัยในเมืองไทย (ไม่ระบุ) ในการผลิตจีเอ็มซีเอสเอฟ (GM-CSF) เพื่อใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็ง เป็นต้น อย่างไรก็ตามในการผลิตยาบางชนิดอาจจะยังคงคิดเงื่อนไขทางสิทธิบัตรและความเชี่ยวชาญของหน่วยงานภาครัฐ ในการพัฒนาวิทยาการระดับอนุชีววิทยาเพื่องานทางเภสัชกรรมของประเทศไทย

เทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่อการผลิตวัคซีน

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางด้านพันธุวิศวกรรม ส่งผลให้มีผลิตภัณฑ์วัคซีนมากขึ้นเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อ ได้แก่ โรคหัด โรคคางทูม โรคโปลิโอ โรคอีสุกอีใส โรคหัด โรคพิษสุนัขบ้า โรคคอตีบ และโรคบาดทะยัก ในอดีตผู้ที่ได้รับวัคซีนตัวเป็น (live-attenuated vaccine) ซึ่งเตรียมจากจุลชีพโดยตรง มีโอกาสป่วยเป็นโรคหลังจากการได้รับวัคซีน การพัฒนาวัคซีนแบบหน่วยย่อย (subunit vaccines) ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการใช้จุลชีพทั้งตัวหรือสารพิษของจุลชีพทั้งโมเลกุล จึงไม่มีความเสี่ยงสำหรับผู้ได้รับวัคซีน วัคซีนชนิดนี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งของโปรตีนของเชื้อก่อโรค ผลิตขึ้นโดยการตัดต่อยีนที่สร้างโปรตีนที่ต้องการไปใส่ในโฮสต์ ได้แก่ ยีสต์ เพื่อให้ยีสต์สามารถผลิตโปรตีนของเชื้อจุลชีพก่อโรคได้ ทำให้สามารถเตรียมได้จำนวนมากและแยกให้บริสุทธิ์ได้ง่าย² ตัวอย่างวัคซีนแบบหน่วยย่อย ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของไวรัสตับอักเสบบี ดังนั้นผู้ได้รับวัคซีนจึงไม่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ดังเช่นในอดีต

ในช่วงที่ผ่านมาได้มีการนำไวรัสบางชนิด เช่น vaccinia virus มาใช้ร่วมในการผลิตวัคซีน¹ โดยดัดแปลงพันธุกรรมของไวรัสให้สร้างโปรตีนของจุลชีพชนิดอื่นที่ส่วนผิวของไวรัส (surface protein)

เมื่อนำไวรัสไปฉีดให้กับคน คนคนนั้นสามารถสร้างภูมิคุ้มกันป้องกันจุลชีพอื่นได้ นอกจากนี้ยังมีการผลิตวัคซีนวีแอลพี (virus-like particle; VLP) โดยดัดแปลงพันธุกรรมของจุลชีพให้สร้างโปรตีนแคปซิดหลัก (major capsid proteins) ของไวรัส ตัวอย่างวัคซีน VLP ได้แก่ วัคซีน human papilloma virus (HPV)¹³

วัคซีนดีเอ็นเอ (DNA vaccines) เป็นวัคซีนแนวใหม่ที่มีแนวโน้มจะนำมาใช้ในอนาคต โดยทั่วไปวัคซีนดีเอ็นเอเป็นพลาสมิดที่มียีนสร้างโปรตีนของไวรัส และสามารถเพิ่มจำนวนได้ในแบคทีเรีย ในขณะนี้ยังไม่มีวัคซีนดีเอ็นเอสำหรับคนออกมาวางขาย แต่การศึกษาในสัตว์ทดลองและคนแสดงให้เห็นว่าเมื่อฉีดวัคซีนดีเอ็นเอเข้าไปในกล้ามเนื้อ สามารถกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้ วัคซีนประเภทนี้ได้แก่ วัคซีนดีเอ็นเอต้านเอชไอวี ชาร์ส ไข้หวัดใหญ่ และมาลาเรีย ซึ่งอยู่ในขั้นทดสอบในมนุษย์แล้ว

ส่วนวัคซีนในรูปอาหาร (Edible vaccines) นั้น ยังคงอยู่ในขั้นทดลองเช่นกัน วัคซีนเหล่านี้พัฒนาให้อยู่ในรูปที่เป็นผลิตภัณฑ์มาจากพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้วยกำลังเป็นที่น่าสนใจเนื่องจากเด็กรับประทานดิบได้ และปลูกได้ในเขตร้อน¹

การวิจัยโดยใช้เทคโนโลยีทางอนุชีววิทยาเพื่อการผลิตวัคซีนในประเทศไทยกำลังมีการพัฒนาเพิ่มขึ้น ก่อนหน้านั้นไบโอเทคได้สนับสนุนการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีน เพื่อเตรียมความพร้อมในการผลิตวัคซีนสำหรับไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) วัคซีนบางชนิด เช่น วัคซีนต้านโรคไทรน มีการพัฒนาสายพันธุ์เชื้อสำหรับผลิตวัคซีนป้องกันโรคไทรน โดย รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิตต์ บุญเกิด ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเกิดขึ้นครั้งแรกในประเทศไทย และถ่ายโอนเทคโนโลยีไปยังบริษัท ไบโอเนท-เอเชีย คาดว่าในอีกไม่กี่ปีข้างหน้าประเทศไทยจะสามารถผลิตวัคซีนไทรนแบบไร้เชื้อและนำมาฉีดให้เด็กไทยได้

ส่วนศูนย์พัฒนาวัคซีน มหาวิทยาลัยมหิดล พัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไข้สมองอักเสบชนิดเชื้อตายจากเซลล์เพาะเลี้ยง วัคซีนรวมป้องกันคอตีบ ไอกรน บาดทะยัก และดับอักเสบชนิดบี (DTP-HP) วัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกชนิดคอตีบเย็น เป็นสูตรรวมเข็มเดียวคุมได้ 4 สายพันธุ์ ซึ่งวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกปัจจุบันอยู่ระหว่างงานวิจัยทางคลินิกที่จังหวัดราชบุรี นอกจากนี้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีแผนสร้างโรงงานผลิตวัคซีนป้องกันโรคระบาด เพื่อทดลองผลิตวัคซีนโรคต่างๆ ที่ต้องเฝ้าระวังและยังไม่เคยผลิตในไทยมาก่อน ได้แก่ วัคซีนไข้หวัดใหญ่ ไข้หวัดนก ไข้เลือดออก เป็นต้น ซึ่งมีแนวโน้มประสบปัญหาด้านงบประมาณและบุคลากรผู้เชี่ยวชาญ

วิทยาการระดับอนุชีววิทยา นับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการวัคซีน ทั้งการวิจัยและพัฒนาวัคซีนแบบหน่วยย่อย วัคซีนนิวแอลพี วัคซีนดีเอ็นเอ และวัคซีนในรูปอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิจัยและพัฒนาวัคซีนในรูปอาหารที่รับประทานได้ และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอากาศที่เหมาะสมของประเทศไทย หากงานวิจัยทางการแพทย์และสาธารณสุขของไทย สามารถพัฒนาสู่ภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมได้ น่าจะช่วยเพิ่มมูลค่าของผลผลิตในประเทศเพื่อการส่งออก และลดการขาดดุลทางการค้าของประเทศ ซึ่งอาจจะส่งผลให้เศรษฐกิจโดยรวมของประเทศดีขึ้น ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพของประเทศเป็นสำคัญ

การตรวจจับทางชีวภาพ (Biosensing)

จากเหตุการณ์ก่อการร้ายทางชีวภาพโดยใช้เชื้อแอนแทรกซ์ (anthrax bioterrorism) ในปี ค.ศ. 2001 รวมถึงเหตุการณ์ที่เกี่ยวข้องต่อมา ส่งผลให้นักวิจัยมองหาทางเลือกที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วมากยิ่งขึ้นในการตรวจหาอาวุธชีวภาพ โดยพัฒนาการตรวจจับทางชีวภาพ เนื่องจากจุลชีพก่อโรค

หลายชนิดมีแนวโน้มว่าสามารถนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพได้ ผู้ที่ได้รับอาวุธชีวภาพในระยะแรกอาจไม่แสดงอาการเป็นเวลาหลายวัน และอาวุธชีวภาพบางชนิดก่อให้เกิดอาการเริ่มต้นคล้ายเป็นหวัด ดังนั้นการตรวจหาร่องรอยของการได้รับอาวุธชีวภาพจึงต้องอาศัยวิธีการตรวจที่มีความไวสูง ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ค้นคว้าและทราบลำดับเบสทั้งหมดของสารพันธุกรรมของจุลชีพก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ ไวรัสเอชไอวี ไวรัสโปลิโอ ไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า ไวรัสโรคซาร์ส *Haemophilus influenza*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*, *Escherichia coli* O157:H7, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Staphylococcus aureus*, *Treponema pallidum* และ *Vibrio cholera*^{2,14,15} ทำให้เป็นประโยชน์มากในการออกแบบระบบการตรวจที่รวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ (biosensors) หรืออุปกรณ์ที่สามารถตรวจจับและส่งสัญญาณชีวภาพออกมาโดยอุปกรณ์ดังกล่าวประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ตัวแปลงสัญญาณ และสารชีวภาพ ใช้กลไกการจดจำทางชีวภาพ ซึ่งเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีและมีการถ่ายทอดสัญญาณเฉพาะซึ่งอาจเป็นอิเล็กทรอนิกส์ แสง และอื่นๆ เข้าสู่ตัวแปลงสัญญาณ ซึ่งแปลงสัญญาณทางกายภาพเป็นสัญญาณไฟฟ้าผ่านเครื่องอ่านสัญญาณให้ผู้ใช้อุปกรณ์อ่านค่าได้¹⁶ ตัวอย่างการตรวจโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ อาทิ การตรวจกลูโคสในผู้ป่วยเบาหวาน สารพิษ สารปลอมปนในอาหารส่งออก สารฆ่าแมลง โลหะหนัก สารก่อมลพิษ บีโอดี อาวุธชีวภาพ เชื้อก่อโรคพืชในดิน อาหาร หรือน้ำ เช่น การตรวจหาแบคทีเรียและสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร เป็นต้น³ ในประเทศไทยนั้นนักวิจัยไทยได้ค้นคว้าและวิจัยไบโอเซนเซอร์อย่างต่อเนื่องมานานกว่า 20 ปี ปัจจุบันมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ ซึ่งน่าจะได้รับการผลักดันให้มีการผลิตเพื่อวางจำหน่ายในอนาคต ตัวอย่างของความสำเร็จในการพัฒนาเทคโนโลยีขั้นสูงของ

ประเทศไทยได้แก่ความร่วมมือของไบโอเทคและบริษัท อินโนวา ไบโอเทคโนโลยี จำกัด ต่อยอดงานวิจัยของ ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงธารารัตน์ ธารากุล จาก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลและคณะ โดยการ พัฒนา “ชุดตรวจวินิจฉัยใช้หัตถ์นก โดยใช้หลักการ ไบโอเซนเซอร์” ซึ่งเป็นชุดตรวจใช้หัตถ์นกแบบ ไบโอเซนเซอร์ที่ผลิตได้ในเชิงพาณิชย์ชุดแรกของโลก และได้ยื่นจดทะเบียนสิทธิบัตรแล้ว โดยผสมผสาน เทคโนโลยีชีวภาพเข้ากับนาโนเทคโนโลยี ลดการนำเข้า ชุดตรวจวินิจฉัยจากต่างประเทศ และลดความสูญเสีย จากการระบาดของโรคใช้หัตถ์นกอีกด้วย

บทสรุป

เทคนิคทางอณูชีววิทยาสามารถนำมา ประยุกต์เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ การเลือกใช้ เทคนิคใดขึ้นอยู่กับรายละเอียดและข้อมูลของจุลชีพก่อโรคที่ต้องการตรวจวินิจฉัย ว่ามีความเหมาะสมกับเทคนิคดังกล่าวมากน้อยเพียงไร ปัจจุบันมีการดัดแปลงพันธุกรรมของจุลชีพเพื่อใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะ รวมทั้งผลิตภัณฑ์อื่นทางด้านเภสัชกรรม เพื่อการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อ เนื่องจากโรคติดเชื้อที่มีมาแต่เดิมยังคงมีอยู่ในปัจจุบันและโรคติดเชื้อใหม่ก็มีเพิ่มมากขึ้น วิทยาการระดับอณูชีววิทยาน่าจะเป็นทางออกสำคัญต่อวงการสาธารณสุข ถึงแม้ปัจจุบันจะยังมีข้อจำกัดทางด้านทรัพยากรทั้งบุคลากรและอุปกรณ์ แต่หากมีการประสานการทำงานอย่างเป็นระบบ ใช้ทรัพยากรร่วมกัน มุ่งตรงต่อปัญหาและคำนึงถึงการแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อของประเทศเป็นสำคัญ ผลสำเร็จย่อมเกิดขึ้นและก่อให้เกิดสุขภาวะของประชาชน ภายใต้บริบทของประเทศไทยอย่างแท้จริง

เอกสารอ้างอิง

1. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology. 9th ed. San Francisco:

- Benjamin Cummings, 2007.
2. Pommerville JC. Alcamo's fundamentals of microbiology. 8th ed. Sudbury: Jones and Bartlett, 2006.
3. O'Connor L. Diagnostic Bacteriology Protocols. 2nd ed. New Jersey: Humana, 2006.
4. Liu H, Rahman A, Semino-Mora C, Doi SQ, Dubois A. Specific and sensitive detection of *Helicobacter pylori* in biological specimens by real-time RT-PCR and *in situ* hybridization. PLoS ONE 2008; 3(7): 1-7.
5. Goyal SM. Viruses in foods. New York: Springer, 2006.
6. Bühlmann M, Bögli-Stuber K, Droz S, Mühlemann K. Rapid screening for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR and associated costs. J Clin Microbiol 2008; 46(7): 2151-4.
7. Nintasen R, Utrarachkij F, Siripanichgon K, Bhumiratana A, Suzuki Y, Suthienkul O. Enhancement of *Legionella pneumophila* culture isolation from microenvironments by macrophage infectivity potentiator (*mip*) gene-specific nested polymerase chain reaction. Microbiol Immunol 2007; 51(8): 777-85.
8. Kaestli M, Mayo M, Harrington G, Watt F, Hill J, Gal D, et al. Sensitive and specific molecular detection of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, in the soil of tropical northern Australia. Appl Environ Microbiol 2007; 73(21): 6891-7.

9. Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, et al. Rapid diagnosis of Herpes Simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 2005; 43(2):951-5.
10. Eiken genome site. Available at <http://loopamp.eiken.co.jp/e/products/index.html>, accessed Jul 1, 2005.
11. Edagawa A, Kimura A, Doi H, Tanaka H, Tomioka K, Sakabe K, et al. Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. *J Appl Microbiol* 2008; 105: 2104-14.
12. Datta S, Biswas A, Chandra PK, Banerjee A, Panigrahi R, Mahapatra PK, et al. Molecular epidemiology and clinical significance of Hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations in eastern India. *Intervirology* 2008; 51: 275-84.
13. Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Nester MT. *Microbiology: a human perspective*. 6th ed. New York: McGraw Hill; 2009.
14. Chan VL, Sherman PM, Bourke B. *Bacterial genomes and infectious diseases*. New Jersey: Humana; 2006.
15. Cowan MK, Talaro KP. *Microbiology: a systems approach*. Boston: McGraw-Hill; 2006.
16. มวลินี อัสวดิษฐเลิศ. What's biosensor? Available at <http://www.vcharkarn.com/varticle/38381>, accessed Feb 8, 2009.

Molecular Biology Technology in Infectious Diseases

Chayaporn Saranpuetti*

ABSTRACT

Genetic engineering brought biotechnology into a new era by a revolution in molecular biology which has occurred over the past several decades. The rapid developments in recombinant DNA techniques have made it possible to genetically alter organisms to give them more useful traits. Molecular biology provided a powerful tool for manipulation microorganisms for medical, industrial, and research uses i.e. detection of infectious diseases, pharmaceutical production, vaccine production, and biosensing. The knowledge in molecular biology leads to the development in detection of infectious diseases: A) hybridization, DNA probes are used to locate nucleotide sequences of interest in individual cells or nucleic acid extracted from samples. B) amplification, the polymerase chain reaction (PCR) and its application can be used to create millions of copies of target sequences within a few hours to detect organisms present in extremely small numbers as well as those that cannot yet be grown in culture. C) DNA sequencing, provides a mechanism for determining the evolutionary relatedness of organisms. D) enzymatic digestion, restriction enzymes cut interest DNA into fragments. Each microorganism can be identified by numbers and size of DNA fragments in gel electrophoresis. Many pharmaceutical products are now produced by genetically engineered microorganisms which are safer and more economical than extracting it from animal tissues. In vaccine production, the genes can be cloned into yeast or bacteria so that these cells produce large amount of immunizing proteins. This type of vaccine is currently used to prevent hepatitis B and cervical cancer in humans. Molecular biology also leads to the development of biosensing. High sensitivity of biosensing is necessary for the detection of bioterrorism clues.

Key words: Molecular biology, infectious diseases, genetic engineering, PCR, DNA