ความหลากหลายของยีนนิวคลีโอโปรตีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย

นางสาวณัฐกานต์ ทิพม้อม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

VARIATIONS OF NUCLEOPROTEIN GENE OF INFLUENZA A VIRUSES ISOLATED FROM HUMAN, SWINE AND AVIAN SPECIES IN THAILAND

Miss Nattakarn Thippamom

ศูนย์วิทยทรัพยากร
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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายของยีนนิวคลีโอโปรตีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย
โดย	นางสาวณัฐกานต์ ทิพม้อม
สาขาวิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อลงกร อมรศิลป์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ประวีณา กิติคุณ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อลงกร อมรศิลป์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ประวีณา กิติคุณ)

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

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(สัตวแพทย์หญิง ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ณัฐกานต์ ทิพม้อม : ความหลากหลายของยีนนิวคลีโอโปรตีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย.(VARIATIONS OF NUCLEOPROTEIN GENE OF INFLUENZA A VIRUSES ISOLATED FROM HUMAN, SWINE AND AVIAN SPECIES IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ.สพ.ญ.ดร. ประวีณา กิติคุณ, 118 หน้า.

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ เป็นเชื้อสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์ และทำให้เกิดผลกระทบทั้งทางด้านเศรษฐกิจและการสาธารณสุข การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน Nucleoprotein (NP) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 49 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจำนวน 18 ตัวอย่าง เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจำนวน 16 ตัวอย่าง และเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างทั้งหมดมาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี RT-PCR และทำการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน NP จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic analysis) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งต่าง ๆ ที่มีความสำคัญและจำเพาะต่อโฮสต์ ผลการศึกษาพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของแต่ละสายพันธุ์แยกกันอย่างชัดเจน ในส่วนการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนมากที่สุด และในสัตว์ปีกมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนน้อยที่สุด โดยพบกรดอะมิโน 18 ตำแหน่ง ที่แยกความแตกต่างของระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและสัตว์ปีก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทยทั้งหมดนั้นมีกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในคน (human-like amino acid; D16) ส่วนเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรและสัตว์ปีกนั้นต่างก็มีกรดอะมิโนจำเพาะต่อเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์ปีก (avian-like amino acid; G16) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย มีความแตกต่างกันตามชนิดของ host และยังสามารถบ่งชี้ถึงการติดเชื้อข้ามชนิดของโฮสต์ได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อติดตามทางระบาดวิทยาของเชื้อไข้หวัดใหญ่ เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการวางแผนการจัดการควบคุม ป้องกันการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอทั้งในคนและสัตว์ในประเทศไทยต่อไป

ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อนิสิต ณัฐกานต์ ทิพม้อม

สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

#4975560431: MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEYWORDS : Variations / Nucleoprotein / Influenza A / Human / Swine/Avian

NATTAKARN THIPPAMOM: VARIATIONS OF NUCLEOPROTEIN GENE OF INFLUENZA A VIRUSES ISOLATED FROM HUMAN, SWINE AND AVIAN SPECIES IN THAILAND. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. ALONGKORN AMONSIN, D.V.M., Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: PRAVINA KITIKOON, D.V.M., Ph.D., 118 pp.

Influenza A virus causes a significant disease in both humans and animals, poses considerable impact on economy and public health. The purpose of this study was to determine the genetic variation of the nucleoprotein (NP) gene of influenza A viruses. In total 49 samples were isolated from human (n=18), swine (n=16) and avian (n=15) species in Thailand. All samples were amplified by using RT-PCR technique and nucleotide sequencing. Data analysis includes phylogenetic and amino acid analysis. The results showed that the NP gene, were clustered into distinct lineages in a host-specific manner. Furthermore, analysis of amino acid sequence showed that amino acids in human lineages changed the most while avian lineages changed the least. Moreover, 18 amino acid positions were found capable to distinguish between human and avian lineages. In Thailand, NP genes of human influenza viruses consist of human-like amino acids whereas swine and avian influenza viruses consist of avian-like amino acids. This study showed that NP gene of influenza A virus in Thailand were highly conserved with a host-specific characteristic and can be used for tracing interspecies (human-animal) transmission. Results from this study can be used for preparation and disease control management to prevent influenza pandemic in the humans and animals population in Thailand.

Department : Veterinary Public Health	Student's Signature ณัฐกานต์ ทิพย์พ้อม
Field of Study : Veterinary Public Health	Advisor' s Signature
Academic Year : 2009	Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อลงกร อมรศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ประวีณา กิติคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในด้านการศึกษา การทำวิจัย และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด จนสำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.เบญจมาศ ปัทมาลัย ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิง ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิงรุ่งทิพย์ ชวนชื่น คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้อันมีค่าด้วยความเมตตาแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.ยง ภู่วรวรรณ หัวหน้าศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัส วิทยาคลินิค คณะแพทยศาสตร์ ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช หัวหน้าหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และกลุ่มงานไวรัสวิทยาสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิงดลฤทัย ศรีทะ ที่ให้ความช่วยเหลือผู้วิจัยในทุก ๆ ด้าน และนิสิตปริญญาเอก ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัส วิทยาคลินิค คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการถอดรหัสพันธุกรรมพร้อมทั้งให้คำปรึกษาในหลาย ๆ เรื่อง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขที่อำนวยในเรื่องเอกสารต่าง ๆ ให้ดำเนินไปได้ด้วยดี และขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ นิสิตปิญญาโท-เอก ในภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา พี่ชาย พี่สาว และเพื่อนนิสิตหอพักศึกษิตนิเวศน์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจให้ตลอดมา และขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี-จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และกองทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ ทุน 90 ปี รัชดาภิเษกสมโภชที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง…… ญ

สารบัญภาพ…….. ฏ

บทที่ 1 บทนำ…… 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……... 6

ลักษณะของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ…… 6

ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ…… 7

การเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ…… 8

การเปลี่ยนแปลงของแอนติเจน 9

Antigenic drift…….. 10

Antigenic shift…….. 10

ความสามารถในการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในสิ่งมีชีวิตของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ และความสำคัญของ Nucleoprotein (NP)…… 12

โรคไข้หวัดใหญ่ในคน…… 14

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร……... 16

โรคไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก…….. 19

การติดต่อข้าม species จากสัตว์สู่คน…….. 20

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย…….. 21

ระยะที่ 1 รวบรวมตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย…… 21

ระยะที่ 2 ถอดรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก…… 22

หน้า

ระยะที่ 3 วิเคราะห์ความหลากหลายของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย..... 27
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย..... 28
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 35
ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก..... 35
ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย..... 39
- ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนในประเทศไทย..... 39
- ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย..... 40
- ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในประเทศไทย..... 41
ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย เปรียบเทียบกับเชื้อต่างประเทศ..... 43
- ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ ในคน ที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจากต่างประเทศ..... 43
- ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร ที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจากต่างประเทศ..... 45
- ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจากต่างประเทศ..... 47
- ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย..... 49
ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก..... 52
- การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนในประเทศไทย..... 52
- การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย..... 54
- การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในประเทศไทย..... 56

หน้า

- การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบนยีน NP……..…….. 57
- การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีกที่จำเพาะต่อโฮสต์…..…… 61

บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ…… 66

รายการอ้างอิง…… 78

ภาคผนวก……... 86

ภาคผนวก ก……... 87

ภาคผนวก ข……... 92

ภาคผนวก ค……... 94

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…….. 118

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดง genome ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ……..	7
2	แสดง primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก……	31
3	ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน จำนวน 18 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา……..	32
4	ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร จำนวน 16 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา……	33
5	ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก จำนวน 15 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา……	34
6	แสดงรายละเอียดของรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน จำนวน 18 ตัวอย่าง……..	36
7	แสดงรายละเอียดของรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร จำนวน 16 ตัวอย่าง……..	37
8	แสดงรายละเอียดของรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก จำนวน 15 ตัวอย่าง……..	38
9	แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน 34 ตำแหน่ง ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน ระหว่างสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่ใช้ในการศึกษา 18 ตัวอย่าง……	53
10	แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน 62 ตำแหน่งของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ H1N1 H1N2 และ H3N2 ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 16 ตัวอย่าง……	54
11	แสดง 10 ตำแหน่งของกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่เคยมีรายงานในประเทศไทย……	56
12	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทย ในส่วนของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเชื้อไวรัสที่ตำแหน่ง 16……	58
13	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศไทย ในส่วนของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเชื้อไวรัสที่ตำแหน่ง 16……	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย ในส่วนของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเชื้อไวรัสที่ตำแหน่ง 16.....	60
15	แสดงตำแหน่งกรดอะมิโน 18 ตำแหน่ง ที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษา 49 ตัวอย่าง ที่แยกได้ในประเทศไทย.....	62
16	แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน 26 ตำแหน่ง ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและสุกรสายพันธุ์ H3N2.....	63
17	แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน 41 ตำแหน่ง ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและสุกรสายพันธุ์ H1N1.....	64

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภูมิแสดงวิธีวิจัย……..	5
2	แสดงลักษณะและโครงสร้างของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่……	6
3	แสดงการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่……...	9
4	แสดงการเกิด Antigenic drift ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่บนยีน HA ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการสร้างโปรตีน HA……	10
5	แสดงการเกิด Antigenic shift ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ ซึ่งเกิดจากการ reassortment ของยีน HA และ NA โดยอาศัยโฮสต์กึ่งกลาง ซึ่งสามารถติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ได้ทั้งในคนและสัตว์ปีก ส่งผลให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ได้ทั้งในคนและสัตว์ปีก……	11
6	แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทย……..	40
7	แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศไทย……	41
8	แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย……	42
9	แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจากต่างประเทศ……	44
10	แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจากต่างประเทศ……	46
11	แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจากต่างประเทศ……	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	Phylogenetic tree ของยีน NP แสดงสายวิวัฒนาการของไวรัสที่จำเพาะกับ species ของ host ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย.....	50
13	Phylogenetic tree ของยีน NP แสดงสายวิวัฒนาการของไวรัสที่จำเพาะกับ species ของ host ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทยกับเชื้อต่างประเทศ.....	51

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไข้หวัดใหญ่ (Influenza) มีสาเหตุมาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ ทำให้เกิดโรคติดต่อทางระบบทางเดินหายใจที่แพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ที่แตกต่างกัน ไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 3 types ได้แก่ type A, B และ C โดยเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด B และ C มักก่อโรคเฉพาะในคน เรียกว่า “โรคไข้หวัด” (common cold) หรือหากมีอาการรุนแรงเรียก “โรคไข้หวัดใหญ่” ในขณะที่ไข้หวัดใหญ่ชนิด A เป็นกลุ่มที่สามารถก่อโรคได้ในสัตว์ปีก คน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดได้แก่ สุกร ม้า สัตว์ปีก นกน้ำ นกชายฝั่ง วาฬ และแมวน้ำ (Hinshaw and Webster, 1982)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ จัดอยู่ในตระกูล *Orthomyxoviridae* มีลักษณะพันธุกรรมเป็นชนิด RNA สายลบเดี่ยว เป็นท่อน (segmented negative sense single - stranded RNA) จำนวน 8 ท่อน มี Nucleoprotein (NP) ล้อมรอบสารพันธุกรรมรวมเรียกว่า ribonucleoprotein (RNP) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวเป็นแท่งเกลียว (helical nucleocapsid) มีเยื่อไขมันเป็น envelop ห่อหุ้ม ที่เยื่อผิวชั้นนอกมี glycoproteins จำเพาะของไวรัสสอดแทรกอยู่ glycoprotein ที่สำคัญของเชื้อไวรัสคือ hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) (De Jong et al., 2000) ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ใช้ในการแบ่งเชื้อไวรัสเป็น subtype โดยสามารถแบ่งได้เป็น HA 16 subtypes และ NA 9 subtypes (Fouchier et al., 2005) และไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ subtypes หลัก ๆ ที่เคยทำให้เกิดการติดเชื้อในคนมี 4 subtypes หลักๆ คือ H1N1, H2N2, H3N2 และ H1N2 ในปัจจุบันไม่พบ H2N2 แล้ว ส่วนในสุกรพบหลัก ๆ อยู่ 3 subtypes คือ H1N1, H3N2 และ H1N2 นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีรายงานพบ subtypes อื่นๆ เช่น H3N1, H3N3 และ H2N3 อีกด้วย ส่วนในสัตว์ปีกโดยเฉพาะในนกน้ำพบได้ทุก subtype คือ ตั้งแต่ H1-H16 และ N1-N9 และเชื่อว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสัตว์ปีกเป็นต้นกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ subtype ต่าง ๆ ที่พบในคน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่าง ๆ อีกด้วย(1) (Claas et al., 1998)

เนื่องด้วยไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ มี genome เป็นท่อน 8 ท่อน ได้แก่ HA (Hemagglutinin), NA (Neuraminidase), PB1 (Polymerase basic protein 1), PB2 (Polymerase basic protein 2), PA (Polymerase acidic protein), NP (Nucleoprotein), M (Matrix), NS (Non-structural protein) และพบว่าในกลุ่มของโปรตีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

ทั้งหมดนั้นยีน NP เป็นโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญของอนุภาคไวรัส และมีปริมาณมากที่สุด นอกจากนี้ NP ยังเป็นโปรตีนที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มไวรัสไข้หวัดใหญ่ออกเป็น type คือ type A, B และ C รวมทั้งยังเป็นแอนติเจนที่สำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ (cytotoxic T lymphocyte) (Yewdell et al., 1985) และยังมีบทบาทเป็นตัวกำหนด host range และ host specificity ดังพบรายงานในปี ค.ศ. 1990 Gorman และคณะ ศึกษาวิวัฒนาการของยีน NP ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ด้วยเทคนิค RNA hybridization และพบว่าสามารถจำแนกยีน NP แบ่งออกตามกลุ่ม host specificity ได้ 5 กลุ่ม ซึ่งประกอบด้วย 1) กลุ่มของ Equine/ Prague /56, 2) กลุ่มของ recent equine strains, 3) กลุ่มของ classic swine และ Human strains, 4) กลุ่มของ gull H13 viruses และ 5) กลุ่มของ avian strain จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน NP มีความจำเพาะต่อ host และคาดว่ายีน NP ในไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ มีบทบาทในการกำหนดโฮสต์ที่เหมาะสมให้ไวรัสปรับตัวและเพิ่มจำนวน (Scholtissek et al., 1985)

ในปี ค.ศ. 2004 Reid และคณะศึกษาเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่ก่อโรคในปี 1918 พบว่าในยีน NP มีกรดอะมิโน 6 ตำแหน่งที่สามารถแยกยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนออกจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก คือกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 16, 33, 100, 136, 283 และ 313 โดยพบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 33, 100 และ 136 ของไวรัสในคนและสุกรในปี 1918 เป็นตำแหน่งที่มีความคงตัวสูงทำให้สามารถแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกและม้าได้ชัดเจน

ข้อมูลในอดีตยังบ่งชี้ว่ายีน NP เป็นยีนที่มีความคงตัวสูงในกลุ่มของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ซึ่งถ้าหากยีนมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอาจมีผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อและการก่อโรคของไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคนและสัตว์ได้ สำหรับในประเทศไทยข้อมูลต่าง ๆ ดังกล่าวยังไม่มีรายงานโดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ซึ่งในประเทศไทยการเลี้ยงสัตว์ปีกและสุกรร่วมกันเป็นวิถีปกติของครัวเรือนในสังคมเกษตรกรรมของประชากรในทวีปเอเชีย ซึ่งต่างจากในทวีปอเมริกาและยุโรป ดังนั้นการศึกษายีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ จะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานด้านระบาดวิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน NP ในเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกในประเทศไทย และสามารถใช้เป็นข้อมูลที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อข้ามชนิดของสัตว์ได้ ข้อมูลดังกล่าวมีประโยชน์ในการนำไปใช้เตรียมความพร้อมสำหรับการวางแผนการจัดการ ควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร สัตว์ปีก ในประเทศไทยได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ในประเทศไทย

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ความหลากหลาย (Variation) นิวคลีโอโปรตีน (Nucleoprotein) ไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Influenza A) คน (Human) สุกร (Swine) สัตว์ปีก (Avian)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ด้านองค์ความรู้ใหม่

   - ทราบข้อมูลพื้นฐานด้านรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย

   - ข้อมูลรหัสพันธุกรรมสามารถนำไปเผยแพร่ไว้ในฐานข้อมูล

   - ทราบวิวัฒนาการของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ในลักษณะความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงจำเพาะภายในยีน NP ว่าน่าจะมาจากแหล่งใด

2. ด้านการนำไปใช้ประโยชน์

   - ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปใช้เป็นข้อมูลร่วมกับข้อมูลทางด้านพันธุกรรมอื่นของเชื้อเพื่อบ่งชี้การระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการเตรียมความพร้อมเกี่ยวกับการระบาด และเป็นข้อมูลในการกำหนดแนวทางการวางแผน ควบคุม และป้องกันโรค

สมมติฐานของการวิจัย

ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP มีความแตกต่างกันตามชนิดสัตว์

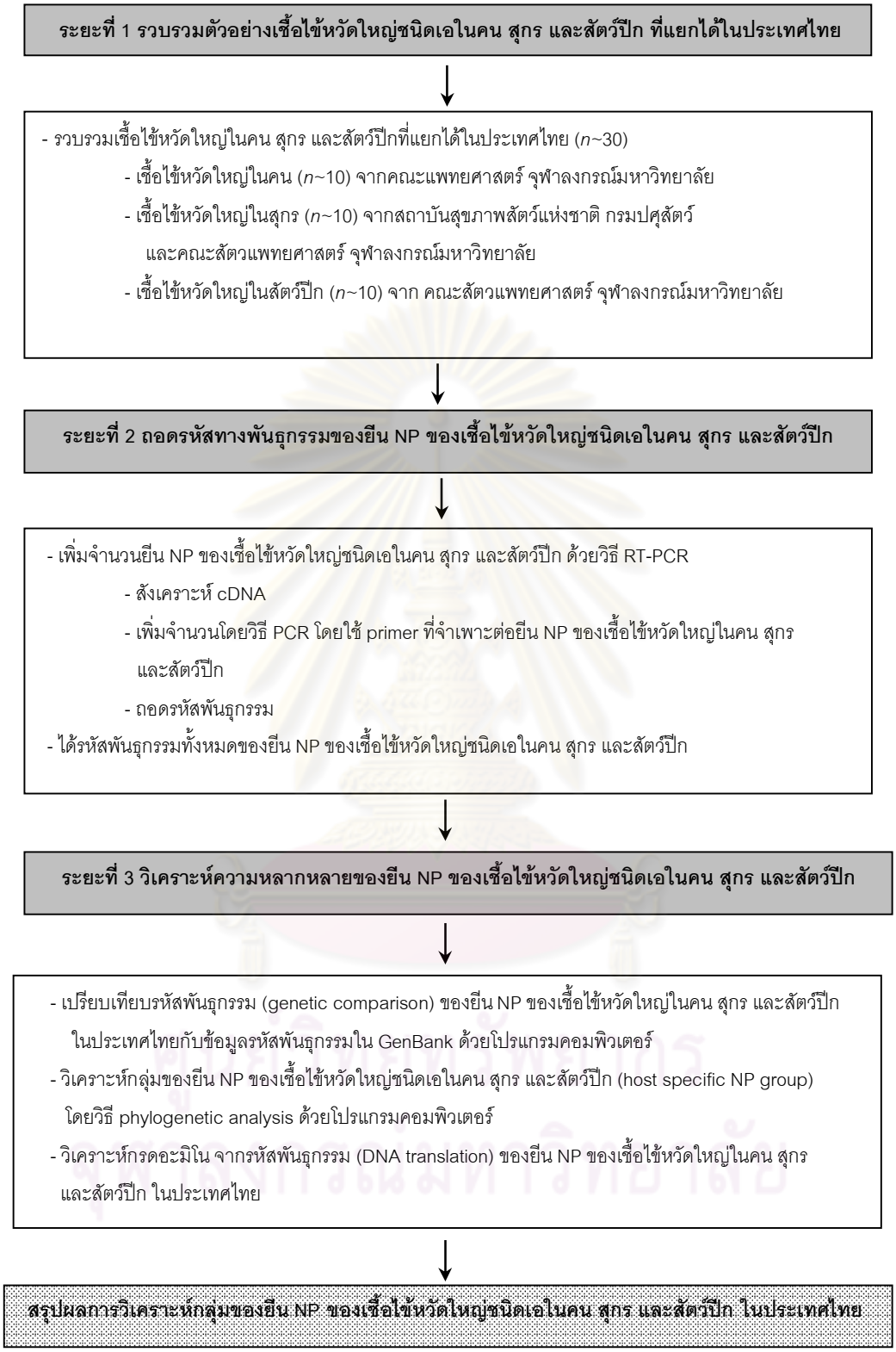
คำถามสำหรับการวิจัย

1. ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทยมีความแตกต่างกันตามชนิดสัตว์ที่ติดเชื้อหรือไม่
2. ความแตกต่างของลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทยเป็นอย่างไร และสามารถบ่งชี้ถึงการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์ได้หรือไม่

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนนิวคลีโอโปรตีน (NP) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย โดยมีสมมติฐานว่าลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP มีความแตกต่างกันตามชนิดสัตว์ และเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้จะดำเนินการเป็น 3 ระยะ ดังแสดงในแผนภาพที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



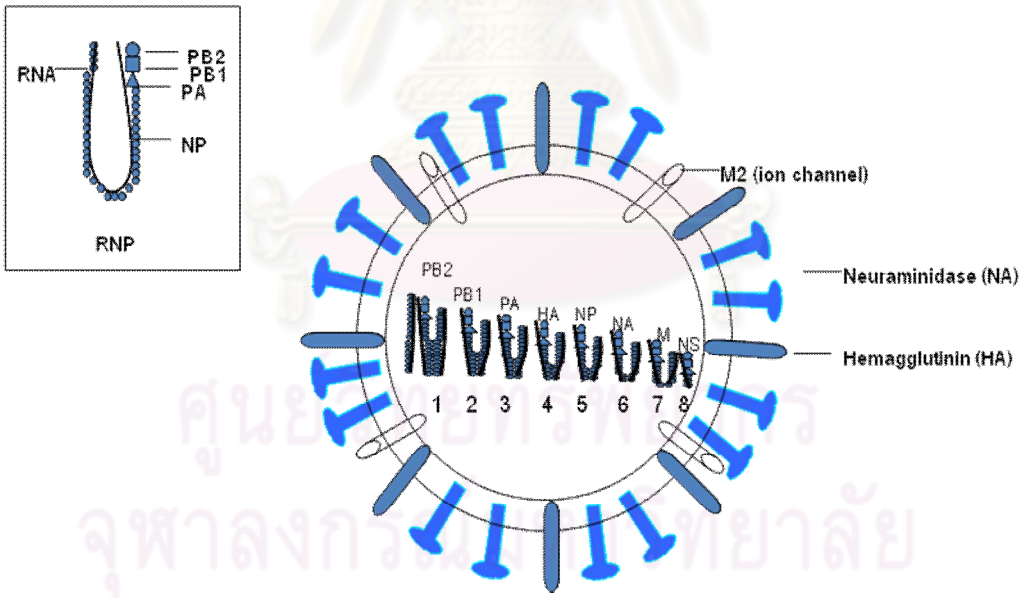
ภาพที่ 1 แผนภูมิแสดงวิธีการวิจัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Influenza A virus)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ หรือไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ จัดอยู่ใน genus Influenza A virus และใน family *Orthomyxoviridae* มีลักษณะพันธุกรรมเป็นแบบ RNA สายลบเดี่ยว เป็นท่อน (segmented single - strand negative-sense RNA) มีขนาดประมาณ 120 นาโนเมตร มีเปลือกหุ้ม (enveloped) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน hemagglutinin (HA)และ neuraminidase (NA) และโปรตีนทั้ง 2 นี้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนหลักของเชื้อ นอกจากนี้ ยังมีโปรตีนโครงสร้าง matrix และโปรตีนส่วน RNA polymerase อยู่ภายใน genome ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ genome ของเชื้อไวรัสไข้หวัดประกอบด้วยยีนทั้งหมด 8 ท่อน และสร้างโปรตีนอย่างน้อย 10 ชนิด เพื่อทำหน้าที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2) (Murphy and Webster, 1996)



แผนภาพที่ 2 แสดงลักษณะและโครงสร้างของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่มี envelope ห่อหุ้ม และที่ผิวด้านนอกประกอบด้วย hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) glycoprotein และ matrix 2 (M2) protein ส่วนภายใน envelope จะบรรจุ single–strand RNA จำนวน 8 ท่อน โดยจะมีความยาวของสาย Nucleotide ประมาณ 890-2341 bp

ตารางที่ 1 แสดง genome ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ทั้ง 8 ท่อน

RNA segment	Nucleotides (bp)	Protein	Amino acid (aa)	Molecules/virion
1	2341	Polymerase PB2	759	30-60
2	2341	Polymerase PB1	757	30-60
3	2233	Polymerase PA	716	30-60
4	1778	Haemagglutinin HA	556	500
5	1565	Nucleoprotein NP	498	1000
6	1413	Neuraminidase NA	454	100
7	1027	Matrix protein M1	252	3000
		Matrix protein M2	97	20-60
8	890	Non-structural protein NS1	230	
		Non-structural protein NS2	121	130-200

ที่มา : ดัดแปลงจาก Heinen (2003)

2. ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

1. โปรตีน PB2 ทำหน้าที่เป็น cap binding protein และ endonuclease
2. โปรตีน PB1 ทำหน้าที่เป็น RNA polymerases
3. โปรตีน PA ทำหน้าที่เป็น RNA polymerase subunit และ proteolysis
4. โปรตีน HA มีส่วนสำคัญในการทำหน้าที่เกาะติดกับตัวรับบนผิวเซลล์ (Receptor) และการ fusion ของเปลือกหุ้มของไวรัสกับผิวของเซลล์โฮสต์
5. โปรตีน NP ทำหน้าที่เป็นส่วนหนึ่งของ Ribonucleoprotein (RNP) โดย RNP ประกอบด้วย Nucleoprotein และเอนไซม์ Polymerases
6. โปรตีน NA ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ sialidase activity ช่วยในการปลดปล่อยไวรัส
7. โปรตีน M1 เป็น major component ของอนุภาคไวรัส และโปรตีน M2 ทำหน้าที่เป็น Ion channel
8. โปรตีน NS1, NS2 เป็น nonstructural protein โดย NS1 ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ Interferon ใน host cells, ควบคุมการ splice ของ viral mRNA และการ Transport mRNA ออกจาก nucleus เข้าสู่ cytoplasm ส่วนโปรตีน

NS2 หรือ nuclear export protein ทำหน้าที่ในการ transport RNP ออกจากนิวเคลียสสู่ Cytoplasm

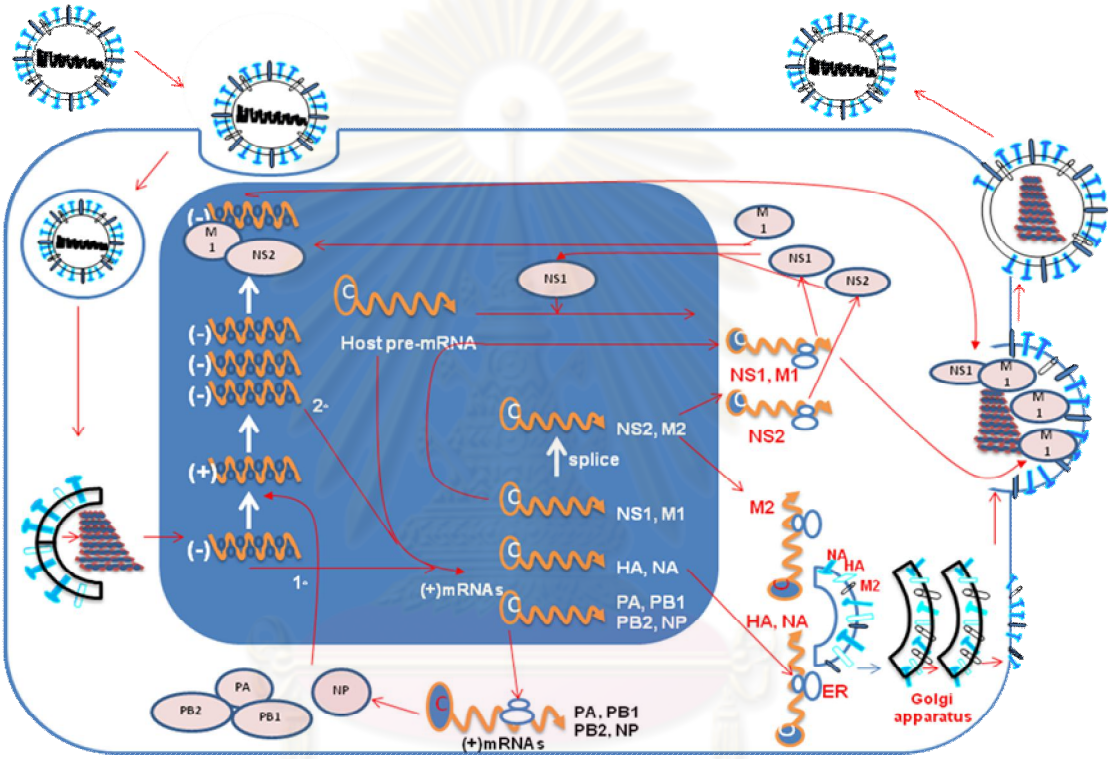
3. การเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

ขั้นตอนการเข้าเซลล์และการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ (ภาพแผนภาพที่ 3)

1. ไวรัสจับกับตัวรับบนผิวเซลล์
2. การเข้าเซลล์ (receptor mediated endocytosis)
3. การเชื่อมกันของไวรัสกับ endosomal membrane
4. Genome ของไวรัสเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์
5. การเพิ่มจำนวน genome และการสังเคราะห์โปรตีน
6. การประกอบลูกหลานไวรัสและการออกจากเซลล์

ไวรัสไข้หวัดใหญ่จะเข้าสู่เซลล์ได้จะต้องจับกับส่วนรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์ (sialic acid containing receptors) โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) จะทำหน้าที่ย่อยและแยกโปรตีน hemagglutinin ออกเป็น 2 ส่วน คือโปรตีน HA1 และ HA2 ส่วนของโปรตีน HA1 จะมีตำแหน่งที่ใช้จับกับส่วนรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์โฮสต์ ความจำเพาะของโปรตีน HA1 กับส่วนรับบนผิวเซลล์ มีบทบาทในการกำหนดชนิดของโฮสต์ (host specificity) (Cross et al., 2001) โดยพบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจับกับส่วนรับบนผิวเซลล์ที่ตำแหน่ง N-acetylneuraminic acid-2,3 galactose ซึ่งพบมากที่ทางเดินหายใจและทางเดินอาหารของสัตว์ปีก ส่วนไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์จับส่วนรับบนผิวเซลล์ที่ตำแหน่ง N-acetylneuraminic acid-2,6-galactose ซึ่งพบมากที่ทางเดินหายใจ ในขณะที่บนผิวเซลล์ทางเดินหายใจของสุกรมีส่วนรับทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าวในทางเดินหายใจ (Heinen, 2003) เมื่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอจับกับตัวรับบนผิวเซลล์แล้ว จะถูกดึงเข้าเซลล์ด้วยขบวนการ receptor mediated endocytosis ผ่านทาง clathrin coated pits และ vesicle (Cross et al., 2001) ต่อจากนั้นจะเกิดการเชื่อมกัน (fusion) ของเปลือกหุ้มไวรัสกับเยื่อหุ้ม endosome โดยพบว่าโปรตีน M2 มีบทบาทในการควบคุมการเข้า-ออกของโปรตอน ซึ่งส่งผลให้ความเป็นกรด-ด่างต่ำลง จึงกระตุ้นการทำงานของโปรตีน HA2 ทำให้เกิดการเชื่อมกันของเยื่อหุ้มทั้งสอง ต่อจากนั้นโปรตีน M1 จะแยกตัวออกทำให้ RNP complexes เคลื่อนออกมาสู่ไซโตพลาสซึมและเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสต่อไป เพื่อเพิ่มจำนวนกรดไรโบนิวคลีอิค โดยการทำหน้าที่ร่วมกันของโปรตีน PB1 PB2 PA และ NP ในการกระตุ้นขบวนการคัดลอกสาย ไรโบนิวคลีโอไทด์ซึ่งมี genome ของไวรัสเป็นต้นแบบ รวมทั้งการเติม cap และหมู่นิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 5’ และ 3’

เพื่อเปลี่ยนให้ mRNA ที่สร้างขึ้นในนิวเคลียสกลายเป็น genomic RNA ของไวรัส ในแต่ละรอบของการเพิ่มจำนวนไวรัส โปรตีน NS มีบทบาทในการขนส่ง RNA ของไวรัสออกจากนิวเคลียส เพื่อไปประกอบกับโครงสร้าง อื่นๆ เป็นไวรัสที่สมบูรณ์และออกจากเซลล์ต่อไป พบว่าโปรตีน NA มีบทบาทในการปลดปล่อยลูกหลานของไวรัสออกจากเซลล์ โดยทำหน้าที่ย่อยทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนโปรตีน HA2 มีบทบาทในการเชื่อมกันของเปลือกหุ้มไวรัสก่อนออกนอกเซลล์ (Mittelholzer, 2006)



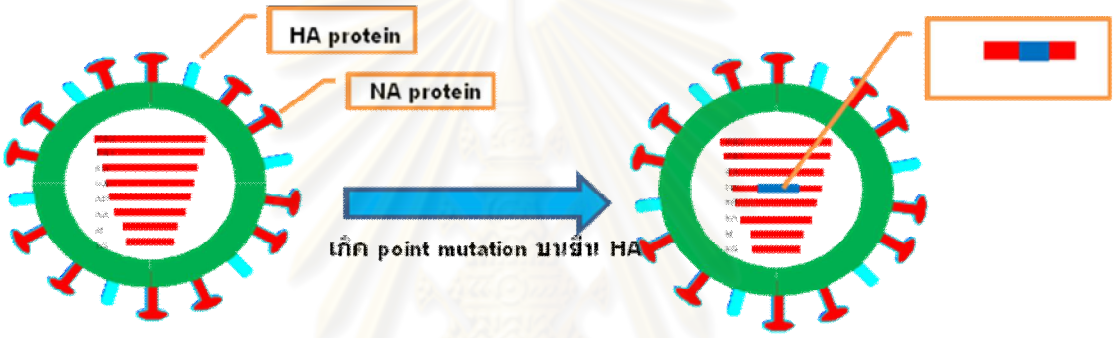
แผนภาพที่ 3 แสดงการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่

4. การแปลี่ยนแปลงของแอนติเจน

จากการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นตลอดเวลา อย่างไรก็ตามมีไวรัสเพียงบางอนุภาคเท่านั้นที่กลายพันธุ์แล้วยังมีความสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนต่อไปได้ ในขณะที่บางอนุภาคก็ไม่ส่งผลดังกล่าว ดังนั้นการเฝ้าระวังเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่บางสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นอาจถูกมองข้ามไป แต่ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างชัดเจนของสายพันธุ์ และมีผลกระทบต่อคนและสัตว์ก็จะถูกตรวจพบได้ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง 3 ชนิด มีการกลายพันธุ์ตลอดเวลา แต่ที่มีการกลายพันธุ์

สูงสุดในบรรดา 3 ชนิด คือไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ การกลายพันธุ์นั้นเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของยีน การเปลี่ยนแปลงของยีนทำให้แอนติเจน ซึ่งเป็นผลผลิตของยีนเปลี่ยนแปลงไปด้วย คือมี antigenic variation ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ Antigenic drift และAntigenic shift

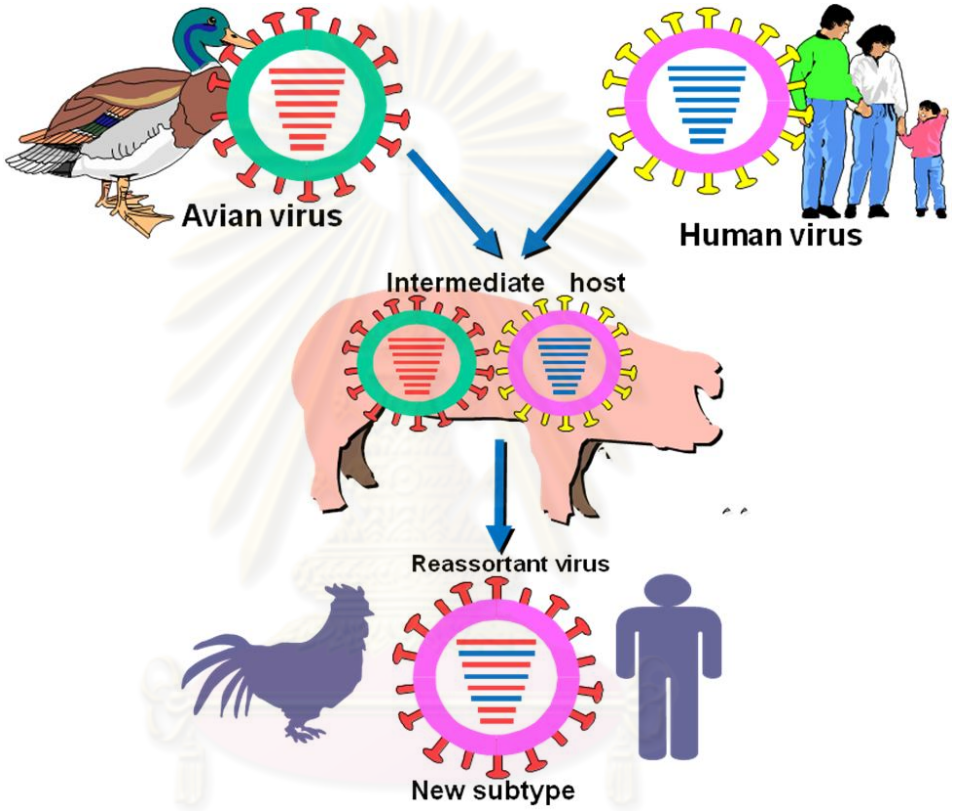
Antigenic drift คือ การเปลี่ยนแปลงที่แอนติเจนใหม่ในส่วนของสารพันธุกรรมซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนไม่มากนัก พบได้ในไวรัสไข้หวัดใหญ่ทุกชนิดแต่พันธุกรรมของไวรัสชนิด C ค่อนข้างคงตัว การเกิด antigenic drift อาจทำให้เกิดการระบาด (epidemic) ได้ในวงไม่กว้างนักดังแสดงในแผนภาพที่ 4



แผนภาพที่ 4 แสดงการเกิด antigenic drift ของเชื้อไข้หวัดใหญ่บนยีน HA ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการสร้างโปรตีน HA

Antigenic shift คือ การเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนใหม่เนื่องจากการเกิดขบวนการ gene reassortment โดยการที่ไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2 ชนิด ติดเชื้อในเซลล์เดียวกัน ในขั้นตอน self assembly เพื่อประกอบเป็นอนุภาค อาจมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมทั้งท่อนของไวรัสชนิดหนึ่งใส่เข้าไปในอนุภาคของไวรัสอีกชนิดหนึ่งจึงทำให้ได้อนุภาคของไวรัสชนิดใหม่ ซึ่งมีแอนติเจนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ถ้ายีนที่รับมาเป็น H หรือ N ก็จะทำให้เกิดการเปลี่ยน subtype ให้เห็นได้ ซึ่งพิสูจน์ได้ด้วยวิธีทาง serological และ molecular techniques เท่านั้น แต่ถ้าส่วนของยีนที่รับมาเป็น internal gene จะไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีทาง serological ต้องตรวจด้วยวิธีทาง molecular techniques เท่านั้น ในการระบาดใหญ่ที่เกิดขึ้นหลายครั้งที่ผ่านมาเกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อมี antigenic shift ที่ H และ N ทำให้เกิดไวรัสลูกผสม ซึ่งเรียกว่า reassortant ทำให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่และเกิดการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่เป็นบริเวณกว้าง นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดจากการติดเชื้อข้ามชนิดโฮสต์ (interspecies transmission) และอาจติดต่อไปยังสัตว์ได้หลายชนิด ถ้าไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2 สายพันธุ์ที่มี genome แตกต่างกันทั้ง 8 ท่อน เกิดการ

แลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกัน จะมีโอกาสเกิดไวรัส genotype ใหม่ได้ 256 genotypes (Mittelholzer, 2006) การระบาดของไวรัส ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H2N2 หรือ Asian flu ที่ระบาดในมนุษย์เมื่อปี ค.ศ. 1957 เกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม ของไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์และสัตว์ปีก (Heinen, 2003) ส่วนไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่ระบาดในแถบเอเชียและทำให้มีผู้คนเสียชีวิตจำนวนมากนั้นเกิดจากการติดเชื้อข้ามชนิดโฮสต์ (Olsen, 2002) ดังแผนภาพที่ 5



แผนภาพที่ 5 แสดงการเกิด Antigenic shift ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ ซึ่งเกิดจาก การ reassortment ของยีน HA และ NA โดยอาศัยโฮสต์กึ่งกลาง ซึ่งสามารถติดเชื้อไข้หวัดได้ทั้งในคน และสัตว์ปีก ส่งผลให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ได้ทั้งในคนและสัตว์ปีก

กลไกในการเกิด antigenic drift เชื่อว่าเกิดจากขบวนการ point mutation ได้แก่ substitution, deletion และ insertion ภายในสายพันธุกรรมของยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ซึ่งมีเอนไซม์ RNA polymerase ซึ่งไม่มี proof reading activity และความผิดพลาดในการเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรมซึ่งพบได้ในอัตรา $1/10^4$ base ในแต่ละ replication cycle ทำให้มีโอกาสเกิดลูกหลานของไวรัสที่ไม่เหมือนเดิมได้จำนวนมาก มีเพียงบางอนุภาคเท่านั้นที่สามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้ พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ในลักษณะนี้ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจะเกิดช้ากว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน (Slemons, 2002; Mittelholzer, 2006) อัตราการเกิดการกลายพันธุ์ในส่วน

โปรตีน HA1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ classic H1N1 และไวรัสไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์สายพันธุ์ H1N1 ประมาณร้อยละ 0.4 และ 0.8 ของจำนวนกรดอะมิโนต่อปี ตามลำดับ (Olsen, 2002)

5. ความสามารถในการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในสิ่งมีชีวิตของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ และความสำคัญของ Nucleoprotein (NP)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสามารถก่อโรคในสิ่งมีชีวิตได้หลายชนิด (Suzuki et al., 2005) คือในสัตว์ปีก เช่น ไก่บ้าน ไก่ป่า นกป่าชนิดต่าง ๆ ไก่งวง ห่าน เป็ด เป็นต้น ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สุกร ม้า วาฬ คน แมวน้ำ ตัวมิ้งค์ และลิงเป็นต้น แต่พบว่าสัตว์ปีกโดยเฉพาะพวกนกน้ำเป็นสิ่งมีชีวิตที่แยกเชื้อไวรัสได้หลากหลายและพบมี subtype ของเชื้อมากที่สุด (Hinshaw et al., 1980) และมีการศึกษาที่ทำให้บ่งชี้ว่า ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่พบแพร่กระจายในคนนั้น มีจุดเริ่มต้นมาจากสัตว์ปีก โดยอาจรับมาโดยตรง และเกิดการกลายพันธุ์ระหว่างที่มีการเจริญภายในร่างกายคน จนทำให้มีความเหมาะสมที่จะแพร่กระจายระหว่างคนได้ หรืออาจเกิดจากการที่ไวรัสในสัตว์ปีกติดเชื้อผ่านเข้าทางสุกร ทำให้ไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงจนมีความเหมาะสมที่จะเจริญเติบโตในคนได้ดีขึ้น ทำให้เกิดสมมติฐานว่า สุกรน่าจะเป็นตัวกลางทำหน้าที่เป็น mixing vessel ระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่าง ๆ ของสัตว์ปีกให้มีการกลายพันธุ์ทั้งแบบ point mutation และ genetic reassortment (Scholtissek et al., 1998) การที่ไวรัสสามารถเข้าไปเพิ่มจำนวนในสิ่งมีชีวิตได้ต้องมีความจำเพาะกับเซลล์สิ่งมีชวิตนั้น ๆ ส่วนที่เป็นตัวกำหนดชนิดเซลล์ (cell tropism) คือ ตัวรับที่เป็น sialic acid ชนิด α 2,6 หรือ α 2,3 linkage ที่อยู่บนผิวเซลล์ที่สามารถจับกับ HA บนผิว envelope ของไวรัสได้อย่างจำเพาะ (Rogers et al., 1983; Weis et al.,1988) ความจำเพาะนี้จึงเป็นตัวกำหนดการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส (Suzuki et al., 2000) นอกจากยีน HA แล้ว การเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่ติดเชื้อนั้นยังต้องอาศัยการทำงานของโปรตีนที่อยู่ภายในของไวรัสร่วมกัน โดยโปรตีนที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งคือ โปรตีน NP (Scholtissek et al, 1985)

โปรตีน NP เป็นโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญของอนุภาคไวรัส มีปริมาณมากที่สุด และเป็นโปรตีนสำคัญที่ใช้ในการแยกชนิดของไข้หวัดใหญ่ออกเป็น type A, B และ C และทำหน้าที่จับกับอนุภาคของ RNA ในกระบวนการ transcription และ replication โดย NP ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ RNP ของไวรัสซึ่งมี nuclear localization signal จะนำ RNA genome เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสทาง nuclear pore และ RNA genome จะทำหน้าที่เป็น template ให้เอนไซม์ polymerase (transcriptase) ของไวรัสใช้ในการสร้าง mRNA ต่อไป (Portela and Digard,

2002) นอกจากนี้ NP ยังเป็นแอนติเจนที่สำคัญในการกระตุ้น cytotoxic T lymphocyte ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ ทำให้มีผลคุ้มโรคข้ามระหว่าง subtype ที่แตกต่างกันได้ (Yewdell et al., 1985)

นอกจากนี้มีหลายรายงานที่พบว่ายีน NP มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการกำหนด host -specific เช่น รายงานของ Scholtissek และคณะ ในปี 1978 สามารถแยกความแตกต่างของ ยีน NP ของคนในสัตว์ปีกและม้าได้ โดยใช้เทคนิค RNA hybridization และรายงานของ Gammelin และคณะ (1989) พบว่ายีน NP สามารถใช้ยืนยัน host specificity ของเชื้อไวรัสได้ เช่นเดียวกับ Gorman และคณะ (1990) สามารถแยกยีน NP ได้ 5 กลุ่ม host specific คือ Equine1, Equine2, Human & Swine, H13 Gull และ avian และในปี ค.ศ. 1991 Gorman และคณะ ได้วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน และสุกร พบว่าวิวัฒนาการและแหล่งกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ มีความสัมพันธ์กับแหล่งกำเนิดของยีน NP

ในปี ค.ศ. 2004 Reid และคณะศึกษาเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ และพบว่ากรดอะมิโน 6 ตำแหน่งสามารถแยกยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน ออกจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก คือกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 16, 33, 100, 136, 283 และ 313 โดยพบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 33, 100 และ 136 ของไวรัสในคนและสุกรในปี 1918 เป็นตำแหน่งที่มีความคงตัวสูง ทำให้สามารถแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกและม้าได้ชัดเจน และพบว่ากรดอะมิโนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีก ม้า และสุกร ในปี 1918 ตำแหน่งที่ 283 ถูกแทนที่ leucine โดย Proline ของไวรัสไข้หวัดในคน อาจทำให้เชื้อมีความรุนแรงได้

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับ T cell epitope ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ และการเปลี่ยนแปลง ของ epitopes น้อยมากและเนื่องจาก T cell epitope มักอยู่ในโปรตีนภายในของไวรัสที่มีความผันแปรต่ำ เช่น nucleoprotein (NP) จึงเชื่อกันว่าอาจมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะ escape mutation เกิดขึ้นได้น้อย อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงของ nucleoprotein ในลักษณะที่ทำให้ไวรัสหลบหลีก CTL ได้ (Rimmelzwaan et al., 2004) ที่น่าสนใจคือ escape mutant นี้มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนลดลง (Berkhoff et al., 2006) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า nucleoprotein เป็นยีนที่ยอมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้น้อย มิฉะนั้นโปรตีนจะไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ และทำให้ความสามารถ ในการเพิ่มจำนวนของไวรัสต่ำลง (fitness) และน่าจะเป็นด้วยเหตุนี้ที่ทำให้ไม่เกิด escape mutation ต่อ CTL ขึ้นบ่อยอย่างที่เกิดกับ B cell

แต่ก็มีบาง CTL epitopes ที่ยอมให้มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าตำแหน่งอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะ CTL จับ epitopes นั้นได้ดีมากทำให้มี selection pressure ที่รุนแรง และ epitope นั้นไม่อยู่ในตำแหน่งที่สำคัญมากในแง่การทำหน้าที่ของโปรตีนของไวรัสหรือสามารถมี mutation เพิ่มเติมที่แก้ไขปัญหาในการทำงานของโปรตีนของไวรัสที่เกิดจาก mutation แรก (Rimmelzwaan et al., 2004,2005)

ในปี ค.ศ. 2006 Altstein A.D. และคณะได้ศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันไวรัสไข้หวัดใหญ่ในการแสดงออกของโปรตีน NP พบไวรัสไข้หวัดใหญ่อาจมีการกลายพันธุ์หลบหลีก T cell ได้เช่นเดียวกับที่เกิดกับแอนติบอดีในการศึกษาของ Rimmelzwaan และคณะ (2004) ซึ่งวิเคราะห์การตอบสนองของ T cell ต่อ $NP_{383-391}$ epitope (ELRSRYWAI) พบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่เกิดระหว่างปี ค.ศ.1993-1994 มีการกลายพันธุ์เป็น SQYWAIRTR และ ELRSGYWAI ตามลำดับ ทำให้มีการหลบหลีกจาก T cell ที่จำเพาะต่อ epitope (Rimmelzwaan และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์จาก arginine เป็น glycine ที่ตำแหน่ง 384 (R384G) เพื่อหลบหลีกจากภูมิคุ้มกันนั้น ไวรัสไข้หวัดใหญ่ต้องแลกกับการสูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวน (fitness) (Rimmelzwaan และคณะ, 2004)

6. โรคไข้หวัดใหญ่ในคน

โรคไข้หวัดใหญ่ในคนเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ทั้ง 3 types คือ type A, B และ C และก่อให้เกิดการติดเชื้อไวรัสที่ระบบทางเดินหายใจ โดยผู้ป่วยจะแสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน คือ มีไข้สูงแบบทันทีทันใด ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้ออ่อนเพลีย (CDC, 2007) ไข้หวัดใหญ่เป็นโรคที่สำคัญที่สุดโรคหนึ่งในกลุ่มโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และโรคติดเชื้ออุบัติซ้ำ เนื่องจากเกิดการระบาดใหญ่ทั่วโลกมาแล้วหลายครั้ง แต่ละครั้งเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางเกือบทุกทวีป ทำให้มีผู้ป่วยและเสียชีวิตนับล้านคน (Webster, 2004)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ เป็นชนิดที่ทำให้เกิดการระบาดอย่างกว้างขวางทั่วโลก ในขณะที่ไวรัส ชนิด B ทำให้เกิดการระบาดในพื้นที่ระดับภูมิภาค (OIE, 2000) ส่วนชนิด C มักเป็นการติดเชื้อที่แสดงอาการอย่างอ่อนหรือไม่แสดงอาการ และไม่ทำให้เกิดการระบาด เชื้อไวรัสชนิดเอแบ่งเป็น subtype ตามความแตกต่างของโปรตีนของไวรัสคือ HA และ NA โปรตีน ในปัจจุบัน พบการติดเชื้อและการก่อโรคระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนได้หลาย subtypes ได้แก่ H1N1, H1N2 และ H3N2 นอกจากนี้ยังพบรายงานการติดเชื้อ H5N1 และ H9N2 เป็นระยะๆ

ระหว่างปี ค.ศ. 1918-1957 พบรายงานการเกิดโรคไข้หวัดใหญ่ในคนที่เรียกว่า “Spanish Flu” ซึ่งเป็นการแพร่ระบาดครั้งใหญ่ที่กระจายไปทั่วโลกอย่างรวดเร็วและรุนแรง พบผู้ป่วยในทุกทวีปและทำให้มีผู้เสียชีวิตทั่วโลกมากกว่า 21 ล้านคน ซึ่งจากการศึกษาย้อนหลังในหลายสิบปีต่อมาจึงพบว่าเป็นเชื้อไวรัสชนิด H1N1 ต่อมาในช่วงปี ค.ศ. 1957-1968 พบการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ที่เรียกว่า “Asian flu” เกิดจากเชื้อ H2N2 ซึ่งเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอที่เปลี่ยนแปลงไปจาก Spanish flu เดิม และหลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1968 พบรายงานการระบาดของไข้หวัดใหญ่ที่เรียกว่า “Hong Kong flu” เกิดจากเชื้อ H3N2 และจากนั้นตั้งแต่ปี ค.ศ.1977 พบรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ที่เรียกว่า “Russian flu” เกิดจากเชื้อ H1N1 จนถึงปัจจุบัน (Webster, 2004) และปี ค.ศ. 1997 มีรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ H5N1 ในสัตว์ปีกที่เรียกว่า “โรคไข้หวัดนกหรือ Bird flu (H5N1 subtype)” ที่ฮ่องกงและพบผู้ป่วยเสียชีวิตจากการติดเชื้อนี้เป็นครั้งแรกในโลก และการแพร่ระบาดของโรคในสัตว์ปีกได้กระจายไปอย่างกว้างขวางในทวีปเอเชียทำให้มีผู้ป่วยเสียชีวิตในหลายประเทศ ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ H5N1 นี้มีอัตราการเสียชีวิตสูง (Beigel, 2005) ต่อมาในปี 2009 มีการแพร่ระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 ซึ่งเป็นไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ของคนแพร่กระจายทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยด้วย และถือว่าเป็นการระบาดใหญ่ของไข้หวัดใหญ่ในคน และเป็นไข้หวัดใหญ่ที่ไม่เคยพบมาก่อน เนื่องจากเป็นการผสมกันของสารพันธุกรรมไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์, ไข้หวัดนกที่พบในทวีปอเมริกาเหนือ และไข้หวัดหมูที่พบในทวีปเอเชีย และยุโรป ทำให้องค์การอนามัยโลกต้องเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ใหม่ 2009 เนื่องจากหวั่นวิตกว่า เชื้อ H1N1 อาจจะกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่อันตรายยิ่งขึ้น และมีแนวโน้มว่าอาจก่อให้เกิดโรคที่ระบาดรุนแรงในคนมากขึ้นเรื่อย ๆ ในอนาคต

ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาไข้หวัดใหญ่ในคน โดย Chutinimitkul และคณะ (2008a) ศึกษาชีวโมเลกุลเชิงลึกของโปรตีน HA และ NA ของ subtypes H1N1 และ H3N2 ที่แยกได้จากคน พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคนทั้งสอง subtypes (H1N1 และ H3N2) มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่อยู่ในกลุ่มของวัคซีนสายพันธุ์ใน Northern Hemisphere ที่มีในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนในการศึกษาครั้งนี้

7. โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (Swine influenza)

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรเกิดจากการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร (Swine Influenza Virus) เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน (acute respiratory disease) ในสุกรทุกช่วงอายุ ในปัจจุบันเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่มีรายงานการระบาดในสุกรทั่วโลกมี 3 subtypes ได้แก่ H1N1, H3N2 และ H1N2 (Slemons, 2002; Dee, 2005) รายงานการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรเกิดครั้งแรกในปลายฤดูร้อน ค.ศ. 1918 ในรัฐอิลลินอยส์และไอโอว่าของสหรัฐอเมริกา โดยพบสุกรจำนวนมากแสดงอาการคล้ายโรคไข้หวัดใหญ่ในคน ซึ่งในช่วงเวลานั้นมีการระบาดของไข้หวัดใหญ่ในคนอย่างรุนแรง ซึ่งต่อมาสามารถวินิจฉัยแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 (classical swine H1N1) ได้ในปี ค.ศ. 1930 จากการศึกษาย้อนหลังทางด้านซีรั่มวิทยาในคน พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ในปี ค.ศ. 1918-1919 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในปี 1930 ในปัจจุบันพบว่ารายงานการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นครั้งคราวกระจายอยู่ในประเทศต่างๆ ทั่วโลกทั้งเชื้อไวรัส subtype H1N1 และ H3N2 จนกระทั่งเมื่อปี ค.ศ. 1975 จนถึงปัจจุบัน และการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีความถี่มากขึ้นและระบาดเป็นบริเวณกว้างมากขึ้นตามจุดต่างๆ ทั่วโลก รวมทั้งในแถบทวีปเอเชียด้วย

เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมีความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากพบว่าเชื้อไวรัสเกิดการกลายพันธุ์และการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ทั้ง subtype ที่มาจากคน สัตว์ปีก และสุกรได้ (Slemons, 2002) โดยพบว่าสุกรมีตัวรับ (receptor site) บนผิวเซลล์ที่ตำแหน่ง N-acetylneuraminic acid 2,3-galactose ของสัตว์ปีก และตำแหน่ง N-acetylneuraminic acid 2,6-galactose ของคน ทำให้ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนและสัตว์ปีกสามารถติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ของสุกรพร้อม ๆ กันได้ จึงมีโอกาสเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดทั้ง 2 ชนิดในเซลล์สุกรได้สูง สุกรจึงเปรียบเป็นถังผสม “mixing vessel” เมื่อมีการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิดในเซลล์เดียวกัน และอาจทำให้เกิด “reassortment” ได้เชื้อไวรัสตัวใหม่เกิดขึ้น (reassortant virus)

ในอดีตการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีสาเหตุจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ส่วนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 พบเริ่มมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากมีรายงานการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 กระจายตามส่วนต่าง ๆ ทั่วโลกมากขึ้น และมีแนวโน้มว่าจะมีการระบาดแทนที่ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 (Marozin et al., 2002) พบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้จากสุกรในแถบทวีปอเมริกา เกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างไวรัสสายพันธุ์ classical H1N1

และไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ที่เคยระบาดในสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1998 (ไวรัสสายพันธุ์ H3N2 มาจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสสายพันธุ์ H3N2 จากมนุษย์ ไวรัสสายพันธุ์ H1N1 จากสุกร และไวรัสสายพันธุ์ H1N1 จากสัตว์ปีก) (Karasin et al., 2002; Richt et al., 2003) ซึ่งแตกต่างจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้ในแถบทวีปยุโรปและทวีปเอเชีย โดยพบว่ามาจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสสายพันธุ์ human H1N1 และไวรัสสายพันธุ์ human-like H3N2 (Spickler, 2004) การอุบัติใหม่ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ทั้งในแถบทวีปอเมริกา ทวีปยุโรป และทวีปเอเชีย ทำให้เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรกระจายในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก โดยสุกรป่วยจะแสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันและแม่สุกรแท้งลูก

จากการศึกษาของ Van Reeth และคณะ (2003) พบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้ในประเทศอังกฤษ ทำให้สุกรทดลองแสดงอาการหลังติดเชื้อ 24 ชั่วโมง โดยมีไข้ (อุณหภูมิเมื่อวัดทางทวารหนัก 40.6°C) ซึม เบื่ออาหาร หายใจด้วยช่องท้อง อัตราการหายใจเพิ่มขึ้น ส่วนที่สหรัฐอเมริกา Karasin และคณะ (2000) รายงานการเพาะแยกไวรัส สายพันธุ์ H1N2 ได้จากฟาร์มที่มีการระบาดของโรคทางเดินหายใจในสุกรป่วยช่วงอายุ 6 สัปดาห์ขึ้นไป และจากฟาร์มสุกรแห่งหนึ่งที่มี แม่สุกรแท้งลูกจำนวน 600 ตัว เมื่อเดือนพฤศจิกายน ปี ค.ศ. 1999 ที่รัฐอินเดียนา (Indiana) และพบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้ใน Indiana, Illinois, Minnesota, Ohio, Iowa และ North- Carolina ระหว่างปี ค.ศ. 2000-2001 มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนกับไวรัสสายพันธุ์ H1N2 ที่ระบาดใน รัฐอินเดียนาเมื่อปลายปี ค.ศ. 1999 (Karasin et al., 2002)

ส่วนในแถบทวีปเอเชีย Li และคณะ (2004) รายงานผลการสำรวจที่ประเทศจีนในปี ค.ศ. 2001 พบว่าสามารถเพาะแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ได้จากช่องจมูกสุกรจำนวน 2 ตัวอย่าง จากสุกรที่ให้ผลบวกในการทดสอบทางซีรัมวิทยาต่อ H1 จำนวน 27 ตัวอย่าง จากสุกรทั้งหมด 951 ตัว และที่ประเทศเกาหลี Jung และคณะ (2005) รายงานการศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้ในประเทศเกาหลีเมื่อปี ค.ศ. 2003 จากสุกรแม่พันธุ์จำนวน 200 ตัวที่แสดงอาการคล้ายโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดรุนแรง พบว่าสามารถทำให้สุกรทดลองแสดงอาการและมีรอยโรคของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันได้ นอกจากนี้โรคไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นโรคสัตว์ติดคน (zoonotic disease) ซึ่งพบได้ทั้งการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จากคนไปสุกรหรือในทางกลับกันสามารถติดเชื้อจากสุกรไปยังคนได้เช่นเดียวกัน (Stuart-Harris, 2003)

ดังนั้นการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม รวมถึงการศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในท้องถิ่นต่าง ๆ จึงมีความสำคัญมาก เพื่อการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งในท้องถิ่นและพื้นที่อื่น ๆ ทั่วโลก

ในประเทศไทยมีรายงานพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรดังนี้ Kupradinun และคณะ (1991) รายงานการเพาะแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ได้เป็นครั้งแรกจากสุกรป่วยที่แสดงอาการคล้ายโรคไข้หวัดใหญ่ในเดือนมกราคม ปี ค.ศ. 1988 และจากการรายงานผลการสำรวจทางซีรั่มวิทยาต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 จากสุกรใน 15 จังหวัดของประเทศไทย โดย Damrongwatanapokin และคณะ (2003) พบอุบัติการณ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ร้อยละ 39 จากตัวอย่างซีรั่มสุกรทั้งหมด 1,610 ตัวอย่าง ส่วน Parchariyanon และคณะ (2006) รายงานการสำรวจทางซีรั่มวิทยาของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากสุกรใน 5 จังหวัด ได้แก่ ฉะเชิงเทรา กาญจนบุรี ขอนแก่น สุโขทัย และสุพรรณบุรี ในปี พ.ศ. 2547 พบตัวอย่างซีรั่มสุกรให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ร้อยละ 7.9 และให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ร้อยละ 20.6 จากตัวอย่างซีรั่มสุกรทั้งหมด 533 ตัวอย่าง และ Damrongwatanapokin และคณะ (2006) รายงานการสำรวจทางซีรัมวิทยาและไวรัสวิทยาของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2547 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2548 ใน 35 จังหวัดของประเทศไทย พบตัวอย่างซีรั่มสุกรขุนให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ร้อยละ 55 และให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ร้อยละ 31 จากตัวอย่างซีรั่มสุกรขุน 751 ตัวอย่าง และพบตัวอย่างซีรั่มแม่สุกรให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ร้อยละ 91 และให้ ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ร้อยละ 52 จากตัวอย่างซีรั่มแม่สุกร 2,494 ตัวอย่าง ส่วนผลการแยกเชื้อและการจำแนกสายพันธุ์ไวรัสจากตัวอย่างป้ายเช็ดจมูกสุกรในปี พ.ศ. 2548 พบไวรัสสายพันธุ์ H1N1, H3N2 และ H1N2 จำนวน 9, 4 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ จากตัวอย่างป้ายเช็ดจมูกสุกรทั้งหมด 31 ตัวอย่าง เป็นที่น่าสังเกตว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 นั้นสามารถแยกได้ในประเทศไทยเป็นครั้งแรกเมื่อต้นปี พ.ศ. 2548 ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาไวรัสสายพันธุ์นี้

อย่างไรก็ตามในปี พ.ศ. 2551 มีรายงานการศึกษารหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกรโดย Chutinimitkul และคณะ (2008b) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร subtype H1N1, H1N2 และ H3N2 ในภาคกลาง ได้แก่จังหวัดสระบุรี นครปฐม ราชบุรี และภาคตะวันออกได้แก่จังหวัดฉะเชิงเทรา และชลบุรี จำนวน 12 ตัวอย่าง แต่เป็นเพียงการศึกษาเฉพาะในส่วนของยีน HA และ NA แต่การศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP ยังมีอยู่ไม่มากนัก ในปี 2008 Takemae และคณะ (2008) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ของไวรัส

ไข้หวัดใหญ่ในสุกรในประเทศไทย ประกอบด้วย subtype H1N1, H3N2 และ H1N2 และพบว่ายีน NP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม classical swine และ avian-like-swine 57 ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP บ้างแต่ก็เป็นเพียงการศึกษาในสุกรเท่านั้นไม่ได้มีการศึกษาในคนและสัตว์ชนิดอื่นๆ

8. โรคไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก (Avian influenza)

โรคไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกหรือโรคไข้หวัดนก มีสาเหตุมาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Influenza A virus) (OIE, 2000) เป็นโรคของสัตว์ปีก พบครั้งแรกที่ประเทศอิตาลีเมื่อร้อยกว่าปีมาแล้ว ต่อมาพบเกิดขึ้นในทุกภูมิภาคทั่วโลก แบ่งเป็นชนิดรุนแรง (Highly Pathogenic Avian Influenza virus, HPAIV) และชนิดไม่รุนแรง (Low Pathogenic Avian Influenza Virus, LPAIV) โดยเชื้อไข้หวัดนกชนิดรุนแรง พบว่าเกิดจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ subtype H7 และ H5 ซึ่งทำให้เกิดโรคที่รุนแรงในสัตว์ปีกและในบางสถานการณ์อาจติดต่อมาสู่คน (OIE, 2004) ในปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีก 16 subtypes ได้แก่ H1-H16 และ N1-N9 AIV ส่วนใหญ่เป็นเชื้อชนิดไม่รุนแรง (Low pathogenic avian influenza virus, LPAIV) เชื้อชนิดรุนแรง (highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV) มักเป็น H5 และ H7 subtypes

ในปี ค.ศ.1997 พบการระบาดของไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกบนเกาะฮ่องกง ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส H5N1 ข้อมูลบ่งชี้ว่าเชื้อแพร่กระจายจากนกที่อยู่ตามชายฝั่ง (shorebird) ไปสู่เป็ดโดยการปนเปื้อนของอุจจาระ จากนั้นแพร่ไปสู่ไก่และปักหลักอยู่ในตลาดขังสัตว์ปีกมีชีวิต (live bird market) นกที่อยู่ตามชายฝั่งและเป็ดไม่เป็นโรคเพราะเป็นแหล่งเก็บเชื้อโดยธรรมชาติ ส่วนไก่เป็นโรคติดเชื้อรุนแรงและมีอัตราการตายสูงมาก ส่วนคนติดเชื้อมาจากไก่ทางอุจจาระที่ปนเปื้อน (fecal - oral route) (Claas et al., 1998)

โดยทั่วไปโรคไข้หวัดนกเป็นโรคติดต่อของสัตว์ปีก ตามปกติโรคนี้ติดต่อมายังคนได้ไม่ง่ายนักแต่คนที่สัมผัสใกล้ชิดกับสัตว์ที่เป็นโรคอาจติดเชื้อได้ มีรายงานการเกิดโรคในคนเป็นครั้งแรกในปี 1997 เมื่อเกิดโรคระบาดของสัตว์ปีกในฮ่องกง คนติดโรคได้โดยการสัมผัสกับสัตว์ปีกที่ป่วยหรือตาย เชื้อที่อยู่ในน้ำมูก น้ำลาย และมูลของสัตว์ป่วย อาจติดมากับมือ และเข้าสู่ร่างกายทางเยื่อบุของจมูกและตา ทำให้เกิดโรคคล้ายไข้หวัดใหญ่ ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง หนาวสั่น ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อ่อนเพลีย เจ็บคอ ไอ ผู้ป่วยเด็กเล็ก ผู้สูงอายุ หรือผู้ที่มีโรคประจำตัวอาจมีภูมิคุ้มกันไม่ดี และมีอาการรุนแรงได้ โดยจะมีอาการหอบ หายใจลำบาก เนื่องจาก

ปอดอักเสบรุนแรง (CDC, 2007) ผู้ที่มีความเสี่ยงต่อโรคไข้หวัดนก ได้แก่ ผู้ที่ทำงานในฟาร์มสัตว์ปีก ผู้ที่ฆ่าหรือชำแหละสัตว์ปีก ในพื้นที่ที่เกิดโรคไข้หวัดนกระบาด

ในประเทศไทยมีการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในช่วงปี 2004 ซึ่งถือว่าเป็นโรคอุบัติใหม่ มีผลทำให้สัตว์ปีก คน และยังทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดเกิดโรคและตายได้อีกด้วย เช่นเสือ (Amonsin et al., 2006; Keawcharoen et al., 2004; Thanawongnuwech et al., 2005) แมว (Songsermn et al., 2006) และสุนัขเป็นต้น

9. การติดต่อข้าม Species จากสัตว์สู่คน

จากการที่เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทำให้เกิดโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ ทั้งยังเป็นโรคสัตว์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถติดต่อถึงคน ได้ในบางสถานการณ์ (OIE, 2004) มีลักษณะของการก่อโรคทั้งชนิดไม่รุนแรง (low or mild clinical manifestation) หรือสัตว์ที่ได้รับเชื้อไม่แสดงอาการป่วยแต่แพร่เชื้อได้ (asymtomatic but carrier status) และเป็นโรคร้ายแรงที่ทำให้สัตว์และคนเสียชีวิต (highly pathogenic) ได้ แม้อัตราการติดเชื้อในคนจะต่ำแต่มีอัตราการเสียชีวิตสูง หลักฐานการแพร่โรคจากคนสู่คนโดยตรงยังไม่มีความชัดเจน แต่เมื่อประกอบกับที่เชื้อไวรัสนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ปลีกย่อยหลากหลาย ทั้งในชนิดหลักของเชื้อ (Types A, B และ C) หรือในส่วนของชนิดย่อย (surface antigens คือ16 HA และ 9 NA genes) และยังมีส่วนที่อยู่ภายใน viral particles อีก 8 segmented RNA genomes ซึ่งในแต่ละ genome นั้นประกอบไปด้วยกรดอะมิโน (amino acid) หรือ polypeptides ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงภายในตามธรรมชาติ (metamorphosis) ได้อีกมากมาย เช่น ขณะที่มีการเพิ่มจำนวนไวรัส (viral replication) ภายในโฮสต์เซลล์หลังการติดเชื้อ หรือในบางกรณีที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงแค่เพียงกรดอะมิโนตำแหน่งเดียวก็สามารถส่งผลกระทบไม่ให้แอนติบอดีเกาะเกี่ยวโฮสต์เซลล์ได้ (Zhang, 2004) อีกทั้งความสามารถในการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และการวิวัฒนาการปรับตัวคงที่อย่างสม่ำเสมอตามธรรมชาติ (evolutionary stasis) ประกอบกับมีการแพร่ของโรคข้ามสายพันธุ์เช่น การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่จากสัตว์ปีกสู่คนของเชื้อไข้หวัดสายพันธุ์ H7N7 ที่ประเทศเนเธอร์แลนด์และ H5N1 ในทวีปเอเชีย ที่เกิดในสาธารณรัฐประชาชนจีน ฮ่องกง เวียดนาม ไทย กัมพูชา หรือ จากสัตว์ปีกไปสู่แมวและเสือ หรือจากเสือไปสู่เสือ ดังเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย แม้ว่าจะยังไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนนักในการแพร่ระบาดจากคนสู่คน และ/หรือความยากง่ายของการติดเชื้อระหว่างคน (WHO, 2006)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนนิวคลีโอโปรตีน (NP) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย โดยมีสมมติฐาน คือ ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP มีความแตกต่างกันตามชนิดสัตว์ และเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้จะดำเนินการเป็น 3 ระยะคือ

ระยะที่ 1 รวบรวมตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย

ระยะที่ 2 ถอดรหัสทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก

ระยะที่ 3 วิเคราะห์ความหลากหลายของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก

ระยะที่ 1 รวบรวมตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย

1.1 การรวบรวม และที่มาของตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างไวรัสทั้งหมดจำนวน 49 ตัวอย่าง โดยแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ที่แยกได้จากคน สุกร และสัตว์ปีก จำนวน 18, 16 และ 15 ตัวอย่างเชื้อตามลำดับ และจำนวนตัวอย่างทั้งหมดประมาณการจากความร่วมมือในการรับส่งตัวอย่างจากสถาบันต่าง ๆ และค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ โดยเชื้อไข้หวัดใหญ่ทั้งหมดที่นำมาศึกษาได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อมาจาก

- เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคนได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อจากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัส วิทยาคลินิค คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสุกรได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อจากกลุ่มงานไวรัสวิทยาสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ และหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสัตว์ปีกได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อจากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 สายพันธุ์ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่

- เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน จำนวน 18 ตัวอย่าง ได้แก่ subtypes H1N1 จำนวน 5 ตัวอย่างและ H3N2 จำนวน 13 ตัวอย่าง รายละเอียดของตัวอย่างเชื้อไข้ใหญ่ในคน ประกอบด้วย รหัสตัวอย่าง ปีที่เก็บและชนิดสายพันธุ์ของเชื้อ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

- เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร จำนวน 16 ตัวอย่าง ได้แก่ subtypes H1N1 จำนวน 6 ตัวอย่าง, H1N2 จำนวน 2 ตัวอย่าง และ H3N2 จำนวน 8 ตัวอย่าง รายละเอียดของตัวอย่างเชื้อไข้ใหญ่สุกร ประกอบด้วย รหัสตัวอย่าง ปีที่เก็บและชนิดสายพันธุ์ของเชื้อ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4

- เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก จำนวน 15 ตัวอย่าง ได้แก่ subtypes H5N1 จำนวน 8 ตัวอย่าง, H7N4 จำนวน 5 ตัวอย่าง และยังไม่ทราบ subtypes จำนวน 2 ตัวอย่าง รายละเอียดของตัวอย่างเชื้อไข้ใหญ่สัตว์ปีก ประกอบด้วย รหัสตัวอย่าง ปีที่เก็บและชนิดสายพันธุ์ของเชื้อ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตัวอย่างที่ได้มาอยู่ในรูปของ RNA และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 ^{O}C เพื่อนำมาใช้ในระยะที่ 2 ต่อไป

ระยะที่ 2 ถอดรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก

2.1 การเตรียม cDNA จากตัวอย่าง RNA

เปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) โดยใช้ random hexamer primers ในปริมาตรทั้งหมด 20 µl เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสด้วยวิธี Multiplex RT-PCR

การสังเคราะห์ cDNA ทำได้โดยเตรียมส่วนผสม RNA และ random hexamer primers ดังต่อไปนี้

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

จากนั้นนำสารละลายไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler ที่ 70 ^{O}C เป็นเวลา 5 นาที และ 4^{O}C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดการจับกันระหว่าง RNA เป้าหมาย และ random hexamer primers หลังจากนั้นเตรียมส่วนผสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse- transcriptase ในการสร้าง cDNA จาก RNA ดังนี้

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
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	5.7 µl	
ปริมาตรรวม	15 µl	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำส่วนผสมระหว่าง RNA กับ primers ที่เตรียมไว้ข้างต้นผสมรวมกับส่วนผสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA และนำไปใส่เครื่อง Thermal cycler ที่ 25 ^{O}C เป็นเวลา 5 นาที และ 42 ^{O}C เป็นเวลา 60 นาที และ 70 ^{O}C เป็นเวลา 15 นาที นำ cDNA ที่เตรียมได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

2.2 การเพิ่มจำนวน (Amplification) ยีน NP ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

การเพิ่มจำนวน (Amplification) ยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยเตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน NP (ตารางที่ 2) และในการทดลองแต่ละครั้งจะใช้น้ำกลั่นเป็น negative control แบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

- นำ cDNA ที่ได้จากข้อ 2.1 มาเพิ่มจำนวนยีน NP โดยทำการเตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ในปริมาตรทั้งหมด 50 µl ประกอบด้วย

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
cDNA	2 µl	
10 µM Forward primer	1 µl	0.2 µM
10 µM Reverse primer	1 µl	0.2 µM
25 mM $MgCl_2$	2 µl	1 mM
2x PCR Master Mix	25 µl	1x
Water, nuclease free	19 µl	
ปริมาตรรวม	50 µl	

- นำส่วนผสมไปเพิ่มจำนวนโดยเครื่อง Thermal cycler ภายใต้ PCR-condition ดังแสดงข้างล่างโดยการทดลองแต่ละครั้งใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ (negative control)

PCR-condition สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน NP

1.	Initial denaturation	94 ^{O}C	3 นาที
2.	Denaturation	94 ^{O}C	30 วินาที
	Annealing	45 ^{O}C	30 วินาที**
	Extension	72 ^{O}C	1.3 นาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 40 รอบ		
3.	Final extension	72 ^{O}C	7 นาที
	Holding tempurature	25 ^{O}C	

** ขั้นตอน annealing นั้นอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับ primers แต่ละคู่ อาจมีการดัดแปลงเพื่อให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมเนื่องด้วยในการศึกษาครั้งนี้มีการใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน NP จำนวนหลายคู่ซึ่งมีขนาดและความยาวที่แตกต่างกันดังนั้นในส่วนของ อุณหภูมิและเวลาจึงมีการปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนของ primers แต่ละคู่

2.3 ตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธีเจลแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)

นำ PCR product (ขนาดและความยาวของ PCR products ขึ้นอยู่กับ primers ที่ใช้ดังในตารางที่ 2) ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์โดยวิธีเจลแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) โดยเตรียม agarose gel ความเข้มข้น 2 % ใน 1x Tris borate-EDTA จากนั้นนำ PCR products ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.2% Orange G loading dye ใน 50 % glycerol (Carlo Ebra Reagent ®) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และหยอดลงในแผ่นเจลหลุม ๆ ละ 25 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง แยก DNA บนแผ่นเจลด้วยโดยการใช้กระแสไฟฟ้า100 โวลต์ นาน 30-45 นาที จากนั้นย้อม DNA บนแผ่นเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปตรวจสอบขนาด PCR product ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองในลักษณะของภาพถ่ายด้วยชุด Gel Documentation

2.4 การสกัดสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์

การสกัดสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์โดยแยกสายดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากสิ่งปลอมปนอื่นโดยเทคนิค Agarose gel electrophoresis แล้วเลือกตัดแถบ specific PCR product ออกมา จากนั้นละลาย Agarose gel ด้วยชุด purification สำเร็จรูป Perfectprep Gel Cleanup kit® (Eppendorf, Hamburg, Germany) ซึ่งอาศัยแผ่น glass fiber membrane ในการแยก DNA ออกจากสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่ปนอยู่ใน DNA เพื่อให้ได้ DNA บริสุทธิ์สำหรับที่จะนำไปใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรม และจากนั้นเตรียมตัวอย่าง DNA ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 ng/µl ปริมาตร 20 µl พร้อมกับส่ง primers ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 µM อย่างละ 10 µl ส่งไปหาลำดับเบสของยีน NP ด้วยวิธี Dideoxy Chain Termination

2.5 ถอดรหัสพันธุกรรมของยีน NP

นำ DNA ที่ได้ไปถอดรหัสพันธุกรรมของยีน NP ตลอดทั้งยีนด้วยวิธี Dideoxy Chain Termination (โดยถอดรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของยีน NP) ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัส วิทยาคลินิค คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ/หรือบริษัท Macrogen เมืองโซล ประเทศเกาหลีใต้ และ/หรือ บริษัท Techdragon ประเทศฮ่องกง

2.6 ตรวจสอบความถูกต้องและประกอบสายพันธุกรรม

- วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการหารหัสพันธุกรรมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยข้อมูลจะอยู่ในรูปของกราฟ Chromatogram (ABI file) และรหัสพันธุกรรม (Text file) และนำมาตรวจสอบความถูกต้อง ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Chromas version 1.45

- อ่านและยืนยันข้อมูลรหัสพันธุกรรม ซึ่งโดยปกติรหัสพันธุกรรมที่ได้จากเครื่อง ABI automated DNA sequencer (Applied Biosystems) จะได้มาในรูป ABI file formet ซึ่งในการอ่านข้อมูลรหัสพันธุกรรมจาก ABI file จำเป็นต้องใช้โปรแกรมในการอ่านซึ่งในการศึกษาได้ใช้โปรแกรม Chromas V1.45 (Griffith University, Queensland, Australia) ในการอ่านข้อมูลรหัสพันธุกรรมและยืนยันผลการอ่าน (validate) รหัสพันธุกรรมให้ถูกต้อง

2.7 การประกอบรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (gene assembly)

การประกอบรหัสพันธุกรรม (assembly) โดยใช้คอมพิวเตอร์ และโปรแกรมที่ใช้ในการอ่านและประกอบรหัสพันธุกรรม คือโปรแกรม DNASTAR (DNASTAR, Madison, WI) ซึ่งมีขั้นตอนการประกอบรหัสพันธุกรรมดังนี้

- แปลงรหัสพันธุกรรมให้อยู่ใน file ที่เหมาะสมกับ assemble program โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้โปรแกรม EditSeq (DNASTAR) ในการแปลง file

- ประกอบรหัสพันธุกรรม (assembly program) ให้ได้สายรหัสพันธุกรรมที่ยาวและครอบคลุมทั้งยีน (complete gene) ซึ่งในการศึกษาได้ใช้โปรแกรม SeqMan (DNASTAR) ในการประกอบรหัสพันธุกรรม (assembly program)

- เมื่อได้รหัสพันธุกรรมทั้งหมดของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก แล้วนำไปวิเคราะห์ข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ระยะที่ 3 วิเคราะห์ความหลากหลายของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย

3.1 รวบรวมข้อมูลเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก สำหรับใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน NP

- เมื่อตรวจสอบความถูกต้องและประกอบรหัสพันธุกรรมแล้ว จะได้รหัสพันธุกรรมของยีน NP (~1500 bp) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ที่ใช้ในงานวิจัยจำนวน 49 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน 18 ตัวอย่าง เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร 16 ตัวอย่าง และเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก 15 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่เคยมีรายงานการระบาดในประเทศไทยและต่างประเทศ ซึ่งข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกได้มาจากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

- หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก โดยหาความสัมพันธ์ในรูปของ Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining และ bootstrap (1,000 replications) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA 4

3.2 วิเคราะห์กลุ่มของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก (host specific group)

- วิเคราะห์กลุ่มของยีน NP โดยอ่านผลในรูปความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก เพื่อดูความแตกต่างและลักษณะการแบ่งกลุ่มของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ในประเทศไทย

3.3 วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก

- โดยนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่ได้มาแปลงเป็นสายโปรตีน (DNA translation) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์และวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

- เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างตัวอย่างเชื้อไวรัสจำนวนตัวอย่างทั้งหมดร่วมกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่เคยมีรายงานการระบาดในประเทศไทย เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของยีน NP ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ 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 $MgCl_2$, 25 mM (Promega, Madison, WI, USA)

1.5 Random primers, 0.5 µg (Promega, Madison, WI, USA)

1.6 Recombinant RNAsin ® Ribonuclease Inhibitor, 40 u / µl (Promega, Madison, WI, USA)

1.7 Rneasy mini kit® (Qiagen, Hilden, Germany)

1.8 Recombinant RNAsin ® Ribonuclease Inhibitor, 40 u / µl (Promega, Madison, WI, USA)

1.9 Ultrapure ™ Distrilled 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 Mg^{2+} solution, 25 mM (Eppendorf®, Hamburg, Germany)

2.6 0.2% Orange G loading dye ใน 50 % glyceral (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™ Distrilled water DNAse, RNAse (GIBCO ®, USA)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1 PCR tube 0.2 ml. (Axygen Scientific®, CA, USA)

3.2 Microcentrifuge tube (eppenorf tubes) 1.5 ml

3.3 Micropipett 0.5-2, 2-20, 20-200 และ 100-1000 µl (Gilson®, France)

3.4 Micropipett tip 2, 200 และ 1000 µl

3.5 อุปกรณ์เครื่องแก้ววิทยาศาสตร์

4. เครื่องมือที่ในการวิจัย

4.1 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermocycler) (Thermoelectron corporation®, USA)

4.2 เครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis system) (OWI Scientific Inc®, USA)

4.3 เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat®)

4.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Denville Scientific Inc. ®, USA)

4.5 ตู้แช่แข็ง –20^{O} C และ -80^{O} C

4.6 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ (primers) ที่ใช้ในงานวิจัย

นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ ได้แก่

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

5.2 Primers สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน NP เพื่อใช้ในการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน NP ประกอบด้วย primers จำนวน หลายคู่ ซึ่งจะได้ PCR product ขนาดแตกต่างกัน เพื่อให้เหมาะสมต่อการหาลำดับเบส รายละเอียดของลำดับเบส primer ของยีน NP และขนาดของ primers แต่ละคู่ แสดงในตารางที่ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก

Primer	Nucleotides	PCR product (bp)
NP-F5'	5'-AGC AAA AGC AGG GTA GAT AAT C-3'	613
NP-R1	5'-CCA TCG TCC CGA CTC CCT TTA-3'	
NP-F2	5'-TGA TGC CAC ATA CCA GAG AAC-3'	1087
NP-R3'	5'-AGT AGA AAC AAG GGT ATT TTT CT-3'	
NP- cF1	5'-CTC AAG GCA CCA AAC GAT CT-3'	468
NP-cR1	5'-GTT GCG TCC TCT CCA TTG TT-3'	
NP-cF2	5'-TGG GTG AGA GAG CTA ATT CTG-3'	560
NP-cR2	5'-CTT TGT GCT GCT GTT TGG AA-3'	
NP-cF3	5'-TTT CTG GAG AGG CGA AAA TG-3'	472
NP-cR3	5'-TCC TCT TGG GAC CAC TCT TG-3'	
NP-cF4	5'-GAG AAT CCA GCA CAT AAG AGT CAA-3'	540
NP-cR4	5'-GCA TTG TCT CCG AAG AAA TAA GA-3'	
NP-AF1	5'-CCA GGG CAC CAA ACG TAG-3'	577
NP-AR1	5'-ACG AAT CAG TTC CAT CAC CA-3'	
NP-AF2	5'-GCG TAT GTA CAG CCT GAT G-3'	646
NP-AR2	5'-GCT ATC CAT CGC TTC CAT GT-3'	
NP-AF3	5'-AGC GGC TAT GAT TTT GAA CG-3'	602
NP-AR3	5'-TAG CTG CCT TCG TTG TTC AT-3'	
*NP-1F	5'-TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TA-3'	1565
*NP-1565R	5'-ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT ATT TTT-3'	

*ดัดแปลงมาจาก Hoffmann, 2001

ตารางที่ 3 ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน จำนวน 18 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Strain	Subtype	Year(2006-2008)
A/Thailand/CU32/2006(H1N1)	H1N1	2006
A/Thailand/CU44/2006(H1N1)	H1N1	2006
A/Thailand/CU51/2006(H1N1)	H1N1	2006
A/Thailand/CU68/2006(H1N1)	H1N1	2006
A/Thailand/CU88/2006(H1N1)	H1N1	2006
A/Thailand/CU23/2006(H3N2)	H3N2	2006
A/Thailand/CU46/2006(H3N2)	H3N2	2006
A/Thailand/CU228/2006(H3N2)	H3N2	2006
A/Thailand/CU231/2006(H3N2)	H3N2	2006
A/Thailand/CU260/2006(H3N2)	H3N2	2006
A/Thailand/CU280/2007(H3N2)	H3N2	2007
A/Thailand/CU282/2007(H3N2)	H3N2	2007
A/Thailand/CU1101/2008(H3N2)	H3N2	2008
A/Thailand/CU1102/2008(H3N2)	H3N2	2008
A/Thailand/CU1103/2008(H3N2)	H3N2	2008
A/Thailand/CU356/2008(H3N2)	H3N2	2008
A/Thailand/CU370/2008(H3N2)	H3N2	2008
A/Thailand/CU379/2008(H3N2)	H3N2	2008

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร จำนวน 16 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Strain	Subtype	Year (2003-2009)
A/Swine/Chonburi/NIAH9469/04(H1N1)	H1N1	2004
A/Swine/Thailand-HF6/05(H1N1)	H1N1	2005
A/Swine/Thailand/06CB2/06(H1N1)	H1N1	2006
A/Swine//Thailand/CU-CB1/06(H1N1)	H1N1	2006
A/Swine/Thailand/CU-CHK1/08(H1N1)	H1N1	2008
A/Swine/Thailand/CU-CBP18/09(H1N1)	H1N1	2009
A/Swine/Saraburi/NIAH13021/05(H1N2)	H1N2	2005
A/Swine/Thailand/CU-CHL2/09(H1N2)	H1N2	2009
A/Swine/Nakhon pathom/NIAH586/05(H3N2)	H3N2	2005
A/Swine/Chachoengsao/NIAH/03(H3N2)	H3N2	2003
A/Swine/Nakhon pathom/NIAH586-2/05(H3N2)	H3N2	2005
A/Swine/Chachoengsao/NIAH586-3/05(H3N2)	H3N2	2005
A/Swine/Unknow/NIAH586-4/05(H3N2)	H3N2	2005
A/Swine/Ratchaburi/NIAH874/05(H3N2)	H3N2	2005
A/Swine/Thailand/S1/05(H3N2)	H3N2	2005
A/Swine/ Thailand/CU-CB8.4/07(H3N2)	H3N2	2007

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก จำนวน 15 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Strain	Subtype	year
A/ Chicken /Bangkok/CU-269/06(H5N1)	H5N1	2006
A/Chicken/Chonburi/CU-279/06(H5N1)	H5N1	2006
A/Quail/Nakhonratchasima/CU-284/06(H5N1)	H5N1	2006
A/Chicken/Chonburi/CU-285/06(H5N1)	H5N1	2006
A/Chicken/Prachinburi/CU-304/06(H5N1)	H5N1	2006
A/Chicken/Unknown/CU-307/06(H5N1)	H5N1	2006
A/Chicken/Uthaithani/CU-P76/08(H5N1)	H5N1	2008
A/Chicken/Uthaithani/CU-P87/08(H5N1)	H5N1	2008
A/Quail/Ayuthaya/CU-J1243/09	Unknown	2009
A/Quail/Suphanburi/CU-J1475/09	Unknown	2009
A/Duck/Phitsanulok/CU-P622/09(H7N4)	H7N4	2009
A/Duck/Phitsanulok/CU-P624/09(H7N4)	H7N4	2009
A/Duck/Phitsanulok/CU-P630/09(H7N4)	H7N4	2009
A/Duck/Phitsanulok/CU-P632/09(H7N4)	H7N4	2009
A/Duck/Phitsanulok/CU-P634/09(H7N4)	H7N4	2009

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาความหลากหลายของยีนนิวคลีโอโปรตีน (NP) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ซึ่งเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย

1. ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก

การศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของยีน NP ทั้งหมด 49 เส้น ประกอบด้วยเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจำนวน 18 เส้น ซึ่งข้อมูลรหัสพันธุกรรม ได้นำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล Genbank ผ่านทาง http://www.ncbi.nlm.nih.gov เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจำนวน 16 เส้น เผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank แล้วจำนวน 4 เส้น และเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งข้อมูลรหัสพันธุกรรม จะนำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูลต่อไป รายละเอียดรหัสพันธุกรรมดังแสดงในตาราง 6, 7 และ 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงรายละเอียดของรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน จำนวน 18 ตัวอย่าง

Strain	Subtype	year	GenBank #Accession No.
เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน			
A/Thailand/CU32/2006(H1N1)	H1N1	2006	FJ912910
A/Thailand/CU44/2006(H1N1)	H1N1	2006	FJ912916
A/Thailand/CU51/2006(H1N1)	H1N1	2006	FJ912928
A/Thailand/CU68/2006(H1N1)	H1N1	2006	FJ912934
A/Thailand/CU88/2006(H1N1)	H1N1	2006	FJ912940
A/Thailand/CU23/2006(H3N2)	H3N2	2006	FJ912904
A/Thailand/CU46/2006(H3N2)	H3N2	2006	FJ912922
A/Thailand/CU228/2006(H3N2)	H3N2	2006	FJ912946
A/Thailand/CU231/2006(H3N2)	H3N2	2006	FJ912952
A/Thailand/CU260/2006(H3N2)	H3N2	2006	FJ912958
A/Thailand/CU280/2007(H3N2)	H3N2	2007	FJ912964
A/Thailand/CU282/2007(H3N2)	H3N2	2007	FJ912970
A/Thailand/CU1101/2008(H3N2)	H3N2	2008	FJ912300
A/Thailand/CU1102/2008(H3N2)	H3N2	2008	FJ913006
A/Thailand/CU1103/2008(H3N2)	H3N2	2008	FJ913012
A/Thailand/CU356/2008(H3N2)	H3N2	2008	FJ912978
A/Thailand/CU370/2008(H3N2)	H3N2	2008	FJ912986
A/Thailand/CU379/2008(H3N2)	H3N2	2008	FJ912994

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงรายละเอียดของรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร จำนวน 16 ตัวอย่าง

Strain	Subty	year	GenBank #Accession No.
เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร			
A/Swine/Chonburi/NIAH9469/04(H1N1)	H1N1	2004	AB434305
A/Swine/Thailand-HF6/05(H1N1)	H1N1	2005	N/A*
A/Swine/Chonburi/06CB2/06(H1N1)	H1N1	2006	N/A*
A/Swine/Thailand/CU-CB1/06(H1N1)	H1N1	2006	N/A*
A/Swine/Thailand/CU-CHK1/08(H1N1)	H1N1	2008	N/A*
A/Swine/Thailand/CU-CBP18/09(H1N1)	H1N1	2009	N/A*
A/Swine/Saraburi/NIAH13021/05(H1N2)	H1N2	2005	AB434337
A/Swine/Thailand/CU-CHL2/09(H1N2)	H1N2	2009	N/A*
A/Swine/Chachoengsao/NIAH/03(H3N2)	H3N2	2003	AB434345
A/Swine/Nakhon pathom/NIAH586/05(H3N2)	H3N2	2005	N/A*
A/Swine/Nakhon pathom/NIAH586-2/05(H3N2)	H3N2	2005	N/A*
A/Swine/Chachoengsao/NIAH586-3/05(H3N2)	H3N2	2005	N/A*
A/Swine/Unknown/NIAH586-4/05(H3N2)	H3N2	2005	N/A*
A/Swine/Ratchaburi/NIAH874/05(H3N2)	H3N2	2005	AB434377
A/Swine/Thailand/S1/05(H3N2)	H3N2	2005	N/A*
A/Swine/ Thailand/CU-CB8.4/07(H3N2)	H3N2	2007	N/A*

*N/A หมายถึง Not Available เนื่องจากยังไม่ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงรายละเอียดของรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก จำนวน 15 ตัวอย่าง

Strain	Subtype	year	GenBank #Accession
เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก			
A/ Chicken /Bangkok/CU-269/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*
A/Chicken/Chonburi/CU-279/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*
A/Quail/Nakhonratchasima/CU-284/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*
A/Chicken/Chonburi/CU-285/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*
A/Chicken/Prachinburi/CU-304/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*
A/Chicken/Unknown/CU-307/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*
A/Chicken/Uthaithani/CU-P76/08(H5N1)	H5N1	2008	N/A*
A/Chicken/Uthaithani/CU-P87/08(H5N1)	H5N1	2008	N/A*
A/Quail/Ayuthaya/CU-J1243/09	Unknown	2009	N/A*
A/Quail/Suphanburi/CU-J1475/09	Unknown	2009	N/A*
A/Duck/Phitsanulok/CU-P622/09(H7N4)	H7N4	2009	N/A*
A/Duck/Phitsanulok/CU-P624/09(H7N4)	H7N4	2009	N/A*
A/Duck/Phitsanulok/CU-P630/09(H7N4)	H7N4	2009	N/A*
A/Duck/Phitsanulok/CU-P632/09(H7N4)	H7N4	2009	N/A*
A/Duck/Phitsanulok/CU-P634/09(H7N4)	H7N4	2009	N/A*

*N/A หมายถึง Not Available เนื่องจากยังไม่ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank

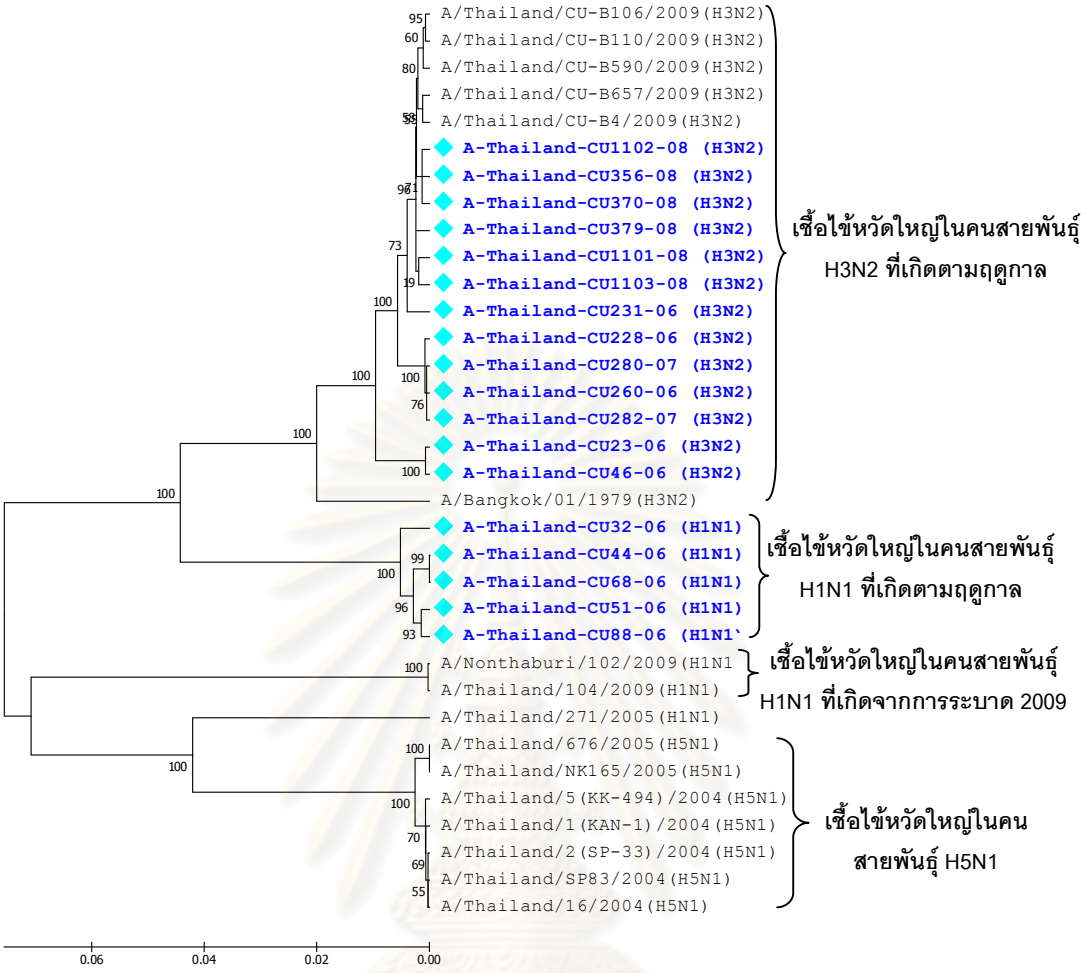
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย

ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน NP โดยวิธี cluster analysis และแสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในรูปแบบของ phylogenetic tree ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทยระหว่างเชื้อที่ใช้ในการศึกษากับเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยที่เผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank

2.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนในประเทศไทย

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 18 ตัวอย่าง ประกอบด้วย H1N1 จำนวน 5 ตัวอย่าง และ H3N2 จำนวน 13 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่เคยแยกได้ในไทย พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่เกิดตามฤดูกาล ประกอบด้วย เชื้อที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 18 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ H3N2 ที่มีรายงานในปี 2009 และรวมทั้งสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในปี 1979 คือ A/Bangkok/01/1979 (H3N2) นอกจากนี้ยังพบว่ายีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่เกิดตามฤดูกาลมีแบ่งกลุ่มอย่างชัดเจนระหว่างสายพันธุ์ คือ กลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 และสายพันธุ์ H1N1 และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่เกิดในช่วงที่มีการระบาด ประกอบด้วยสายพันธุ์ H1N1(2009) ที่กำลังระบาดในปัจจุบันซึ่งแยกต่างหากจากเชื้อไข้หวัดที่เกิดตามฤดูกาล และสายพันธุ์ H5N1 ที่เกิดในช่วงที่มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในระหว่างปี 2004-2005 นอกจากนี้ยังพบว่ามี 1 คือ สายพันธุ์ A/Thailand/271/2005 (H1N1) ไม่จัดอยู่ทั้งในกลุ่มของสายพันธุ์ H1N1 ที่เกิดตามฤดูกาลและกลุ่มที่เกิดจากการระบาดในปัจจุบันเนื่องด้วยลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อใกล้เคียงกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ยุโรป (Kingsford, 2009) และผลของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนในประเทศไทย ได้แสดงไว้ในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ดังแสดงในภาพ 6



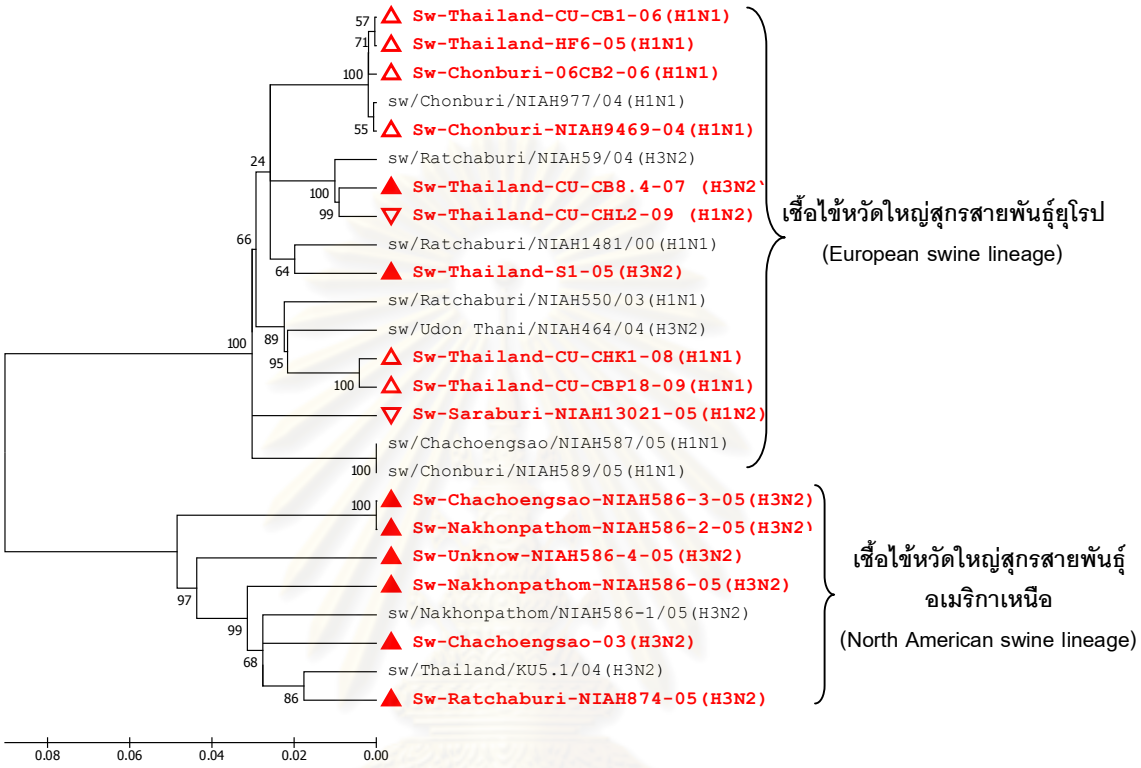
แผนภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทย

* ◆ ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 18 ตัวอย่าง

3.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย

ผลของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกรจำนวน 16 ตัวอย่างประกอบด้วย เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 6 ตัวอย่าง เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 จำนวน 2 ตัวอย่าง และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 8 ตัวอย่าง ร่วมกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เคยพบรายงายในประเทศไทย พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยแยกออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์อเมริกา-เหนือ ซึ่งในประเทศไทยเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เคยมีรายงานและเชื้อที่ใช้ในการศึกษาพบว่าเป็นสายพันธุ์H3N2 ทั้งหมด ส่วนในกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ยุโรป ประกอบด้วย

สายพันธุ์ H1N1, H1N2 และ H3N2 ดังนั้นจากผลการศึกษาและที่เคยมีรายงานในปัจจุบันสรุปได้ว่ายีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยพบทั้งสายพันธุ์ยุโรป และสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American swine) ดังแสดงในแผนภาพที่ 7



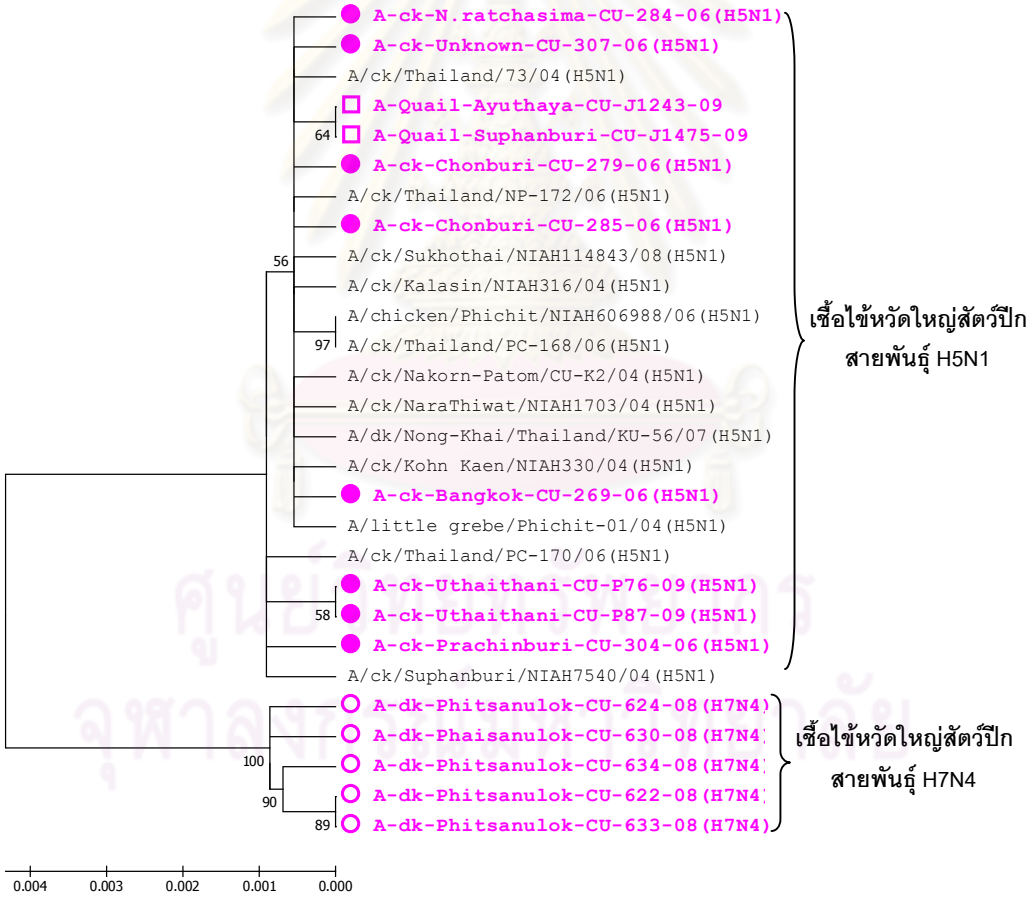
แผนภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกรที่แยกได้ในประเทศไทย

* ▲ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมดจำนวน 7 ตัวอย่าง
* △ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมดจำนวน 7 ตัวอย่าง
* ▽ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมดจำนวน 2 ตัวอย่าง

3.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในประเทศไทย

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย subtype H5N1 จำนวน 8 ตัวอย่าง subtype H7N4 จำนวน 5 ตัวอย่าง และยังไม่ทราบ subtypeจำนวน 2 ตัวอย่าง กับเชื้อที่เคยแยกได้ในประเทศไทย (พบมีรายงานเฉพาะสายพันธุ์ H5N1) ตั้งแต่ปี 2004-2009 พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก แยกออกเป็นสองกลุ่มอย่างชัดเจน ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มของ

เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก subtype H5N1 ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาและที่เคยมีรายงานระบาดในประเทศไทยที่ผ่านมา และอีกกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่ subtype H7N4 ซึ่งในไทยยังไม่พบมีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ผ่านทาง http://www.ncbi.nlm.nih.gov ดังนั้นจากผลที่ได้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทยจากข้อมูลที่พบรายงานในปัจจุบันสรุปได้ว่ายีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกนั้นแบ่งกลุ่มตามชนิดสายพันธุ์ คือ กลุ่มไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N4 และกลุ่มไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H5N1 โดยยังพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ยังไม่ทราบ subtype ก็จัดอยู่ในกลุ่มไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H5N1 ทั้งของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาและที่เคยแยกได้ในประเทศไทย เป็นไปได้ว่าเชื้อทั้งสองตัวอย่างมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ H5N1หรืออาจจะเป็น subtype H5N1ก็ได้ดังแสดงในภาพที่ 8



แผนภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย

* ● เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H5N1 ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจำนวน 10 ตัวอย่าง
* ○ เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H7N4 ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจำนวน 5 ตัวอย่าง
* □ เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่ยังไม่ทราบ subtype ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจำนวน 2 ตัวอย่าง

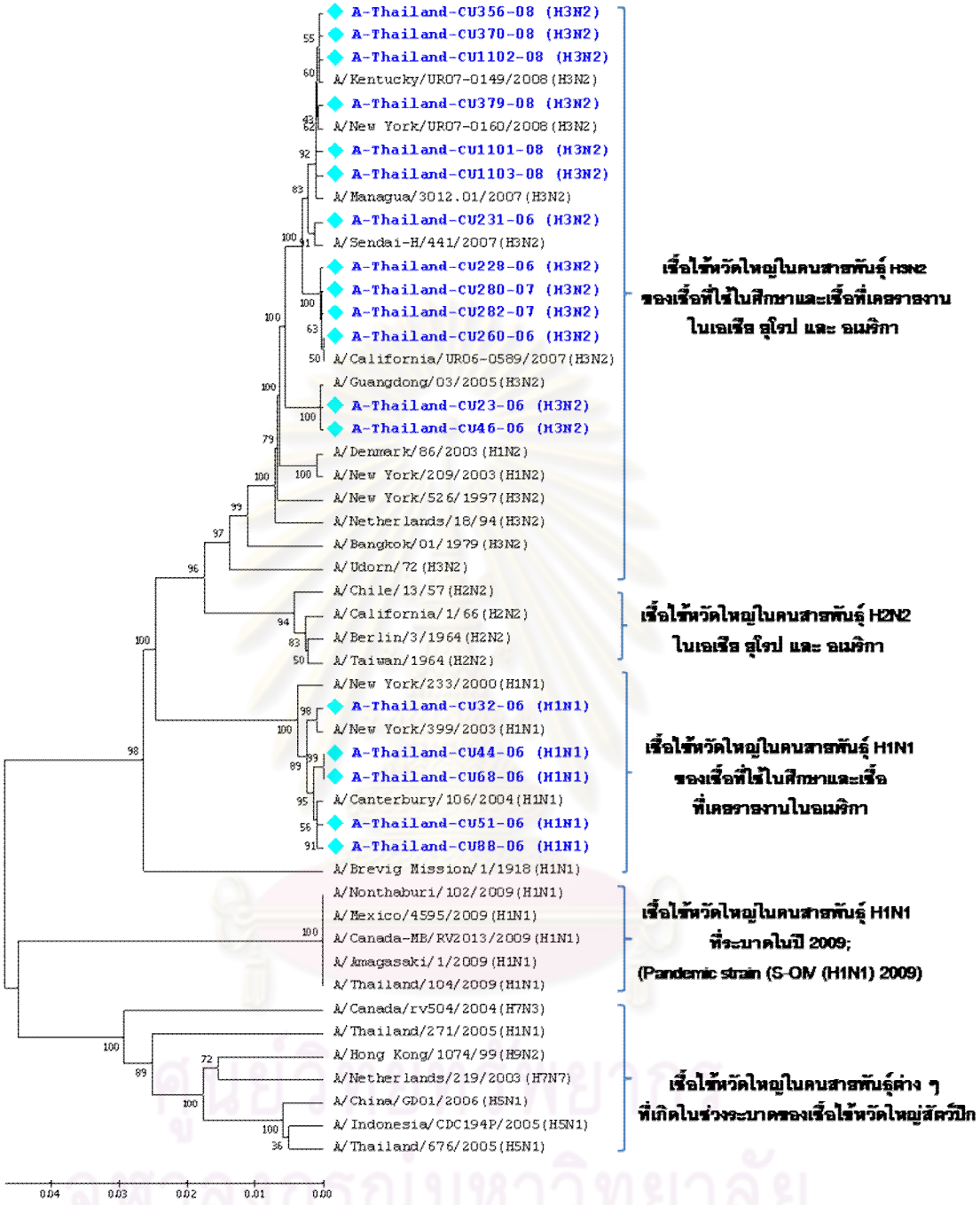
3. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อที่เคยมีรายงานจากต่างประเทศ

การศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน NP โดยวิธี cluster analysis และแสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในรูปแบบของ phylogenetic tree ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่จากต่างประเทศ

3.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจากต่างประเทศ

ผลของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 18 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจากต่างประเทศ พบเชื้อไข้หวัดใหญ่ ในคนสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 5 ตัวอย่างที่แยกได้ในปี 2006 จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ในอเมริกาช่วงปี 2006 และเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 11 ตัวอย่างเชื้อจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไข้หวัดในคนสายพันธุ์ H3N2 ที่เกิดในอเมริกาที่แยกได้ในปี 2008 นอกจากนี้ยังพบเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ A/Thailand/CU23/2006 (H3N2) และ A/Thailand/CU46/2006 (H3N2) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H3N2 ที่เกิดขึ้นในเอเชีย ดังแสดงในแผนภาพที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



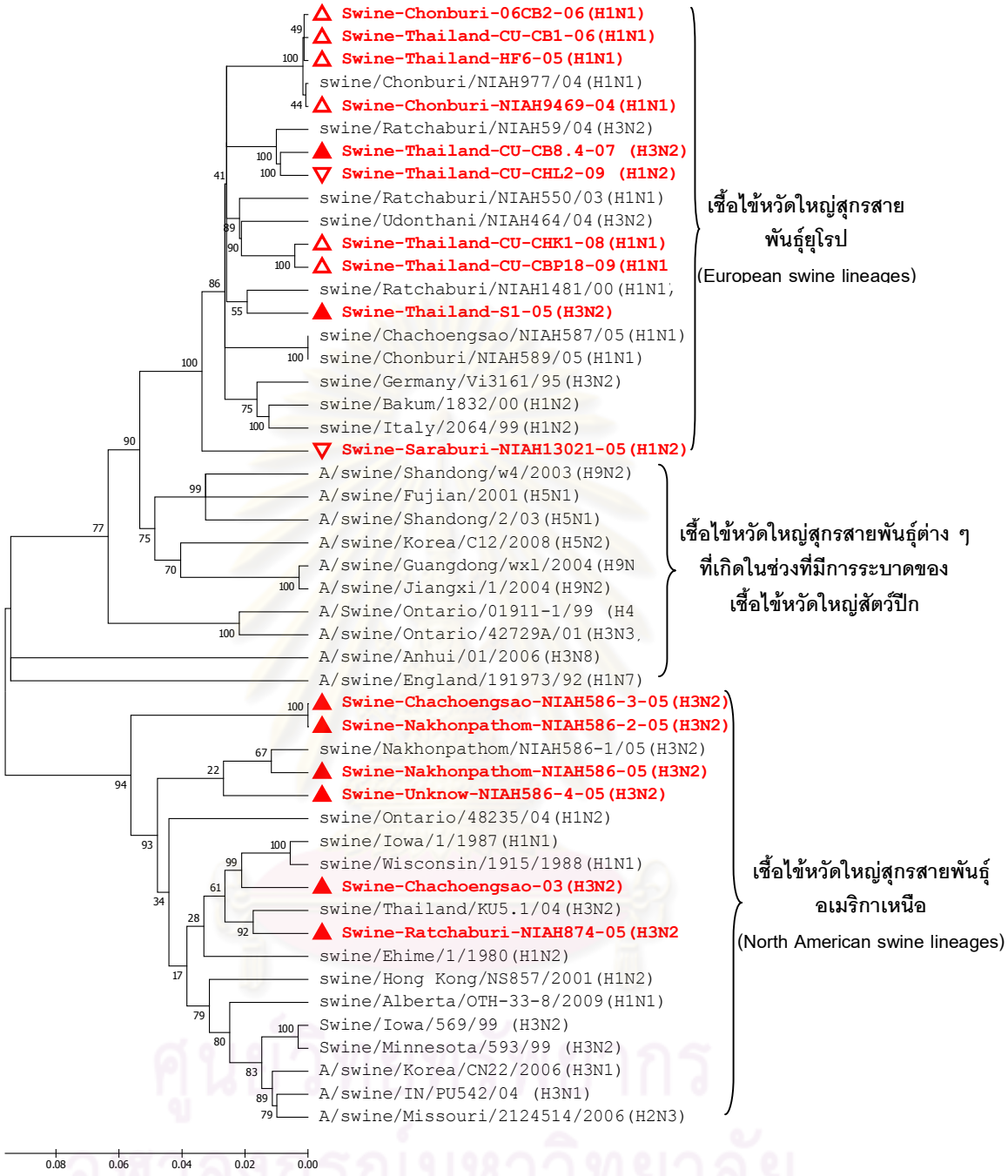
แผนภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจากต่างประเทศ

* ◆ ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 18 ตัวอย่าง

3.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจากต่างประเทศ

ผลของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกรจำนวน 16 ตัวอย่างประกอบด้วย เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 6 ตัวอย่าง เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 จำนวน 2 ตัวอย่าง เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 8 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจากต่างประเทศ พบว่าส่วนใหญ่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 จัดอยู่ในกลุ่มไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ในยุโรป และส่วนใหญ่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ในอเมริกาเหนือ (North American swine lineage) แต่มีเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ A/Swine/Thailand/CU-CB8.4/07 (H3N2) และ A/Swine/Thailand/S1/05 (H3N2) จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ในยุโรป รายละเอียดดังแสดงในแผนภาพที่ 10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



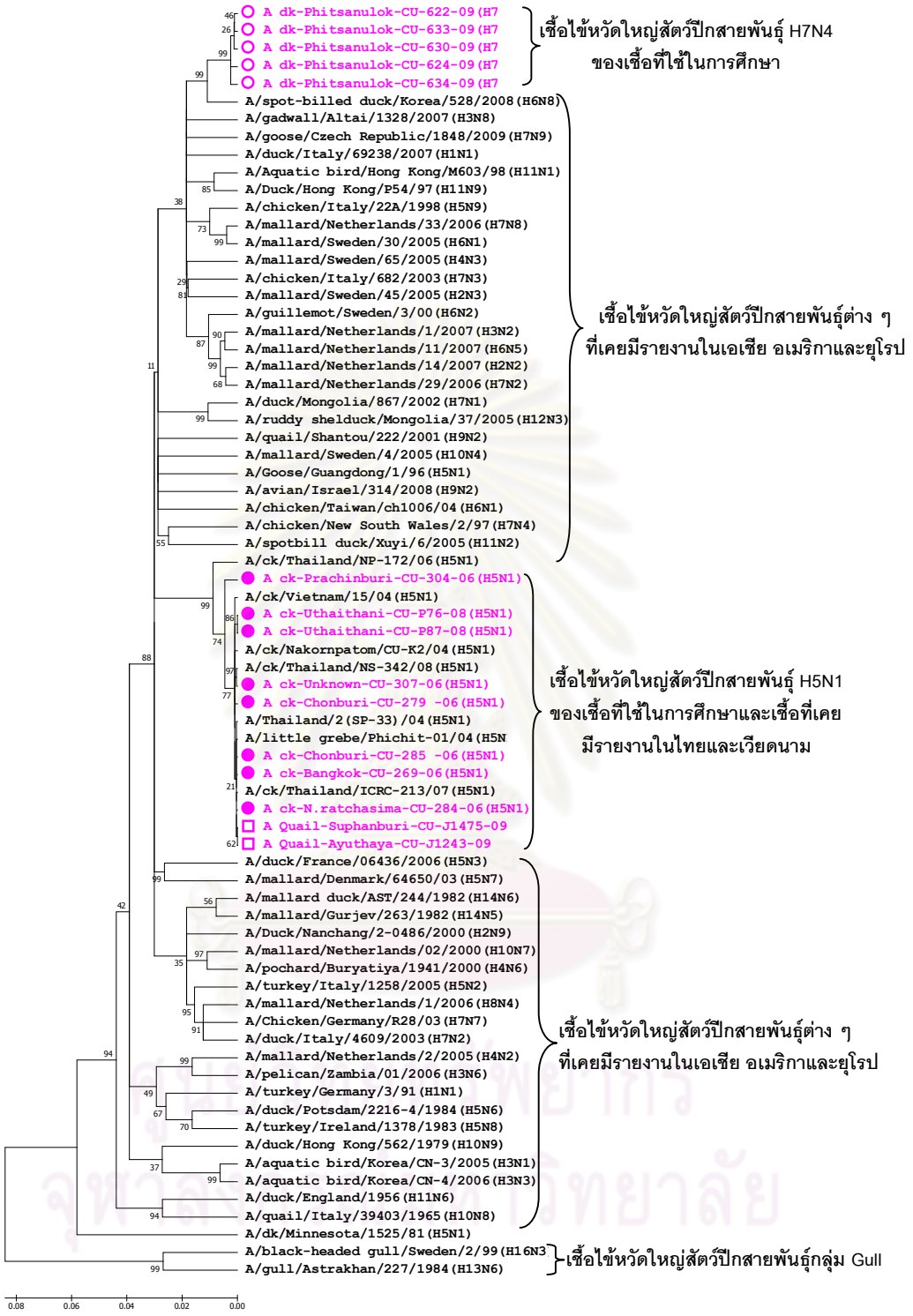
แผนภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกรที่แยกได้ในประเทศไทยกับเชื้อต่างประเทศ

* ▲ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมดจำนวน 7 ตัวอย่าง
* △ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมดจำนวน 7 ตัวอย่าง
* ▽ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมดจำนวน 2 ตัวอย่าง

3.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกของเชื้อที่นำมาศึกษาที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจากต่างประเทศ

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจาก Phylogenetic tree ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกของเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อจากต่างประเทศ ซึ่งประกอบด้วยเชื้อจาก เอเชีย ยุโรป และอเมริกา พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกของเชื้อที่ใช้ในการศึกษา 10 ตัวอย่าง คือ subtype H5N1 จำนวน 8 ตัวอย่างและ ยังไม่ทราบ subtype จำนวน 2 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H5N1 ของเชื้อที่ไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในไทยและเวียดนามที่มีการระบาดในระหว่างปี 2004-2008 ส่วนเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H7N4 พบว่าแยกออกเป็นกลุ่มเดี่ยวเฉพาะเชื้อที่ใช้ในการศึกษา แม้ว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H7N4 จะแยกออกเฉพาะกลุ่ม แต่พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่เกิดการระบาดในเอเชียในปี 1996 -1997 ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันและอาจมีวิวัฒนาการมาจากเชื้อไข้หวัดนก Goose/Guangdong/1/96 ที่คาดว่าเป็นต้นแบบของเชื้อที่ทำให้เกิดการระบาดในปี 1997 และ 2001 ในจีนและฮ่องกง (Guan et al., 2002) ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่ใช้ในการศึกษาที่แยกได้ในไทยกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้จากประเทศต่าง ๆ ทั้งในเอเชีย ยุโรป และอเมริกา แสดงไว้ในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ในภาพที่ 11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทยกับเชื้อต่างประเทศ

* ● เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H5N1 ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจำนวน 10 ตัวอย่าง
* ○ เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H7N4 ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจำนวน 5 ตัวอย่าง
* □ เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่ยังไม่ทราบ subtype ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจำนวน 2 ตัวอย่าง

3.4 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย

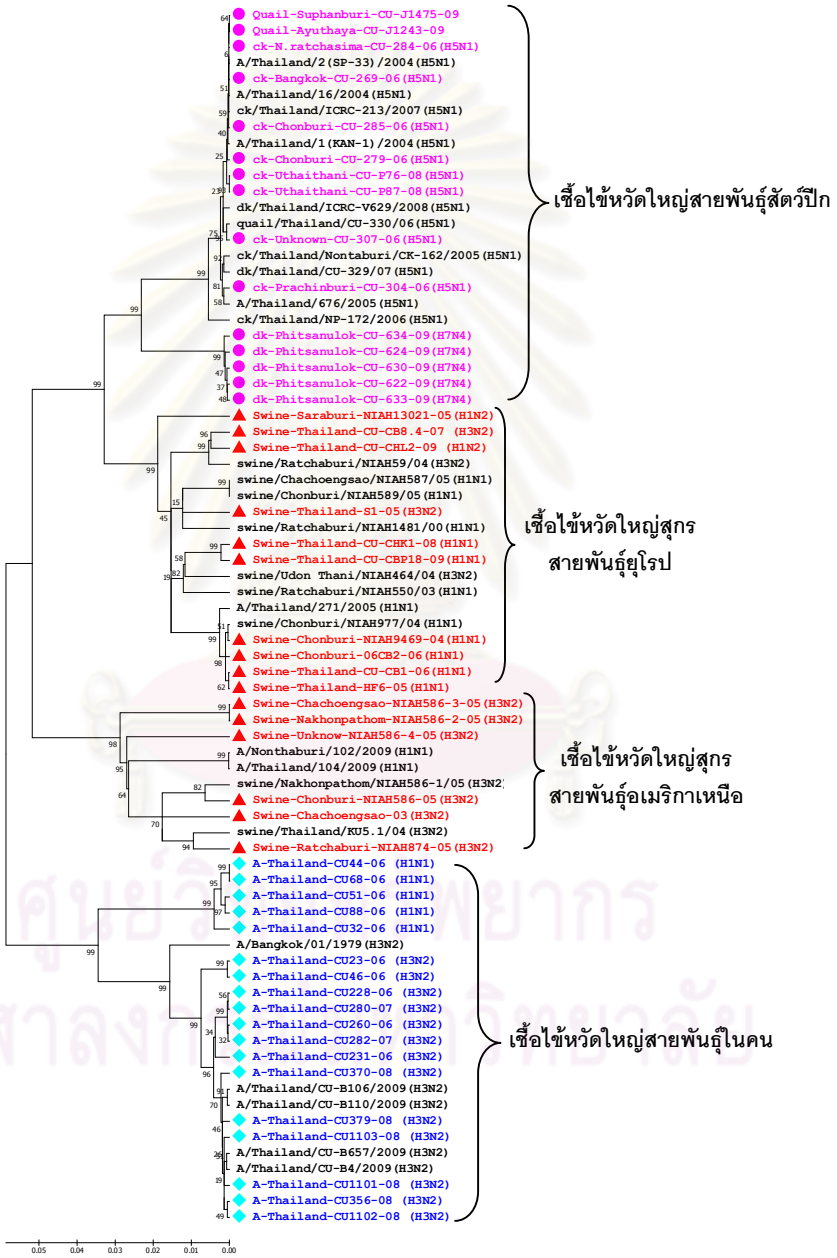
ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจาก Phylogenetic tree ของยีน NP ของ เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด จำนวน 49 ตัวอย่าง กับเชื้อที่เคยมีรายงานในประเทศไทย โดยเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนของไทย มีรายงาน 3 subtypes คือ H1N1 H3N2 และ H5N1 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมี 3 subtypes คือ H1N1 H1N2 และ H3N2 ส่วนไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกมีรายงานเฉพาะ subtype H5N1 เท่านั้น และจากผลการวิเคราะห์พบว่า เชื้อไข้หวัดใหญ่ของไทยแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน กลุ่มที่สองประกอบด้วยกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกและเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร และในแต่ละกลุ่มยังแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามชนิดสายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่

เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน แบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อยเช่นกัน คือกลุ่มของสายพันธุ์ H1N1 ที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 5 ตัวอย่าง และกลุ่มสายพันธุ์ H3N2 ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาและเชื้อที่เคยมีรายงานในช่วงปี 2006-2009 รวมทั้งเชื้อที่เคยมีรายงานในปี 1979 (A/Bangkok/01/1979 (H3N2)ด้วย

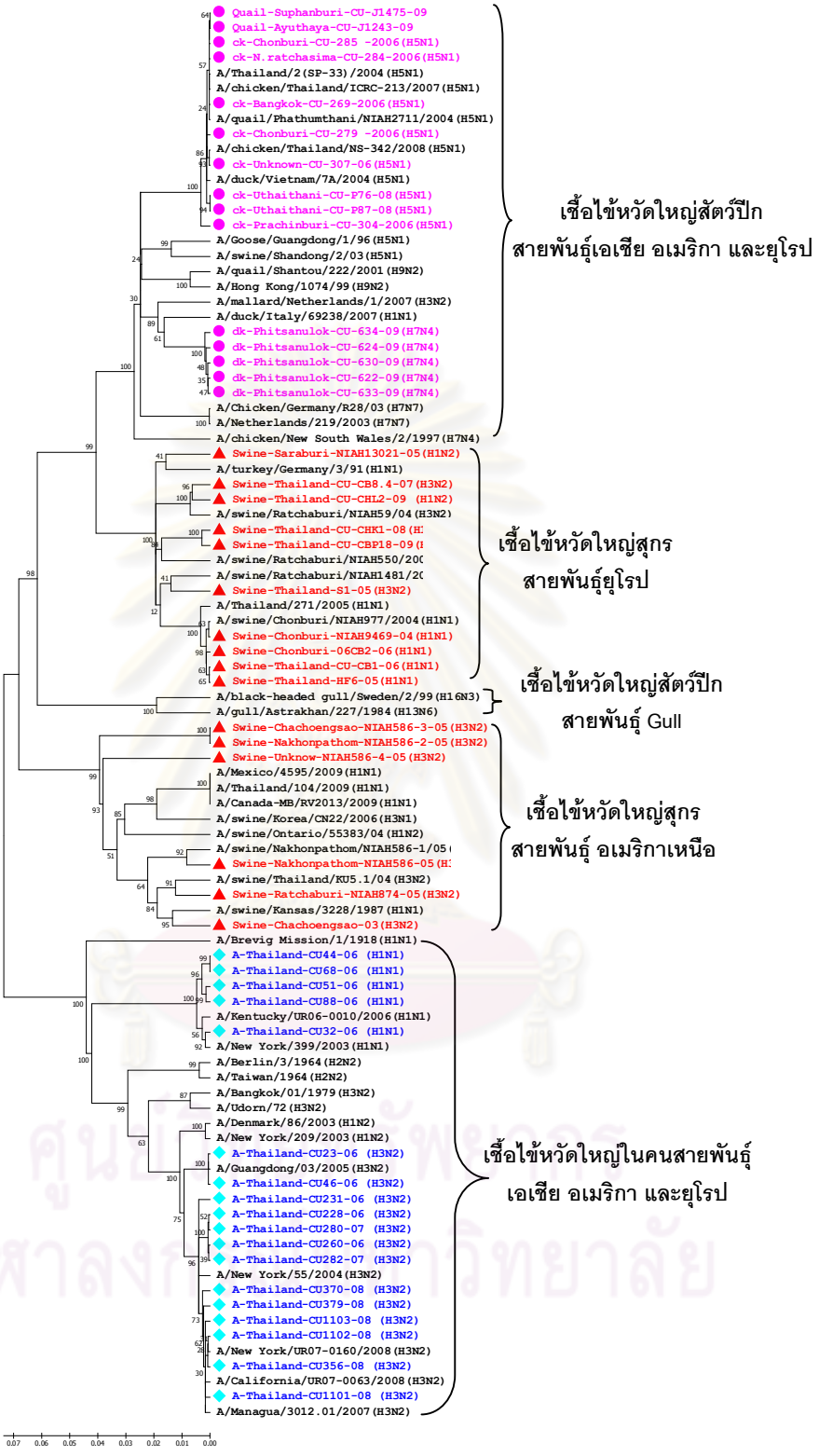
เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร แบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อยเช่นกัน คือกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ โดยในกลุ่มสายพันธุ์ยุโรปพบเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจำนวน 1 ตัวอย่าง คือ A/Thailand/271/2005 (H1N1) จัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย และเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อตัวนี้ไม่ได้เกิดในช่วงที่มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร แต่เป็นไข้หวัดใหญ่ที่เกิดตามฤดูกาลทั่วไป นอกจากนี้ในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกันพบเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H1N1 (2009) ซึ่งเป็นเชื้อที่เกิดในช่วงที่มีการระบาดของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ในคนในปี 2009 จัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่ว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 มีที่มาของเชื้อคล้ายคลึงกับไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American swine) (Kingsford, 2009)

ในเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกพบแบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อย คือกลุ่มสายพันธุ์ H7N4 จำนวน 5 ตัวอย่าง (ในไทยยังไม่พบมีรายงาน) และกลุ่มสายพันธุ์ H5N1 และเชื้อที่เคยมีรายงานตั้งแต่ปี 2004-2008 นอกจากนี้ยังพบเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H5N1 ที่มีรายงานในปี 2004-2005 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกในไทย จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกด้วย ซึ่งบ่งชี้ว่าคนมีการติดเชื้อมาจากสัตว์ปีก

นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจาก Phylogenetic tree ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ระหว่างเชื้อที่ใช้ในการศึกษากับเชื้อไข้หวัดใหญ่จากต่างประเทศในคน สุกร และสัตว์ปีก พบให้ผลเป็นไปในแบบเดียวกันกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีกในประเทศไทย ซึ่งรายละเอียดผลการศึกษาดังแสดงในแผนภาพที่ 12 และแผนภาพที่ 13



แผนภาพที่ 12 Phylogenetic tree ของยีน NP แสดงสายวิวัฒนาการของไวรัสที่จำเพาะกับ specie ของโฮสต์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย (◆ = เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่ใช้ในการศึกษา, ▲ = เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ใช้ในการศึกษา และ ●= เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่ใช้ในการศึกษา)



แผนภาพที่ 13 Phylogenetic tree ของยีน NP แสดงสายวิวัฒนาการของไวรัสที่จำเพาะกับ specie ของโฮสต์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทยกับเชื้อต่างประเทศ (◆ = เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่ใช้ในการศึกษา, ▲ = เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ใช้ในการศึกษาและ ●= เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่ใช้ในการศึกษา)

4. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ในคน สุกร และสัตว์ปีก

4.1 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนในที่แยกได้ในประเทศไทย

ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจำนวน 18 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่เคยแยกได้ในไทย พบว่ามีกรดอะมิโน 74 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน และพบความแตกต่างของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 18 ตัวอย่าง ว่ากรดอะมิ-โนมีความแตกต่างกัน 34 ตำแหน่ง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 10 นอกจากนี้ การเปรียบเทียบเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่ใช้ในการศึกษากับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่เคยมีรายงานในประเทศไทย ยังพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H3N2 มีกรดอะมิโน 7 ตำแหน่งที่มีความจำเพาะกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนทุกตัวอย่างของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาและเชื้อที่เคยมีรายงานในไทยสายพันธุ์ H3N2 ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31(K), 217(S), 286(S), 343(L), 344(L), 353(S) และ 459 (R) ส่วนในเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H1N1 ไม่พบตำแหน่งที่มีความจำเพาะเด่นชัดเหมือน H3N2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน 34 ตำแหน่งเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน ระหว่างสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่ใช้ในการศึกษา 18 ตัวอย่าง

ตำแหน่งกรดอะมิโน	สายพันธุ์ H1N1	สายพันธุ์ H3N2
18	E	D
31	R	K
34	G	D
50	N	S
65	R	K
98	K	R
105	V	M
127	D	E
146	T	A
186	V	I
191	L	M
217	I	S
236	K	R
239	M	V
257	T	I
286	A	S
301	V	I
309	T	N
334	N	H
343	V	L
344	S	L
353	L	S
373	A	N
374	I	M
375	V	G
384	R	G
406	I	T
408	T	V
421	D	E
423	T	S
446	K	R
452	R	K
459	Q	R
470	R	K

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในไทย

ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจำนวน 16 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกรที่เคยมีรายงานในไทยพบว่ามีกรดอะมิโน 62 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน รายละเอียดของข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน 62 ตำแหน่งเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1, H1N2 และ H3N2 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่ใช้ในการศึกษา 16 ตัวอย่าง

ตำเหน่งกรดอะมิโน	สายพันธุ์ H1N1	สายพันธุ์ H1N2	สายพันธุ์ H3N2
21	N	N	N/D
33	V	V	V/I
34	G	G/E	G
48	Q	Q	Q/K
61	I	I/M	I/M
63	I	I	I/L/V
77	K/R	K	K
98	K	K	K/R
99	K	K	K/R
100	R	R	R/V
105	M	M	M/I
109	I/V	I	I
114	D	D	D/E
115	E	E/D	E
119	I	I	I/V
127	E	E	E/D
136	L	L	L/I
152	R	R	R/K
174	R	R	R/I
183	V	V/I	V
190	V	V	V/A/T
199	R	R/K	R/K
217	I	I	I/V
230	F	F/L	F
260	A	A	A/T
265	I	I	I/V
284	V	V	V/A
289	Y	Y	Y/H

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน 62 ตำแหน่งเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1, H1N2 และ H3N2 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่ใช้ในการศึกษา 16 ตัวอย่าง (ต่อ)

ตำเหน่งกรดอะมิโน	สายพันธุ์ H1N1	สายพันธุ์ H1N2	สายพันธุ์ H3N2
305	R	R	R/K
313	F/L	F	F/L
321	N	N	N/D
323	V	V	V/A
329	I/A/M	I/A	I/A/M
338	F/Y	F	F
344	S/L	S	S
348	T	T	T/K
353	V/I	V	V/I
357	Q	Q/K	Q/K
358	L	L/M	L
363	V/I	V	V/I
371	M	M	M/V
373	T	T	T/A
375	D	D	D/N
377	V/I	V/M	V/N
382	K	K	K/R
391	R	R	R/K
400	R	R/K	R/K
404	G	G	G/S
406	I	I	I/V
408	V/I	V	V
413	S	S	S/L
423	S	S	S/T
425	I	I	I/V
426	M	M	M/L
433	T	T/N	T/N
444	I	I	I/V
450	F/N	F	F/N
452	R	R/K	R/K
454	V	V	V/L
466	L	L/I	L
473	N/T	N	N
482	S	S	S/N

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในไทย

ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจำนวน 15 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก ในประเทศไทยที่เคยมีรายงานพบว่ามีกรดอะมิโน 10 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน และผลสรุปได้แสดง ไว้ในตาราง 11

ตารางที่ 11 แสดง 10 ตำแหน่งของกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่เคยแยกได้ในประเทศไทย

สายพันธ์เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก	ตำแหน่งกรดอะมิโนที่แตกต่าง									
	34	77	96	257	353	373	374	377	408	482
A/ Chicken /Bangkok/CU-269/06 (H5N1)	S	R	I	I	V	A	M	N	V	N
A/Chicken/Chonburi/CU-279/06 (H5N1)	S	R	I	I	V	A	M	N	V	N
A/Quail/Nakhonratchasima/CU-284/06(H5N1)	S	R	I	I	V	A	M	N	V	N
A/Chicken/Chonburi/CU-285/06 (H5N1)	S	R	I	I	V	A	M	N	V	N
A/Chicken/Unknown/CU-307/06 (H5N1)	S	R	I	I	V	A	M	N	I	N
A/Chicken/Uthaithani/CU-P76/08 (H5N1)	S	R	I	I	V	A	M	N	I	N
A/Chicken/Uthaithani/CU-P87/08 (H5N1)	S	R	I	I	V	A	I	N	V	N
A/Quail/Ayuthaya/CU-J1243/09(Unknown)	S	R	I	I	V	A	I	N	V	N
A/Quail/Suphanburi/CU-J1475/09 (Unknown)	G	R	I	I	V	A	M	N	V	N
A/Chicken/Prachinburi/CU-304/06 (H5N1)	G	K	I	I	A	T	M	S	V	S
A/Duck/Phitsanulok/CU-P624/09 (H7N4)	G	K	I	I	A	T	M	S	V	S
A/Duck/Phitsanulok/CU-P630/09(H7N4)	G	K	I	T	A	T	M	S	V	S
A/Duck/Phitsanulok/CU-P634/09 (H7N4)	G	K	V	T	A	T	M	S	V	S
A/Duck/Phitsanulok/CU-P622/09 (H7N4)	G	K	V	T	A	T	M	S	V	S
A/Duck/Phitsanulok/CU-P633/09 (H7N4)										

4.4 การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบนยีน NP

การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของโปรตีน NP ตำแหน่งที่ 16 จะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเชื้อไวรัสว่ามีลักษณะของเชื้อไวรัสในคน (human-like amino acid) เมื่อมีกรดอะมิโนเป็น D (Aspartate) หรือมีลักษณะของเชื้อไวรัสในสัตว์ปีก (avian-like amino acid) เมื่อมีกรดอะมิโนเป็น G (Glycine) (Lipatov et al, 2008) ซึ่งในตำแหน่งที่ 16 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทยทั้งหมดทุกตัวอย่างมีกรดอะมิโนที่มีลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสก่อโรคในคน (D16) ส่วนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 16 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกรและเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย พบว่ามีลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสก่อโรคในสัตว์ปีก (G16) ดังแสดงในตารางที่ 12, 13 และ 14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทยในส่วนของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องคุณสมบัติของเชื้อไวรัสที่ตำแหน่ง 16

Virus	NP gene
	Human/Avian like characteristics
	16[a]
A/Thailand/CU23/2006 (H3N2)	D
A/Thailand/CU32/2006 (H1N1)	D
A/Thailand/CU44/2006 (H1N1)	D
A/Thailand/CU46/2006 (H3N2)	D
A/Thailand/CU51/2006 (H1N1)	D
A/Thailand/CU68/2006 (H1N1)	D
A/Thailand/CU88/2006 (H1N1)	D
A/Thailand/CU228/2006 (H3N2)	D
A/Thailand/CU231/2006 (H3N2)	D
A/Thailand/CU260/2006 (H3N2)	D
A/Thailand/CU280/2007 (H3N2)	D
A/Thailand/CU282/2007 (H3N2)	D
A/Thailand/CU1101/2008 (H3N2)	D
A/Thailand/CU1102/2008 (H3N2)	D
A/Thailand/CU1103/2008 (H3N2)	D
A/Thailand/CU356/2008 (H3N2)	D
A/Thailand/CU370/2008 (H3N2)	D
A/Thailand/CU379/2008 (H3N2)	D

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยในส่วนของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องคุณสมบัติของเชื้อไวรัสที่ตำแหน่ง 16

Virus	NP gene
	Human/Avian like characteristics
	16[a]
A/Swine/Chonburi/NIAH9469/04(H1N1)	G
A/Swine/Thailand-HF6/05(H1N1)	G
A/Swine/Chonburi/06CB2/06(H1N1)	G
A/Swine/Thailand/CU-CB1/06(H1N1)	G
A/Swine/Thailand/CU-CHK1/08(H1N1)	G
A/Swine/Thailand/CU-CBP18/09(H1N1)	G
A/Swine/Saraburi/NIAH13021/05(H1N2)	G
A/Swine/Thailand/CU-CHL2/09(H1N2)	G
A/Swine/Chachoengsao/NIAH/03(H3N2)	G
A/Swine/Nakhon pathom/NIAH586/05(H3N2)	G
A/Swine/Nakhon pathom/NIAH586-2/05(H3N2)	G
A/Swine/Chachoengsao/NIAH586-3/05(H3N2)	G
A/Swine/Unknown/NIAH586-4/05(H3N2)	G
A/Swine/Ratchaburi/NIAH874/05(H3N2)	G
A/Swine/Thailand/S1/05(H3N2)	G
A/Swine/ Thailand/CU-CB8.4/07(H3N2)	G

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NP ของเชื้อไข้หวัดสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทยในส่วนของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องคุณสมบัติของเชื้อไวรัสที่ตำแหน่ง 16

Virus	NP gene
	Human/Avian like characteristics
	16[a]
A/ Chicken /Bangkok/CU-269/06 (H5N1)	G
A/Chicken/Chonburi/CU-279/06 (H5N1)	G
A/Quail/Nakhonratchasima/CU-284/06(H5N1)	G
A/Chicken/Chonburi/CU-285/06 (H5N1)	G
A/Chicken/Unknown/CU-307/06 (H5N1)	G
A/Chicken/Uthaithani/CU-P76/08 (H5N1)	G
A/Chicken/Uthaithani/CU-P87/08 (H5N1)	G
A/Quail/Ayuthaya/CU-J1243/09 (Unknown)	G
A/Quail/Suphanburi/CU-J1475/09 (Unknown)	G
A/Chicken/Prachinburi/CU-304/06 (H5N1)	G
A/Duck/Phitsanulok/CU-P624/09 (H7N4)	G
A/Duck/Phitsanulok/CU-P630/09(H7N4)	G
A/Duck/Phitsanulok/CU-P634/09 (H7N4)	G
A/Duck/Phitsanulok/CU-P622/09 (H7N4)	G
A/Duck/Phitsanulok/CU-P633/09 (H7N4)	G

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่มีความจำเพาะต่อโฮสต์

จากการเปรียบเทียบกรดอะมิโน บนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ซึ่งสรุปได้ดังนี้

จากตารางที่ 15 สรุปได้ว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 49 ตัวอย่าง พบมีกรดอะมิโนแตกต่างกัน 18 ตำแหน่ง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 15

จากตารางที่ 16 สรุปได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 ในคน และในสุกรของไทย พบว่ามีความแตกต่างของกรดอะมิโน 26 ตำแหน่ง ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 16

จากตารางที่ 17 เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ในคน และในสุกรของไทย พบว่ามีความแตกต่างของกรดอะมิโน 41 ตำแหน่ง ดังแสดงรายละเอียด ในตารางที่ 17

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดงตำแหน่งกรดอะมิโน 18 ตำแหน่ง ที่แตกต่างกันระหว่าง เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในคน สุกร และจากสัตว์ปีกของเชื้อที่ใช้ในการศึกษา49 ตัวอย่าง ที่แยกได้ในไทย

ตำแหน่งกรดอะมิโน	Human	Avian	Swine
16	D	G	G
33	I	V	I/V
61	L	I	I/M
100	V	R	V/R
109	V	I	I/V
136	I	L	L/I
214	K	R	R/K
283	P	L	L
293	K	R	R
305	K	R	R/K
313	Y	F	L/F
353	S/L	A/V	V/I
357	K	Q	Q/K
372	D	E	E
375	G/V	D	D/N
422	K	R	R
423	S/T	A	S/T/A
442	A	T	T

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน 26 ตำแหน่ง ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ ในคนและในสุกร สายพันธุ์ H3N2

ตำแหน่งกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน	เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร	เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน
16	G	D
18	E	D
31	R	K
34	G	D
61	I/M	L
65	R	K
109	I	V
186	V	I
217	I/V	S
237	M	V
286	A	S
293	R	K
313	F/L	Y
343	V	L
344	S	L
353	V	S
372	E	D
373	A/T	N
375	D	G
377	N/V	S/G
384	R/K	G
406	V/I	T
422	R	K
442	T	A
455	D	E
459	Q	R

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน 41 ตำแหน่ง ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและสุกรสายพันธุ์ H1N1

ตำแหน่งกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน	เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร	เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน
16	G	D
33	V	I
48	Q	K
50	S	N
61	I	L
99	K	R
100	R	V
105	M	V
114	D	E
127	E	D
136	L	I
146	A	T
191	M	L
214	R	K
236	R	K
257	I	T
283	L	P
284	V	A
293	R	K
301	I	V
305	R	K
309	N	T
313	F	Y
323	V	A
334	H	N
351	K	R
353	I	L
357	Q	K
372	E	D
373	T	A

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน 41 ตำแหน่ง ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ ในคนและในสุกร สายพันธุ์ H1N1 (ต่อ)

ตำแหน่งกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน	เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร	เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน
374	M	I
376	D	V
377	V	S
384	K	R
408	V	T
421	E	D
422	R	K
423	S	T
442	T	A
446	R	K
470	K	R

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

โรคไข้หวัดใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza) ทำให้เกิดโรคทางเดินหายใจทั้งคน และสัตว์ ในประเทศไทยมีการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H5N1 ในช่วงปี 2004 เป็นต้นมา ซึ่งถือว่าเป็นโรคอุบัติใหม่มีผลทำให้สัตว์ปีก คน และยังทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดเกิดโรคและตายได้อีกด้วย (Amonsin et al., 2006; Keawcharoen et al., 2004; Thanawongnuwech et al., 2005) ต่อมาในปี 2009 มีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ (H1N1) เกิดขึ้นในคนทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยด้วย ซึ่งถือว่าเป็นการระบาดใหญ่ (pandemic) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน และก่อให้เกิดปัญหาด้านสาธารณสุขเป็นอย่างมาก

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ในประเทศไทย เนื่องด้วยไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ มี genome เป็นท่อน 8 ท่อน และพบว่าในกลุ่มโปรตีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอทั้งหมด ยีน NP เป็นโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญของอนุภาคไวรัส และเป็นโปรตีนที่ใช้แบ่งกลุ่มไวรัสไข้หวัดใหญ่ออกเป็น type A B และ C รวมทั้งเป็นแอนติเจนที่สำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ นอกจากนี้ยังมีบทบาทเป็นตัวกำหนด host range และ และ host specificity ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประเทศไทยจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่ง เพื่อจะได้ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก นำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านระบาดวิทยา และสามารถใช้เป็นข้อมูลที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อข้ามชนิดของสัตว์ได้ ข้อมูลดังกล่าวมีประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อม สำหรับการวางแผน จัดการควบคุม ป้องกัน การระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ในประเทศไทยต่อไปในอนาคต การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปการทดลองออกเป็น

- ความสัมพันธ์ทางพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก

- การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก

5.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก

การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 49 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจำนวน 18 ตัวอย่าง เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจำนวน 16 ตัวอย่าง และเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจำนวน 15 ตัวอย่าง ดังสรุป

5.1.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน

การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน โดยใช้ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 18 ตัวอย่าง ประกอบด้วยสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 5 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 13 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อไข้หวัดที่เกิดตามฤดูกาลที่แยกได้ในระหว่างปี 2006-2008 เปรียบเทียบกับเชื้อที่เคยแยกในประเทศไทย พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนทั้ง 18 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไข้หวัดที่เกิดตามฤดูกาล โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ตามชนิดของสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ H1N1 ทั้ง 5 ตัวอย่างมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน โดยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งแยกต่างหากกับกลุ่มสายพันธุ์ H1N1 ที่มีรายงานในปี 2009 ที่มีการระบาดทั่วโลก เนื่องจากสายพันธุ์ H1N1 (2009) เป็นกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ซึ่งลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมีความใกล้เคียงกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์อเมริกาเหนือ จึงมีความแตกต่างจากเชื้อที่ใช้ในการศึกษาสายพันธุ์ H1N1 ที่เกิดตามฤดูกาล และพบว่ามีเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่เกิดตามฤดูกาลที่เคยแยกเชื้อได้ในประเทศไทย 1 ตัวอย่าง คือ A/Thailand/271/2005 (H1N1) ก็ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับสายพันธุ์ H1N1 ทั้งกลุ่มสายพันธุ์ H1N1 ที่กำลังระบาดในปัจจุบันและกลุ่มของเชื้อที่เกิดตามฤดูกาลทั้งที่ใช้ในการศึกษาทั้งที่เป็นเชื้อที่เกิดตามฤดูกาลเช่นเดียวกัน แต่กลับมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H5N1 ที่เกิดในช่วงที่มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกในปี 2004-2005 ในประเทศไทย ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่าเชื้อ A/Thailand/271/2005 (H1N1) ของไทยมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ยุโรปของไทย (Kingsford, 2009) โดยเป็นที่ทราบอยู่แล้วว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ยุโรปนั้นมีบรรพบุรุษมาจากสายพันธุ์สัตว์ปีกดังนั้นเชื้อไข้หวัดใหญ่ของไทยสายพันธุ์ A/Thailand/271/2005 (H1N1) จึงมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน

สายพันธุ์ H5N1 ที่เกิดในช่วงที่มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกในประเทศไทย และในส่วนสายพันธุ์ H3N2 ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 13 ตัวอย่าง มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน โดยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ สายพันธุ์ H3N2 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่มีรายงานในปี 1979 (A/Bangkok/01/1979 (H3N2) รวมทั้งสายพันธุ์ H3N2 ที่มีรายงานในประเทศไทยในปี 2009

จากนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เคยมีรายงานจากต่างประเทศ พบว่าเชื้อไข้หวัด-ใหญ่ในคนสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 5 ตัวอย่างที่แยกได้ในปี 2006 มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงของเชื้อกับสายพันธุ์ H1N1 ในอเมริกาที่มีรายงานในช่วงปี 2006 และเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H3N2 ของเชื้อที่นำมาศึกษาจำนวน 11 ตัวอย่าง มีลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อใกล้เคียงกันกับเชื้อสายพันธุ์ H3N2 ที่เกิดในอเมริกาที่แยกได้ในปี 2008 นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H3N2 ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ A/Thailand/CU23/2006 (H3N2) และ A/Thailand/CU46/2006 (H3N2) มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H3N2 ที่เกิดขึ้นในเอเชีย ซึ่งแตกต่างกันกับส่วนของยีน HA และ NA ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อที่นำมาทำวัคซีนที่ใช้กันทั่วไปจากรายงานการศึกษาของ Chutinimitkul และคณะ (2008a)

5.1.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร

การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัด-ใหญ่สุกร โดยใช้ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 16 ตัวอย่าง ประกอบด้วยสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 6 ตัวอย่าง สายพันธุ์ H1N2 จำนวน 2 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 8 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้ระหว่างปี 2003-2009 เปรียบเทียบกับเชื้อเคยมีรายงายในประเทศไทย พบว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (North American swine lineage) และสายพันธุ์ยุโรป (European swine lineage) โดยเชื้อที่ใช้ในการศึกษาสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่สายพันธุ์ swine/Nakhonpathom/NIAH586-2/2005(H3N2), swine/Chachoengsao/NIAH586-3/2005(H3N2), swine/Unknow/NIAH586-4 (H3N2), swine/Nakhon pathom/NIAH586-05(H3N2), swine/Chachoengsao/2003(H3N2) และ swine/Ratchaburi/ NIAH874/2005(H3N2) มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกลับสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ส่วนเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 10 ตัวอย่าง มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ยุโรป ประกอบด้วยสายพันธุ์ H1N1, H1N2 และ H3N2 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Takemei และคณะ (2008) ที่พบว่าเชื้อไข้ใหญ่สุกรสายพันธุ์ , sw/Chachoengsao/2003(H3N2)

และ sw/Ratchaburi/NIAH874/2005(H3N2) มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP เป็นสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ส่วนสายพันธุ์ sw/chonburi/NIAH9469/2004 (H1N1) และ sw/Saraburi/NIAH13021/2005(H1N2) มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP เป็นสายพันธุ์ยุโรป

จากนั้นเมื่อเปรียบเทียบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ใช้ในการศึกษากับเชื้อที่เคยมีรายงานจากต่างประเทศ พบว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษามีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์อเมริกันและสายพันธุ์ยุโรปเช่นเดียวกัน โดยเชื้อที่ใช้ศึกษาที่จัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกันจำนวน 5 ตัวอย่าง มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อที่เคยรายงานในไทย และมี 1 ตัวอย่างคือ sw/Chachoengsao/2003(H3N2) มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อที่เกิดในอเมริกา ในส่วนของกลุ่มสายพันธุ์ในยุโรป พบว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 9 ตัวอย่างที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อที่เคยมีรายงานในประเทศไทย และมี 1 ตัวอย่างคือ sw/Saraburi/NIAH13021/2005(H1N2) มีลักษณะทางพันธุกรรมแยกออกต่างหากไม่คล้ายคลึงกับทั้งสายพันธุ์ที่มาจากเอเชีย อเมริกาและยุโรป

5.1.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก

การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก โดยใช้ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วยสายพันธุ์ H5N1 จำนวน 8 ตัวอย่าง สายพันธุ์ H7N4 จำนวน 5 ตัวอย่าง และยังไม่ทราบ subtype จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้ระหว่างปี 2006-2009 เปรียบเทียบกับเชื้อเคยมีรายงายในประเทศไทย พบว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มสายพันธุ์ H5N1 และกลุ่มสายพันธุ์ H7N4 โดยกลุ่มสายพันธุ์ H5N1 มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อที่เคยมีรายงานตั้งแต่ปี 2004 ส่วนกลุ่มของเชื้อที่ใช้ในการศึกษารวมทั้งเชื้อที่ยังไม่ทราบ subtype ทั้งสองตัวอย่างก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วยเป็นไปได้ว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกทั้ง 2 ตัวอย่างที่ยังไม่ทราบ subtype อาจเป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 เพราะมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันแต่ทั้งนี้ก็ต้องรอดูผลการแยกเชื้ออีกที ส่วนสายพันธุ์ H7N4 มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันทั้ง 5 ตัวอย่าง และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันซึ่งแยกเป็นกลุ่มเดี่ยว ๆ เพราะในประเทศไทยยังไม่พบมีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ผ่านทาง http://www.ncbi.nlm.nih.gov

จากนั้นเมื่อเปรียบเทียบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ใช้ในการศึกษากับเชื้อที่มีรายงานจากต่างประเทศ พบว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาสายพันธุ์ H5N1 ทั้ง 10 ตัวอย่างมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ H5N1 ของไทยและเวียดนามที่มีเกิดการระบาดในระหว่างปี

2004-2008 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Viseshakul และคณะ (2004) ที่แยกเชื้อไข้หวัดนกที่ระบาดในประเทศไทยเมื่อปี 2004 และพบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อที่แยกได้จากเวียดนามและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนสายพันธุ์ H7N4 ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 5 ตัวอย่างมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากสายพันธุ์ H7N4 ที่เคยมีรายงานในอเมริการวมทั้งแตกต่างกับสายพันธุ์อื่นในสัตว์ปีกด้วย

5.1.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และ สัตว์ปีก

การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 49 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจำนวน 18 ตัวอย่าง เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจำนวน 16 ตัวอย่าง และเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจำนวน 15 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเชื้อที่เคยมีรายงานในประเทศไทย พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาแบ่งออกตามชนิดของสายพันธุ์อย่างชัดเจนคือ กลุ่มของสายพันธุ์ในคน กลุ่มสายพันธุ์สุกร และกลุ่มสายพันธุ์สัตว์ปีก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Scholtissek และคณะ ในปี 1978 สามารถแยกความแตกต่างของยีน NP ของคนในสัตว์ปีกและม้าได้ โดยใช้เทคนิค RNA hybridization และรายงานของ Gammelin และคณะ (1989) พบว่ายีน NP สามารถใช้ยืนยัน host specificity ของเชื้อไวรัสได้ นอกจากนี้พบเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H5N1 ที่มีรายงานในปี 2004-2005 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกในประเทศไทย มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกด้วย ซึ่งเป็นไปได้ว่าคนมีการติดเชื้อมาจากสัตว์ปีก สอดคล้องกับรายงานการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H5N1 ในคนที่ผ่านมา (Tran et al., 2004, Ungchusak et al., 2005) และยังพบเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจำนวน 1 ตัวอย่าง คือ A/Thailand/271/2005 (H1N1) มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับกลุ่มไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ยุโรป และจัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อตัวนี้ไม่ได้เกิดในช่วงที่มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร แต่เป็นไข้หวัดใหญ่ที่เกิดตามฤดูกาลทั่วไป นอกจากนี้ในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกันพบเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H1N1 (2009) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการระบาดของไข้หวัด-ใหญ่สายพันธุ์ใหม่ในคนในปี 2009 จัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่ว่าในส่วนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 นั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อคล้ายคลึงกับไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์อเมริกัน (classical swine) (Kingsford, 2009)

ผลการศึกษาที่พบ สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่าหากมีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สองสายพันธุ์ในเซลล์เดียวกัน และมีการรวมชิ้นส่วน genome ของสองสายพันธุ์ลงในอนุภาคไวรัสเดียวกัน หรือที่เรียกว่าเกิดกระบวนการ reassortment จะทำให้เกิดไวรัสลูกผสมที่เรียกว่า reassortant ซึ่งเชื่อว่าเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้มีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมและลักษณะทางแอนติเจนใหม่ ๆ จากไวรัสของนก หรือสุกร เข้าสู่ไวรัสของคนได้ ซึ่งอาจทำให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ทำให้เกิด pandemic ได้ (Kawaoka et al., 1989)

จากนั้นเมื่อเปรียบเทียบเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่ใช้ในการศึกษากับเชื้อที่เคยมีรายงานจากต่างประเทศ พบลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาแบ่งออกตามชนิดของสายพันธุ์เช่นเดียวกัน และพบว่ากลุ่มเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ gull แยกออกเป็นคนละกลุ่มกับสายพันธุ์สัตว์ปีกอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gorman และคณะ (1990) ซึ่งสามารถแยกยีน NP ได้ 5 กลุ่มตาม host specific คือ Equine1, Equine2, Human & Swine, H13 Gull และ avian และในปี ค.ศ. 1991 Gorman และคณะ ที่ได้วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP ที่พบในไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน และสุกร พบว่าวิวัฒนาการและแหล่งกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ มีความสัมพันธ์กับแหล่งกำเนิดของยีน NP เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาที่พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีกของไทยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันของที่มาของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ คืออย่างในเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H5N1 ที่เกิดในช่วงที่มีการระบาดของไข้หวัดนกมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อไข้หวัดสัตว์ปีกสายพันธุ์ H5N1 และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์สัตว์ปีกด้วยเป็นไปได้ว่าคนติดเชื้อไข้หวัดใหญ่จากสัตว์ปีกที่ระบาดในช่วงนั้น และจากผลการศึกษาที่ได้ว่าเชื้อไข้หวัดในคนสายพันธุ์ A/Thailand/271/2005 (H1N1) ของไทยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมากกว่าในคน และจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยเป็นไปได้ว่าคนอาจได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่มาจากสุกรแต่ที่น่าแปลกใจตรงที่ว่าคนได้รับเชื้อมาได้อย่างไร ทั้งที่ในช่วงที่แยกเชื้อได้นั้นไม่พบมีรายงานการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย และจากผลที่พบนี้จึงเป็นสิ่งที่ต้องเฝ้าติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไข้หวัด-ใหญ่ทั้งในคนและสัตว์ แต่ในส่วนของเชื้อที่นำมาศึกษาทั้ง 49 ตัวอย่างทั้งในคน สุกร และสัตว์ปีกนั้นยังคงไม่พบมีการเปลี่ยนแปลงคือ เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนยังคงมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่เกิดตามฤดูกาล และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรยังคงมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับที่เคยแยกได้ในประเทศไทยทั้งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ส่วนในเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกไม่พบมีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน

5.2 การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกรและสัตว์ปีกนั้นมีความสำคัญต่อความจำเพาะของกลุ่มไวรัสไข้หวัดใหญ่แต่ละสายพันธุ์

5.2.1 การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน

การศึกษาการการศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจากเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 18 ตัวอย่าง กับเชื้อที่เคยรายงานในประเทศไทย พบว่ามีกรดอะมิโนแตกต่างกัน 74 ตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าในบรรดาเชื้อไข้หวัดใหญ่ว่ายีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจะมีการแปลี่ยนแปลงมากที่สุด และยังพบว่าเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาคือสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 5 ตัวอย่างและสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 13 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันของกรดอะมิโน 34 ตำแหน่ง

5.2.2 การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร

การศึกษาการการศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 16 ตัวอย่าง กับเชื้อที่เคยรายงานในประเทศไทยพบว่ามีความแตกต่างกันของกรดอะมิโน 62 ตำแหน่ง

5.2.3 การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 15 ตัวอย่างกับเชื้อที่เคยรายงานในประเทศไทยพบว่ามีความแตกต่างกันของกรดอะมิโน 10 ตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาว่าในบรรดาเชื้อไข้หวัดทั้งหมด ยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดไม่เกิน 10 ตำแหน่ง

5.2.4 การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน NP ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก

การศึกษาการการศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 49 ตัวอย่าง พบว่ามีกรดอะมิโนแตกต่างกัน 18 ตำแหน่ง ซึ่งใช้แยกระหว่างสายพันธุ์ของในคนและสัตว์ปีก และส่วนในสายพันธุ์สุกรพบมีความหลากหลายคือเหมือนทั้งในกลุ่มของสายพันธุ์ในคนและสายพันธุ์สัตว์ปีก ซึ่งสอดคล้องกับคำกล่าวที่ว่าสุกรนั้นเปรียบเสมือนเป็นถังผสม (mixing vessel)

การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ จะมีตำแหน่งและกรดอะมิโนที่ส่วนใหญ่ที่สามารถบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ในคน (human-like amino acid) หรือสายพันธุ์ในสัตว์ปีก(avian-like amino acid) โดยดูตำแหน่งที่ 16 ของโปรตีน NP จะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเชื้อไวรัสว่ามีลักษณะของเชื้อไวรัสในคน (human-like amino acid) เมื่อมีกรดอะมิโนเป็น D (Aspartate) หรือมีลักษณะของเชื้อไวรัสในสัตว์ปีก (avian-like amino acid) เมื่อมีกรดอะมิโนเป็น G (Glycine) (Lipatov et al, 2008) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าตำแหน่งที่ 16 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทยทั้งหมดทุกตัวอย่างมีกรดอะมิโนที่มีลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสก่อโรคในคน (D16) ซึ่งเป็น human-like amino acid ส่วนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 16 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกรและเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย พบว่ามีลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสก่อโรคในสัตว์ปีก (G16) ซึ่งเป็น avian-like amino acid

ก่อนหน้านี้มีรายงานว่าหากเปรียบเทียบ genome ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอจากสัตว์ปีกและคนจำนวนมาก ๆ ที่มีความหลากหลาย จะพบว่ามีกรดอะมิโนจำนวน 32 ตำแหน่งในยีนต่าง ๆ ที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มของไวรัสของสัตว์ปีก และกลุ่มไวรัสของคน จึงเชื่อว่าตำแหน่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีบทบาทที่ทำให้ไวรัสเหมาะสมกับการติดเชื้อในสัตว์ปีกหรือในคน และเมื่อกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปอาจทำให้ไวรัสนั้นมีความรุนแรงในการก่อโรคสูง (Klenk and Garten, 1994)

ในปี ค.ศ. 2004 Reid และคณะทำการศึกษาเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอพบว่ากรดอะมิโน 6 ตำแหน่งสามารถแยกยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนออกจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก คือกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 16, 33, 100, 136, 283 และ 313 โดยพบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 33, 100 และ 136 ของไวรัสในคนและสุกรในปี 1918 เป็นตำแหน่งที่มีความคงตัวสูง ทำให้

สามารถแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกและม้าได้ชัดเจน และพบว่ากรดอะมิโนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีก ม้า และสุกร ในปี 1918 ตำแหน่งที่ 283 ถูกแทนที่ leucine โดย Proline ของไวรัสไข้หวัดในคน อาจทำให้เชื้อมีความรุนแรงได้

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีกในประเทศไทย จำนวน 49 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของยีน NP ซึ่งอาจนำข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านระบาดวิทยา และสามารถใช้เป็นข้อมูลที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อข้ามชนิดของสัตว์ได้ ข้อมูลดังกล่าวมีประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อม สำหรับการวางแผน จัดการควบคุม ป้องกัน การระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ในประเทศไทยต่อไปในอนาคต ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า

1. เชื้อไข้หวัดใหญ่ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจำนวน49 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อ

- ไข้หวัดใหญ่ในคนจำนวน 18 ตัวอย่าง เป็นสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 5 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 13 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่แยกได้ในช่วงปี 2006-2008 ได้ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน จำนวน 18 เส้น และนำข้อมูลรหัสพันธุกรรม ไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) แล้วทั้งหมด

- เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจำนวน 16 ตัวอย่าง เป็นสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 6 ตัวอย่าง สายพันธุ์ H1N2 จำนวน 2 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 8 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่แยกได้ในระหว่างปี 2003-2009 ได้ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร จำนวน 16 เส้น และนำข้อมูลรหัสพันธุกรรม ไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) แล้วจำนวน 4 เส้น และบางส่วนที่เหลือจะนำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูลต่อไป

- เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจำนวน 15 ตัวอย่าง เป็นสายพันธุ์ H5N1 จำนวน 8 ตัวอย่าง สายพันธุ์ H7N4 จำนวน 5 ตัวอย่าง และยังไม่ทราบ subtype จำนวน 2 ตัวอย่าง และได้ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัด

ใหญ่สัตว์ปีก จำนวน 15 เส้น และจะนำข้อมูลรหัสพันธุกรรม ไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ต่อไป

2. ความสัมพันธ์ทางรหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีก ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดยพบว่า

- เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 5 ตัวอย่าง มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่จัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อที่เคยมีรายงานในประเทศไทย และในส่วนของสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 13 ตัวอย่าง มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน รวมทั้งอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่เคยมีรายงานในประเทศไทย เอเชีย และอเมริกา

- เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรพบแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือ (Nort American swine) จำนวน 6 ตัวอย่าง และมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ยุโรป (European swine) จำนวน 10 ตัวอย่าง และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันในแต่ละสายพันธุ์ รวมทั้งอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อที่เคยมีรายงานในประเทศไทยทั้งกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาเหนือ และกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป

- เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H5N1 จำนวน 8 ตัวอย่าง และเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่ยังไม่ทราบ subtype จำนวน 2 ตัวอย่าง ในการศึกษาครั้งนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันทั้ง 10 ตัวอย่าง และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกสายพันธุ์ H5N1 ที่เคยมีรายงานในประเทศไทยและเวียดนาม ส่วนสายพันธุ์ H7N4 มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันทั้ง 5 ตัวอย่าง และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่แยกออกคนละกลุ่มกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่เคยรายงานทั้งในประเทศไทยและเชื้อไข้หวัดใหญ่จากต่างประเทศ

- ความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 49 ตัวอย่าง พบมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันในแต่ละสายพันธุ์แยกกันอย่างชัดเจน คือเชื้อในคนมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ในคน เชื้อในสุกรมีลักษณะทาง

พันธุกรรมใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ในสุกร และเชื้อในสัตว์ปีกก็มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ในสัตว์ปีก ซึ่งจากผลการศึกษายังไม่พบมีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางพันธุกรรมของข้ามสายพันธุ์

3. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน NP ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษาในคน สุกร และสัตว์ปีก โดยในบรรดาเชื้อไข้หวัดใหญ่ทั้งสามทำให้ทราบว่าเชื้อในคนมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนมากที่สุด และในสัตว์ปีกมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนน้อยที่สุด และพบว่ากรดอะมิโน 18 ตำแหน่ง ที่แยกความแตกต่างระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและสัตว์ปีก และในการศึกษาครั้งนี้พบว่าตำแหน่งที่ 16 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่แยกได้ในประเทศไทยทั้งหมดทุกตัวอย่างมีกรดอะมิโนที่มีลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสก่อโรคในคน (D16) ซึ่งเป็น human-like amino acid ส่วนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 16 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกรและเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทย พบว่ามีลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสก่อโรคในสัตว์ปีก (G16) ซึ่งเป็น avian-like amino acid

การศึกษาครั้งนี้มีประโยชน์ในด้านการหาข้อมูลของรหัสพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก และสามารถนำรหัสพันธุกรรมไปเผยแพร่ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลสำหรับผู้สนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุลเชิงลึก และสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงได้ นอกจากนี้ยังทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานด้านระบาดวิทยา และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร และสัตว์ปีกในประเทศไทย และสามารถใช้เป็นข้อมูลที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อข้ามชนิดของสัตว์ได้ ข้อมูลดังกล่าวมีประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมสำหรับการวางแผนการจัดการควบคุม ป้องกัน การระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน สุกร สัตว์ปีกในประเทศไทยต่อไปได้

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน NP ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงที่มาของเชื้อไข้หวัดใหญ่รวมทั้งได้วิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนในจุดที่มีความสำคัญของยีน NP ซึ่งเป็นการเฝ้าติดตามดูการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ระหว่างโฮสต์ ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีกในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาต่อไปอาจจะทำการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนทั้งหมดของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน สุกร และสัตว์ปีก ให้ครบทั้ง 8 ท่อน เพื่อเป็น

การติดตามการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้งในคน สุกร และสัตว์ปีกที่อาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจากอาจเกิดความรุนแรงขึ้นได้จากเชื้อไข้หวัดใหญ่เป็นเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ส่งผลให้เชื้อสามารถเกิดสายพันธุ์ใหม่ และอาจเกิดความรุนแรงทั้งในคนและสัตว์ และเกิดการระบาดที่รุนแรงกว้างขวางขึ้นได้ ทำให้มีความจำเป็นในการเฝ้าระวังและติดตามอย่างใกล้ชิด และข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบคุณสมบัติหรือลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ซึ่งอาจใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการวางนโยบายการควบคุมและป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ในประเทศไทยได้ในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

Altstein AD, Gitelman AK, Smirnov YA, Piskareva LM, Zakharova LG, Pashvykina GV, Shmarov MM, Zhirnov OP, Varich NP, Ilyinskii PO ., Varich, N. P., Ilyinskii, P. O., Shneider, A. M. 2006. Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. Arch Virol 151(5):921-931.

Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, Thanawongnuwech R, Suradhat S, Pariyothorn N, Tantilertcharoen R, Damrongwantanapokin S, Buranathai C, Chaisingh A et al. . 2006. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. Virology 344(2):480-491.

Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, Lochindarat S, Nguyen TK, Nguyen TH, Tran TH, Nicoll A, Touch S, Yuen Ky; Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5 (September 29, 2005). Avian influenza A (H5N1) infection in humans". The New England Journal of Medicine 353(13): 1374-1385

Berkhoff EG, de Wit E, Geelhoed-Mieras MM, Boon AC, Symons J, Fouchier RA, Osterhaus AD, and Rimmelzwaan GF. 2006. Fitness costs limit escape from cytotoxic T lymphocytes by influenza A viruses. Vaccine 24(44-46):6594-6596.

Chutinimitkul S, Chieochansin T, Payungporn S, Samransamruajkit R, Hiranras T, Theamboonlers A, and Poovorawan Y. 2008a. Molecular characterization and phylogenetic analysis of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses among infants and children in Thailand. Virus Res 132(1-2):122-131.

Chutinimitkul S, Thippamom N, Damrongwatanapokin S, Payungporn S, Thanawongnuwech R, Amonsin A, Boonsuk P, Sreta D, Bunpong N, Tantilertcharoen R ., Chamnanpood, P., Parchariyanon, S.,Theamboonlers, A., Poovorawan, Y . 2008b. Genetic characterization of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza virus in Thailand. Arch Virol 153(6):1049-1056.

CDC. 2007. Prevention and control of Influenza A viruses Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2007. MMWR 56: 1-54.

Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF, and Webster RG. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet 351(9101):472-477.

Cross KJ, Burleigh LM, and Steinhauer DA. 2001. Mechanisms of cell entry by influenza virus. Expert Rev Mol Med 3(21):1-18.

Dee, S. A. 2005. Respiratory Disease of Pigs. In: The Merck Veterinary Manual. 9th ed. Philadelphia, Pensylvania, U S A. National Publishing Inc. 1228.

De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, and Osterhaus AD. 2000. Influenza virus: a master of metamorphosis. J Infect 40(3):218-228.

Damrongwatanapokin, S., Pinychon, W., Parchariyanon, S. and Damrongwatanapokin, T. 2006. Serological study and isolation of influenza A virus infection of pigs in Thailand. Proceeding of The 19th IPVS congress. Copenhagen, Denmark. 2: 9-16.

Damrongwatanapokin, Parchariyanon, S. and Pinychon, W. 2003. Serological study and isolation of influenza A virus H1N1 infection in pigs of Thailand. Proceeding of The 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease-Rome June 29th – July 2nd. Rome. 261.

Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, and Osterhaus AD. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 79(5):2814-2822.

Frederick, A., Murphy, E., Gibbs, P.J., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J. 1999. Immune Response to Virol Infections. In: Veterinary virology. 3rd ed. Califonia, U S A. 127-468.

Gammelin M, Mandler J, and Scholtissek C. 1989. Two subtypes of nucleoproteins (NP) of influenza A viruses. Virology 170(1):71-80.

Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Donatelli I, Guo YJ, and Webster RG. 1991. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. J Virol 65(7):3704-3714.

Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, and Webster RG. 1990. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. J Virol 64(4):1487-1497.

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.

Heinen, P. 2003. Swine influenza: a zoonosis. Vet. Sci. Tomorrow (Serial online). [Online]. Available. http://www.vetscite.org

Hinshaw V. S. and R.G. Webter. 1982. The natural history of influenza A viruses. In A.S. Beare (ed) Basic and applied influenza research. CRC Press. Inc., Boca Raton, Fla. 79-104.

Hinshaw VS, Webster RG, Bean WJ, and Sriram G. 1980. The ecology of influenza viruses in ducks and analysis of influenza viruses with monoclonal antibodies. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 3(1-2):155-164.

Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, and Perez DR. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch Virol 146(12):2275-2289.

Jung K, Ha Y, and Chae C. 2005. Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs. J Comp Pathol 132(2-3):179-184.

Karasin AI, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, Scherba G, Anderson G, and Olsen CW. 2002. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. J Clin Microbiol 40(3):1073-1079.

Karasin AI, Olsen CW, and Anderson GA. 2000. Genetic characterization of an H1N2 influenza virus isolated from a pig in Indiana. J Clin Microbiol 38(6):2453-2456.

Kawaoka Y, Krauss S, and Webster RG. 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. J Virol 63(11):4603-4608.

Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodorn S, Theambooniers A, Tantilertcharoen R., Pattanarangsan, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, D. M., Poovorawan, Y . 2004. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerg Infect Dis 10(12):2189-2191.

Kingsford C, Nagarajan N, and Salzberg SL. 2009. 2009 Swine-origin influenza A (H1N1) resembles previous influenza isolates. PLoS One 4(7):e6402.

Klenk HD, and Garten W. 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. Trends Microbiol 2(2):39-43.

Kupradinun S, Peanpijit P, Bhodhikosoom C, Yoshioka Y, Endo A, and Nerome K. 1991. The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. Arch Virol 118(3-4):289-297.

Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD et al. . 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. Nature 430(6996):209-213.

Lipatov AS, Yen HL, Salomon R, Ozaki H, Hoffmann E, and Webster RG. 2008. The role of the N-terminal caspase cleavage site in the nucleoprotein of influenza A virus in vitro and in vivo. Arch Virol 153(3):427-434.

Marozin S, Gregory V, Cameron K, Bennett M, Valette M, Aymard M, Foni E, Barigazzi G, Lin Y, and Hay A. 2002. Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. J Gen Virol 83(Pt 4):735-745.

Mitteiholzer, C.M. 2006. Influenza virus-Protection and Adaptation. Thesis for Ph.D. Karolinska Institutet. Stockholm. 61p.

Murphy, B.R. and R. G. Webter. 1996. Orthomyxoviruses. In: Fields, N. B., Knipe, D. M., Howley, P. M. (Eds). Virology, 3rd ed. Lippincott. Raven, Philadelphia. 1397-1445.

OIE. 2004. Avian influenza: methods for the disease control. [Online]. Available. http://www.oie.int/eng/AVIAN_INFLUENZA/home.htm

OIE. 2000. OIE manual of standard for diagnostic test and vaccines. 4th edition, office of international des epizooties Paris, France. 121-220.

Olsen, C.W. 2002. Review: The emergence of novel swine influenza viruses in North America. Virus Res 85: 199-210.

Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, S., Pinychon, W., Chuxnum, T., Soawapak, H., and Choomkasien, P. 2006. Investigation of influenza A virus infection in pigs from 5 reported AIV outbreak provinces in 2004. Proceeding of The 19th IPVS Congress. Copenhagen, Denmark. 2: 9-17.

Portela. A and P. Digard. 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. J Gen Virol 83(Pt4): 723-734.

Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Lourens RM, and Taubenberger JK. 2004. Novel origin of the 1918 pandemic influenza virus nucleoprotein gene. J Virol 78(22):12462-12470.

Richt JA, Lager KM, Janke BH, Woods RD, Webster RG, and Webby RJ. 2003. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. J Clin Microbiol 41(7):3198-3205.

Rimmelzwaan GF, Berkhoff EG, Nieuwkoop NJ, Smith DJ, Fouchier RA, and Osterhaus AD. 2005. Full restoration of viral fitness by multiple compensatory co-mutations in the nucleoprotein of influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte escape mutants. J Gen Virol 86(Pt 6):1801-1805.

Rimmelzwaan GF, Boon AC, Voeten JT, Berkhoff EG, Fouchier RA, and Osterhaus AD. 2004. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. Virus Res 103(1-2):97-100.

Rogers GN, Paulson JC, Daniels RS, Skehel JJ, Wilson IA, and Wiley DC. 1983. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. Nature 304(5921):76-78.

Scholtisak C., Hinshaw V.S. and Oslen, CW. 1998. Influenza in pigs and their role as the intermediate host. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, eds. Textbook of influenza Oxford: Blackwell Sciences 137-145

Scholtissek C, Burger H, Kistner O, and Shortridge KF. 1985. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. Virology 147(2):287-294.

Scholtissek C, Koennecke I, and Rott R. 1978. Host range recombinants of fowl plague (influenza A) virus. Virology 91(1):79-85.

Slemons, R.D. 2002. History, Structure and Function of Swine Influenza Virus. Proceeding of Scientific Symposium on Swine Influenza. Iowa. June 2nd. 1-4.

Songserm 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.

Spickler A.R. 2004. Influenza in The Center for Food Security & Public Health. [online]. Available: http://www.cfcph.iastate.edu

Stuart-Harris C. 1976. Swine influenza virus in man. Zoonosis or human pandemic? Lancet 2(7975):31-32.

Suzuki Y. 2005. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biol Pharm Bull 28(3):399-408.

Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R., E., Jr. Chambers, T., M. Kiso, M., Ishida, H., and Kawaoka,. Y. 2000. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. J Virol 74(24): 11825-11831.

Takemae N, Parchariyanon S, Damrongwatanapokin S, Uchida Y, Ruttanapumma R, Watanabe C, Yamaguchi S, and Saito T. 2008. Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. Influenza Other Respi Viruses 2(5):181-189.

Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, Damrongwatanapokin S, Theamboonlers A, Payungporn S, Nanthapornphiphat K, Ratanamungklanon S, Tunak E, Songserm T ., Vivatthanavanich, V., Lekdumrongsak, T., Kesdangsakonwut, S., Tunhikorn, S., Poovorawan, Y. . 2005. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. Emerg Infect Dis 11(5):699-701.

Tran N, Raponi M, Dawes IW, and Arndt GM. 2004. Control of specific gene expression in mammalian cells by co-expression of long complementary RNAs. FEBS Lett 573(1-3):127-134.

Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, Kitphati R, Auwanit W, Puthavathana P, Uiprasertkul M, Boonnak K, Pittayawonganon C, Cox NJ et al. . 2005. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). N Engl J Med 352(4):333-340.

Van Reeth K, Gregory V, Hay A, and Pensaert M. 2003. Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes. Vaccine 21(13-14):1375-1381.

Viseshakul, N., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Suradhat, S., Payungporn, S., Keawchareon, J., Oraveerakul, K., Wongyanin, P., Plitkul, S., Theamboonlers, A., 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): 169-176.

Webster, R. G. 2004. Animal Influenza Surveillance-The Animal/human Interface A Presentation at the WHO/ NIAH “Training Course in Animal Influenza at the University of Hong Kong”. Queen Mary Hospital, Faculty of Medicine, University of Hong Kong SAR, PR China. 1-5 March 2004.

Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, and Wiley DC. 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. Nature 333(6172):426-431.

World Health Organization (WHO). 2006. “Cumulative number of confirmed human case 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/

Yewdell JW, Bennink JR, Smith GL, and Moss B. 1985. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 82(6):1785-1789.

Zhang H, Links PH, Ngsee JK, Tran K, Cui Z, Ko KW, and Yao Z. 2004. Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment. J Biol Chem 279(3):2221-2230.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
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. เตรียมตัวอย่างน้ำไข่ฟักปริมาณ 200 µl จากนั้นเติม AVL buffer ปริมาณ 560 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15-25 ^{O}C) เป็นเวลา 10 นาที ได้สารละลายตัวอย่างปริมาณ 760 µl

2. เติม 100% เอทานอล ปริมาณ 560 µl ลงในสารละลายตัวอย่าง แล้วผสมให้เข้ากัน

3. ดูดสารลารละลายตัวอย่างปริมาณ 630 µl 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 µl ลงใน QIA spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 6000xg (8000 rpm) 1 นาที เทของเหลวด้านล่างทิ้ง

6. เติม AW 2 buffer 500 µl 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 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 x g (8000 rpm) 1 นาที

8. จากข้อ 7 จะได้ viral RNA ปริมาณ 60 µl แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C หรือ –70 ^{O}C

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 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดมา (เจล 1 มก.เท่ากับ 1 µl)

2. นำตัวอย่างไปไว้ใน heat block ที่อุณหภูมิ 50 ^{O}C เป็นเวลาประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายจนหมด และควร vortex ทุกๆ 2-3 นาที

3. เมื่อเจลละลายจนสมบูรณ์แล้ว เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาณเท่ากับน้ำหนักเจล 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 µl 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 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000-10,000 x g 1 นาที

8. จากข้อ 7 จะได้ DNA บริสุทธิ์ปริมาตร 30 µl สำหรับใช้ในการหาลำดับเบส

สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

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 glyceral 50 % (Carlo Ebra Reagent ®) ประกอบด้วย

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

วิธีเตรียม

1. ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนละลายเข้ากัน
2. แบ่งใส่หลอด 1.5 มล. แล้วเก็บไว้ที่ 4 ^{O}C

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดัชนีกรดอะมิโน

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
Proline	Pro, P
Serine	Ser, S
Threonine	Thr, T
Tyrosine	Tyr, Y
Valine	Val, V

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงผลการ BLAST ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน จำนวน 18 ตัวอย่าง

Strain	Subtype	year	Accession number	Virus with highest homology	Nucleotides analyzed	%[a]
A/Thailand/CU32/2006 (H1N1)	H1N1	2006	FJ912910	A/New York/399/2003(H1N1)	1-1564	99%
A/Thailand/CU44/2006 (H1N1)	H1N1	2006	FJ912916	A/Canterbury/106/2004(H1N1)	9-1538	99%
A/Thailand/CU51/2006 (H1N1)	H1N1	2006	FJ912928	A/New York/443/2001(H1N1)	1-1561	99%
A/Thailand/CU68/2006 (H1N1)	H1N1	2006	FJ912934	A/Canterbury/106/2004(H1N1)	1-1519	99%
A/Thailand/CU88/2006 (H1N1)	H1N1	2006	FJ912940	A/Canterbury/106/2004(H1N1)	1-1514	99%
A/Thailand/CU23/2006 (H3N2)	H3N2	2006	FJ912904	A/Hiroshima/52/2005(H3N2)	2-1543	99%
A/Thailand/CU46/2006 (H3N2)	H3N2	2006	FJ912922	A/Hiroshima/52/2005(H3N2)	1-1542	99%
A/Thailand/CU228/2006 (H3N2)	H3N2	2006	FJ912946	(A/California/UR06-589/2007(H3N2)	17-1542	99%
A/Thailand/CU231/2006 (H3N2)	H3N2	2006	FJ912952	A/Sendai-H/441/2007(H3N2)	19-1554	99%
A/Thailand/CU260/2006 (H3N2)	H3N2	2006	FJ912958	A/California/UR06-0589/2007(H3N2)	18-1543	100%
A/Thailand/CU280/2007(H3N2)	H3N2	2007	FJ912964	A/California/UR06-0589/2007(H3N2)	19-1544	99%
A/Thailand/CU282/2007(H3N2)	H3N2	2007	FJ912970	A/California/UR06-0589/2007(H3N2)	19-1544	99%
A/Thailand/CU1101/2008	H3N2	2008	FJ912300	A/Texas/UR06-0358/2007(H3N2)	1-1519	99%
A/Thailand/CU1102/2008	H3N2	2008	FJ913006	Kentucky/UR07-0149/2008(H3N2)	20-1543	99%
A/Thailand/CU1103/2008	H3N2	2008	FJ913012	A/Texas/UR06-0358/2007(H3N2)	1-1519	99%
A/Thailand/CU356/2008 (H3N2)	H3N2	2008	FJ912978	A/Kentucky/UR07-0149/2008(H3N2)	20-1543	99%
A/Thailand/CU370/2008 (H3N2)	H3N2	2008	FJ912986	A/Kentucky/UR07-0083/2008(H3N2)	1-1501	99%
A/Thailand/CU379/2008 (H3N2)	H3N2	2008	FJ912994	A/Kentucky/UR07-0149/2008(H3N2)	20-1543	99%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงผลการ BLAST ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร จำนวน 16 ตัวอย่าง

Strain	Subtype	year	Accession number	Virus with highest homology	Nucleotides analyzed	%[a]
A/Swine/Chachoengsao/NIAH586-3/05 (H3N2)	H3N2	2005	N/A*	A/swine/Nakhon pathom/NIAH586-1/2005(H3N2)	47-1532	94%
A/Swine/Nakhonpathom/NIAH586-2/05 (H3N2)	H3N2	2005	N/A*	A/swine/Nakhon pathom/NIAH586-1/2005(H3N2)	47-1528	94%
A/Swine/Unknow/NIAH586-4/05 (H3N2)	H3N2	2005	N/A*	A/swine/Nakhon pathom/NIAH586-1/2005(H3N2)	27-1514	93%
A/Swine/Chonburi/NIAH9469/04 (H1N1)	H1N1	2004	AB434305	A/Thailand/271/2005(H1N1)	1-1506	99%
A/Swine/Saraburi/NIAH13021/05 (H1N2)	H1N2	2005	AB434337	A/swine/Italy/839/1989 (H1N1)	1-1524	95%
A/Swine/Chachoengsao/03 (H3N2)	H3N2	2003	AB434345	A/swine/Kansas/3024/1987(H1N1)	15-1512	96%
A/Swine/ Thailand/CU-CB8.4/07(H3N2)	H3N2	2007	N/A*	A/swine/Ratchaburi/NIAH59/04(H3N2)	60-1497	98%
A/Swine/Chonburi/NIAH586/05 (H1N1)	H1N1	2005	N/A*	A/swine/Nakhon pathom/NIAH586-1/2005(H3N2)	47-1516	97%
A/Swine/Ratchaburi/NIAH874/05 (H3N2)	H3N2	2005	AB434377	A/swine/Thailand/KU5.1/2004(H3N2)	1-1462	96%
A/Swine/Chonburi/Thailand-S1/05 (H3N2)	H3N2	2005	N/A*	A/swine/Italy/839/1989(H1N1)	2-1508	95%
A/Swine/Chonburi/Thailand-HF6/05 (H1N1)	H1N1	2005	N/A*	A/Thailand/271/2005(H1N1)	2-1508	98%
A/Swine/Chonburi/06CB2/06 (H1N1)	H1N1	2006	N/A*	A/Thailand/271/2005(H1N1)	1-1505	98%
A/Swine/Chachoengsao/K1/08 (H1N1)	H1N1	2008	N/A*	A/swine/Italy/839/1989(H1N1)	1-1528	95%
A/Swine/Chonburi/Thailand/CU-CB1/06 (H1N1)	H1N1	2006	N/A*	A/Thailand/271/2005(H1N1)	1-1527	98%
A/Swine/Chonburi/Thailand/CU-CBP18/09 (H1N1)	H1N1	2009	N/A*	A/swine/Italy/839/1989(H1N1)	1-1530	95%
A/Swine/Thailand/CU-CHL2/09 (H1N2)	H1N2	2009	N/A*	A/swine/Ratchaburi/NIAH59/2004(H3N2)	46-1526	97%

ตารางแสดงผลการ BLAST ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก จำนวน 15 ตัวอย่าง

Strain	Subty	year	Accession	Virus with highest homology	Nucleotides	%[a]
A/ Chicken /Bangkok/CU-269/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*	A/quail/Phathumthani/NIAH2711/2004(H5N1)	1-1484	99%
A/Chicken/Chonburi/CU-279/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*	A/quail/Phathumthani/NIAH2711/2004(H5N1)	1-1484	99%
A/Quail/Nakhonratchasima/CU-284/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*	A/little grebe/Thailand/Phichit-01/2004(H5N1)	1-1504	99%
A/Chicken/Chonburi/CU-285/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*	A/open-billed stork/Nakhonsawan/BBD0404F/2004(H5N1)	1-1475	100%
A/Chicken/Prachinburi/CU-304/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*	A/golden pheasant/Thailand/VSMU-21-SPB/2005(H5N1)	1-1502	99%
A/Chicken/Unknown/CU-307/06(H5N1)	H5N1	2006	N/A*	A/chicken/Thailand/NS-342/2008(H5N1)	1-1475	99%
A/Chicken/Uthaithani/CU-P622/08(H7N4)	H7N4	2008	N/A*	A/garganey/SanJiang/160/2006(H5N2)	1-1492	96%
A/Chicken/Uthaithani/CU-P624/08(H7N4)	H7N4	2008	N/A*	A/garganey/SanJiang/160/2006(H5N2)	1-1497	96%
A/Chicken/Uthaithani/CU-P630/08(H7N4)	H7N4	2008	N/A*	A/garganey/SanJiang/160/2006(H5N2	1-1486	96%
A/Chicken/Uthaithani/CU-P632/08(H7N4)	H7N4	2008	N/A*	A/garganey/SanJiang/160/2006(H5N2)	1-1474	96%
A/Chicken/Uthaithani/CU-P634/08(H7N4)	H7N4	2008	N/A*	A/garganey/SanJiang/160/2006(H5N2)	1-1475	96%
A/Duck/Phitsanulok/CU-P76/09(H5N1)	H5N1	2009	N/A*	A/tiger/Thailand/CU-T3/2004(H5N1)	2-1521	99%
A/Duck/Phitsanulok/CU-P87/09(H5N1)	H5N1	2009	N/A*	A/open-billed stork/Nakhonsawan/BBD1621J/05(H5N1)	1-1517	99%
A/Quail/Ayuthaya/CU-J1243/09(H5N1)	H5N1	2009	N/A*	A/little grebe/Thailand/Phichit-01/2004(H5N1)	2-1543	99%
A/Quail/Suphanburi/CU-J1475/09(H5N1)	H5N1	2009	N/A*	A/Thailand/2(SP-33)/2004(H5N1)	2-1568	99%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน จำนวน 18 ตัวอย่าง

Virus	CU-23	CU-32	CU-44	CU-46	CU-51	CU-68	CU-88	CU-228	CU-231	CU-260	CU-280	CU-282	CU-356	CU-370	CU-379	CU-1101	CU-1102	CU-1103
CU-23		88.4	88.6	99.7	88.6	88.6	88.4	97.2	97.4	97.1	97.2	96.9	97.3	97.1	97.1	97.2	97.4	97.4
CU-32			98.6	88.6	98.4	98.6	98.3	88.4	88.8	88.3	88.4	88.3	88.2	88.3	88.1	88.3	88.1	88.3
CU-44				88.8	99.2	100	99.1	88.6	88.8	88.6	88.6	88.6	88.2	88.3	88.1	88.3	88.1	88.3
CU-46					88.8	88.8	88.6	97.4	97.4	97.3	97.4	97.2	97.4	97.2	97.2	97.3	97.4	97.4
CU-51						99.2	99.5	88.6	88.9	88.5	88.6	88.5	88.3	88.4	88.2	88.2	88.2	88.4
CU-68							99.1	88.6	88.8	88.6	88.6	88.6	88.2	88.3	88.1	88.3	88.1	88.3
CU-88								88.3	88.6	88.2	88.3	88.2	88	88.1	87.9	87.9	87.9	88.1
CU-228									98.7	99.7	99.8	99.6	98.4	98.1	98.4	98.5	98.5	98.6
CU-231										98.6	98.7	98.4	98.9	98.6	98.9	98.9	99	99.1
CU-260											99.9	99.8	98.4	98	98.3	98.4	98.4	98.5
CU-280												99.7	98.4	98.1	98.4	98.5	98.5	98.6
CU-282													98.2	97.9	98.2	98.3	98.3	98.4
CU-356														99.5	99.3	99.3	99.7	99.5
CU-370															99	99	99.4	99.1
CU-379																99.1	99.4	99.3
CU-1101																	99.4	99.4
CU-1102																		99.5
CU-1103																		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน จำนวน 18 ตัวอย่าง

virus	CU-23	CU-32	CU-44	CU-46	CU-51	CU-68	CU-88	CU-228	CU-231	CU-260	CU-280	CU-282	CU-356	CU-370	CU-379	CU-1101	CU-1102	CU-1103
CU-23		92.2	92.2	99.7	92	92.2	91.8	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.3	98.3	98.5	98.5	98.5
CU-32			100	92.4	99.7	100	99.5	91.5	92	91.5	91.5	91.5	91.5	91.8	91.8	91.5	91.5	91.5
CU-44				92.4	99.7	100	99.5	91.5	92	91.5	91.5	91.5	91.5	91.8	91.8	91.5	91.5	91.5
CU-46					92.2	92.4	92	98.7	98.7	98.7	98.7	98.7	98.7	98.5	98.5	98.7	98.7	98.7
CU-51						99.7	99.7	91.3	91.8	91.3	91.3	91.3	91.3	91.5	91.5	91.3	91.3	91.3
CU-68							99.5	91.5	92	91.5	91.5	91.5	91.5	91.8	91.8	91.5	91.5	91.5
CU-88								91.1	91.5	91.1	91.1	91.1	91.1	91.3	91.3	91.1	91.1	91.1
CU-228									99.5	100	100	100	99.5	99.3	99.3	99.5	99.5	99.5
CU-231										99.5	99.5	99.5	99.5	99.3	99.7	99.5	99.5	99.5
CU-260											100	100	99.5	99.3	99.3	99.5	99.5	99.5
CU-280												100	99.5	99.3	99.3	99.5	99.5	99.5
CU-282													99.5	99.3	99.3	99.5	99.5	99.5
CU-356														99.7	99.7	100	100	100
CU-370															99.5	99.7	99.7	99.7
CU-379																99.7	99.7	99.7
CU-1101																	100	100
CU-1102																		100
CU-1103																		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity)ของนิวคลีโอไทด์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร จำนวน 16 ตัวอย่าง

Virus	586-4	K1	586-3	Sw-03	06CB2	586-05	9469	CB1	CBP18	586-2	874	13021	CB8.4	CHL2	HF6	S1
586-4		85.6	88.1	88.1	85.6	95.6	85.6	85.7	85.4	88.1	90.6	86.3	86.1	86.3	85.6	85.6
K1			85.8	81	93.4	84	93.4	93.5	99.1	85.8	81.5	92.7	93.7	93.6	93.4	93.6
586-3				88.8	87.1	92	87.1	87.3	85.6	100	91.3	86.9	87	87.3	87.2	87
Sw-03					81.8	91	81.6	81.7	80.6	88.8	93.5	82.1	81.9	81.8	81.7	81.8
06CB2						85.2	99.4	99.6	93.2	87.1	81.9	93.2	94.1	94.1	99.5	94.5
586-05							85.1	85.3	83.8	92	93.5	85	85	85.3	85.2	84.4
9469								99.6	93.3	87.1	81.7	93.3	94.2	94.3	99.7	95
CB1									93.4	87.3	81.9	93.2	94.3	94.3	99.9	94.9
CBP18										85.6	81.3	92.6	93.3	93.2	93.3	93.5
586-2											91.3	86.9	87	87.3	87.2	87
874												82.1	82.5	82.1	81.9	81.5
13021													92.9	92.6	93.3	93.6
CB8.4														98.2	94.2	94.5
CHL2															94.3	94.3
HF6-05																95
S1																

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของกรดอะมิโนบนยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร จำนวน 16 ตัวอย่าง

virus	586-4	K1	586-3	Sw-03	06CB2	586-05	9469	CB1	CBP18	586-2	874	13021	CB8.4	CHL2	HF6-05	S1
586-4		91.5	94.8	94.8	91.7	97.9	91.9	91.9	91.1	94.8	95.2	92.1	91.5	92.1	91.1	91.9
K1			94.2	92.3	98.3	93	98.3	98.3	99.3	94.2	91.7	96	97.5	98.3	98.3	98.1
586-3				95.6	94.6	96.9	94.4	94.4	93.8	100	96,2	95	94	94.6	94.4	94.4
Sw-03					92.5	96.5	92.3	92.3	91.9	95.6	96.7	93	92.1	92.7	92.3	92.5
06CB2						93.2	99.7	99.7	98.3	94.6	92.5	96.7	97.9	98.3	99.7	98.5
586-05							93.4	93.4	92.5	96.9	96.9	93.6	93	93.6	93.4	93.4
9469								100	98.3	94.4	92.3	96.5	98.1	98.5	100	98.7
CB1									98.3	94.4	92.3	96.5	98.1	98.5	100	98.7
CBP18										93.8	91.7	96.2	97.7	98.1	98.3	98.3
586-2											96.2	95	94	94.6	94.4	94.4
874												93.2	91.9	92.1	92.3	92.3
13021													96.5)	96.7	96.5	96.9
CB8.4														98.7	98.1	98.5
CHL2															98.5	98.9
HF6-05																98.7
S1																

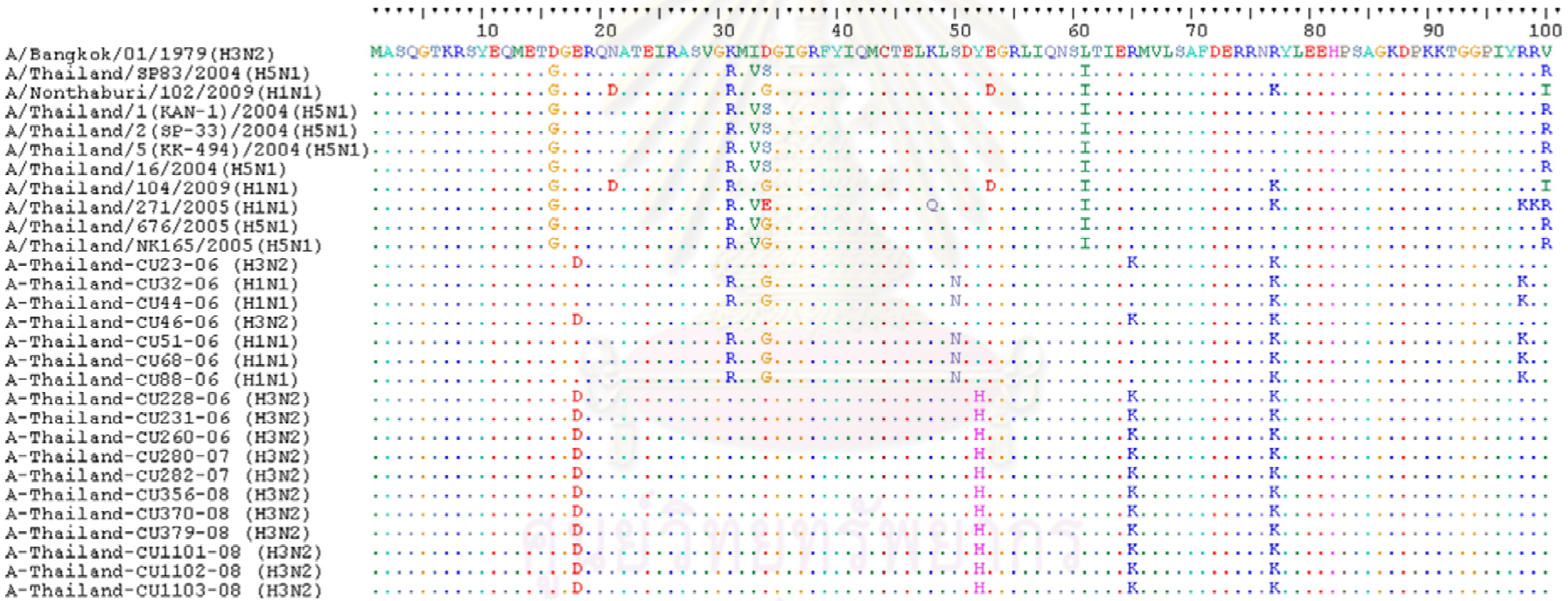
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก จำนวน 15 ตัวอย่าง

virus	CU-J1475	CU-629	CU-279	CU-285	CU-284	CU-304	CU-307	CU-622	CU-624	CU-630	CU-633	CU-643	CU-P76	CU-P87	CU-J1243
CU-J1475		99.8(99.5)	99.7(99.7)	99.9(99.7)	99.1(99.1)	99.1(99.3)	99.6(99.7)	91.9(98.1)	91.9(98.5)	92(98.5)	91.9(98.1)	92(98.3)	99.6(99.5)	99.6(99.5)	100(100)
CU-629			99.7(99.7)	99.9(99.7)	99.7(99.1)	99.1(99.3)	99.6(99.7)	91.9(98.1)	92(98.5)	92.1(98.5)	92(98.1)	92.1(98.3)	99.7(99.5)	99.7(99.5)	99.8(99.5)
CU-279				99.8(100)	99.6(99.3)	99.1(99.5)	99.6(100)	91.8(98.3)	91.9(98.7)	91.9(98.7)	91.9(98.3)	91.9(98.5)	99.5(99.7)	99.5(99.7)	99.7(99.7)
CU-285					99.7(99.3)	99.1(99.5)	99.7(100)	91.9(98.3)	92(98.7)	92.1(98.7)	92(98.3)	92.1(98.5)	99.7(99.7)	99.7(99.7)	99.9(99.7)
CU-284						98.9(98.9)	99.5(99.3)	91.7(97.7)	91.8(98.1)	91.9(98.1)	91.8(97.7)	91.9(97.9)	99.5(99.1)	99.5(99.1)	99.7(99.1)
CU-304							98.9(99.5)	91.9(98.3)	91.9(98.7)	92(98.7)	91.8(98.3)	91.9(98.5)	99(99.3)	99(99.3)	99.1(99.3)
CU-307								91.8(98.3)	91.9(98.7)	91.9(98.7)	91.9(98.3)	91.9(98.5)	99.4(99.7)	99.4(99.7)	99.6(99.7)
CU-622									99.6(99.5)	99.7(99.5)	99.7(100)	99.5(99.7)	92.1(98.1)	92.1(98.1)	91.9(98.1)
CU-624										99.6(100)	99.4(99.5)	99.5(99.7)	92.1(98.5)	92.1(98.5)	91.9(98.5)
CU-630											99.7(99.5)	99.4(99.7)	92.2(98.5)	92.2(98.5)	92(98.5)
CU-633												99.3(99.7)	92.1(98.1)	92.1(98.1)	91.9(98.1)
CU-643													92.2(98.3)	92.2(98.3)	92(98.3)
CU-P76														100(100)	99.6(99.5)
CU-P87															99.6(99.5)
CU-J1243															

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

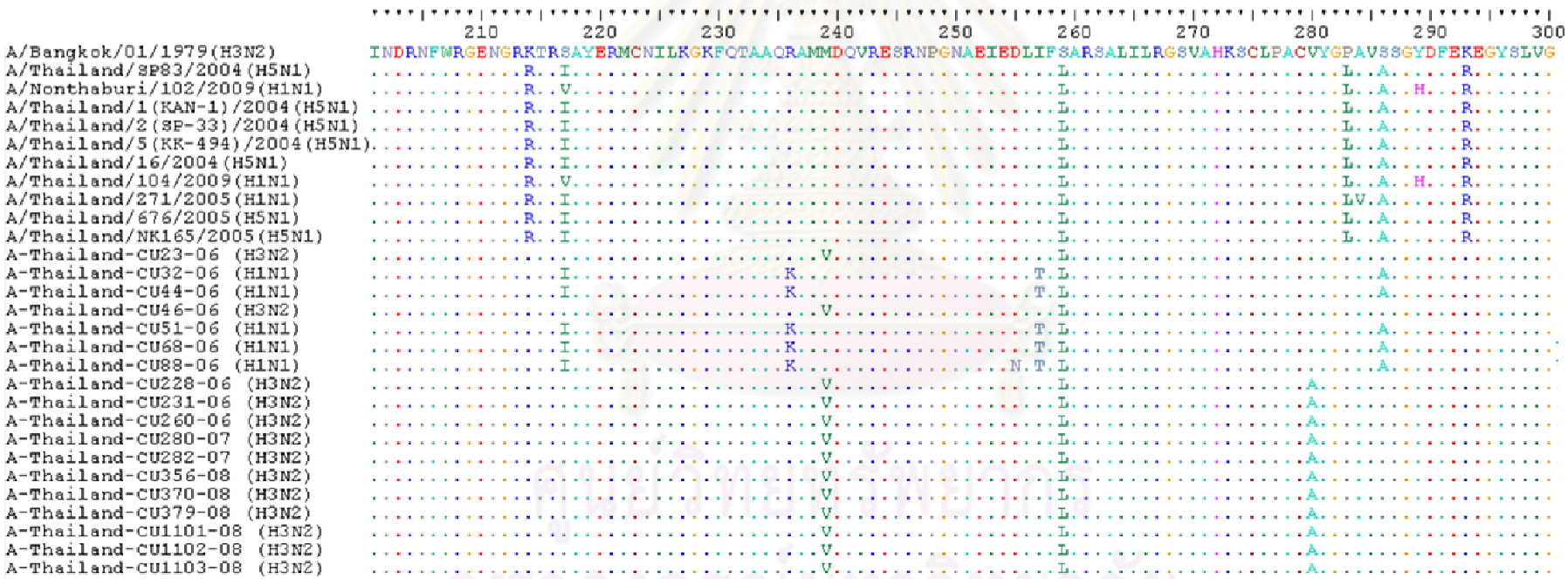
แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนตำแหน่งที่ 1-100



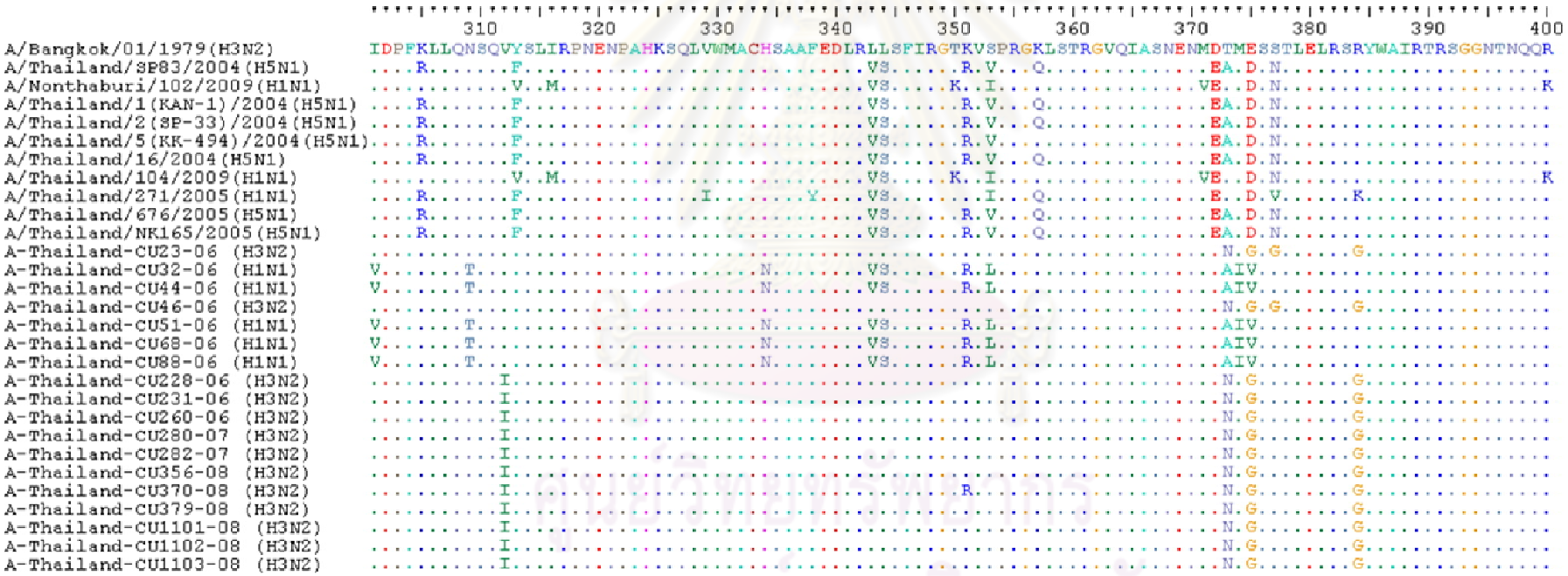
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนตำแหน่งที่ 101-200

แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนตำแหน่งที่ 201-300

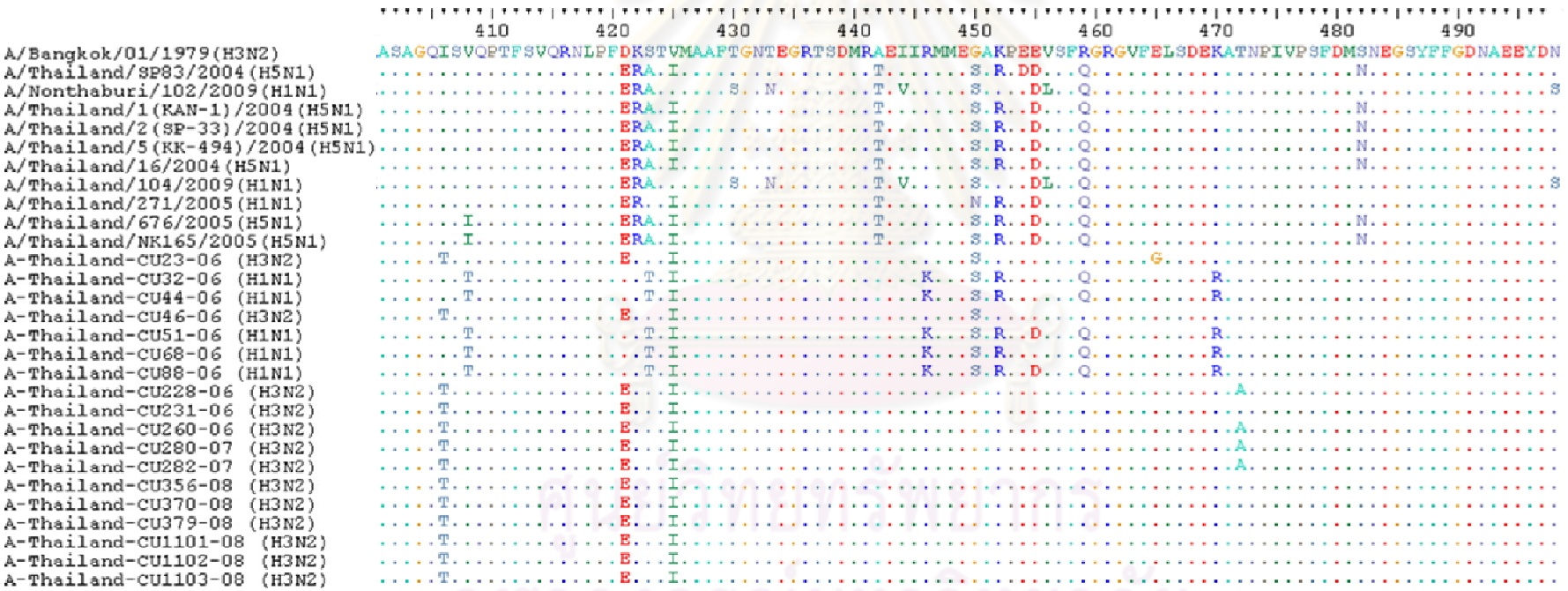


แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนตำแหน่งที่ 301-400



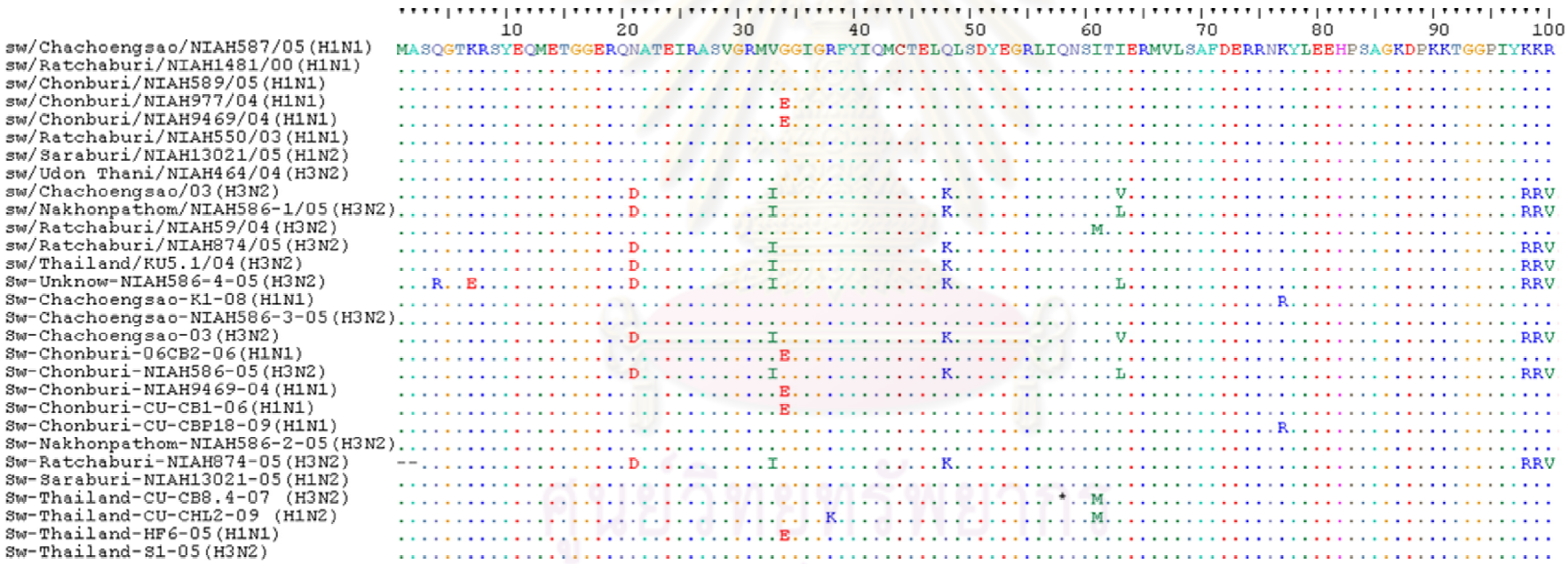
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนตำแหน่งที่ 401-498



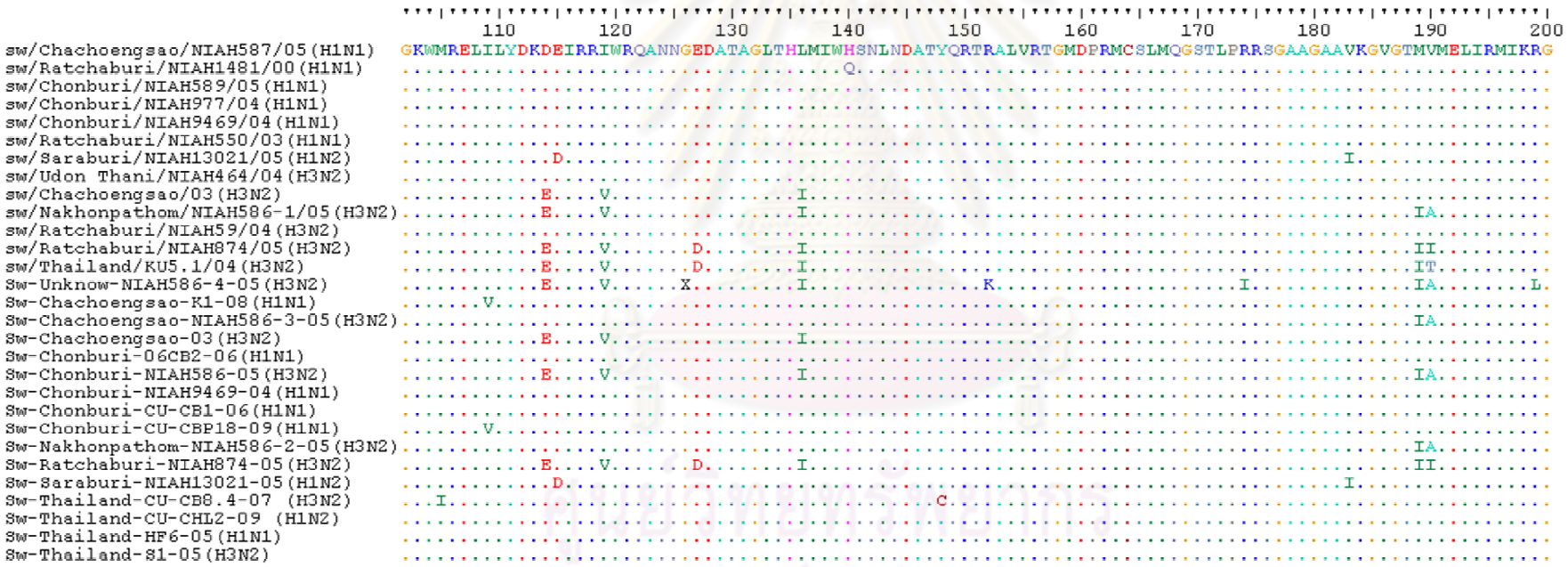
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรตำแหน่งที่ 1-100



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

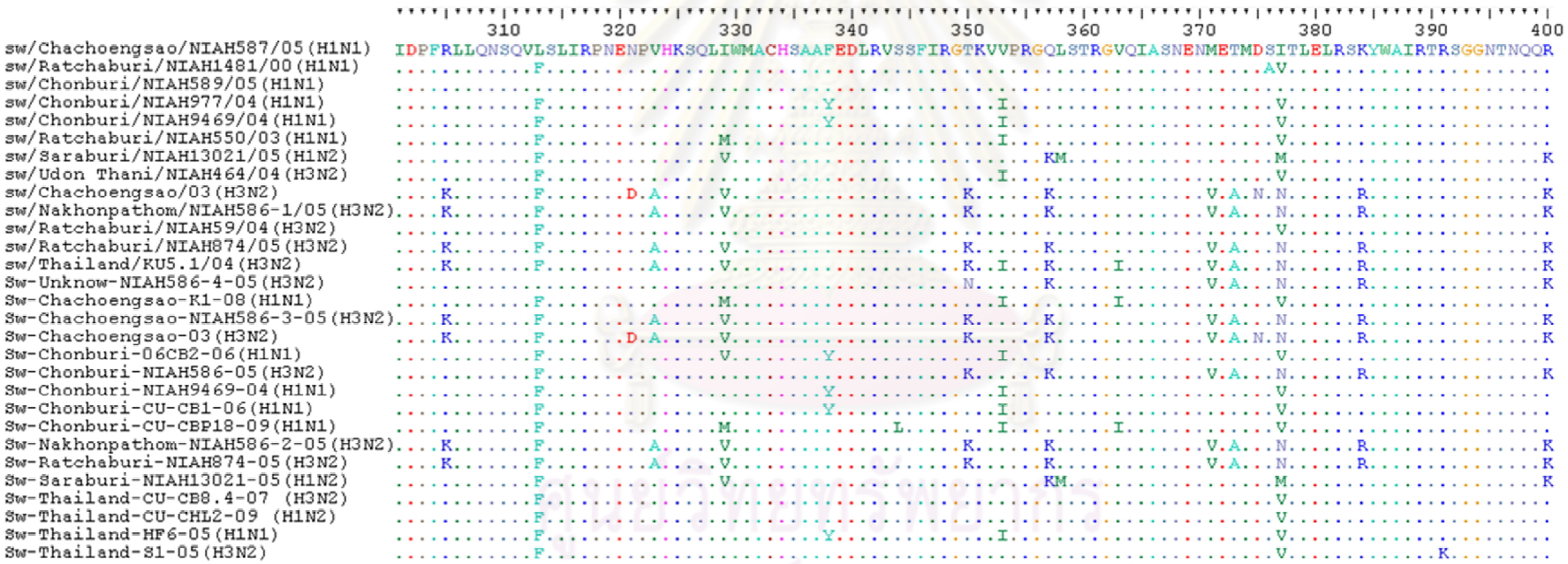
แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรตำแหน่งที่ 101-100



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

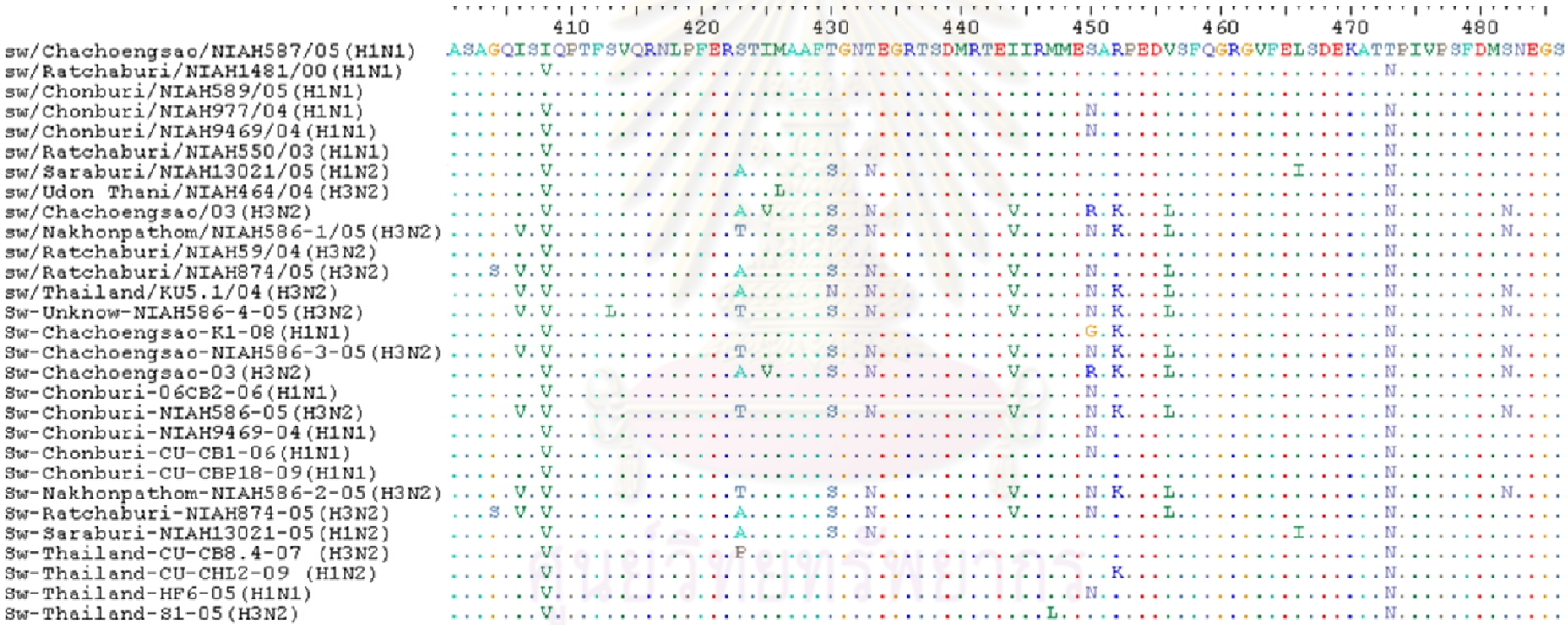
แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรตำแหน่งที่ 201-300

แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรตำแหน่งที่ 301-400



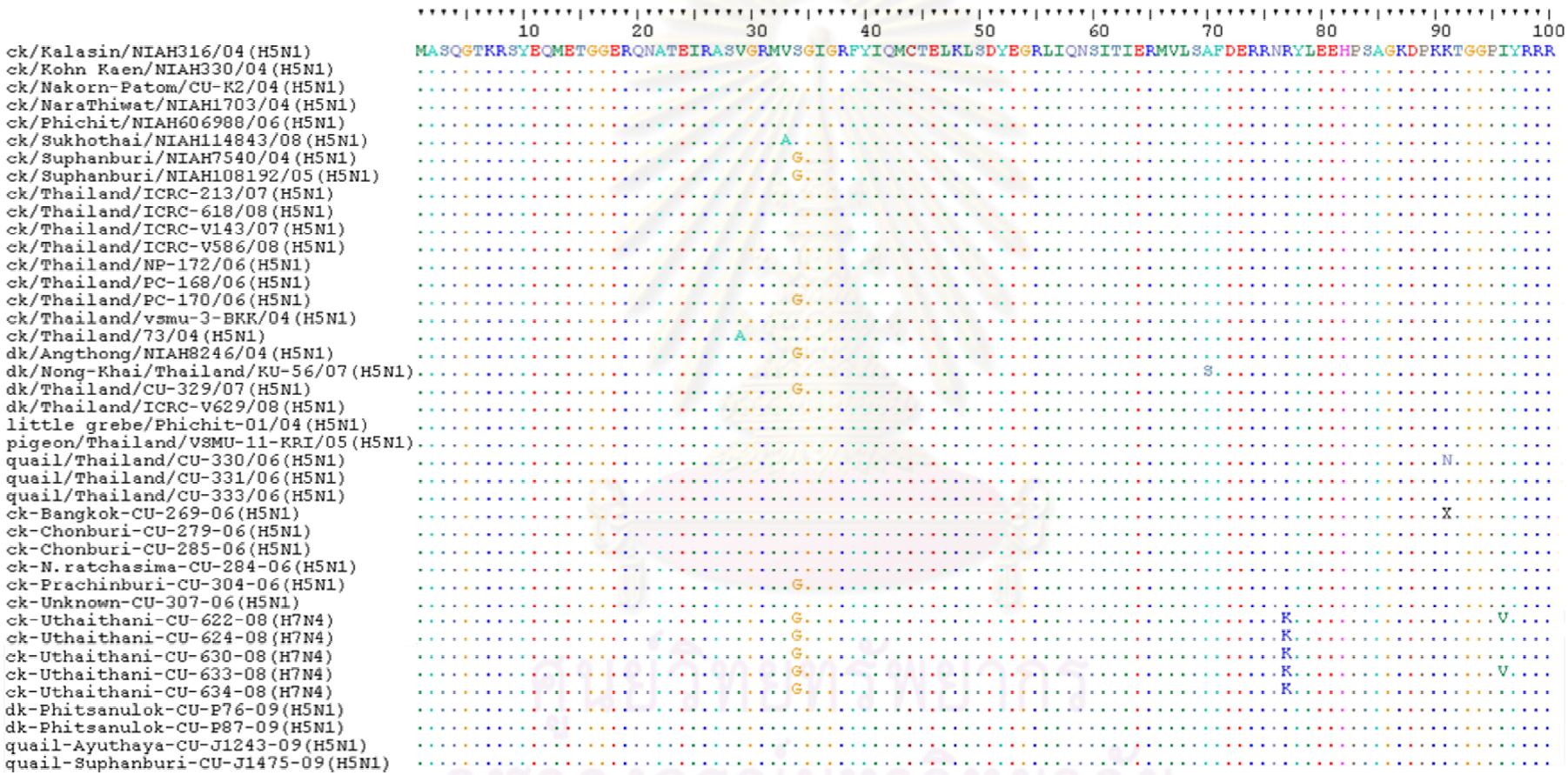
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรตำแหน่งที่ 401-486



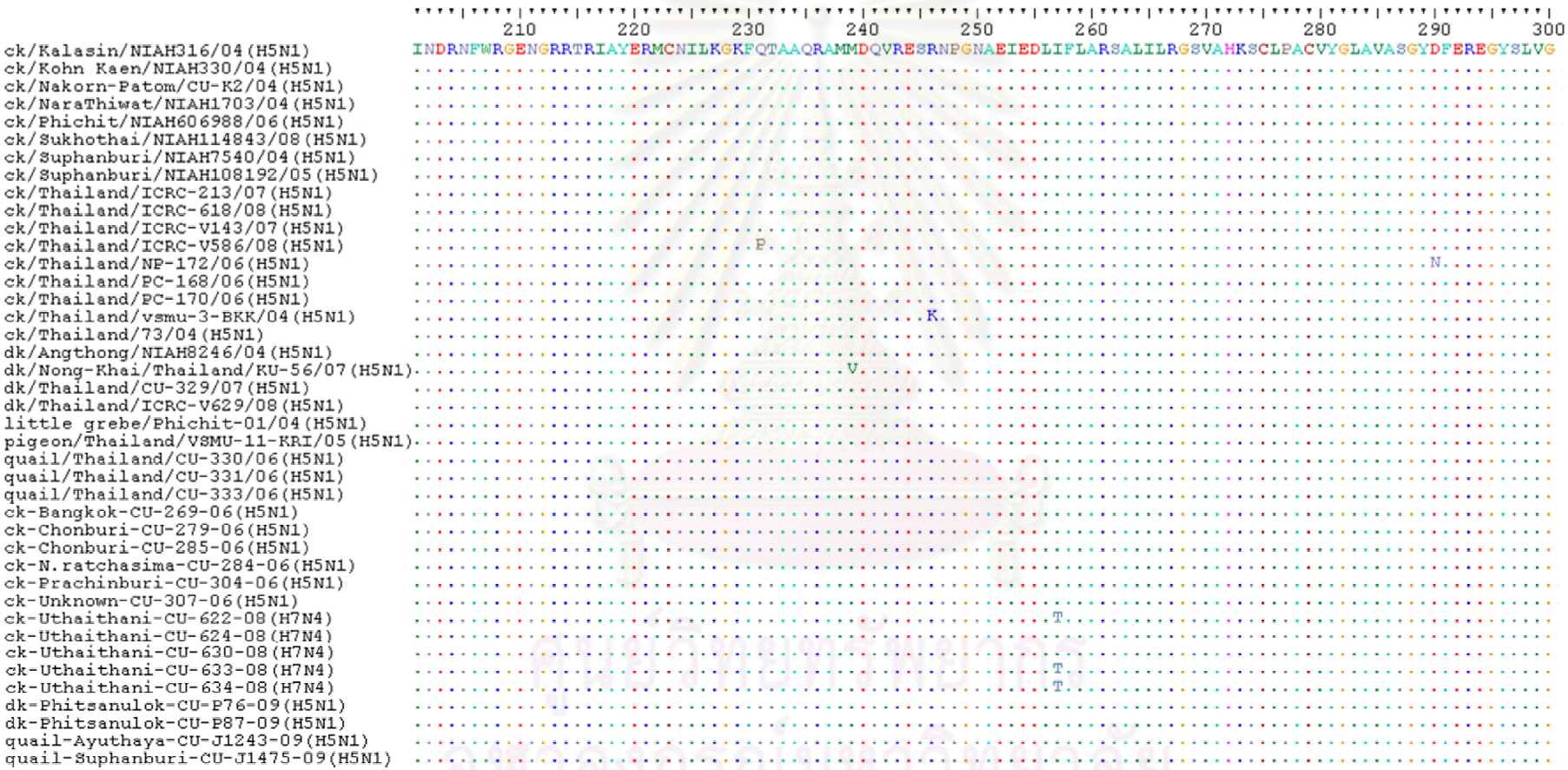
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในประเทศไทยตำแหน่งที่ 1-100



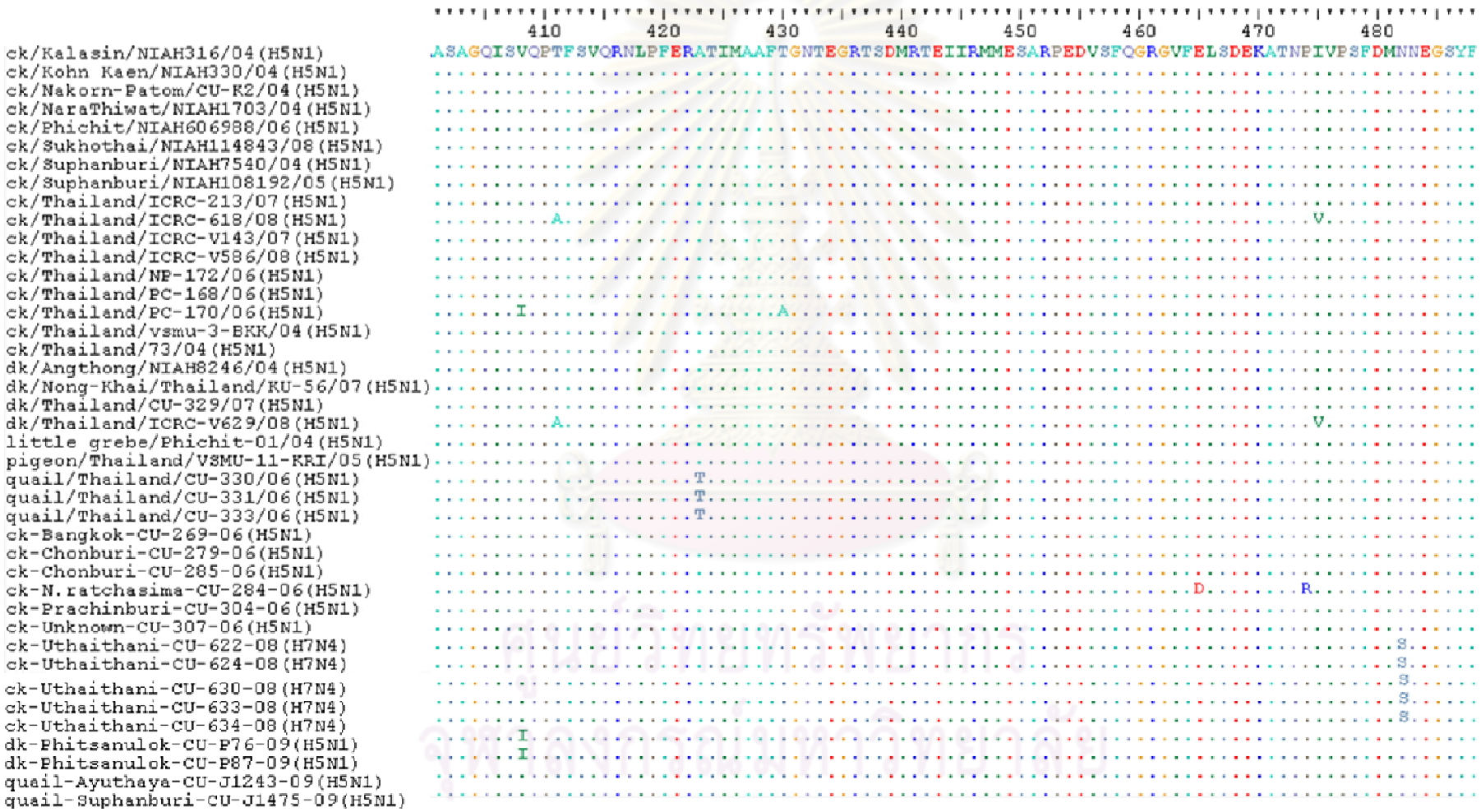
แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในประเทศไทยตำแหน่งที่ 101-200

แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในประเทศไทยตำแหน่งที่ 201-300



แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในประเทศไทยตำแหน่งที่ 301-400

แผนภาพแสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกในประเทศไทยตำแหน่งที่ 401-488



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ณัฐกานต์ ทิพม้อม เกิดเมื่อวันที่ 23 เมษายน พ.ศ. 2521 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร เมื่อปี พ.ศ.2544 ในปี พ.ศ. 2545 - 2548 ทำงานที่กลุ่มงานไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย