

คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีนฮีมากลูตินิน และนิวรามิनिเดสของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก
(H5N1) ในสัตว์ปีกที่พบในประเทศไทย



นางสาว นวลอนงค์ ปรีโยธ

สถาบันวิทย์บริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

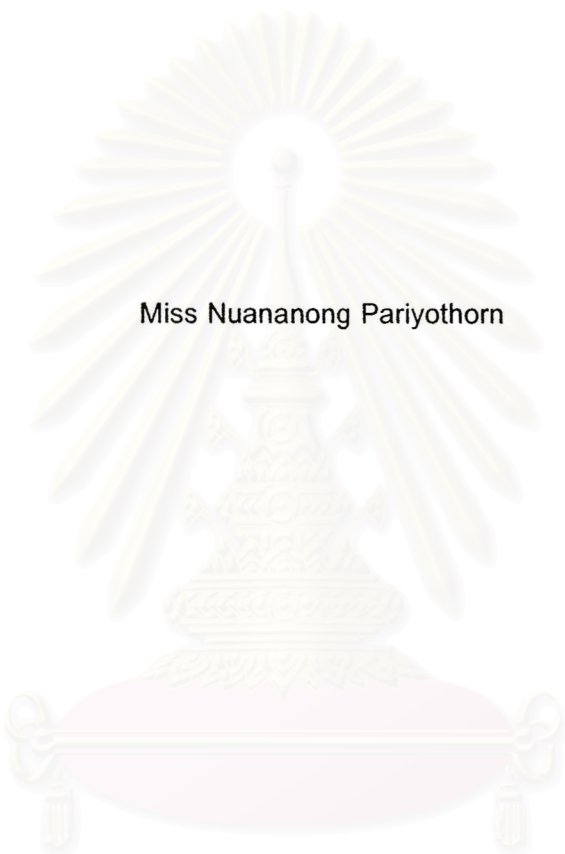
ปีการศึกษา 2549

ISBN : 974-14-3527-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC CHARACTERIZATION OF HEMAGGLUTININ AND NEURAMINIDASE
GENES OF AVIAN INFLUENZA VIRUSES (H5N1) ISOLATED FROM AVIAN SPECIES
IN THAILAND

Miss Nuananong Pariyothorn



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health
Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006
ISBN : 974-14-3527-4
Copyright of Chulalongkorn University

490080

หัวข้อวิทยานิพนธ์ คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีนฮีมากลูตินิน และนิวรามิनिเดสของ
เชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ในสัตว์ปีกที่พบในประเทศไทย
โดย นางสาว นวลอนงค์ ปรีโยธร
สาขาวิชา สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อลงกร อมรศิลป์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....
.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรถพร คุณาวงศ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย)

.....
.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อลงกร อมรศิลป์)

.....
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น)

.....
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สันนิภา สุรทัตต์)

.....
.....กรรมการ
(อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ธราดล เหลืองทองคำ)

นวลอนงค์ ปรีโยธ : คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีนฮีมากลูตินิน และนิวรามิनिเดส ของเชื้อ
ไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ในสัตว์ปีกที่พบในประเทศไทย (GENETIC CHARACTERIZATION OF
HEMAGGLUTININ AND NEURAMINIDASE GENES OF AVIAN INFLUENZA VIRUSES
(H5N1) ISOLATED FROM AVIAN SPECIES IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษา: ผศ. น.สพ. ดร.
อลงกร อมรศิลป์ อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. สพ.ญ. ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น; 73 หน้า, ISBN974-14-
3527-4

ในประเทศไทยมีรายงานระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกตั้งแต่ต้นปี 2547 ซึ่งทำให้เกิดความ
เสียหายทางด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุข การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะทาง
พันธุศาสตร์ของยีนฮีมากลูตินิน และนิวรามิनिเดส ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีก
ที่พบในประเทศไทย ในช่วงปีพ.ศ. 2547-2548 จำนวน 43 ตัวอย่าง โดยการนำเชื้อไวรัสมาตรวจ
พิสูจน์ทางอณูชีววิทยา หาลำดับเบส วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis และวิเคราะห์
การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆของยีน H5 และ N1 ที่มีความสำคัญต่อคุณสมบัติ
ของเชื้อไวรัส ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกและตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกซึ่งเป็นลักษณะของ
เชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดความรุนแรง (Highly pathogenic avian influenza (HPAI) และมีลักษณะทาง
พันธุกรรมใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน รวมทั้งอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคย
มีการระบาดในประเทศไทย และเวียดนาม นอกจากนี้ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน
ตำแหน่งต่างๆของยีน H5 และ N1 ที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกดังนั้นการศึกษาถึง
ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จะทำให้ทราบถึงข้อมูลรหัส
พันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ปีกที่พบในประเทศไทย ซึ่ง
สามารถนำไปใช้อธิบายความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการ
กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่อาจเกิดขึ้นได้ต่อไปในอนาคต

ภาควิชา สัตวแพทยศาสตรอนสุข
สาขาวิชา สัตวแพทยศาสตรอนสุข
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อผู้สิดิ่..... นวลอนงค์ ปรีโยธ

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม..... รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

4775585031 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEYWORD : Avian influenza viruses H5N1, Avian, Thailand

NUANANONG PARIYOTHORN : GENETIC CHARACTERIZATION OF
HEMAGGLUTININ AND NEURAMINIDASE GENES OF AVIAN INFLUENZA
VIRUSES (H5N1) ISOLATED FROM AVIAN SPECIES IN THAILAND.

Since 2004, Avian Influenza (AI) outbreaks have been reported in Thailand. The disease has caused considerable economic losses and public health problems. This study addressed the genetic characterization of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of 43 avian influenza viruses (H5N1) isolated from avian species in Thailand. The H5N1 viruses were sequenced and analyzed for genetic relatedness and genetic changes. Our results showed that the viruses in this study were Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) viruses and were clustered into the same group with H5N1 viruses from Thailand and Vietnam. Major genetic changes of HA and NA genes were not observed in this study. In summary, genetic characterization of HA and NA genes of H5N1 viruses have provided the basic information of viral sequences, genetic relationship and genetic changes of the viruses in Thailand. This information will be useful for genetic monitoring of AI viruses in the future.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Veterinary Public Health

Field of Study Veterinary Public Health

Academic Year 2006

Student's Signature... *Nuananong Pariyothorn*

Advisor's Signature... *Asst. Prof. Dr. Rungroj Chulak*

Co-advisor's Signature... *Rungroj Chulak*

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. อลงกร อมรศิลป์ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ข้อตักเตือน และแก้ไขในสิ่งที่เป็น ประโยชน์ในด้านการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาสัตวแพทยศาสตรณสุขที่ให้ความรู้ในด้านวิชา ต่างๆ และอนุเคราะห์สถานที่ที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. สันนิภา สุรทัตต์ อาจารย์ น.สพ. ดร. ธราดล เหลืองทองคำ ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการใน การสอบวิทยานิพนธ์ คุณอภิรดี เทียมบุญเลิศ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบ คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำ ภาควิชาสัตวแพทยศาสตรณสุข ที่เอื้ออำนวยในเรื่องเอกสารต่างๆ ให้ดำเนินการไปด้วยดี ขอขอบคุณ คุณไฉไล คุณวัฒนากุล เพื่อนๆ ในภาควิชาสัตวแพทยศาสตรณสุข และครอบครัว ที่คอย ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดีในการเรียนและทำวิทยานิพนธ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก.....	5
พยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก.....	6
การติดเชื้อไวรัสในสัตว์.....	7
คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก.....	7
การศึกษาคุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน HA.....	7
การศึกษาคุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NA.....	9
ลักษณะการเปลี่ยนแปลงและกลายพันธุ์ของเชื้ออินฟลูเอนซ่า เอ.....	11
Antigenic drift.....	11
Antigenic shift.....	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	14
ระยะที่ 1 เก็บรวบรวมตัวอย่างและตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1.....	15
ระยะที่ 2 หาลำดับเบสของยีน H5 และ N1 (DNA sequencing).....	18
ระยะที่ 3 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและหาความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1.....	20
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA.....	21
สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและหาลำดับเบสของยีน...	21
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	21
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	22
นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ (primers) ที่ใช้ในงานวิจัย.....	22

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	25
ตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้.....	25
ผลการหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1.....	28
ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก.....	31
ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน H5 และ N1.....	36
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	52
รายการอ้างอิง.....	59
ภาคผนวก.....	66
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	73

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	จำนวนผู้ติดเชื้อและผู้เสียชีวิตจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1.....
ตารางที่ 2	ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก.....
ตารางที่ 3	การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธี Multiplex RT-PCR.....
ตารางที่ 4	Primers ที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกด้วยวิธี Multiplex RT-PCR.....
ตารางที่ 5	Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1.....
ตารางที่ 6	ตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากสัตว์ปีกระหว่างปี 2004-2005 จำนวน 43 ตัวอย่าง ที่ศึกษาครั้งนี้.....
ตารางที่ 7	แสดงขนาดของยีนและ GenBank Accession H5 และ N1 ของตัวอย่างจำนวน 43 ตัวอย่าง.....
ตารางที่ 8	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนก เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกแยกได้ช่วงต้นปี 2004.....
ตารางที่ 9	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกในไก่ เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกแยกได้ช่วงต้นปี 2004.....
ตารางที่ 10	สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน H5.....
ตารางที่ 11	สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน N1.....

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1	ลักษณะและโครงสร้างของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก..... 5
รูปที่ 2	Antigenic drift ของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า..... 12
รูปที่ 3	Antigenic shift ของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า..... 13
รูปที่ 4	แผนภูมิแสดงวิธีการดำเนินการวิจัย..... 14
รูปที่ 5	Primers ที่ใช้ในการหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1..... 24
รูปที่ 6	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส PCR product ต่อยีน M H5 และ N1..... 26
รูปที่ 7	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส PCR product ในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1..... 28
รูปที่ 8	ตัวอย่างผลของลำดับเบสในรูปกราฟ chromatogram และ text file..... 29
รูปที่ 9	Phylogenetic tree ของยีน H5 และ N1 ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษา กับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในประเทศไทยช่วงต้นปี 2004..... 33
รูปที่ 10	Phylogenetic tree ของยีน H5 ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษา กับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในทวีปเอเชีย และยุโรปในปี 2004-2005..... 34
รูปที่ 11	Phylogenetic tree ของยีน N1 ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษา กับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในทวีปเอเชีย และยุโรปในปี 2004-2005..... 35
รูปที่ 12	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโน (Alignment) บริเวณ HA cleavage site..... 45
รูปที่ 13	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ receptor binding site..... 46
รูปที่ 14	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ N-link glycosylation site..... 47
รูปที่ 15	ผลการเปรียบเทียบบริเวณ stalk region ที่พบการลดลงของกรดอะมิโน..... 48
รูปที่ 16	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่ง 119..... 49
รูปที่ 17	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่ง 293, 295..... 50
รูปที่ 18	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่ง 275..... 51

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 (Avian influenza A viruses (H5N1)) สามารถทำให้เกิดโรคไข้หวัดนก (Avian influenza) ในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด โดยสำนักงานโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties; OIE) ได้จัดให้โรคนี้อยู่ในกลุ่ม list A ซึ่งเป็นกลุ่มโรคที่มีความรุนแรง แพร่กระจายอย่างรวดเร็ว และทำให้เกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุข (OIE, 2005a)

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ (Influenza A) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่สามารถทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ในคน ในอดีตมีรายงานการระบาดรุนแรงของโรคไข้หวัดใหญ่ที่เกิดจากเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ ครั้งแรกในช่วงปี 1918 -1919 โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 หรือที่เรียกกันว่า “Spanish flu” จากนั้นในช่วงปี 1957-1958 มีการระบาดอย่างรุนแรงเป็นครั้งที่สองในประเทศจีนซึ่งเรียกกันว่า “Asian flu” (H2N2) ต่อมาได้เกิดการระบาดรุนแรงอีกครั้งที่ประเทศฮ่องกงในช่วงปี 1968-1969 เรียกว่า “Hong Kong flu” (H3N2) ซึ่งการระบาดในแต่ละครั้งได้ทำให้มีผู้เสียชีวิตจำนวนมากและก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุข (Ligon, 2005)

ในปี 1997 ได้มีรายงานการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในประเทศฮ่องกง ส่งผลให้มีไ้ตายเป็นจำนวนมาก และมีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส ซึ่งไม่เคยมีรายงานการระบาดมาก่อน โดยพบว่าเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในคนมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากไก่ (Claas et al., 1998) รายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนกในครั้งนั้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสามารถแพร่จากสัตว์ปีกไปสู่คนได้โดยตรง โดยไม่ต้องอาศัยสัตว์ตัวกลาง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า สุกรเป็นสัตว์ตัวกลางที่สามารถรับเชื้อไวรัสไข้หวัดที่ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ปีกเข้าไปในร่างกายและแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (genetic mixing vessel) ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ถ่ายทอดไปสู่คนได้ (Osterhaus et al., 2002; Claas et al., 1998) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 มีความสำคัญเนื่องจากเป็นเชื้อไวรัสที่มีความสามารถในการแพร่เชื้อจากสัตว์ปีกมาสู่คนได้โดยตรง

ต่อมาในช่วงปลายปี 2003 - ต้นปี 2004 พบการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ปีกในแถบทวีปเอเชีย 8 ประเทศ ได้แก่ กัมพูชา เกาหลีใต้ จีน ญี่ปุ่น ไทย ลาว เวียดนาม อินโดนีเซีย และได้มีการทำลายสัตว์ปีกไปเป็นจำนวนมากกว่า 100 ล้านตัว จากนั้นเดือนมิถุนายน 2004 พบการระบาดเพิ่มขึ้นอีกครั้งในหลายประเทศแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ มาเลเซีย มองโกเลีย รัสเซีย(ไซบีเรีย) (CDC, 2005) รวมทั้งในปี 2005-2006 ได้มีการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีกไปยังหลายประเทศในยุโรป เช่น ตุรกี ออสเตรเลีย เยอรมัน รัสเซีย และ ฝรั่งเศส (CDC, 2005) และประเทศในทวีปแอฟริกา เช่น คาเมอรูน ชูดาน ไนจีเรีย ไนเจอร์ (OIE, 2006)

ในประเทศไทย พบการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกตั้งแต่ต้นปี 2004 จนถึงปี 2006 โดยรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนกแบ่งเป็น 4 รอบคือ รอบที่ 1 วันที่ 23 มกราคม 2004 - 24 พฤษภาคม 2004 , รอบที่ 2 วันที่ 3 กรกฎาคม 2004 - 12 เมษายน 2005, รอบที่ 3 วันที่ 1 กรกฎาคม 2005 - 9 กันยายน 2005 และรอบที่ 4 วันที่ 26 กรกฎาคม 2006 - 7 สิงหาคม 2006 (DLD, 2006) โดยมีรายงานของผู้ติดเชื้อไวรัสทั้งหมด 24 ราย และเสียชีวิต 16 ราย (รายงานเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2006) (WHO, 2006) ซึ่งในช่วงเวลาเดียวกันได้มีรายงานของผู้ติดเชื้อไวรัสและเสียชีวิตในประเทศต่างๆ รวมเป็น 244 รายและ 143 ราย ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนผู้ติดเชื้อและผู้เสียชีวิตจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในแต่ละประเทศ

(Cumulative number of confirmed human cases of Avian Influenza A (H5N1) reported to WHO)

ประเทศที่มีการระบาด	2003		2004		2005		2006		รวม	
	ผู้ติดเชื้อ	ผู้เสียชีวิต	ผู้ติดเชื้อ	ผู้เสียชีวิต	ผู้ติดเชื้อ	ผู้เสียชีวิต	ผู้ติดเชื้อ	ผู้เสียชีวิต	ผู้ติดเชื้อ	ผู้เสียชีวิต
อาร์เจนตินา	0	0	0	0	0	0	8	5	8	5
กัมพูชา	0	0	0	0	4	4	2	2	6	6
จีน	1	1	0	0	8	5	12	8	21	14
ไดบุติ (Djibouti)	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
อียิปต์	0	0	0	0	0	0	14	6	14	6
อินโดนีเซีย	0	0	0	0	19	12	44	36	63	48
อิรัก	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
ประเทศไทย	0	0	17	12	5	2	2	2	24	16
ตุรกี	0	0	0	0	0	0	12	4	12	4
เวียดนาม	3	3	29	20	61	19	0	0	93	42
รวม	4	4	46	32	95	41	96	64	244	143

(WHO, 2006) (รายงานเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2006)

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกเป็น RNA ไวรัสชนิดสายเดี่ยว (single-stranded RNA virus) และยีนของเชื้อไวรัสมีลักษณะเป็นท่อน จำนวน 8 ท่อน ประกอบด้วย Polymerase Basic 2 (PB2), Polymerase Basic 1 (PB1), Polymerase acid (PA), Hemagglutinin (HA), Nucleocapsid protein (NP), Neuraminidase (NA), Matrix (M), Nonstructural protein (NS) โดยยีนเหล่านี้มีหน้าที่เป็นโครงสร้างและเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส รวมทั้งความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส (de Jong and Hien, 2006) จากลักษณะของยีนที่เป็นท่อนจึงทำให้เชื้อไวรัสสามารถเกิดกระบวนการที่เรียกว่า genetic reassortment หรือ genetic shift ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ใหม่ (Webster et al., 1997) นอกจากนี้แล้วธรรมชาติของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ซึ่งเป็น RNA ไวรัสจะมีการเปลี่ยนแปลงของตัวเชื้อไวรัสตลอดเวลาแบบค่อยเป็นค่อยไป หรือกระบวนการที่เรียกว่า genetic drift ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 ชนิดนี้อาจส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและลักษณะของเชื้อไวรัส ทำให้มีการระบาดอย่างรุนแรงและสร้างความเสียหายได้ในอนาคต ดังนั้นการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จะทำให้ทราบถึงข้อมูลรหัสพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ปีกที่พบในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำไปใช้อธิบายความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่อาจเกิดขึ้นได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน Hemagglutinin (H5) และ Neuraminidase (N1) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ในสัตว์ปีกที่พบในประเทศไทย

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาในเชิงพรรณนา (descriptive study) และมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่พบในประเทศไทย เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว การศึกษาค้นคว้านี้ได้ดำเนินการเป็น 3 ระยะคือ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างและตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1
2. หาลำดับเบสของยีน H5 และ N1
3. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์และการเปลี่ยนแปลงของยีน H5 และ N1

ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษาค้างนี้

1. ด้านองค์ความรู้ใหม่

- การศึกษาค้างนี้ได้ข้อมูลของรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ในสัตว์ปีกในประเทศไทย และสามารถนำรหัสพันธุกรรมไปเผยแพร่ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

2. ด้านการนำไปใช้ประโยชน์

- สามารถนำข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกไปใช้ในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในระดับอนุชีววิทยา เพื่อเป็นข้อมูลในการกำหนดแนวทางการควบคุมและป้องกันโรคได้
- สามารถนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกไปพัฒนาวิธีการในการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ สายพันธุ์อื่นๆ ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

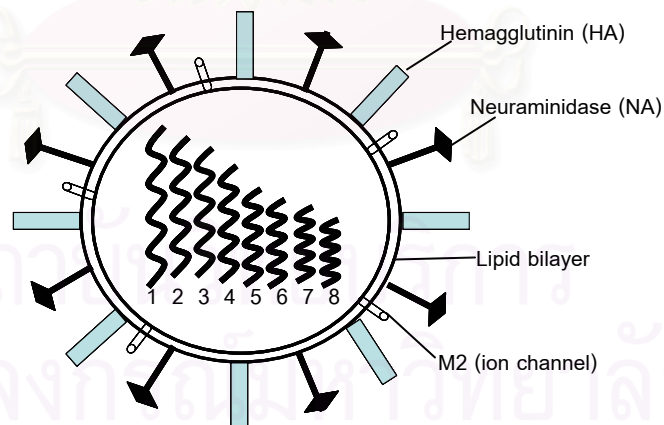
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกเป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ จัดอยู่ในตระกูล *Orthomyxoviridae* เป็น single-strand RNA virus มี envelope ห่อหุ้ม และมีส่วนของ glycoprotein ยื่นออกมาจาก envelope ได้แก่ hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) (รูปที่ 1) (De Jong et al., 2000) เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ สามารถแบ่งสายพันธุ์ตามยีน HA และ NA ได้เป็น 16 subtypes และ 9 subtypes ตามลำดับ (Fouchier et al., 2004)

RNA ของเชื้อไวรัสชนิดนี้มีลักษณะเป็นท่อนจำนวน 8 ยีน ซึ่งแตกต่างกันตามน้ำหนักโมเลกุล โดย RNA จำนวน 8 ยีนจะเป็นตัวกำหนดการสร้างโปรตีน 10 ชนิด โดยโครงสร้างของเชื้อไวรัสสามารถแบ่งได้บริเวณเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัสซึ่งจะมีโปรตีน HA, NA, และ M2 และบริเวณส่วนแกนกลางของไวรัสประกอบด้วยกลุ่มของ Ribonucleoprotein (RNP) complex ได้แก่ RNA, Nucleoprotein (NP) และ polymerase protein (PB2, PB1, PA) โดย RNP complex จะถูกล้อมรอบด้วยโปรตีน M1 ซึ่งทำหน้าที่เป็น membrane protein นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเชื้อ (non-structural protein) ได้แก่ NS1 และ NS2 (Easterday et al., 1997) รายละเอียดชนิดและหน้าที่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 2



รูปที่ 1 ลักษณะและโครงสร้างของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่มี envelope ห่อหุ้ม และที่ผิวด้านนอก

ประกอบด้วย hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) glycoprotein และ M2 protein ส่วนภายใน envelope จะบรรจุ single-strand RNA จำนวน 8 ท่อน โดยจะมีความยาวของสาย nucleotide ประมาณ 890-2341 bp (หมายเลข 1-8 แสดงถึงยีน PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M และ NS ตามลำดับ)

ตารางที่ 2 ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

ลำดับท่อนของ ยีน	ยีนที่กำหนดการสร้าง โปรตีน	จำนวนนิวคลีโอไทด์ (bp)	หน้าที่
1	PB2	2,341	Host-cell RNA cap binding : Component of RNA transcriptase
2	PB1	2,341	Component of RNA transcriptase
3	PA	2,233	Component of RNA transcriptase
4	HA	1,778	Surface glycoprotein: attaches to cell surface sialic receptors
5	NP	1,565	Structural component of RNA transcriptase
6	NA	1,413	Surface glycoprotein : neuraminidase activity
7	M1	1,027	Membrane protein
	M2		Ion channel
8	NS1	890	TNF α -response
	NS2		

(ดัดแปลงจาก Lamp and Choppin, 1983)

2. พยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่รุนแรงต่ำ (Low pathogenic avian influenza; LPAI) โดยสัตว์ที่ได้รับเชื้อ LPAI จะมีอาการของระบบทางเดินหายใจที่ไม่รุนแรงหรือไม่แสดงอาการเลย อีกชนิดหนึ่งคือ เชื้อที่มีความรุนแรงสูง (Highly pathogenic avian influenza; HPAI) ซึ่งมักพบในสายพันธุ์ H5 และ H7 subtypes (OIE, 2005b) เชื้อไวรัสชนิด HPAI ทำให้เกิดอาการที่รุนแรงในสัตว์ปีกโดยจะพบอาการของระบบทางเดินหายใจ อาการทางระบบประสาท บวม น้ำที่บริเวณหัว ท้องเสีย และมีอัตราการตายเกือบ 100 % (Easterday et al., 1997)

โปรตีน HA ซึ่งอยู่บนผิวของเชื้อไวรัส มีส่วนสำคัญต่อคุณสมบัติของเชื้อไวรัสในการติดเชื้อและการเข้าสู่เซลล์โฮสต์ โดยทั่วไปโปรตีน HA จะถูกตัดย่อยออกเป็น 2 subunits ได้แก่ HA1 และ HA2 ตรงตำแหน่งของ cleavage site โดยอาศัยเอนไซม์ protease จากตัวสัตว์ จากนั้นโปรตีนจะไปจับบน sialo-oligosaccharides ที่เป็น receptor อยู่บนผิวของเซลล์โฮสต์ แล้วเชื้อไวรัสจะเข้าสู่เซลล์โดยวิธี endocytosis และเริ่มมีการสร้างและเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส (Hughes et al., 2001)

โปรตีน NA เป็นโปรตีนบนผิวของเชื้อไวรัสเช่นกัน โดยโปรตีน neuraminidase มีหน้าที่ทำให้ส่วนของ terminal sialic acid residue บนโฮสต์เซลล์แยกออก และมีการปล่อยเชื้อไวรัสออกมาจากภายในเซลล์ (Hughes et al., 2001) รวมทั้งป้องกันไม่ให้ตัวเชื้อไวรัสจับกันเป็นกลุ่มอยู่ภายในเซลล์ (Gubareva, 2004) นอกจากนี้โปรตีน neuraminidase ยังมีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจ (epithelial cell) ของเชื้อไวรัสได้เช่นกัน (Lamp and Choppin, 1983)

3. การติดเชื้อไวรัสในสัตว์

โรคไข้หวัดนกที่เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 สามารถพบได้ในสัตว์ปีกหลายชนิด เช่น นกป่า ไก่ ไก่วง เป็ด นกกระทา (de Jong and Hien, 2005; Ligon, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด เช่น เสือ (Amonsin et al., 2006; Thanawongnuwech et al., 2005), เสือดาว (leopard) (Keawcharoen et al., 2004) แมว (Songserm et al., 2006) และยังพบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ในสัตว์ทดลอง เช่น หนูขาว (mice) (Gubareva et al., 1998; Gao et al., 1999), เฟอเรต (ferret) (Zitzow et al., 2002) และลิง (Kuiken et al., 2003)

4. คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

4.1 คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน HA

โปรตีน HA เป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวของเชื้อไวรัสและมีหน้าที่ทำให้เชื้อไวรัสจับบนผิวของเซลล์โฮสต์ โดยโปรตีน HA จะถูกกำหนด (encode) ด้วยยีน HA โดยทั่วไปยีน HA มีตำแหน่งที่สำคัญ 3 ตำแหน่งซึ่งสามารถใช้บ่งบอกถึงความรุนแรงและความสามารถในการติดเชื้อของเชื้อไวรัสในโฮสต์ชนิดต่างๆ คือ HA cleavage site, receptor binding site และ N-link glycosylation site

4.1.1 HA cleavage site

บริเวณ cleavage site อยู่ระหว่าง HA1 และ HA2 ของยีน HA และมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการติดเชื้อของเชื้อไวรัส โดยพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดที่ก่อโรครุนแรงจะมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบเบสหลายตัว (multiple basic amino acids) เนื่องจากลำดับของกรดอะมิโนลักษณะนี้จะถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์ที่เรียกว่า subtilisin-like proteases ซึ่งพบได้ทั่วไปในเซลล์ของร่างกายโฮสต์ ส่งผลให้เชื้อสามารถเข้าสู่อวัยวะต่างๆ และเกิดการติดเชื้อได้ทั่วร่างกาย (Steinhauer, 1999)

HA cleavage site ที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ multiple basic amino acids ใช้เป็นลักษณะที่ใช้ในการนิยาม (definition) ชนิดของเชื้อที่มีความรุนแรงสูง (Highly Pathogenic Avian Influenza virus) (OIE, 2005b) ซึ่งสามารถพบการเรียงตัวของ กรดอะมิโนชนิด arginine (R) และ lysine (K) ระหว่าง HA1และ HA2 connecting peptide จำนวน 3-5 ตัว (Steinhauer, 1999)

รายงานการศึกษาของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในปี 1996 ที่พบในห่านจาก มณฑลกวางตุ้ง ประเทศจีน (A/Goose/Guangdong/96)¹ พบว่า HA cleavage site มีลักษณะ ของ multiple basic amino acids และมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับยีน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ที่แยกจากการระบาดในคนที่ประเทศฮ่องกงในปี 1997 (A/HongKong/ 156/97)¹ (Xu et al., 1999) และรายงานการระบาดในปี 1997 ที่ประเทศฮ่องกงพบว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จาก ผู้ป่วยและสัตว์ปีกที่ติดเชื้อมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน และพบ multiple basic amino acids บนยีน HA นอกจากนี้การระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในปี 2001 ที่ประเทศฮ่องกงก็พบ การเรียงตัวของลำดับของกรดอะมิโนแบบ multiple basic amino acid เช่นเดียวกัน (Guan et al., 2002)

Viseshakul และคณะ (2004) ได้ศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ที่แยกได้จากไก่ในจังหวัด นครปฐม (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04)¹ พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยก ได้ในประเทศไทยเป็น HPAI ที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ multiple basic amino acids ที่ HA cleavage site และเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้ในประเทศไทย (CU-K2) มีลักษณะทาง พันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้ในประเทศจีน A/Duck/China/E319-2/03¹

4.1.2 Receptor binding site

โปรตีน HA ประกอบด้วย receptor binding site ซึ่งอยู่บน HA globular head และ ทำหน้าที่เกี่ยวกับความสามารถในการติดเชื้อของไวรัสไปยังโฮสต์ชนิดต่างๆ โดยปกติเชื้อไวรัส จะอาศัยส่วน HA glycoprotein ไปจับกับ sialic acid receptor ที่อยู่บนเซลล์เป้าหมาย เชื้อ ไวรัสไข้หวัดในคน (H1, H2 และ H3 subtypes) จะจับกับ α 2-6-linked sialic acid ซึ่งพบได้ ในเซลล์ของระบบทางเดินหายใจในคน แต่เชื้อไวรัสไข้หวัดในสัตว์ปีกนั้น (H5 และ H7) จะจับ กับ α 2-3 linked sialic acid ที่พบในสัตว์ปีก (Gambaryan et al., 2006) อย่างไรก็ตามการ ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ที่ประเทศฮ่องกงในปี 1997 นั้นมีรายงานว่าเชื้อไวรัสที่มีลักษณะ

¹ type / animal / place of isolation / sequential number / year of isolation

ของ receptor binding site เหมือนกับในสัตว์ปีกก็สามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้เช่นกัน (Matrosovich et al., 1999)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อไวรัสที่พบกรดอะมิโน glutamine (Gln) แทนที่กรดอะมิโน leucine (L) ที่ตำแหน่ง 222 ซึ่งเป็นบริเวณ receptor binding pocket (H5 numbering)(ตำแหน่งที่ 226 ใน H3 numbering) ส่งผลให้เชื้อไวรัสก่อโรคทั้งในสัตว์ปีกและคน เช่นกัน (Vines et al., 1998; Suzuki, 2005)

4.1.3 Glycosylation sites

ตำแหน่งของ glycosylation site บนยีน HA ประกอบด้วยสายของคาร์โบไฮเดรตแล้ว เชื่อมต่อด้วยพันธะ N-glycosidic linkage (Lamb and Choppin, 1983) และตำแหน่งของ glycosylation site บนยีน HA สามารถพบได้ 5-11 แห่ง ขึ้นกับสเตรนของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า (Bright et al., 2003) รายงานของ Amonsin และคณะ (2006) สามารถแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ได้จากเลือด และพบ glycosylation site บนยีน HA เป็นจำนวนอย่างน้อย 7 แห่ง ได้แก่ กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 10-12 (N-N-S), 11-13 (N-S-T), 23-25 (N-V-T), 154-156 (N-S-T), 165-167 (N-S-T), 193-195 (N-P-T), 286-288 (N-S-S)

ทั้งนี้มียางานการพบกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ตำแหน่ง 154-156 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงสูง โดยเฉพาะในเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากสัตว์ปีกและคน พบว่า ตำแหน่ง glycosylation site ที่ตำแหน่ง 154-156 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใกล้กับ receptor binding pocket จะมีผลต่อการเกาะจับของเชื้อไวรัสและอาจมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อไวรัส (Matrosovich et al., 1999; Hulse et al., 2004)

4.2 คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NA

โปรตีน NA เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่อยู่บนผิวของไวรัส ซึ่งมีเอนไซม์ neuraminidase ทำหน้าที่ในการปล่อยเชื้อไวรัสออกจากเซลล์ โดยโปรตีน NA จะถูกกำหนดโดยยีน NA ทั้งนี้มีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน NA ที่บริเวณ NA stalk region จะมีผลในด้านการปรับตัวและวิวัฒนาการของไวรัส และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ NA active site จะมีผลทำให้เชื้อไวรัสติดต่อยาต้านไวรัส

4.2.1 NA stalk region

โปรตีน NA มีรูปร่างคล้ายเห็ด (mushrooms) ซึ่งประกอบด้วยส่วน head และ stalk region (Lamb and Choppin, 1983) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน stalk region ของยีน NA ส่งผลให้ไวรัสมีการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมใหม่และมีคุณสมบัติที่ทำให้ไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อไปยังสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆได้ (Bender et al., 1999; Suzuki, 2005)

นอกจากนี้มีการศึกษาในเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ สายพันธุ์ H1N1 ที่แยกได้จากไขไก่ พบว่าความยาวของ NA stalk region สัมพันธ์กับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส ถ้า stalk มีความยาวมากก็จะทำให้เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนได้ดี และจากการทดลองในหนู mice ถ้าไม่มีส่วนของ stalk เลยก็จะพบว่าเชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนได้น้อยลงและจะมีความรุนแรงที่ลดลงมาก (Castrucci and Kawaoka, 1993)

รายงานการศึกษาของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ในปี 1996 ที่แยกได้จากน่านในมณฑล กวางตุ้ง ประเทศจีน (A/Goose/Guangdong/96)¹ พบว่าส่วนของยีน NA มีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส A/Parrot/Ulster/73¹ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน stalk region (Xu et al., 1999) และในรายงานการระบาดในปี 1997 ที่ประเทศฮ่องกง พบการลดจำนวนของกรดอะมิโนจำนวน 19 ตัว (19-amino acid deletion) บน stalk region ของยีน NA (Subbarao et al., 1998) และ แตกต่างจากการระบาดในปี 2001 ซึ่งพบการลดจำนวนของกรดอะมิโนจำนวน 20 ตัว (20-amino acid deletion) บน stalk region (Guan et al., 2002)

รายงานการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ที่แยกได้จากการระบาดเมื่อต้นปี 2004 จากไก่ในประเทศไทย (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04)¹ พบ 20-amino acid deletion บน stalk region ของยีน NA ซึ่งคล้ายกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศฮ่องกงในปี 2001 (Guan et al., 2002) และเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศเวียดนามในปี 2004 (Nguyen et al., 2005)

¹ type / animal / place of isolation / sequential number / year of isolation

4.2.2 NA active site

การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณ NA active site มีผลทำให้เชื้อไวรัสติดต่อด้านไวรัส oseltamivir ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนเหล่านั้น ได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 119 (Glu 119 Val), 292 (Arg292Lys), 294 (Asn294Ser) และ 275 (His275Tyr) (N1 numbering) (Brown, 2000; McKimm-Breschkin et al., 2001; Kiso et al., 2004) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนอาจมีผลทำให้โครงสร้างของ neuraminidase เปลี่ยน ดังนั้นยา oseltamivir ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ neuraminidase ไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้เชื้อไวรัสติดต่อด้านไวรัส

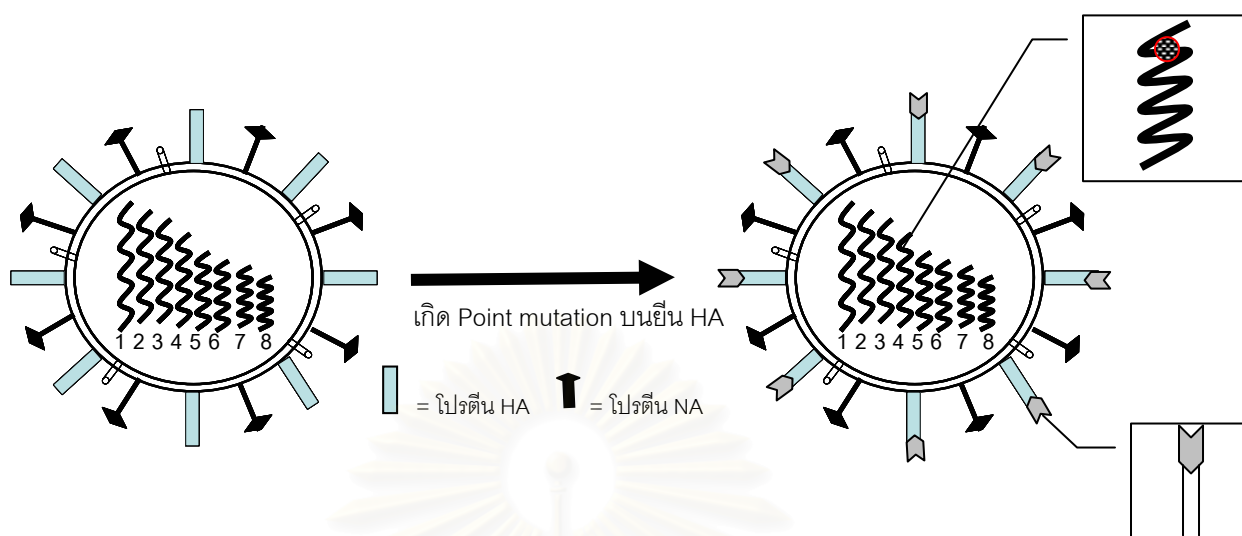
5. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงและกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกรวมทั้งเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ ที่เกิดขึ้นนั้นเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการเป็นเชื้อไวรัสชนิด RNA ของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า ซึ่งกระบวนการสร้างเชื้อไวรัสสามารถเกิดความผิดพลาดได้สูงทำให้เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่าเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (antigenic variation) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวจะไปมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายผู้ที่ติดเชื้อ ทั้งนี้สามารถแบ่งลักษณะของ antigenic variation ออกได้เป็น 2 ชนิดคือ antigenic drift และ antigenic shift

Antigenic drift

Antigenic drift เป็นกระบวนการที่มีการเปลี่ยนแปลงในบางจุดของยีน (point mutation) และการเปลี่ยนแปลงนี้จะค่อยๆ เกิดอย่างต่อเนื่อง (Brown, 2000) โดยการเปลี่ยนแปลงเกิดจากความผิดพลาดในขั้นตอนการสร้าง viral RNA เนื่องจากการสร้าง RNA ของเชื้อไวรัสนี้ขาดกระบวนการ การตรวจสอบความถูกต้องของ nucleotide ที่นำมาใช้ในการสร้างสาย RNA (proofreading) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัส (Wilschut and McElhaney, 2005)

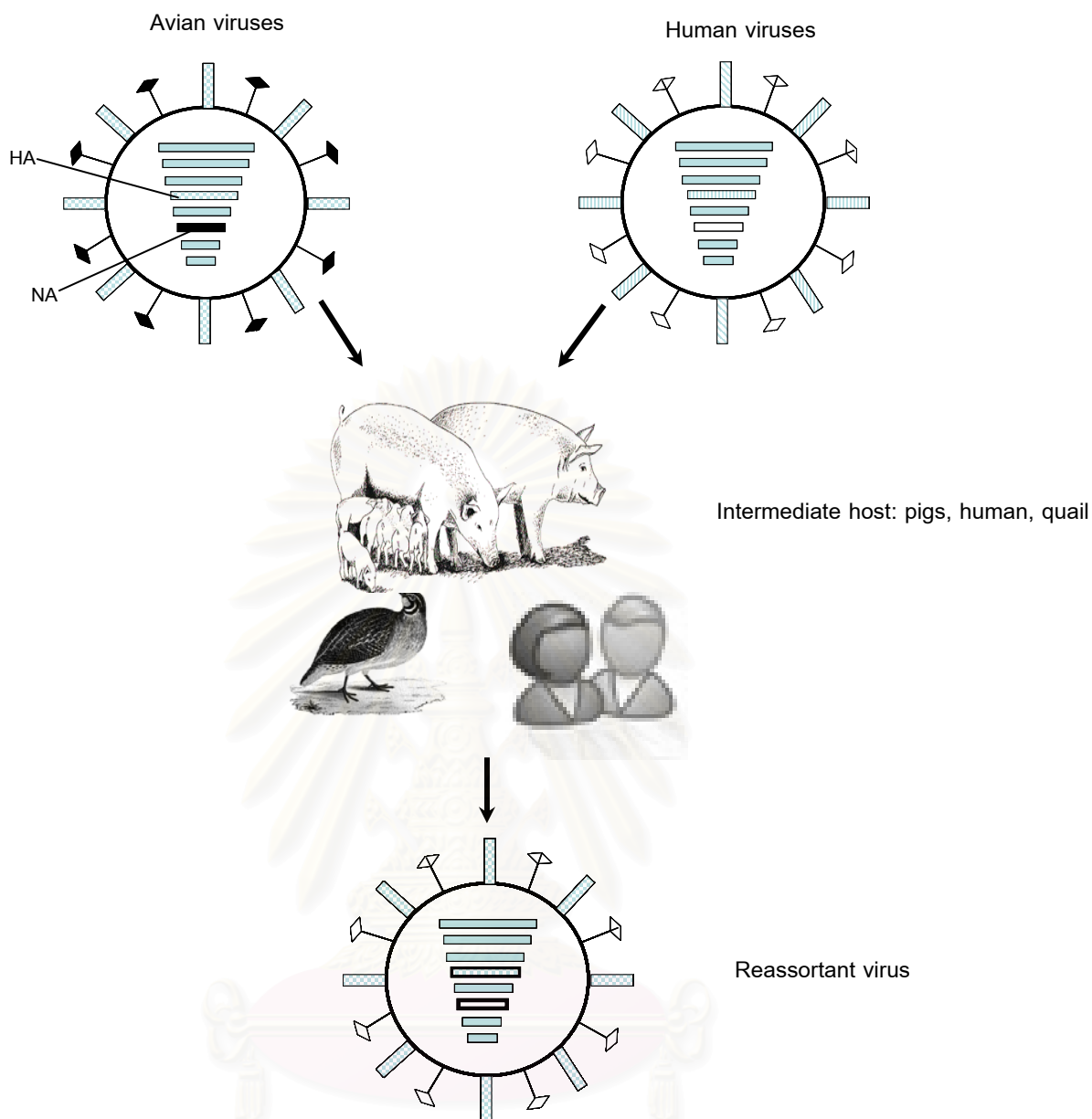
การเปลี่ยนแปลงบางจุดบนยีน HA (antigenic drift) จะมีผลต่อโครงสร้าง antigenic epitope บนผิวโปรตีน HA ซึ่งเป็น surface glycoprotein และเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้โฮสต์ที่ติดเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงบนยีน HA ไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาต้านเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ได้อย่างสมบูรณ์ รวมทั้งยังมีผลต่อความสามารถในการคุ้มโรคของวัคซีนหรือการเลือกใช้วัคซีน (De jong et al., 2000) ตัวอย่างการเกิด antigenic drift ของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การเกิด antigenic drift ของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ บนเยื่อ HA ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการสร้างโปรตีน HA

Antigenic shift

Antigenic shift เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้เกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ชนิดใหม่ เป็นผลมาจากการแลกเปลี่ยนท่อนยีนระหว่างเชื้อไวรัส 2 ชนิดที่ติดเชื้อในเซลล์เดียวกัน (genetic reassortment) และทำให้เกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้ ส่งผลให้คุณสมบัติของเชื้อไวรัสเปลี่ยนและอาจกลายเป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรครุนแรงขึ้น เนื่องจากผู้ที่ได้รับเชื้อมันยังไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อ subtype ใหม่ที่เกิดขึ้น ดังเช่นเหตุการณ์ในปี 1957 และ 1968 ซึ่งเป็นการระบาดครั้งรุนแรงของเชื้อไวรัสไข้หวัด H2N2 และ H3N2 โดยพบว่าเชื้อไวรัสที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการเกิด genetic reassortment ระหว่างเชื้อไวรัสที่พบในสัตว์ปีกและเชื้อไวรัสที่พบในคน โดยอาศัยโฮสต์ตัวกลาง เช่น สุกร ซึ่งสามารถติดเชื้อไวรัสได้ทั้งเชื้อไวรัสในคนและในสัตว์ปีก ส่งผลให้เกิดเชื้อไวรัสชนิดใหม่และเกิดการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ต่อไป (Brown., 2000; Wilschut and McElhaney., 2005) ตัวอย่างการเกิด antigenic shift ของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การเกิด antigenic shift ของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ ซึ่งเป็นผลจาก genetic reassortment ของยีน HA และ NA โดยอาศัยโฮสต์กึ่งกลาง เช่น สุกร คน นกกระทา ซึ่งสามารถติดเชื้อไวรัสที่มาจากสัตว์ปีกและคนได้ ส่งผลให้เกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

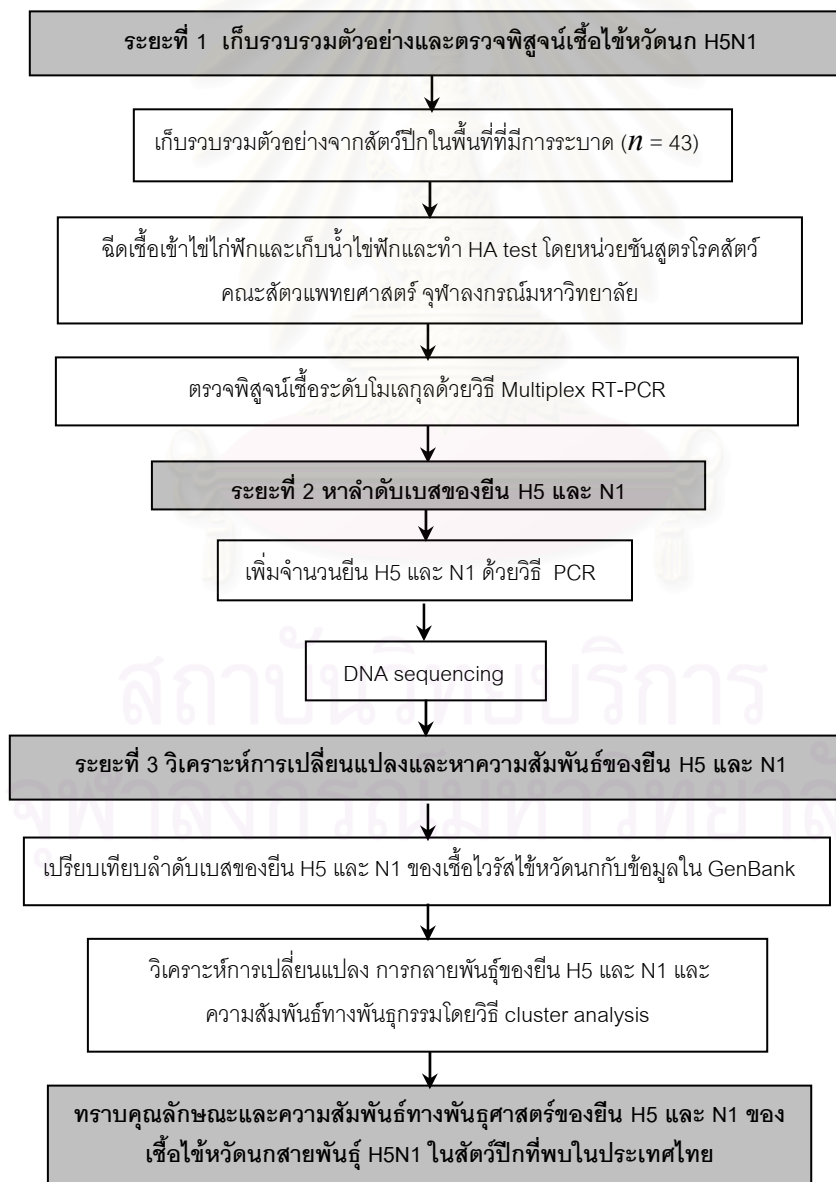
การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในประเทศไทย เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว การศึกษาดังนี้จึงแบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ

ระยะที่ 1 เก็บรวบรวมตัวอย่างและตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก

ระยะที่ 2 หาลำดับเบสของยีน H5 และ N1

ระยะที่ 3 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและหาความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1

แผนภูมิวิธีการดำเนินการวิจัยแสดงไว้ในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงวิธีการดำเนินการวิจัย

ระยะที่ 1 เก็บรวบรวมตัวอย่างและตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก

1.1 การเก็บรวบรวมและเตรียมตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

เก็บและรวบรวมตัวอย่างน้ำจากไข่ฟัก (allantoic fluid) จากหน่วยชั้นสุตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยหน่วยชั้นสุตรฯ ได้เก็บตัวอย่างสัตว์ปีกชนิดต่างๆ ด้วยวิธีการป้ายเก็บช่องทวารร่วม (cloacal swab) และ/หรือสิ่งคัดหลั่งจากหลอดลม (tracheal swab) หรืออวัยวะภายในจากซากสัตว์ปีก

แยกเชื้อไวรัสโดยการฉีดตัวอย่างเข้าไข่ฟักที่มีอายุประมาณ 9 -12 วัน จำนวน 2 ฟองต่อ 1 ตัวอย่าง และส่องไข่ฟักทุก 24 ชม. เพื่อดูการตายของตัวอ่อน และเก็บน้ำไข่ฟักจากไข่ฟักที่ตายภายใน 24-72 ชม. หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทั้งหมดภายใน 7 วันหลังการฉีดเชื้อ แล้วทำให้เชื้อไวรัสตายโดยการให้ความร้อนด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 56 ° ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (OIE, 2005) จากนั้นทดสอบทางซีรั่มวิทยาด้วยวิธี Hemagglutination (HA) test และเก็บรักษาน้ำไข่ฟักไว้ที่อุณหภูมิ - 20° ซ จนกว่าจะนำไปแยกสกัด RNA เพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกในระดับโมเลกุลต่อไป โดยเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ได้มาจากสัตว์ปีกชนิดต่างๆ ซึ่งพบได้ในพื้นที่ที่มีการระบาดในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 43 ตัวอย่าง

1.2 การสกัด RNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

นำน้ำไข่ฟักที่ให้ผลบวกต่อการแยกเชื้อไวรัสไปสกัดแยก RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Rneasy mini kit® (Qiagen, Hilden, Germany) โดยอาศัยหลักการแยก RNA ด้วยแผ่น silica gel membrane และได้ RNA ที่ปราศจากการปนเปื้อนของโปรตีน, nuclease, ribonuclease (RNases) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายไม่น้อยกว่า 1 µg ในปริมาตรรวม 60 µl (วิธีการแยกสกัด RNA ได้แสดงไว้ในภาคผนวก)

1.3 การเตรียม cDNA จากตัวอย่างเชื้อไวรัส

สังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription ในปริมาตรทั้งหมด 20 µl เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสด้วยวิธี multiplex RT-PCR ขั้นตอนการเตรียม cDNA ทำได้โดยเตรียมส่วนผสม RNA และ random primers ดังต่อไปนี้

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
RNA	4 µl	>1 µg
0.5µg Random primers	1 µl	0.1 µg
ปริมาตรรวม	5 µl	

จากนั้นนำสารละลายไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler ที่ 70°C เป็นเวลา 5 นาที และ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดการจับกันระหว่าง RNA เป้าหมาย และ random primers หลังจากนั้นเตรียมส่วนผสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase ในการสร้าง cDNA จาก RNA

	<u>ปริมาตร</u>	<u>ความเข้มข้นสุดท้าย</u>
Improm-II TM 5x Reaction buffer	4 μl	1x
25 mM MgCl_2	2 μl	2.5 mM
5 mM dNTPs	2 μl	0.5 mM
Recombinant RNAsin [®] Ribonuclease Inhibitor	0.3 μl	40U/ μl
Improm-II TM Reverse transcriptase	1 μl	
Nuclease free water	<u>5.7</u> μl	
ปริมาตรรวม	15 μl	

นำส่วนผสมระหว่าง RNA กับ random primer ที่เตรียมไว้ข้างต้นผสมรวมกับส่วนผสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA และนำไปใส่เครื่อง Thermal cycler ที่ 25°C เป็นเวลา 5 นาที และ 42°C เป็นเวลา 60 นาที และ 70°C เป็นเวลา 15 นาที นำ cDNA ที่เตรียมได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

1.4 การตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสด้วยวิธี multiplex RT-PCR

นำ cDNA ต้นแบบมาตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสด้วยวิธี multiplex RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจหายีนจำนวน 3 ยีนคือ M H5 และ N1 ในเวลาเดียวกัน โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 μl ดังนี้

	<u>ปริมาตร</u>	<u>ความเข้มข้นสุดท้าย</u>
cDNA	1 μl	
10 μM ของ primers แต่ละตัว*	1.5 μl	0.5 μM
25 mM MgCl_2	1 μl	1 mM
2.5 x Eppendorf MasterMix	10 μl	1x
Nuclease free water	<u>11.5</u> μl	
ปริมาตรรวม	25 μl	

* primers จำเพาะต่อยีน M H5 และ N1

จากนั้นนำส่วนผสมไปเพิ่มจำนวน ในเครื่อง Thermal cycler โดยการทดลองแต่ละครั้งจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) และใช้ cDNA ที่ได้จากตัวอย่าง A/Chicken/Thailand/CU-K2/04 เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ภายใต้ PCR-condition ดังต่อไปนี้

1.	Initial denaturation	94 ^o ซ	3 นาที
2.	Denaturation	94 ^o ซ	30 วินาที
	Annealing	55 ^o ซ	30 วินาที
	Extension	72 ^o ซ	30 วินาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 40 รอบ		
3.	Final extension	72 ^o ซ	7 นาที
	Holding temperature	25 ^o ซ	

1.5 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วย Agarose gel electrophoresis

เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 2 % ใน 1x Tris borate-EDTA จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 10 µl ผสมกับ 0.2% Orange G loading dye ใน 50 % glycerol (Carlo Ebra Reagent[®]) ปริมาตร 2 µl และแยก DNA บนแผ่นเจลด้วยโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30-45 นาที จากนั้นย้อม DNA บนแผ่นเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 10 mg/ml และนำไปตรวจสอบขนาด PCR product ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

1.6 การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก ด้วยวิธี multiplex-RT PCR

การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก ด้วยวิธี multiplex RT-PCR จะให้ผลการตรวจหา ยีน M H5 และ N1 เท่ากับ 276, 189 และ 131 bp ตามลำดับ และผลที่อาจพบได้ คือ

- ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จะให้ผลบวกต่อ ยีนทั้ง 3 ยีนคือ M H5 และ N1
- ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ และไม่ใช่อายพันธุ์ H5N1 จะให้ผลบวกต่อ ยีน M ถ้าเชื้อไวรัสเป็น H5 subtype แต่เป็น NA subtype อื่นๆ จะให้ผลบวกเฉพาะ ยีน M และ H5 และถ้าเชื้อไวรัสเป็น N1 subtype แต่เป็น HA subtype อื่นๆ จะให้ผลบวกเฉพาะ ยีน M และ N1
- ตัวอย่างที่ไม่ใช่เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ จะไม่ให้ผลบวกต่อ ยีนทั้ง 3 ยีนคือ M H5 และ N1 (ไม่ปรากฏ band ของ PCR product)

รายละเอียดการแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยใช้วิธี multiplex RT-PCR ได้แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยวิธี Multiplex RT-PCR

ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัส	ยีน		
	M	H5	N1
เชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1	+	+	+
เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ (ไม่ใช่ H5N1)	+	-	-
เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ เฉพาะ H5 subtype	+	+	-
เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ เฉพาะ N1 subtype	+	-	+
ไม่พบเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ รวมทั้งเชื้อไข้หวัดนก H5N1	-	-	-

เครื่องหมาย + หมายถึง ผลบวกของ PCR product ที่มีขนาดจำเพาะต่อยีน H5 N1 M

ระยะที่ 2 หาลำดับเบสของยีน H5 และ N1

เมื่อตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสแล้วพบว่าตัวอย่างให้ผลบวกต่อยีน M H5 N1 ในปฏิกิริยา multiplex RT-PCR จึงนำ cDNA นั้นมาหาลำดับเบส โดยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

2.1 การเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ทำการเตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ในปริมาตรทั้งหมด 50 μ l ประกอบด้วย

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
cDNA	2 μ l	
10 μ M Forward primer	1 μ l	0.2 μ M
10 μ M Reverse primer	1 μ l	0.2 μ M
25 mM MgCl ₂	2 μ l	1 mM
2.5 x Eppendorf MasterMix	20 μ l	1x
Nuclease free water	24 μ l	
ปริมาตรรวม	50 μ l	

นำส่วนผสมไปเพิ่มจำนวนโดยใช้เครื่อง Thermal cycler ภายใต้ PCR-condition และการทดลองแต่ละครั้งจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ (negative control)

PCR-condition สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน H5

1.	Initial denaturation	94 ^o ซ	3 นาที
2.	Denaturation	94 ^o ซ	30 วินาที
	Annealing	50 ^o ซ	30 วินาที
	Extension	72 ^o ซ	1.3 นาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 40 รอบ		
3.	Final extension	72 ^o ซ	7 นาที
	Holding temperature	25 ^o ซ	

PCR-condition สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน N1

1.	Initial denaturation	94 ^o ซ	3 นาที
2.	Denaturation	94 ^o ซ	30 วินาที
	Annealing	55 ^o ซ	30 วินาที
	Extension	72 ^o ซ	1.3 นาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 40 รอบ		
3.	Final extension	72 ^o ซ	7 นาที
	Holding temperature	25 ^o ซ	

2.2 การสกัด DNA บริสุทธิ์และหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1

2.2.1 นำ PCR product ไปตรวจสอบขนาดและความจำเพาะด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการตัด agarose gel ในส่วนที่มี PCR product

2.2.2 ทำการสกัด DNA ออกจากแผ่นเจลโดยใช้ชุด Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Hamburg, Germany) ซึ่งอาศัยแผ่น glass fiber membrane ในการแยก DNA ออกจากสารอินทรีย์ต่างๆที่ปนอยู่ใน DNA เพื่อให้ได้ DNA บริสุทธิ์ปริมาตร 35 µl สำหรับใช้ในการหาลำดับเบส

2.2.3 นำตัวอย่าง DNA มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 ng/µl ปริมาตร 20 µl พร้อมกับส่ง forward และ reverse primers ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 µM อย่างละ 10 µl นำไปหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1 ด้วยวิธี Dideoxy Chain Termination ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสดัดแปลง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ/หรือบริษัท macrogen เมืองโซล ประเทศเกาหลีใต้

2.2.4 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับเบสด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยข้อมูลจะอยู่ในรูปของกราฟ Chromatogram (ABI file) และลำดับเบส (Text file) และนำมาตรวจสอบความถูกต้อง

และประกอบลำดับเบส (assembly) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Chromas version 1.45 และ Bioedit version 7.0.0 ตามลำดับ

ระยะที่ 3 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและหาความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1

3.1 เมื่อตรวจสอบความถูกต้องและประกอบลำดับเบสแล้ว จะได้ลำดับเบสของยีน H5 (~1700 bp) และยีน N1 (~1400 bp) จึงนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน H5 และ N1 ของตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานการระบาดในประเทศไทยและรายงานจากประเทศในทวีปเอเชีย ยุโรป ซึ่งข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกมาจากรฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.2 หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 โดยหาความสัมพันธ์ในรูปของ phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining และ bootstrap analysis (1,000 replications) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Mega 3.1 และอ่านผลในรูปความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ใช้ในการศึกษาจาก phylogenetic tree

3.2 หาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 และ N1 โดยเลือกตัวแทนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ปีกที่แยกได้จากพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 8 ตัวอย่าง รวมทั้งเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 และ N1 จากเชื้อไข้หวัดนกในไก่จำนวน 8 ตัวอย่างด้วยวิธี pair-wise comparison และแสดงผลในรูปเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0.0

3.3 เปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจำนวน 43 ตัวอย่าง ร่วมกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่มีรายงานในประเทศไทย ประเทศในทวีปเอเชีย และยุโรป เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งต่างๆของยีน H5 และ N1 ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

Mega 3.1

3.3.1 ยีน H5 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่บริเวณ 3 ตำแหน่ง คือ

- HA cleavage site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 320-330
- receptor binding site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 222-224
- glycosylation site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 154-156

3.3.2 ยีน N1 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่บริเวณ 2 ตำแหน่ง คือ

- NA stalk region ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 49 - 68
- NA active sites ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 119 , 293, 295 และ 275

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA

- 1.1 2,3-dideoxynucleoside triphosphate (dNTPS), 5mM (Fermentas[®], USA)
- 1.2 Improm-II[™] 5x Reaction buffer (Promega, Madison, WI, USA)
- 1.3 Improm-II[™] Reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)
- 1.4 MgCl₂, 25 mM (Promega, Madison, WI, USA)
- 1.5 Random primers, 0.5 µg (Promega, Madison, WI, USA)
- 1.6 Rneasy mini kit[®] (Qiagen, Hilden, Germany)
- 1.7 Recombinant RNAsin[®] Ribonuclease Inhibitor, 40 u/µl
(Promega, Madison, WI, USA)
- 1.8 Ultrapure[™] Distilled water DNase, RNase free (GIBCO[®], USA)

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสและหาลำดับเบสของยีน

- 2.1 Agarose gel powder
- 2.2 Ethidium Bromide 10 mg/ml (Sigma Aldrich Inc., USA)
- 2.3 GeneRuler[™] 100 bp DNA ladder (Fermentas[®], USA)
- 2.4 2.5x Master Mix (Eppendorf[®], Hamburg, Germany)
- 2.5 Mg²⁺ solution, 25 mM (Eppendorf[®], Hamburg, Germany)
- 2.6 0.2% Orange G loading dye ใน 50 % glycerol (Carlo Ebra Reagent[®])
- 2.7 Perfectprep Gel Cleanup kit[®] (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- 2.8 40x Tris-boric acid – EDTA (TBE) powder (Bio Basic Inc.[®], USA)
- 2.9 Ultra Pure[™] Distilled water DNase, RNase (GIBCO[®], USA)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 3.1 หลอดพลาสติกสำหรับทำ PCR ขนาด 0.2 ml. (Axygen Scientific[®], CA, USA)
- 3.2 หลอดพลาสติก (eppendorf tubes) ขนาด 1.5 ml
- 3.3 ไมโครปิเปต ขนาด 0.5-2, 2-20, 20-200 และ 100-1000 µl (Gilson[®], France)
- 3.4 ไมโครปิเปตทิป ขนาด 2, 200 และ 1000 µl
- 3.5 อุปกรณ์เครื่องแก้ววิทยาศาสตร์

4. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- 4.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermocycler) (Thermoelectron corporation[®], USA)
- 4.2 เครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis system) (OWL Scientific Inc.[®], USA)
- 4.3 เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat[®])
- 4.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Denville Scientific Inc.[®], USA)
- 4.5 ตู้แช่แข็ง -20°C
- 4.6 เครื่องซังทศนิยม 2 ตำแหน่ง

5. นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ (primers) ที่ใช้ในงานวิจัย

นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์สำหรับการศึกษานี้จะแบ่งออกเป็น 3 ชุด ได้แก่

5.1 Random Hexamers ซึ่งเป็น random primers ความยาว 6 bp เพื่อใช้ในการเกาะจับกับ RNA สำหรับสังเคราะห์ cDNA

5.2 Primers สำหรับการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก ด้วยวิธี multiplex RT-PCR ออกแบบโดยอาศัยข้อมูลจาก Payungporn และคณะ (2004) รายละเอียดของลำดับเบส และขนาดของ PCR product แสดงไว้ในตารางที่ 4

5.3 Primers สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 เพื่อใช้ในการหาลำดับเบส (DNA sequencing) เป็น primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน H5 และ N1 primers ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 5 คู่ โดยยีน H5 ประกอบด้วย primers จำนวน 3 คู่และยีน N1 ประกอบด้วย primers จำนวน 2 คู่ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะมีขนาด 500- 800 bp เพื่อให้เหมาะสมต่อการหาลำดับเบส รายละเอียดของตำแหน่งของ primer ที่จับบนยีน H5 และ N1 และลำดับเบสของ primers แสดงดังรูปที่ 5 และตารางที่ 5

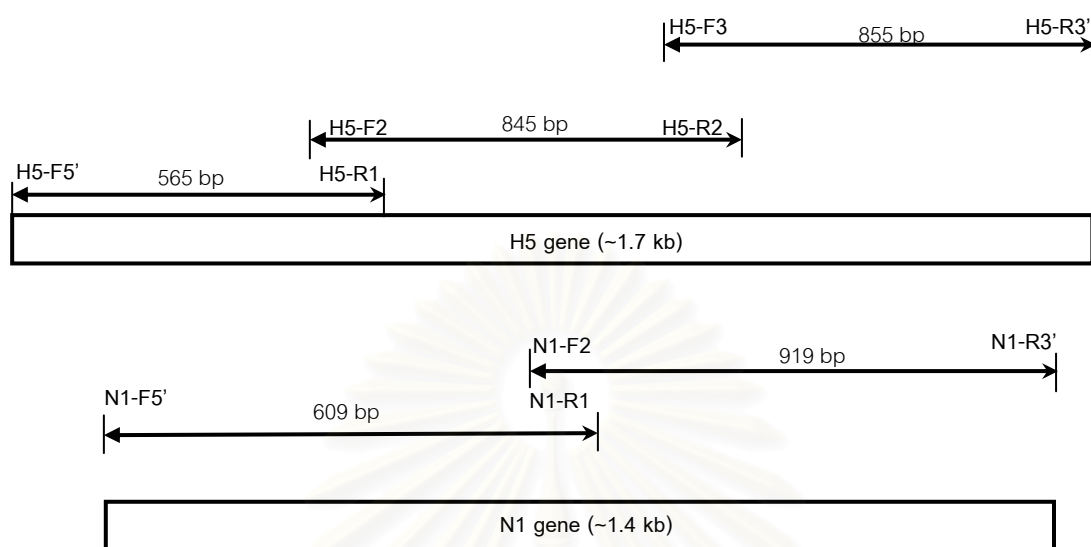
ตารางที่ 4 Primers ที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก ด้วย Multiplex RT-PCR

ชนิดของยีน	Primers	ลำดับเบส	ขนาด primers (bp)	ขนาดของ PCR product (bp)
M gene	MF	5'-TGATCTTCTTGAATTTGCAG-3'	22	276
	MR	5'-TGTTGACAAAATGACCATCG-3'	20	
H5 gene	H5F	5'-GACTCAAATGTCAAGAACCTTTA-3'	23	189
	H5R	5'-CCACTTATTTCTCTCTGTTTAG-3'	23	
N1 gene	N1F	5'-GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC-3'	21	131
	N1R	5'-TGATAGTGTCTGTTATTATGCC-3'	21	

F = Forward primers, R= Reverse primers, bp= base pair (Payungporn et al., 2004)

ตารางที่ 5 primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1

ชนิดของยีน	คู่ที่	Primer	ลำดับเบส	ขนาด primers (bp)	ตำแหน่ง bp ที่จับบนยีน	ขนาดของ PCR product (bp)
H5 gene	1	H5-F5'	5'-AGCAAAAGCAGGGGTCTGATCTG-3'	23	1-23	565
		H5-R1	5'-GCTCCTCTTTATTGTTGGGTATG-3'	23	543-565	
	2	H5-F2	5'-TGAGAAAATTCAGATCATCCCC-3'	22	409-430	845
		H5-R2	5'-CAACGGCCTCAAAGTGTGT-3'	21	1233-1253	
	3	H5-F3	5'-ACTCCAATGGGGGCGATAAAC-3'	21	914-934	855
		H5-R3'	5'-AGTAGAAACAAGGGTGTTTTAACTAC-3'	27	1742-1768	
N1 gene	1	N1-F5'	5'-AGCAAAAGCAGGAGTTTAAATG-3'	23	1-23	609
		N1-R1	5'-TGATAGTGTCTGTTATTATGCC-3'	22	588-609	
	2	N1-F2	5'-GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC-3'	21	479-499	919
		N1-R3'	5'-AGTAGAAACAAGGAGTTTTTGAAC-3'	25	1374-1398	



รูปที่ 5 ตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้

1.1 การศึกษาครั้งนี้เก็บรวบรวมเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ได้จากตัวอย่างน้ำไข่ฟกจากสัตว์ปีกในช่วงที่มีการระบาดในปี 2004-2005 โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจำนวน 43 ตัวอย่าง รายละเอียดของตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกประกอบด้วย รหัสของตัวอย่าง ชนิดของสัตว์ปีก พื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง และปีที่เก็บตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากสัตว์ปีกระหว่างปี 2004-2005 จำนวน 43 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

รหัสของตัวอย่าง	ชนิดสัตว์ปีก	พื้นที่ที่เก็บ	ปีที่เก็บตัวอย่าง
CU-1	ไก่	สุพรรณบุรี	2004
CU-2	เป็ด	ชลบุรี	2004
CU-3	ไก่	กรุงเทพฯ	2004
CU-4	อีเกา	กรุงเทพฯ	2004
CU-5	เป็ด	ชลบุรี	2004
CU-7	ไก่เนื้อ	ชลบุรี	2004
CU-8	ไก่เนื้อ	ปราจีนบุรี	2004
CU-9	ไก่เนื้อ	สุพรรณบุรี	2004
CU-10	ไก่เนื้อ	ฉะเชิงเทรา	2004
CU-11	ไก่ไข่	ฉะเชิงเทรา	2004
CU-12	ไก่ไข่	นครสวรรค์	2004
CU-14	ไก่ไข่	นครปฐม	2004
CU-15	อีเกา	กรุงเทพฯ	2004
CU-16	นกยูง	กรุงเทพฯ	2004
CU-17	ไก่	สระบุรี	2004
CU-18	ไก่ฟ้า	กรุงเทพฯ	2004
CU-19	นกกระเจือกเทศ	สมุทรปราการ	2004
CU-21	ไก่	กรุงเทพฯ	2004

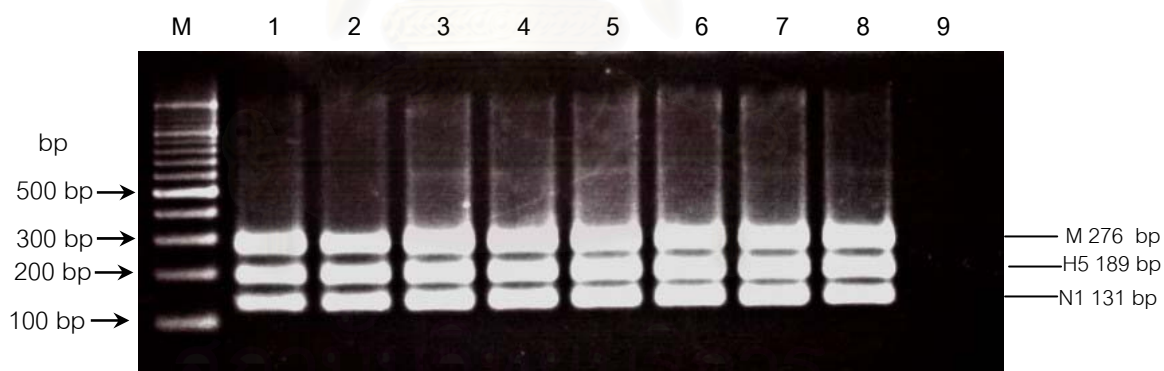
ตารางที่ 6 ตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากสัตว์ปีกระหว่างปี 2004-2005 จำนวน 43 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (ต่อ)

รหัสของตัวอย่าง	ชนิดสัตว์ปีก	พื้นที่ที่เก็บ	ปีที่เก็บตัวอย่าง
CU-23	ไก่ไข่	อยุธยา	2004
CU-26	นกตะขาบทุ่ง	กรุงเทพฯ	2004
CU-31	นกกระเจือกเทศ	สมุทรปราการ	2004
CU-35	อีเกา	กรุงเทพฯ	2004
CU-38	ไก่	ลพบุรี	2004
CU-39	ไก่	นครสวรรค์	2004
CU-71	เป็ด	นครปฐม	2004
CU-74	เป็ด	สระบุรี	2004
CU-76	เป็ด	ชลบุรี	2004
CU-77	เป็ด	ฉะเชิงเทรา	2004
CU-89	เป็ด	นครนายก	2004
CU-90	เป็ด	นครสวรรค์	2004
CU-93	เป็ด	ปทุมธานี	2004
CU-95	เป็ด	ปราจีนบุรี	2004
CU-98	เป็ด	นครปฐม	2004
CU-202	นกพิราบ	สมุทรปราการ	2004
CU-203	นกกระเจือก	พังงา	2004
CU-209	นกเอี้ยง	ระนอง	2004
CU-130	เป็ดกาก็	สุพรรณบุรี	2005
CU-131	เป็ดกาก็	สุพรรณบุรี	2005
CU-160	ไก่	กาญจนบุรี	2005
CU-161	นกกระทา	นครปฐม	2005
CU-162	ไก่	นนทบุรี	2005
CU-258	นกกระทา	ปทุมธานี	2005
CU-259	นกกระทา	ปทุมธานี	2005

จากตารางที่ 6 สรุปได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ศึกษาครั้งนี้จำนวน 43 ตัวอย่าง เป็นเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไก่ 18 ตัวอย่าง (41.9%) เป็ด 13 ตัวอย่าง (30.2%) อีเกา 3 ตัวอย่าง (6.9%) นกกระทา 3 ตัวอย่าง (6.9%) นกกระจอกเทศ 2 ตัวอย่าง (4.7%) และนกกระจอก นกเอี้ยง นกตะขาบทุ่ง นกฟิราบนกยูง ไก่ฟ้า จำนวนอย่างละ 1 ตัวอย่าง (1% ต่อตัว) โดยตัวอย่างส่วนใหญ่แยกได้จากหลายจังหวัดในภาคกลาง ได้แก่ กาญจนบุรี กรุงเทพมหานคร นนทบุรี นครปฐม นครนายก นครสวรรค์ ปทุมธานี ลพบุรี สระบุรี สมุทรปราการ สุพรรณบุรี อุทัยฯ ภาคตะวันออก ได้แก่ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ปราจีนบุรี และภาคใต้ ได้แก่ พังงา ระนอง

1.2 ผลการตรวจพิสูจน์และยืนยันเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยวิธี multiplex RT-PCR ซึ่งเป็นการตรวจหา ยีน M H5 และ N1 โดยตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจะให้ผลบวก (positive) ของยีน M H5 และ N1 ที่ขนาด 276 189 และ 131 bp ตามลำดับ

การศึกษานี้พบว่าตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนก 43 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อยีน M H5 และ N1 ตัวอย่างของการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธี multiplex RT-PCR ที่ให้ผลบวกต่อยีน M H5 และ N1 แสดงไว้ในรูปที่ 6

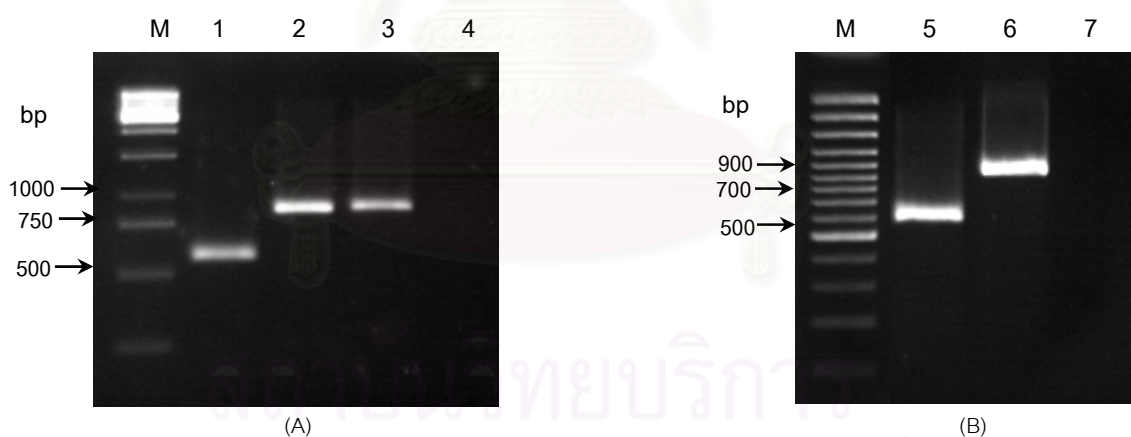


รูปที่ 6 รูปตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีน M H5 และ N1 ในตัวอย่างสัตว์ปีกแต่ละชนิดจำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ Lane 1; Duck/THA/CU-05/04, Lane 2; Peacock/THA/CU-16/04, Lane 3; Pheasant/THA /CU-18/04, Lane 4; Ostrich/THA /CU-19/04, Lane5; Chicken/THA /CU-23/04, Lane 6; Crow/THA /CU-35/04, Lane7; Chicken/THA /CU-10/04, Lane 8; Roller/THA /CU-26/04, Lane 9; negative control, M; DNA ladder

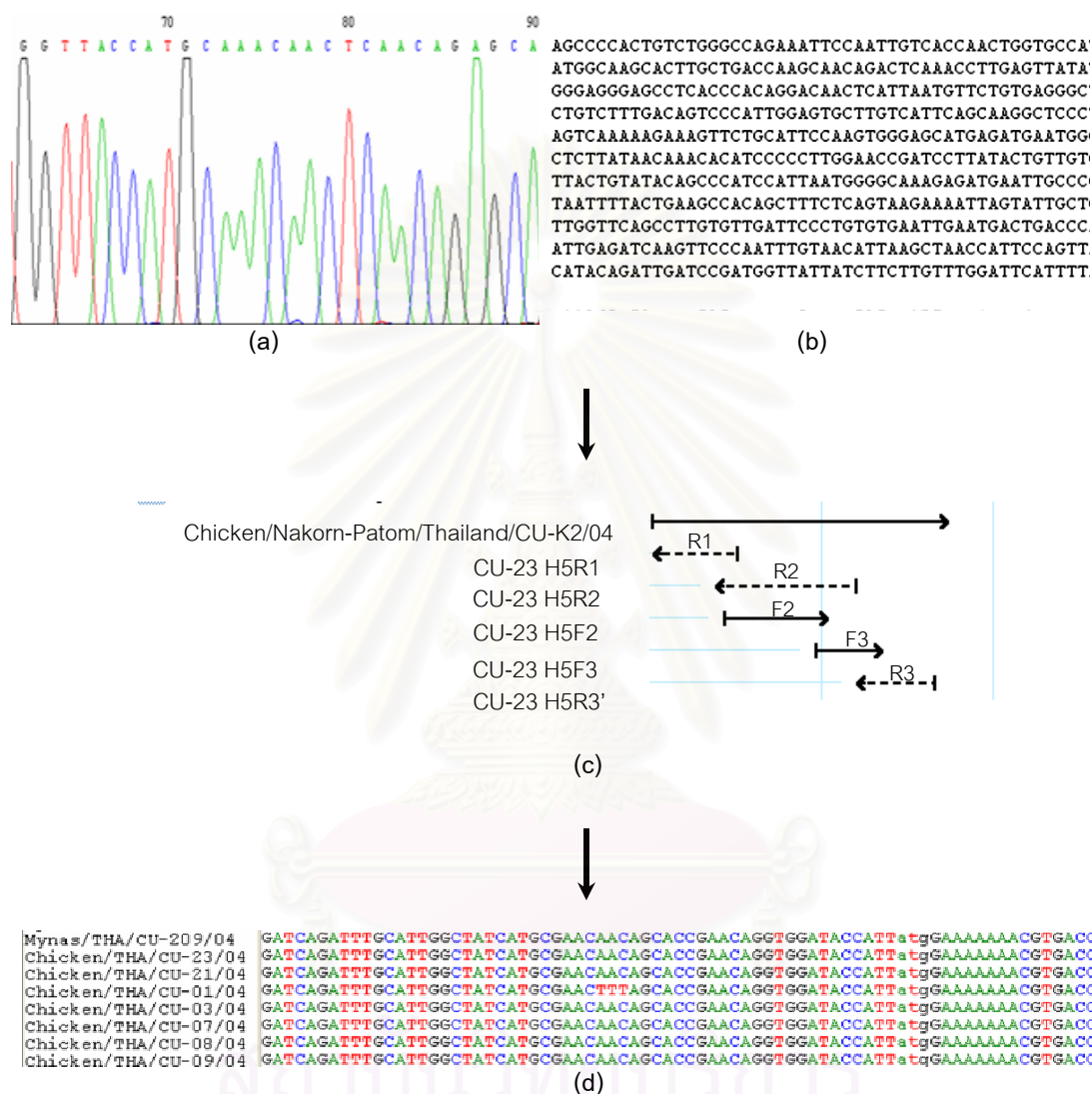
2. ผลการหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1

ในการหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1 ได้นำตัวอย่างเชื้อไวรัสใช้หัวดุนกที่ให้ผลบวกต่อยีน M H5 และ N1 มาเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน H5 และ N1 โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละชนิด และตัวอย่างของผลการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 ได้แสดงไว้ในรูปที่ 7 และหลังจากนำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบส ผลการหาลำดับเบสจะอยู่ในรูปกราฟ chromatogram และ text file และนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องโดยทำการยืนยันผลของลำดับเบสที่ได้จาก forward และ reverse primers เปรียบเทียบกัน จากนั้นนำลำดับเบสมาประกอบให้ครบทั้งยีน H5 และ N1 โดยการใช้โปรแกรม Bioedit version 7.0.0 (รูปที่ 8)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลลำดับเบสของยีน H5 และ N1 ทั้งหมด 86 เส้น (จำนวน 43 ตัวอย่าง) และได้้นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ 64 เส้น (จำนวน 32 ตัวอย่าง) ไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล Genbank ซึ่งสามารถ download ข้อมูลของลำดับเบสได้ตาม Genbank Accession Number โดยผ่านทาง <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ดังแสดงในตารางที่ 7 ทั้งนี้ตัวอย่างอีก 22 เส้น (จำนวน 11 ตัวอย่าง) ยังไม่ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูลไปยังฐานข้อมูล GenBank



รูปที่ 7 รูปตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 โดยรูป A แสดงตัวอย่าง CU-23 ที่ให้ผลบวกในการเพิ่มจำนวนยีน H5 โดยการใช้ primers จำนวน 3 คู่ คือ Lane 1; H5F5'/H5R1 ขนาด 565 bp, Lane 2; H5F2/R2 ขนาด 845 bp; Lane 3; HF3/R3' ขนาด 855 bp, Lane 4; negative control และรูป B แสดงตัวอย่าง CU-23 ที่ให้ผลบวกในการเพิ่มจำนวนยีน N1 จาก primer จำนวน 2 คู่ และให้ขนาด PCR product คือ Lane 5; N1F5'/R1 ขนาด 609 bp, Lane 6; N1F2/R3' ขนาด 919 bp, Lane 7; negative control, M; DNA ladder



รูปที่ 8 ตัวอย่างผลของลำดับเบสในรูปแบบกราฟ Chromatogram (a) ซึ่งอ่านผลโดยโปรแกรม Chromas 1.45 และ ผลลำดับเบสในรูปแบบ text file (b) ซึ่งเป็นผลลำดับเบสที่ได้จาก forward (F) และ reverse (R) primers ในแต่ละคู่ จากนั้นนำข้อมูลมาตรวจสอบความถูกต้องและยืนยันลำดับเบส (c) และนำลำดับเบสมาประกอบให้ครบทั้งยีน โดยการใช้โปรแกรม Bioedit version 7.0.0 (d)

ตารางที่ 7 ขนาดและหมายเลขประจำลำดับเบส (GenBank Acession No.) ของยีน H5 และ N1 ของตัวอย่างจำนวน 43 ตัวอย่าง

Isolated ID	ชนิดสัตว์ปีก	ขนาดของยีน (bp)		GenBank Accession No.	
		H5	N1	H5	N1
CU-1	ไก่	1700	1407	AAZ29946	AAZ29982
CU-2	เป็ด	1653	1363	AAV48778	AAV48779
CU-3	ไก่	1712	1407	AAZ29947	AAZ29983
CU-4	อีเกา	1690	1407	AAZ29948	AAZ29984
CU-5	เป็ด	1697	1398	AAZ29949	AAZ29985
CU-7	ไก่เนื้อ	1688	1366	AAZ29951	AAZ29987
CU-8	ไก่เนื้อ	1656	1378	AAZ29952	AAZ29988
CU-9	ไก่เนื้อ	1660	1377	AAZ29953	AAZ29989
CU-10	ไก่เนื้อ	1666	1377	AAZ29954	AAZ29990
CU-11	ไก่ไข่	1670	1385	AAZ29955	AAZ29991
CU-12	ไก่ไข่	1649	1377	AAZ29956	AAZ29992
CU-14	ไก่ไข่	1649	1381	AAZ29958	AAZ29994
CU-15	อีเกา	1710	1405	AAZ29959	AAZ29995
CU-16	นกยูง	1712	1432	AAZ29960	AAZ29996
CU-17	ไก่	1713	1387	AAZ29961	AAZ29997
CU-18	ไก่ฟ้า	1660	1356	AAZ29962	AAZ29998
CU-19	นกกระเจือกเทศ	1669	1383	AAZ29963	AAZ29999
CU-21	ไก่	1680	1364	AAV48780	AAV48781
CU-23	ไก่ไข่	1711	1342	AAV41002	AAV41003
CU-26	นกตะขาบทุ่ง	1652	1167	AAZ29967	AAZ30003
CU-31	นกกระเจือกเทศ	1680	1366	AAZ29970	AAZ30006
CU-35	อีเกา	1645	1400	AAZ29971	AAZ30007
CU-38	ไก่	1668	1407	AAZ29972	AAZ30008
CU-39	ไก่	1664	1407	AAZ29973	AAZ30009
CU-71	เป็ด	1700	1360	AAZ29975	AAZ30011
CU-74	เป็ด	1700	1373	AAZ29977	AAZ30013
CU-76	เป็ด	1672	1373	N/A*	N/A
CU-77	เป็ด	1665	1368	N/A	N/A
CU-89	เป็ด	1696	1373	N/A	N/A
CU-90	เป็ด	1674	1381	N/A	N/A

* N/A หมายถึง Not Available เนื่องจากยังไม่ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank

ตารางที่ 7 ขนาดและหมายเลขประจำลำดับเบส (GenBank Accession No.) ของยีน H5 และ N1 ของตัวอย่างจำนวน 43 ตัวอย่าง

Isolated ID	ชนิดสัตว์ปีก	ขนาดของยีน (bp)		GenBank Accession No.	
		H5	N1	H5	N1
CU-93	เปิด	1664	1373	N/A*	N/A
CU-95	เปิด	1667	1407	N/A	N/A
CU-98	เปิด	1667	1377	N/A	N/A
CU-130	เปิดกาก็	1711	1412	N/A	N/A
CU-131	เปิดกาก็	1697	1412	N/A	N/A
CU-160	ไก่	1704	1347	ABC69216	ABC69218
CU-161	นกกระทา	1704	1347	ABC69224	ABC69226
CU-162	ไก่	1704	1344	ABC69232	ABC69234
CU-202	นกพิราบ	1712	1406	AAZ29979	AAZ30015
CU-203	นกกระจอก	1714	1406	AAZ29980	AAZ30016
CU-209	นกเขีย	1712	1404	AAZ29981	AAZ30017
CU-258	นกกระทา	1720	1413	N/A	N/A
CU-259	นกกระทา	1718	1414	N/A	N/A

* N/A หมายถึง Not Available เนื่องจากยังไม่ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank

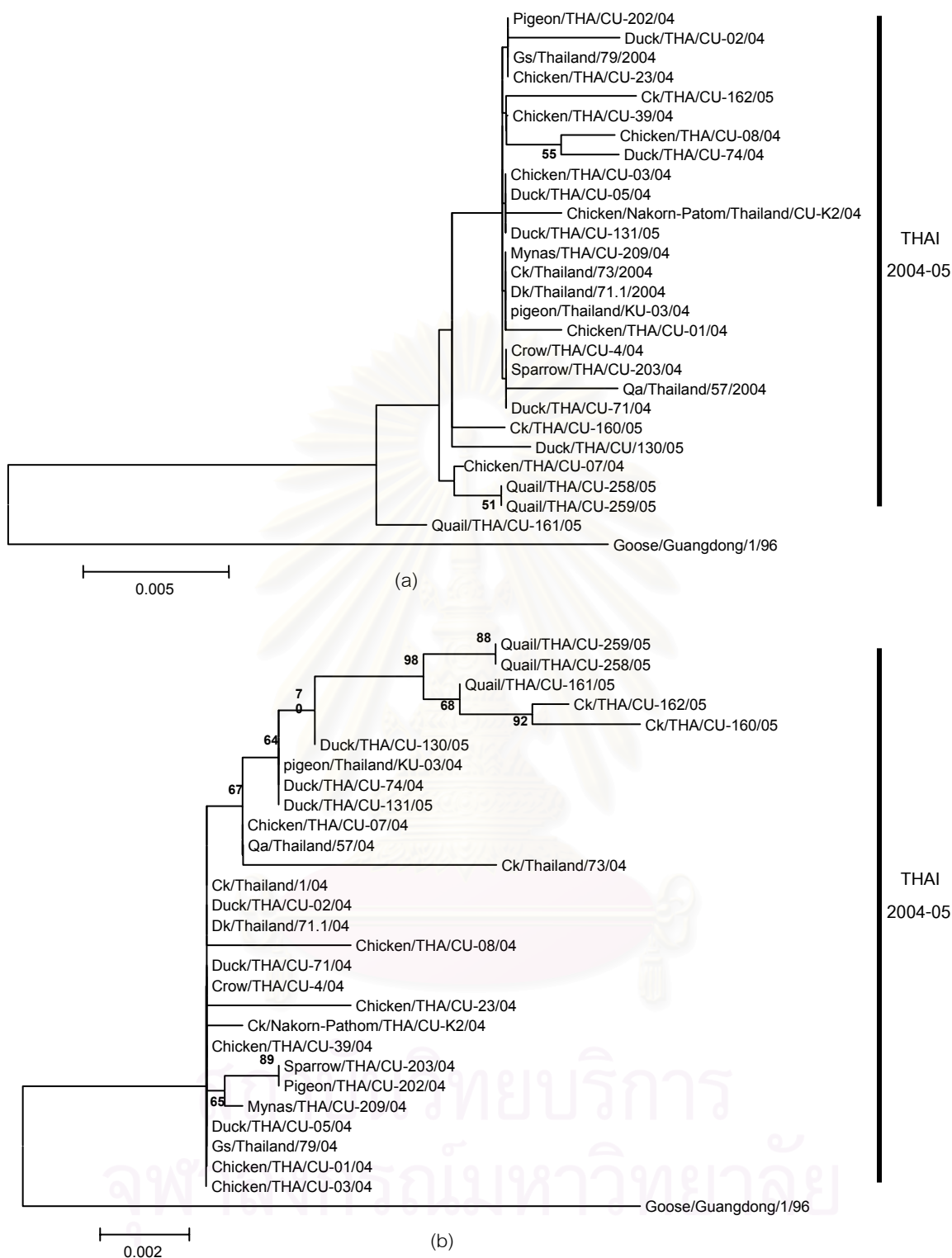
3. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้ในประเทศไทย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1 โดยวิธี cluster analysis และแสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในรูปแบบของ phylogenetic tree ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากการระบาดในปี 2004-2005 ผลการศึกษานี้พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสที่เคยระบาดในประเทศไทยเมื่อต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) และกลางปี 2004 (A/Chicken/Thailand/CU-23/04) (รูปที่ 9)

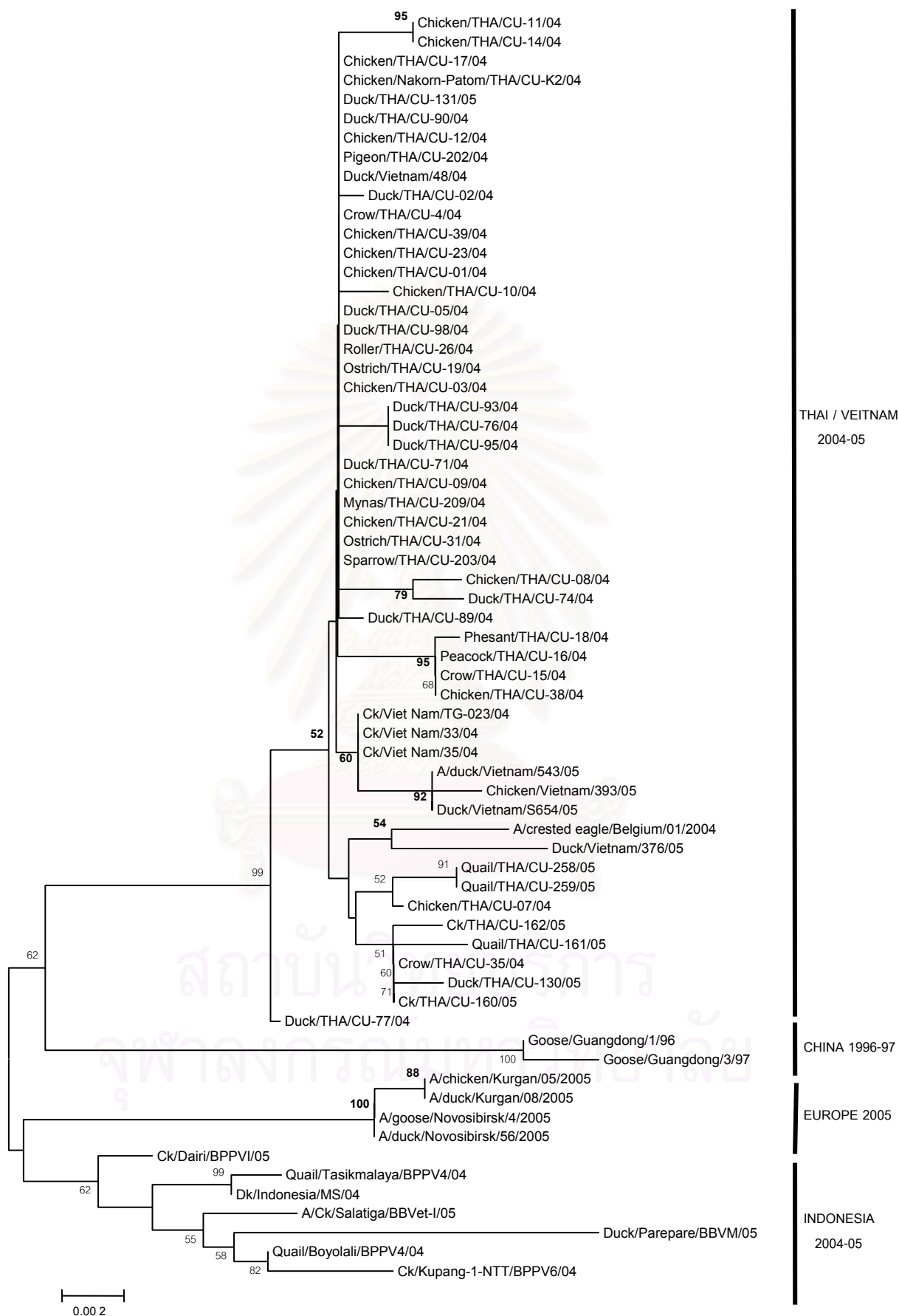
นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้ในการศึกษารั้งนี้กับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่มีรายงานในประเทศต่างๆ พบว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่พบจากการศึกษารั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสที่พบในประเทศเวียดนามช่วงปี 2004-2005 แต่แยกกลุ่มออกจากเชื้อไวรัสที่พบในประเทศอินโดนีเซีย ปี 2004-2005 ประเทศในแถบทวีปยุโรปปี 2005 และประเทศจีนทางตอนใต้ในปี 1996-1997 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษารั้งนี้สามารถแยกเชื้อไวรัสได้ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ เชื้อไวรัสในกลุ่มของประเทศไทยและเวียดนาม เชื้อไวรัสในกลุ่มอินโดนีเซีย เชื้อไวรัสในกลุ่มประเทศทางยุโรป และเชื้อไวรัสในกลุ่มประเทศจีนตอนใต้ ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11

อย่างไรก็ตามการศึกษารั้งนี้เชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่นำมาศึกษาทั้งหมดเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 กลุ่ม genotype Z และเป็น genotype เดียวกันกับเชื้อที่พบในหลายประเทศในเอเชีย เช่น ประเทศจีน เวียดนาม อินโดนีเซีย ฮองกง รวมทั้งเชื้อที่พบในยุโรปและแอฟริกา

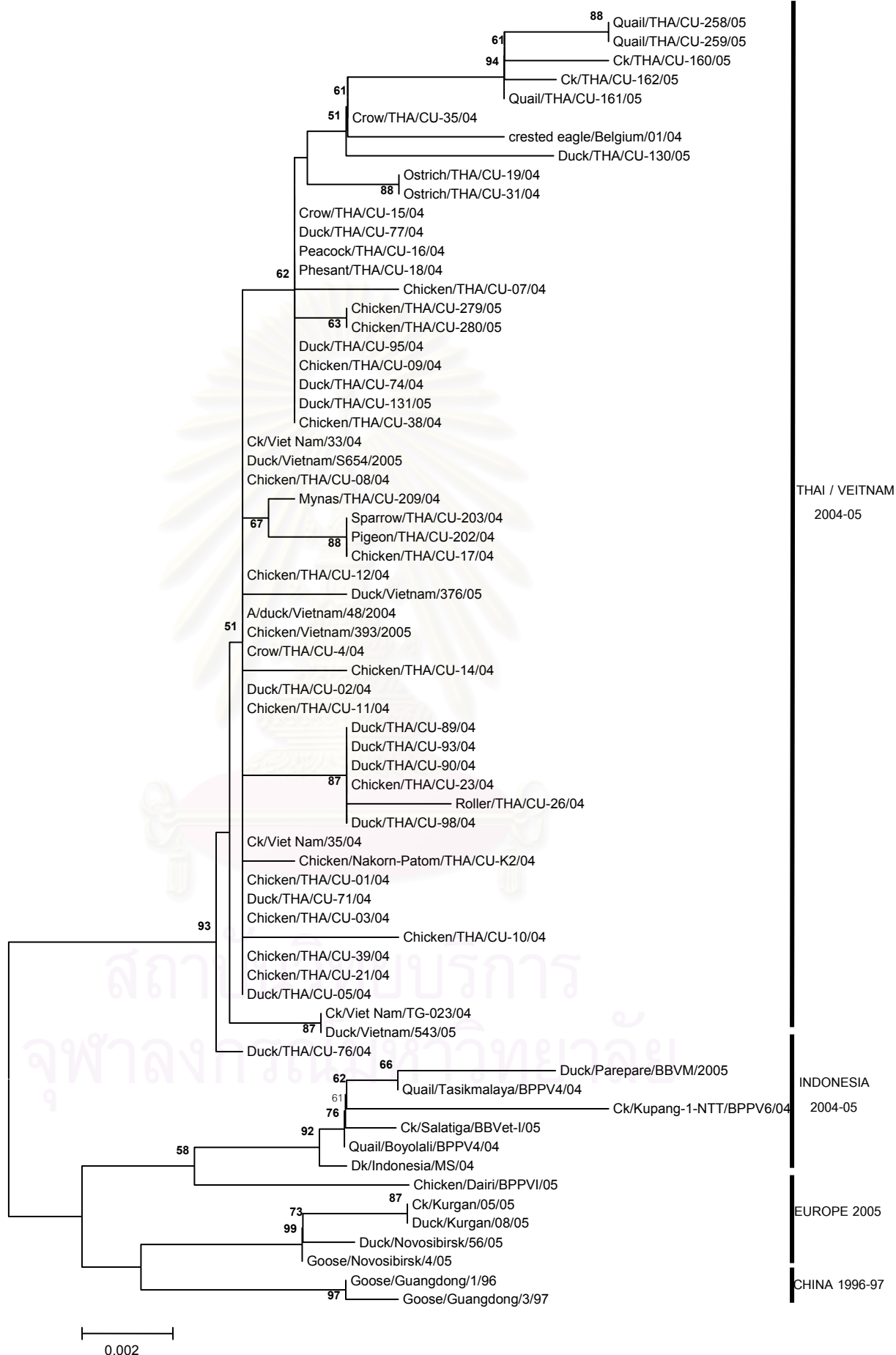
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน H5 (a) และ N1 (b) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้กับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในประเทศไทยช่วงต้นปี 2004 (Chicken/Nakon-Pathom/Thailand/CU-K2/04) ในรูปแบบ phylogenetic tree ของยีน H5 และ N1 โดยวิเคราะห์ nucleotide ของยีน H5 ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 49-1580 bp และ nucleotide ของยีน N1 ตั้งแต่ 1-1359 bp ผลการวิเคราะห์ bootstrap analysis แสดงเป็นตัวเลขบนแต่ละ branches และความยาวของเส้นแนวนอน (horizontal lines) เป็นค่าสัดส่วนความแตกต่างของจำนวนนิวคลีโอไทด์ และในแต่ละ branches แทนด้วยชื่อของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา



รูปที่ 10 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน H5 ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในทวีปเอเชีย และยุโรปในปี 2004-2005 ในรูปแบบ phylogenetic tree



รูปที่ 11 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน N1 ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในทวีปเอเชีย และยุโรปในปี 2004-2005 ในรูปแบบ phylogenetic tree

4. ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน H5 และ N1

ข้อมูลลำดับเบสของยีน H5 และ N1 สามารถนำมาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้าย (identity) ของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของแต่ละยีน การวิเคราะห์ข้อมูลครั้งนี้ได้เปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสจำนวน 43 ตัวอย่าง ร่วมกับข้อมูลที่เคยมีรายงานในประเทศต่างๆ ด้วยโปรแกรม Mega 3.1

4.1 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 และ N1

วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ similarity ในตัวแทนเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานคร ในเดือนกุมภาพันธ์ มีนาคม และ สิงหาคม 2004 จำนวน 7 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในช่วงต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) ผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 ในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้มีค่ามากกว่า 99 % และเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน N1 มีค่าประมาณ 97-99 % ดังแสดงตารางที่ 8

นอกจากนี้การศึกษานี้ได้วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากไก่ จำนวน 8 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในช่วงต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 ในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้มีค่ามากกว่า 99 % ส่วนเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน N1 มีค่าประมาณ 96-97 % (ตารางที่ 9)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 7 ตัวอย่าง
เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกแยกได้ในช่วงต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-
Pathom/Thailand/CU-K2/04)

เชื้อไวรัสที่แยกได้	ความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ (bp)		ช่วงเวลา (เดือน)	% nucleotide identity (amino acid)	
	H5	N1		H5	N1
Chicken/THA/CU-03/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.9(99.8)	98.0(97.9)
Crow/THA/CU-04/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.9(99.8)	98.0(97.9)
Crow/THA/CU-15/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.6(99.4)	97.9(97.6)
Peacock/THA/CU-16/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.6(99.4)	97.9(97.6)
Pheasant/THA/CU-18/04	49-1578	1-1356	กุมภาพันธ์	99.6(99.2)	97.7(97.4)
Chicken/THA/CU-21/04	49-1578	16-1359	มีนาคม	99.9(99.8)	99.2(99.0)
Crow/THA/CU-35/04	49-1578	1-1359	สิงหาคม	99.7(99.6)	97.8(97.2)

ตารางที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกในไก่
เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกแยกได้ในช่วงต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-
K2/04)

เชื้อไวรัสที่แยกได้	ความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ (bp)		ช่วงเวลา (เดือน)	% nucleotide identity (amino acid)	
	H5	N1		H5	N1
Chicken/THA/CU-01/04	49-1578	1-1359	มกราคม	99.7(99.6)	98.0(97.9)
Chicken/THA/CU-03/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.9(99.8)	98.0(97.9)
Chicken/THA/CU-10/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.8(99.6)	97.8(97.6)
Chicken/THA/CU-21/04	49-1578	16-1359	มีนาคม	99.9(99.8)	99.2(99.0)
Chicken/THA/CU-23/04	49-1578	16-1356	กรกฎาคม	99.9(99.8)	98.6(98.3)
Chicken/THA/CU-39/04	49-1578	1-1359	กันยายน	99.9 (99.8)	98.0(97.9)
Chicken/THA/CU-160/05	49-1578	1-1359	ตุลาคม	99.6(99.2)	97.1(96.0)
Chicken/THA/CU-162/05	49-1578	1-1359	-	99.5(99.0)	97.3(96.3)

4.2 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน H5

HA cleavage site

การเรียงตัวของกรดอะมิโนที่บริเวณ HA cleavage site สามารถใช้บ่งบอกถึงความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยพบว่าเชื้อไวรัสที่ก่อโรคที่มีความรุนแรงต่ำจะมีลักษณะของกรดอะมิโนบริเวณ HA cleavage site แบบ single basic amino acid แต่ในเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงสูงจะมีการเรียงตัวแบบ multiple basic amino acids (Wilschut and McElhaney, 2005)

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน cleavage site แบบ multiple basic amino acid ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดก่อโรครุนแรง และยังสามารถแบ่งการเรียงตัวของกรดอะมิโนออกได้เป็น 3 แบบ คือ RRRKKR, RKRRKR, KRRKRR ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 12 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่บริเวณตำแหน่งที่ 320-330 บนยีน HA (HA cleavage site)

การเรียงตัวแบบ RRRKKR พบได้ในสัตว์ปีกหลายชนิด โดยเฉพาะในไก่ (n=13) เป็ด (n=12) นอกจากนี้ยังพบได้ในอีกา (n=2) นกกระจอกเทศ (n=2) นกตะขาบทุ่ง (n=1) นกเอี้ยง (n=1) นกกระจอก (n=1) นกฟิราบ (n=1) ส่วนการเรียงตัวแบบ RKRRKR พบในนกยูง อีกา ไก่ ไก่ฟ้า (ชนิดละ 1 ตัวอย่าง) และการเรียงตัวในลักษณะ KRRKRR พบได้ในนกกระทา (n=3) เป็ด (n=1) และไก่ (n=2)

อย่างไรก็ตามจะพบว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน HA cleavage site แบบ RRRKKR สามารถพบได้ในเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่รายงานในประเทศไทยในปี 1996-1997 ประเทศเวียดนาม อินโดนีเซียในปี 2004-2005 และประเทศในแถบยุโรปในปี 2005 ยกเว้นเชื้อไวรัสที่แยกจากประเทศเบลเยียม(A/crested_eagle/Belgium/01/2004) จะเป็นการเรียงตัวแบบ KRRKRR (รูปที่ 12)

Receptor binding site

เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ ก่อให้เกิดโรคในสัตว์หลายชนิด แต่มีรายงานลักษณะของกรดอะมิโนบน receptor binding site ที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดความจำเพาะต่อการจับบน oligosaccharide receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ host พบว่าเชื้ออินฟลูเอนซ่าที่ก่อโรคในสัตว์ปีกจะพบกรดอะมิโนชนิด glutamine (Q) และ glycine (G) ที่ตำแหน่ง 222 และ 224 บนยีน HA (Q226 และ G228 ของระบบ H3 numbering) (Vines et al., 1998)

จากตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 222 และ 224 (Q222-G224) ดังตารางสรุปที่ 8 และเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างเชื้อไวรัสจากประเทศต่างๆ คือ จีน เวียดนาม อินโดนีเซีย ประเทศแถบยุโรป พบว่าเชื้อไวรัสยังมีลักษณะของกรดอะมิโนแบบ Q222 และ G224 เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของ receptor binding site ของเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์ปีก (รูปที่ 13)

N-link glycosylation site

ตำแหน่งของ glycosylation site บนยีน HA ประกอบด้วยสายของคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกับพันธะ N-glycosidic linkage (Lamb and Choppin, 1983) และ glycosylation site จะเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อไวรัส (Hulse et al., 2004) โดยเฉพาะ glycosylation site ที่บริเวณใกล้เคียงกับ receptor binding site เช่น ตำแหน่ง glycosylation site ที่ 154-156

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่รายงานในประเทศจีนช่วงปี 1996-1997 ประเทศในแถบยุโรปปี 2004-2005 และเชื้อไวรัสบางตัวในประเทศอินโดนีเซีย (Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04) ไม่พบ glycosylation site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 154-156 อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าพบ glycosylation site แบบ NST ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 154-156 ในทุกตัวอย่างของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (แสดงดังตารางสรุปที่ 10 และรูปที่ 14)

4.3 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน N1

NA stalk region

โปรตีน NA มีรูปร่างแบบ mushrooms ซึ่งประกอบด้วยส่วน head และ stalk region (Lamb and Choppin, 1983) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน stalk region ของยีน NA ส่งผลให้ไวรัสมีการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมใหม่และมีคุณสมบัติที่ทำให้ไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อไปยังสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้ (Bender et al., 1999; Suzuki, 2005)

จากการศึกษาค้นคว้าพบการลดจำนวนของกรดอะมิโนจำนวน 20 ตัว ที่ตำแหน่ง 49-68 ของ NA stalk region ในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา (ตารางสรุปที่ 11) และวิเคราะห์เปรียบเทียบกับตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในต่างประเทศตั้งแต่ปี 2004 เป็นต้นมา พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าต่างไปจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากจีนในปี 1996-1997 (Gs/Gd/96 lineage) ซึ่งไม่พบการลดจำนวนของกรดอะมิโนที่บริเวณ NA stalk region (รูปที่ 15)

NA active site

NA active site เป็นตำแหน่งที่อยู่บนส่วน head ของโปรตีน NA ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน NA active site มีผลทำให้เชื้อไวรัสดื้อต่อยาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวรามิनिเดส (Moscona, 2005) ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน NA active site ที่มีผลต่อการดื้อยา oseltamevir ซึ่งจากผลการศึกษายังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 119, 293, 295, 275 ในตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจำนวน 43 ตัวอย่าง (ตารางสรุปที่ 11) เช่นเดียวกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้ในจีนตอนใต้ (Gs/Gd/96 lineage) อินโดนีเซีย เวียดนาม และยุโรปปี 2004-2005 ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณ NA active site (รูปที่ 16, 17 และ 18)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน H5

เชื้อไวรัส	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของยีน H5*			
	Cleavage site	Receptor binding site		N-link glycosylation site
		222	224	154-156
A/Goose/Guangdong/1/96	TPQRERRRKKR	Q	G	- (NSA)
A/Goose/Guangdong/3/97	TPQRERRRKKR	Q	G	- (NSA)
A/crested_eagle/Belgium/01/2004	SPQREKRRKKR	Q	G	NST
A/chicken/Kurgan/05/2005	SPQGERRRKKR	Q	G	- (DNA)
A/duck/Kurgan/08/2005	SPQGERRRKKR	Q	G	- (DNA)
A/duck/Novosibirsk/56/2005	SPQGERRRKKR	Q	G	- (NNA)
A/goose/Novosibirsk/4/2005	SPQRERRRKKR	Q	G	- (NNA)
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	SPQRERRRKKR	Q	G	- (NSA)
Quail/Boyolali/BPPV4/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/Kupang-1-NTT/BPPV6/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Dk/Indonesia/MS/04	SPQRERRRKKR	Q	G	- (NSA)
Duck/Parepare/BBVM/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/Dairi/BPPVI/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
A/Ck/Salatiga/BBVet-I/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NSS
Ck/Viet_Nam/33/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/Viet_Nam/35/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/Viet_Nam/TG-023/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/Vietnam/376/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/Vietnam/543/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/Vietnam/393/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/Vietnam/48/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/Vietnam/S654/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/Nakorn-Patom/THA/CU-K2/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Peacock/THA/CU-16/04	SPQREKRRKKR**	Q	G	NST
Crow/THA/CU-4/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Crow/THA/CU-15/04	SPQREKRRKKR**	Q	G	NST
Phesant/THA/CU-18/04	SPQREKRRKKR**	Q	G	NST
Ostrich/THA/CU-19/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Roller/THA/CU-26/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ostrich/THA/CU-31/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Crow/THA/CU-35/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Pigeon/THA/CU-202/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Sparrow/THA/CU-203/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Mynas/THA/CU-209/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST

* ชื่อเต็มของกรดอะมิโนแต่ละชนิดสามารถดูได้ที่ภาคผนวก

ตารางที่ 10 สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน H5 (ต่อ)

เชื้อไวรัส	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของยีน H5*			
	Cleavage site	Receptor binding site		N-link glycosylation site
		222	224	154-156
Chicken/THA/CU-23/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-21/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-01/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-03/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-07/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-08/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-09/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-10/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-11/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-12/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-14/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-17/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-38/04	SPQREK R RRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-39/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-02/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-05/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-71/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-74/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-76/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-77/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-89/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-90/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-93/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-95/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Duck/THA/CU-98/04	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Quail/THA/CU-258/05	SPQREK R RRKKR***	Q	G	NST
Quail/THA/CU-259/05	SPQREK R RRKKR***	Q	G	NST
Duck/THA/CU-130/05	SPQREK R RRKKR***	Q	G	NST
Duck/THA/CU-131/05	SPQRERRRK K R	Q	G	NST
Ck/THA/CU-160/05	SPQREK R RRKKR***	Q	G	NST
Quail/THA/CU-161/05	SPQREK R RRKKR***	Q	G	NST
Ck/THA/CU-162/05	SPQREK R RRKKR***	Q	G	NST

* ชื่อเต็มของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในสามารถดูได้ที่ภาคผนวก
การเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ RRRKKR พบจำนวน 33 ตัวอย่าง

**การเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ RK~~R~~KKR พบจำนวน 4 ตัวอย่าง

***การเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ RRRKKR พบจำนวน 6 ตัวอย่าง

ตารางที่ 11 สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน N1

เชื้อไวรัส	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของยีน N1*				
	NA stalk region	ตำแหน่งกรดอะมิโนบน NA active site			
		119	293	295	275
A/Goose/Guangdong/1/96	No deletion	E	R	N	H
A/Goose/Guangdong/1/97	No deletion	E	R	N	H
A/crested_eagle/Belgium/01/2004	20-aa deletion	E	R	N	H
A/chicken/Kurgan/05/2005	20-aa deletion	E	R	N	H
A/duck/Kurgan/08/2005	20-aa deletion	E	R	N	H
A/duck/Novosibirsk/56/2005	20-aa deletion	E	R	N	H
A/goose/Novosibirsk/4/2005	20-aa deletion	E	R	N	H
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Quail/Boyolali/BPPV4/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Kupang-1-NTT/BPPV6/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Dk/Indonesia/MS/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/Parepare/BBVM/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Dairi/BPPVI/05	20-aa deletion	E	R	N	H
A/Ck/Salatiga/BBVet-I/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Viet_Nam/33/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Viet_Nam/35/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Viet_Nam/TG-023/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/Vietnam/376/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/Vietnam/543/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/Vietnam/393/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/Vietnam/48/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/Vietnam/S654/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Nakorn-Patom/THA/CU-K2/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Crow/THA/CU-4/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Crow/THA/CU-15/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Peacock/THA/CU-16/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Phesant/THA/CU-18/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Ostrich/THA/CU-19/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Roller/THA/CU-26/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Ostrich/THA/CU-31/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Crow/THA/CU-35/04	20-aa deletion	E	R	N	H

* ชื่อเต็มของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในสามารรถดูได้ที่ภาคผนวก

ตารางที่ 11 สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน N1 (ต่อ)

เชื้อไวรัส	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของยีน N1*				
	20-aa deletion	ตำแหน่งกรดอะมิโนบน NA active site			
		119	293	295	275
Pigeon/THA/CU-202/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Sparrow/THA/CU-203/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Mynas/THA/CU-209/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-23/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-21/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-01/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-03/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-07/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-08/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-09/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-10/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-11/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-12/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-14/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-17/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-38/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-39/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-02/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-05/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-71/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-74/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-76/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-77/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-89/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-90/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-93/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-95/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-98/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Quail/THA/CU-258/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Quail/THA/CU-259/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-130/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-131/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/THA/CU-160/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Quail/THA/CU-161/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/THA/CU-162/05	20-aa deletion	E	R	N	H

* ชื่อเต็มของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในสามารถดูได้ที่ภาคผนวก

* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 320 -330

รูปที่ 14 ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ N-link glycosylation site ที่ตำแหน่ง 154-156 (N-T)

		154*	156*
	* * * * *		
Goose/Guangdong/1/96	SSGVSSACPYHGRSSFFRNVVWLIKKN	SA	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Goose/Guangdong/3/97	SSGVSSACPYHGRSSFFRNVVWLIKKN	SA	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
A/crested_eagle/Belgium/01/2004	SLGVSSACPYQGKPSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
A/chicken/Kurgan/05/2005	SSGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	NA	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
A/duck/Kurgan/08/2005	SSGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	NA	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
A/duck/Novosibirsk/56/2005	SSGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	NA	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	SSGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	SA	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
A/goose/Novosibirsk/4/2005	SSGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	NA	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Quail/Boyolali/BPPV4/04	SSGVSSACPYLGRSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Ck/Kupang-1-NIT/BPPV6/04	SSGVSSACPYLGRSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Dk/Indonesia/MS/04	SSGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	SA	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/Parepare/BBVM/05	SSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Ck/Dairi/BPPVI/05	SLGVSSACPYLGRSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
A/Ck/Salatiga/BBVet-I/05	SSGVSSACPYLGRSSFFRNVVWLIKKN	SS	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Ck/Viet_Nam/33/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Ck/Viet_Nam/35/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Ck/Viet_Nam/TG-023/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/Vietnam/376/05	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
A/duck/Vietnam/543/05	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/Vietnam/393/05	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/Vietnam/48/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/Vietnam/S654/05	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/Nakorn-Patom/THA/CU-K2/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Peacock/THA/CU-16/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Crow/THA/CU-4/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Crow/THA/CU-15/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Phasant/THA/CU-18/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Crow/THA/CU-35/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Pigeon/THA/CU-202/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Sparrow/THA/CU-203/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Mynas/THA/CU-209/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-23/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-21/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-01/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-03/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-07/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-08/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-09/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-10/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-11/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-12/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-14/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-17/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-38/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Chicken/THA/CU-39/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-02/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-05/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-71/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-74/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-76/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-77/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-89/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-90/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-93/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-95/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'
Duck/THA/CU-98/04	SLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIKKN	ST	YPTIKRSYNNNTNQEDLL'

* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 154 - 156

รูปที่ 15 ผลการเปรียบเทียบบริเวณ stalk region ที่ตำแหน่ง 49-68

		49*	68*	
Goose/Guangdong/1/96	GIISLMLQIGNIISIWVSHSIQTGNQHQAEF	CNQSIIITYENNTWVNQTYVM	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Goose/Guangdong/3/97	GIVSLMLQIGNIISIWVSHSIQTGNQHQAEF	CNQSIIITYENNTWVNQTYVM	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Ck/Kupang-1-NTT/BPPV6/04	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	TSNTNFLT	TEKAVASVTL/
Quail/Boyolali/BPPV4/04	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	ISNNNFLT	TEKAVASVTL/
Dk/Indonesia/MS/04	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/Dairi/BPPVI/05	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Ck/Salatiga/BEVet-I/05	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	IGNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/Parepare/BBVM/2005	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/Vietnam/S654/2005	GIVSLMLQVGNMISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Ck/Kurgan/05/05	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	ISNTKFLT	TEKAVASVTL/
Duck/Kurgan/08/05	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	ISNTKFLT	TEKAVASVTL/
crested_eagle/Belgium/01/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Goose/Novosibirsk/4/05	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	ISNTKFLT	TEKAVASVTL/
Duck/Novosibirsk/56/05	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIQTGNQHQAEF	-----	ISNTKFLT	TEKAVASVTL/
Ck/Viet_Nam/TG-023/04	GIVNMLQVGNMISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Ck/Viet_Nam/33/04	GIVSLMLQVGNMISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Ck/Viet_Nam/35/04	GIVSLMLQVGNMISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/Vietnam/376/05	GIVSLMLQVGNMISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/Vietnam/543/05	GIVSLMLQVGNMISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/Vietnam/393/2005	GIVSLMLQVGNMISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
A/duck/Vietnam/48/2004	GIVSLMLQIGNMISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/Nakorn-Patom/THA/CU-K2/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Crow/THA/CU-4/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Crow/THA/CU-15/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Peacock/THA/CU-16/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Pheasant/THA/CU-18/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Ostrich/THA/CU-19/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Roller/THA/CU-26/04	-----	-----	ASVTL/	
Ostrich/THA/CU-31/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Crow/THA/CU-35/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Pigeon/THA/CU-202/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Sparrow/THA/CU-203/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Mynas/THA/CU-209/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-23/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-21/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-01/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-03/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-07/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-08/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-09/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-10/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-11/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-12/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-14/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-17/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-38/04	GTVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Chicken/THA/CU-39/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-02/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-05/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-71/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-74/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-76/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-77/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSVHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-89/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-90/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-93/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-95/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/
Duck/THA/CU-98/04	GMVSLMLQIGNLISIWVSHSIHTGNQHQAEF	-----	ISNTNFLT	TEKAVASVTL/

* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 49 - 68

รูปที่ 17 ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่ง 293 (R to K)

และ 295 (N to S)

		R293*	N295*
Goose/Guangdong/1/96	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Goose/Guangdong/3/97	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Ck/Kupang-1-NTT/BPPV6/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Quail/Boyolali/BPPV4/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Dk/Indonesia/MS/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/Dairi/BPPVI/05	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Ck/Salatiga/BBVet-I/05	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/Parepare/BBVM/2005	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/Vietnam/S654/2005	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Ck/Kurgan/05/05	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/Kurgan/08/05	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
crested_eagle/Belgium/01/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Goose/Novosibirsk/4/05	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/Novosibirsk/56/05	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Ck/Viet_Nam/TG-023/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Ck/Viet_Nam/33/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Ck/Viet_Nam/35/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/Vietnam/376/05	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/Vietnam/543/05	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/Vietnam/393/2005	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
A/duck/Vietnam/48/2004	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/Nakorn-Patom/THA/CU-K2/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Crow/THA/CU-4/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Crow/THA/CU-15/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Peacock/THA/CU-16/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Pheasant/THA/CU-18/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Ostrich/THA/CU-19/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Roller/THA/CU-26/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Ostrich/THA/CU-31/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Ostrich/THA/CU-31/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Crow/THA/CU-35/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Pigeon/THA/CU-202/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Sparrow/THA/CU-203/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Mynas/THA/CU-209/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-23/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-21/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-01/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-03/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-07/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-08/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-09/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-10/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-11/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-12/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-14/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-17/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-38/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Chicken/THA/CU-39/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-02/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-05/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-71/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-74/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-76/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-77/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-89/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-90/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-93/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-95/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H
Duck/THA/CU-98/04	PNYHYEECSCTPDAGEITCVGRN	W	H

* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ R293 และ N295

รูปที่ 18 ผลแสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่ง 275 (H to Y)

H275*

Goose/Guangdong/1/96	YKIFKMEKGKVVKSVELNAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Goose/Guangdong/3/97	YKIFKMEKGKVVKSVELNAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Ck/Kupang-1-NIT/BPPV6/04	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Quail/Boyolali/BPPV4/04	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Dk/Indonesia/MS/04	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/Dairi/BPPVI/05	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Ck/Salatiga/BBVet-I/05	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/Parepare/BBVM/2005	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/Vietnam/S654/2005	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Ck/Kurgan/05/05	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/Kurgan/08/05	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
crested_eagle/Belgium/01/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Goose/Novosibirsk/4/05	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/Novosibirsk/56/05	YKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Ck/Viet_Nam/TG-023/04	HKIFKMEKGKVVKSVELNAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Ck/Viet_Nam/33/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Ck/Viet_Nam/35/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/Vietnam/376/05	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/Vietnam/543/05	HKIFKMEKGKVVKSVELNAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/Vietnam/393/2005	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
A/duck/Vietnam/48/2004	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/Nakorn-Patom/THA/CU-K2/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Crow/THA/CU-4/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Crow/THA/CU-15/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Peacock/THA/CU-16/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Pheasant/THA/CU-18/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Ostrich/THA/CU-19/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Roller/THA/CU-26/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Ostrich/THA/CU-31/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Crow/THA/CU-35/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Pigeon/THA/CU-202/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Sparrow/THA/CU-203/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Mynas/THA/CU-209/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-23/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-21/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-01/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-03/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-07/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-08/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-09/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-10/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-11/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-12/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-14/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-17/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-38/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Chicken/THA/CU-39/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-02/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-05/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-71/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-74/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-76/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-77/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-89/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-90/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-93/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-95/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV
Duck/THA/CU-98/04	HKIFKMEKGKVVKSVELDAPNHYEECSCTPDAGEITCV

* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ H275

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ที่พบในประเทศไทยในช่วงปี 2004-2005 โดยธรรมชาติแล้วเชื้อไวรัสไข้หวัดนกเป็น RNA virus ซึ่งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัสชนิดนี้จึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อที่จะได้ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัส ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในอนาคต การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถสรุปผลการทดลองแบ่งออกเป็น

- ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน H5 และ N1
- การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆของยีน H5 และ N1

1. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน H5 และ N1

ความสัมพันธ์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจำนวน 43 ตัวอย่างในการศึกษาค้นคว้า ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากสัตว์ปีกในประเทศไทยในช่วงปี 2004-2005 พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ศึกษามีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน โดยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เป็นตัวแทนของเชื้อในประเทศไทยในรอบการระบาดครั้งที่ 1 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) และครั้งที่ 2 (Chicken/Thailand/CU-23/04) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนกในประเทศไทยเป็นเชื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันและทำให้เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย และเมื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้ในประเทศไทยกับเชื้อที่แยกได้ในประเทศต่างๆ พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่พบในประเทศเวียดนาม ในปี 2004-2005 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Viseshakul และคณะ (2004) ที่ทำการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดนก A/Chicken/Nakon-Pathom/Thailand/CU-K2/04 และพบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่แยกได้จากเวียดนามเช่นเดียวกัน (Thailand and Vietnam lineage) แต่จัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อที่พบในประเทศอินโดนีเซีย จีน และประเทศแถบทวีปยุโรป ในช่วงปี 2004-2005

นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Chen และ คณะ (2006) ที่หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ระบาดในประเทศแถบเอเชียในช่วงปี 2004-2005 พบว่า เชื้อที่แยกได้จากประเทศไทย เวียดนาม มาเลเซีย จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (VTM lineage) แต่จัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อที่พบในประเทศอินโดนีเซีย (IND lineage) และสอดคล้องกับรายงานของ Smith และคณะ (2006) ที่พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ปี 2003-2005 ที่แยกจากประเทศเวียดนามตอนเหนือจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อจากประเทศไทยและแยกกลุ่มออกจากอินโดนีเซีย

นอกจากนี้ผลการศึกษานี้ยังสามารถแสดงได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้ในประเทศไทย มีวิวัฒนาการมาจากเชื้อไวรัส Gs/Gd/96-lineage ซึ่งเป็นเชื้อที่พบในประเทศจีนตอนใต้ในปี 1996 (Li et al., 2004) และเป็นไวรัสต้นกำเนิดของการระบาดที่พบในปี 1997 ที่ประเทศฮ่องกง (Xu et al., 1999) รวมทั้งเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยยังจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 genotype Z เช่นเดียวกับเชื้อที่แยกได้ในประเทศเวียดนาม อินโดนีเซีย ฮ่องกง และบางมณฑลของจีน ซึ่งเป็น genotype ที่เริ่มพบตั้งแต่การระบาดในปี 2002 (Chen et al., 2006; Li et al., 2004)

2. การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆของยีน H5 และ N1

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 ของเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากสัตว์ปีกในเขตกรุงเทพมหานครมีค่ามากกว่า 99 % และเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน N1 ของเชื้อไข้หวัดนกมีค่าประมาณ 97-99 % และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดนกในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการเก็บมาจากการระบาดในเดือนกุมภาพันธ์ – สิงหาคม 2004 พบว่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 มีค่ามากกว่า 99 % และมากกว่า 97 % ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในจากพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานครในการศึกษานี้มีความใกล้เคียงกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในช่วงต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อไข้หวัดนกในแต่ละตัวอย่างพบว่าเชื้อไวรัสยังคงมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 ของเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากไก่ในพื้นที่ต่างๆในช่วงปี 2004 - 2005 มีค่ามากกว่า 99% และเมื่อหาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน N1 มีค่าประมาณ 96-97 % ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในช่วงต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04)

ทั้งนี้การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการหาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากพื้นที่ในกรุงเทพมหานครเท่านั้น ในส่วนของจังหวัดอื่นๆ นั้นอาจจะต้องทำการเก็บตัวอย่างให้มีจำนวนมากขึ้น และเก็บตัวอย่างซ้ำในพื้นที่นั้น เพื่อให้มีจำนวนตัวอย่างเพียงพอและสามารถดูการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไข้หวัดนกได้ชัดเจนมากขึ้น

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าบริเวณ HA cleavage site ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจำนวน 43 ตัวอย่างมีลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ multiple basic amino acids แต่มีความหลากหลายของการเรียงตัวของกรดอะมิโนชนิด Arginine (R) และ Lysine (K) ที่ตำแหน่งที่ 320-330 ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ 3 แบบ คือ RRRKKR/G, RKRRKKR/G, KRRKKRR/G

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ได้จากประเทศต่างๆ ที่มีรายงานการระบาดตั้งแต่ปี 1997-2005 ซึ่งจะพบลักษณะของ multiple basic amino acids เรียงตัวแบบ RRRKKR/G เป็นส่วนใหญ่ เช่นเชื้อไวรัสที่แยกได้ในฮ่องกง (Claas et al., 1998), เวียดนาม อินโดนีเซีย (Smith et al., 2006), จีน (Zhou et al., 2006) และสามารถพบความหลากหลายของการเรียงตัวของกรดอะมิโนได้ โดยอาจจะเป็นการเพิ่มหรือขาดหายไปของกรดอะมิโน R หรือ K ในบางตำแหน่งบน HA cleavage site เช่น เชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศเกาหลีใต้ พบการเรียงตัวแบบ KRKK-R/G (Lee et al., 2005) ถึงแม้ว่าจะพบการหายไปของกรดอะมิโน 1 ตัว แต่เชื้อไวรัสไข้หวัดนกก็ยังคงเป็นชนิดที่ก่อโรครุนแรงได้เช่นกัน (Muramoto et al., 2006)

บริเวณ HA cleavage site เป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัส โดยพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบเบสจำนวนมาก (multiple basic amino acid) ได้ใช้เป็นลักษณะที่ใช้ในการนิยามเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดที่ก่อโรครุนแรง (Highly Pathogenic Avian influenza (HPAI)) (Claas et al., 1998; Steinhauer, 1999)

Receptor binding site เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนบนเยื่อ HA ที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการเกาะจับบนเซลล์โฮสต์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก มีรายงานถึงความแตกต่างของกรดอะมิโนบน receptor binding site ซึ่งเกี่ยวข้องกับความจำเพาะในการก่อโรคของเชื้อไวรัสในโฮสต์ชนิดต่างๆ โดยมีรายงานว่าพบกรดอะมิโน Glutamine ที่ตำแหน่ง 222 และ Glycine ที่ตำแหน่ง 224 (Q222-G224) จะเป็นลักษณะของเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์ปีก และสามารถเข้าจับกับ receptor ชนิด α 2-3 linked sialic acid ซึ่งเป็น receptor ที่พบในสัตว์ปีก แต่เชื้อไวรัสที่ก่อโรคในคนจะพบกรดอะมิโน leucine (L) ที่

ตำแหน่ง 222 (226 in H3 numbering) และจะจับกับ receptor ชนิด α 2-6 linked sialic acid (Ha et al., 2001; Gambaryan et al., 2006)

การศึกษาค้นคว้านี้สอดคล้องกับรายงานของ Ha และคณะ (2001) ซึ่งแสดงการพบลักษณะกรดอะมิโน Glutamine และ Glycine (Q222-G224) ที่ตำแหน่ง 222 และ 224 ตามลำดับ ในเชื้อไวรัสไข้หวัดนกทุกตัวอย่าง นอกจากนี้มีรายงานในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา เช่น รายงานการเกิดโรคไข้หวัดนกในประเทศฮ่องกงปี 1997 พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่แยกได้จากคนนั้นมีลักษณะของ receptor binding site ที่จำเพาะกับ receptor binding site ในสัตว์ปีก (Claas et al., 1998) และสอดคล้องกับรายงานผู้ป่วยในประเทศไทยซึ่งพบลักษณะ receptor binding site ที่พบได้ในสัตว์ปีกเช่นเดียวกัน (Puthavathana et al., 2005) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าเชื้อไวรัสที่มี receptor binding site ที่จับกับ receptor ชนิด α 2-3 linked sialic acid ซึ่งเหมาะสมกับสัตว์ปีก สามารถเพิ่มจำนวนและทำให้เกิดโรคในคนได้

N-link glycosylation site เป็นตำแหน่งที่พบการเรียงตัวของกรดอะมิโน Asparagine -X-Threonine/Serine (N-X-T/S) (Robert et al., 1993) ในรายงานของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในประเทศฮ่องกงและประเทศไทย พบ glycosylation site ที่ตำแหน่ง 154-156 (Claas et al., 1998; Amonsin et al., 2006) ทั้งนี้การพบ glycosylation site ที่ตำแหน่ง 154-156 (NST) ซึ่งเป็นบริเวณที่ใกล้เคียงกับ receptor binding site และ antigenic site บนโปรตีน HA อาจมีผลต่อการจับบน receptor และอาจช่วยให้เชื้อไวรัสสามารถหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของ host (Li et al., 2004)

การศึกษาค้นคว้านี้พบ glycosylation site ทั้งหมด 7 ตำแหน่งบนโปรตีน HA1 และพบการเพิ่มของ glycosylation site ที่ตำแหน่ง 154-156 สอดคล้องกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากคนและสัตว์ในประเทศไทย (Puthavathana et al., 2005; Amonsin et al., 2006) รวมทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศเวียดนามในช่วงปี 2004-2005 ซึ่งพบการเพิ่ม glycosylation site ที่บริเวณ 154-156 1 ตำแหน่ง และอาจมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อไวรัส (Matrosovich et al., 1999) อย่างไรก็ตามไม่พบ glycosylation site ที่ตำแหน่งนี้ในเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกจากประเทศจีนในปี 1996 และ 1997

NA stalk region เป็นบริเวณกรดอะมิโนบน stalk ของโปรตีน NA และเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของ NA stalk (Castrucci and Kawaoka, 1993) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน stalk region ของโปรตีน NA เกี่ยวข้องกับการปรับตัวหรือวิวัฒนาการของเชื้อไข้หวัดนกในการติดเชื้อจากนกน้ำ นกป่ามายังสัตว์ปีกชนิดเลี้ยงไว้ เช่น ไก่ เป็ด (Wan et al., 2005) รายงานการศึกษา NA stalk region ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกพบว่าเชื้อที่แยกได้จากประเทศจีนในปี 1996 นั้นยังไม่มีเปลี่ยนแปลงของ

กรดอะมิโนที่บริเวณ stalk region แต่เริ่มพบการเปลี่ยนแปลงโดยมีลักษณะการลดจำนวนของกรดอะมิโนจำนวน 19 ตัว (19-amino acid deletion) จากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากฮ่องกงในปี 1997 (A/HK/156/97) (Subbrarao et al., 1998) หลังจากนั้นเริ่มมีรายงานพบ 20-amino acid deletion (49-68) จากเชื้อที่แยกได้ตั้งแต่ปี 2002 รวมทั้งเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทย (Li et al., 2004)

การศึกษาค้นพบการลดจำนวนของกรดอะมิโนจำนวน 20 ตัว (20-amino acid deletion) ที่ตำแหน่ง 49-68 และสอดคล้องกับรายงานของ Viseshakul และคณะ (2004) ที่พบ 20-amino acid deletion บริเวณ stalk region รวมทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศเวียดนาม (Muramoto et al., 2006) ซึ่งแตกต่างไปจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ระบาดก่อนปี 2002 แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาและมีการปรับตัวหรือวิวัฒนาการให้เหมาะสมต่อการติดเชื้อในสัตว์ปีกชนิดต่างๆ

การรักษาผู้ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสามารถรักษาโดยใช้ยาในกลุ่ม neuraminidase inhibitor ได้แก่ oseltamivir, zanamivir ซึ่งยาต้านไวรัสกลุ่มนี้จะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ neuraminidase ทำให้ไม่สามารถปล่อยเชื้อไวรัสออกจากเซลล์ โดยปกติบริเวณ NA active site เป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ neuraminidase และปล่อยเชื้อไวรัสออกจากเซลล์ (Wilschut and Mc Elhaney, 2005) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในบริเวณ NA active site จะมีผลต่อเอนไซม์นิวรามินิเดส ทำให้เชื้อไวรัสติดต่อด้านไวรัส เช่น รายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในบางตำแหน่งบนบริเวณ NA active site คือ 119 (E119V), 293 (R293K), 295 (N295S), 275 (H275Y) ซึ่งจะส่งผลให้เชื้อไวรัสไข้หวัดนกต้านต่อยา oseltamivir (Mc-Kimm Breschin et al., 2001) รายงานการรักษาโดยใช้ยา oseltamivir ในผู้ป่วยชาวเวียดนามที่เสียชีวิตจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน NA active site ที่ตำแหน่ง 275 (H to Y) ส่งผลให้เชื้อไวรัสไข้หวัดนกต้านต่อยา oseltamivir (de Jong et al., 2005) การศึกษาค้นพบยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ (119, 293, 295, 275) ของยีน NA ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ใช้ในการศึกษาค้นพบนี้ยังไม่มีลักษณะที่มีผลต่อการติดต่อยา oseltamivir

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่แยกได้ในประเทศไทยในปี 2004-2005 จำนวน 43 ตัวอย่าง รวมทั้งวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งที่สำคัญซึ่งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงและกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่า

1. เชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้เป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 รวมทั้งได้ข้อมูลลำดับเบสของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจำนวน 43 ตัวอย่าง (จำนวน 86 เส้น) และนำข้อมูลลำดับเบสของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
2. เชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน รวมทั้งอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีการระบาดในประเทศไทย และเวียดนาม
3. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ บนยีน H5 ทำให้ทราบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้นั้นเป็นชนิดที่ก่อโรครุนแรงโดยดูจากกรดอะมิโนบน HA cleavage site ที่มีการเรียงตัวแบบกรดอะมิโนจำนวนมาก และพบลักษณะ receptor binding site ของเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์ปีก รวมทั้งลักษณะของการเพิ่มของ glycosylation site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 154-156 บนยีน H5
4. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ บนยีน N1 พบการลดจำนวนของกรดอะมิโนจำนวน 20 ตัวบน NA stalk region แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่มีผลต่อการติดยาด้านไวรัสของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีประโยชน์ในด้านการหาข้อมูลของรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ปีกในประเทศไทย และสามารถนำรหัสพันธุกรรมไปเผยแพร่ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลสำหรับนักวิทยาศาสตร์และผู้สนใจที่ต้องการจะศึกษาถึงข้อมูลรหัสพันธุกรรมในเชิงลึกและสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงต่อไปได้ นอกจากนี้ ข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกทำให้ทราบถึงลักษณะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำไปใช้เฝ้าระวังการเกิดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกตัวใหม่ และนำมาใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดแนวทางการควบคุม และป้องกันโรคไข้หวัดนกได้

ข้อเสนอแนะ

1. ด้านความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัส

เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกเป็นเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงได้รวดเร็ว ส่งผลให้เชื้อสามารถเกิดสายพันธุ์ใหม่และอาจก่อให้เกิดความรุนแรงขึ้นได้ ดังเช่นเหตุการณ์ที่เกิดการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ในปี 1997 ที่ประเทศฮ่องกง ที่เชื้อไวรัสสามารถติดจากสัตว์ปีกมาสู่คนได้โดยตรง ทำให้ผู้ติดเชื้อไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันในการป้องกันเชื้อนี้ได้ ดังนั้นการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ โดยการเฝ้าระวังนั้นควรทำทั้งในด้านการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสังเกตการเปลี่ยนแปลงของยีนต่างๆ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะสามารถบอกได้ว่าการระบาดที่เกิดขึ้นนั้นมาจากเชื้อไวรัสที่อยู่ในกลุ่มใด ซึ่งอาจจะยังคงเป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มเดิม หรือเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่

การศึกษานี้ได้ทำการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเฉพาะยีน H5 และ N1 ดังนั้นการศึกษาต่อไปอาจจะทำการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนทั้งหมดให้ครบทั้ง 8 ยีนร่วมด้วย เพื่อให้สามารถทราบถึงลักษณะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชื้อไวรัสไข้หวัดนกได้ชัดเจนมากขึ้น

2. ด้านการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์

ในด้านการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกนั้น นอกจากจะเก็บตัวอย่างในสัตว์ปีกแล้วนั้น สิ่งที่จะต้องทำต่อไปคือทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างให้หลากหลาย เช่น การเก็บตัวอย่างในสัตว์หลากหลายชนิด เช่น สัตว์ปีกป่า สัตว์ป่า สุนัข และแมว และเก็บตัวอย่างจากหลากหลายพื้นที่ในประเทศไทย ทั้งนี้การเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสจะต้องทำการเก็บตัวอย่างอย่างต่อเนื่อง ทั้งในช่วงที่มีการระบาดและไม่มีระบาด เพื่อเป็นการติดตามการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่อาจเกิดขึ้นได้ และข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบคุณสมบัติหรือลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ซึ่งใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการวางนโยบายการควบคุมและป้องกันโรคได้ในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- Amonsin, A., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Thanawongnuwech, R., Suradhat, S., Pariyothorn, N., Tantilertcharoen, R., Damrongwantanapokin, S., Buranathai, C., Chaisingh, A., Songserm, T. and Poovorawan, Y. 2006. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. Virology. 344(2): 480-491.
- Bender, C., Hall, H., Huang, J., Klimov, A., Cox, N., Hay, A., Gregory, V., Cameron, K., Lim, W. and Subbarao, K. 1999. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998. Virology. 254(1): 115-123.
- Bright, R.A., Ross, T.M., Subbarao, K., Robinson, H.L. and Katz, J.M. 2003. Impact of glycosylation on the immunogenicity of a DNA-based influenza H5 HA vaccine. Virology. 308(2): 270-278.
- Brown, E.G. 2000. Influenza virus genetic. Biomed. Pharmacother. 54(4): 196-209.
- Castrucci, M. and Kawaoka, Y. 1993. Biologic importance of neuraminidase stalk region length in influenza A virus. J. Virol. 67(2): 759-764.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. "Avian influenza: current situation." [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/flu/avian/outbreaks/current.htm#animals>
- Chen, H., Smith, G.J., Li, K.S., Wang, J., Fan, X.H., Rayner, J.M., Vijaykrishna, D., Zhang, L.X., Zhang, L.J., Guo, C.T., Cheung, C.L., Xu, K.M., Duan, L., Huang, K., Qin, K., Leung, Y.H., Wu, W.L., Lu, H.R., Chen, Y., Xia, N.S., Naipospos, T.S., Yuen, K.Y., Hassen, S.S., Bahri, S., Nguyen, T.D., Webster, R.G., Peiris, J.S. and Guan Y. 2006. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103(8): 2845-2850.
- Claas, E.C., Osterhaus, A.D., van Beek, R., De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Senne, D.A., Krauss, S., Shortridge, K.F. and Webster, R.G. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet. 351(9101): 472-477.

- Department of Livestock Development (DLD). 2006."Avian Influenza situation and control measures."[Online].Available:
http://www.dld.go.th/home/bird_flu/Livestock_by_En_don.html
- De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A. and Osterhaus, A.D. 2000. Influenza virus: a master of metamorphosis. J. Infect. 40(3): 218-228.
- de Jong, M.D., Tran, T.T., Truong, H.K., Vo, M.H., Smith, G.J., Nguyen, V.C., Bach, V.C., Phan, T.Q., Do, Q.H., Guan, Y., Peiris, J.S., Tran, T.H., Farrar, J. 2005. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. N. Engl. J. Med. 353. 2667-2672.
- de Jong, M.D. and Hien, T.T. 2006. Avian influenza A (H5N1). J. Clin. Virol. 35(1): 2-13.
- Easterday, B.C., Hinshaw, V.S. and Halverson, D.A. 1997. Influenza. In : Disease of poultry. B.W. Calnek, H. J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, Y.M. Saif (ed.) Iowa: Iowa State University Press. 583-608.
- Fouchier, R.A.M., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfsy, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B. and Osterhaus, A.D. 2004. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from Black-Head gulls. J. Virol. 79(5): 2814-2822.
- Gambaryan, A., Tuzikov, A., Pazynina, G., Bovin, N., Balish, A. and Klimov, A. 2006. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. Virology. 344(2): 432-438.
- Gao, P., Watanabe, S., Ito, T., Goto, H., Wells, K., McGregor, M., Cooley, A.J. and Kawaoka, Y. 1999. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. J. Virol. 73(4): 3184-3189.
- Guan, Y., Peiris, J.S., Lipatov, A.S., Ellis, T.M., Dyrting, K.C., Krauss, S., Zhang, L.J., Webster, R.G. and Shortridge, K.F. 2002. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99(13): 8950-8955.
- Gubareva, L.V., McCullers, J.A., Bethell, R.C. and Webster, R.G. 1998. Characterization of influenza A/HongKong/156/97 (H5N1) virus in a mouse model and protective effect of zanamivir on H5N1 infection in mice. J. Infect. Dis. 178(6): 1592-1596.
- Gubereva, L.V. 2004. Molecular mechanism of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. Virus. Res. 103(1-2): 199-203.

- Ha, Y., Stevens, D.J., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. 2001. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98(20): 11181-11186.
- Hughes, M.T., McGregor, M., Suzuki, T., Suzuki, Y. and Kawaoka, Y. 2001. Adaptation of influenza A viruses to cells expressing low levels of sialic acid leads to loss of neuraminidase activity. J. Virol. 75(8): 3766-3770.
- Hulse, D.J., Webster, R.G., Russell, R.J. and Perez, D.R. 2004. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. J. Virol. 78(18): 9954-9964.
- Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier, R.A., Amonsin, A., Payungporn, S., Noppornpanth, S., Wattanodorn, S., Theambooniers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsarn, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, D.M. and Poovorawan, Y. 2004. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerg. Infect. Dis. 10(12): 2189-2191.
- Kiso, M., Mitamura, K., Sakai-Tagawa, Y., Shiraishi, K., Kawakami, C., Kimura, K., Hayden, F.G., Sugaya, N. and Kawaoka, Y. 2004. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. Lancet. 364(9436): 759-765.
- Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G. and Osterhaus, A.D. 2003. Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). Vet. Pathol. 40(3): 304-310.
- Lamp, R.A. and Choppin, P.W. 1983. The gene structure and replication of influenza virus. Ann. Rev. Biochem. 52: 467-506.
- Lee, C.W., Suarez, D.L., Tumpey, T.M., Sung, H.W., Kwon, Y.K., Lee, Y.J., Choi, J.G., Joh, S.J., Kim, M.C., Lee, E.K., Park, J.M., Lu, X., Katz, J.M., Spackman, E., Swayne, D.E. and Kim, J.H. 2005. Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. J. Virol. 79(6): 3692-3702.
- Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J., Xu, K.M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. and Peiris, J.S. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. Nature. 430(6996): 209-213.

- Ligon, B.L. 2005. Avian influenza virus H5N1: a review of its history and information regarding its potential to cause the next pandemic. Semin. Pediatr. Infect. Dis. 16(4): 326-335.
- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y. and Webster, R. 1999. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. J. Virol. 73(2): 1146-1155.
- Moscona, A. 2005. Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. N. Engl. J. Med. 353(25), 2633-2636.
- McKimm-Breschkin, J., Sahasrabudhe, A., Blick, T. and McDonald, M. 2001. Mechanisms of resistance of influenza virus to neuraminidase inhibitors. Int. Congr. Ser. 1219: 855-861.
- Muramoto, Y., Le, T.Q., Phuong, L.S., Nguyen, T., Nguyen, T.H., Sakai-Tagawa, Y., Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Kida, H. and Kawaoka, Y. 2006. Molecular characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 influenza A viruses isolated from poultry in Vietnam from 2004 to 2005. J. Vet. Med. Sci. 68(5): 527-531.
- Nguyen, D.C., Uyeki, T.M., Jadhao, S., Maines, T., Shaw, M., Matsuoka, Y., Smith, C., Rowe, T., Lu, X., Hall, H., Xu, X., Balish, A., Klimov, A., Tumpey, T.M., Swayne, D.E., Huynh, L.P., Nghiem, H.K., Nguyen, H.H., Hoang, L.T., Cox, N.J. and Katz, J.M. 2005. Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001. J. Virol. 79(7): 4201-4212.
- Office International des Epizooties (OIE). 2005a. "Old Classification of Diseases Notifiable to the OIE." [Online]. Available: http://www.oie.int/eng/maladies/en_OldClassification.htm.
- Office International des Epizooties (OIE). 2005b. "Avian Influenza" [Online]. Available: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm
- Office International des Epizooties (OIE). 2006. "Update on Avian Influenza in Animals (TYPE 5)" [Online]. Available: http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm
- Osterhaus, A.D., de Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F. and Claas, E.C. 2002. H5N1 influenza in Hong Kong: virus characterizations. Vaccine. 20. Suppl. 2: S82-83.

- Payungporn, S., Phakdeewirot, P., Chutinimitkul, S., Theamboonlers, A., Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Amonsin, A. and Poovorawan, Y. 2004. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. Viral. Immunol. 17(4): 588-593.
- Puthavathana, P., Auewarakul, P., Chor Charoenying, P., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Boonnak, K., Khanyok, R., Thawachsupha, P., Kijphati, R. and Sawanpanyalert, P. 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. J. Gen. Virol. 86: 423-433.
- Roberts, P.C., Garten, W. and Klenk, H.D. 1993. Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. J. Virol. 67(6), 3048-3060.
- Smith, G.J., Naipospos, T.S., Nguyen, T.D., de Jong, M.D., Vijaykrishna, D., Usman, T.B., Hassan, S.S., Nguyen, T.V., Dao, T.V., Bui, N.A., Leung, Y.H., Cheung, C.L., Rayner, J.M., Zhang, J.X., Zhang, L.J., Poon, L.L., Li, K.S., Nguyen, V.C., Hien, T.T., Farrar, J., Webster, R.G., Chen, H., Peiris, J.S. and Guan, Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. Virology. 350(2): 258-268.
- Songsermn, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Meemak, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2006. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. Emerg. Infect. Dis. 12(4): 681-683.
- Steinhauer, D.A. 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. Virology. 258(1):1-20.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. and Cox, N. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. Science. 279(5349), 393-396.
- Suzuki, Y. 2005. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biol. Pharm. Bull. 28(3): 399-408.

- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tantilertcharoen, R., Damrongwatanapokin, S., Theamboonlers, A., Payungporn, S., Nanthapornphiphat, K., Ratanamungklanon, S., Tunak, E., Songserm, T., Vivatthanavanich, V., Lekdumrongsak, T., Kesdaangakonwut, S., Tunhikorn, S. and Poovorawan, Y. 2005. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. Emerg. Infect. Dis. 11(5): 699-701.
- Vines, A., Wells, K., Matrosovich, M., Castrucci, M.R., Ito, T. and Kawaoka, Y. 1998. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. J. Virol. 72(9): 7626-7631.
- Viseshakul, N., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Suradhat, S., Payungporn, S., Keawchareon, J., Oraveerakul, K., Wongyanin, P., Plitkul, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2004. The genome sequence analysis of H5N1 avian influenza A virus isolated from the outbreak among poultry populations in Thailand. Virology. 328(2): 169-76.
- Wan, X.F., Ren, T., Luo, K.J., Liao, M., Zhang, G.H., Chen, J.D., Cao, W.S., Li, Y., Jin, N.Y., Xu, D. and Xin, C.A. 2005. Genetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in southern China during the 2003-04 avian influenza outbreaks. Arch. Virol. 150(6): 1257-1266.
- Webster, R.G., Shortridge, K.F. and Kawaoka, Y. 1997. Influenza: interspecies transmission and emergence of new pandemics. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 18(4): 275-279.
- Wilschut, J and McElhaney, J.E. 2005. Antigenic Drift and Shift: Epidemic and Pandemic Influenza. In : Influenza. London: Elsevier Limited. 47-53.
- World Health Organization (WHO). 2006. "Cumulative number of confirmed human cases of Avian Influenza A(H5N1) reported to WHO." [Online]. Available: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_02_20/en/
- Xu, X., Subbarao, Cox, N.J. and Guo, Y. 1999. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. Virology. 261(1): 15-19.

- Zhou, H., Jin, M., Chen, H., Huag, Q. and Yu, Z. 2006. Genome-sequence analysis of the pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated in China in 2004. Virus. Genes. 32(1): 85-95.
- Zitzow, L.A., Rowe, T., Morken, T., Shieh, W.J., Zaki, S. and Katz, J.M. 2002. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. J. Virol. 76(9): 4420-4429.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 1

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ (กรดอะมิโน) ของยีน H5 ในสัตว์
ปีกที่แยกได้จากพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานคร

	CU-K2	CU-03	CU-04	CU-15	CU-16	CU-18	CU-21	CU-23	CU-35
CU-K2		99.9(99.8)	99.9(99.8)	99.6(99.4)	99.6(99.4)	99.6(99.2)	99.9(99.8)	99.9(99.8)	99.7(99.6)
CU-03	99.9(99.8)		100(100)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.6(99.4)	100(100)	100(100)	99.8(99.8)
CU-04	99.9(99.8)	100(100)		99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.6(99.4)	100(100)	100(100)	99.8(99.8)
CU-15	99.6(99.4)	99.7(99.6)	99.7(99.6)		100(100)	99.9(99.8)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.5(99.4)
CU-16	99.6(99.4)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	100(100)		99.9(99.8)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.5(99.4)
CU-18	99.6(99.2)	99.6(99.4)	99.6(99.4)	99.9(99.8)	99.9(99.8)		99.6(99.4)	99.6(99.4)	99.4(99.2)
CU-21	99.9(99.8)	100(100)	100(100)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.6(99.4)		100(100)	99.8(99.8)
CU-23	99.9(99.8)	100(100)	100(100)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.6(99.4)	100(100)		99.8(99.8)
CU-35	99.7(99.6)	99.8(99.8)	99.8(99.8)	99.5(99.4)	99.5(99.4)	99.4(99.2)	99.8(99.8)	99.8(99.8)	

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ (กรดอะมิโน) ของยีน N1 ในสัตว์
ปีกที่แยกได้จากพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานคร

	CU-K2	CU-03	CU-04	CU-15	CU-16	CU-18	CU-21	CU-23	CU-35
CU-K2		98.0(97.9)	98.0(97.9)	97.9(97.6)	97.9(97.6)	97.7(97.4)	99.2(99.0)	98.6(98.3)	97.8(97.2)
CU-03	98.0(97.9)		100(100)	99.9(99.7)	99.9(99.7)	99.6(99.5)	98.8(98.8)	98.3(98.1)	99.7(99.3)
CU-04	98.0(97.9)	100(100)		99.9(99.7)	99.9(99.7)	99.6(99.5)	98.8(98.8)	98.3(98.1)	99.7(99.3)
CU-15	97.9(97.6)	99.9(99.7)	99.9(99.7)		100(100)	99.7(99.7)	98.7(98.6)	98.2(97.9)	99.8(99.5)
CU-16	97.9(97.6)	99.9(99.7)	99.9(99.7)	100(100)		99.7(99.7)	98.7(98.6)	98.2(97.9)	99.8(99.5)
CU-18	97.7(97.4)	99.6(99.5)	99.6(99.5)	99.7(99.7)	99.7(99.7)		98.5(98.3)	98.4(98.1)	99.6(99.3)
CU-21	99.2(99.0)	98.8(98.8)	98.8(98.8)	98.7(98.6)	98.7(98.6)	98.5(98.3)		99.4(99.2)	98.6(98.1)
CU-23	98.6(98.3)	98.3(98.1)	98.3(98.1)	98.2(97.9)	98.2(97.9)	98.4(98.1)	99.4(99.2)		98.0(97.4)
CU-35	97.8(97.2)	99.7(99.3)	99.7(99.3)	99.8(99.5)	99.8(99.5)	99.6(99.3)	98.6(98.1)	98.0(97.4)	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ (กรดอะมิโน) ของยีน H5 ในไก่ที่
แยกได้จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทยช่วงปี 2004-2005

	CU-K2	CU-01	CU-03	CU-10	CU-21	CU-23	CU-39	CU-160	CU-162
CU-K2		99.7(99.6)	99.9(99.8)	99.8(99.6)	99.9(99.8)	99.9(99.8)	99.9(99.8)	99.6(99.2)	99.5(99.0)
CU-01	99.7(99.6)		99.8(99.8)	99.6(99.6)	99.8(99.8)	99.8(99.8)	99.8(99.8)	99.5(99.2)	99.4(99.0)
CU-03	99.9(99.8)	99.8(99.8)		99.8(99.8)	100(100)	100(100)	100(100)	99.7(99.4)	99.6(99.2)
CU-10	99.8(99.6)	99.6(99.6)	99.8(99.8)		99.8(99.8)	99.8(99.8)	99.8(99.8)	99.6(99.2)	99.4(99.0)
CU-21	99.9(99.8)	99.8(99.8)	100(100)	99.8(99.8)		100(100)	100(100)	99.7(99.4)	99.6(99.2)
CU-23	99.9(99.8)	99.8(99.8)	100(100)	99.8(99.8)	100(100)		100(100)	99.7(99.4)	99.6(99.2)
CU-39	99.9(99.8)	99.8(99.8)	100(100)	99.8(99.8)	100(100)	100(100)		99.7(99.4)	99.6(99.2)
CU-160	99.6(99.2)	99.5(99.2)	99.7(99.4)	99.6(99.2)	99.7(99.4)	99.7(99.4)	99.7(99.4)		99.8(99.8)
CU-162	99.5(99.0)	99.4(99.0)	99.6(99.2)	99.4(99.0)	99.6(99.2)	99.6(99.2)	99.6(99.2)	99.8(99.8)	

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ (กรดอะมิโน) ของยีน N1 ในไก่ที่
แยกได้จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทยช่วงปี 2004-2005

	CU-K2	CU-01	CU-03	CU-10	CU-21	CU-23	CU-39	CU-160	CU-162
CU-K2		98.0(97.9)	98.0(97.9)	97.8(97.6)	99.2(99.0)	98.6(98.3)	98.0(97.9)	97.1(96.0)	97.3(96.3)
CU-01	98.0(97.9)		100(100)	99.7(99.7)	98.8(98.8)	98.3(98.1)	100(100)	99.0(98.1)	99.2(98.3)
CU-03	98.0(97.9)	100(100)		99.7(99.7)	98.8(98.8)	98.3(98.1)	100(100)	99.0(98.1)	99.2(98.3)
CU-10	97.8(97.6)	99.7(99.7)	99.7(99.7)		98.6(98.6)	98.0(97.9)	99.7(99.7)	98.8(97.9)	98.9(98.1)
CU-21	99.2(99.0)	98.8(98.8)	98.8(98.8)	98.6(98.6)		99.4(99.2)	98.8(98.8)	97.9(96.9)	98.0(97.2)
CU-23	98.6(98.3)	98.3(98.1)	98.3(98.1)	98.0(97.9)	99.4(99.2)		98.3(98.1)	97.3(96.3)	97.5(96.5)
CU-39	98.0(97.9)	100(100)	100(100)	99.7(99.7)	98.8(98.8)	98.3(98.1)		99.0(98.1)	99.2(98.3)
CU-160	97.1(96.0)	99.0(98.1)	99.0(98.1)	98.8(97.9)	97.9(96.9)	97.3(96.3)	99.0(98.1)		99.6(99.3)
CU-162	97.3(96.3)	99.2(98.3)	99.2(98.3)	98.9(98.1)	98.0(97.2)	97.5(96.5)	99.2(98.3)	99.6(99.3)	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการสกัดแยก RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Rneasy mini kit® (Qiagen, Hilden, Germany)

สารเคมี

AVL buffer	31	มล.
AW1 buffer (concentration)	19	มล.
AW2 buffer (concentration)	13	มล.
AVE buffer	3X2	มล.
Carrier RNA (poly A)	310	ไมโครกรัม

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม AVL buffer

ละลาย Carrier RNA (poly A) ด้วย Buffer AVL 1 มล. ได้เป็นสารละลาย Carrier RNA จากนั้นดูดสารละลาย Carrier RNA ทั้งหมดใส่ลงใน Buffer AVL ละลายให้เข้ากัน

การเตรียม AW1 และ AW 2 buffer

เติม 96 -100 % เอทานอลปริมาณ 25 และ 30 มล. ลงใน AW1 และ AW2 buffer ตามลำดับ

วิธีการสกัดแยก RNA

1. เตรียมตัวอย่างน้ำไขฟักปริมาณ 200 μ l จากนั้นเติม AVL buffer ปริมาณ 560 μ l ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($15-25^{\circ}$ C) เป็นเวลา 10 นาที ได้สารละลายตัวอย่างปริมาณ 760 μ l
2. เติม 100% เอทานอล ปริมาณ 560 μ l ลงในสารละลายตัวอย่าง แล้วผสมให้เข้ากัน
3. ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาณ 630 μ l ลงใน QIA spin column (อยู่ในหลอดขนาด 2 มล.) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg (8000 rpm) 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ในหลอด 2 มล.ทิ้ง และเก็บส่วนของ QIA spin column ไว้
4. ดูดสารละลายตัวอย่างที่เหลือ แล้วทำซ้ำข้อ 3
5. เติม AW1 buffer ปริมาณ 500 μ l ลงใน QIA spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg (8000 rpm) 1 นาที เทของเหลวด้านล่างทิ้ง

6. เติม AW 2 buffer 500 μ l ลงใน QIA spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000xg (14,000 rpm) 3 นาที จากนั้นเทของเหลวทิ้งและนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำเป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด AW2 buffer ให้หมด

7. นำ QIA spin column ใส่ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มล. แล้วเติม AVE buffer ปริมาณ 60 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg (8000 rpm) 1 นาที

8. จากข้อ 7 จะได้ viral RNA ปริมาณ 60 μ l แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20° ซ หรือ -70° ซ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการสกัด DNA ออกจากแผ่นเจลโดยใช้ชุด Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Hamburg, Germany)

สารเคมี

Binding buffer	130	มล.
Wash buffer concentration	50	มล.
Elution buffer	4	มล.

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม Wash buffer concentration

เติม 95-100 % เอทานอล ปริมาณ 200 มล. ลงใน Wash buffer concentration ผสมให้เข้ากัน จะได้ Wash buffer ที่เจือจางลงและสามารถนำไปใช้ในการสกัด DNA ออกจากแผ่นอะกาโรสเจล

วิธีการสกัด DNA ออกจากแผ่นอะกาโรสเจล

1. ตัด agarose gel ในส่วนที่มี PCR product ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 2 มล. จากนั้นเติม Binding buffer ปริมาณเป็น 3 เท่าของน้ำนักเจลที่ตัดมา (เจล 1 มก.เท่ากับ 1 μ l)
2. นำตัวอย่างไปไว้ใน heat block ที่อุณหภูมิ 50 ° ซ เป็นเวลาประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายจนหมด และควร vortex ทุกๆ 2-3 นาที
3. เมื่อเจลละลายจนสมบูรณ์แล้ว เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาณเท่ากับน้ำนักเจล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลง (inversion)
4. นำ spin column ซึ่งมีแผ่นเมมเบรนอยู่ตรงกลาง มาใส่ในหลอดขนาด 2 มล.
5. ทำการดูดตัวอย่างลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000-10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง
6. เติม Wash buffer ปริมาณ 750 μ l ลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000-10,000 x g 1 นาที จากนั้นเทของเหลวทิ้ง แล้วนำ spin column ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัด Wash buffer ให้หมด
7. นำ spin column ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 2 มล. จากนั้นเติม elution buffer ปริมาณ 30 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000-10,000 x g 1 นาที
8. จากข้อ 7 จะได้ DNA บริสุทธิ์ปริมาตร 35 μ l สำหรับใช้ในการหาลำดับเบส

สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

1. Eppendorf MasterMix (2.5x) (Eppendorf[®], Hamburg, Germany) ประกอบด้วย

- Taq DNA polymerase	62.5	U/ml
- KCl	125	mM
- Tris-HCl pH 8.3	75	mM
- Mg(OAc) ₂	3.75	mM
- Igepal [®] -CA630	0.25	%
- each dNTP	500	μM

2. GeneRuler[™] 100 bp DNA ladder (Fermentas[®], USA) ประกอบด้วย

- DNA มาตรฐาน ที่ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 800, 900 และ 1000 bp

ละลายใน TE buffer

- TE buffer ประกอบด้วย 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 1mM EDTA

3. Orange G loading dye 0.2% ใน glycerol 50 % (Carlo Erba Reagent[®]) ประกอบด้วย

- Orange G powder	0.2	กรัม
- Pure glycerine	50	มล.
- Distilled water	50	มล.

วิธีเตรียม

1. ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนเข้ากัน
2. แบ่งใส่หลอด 1.5 มล. แล้วเก็บไว้ที่ 4^o ซ

ภาคผนวกที่ 2

ชนิดกรดอะมิโน	อักษรย่อ
Arginine	Arg, R
Alanine	Ala, A
Asparagine	Asp, N
Aspartic acid	Asp, D
Glutamine	Gln, Q
Glutamic acid	Glu, E
Glycine	Gly, G
Histidine	His, H
Leucine	Leu, L
Lysine	Lys, K
Proline	Pro, P
Serine	Ser, S
Threonine	Thr, T
Tyrosine	Tyr, Y
Valine	Val, V

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว นวลอนงค์ ปรีโยธร เกิดเมื่อวันที่ 21 เมษายน พ.ศ. 2523 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีพ.ศ. 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาสัตวแพทยศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรสัตวแพทยศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวแพทยศาสตรารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย