

ผลการวิจัย

ตัวอย่างนกกระทา

การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างจากฟาร์มนกกระทาจำนวน 2 ฟาร์ม ซึ่งคณะผู้วิจัยได้เลือกเก็บตัวอย่างจากฟาร์มในจังหวัดอยุธยาจำนวน 1 ฟาร์ม และจังหวัดสุพรรณบุรีจำนวน 1 ฟาร์ม โดยเก็บตัวอย่างจากนกกระทาในแต่ละฟาร์มเดือนละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2553 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกฟาร์มทั้ง 2 ฟาร์มประกอบด้วย 1) เป็นฟาร์มที่ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดที่เคยมีรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนก H5N1 2) ฟาร์มนกกระทาที่คัดเลือกเป็นฟาร์มที่อยู่ในพื้นที่ของการระบาด 3) ได้รับความร่วมมือจากเจ้าของฟาร์มในการศึกษาวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างนกกระทาจากจังหวัดสุพรรณบุรีเดือนละประมาณ 40 ตัวอย่าง และจากจังหวัดอยุธยาเดือนละประมาณ 50 ตัวอย่าง (จำนวนตัวอย่างขึ้นกับข้อตกลงกับทางเจ้าของฟาร์ม) โดยสรุปจำนวนตัวอย่างนกกระทาที่เก็บทั้งสิ้นในระยะเวลา 12 เดือน คือ 2,040 ตัวอย่าง จากนกกระทา 1,020 ตัว เป็นตัวอย่าง swab จากช่องปาก (oropharyngeal swab, OPS) จำนวน 1,020 ตัวอย่าง และ ตัวอย่าง swab จากทวารร่วม (cloacal swab, CS) จำนวน 1,020 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างทั้งหมดแบ่งเป็นตัวอย่างนกกระทาจากฟาร์มในจังหวัดสุพรรณบุรี 469 ตัว (OPS, n = 469 และ CS, n = 469) และตัวอย่างนกกระทาจากฟาร์มในจังหวัดอยุธยา 551 ตัว (OPS, n = 551 และ CS, n = 551) ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่จากตัวอย่างนกกระทา

การเพาะแยกเชื้อและตรวจพิสูจน์เชื้อจากตัวอย่างนกกระทา ดำเนินการในห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (BSL 3) ณ หน่วยชั้นสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และการตรวจพิสูจน์ยืนยันไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ โดยวิธี real time RT-PCR และแยกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส โดยวิธี conventional RT-PCR ดำเนินการในห้องปฏิบัติการสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการเพาะแยกเชื้อและตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่จากตัวอย่างนกกระทา โดยวิธีการฉีดเชื้อเข้าไข้ฟักพบว่า จากตัวอย่างทั้งหมด 2,040 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HA test จำนวน 151 ตัวอย่าง (OPS, n = 71 และ CS, n = 80) คิดเป็น 7.4% (151/2040) และจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HA test จำนวน 151 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ซึ่งตรวจพิสูจน์ โดยวิธี real

time RT-PCR จำนวน 24 ตัวอย่างคิดเป็น 1.18% (24/2040) ดังแสดงในตารางที่ 3 ผลการตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ พบว่าตัวอย่างจากฟาร์มนกกระทาในจังหวัดอยุธยาให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (real time RT-PCR) มากกว่าฟาร์มในจังหวัดสุพรรณบุรี (1.54% (17/2070) และ 0.75% (7/2040) ตามลำดับ) และพบว่าตัวอย่างที่เก็บจาก OPS จะให้ผลบวก 1.47% (15/2040) ซึ่งมากกว่าตัวอย่างจาก CS 0.88% (9/2040) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างนกกระทาที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดสุพรรณบุรีและอยุธยา

เดือน	ฟาร์ม สุพรรณบุรี			ฟาร์ม อยุธยา			รวม		
	จำนวน นกกระทา	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน นกกระทา	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน นกกระทา	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง
	(ตัว)	OPS		(ตัว)	OPS		(ตัว)	OPS	
พค 52	43	43	43	-	-	-	43	43	43
มิย 52	-			50	50	50	50	50	50
กค 52	42	42	42	51	51	51	93	93	93
สค 52	41	41	41	52	52	52	93	93	93
กย 52	41	41	41	49	49	49	90	90	90
ตค 52	40	40	40	50	50	50	90	90	90
พย 52	43	43	43	47	47	47	90	90	90
ธค 52	40	40	40	50	50	50	90	90	90
มค 53	41	41	41	50	50	50	91	91	91
กพ 53	45	45	45	51	51	51	96	96	96
มีค 53	50	50	50	50	50	50	100	100	100
เมย 53	43	43	43	51	51	51	94	94	94
รวม	469	469	469	551	551	551	1,020	1,020	1,020

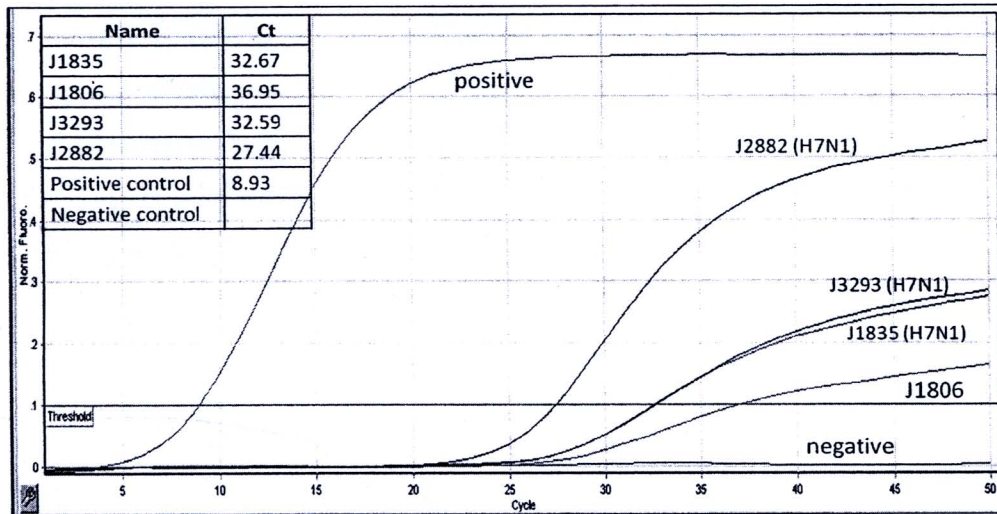
ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างนกกระทา และผลการเพาะแยกเชื้อและตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธี HA test และ real time RT-PCR

เดือน	ฟาร์ม สุพรรณบุรี					ฟาร์ม อยุธยา					รวม				
	จำนวน นกกระทา (ตัว)	ผลบวก				จำนวน นกกระทา (ตัว)	ผลบวก				จำนวน นกกระทา (ตัว)	ผลบวก			
		HA test		rRT-PCR			HA test		rRT-PCR			HA test		rRT-PCR	
		OPS	CS	OPS	CS		OPS	CS	OPS	CS		OPS	CS	OPS	CS
พค 52	43	0	4	0	3	-	-	-	-	-	43	0	4	0	3
มีย 52	-	-	-	-	-	50	0	0	0	0	50	0	0	0	0
กค 52	42	0	0	0	0	51	3	0	3	0	93	3	0	3	0
สค 52	41	1	0	1	0	52	2	4	0	3	93	3	4	1	3
กย 52	41	1	1	1	0	49	7	3	5	1*	90	8	4	6	1
ตค 52	40	0	0	0	0	50	0	0	0	0	90	0	0	0	0
พย 52	43	10	9	0	0	47	0	0	0	0	90	10	9	0	0
ธค 52	40	10	0	0	0	50	14	16	1*	0	90	24	16	1	0
มค 53	41	0	7	0	0	50	6	2	0	0	91	6	9	0	0
กพ 53	45	7	4	1	1	51	1	3	0	0	96	8	7	1	1
มีค 53	50	0	4	0	0	50	7	17	2	1	100	7	21	2	1
เมย 53	43	0	6	0	0	51	2	0	1*	0	94	2	6	1	0
รวม	469	29	35	3	4	551	42	45	12	5	1,020	71	80	15	9

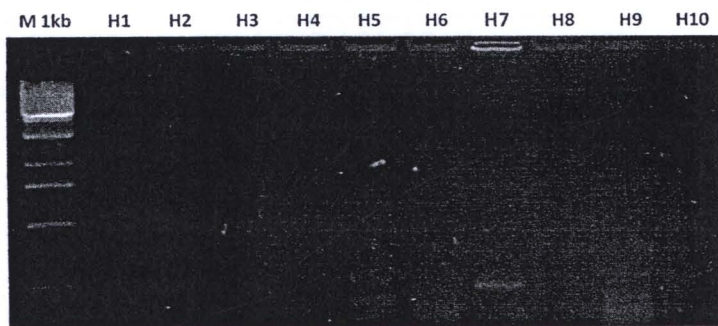
*ตัวอย่างที่สามารถตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่และแยกสายพันธุ์ได้เป็น H7N1

ผลการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธี conventional RT-PCR

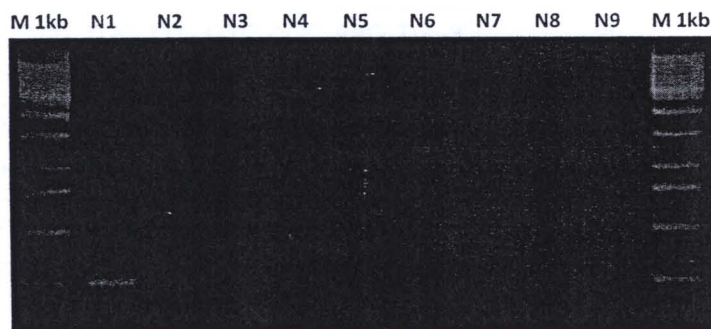
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ซึ่งตรวจพิสูจน์ด้วยวิธี real time RT-PCR มีจำนวน 24 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.18% (24/2040) (ตารางที่ 3) ในจำนวน 24 ตัวอย่างนี้สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสได้เป็นสายพันธุ์ H7N1 จำนวน 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2) โดยพบว่าตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากนกกระทาอายุ 45 วัน จากฟาร์มในจังหวัดอยุธยา โดยแยกเป็นตัวอย่างจาก CS ที่เก็บได้ในเดือนกันยายน พ.ศ.2552 จำนวน 1 ตัวอย่าง (A/Quail/Ayutthaya/Thailand/CU-J1835/2009) ตัวอย่างจาก OPS ที่เก็บได้ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 จำนวน 1 ตัวอย่าง (A/Quail/Ayutthaya/Thailand/CU-J2882/2009) และตัวอย่างจาก OPS ที่เก็บได้ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2553 จำนวน 1 ตัวอย่าง (A/Quail/Ayutthaya/Thailand/CU-J3293/2010)



ภาพที่ 1 การตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (ให้ผลบวกต่อ M gene) โดยวิธี real time RT-PCR



ผลการจำแนกสายพันธุ์ (HA subtype) (H7 positive)



ผลการจำแนกสายพันธุ์ (NA subtype) (N1 positive)

ภาพที่ 2 ตัวอย่างผลการตรวจพิสูจน์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ (subtype) โดยวิธี RT-PCR ซึ่งสามารถตรวจพิสูจน์ได้เชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1

รหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ในนกกระทา

ในการถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 นี้ เนื่องจากสายพันธุ์ H7N1 ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ออกแบบ primer ใหม่สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Primer3 Input (v.0.4.0) รายละเอียดของ primer ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน HA และ NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่แยกได้จากนกกระทา

Primer name	Primer for H7 subtype	Length (bp)	Tm (°C)	Product size (bp)
H7F1	5'- CAA AAG CAG GGG ATA CAA A -3'	19	58.6	491
H7R1	5'- CTC TGC ATA GAA TGA AGA TCC -3'	21	55.9	
H7F2	5'- CAA TGG GAT TCA CAT ACA GC -3'	20	55.3	463
H7R2	5'- GCA TCA ACC TGT ACT CCA CT -3'	20	57.3	
H7F3	5'- GAC CAA RCT MTA YGG RAG TG -3'	20	49.2	816
H7R3	5'- CCA TCT TCT TCA GCA TTC TC -3'	20	55.3	
H7F4	5'- GAG AAT GCT GAA GAA GAT GG -3'	20	55.3	259
H7R4	5'- ATA GTG CAC YGC ATG TTT -3'	28	47.9	
Primer for N1 subtype				
N1F1	5'- CAG GAG TTC AAA ATG AAT CCA A -3'	22	51.2	600
N1R1	5'- AAA GCA AGA GCC ATT TAC ACA -3'	21	52.8	
N1F2	5'- TGT TGC TTG GTC AGC AAG TG -3'	20	61.05	386
N1R2	5'- TTG AGC CAT GCC AAT TAT CC -3'	20	60.81	
N1F3	5'- TCA CTA TGA GGA ATG CTC CTG -3'	21	57.91	388
N1R3	5'- CAC TGA AAA GCT ACT GTC CGT TT -3'	23	59.87	
N1F4	5'- CCA TGG GTA TCT TTC AAT CAA -3'	21	57.41	500
N1R4	5'- TCA ATG GTG AAT GGC AAC T -3'	19	57.42	

ในการถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 นี้ ได้เลือกตัวอย่างเชื้อไวรัส 1 ตัวอย่าง คือเชื้อไวรัส A/Quail/Ayutthaya/ Thailand/CU-J2882/2009 สาเหตุที่เลือกตัวอย่างเชื้อไวรัส 1 ตัวอย่างมาถอดรหัสพันธุกรรม เนื่องจาก 1) เพื่อความเหมาะสมทางด้านเงินทุนวิจัย 2) เป็นตัวอย่างที่มีปริมาณสารพันธุกรรมมาก รายละเอียดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่แยกได้จากนกกระทาในการศึกษาครั้งนี้ และผลการถอดรหัสพันธุกรรมของยีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5 และ ตารางที่ 6

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่แยกได้จากนกกระทาในการศึกษาครั้งนี้

ตัวอย่าง	เชื้อไวรัส	สถานที่/เวลา	ชนิดสัตว์
J1835	A/Quail/Ayutthaya/Thailand/CU-J1835/2009	อยุธยา/กย 52	นกกระทา
J2882	A/Quail/ Ayutthaya/Thailand/CU-J2882/2009	อยุธยา/ธค 52	นกกระทา
J3293	A/Quail/Ayutthaya/Thailand/CU-J3293/2010	อยุธยา/เมษ 53	นกกระทา

หมายเหตุ: ตัวอย่าง J2882 เป็นตัวอย่างที่คัดเลือกเพื่อถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัส

ตารางที่ 6 แสดงผลการถอดรหัสพันธุกรรมของแต่ละยีนของเชื้อไวรัส A/Quail/Ayutthaya/Thailand/ CU-J2882/09

ตัวอย่าง	ชนิดสัตว์	สถานที่	จำนวนนิวคลีโอไทด์ของยีน (bp)	
			HA	NA
J2882	นกกระทา	อยุธยา	1,284	1,343

หมายเหตุ การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ถอดรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของเชื้อ อย่างไรก็ตามผลการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS ได้รหัสพันธุกรรม 646, 753, 471, 873, 960 และ 828 bp

ข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะนำไปเผยแพร่ โดยจะส่งข้อมูลรหัสพันธุกรรมของยีน (nucleotide sequences) ไปยังฐานข้อมูล GenBank ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่อไป ซึ่งฐานข้อมูลดังกล่าวสามารถเข้าไปค้นคว้าได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> โดยรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจะมีหมายเลขประจำของรหัสพันธุกรรม (GenBank accession number) เพื่อประโยชน์ในการค้นหาข้อมูลดังกล่าว อย่างไรก็ตามในรายงานฉบับนี้ตัวอย่างไวรัสไข้หวัดใหญ่และรหัสพันธุกรรมของแต่ละยีน ได้เตรียมข้อมูลเพื่อส่งไปยังฐานข้อมูล GenBank แต่ยังไม่มีความหมายเลขประจำของรหัสพันธุกรรม จนกว่าจะมีการตีพิมพ์ผลงานวิจัย รายละเอียดรหัสพันธุกรรมและขนาดรหัสพันธุกรรมของยีนของเชื้อไวรัส ในรูปแบบของฐานข้อมูล GenBank ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก

ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 (H7N1)

การวิจัยครั้งนี้ได้ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากนกกระทาในฟาร์มที่จังหวัดอยุธยา จำนวน 3 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ถอดรหัสพันธุกรรมของยีน HA และ NA ของเชื้อไวรัสจำนวน 1 ตัวอย่าง คือ A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 (H7N1) เพื่อนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม เช่น การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส (genetic relatedness) โดยวิธี cluster analysis ซึ่งจะสามารถบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) โดยจัดกลุ่มของเชื้อไวรัสที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันไว้ด้วยกัน และได้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้กับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่แยกได้จากประเทศต่างๆ เพื่อให้เห็นภาพรวมของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H7N1 ที่ระบาดทั่วโลก นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) และกรดอะมิโน (amino acids) ของยีน HA และ NA ของเชื้อไวรัส เพื่อศึกษาจุดที่มีความแตกต่างและความเหมือนในแต่ละยีน (polymorphic sites) และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุดที่มีความสำคัญต่อความรุนแรงของเชื้อไวรัส (virulence determinants)

ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 (H7N1) ประกอบด้วย

- ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1
- การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1

ตารางที่ 7 แสดงผลการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 (H7N1) กับข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในฐานข้อมูล GenBank ผลการศึกษาพบว่า ยีน HA ของเชื้อไวรัส CU-J2882 มีความใกล้เคียงกับ A/duck/Korea/GJ56/07(H7N8) คือ 97% และยีน NA ของเชื้อไวรัส CU-J2882 มีความใกล้เคียงกับ A/quail/Phathumthani/NIAH2711/2004(H5N1) คือ 98% (ตารางที่ 7) ในขณะที่ยีน M และ NS มีความใกล้เคียงกับ A/mallard/Korea/GH171/07(H7N7) และ A/aquatic bird/India/NIV-17095/2007(H11N1) ตามลำดับ เป็นที่น่าสนใจที่เชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 จากการศึกษาค้นนี้มียีนทั้ง 8 ยีนที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ในกลุ่มยุโรปและเอเชีย (Eurasian lineage) (ตารางที่ 7)

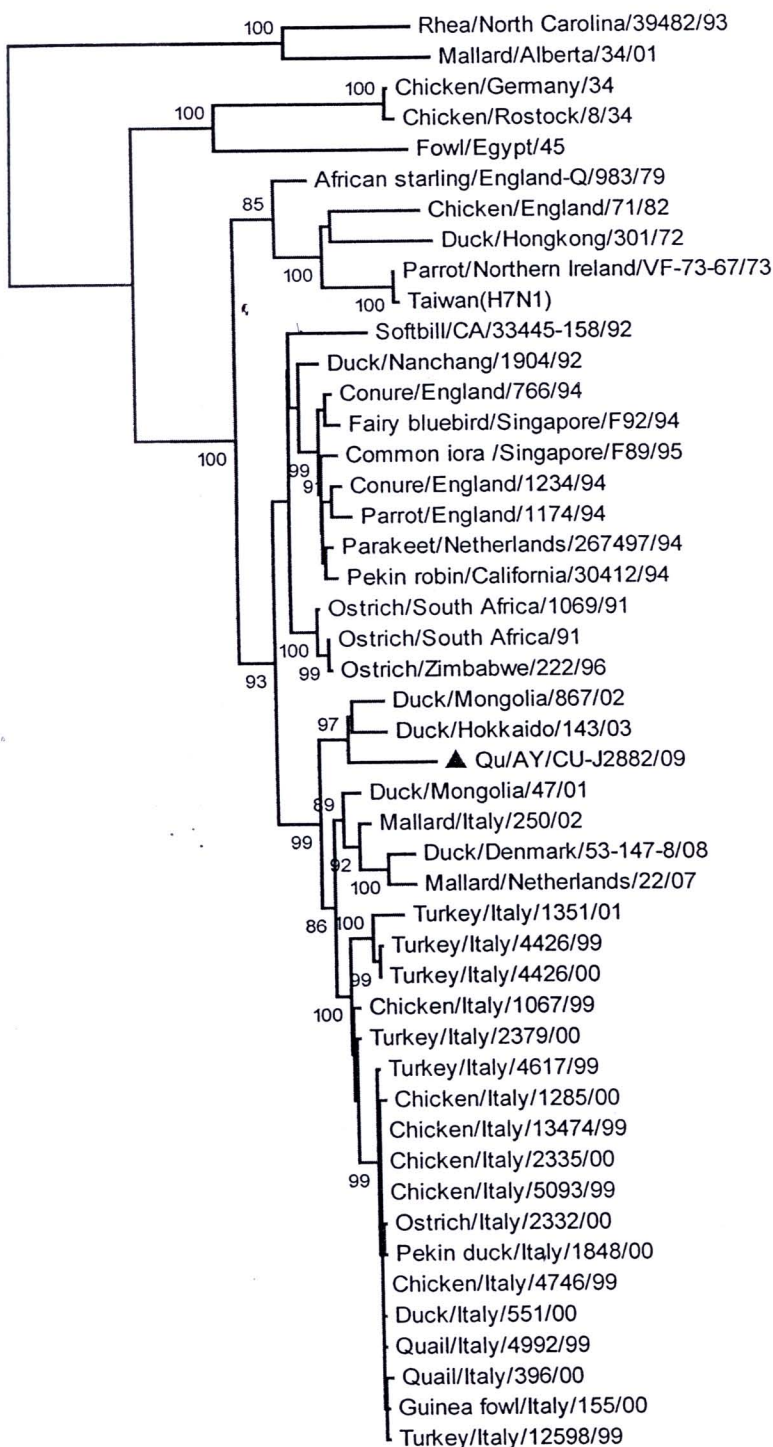
ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลรหัสพันธุกรรมของยีนต่างๆ ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 กับเชื้อไวรัสที่มีความใกล้เคียงมากที่สุดในฐานะข้อมูล GenBank

Gene	Nucleotide sequence compared	Virus with most closely related gene of interest	Homology (%)	GenBank accession no.
PB2	1619-2264	A/pintail/Aomori/1130/2008(H1N3)	98% (646 bp)	AB546177.1
PB1	1507-2259	A/goose/Italy/296426/03(H1N1)	97% (753 bp)	FJ432784.1
PA	1723-2193	A/mallard/Korea/GH170/07(H7N7)	99% (471 bp)	FJ750869.1
HA	388-1671	A/duck/Korea/GJ56/07(H7N8)	97% (1,284 bp)	FJ750853.1
NP	615-1487	A/spot-billed duck/Korea/546/08(H6N1)	98% (873 bp)	GQ414896.1
NA	1-1343	A/quail/Phathumthani/NIAH2711/2004(H5N1)	97% (1,343 bp)	AB450600.1
M	1-960	A/mallard/Korea/GH171/07(H7N7)	99% (960 bp)	FJ959087.1
NS	1-828	A/aquatic bird/India/NIV-17095/2007(H11N1)	98% (828 bp)	CY055179.1

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน HA

ผลการหาความสัมพันธ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) พบว่ายีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ในกลุ่มยุโรปและเอเชีย (Eurasian lineage) โดยมีเชื้อไวรัส A/Chicken/Rostock/8/1934 (H7N1) ซึ่งแยกได้จากไก่ในประเทศเยอรมัน เป็นต้นกำเนิดสายพันธุ์ (ancestor) (ภาพที่ 3)

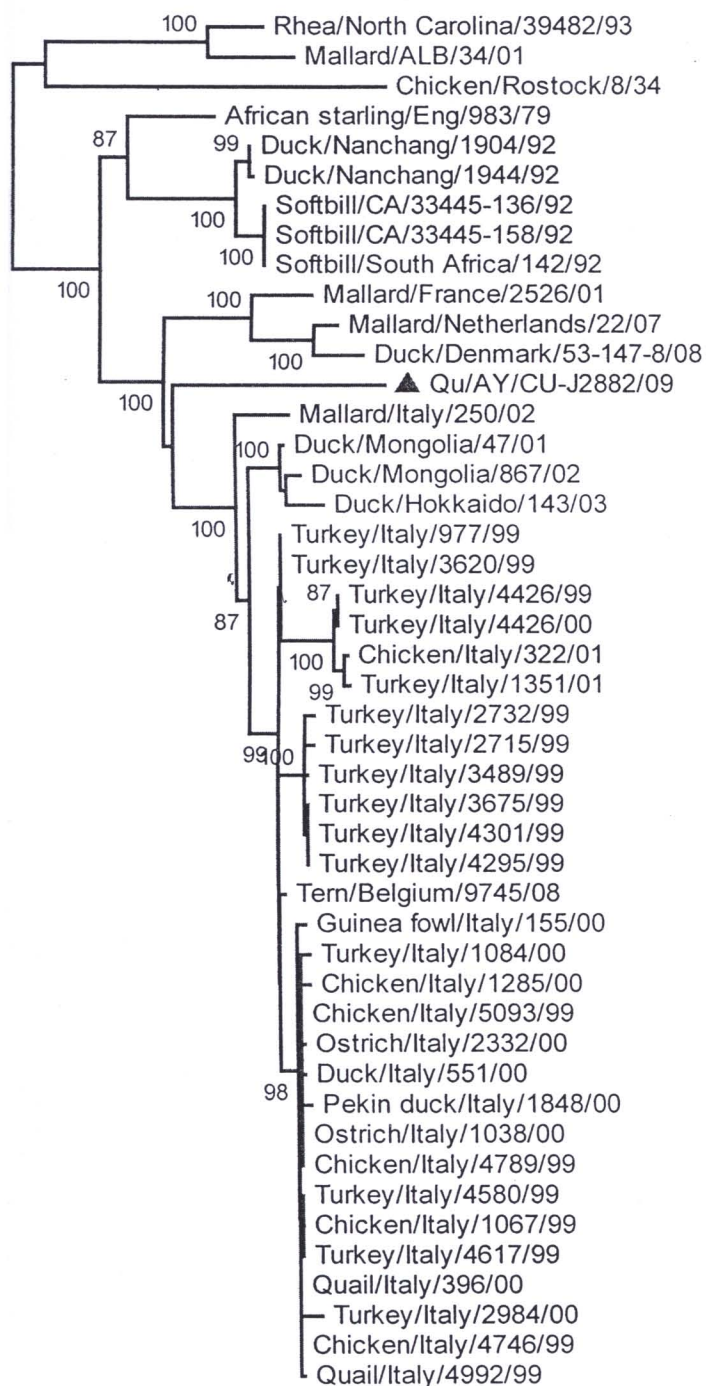
ผลการหาความสัมพันธ์ของยีน HA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 จากการศึกษากับเชื้อไวรัสในกลุ่มสายพันธุ์ H7 โดยมี NA เป็นสายพันธุ์ต่างกัน พบว่ายีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 มีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H7N7 ที่แยกได้จากประเทศเกาหลี (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของยีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ในต่างประเทศ โครงสร้างความสัมพันธ์วิเคราะห์โดยวิธี Neighbor-joining algorithm with branch swapping และใช้ bootstrap analysis 1,000 replications

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NA

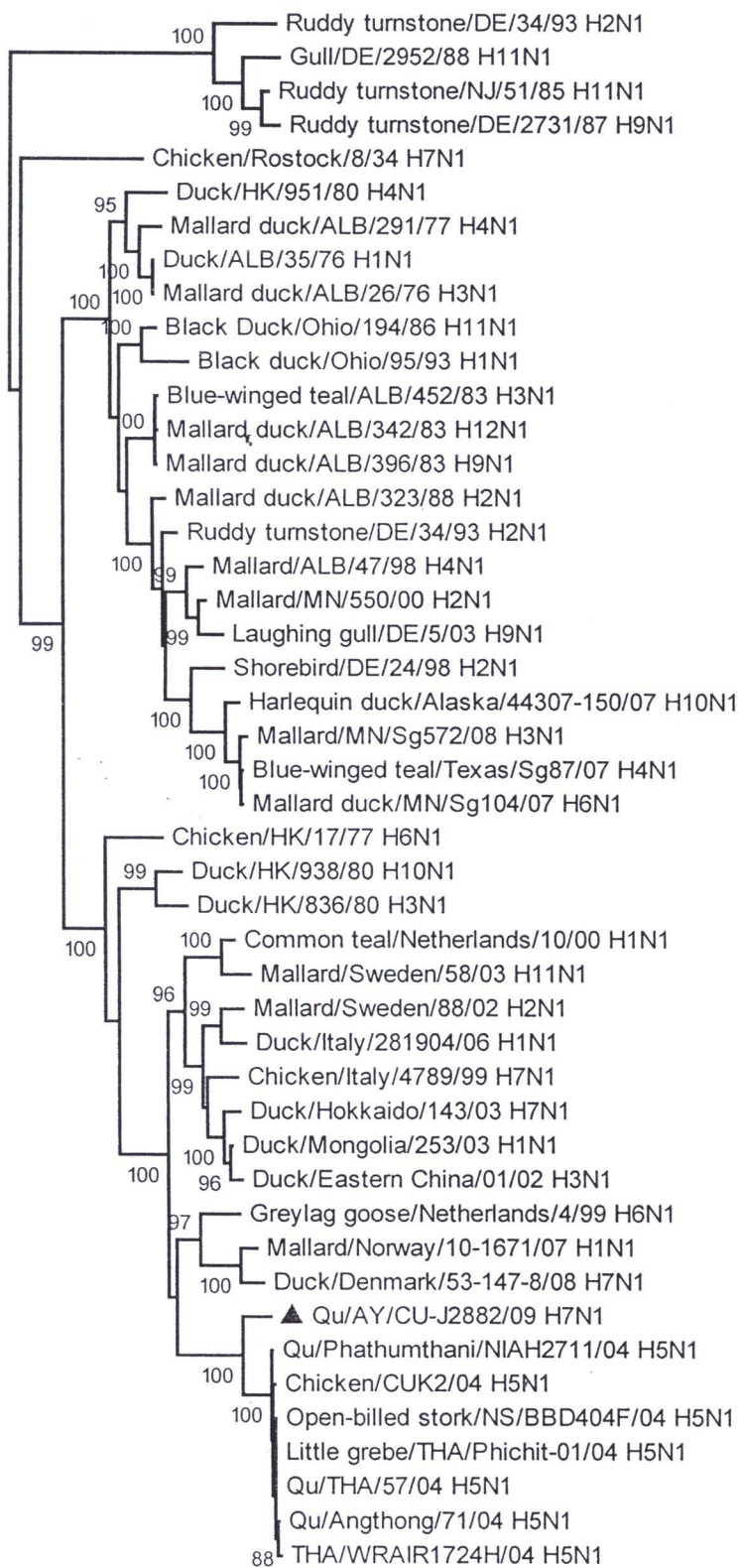
ผลการเปรียบเทียบข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 กับเชื้อไวรัสในฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีน NA ของเชื้อไวรัส CU-J2882 มีความใกล้เคียงกับ A/Quail/Phathumthani/NIAH2711/2004(H5N1) คือ 97% (ตารางที่ 7) โครงสร้างความสัมพันธ์ซึ่งเป็นผลการหาความสัมพันธ์ของยีน NA ของเชื้อไวรัส CU-J2882 พบว่าเชื้อไวรัสถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Eurasian lineage เช่นเดียวกับยีน HA (ภาพที่ 5) และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน NA กับเชื้อไวรัสในกลุ่ม N1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ (HxN1) พบว่ายีน NA ของเชื้อไวรัส CU-J2882 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 ที่เคยมีการระบาดอยู่ในประเทศไทย (ภาพที่ 6) จึงเป็นที่น่าสนใจว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่แยกได้จากนกกระท่ายในการการศึกษานี้ มียีน NA ที่ใกล้เคียงกับยีน NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 และมีความเป็นไปได้ที่อาจเคยมีการวนเวียนและติดเชื้อไวรัส H7N1 และ H5N1 อยู่ในฟาร์มนกกระท่ายและมีโอกาสเกิดการแลกเปลี่ยนท่อนสารพันธุกรรม (genetic reassortment) เกิดขึ้นภายในโฮสต์ชนิดนี้



0.02

ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของยีน NA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 จากต่างประเทศ ซึ่งโครงสร้างความสัมพันธ์วิเคราะห์โดยวิธี Neighbor-joining algorithm with branch swapping และใช้ bootstrap analysis 1,000 replications





ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของยีน NA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับยีน NA (N1) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่จากต่างประเทศ ซึ่งโครงสร้างความสัมพันธ์วิเคราะห์โดยวิธี Neighbor-joining algorithm with branch swapping และใช้ bootstrap analysis 1000 replication

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน HA

ยีน HA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สร้างโปรตีน hemagglutinin ที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับ ความรุนแรงของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในการก่อโรคทั้งในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การแผ่รังสี การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของยีน HA ในจุดต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อคุณสมบัติของเชื้อไวรัส และความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อไวรัส ได้แก่

- Connective peptide sequence (HA cleavage site)
- Right edge of receptor binding pocket ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 124-128
- Left edge of receptor binding site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 215-220
- Receptor binding residues ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 142, 143, 175, 182 และ 185
- N-linked oligosaccharide ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 123 และ 149

ผลสรุปการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 ในจุดที่มีความสำคัญดังกล่าวของยีน HA ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโดยวิธี alignment ในส่วนของ connecting peptide sequence (HA cleavage site) พบว่าเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 มีลำดับกรดอะมิโนแบบ PEIPKGR/G ซึ่งแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7 ที่ทำให้เกิดการระบาดในประเทศอเมริกา (North American lineage) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโน PENPKTR/G และ PENPKPR/G (Suarez et al., 1999) โดยสรุปไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่แยกได้ใน การศึกษานี้ มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง HA cleavage site ซึ่งแสดงถึงคุณลักษณะของเชื้อไวรัสที่ไม่ก่อโรครุนแรง (Low pathogenicity avian influenza, LPAI) (ภาพที่ 7) และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H7 ที่ก่อโรครุนแรง (High pathogenicity avian influenza, HPAI) เช่น A/Chicken/Rostock/8/34 H7N1 จะมีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง HA cleavage site ที่แตกต่างคือมี polybasic amino acids (PEPSKKRKRR/G) (ตารางที่ 8 และภาพที่ 7)

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของยีน HA ในส่วนของของ N-link oligosaccharide ตำแหน่ง 123 และ 149 พบว่าเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 มีลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 123 และ 149 เป็น 123N และ 149N ตามลำดับ แสดงว่า N-link oligosaccharide ของเชื้อไวรัสเหมือนกันกับไวรัสไข้หวัดใหญ่จากฐานข้อมูล GenBank คือเป็น Asparagine (N) (ตารางที่ 8)

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของยีน HA ในส่วนของ receptor-binding site (RBS) ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 ทั้งในส่วน of right edge และ left edge of receptor-binding pockets และส่วนของ receptor-binding residues พบว่าเชื้อไวรัส CU-J2882 มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวเหมือนกับเชื้อไวรัสจากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน โดยวิธี alignment ในส่วนของ receptor binding site ของยีน HA ของเชื้อไวรัส CU-J2882 พบว่าที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 212-219 ไม่มีการลดจำนวนลงของกรดอะมิโนเหมือนเช่นเชื้อไวรัสบางตัวอย่าง เช่น เชื้อไวรัสสายพันธุ์ H7N2 ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่แยกได้จากสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกประเทศอเมริกา (ภาพที่ 8) ซึ่งการลดจำนวนลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าว ซึ่งทำให้ตำแหน่งของ left edge of receptor binding pocket หายไป และอาจส่งผลกระทบต่อ การเข้าสู่เซลล์โฮสต์ของเชื้อไวรัส (Matrosovich et al., 1999; Spackman et al., 2003; Wagner et al., 2000) อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวยังคงต้องทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 8 รายละเอียดผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/ CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7 จากฐานข้อมูล GenBank

Virus	Subtype	HA gene									
		N-glycan		Right edge	Receptor-binding					Left edge of	Cleavage site
		123	149	of RBS	resdues					RBS	sequence
				124-128	142	143	175	182	185	215-220	315-325
Qa/AY/CU-J2882/09	H7N1	N	N	GATSA	W	L	H	Q	L	NGQSGR	PEIPKGR/G
Ck-Rostock-8-34	H7N1	N	N	GT TSA	W	L	H	Q	L	NGQSGR	PEPSKKRKKR/G
Dk-HK-301-72	H7N1	N	N	GATSA	W	L	H	Q	L	NGQSGR	PEIPKGR/G
Dk-Korea-GJ56-07	H7N8	N	N	GATSA	W	L	H	Q	L	NGQSGR	PEIPKGR/G
Rhea-NC-39482-93	H7N1	N	N	GATSA	W	L	H	Q	L	NGQSGR	PENPKTR/G
Av-NY-70411-12-00	H7N2	N	N	GATSA	W	L	H	Q	L	R	PEKPKPR/G
GF-Pa-7777-96	H7N2	N	N	GATSA	W	L	H	Q	L	R	PENPKPR/G

A, Alanine; E, Glutamic acid; G, Glycine; H, Histidine; I, Isoleucine; K, Lysine; L, Leucine; N, Asparagine; P, Proline; Q, Glutamine; R, Arginine; S, Serine; T, Threonine; W, Tryptophan

7 Sequences	300	310	320	330	340
Qu-AY-CU-J2282 (H7N1)	RYVKQESLLLATGMKNV	PEIPKG---	RGLFGAIAGFIENGWEGL		
Ck-Rostock-8-34 (H7N1)	RYVKQESLLLATGMKNV	PEPSKKRKKRGL	FGAIAGFIENGWEGL		
Dk-HK-301-72 (H7N1)	RYVKQESLLLATGMKNV	PEIPKG---	RGLFGAIAGFIENGWEGL		
Dk-Korea-GJ56-07 (H7N8)	RYVKQESLLLATGMKNV	PEIPKG---	RGLFGAIAGFIENGWEGL		
Rhea-NC-39482-93 (H7N1)	RYVKQPSLLLATGMRNV	PENPKT---	RGLFGAIAGFIENGWEGL		
Avian-NY-70411-12-00 (H7N2)	RYVKQKSLLLATGMRNV	PEKPKP---	RGLFGAIAGFIENGWEGL		
GF-Pa-7777-96 (H7N2)	RYVKQTSLLLATGMRNV	PENPKP---	RGLFGAIARFIENGWEGL		

ภาพที่ 7 ลำดับกรดอะมิโนของยีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/ CU-J2882/09 กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 315-325 แสดง HA cleavage site

7 Sequences	200	210	220	230	240
Qu-AY-CU-J2282 (H7N1)	NYQQSFVPSPGARPQVNGQSGRIDFHWLMLNPNDTVTFSFNGA				
Ck-Rostock-8-34 (H7N1)	KYHQSFVPSPGTRPQINGQSGRIDFHWLILDPNDTVTFSFNGA				
Dk-HK-301-72 (H7N1)	NYQQSFVPSPGARPQVNGQSGRIDFHWLILNSNDTVTFSFNGA				
Dk-Korea-GJ56-07 (H7N8)	NYQQSFVPSPGARPQVNGQSGRIDFHWLMLNPNDTVTFSFNGA				
Rhea-NC-39482-93 (H7N1)	KYQQSFVTPSPGARPQVNGQSGRIDFHWMLLDPNDTVTFTFNGA				
Avian-NY-70411-12-00 (H7N2)	KYQQSFVTPSPGAR-----RIDFHWLMLLDPNDTVTFTFNGA				
GF-Pa-7777-96 (H7N2)	KYQQSFVTPSPGAR-----RIDFHWLMLLDPNDTVTFTFNGA				

* ยีน HA ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H7N2 มีการลดจำนวนลงของกรดอะมิโน 8 ตัว

ภาพที่ 8 ลำดับกรดอะมิโนของยีน HA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/ CU-J2882/09 กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 215-220 แสดง left edge of receptor binding pocket และในเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H7N2 ไม่พบการลดจำนวนลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง receptor binding site (212-219)

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน NA

ยีน NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สร้างโปรตีน neuraminidase ที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้อง กับวิวัฒนาการและความรุนแรงของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในการก่อโรคทั้งในสัตว์ปีก การแผ่ระว่างการ เปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของยีน NA ในจุดที่มีความสำคัญต่อคุณสมบัติของเชื้อไวรัสและความ รุนแรงในการก่อโรคของเชื้อไวรัส เช่น amino acid deletion

ผลการศึกษากรดอะมิโนของโปรตีน NA บริเวณ stalk region ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/ Thailand/CU-J2882/09 พบว่ามีการลดจำนวนของกรดอะมิโน 20 ตัว (20 amino acid deletion) เมื่อ เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 จากห่านในประเทศจีน A/Goose/Guangdong/1/ 1996 (H5N1) แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณ stalk region ในรูปแบบของวิวัฒนาการ จากการไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือลดจำนวนลงของกรดอะมิโน เป็นการลดลงของกรดอะมิโนที่บริเวณ ดังกล่าว (ตารางที่ 9 และภาพที่ 9) และเป็นที่น่าสังเกตว่าถึงแม้ว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 (A/Goose/Guangdong/1/1996) ไม่มีกรดอะมิโนที่ลดลง ในขณะที่เชื้อไวรัสสายพันธุ์ H7N1 (A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09) จะมีจำนวนกรดอะมิโนที่ลดลง 20 bp แต่เชื้อไวรัสทั้ง 2 ตัวอย่าง ไม่ก่อโรครุนแรงในสัตว์ปีก แสดงให้เห็นว่าบริเวณดังกล่าวเกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสมากกว่า ความรุนแรงของเชื้อ

ตารางที่ 9 รายละเอียดผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีน NA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/ CU-J2882/09 เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ N1 จากฐานข้อมูล GenBank

NA gene		
Virus	Subtype	20 amino acids deletion
		315-325
Qa/AY/CU-J2882/09	H7N1	20 amino acids deletion (49-68)
Qa/Angthong/71/04	H5N1	20 amino acids deletion (49-68)
Ck/Rostock/8/34	H7N1	22 amino acids deletion (54-75)
Nonthaburi/102/09	H1N1	No amino acids deletion
GS/Guangdong/1/96	H5N1	No amino acids deletion

5 Sequences	40	50	60	70	80
Qu-AY-CU-J2882-09 (H7N1)	HTGNQHKAEP-----			ISNTNFLIEKAVA:	
Qu-Angthong-71-04 (H5N1)	HTGNQQKAEP-----			ISNTNFLTEKAVA:	
Ck-Rostock-8-34 (H7N1)	QTENQNHHEACNPSI-----			AGQDAA:	
Nonhaburi_102_09 (H1N1)	QLGNQNQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNI			ISNTNFAAGQSVV:	
Gs-Guangdong-96 (H5N1)	QTGNQHQAEPNCQSIITYENNTWVNQTYVNI			ISNTNFLTEKAVA:	

ภาพที่ 9 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NA ของเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09
กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 49-68 แสดงบริเวณ stalk ที่มีการลดลงของกรดอะมิโน 20 ตัว เปรียบเทียบกับ
A/Gs/Guangdong/1/96 (H5N1)