ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร — **สาขา**

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา — **ภาควิชา**

เรื่อง ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ในประเทศไทยและการผลิตโปรตีนลูกผสม M1

Genetic Characterization of Swine Influenza Virus Subtype H3N2 in Thailand and Production of Recombinant M1 Protein

นามผู้วิจัย นางสาวจินต์ภาณี ณ นคร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์วรวิทย์ วัชชวัลคุ, D.M.S.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา .....

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ในประเทศไทยและการผลิตโปรตีนลูกผสม M1

Genetic Characterization of Swine Influenza Virus Subtype H3N2 in Thailand and Production of Recombinant M1 Protein

โดย

นางสาวจินต์ภาณี ณ นคร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2551

จินต์ภาณี ณ นคร 2551: ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ในประเทศไทยและการผลิตโปรตีนลูกผสม M1 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ วรวิทย์ วัชชวัลคุ, D.M.S. 83 หน้า

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร เป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ที่ก่อโรคทางระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน ไวรัสชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์ *Orthomyxoviridae* ในปัจจุบัน เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่แบ่งออกเป็น 3 สายพันธุ์หลักๆ คือ H1N1, H1N2 และ H3N2 ซึ่งพบกระจายอยู่ในประชากรสุกรทั่วโลก ในการศึกษานี้เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU5.1/04 (H3N2) ได้ถูกเพาะแยกเชื้อและทำการศึกษาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนทั้ง 8 แท่ง โดยการทำ genotyping และ phylogenetic analysis แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสที่ศึกษานั้นอาจจะเกิดจาก triple reassortant ซึ่งประกอบไปด้วย ยีน HA และ NA ได้จาก human-like influenza virus ที่มาจาก North America ส่วนยีน NS และ NP ได้จาก swine influenza virus (SIV) ที่มีลักษณะคล้ายกับ SIV ที่พบที่ North America และยีน M, PA, PB1 และ PB2 ได้จาก SIV ที่มีลักษณะคล้ายกับ SIV ที่พบในทวีปยุโรป ผลจากการศึกษายังบ่งบอกว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ นั้นสามารถติดไปมาระหว่าง สุกรกับคนได้ และผลจากการนำเข้าหรือส่งออกของสัตว์ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ ที่ทำให้เกิดการติดต่อแพร่กระจาย ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ไปทั่วโลกได้ นอกจากนี้ ในการศึกษานี้ยังได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม M1 ใน *E.coli* โดยการสกัดอาร์เอนเอจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU7.2/04 (H3N2) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน M ของไวรัสด้วยวิธีการ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะ แล้วนำชิ้นส่วนของยีน M มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pQE30 ถ่ายพลาสมิดลูกผสมที่ได้เข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ M15 สำหรับโปรตีนลูกผสม M1 ได้ เมื่อนำไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย พบว่าแอนติบอดีที่ได้ สามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ดังนั้นโปรตีนลูกผสมและแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำมาพัฒนาสำหรับการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ต่อไป

_____ / / /

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Jinpanee Na Nakorn 2008: Genetic Characterization of Swine Influenza Virus Subtype H3N2 in Thailand and Production of Recombinant M1 Protein. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Worawidh Wajjwalku, D.M.S. 83 pages.

Swine influenza virus (SIV) is an influenza A virus causius an acute respiratory disease in swine. The virus is classified as a member of the family *Orthomyxoviridae*. Up to date, three major subtypes of SIV, H1N1, H1N2 and H3N2, are circulating in swine populations throughout the world. In this study, A/SW/Thailand/KU5.1/04 (H3N2) was isolated and its eight genes were characterized and analyzed. Genotyping and phylogenetic analyses demonstrated that KU5.1 virus may be a triple reassortant comprising of the HA and NA genes from human-like influenza viruses from North America, the NS and NP genes from a SIV closely related to North American swine viruses and the M, PA, PB1 and PB2 genes related to those of European SIV. The results restate that transmission of influenza A virus among human and swine populations is common. International live-animal trading may be an important mean for SIV transmission among countries in analogy to the transmission of global Flu via aviation. In addition, we also expressed M gene of an SIV, A/SW/Thailand/KU7.2/04 (H3N2) in *E. coli*. The viral RNA was extracted from MDCK cells infected with the SIV subtype H3N2. The viral RNA was extracted and used as template for M gene by RT-PCR using specific primer. The M1 gene was cloned into the pQE30 and expressed in *E.coli*. The recombinant M1 protein was used as an antigen for the production of polyclonal antibodies in rabbit. The results indicated that the polyclonal antibodies could detect influenza A virus in infected cells by immunoperoxidase monolayer assay (IPMA). Therefore, the recombinant M1 protein and the rabbit hyperimmune serum may be used for diagnostic purposes.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์วรวิทย์ วัชชวัลคุ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ซึ่งให้คำปรึกษา คำแนะนำ ทั้งด้านการศึกษาและงานวิจัย ตลอดจนแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือและตรวจแก้ไขในการเขียนวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณอรวรรณ บุตรดี คุณวิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์ คุณน้องนิด เก้าลิ้ม หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และพี่ๆ ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และ ให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย พี่สาว และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิศณุ บุญญาวิวัฒน์ ที่คอยอบรมสั่งสอน และให้กำลังใจที่ดีอย่างยิ่งตลอดการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ทั้งนี้วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

จินต์ภาณี ณ นคร

ตุลาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	28
สรุป	56
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	57
ภาคผนวก	67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติและโปรตีนที่สร้างจากสารพันธุกรรมของไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ	12
2	ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของ SIV และขนาดของ DNA	26
3	เปอร์เซนต์ identity ในแต่ละยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทั้ง 7 ตัวอย่าง ระหว่างปี 2004-2006	33
4	แสดงผลการเปรียบเทียบทั้ง 8 ยีนโดยวิธี Megablast analysis ของเชื้อ SIV subtype H3N2 (A/SW/Thailand/KU5.1/04) กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีรางานฐานข้อมูลจาก Genbank	34

ตารางผนวกที่

1	แสดงสัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส	68
2	แสดงสัญลักษณ์ที่ใช้แทนกรดอะมิโน	69

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ	6
2	วงจรการจำลองตัวเองของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ	13
3	แสดงลักษณะการเกิด cytopatic effect (CPE) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร	29
4	การทดสอบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยวิธี IPMA	30
5	การตรวจสอบขนาด PCR product ของยีน NS M NA NP และ HA ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ด้วย 1% agarose gel electrophoresis	31
6	การตรวจสอบขนาด PCR product ของยีน PA PB1 และ PB2 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ด้วย 1% agarose gel electrophoresis	32
7	แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน HA1 ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04	36
8	แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน NA ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04	37
9	แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน NS ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04	40
10	แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน NP ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04	41
11	แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน M ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04	43
12	แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน PA ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04	44
13	แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน PB1 ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04	45
14	แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน PB2 ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

15	การตรวจสอบ PCR Product ของยีน M ที่ได้จากการทำ RT-PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis	48
16	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน M ที่โคลนได้กับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานใน Genbank	49
17	การตรวจสอบโปรตีนลูกผสม M1 ใน *E.coli.* M15 ด้วย 15% SDS-PAGE	52
18	การทดสอบโปรตีนลูกผสม M1 กับ แอนติบอดีจากสัตว์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Western blot	53
19	การทดสอบแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม M1 จากซีรัมกระต่ายโดยวิธี dot blotting	54
20	การทดสอบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ที่ติดในเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)	55

ภาพผนวกที่

1	แสดงลำดับเบสของยีน NS ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร KU5.1	70
2	แสดงลำดับเบสของยีน M ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร KU5.1	71
3	แสดงลำดับเบสของยีน NA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร KU5.1	72
4	แสดงลำดับเบสของยีน NP ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร KU5.1	73
5	แสดงลำดับเบสของยีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร KU5.1	75
6	แสดงลำดับเบสของยีน PA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร KU5.1	77
7	แสดงลำดับเบสของยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร KU5.1	79
8	แสดงลำดับเบสของยีน PB2 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร KU5.1	81
9	แสดงลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีน M1 ที่อยู่ใน pQE30 vector	83

ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ในประเทศไทยและการผลิตโปรตีนลูกผสม M1

Genetic Characterization of Swine Influenza Virus Subtype H3N2 in Thailand and Production of Recombinant M1 Protein

คำนำ

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza virus: SIV) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในวงศ์ *Orthomyxoviridae* มีสายพันธุกรรมแบบ RNA สายเดี่ยว ที่ประกอบไปด้วยยีนจำนวน 8 ยีน คือ polymerase basic 2 (PB2), polymerase basic 1 (PB1), polymerase acid (PA), hemagglutinin (HA), nucleoprotein (NP), neuraminidase (NA), matrix (M1, M2) และ non structural (NS1, NS2) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีอยู่ 3 ชนิด คือ เอ บี และ ซี โดยที่ ชนิด เอ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคทางระบบหายใจอย่างเฉียบพลันในคนและสัตว์หลายชนิดรวมทั้งสุกร สุกรป่วยจะพบอาการ มีไข้ ซึม อ่อนเพลีย หายใจลำบาก ในบางครั้งอาจมีน้ำมูกหรือสิ่งคัดหลั่งจากตา น้ำหนักลด ในสุกรตั้งท้องอาจจะทำให้แท้งได้ โรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีรายงานการแยกเชื้อครั้งแรกในปี 1930 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นสายพันธุ์ย่อย H1N1 ต่อมาก็มีการระบาดของเชื้อกระจายไปยังทวีปยุโรป และสามารถแยกเชื้อได้ในเวลาต่อมา พบว่าได้มีการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสจากสายพันธุ์เดิม กลายเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ เนื่องจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ จะมีการกลายพันธุ์อยู่เสมอ และทำให้เกิดการระบาดของไข้หวัดใหญ่เป็นระยะๆ

ถึงแม้ว่าจะมีรายงานการพบโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในหลายประเทศ แต่ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานโรคไข้หวัดใหญ่แบบ epizootic form ในประชากรสุกรในประเทศไทย สุจิราและคณะ (2548) ทำการสำรวจการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกร ช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงกรกฎาคม ปี 2547 พบว่า ซีรัมจากสุกรให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ย่อย H3N2 โดยวิธี serum neutralization test แสดงให้เห็นว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร มีการหมุนเวียนอยู่ในประชากรสุกรของประเทศไทย แต่ยังไม่มีรายงานว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ที่พบนั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเป็นอย่างไร และมีความเกี่ยวข้องกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนและสัตว์อื่นๆเช่นใด

การศึกษานี้ จะทำให้ทราบถึงลักษณะทางพันธุกรรมทั้ง 8 ยีน ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ที่พบในประเทศไทย และยังทราบถึงความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ที่พบในประเทศไทยและจากประเทศอื่นว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร ข้อมูลที่ได้จะเป็นพื้นฐานในการวิจัยขั้นต่อไป และช่วยในการพัฒนาการวินิจฉัยที่ความจำเพาะที่สูงขึ้น อีกทั้งยังเพื่อช่วยเฝ้าระวังการเกิดโรคในสุกร และเฝ้าระวังโรคที่อาจจะมีโอกาสติดต่อสู่คนได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรสายพันธุ์ H3N2 ทั้ง 8 ยีน ที่แยกได้ในประเทศไทย ในปี 2004

2. เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ของแต่ละยีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรชนิด H3N2 ในประเทศไทยและในประเทศอื่นๆ

3. เพื่อสร้างโปรตีนลูกผสม M1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรสายพันธุ์ H3N2 เพื่อนำไปผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนลูกผสม M1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรสายพันธุ์ H3N2

การตรวจเอกสาร

ไวรัสไข้หวัดใหญ่

โรคไข้หวัดใหญ่ (Influenza) มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) ทำให้เกิดโรคทางระบบหายใจอย่างเฉียบพลันในสัตว์หลายชนิด (Webster *et al.,* 1992) ได้แก่ คน สัตว์ปีก ม้า ปลาวาฬ และสุกร เป็นต้น ไวรัสชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์ *Orthomyxoviridae* ชื่อนี้มาจากภาษากรีก 2 คำ คือ othos มีความหมายว่า straight หรือ standard หรือ correct และ myxo มีความหมายว่า mucous ส่วนคำว่า influenza เป็นคำที่มาจากภาษาลาติน influential มีความหมายว่า epidemic (ระบาด) ไวรัสวงศ์นี้ประกอบด้วย 4 ชนิด คือ ชนิด เอ บี ซี และ Thogotovirus

การแบ่งชนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่นั้นอาศัยคุณสมบัติหลายประการ ได้แก่

1. จำนวนสารพันธุกรรมที่บรรจุอยู่ภายในอนุภาคไวรัส ถ้าเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอและบี จะมีจำนวนสารพันธุกรรม 8 ยีน ส่วน ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดซี มี 7 ยีน ยกเว้น ยีน NA (Lamb and Choppin, 1983)

2. คุณสมบัติความแตกต่างของแอนติเจนระหว่าง NP และ M1 สำหรับไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ยังสามารถแบ่งออกเป็น subtype ย่อย ได้อีก โดยพิจารณาจากลักษณะความแตกต่างของแอนติเจนบน HA และ NA ที่อยู่บนเยื่อหุ้มของอนุภาคไวรัส ปัจจุบัน HA แบ่งได้เป็น 16 ชนิด (H1-H16) และ NA แบ่งได้เป็น 9 ชนิด (N1-N9)

3. ความแตกต่างของชนิดสิ่งมีชีวิตที่ไวรัสสามารถติดเข้าไปและมีการเพิ่มจำนวนได้ คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สามารถติดได้ใน คน สัตว์ปีก และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ม้า สุกร แมวน้ำ และปลาวาฬ เป็นต้น ส่วนไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด บี และซี จะพบการติดเชื้อระหว่างคนเป็นหลัก แต่มีรายงานว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด บี ได้ในแมวน้ำ (Osterhaus *et al.,* 2000) และแยกเชื้อไวรัสใหญ่ชนิด ซี ได้ในสุกร (Guo and Ulrich, 1984) อีกด้วย สำหรับนกน้ำ (water bird) สามารถติดเชื้อได้ทุก subtypes โดยไม่แสดงอาการ จึงทำหน้าที่เป็นพาหะแพร่เชื้อให้กับสัตว์ชนิดอื่นๆ

4. คุณสมบัติความแตกต่างของ surface glycoprotein (HA และ NA) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงบ่อย และไม่คงที่มากกว่า ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด บี แต่ใน ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด ซี มี single glycoprotein ที่มีหน้าที่หลากหลายกว่า ซึ่งมีคุณสมบัติร่วมกันของ Hemagglutinin-Esterase-Fusion (HEF)

5. ความแตกต่างในการสร้างโปรตีนจำเพาะในไวรัสแต่ละชนิดที่เกิดขึ้นในขบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส

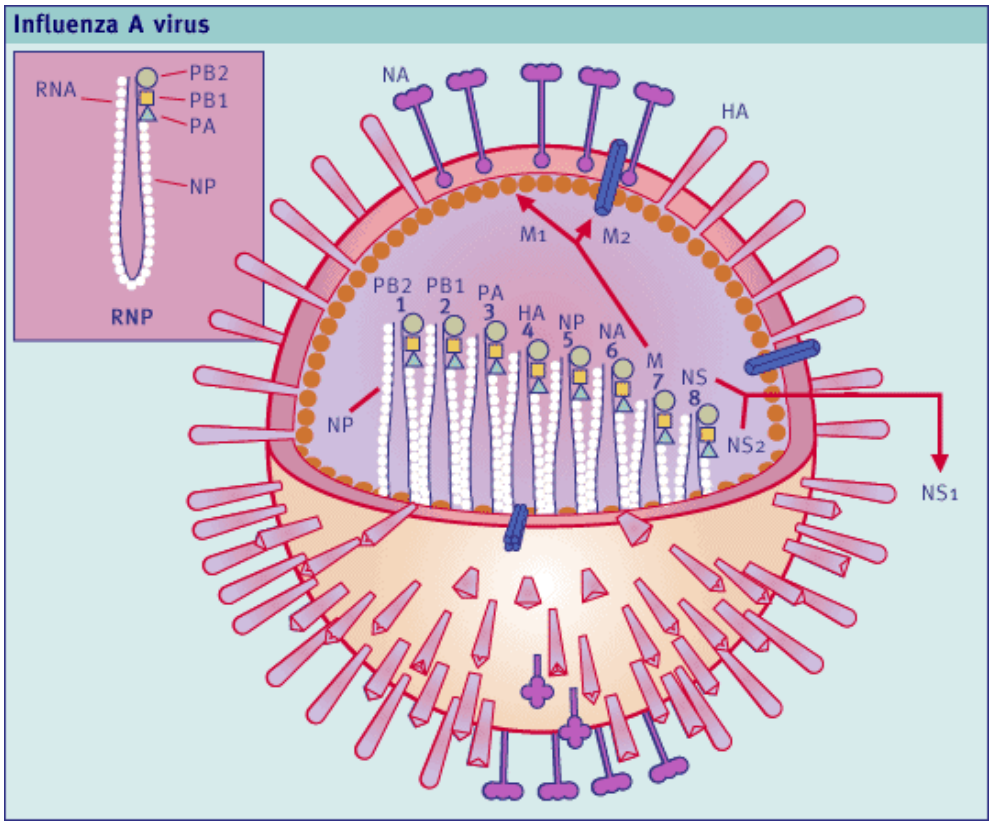
สำหรับ thogovirus ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดนัก แต่พบว่า thogovirus จะประกอบไปด้วย tickborne viruses ที่มีโครงสร้างและลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์กับไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ บี และซี (Leahy *et al.,* 1997) และประกอบด้วย glycoprotein เพียงชนิดเดียว (Morse *et al.,* 1992)

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ถูกทำลายได้ง่ายด้วย ความร้อน เช่น ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที และสารเคมีต่างๆ เช่น สารที่มีคุณสมบัติในการละลายไขมัน (lipid solvents), formalin, beta-propiolactone, oxidizing agents, sodium dodecylsulfate, hydroxylamine, ammonium ions และ iodine compounds แต่เชื้อนี้สามารถ คงอยู่ได้นานในสิ่งขับถ่าย เช่น น้ำมูก น้ำตา น้ำลาย เสมหะ อุจจาระและในแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ (Easterday *et al.,* 1997)

ลักษณะโครงสร้างของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

อนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ จะประกอบไปด้วยสารพันธุกรรมชนิด RNA เส้นเดี่ยว สายลบ (Lamb and Krug, 1996) ลักษณะเป็นแท่ง (segment) จำนวน 8 แท่ง โดยมี NP พันร่วมไปกับสายพันธุกรรม (RNA genome) เรียกว่า ribonucleoprotein (RNP) มีการจัดเรียงตัวเป็นแท่งเกลียว (helical nucleocapsid) มีเยื่อหุ้ม (envelope) ล้อมรอบ ชั้นนอกเป็น lipid membrane ที่ได้จาก เซลล์เจ้าบ้าน มี glycoproteins 3 ชนิด ได้แก่ HA และ NA เป็นปุ่มยื่นออกมา (spikes) ส่วน glycoprotein อีกชนิดหนึ่ง คือ ion-channel protein (M2) เปลือกชั้นในเป็น matrix protein (M1) ที่ทำให้เชื้อคงรูปร่าง ขนาดของอนุภาคไวรัสมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 80-120 นาโนเมตร ภายในอนุภาคไวรัสมีสายพันธุกรรมซึ่งมีความยาวโดยรวมประมาณ 13.5 กิโลเบส บรรจุรหัส (code) สำหรับการ

สังเคราะห์ โปรตีนของไวรัส 10 ชนิด (Murphy & Webster, 1996, Ghendin *et al.,* 2005) ดังแสดงในภาพที่ 1 ได้แก่



ภาพที่ 1 ลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

ที่มา: Heinen (2002)

polymerase complex ประกอบด้วยโปรตีนที่สร้างจากสายพันธุกรรมขนาดใหญ่ 3 แท่ง คือ PB1, PB2 และ PA โดย PB2 และ PB1 มีความยาว 2,341 นิวคลีโอไทด์ PB2 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 759 ตัว และ PB1 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 757 ตัว ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส มีประจุสุทธิเป็นบวก (+28) ที่ pH 6.5 ส่วน PA มีความยาว 2,233 นิวคลีโอด์ ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 716 ตัว มีประจุสุทธิเป็นลบ (-13.5) ที่ pH 6.5 ในการแยกความแตกต่างของโปรตีนทั้งสามชนิดนี้ อาศัยคุณสมบัติของโปรตีนที่เคลื่อนที่ตามขนาดประจุใน isoelectric focusing gel พบโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง 2 ชนิด คือ PB2 และ PB1 และโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด 1 ชนิด คือ PA (Horisberger, 1980) หลังจากมีการสร้างโปรตีนทั้งสามชนิดนี้แล้ว โปรตีนจะรวมกันเป็น complex ในไซโตพลาสซึม และเคลื่อนสู่นิวเคลียสต่อไป ซึ่ง PB2 PB1 และ PA จะสร้าง polymerase complex สำหรับการ transcription และการ replication ของอนุภาคไวรัส

hemagglutinin (HA) เป็นโปรตีนที่สร้างจากสายพันธุกรรมแท่งที่ 4 ซึ่งมีความยาว 1,778 นิวคลีโอไทด์ ประกอบไปด้วยกรอะมิโน 566 ตัว การที่มีชื่อเรียกเช่นนี้เนื่องมาจากความสามารถของเชื้อไวรัส ในการทำให้เกิด agglutination ของเม็ดเลือดแดง (Hirst, 1941) โดยจะจับกับ sialic acid–containing receptor ที่มีความจำเพาะ โปรตีนชนิดนี้มีหน้าที่สำคัญคือ ทำหน้าที่เป็น attachment site ของไวรัส ที่จับกับตัวรับ (receptor) ของเซลล์ ทำให้เกิดการเกาะติดของชิ้นส่วนไวรัสกับเซลล์ และ HA ยังทำให้ไวรัสผ่านเข้าสู่เซลล์ (penetraion) เจ้าบ้านได้ โดยเกิดขบวนการ endocytosis ก่อนที่จะเกิดการ fusion ของ envelope ของไวรัสกับผนังของ endosome ทำให้เกิดการปล่อย nucleocapsid เข้าสู่เซลล์ ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า การถอดเปลือกหุ้ม (uncoating) นอกจากนี้ HA ยังเป็นแอนติเจนหลักของเชื้อไวรัสในการต่อสู้กับ neutralizing antibody ที่ถูกผลิตขึ้นในขณะเกิดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส การสร้าง HA เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมบริเวณ membrane-bound ribosome จากนั้นจะเคลื่อนเข้าสู่ endoplasmic reticulum ของเซลล์ที่ติดเชื้อโดยเป็นโปรตีนชิ้นเดียว (single peptide) คือ HA0 หลังจากนั้นสามารถถูกตัดออกเป็น HA1 และ HA2 ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ขั้นตอนการตัดเพื่อให้ได้โปรตีนทั้งสองส่วนนี้ จะทำให้ไวรัสมีความสามารถในการติดเชื้อหรือเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของตำแหน่งในการตัดของ HA0 นี้ อาจจะมีความสัมพันธ์กับความความรุนแรงของการเกิดโรคและความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อสู่เนื้อเยื่อต่างๆได้ (Fouchier *et al.,* 2005) โปรตีน HA ยังใช้ในการแบ่ง subtype ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 16 ชนิด (H1-H16)

nucleoprotein (NP) เป็นโปรตีนที่สร้างจากสายพันธุกรรมแท่งที่ 5 มีความยาว 1,565 นิวคลีโอไทด์ ประกอบไปด้วยกรอะมิโน 498 ตัว โปรตีนส่วนใหญ่ คือ arginine และมีประจุสุทธิเป็นบวก (+14) มี pH 6.5 (Winter *et al.,* 1981) การสังเคราะห์ NP เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม แล้วถูกส่งไปในนิวเคลียส (Lin and Lai, 1983) NP เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักที่สำคัญของอนุภาคไวรัส เป็นส่วนที่จับกับสารพันธุกรรม รวมเรียกว่า RNP โปรตีน NP เป็นแอนติเจนชนิดหนึ่งที่ใช้เป็นตัวแยกชนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (type – specific antigen) ออกเป็น ชนิด เอ บี และซีได้ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน NP ของเชื้อ SIV ชนิด เอ จะแตกต่างกับชนิดอื่นๆ โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างชนิดกันประมาณ 60% แต่ภายในกลุ่มของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ เดียวกัน แต่ต่าง strain กันจะมีลำดับความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 90% (Olsen *et al.,* 2000) นอกจากนี้ NP ยังเป็นตัวหลักในการทำให้เกิด cross reaction ของ cytotoxic T lymphocytes ในการต่อต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ทำการศึกษาในหนูขาวและในคน (Yewdell *et al.,* 1989) ในช่วงท้ายของการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ พบว่าโปรตีน NP จะถูกตัดโดย cellular caspase จาก 56 กิโลดาลตัน ลดขนาดลงเป็น 53 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่าระยะนี้เป็นระยะเริ่มต้นของการเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ติดเชื้อ (Zhirnov *et al.,* 1999)

neuraminidase (NA) เป็นโปรตีนที่สร้างจากสายพันธุกรรมแท่งที่ 6 มีความยาว 1,413 นิวคลีโอไทด์ ประกอบไปด้วยกรอะมิโน 453 ตัว โดย NA ประกอบไปด้วยส่วน head domain ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ และส่วนก้าน (stalk) เป็นที่เกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ NA เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่อยู่บน envelope เช่นเดียวกับ HA และใช้แบ่ง subtype ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (subtype – specific glycoprotein) เช่นกัน ในปัจจุบันแบ่งออกได้เป็น 9 ชนิด (Colman, 1989) คือ N1 ถึง N9 โปรตีน NA มีคุณสมบัติเป็น enzyme ในการย่อย sialic acid ออกจาก glycoprotein บนผิวเซลล์ (Palese *et al.,* 1974) หน้าที่ที่สำคัญของโปรตีนชนิดนี้ในขบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส คือเป็นตัวที่ช่วยแยก sialic acid ออกจาก HA NA และบริเวณผิวของเซลล์ขณะที่ไวรัสกำลังออกนอกเซลล์ และเป็นแอนติเจนอีกชนิดหนึ่ง ที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีจำเพาะ

matrix protein (M1) และ ion-channel protein (M2) เป็นโปรตีนที่สร้างจากสายพันธุกรรมแท่งที่ 7 มีความยาว 1,027 นิวคลีโอไทด์ แบ่งออกเป็น M1 และ M2 โดย M1 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 252 ตัว ส่วน M2 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 97 ตัว ซึ่ง M1 จะอยู่ภายใต้ชั้น envelope มีหน้าที่ทำให้โครงสร้างของอนุภาคไวรัสมีความแข็งแรง และคงรูปร่าง โดย M1 จะจับกับส่วนปลายที่ยื่นเข้าไปในไซโตพลาสซึมของ HA NA และ M2 นอกจากนี้ M1 ยังจับกับ RNP ด้วย และ

ถ้าโปรตีน M1 ไม่ได้ถูกแยกออกจาก RNP ภายในไซโตพลาสซึม RNP ก็ไม่สามารถถูกส่งเขาสู่นิวเคลียสได้ (Martin and Helenius, 1991) แต่หลังจากการติดเชื้อ การส่งโปรตีน M1 เข้าไปในนิวเคลียสจะทำให้เกิดการรวมของ RNP ตัวใหม่ที่จะถูกส่งออกจากเซลล์ต่อไป (Martin *et al.,* 1982) ส่วน M2 พบกระจายอยู่บนผิวของ envelope ของไวรัส ทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านของอิออนต่างๆ (ion-channel) เพื่อช่วยในขบวนการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสในขั้นตอน prenetration และ uncoating นอกจากนี้ M2 ยังทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงภาวะความเป็นกรดด่างใน golgi apparatus ได้ (Sugrue and Hay, 1991)

non structural protein (NS1) และ NS2 เป็นโปรตีนที่ถูกแปลรหัสมาจาก unspliced mRNA และ spliced mRNAจากสายพันธุกรรมแท่งที่ 8 มีความยาว 890 นิวคลีโอไทด์ แบ่งออกเป็น non structural protein1 (NS1) และ NS2 โดย NS1 ประกอบไปด้วยกรอะมิโน 230 ตัว ส่วน NS2 ประกอบไปด้วยกรอะมิโน 121 ตัว ซึ่ง NS1 จะพบในเซลล์ที่ติดเชื้อ แต่จะไม่พบในอนุภาคไวรัส จึงระบุว่าโปรตีนชนิดนี้ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง (Krug and Etkind, 1973) NS1 พบในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อและพบอยู่บน polysome (Compans,1973) โปรตีน NS1 ประกอบไปด้วย nuclear export signal (NES) ที่เป็นกรดอะมิโนลำดับสั้นๆที่มี leucine จำนวนมาก (leucine – rich sequence) พบว่าโปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์และการขนส่ง RNA ของเซลล์ออกนอกนิวเคลียส (Ludwing *et al.,* 2002) ส่วนโปรตีน NS2 จะพบในอนุภาคไวรัสโดยจะจับ NP รวมอยู่ใน RNP complex โดยพบว่า NS2 จะไปจับกับ M1 เพื่อช่วยในขบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยเฉพาะการเคลื่อนย้าย RNP complex ออกจากนิวเคลียส ดังนั้น NS2 จึงถูกเรียกว่า Nuclear Export Protein (NEP) (Brown, 2000)

เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็น RNA virus และสารพันธุกรรมมีลักษณะเป็นแท่งจำนวน 8 แท่ง จึงทำให้มีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลง และแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อได้ค่อนข้างง่าย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนที่เรียกว่า “Antigenic drift และ Antigenic shift” antigenic drift เป็นการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนแบบค่อยเป็นค่อยไปพบได้ในไวรัสไข้หวัดใหญ่ทุกชนิด ซึ่งกลไกการเกิด antigenic drift นั้นเกิดจากขบวนการ mutation แต่ antigenic shift พบเฉพาะในไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ เป็นการเปลี่ยนแปลงยีนที่กำหนดลักษณะ surface antigen จนกระทั่งได้ HA หรือ NA subtype ใหม่ ชนิดที่ร่างกายของ host ไม่เคยรู้จักมาก่อน จึงทำให้เชื้อสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกัน ของ host ได้ ทำให้เกิดการระบาดอย่างรุนแรงเป็นวงกว้าง ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสอยู่ตลอดเวลา เพื่อที่จะสามารถเลือกเชื้อไวรัสที่

เหมาะสมในการผลิตวัคซีนสำหรับคนหรือสัตว์ หรือใช้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาในการป้องกัน ควบคุม และกำจัดโรค

วงจรการจำลองตัวเองของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เข้าสู่เซลล์โดยใช้ receptor–binding site ซึ่งอยู่ที่ส่วนปลายโมเลกุล HA จับกับ sialic acid ที่เชื่อมอยู่กับ galactose ที่ปลายสายของ polysaccharide บน glycoprotein หรือ glycolipid ด้วยพันธะ α 2,3 หรือ α 2,6 โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ต่างสายพันธุ์จะมีความจำเพาะกับ sialic acid ที่เชื่อมอยู่กับ galactose ที่ต่างกัน โดยอาจเป็นพันธะ α 2,3 หรือ α 2,6 ซึ่งสิ่งเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ กรดอมิโนที่จำเพาะภายใน receptor–binding pocket ของ HA (Weis *et al.,* 1988) ยกตัวอย่างเช่น ถ้าเป็นสายคาร์โบไฮเดรต ในลำไส้ของสัตว์ปีกจะประกอบด้วย sialic acid ที่เชื่อมกับ galactose ด้วยพันธะ α 2,3 ส่วนในหลอดลมสุกรประกอบด้วย sialic acid ที่เชื่อมกับ galactose ด้วยพันธะ α 2,3 และα 2,6 และในหลอดลมของมนุษย์ สายคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วย sialic acid ที่เชื่อมกับ galactose ด้วยพันธะ α 2,6 (Ito *et al.,* 1998) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งความจำเพาะของ HA ตรงส่วน sialic acid ไม่ว่าจะเป็นที่เชื่อมกับ galactose ด้วยพันธะ α 2,3 หรือ α 2,6 เป็นกุญแจสำคัญที่จะจำกัดการถ่ายทอดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จากสัตว์ปีกสู่มนุษย์โดยตรง

หลังจากไวรัสเกาะผนังเซลล์แล้ว จะเกิดขบวนการ receptor–mediated endocytosis มีผลให้อนุภาคไวรัสเข้าสู่เซลล์ในลักษณะถุงเอนโดโซม (endosomal vesicle) ซึ่งขบวนการดังกล่าวเกิดจากการนำสารเข้าเซลล์ผ่าน clathrin–coated membrane ซึ่ง clathrin–coated membrane–bound vesicle จะ form ตัวโดยการพับเข้าบริเวณ coated–pit domain ที่จำเพาะของเยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากการเข้าไปของไวรัสในถุงเอนโดโซม (internalization) แล้วส่วน clathrin coat จะหลุดออกจาก membrane และมีการหลอมรวมของถุงเอนโดโซมกับ lyzosome ความเป็นกรดภายในถุงเอนโดโซม จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆโดยจะเริ่มเป็นกรดอ่อนก่อน เรียกช่วงนี้ว่า primary endosome และจะตามด้วยช่วง late endosome ซึ่งมีความเป็นกรดสูง การทำให้เกิดกรดในถุงเอนโดโซม สามารถทำได้โดยการ pump H^+ เข้าในถุงเอนโดโซม โดยใช้ ATPase

ขั้นตอนการถอดเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัสในถุงเอนโดโซม เกิดขึ้นโดยอาศัยค่าความเป็นกรดขององค์ประกอบต่างๆ และตัวที่ทำให้เกิดกรด สำหรับการที่ RNPs ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะผ่านเข้าไปใน cytosol นั้น RNPs จะต้องผ่านเยื่อหุ้มของอนุภาคไวรัสเอง และผ่านเยื่อหุ้มของถุง

เอนโดโซม ซึ่งจะเกิดหลังจากการเชื่อมรวมของเยื่อหุ้มไวรัส โดยการใช้ HA เป็นตัวกลางในการเชื่อมกับเยื่อหุ้มเซลล์ (Murphy & Webster, 1996) เข้ากับเยื่อหุ้มไวรัส เนื่องจากสารพันธุกรรมของไวรัสเป็น RNA สายลบ ในอนุภาคของไวรัสจะนำเอา RNA polymerase เข้ามาพร้อมกับอนุภาค และทำการสร้างสาย RNA สายบวกที่เป็นคู่สมกับที่เป็นสายลบ (complementary RNA) ซึ่งมีสองชนิดคือ 1) mRNA ที่มี 5' cap และ poly A tail และ 2) Template RNA ที่มีความยาวเต็มสายใช้เป็นแม่แบบของการสร้างสายพันธุกรรม โดยการสร้าง RNA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้งหมดจะเกิดภายในนิวเคลียส โปรตีนจะถูกสร้างที่ไซโตพลาสซึม ซึ่งโปรตีนที่สร้างจากสายพันธุกรรมทั้ง 8 สาย จะมีหน้าที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ในการสร้างสาย RNA สายลบ จะต้องอาศัยสาย RNA สายบวก ที่เกิดจากขบวนการถอดรหัสเป็นต้นแบบ หลังจากนั้นจึงมีการรวมส่วนประกอบต่างๆ ของ RNP ขึ้นในนิวเคลียสก่อนแล้วจึงถูกส่งผ่านออกมาสู่ไซโตพลาสซึมด้วยการทำงานของโปรตีน NS2 และ M1 ในขณะที่โปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มไวรัส จะถูกสร้างขึ้นใน endoplasmic reticulum และผ่านออกมาทาง golgi apparatus สู่ผิวเซลล์ จากนั้น RNP จะเข้ามารวมกันใต้ผิวเซลล์เกิดขบวนการ assembly และ budding ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยมี HA และ NA แทรกอยู่ ดังแสดงในภาพที่ 2

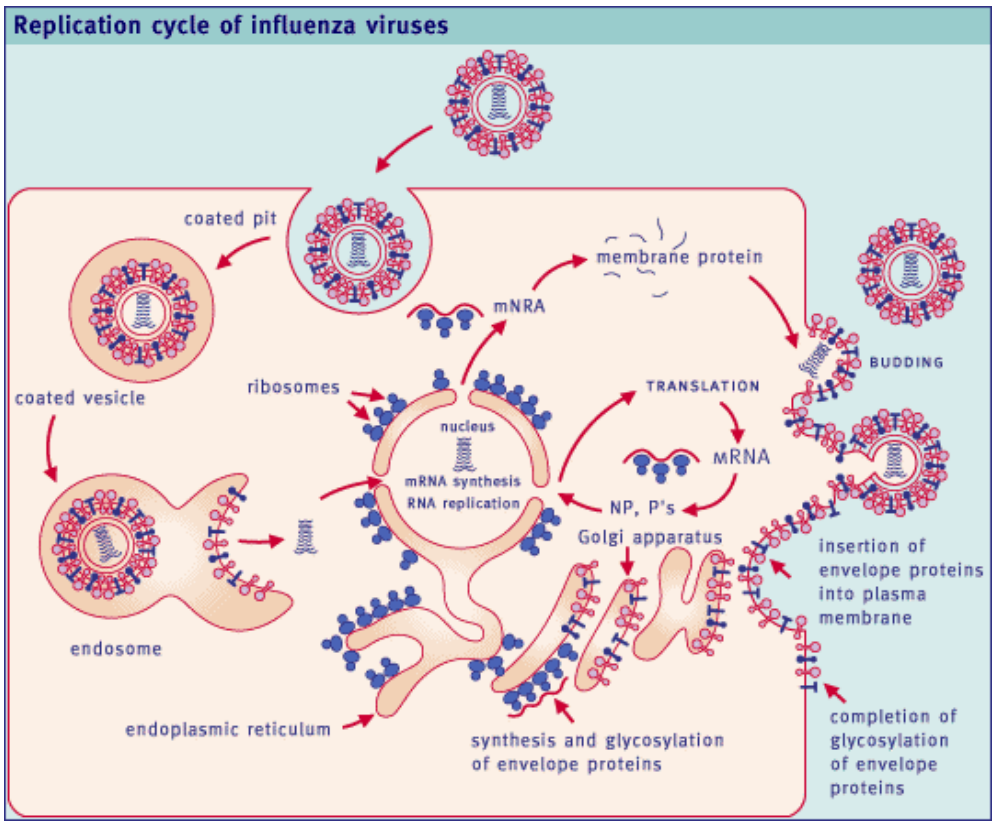
สรุปขั้นตอนสำคัญในวงจรชีวิตของเชื้อไวรัส มีดังนี้

1. การเข้าจับกับ host cell (binding) โดยใช้ HA
2. การเข้าสู่เซลล์ (internalisation)
3. การปล่อยสารพันธุกรรมของไวรัส (uncoating)
4. การผลิตสารพันธุกรรม โปรตีน และสารอินทรีย์ที่จำเป็นในการสร้างไวรัสรุ่นใหม่ (synthesis of viral proteins)
5. การออกจาก host cell (budding) โดยใช้ NA เป็นตัวที่ช่วยแยก sialic acid ออกจาก HA NA และบริเวณผิวของเซลล์ขณะที่ไวรัสกำลังออกนอกเซลล์

ตารางที่ 1 คุณสมบัติและโปรตีนที่สร้างจากสารพันธุกรรมของไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

สายพันธุกรรม	ขนาด (จำนวนเบส)	โปรตีน	หน้าที่
1	2341	PB2	เป็นส่วนหนึ่งของ RNA transcriptase complex
2	2341	PB1	หน้าที่เป็น endonuclease activity กระตุ้นการเพิ่มของนิวคลีโอ-ไทด์ และเป็นส่วนหนึ่งของ RNA transcriptase และ replicase complex
3	2233	PA	เป็นส่วนหนึ่งของ RNA transcriptase และ replicase complex
4	1778	HA	เป็น surface glycoprotein หลักที่ทำหน้าที่เป็น receptor binding ทำให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ของ host กับ เชื้อไวรัส เพื่อนำไปสู่การติดเชื้อ
5	1565	NP	มีหน้าที่ในการประกอบตัวของ RNA เป็น ribonucleoprotein และเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ RNA ของเชื้อไวรัส (viral synthesis)
6	1413	NA	เป็น surface glycoprotein ทำหน้าที่ neuraminidase activity
7	1027	M1	Matrix protein เป็นโปรตีนที่สำคัญวางตัวอยู่ใต้ lipid bilayer ช่วยให้เชื้อคงรูปร่าง
		M2	มีหน้าที่เป็น ion channel มีความสำคัญในช่วงการปล่อยสารพันธุกรรมของไวรัส (virus uncoating)
8	890	NS1	เป็น non-sructural protein มีหน้าที่เป็นตัว interferon response inhibitor
		NS2	มีหน้าที่เคลื่อนย้าย RNP complex ออกจากนิวเคลียส (nuclear export of viral RNA) และเกี่ยวข้องกับการรวมตัวของไวรัส (viral assembly)

ที่มา: Brown (2000)



ภาพที่ 2 วงจรการจำลองตัวเองของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

ที่มา: Heinen (2002)

ไข้หวัดใหญ่สุกร (Swine influenza)

สาเหตุของโรค

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza) มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด เอ ที่เรียกว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza virus; SIV) เชื้อ SIV จะจับกับตัวรับ (receptor) บนเซลล์เยื่อบุ (epithelial cell) ของระบบทางเดินหายใจและปอดของสุกร โดยเซลล์ของสุกรจะมีตัวรับที่จำเพาะ 2 แบบ คือ α2-3-galactose sialic acid ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับในสัตว์ปีก และ α2-6-galactose sialic acid เป็นชนิดเดียวกับที่พบในคน (Ito *et al.,* 1998) จึงมักพบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จากคนไปสุกร หรือจากสุกรไปยังคนอยู่บ่อยๆ เนื่องจากสุกรมีตัวรับบนผิวเซลล์ที่สามารถจับกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ ที่มาจากสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ สุกรจึงเปรียบเหมือนสื่อกลางในการผสมรวมของสายพันธุกรรมหรือ “mixing vessel” เมื่อมีการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิดในเซลล์เดียวกัน อาจทำให้เกิดการผสมรวมกัน (reassortment) ได้ไวรัสตัวใหม่เกิดขึ้น (reassortant virus) (Ito *et al.,* 1998) เชื้อ SIV จะทำให้เกิดการตายและความเสียหายของเซลล์ แต่อย่างไรก็ดีเซลล์เหล่านั้นสามารถที่จะถูกสร้างทดแทนได้ใหม่ ถ้าไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน เนื่องจากว่าเชื้อ SIV สามารถถูกกำจัดได้อย่างรวดเร็วในระบบทางเดินหายใจ (Thacker *et al.,* 2001) มีรายงานการตรวจพบเชื้อ SIV 3 subtypes หลักๆ คือ H1N1, H3N2 และ H1N2 (Olsen, 2002; Choi *et al.,* 2002) และอาจพบชนิด H3N1 (Lekcharoensuk *et al.,* 2006; Ma *et al.,* 2006) และ H1N7 (Brown *et al.,* 1996) ได้ด้วย

สถานการณ์ของโรคไข้หวัดใหญ่สุกร

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรพบครั้งแรกในปี 1918 ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับการระบาดของ Spanish influenza ในคน (Webster *et al.,* 1992) และเชื้อไวรัสถูกเพาะแยกครั้งแรกในปี 1930 (Shop, 1931) ซึ่งลักษณะทางพันธุกรรมมีความคล้ายคลึงกับไข้หวัดใหญ่ในคน สายพันธุ์ H1N1 (Reid *et al.,* 1999) ในปี 1998 ทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกาพบไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 ซึ่งประกอบด้วยสายพันธุกรรมที่ได้รับมาจาก ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร คน และสัตว์ปีก (Karasin *et al.,* 2000) และในปี 1999 มีการพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ซึ่งเป็นการผสมรวมกันระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 และ สายพันธุ์ H1N1 ดั้งเดิม (classical H1N1 SIV) (Karasin *et al.,* 2000) ไข้หวัดใหญ่สุกรมีการแพร่กระจายทั่วโลกเช่นเดียวกับไข้หวัดใหญ่ในคน

จากการศึกษาทางซีรัมวิทยาพบว่าสุกรติดเชื้อชนิด H1N1 และ H3N2 ตามลำดับในอัตราส่วนดังนี้ 92% และ 57% ที่เบลเยียมในปี 1996 ; 73% และ 62% ที่สเปนในปี 1992 ; 55% และ 51% ที่เยอรมันในปี 1993 และ 60% และ 30% ในปี 1990 ; 54% และ 13% ในปี 2001 ที่เนเธอร์แลนด์ (Heinen, 2002) ในประเทศไทย Kupradinan (1991) และ สุจิราและคณะ (2548) ได้รายงานการแยกเชื้อไวรัส H1N1 จากสุกรที่มีอาการระบบทางเดินหายใจส่วนต้น ผลสำรวจการติดเชื้อ H1N1 ในสุกรด้วยวิธี ELISA จาก 15 จังหวัดในประเทศไทยพบแอนติบอดีต่อเชื้อ H1N1 ในสุกรพ่อแม่พันธุ์ 44% (จาก 33 ฟาร์ม) และในสุกรขุน 20% (จากฟาร์ม) โดยพบอัตราการติดเชื้อสูงที่จังหวัดนครปฐม และราชบุรีซึ่งเป็นเขตพื้นที่เลี้ยงสุกรหนาแน่น (อารุณี, ม.ป.ป.)

นอกจากนั้นยังมีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสสุกร ชนิด H1 จากผู้ที่ทำงานใกล้ชิดกับสุกร (Kluska *et al.,*1961; Schnurrenberger *et al.,*1970) และในที่สุดก็สามารถยืนยันได้ว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ของสุกรสามารถติดต่อสู่คนได้ จากการพบเชื้อไวรัสในสุกรและผู้เลี้ยงสุกรที่เป็นเชื้อชนิดเดียวกันและมีความเหมือนกัน ทั้งทางแอนติเจนและพันธุกรรมกับเชื้อไวรัสสุกรชนิด H1N1 หลังจากนั้นก็มีรายงานการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้จากคนป่วยด้วยอาการของระบบหายใจ (Dasco *et al.,*1984) บางครั้งก็ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต (Rota *et al.,* 1989; Wentworthet *et. al.,*1997) ผู้ป่วยทุกรายเคยสัมผัสกับสุกรป่วยและเชื้อไวรัสชนิด H1N1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีความใกล้ชิดกับ classical swine influenza virus H1N1 (Alexander and Brown, 2000) สุกรสามารถติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและทำให้ป่วยได้ (Brown *et al.,*1995; Katsuda *et al.,* 1995) และสามารถติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ของสัตว์ปีก (Avian influenza virus; AIV) ได้ (Kida *et al.,* 1994) สุกรจึงเป็น intermediate host ของคนและสัตว์ปีก (Scholtissek *et. al.,* 1983) เนื่องจากสุกรมี receptor ที่สามารถจับกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคนซึ่งเป็น α2-6-galactose sialic acid และของสัตว์ปีกซึ่งมี α2-3-galactose sialic acid ดังนั้นสุกรจึงทำหน้าที่เป็น “mixing vessel” ในการเกิดการผสมรวมของสายพันธุกรรม (genetic reassortment) ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคนและสัตว์ปีก ซึ่งอาจทำให้เกิดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ๆได้ง่าย (Ito *et al.,*1998) ในชนบทของหลายๆประเทศ เกษตรกรมักเลี้ยงสุกร ไก่และเป็ดแบบปล่อยรวมกันหลังบ้าน สุกรจึงมีโอกาสติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ ของคนและสัตว์ปีกพร้อมกันได้ และขณะเชื้อเพิ่มจำนวนก็เกิดการแลกเปลี่ยนสายพันธุกรรมของเชื้อแต่ละชนิด สุกรมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อระบาดวิทยาและสาเหตุของไข้หวัดใหญ่ในคน เนื่องจากเชื้อ classical swine influenza virus H1N1 เป็นเชื้อโรคสัตว์ติดคน และสามารถแพร่สู่คนได้โดยตรง และนอกจากนั้นสุกรเป็น intermediate host และ mixing vessels ทำให้เกิดสาย

พันธุ์ เชื้อไข้หวัดใหญ่ใหม่ๆ ซึ่งผสมผสานระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ของสัตว์ปีกชนิดต่างๆของคนรวมทั้งของสุกรเอง (Myers *et al.,* 2007)

ลักษณะอาการทางคลินิก

โรคนี้ทำให้สุกรแสดงอาการของระบบทางเดินหายใจคล้ายกับคนที่เป็นหวัด สุกรจะมีอาการไข้สูงประมาณ 40.5–41.7°C ซึม น้ำหนักลด หายใจลำบาก อาจมีน้ำมูก ไอและจาม ความรุนแรงของอาการป่วยขึ้นกับชนิดของเชื้อที่ได้รับ อายุของสุกร ภูมิคุ้มโรค สภาพการเลี้ยง ความเครียด และภาวะติดเชื้อชนิดอื่นๆแทรกซ้อน (Heinen, 2002) อัตราการติดเชื้อในฝูงอาจสูงถึง 100% แต่อัตราการตายต่ำกว่า 5% (Kida *et al.,* 1994) สุกรจะหายป่วยเป็นปกติได้เร็ว โดยทั่วไปสุกรจะแสดงอาการป่วยนานประมาณ 5-7 วัน หลังจากนั้นจะหายเป็นปกติสุกรอาจตายได้ ถ้ามีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน (Heinen, 2002) สุกรที่มีภูมิคุ้มจากแม่หรือสุกรที่เคยได้รับเชื้อมาก่อนอาจป่วยเพียงเล็กน้อย แม้ว่าโรคนี้จะไม่ทำให้สุกรตาย แต่การติดเชื้อมีผลต่อสุขภาพสุกรทำให้น้ำหนักลด ดังนั้นจึงต้องใช้เวลาในการขุนสุกรนานขึ้น ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ ที่ประเทศอังกฤษมีการประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจ จากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรทำให้สูญเสียประมาณ 7 ปอนด์/ตัว และโดยเฉลี่ยถึงปีละ 65 ล้านปอนด์ (Kay *et al.,* 1994)

การติดต่อ

เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจะติดต่อจากสุกรไปสู่สุกรผ่านทางจมูกและคอ (nasopharyngeal) โดยไวรัสจะออกมากับสิ่งคัดหลั่งในจมูก และจะติดจากการจาม ไอ หรือการสัมผัสสิ่งคัดหลั่งที่มีเชื้อไวรัสปนอยู่โดยตรง (Heinen, 2002) การระบาดของโรคในฟาร์มสุกรจะรวดเร็ว โดยสุกรจะป่วยพร้อมๆกัน ฤดูการก็มีอิทธิพลต่อการระบาดได้ เช่นในช่วงต่อระหว่างฤดูฝนสู่ฤดูหนาว จะพบอัตราการป่วยของสุกรในฟาร์มเพิ่มขึ้น (Easterday and Reeth, 1999)

การตรวจวินิจฉัย

การวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโดยทั่วไปจะใช้ลักษณะอาการทางคลินิก ร่วมกับการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการซึ่งมี 3 วิธีหลักๆ คือ การแยกและการพิสูจน์เชื้อไวรัส การตรวจหาแอนติเจนจากตัวอย่าง และการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม (สุดา, 2549) แนวทางวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไข้หวัด

ใหญ่ อาจจะใช้การตรวจหาแอนติเจนในเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยการย้อมดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ หรือทดสอบหาแอนติเจนในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี Rapid test ซึ่งจะบอกได้เพียงว่าติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ ส่วนการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) จากตัวอย่างสิ่งที่ตรวจหรือจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ สามารถยืนยันการติดเชื้อ และใช้แยกชนิดของไวรัสได้ (Choi *et al.,* 2002) ส่วนการแยกเชื้อไวรัสถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการบ่งชี้ถึงชนิดของเชื้อ จะทราบผลได้ภายใน 10-14 วัน ซึ่งจะใช้การเพาะเลี้ยงในเซลล์ หรือเลี้ยงในไข่ฟัก แต่เลี้ยงในเซลล์จะมีความสะดวกกว่า เซลล์ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรคือ เซลล์ Madin Darby Canine Kidney (MDCK) สามารถตรวจดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัส ส่วนการทดสอบหาแอนติบอดีจากซีรัมสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ neutralization test, hemagglutination inhibition test และ enzyme linked immunosorbent assay เป็นต้น (Heinen, 2002)

ความไวและความจำเพาะของการทดสอบทางห้องปฏิบัติการขึ้นกับปัจจัยหลายๆอย่าง ได้แก่ ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง วิธีการเก็บและชนิดตัวอย่างที่ใช้ ตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง คุณภาพของตัวอย่างที่ตรวจสอบ และการเลือกเทคนิคในการตรวจสอบหาเชื้อ เป็นต้น (สุดา, 2549)

การควบคุมป้องกันและรักษา

การควบคุมและป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่สุกรนั้นมีความสำคัญ เนื่องจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรมีผลกระทบต่อทั้งเศรษกิจและยังมีความสำคัญในทางระบาดวิทยาและสาเหตุของไข้หวัดใหญ่ในคน เชื้อ classical swine influenza virus, H1N1 เป็นเชื้อโรคสัตว์ติดคน และสามารถแพร่สู่คนได้โดยตรง (zoonosis) อีกทั้งสุกรเป็น intermediate host และ mixing vessels ทำให้เกิดสายพันธุ์เชื้อไข้หวัดใหญ่ใหม่ๆ ซึ่งผสมผสานระหว่างเชื้อไวรัส influenza ของสัตว์ปีกชนิดต่างๆของคนรวมทั้งของสุกรเอง วิธีการที่ดีที่สุดในการจัดการกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรคือ การป้องกันการเกิด และแพร่ระบาดของโรค (อารุณี, ม.ป.ป.) โดยจำกัดการเคลื่อนย้ายฝูงสัตว์ พยายามหลีกเลี่ยงการซื้อสัตว์มาใหม่มาเพิ่มในฝูง และหลีกเลี่ยงการนำสัตว์มาแสดงในที่ซึ่งสัตว์สามารถสัมผัสกับสัตว์อื่นๆ รวมถึงการจัดการฟาร์มและการสุขาภิบาลฟาร์มที่ดีและเข้มงวด นอกจากจะเป็นการป้องกันโรคในสุกรแล้วยังช่วยลดความเสี่ยงจากการระบาดของไข้หวัดใหญ่ในคนด้วย นอกจากนี้ยังมีวัคซีนชนิด live-attenuated virus vaccines และ inactivated virus vaccines ใช้สำหรับป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่สุกร (Heinen, 2002)

ส่วนการรักษาจะรักษาตามอาการ โดยใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อน (secondary infection) ที่อาจจะเกิดขึ้นได้ จะต้องมีการจัดการสุขาภิบาลในฟาร์มที่ดี เช่น ปรับสภาพคอกและสิ่งแวดล้อมให้แห้ง สะอาด มีการพ่นยาฆ่าเชื้อ อีกทั้งควรลดหรือหลีกเลี่ยงความเครียดที่จะเกิดกับสุกร เช่นการเคลื่อนย้ายสัตว์ หรือนำสัตว์จากต่างที่มารวมกัน และเมื่อส่งกลุ่มสุกรที่เคยติดเชื้อ SIV ไปโรงฆ่าแล้ว จะต้องทำความสะอาดและฆ่าเชื้อในโรงเรือนให้มั่นใจก่อนที่จะสุกรรุ่นต่อไปเข้ามาเลี้ยง เพื่อป้องกันการติดเชื้อไปยังสุกรกลุ่มใหม่ (Carol, 1996)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรสายพันธุ์ H3N2 ทั้ง 8 ยีน

1.1 การเพาะแยกเชื้อไวรัส (Virus Isolation)

ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร KU7.2, KU5.1, KU5.2, KU6.1, KU21, KU45 และ KU58 โดย KU7.2 และ KU5.1 เก็บจากฟาร์มสุกรจังหวัดชลบุรี KU5.2 เก็บจากฟาร์มสุกรจังหวัดสุพรรณบุรี KU6.1 เก็บจากฟาร์มสุกรจังหวัดนครปฐม และ KU21, KU45 และ KU58 เก็บจากฟาร์มสุกรจังหวัดราชบุรี ทำการป้าย (swab) ตัวอย่างจากบริเวณโพรงจมูกของสุกรที่แสดงอาการ ไอ หายใจลำบาก และอ่อนแรง เขย่าสารละลายที่มี nasal swab อย่างแรง กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 μ จากนั้น inoculate virus suspension ปริมาณ 1 ml ลงบนเซลล์ MDCK อบที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย 1 μg/ml TPCR treated trypsin 0.3% bovine serum albumin และยาปฏิชีวนะ หลังจาก inoculation จะเก็บ flask ที่บรรจุเซลล์ที่มีไวรัสไว้ในตู้ CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของ cytopatic effect (CPE) ที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยวิธี Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) โดยใช้ Monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน NP ของ SIV เป็นตัวทดสอบ

1.2 การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

ทำการย่อยเซลล์ให้หลุดเป็นเซลล์เดี่ยวด้วย 0.1% trypsin จำนวน 1 ml เคาะให้เซลล์หลุดเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นเติม 1X PBS จำนวน 5 ml แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอดขนาด 15 ml นำไปปั่นที่ 1,500 rpm นาน 5 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ไปเกลี่ยบนสไลด์คู่กับเซลล์ควบคุม ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำสไลด์ไป fix ใน 4% formalin โดยใส่ใน jar ให้ท่วม 10 นาที ย้ายสไลด์ไปแช่ใน 0.5% saponin 10 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วย PBS ที่ผสมด้วย 0.5% tween 80 จากนั้นเติม monoclonal antibody ต่อ NP ที่เจือจาง 1:2000 ให้ท่วมตัวอย่าง วางสไลด์ใน moist chamber นำทั้งหมดอบ ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำสไลด์ไปล้างด้วย PBS ที่ผสมด้วย 0.5% tween 80 จากนั้นเติม antibody ต่อ Ig G ของหนูที่ติดฉลากด้วย peroxidase ซึ่งเจือจาง 1: 250 ให้ท่วมตัวอย่าง วางสไลด์ลงใน moist chamber นำทั้งหมดอบ ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำสไลด์ไปล้างด้วย PBS ที่

ผสมด้วย 0.5% tween 80 จากนั้นเติมสารละลาย DAB (3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride dehydrate) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10-15 นาที แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อ่านผลเซลล์ที่ติดเชื้อจะให้สีน้ำตาลแดง

1.3 การสกัด RNA

ทำการสกัด RNA โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ด้วย Trizol® (Invitrogen) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสจำนวน 500 µl เติม Trizol® (Invitrogen) 500 µl ผสมเบาๆให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วเติม cholofrom 200 µl เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นที่ 11,000 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วย้ายส่วนใสไปยัง microcentrifuge tube ใหม่ แล้วเติม isopropanol เท่ากับปริมาตรที่ย้ายออกมา เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที หลังจากนั้นปั่นที่ 11,000 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บตะกอน RNA แล้วนำไปปั่นล้างด้วย 75% Ethanol 500 µl ปั่นที่ 11,000 x g นาน 5 นาที นำตะกอน RNA ที่ได้มาทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนด้วย distilled water เพื่อใช้เป็น template ในการทำ cDNA ต่อไป

1.4 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธีการ reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

ทำการสังเคราะห์ DNA จาก RNA และเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primer ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M และ NS ดังแสดงในตารางที่ 2

ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 µl ประกอบไปด้วย 2x reaction mix (Invitrogen) จำนวน 12.5 µl forward และ reverse primers ที่ความเข้มข้น 10 pmol อย่างละ 2.5 µl เอนไซม์SuperScrip™III RT/Platinum® *Taq* Mix (Invitrogen) จำนวน 0.5 µl และ RNA จำนวน 7 µl โดยตั้งอุณหภูมิ cDNA synthesis ที่ 45 °C นาน 60 นาที pre-denaturation ที่ 94 °C นาน 10 นาที denature ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 55°C นาน 30 วินาที extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที

ทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยเปรียบเทียบกับ standard DNA (DNA marker) โดยใช้ 1.0 % agarose gel เป็นตัวกลางในการทำ electrophoresis และใช้ 1xTA (Tris-actate) เป็น buffer ที่ใช้ในการเคลื่นที่ของ PCR product โดยผ่านสนามไฟฟ้าขนาด 100 volt นาน 30 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบขนาดภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV illuminator

1.5 การสกัด DNA จากเจล (Gel purification)

ทำการตัดแถบ DNA ที่ต้องการ จาก agarose gel ใส่ใน microcentrifuge tube ใหม่ จากนั้นแยก DNA ให้บริสุทธิ์ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต (Nucleospin®) ดังนี้ เติม 200 µl buffer NT แล้วนำไป incubate ที่ 50^{O}C ประมาณ 5-10 นาที vortex ทุกๆ 2-3 นาที จนเจลละลายหมด แล้วถ่ายไปที่ NucleoSpin® Extract II column นำไปปั่น 1 นาที ที่ 11,000 x g เทน้ำส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วย 600 µl buffer NT3 นำไปปั่น 1 นาที ที่ 11,000 x g เทน้ำส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง แล้วทำให้ silica membrane แห้ง โดยนำไป centrifuge 2 นาที ที่ 11,000 x g จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปยัง microcentrifuge tube ใหม่ เติม 10 µl elution buffer ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 นาที แล้วนำไปปั่น 1 นาที ที่ 11,000 x g เพื่อเก็บ DNA จาก silica membrane

1.6 การหาลำดับเบส (DNA Sequencing)

ในการหาลำดับเบสจะส่ง PCR products หรือ plasmid ที่มียีนของ SIV ไปที่ หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice unit: BSU) กรุงเทพมหานคร หรือที่ห้องปฏิบัติการ DNA เทคโนโลยี (DNA TECH) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เพื่อทำการหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA sequencing โดยวิธี dideoxy chain termination

1.7 การเปรียบเทียบเบส (Alignment)

เมื่อได้ลำดับเบสมาแล้ว จะนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสใน Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม Megabast เพื่อหา sequence ของยีนที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด ซึ่งสามารถทำการวิเคราะห์ได้จากหน้าต่างของ NCBI เพื่อตรวจสอบว่าลำดับ

เบสที่ได้นั้นเป็นของ Swine influenza virus และหายีนของ SIV ใน database ที่มีลำดับเบสเหมือนกับของ DNA ที่ amplified ได้มากที่สุด

1.8 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรที่พบในประเทศไทยและในต่างประเทศ (phylogenetic tree)

ทำการ retrieve DNA sequence ของทั้ง 8 ยีน ของ SIV จาก database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) จากนั้นทำการเรียงเพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสด้วยโปรแกรม CLUSTAL W (DNA star) ตัดเฉพาะส่วนที่มีความหลากหลายเพื่อทำ subalignment จากนั้นนำข้อมูลมาเปรียบเทียบและจัดความสัมพันธ์ ในรูปของ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA4 (Tamura *et al.,* 2007)

2. การโคลนและการแสดงออกของโปรตีน M1

2.1 การสังเคราะห์ M1 gene ด้วยเทคนิค RT-PCR

สกัด viral RNA จากเชื้อไวรัส SIV สายพันธุ์ H3N2 (A/SW/Thailand/KU7.2/04) ที่แยกได้ในประเทศไทยในปี 2004 จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยใช้ Trizol® (Invitrogen) นำ RNA ที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ cDNA และเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี RT-PCR โดยใช้ specific primer ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อ M1 gene คือ McloneSIV1 (5’ CGC GGA TCC GGT CCC CTC AAA GCC 3’) และ McloneSIV2 (5’ CGG GGT ACC TCA CTT GAA TCG CTG 3’) สำหรับการสังเคราะห์ M gene ของเชื้อไวรัส SIV ซึ่ง primers ดังกล่าวประกอบด้วยตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Kpn*I ตามลำดับ ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรสารโดยรวม 25 µl ประกอบไปด้วย 2x reaction mix (Invitrogen) จำนวน 12.5 µl Forward และ Reverse primer ความเข้มข้น 10 pmol อย่างละ 2.5 µl เอนไซม์ SuperScrip™III RT/Platinum® *Taq* Mix (Invitrogen) จำนวน 0.5 µl และ RNA จำนวน 7 µl โดยตั้งอุณหภูมิสำหรับ cDNA synthesis 45 °C นาน 60 นาที เมื่อมีการสังเคราะห์ cDNA แล้วจะเข้าสู่การทำ PCR โดยทันที ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ pre-denaturation ที่ 94°C นาน 10 นาที denaturation ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 55°C นาน 30 วินาที extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที ทำการตรวจสอบขนาดของ PCR

product โดยเปรียบเทียบกับ standard DNA (DNA marker) โดยใช้ 1.0 % agarose gel เป็นตัวกลางในการทำ electrophoresis และใช้ 1xTA เป็น buffer ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของ PCR product โดยผ่านสนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 volt นาน 30 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบขนาดภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel document และเก็บ PCR product ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการโคลนต่อไป

2.2 การโคลน M1 gene ของเชื้อไวรัส SIV สำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม M1

นำ PCR product โคลนเข้าสู่ TA cloning vector (RBC) โดยทำการ ligate ที่อุณหภูมิ 16 °C นานข้ามคืน ได้เป็น pTA_M นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีทางเคมี (chemically transformation) ทำการตรวจสอบโคลนจากคุณสมบัติต้านยาปฏิชีวนะ ampicillin และ วิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน M และยืนยันความถูกต้องของยีนโดยการหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA sequencing โดยวิธี dideoxy chain termination เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม Bioedit version 7.0.9.0 จากนั้นเลี้ยง *E.coli* ในอาหารเหลว LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml เพื่อเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis method (Sambrook *et al.,* 1989) นำยีนเป้าหมาย subclone เข้าสู่ protein expression vector (pQE30) โดยนำพลาสมิด pTA_M และ pQE30 ที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ออกแบบไว้ที่ปลาย 5’ และ 3’ ของยีน คือ *Bam*HI และ *Kpn*I หลังจากนั้นเชื่อมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันตามวิธีข้างต้นเพื่อสร้าง pQE30_M นำพลาสมิด pQE30_M เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี transformation คัดเลือกโคลนจากคุณสมบัติต้านยาปฏิชีวนะ ampicillin และวิธี PCR

2.3 การผลิตและการตรวจสอบโปรตีนลูกผสม M1

เลี้ยง *E.coli* DH5α ที่มี พลาสมิด pQE30_M ใน LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) เพื่อเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดจากนั้นถ่ายยีน M1 เข้าสู่เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ M15 เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ทำการทดสอบและคัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกไปสังเคราะห์โปรตีน โดยเลี้ยง *E.coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีพลาสมิด pQE30_M ในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชวนะ ampicillin (100 µg/ml) และ kanamycin (25 µg/ml) ในเครื่อง shaking incubator ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C นานข้ามคืน แล้ว subculture ลงในอาหารชนิดเดียวกันในสัดส่วน 1:50 เลี้ยงต่อไป

ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) ที่ความเข้มข้น 1.0 mM และนำไปเลี้ยงต่อนาน 3 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000xg นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ และทำการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนที่ได้ โดยแบ่งส่วนตะกอนเซลล์ที่ปั่นแยกมาละลายในสารละลาย 1xSTE pH 8.0 (10mM Tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0 และ 10 mM NaCl) ปริมาตร 200 µl และเติม lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 30 mg/ml ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 ×g นาน 1 นาที แยกส่วนใสด้านบนและตะกอน โดยส่วนใสด้านบนเป็นตัวแทนของ soluble protein และตะกอนเป็นตัวแทน insoluble protein (inclusion body) หลังจากนั้นนำทั้งสองส่วนมาตรวจสอบด้วย SDS-PAGE ผ่าน gel ที่มีความเข้มข้น 15%

2.4 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification)

จากการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนพบว่ามีรูปแบบเป็น inclusion bodies จึงนำส่วนตะกอนเซลล์มาล้างโปรตีนที่ไม่ต้องการออกด้วย urea ที่ความเข้มข้น 8 M นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 ×g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนตะกอนเซลล์มาละลายด้วย 10% sarcosine ใน 1x STE pH 8.0 และ sonicate 3 ครั้ง ที่ 5 amplitude micron นาน 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 ×g นาน 5 นาที ย้ายส่วนใสใส่ microtube หลอดใหม่ แล้วเติม 10% Triton X-100 ผสมให้เข้ากันและเก็บที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 °C เพื่อใช้สำหรับเป็น protein antigen ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย

2.5 การทำ western blot analysis

ทำการตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนลูกผสม M1 (recombinant M protein) ที่ผลิตได้ โดยวิธี western blot นำ โปรตีนลูกผสม M1 มาแยกขนาดด้วย SDS-PAGE ผ่าน gel ที่มีความเข้มข้น 15%โดยผ่านสนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 90 volt นาน 120 นาที ทำการย้ายโปรตีนจากเจลลงใน nitrocellulose membrane ด้วยเครื่อง transfer gel ด้วยกระแสไฟฟ้า 250 mA นาน 3 ชั่วโมง นำส่วนของเจลไปย้อมด้วย Coomassie blue staining เพื่อตรวจสอบการ transfer แล้วนำ membrane ไปตรวจสอบด้วยการทำ blotting โดยจะบล็อก membrane ด้วย 10% skim milk (10% dry skim milk ใน 1x PBST) ที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน จากนั้นนำ membrane มาตัดแบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกนำมาบ่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ในซีรัมของสุกรที่ปกติ และที่มีแอนติบอดีต่อไข้หวัด

ใหญ่ ชนิดเอ (primary antibody) โดยทำการเจือจางซีรัมสุกรที่อัตราส่วน 1:200 และใช้ Protein G ที่ติดฉลากด้วย peroxidase (ZYMED™) เป็น secondary antibody ในอัตราส่วน 1:500 ส่วนกลุ่มที่สองนำมาบ่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ในซีรัมของไก่ที่ปกติ และที่มีแอนติบอดีต่อไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ (primary antibody) โดยทำการเจือจางซีรัมไก่ที่อัตราส่วน 1:200 และใช้ antibody ต่อ Ig G ของไก่ที่ติดฉลากด้วย peroxidase (ZYMED™) เป็น secondary antibody ในอัตราส่วน 1:500 และใช้ DAB (3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride dehydrate) เป็น substrate ทิ้งไว้จนเกิดสี และหยุดปฏิกิริยาด้วย น้ำกลั่น (Harlow and Lane, 1988)

2.6 การกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในกระต่ายและการตรวจสอบแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม M1 และเซลล์ติดเชื้อ

นำโปรตีนลูกผสม M1 ที่ผ่านการทำ partial purification ผสมกับ complete Freund's adjuvant (SIGMA®) อัตราส่วน 1:1 ฉีดเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในกระต่าย โดยฉีดกระตุ้นภูมิทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ หลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 3 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงทำการเก็บซีรัมของกระต่ายเพื่อนำมาตรวจสอบหาแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม M1 โดยวิธี dot blotting เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างซีรัมกับตัวเจือจาง (diluent) ที่เหมาะสมที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับแอนติเจนโปรตีนลูกผสม M1 โดยเริ่มจาก 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600, 1:3,200, 1:6,400 และ 1:12,800 โดยใช้ goat anti-rabbit peroxidase (ZYMED™) เจือจางที่อัตราส่วน 1:500 เป็น secondary antibody และใช้ DAB เป็น substrate หลังจากนั้นทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัส SIV สายพันธุ์ H3N2 ด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) โดยทำการย่อยเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ที่ติดเชื้อไวรัส SIV สายพันธุ์ H3N2 ให้หลุดเป็นเซลล์เดี่ยวด้วย 0.1% trypsin จากนั้นเติม 1X PBS นำสารละลายทั้งหมดไปปั่นที่ 1,500 rpm นาน 5 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ไปเกลี่ยลงบนสไลด์คู่กับเซลล์ควบคุม ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำสไลด์ไป fix ใน 4% formalin นาน 10 นาที ย้ายสไลด์ไปใส่ใน 0.5% saponin นาน 10 นาที จากนั้นเติมซีรัมที่กระตุ้นได้จากกระต่าย ในอัตราส่วน 1:400 เป็น primary antibody และใช้ goat anti-rabbit peroxidase เป็น secondary antibody ในอัตราส่วน 1: 500 จากนั้นเติม DAB เป็น substrate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10-15 นาที แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อ่านผลเซลล์ที่ติดเชื้อจะให้สีน้ำตาลแดง

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของ SIV และขนาดของ DNA

Primers	ยีน	ลำดับเบส	แหล่งอ้างอิง
NS_F	NS	AGCAAAAGCAGGGTGACAAA	Zou.,1997
NS_R	NS	AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTT	Zou.,1997
M_F	M	CTCGAGCAAAAGCAGGTAGAT	Zou.,1997
M_R	M	AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTT	Zou.,1997
NA_F	NA	AGCAAAAGCAGGAGTTTAAAATG	Zou.,1997
NA_R	NA	AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	Zou.,1997
NP_F	NP	CTCGAGAGCAAAAGCAGGGT	Zou.,1997
NP_R	NP	AGTAGAAACAAGGGTATTTTTC	Zou.,1997
HA_F	HA	GATCGCTCTTCTGGGAGCAAAAGC AGGGGATAATTCTAT	Hoffmann *et al.,* 2001
HA_R	HA	CATCGCTCTTCTATTAGTAGAAAC AAGGGTGTTTTTAAT	Hoffmann *et al.,* 2001
PA_1_F	PA	GATCGCTCTTCTGGGAGCGAAAGC AGGTACTGAT	Hoffmann *et al.,* 2001
PA_1_R	PA	ATGCTCAATTTAAGGCATCC	Designed in this study
PA_2_F	PA	GAGGGCAAGCTTTCTCAAATG	Designed in this study
PA_2_R	PA	CAAGAACACAATACTTCTCCC	Designed in this study
PA_3_F	PA	GGGTTCATTGTAAAAGGGAGATC	Designed in this study
PA_3_R	PA	CATCGCTCTTCTATTAGTAGAAAC AAGGTACTT	Hoffmann *et al.,* 2001
PB1_1_F	PB1	GATCGCTCTTCTGGGAGCGAAAGC AGGCAAACCA	Hoffmann *et al.,* 2001
PB1_1_R	PB1	CATTTTTCTCACAACATTTGCC	Designed in this study
PB1_2_F	PB1	GTACTTCGTAGAAACACT	Designed in this study
PB1_2_R	PB1	TGCTGGTCCAAGATCATTGTT	Designed in this study
PB1_3_F	PB1	AGCCAATTTCAGTATGGAG	Designed in this study

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Primers	ยีน	ลำดับเบส	แหล่งอ้างอิง
PB1_3_R	PB1	CATCGCTCTTCTATTAGTAGAAAC AAGGCATTT	Hoffmann *et al.,* 2001
PB2_1_F	PB2	GATCGCTCTTCTGGGAGCGAAAGC AGGTCAAATA	Hoffmann *et al.,* 2001
PB2_1_R	PB2	ACCAATTTGTGTGCTGTGGCACA	Designed in this study
PB2_2_F	PB2	ACCTGCTGGGACAGATGTACACT	Designed in this study
PB2_2_R	PB2	TCCGTTGATTCTCCACATCAT	Designed in this study
PB2_3_F	PB2	CTTGAGAGTTCGAGATCAGC	Designed in this study
PB2_3_R	PB2	CATCGCTCTTCTATTAGTAGAAAC AAGGTCGTTT	Hoffmann *et al.,* 2001

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรสายพันธุ์ H3N2 ทั้ง 8 ยีน

1.1 การเพาะแยกเชื้อไวรัส และการแยก subtype

จากการเพาะแยกเชื้อไวรัสที่ได้จาก nasal swab ของสุกรที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่นการไอ หายใจลำบาก และอ่อนเพลีย ทั้ง 7 ตัวอย่างในเซลล์ MDCK ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM พบลักษณะของ CPE ภายใน 2-3 วันหลังจากการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 3) จากนั้นทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ด้วยวิธี IPMA โดยใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน NP ของ SIV เป็นตัวทดสอบ พบว่ามีการทำปฏิกิริยากันระหว่าง monoclonal antibody กับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสที่อยู่ภายในเซลล์ MDCK จะเห็นได้จากเซลล์ติดเชื้อไวรัสจะมีสีน้ำตาลแดงของ peroxide เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่ติดสี (ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ MDCK เป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

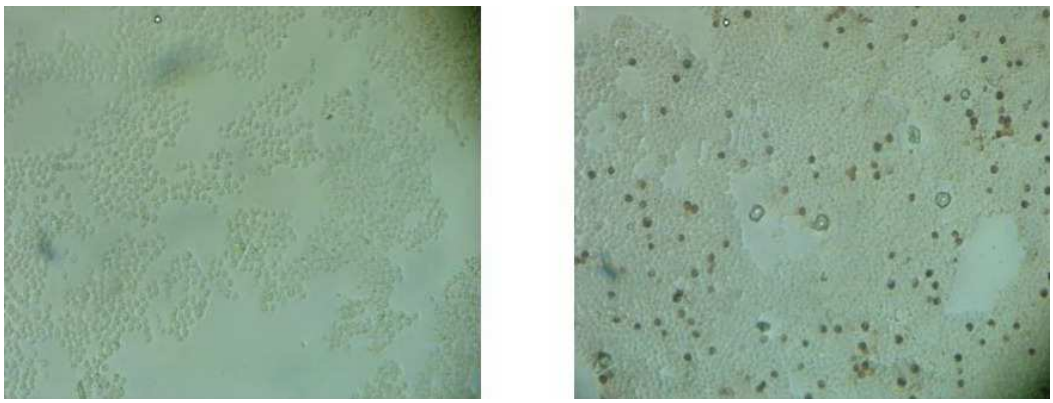
เมื่อทำการสกัด RNA จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ MDCK ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่แล้วใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ DNA จาก RNA ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primer ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M และ NS (ภาพที่ 5 และ 6) เพื่อหาลำดับเบสของยีนแต่ละแท่ง โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BioService Unit: BSU) ประเทศไทย และได้ทำการตั้งชื่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้ คือ A/SW/Thailand/KU7.2/04 (KU7.2) จากฟาร์มสุกรจังหวัดชลบุรี A/SW/Thailand/KU5.1/04 (KU5.1) จากฟาร์มสุกรจังหวัดชลบุรี A/SW/Thailand/KU5.2/04 (KU5.2) จากฟาร์มสุกรจังหวัดสุพรรณบุรี A/SW/Thailand/KU6.1/04 (KU6.1) จากฟาร์มสุกรจังหวัดนครปฐม A/SW/Thailand/KU21/06 (KU21) จากฟาร์มสุกรจังหวัดราชบุรี A/SW/Thailand/KU45/06 (KU45) จากฟาร์มสุกรจังหวัดราชบุรี และ A/SW/Thailand/KU58/06 (KU58) จากฟาร์มสุกรจังหวัดราชบุรี

(ก) **(ข)**

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะการเกิด cytopatic effect (CPE) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร

(ก) คือ เซลล์ MDCK ที่ปกติ

(ข) คือ เซลล์ MDCK ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรซึ่งเกิดลักษณะ CPE ขึ้น

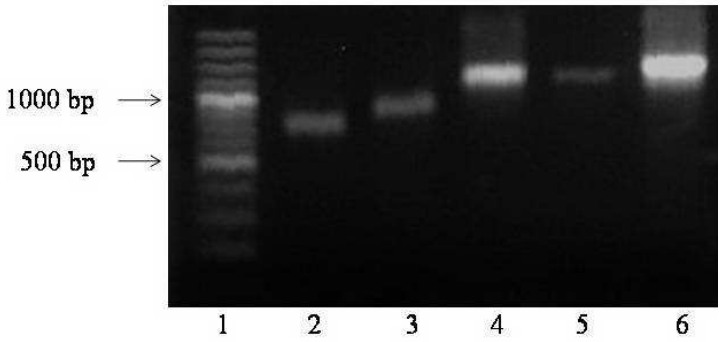


(ก) **(ข)**

ภาพที่ 4 การทดสอบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยวิธี IPMA

(ก) คือ เซลล์ MDCK ที่ปกติ เมื่อทดสอบด้วยวิธี IPMA เซลล์จะไม่ติดสีน้ำตาลแดง

(ข) คือ เซลล์ MDCK ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร เมื่อทดสอบด้วยวิธี IPMA พบว่ามีการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับตัวเชื้อไวรัส ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อติดสีน้ำตาลแดง



ภาพที่ 5 การตรวจสอบขนาด PCR product ของยีน NS, M, NA, NP และ HA ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 โดยใช้ primer ที่จำเพาะ (Zou.,1997; Hoffmann *et al.,* 2001) ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ช่องที่ 1 = DNA marker

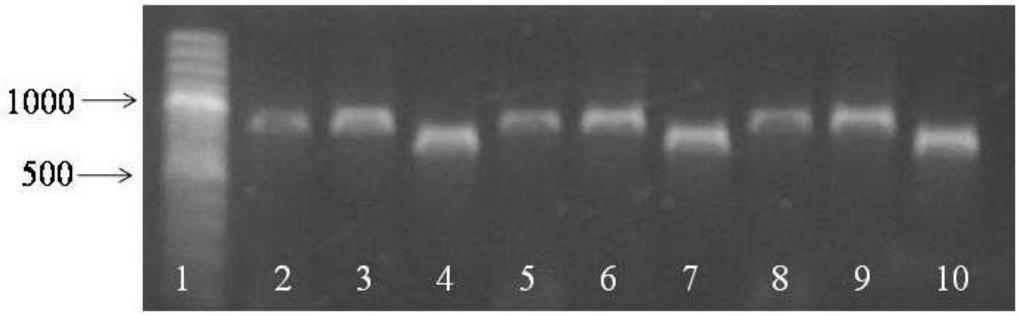
ช่องที่ 2 = PCR product ของ ยีน NS

ช่องที่ 3 = PCR product ของ ยีน M

ช่องที่ 4 = PCR product ของ ยีน NP

ช่องที่ 5 = PCR product ของ ยีน NA

ช่องที่ 6 = PCR product ของ ยีน HA



ภาพที่ 6 การตรวจสอบขนาด PCR product ของยีน PA, PB1 และ PB2 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 โดยใช้ primer ที่จำเพาะ (Hoffmann *et al.,* 2001) ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ช่องที่ 1 = DNA marker

ช่องที่ 2 = PCR product ของ ยีน PA (Segment 1)

ช่องที่ 3 = PCR product ของ ยีน PA (Segment 2)

ช่องที่ 4 = PCR product ของ ยีน PA (Segment 3)

ช่องที่ 5 = PCR product ของ ยีน PB1 (Segment 1)

ช่องที่ 6 = PCR product ของ ยีน PB1 (Segment 2)

ช่องที่ 7 = PCR product ของ ยีน PB1 (Segment 3)

ช่องที่ 8 = PCR product ของ ยีน PB2 (Segment 1)

ช่องที่ 9 = PCR product ของ ยีน PB2 (Segment 2)

ช่องที่ 10 = PCR product ของ ยีน PB2 (Segment 3)

1.2 การวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequence Analysis)

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นในแต่ยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ subtype H3N2 ที่เพาะแยกได้ทั้ง 7 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนในแต่ละยีนทั้ง 8 ยีน อยู่ระหว่าง 99.2%-100% โดยที่ยีน PA และยีน NS มีความเหมือนกันในแต่ละยีนมาก ในขณะที่ยีน HA มีความแตกต่างกันมากกว่า คือระหว่าง 99.2%-99.7% ส่วนอีก 5 ยีนที่เหลือของทั้ง 7 ตัวอย่างพบว่ามีค่าความเหมือนกันมากกว่า 99.5% ดังนั้นจึงเลือก A/SW/Thailand/KU5.1/04 เป็นตัวแทนของทั้ง 7 ตัวอย่าง ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ต่อไป โดยทำการสังเคราะห์ยีนทั้ง 8 ยีน ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04 แบบเต็มสาย แล้วส่งไปหาลำดับเบสที่ BSU แล้วนำลำดับเบสทั้งเส้นของแต่ละยีนที่ได้ ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบส ที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank โดยเลือกใช้วิธี Megablast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ในตารางที่ 3 ได้แสดงให้เห็นว่า ยีน HA และ NA ของ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 นั้นมีส่วนที่คล้ายกับ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H3N2 ที่เพาะแยกได้จากในคนมากที่สุด (A/New York/584/1996) ส่วนยีน PB2 มีความคล้ายกับเชื้อไวรัสที่เพาะแยกจากในคน (A/Thailand/271/05) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อไวรัสในสุกร (Komadina, *et al.,* 2007) ส่วนอีก 5 ยีนที่เหลือมีความคล้ายกับ SIV ใน subtype ที่แตกต่างกันออกไปตามที่แสดงไว้ใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์ identity ในแต่ละยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ที่ทำการศึกษาทั้ง 7 ตัวอย่าง ระหว่างปี 2004-2006

ยีน	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ	108-551	62-374	61-343	43-636	100-652	49-881	47-639	12-524
% ความเหมือนกันของในแต่ละยีน (% identity)	99.5-100	99.7-100	100	99.2-99.7	99.8-100	99.7-100	99.8-100	100

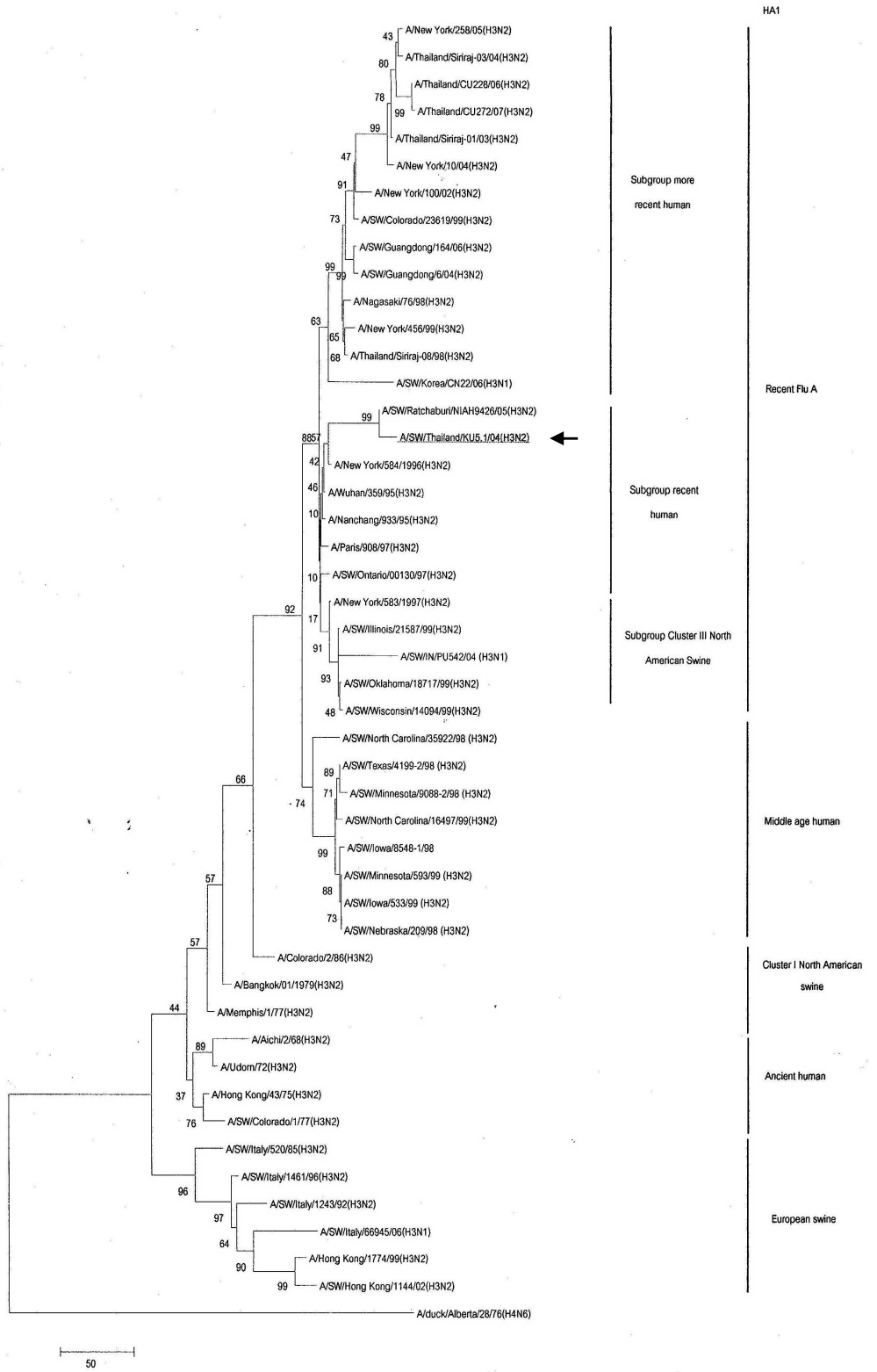
ตารางที่ 4 แสดงผลการเปรียบเทียบทั้ง 8 ยีน โดยวิธี Megablast analysis ของเชื้อ SIV subtype H3N2 (A/SW/Thailand/KU5.1/04) กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีรายงานจาก ฐานข้อมูล Genbank

ยีน	ไวรัสมีที่ค่าความเหมือนกันมากที่สุด	สายพันธุ์ย่อย	% ความเหมือน	แหล่งที่มาของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่
PB2	A/Thailand/271/05	H1N1	94	คน
PB1	A/SW/Leipzig/1/97	H3N2	96	สุกร
PA	A/SW/Italy/2064/99	H1N2	95	สุกร
HA	A/New York/584/96	H3N2	96	คน
NP	A/SW/IN/1726/88	H1N1	95	สุกร
NA	A/New York/584/96	H3N2	95	คน
M	A/SW/Leipzig/145/92	H3N2	96	สุกร
NS	A/WI/4775/94	H1N1	96	สุกร

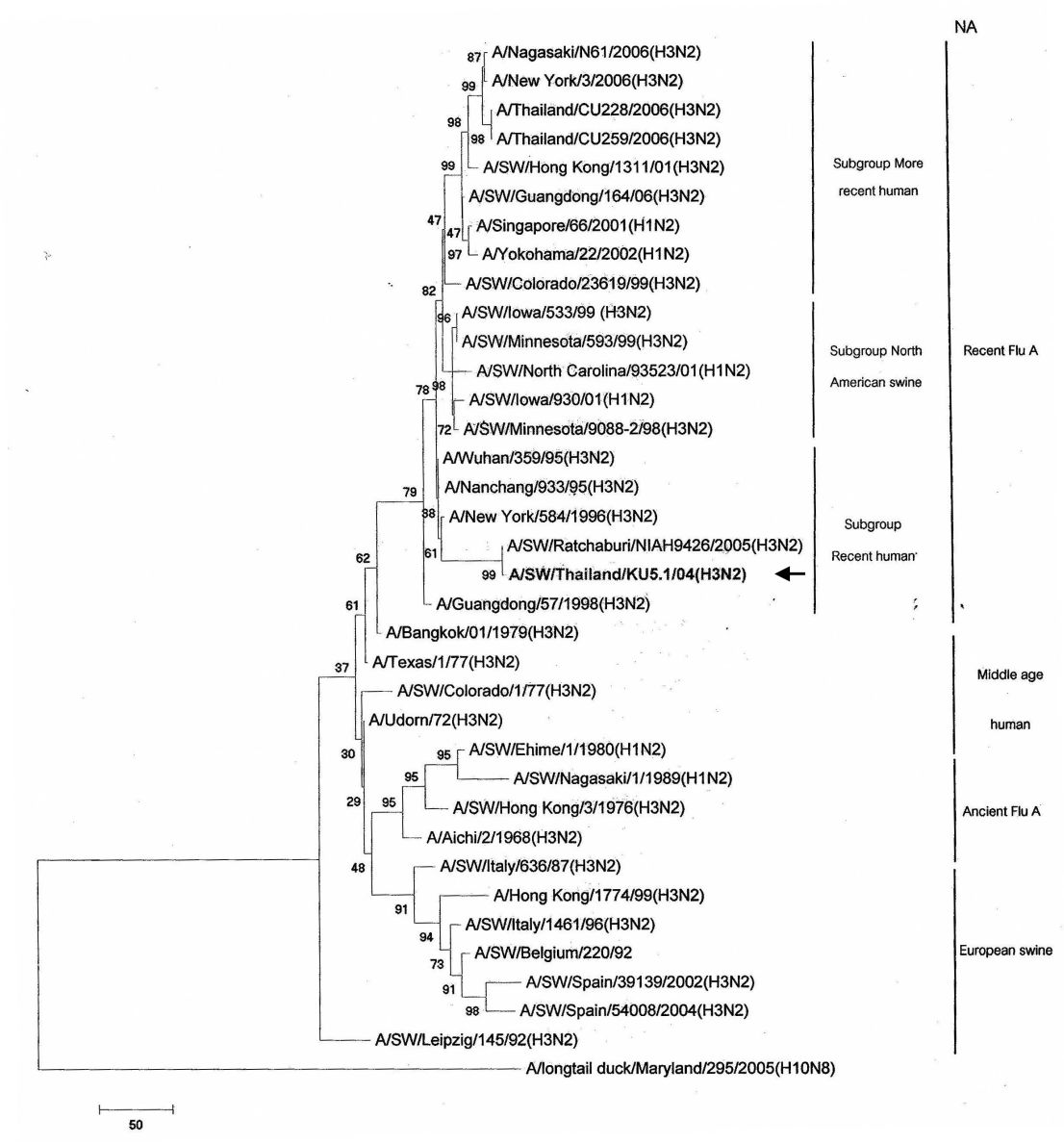
1.3 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแต่ละยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร subtype H3N2 ด้วยแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic Analysis)

แผนภูมิต้นไม้ของความสัมพันธ์ของยีน ทั้ง 8 แท่งของ A/SW/Thailand/KU5.1/2004 ที่เพาะแยกได้ แสดงในรูปภาพที่ 7- 15 โดยวิวัฒนาการของยีน HA ได้แยกมาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนและในสุกร ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มคือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคนยุคโบราณ (ancient human) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคนยุคกลาง (middle age human) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคนยุคปัจจุบัน (recent Flu A) ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรกลุ่มที่ 1 จากทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา (cluster I North American swine) (Webby *et al.,* 2000) และ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่มาจากประเทศแถบยุโรป (European swine) (ภาพที่ 7) ไวรัสในกลุ่ม recent Flu A สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนสมัยใหม่กว่า (more recent human) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนสมัยใหม่ (recent human) และ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรกลุ่มที่ 3 จากทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา (cluster III North American swine Flu) (Webby *et al.,* 2000) ซึ่งเชื้อไวรัส KU5.1 และ เชื้อไวรัส subtype H3N2 ที่พบในประเทศไทย ในปี 2005 อยู่ในกลุ่มย่อย ไข้หวัดใหญ่ในคนสมัยใหม่ (recent human) และมีความใกล้ชิดกับ A/New York/584/96 (H3N2) ซึ่งเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากในคน

สำหรับยีน NA ลักษณะของแผนภูมิต้นไม้ที่ได้มีความคล้ายกับยีน HA (ภาพที่ 8) โดยแผนภูมิได้แบ่งยีน NA ของไวรัสในคนและสุกรออกเป็น 4 กลุ่ม คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคโบราณ (ancient Flu A) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคกลาง (middle age human) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคปัจจุบัน (recent Flu A) และ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่มาจากประเทศแถบยุโรป (European swine) ซึ่งไวรัสในกลุ่ม recent Flu A ยังแบ่งเป็นกลุ่มย่อยอีก 3 กลุ่ม ได้แก่ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนสมัยใหม่กว่า (more recent human virus) ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา (North American SIV) และไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนสมัยใหม่ (recent human virus) ซึ่งกลุ่มย่อย more recent human virus และ North American SIV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก และน่าจะมี common ancestor ร่วมกัน จากแผนภูมิของทั้ง HA และ NA พบว่า เชื้อไวรัส KU5.1 จัดอยู่ในกลุ่มย่อย recent human virus เหมือนกัน และทั้งคู่ยังมีความใกล้ชิดอย่างมากกับ A/New York/584/96 (H3N2) ซึ่งไวรัสที่แยกจากคนตัวนี้ก็มีพันธุกรรมคล้ายกับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนสำหรับป้องกันไข้หวัดใหญ่ในคน ในปี 1995 คือ A/Nanchang/933/95 (H3N2) และ A/Wuhan/359/95 (H3N2) (MMRR, CDC, USA) ด้วย



ภาพที่ 7 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน HA1 ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อื่นๆจากฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 และเพิ่มความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้การ bootstrap 1000 ครั้ง



ภาพที่ 8 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน NA ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อื่นๆจากฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 เพิ่มความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้การ bootstrap 1000 ครั้ง

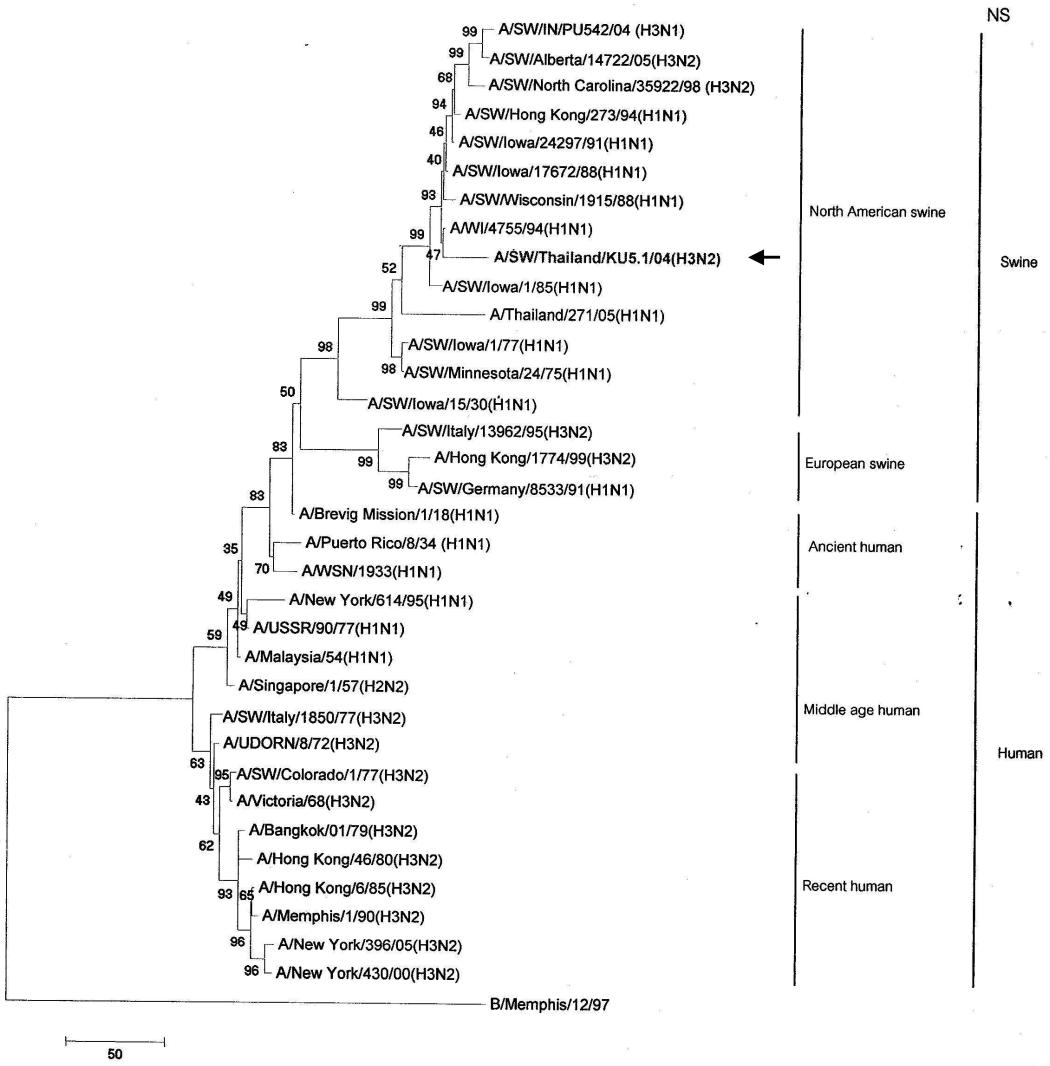
เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 พบในสุกรไทย ตั้งแต่ปี 1978 (Nerome *et al.,* 1981) ลักษณะ antigenic ของเชื้อมีความคล้ายคลึงกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน สายพันธุ์ H3N2 ในช่วงเวลาเดียวกัน ตั้งแต่นั้นก็ยังไม่มีรายงานของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ในประเทศไทย เป็นเวลาหลายปี อาจเนื่องมาจากไม่มีการสำรวจหาเชื้อไวรัสก็เป็นได้ จนกระทั่งในปี 2004 ได้มีการตรวจพบลักษณะแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ในการสำรวจการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ ในสุกรจาก 5 จังหวัดที่มีรายงานการระบาดของไข้หวัดนก (Parchariyanon *et al.,* 2006) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ยังคงอยู่ในสุกรไทย แม้ว่าจะไม่มีรายงานการระบาดของโรคก็ตาม และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ศึกษานี้ (A/SW/Thailand/KU5.1/04) ได้ถูกเพาะแยกเชื้อและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของทั้ง 8 ยีน และเมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างยีนของไข้หวัดใหญ่สุกรที่ถูกแยกได้ในปี 2006 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบส (align) ของ KU5.1 กับลำดับเบสที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank พบว่า ยีน HA และ NA ความคล้ายคลึงกับ A/SW/Ratchaburi/NIAH9426/05 ซึ่งเป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในประเทศไทย (Chutinimitkul *et al.,* 2008) โดยมีค่าความเหมือนของยีน HA และยีน NA ที่ 99.1% และ 99.6 % ตามลำดับ ผลที่ออกมาบ่งบอกได้ว่าสุกรในประเทศไทยมีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรไม่ต่ำกว่า 4 ปี

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 มีรายงานการพบในสุกรเอเชียหลายประเทศ รวมทั้งสุกรไทย ซึ่งได้รับยีน HA และ NA มาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนในช่วงเวลานั้น (Shortridge and Webster, 1979; Nerome *et al.,* 1981) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้จากประเทศญี่ปุ่น (A/SW/Wadayama/5/69) และจากประเทศไทย (A/SW/Bangkok/9/78) ลักษณะแอนติเจนของยีน HA ที่พบนั้นมีความคล้ายคลึงกับยีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน A/Aicki/2/68 และ A/Bangkok/36/78 ตามลำดับ (Nerome *et al.,* 1981) ยีน HA ของไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในฮ่องกง A/SW/Hong Kong/34/76 มีลักษณะทางแอนติเจนที่ใกล้เคียงกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน A/Victoria/3/75 ในช่วงนั้น (Shortridge and Webster, 1979) ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ KU5.1 ของยีน HA และ NA พบว่ามีความต่างกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H3N2 ที่พบในประเทศไทยในช่วงเวลาเดียวกัน (Chutinimitkul *et al.,* 2008)

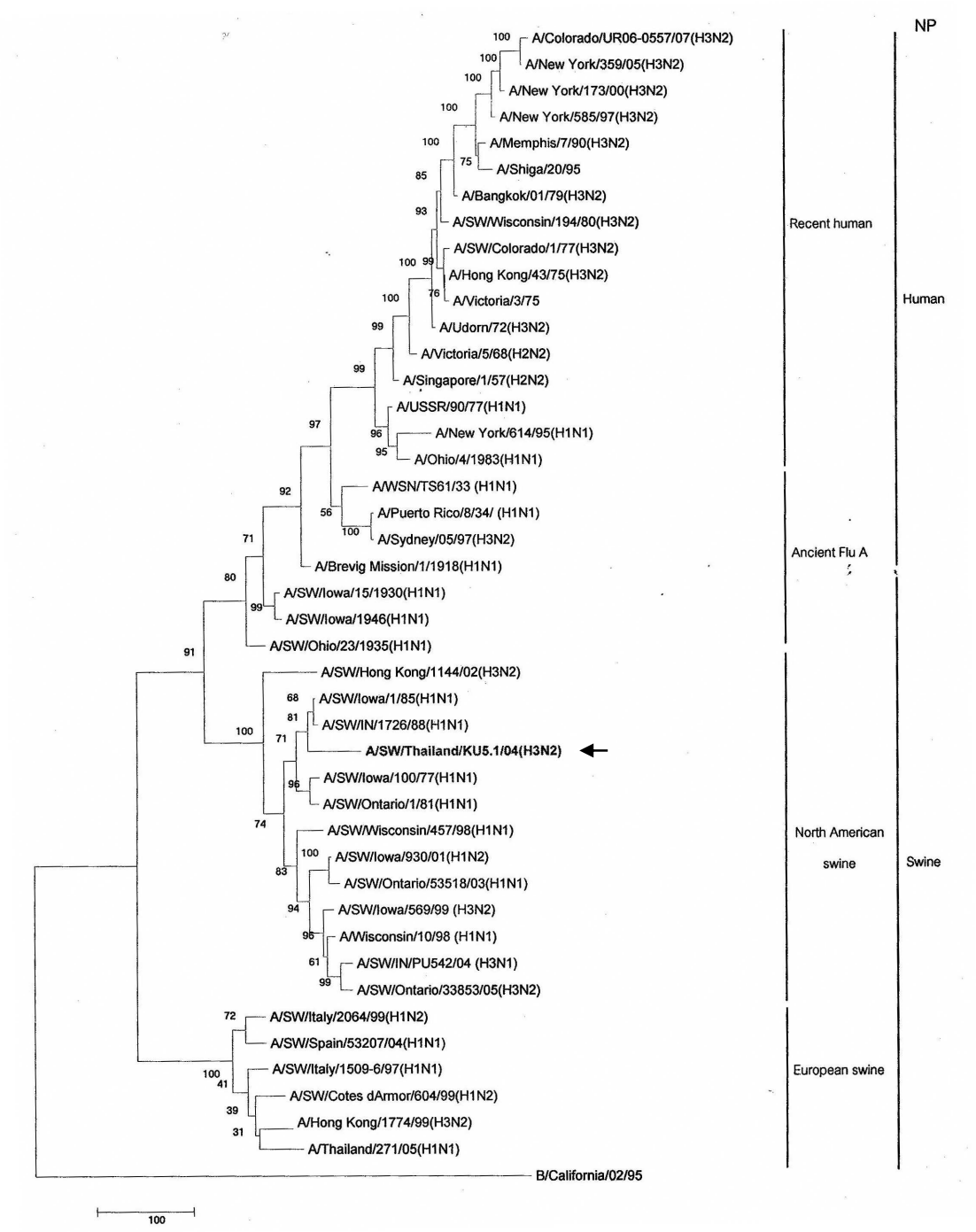
สำหรับแผนภูมิต้นไม้ของยีน NS, M, NP, PA และ PB2 นั้นมีความแตกต่างกับแผนภูมิต้นไม้ของ HA และ NA อย่างเด่นชัด เนื่องจากแผนภูมิต้นไม้ของทั้ง 4 ยีนนี้สามารถแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน และในสุกรได้อย่างชัดเจน ซึ่งแบ่งออกเป็นสองกลุ่มหลักตามลักษณะของ host

species (ภาพที่ 9 - 14) และยังสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้เป็น 5 กลุ่ม คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคโบราณ (ancient human) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคกลาง (middle age human) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคปัจจุบัน (recent human) ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่มาจากประเทศแถบยุโรป (European swine) และ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา (North American swine) โดยยีน NS และ NP ของเชื้อไวรัส KU5.1 จะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม North American swine ซึ่งยีน NS มีความสัมพันธ์ใกล้กับ A/WI/4755/1994 (H1N1) ซึ่งไวรัสตัวนี้เป็นไวรัสในสุกรที่ติดไปสู่คน (Wentworth *et al.,* 1997) และจากลักษณะของกิ่งที่สั้นของไวรัสทั้งสองตัวนี้ ชี้ได้ว่าไวรัสทั้งสองมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่า A/WI/4755/1994 (H1N1) อาจจะเป็น donor ของยีน NS ของเชื้อไวรัส KU5.1 นอกจากนี้ยีน NS ของเชื้อไวรัส KU5.1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ A/WI/4755/1994 (H1N1) และ A/SW/Iowa/1/85 (IA1/85) มากกว่า A/Thailand/271/05 (TH271) ซึ่งเป็น ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนซึ่งคล้ายกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (swine-liked human virus) ที่หมุนเวียนอยู่ในช่วงเวลาเดียวกัน (Komadina *et al.,* 2007) ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่า TH271 อาจจะไม่ได้รับยีน NS จาก KU5.1 แต่ก็อาจจะเป็นไปได้ว่าไวรัสทั้งสองนี้อาจจะได้รับยีน NS มาจากแหล่งที่มีไวรัสที่มีความคล้ายคลึงกัน

ในส่วนของวิวัฒนาการของแผนภูมิต้นไม้ของยีน NP แยกออกได้เป็นไวรัสจากคน และจากสุกร แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคโบราณ (ancient Flu A) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคปัจจุบัน (recent human) ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่มาจากประเทศแถบยุโรป (European swine) และไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา (North American swine) (ภาพที่ 10) ซึ่งยีน NP ในกลุ่ม North American SIV มีความใกล้ชิดกับกลุ่ม human influenza virus มากกว่ากลุ่ม European SIV อันที่จริงแล้ว North American SIV ได้รับยีน NP มาจาก classical SIV H1N1 (Webby *et al.,* 2000) แต่ European SIV นั้นได้รับยีน NP จากพวกสัตว์ปีก (Brown *et al.,* 1998) ส่วนยีน NP ของ KU5.1 จัดอยู่ในกลุ่ม North American SIV และมีความใกล้ชิดกับ A/SW/IN/1726/1988 และ A/SW/IA/1/1985 ซึ่งเมื่อสังเกตดูจะพบว่า ทั้ง ยีน NS และ NP ต่างก็มีความใกล้ชิดกับ A/SW/IA/1/1985 ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า KU5.1 นั้นอาจจะได้รับยีน NS และ NP จากแหล่งเดียวกัน ซึ่งอาจเป็น SIV จากอเมริกาตอนเหนือ



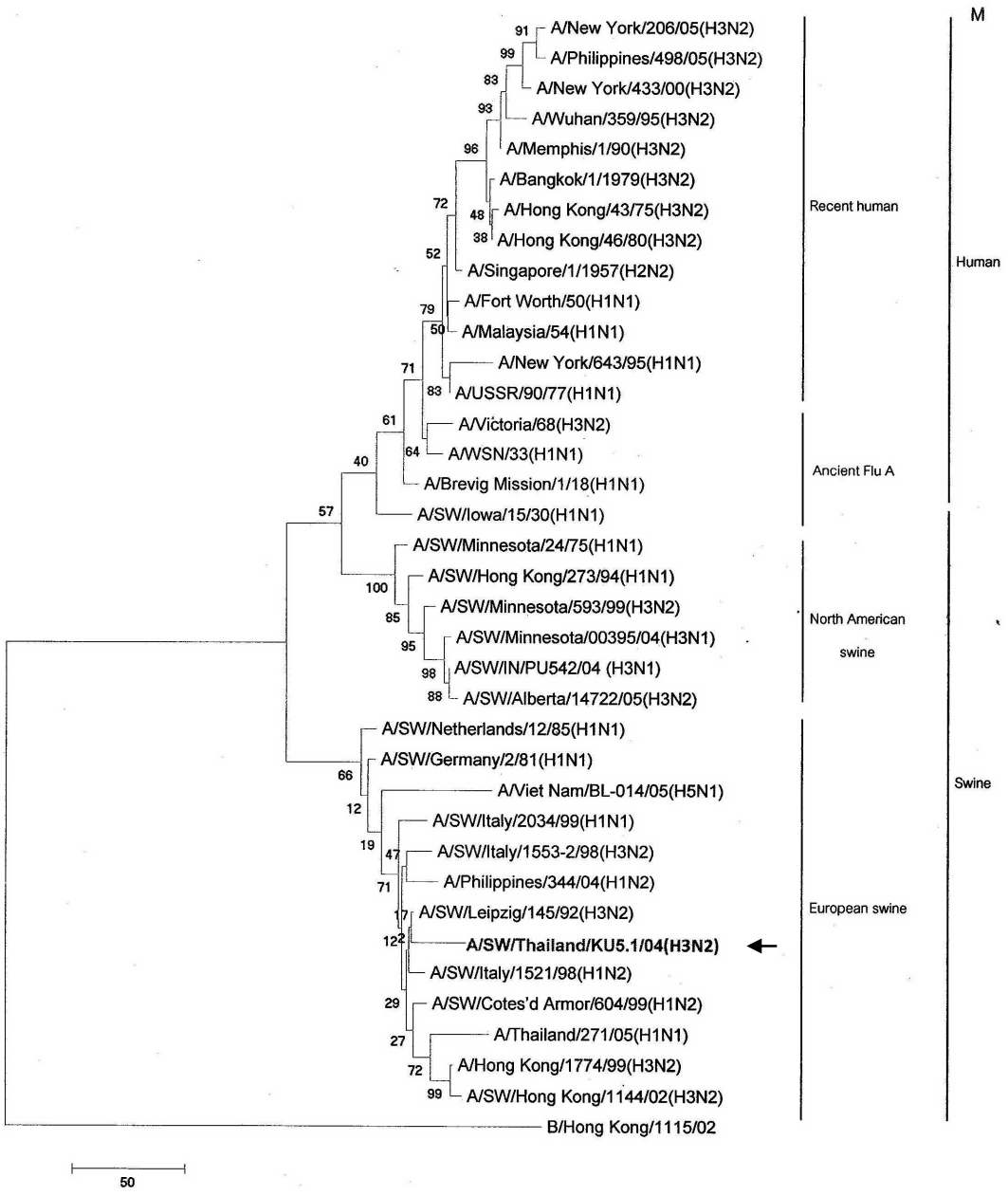
ภาพที่ 9 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน NS ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อื่นๆจากฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 เพิ่มความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้การ bootstrap 1000 ครั้ง



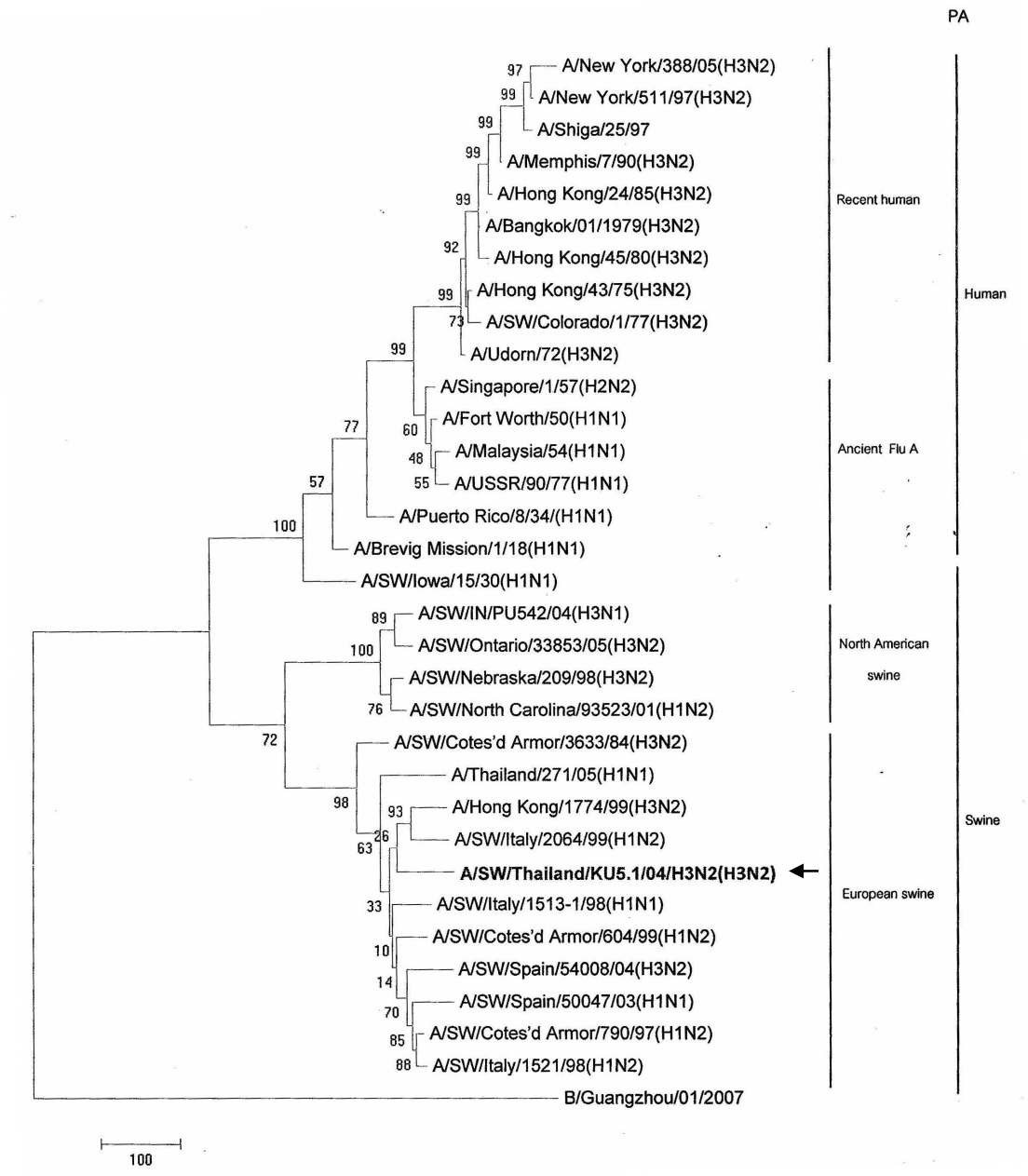
ภาพที่ 10 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน NP ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อื่นๆจากฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 เพิ่มความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้การ bootstrap 1000 ครั้ง

รูปแผนภูมิต้นไม้ของยีน M PA และ PB2 แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคโบราณ (ancient Flu A) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคปัจจุบัน (recent human) ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา (North American swine) และ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่มาจากประเทศแถบยุโรป (European swine) (ภาพที่ 11, 12 และ 14) สำหรับแผนภูมิของยีน M PA และ PB2 ของ KU5.1 นั้นจัดอยู่ในกลุ่ม SIV จากทวีปยุโรป และมีใกล้ชิดกับไวรัส TH271 (A/Thailand/271/05) ที่แยกได้จากประเทศไทย (Komadina *et al.,* 2007) และไวรัส HK1774 (A/Hong Kong/1774/99) ที่แยกได้จากประเทศฮ่องกง (Gregory *et al.,* 2001) ส่วนแผนภูมิต้นไม้ของยีน PB1 นั้นแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคโบราณ (ancient Flu A) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนยุคปัจจุบัน (recent human) ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรยุคกลางที่พบทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา(middle age North American swine) และไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่มาจากประเทศแถบยุโรป (European swine) (ภาพที่ 13) ซึ่งเชื้อไวรัส KU5.1 จัดอยู่ในกลุ่ม European SIV และมีความใกล้ชิดกับไวรัส TH271 (H1N1) ซึ่งเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคนที่มีความรุนแรงคล้ายคลึงกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (swine-liked human influenza virus) (Komadina *et al.,* 2007)

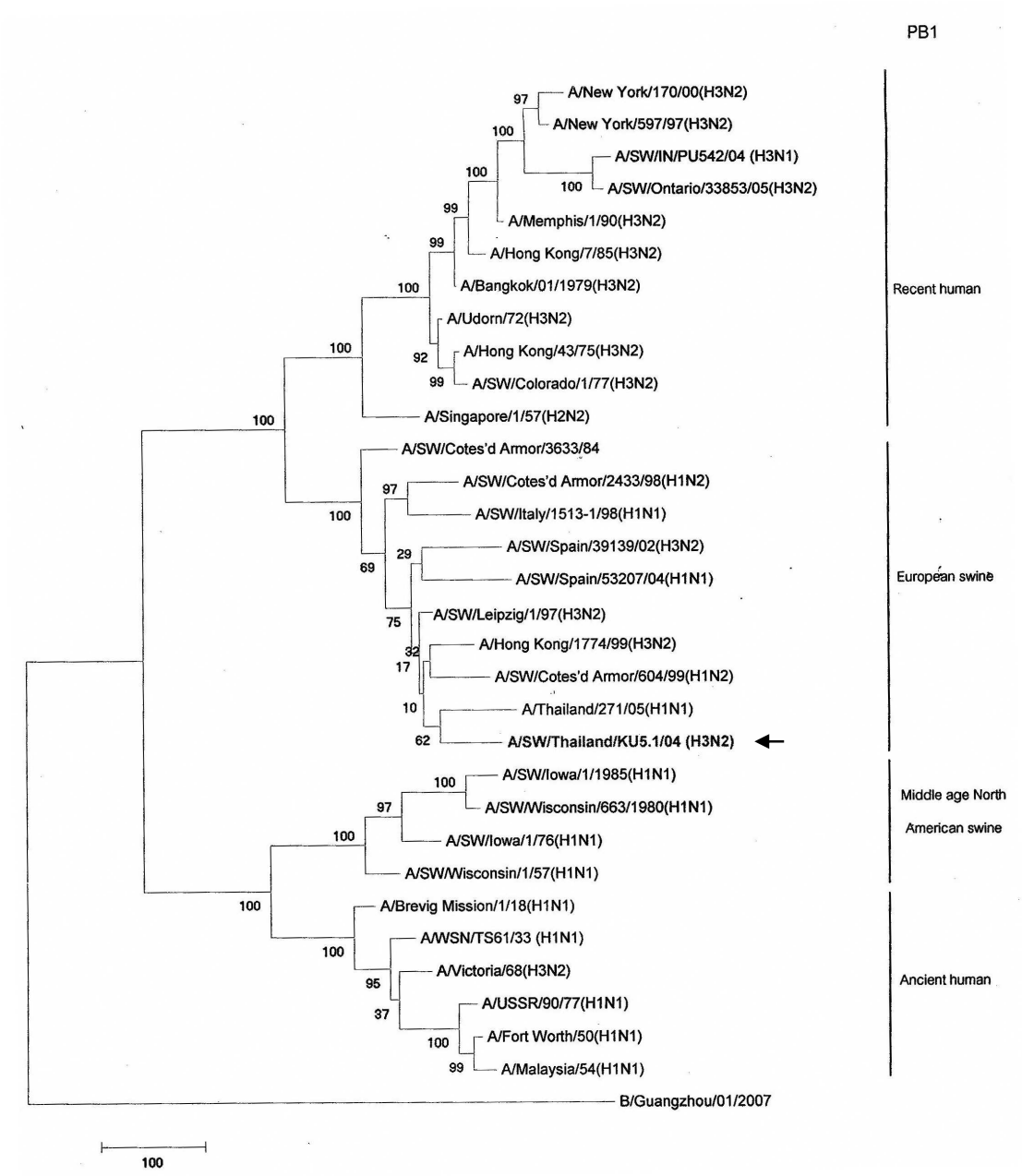
เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร KU5.1 อาจจะเกิดจากการผสมรวมกันจากสามแหล่ง (triple reassortant) โดยยีน HA และยีน NA ได้มาจากเชื้อไวรัสที่คล้ายกับที่พบในคน (human-like influenza virus) ซึ่งพบทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนยีน NS และยีน NP ได้มาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่คล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ที่พบทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา และอีก 4 ยีน คือ M PA PB1 และ PB2 นั้น มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในทวีปยุโรป การผสมรวมกันของเชื้อไวรัส KU5.1 น่าจะเกิดขึ้นสองครั้ง โดยจะเกิดจากการนำเข้าสุกรที่มาจากประเทศสหรัฐอเมริกา และจากประเทศในทวีปยุโรป (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) ซึ่งการแลกเปลี่ยนนำเข้าส่งออกสัตว์มีชีวิตจากต่างชาติ อาจจะเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจากประเทศหนึ่งไปสู่อีกประเทศหนึ่งได้



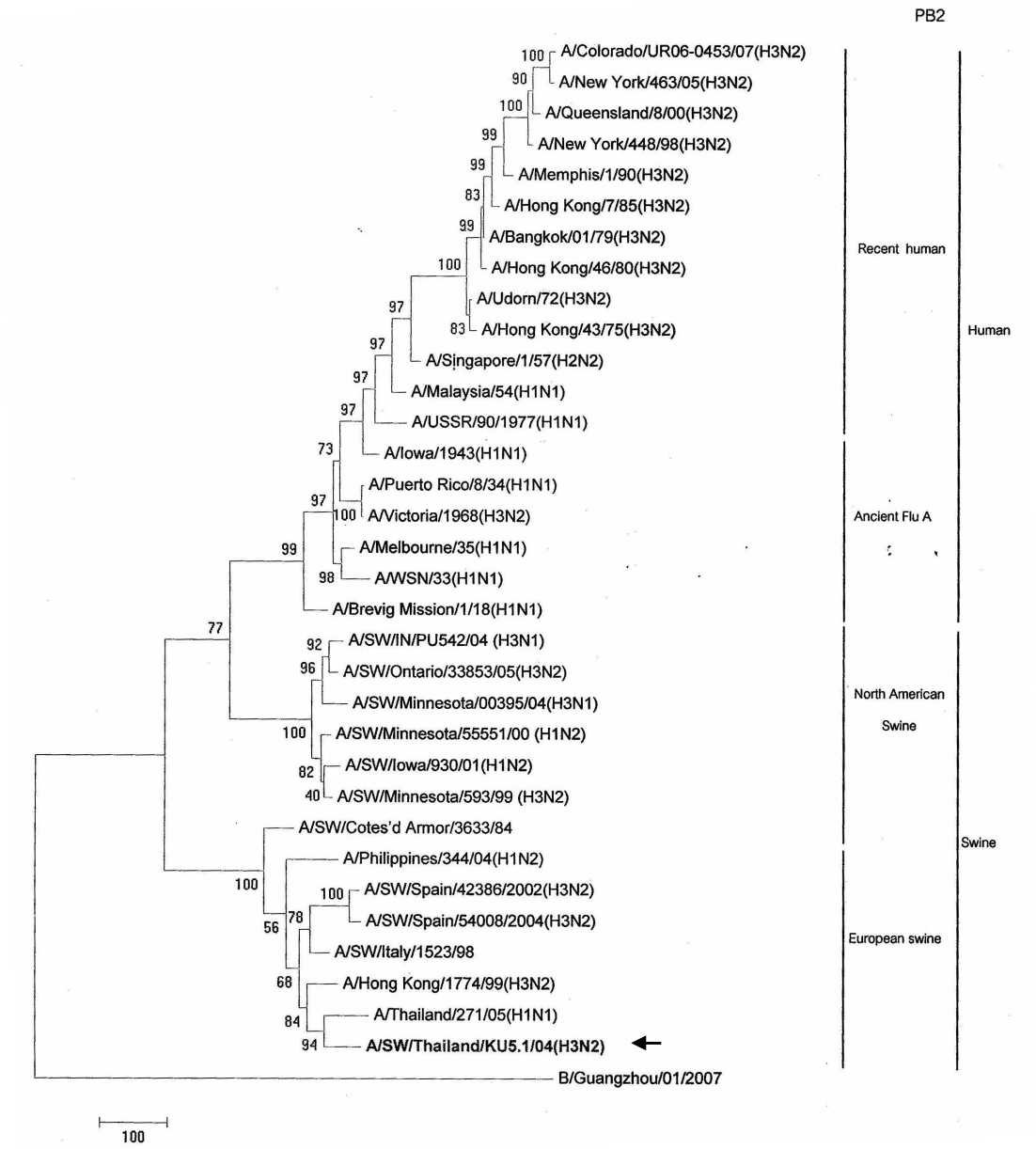
ภาพที่ 11 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน M ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อื่นๆจากฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 เพิ่มความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้การ bootstrap 1000 ครั้ง



ภาพที่ 12 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน PA ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อื่นๆจากฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 เพิ่มความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้การ bootstrap 1000 ครั้ง



ภาพที่ 13 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน PB1 ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อื่นๆจากฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 เพิ่มความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้การ bootstrap 1000 ครั้ง

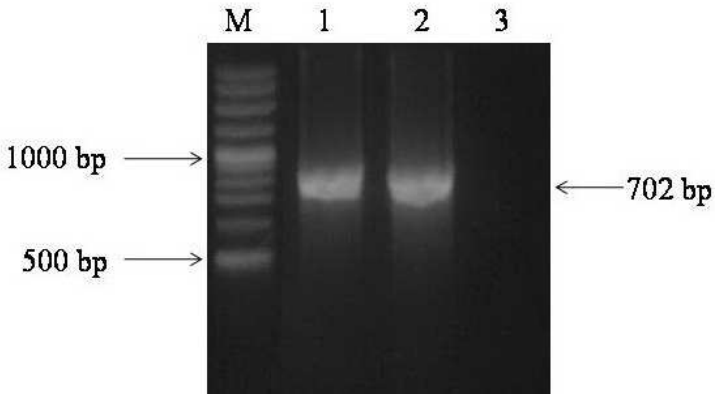


ภาพที่ 14 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของยีน PB2 ของ A/SW/Thailand/KU5.1/04 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อื่นๆจากฐานข้อมูลใน Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 เพิ่มความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้การ bootstrap 1000 ครั้ง

2. การโคลนและการแสดงออกของโปรตีน M1

2.1 การสังเคราะห์ และการโคลนยีน M1

จากการทำ RT-PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน M1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่นั้น พบว่าได้ PCR product ที่มีขนาด 702 bp (ภาพที่ 15) และเมื่อนำ PCR product ที่ได้โคลนลงใน TA cloning kit และ transform ลงใน *E.coli* DH5α ทำการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด โดยดูจากสีของโคโลนีที่ได้สีขาว (Blue-white screening) และสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จากนั้นนำโคโลนีสีขาวนั้นมาตรวจสอบยืนยันว่ามียีน M1 แทรกอยู่จริงโดยทำ PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อ M1 gene เพื่อยืนยันผล และหาลำดับเบสของโคลนที่ได้โดยตรวจสอบลำดับเบส พบว่า primer ที่ใช้ในการทำ PCR มีความจำเพาะต่อยีน M1 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ ทำการยืนยันผลลำดับเบสจาก PCR product และเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ influenza A viruses ที่แยกได้จากสุกร (A/swine/Leipzig/145/92(H3N2)) หมูป่า (A/wild boar/Germany/WS169/2006(H3N2)) ไก่งวง (A/turkey/Germany/3/91(H1N1)) คน (A/Philippines/344/2004(H1N2)) และ ไก่ (A/chicken/Hubei/wk/1997(H5N1)) ซึ่งมีรายงานในฐานข้อมูล Genbank พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายคลึงประมาณ 93-97% ส่วน amino acid มีความคล้ายคลึงกันประมาณ 97-99% (ภาพที่ 16) และเมื่อนำ amino acid ของไข้หวัดใหญ่ชนิดบี และซีมาเปรียบเทียบพบมีความคล้ายคลึงเพียง 46.7% และ 30.2% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ายีน M ที่ผลิตได้นั้นมีความจำเพาะต่อยีน M ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ มากกว่าชนิดบี และซี

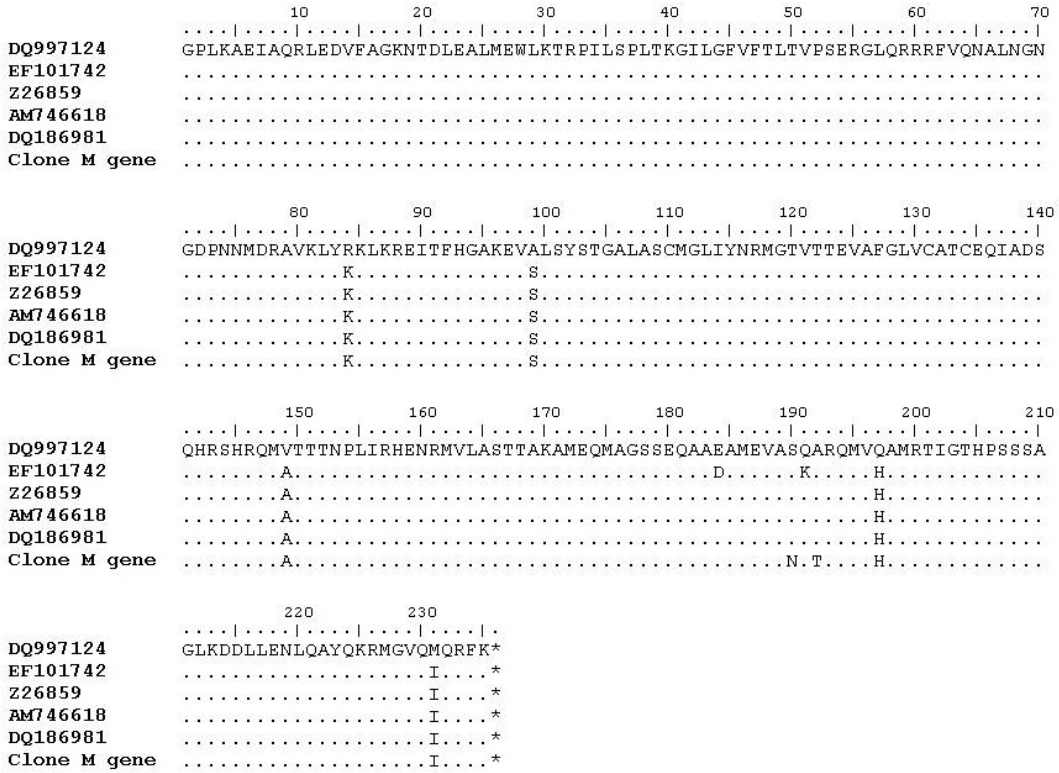


ภาพที่ 15 การตรวจสอบ PCR Product ของยีน M ที่ได้จากการทำ RT-PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะ ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ช่อง M = DNA marker

ช่อง 1,2 = PCR Product ขนาด 702 bp

ช่อง 3 = Negative control



ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน M ที่โคลนได้กับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ที่แยกได้จาก A/swine/Leipzig/145/92(H3N2) (DQ186981), A/wild boar/Germany/WS169/2006(H3N2) (AM746618), A/turkey/Germany/3/91(H1N1) (Z26859), A/Philippines/344/2004(H1N2) (EF101742) และ A/chicken/Hubei/wk/1997(H5N1) (DQ997124) ซึ่งมีรายงานในฐานข้อมูล Gen Bank โดยใช้โปรแกรม Bioedit version 7.0.9.0

2.2 การผลิต และการประเมินความจำเพาะของโปรตีนลูกผสม M1

จากการเลี้ยงเชื้อ *E.coli* เพื่อสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I และโคลนเข้าสู่ expression vector (pQE30) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน แล้วทำการ transform เข้า *E coli* สายพันธุ์ DH5α และ subclone ลงใน *E coli* สายพันธุ์ M15 เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนพบว่ามีการสร้างโปรตีนซึ่งมีขนาดประมาณ 26 kDa (ภาพที่ 17) โปรตีน M1 ที่สังเคราะห์จาก *E. coli* ส่วนใหญ่อยู่ในรูป inclusion body ภายในเซลล์ เนื่องจากแถบโปรตีนปรากฏชัดเจนอยู่ในตะกอนเซลล์ เมื่อตรวจสอบโดยการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ใน 15% gel จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์บางส่วนและนำไปใช้ เมื่อนำโปรตีนลูกผสม M1 ไปตรวจสอบความจำเพาะด้วยวิธี Western blot กับซีรัมของสุกรและไก่ที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ พบว่าเกิดแถบสีน้ำตาลตรงตำแหน่งประมาณ 26 kDa แต่ไม่ขึ้นแถบสีน้ำตาลที่ตำแหน่งประมาณ 26 kDa ในซีรัมสุกรและไก่ที่ปกติ (ภาพที่ 18) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนลูกผสม M1 นี้มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีของสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ได้

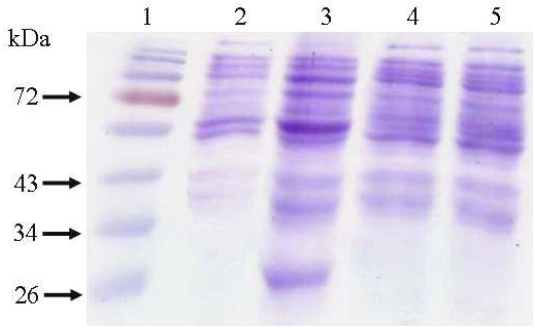
2.3 การกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกระต่ายและตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม M1

เมื่อนำซีรัมจากกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย โปรตีนลูกผสม M1 มาตรวจสอบหาแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี dot blotting พบว่า ซีรัมจากกระต่ายสามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับ โปรตีนลูกผสม M1 ส่วนการทดสอบหาไตเตอร์ ของ hyperimmune serum จากกระต่ายที่ได้โดยการทำเจือจางตามลำดับแบบสองเท่า (two-fold serial dilution) จาก 1:100 ถึง 1:12,800 และปล่อยให้ทำปฏิกิริยากับ โปรตีนลูกผสม M1 พบว่า แอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ทุกความเข้มข้น (ภาพที่ 19) ซึ่งแสดงว่าปรตีนลูกผสม M1 มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดี และ hyperimmune serum จากกระต่าย มีไตเตอร์สูงมากกว่า 1:12,800

เมื่อนำแอนติบอดีดังกล่าวมาตรวจสอบการทำปฏิกิริยากับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ในเซลล์ MDCK ด้วยวิธี IPMA พบว่ามีการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดีกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ที่ อยู่ภายในเซลล์ MDCK จะเห็นได้จากเซลล์ติดเชื้อไวรัสจะมีสีน้ำตาลแดงของ DAB เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่ติดสี (ภาพที่ 20) แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ได้

จากการกระตุ้นให้เกิดการผลิตด้วยโปรตีนลูกผสม M1 นั้นสามารถทำปฏิกิริยาได้กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ดังนั้นแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบ และวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อได้ ซึ่งเป็นการวินิจฉัยการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ อีกวิธีหนึ่งที่ให้ความรวดเร็ว และง่ายกว่าวิธีการการเพาะแยกเชื้อจากไข่ฟัก หรือจากเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่มีความจำเพาะสูง แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบโดยเฉลี่ยประมาณ 5 วัน แต่อาจนานมากกว่าสัปดาห์หากเชื้อมีปริมาณน้อย (Shalit *et.al.,* 1985) งานวิจัยในครั้งนี้มีเป้าหมายหลักในการผลิตโปรตีนลูกผสม ที่ถูกลอกรหัสจากยีน M ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างของเชื้อไข้หวัดใหญ่ ที่ใช้แยกชนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ว่าเป็นชนิด เอ บี หรือ ซีที่มีความจำเพาะสูง (Lamb and Lai, 1981; Bucker-White *et al.,* 1986; Ito *et al.,* 1991) เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในสัตว์ ให้เกิดความรวดเร็ว ถูกต้อง อีกทั้งโปรตีนลูกผสม M1 ที่ได้ ยังสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณการผลิตเพื่อให้ได้ตามความต้องการ



ภาพที่ 17 การตรวจสอบโปรตีนลูกผสม M1 ใน *E.coli.* M15 ด้วยวิธี SDS-PAGE ผ่าน 15% gel

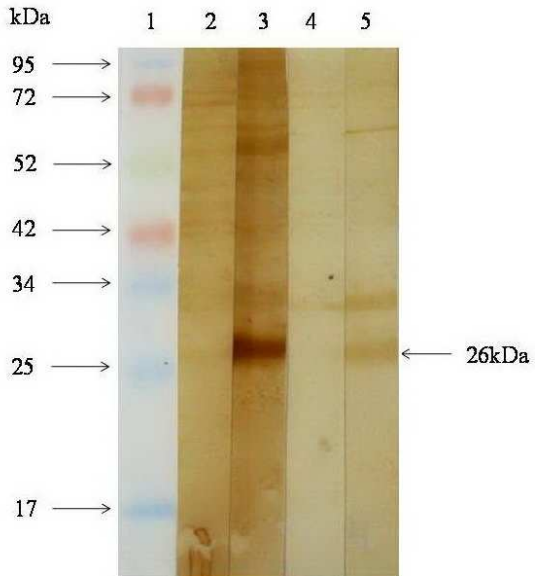
ช่องที่ 1 = Molecular Weight Marker (kDa)

ช่องที่ 2 = โปรตีนที่ได้จาก *E.coli.* M15 ที่มีพลาสมิด pQE30-M1 แต่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG

ช่องที่ 3 = โปรตีนที่ได้จาก *E.coli.* M15 ที่มีพลาสมิด pQE30-M1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนลูกผสม M1 ที่มีขนาดประมาณ 26 kDa

ช่องที่ 4 = โปรตีนที่ได้จาก *E.coli.* M15 ที่มีพลาสมิด pQE30 แต่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG

ช่องที่ 5 = โปรตีนที่ได้จาก *E.coli.* M15 ที่มีพลาสมิด pQE30 ที่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG



ภาพที่ 18 การทดสอบโปรตีนลูกผสม M1 กับ แอนติบอดีจากสัตว์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Western blot

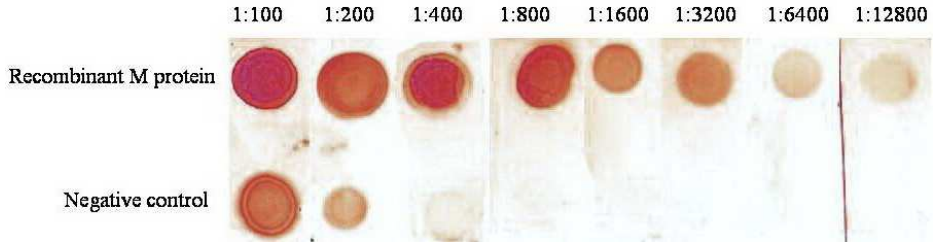
ช่องที่ 1 = Molecular Weight Marker (kDa)

ช่องที่ 2 = แอนติบอดีจากไก่ปกติ

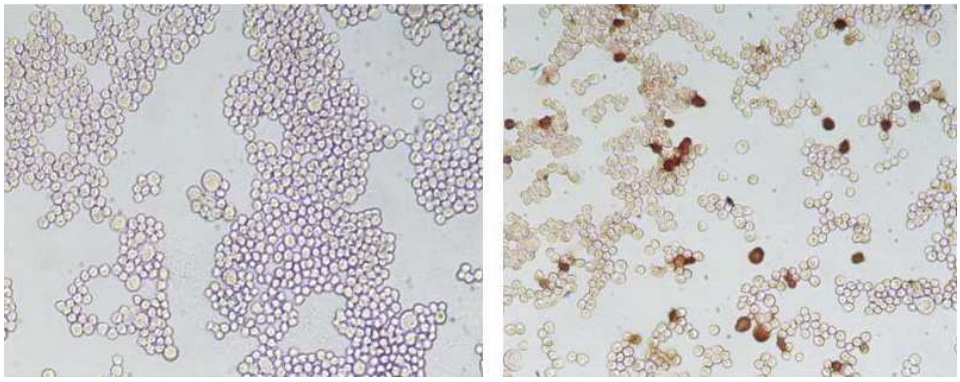
ช่องที่ 3 = แอนติบอดีจากไก่ที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H5N1

ช่องที่ 4 = แอนติบอดีจากสุกรปกติ

ช่องที่ 5 = แอนติบอดีจากสุกรติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H3N2



ภาพที่ 19 การทดสอบแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม M1 จากซีรัมกระต่ายโดยวิธี Dot blotting โดยใช้อัตราส่วนระหว่างซีรัมกับตัวเจือจาง 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600, 1:3,200, 1:6,400 และ1:12,800 ตามลำดับ



(ก) **(ข)**

ภาพที่ 20 การทดสอบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ที่ติดในเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ด้วยวิธี Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

รูป ก คือเซลล์ MDCK ที่ปกติ

รูป ข คือเซลล์ MDCK ที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีดังกล่าว เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะติดสีน้ำตาลเข้ม

สรุป

1. ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H3N2 ที่ทำการเก็บตัวอย่างในประเทศไทย ระหว่างปี 2004-2006 พบว่าเชื้อไวรัสที่ศึกษานี้เป็น อาจจะเกิดจากการผสมรวมกัน (reassortant) โดยได้รับ ยีน HA และ ยีน NA มาจาก ไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีลักษณะคล้ายไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน (human-like influenza virus) ซึ่งมีแหล่งที่มาจากสุกรทางตอนเหนือของประเทศอเมริกา (North American swine) ส่วนยีน NS และ ยีน NP เป็นยีนที่มาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร(SIV) ซึ่งความใกล้ชิดกับ North American SIV ส่วนยีน M ยีน PA ยีน PB1 และยีน PB2 นั้น เป็นยีนที่มาจาก SIV ซึ่งความใกล้ชิดกับ European SIV โดยการเกิด reassortant ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย น่าจะมาจากการรวมกันของเชื้อที่มีอยู่แล้วในประเทศกับเชื้อที่มาจากการนำเข้าสุกรที่มาจากประเทศอเมริกา และจากประเทศในทวีปยุโรป

2. ผลจากการโคลน และการแสดงออกของโปรตีน M1 ซึ่งศึกษาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU7.2/04 พบว่า primer ที่ออกแบบสำหรับโคลนยีน M1 นั้นมีความจำเพาะต่อ ยีน M1 ของเชื้อไวรัสโดยยืนยันจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank และเมื่อนำชิ้น PCR product ทำการโคลนลง expression vector pQE30 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต โปรตีนลูกผสม M1 ได้ในเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ M15 ซึ่งมีขนาดประมาณ 26 kDa และโปรตีนลูกผสม M1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีในกระต่ายได้ ซึ่งแอนติบอดีที่ได้สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ในเซลล์ MDCK ดังนั้นโปรตีนลูกผสมและแอนติบอดีที่ผลิตได้จาก *E. coli* นี้ จึงมีความจำเพาะ และเหมาะสำหรับที่จะนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ในการตรวจสอบสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด เอ อาทิเช่น สายพันธุ์ H3N2 ในสุกร หรือ สายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีก หรือในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น เพื่อเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ ต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

สุจิรา ปาจริยานนท์, สุดารัตน์ ดำรงโภคิน, วาสนา ภิญโญชนม์, ธีรศักดิ์ รักนำ, เสาวพักตร์ ฮิ้นจ้อย และประวิทย์ ชุมเกษียร. 2548 การสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ไทป์ A ในสุกรจาก 5 จังหวัดที่มีรายงานการระบาดของไข้หวัดนก, น. 48. *ใน* **การวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 31.** สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

สุดา ลุยศิริโรจนกุล. 2549. การวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่/ไข้หวัดนกทางห้องปฏิบัติการ, น.197-203. *ใน* ภาวพันธ์ ภัทรโกศล และ ประเสริฐ เอื้อวรากุล, บรรณาธิการ. **ไข้หวัดใหญ่/ไข้หวัดนก.** สมาคมไวรัสวิทยา, กรุงเทพฯ.

อารุณี ชัยสิงห์. ม.ป.ป. **โรคอินฟลูเอนซ่าในสัตว์ (Influenza).** แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/niah/DataFile/pdf/birdflu-2.pdf, 24 กุมภาพันธ์ 2550.

Alexander, D.J. 2000. A review of avian influenza in different bird species. **Vet. Microbiol**. 74: 3–13.

_____, D.J. and I.H. Brown. 2000 Recent zoonoses caused by influenza A viruses. **Rev. Sci. Tech.** 19:197-225.

Brown, I.H., P. Chakraverty, P Harris and D. Alexander. 1995. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. **Vet. Rec.** 136: 328–329.

_____, I.H., M.L. Hill, P.A. Harris, D.J. Alexander and J.W. McCauley 1996. Genetic characterisation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) isolated from pigs in England. **Arch. Virol.** 142: 1045-1050.

_____, I.H., P.A. Harris, J.W. McCauley and D.J. Alexander. 1998. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in emergence of an H1N2 virus of novel genotype. **J. Gen. Virol.** 79: 2947–2955.

_____, I. H. 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Vet. Microbiol.** 74: 29–46.

Buckler-White, A.J., C.W. Naeve and B.R. Murphy. 1986. Characterization of a gene coding for M proteins which is involved in host range restriction of an avian influenza A virus in monkeys. **J .Virol.** 57: 697-700.

Choi, Y.K., S.M. Goyal, S.W. Kang, M.W. Farnham and H.S. Joo. 2002. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. **J. Virol. Methods.** 102: 53–59.

Chutinimitkul, S., N. Thippamom, S. Damrongwatanapokin, S. Payungporn, R. Thanawongnuwech, A. Amonsin, P. Boonsuk, D. Sreta, N. Bunpong, R. Tantilertcharoen, P. Chamnanpood, S. Parchariyanon, A. Theamboonlers and Y. Poovorawan. 2008. Genetic characterization of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza virus in Thailand. **Arch. Virol.** 153: 1049–1056.

Compans R.W. 1973. Influenza virus proteins II association with component of the cytoplasm. **Virology**. 51: 56-70.

Dasco C.C., R.B. Couch, H.R. Six, J.E. Young, J.M Quarles and J.A. Kasel. 1984. Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections. **J. Clin. Microbiol.** 20: 833–835.

Easterday B.C., V.S. Hinshaw and D.A. Halvorson. 1997. Influenza, pp. 583-605. *In* B.W. Calnek, ed. **Disease of Poultry**. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.

_____, B.C. and K.Van Reeth. 1999. Swine influenza, pp. 277–290. *In* B.E. Straw, S.D. Allaire, W.L. Mengeling and D.J. Taylor, eds. **Disease of Swine.** Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Fouchier, R.A.M., V.J. Munster, A. Wallensten, T.M. Bestebroer, S. Herfst, D.J. Smith, G.F. Rimmelzwaan, B. Olsen and A.D.M.E. Osterhaus. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. **J. Virol.** 79: 2814–2822.

Ghedin, E., N. Sengamalay, M. Shumway, J. Zaborsky, T. Feldblyum, V. Subbu, D. Spiro, J. Sitz, H. Koo, P. Bolotov, D. Dernovoy, T. Tatusova, Y. Bao, K. St George, J. Taylor, D. Lipman, C. Fraser, J. Taubenberger and S. Salzberg. 2005. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. **Nature.** 437: 1162-1166

Gregory, V., W. Lim, K. Cameron, M. Bennett, S. Marozin, A. Klimov, H. Hall, N. Cox, A. Hay and Y. P. Lin. 2001. Infection of a child in Hong Kong by an influenza A H3N2 virus closely related to viruses circulating in European pigs. J. Gen. Virol. 82: 1397-1406.

Guo, Y. and D. Ulrich. 1984. Genome Analysis of Influenza C Viruses Isolated in 1981/82 from Pigs in China. **J. Gen. Virol.** 65: 1857-1872.

Harlow, E. and D. Lane. 1988. **Antibodies a Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Heinen P. 2002. **Swine influenza: a zoonosis.** Vet. Sci. Tomorrow. Available Source: http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.html, March 27, 2005.

Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R.G. Webster and D.R. Perez. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Arch. Virol.** 146: 2275–2289.

Horisberger, M.A. 1980. The large P protein of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. **Virology**. 107: 302-305.

Ito T., J.N. Couceiro, S. Kelm, L.G. Baum, S. Krauss, M.R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J.C. Paulson, R.G. Webster and Y. Kawaoka. 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. **J. Virol.** 72: 7367-7373.

_____, T., O.T. Gorman, Y. Kawaoka, W.J. Bean and R.J. Webster. 1991. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. **Virology.** 65: 5491-5498.

Jung, K. and C. Chae. 2004. Phylogenetic analysis of an H1N2 influenza A virus isolated from a pig in Korea. **Arch. Virol.** 149: 1415-1412.

Karasin, A.I., C.W. Olsen and G.A. Anderson. 2000. Genetic characterization of an H1N2 influenza virus isolated from a pig in Indiana. **J. Clin. Microbiol.** 38: 2453–2456.

Katsuda, K., S. Sato, T. Shirahata, S. Lindstrom, R. Nerome, M. Ishida, K. Nerome and H. Goto. 1995. Antigenic and genetic characteristics of H1N1 human influenza virus isolated from pigs in Japan. **J. Gen. Virol. 76**: 1247-1249.

Kay R.M., S.H. Done and D.J. Paton. 1994. Effect of sequential porcine reproductive and respiratory syndrome and swine influenza on the growth and performance of finishing pigs. **Vet. Rec.** 135:199-204.

Kida, H., T. Ito, J. Yasuda, Y. Shimizu, C. Itakura, K.F. Shortridge, K. Yoshihiro and R.G. Webster. 1994. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. **J. Gen. Virol.** 75: 2183–2188.

Kluska, V., M. Macku and J. Mensik. 1961 Evidence for swine influenza antibodies in human. **Cesk. Pediatr**. 116: 408–414.

Komadina, N., V. Roque, P. Thawatsupha, J. Rimando-Magalong, S. Waicharoen, E. Bomasang, P. Sawanpanyalert, M. Rivera, P. Iannello, A.C. Hurt and I.G. Barr. 2007. Genetic analysis of two influenza A (H1) swine viruses isolated from humans in Thailand and the Philippines. **Virus Genes.** 35: 161-165.

Krug, R.M. and P.W. Etkind. 1973. Cytoplasm and nuclear virus specific protein in influenza virus-infected MDCK cells. **Virology.** 56: 334-348.

Kupradinun, S., P. Peanpijit, C. Bhodhikosoom, Y. Yoshioka, A. Endo and K. Nerom. 1991. The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. **Arch. Virol.** 11: 289-297.

Lamb, R.A. and P.W. Choppin. 1983. The gene structure and replication of influenza virus. **Annu. Rev. Biochem.** 52: 467-506.

_____, R.A. and R.M. Krug. 1996. Orthomyxoviridae, pp. 1353-1445. *In* B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. **The viruses and their replication.** Lippincott-Raven, Philadelphia.

_____, R.A. and C.J. Lai. 1981. Conservation of influenza virus membrane protein (Ml) amino acid sequence and open reading frame of RNA segment 7 encoding a second protein (M2) in HlNl and H3N2 strains. **Virology.** 112: 746-751.

Leahy, M.B., J.T. Dessens, F. Weber, G. Kochs and P.A. Nuttall. 1997. The fourth genus in the *Orthomyxoviridae*: sequence analyses of Thogoto virus polymerase proteins and comparison with influenza viruses. **Virus. Res**. 50: 215–224.

Lekcharoensuk, P., K.M. Lager, R. Vemulapalli, M. Woodruff, A.L. Vincent and J.A. Richt. 2006. Novel swine influenza virus subtype H3N1, United States. **Emerg. Infect. Diseases.** 12: 787-794.

Lin, B.C. and C.J. Lai. 1983. The influenza virus nucleoprotein synthesized from clones DNA in a simian virus 40 vector is detected in the nucleus. **J. Virol.** 45: 434-438.

Ma, W., M. Gramer, K. Rossow and K.J. Yoon. 2006. Isolation and Genetic Characterization of New Reassortant H3N1 Swine Influenza Virus from Pigs in the Midwestern United States. **J. Virol.** 80: 5092-5096.

Martin, K. and A. Helenius. 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein: The viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. **Cell.** 67: 117-130.

_____, K.S., H. Reggio, A. Helenius, K. Simons. 1982. The entry of enveloped viruses into an epithelial cell line. **Prog. Clin. Biol.Res.** 91: 599-611.

Morse, M.A., A.C. Marriott and P.A. Nuttall. 1992. The glycoprotein of Thogoto virus (a tick-borne orthomyxo-like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64. **Virology.** 186: 640-646.

Murphy, B.R. and R.G. Webster. 1996. Orthomyxoviruses, pp. 1397-445. *In* B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, eds. **Virology.** Lippincott-Raven, Philadelphia.

Myers, K.P., C.W. Olsen and G.C. Gray. 2007. Cases of Swine Influenza in Humans: A Review of the Literature. **Clin. Infect. Dis.** 44: 1084–1088.

Nerome, K., M. Ishida, M. Nakayama, A. Oya, C. Kanai and K. Suwicha. 1981. Antigenic and genetic analysis of A/Hong Kong (H3N2) influenza viruses isolated from swine and man. **J. Gen Virol.** 56: 441-445.

Olsen, C.W., S. Carey, L. Hinshaw, A.I. Kasarin. 2000. Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the northcentral United States. **J. Virol.** 145: 1399-1419.

Osterhaus, A.D.M.E., G.F. Rimmelzwaan, B.E.E. Martina, T.M. Bestebroer and R.A.M. Fouchier. 2000. Influenza B Virus in Seals. **Science.** 288: 1051-1053

Palese, P., K. Tobita, M. Ueda and R.W. Compans. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in nuraminidase. **Virology.** 61: 397-410.

Parchariyanon, S., S. Damrongwatanapokin, W. Pinyochon, T. Chuxnum, S. Hinjoy and P. Choomkasien. 2006. Investigation of influenza A virus infection in pigs from 5 reported AIV outbreak provinces in 2004. **J. Thai Vet. Med. Assoc.** 57: 16-25.

Rota, P.A., E.P. Rocha, M.W. Harmon, V.S. Hinshaw, M.G. Sheerar, Y. Kawaoka and T.L. Smith. 1989. Laboratory characterization of a swine influenza virus isolated from a fatal case of human influenza. **J. Clin. Microbiol.** 27: 1413–1416.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press**,** USA.

Schmidtke, M., R. Zell, K. Bauer, A. Krumbholz, C. Schrader, J. Suess and P. Wutzler. 2006. Amantadine Resistance among Porcine H1N1, H1N2, and H3N2 Infl uenza A Viruses Isolated in Germany between 1981 and 2001. **Intervirology.** 49: 286–293.

Schnurrenberger, P.R., G.T. Woods and R.J. Martin. 1970 Serologic evidence of human infection with swine influenza virus. **Am. Rev. Respir. Dis.** 102: 356–361.

Scholtissek, C., H. Burger, P.A. Bachmann and C. Hannoun. 1983. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza viruses from swine and birds. **Virology.** 129: 521-523.

Shalit, I., P.A. Mckee, H. Beauchamp and J.L. Waner. 1985. Comparison of polyclonal antiserum versus monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of influenza A virus infection by immunofluorescence in clinical specimens. **J. Clin. Microbiol**. 22: 877–879.

Shope, R.E. 1931. Swine influenza. III. Filtration experiments and aetiology. **J. Exp. Med**. 54: 373-380.

Shortridge, K.F. and R.G. Webster. 1979. Geographical distribution of swine (Hsw1N1) and Hong Kong influenza virus variants in pigs. **Science.** 196: 1454–1455.

Shu, L.L., Y.P. Lin, S.M. Wright, K.F. Shortridge and R.G. Webster. 1994. Evidence for interspecies transmission and reassortment of influenza A viruses in pigs in southern China. **Virology**. 202: 825–833.

Sugrue, R. and A. Hay. 1991. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. **Virology.** 180: 617–624.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution.** 24: 1596-1599.

Thacker, E.L., B.J. Thacker and B.H. Janke. 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. **J. Clin. Microbiol**. 39: 2525–2530.

Webby, R. J., S.L. Swenson, S.L. Krauss, P.J. Gerrish, S.M. Goyal and R.G. Webster. 2000. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. **J. Virol.** 74: 8243–8251.

Webster, R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chamber and Y. Kawaoka. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiol. Rev.** 56: 152-179.

Weis, W., J.H. Brown and S. Cusack. 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. **Nature.** 333: 426-431.

Wentworth, D.E., M.W. McGregor, M.D. Macklin, V. Neumann and V.S. Hinshaw. 1997. Transmission of swine influenza virus to humans after exposure to experimentally infected pigs. **J. Infect. Dis.** 175: 7-15.

Winter, G. and S. Fields. 1981. The structure of the gene encoding the nucleoprotein of human influenza virus A/PR/8/34. **Virology.** 114: 423-428.

Yewdell, J.W. and C.J. Hackett. 1989. Specificity and function of T lymphocytes induced by influenza A viruses, pp. 361-429. *In* R.M. Krung, ed. **The influenza viruses.** Plenum, New York.

Zhirnov, O.P., T.E. Konakova, W. Garten and H. Klenk. 1999. Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. **J. Virol.** 73: 10158-10163.

Zhou, N.N., D.A. Senne, J.S. Landgraf, S.L. Swenson, G. Erickson, K. Rossow, L. Liu, K.J. Yoon, S. Kraus and R.G. Webster. 1999. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. **J. Virol.** 73: 8851–8856.

Zou, S. 1997. A practical approach to genetic screening for influenza virus variants. **J. Clin. Microbiol.** 35: 2623–2627

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 แสดงสัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส

สัญลักษณ์	เบส
A	Adenine (A)
C	Cytocine (C)
G	Guanine (G)
T	Thymine (T)
M	A หรือ C
R	A หรือ G
W	A หรือ T
S	C หรือ G
Y	C หรือ T
K	G หรือ T
V	A หรือ C หรือ G
H	A หรือ C หรือ T
D	A หรือ G หรือ T
B	C หรือ G หรือ T
X/N	A หรือ C หรือ G หรือ T
*	ไม่ใช่ A, C, G, T

ตารางผนวกที่ 2 แสดงสัญลักษณ์ที่ใช้แทนกรดอะมิโน

สัญลักษณ์	กรดอะมิโน
A	Alanine
R	Arginine
N	Asparagine
D	Aspartic acid
C	Cysteine
E	Glutamic acid
Q	Glutamine
G	Glycine
H	Histidine
I	Isoleucine
L	Leucine
K	Lysine
M	Methionine
F	Phenylalanine
P	Proline
S	Serine
T	Threonine
W	Tryptophan
Y	Tyrosine
V	Valine

NS gene

ATGGATTCCA ACACTGTGTC AAGCTTTCAG GTAGACTGTT TCCTTTGGCA TATCCGCAAA

CGGTTTGCAG ACAATGGATT GGGTGATGCC CCATTCCTTG ATCGGCTACG CCGAGATCAA

AAATCCCTAA AAGGAAGAGG CAGCACCCTT GGTCTCGACA TCGAAACAGC CACTCTTGTT

GGGAAACAAA TTGTGGAGTG GATTCTGAAA GGGGAATCCA ACGAAACACT TAAGATGACC

ATTGCATCAG TACCTGCTCC GCGCTACCTA GCTGACATGA CCCTTGAGGA AATGTCACGA

GATTGGTTCA TGCTATTGCC TAGGCAAAAG ATAACAGGCT CTCTCTGTGT GCGAATGGAC

CAGGCGATCA TGGGAAAGAA CATCACACTG AAAGCGAACT TCAGTGTGAT TTTCAACCGA

TTAGAGACTT TAATACTATT AAGGGCTTTC ACCGAAGAGG AAGCAATCGT TGGGGAAATT

TCATCATTAC CTTCTCTTCC AGGACATACT GGTGAGGATG TCGAAAATGC AGTTGGAGTC

CTCATCAGAG GGTTTGAATG GAATGGTAAC ACGGTTCGAG TCTCTGAAAA TTTACAGAGA

TTCGCTTGGA GAAGCCGTAA TGAGGATGGG AGACCTTCAC TACCTCCAGA GCAGAAATGA

ภาพผนวกที่ 1 แสดงลำดับเบสของยีน NS ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU5.1/04 (H3N2)

M gene

ATGAGTCTTC TAACCGAGGT CGAAACGTAC GTTCTTTCTA TCATTTCGTC AGGCCCCCTC

AAAGCCGAGA TCGCACAGAG ACTGGAAGAT GTCTTTGCAG GGAAGAACAC AGATCTTGAG

GCTCTCATGG AGTGGTTAAA GACAAGACCA ATCCTGTCAC CTCTGACTAA GGGGATTTTA

GGGTTCGTGT TCACGCTCAC CGTGCCCAGT GAGCGGGGAC TGCAGCGTAG ACGCTTTGTC

CAAAATGCCC TAAATGGGAA CGGGGACCCA AACAACATGG ATAGGGCAGT CAAACTATAC

AAGAAACTCA AAAGAGAAAT AACATTCCAT GGGGCCAAGG AGGTGTCACT CAGCTACTCA

ACTGGTGCAC TTGCCAGTTG CATGGGCCTC ATATACAACA GAATGGGAAC AGTGACCACA

GAAGTGGCTT TTGGTCTAGT GTGTGCCACT TGTGAGCAGA TTGCTGATTC ACAGCATCGG

TCTCACAGAC AAATGGCGAC TACTACCAAC CCACTGATCA GGCATGAAAA TAGAATGGTG

CTGGCTAGCA CTACAGCTAA GGCTATGGAG CAGATGGCTG GGTCGAGTGA ACAGGCAGCG

GAAGCCATGG AGGTTGCCAA TCAGACTAGA CGAATGGTAC ATGCGATGAG AACGATTGGG

ACTCATCCTA GCTCCAGTGC TGGTCTGAAA GATGACCTTC TTGAAAATTT GCAGGCCTAC

CAGAAACGGA TGGGAGTGCA GATACAGCGA TTCAAGTGA

ภาพผนวกที่ 2 แสดงลำดับเบสของยีน M ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU5.1/04 (H3N2)

NA gene

ATGAATCCAA ATCAAAAGAT AATAACTATT GGCTCTGTTT CCCTCACCAT TGCCACAATA
TGCCTCCTTA TGCAAATTGC CATCCTGGTA ACTACTGTAA CATTACATTT CAAGCGGTAT
GAATGCAACT CCCACCCAAA CAACCAAGTA ATGCTGTGTG AACCAACAAT AATAGAAAGA
AACACAACAG AGATAGTGTA TCTGACCAAC ACCACCATAG AGAAGGAAAC ATGCCCCAAA
CTAGCAGAAT ACAGGACTTG GTCAAAGCCG CAATGTAAAG TTACAGGATT TGCACCTTTT
TCTAAGGACA ATTCAATTAG GCTTTCCGCT GGTGGGGACA TTTGGGTGAC AAGAGAACCT
TATGTGTCAT GCGATCCTGA CAAGTGTTAT CAATTTGCCC TTGGACAGGG AACAACACTA
AACAACCGGC ATTCAAATGA CACAGTACAT GATAGGACCC CTTATCGAAC CCTATTGATG
AATGAATTGG GTGTTCCATT TCATTTGGGA ACCAAGCAAG TATGTATAGC ATGGTCCAGC
TCAAGTTGTC ACGATGGAAA AGCATGGCTG CATGTTTGTA TAACTGGGCA TGATGAAAAT
GCAACTGCTA GTTTCATTTA CAATGGGAGA CTTGTAGATA GTATTGGTTC ATGGTCCAAA
AAAATCCTCA GGACCCAGGA GTCGGAATGC GTTTGTATTA ATGGAACTTG TACAGTAGTA
ATGACTGATG GAAGTGCTTC CGGAAGAGCT GATACTAAAA TACTATTCAT TGAAGAGGGG
AAAATCATTC ATATTAGTCC ATTGTCAGGA AGTGCTCAAC ATGTCGAGGA GTGTTCCTGT
TATCCTCGAT ACTCTGGTGT TAGATGTGTC TGCAGAGACA ACTGGAAAGG TTCCAATAGG
CCTATCGTGG ATATAAATAT GACTGATTAT AGCATTGTTT CTAGTTATGT GTGCTCAGGA
CTTGTTGGAG ACACACCCAG AAAACCTGAC AGTCACAGCA GTAGCAATTG CCTGAATCCT
AACAATGAGG AGGGGGGTCA TGGAGTGAAA GGCTGGGCCT TTGATGATGG AGATGACTTG
TGGATGGGAC GGACGATCAG CGAGAAGGTT CGCTTAGGTT ATGAGACCTT CAAAGTCATA
GGGGGCTGGT CCAAATCTAA TTCCAAATTT CAGATAAACA GGCAAGTCAT AGTTGACAGA
GGTGATAGGT CCGGTTATTC TGGCATTTTC TCTGTTGAAG GCAAAGGCTG CATCAATCGG
TGCTTTTATG TGGAGTTGAT AAGGGGAAGG AAACAGGAAA CTGAAGTCTG GTGGACCTCG
AACAGTATTG TTGTGTTTTG TGGCACCTCA GGTACATATG GAACAGGCTC ATGGCCTGAT
GGGGCGGACA TCAATCTCAT GCCTATATAA

ภาพผนวกที่ 3 แสดงลำดับเบสของยีน NA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU5.1/04 (H3N2)

NP gene

ATGCTCCCGG CCGCCATGGC GGCCGCGGGA TTCGATTTAT TCGTCTCAGG GAGCAAAAGC

AGGGTAGATA ATCACTCAAT GAGTGACATC GAAGTCATGG CGTCTCAAGG CACCAAACGA

TCATATGAGC AAATGGAGAC TGGTGGGGAA CGCCAGGATG CCACAGAAAT CAGGGCATCG

GTCGGAAGAA TGATTGGTGG AATAGGAAGA TTCTACATTC AAATGTGTAC TGAACTCAAA

CTCAGTGACT ATGAGGGACG GTTAATTCAA AATAGCATAA CAATAGAGAG AATGGTGCTC

TCTGCTTTTG ACGAGAGAAG GAATAAATAC CTGGAAGAAC ATCCCAGTGC TGGGAAAGAT

CCTAAGAAAA CCGGTGGACC CATATATAGA AGAGTAGACG GAAAATGGAT GAGGGAACTC

ATCCTTTACG ACAAAGAAGA AATAAGGAGA GTTTGGCGCC AGGCAAACAA TGGCGATGAT

GCGACAGCCG GTCTCACTCA TATCATGATT TGGCACTCCA ATCTGAATGA TGCAACCTAT

CAGAGGACAA GAGCTCTTGT CCGCACTGGG ATGGATCCCA GAATGTGCTC CCTAATGCAA

GGCTCAACAC TTCCCAGGAG GTCTGGAGCC GCAGGTGCTG CAGTAAAAGG AGTCGGAACA

ATCACAATGG AGCTAATCAG AATGATCAAA CGTGGAATCA ATGACCGAAA CTTCTGGAGG

GGTGAAAATG GGCGAAAGAC AAGGATTGCA TATGAAAGAA TGTGCAACAT TCTCAAAGGA

AAATTTCAAA CAGCCGCCCA AAGGGCAATG ATGGATCAAG TGAGAGAAAG TCGAAACCCA

GGAAACGCTG AGATCGAAGA TCTCATTTTC CTAGCAAGGT CAGCACTCGT CTTAAGAGGG

TCAGTCGCAC ATAAGTCTTG CCTGCCTGCT TGTGTGTATG GACTTGCAGT AGCGAGTGGA

CATGACTTTG AAAGAGAAGG ATATTCACTG GTCGGGATAG ACCCCTTCAA ACTGCTTCAA

AACAGTCAAG TGTTTAGCCT AATCAGACCA AATGAAAACC CAGCTCACAA GAGTCAATTG

GTGTGGATGG CATGCCATTC TGCTGCATTT GAGGACTTAA GAGTGTCAAG CTTCATAAGG

GGTAAGAAAG TGATTCCAAG AGGAAAGCTT TCCACAAGAG GGATTCAGAT TGCTTCAAAT

GAGAATGTGG AAGCTATGGA CTCTAATACA CTGGAACTAA GAAGCAGATA CTGGGCCATA

AGGACCAGAA GCGGAGGAAA TACCAATCAA CAGAAGGCAT CCGCAGGCCA GGTCAGTGTA

ภาพผนวกที่ 4 แสดงลำดับเบสของยีน NP ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU5.1/04 (H3N2)

CAACCTACAT TCTCAGTGCA ACGGAATCTC CCTTTTGAGA GAGCGACCAT TATGGCAGCT

TTCAATGGGA ACAATGAGGG CCGAACATCA GATATGCGAA CGGAGGTTAT AAGGATGATG

GAAAATGCAA AACCAGAAGA TTTGTCATTC CAGGGGCGGG GAGTCTTCGA GCTCTCGGAC

GAAAAGGCAA CGAACCCGAT CGTGCCTTCC TTTGACATGA ATAATGAGGG GTCTTATTTC

TTCGGAGACA ATGCAGAGGA GTTTGACAAT TGA

ภาพผนวกที่ 4 (ต่อ)

HA gene

ATGAAGACTA TCATTGCTGT AAGCAACATC TTATGTCTGG TTTTCGCTCA AAAACTTCCC

GGAAATGACA ACACCACGGC AACGCTGTGC CTGGGGCACC ATGCAGTGCC AAACGGAACG

CTAGTGAAAA CACTCACGGA TGACCAAATT GAAGTGACTA ATGCTACTGA GCTGGTTCAG

AGCTCTTCCA CAGGTGGAAT ATGTGACAGT CCTCACCGAA TCCTTGATGG GAAAAACTGC

ACATTGATAG ATGCTCTATT GGGAGACCCC CATTGTGATG ACTTCCAAAA TAAGGAGTGG

GACCTTTTTA TTGAACGCAG CGAAGCTTAC AGCGACTGTT ACCCTTATGA TGTGCCAGAT

TATGCTTCCC TTAGGTCACT AGTTGCCTCA TCCGGCACCC TGGAGTTTAC CAAAGAAGGC

TTCAATTGGA CTGGAGTCGC TCAGGATGGG ACAAGCATTT CTTGCAAACG GGGATCTGTT

AAAAGTTTCT TTAGTAGATT GAATTGGTTG CACAAATTAG ACTACAAATA TCCAGCATTG

AACGTAACTA TGCTAAACAA TGACAAATTT GACAAATTGT ACATCTGGGG GGTCCACCAC

CCGAGTACGG ACAGTGATCA AACCAACCTA TATGTTCAAG CATCAGGGAG AGTCACAGTT

TCTACCAAAA GAAGCCAACA AACTGTAATC CCGAACATCG GGTCTAGACC CTGGGTAAGG

GGGATTTCCA GCAGAATAAG TATCTATTGG ACAATAGTAA AACCGGGAGA CATACTTTTG

ATTAATAGCA CAGGGAATCT AATTGCCCCT CGGGGTTACT TCAAAATACG GAGTGGGAAA

AGCTCAATAA TGAGATCAGA TGCACCCATT GGCAAATGCA ATTCTGAATG CATCACTCCA

AATGGGAGCA TCCCAAATGA CAAACCTTTC CAAAATGTAA ACAGGATCAC ATATGGAGCC

TGTCCCAGAT ATATTAAGCA AAACACTCTA AAATTGGCAA CAGGGATGCG AAATGTACCA

GAGAAACAAA CTAGAGGCAT ATTCGACGCA ATCGCAGGTT TCATAGAAAA TGGTTGGGAG

GGAATGGTAG ACGGTTGGTA TGGTTTCAGG CATCAAAATT CTGAGGGCAC AGGACAAGCA

GCAGATCTTA AAAGCACTCA AGCAGCAATC AACCAAATCA ACGGGAAACT GAATAGGTTA

ATTGAGAAAA CGAACGAGAA ATTTCATCAA ATCGAAAAAG AATTCTCAGA AGTAGAAGGA

AGAATTCAGG ACCTCGAGAA ATACATTGAA GACACTAAAA TAGATCTCTG GTCTTACAAC

ภาพผนวกที่ 5 แสดงลำดับเบสของยีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU5.1/04 (H3N2)

GCAGAGCTTC TTGTTGCCCT GGAGAACCAA CATACAATTG ATCTAACTGA CTCAGAAATG

AACAAACTGT TTGAAAAAAC AAGGAAGCAA CTGAGGGAAA ATGCTGAGGA CATGGGCAAT

GGCTGCTTCA AAATATACCA CAAATGTGAC AATGCCTGCA TAGGGTCAAT CAGAAATGGA

ACTTATGACC ATAATGTATA CAGAGACGAA GCATTAAACA ACCGGTTCCA GATCAAAGGT

GTTGAGCTAA ATTCAGGATA CAAAGATTGG ATCATATGGA TTTCCTTTGC CATATCATGC

TTTTTGCTTT GTGTTGTTTT ACTGGGGTTC ATCATGTGGG CCTGCCAAAA AGGCAACATT

AGGTGCAACA TTTGCATTTG A

ภาพผนวกที่ 5 (ต่อ)

PA gene

ATGGAAGACT TTGTGCGGCA ATGCTTCAAT CCGATGATCG TCGAGCTTGC GGAAAAAGCA

ATGAAAGAAC ATGGAGAAGA CCCGAAGATT GAAACAAACA AATTTGCTGC AATATGCACA

CACCTGGAAG TCTGTTTCAT GTATTCGGAT TTCCACTTCA TAGATGAACG AGGTGAATCA

ATAGTCTTTG AATCTGGTGA TCCAAATGCA CTTCTAAAAC ACAGATTTGA AATAATTGAA

GGAAGGGATC GCACAGTGGC CTGGACAGTG GTGAACAGCA TTTGCAATAC TACAGAGGCT

GAGAAGCCCA AATTTCTTCC AGATTTATAT GACTATAAGG AGAACCGATT CATTGAAATA

GGTGTAACAA GAAGAGAAGT CCACATATAC TACTTAGAAA AAGCCAACAA AATAAAATCA

GAAAAGACAC ACATCCACAT TTTCTCATTC ACTGGAGAAG AAATGGCCAC TAAGGCAGAT

TACACTCTTG ACGAGGAGAG TAGAGCAAGA ATCAAGACCA GACTATTCAC CATAAGGCAG

GAAATGGCCA TTAGGGGCCT ATGGGACTCC TTTCGTCAGT CCGAAAGAGG CGAAGAGACA

ATTGAAGAAA GATTTGAAAT CAAAGGAACC ATGCGCAGGC TTGTCAACCA AAGTCTCCCG

CCAAACTTCT CCAGCATTGA AAACTTTAGA TCCTATGTGG ATGGATTTGA ACCGAACGGC

TGCATTGAGG GCAAGCTTTC TCAAATGTCC AAAGAAGTGA ATGCTAGGAT CGAACCATTC

TTGAGGGAAA CACCACGCTC ACTCAGATTA CCTGATGGAC CTCCCTGTTC TCAACGGTCA

AAATTCCTGC TGATGGATGC CTTAAAATTA AGCATTGAGG ATCCGAGTCA TGAGGGAGAG

GGGATACCGC TATATGATGC AATCAAATGT ATGAAGACAT TTTTCGGATG GAAAGAGCCC

AACATTGTCA AACCACATGA AAAGGGCATA AACCCCAACT ATCTCCTTGC TTGGAAACAG

GTGCTGGCAG AGCTACAGGA CATTGAAAAT GAGGAGAAAA TCCCAAAGAC CAAAAATATG

AGGAAAACAA GTCAACTAAA GTGGGCACTT GGTGAAAACA TGGCACCTGA AAAAGTGGAT

TTTGAAGATT GCAAAGATAT TGGTGATTTA AAACAATATG ACAGTGATGA GCCAAAAATG

AGATCCCTGG CAAGCTGGAT TCAGAGTGAA TTCAACAAGG CATGCGAACT GACTGATTCT

AGTTGGATAG AGCTCGACGA AATAGGGGAG AATGTCGCCC CAATCGAACA TATTGCGAGC

ภาพผนวกที่ 6 แสดงลำดับเบสของยีน PA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU5.1/04 (H3N2)

ATGAGGAGAA ACTACTTCAC AGCAGAAGTA TCCCACTGCA GGGCCACTGA GTACATAATG

AAGGGAGTGT ACATAAACAC AGCCCTACTC AATGCATCTT GTGCAGCCAT GGATGACTTC

CAGTTAATCC CAATGCTGAG CAAGTGCAGG ACAAAAGAAG GAAGGCGGAA GACAAATCTA

TATGGGTTTA TTGTAAAAGG GAGATCTCAT TTAAGGAACG ATACTGACGT GGTAAATTTT

GTGAGTATGG AGTTTTCTCT CACTGACCCG AGGCTGGAGC CACACAAGTG GGAAAAGTAT

TGTGTTCTTG AGATAGGAGA CATGCTCCTG AGAACTTCAA TTGGCCAAGT GTCAAGGCCA

ATGTTTCTGT ATGTGAGGAC CAATGGGACC TCCAAAATCA AAATGAAGTG GGGTATGGAA

ATGAGACGTT GCCTCCTTCA ATCTCTCCAA CAGATTGAGA GCATGATCGA GGCGGAATCC

TCTGTCAGAG AAAAGGACAT GACAAAAGAA TTTTTTGAAA ACAAATCTGA GACATGGCCC

ATTGGGGAAT CACCCAAAGG AGTGGAAGAA GGCTCCATCG GGAAAGTATG CAGGACCTTA

CTGGCAAAGT CTGTATTCAA TAGCCTGTAT GCATCCCCAC AACTCGAGGG ATTTTCAGCT

GAATCAAGAA AGTTACTTCT AATTGTTCAG GCACTTAGGG ACAACCTGGA ACCTGGGACC

TTTGATCTTG AAGGGCTATA TGATGCAATT GAGGAATGCC TGATTAATGA TCCCTGGGTT

TTGCTTAATG CGTCTTGGTT CAACTCCTTC ATTGTGCATG CACTGAAATA G

ภาพผนวกที่ 6 (ต่อ)

PB1 gene

ATGGATGTCA ACCCGACTCT ACTTTTCTTG AAAGTACCAG CGCAAAATGC CATAAGCACT
ACATTCCCTT ACACTGGAGA TCCTCCATAC AGTCATGGGA CAGGAACAGG TTACACCATG
GACACAGTCA ACAGAACACA TCAATATTCA GAAAGAGGGA AATGGGCAAC AAACACAGAG
ACTGGAGCAC CCCGGCTTAA CCCGATTGAT GGGCCACTAC CTGAGGACAA TGAACCAAGC
GGATATGCAC AAACAGACTG TGTCCTGGAG GCAATGGCTT TCCTTGAGGA ATCCCACCCA
GGAATATTTG AAAACTCGTG TCTTGAGGCG ATAGAGGTTG TACAACAAAC AAGAGTGGAC
AAATTGACTC AAGGTCGTCA GACCTATGAC TGGACATTAA ACAGAAACCA ACCGGCTGCA
ACTGCTTTGG CCAACACCAT AGAGGTCTTC AGGTTAAACA GTCTAACAGC TAATGAGTCA
GGGAGGCCAA TAGACTTCCT CAAAGATGTA ATGGAATCAA TGGACAAAGA AGAAATGGAA
ATTACAACAC ATTTCCAAAG GAAAAGAAGA GTAAGAGACA ATATGACCAA GAAAATGGTA
ACACAAAGGA CAATAGGAAA GAAGAAACAG AAACTGAACA AGAGAAATTA TCTCATAAGG
GCATTGACAT TAAACACAAT GACAAAAGAT GCAGAAAGAG GCAAGTTGAA AAGGCGTGCG
ATTGCAACAC CAGGAATGCA GATAAGAGGG TTTGTGTACT TCGTAGAAAC ACTAGCGAGG
AACATCTGTG AGAAACTTGA GCAGTCTGGG CTACCAGTTG GAGGAAATGA AAAGAAAGCC
AAATTGGCAA ATGTTGTGAG AAAAATGATG ACCAACTCAC AAGACACAGA GCTCTCCTTT
ACAATTACTG GAGACAACAC CAAATGGAAT GAAAATCAAA ACCCTCGGAT GTTCCTAGCG
ATGATAACGT ACATCACGAG AAATCAGCCA GAATGGTTCA GAAATGTTTT GAGCATTGCC
CCTATAATGT TCTCAAACAA AATGGCAAAG TTAGGGAAAG GATACATGTT CGAAAGTAAG
AGCATGAAAC TACGGACACA AATACCAGCA GAAATGCTTG CAAACATTGA CTTGAAATAC
TTCAATGAAT CAACGAGGAA GAAAATCGAG AAGATAAGGC CACTCCTAAT AGATGGCACG
GCCTCATTGA GTCCTGGAAT GATGATGGGT ATGTTTAACA TGCTGAGCAC AGTCCTAGGA
GTCTCGATCT TGAATCTTGG GCAAAAGAGA TACACTAAAA CCACATACTG GTGGGATGGA

ภาพผนวกที่ 7 แสดงลำดับเบสของยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU5.1/04 (H3N2)

CTTCAATCTT CTGATGACTT CGCCTTAATA GTGAATGCAC CTAATCATGA GGGAATACAA

GCGGGAGTGG ATAGGTTTTA TAGGACCTGC AAACTGGTTG GAATCAATAT GAGCAAAAGG

AAATCTTACA TAAATAGGAC AGGAACATTT GAATTCACAA GCTTTTTCTA CCGCTATGGG

TTTGTAGCCA ATTTCAGTAT GGAGCTACCC AGCTTTGGGG TATCTGGAGT TAATGAATCG

GCTGATATGA GCATTGGAGT GACAGTGATA AGGAACAACA TGATAAACAA TGATCTTGGC

CCAGCAACTG CTCAAATGGC TCTTCAGCTA TTCATCAAGG ACTACAGGTA CACATACCGG

TGTCACAGAG GTGATACGCA AATCCAAACG AGAAGATCAT TTGAGCTAAA GAAGCTATGG

GAGCAAACCC ATTCAAAGAC AGGACTACTG GTTTCAGATG GAGGACCAAA TCTATACAAT

ATCCGAAACC TCCACATTCC AGAAGTCTGC TTGAAGTGGG AGCTAATGGA TGAGGATTAT

CGGGGTAGAT TGTGTAACCC TCTGAATCCA TTTGTTAGCC ACAAGGAAAT TGAATCCGTA

AACAGTGCCG TGGTAATGCC AGCTCATGGT CCCGCCAAGA GCATGGAATA TGATGCCGTT

GCAACTACAC ACTCTTGGGT TCCCAAAAGG AACCGTTCCA TTCTCAATAC CAGCCAAAGG

GGAATTCTTG AGGATGAACA AATGTACCAG AAGTGCTGCA ATCTATTTGA GAAATTCTTC

CCTAGCAGTT CATACAGGAG GCCAGTTGGA ATTTCCAGCA TGGTGGAGGC CATGGTATCT

AGGGCCAGGA TTGATGCACG GATTGATTTC GAGTCTGGAA GGATCAAGAA AGAAGAGTTT

GCTGAGATCA TGAAGATCTG TTCCACCATT GAAGAGATCA GACGGCAGAA ATAG

ภาพผนวกที่ 7 (ต่อ)

PB2 gene

ATGGAAAGAA TAAAAGAATT AAGAGATCTA ATGTCTCAGT CTCGCACTCG CGAGATACTG
ACAAAAACCA CTGTGGACCA TATGGCAATA ATCAAAAAAT ACACATCAGG AAGACAAGAG
AAGAACCCAG CCCTCAGAAT GAAATGGATG ATGGCAATGA AATATCCGAT CACAGCAGAC
AGGAGAATAA TGGAGATGAT TCCTGAAAGA AATGAACAAG GACAAGCACT TTGGAGTAGG
ACAAATGATG CCGGATCAGA TAGAGTGATG GTGTCACCCC TAGCCGTAAC TTGGTGGAAT
AGGAATGGAC CGACAACAAA TACAGTCCAC TATCCGAAGG TCTACAAAAC ATATTTTGAA
AAAGTTGAAA GGTTAAAGCA TGGGACCTTT GGTCCTGTCC ATTTTCGAAA TCAAGTTAAA
ATACGCCGAA GAGTTGACAT AAACCCAGGC CATGCAGACC TCAGTGCAAA GGAAGCACAA
GATGTTATTA TGGAGGTCGT TTTCCCAAAT GAGGTGGGAG CCAGAATATT GACATCAGAA
TCGCAATTAA CAATAACAAA AGAGAAGAAA GAGGAGCTCC AGGATTGTAA GATCGCCCCT
TTAATGGTGG CATACATGTT GGAAAGAGAA CTGGTTCGCA AAACCAGATT CCTACCGGTA
GCAGGCGGAA CAAGCAGTGT GTACATTGAA GTATTGCACC TGACCCAAGG AACCTGCTGG
GAACAGATGT ACACTCCAGG TGGAGAGGTG AAGAATGATG ACATTGATCA GAGTTTAATC
ATTGCTGCCA GGAACATTGT TAGGAGAGCA ACAGTATCGG CAGATCCACT GGCATCACTA
TTGGAGATGT GTCATAGCAC ACAAATTGGT GGAATAAGGA TGGTCGACAT CCTCAGACAG
AACCCAACGG AAGAACAAGC CGTGGATATA TGCAAAGCAG CGATGGGTTT GAGAATCAGC
TCCTCCTTTA GCTTTGGGGG CTTCACTTTC AAAAGAACAA GTGGGTCATC TGTTAAAAGG
GAAGAAGAAG TGCTCACAGG CAATCTCCAA ACACTAAAAA TAAGAGTACA TGAGGGATAT
GAGGAATTCA CAATGGTTGG GAGAAGAGCA ACAGCTATCT TAAGGAAAGC AACCAGAAGG
CTGATCCAGC TGATAGTAAG TGGAAAGGAC GAACAGTCAA TTGCTGAAGC AATCATAGTA
GCAATGGTGT TCTCGCAAGA GGATTGCATG ATAAAGGCTG TCCGAGGTGA TCTGAATTTT
GTAAACAGAG CAAACCAACG GCTGAACCCC ATGCATCAAC TCCTGAGGCA CTTCCAGAAG

ภาพผนวกที่ 8 แสดงลำดับเบสของยีน PB2 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/SW/Thailand/KU5.1/04 (H3N2)

GATGCAAAGG TGCTGATTCA AAATTGGGGA ATTGAACCTA TTGATAATGT CATGGGGATG

ATAGGGATAT TACCTGATAT GACCCCAAGC ACAGAGATGT CACTGAGAGG GGTGAGGGTC

AGTAAAACGG GAGTAGATGA ATATTCCAGT ACTGAGAGAG TGATTGTGAG TATTGATCGC

TTCTTGAGAG TTCGAGACCA GCGGGGGAAT GTACTCCTAT CTCCTGAGGA GGTTAGCGAA

ACACAGGGAA CAGAGAAATT AACAATAACA TATTCATCAT CAATGATGTG GGAGATCAAC

GGTCCTGAGT CAGTGCTCGT CAACACATAT CAATGGATAA TTAGAAATTG GGAAGCTGTG

AAGATCCAAT GGTCTCAGGA CCCCACAATG CTATACAATA AGATGGAATT TGAGCCATTT

CAGTCTCTGG TACCCAAAGC GGCCAGAGGT AAATACAGTG GGTTTGTGAG AACACTATTC

CAGCAAATGC GTGATGTGCT GGGGACATTT GATACTGCCC AAATAATAAA GCTGCTGCCA

TTTGCAGCAG CACCACCTGA ACAAAGTAGG ATGCAGTTCT CGTCTCTAAC TGTAAATGTA

AGAGGATCAG GGATGAGAAT ACTCATAAGA GGTAACTCCC CCGTGTTCAA CTACAACAAG

ATAACCAGAA GACTAACAGT CCTCGGAAAG GACGCAGGAG CATTAACAGA AGATCCAGAT

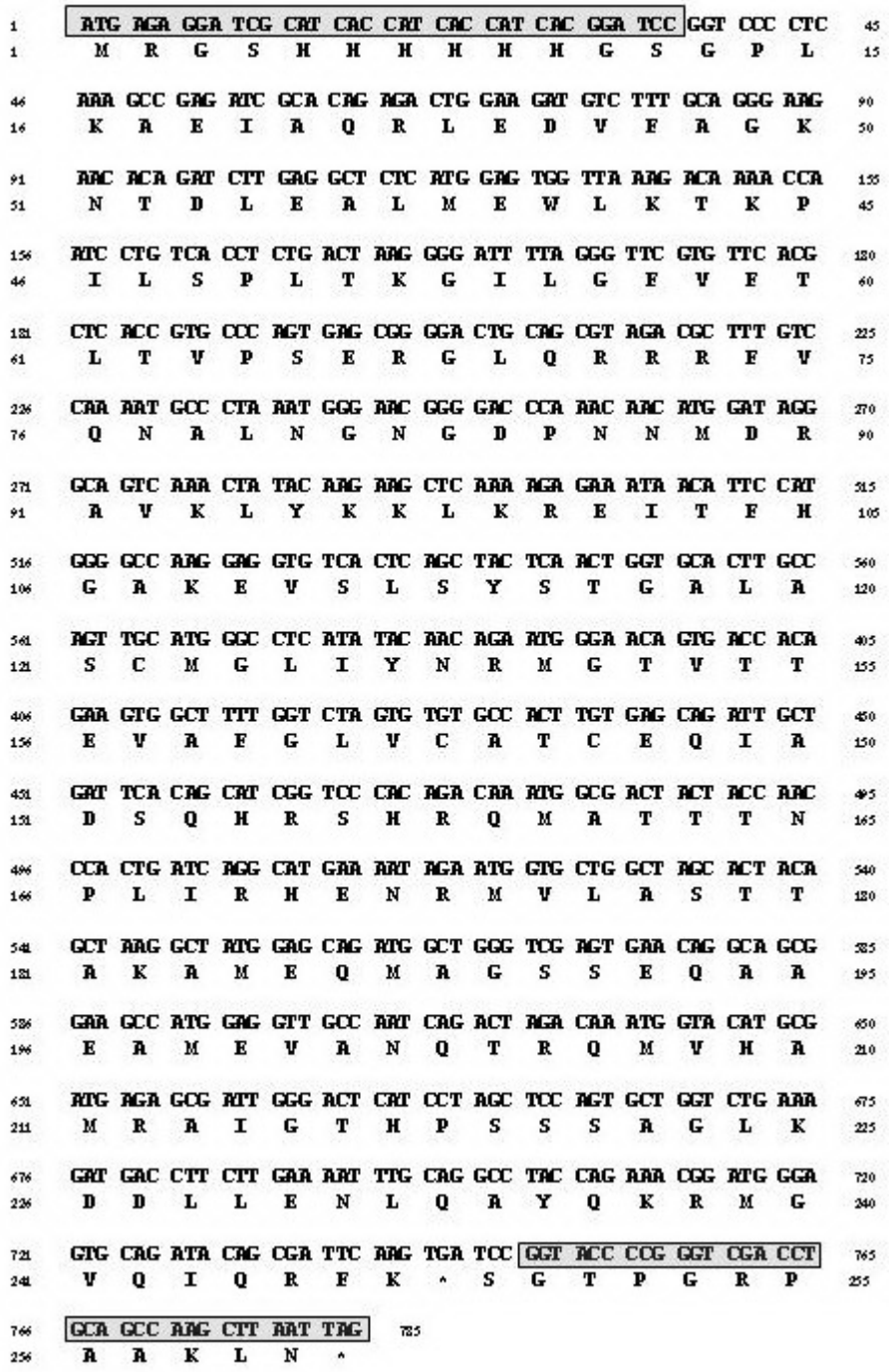
GAGGGGACAG CTGGAGTAGA ATCTGCGGTA CTGAGAGGTT TCCTAATTCT CGGAAAGGAA

AACAAAAGAT ACGGACCAGC ATTAAGCATT AATGAATTGA GTAATCTTGC AAAAGGGGAG

AAAGCCAATG TGTTGATAGG GCAAGGAGAC GTGGTGTTGG TGATGAAACG GAAACGGGAC

TCTAGCATAC TTACTGACAG CCAGACAGCG ACCAAAAGAA TTCGGATGGC CATCAATTAG

ภาพผนวกที่ 8 (ต่อ)



ภาพผนวกที่ 9 แสดงลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีน M1 ที่อยู่ใน pQE30 vector (กรอบสี่เหลี่ยม)