



245501



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การเฝ้าระวังไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในนกกระทา
ในประเทศไทย

โดย

อลงกร อมรศิลป์

กุมภาพันธ์ 2555



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การเฝ้าระวังไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในนกกระทา
ในประเทศไทย

โดย

อลงกร อมรศิลป์

กุมภาพันธ์ 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปี 2552 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ หน่วยปฏิบัติการโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการหน่วยชั้นสูงโรคสัตว์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคห้องปฏิบัติการ การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส การแยกสกัดสารพันธุกรรม และการถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในงานห้องปฏิบัติการและจัดทำรายงานวิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การเฝ้าระวังไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในนกกกระทาในประเทศไทย
ชื่อผู้วิจัย รศ.น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์, ศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช,
 รศ.สพ.ญ.ดร. สันนิภา สุรทัตต์, น.สพ. รัชฎ ดันติเลิศเจริญ และ น.สพ.
 มนุศักดิ์ วงษ์พัชรชัย
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กันยายน 2553

บทคัดย่อ

245501

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการเฝ้าระวังไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในนกกกระทา จากฟาร์มจำนวน 2 ฟาร์มในเขตพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรีและอยุธยา ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2553 โดยเก็บตัวอย่างนกกกระทาจำนวน 1,020 ตัว (ตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากช่องปาก 1,020 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากทวารร่วม 1,020 ตัวอย่าง) ผลการวิจัยพบไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ H7N1 จำนวน 3 ตัวอย่าง และได้ถอดรหัสพันธุกรรมของยีน HA และ NA ของเชื้อไวรัส H7N1 จำนวน 1 ตัว คือ A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ พบว่าไวรัส ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่แยกได้จากศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส สายพันธุ์ H7N1 ในกลุ่ม Eurasian lineage และมีกรดอะมิโนในตำแหน่ง HA cleavage site ที่แสดงถึง คุณลักษณะของเชื้อไวรัสที่ไม่ก่อโรครุนแรง (low pathogenicity avian influenza, LPAI) และไม่พบการ เปลี่ยนแปลงหรือการกลายพันธุ์ในบริเวณ receptor binding site รวมทั้งมีการลดจำนวนลงของกรด อะมิโน 20 ตัว ในตำแหน่ง NA stalk region ซึ่งแสดงถึงวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส การวิจัยครั้งนี้เป็น รายงานแรกในประเทศไทยที่รายงานไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ในนกกกระทาในประเทศไทย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project title Surveillance of influenza A viruses from quail in Thailand
Name of the investigators Alongkorn Amonsin, Roongroje Thanawongnuwech,
Sanipa Suradhat, Rachod Tantilertcharoen and
Manoosak Wongphatcharachai
Year September 2010

Abstract

245501

A surveillance program for influenza A viruses was conducted in quails from 2 farms at Suphanburi and Ayutthaya provinces during May 2009 to April 2010. Samples were collected from 1,020 quails (POS = 1,020 and CS = 1,020) and subjected for virus isolation and identification. Three viruses were identified and subtyped as influenza A subtype H7N1. One virus "A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09" was characterized by HA and NA gene sequencing. Our report showed that H7N1 virus circulating in quails is genetically related to H7N1 viruses in Eurasian lineage. Genetic analysis of the virus showed that amino acids at HA cleavage site has low pathogenicity avian influenza (LPAI) characteristics. Genetic mutation at receptor binding site is not detected in the H7N1 virus. The deletion of 20 amino acids at NA stalk region indicates the evolution of the virus. This report is the first report of surveillance and identification of H7N1 in quails in Thailand.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ลักษณะของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ	4
ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในนกกระทา	5
การศึกษาผลการติดไวรัสไข้หวัดใหญ่ในนกกระทา	6
วิธีการตรวจวินิจฉัยไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอทางห้องปฏิบัติการ	7
วิธีการวิจัย	8
ระยะที่ 1	
สถานที่เก็บตัวอย่าง	8
การเก็บตัวอย่างจากนกกระทา	
ระยะที่ 2	9
การตรวจพิสูจน์หาไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธีฉีดเข้าไขพัก	9
การตรวจพิสูจน์หาไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธี realtime RT-PCR	10
การตรวจพิสูจน์แยกสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธี conventional RT-PCR	10
ระยะที่ 3	
การแยกสกัด RNA และ การเตรียม cDNA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่	11
การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยวิธี RT-PCR	12
การถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่	13
การประกอบรหัสพันธุกรรม	14
การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมและเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่	14
การเผยแพร่ข้อมูล	15

ผลการวิจัย	16
ตัวอย่างนกกระทา	16
ผลการตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่จากตัวอย่างนกกระทา	18
ผลการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธี conventional RT-PCR	18
รหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ในนกกระทา	20
ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 (H7N1)	22
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน HA	23
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NA	26
การเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1	29
การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน HA	29
การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน NA	33
การอภิปรายผล	35
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก: รายละเอียดรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1	46
จำนวน 1 ตัวอย่าง (8 สายพันธุ์กรรม) ที่เผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank	

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 รายงานจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อและเสียชีวิตจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1	2
ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างนกกระทาที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดสุพรรณบุรีและอยุธยา	17
ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างนกกระทาและผลการเพาะแยกเชื้อและตรวจพิสูจน์ไวรัส ไข้หวัดใหญ่ โดยวิธี HA test และ real time RT-PCR	18
ตารางที่ 4 primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน HA และ NA ของไวรัส ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่แยกได้จากนกกระทา	20
ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่แยกได้จาก นกกระทาในการศึกษาครั้งนี้	21
ตารางที่ 6 แสดงผลการถอดรหัสพันธุกรรมของแต่ละยีนของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/ Thailand/CU-J2882/09	22
ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลรหัสพันธุกรรมของยีนต่างๆ ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 กับเชื้อไวรัสที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด ในฐานข้อมูล GenBank	23
ตารางที่ 8 รายละเอียดผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H7 จากฐานข้อมูล GenBank	31
ตารางที่ 9 รายละเอียดผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีน NA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ N1 จากฐานข้อมูล GenBank	33

รายการภาพประกอบ

	หน้า
ภาพที่ 1	19
การตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (ให้ผลบวกต่อ M gene) โดยวิธี real time RT-PCR	
ภาพที่ 2	19
ตัวอย่างผลการตรวจพิสูจน์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ (subtype) โดยวิธี RT-PCR ซึ่งสามารถตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1	
ภาพที่ 3	24
แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของยีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY /Thailand/CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ในต่างประเทศ	
ภาพที่ 4	25
แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของยีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7 ในต่างประเทศ	
ภาพที่ 5	27
แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของยีน NA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 จากต่างประเทศ	
ภาพที่ 6	28
แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของยีน NA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับยีน NA (N1) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่จากต่างประเทศ	
ภาพที่ 7	31
ลำดับกรดอะมิโนของยีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 315-325 แสดง HA cleavage site	
ภาพที่ 8	32
ลำดับกรดอะมิโนของยีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 215-220 แสดง left edge of receptor binding pocket	
ภาพที่ 9	34
ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 49-68 แสดงบริเวณ stalk ที่มีการลดลงของกรดอะมิโน 20 ตัว เปรียบเทียบกับ A/Gs/Guangdong/96 (H5N1)	