

คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีนฮีมากลูตินิน และนิวรามินิเดสของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก  
(H5N1) ในสัตว์ปีกที่พบในประเทศไทย



นางสาว นवलอนงค์ ปรีโยธร

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

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

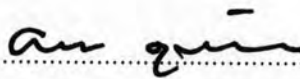
Copyright of Chulalongkorn University

**490080**

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

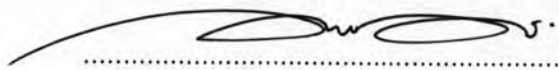
---

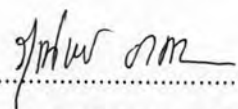
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

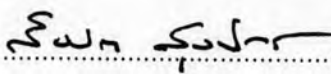
.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรณพ คุณาวงศ์กฤต)

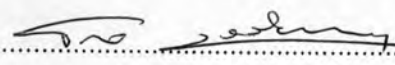
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....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)

นวนอนงค์ ปรีโยธร : คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีนฮีมากลูตินิน และนิวรามินิเดส ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (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 ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุข การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีนฮีมากลูตินิน และนิวรามินิเดส ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีกที่พบในประเทศไทย ในช่วงปีพ.ศ. 2547-2548 จำนวน 43 ตัวอย่าง โดยการนำเชื้อไวรัสมาตรวจพิสูจน์ทางอณูชีววิทยา หาลำดับเบส วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆของยีน H5 และ N1 ที่มีความสำคัญต่อคุณสมบัติของเชื้อไวรัส ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกและตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดความรุนแรง (Highly pathogenic avian influenza (HPAI) และมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน รวมทั้งอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีการระบาดในประเทศไทย และเวียดนาม นอกจากนี้ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆของยีน H5 และ N1 ที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ดังนั้นการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จะทำให้ทราบถึงข้อมูลรหัสพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ปีกที่พบในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำไปใช้อธิบายความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่อาจเกิดขึ้นได้ต่อไปในอนาคต

ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข  
สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข  
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อ นิสิต..... นอนงค์ ปรีโยธร  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม.....

## 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.

Department Veterinary Public Health

Field of Study Veterinary Public Health

Academic Year 2006

Student's Signature.....*Nuananong Pariyothorn*.....

Advisor's Signature.....*A. A.*.....

Co-advisor's Signature.....*Romy Chuda*.....

## กิตติกรรมประกาศ

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

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาสัตวแพทยศาสตรารณสุขที่ให้ความรู้ในด้านวิชา ต่างๆ และอนุเคราะห์สถานที่ที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. สันนิภา สุรทัตต์ อาจารย์ น.สพ. ดร. ธราดล เหลืองทองคำ ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ คุณอภิรดี เทียมบุญเลิศ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบบี คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำ ภาควิชาสัตวแพทยศาสตรารณสุข ที่เอื้ออำนวยในเรื่องเอกสารต่างๆ ให้ดำเนินการไปด้วยดี ขอขอบคุณ คุณไฉไล คุ้มมณฑล เพื่อนๆ ในภาควิชาสัตวแพทยศาสตรารณสุข และครอบครัว ที่คอย ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดีในการเรียนและทำวิทยานิพนธ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
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



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	จำนวนผู้ติดเชื้อและผู้เสียชีวิตจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1..... 2
ตารางที่ 2	ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก..... 6
ตารางที่ 3	การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธี Multiplex RT-PCR..... 18
ตารางที่ 4	Primers ที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกด้วยวิธี Multiplex RT-PCR..... 23
ตารางที่ 5	Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1..... 23
ตารางที่ 6	ตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากสัตว์ปีกระหว่างปี 2004-2005 จำนวน 43 ตัวอย่าง ที่ศึกษาครั้งนี้..... 25
ตารางที่ 7	แสดงขนาดของยีนและ GenBank Accession H5 และ N1 ของตัวอย่างจำนวน 43 ตัวอย่าง..... 30
ตารางที่ 8	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนก เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกแยกได้ช่วงต้นปี 2004..... 37
ตารางที่ 9	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกในไก่ เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกแยกได้ช่วงต้นปี 2004..... 37
ตารางที่ 10	สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน H5..... 41
ตารางที่ 11	สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน N1..... 43

## สารบัญญภาพ

	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