การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่แยกได้ในประเทศไทย และการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนในการนิวทรัลไลซ์ไวรัส

นายภีมภัส เบ็งทอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

TYPING OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS THAI - ISOLATES AND EVALUATION OF VACCINE EFFICACY TO NEUTRALIZWD VIRUS

Mr. Pheemphat Bengtong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine
Department of Veterinary Medicine
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่แยกได้ในประเทศไทย และการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนในการนิวทรัลไลซ์ไวรัส
โดย	นายภีมภัส เบ็งทอง
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สมศักดิ์ ภัคภิญโญ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ทวีศักดิ์ ส่งเสริม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภีมภัส เบ็งทอง : การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่แยกได้ในประเทศไทย และการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนในการนิวทรัลไลซ์ไวรัส. (TYPING OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS THAI - ISOLATES AND EVALUATION OF VACCINE EFFICACY TO NEUTRALIZWD VIRUS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. น.สพ. ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. น.สพ. ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์, 44 หน้า.

การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ 13 สเตรน ที่แยกได้จากประเทศไทย เปรียบเทียบกับ วัคซีน สเตรนต่างๆ คือ Ma5, H120 และ 4/91 โดยใช้วิธี RT-PCR RFLP และการการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน หลังจากที่เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในตำแหน่ง S1 ยีน และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sau3AI ผลพบว่า สามารถแยกได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไวรัสสเตรน THA20151, THA40151, THA50151, THA60151 และ THA90151 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไวรัสสเตรน THA30151, THA70151, THA80151, THA100151, THA110351, THA120351, THA130551 และ THA140551 กลุ่มที่ 3 ได้แก่วัคซีนสเตรน Ma5 และ H120 กลุ่มที่ 4 ได้แก่ วัคซีนสเตรน 4/91 ซึ่งผลการแบ่งกลุ่มสอดคล้องกับผลการแบ่งกลุ่มด้วยการหาลำดับพันธุกรรมโดยใช้ตำแหน่ง S1 ยีน จากนั้น ไวรัสสเตรน THA80151 และ THA90151, Ma5, H10 และ 4/91 ถูกใช้ในการศึกษาไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชันด้วยวิธีเบต้า ผลพบว่าไวรัสทั้ง 2 สเตรนมีความแตกต่างจากวัคซีน ทั้ง 3 สเตรน (R value<10%) ผลการศึกษาครั้งนี้สัมพันธ์กับการพบการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ อย่างต่อเนื่องในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้อยู่ในประเทศไทย มีประสิทธิภาพเพียงพอในการฆ่า IBV ที่พบในประเทศไทยได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5275585831 : MAJOR VETERINARY MEDICINE
KEYWORDS: INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS / TYPING / RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM / VIRUS NUETRALIZATION TEST

PHEEMPHAT BENGTONG: TYPING OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS THAI - ISOLATES AND EVALUATION OF VACCINE EFFICACY TO NEUTRALIZWD VIRUS. ADVISOR: ASST. PROF. DR.NIWAT CHANSIRIPORNCHAI, CO-ADVISOR: PROF. DR.JIROJ SASIPREEYAJAN, 44 pp.

Thirteen IBV field isolates and 3 commercial IBV vaccines (Ma5, H120 and 4/91) were typed with 2 different methods which are RT-PCR RFLP and virus neutralization test. After partial S1 gene amplification and restriction with Sau3AI enzyme, the patterns were observed on agarose gel electrophoresis. There were 4 patterns shown in this method. The first group consists of THA20151, THA40151, THA50151, THA60151 and THA90151. The second group consists of THA30151, THA70151, THA80151, THA100151, THA110351, THA120351, THA130551 and THA140551. The third group consists of Ma5 and H120. And the last group consists of 4/91. THA80151, THA90151, Ma5, H120 and 4/91 were represented for virus neutralization test with beta method. The R value the of THA80151 and THA90151 were separated into two different groups. Ma5, H120 and 4/91 cannot be separated into different group. Our study shown that the field IBVs differ from the commercial vaccine (R value < 10%), so IBV outbreak in Thailand is stills the continuing problem. However our studies demonstrated that commercial disinfectants are able to kill IBV.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department:	Veterinary Medicine	Student's Signature	.....
Field of Study:	Veterinary Medicine	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2013	Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ เนื่องด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษาทั้ง 2 ท่าน รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย และ ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์ ซึ่งได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทดลอง

ขอขอบคุณอาจารย์ น.สพ.ดร.ธวัชชัย โพธิ์เฮือง ผู้ซึ่งให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือในการทดลอง และความอนุเคราะห์เชื้อไวรัส ตลอดจนอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน และ รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.สมศักดิ์ ภัคภิญโญ ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อชี้แนะ ซึ่งทำให้งานวิจัยครั้งนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2553 ที่ให้เงินอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ และพนักงานเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนการวิจัยทุกๆด้าน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

1.4 กรอบแนวคิดวิจัย 4

บทที่ 2 5

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (Avian infectious bronchitis) 5

2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IBV 8

2.3 การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยระบบ Biological functional test 9

2.4 การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยระบบ Non biological functional test 10

2.5 ความสามารถในการป้องกันโรคของวัคซีนต่อเชื้อไวรัสข้ามสายพันธุ์ 10

2.6 IBV ในประเทศไทย 11

2.7 น้ำยาฆ่าเชื้อ 11

บทที่ 3 12

วิธีดำเนินการวิจัย 12

3.1 เชื้อไวรัส 12

1.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟัก และการคำนวณไวรัสไตเตอร์ 12

1.2 การเก็บเชื้อไวรัส 14

3.2 การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ 14

2.1 การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี RT-PCR RFLP 14

2.2 การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยการวิธีไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน 16

2.3 การวัดความสอดคล้องกันของวิธีการแบ่งกลุ่ม 18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.3 การประเมินคุณสมบัติของน้ำยาฆ่าเชื้อในการทำลายไวรัส 19
3.1 ไข่ไก่ฟัก 19
3.2 IBV ที่ใช้ทดสอบ 19
3.3 น้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ทดสอบ 19
3.4 การทดสอบประสิทธิภาพยาฆ่าเชื้อ 20
3.5 สถิติที่ใช้ทดสอบ 20
บทที่ 4 21
ผลการทดลอง 21
4.1 การแบ่งกลุ่ม IBV ด้วยวิธี RT-PCR RFLP 21
1.1 ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (RT-PCR) 21
1.2 การตัดสายพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) 21
4.2 การแบ่งกลุ่มIBV ด้วยการวิธีไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน 22
2.1 ผลการผลิตแอนตีซีรัม 22
2.2 ผลการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน 23
2.3 ผลการวัดความสอดคล้องกันของวิธีการแบ่งกลุ่ม 24
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพยาฆ่าเชื้อ 24
บทที่ 5 26
สรุปการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 26
รายการอ้างอิง 30
Cook JK, Sarah JO, Martyn AW and Michael BH. 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. Avian Pathol. 28(5):477-485. 31
Li M, Wang XY, Wei P, Chen QY, Wei ZJ and Mo ML. 2012. Serotype and genotype diversity of infectious bronchitis viruses isolated during 1985-2008 in Guangxi, China. Arch. Virol. 157(3):467-74. 32
Terregino C, Toffan A, Beato MS, Nardi DR, Vascellari M, Meini A, Ortali G, Mancin M and Capua I. 2008. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection

induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. Avian Pathol. 37(5):487-93. 33

หน้า

ภาคผนวก 34

รายการอ้างอิง 42

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 44

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 IBV และจีโนไทป์ ที่ใช้ในการศึกษา..... 12

ตารางที่ 2 การคำนวณค่าไวรัสไตเตอร์.....13

ตารางที่ 3 ผล RFLP pattern หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ*Sau3AI*.....22

ตารางที่ 4 ค่า neutralization index ที่ได้จากการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน.....23

ตารางที่ 5 ค่า R-value ที่ได้จากการแยกกลุ่มไวรัสในการศึกษาครั้งนี้.....24

ตารางที่ 6 ผลประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อไวรัส 2 สายพันธุ์..... 25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างและส่วนประกอบของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่..... 5

รูปที่ 2 ลักษณะคัพภะอายุ 16 วัน ปกติ (ซ้าย) และแคระ แกร็น (ขวา).....7

รูปที่ 3 ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR.....21

รูปที่ 4 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์จากการผลิตแอนตีซีรัม.....23

รูปที่ 5 ลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและตำแหน่งที่เอนไซม์ตัด.....34

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เกิดจากไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ (Infectious bronchitis virus; IBV) โดยมีรายงานเป็นครั้งแรกในปี คศ. 1930 เมือง North Dakota ประเทศสหรัสอเมริกา โดย Shalk และ Hawn (cited by Cavanagh and Naqi, 2003) ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคนี้ ถูกจัดอยู่ family *Coronaviridae,* กลุ่มที่ 3 ของ genus *Coronavirus* เป็น enveloped virus RNA สายเดี่ยว ชนิดสายบวก (positive-sense) มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 27,600 นิวคลีโอไทด์

ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนต้น (upper respiratory tract disease) และระบบสืบพันธุ์ (urogenital tract disease) ไก่ที่ติดเชื้อจะแสดงอาการ ไอ จาม และ tracheal rale อัตราการเพิ่มน้ำหนักลดลง ผลผลิตลดลง พบการอักเสบของหลอดลม สายพันธุ์ที่ก่อรอยโรคที่ไต พบภาวะไตบวม ซีด และสารยูเรตคั่ง โรคนี้สามารถก่อโรคได้ทั้งในไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พันธุ์ โดยที่ไก่อายุน้อยจะแสดงอาการรุนแรง และพบการสูญเสียสูง (Cavanagh and Naqi, 2003)

สาย RNA ของไวรัส IBV ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญ 4 ชนิด คือ สไปค์ (S) ไกลโคโปรตีน เมมเบรน (M) ไกลโคโปรตีน นิวคลีโอแคปสิด (N) โปรตีน และ เอนเวลโลป (E) ไกลโคโปรตีน

สำหรับสไปค์ (S) ไกลโคโปรตีน เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญ มีรูปร่างคล้ายกระบอง กระจายตัวอยู่บนผิวของไวรัส สามารถแบ่งได้เป็น S1 และ S2 สับยูนิต โดย S1 โปรตีนเป็นส่วนยอดที่ยื่นออกมาจากผนังเซลล์ และ S2 เป็นส่วนฐานที่ฝังอยู่กับผนังเซลล์ S1 โปรตีน มีบทบาทสำคัญในการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ และเป็นโปรตีนที่กระตุ้นนิวทรัลไลซ์ซิงแอนติบอดี (neutralizing antibody) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ S1 ยีน มักจะถูกเลือกใช้ในการแยกจีโนไทป์ IBV (Cavanagh and Naqi, 2003)

S1 ยีน เป็oตำแหน่งที่พบว่ามีอัตราการเกิดการเปลี่ยนแปลงสายพันธุกรรม nucleotide insertion deletion และการเกิด mutation ซึ่งทำให้มีรายงานการพบไวรัสสายพันธุ์ใหม่อยู่อย่างต่อเนื่อง (Cavanagh et al., 1992) ดังนั้นการแบ่งกลุ่ม (typing) ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ จึงมีความสำคัญต่อการเลือกใช้วัคซีน เนื่องจากวัคซีนที่เตรียมจากไวรัสต่างสายพันธุ์กับไวรัสที่พบการระบาด ให้ประสิทธิภาพการป้องการโรคได้ไม่ดีนัก

สำหรับการแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ สามารถแบ่งเป็น 2 ระบบ คือ แบ่งตามลักษณะทาง biological function system และ non-biological functional system ผลของการแบ่งกลุ่มชนิด biological functional test เรียกว่า อิมมูโนไทป์ (immunotype) และ ซีโรไทป์

(serotype) ผลของการแบ่งกลุ่มแบบ non-biological functional test เรียกว่า จีโนไทป์ (genotype) (De Wit, 2000)

วิธี biological functional test นั้น มักใช้วิธีไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชันและ hemagglutination inhibition (HI test) ในการทดสอบ (serotyping) ซึ่งผลการแยกซีโรไทป์ เป็นประโยชน์ในการเลือกใช้วัคซีนที่เหมาะสมกับแต่ละพื้นที่ แต่เนื่องจากวิธีการนี้ เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองเวลาและค่าใช้จ่าย จึงไม่เป็นที่นิยมมากนักในปัจจุบัน (De Wit, 2000)

วิธี non-biological functional tests นั้น นิยมใช้เทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) และเทคนิคการหาลำดับพันธุกรรม (sequencing) ในการจำแนกกลุ่ม (genotyping) (De Wit, 2000) โดย S1 ยีน คือตำแหน่งของสายพันธุกรรมที่ถูกเลือกใช้ในการแบ่งกลุ่มไวรัสมากที่สุด

การทำ RFLP analysis คือ วิธีที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการตัดสายพันธุกรรมของไวรัส ซึ่งเป็นวิธีที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน อุปกรณ์ และค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก เมื่อเทียบกับเทคนิคการหาลำดับพันธุกรรม

ในประเทศไทย วัคซีนเชื้อเป็นต่อโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ ซีโรไทป์แมสซาชูเซตส์ (Ma5 และ H120) และ 793B (4/91) โดยการศึกษาการแบ่งกลุ่มซีโรไทป์และจีโนไทป์ของเชื้อ IBV ที่พบในประเทศไทย นั้นยังมีไม่มากนัก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อปรียบเทียบวิธีการแบ่งกลุ่มเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่แยกได้ในประเทศไทย ระหว่างวิธี RT-PCR RFLP และการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน

1.2.2 เพื่อปรียบเทียบวิธีการแบ่งกลุ่มเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่แยกได้ในประเทศไทย ระหว่างวิธี RT-PCR RFLP และการหาลำดับพันธุกรรม

1.2.3 เพื่อประเมินประสิทธิภาพวัคซีนต่อการนิวทรัลไลซ์ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่แยกได้ในประเทศไทย

1.2.4 เพื่อประเมินคุณสมบัติของน้ำยาฆ่าเชื้อในการฆ่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาเทคนิคในการแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่เหมาะสม รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ในการวินิจฉัยโรค

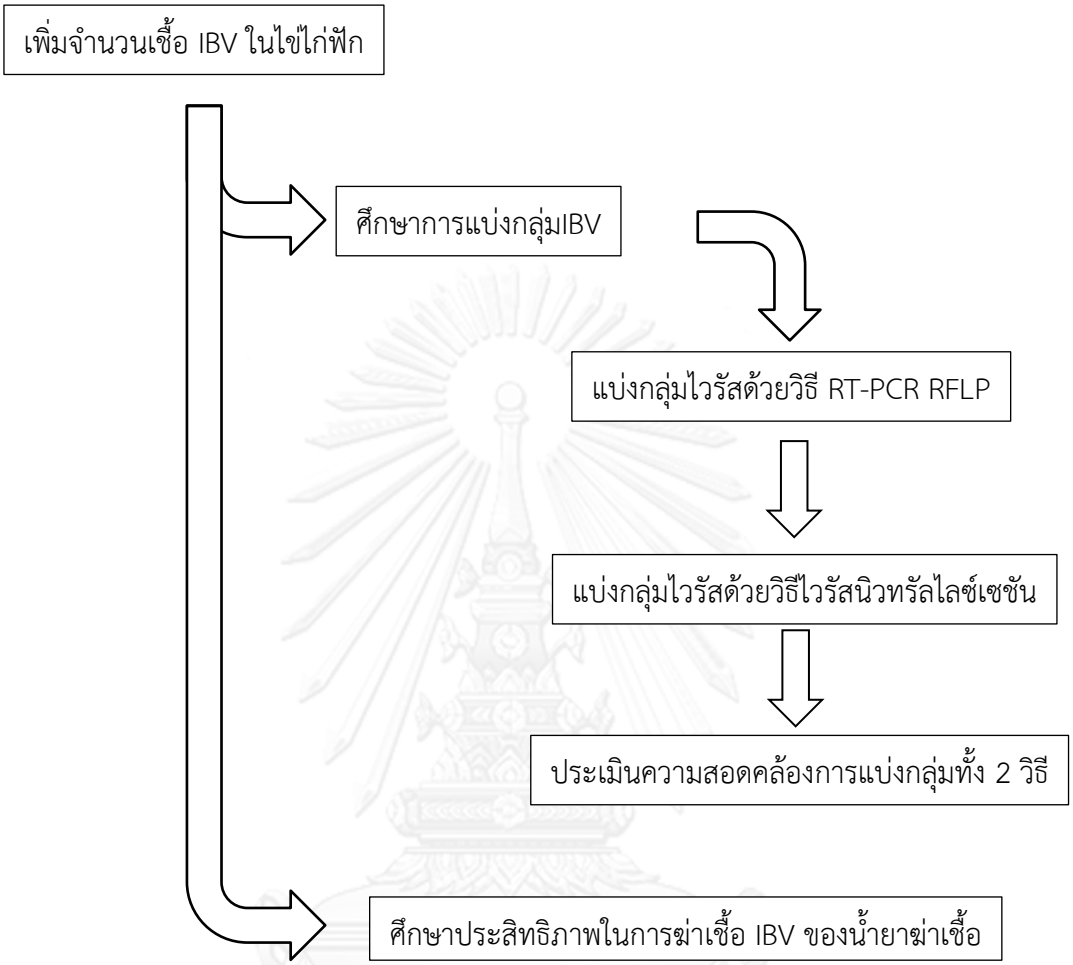
2. สามารถใช้ข้อมูลจากการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชันของวัคซีนต่อเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทย ในการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน เพื่อเลือกใช้วัคซีนที่เหมาะสมสำหรับแต่ละพื้นที่ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. เกษตรกรและผู้ที่เกี่ยวข้องสามารถใช้ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ ต่อการฆ่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบ เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาเลือกใช้ควบคุมและป้องกันโรคภายในฟาร์ม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.4 กรอบแนวคิดวิจัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

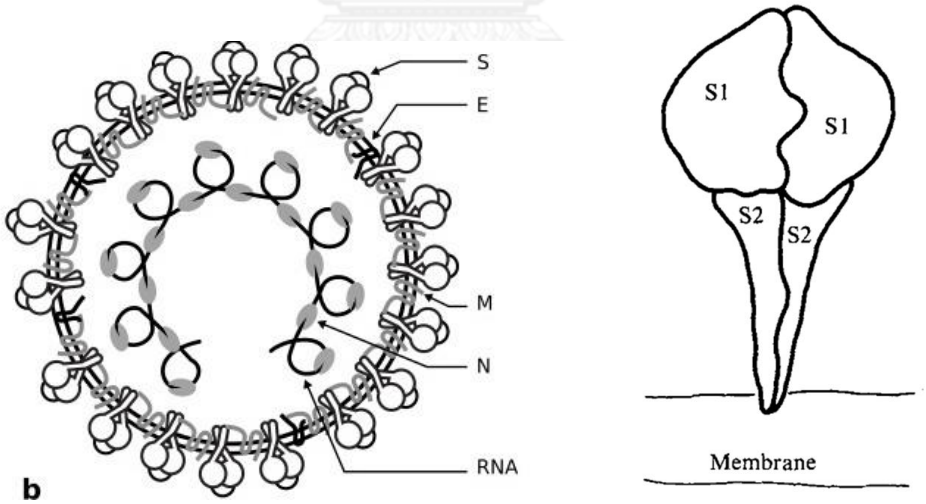
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (Avian infectious bronchitis)

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เกิดจากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ (Infectious Bronchitis Virus; IBV) มีรายงานครั้งแรกในปี คศ. 1930 เมือง North Dakota ประเทศสหรัฐอเมริกา โดย Shalk และ Hawn (cited by Cavanagh and Naqi, 2003) ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (IBV) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคนี้ ถูกจัดอยู่ family *Coronaviridae,* กลุ่มที่ 3 ของ genus *Coronavirus* เป็น enveloped virus RNA สายเดี่ยว ชนิดสายบวก (positive-sense) มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 27,600 นิวคลีโอไทด์ ไวรัส มีรูปร่างกลม หรือ pleomorphic มีโปรตีนลักษณะคล้ายกระบอง รัศมีประมาณ 20 นาโนเมตร ยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 1)

องค์ประกอบทางเคมี

IBV ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญ 4 ชนิด คือ Spike (S) membrane (M) glycoprotein, nucleoprotein (N) และ envelope (E) protein โดย S โปรตีน มีลักษณะคล้ายกระบอง ยื่นออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ แบ่งได้ 2 สับยูนิต ได้แก่ S1 และ S2 ตามลำดับ โดย S1 มีคุณสมบัติกระตุ้นกระบวนการ hemagglutination-inhibiting (HI) และ virus-neutralizing (VN)



รูปที่ 1 โครงสร้างและส่วนประกอบของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (แหล่งที่มา Cavanagh, 1983)

ช่วงอายุที่ไวต่อโรค

ไวรัสสามารถก่อโรคได้ในไก่ทุกช่วงอายุ โดยในไก่อายุน้อย อาจพบอัตราการสูญเสียสูง ขณะที่ในไก่อายุมากขึ้นจะมีความทนทานต่อการเกิดโรค อัตราการสูญเสียต่ำ แต่สามารถพบรอยโรคที่ไต ท่อนำไข่ได้ (Cavanagh and Naqi, 2003)

การแพร่เชื้อ และสัตว์พาหะ

เชื้อสามารถแพร่จากไก่ป่วยไปยังไก่ปกติได้โดยทางตรงและโดยทางอ้อม เชื้อสามารถแพร่ได้รวดเร็วภายในฝูงเดียวกัน ในไก่ที่มีความไวรับสามารถแสดงอาการภายใน 48 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อ และแยกเชื้อไวรัสได้จากหลอดลม ปอด ไต และต่อมเบอร์ซ่าของไก่ ภายใน 24 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อ และอาจพบไวรัสในอวัยวะดังกล่าวได้จนถึง 7 วันหลังได้รับเชื้อ และสามารถแยกไวรัสได้จาก cecal tonsil และมูลไก่ได้จนถึง 14 สัปดาห์ และ 20 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อตามลำดับ (Cavanagh and Naqi, 2003)

สำหรับการติดเชื้อผ่านไข่นั้น มีรายงานการแยกเชื้อไวรัสได้จากไข่จากแม่ไก่ที่หายจากการแสดงอาการป่วยแล้ว 43 วัน แต่ลูกไก่สามารถฟักออกมาได้ และไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้ (Cavanagh and Naqi, 2003)

การแพร่เชื้อทางอากาศระหว่างฝูงนั้น ยังไม่มีการศึกษาและรายงานมากนัก และยังไม่พบสัตว์พาหะต่อโรคนี้ (Cavanagh and Naqi, 2003)

ระยะฟักตัวของโรค

โรคนี้มีระยะฟักตัว 18-36 ชั่วโมง ขึ้นกับปริมาณของไวรัส และตำแหน่งของการติดเชื้อ ในไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อที่เตรียมจากไข่ไก่ฟัก สามารถพบอาการ tracheal rale ภายใน 24 ชั่วโมง สำหรับไก่ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติพบอาการได้ภายใน 36 ชั่วโมงหรือนานกว่า (Cavanagh and Naqi, 2003)

อาการและรอยโรค

IBV ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนต้น (upper respiratory tract disease) และระบบสืบพันธุ์ (urogenital tract disease) อวัยวะเป้าหมาย คือ เซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจส่วนต้น (ciliated epithelial cells) เยื่อบุอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (epithelial cell of reproductive tract) และเยื่อบุในท่อไต (tubular epithelial cells) (Cook et al., 2012) อาการที่พบคือ ไอ จาม และเสียง tracheal rale อัตราการเพิ่มน้ำหนักลดลง และผลผลิตลดลง รอยโรคที่พบคือการอักเสบของหลอดลม ส่วนสายพันธุ์ที่ก่อรอยโรคที่ไต จะพบภาวะไตบวม ซีด และสารยูเรตคั่ง โรคนี้สามารถก่อโรคได้ทั้งในไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พันธุ์ โดยที่ไก่อายุน้อยจะแสดงอาการรุนแรง และพบการสูญเสียสูง (Cavanagh and Naqi, 2003)

ระบบทางเดินหายใจ

ไก่ที่ป่วย จะแสดงอาการซึม ไอ จาม มีน้ำมูก รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา พบการอักเสบของหลอดลม ปอดอักเสบ และผนังปอดหนาตัวขึ้น รวมทั้งอาจพบถุงลมขุ่น ไก่มักจะตายเนื่องจาก หนองแข็งอุดตันหลอดลม จากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าเยื่อบุบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนต้น จะสูญเสียเซลล์ซีเลีย (ciliated cell) ไปจำนวนมาก และพบเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และเฮเทอโรฟิล (heterophil) เข้ามาแทรก (Cook et al., 2012)

ระบบสืบพันธุ์ไก่เพศเมีย

IBV สายพันธุ์ที่ก่อโรคในระบบสืบพันธุ์ จะส่งผลต่ออัตราการให้ผลผลิต และคุณภาพไข่ ในฝูงไก่ไข่ หรือแม่พันธุ์ พบว่าผลผลิตอาจลดลงร้อยละ 2-70 เปลือกไข่ผิดรูป บาง และแตกง่าย ไข่ขาวเหลวกว่าไข่ปกติ ในไก่ที่ได้รับเชื้อตั้งแต่อายุน้อย อาจพบท่อนำไข่มีคั่งของน้ำ (cystic oviduct) ซึ่งส่งผลที่เรียกว่า false layer และไก่เหล่านี้ไม่สามารถให้ผลผลิตได้อีกตลอดการเลี้ยง (Cavanagh and Naqi, 2003)

ไต

IBV บางสายพันธุ์ เช่น Connecticut และ QX สามารถก่อโรคที่ไตได้ และสร้างความสูญเสียได้สูง ไก่ที่ติดเชื้อจะพบการบวมของไต และมีสารยูเรตคั่งในท่อไต (Cavanagh and Naqi, 2003)

อัตราการป่วยและอัตราการตาย

เมื่อมีการติดเชื้อเข้าฝูงไก่ เชื้อสามารถแพร่ได้อย่างรวดเร็ว ไก่ทุกตัวในฝูงจะติดเชื้อ แต่อัตราการตาย ขึ้นกับความรุนแรงของสายพันธุ์ของไวรัส อายุ ระดับภูมิคุ้มกัน ภาวะความเครียดภายในฝูง อาจพบอัตราการตายปานกลางถึงสูงในบางสายพันธุ์ เช่น DE072 และ Australian T ที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจและไต ตามลำดับ ในไก่ที่อายุน้อยกว่า 6 สัปดาห์อาจพบอัตราการตายอาจสูงถึงร้อยละ 25 หรือมากกว่า (Cavanagh and Naqi, 2003)

การวินิจฉัย

เนื่องจาก IBV สามารถก่อโรคในไก่ทุกช่วงอายุ และก่อโรคทั้งในระบบทางเดินหายใจ ระบบสืบพันธุ์และไต การวินิจฉัยนั้น สามารถทำได้โดยการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรง และการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อในซีรัม (Cavanagh and Naqi, 2003)

การแยกเชื้อไวรัส (virus isolation)

ไข่ไก่ฟัก (chicken embryos) เชื้อ IBV สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน allantoic cavity ของไข่ไก่ฟัก คัพภะแสดงลักษณะผิดรูป แคระ แกร็น และ/หรือตาย แต่ไวรัสบางสายพันธุ์อาจพบลักษณะนี้ภายในครั้งที่ 3 ของการฉีดเชื้อเข้าไข่ไก่ฟัก นอกจากนั้นวิธีการนี้ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณไวรัสอีกด้วย (Cavanagh and Naqi, 2003) (รูปที่ 2)

รูปที่ 2 ลักษณะคัพภะอายุ 16 วัน ปกติ (ซ้าย) และแคระ แกร็น (ขวา) (แหล่งที่มา Cavanagh and Naqi, 2003)

เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) เพาะแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์ chick embryo kidney (CEK) และ chicken kidney cell (CK) โดยเซลล์ CEK แสดงลักษณะ plaque ได้ตั้งแต่ครั้งแรกของการแยกเชื้อไวรัส และเซลล์ CK แสดงลักษณะ syncytia ของเซลล์ โดยพบได้ตั้งแต่ 6 ชั่วโมงหลังจากการให้เชื้อ (inoculation) (Cavanagh and Naqi, 2003)

การตรวจหาสารพันธุกรรม

การวินิจฉัยด้วยวิธี RT-PCR โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ IBV จากเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะเป้าหมาย โดยนิยมเลือกตำแหน่ง S gene ของเชื้อไวรัส ในการพัฒนา primer สำหรับการตรวจวินิจฉัย แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัด คือ ไม่สามารถวินิจฉัยแยก ระหว่างไวรัสจากวัคซีน และไวรัสที่ก่อโรคได้ (Cavanagh and Naqi, 2003)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ IBV

การตรวจหาแอนติบอดี ปัจจุบัน วิธี ELISA เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและมีความไวสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น เช่น HI (hemagglutination inhibition test) และวิธีนิวทรัลไลซ์เซชัน (Cavanagh and Naqi, 2003) แต่ข้อจำกัด คือ ค่าแอนติบอดีที่วัดได้ อาจเป็นผลจากวัคซีนกระตุ้นภูมิคุ้ม หรือเป็นผลจากการติดเชื้อได้เช่นกัน

2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ IBV

หลังจากที่มีรายงานการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ครั้งแรกในปี 1930 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา และหลังจากนั้น พบว่ามีรายงานการพบไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ใหม่อย่างต่อเนื่อง (Liu and Kong, 2004; Bayry et al., 2005; Lee et al., 2008; Rimondi et al., 2009)

ในประเทศจีน มีรายงานการแยกเชื้อ IBV 5 สเตรน จากฟาร์มไก่ไข่ใน 4 มณฑล ที่พบปัญหาการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ถึงแม้ว่าฟาร์มเหล่านี้ มีประวัติการใช้วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อก็ตาม เมื่อทดลองให้เชื้อพิษในไก่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free; SPF) อายุ 15 วัน พบว่าเชื้อสามารถก่อโรคได้ และอัตราการตายร้อยละ 10-60 เมื่อผ่าซากพบรอยโรคที่ไต และเมื่อเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมในตำแหน่งยีน S1 ของเชื้อไวรัสทั้ง 5 สเตรน พบว่ามีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 92 และเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัส 16 เสตรน ที่มีรายงานในประเทศจีนก่อนหน้านี้ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 60-81 (Liu and Kong, 2004)

ประเทศอินเดีย พบการระบาดของเชื้อ IBV จีโนไทป์ใหม่ พบปัญหาการก่อโรคที่ไต เมื่อศึกษาทางด้านลำดับพันธุกรรมในตำแหน่งยีน S1 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่พบในประเทศต่างๆ พบว่าลำดับพันธุกรรมมีความใกล้เคียงกับสเตรน 6/82 ที่มีรายงานในยุโรปร้อยละ 68 และใกล้เคียงกับสเตรน Mex/1765/99 ที่มีรายงานในประเทศเมกซิโกร้อยละ 34.3 (Bayry et al., 2005)

ประเทศอาร์เจนตินา มีรายงานการแยกเชื้อ IBV 20 สเตรน จากฟาร์มไก่ไข่และไก่เนื้อ ที่พบปัญหาการระบาดของโรคหลอดลมอักเสบติดต่อ ในพื้นที่ที่ต่างกัน ช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2001 ถึง 2008 โดยพบว่าในจำนวนทั้งหมด 20 สเตรน มี 5 สเตรน แยกได้จากฟาร์มที่มีประวัติการใช้วัคซีนหลอดลม

อักเสบติดต่อซีโรไทป์ Massachusetts และ Connecticut และคณะผู้ศึกษา ได้จำแนกจีโนไทป์ ด้วยวิธีหาลำดับพันธุกรรมในตำแหน่ง hypervariable region 1 (HVR1) และ hypervariable region 2 (HVR2) ของ S1 ยีน พบว่า สามารถจำแนกได้ 3 จีโนไทป์ และทั้ง 3 จีโนไทป์ ถูกจัดอยู่ต่างกลุ่มจากวัคซีนทั้ง 2 ซีโรไทป์ (Rimondi et al., 2009)

ประเทศเกาหลี Lee และคณะ (2008) ได้ศึกษา IBV 33 สเตรน ที่แยกเชื้อจากฟาร์มที่มีการระบาดของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ระหว่างปี ค.ศ. 2003 ถึง 2006 เมื่อเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรม ในตำแหน่ง hypervariable region ของยีน S1 พบว่าสามารถจำแนกได้ 3 จีโนไทป์ คือ K-I K-II และ K-III จีโนไทป์ K-I ประกอบด้วยไวรัส 13 สเตรน โดยกลายพันธุ์จากสเตรน Kr-EJ/95 ที่พบการระบาดในประเทศเกาหลีก่อนหน้านี้ จีโนไทป์ K-II ประกอบด้วยไวรัส 19 สเตรน มีลำดับพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับ IBV สายพันธุ์ที่ก่อโรคที่ไตที่มีรายงานในประเทศจีนและญี่ปุ่น และจีโนไทป์ K-III พบว่ามีสายพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ก่อปัญหากระเพาะแท้อักเสบในประเทศจีน

2.3 การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยระบบ Biological functional test

การแบ่งกลุ่มด้วยระบบ biological functional test หรือการแยกซีโรไทป์ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการทำ Hemmaglutination inhibition test (HI test) และวิธีไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน (VN test)

วิธีไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน สามารถทำได้หลายวิธี เช่น โดยใช้ไข่ไก่ฟัก (Cunningham, 1973; Cowen and Hitchner, 1975; Lohr, 1976; Gelb et al., 1981) เซลล์เพาะเลี้ยง (Hopkins, 1974; Cowen and Hitchner, 1975; Wadey and Faragher, 1981; Csermelyi et al., 1988) และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลอดลม (Johnson and Marquardt, 1975; Darbyshire et al., 1979; Cook, 1984; Cook et al., 1987)

การแยกซีโรไทป์ด้วยเทคนิคการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชันนั้นจำแนกเป็น 2 วิธี คือ วิธี α method และวิธี β method สำหรับวิธี α method นั้น คือ การใช้ซีรัมในปริมาณคงที่ และลดปริมาณไวรัส (virus dilution) ขณะที่วิธี β method นั้นคือการลดปริมาณซีรัมและใช้ไวรัสในปริมาณคงที่ (serum dilution) (Cunningham, 1973) ที่ผ่านมามีหลายงานวิจัยที่ใช้ทั้ง วิธี α method (Ladman et al., 2006; Choi et al., 2009; Liu et al., 2009; Shimazaki et al., 2009) และวิธี β method (Cowen and Hitchner, 1975; Johnson and Marquardt, 1975; Lohr, 1976; Gelb et al., 1981; Wadey and Faragher, 1981; Cook, 1984; Csermelyi et al., 1988; Lee et al., 2003) โดยที่ข้อดีของวิธี β method นั้นคือ ปริมาณของซีรัมที่ใช้น้อยกว่าวิธี α method (Thayer and Beard, 1998)

สำหรับการแยกซีโรไทป์ด้วยวิธี HI test นั้น มีใช้ในห้องปฏิบัติการบางแห่ง (Lashgari and Newman, 1984) โดยผลการแยกซีโรไทป์ด้วยวิธีนี้ มีสอดคล้องกับวิธีไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน แต่มีบางรายงานพบว่าการแยกซีโรไทป์ด้วยวิธี HI test นั้นมีความจำเพาะต่ำกว่าวิธีไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน (De Wit, 2000)

2.4 การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยระบบ Non biological functional test

การแบ่งกลุ่มด้วยระบบ non biological functional test หรือการแยกจีโนไทป์ สามารถทำได้ 2 วิธีหลักๆ คือ การทำ RT-PCR RFLP และการหาลำดับพันธุกรรม โดยตำแหน่งของสายพันธุกรรมที่มักถูกนำมาใช้ในการแยกจีโนไทป์ คือ S1 และ S2 ยีน โดยมีรายงานที่พบว่าการแยกจีโนไทป์ โดยการเลือกตำแหน่ง S1 หรือ S2 ยีนนั้น ให้ผลการแยกจีโนไทป์ที่ไม่สอดคล้องกัน (Mase et al., 2009) แต่ตำแหน่ง S1 ยีนนั้น นิยมใช้ในการแยกจีโนไทป์มากกว่า เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญในการกระตุ้น neutralizing antibody (Cavanagh et al., 1988)

สำหรับวิธีการหาลำดับพันธุกรรมนั้น มีรายงานผลการแยกจีโนไทป์ โดยเลือกใช้ทั้งสายพันธุกรรมของ S1 ยีน เปรียบเทียบกับการเลือกเฉพาะตำแหน่ง Hypervariable region I (HVR1)ของ S1 ยีน พบว่า ทั้ง 2 วิธี ให้ผลการแยกจีโนไทป์สอดคล้องกัน แสดงให้เห็นถึง HVR1 ของ S1 ยีนเป็นตำแหน่งที่สำคัญ ในการใช้จำแนกจีโนไทป์สำหรับเชื้อ IBV (Wang and Huang, 2000) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ladman และคณะในปี 2006 ที่มีรายงานว่าตำแหน่ง HVR1 ของ S1 ยีนนั้นเป็นตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์ในการบ่งบอกถึงระดับในการป้องกันโรคของวัคซีน คณะผู้วิจัยพบว่าการประเมินประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของวัคซีน โดยการเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมของไวรัสจากวัคซีน และไวรัสก่อโรค โดยเลือกตำแหน่ง HVR 1 นั้นให้ผลมีความสอดคล้องมากกว่าวิธีไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน

สำหรับการแยกจีโนไทป์ ด้วยวิธี RT-PCR RFLP นั้น เป็นวิธีที่สะดวก และทราบผลรวดเร็วกว่าวิธีการหาลำดับพันธุกรรม ซึ่งผลการศึกษาของ Kwon และคณะ ในปี 1993 โดยคณะผู้วิจัยได้เลือก เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมตำแหน่ง S1 ยีนขนาด1720 base pairs และเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ *Hae*III, *Xcm*I และ *BstY*I ซึ่งให้ผลในการจัดกลุ่มที่สอดคล้องกับวิธีการหาลำดับพันธุกรรมและไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน ผลของงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัย Jang และคณะ ในปี 2007 ที่พบว่าวิธีการทำ RT-PCR RFLP ในการแยกจีโนไทป์นั้นสอดคล้องกับวิธีการหาลำดับพันธุกรรม

2.5 ความสามารถในการป้องกันโรคของวัคซีนต่อเชื้อไวรัสข้ามสายพันธุ์

ที่ผ่านมามีรายงานการกลายพันธุ์ของ IBV อยู่อย่างต่อเนื่อง จึงมีการศึกษาถึงความสามารถของวัคซีนในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสต่างสายพันธุ์ ผลการศึกษาเหล่านี้ เป็นไปในแนวทางเดียวกัน กล่าวคือ วัคซีนต่างสายพันธุ์ให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคต่ำกว่าวัคซีนจากสายพันธุ์เดียวกัน (Gelb et al., 2005; Lin et al., 2005; Grgic et al., 2009; Liu et al., 2009) Lin และคณะ (2005) ทำการศึกษา โดยให้วัคซีนในไก่อายุ 1 วัน โดยโปรแกรมวัคซีนที่แตกต่างกัน และป้อนเชื้อพิษด้วยเชื้อไวรัสทั้งสายพันธุ์เดียวกัน และต่างสายพันธุ์ พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนสายพันธุ์เดียวกันกับเชื้อพิษให้ผลการป้องกันโรคสูงกว่า ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนต่างสายพันธุ์กับเชื้อพิษ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Liu และคณะในปี 2006 ที่พบว่า วัคซีนทั้ง 5 ชนิด มีความสามารถในการป้องกันโรคในอัตราที่ต่ำ ต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ นอกจากนี้ มีรายงานการทดสอบ โดยให้วัคซีนซีโรไทป์แมสซาชูเซตส์ และป้อนเชื้อพิษต่างซีโรไทป์ ผลพบว่ามีอัตราการป้องกันโรคเพียงแค่ 66.7

เปอร์เซนต์ (Grgic et al., 2009) โดยไวรัสในวัคซีนที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมกับสายพันธุ์ที่มีการระบาด จะสามารถให้ผลการป้องกันโรคได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสในวัคซีนที่มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น้อยกว่า (Gelb et al., 2005)

2.6 IBV ในประเทศไทย

มีรายงานการระบาดของโรคระหว่างปี พ.ศ.2497-2498 (Chaiyasittiyuthaparn, 1957) และมีรายงานการระบาดอีกหลายครั้ง โดยพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ก่อปัญหาที่ไต และระบบทางเดินหายใจ ในปี พ.ศ. 2552 มีรายงานการแยกเชื้อ IBV สายพันธุ์ใหม่ในประเทศไทย คณะผู้วิจัยได้นำส่วนของ HVR ของ S1 ยีน ในการแยกจีโนไทป์ พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Thailand I ที่มีลำดับพันธุกรรมแตกต่างจากเชื้อไวรัสที่พบจากต่างประเทศ และจากวัคซีน และ Thailand II ที่มีลำกับพันธุกรรมความคล้ายคลึง และถูกจัดอยู่จีโนไทป์เดียวกันกับ เชื้อไวรัสที่มีรายงานในประเทศจีนสายพันธุ์ก่อโรคที่ไต (Pohuang et al., 2009)

2.7 น้ำยาฆ่าเชื้อ

น้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ Virusnip, Virkon S, CID 2000 และ Omnicide ซึ่งส่วนประกอบและคุณสมบัติที่แตกต่างกัน

Virusnip ประกอบด้วย potassium peroxymonopersulphate (PMP) ซึ่งเป็นสาร oxidizing agent และ sodium dichloroisocyanurate (SCID) เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติการปล่อยคลอรีน

Virkon S ประกอบด้วย sodium dodecyl benzene sulphonate มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว (anionic surfactant) และ potassium monopersulphate ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติ oxidizing agent

CID 2000 ประกอบด้วย hydrogen peroxide และ peroxyacetic acid ทั้ง 2 สารมีคุณสมบัติเป็นสาร oxidizing agent

Omnicide ประกอบด้วย glutaraldehyde และ akyl benzyl dimethyl ammonium chloride ซึ่งอยู่ในกลุ่มของสาร quaternary ammonium compounds (QACs)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อไวรัส

เลือกเชื้อ IBV 13 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากหน่วยวิจัยอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Pohuang et al., 2009) และเชื้อไวรัสจากวัคซีนได้แก่ Ma5, H120 และ 4/91 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1แสดง IBV และจีโนไทป์ ที่ใช้ในการศึกษา

Isolate	Accession number	Genotype
THA20151	EU678787	Thailand I
THA30151	FJ156074	Thailand II
THA40151	EU925648	Thailand I
THA50151	EU78788	Thailand I
THA60151	EU678789	Thailand I
THA70151	EU678790	Thailand II
THA80151	FJ156075	Thailand II
THA90151	EU925649	Thailand I
THA10151	FJ156076	Thailand II
THA110351	FJ156077	Thailand II
THA120351	FJ156078	Thailand II
THA130551	FJ156079	Thailand II
THA140551	FJ156080	Thailand II

Chulalongkorn University

1.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟัก และการคำนวณไวรัสไตเตอร์

1.1.1 ไข่ไก่ฟักอายุ 1 วัน จากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา

1.1.2 นำมาฟักต่อด้วยตู้ฟักขนาดบรรจุ 72 ฟอง อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส

1.1.3 ส่องไข่ไก่ฟักที่อายุ 9 วัน เพื่อคัดทิ้งไข่ที่ไม่มีคัพภะ คัพภะตาย

1.1.4 กำหนดตำแหน่งในการฉีดเชื้อไวรัส บนเปลือกไข่

1.1.5 ตำแหน่งที่ฉีด คือ บริเวณ allantoic cavity ของฟองไข่

1.1.6 เจือจางไวรัส ด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วน 1:10, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$ $1:10^5$ และ $1:10^6$ ตามลำดับ

1.1.7 เตรียมไข่ไก่ฟัก จำนวน 6 ฟองต่อ 1 ความเข้มข้นของไวรัส

1.1.8 ใช้สำลีชุบสารละลายเบตาดีน เช็ดเปลือกไข่รอบบริเวณที่ได้กำหนดตำแหน่งในการฉีดไว้

1.1.9 ใช้ปลายเข็มเบอร์ 18 ยาว 1 นิ้ว เจาะเปลือกไข่ ตำแหน่งที่ได้กำหนดไว้ ระวังไม่ให้เข็มทะลุจนถึง allantoic cavity และโดนคัพภะ

1.1.10 ใช้ไซริงก์ขนาด 1 มิลลิตร และเข็มเบอร์ 26 ยาว 1 นิ้ว ดูดไวรัสตามความเข้มข้นที่ได้เตรียมไว้

1.1.11 ฉีดเชื้อไวรัสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เข้าไข่ไก่ฟัก ผ่านรูบนเปลือกไข่ ที่ได้เจาะไว้ ระมัดระวังไม่ให้ปลายเข็มแกว่ง และโดนคัพภะภายใน

1.1.12 ใช้เทียนไขปิดรูที่ฟองไข่

1.1.13 นำเข้าฟักในตู้ฟัก อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

1.1.14 ส่องดูการตายของคัพภะและบันทึกการตาย ทุกวัน คัพภะที่ตายภายใน 24 ชั่วโมงแรกจะไม่นำมาใช้คำนวณไวรัสไตเตรชัน

1.1.15 เมื่อครบ 7 วัน คำนวณไวรัสไตเตอร์ ELD_{50} โดยวิธีของ Reed and Muench ตามตัวอย่าง ดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงการคำนวณค่าไวรัสไตเตอร์

อัตราส่วนไวรัส	จำนวนคัพภะที่ตาย	จำนวนคัพภะที่มีชีวิต	จำนวนคัพภะสะสม			% ตาย (A/(A+B))x100
			ตาย (A)	มีชีวิต (B)	A+B	
10^{-1}	6	0	22	0	22	100
10^{-2}	6	0	16	0	16	100
10^{-3}	5	1	10	1	11	90.91
10^{-4*}	3	3	5	4	9	55.56
10^{-5}	1	5	2	9	11	18.18
10^{-6}	1	5	1	14	15	6.67

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำนวณค่าไวรัสไตเตอร์ที่ ELD_{50} จาก

$$= \frac{\text{(\% คัพภะที่ตาย ในอัตราส่วนแรกที่มากกว่า 50\%) – 50}}{\text{(\% คัพภะที่ตายในอัตราส่วนแรกที่มากกว่า 50\%) - (\% คัพภะที่ตายในอัตราส่วนที่น้อยกว่า 50\%)}}$$

$$= (55.56 - 50) / (55.56 - 18.18)$$

$$= 5.56 / 37.38 = 0.15$$

ดังนั้นค่าไวรัสไตเตอร์ที่ ELD_{50} เท่ากับ $10^{4.15}$ ELD_{50}/ 0.1มิลลิลิตร หรือ $10^{5.15}$ ELD_{50}/ มิลลิลิตร

1.2 การเก็บเชื้อไวรัส

1.2.1 นำไข่ออกจากตู้ฟัก กรณีที่คัพภะยังมีชีวิต ให้นำไข่เข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 4 ชั่วโมงเพื่อให้คัพภะตายเสียก่อน

1.2.2 ใช้ 70% แอลกอฮอล์เช็ดโดยรอบเปลือกไข่ เหนือฟองอากาศของฟองไข่ จากนั้นใช้ด้าน blunt end ของ forceps ปลอดเชื้อ ทุบที่บริเวณเหนือฟองอากาศให้แตก ระวังไม่ให้เยื่อภายในฟองไข่ฉีกขาด

1.2.3 ใช้ไซริงก์ 5 มิลลิลิตร ดูด allantoic fluid ที่มีเชื้อ IBV ถ่ายลงในหลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร

1.2.4 นำไปปั่นที่ 1500 x g นาน 5 นาที ทิ้งตะกอน และเก็บ allantoic fluid ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.2 การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ

2.1 การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี RT-PCR RFLP

. 2.1.1 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (RT-PCR)

2.1.1.1 นำ allantoic fluid ที่ได้จากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟัก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาละลายที่อุณหภูมิห้อง

2.1.1.2 สกัดสารพันธุกรรม โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (Nucleic acid extraction kit, RBC Bioscience, Taiwan) โดยขั้นตอนการสกัดเป็นไปตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ

2.1.1.3 เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยใช้วิธี One-step RT-PCR ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป (Accessquick™ RT-PCR system, Promega, USA)

2.1.1.4 Primer ที่ใช้คือ FOR1 (5´-CTT TTG TTT GCA CTA TGT AG-3´) และ RE3 (5´-TAA TAA CCA CTC TGA GCT GT-3´) เพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในตำแหน่ง S1 ยีน ขนาด 878 base pairs (Pohuang et al., 2009)

2.1.1.5 ส่วนประกอบปฏิกิริยา ดังนี้

Master Mix	12.5 ไมโครลิตร
AMV reverse transcriptase	0.5 ไมโครลิตร
RNase free water	8 ไมโครลิตร
Forward primer	0.5 ไมโครลิตร

Reward primer	0.5 ไมโครลิตร
RNA template	3 ไมโครลิตร
รวม	25 ไมโครลิตร

2.1.1.6 ปฏิกิริยาลูกโซ่ ดังนี้

	อุณหภูมิ	เวลา	
RT reaction	48°C	45 นาที	
Heating	94°C	5 นาที	
Denaturation	94°C	30 วินาที	35 รอบ
Annealing	54°C	30 วินาที	
Polymerization	72°C	45 วินาที	
Final elongation	72°C	10 นาที	

2.1.1.7 ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose ความเข้มข้น 1.5%

2.1.2 การตัดสายพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP)

2.1.2.1 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนการทำ RT-PCR ใช้ในการแบ่งกลุ่มด้วย RFLP

2.1.2.2 ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3A*I ในการตัดสายพันธุกรรม

2.1.2.3 ส่วนประสอบ ดังนี้

Buffer	2 ไมโครลิตร
BSA	0.2 ไมโครลิตร
*Sua3A*I	0.5 ไมโครลิตร
Water	7.3 ไมโครลิตร
DNA template	10 ไมโครลิตร
รวม	20 ไมโครลิตร

2.1.2.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.2.5 ตรวจสอบผลของการตัดสายพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose ความเข้มข้น 1.5%

2.1.2.6 จัดกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ตามรูปแบบของผลที่ปรากฏใน agarose gel

2.2 การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยการวิธีไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน

2.2.1 การผลิตแอนตีซีรัม

2.2.1.1 เลือกไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ กลุ่มละ 1 ตัวอย่าง และไวรัสวัคซีน (Ma5, H120 และ 4/91) เพื่อเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม ในการผลิตแอนตีซีรัม

2.2.1.2 ใช้ไก่ไข่เพศผู้ จากฟาร์มไก่ไข่ในจังหวัดฉะเชิงเทรา ในการผลิตแอนตีซีรัม จำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม โดยให้น้ำและอาหารเต็มที่ตลอดการเลี้ยง

2.2.1.3 ให้เชื้อไวรัส ปริมาณ 10^5 ELD_{50}/0.1 มิลลิลิตร/ตัว โดยการหยอดตา ที่อายุไก่ 3 สัปดาห์

2.2.1.4 ให้เชื้อไวรัส ปริมาณ 10^5 ELD_{50}/0.1 มิลลิลิตร/ตัว ซ้ำ 2 สัปดาห์หลังจากให้เชื้อครั้งแรก (ไก่อายุ 5 สัปดาห์)

2.2.1.5 เจาะเลือดเพื่อเก็บซีรัมไก่ 2 สัปดาห์ หลังจากให้เชื้อไวรัส ครั้งที่ 2 (ไก่อายุ 7 สัปดาห์) โดยเก็บซีรัม 10 มิลลิลิตรต่อตัว ใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร

2.2.1.6 นำหลอด centrifuge ปั่นแยกซีรัม 1500 x g นาน 5 นาที

2.2.1.7 แยกเก็บซีรัม เฉพาะส่วนใสด้านบน

2.2.1.8 จากนั้นบ่มซีรัมที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 นาที

2.2.1.9 เก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน

2.2.2 การทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน

2.2.2.1 การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้วิธี β ไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน ตามวิธีของ Thayer and Beard (1998) ในการทดสอบ

2.2.2.2 ละลายแอนตีซีรัมที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.2.3 เจือจางซีรัมด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วน 1:2 จากนั้นเจือจางในอัตราส่วน 1:4 (4 fold) เพื่อให้ได้อัตราส่วน 1:2, 1:8, 1:32, 1:128 และ 1:512 ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.2.4 ใช้ไมโครปิเปตดูดซีรัม 0.6 มิลลิลิตร ในแต่ละอัตราส่วน ใส่ eppendorf ที่เตรียมไว้

2.2.2.5 ใช้ไมโครปิเปต ดูด allantoic fluid ของไวรัส 200 ELD50/100 ไมโครลิตร 0.6 มิลลิลิตร ใส่ลงใน eppendorf ที่มีซีรัมอยู่

2.2.2.6 อัตราของซีรัมสุดท้ายหลังจากผสมด้วยไวรัสได้แก่ 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 และ 1:1024 ตามลำดับ

2.2.2.7 ความเข้มข้นของไวรัสสุดท้ายได้แก่ 100 ELD_{50}/100 ไมโครลิตร

2.2.2.8 นำ eppendorf ที่มีส่วนผสมของซีรัมและไวรัส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง

2.2.2.9 นำ eppendorf ที่มีส่วนผสมของซีรัมและไวรัส ออกจากตู้บ่ม

2.2.2.10 ดูดส่วนผสมของซีรัมและไวรัส ฉีดเข้า Allantoic cavity ของไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/ฟอง จำนวน 6 ฟอง/dilution

2.2.2.11 นำเข้าตู้ฟักที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส

2.2.2.8 ส่องไข่ทุกวัน เพื่อบันทึกการตายของคัพภะเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยคัพภะที่ตายภายใน 24 ชั่วโมงแรกจะไม่นำมาคำนวณ

2.2.3 การคำนวณค่า neutralizing index (NI) และ ค่า antigenic relatedness value (R value)

คำนวณค่าไวรัสไตเตอร์ (ELD_{50}) จากวิธีของ Reed and Muench เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณค่า neutralizing index (NI) และ ค่า Antigenic relatedness value (R value) (Choi et al., 2009)

NI คือ ค่าผลต่าง log ไตเตอร์ของกลุ่ม virus control กับค่า log ไตเตอร์ของกลุ่มไวรัสและซีรัม (serum-virus mixture)

ค่า R value คำนวณจากสูตรของ Archetti และ Horsfall (1950)

$$R = \sqrt{r1 \times r2}$$

r1 คือ อัตราส่วนของค่า NI value ของไวรัส 2 ในแอนตีซีรัมของไวรัส 1 (heterologous NI value) ต่อค่า NI value ของไวรัส 1 ในแอนตีซีรัมของไวรัส 1 (homologous NI value)

r2 คือ อัตราส่วนของค่า NI value ของไวรัส 1 ในแอนตีซีรัมของไวรัส 2 (heterologous NI value) ต่อค่า NI value ของไวรัส 2 ในแอนตีซีรัมของไวรัส 2 (homologous NI value)

ค่า R value บ่งบอกถึงความเหมือนของแอนติเจนของทั้ง 2 ไวรัสที่ได้เปรียบเทียบกัน โดยค่าที่ได้ประเมินตามวิธีของ Choi และคณะ ในปี 2009 โดยมีหลักเกณฑ์ ดังนี้

ค่า R value 100% ไวรัสทั้ง 2 ไม่มีความแตกต่างกัน

ค่า R value 70-99% ไวรัสทั้ง 2 มีความแตกต่างของแอนติเจนเพียงเล็กน้อย

ค่า R value 33-69% ไวรัสทั้ง 2 มีความต่างของแอนติเจนแบบ Minor subtype

ค่า R value 10-32% ไวรัสทั้ง 2 มีความต่างของแอนติเจนแบบ Major subtype

ค่า R value น้อยกว่า 10% ไวรัสทั้ง 2 มีความต่างของแอนติเจนอย่างมาก และถูกจัดให้อยู่ต่างซีโรไทป์กัน

2.3 การวัดความสอดคล้องกันของวิธีการแบ่งกลุ่ม

ใช้สถิติ Cohen's kappa statistic เพื่อวัดความสอดคล้องกันของวิธีการแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อทั้ง 3 วิธี คือ RT-PCR RFLP, ไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน และการหาลำดับพันธุกรรม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (α = 0.05)

โดยตัวอย่างวิธีคำนวณดังนี้ ถ้ามี N ตัวอย่าง ซึ่งจะถูกกำหนดให้อยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง จาก m กลุ่มโดย m กลุ่มนี้จะมีลักษณะเป็น นามบัญญัติ จากกลุ่มของ k raters ข้อมูลที่ได้สามารถจัดลงตารางดังนี้

Object	กลุ่ม (categories)				ค่า S_i
	1	2	j	m	
1	n_{11}	n12	n_{1j}	n_{1m}	S_1
2	n_{21}				S_2
3					
i	ni_1		n_{ij}	n_{im}	S_i
N	n_{iN}		n_{Nj}	n_{Nm}	S_N
ผลรวม	C_1	C_2	C_j	C_m	N_k

ค่าสถิติ Kappa คือ ค่าอัตราส่วน ของความน่าจะเป็นที่คาดว่าจะเป็น เมื่อ H 0 (มีความเป็นอิสระกัน) เป็นจริง กับ ความน่าจะเป็นที่สูงสุด

$$K = \frac{P(A) - P(E)}{1 - P(E)}$$

เมื่อ P(A) = ค่าสัดส่วนที่ k Raters ที่มีความเห็นสอดคล้องกัน

P(E) = ค่าส่วนที่ k Raters ที่มีความเห็นสอดคล้องกันโดยบังเอิญ(by chance)

K = 1 ถ้ามีความเห็นสอดคล้องอย่างสมบูรณ์

K = 0 ถ้ามีความเห็นไม่สอดคล้องกัน (No agreement among the raters)

$$P(A) = 1/N \text{ Sum } S_i$$

เมื่อ $S_i = \text{Sum} \left[\begin{matrix} N_{ij} \\ 2 \end{matrix} \right] \Big/ \left[\begin{matrix} k \\ 2 \end{matrix} \right]$

การทดสอบนัยสำคัญของค่า K

เมื่อ H0 : K = 0 ไม่มีความสอดคล้อง

H1 : K = 1 มีความสอดคล้อง

3.3 การประเมินคุณสมบัติของน้ำยาฆ่าเชื้อในการทำลายไวรัส

3.1 ไข่ไก่ฟัก

3.1.1 ไข่ไก่ฟักอายุ 7 วัน จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.2 นำไข่ไก่ฟักต่อที่หน่วยวิจัย ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3 ส่องไข่ที่อายุ 9 วันเพื่อประเมิน การตาย และระบุตำแหน่งที่จะฉีดเชื้อทดสอบบนผิวเปลือกไข่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 IBV ที่ใช้ทดสอบ

เลือกIBV สเตรน ที่ใช้ในการศึกษาการแบ่งกลุ่ม ได้แก่ THA80151 และ THA90151, โดยเตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้น 1.0×10^6 ELD_{50}

3.3 น้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เลือกใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ Virusnip (Novartis Animal Health Inc, Switzerland), Omnicide (Metrex, USA), Virkon S (DuPont, USA) and CID 2000 (CID LINES N.V., Canada) โดยเตรียมความเข้มข้นตามที่บริษัทผู้ผลิต คือ เตรียม Omnicide, Virkon S และ

CID 2000 ที่อัตราส่วน 1:150, 1:200 และ 1:50 ตามลำดับ ขณะที่ Virusnip เตรียมที่อัตราส่วน 1:200 และ 1:400 ตามลำดับ

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพยาฆ่าเชื้อ

3.4.1 ขั้นตอนการทดสอบ เป็นไปตามวิธีของ Suarez และคณะ (2003)

3.4.2 ใช้ไข่ไก่ฟักอายุ 9 วัน โดยใช้จำนวน 6 ฟอง ต่ออัตราส่วนของน้ำยาฆ่าเชื้อ

3.4.3 ผสมเชื้อ IBV และ น้ำยาฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1:1 โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที และ 30 นาที ตามลำดับ

3.4.4 กลุ่มควบคุมบวก ใช้เชื้อ IBV ผสมสารละลาย PBS

3.4.5 กลุ่มควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นผสมน้ำยาฆ่าเชื้อ ตามลำดับ

3.4.6 ฉีดตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร เข้าตำแหน่ง allantoic cavity ของไข่ไก่ฟัก และนำเข้าฟักในตู้ฟักที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส

3.4.7 ส่องไข่ เพื่อบันทึกการตายของคัพภะทุก 2 วัน ตลอดเวลา 7 วัน โดยคัพภะที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง ไม่นำมาใช้คำนวณ

3.5 สถิติที่ใช้ทดสอบ

ใช้ Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U เพื่อประเมินความแตกต่างระหว่างน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิด และIBV แต่ละสเตรน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

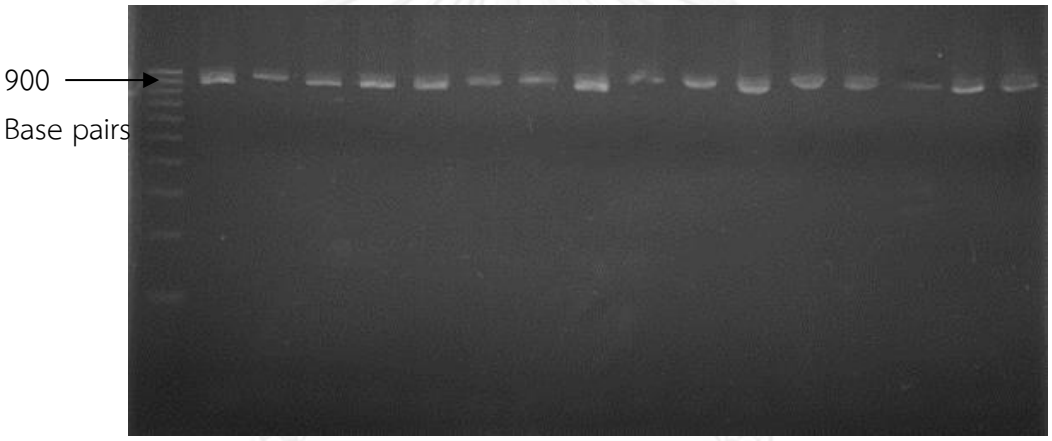
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแบ่งกลุ่ม IBV ด้วยวิธี RT-PCR RFLP

1.1 ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (RT-PCR)

หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการ One-step RT-PCR และ electrophoresis ใน 1.5% agarose gel แล้ว พบว่าทุกตัวอย่าง ให้ผล PCR เป็นบวก และ DNA band ขึ้นที่ประมาณ 900 base pairs (รูปที่ 1) ซึ่งนำไปใช้ในขั้นตอนการตัดสายพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป



รูปที่ 3 ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR ได้แก่ THA20151 THA30151, THA40151,THA50151, THA60151, THA70151, THA80151, THA90151, THA10151, THA110351, THA120351, THA130551, THA140551, Ma5, H120 และ 4/91 ตามลำดับ

1.2 การตัดสายพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP)

จากผล RFLP pattern หลังจากที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3A*I ในการตัดสายพันธุกรรม ผลพบว่า สามารถแบ่งได้ 4 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบ A ประกอบด้วย THA20151, THA40151, THA50151, THA60151 และ THA90151 รูปแบบ B ประกอบด้วย THA30151, THA70151, THA80151, THA10151, THA110351, THA120351, THA130551 และ THA140551 รูปแบบ C ประกอบด้วย Ma5 และ H120 และ รูปแบบ D ประกอบด้วย 4/91 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

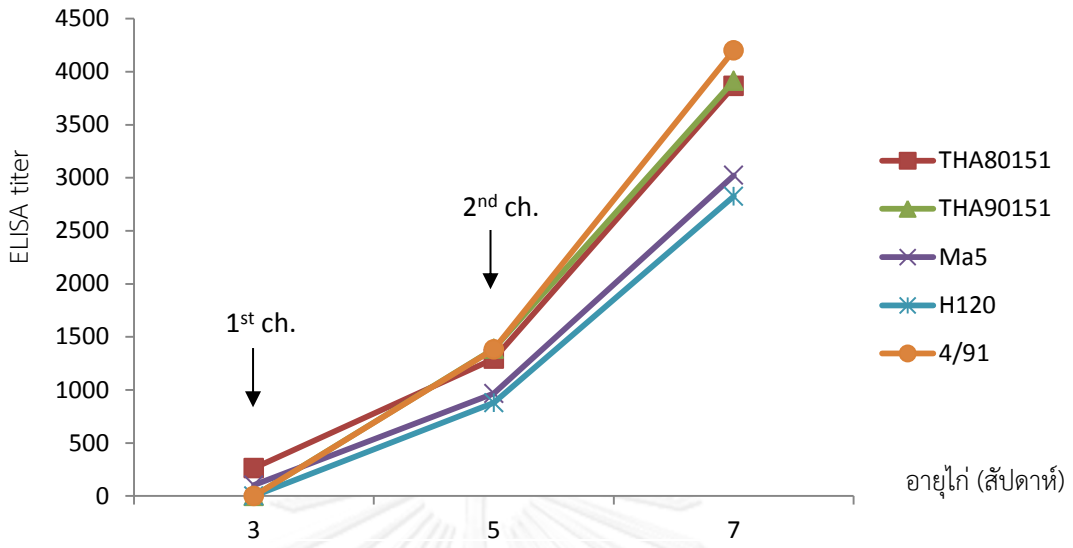
ตารางที่ 3 ผล RFLP pattern ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3A*I

ไวรัส	รูปแบบ	จำนวน DNA band	ขนาด DNA band โดยประมาณ (bp)
THA20151	A	1	900
THA30151	B	2	130, 290 และ 360
THA40151	A	1	900
THA50151	A	1	900
THA60151	A	1	900
THA70151	B	3	130, 290 และ 360
THA80151	B	3	130, 290 และ 360
THA90151	A	1	900
THA10151	B	3	130, 290 และ 360
THA110351	B	3	130, 290 และ 360
THA120351	B	3	130, 290 และ 360
THA130551	B	3	130, 290 และ 360
THA140551	B	3	130, 290 และ 360
Ma5	C	2	400 และ 450
H120	C	2	400 และ 450
4/91	D	2	420 และ 460

4.2 การแบ่งกลุ่มIBV ด้วยการวิธีไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน

2.1 ผลการผลิตแอนตีซีรัม

จากผลการจัดกลุ่ม IBV ด้วยวิธี RT-PCR RFLP จึงได้เลือก IBV สเตรน THA80151 และ THA90151 เป็นตัวแทน จากทั้ง 2 จีโนไทป์ และ วัคซีนทั้ง 3 ชนิด ในการผลิตแอนตีซีรัม เพื่อนำไปใช้ในการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ด้วยวิธี ELISA ที่ได้จากการเก็บซีรัมไก่หลังจากให้เชื้อพิษครั้งที่ 2 2 สัปดาห์ (ไก่อายุ 7 สัปดาห์) เป็นดังนี้ ค่าไตเตอร์ต่อ THA80151 เท่ากับ 3,865 ค่าไตเตอร์ต่อ THA90151 เท่ากับ 3,915 ค่าไตเตอร์ต่อ Ma5 เท่ากับ 3,022 ค่าไตเตอร์ต่อ H120 เท่ากับ 2825 และค่าไตเตอร์ต่อ 4/91 เท่ากับ 4201 ตามลำดับ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์จากการผลิตแอนตีซีรัม

2.2 ผลการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน

ผลการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน หรือการแยกซีโรไทป์ R values ประเมินตามวิธีของ Choi และคณะ ในปี 2009 พบว่า THA80151 และ THA90151 อยู่ต่างซีโรไทป์กัน (R value เท่ากับ 5.2) โดยที่ไวรัสสเตรน THA80151 อยู่ต่างซีโรไทป์จากวัคซีนทั้ง 3 ชนิด คือ Ma5 H120 และ 4/91 (R value เท่ากับ 5.3, 1.5 และ 4.9 ตามลำดับ) ไวรัสสเตรน THA90151 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม major subtype กับวัคซีน Ma5 (R value เท่ากับ 19.24) (ตารางที่ 5)

ขณะที่วัคซีนทั้ง 3 ชนิด ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างของแอนติเจนอยู่บ้าง แต่ต่างจัดให้อยู่ในซีโรไทป์เดียวกัน (R value > 10%) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ค่า neutralization index ที่ได้จากการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน

Anti-Serum	THA80151	THA90151	Ma5	H120	4/91
THA80151	>1024	16	8.1	11.14	34.37
THA90151	64	358.5	41.86	55.37	16
Ma5	55	48	151.45	170.67	95.98
H120	16	4	256	761.24	400
4/91	18.94	42.58	220.3	226.79	256

ตารางที่ 5 ค่า R-value ที่ได้ในการแยกกลุ่มIBV ในการศึกษาครั้งนี้

	THA80151	THA90151	Ma5	H120	4/91
THA80151	100				
THA90151	5.2*	100			
Ma5	5.3*	19.24	100		
H120	1.5*	2.849*	61.56	100	
4/91	4.9*	8.62*	73.84	68.23	100

2.3 ผลการวัดความสอดคล้องกันของวิธีการแบ่งกลุ่ม

จากการวัดความค่าความสอดคล้องระหว่างวิธีการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี RT-PCR RFLP และการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน พบว่าการแบ่งกลุ่มทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน (Kappa = 0.697, P-value < 0.05)

จากการวัดความค่าความสอดคล้องระหว่างวิธีการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี RT-PCR RFLP และการหาลำดับพันธุกรรม พบว่าการแบ่งกลุ่มทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน (Kappa = 1, P-value < 0.001)

จากการวัดความค่าความสอดคล้องระหว่างวิธีการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี ไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน และการหาลำดับพันธุกรรม พบว่าการแบ่งกลุ่มทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน (Kappa = 0.697, Z = 2.171, P-value < 0.05)

จากการวัดความค่าความสอดคล้องระหว่างวิธีการแบ่งกลุ่มทั้ง 3 วิธี พบว่าการแบ่งกลุ่มทั้ง 3 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน (Kappa = 0.789, P-value < 0.05)

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพยาฆ่าเชื้อ

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิด ต่อ THA80151 และ TH90151 ในแต่ละ contact time ที่ต่างกัน และ เปรียบเทียบความทนต่อน้ำยาฆ่าเชื้อของไวรัสทั้ง 2 ต่อน้ำยาฆ่าเชื้อในแต่ละชนิด ใน contact time ที่แตกต่างกัน พบว่าไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความต้านทานต่อน้ำยาฆ่าเชื้อไม่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิด ต่อการฆ่าเชื้อไวรัส THA080151 พบว่ากลุ่ม Virusnip อัตราส่วน 1:200 และ 1:400 และ Omnicide มีจำนวนคัพภะที่มีชีวิตน้อยกว่ากลุ่ม Virkon S (P<0.05)

สำหรับเชื้อไวรัส THA90151 ที่ contact time 5 นาที Virkon S มีจำนวนคัพภะที่ตายน้อยกว่ากลุ่ม Virusnip 1:400

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อไวรัส 2 สายพันธุ์

น้ำยาฆ่าเชื้อ	Contact time	จำนวนคัพภะตาย			
		THA80151	THA90151	ควบคุมลบ	ควบคุมบวก
Virusnip	30 วินาที	1	2	0	6
1:200	1 นาที	0	0	0	6
	5 นาที	0	2	0	6
	30 นาที	0	0	0	6
Virusnip	30 วินาที	2	4	0	6
1: 400	1 นาที	0	3	0	6
	5 นาที	0	4	0	6
	30 นาที	0	0	0	6
Omnicide	30 วินาที	3	3	0	6
	1 นาที	0	1	0	6
	5 นาที	1	3	0	6
	30 นาที	0	2	0	6
CID 2000	30 วินาที	2	2	0	6
	1 นาที	2	1	0	6
	5 นาที	1	2	0	6
	30 นาที	1	3	0	6
Virkon S	30 วินาที	2	1	0	6
	1 นาที	4	1	0	6
	5 นาที	1	0	0	6
	30 นาที	2	0	0	6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

สรุปการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

เชื้อ IBV ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ทั้ง 13 สเตรน เป็นเชื้อที่แยกได้จากฟาร์มไก่ ซึ่งพบว่ามีการระบาดในประเทศไทย ก่อให้เกิดปัญหาสูญเสียทั้งในไก่ไข่ และไก่เนื้อ และผลผลิตไม่ได้ตามเป้าหมาย ในขณะที่ฟาร์มที่พบปัญหาการระบาด มีประวัติการใช้วัคซีนอยู่ เช่น Ma5, H120, 4/91 เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกลุ่ม IBV ที่พบในประเทศไทย เปรียบเทียบกับไวรัสวัคซีน พบว่าเชื้อ IBV ที่พบในประเทศไทย จากการทำ RT-PCR RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3A*I สามารถแยกได้เป็น 2 จีโนไทป์ และ จากการทำไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชันสามารถแยกได้เป็น 2 ซีโรไทป์ และโดยเชื้อ IBV ดังกล่าว ถูกจัดอยู่ต่างจีโนไทป์กับวัคซีนทั้ง 3 ชนิด และซีโรไทป์กับวัคซีนทั้ง 3 ชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า วัคซีนมีความแตกต่างกับไวรัสในท้องที่ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของวัคซีนได้ไม่ดีเพียงพอ และจากการศึกษาของ Pohuang และคณะ (2009) โดยแยกจีโนไทป์เชื้อ IBV ที่พบในประเทศไทยด้วยวิธีหาลำดับพันธุกรรม พบว่ามี 3 จีโนไทป์ ได้แก่ Thailand I, Thailand II และ Massachusetts สำหรับ Thailand I นั้นพบว่ามีความต่างของพันธุกรรมจากสายพันธุ์จากวัคซีน และสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศอื่นๆ สายพันธุ์ Thailand II มีสายพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกับ IBV สายพันธุ์ก่อโรครุนแรงที่ไต (IBV Qx strain) ที่พบในประเทศจีน ซึ่งในประเทศจีนเอง มีรายงาน การระบาดของโรคนี้ และวัคซีนมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่มีการระบาดเช่นกัน และ Massachusetts เป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับวัคซีนที่มีใช้อยู่ในประเทศ เช่น Ma5 และ H120 เป็นต้น

ในกรณีที่เชื้อที่พบในพื้นที่คือสายพันธุ์ Massachusetts นั้น ไก่ที่ได้รับวัคซีนที่มีใช้อยู่ ได้แก่ Ma5 และ H120 สามารถที่จะให้ผลการป้องกันโรคได้ ถ้าการทำวัคซีนมีประสิทธิภาพเพียงพอ แต่ในกรณีที่เชื้อที่มีการระบาดในพื้นที่ เป็นสายพันธุ์ จีโนไทป์ Thailand I หรือ Thailand II มีคำถามถึงประสิทภาพของวัคซีนที่มีใช้อยู่สามารถป้องกันโรคได้หรือไม่

ปัญหาของวัคซีนมีสายพันธุ์ที่แตกต่างจากสายพันธุ์ที่ระบาด ได้มีการศึกษาของ Cook และคณะ (1999) ในการทดลองใช้วัคซีน IBV 2 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน คือให้วัคซีนที่อายุ 1 วันด้วยวัคซีนเชื้อเป็น Ma5 และกระตุ้นอีกครั้งด้วยวัคซีนเชื้อเป็น 4/91 ที่อายุ 2 สัปดาห์ และป้อนเชื้อพิษทับ ที่อายุ 5 สัปดาห์ ด้วยIBV ที่แยกได้จากหลายพื้นที่ทั่วโลก ผลพบว่า สามารถให้ผลการป้องกันโรคได้ดีกว่าการใช้วัคซีนจากสายพันธุ์เดียวเท่านั้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Pohuang และคณะ (2012)

ที่ศึกษาในไก่เนื้อโดยทดลองใช้วัคซีนโปรแกรมที่แตกต่างกัน ทั้งสายพันธุ์เดียวที่มีการระบาดในพื้นที่ (QX-like) และสายพันธุ์ที่ต่างจากที่มีการระบาดในพื้นที่ (Massachusetts และ Connecticut) โดยพบว่าการใช้วัคซีน 2 ครั้ง ด้วยวัคซีน 2 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน และแตกต่างจากสายพันธุ์ที่ระบาด ให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไม่แตกต่างจากการให้วัคซีน 2 ครั้ง ด้วยวัคซีน สายพันธุ์ตรงกับที่มีการระบาด การศึกษาของ Sasipreeeyajan และคณะ (2012) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Terregino และคณะ (2008) ทดลองให้วัคซีน Ma5 และ 4/91 แก่ไก่เนื้อ และไก่ไข่ปลอดเชื้อ (SPF) ที่อายุ 1 และ 14 วัน ตามลำดับ พบว่าให้ผลการป้องกันโรค เมื่อให้เชื้อพิษทับด้วยสายพันธุ์ QX ที่แยกได้จากฟาร์มไก่เนื้อและไก่ไข่ที่ระบาดก่อนหน้านี้

การแบ่งกลุ่มIBV โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในครั้งนี้ เลือกใช้เอนไซม์ *Sau3A*I ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะในตำแหน่งลำดับเบส –GATC เมื่อค้นฐานข้อมูลของ GenBank ตำแหน่ง Partial S1 ยีนบริเวณที่ primer ได้ amplified ขึ้น ขนาดประมาณ 900 bp พบว่าตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดได้นั้นแตกต่างกันไป ใน Pattern A (THA20151, THA40151, THA50151, THA60151 และ THA90151) สายพันธุกรรมไม่มีลำดับ –GATC สัมพันธ์กับผลในการศึกษาครั้งนี้ ที่พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถตัดได้ Pattern B (THA30151, THA70151, THA80151, THA10151, THA110351, THA120551, THA130551 และ THA140551) เอนไซม์สามารถตัดได้ 2 ตำแหน่ง คือ ลำดับเบสที่ 286 และ 515 ของสายพันธุกรรม Pattern C (Ma5 และ H120) เอนไซม์สามารถตัดได้ 2 ตำแหน่ง คือ ลำดับเบสที่ 406 และ 860 Pattern C (4/91) เอนไซม์ตัดสายพันธุกรรมตำแหน่งลำดับเบสที่ 417 ตามลำดับ

ข้อดีขอวิธีการนี้ คือ สามารถวินิจฉัยแยกแยะได้ค่อนข้างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหาลำดับพันธุกรรม หรือ ไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ ถ้าลำดับเบสในสายพันธุกรรมของเชื้อ IBV มีการกลายพันธุ์ไป ในตำแหน่งอื่น ที่ไม่ใช่ตำแหน่ง –GATC วิธีการ RLFP จะไม่สามารถแยกความแตกต่าง ของไวรัสสายพันธุ์เดิม และไวรัสกลายพันธุ์ได้ และจะให้ RLPF pattern ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น เพื่อให้เกิดความจำเพาะมากขึ้น จึงมีการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดมากขึ้น เพื่อให้เห็นความแตกต่างของ pattern มากขึ้น เช่น Kwon และคณะ (1993) ใช้วิธี RT-PCR เพิ่มจำนวนตำแหน่ง S1 ขนาด 1,720 bp ร่วมกับ RFLP ในการแบ่งกลุ่มIBV โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *Hae*III, *Xcm*I และ *BstY*I โดยสามารถใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III แยกIBV ได้แก่ DPI, SE 17, Md 27 และ Iowa 97 จากนั้นใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xcm*I และ *BstY*I ในการแยกIBV สเตรน Beaudette, Massachusetts 41, Connecticut และ Florida 88 ซึ่งผลการจัดกลุ่มด้วยวิธีการนี้ ให้ผลสอดคล้องกับวิธีการไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน

ด้วยการตรวจวินิจฉัย RT-PCR RFLP นี้ สามารถที่จะใช้เป็นวิธีการวินิจฉัยโรคไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อได้รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายในการวินิจฉัยได้ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหาลำดับ

พันธุกรรม ซึ่งเป็นวิธีที่ค่าใช้จ่ายสูง ซึ่งจึงไม่ถูกเลือกใช้เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยมากนักในห้องปฏิบัติการทั่วไป และเกษตรกร หรือฟาร์มไก่ไข่ ไม่สามารถแบกรับค่าใช้จ่ายที่สูงได้ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ สามารถพัฒนาวิธีการวินิจฉัยที่รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ สำหรับตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้

เป็นที่น่าสังเกตว่า ผลการจัดกลุ่มด้วยวิธีนิวทรัลไลซ์เซชัน พบว่าวัคซีน 4/91 อยู่ซีโรไทป์เดียวกับวัคซีน Ma5 และ H120 ซึ่ง แตกต่างจากที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Li et al., 2012) ในการศึกษาของ Li และคณะ (2012) ได้ศึกษา VN test และแยกซีโรไทป์ โดยใช้การเพาะเลี้ยงหลอดลมของคัพภะไก่ อายุ 20 วัน ผลพบว่าวัคซีน Ma5 และ H120 (ซีโรไทป์ Mass) อยู่ต่างซีโรไทป์กับวัคซีน 4/91 (ซีโรไทป์ 793/B) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ ที่ใช้ไข่ไก่ฟักในการทำ VN test ซึ่งเป็นไข่ไก่ที่ได้จากฟาร์มไก่พันธุ์ ไก่ไข่ ที่เลี้ยงเพื่อการค้า ซึ่งฟาร์มมีการใช้วัคซีนไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่ออยู่ เป็นไปได้ว่า มีการถ่ายทอดภูมิคุ้มกันจากแม่สู่ฟองไข่ได้ เปรียบเทียบกับการศึกษาของ Ducatez และคณะ (2009) ซึ่งศึกษา VN test โดยใช้ไข่ไก่ปลอดเชื้อ (SPF) ซึ่งให้ผลการแยกซีโรไทป์ สอดคล้องกับผลของ Li และคณะ (2012) คือ วัคซีน Ma5 และ H120 (ซีโรไทป์ Mass) อยู่ต่างซีโรไทป์กับวัคซีน 4/91 (ซีโรไทป์ 793/B)

จากผลไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน พบว่าไวรัสสเตรน THA90151 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับวัคซีน Ma5 (R value เท่ากับ 19.24) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างของลำดับพันธุกรรมอยู่ค่อนข้างมาก แต่อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้วัคซีน Ma5 มีแนวโน้มที่จะให้ผลการป้องกันโรคได้ดีกว่าวัคซีนที่ผลิตจากไวรัสจากสายพันธุ์อื่น

ถึงแม้ในประเทศไทย จะพบการระบาดของIBV สายพันธุ์ใหม่ และมีแนวโน้มว่า วัคซีนที่มีใช้อยู่ อาจให้ประสิทธิภาพการป้องกันโรคไม่ดีมากนัก แต่จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่างๆที่มีใช้อยู่ในฟาร์ม พบว่ายาฆ่าเชื้อสามารถที่จะทำลายไวรัสได้ น้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วยสาร oxidizing agent (Virusnip, Virkon S และ CID 2000) สารปลดปล่อยคลอรีน (Virusnip) สารลดแรงตึงผิว (Virkon S) และ อนุพันธุ์ของ quarternary ammonium compounds (Omnicide) มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ IBV ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น ระบบความปลอดภัยทางชีวภาพภายในฟาร์ม และการให้ความสำคัญของยาฆ่าเชื้อ ยังมีความสำหรับกลยุทธ์การป้องกันเชื้อเข้าสู่ฟาร์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อย่างไรก็ตาม การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อในฟาร์มไก่ มีโอกาสที่ถูกลดประสิทธิภาพลงด้วย การปนเปื้อนของสารอินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน แกลบ เป็นต้น หรือจากตัวไก่เอง เช่น มูลไก่ หรือสารคัดหลั่ง เช่น น้ำมูก เป็นต้น ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้ ได้ศึกษาในไข่ฟัก ซึ่งมี allantoic fluid ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนในความเข้มข้นสูง ซึ่งสามารถลดประสิทธิภาพของน้ำย่าฆ่าเชื้อได้ (Abe et al.,

2007) สัมพันธ์กับผลการทดลองครั้งนี้ ที่พบว่าไวรัสบางส่วนสามารถคงอยู่และทำให้คัพภะตายได้ ดังนั้น ในการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ ต้องคำนึงถึงปัจจัยที่ส่งผลลดประสิทธิภาพของวัคซีนเหล่านี้ลงด้วย

โดยสรุปแล้ว การศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาวิธีทางห้องปฏิบัติการในการวินิจฉัยโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ คือ RT-PCR และ RFLP ให้ รวดเร็ว และต้นทุนต่ำ และผลการวินิจฉัยสอดคล้องกับวิธีหาลำดับพันธุกรรม และไวรัสนิวทรัลไลซ์เซชัน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลา และต้นทุนสูง อีกทั้งผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงว่า เชื้อ IBV ที่มีการระบาดอยู่ในประเทศไทย มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากวัคซีน ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานให้ ปรับกลยุทธ์ในการเลือกวัคซีนที่ใช้ให้มีประสิทธิภาพ รวมถึงการเลือกใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การติดเชื้อ IBV ในไก่ไข่ หรือไก่พันธุ์ ในช่วงอายุน้อย ถ้าไก่กลับมาปกติ อาจพบปัญหาการเกิดปัญหาถุงน้ำในท่อนำไข่ และเมื่อถึงอายุที่สามารถให้ผลผลิตได้ ไก่ที่ติดเชื้อเหล่านี้ จะไม่สามารถให้ผลผลิตได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้น สำหรับการศึกษาในครั้งต่อไป ควรมุ่งเน้นศึกษาถึงวิธีการตรวจวินิจฉัยด้านซีรัมวิทยา ที่สามารถวินิจฉัยได้ในช่วงต้นของการติดเชื้อ เพื่อป้องกันปัญหาการสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Abe M, Kaneko K, Ueda A, Otsuka H, Shiosaki K, Nozaki C and Goto S. 2007. Effects of several virucidal agents on inactivation of influenza, newcastle disease, and avian infectious bronchitis viruses in the allantoic fluid of chicken eggs. Jpn J Infect Dis. 60(6):342-6

Archetti I and Horsfall FL Jr. 1950. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. J Exp Med. 92(5):441-462.

Bayry J, Goudar MS, Nighot PK, Kshirsagar SG, Ladman BS, Gelb J, Ghalsasi GR and Kolte GN. 2005. Emergence of a nephropathogenic avian infectious bronchitis virus with a novel genotype in India**.** J Clin Microbiol. 43(2): 916–918.

Cavanagh D. 1983. Coronavirus IBV: Structural characterization of the Spike protein. J gen Virol. 64, 2577-2583.

Cavanagh D, Davis PJ, Cook JK, Li D, Kant A and Koch G. 1992. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 21(1):33-43.

Cavanagh D, Davis PJ. and Mockett AP. 1988. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. Virus Res. 11(2):141-150.

Cavanagh D and Naqi SA. 2003. Infectious Bronchitis. 11th ed. In: Disease of poultry. Iowa state press, Iowa state. 101-119.

Chaiyasittiyuthaparn P. 1957. Unknown infectious agent isolated form chickens in Thailand similar to infectious bronchitis. The 9th Pacific science congress, Bangkok, Thailand. Cited in Chindavanig, P. 1962. Studies on the attenuation of infectious bronchitis virus. J Thai Vet. Med Assoc. 12(4): 1-7

Choi KS, Lee EK, Jeon WJ, Park MJ, Kim JW and Kwon JH. 2009. Pathogenicity and antigenicity of a new variant of Korean nephropathogenic infectious bronchitis virus. J Vet Sci. 10(4):357-359.

Cook JK. 1984. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. Avian Pathol. 13(4):733-741.

Cook JK, Brown AJ and Bracewell CD. 1987. Comparison of the haemagglutination inhibition test and the serum neutralisation test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains. Avian Pathol. 16(3):505-511.

Cook JK, Jackwood M and Jones RC. 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. Avian Pathol. 41(3):239-50.

Cook JK, Sarah JO, Martyn AW and Michael BH. 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. Avian Pathol. 28(5):477-485.

Cowen BS and Hitchner SB. 1975. Serotyping of avian infectious bronchitis viruses by the virus-neutralization test. Avian Dis. 19(3):583-595.

Csermelyi M, Thijssen R, Orthel F, Burger AG, Kouwenhoven B and Lutticken D. 1988. Serological classification of recent infectious bronchitis virus isolates by the neutralization of immunofluorescent FOCI. Avian Pathol. 17(1):139-148.

Cunningham CH. 1973. Immunologic methods in avian research: neutralization test. Avian Dis. 17(1):227-235.

Darbyshire JH, Rowell JG, Cook JK and Peters RW. 1979. Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures. Arch Virol. 61(3):227-238.

De Wit JJ. 2000. Detection of infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 29(2):71-93.

Ducatez MF, Martin AM, Owoade AA, Olatoye IO, Alkali BR, Maikano I, Snoeck CJ, Sausy A, Cordioli P and Muller CP. 2009. Characterization of a new genotype and serotype of infectious bronchitis virus in Western Africa. J Gen Virol. 90(11):2679-85.

Gelb JJr, Perkins BE, Rosenberger JK and Allen PH. 1981. Serologic and cross-protection studies with several infectious bronchitis virus isolates from Delmarva-reared broiler chickens. Avian Dis. 25(3):655-666.

Gelb JJr, Weisman Y, Ladman BS and Meir R. 2005. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). Avian Pathol. 34(3):194-203.

Grgic H, Hunter DB, Hunton P and Nagy E. 2009. Vaccine efficacy against Ontario isolates of infectious bronchitis virus. Can J Vet Res. 73(3):212-216.

Hopkins SR. 1974. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque-purified isolants. Avian Dis. 18(2):231-239.

Jang JH, Sung HW, Song CS and Kwon HM. 2007. Sequence analysis of the S1 glycoprotein gene of infectious bronchitis viruses: identification of a novel phylogenetic group in Korea. J Vet Sci. 8(4):401-407.

Johnson RB and Marquardt WW. 1975. The neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measured by the constant-virus variable-serum method in chicken tracheal cultures. Avian Dis. 19(1):82-90.

Kwon HM, Jackwood MW and Gelb JJr. 1993. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Dis. 37(1):194-202.

Ladman BS, Loupos AB and Gelb JJr. 2006. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. Avian Pathology. 35(2):127-133.

Lashgari MS and Newman JA. 1984. Serological comparison and antigenic relationships of seven serotypes of infectious bronchitis virus using the hemagglutination-inhibition test. Avian Dis. 28(2):435-443.

Lee CW, Hilt DA and Jackwood MW. 2003. Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. J Vet Diagn Invest. 15(4):344-348.

Lee EK, Jeon WJ, Lee YJ, Jeong OM, Choi JG, Kwon JH and Choi KS. 2008. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolates in Korea between 2003 and 2006. Avian Dis. 52(2):332-337.

Li M, Wang XY, Wei P, Chen QY, Wei ZJ and Mo ML. 2012. Serotype and genotype diversity of infectious bronchitis viruses isolated during 1985-2008 in Guangxi, China. Arch. Virol. 157(3):467-74.

Lin KY, Wang HC and Wang CH. 2005. Protective effect of vaccination in chicks with local infectious bronchitis viruses against field virus challenge. J Microbiol Immunol Infect. 38(1):25-30.

Liu S and Kong X. 2004. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. Avian Pathol. 33(3):321-327.

Liu S, Chen J, Han Z, Zhang Q, Shao Y, Kong X and Tong G. 2006. Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China. Avian Pathol. 35(5):394-399.

Liu S, Zhang X, Wang Y, Li C, Liu Q, Han Z, Zhang Q, Kong X and Tong G. 2009. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/97I strain of infectious bronchitis coronavirus. Vet J. 179(1):130-136.

Lohr JE. 1976. Serologic differences between strains of infectious bronchitis virus from New Zealand, Australia, and the United States. Avian Dis. 20(3):478-482.

Mase M, Inoue T, Yamaguchi S and Imada T. 2009. Genetic diversity of avian infectious bronchitis viruses in Japan based on analysis of s2 glycoprotein gene. J Vet Med Sci. 71(3):287-291.

Pohuang T, Chansiripornchai N, Tawatsin A and Sasipreeyajan J. 2009. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. J Vet Sci. 10(3):219-223.

Rimondi A, Craig MI, Vagnozzi A, Konig G, Delamer M and Pereda A. 2009. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). Avian Pathol. 38(2):149-153.

Sasipreeyajan J, Pohuang T and Sirikobkul N. 2012. Efficacy of different vaccination programs against Thai QX-like infectious bronchitis virus. Thai J Med. 42(1): 73-79

Shimazaki Y, Harada M, Horiuchi T, Yoshida K, Tanimura C, Nakamura S, Mase M and Suzuki S. 2009. Serological studies of infectious bronchitis vaccines against Japanese field isolates of homologous and heterologous genotypes. J Vet Med Sci. 71(7):891-896.

Terregino C, Toffan A, Beato MS, Nardi DR, Vascellari M, Meini A, Ortali G, Mancin M and Capua I. **2008.** Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. Avian Pathol. 37(5):487-93.

Thayer SG and Beard CW. 1998. Serologic procedure. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogen. The American association of avian pathogists, Pensylvania. 169-174.

Wadey CN and Faragher JT. 1981. Australian infectious bronchitis viruses: plaque formation and assay methods. Res Vet Sci. 30(1):66-69.

Wang CH and Huang YC. 2000. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. Arch Virol. 145(2):291-300.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

```
          5         15         25         35         45         55
1   ~CCTGATGGT TGGCATTTAC ATGGGGGTGC GTATGCGGTT GTTAATATTT CTAGTGAATC
2   ~CCTGATGGT TGGCATTTAC ATGGGGGTGC GTATGCGGTT GTTAATATTT CTAGTGAATC
3   ~GGTCAAGGT TGGCATCTAC ATGGGGGTGC TTATGCAGTA GATAAGGTTT TTAATGGAAC
4   ~CCTACTGGT TGGCATTTAC AAGGAGGTGC TTATGCAGTA GTTAATAGTT CTGTATATTA
5   ~CCTCCAAAT GGATGGCATT TGCAAGGGGG CGCTTATGCA GTAGTGAATT CTACTAATCA
6   ~CCTACTGGT TGGCATTTAC AAGGAGGTGC TTATGCAGTA GTTAATAGTT CTGTATATTA
7   ~CCTACTGGT TGGCATTTAC AAGGAGGTGC TTATGCAGTA GTTAATAGTT CTGTATATTA
8   ~CCTACTGGT TGGCATTTAC AAGGAGGTGC TTATGCAGTA GTTAATAGTT CTGTATATTA
9   ~CCTCCAAAT GGATGGCATT TGCAAGGGGG CGCTTATGCA GTAGTGAATT CTACTAATCA
10  ~CCTCCAAAT GGATGGCATT TGCAAGGGGG CGCTTATGCA GTAGTGAATT CTACTAATCA
11  ~CCTACTGGT TGGCATTTAC AAGGAGGTGC TTATGCAGTA GTTAATAGTT CTGTATATTA
12  ~CCTCCAAAT GGATGGCATT TGCAAGGGGG CGCTTATGCA GTAGTGAATT CTACTAATCA
13  ~CCTCCAAAT GGATGGCATT TGCAAGGGGG CGCTTATGCA GTAGTGAATT CTACTAATCA
14  ~CCTCCAAAT GGATGGCATT TGCAAGGGGG CGCTTATGCA GTAGTGAATT CTACTAATCA
15  ~CCTCCAAAT GGATGGCATT TGCAAGGGGG CGCTTATGCA GTAGTGAATT CTACTAATCA
16  ~CCTCCAAAT GGATGGCATT TGCAAGGGGG CGCTTATGCA GTAGTGAATT CTACTAATCA

          65         75         85         95        105        115
1    TAATAATGCA GGCTCTTCAT CTGGGTGTAC TGTTGGTATT ATTCATGGTG GTCGTGTTGT
2    TAATAATGCA GGCTCTTCAT CTGGGTGTAC TGTTGGTATT ATTCATGGTG GTCGTGTTGT
3    CAACAATGCA GTCAGTGTAT CTGATTGCAC TGCTGGTACT TTTTATGAAA GCTATAATAT
4    TAATAACGCA GGTGGTTCCT CTGAATGCAC TGCTGGTATT ATTAAGGATG TTTATAATCT
5   TACTAATAAT GCCGGTTCTG CACGTGAGTG CACTGTTGGT GTTATTAAGG ACGTCTATAA
6   TAATAACGCA GGTGGTTCCT CTGAATGCAC TGCTGGTATT ATTAAGGATG TTTATAATCT
7    TAATAACGCA GGTGGTTCCT CTGAATGCAC TGCTGGTATT ATTAAGGATG TTTATAATCT
8    TAATAACGCA GGTGGTTCCT CTGAATGCAC TGCTGGTATT ATTAAGGATG TTTATAATCT
9   TACTAATAAT GCCGGTTCTG CACGTGAGTG CACTGTTGGT GTTATTAAGG ACGTCTATAA
10  TACTAATAAT GCCGGTTCTG CACGTGAGTG CACTGTTGGT GTTATTAAGG ACGTCTATAA
11   TAATAACGCA GGTGGTTCCT CTGAATGCAC TGCTGGTATT ATTAAGGATG TTTATAATCT
12  TACTAATAAT GCCGGTTCTG CACGTGAGTG CACTGTTGGT GTTATTAAGG ACGTCTATAA
13  TACTAATAAT GCCGGTTCTG CACGTGAGTG CACTGTTGGT GTTATTAAGG ACGTCTATAA
14  TACTAATAAT GCCGGTTCTG CACGTGAGTG CACTGTTGGT GTTATTAAGG ACGTCTATAA
15  TACTAATAAT GCCGGTTCTG CACGTGAGTG CACTGTTGGT GTTATTAAGG ACGTCTATAA
16  TACTAATAAT GCCGGTTCTG CACGTGAGTG CACTGTTGGT GTTATTAAGG ACGTCTATAA

          125        135        145        155        165        175
1    TAATGCTTCT TCTATAGCTA TGACGGCACC GTCATCAGGT ATGGCTTGGT CTAGCAGTCA
2    TAATGCTTCT TCTATAGCTA TGACGGCACC GTCATCAGGT ATGGCTTGGT CTAGCAGTCA
3    TTCTGCTGCT TCTGTAGCCA TGACAGTACC ACCTGCTGGT ATGTCTTGGT CAGTTGCACA
4    TAGCGCAGCT GCTATATCTA TGACAGCACC ACCTACAGGT ATGTCATGGT CTGCTTCACA
```

5 TCAAAGTGCG GCTTCCATAG CTATGACTGC ACCTCTTCAG GGTATGGCTT GGTCTAAGTC
6 TAGCGCAGCT GCTATATCTA TGACAGCACC ACCTACAGGT ATGTCATGGT CTGTTTCACA
7 TAGCGCAGCT GCTATATCTA TGACAGCACC ACCTACAGGT ATGTCATGGT CTGCTTCACA
8 TAGCGCAGCT GCTATATCTA TGACAGCACC ACCTATAGGT ATGTCATGGT CTGCTTCACA
9 TCAAAGTGCG GCTTCCATAG CTATGACTGC ACCTCTTCAG GGTATGGCTT GGTCTAAGTC
10 TCAAAGTGCG GCTTCCATAG CTATGACTGC ACCTCTTCAG GGTATGGCTT GGTCTAGGTC
11 TAGCGCAGCT GCTATATCTA TGACAGCACC ACCTATAGGT ATGTCATGGT CTGCTTCACA
12 TCAAAGTGCG GCTTCCATAG CTATGACTGC ACCTCTTCAG GGTATGGCTT GGTCTAAGTC
13 TCAAAGTGCG GCTTCCATAG CTATGACTGC ACCTCTTCAG GGTATGGCTT GGTCTAAGTC
14 TCAAAGTGCG GCTTCCATAG CTATGACTGC ACCTCTTCAG GGTATGGCTT GGTCTAAGTC
15 TCAAAGTGCG GCTTCCATAG CTATGACTGC ACCTCTTCAG GGTATGGCTT GGTCTAAGTC
16 TCAAAGTGCG GCTTCCATAG CTATGACTGC ACCTCTTCAG GGTATGGCTT GGTCTAAGTC

185 195 205 215 225 235
1 GTTTTGTACT GCATACTGTA ACTTTTCAGA TACTACAGTG TTTGTTACAC ATTGTTATAA
2 GTTTTGTACT GCATACTGTA ACTTTTCAGA TACTACAGTG TTTGTTACAC ATTGTTACAA
3 GTTTTGTACA GCTCATTGTA ACTTCTCAGA CTTTACAGTG TTTGTTACGC ATTGTTTTAA
4 ATTTTGTACA GCACACTGTA ACTTTTCTGA TTTTACAGTG TTTGTTACAC ATTGTTTTAA
5 ACAATTTTGT AGTGCACACT GTAACTTTTC TGAAATTACA GTTTTTGTCA CACATTGTTA
6 ATTTTGTACA GCACACTGTA ACTTTTCTGA TTTTACAGTG TTTGTTACAC ATTGTTTTAA
7 ATTTTGTACA GCACACTGTA ACTTTTCTGA TTTTACAGTG TTTGTTACAC ATTGTTTTAA
8 ATTTTGTACA GCACACTGTA ACTTTTCTGA TTTTACAGTG TTTGTTACAC ATTGTTTTAA
9 ACAATTTTGT AGTGCACACT GTAACTTTTC TGAAATTACA GTTTTTGTCA CACATTGTTA
10 ACAATTTTGT AGTGCACACT GTAACTTTTC TGAAATTACA GTTTTTGTCA CACATTGTTA
11 ATTTTGTACA GCACACTGTA ACTTTTCTGA TTTTACAGTG TTTGTTACAC ATTGTTTTAA
12 ACAATTTTGT AGTGCACACT GTAACTTTTC TGAAATTACA GTTTTTGTCA CACATTGTTA
13 ACAATTTTGT AGTGCACACT GTAACTTTTC TGAAATTACA GTTTTTGTCA CACATTGTTA
14 ACAATTTTGT AGTGCACACT GTAACTTTTC TGAAATTACA GTTTTTGTCA CACATTGTTA
15 ACAATTTTGT AGTGCACACT GTAACTTTTC TGAAATTACA GTTTTTGTCA CACATTGTTA
16 ACAATTTTGT AGTGCACACT GTAACTTTTC TGAAATTACA GTTTTTGTCA CACATTGTTA

245 255 265 275 285 295
1 ACATGGTGGG TGTCCTATAA CTGGCATGCT TCAACAGCAT TCTATACGTG TTTCTGCTAT
2 ACATGTTGGG TGTCCTATAA CTGGCATGCT TCAACAGCAT TCTATACGTG TTTCTGCTAT
3 AAGTCAACAA GGTAGTTGTC CATTGACAGG TATGATTCCT CAGAATCATA TTCGTATTTC
4 AAGTGGTCAT GGACATTGTC CTTTAACAGG TCTAATACCA AAGAATTACA TTCGCATCTC
5 TAGTAGTGGT ACAGGGTCTT GTCCTATAAC AGGCACGATT GCACGT*GATC ATATTCGTAT
6 AAGTGGTCAT GGACATTGTC CTTTAACAGG TCTAATACCA AAGAATTACA TTCGCATCTC
7 AAGTGGTCAT GGACATTGTC CTTTAACAGG TCTAATACCA AGGAATTACA TTCGCATCTC
8 AAGTGGTCAT GGACATTGTC CTTTAACAGG TCTAATACCA AAGAATTACA TTCGCATCTC
9 TAGTAGTGGT ACAGGGTCTT GTCCTATAAC AGGCACGATT GCACGT*GATC ATATTCGTAT

10 TAGTAGTGAT ACAGGGTCTT GTCCTATAAC AGGCACGATT GCACGT*GATC ATATTCGTAT
11 AAGTGGTCAT GGACATTGTC CTTTAACAGG TCTAATACCA AAGAATTACA TTCGCATCTC
12 TAGTAGTGGT ACAGGGTCTT GTCCTATAAC AGGCACGATT GCACGT*GATC ATATTCGTAT
13 TAGTAGTGGT ACAGGGTCTT GTCCTATAAC AGGCACGATT GCACGT*GATC ATATTCGTAT
14 TAGTAGTGGT ACAGGGTCTT GTCCTATAAC AGGCACGATT GCACGT*GATC ATATTCGTAT
15 TAGTAGTGGT ACAGGGTCTT GTCCTATAAC AGGCACGATT GCACGT*GATC ATATTCGTAT
16 TAGTAGTGGT ACAGGGTCTT GTCCTATAAC AGGCACGATT GCACGT*GATC ATATTCGTAT

305 315 325 335 345 355
1 GAAAAATGGC CAGCTTTTCT ATAATTTAAC AGTTAGTGTA GCTAAGTACC CTACTTTTAA
2 GAAAAATGGC CAGCTTTTTT ATAATTTAAC AGTTAGTGTA GCTAAGTACC CTACTTTTAA
3 TGCTATGAGA TCTGGATTTT TGTTTTATAA TTTAACAGTT AGCGTATCTA AATACCCTAA
4 TGCTATGAGA AATGGTCTTC TTTTTTATAA TTTAACAGTT AGTGTATCTA AATACCCTAA
5 TTCTGCAATG AAAAATGGTT CTTTATTTTA TAATTTAACA GTTAGCGTAT CTAAATACCC
6 TGCTATGAGA AATGGTCTTC TTTTTTATAA TTTAACAGTT AGTGTATCTA AATACCCTAA
7 TGCTATGAGA AATGGTCTTC TTTTTTATAA TTTAACAGTT AGTGTATCTA AATACCCTAA
8 TGCTATGAGA AATGGTCTTC TTTTTTATAA TTTAACAGTT AGTGTATCTA AATACCCTAA
9 TTCTGCAATG AAAAATGGTT CTTTATTTTA TAATTTAACA GTTAGCGTAT CTAAATACCC
10 TTCTGCAATG AAAAATGGTT CTTTATTTTA TAATTTAACA GTTAGCGTAT CTAAATACCC
11 TGCTATGAGA AATGGTCTTC TTTTTTATAA TTTAACAGTT AGTGTATCTA AATACCCTAA
12 TTCTGCAATG AAAAATGGTT CTTTATTTTA TAATTTAACA GTTAGCGTAT CTAAATACCC
13 TTCTGCAATG AAAAATGGTT CTTTATTTTA TAATTTAACA GTTAGCGTAT CTAAATACCC
14 TTCTGCAATG AAAAATGGTT CTTTATTTTA TAATTTAACA GTTAGCGTAT CTAAATACCC
15 TTCTGCAATG AAAAATGGTT CTTTATTTTA TAATTTAACA GTTAGCGTAT CTAAATACCC
16 TTCTGCAATG AAAAATGGTT CTTTATTTTA TAATTTAACA GTTAGCGTAT CTAAATACCC

365 375 385 395 405 415
1 ATCATTTCAG TGTGTTAATA ATTTAACATC CGTATATTTA AATGGT*GATC TTGTTTACAC
2 ATCATTTCAG TGTGTTAATA ATTTAACATC CGTATATTTA AATGGT*GATC TTGTTTACAC
3 ATTTAAATCG CTTCAATGTG TTGGCAATTC TACATCTGTC TATTTAAATG GT*GATCTTGT
4 TTTTAAATCT CTTCAATGTG TTAATAATGC CACATCTGTG TATTTAAATG GTGACCTTGT
5 TAATTTTAAG TCTTTTCAAT GTGTTAACAA CTTCACATCT GTTTATTTAA ATGGT*GATCT
6 TTTTAAATCT CTTCAATGTG TTAATAATGC CACATCTGTG TATTTAAATG GTGACCTTGT
7 TTTTAAATCT CTTCAATGTG TTAATAATGC CACATCTGTG TATTTAAATG GTGACCTTGT
8 TTTTAAATCT CTTCAATGTG TTAATAATGC CACATCTGTG TATTTAAATG GTGACCTTGT
9 TAATTTTAAG TCTTTTCAAT GTGTTAACAA CTTCACATCT GTTTATTTAA ATGGT*GATCT
10 TAATTTTAAG TCTTTTCAAT GTGTTAACAA CTTCACATCT GTTTATTTAA ATGGT*GATCT
11 TTTTAAATCT CTTCAATGTG TTAATAATGC CACATCTGTG TATTTAAATG GTGACCTTGT
12 TAATTTTAAG TCTTTTCAAT GTGTTAACAA CTTCACATCT GTTTATTTAA ATGGT*GATCT
13 TAATTTTAAG TCTTTTCAAT GTGTTAACAA CTTCACATCT GTTTATTTAA ATGGT*GATCT
14 TAATTTTAAG TCTTTTCAAT GTGTTAACAA CTTCACATCT GTTTATTTAA ATGGT*GATCT

15 TAATTTTAAG TCTTTTCAAT GTGTTAACAA CTTCACATCT GTTTATTTAA ATGGT*GATCT
16 TAATTTTAAG TCTTTTCAAT GTGTTAACAA CTTCACATCT GTTTATTTAA ATGGT*GATCT

425 435 445 455 465 475
1 CTCTAATGCG ACCACAGATG TTACATCTGC AGGTGTTTAT TTTAAAGCTG GTGGACCTAT
2 CTCTAATGAG ACCACAGATG TTACATCTGC AGGTGTTTAT TTTAAAGCTG GTGGACCTAT
3 TTTCACTTCT AATGAAACAA CTCACGTTAC GGGTGCAGGC GTTTATTTTA AAAGTGGTGG
4 TTTCTCTTCT AACATGACTA CTGATGTTAC ATCAGCGGGT GTGTATTTTA AAGCAGGTGG
5 TGTTTTTACT TCCAATAAAA CTACTGATGT TACGTCAGCA GGTGTGTATT TTAAAGCAGG
6 TTTCTCTTCT AACATGACTA CTGATGTTAC ATCAGCGGGT GTGTATTTTA AAGCAGGTGG
7 TTTCTCTTCT AACATGACTA CTGATGTTAC ATCAGCGGGT GTGTATTTTA AAGCAGGTGG
8 TTTCTCTTCT AACATGACTA CTGATGTTAC ATCAGCGGGT GTGTATTTTA AAGCAGGTGG
9 TGTTTTTACT TCCAATAAAA CTACTGATGT TACGTCAGCA GGTGTGTATT TTAAAGCAGG
10 TGTTTTTACT TCCAATAAAA CTACTGATGT TACGTCAGCA GGTGTGTATT TTAAAGCAGG
11 TTTCTCTTCT AACATGACTA CTGATGTTAC ATCAGCGGGT GTGTATTTTA AAGCAGGTGG
12 TGTTTTTACT TCCAATAAAA CTACTGATGT TACGTCAGCA GGTGTGTATT TTAAAGCAGG
13 TGTTTTTACT TCCAATAAAA CTACTGATGT TACGTCAGCA GGTGTGTATT TTAAAGCAGG
14 TGTTTTTACT TCCAATAAAA CTACTGATGT TACGTCAGCA GGTGTGTATT TTAAAGCAGG
15 TGTTTTTACT TCCAATAAAA CTACTGATGT TACGTCAGCA GGTGTGTATT TTAAAGCAGG
16 TGTTTTTACT TCCAATAAAA CTACTGATGT TACGTCAGCA GGTGTGTATT TTAAAGCAGG

485 495 505 515 525 535
1 AACTTATAAA GTTATGAGAG AAGTTAGAGC CCTGGCTTAT TTTGTTAATG GTACTGCACA
2 AACTTATAAA GTTATGAGAG AAGTTAGAGC CCTGGCTTAT TTTGTTAATG GTACTGCACA
3 GCCTGTAACT TATAAAGTTA TGAAAGAAGT TAAAGCCCTA GCCTACTTTA TTAATGGTAC
4 ACCTGTTATT TATAGTGTTA TGAAACAGTT TAAGGTTCTG GCTTACTTTG TTAATGGTAC
5 TGGACCTGTA AATTATAGTA TTATGAAAGA ATTTAAGGTT CTTGCTTATT TTGTCAATGG
6 ACCTGTTATT TATAGTGTTA TGAAACAGTT TAAGGTTCTG GCTTACTTTG TTAATGGTAC
7 ACCTGTTATT TATAGTGTTA TGAAACAGTT TAAGGTTCTG GCTTACTTTG TTAATGGTAC
8 ACCTGTTATT TATAGTGTTA TGAAACAGTT TAAGGTTCTG GCTTACTTTG TTAATGGTAC
9 TGGACCTGTA AATTATAGTA TTATGAAAGA ATTTAAGGTT CTTGCTTATT TTGTCAATGG
10 TGGACCTGTA AATTATAGTA TTATGAAAGA ATTTAAGGTT CTTGCTTATT TTGTCAATGG
11 ACCTGTTATT TATAGTGTTA TGAAACAGTT TAAGGTTCTG GCTTACTTTG TTAATGGTAC
12 TGGACCTGTA AATTATAGTA TTATGAAAGA ATTTAAGGTT CTTGCTTATT TTGTCAATGG
13 TGGACCTGTA AATTATAGTA TTATGAAAGA ATTTAAGGTT CTTGCTTATT TTGTCAATGG
14 TGGACCTGTA AATTATAGTA TTATGAAAGA ATTTAAGGTT CTTGCTTATT TTGTCAATGG
15 TGGACCTGTA AATTATAGTA TTATGAAAGA ATTTAAGGTT CTTGCTTATT TTGTCAATGG
16 TGGACCTGTA AATTATAGTA TTATGAAAGA ATTTAAGGTT CTTGCTTATT TTGTCAATGG

545 555 565 575 585 595
1 AGATGTTATT TTGTGTGATG GGTCACCTAG AGGCTTGTTA GCATGCCAGT ATAATACTGG

2 CGCACAAGAG GTTATTTTAT GTGATAACTC ACCTAGAGGT TTGCTTGCAT GTCAGTATAA
3 TGTGCAAGAT GTAATCCTGT GTGATGACAC ACCTAGAGGT TTGCTAGCCT GTCAATATAA
4 TACAGCACAA GATGTAATTT TGTGTGACAA TTCCCCCAAG GGTTTGCTAG CCTGTCAATA
5 TGTGCAAGAT GTAATCCTGT GTGATGACAC ACCTAGAGGT TTGCTAGCCT GTCAATATAA
6 TGTGCAAGAT GTAATCCTGT GCGATGACAC ACCTAGAGGT TTGCTAGCCT GTCAATATAA
7 TGTGCAAGAT GTAATCCTGT GTGATGACAC ACCTAGAGGT TTGCTAGCCT GTCAATATAA
8 TACAGCACAA GATGTAATTT TGTGTGACAA TTCCCCCAAG GGTTTGCTAG CCTGTCAATA
9 TACAGCACAA GATGTAATTT TGTGTGACAA TTCCCCCAAG GGTTTGCTAG CCTGTCAATA
10 TGTGCAAGAT GTAATCCTGT GTGATGACAC ACCTAGAGGT TTGCTAGCCT GTCAATATAA
11 TACAGCACAA GATGTAATTT TGTGTGACAA TTCCCCCAAG GGTTTGCTAG CCTGTCAATA
12 TACAGCACAA GATGTAATTT TGTGTGACAA TTCCCCCAAG GGTTTGCTAG CCTGTCAATA
13 TACAGCACAA GATGTAATTT TGTGTGACAA TTCCCCCAAG GGTTTGCTAG CCTGTCAATA
14 TACAGCACAA GATGTAATTT TGTGTGACAA TTCCCCCAAG GGTTTGCTAG CCTGTCAATA
15 TACAGCACAA GATGTAATTT TGTGTGACAA TTCCCCCAAG GGTTTGCTAG CCTGTCAATA
16 TACAGCACAA GATGTAATTT TGTGTGACAA TTCCCCCAAG GGTTTGCTAG CCTGTCAATA

605 615 625 635 645 655
1 CAATTTTTCA GATGGCTTTT ATCCTTTTAC TAATAGTAGT TTAGTTAAGC AGAAGTTTAT
2 CAATTTTTCA GATGGCTTTT ATCCTTTTAC TAATAGTAGT TTAGTTAAGC AGAAGTTTAT
3 CACTGGTAAT TTTTCAGATG GATTCTACCC TTTTACTAAT TCTTCTTTAG TTAAGGATAG
4 CACTGGCAAT TTTTCAGATG GCTTTTATCC TTTTACTAAT AGTACTTTAG TTAGGGAAAA
5 TAACACTGGC AATTTTTCAG ATGGCTTTTA TCCTTTTACT AATAGTACTT TAGTTAGGGA
6 CACTGGCAGT TTTTCAGATG GCTTTTATCC TTTTACTAAT AGTACTTTAG TTAGGGAAAA
7 CACTGGCAAT TTTTCAGATG GCTTTTATCC TTTTACTAAT AGTACTTTAG TTAGGGAAAA
8 CACTGGCAAT TTTTCAGATG GCTTTTATCC TTTTACTAAT AGTACTTTAG TTAGGGAAAA
9 TAACACTGGC AATTTTTCAG ATGGCTTTTA TCCTTTTACT AATAGTACTT TAGTTAGGGA
10 TAACACTGGC AATTTTTCAG ATGGCTTTTA TCCTTTTACT AATAGTACTT TAGTTAGGGA
11 CACTGGCAAT TTTTCAGATG GCTTTTATCC TTTTACTAAT AGTACTTTAG TTAGGGAAAA
12 TAACACTGGC AATTTTTCAG ATGGCTTTTA TCCTTTTACT AATAGTACTT TAGTTAGGGA
13 TAACACTGGC AATTTTTCAG ATGGCTTTTA TCCTTTTACT AATAGTACTT TAGTTAGGGA
14 TAACACTGGC AATTTTTCAG ATGGCTTTTA TCCTTTTACT AATAGTACTT TAGTTAGGGA
15 TAACACTGGC AATTTTTCAG ATGGCTTTTA TCCTTTTACT AATAGTACTT TAGTTAGGGA
16 TAACACTGGC AATTTTTCAG ATGGCTTTTA TCCTTTTACT AATAGTACTT TAGTTAGGGA

665 675 685 695 705 715
1 TGTCTATCGT GAAAATAGTG TTAATACTAC TTTTACGTTA CACAATTTCA CTTTTCATAA
2 TGTCTATCGT GAAAATAGTG TTAATACTAC TTTTACGTTA CACAATTTCA CTTTTCATAA
3 GTTTATTGTA TATCGAGAAA GTAGCACTAA CACTACTTTA GAGTTAACTA ATTTCACTTT
4 GTTCATTGTC TATCGCGAAA GTAGTGTTAA TACTACTCTG GCGTTAACTA ATTTCACTTT
5 AAAGTTCATT GTCTATCGCG AAAGTAGTGT TAATACTACT CTGGCGTTAA CTAATTTCAC

6 GTTCATTGTC TATCGCGAAA GTAGTGTTAA TACTACTCTG GCGTTAACTA ATTTCACTTT
7 GTTCATTGTC TATCGCGAAA GTAGTGTTAA TACTACTCTG GCGTTAACTA ATTTCACTTT
8 GTTCATTGTC TATCGCGAAA GTAGTGTTAA TACTACTCTG GCGTTAACTA ATTTCACTTT
9 AAAGTTCATT GTCTATCGCG AAAGTAGTGT TAATACTACT CTGGCGTTAA CTAATTTCAC
10 AAAGTTCATT GTCTATCGCG AAAGTAGTGT TAATACTACT CTGGCGTTAA CTAATTTCAC
11 GTTCATTGTC TATCGCGAAA GTAGTGTTAA TACTACTCTG GCGTTAACTA ATTTCACTTT
12 AAAGTTCATT GTCTATCGCG AAAGTAGTGT TAATACTACT CTGGCGTTAA CTAATTTCAC
13 AAAGTTCATT GTCTATCGCG AAAGTAGTGT TAATACTACT CTGGCGTTAA CTAATTTCAC
14 AAAGTTCATT GTCTATCGCG AAAGTAGTGT TAATACTACT CTGGCGTTAA CTAATTTCAC
15 AAAGTTCATT GTCTATCGCG AAAGTAGTGT TAATACTACT CTGGCGTTAA CTAATTTCAC
16 AAAGTTCATT GTCTATCGCG AAAGTAGTGT TAATACTACT CTGGCGTTAA CTAATTTCAC

725 735 745 755 765 775
1 TGAGACTGGC GCCAACCCAA ATCCTAGTGG TGTCCAGAAT ATTCAAACTT ACCAAACACA
2 TGAGACTGGC GCCAACCCAA ATCCTAGTGG TGTCCAGAAT ATTCAAACTT ACCAAACACA
3 TACTAATGTA AGTAATGCTT CTCCTAATTC AGGTGGCGTT GATACTTTCC AATTATATCA
4 TACTAATGTA AGTAATGCAC AGCCTAATAG TGGTGGTGTT CATACTTTTC ATTTATATCA
5 TTTTACTAAT GTAAGTAATG CACAGCCTAA TAGTGGTGGT GTTAGTACTT TTCATTTATA
6 TACTAATGTA AGTAATGCAC AGCCTAATAG TGGTGGTGTT CATACTTTTC ATTTATATCA
7 TACTAATGTA AGTAATGCAC AGCCTAATAG TGGTGGTGTT CATACTTTTC ATTTATATCA
8 TACTAATGTA AGTAATGCAC AGCCTAATAG TGGTGGTGTT CATACTTTTC ATTTATATCA
9 TTTTACTAAT GTAAGTAATG CACAGCCTAA TAGTGGTGGT GTTAGTACTT TTCATTTATA
10 TTTTACTAAT GTAAGTAATG CACAGCCTAA TAGTGGTGGT GTTAGTACTT TTCATTTATA
11 TACTAATGTA AGTAATGCAC AGCCTAATAG TGGTGGTGTT CATACTTTTC ATTTATATCA
12 TTTTACTAAT GTAAGTAATG CACAGCCTAA TAGTGGTGGT GTTAGTACTT TTCATTTATA
13 TTTTACTAAT GTAAGTAATG CACAGCCTAA TAGTGGTGGT GTTAGTACTT TTCATTTATA
14 TTTTACTAAT GTAAGTAATG CACAGCCTAA TAGTGGTGGT GTTAGTACTT TTCATTTATA
15 TTTTACTAAT GTAAGTAATG CACAGCCTAA TAGTGGTGGT GTTAGTACTT TTCATTTATA
16 TTTTACTAAT GTAAGTAATG CACAGCCTAA TAGTGGTGGT GTTAGTACTT TTCATTTATA

785 795 805 815 825 835
1 AACAGCTCAG AGTGGTTATT ATAATTTTAA TTTTTCCTTT CTGAGTAGTT TTGTTTATAA
2 AACAGCTCAG AGTGGTTATT ATAATTTTAA TTTTTCCTTT CTGAGTAGTT TTGTTTATAA
3 AACACATACT GCTCAGGATG GTTATTATAA TTTTAATTTA TCATTTCTGA GTAGTTTTGT
3 AACGCAAACA GCTCAGAGTG GTTATTATAA TTTTAATTTG TCATTTCTGA GTCAGTTTGT
4 TCAAACGCAA ACAGCTCAGA GTGGTTATTA TAATTTTAAT TTGTCAT~TT CTGAGTCAGT
5 AACGCAAACA GCTCAGAGTG GTTATTATAA TTTTAATTTG TCATTTCTGA GTCAGTTTGT
6 AACGCAAACA GCTCAGAGTG GTTATTATAA TTTTAATTTG TCATTTCTGA GTCAGTTTGT
7 AACGCAAACA GCTCAGAGTG GTTATTATAA TTTTAATTTG TCATTTCTGA GTCAGTTTGT
8 TCAAACGCAA ACAGCTCAGA GTGGTTATTA TAATTTTAAT CTGTCATTTC TGAGTCAGTT
9 TCAAACGCAA ACAGCTCAGA GTGGTTATTA TAATTTTAAT CTGTCATTTC TGAGTCAGTT

```
10      AACGCAAACA GCTCAGAGTG GTTATTATAA TTTTAATTTG TCATTTCTGA GTCAGTTTGT
11      TCAAACGCAA ACAGCTCAGA GTGGTTATTA TAATTTTAAT CTGTCATTTC TGAGTCAGTT
12      TCAAACGCAA ACAGCTCAGA GTGGTTATTA TAATTTTAAT CTGTCATTTC TGAGTCAGTT
13      TCAAACGCAA ACAGCTCAGA GTGGTTATTA TAATTTTAAT CTGTCATTTC TGAGTCAGTT
14      TCAAACGCAA ACAGCTCAGA GTGGTTATTA TAATTTTAAT CTGTCATTTC TGAGTCAGTT
15      TCAAACGCAA ACAGCTCAGA GTGGTTATTA TAATTTTAAT CTGTCATTTC TGAGTCAGTT

            845         855         865         875
1       GGAGTCTAAT TTTATGTATG *GATCTTATCA CCCAAGTTGT AA~.
2       GGAGTCTAAT TTTATGTATG *GATC TTATCA CCCAAGTTGT AA~.
3       GTATAAACCA TCTGATTTTA TGTATGGGTC ATACCACCCA AA~.
4       GTATAAAGCA AGTGATTTTA TGTATGGGTC TTATCACCCT AG~.
5       TTGTGTATGA AGCAAGTGAT TTTATGTATG GGTCTTATCA CCC~
6       GTATAAAGCA AGTGATTTTA TGTATGGGTC TTATCACCCT AG~.
7       GTATAAAGCA AGTGATTTTA TGTATGGGTC TTATCACCCT AG~.
8       GTATAAAGCA AGTGATTTTA TGTATGGGTC TTATCACCCT AG~.
9       TGTGTATGAA GCAAGTGATT TTATGTATGG GTCTTATCAC CC~.
10      TGTGTATGAA GCAAGTGATT TTATGTATGG GTCTTATCAC CC~.
11      GTATAAAGCA AGTGATTTTA TGTATGGGTC TTATCACCCT AG~.
12      TGTGTATGAA GCAAGTGA~T TTTATGTATG GGTCTTATCA CCC~
13      TGTGTATGAA GCAAGTGATT TTATGTATGG GTCTTATCAC CC~.
14      TGTGTATGAA GCAAGTGATT TTATGTATGG GTCTTATCAC CC~.
15      TGTGTATGAA GCAAGTGATT TTATGTATGG GTCTTATCAC CC~.
16      TGTGTATGAA GCAAGTGATT TTATGTATGG GTCTTATCAC CC~.
```

รูปที่ 5 แสดงลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและตำแหน่งที่เอนไซม์ตัด ไวรัสได้แก่ Ma5, H120, 4/91, THA20151 THA30151, THA40151,THA50151, THA60151, THA70151, THA80151, THA90151, THA10151, THA110351, THA120351, THA130551 และ THA140551 และ * แสดงตำแหน่งที่เอนไซม์ *Sua3A*I ตัด

CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายภีมภัส เบ็งทอง เกิดเมื่อวันที่ 14 ตุลาคม 2526 ที่จังหวัดกำแพงเพชร สำเร็จปริญญาตรี วุฒิการศึกษาสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550 จากนั้นเข้าทำงานในตำแหน่งวิชาการสัตวแพทย์ บริษัท แกรมเปี้ยน ฟู้ดส์ สยาม และจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในสาขาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ในปีการศึกษา 2552-2555

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University