การตรวจติดตามและศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง

นางสาว ชื่นสกนธ์ เชาว์ตระกูล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MONITORING AND GENETIC CHARACTERIZATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1) FROM AVIAN SPECIES IN LIVE BIRD AND FOOD MARKETS IN BANGKOK AND VICINITY

Miss Cheunsakon Choatrakul

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health
Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจติดตามและศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง
โดย	นางสาวชื่นสกนธ์ เชาว์ตระกูล
สาขาวิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อลงกร อมรศิลป์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

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

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่นสกนธ์ เชาว์ตระกูล : การตรวจติดตามและศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง. (MONITORING AND GENETIC CHARACTERIZATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1) FROM AVIAN SPECIES IN LIVE BIRD AND FOOD MARKETS IN BANGKOK AND VICINITY) อ. ที่ปรึกษาหลัก : รศ. น.สพ. ดร. อลงกร อมรศิลป์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. สพ.ญ. ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น, 116 หน้า.

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจติดตามและศึกษาลักษณะพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549-กรกฎาคม พ.ศ. 2550 โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 836 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างจากสัตว์ปีกมีชีวิตจำนวน 354 ตัวอย่าง และเนื้อสัตว์ปีกจำนวน 482 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาเพาะแยกเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ด้วยวิธีการฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก และตรวจพิสูจน์ด้วยวิธี hemagglutination test (HA) และ multiplex RT-PCR จากนั้นศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ด้วยวิธีการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน hemagglutinin (H5) และ neuraminidase (N1) วิเคราะห์รหัสพันธุกรรมด้วยวิธี phylogenetic analysis และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งต่างๆ ที่มีความสำคัญบนยีน H5 และ N1 ผลการศึกษาพบอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 คิดเป็น 1.4 เปอร์เซ็นต์ (12/836) โดยเชื้อไข้หวัดนกที่พบเป็นเชื้อไข้หวัดนกชนิดก่อโรครุนแรง (Highly Pathogenic Avian Influenza; HPAI) ซึ่งพบการเรียงตัวของกรดอะมิโนชนิดเบสหลายตัวที่ HA cleavage site และการลดจำนวนของกรดอะมิโน 20 ตัว ที่ NA stalk region รวมถึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อการกลายพันธุ์ การศึกษาทาง phylogenetic analysis ของยีน H5 และ N1 พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่พบจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยและประเทศเวียดนาม (genotype Z) ดังนั้นเชื้อไข้หวัดนกที่พบในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดมีความใกล้เคียงกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2547-2548 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อไข้หวัดนกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสด ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคและลดความเสี่ยงของเชื้อไข้หวัดนกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดจะช่วยควบคุมและป้องกันการติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในคน

ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อนิสิต ชื่นสกนธ์ เชาว์ตระกูล
สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาร่วม .....

4675556031 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEY WORD: Avian influenza A virus / H5N1 / Avian species / Live bird markets / Food markets / Monitoring / Bangkok and vicinity

CHEUNSAKON CHOATRAKUL : MONITORING AND GENETIC CHARACTERIZATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1) FROM AVIAN SPECIES IN LIVE BIRD AND FOOD MARKETS IN BANGKOK AND VICINITY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ALONGKRON AMONSIN, THESIS COADVISOR : ASST. PROF. RUNGTIP CHUANCHUEN, 116 pp.

The aims of this study were to monitor and characterize Avian influenza virus (H5N1) in live bird and food markets in Bangkok and vicinity, Thailand, from August 2006 to July 2007. Eight hundreds and thirty six samples, including 354 live birds and 482 bird meats, w ere collected from the markets. H5N1 viruses were isolated, identified and characterized using embryonated egg inoculation, hemagglutination assay (HA), multiplex RT-PCR, nucleotide sequencing and phylogenetic analysis. The results revealed th at the incidence of avian influenza virus (H5N1) was 1.4% (12/836). The viruses had common genetic characteristics of Highly Pathogenic Avain Influenza (HPAI), with multiple basic amino acids in the HA cleavage site and a 20-amino acid deletion on NA stalk region. No significant point mutations were identified in critical regions of HA and NA genes. Phylogenetic analysis of the HA and NA genes showed that the viruses clustered within the lineage of H5N1 avian isolates from Thailand and Vietnam (genotype Z). Therefore, H5N1 viruses circulating in live birds and bird meats were more genetically related to H5N1 viruses in 2004-2005 in Thailand. In summary, this study presented the evidence of HPAI contamination in live bird and food markets. Increased public awareness of the risks of H5N1 virus associated with live bird and food markets will help prevent and control H5N1 infection in humans.

Department: Veterinary Public Health Student's signature: CHEUNSAKON CHOATRAKUL

Field of study: Veterinary Public Health Advisor's signature: Alongkron Amonsin

Academic year: 2007 Co-advisor's signature: Rungtip Chuanchuen

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อลงกร อมรศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และให้ความช่วยเหลือในด้านการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณคณาอาจารย์ภาคสัตวแพทยสาธารณสุขทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้อันมีค่าด้วยความเมตตาแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช หัวหน้าหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนายสัตว์แพทย์ รชฎ ตันติเลิสเจริญ รองหัวหน้าหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องการใช้ห้องปฏิบัติการความปลอดภัยระดับ 3 ขอขอบคุณ คุณอภิรดี เทียมบุญเลิศ และนิสิตปริญญาเอก ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขที่เอื้ออำนวยในเรื่องเอกสารต่างๆ ให้ดำเนินไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณเพื่อนๆ นิสิตปริญญาโทในภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ที่ให้กำลังใจเป็นอย่างดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่สาว ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมา ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่คอยให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

ลักษณะของเชื้อไข้หวัดนก..... 4

การติดเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์..... 7

ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1..... 8

การศึกษาคุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน HA..... 8

การศึกษาคุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NA..... 11

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงและกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัด..... 13

Antigenic drift..... 13

Antigenic shift..... 14

การศึกษาเชื้อไข้หวัดนกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสด..... 17

วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดนกทางห้องปฏิบัติการ..... 17

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 18

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างในตลาดค้าสัตว์ปีกชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง..... 19

ระยะที่ 2 ตรวจพิสูจน์หาเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1..... 22

ระยะที่ 3 ศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนก H5N1..... 25

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย..... 30

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 34
ข้อมูลตัวอย่างสัตว์ปีกในการศึกษาครั้งนี้..... 34
ข้อมูลตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้..... 35
ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1..... 38
ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนก..... 41
- ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์บนยีน H5 และ N1... 41
- ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1..... 45
ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบนยีน H5 และ N1..... 50
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ..... 62
รายการอ้างอิง..... 76
ภาคผนวก..... 86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 116

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนของเชื้อไข้หวัด.....	2
ตารางที่ 2	การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกโดยวิธี Multiplex RT-PCR.....	25
ตารางที่ 3	Primers ที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกด้วยวิธี Multiplex RT-PCR	32
ตารางที่ 4	Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1.....	32
ตารางที่ 5	จำนวนตัวอย่างสัตว์ปีกที่เก็บในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง.....	35
ตารางที่ 6	ข้อมูลตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้.....	36
ตารางที่ 7	รายละเอียดของรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 12 ตัวอย่าง.....	40
ตารางที่ 8	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 12 ตัวอย่าง	43
ตารางที่ 9	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 12 ตัวอย่าง	43
ตารางที่ 10	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกแยกได้ในประเทศไทย ปี 2004-2006 และเชื้อไข้หวัดนก Goose/Guangdong/1/96.....	44
ตารางที่ 11	สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน H5.....	53
ตารางที่ 12	สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน N1.....	54

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของเชื้อไข้หวัดนก…..……....	5
ภาพที่ 2	Antigenic drift ของเชื้อไข้หวัด…….…….…….……	15
ภาพที่ 3	Antigenic shift ของเชื้อไข้หวัด.....	16
ภาพที่ 4	แผนภูมิแสดงวิธีการดำเนินการวิจัย……	18
ภาพที่ 5	พื้นที่ที่เข้าเก็บตัวอย่างในการวิจัย.....	20
ภาพที่ 6	ตัวอย่างการตรวจสอบความถูกต้องและประกอบสายพันธุกรรม.....	29
ภาพที่ 7	ตำแหน่งของ Primers และขนาดของ PCR product ที่ใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และN1…….……	33
ภาพที่ 8	ตัวอย่างผลการตรวจโดยวิธี Mulitplex RT-PCR ที่ให้ผลบวกต่อยีน M, H5 และ N1…….……	37
ภาพที่ 9	รูปเจลแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าของตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการเพิ่มจำนวนต่อยีน H5 และ N1……	39
ภาพที่ 10	Phylogenetic tree ของยีน H5 ระหว่างเชื้อไข้หวัดนกในการศึกษากับเชื้อไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในประเทศไทย ปี 2004-2006……	46
ภาพที่ 11	Phylogenetic tree ของยีน N1 ระหว่างเชื้อไข้หวัดนกในการศึกษากับเชื้อไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในประเทศไทย ปี 2004-2006……	47
ภาพที่ 12	Phylogenetic tree ของยีน H5 ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษากับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในทวีปเอเชีย ปี 2004-2007……	48
ภาพที่ 13	Phylogenetic tree ของยีน H5 ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษากับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในทวีปเอเชีย ปี 2004-2007……	49
ภาพที่ 14	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโน (Alignment) บริเวณ HA clevage site….....	55
ภาพที่ 15	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ receptor binding site…….....	56
ภาพที่ 16	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ N-link glycosylation site…..……	57
	ผลการเปรียบเทียบบริเวณ stalk region ที่พบการลดลงของกรดอะมิโน….....	58
	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่ง 119….....	59
	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่ง 293, 295…	60
	ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่ง 275….....	61

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 (Avian Influenza virus subtype H5N1) เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงทั้งในสัตว์ปีกและคน ส่งผลให้เกิดความเสียหายทั้งด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุขเป็นอย่างมาก เชื้อไข้หวัดนกเป็นเชื้อไวรัสที่แพร่กระจายไปได้กว้างขวางและรวดเร็ว ส่งผลให้มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกไปยังหลายประเทศทั่วโลก ลักษณะพิเศษของเชื้อไข้หวัดนกนี้ คือเป็นเชื้อที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมตลอดเวลา จนอาจเกิดเป็นเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ใหม่ที่มีความก่อโรครุนแรงจนทำให้เกิดการระบาดครั้งใหม่ ดังนั้นโรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จึงถือเป็นโรคอุบัติใหม่ (emerging disease) และอุบัติซ้ำ (re-emerging disease) ที่หลายประเทศทั่วโลกกำลังให้ความสำคัญและตื่นตัวในการหามาตรการป้องกันและควบคุมการระบาดของโรค

เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 แยกได้เป็นครั้งแรกจากไก่ในประเทศสก๊อตแลนด์เมื่อปี ค.ศ. 1959 ส่วนในทวีปเอเชียมีรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนก H5N1 ในคนเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1997 ที่ประเทศฮ่องกง โดยมีผู้เสียชีวิตจำนวน 6 คน จากผู้ป่วยติดเชื้อทั้งหมดจำนวน 18 คน ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์ปีก ผู้ติดเชื้อไข้หวัดนกส่วนใหญ่เคยมีประวัติสัมผัสหรืออยู่ใกล้ชิดกับสัตว์ปีกในตลาดสด และพบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในผู้ป่วยมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไก่ แสดงว่าได้ว่าเชื้อไข้หวัดนกสามารถแพร่จากสัตว์ปีกไปสู่คนได้โดยตรง (Chan, 2002; Claas et al., 1998) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เป็นต้นมามีการระบาดของโรคไข้หวัดนกในหลายประเทศในทวีปเอเชีย ยุโรป และแอฟริกา (WHO, 2008) และพบว่าเกษตรกรและผู้ประกอบอาชีพที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ปีกเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 (Chen et al., 2006)

ในประเทศไทยพบการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์ปีกแบ่งเป็น 6 ระยะใหญ่ โดยครั้งแรกเกิดขึ้นระหว่างมกราคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2547 ครั้งที่ 2 ระหว่างกรกฎาคม พ.ศ. 2547-เมษายน พ.ศ. 2548 ครั้งที่ 3 ระหว่างกรกฎาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2548 ครั้งที่ 4 ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2549 ครั้งที่ 5 ในระหว่างเดือนมกราคม-มีนาคม พ.ศ. 2550 และครั้งล่าสุดคือเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 (DLD, 2008) การระบาดของโรคไข้หวัดนกในคนในประเทศไทยโดยรายงานขององค์การอนามัยโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ถึง 5 มีนาคม พ.ศ. 2551 มีผู้เสียชีวิตจากเชื้อ

ไข้หวัดนกจำนวน 17 คน จากผู้ติดเชื้อจำนวนทั้งหมด 25 คน (รายงานเมื่อวันที่ 5 มีนาคม พ.ศ. 2551) (WHO, 2008) โดยผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่มีประวัติการเก็บเนื้อไก่ที่ป่วยตายไว้ในบ้าน การสัมผัสไก่ตายหรือไก่ป่วย รวมถึงการเชือดและชำแหละไก่ป่วย (ดารินทร์และคณะ, 2004; Chotpitayasunondh et al., 2005; Ungchusak et al., 2005) แสดงให้เห็นว่าการสัมผัสสัตว์ป่วย สัตว์ที่ติดเชื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไข้หวัดนก อาจเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญในการติดเชื้อไข้หวัดนกในคน อีกทั้งลักษณะการบริโภคสัตว์ปีกในหลายประเทศทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยนั้น ส่วนใหญ่ซื้อไก่จากตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสด ซึ่งบางครั้งอาจมีการเชือดและชำแหละสัตว์ปีกที่จุดขาย ตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย ดังนั้นตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดจึงอาจเป็นสถานที่สำคัญสำหรับการเพิ่มโอกาสในการแพร่เชื้อไข้หวัดนกในสัตว์ปีกและคนได้

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดนกมีหลายวิธี เช่น ชุดทดสอบสำเร็จรูปที่อาศัยการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัส ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อไข้หวัดได้อย่างรวดเร็ว แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดคือไม่อาจตรวจแยกสายพันธุ์ (subtype) ของเชื้อไข้หวัดได้และมีความไวต่ำกว่าวิธีมาตรฐาน ส่วนวิธีที่ได้รับการยอมรับว่ามีความไวสูงสุดและถือเป็นวิธีมาตรฐานคือ วิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัสโดยการฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก (embryonated egg inoculation) หรือเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (Madin-Darby canine kidney; MDCK) และนำไปตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางแอนติเจนของเชื้อไข้หวัดด้วยวิธี Hemagglutination test (HA) และยืนยันผลของเชื้อไข้หวัดและแยกสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์สารพันธุกรรมโดยวิธีการทางอณูชีววิทยา

การตรวจติดตามหาเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่แยกได้จากสัตว์ปีกมีชีวิตและเนื้อสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในประเทศไทย และศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยาของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่แยกได้ จะทำให้ทราบถึงอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์ปีกมีชีวิตและเนื้อสัตว์ปีกในตลาดในประเทศไทย และทราบข้อมูลความเสี่ยงของการปนเปื้อนของเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์ปีกมีชีวิตและเนื้อสัตว์ปีก รวมทั้งข้อมูลรหัสพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนก นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลไปใช้เฝ้าระวังการระบาดและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไข้หวัดนก ที่อาจเกิดขึ้นได้ต่อไปในอนาคต และใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดแนวทางการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การตรวจติดตามหาอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง จะเป็นการเฝ้าระวังการระบาดของโรคไข้หวัดนกและทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 เพื่อตอบคำถามสำหรับการวิจัยผู้วิจัยได้ตั้งวัตถุประสงค์ดังนี้

1. ตรวจแยกพิสูจน์หาเชื้อไข้หวัดนก H5N1 ด้วยวิธี embryonated egg inoculation, hemagglutination (HA) test และ multiplex RT-PCR จากตัวอย่างสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง
2. หาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน hemagglutinin (H5) และ neuraminidase (N1) ของเชื้อไข้หวัดนก H5N1

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ด้านองค์ความรู้ใหม่
   - ทราบข้อมูลอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกที่ปนเปื้อนในสัตว์ปีกมีชีวิตและเนื้อสัตว์ปีกในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง และทราบถึงความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อไข้หวัดนกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสด
   - ทราบข้อมูลของรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่แยกได้จากสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในประเทศไทย และสามารถนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมไปเผยแพร่ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
2. ด้านการนำไปใช้ประโยชน์
   - การตรวจติดตามหาเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 และข้อมูลลักษณะทางพันธุศาสตร์และความสัมพันธ์ของเชื้อไข้หวัดนกสามารถนำไปใช้เฝ้าระวังการระบาดและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไข้หวัดนก ซึ่งจะนำมาใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดแนวทางการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคไข้หวัดนก (Avian influenza) เป็นโรคติดต่อร้ายแรงในสัตว์ปีก การติดเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์ปีกมีความหลากหลายตั้งแต่การติดเชื้อชนิดไม่รุนแรง เช่น การติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจ อัตราการไข่ลด จนถึงการติดเชื้อชนิดรุนแรง ที่ทำให้อัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในปัจจุบันเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงและสร้างความเสียหายไปทั่วโลกคือ สายพันธุ์ H5N1 เชื้อไข้หวัดนกทุกสายพันธุ์สามารถพบได้ในนกเป็ดน้ำหลายชนิด นกทะเล และนกนางนวล ซึ่งถือเป็นแหล่งสะสมเชื้อไวรัสตามธรรมชาติ (natural reservoir) โดยไม่ทำให้สัตว์ดังกล่าวมีอาการป่วยแม้จะเป็นเชื้อไข้หวัดนกที่มีความก่อโรครุนแรง เชื้อไข้หวัดนกสามารถก่อโรครุนแรงและทำให้เกิดอัตราการตายสูงในสัตว์ปีกบางชนิด เช่น ไก่ ไก่งวง ซึ่งถือเป็นสัตว์ปีกที่เลี้ยงเป็นระบบอุตสาหกรรมและเมื่อสัตว์เหล่านี้เกิดการติดเชื้อไข้หวัดนกชนิดรุนแรง จึงมีผลให้เกิดความเสียหายในระบบเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก ดังเช่นการแพร่ระบาดของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในประเทศไทยในต้นช่วงปี พ.ศ. 2547 ทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกเป็นอย่างมาก

2.1 ลักษณะของเชื้อไข้หวัดนก

เชื้อไข้หวัดนกจัดอยู่ในตระกูล Orthomyxoviridae กลุ่มอินฟลูเอนซ่า เอ (Influenza A) เชื้อไวรัสในกลุ่มนี้สามารถแบ่งเป็นสายพันธุ์ (subtype) ตามลักษณะทางแอนติเจนของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) บนผิวเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัสได้เป็น hemagglutinin (HA) 16 subtypes และ neuraminidase (NA) 9 subtypes (Fouchier et al., 2004)

เชื้อไข้หวัดนกมีรูปร่างหลากหลาย เช่น กลม (spherical form) หรือสายยาว (filamentous form) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 80-120 นาโนเมตร ลักษณะภายนอกเป็นเปลือกหุ้ม (envelope) ซึ่งมีส่วนของ glycoprotein ที่สำคัญ 2 ชนิด ยื่นออกมาและกระจายอยู่โดยรอบ ได้แก่ hemagglutinin (HA) มีรูปร่างเป็นแท่ง และ neuraminudase (NA) มีลักษณะคล้ายดอกเห็ด (De Jong et al., 2000) ภายในเปลือกหุ้มบรรจุสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว เป็นท่อนจำนวน 8 ท่อน ซึ่งแต่ละท่อนมีน้ำหนักโมเลกุลและกำหนดการสร้างโปรตีนแตกต่างกัน ได้แก่ ยีน PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M และ NS ตามลำดับ ยีนแต่ละท่อนเป็นต้นแบบในการสร้างโปรตีนที่เป็น

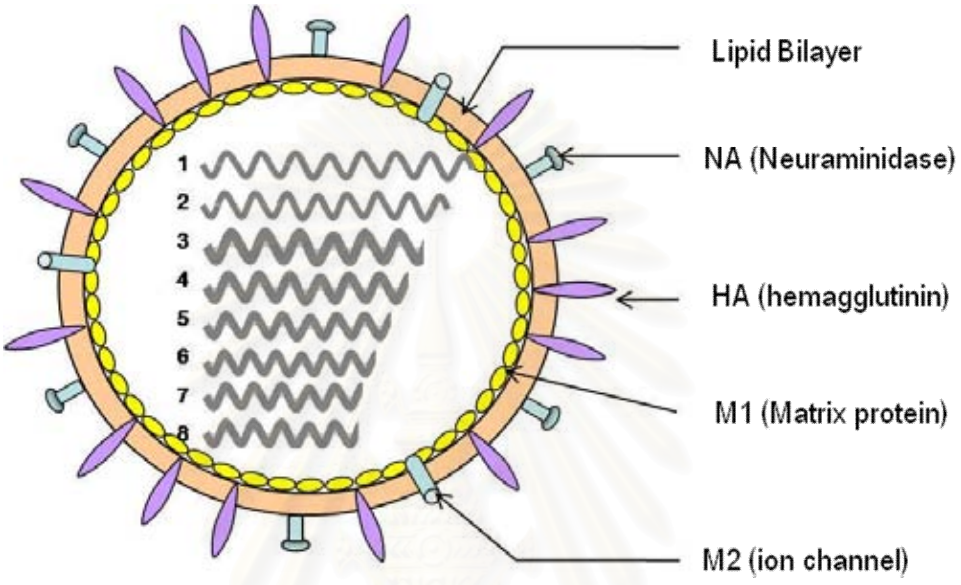
ส่วนประกอบต่างๆ ของเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 10 ชนิด รายละเอียดชนิดและหน้าที่ของเชื้อไข้หวัดนกได้แสดงไว้ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1 (Lamb and Krug, 2001)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดและหน้าที่ของโปรตีนของเชื้อไข้หวัด

Segments	Encoding polypeptide	Nucleotide Length (bp)	Functions
1	PB2	2,341	Host-cell RNA cap binding : Component of RNA transcriptase
2	PB1	2,341	Component of RNA transcriptase
3	PA	2,233	Component of RNA transcriptase
4	HA	1,778	Surface glycoprotein: attaches to cell surface sialic receptors
5	NP	1,565	Structural component of RNA transcriptase
6	NA	1,413	Surface glycoprotein : neuraminidase activity
7	M1	1,027	Membrane protein
	M2		Ion channel
8	NS1	890	TNFα-response
	NS2		

(ดังแปลงจาก Lamb and Krug, 2001)

โครงสร้างของเชื้อไข้หวัดนกสามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วนหลักๆ คือ 1. บริเวณเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัสซึ่งจะมีโปรตีน HA, NA, M1 และ M2 2. บริเวณแกนกลางของเชื้อไวรัสคือกลุ่มของ Ribonucleoprotein (RNP) complex ซึ่งประกอบด้วย RNA และโปรตีน 4 ชนิด คือ nucleoprotein (NP), polymerase protein ได้แก่ PB2, PB1 และ PA 3. ส่วนของโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเชื้อไวรัส (non-structural protein) ได้แก่ NS1 และ NS2 (Easterday et al., 1997)



ภาพที่ 1 แบบจำลองลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของเชื้อไข้หวัดนกที่มีเปลือก (envelope) ห่อหุ้ม บริเวณผิวด้านนอกประกอบด้วยไกลโคโปรตีน hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA) และโปรตีน M ภายในบรรจุ RNA สายเดี่ยวจำนวน 8 ท่อน โดยจะมีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ประมาณ 890-2341 bp (หมายเลข 1-8 แสดงถึงยีน PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M และ NS ตามลำดับ) (ดังแปลงจาก Lamb and Krug, 2001)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การติดเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์

เชื้อไข้หวัดนกสามารถแบ่งตามความรุนแรงในการก่อโรคเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีความรุนแรงต่ำ (Low Pathogenic Avian Influenza; LPAI) ซึ่งสัตว์ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการของระบบทางเดินหายใจที่ไม่รุนแรงหรือไม่แสดงอาการเลย และชนิดที่มีความรุนแรงสูง (Highly Pathogenic Avian Influenza; HPAI) ได้แก่ สายพันธุ์ H5 และ H7 เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์นี้ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในสัตว์ปีกโดยจะพบอาการของระบบทางเดินหายใจ อาการทางระบบประสาท บวมน้ำที่บริเวณหัว ท้องเสีย และมีอัตราตายเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ (de Jong and Hien, 2006)

เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 สามารถก่อโรคตามธรรมชาติได้ในสัตว์ปีกหลายชนิด เช่น นกป่า ไก่ ไก่งวง เป็ด (de Jong and Hien, 2006; Ligon, 2005) เหยี่ยว (Van Borm et al., 2005) นกพิราบ (Songserm et al., 2006b) นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น เสือ (Amonsin et al., 2006b; Thanawongnuwech et al., 2005), เสือดาว (Keawcharoen et al., 2004) แมว (Amonsin et al., 2007; Songserm et al., 2006a) สุนัข (Amonsin et al., 2007; Songserm et al., 2006b) และยังพบการติดเชื้อไวรัส H5N1 ในสัตว์ทดลอง เช่น หนูขาว (Gubareva et al., 1998; Gao et al., 1999), เฟอเรต (Zitzow et al., 2002), แมว (Rimmelzwaan et al., 2006; Kuiken et al., 2004; Thiry et al., 2007), ลิง (Kuiken et al., 2003) สุนัข (Giese et al, 2008) และสุกร (Choi et al., 2005) เป็นต้น บ่งบอกว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถพบได้ในสัตว์หลายชนิดและความสัมพันธ์ของสัตว์ส่วนใหญ่อยู่ในห่วงโซ่อาหารเดียวกัน ส่งผลให้อาจเกิดการติดเชื้อโดยตรงผ่านการกินได้

การติดเชื้อไข้หวัดในเซลล์โฮสต์นั้นเชื้อไวรัสจะอาศัยโปรตีนบนเปลือกหุ้มไวรัส 2 ชนิดหลัก โปรตีนชนิดแรกคือโปรตีน HA จะจับกับตัวรับบนเซลล์ และโปรตีนจะถูกย่อยที่ตำแหน่งของ cleavage site ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากเซลล์โฮสต์ทั่วไปแบ่งโปรตีน HA เป็น 2 ส่วนคือ HA1 และ HA2 จากนั้นโปรตีนจะไปจับบนตัวรับ sialo-oligosaccharides บนผิวเซลล์ และเข้าสู่เซลล์เพื่อสร้างและเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส โปรตีน NA มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการแยกส่วน terminal sialic acid residue บนเซลล์โฮสต์เพื่อปล่อยเชื้อไวรัสตัวใหม่ออกจากเซลล์ (Hughes et al., 2001) และป้องกันเชื้อไวรัสจับกันเป็นกลุ่มอยู่ภายในเซลล์ รวมถึงกระบวนการเพิ่มความสามารถของเชื้อไวรัสเพื่อให้เข้าไปในเซลล์เยื่อบุของระบบทางเดินหายใจได้ (Lamb and Krug, 2001)

2.3 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1

เชื้อไข้หวัดนกมีโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิด ที่อยู่บริเวณผิวเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัสคือ HA (hemagglutinin) และ NA (neuraminidase) ซึ่งเป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส โปรตีนทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสในเซลล์เป้าหมาย ความรุนแรงในการเกิดโรคและการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส ดังนั้นการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในตำแหน่งต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะของเชื้อไข้หวัดนกบนยีน HA และ NA จึงมีความสำคัญอย่างมาก

2.3.1 การศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน HA

ยีน HA เป็นสารพันธุกรรมท่อนที่ 4 ที่กำหนดการสร้างโปรตีน HA มีหน้าที่สำคัญในการจับกับตัวรับบนผิวของเซลล์ และเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัส โปรตีน HA มีคุณสมบัติในการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงและมีหน้าที่สำคัญในการจับกับโครงสร้าง sialic acid ของตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมายเพื่อเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ต่อไป ดังนั้นหากเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน HA อาจทำให้ไวรัสนี้สามารถหลบหลีกจากภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ โปรตีน HA มีตำแหน่งสำคัญอยู่ 3 ตำแหน่ง คือ

<u>HA cleavage site</u>

โปรตีน HA มีรูปร่างแท่ง (rod shape spike) มีขนาดของกรดอะมิโนประมาณ 562-566 ถูกเรียกว่า HA0 จากนั้นก่อนเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ HA0 ถูกตัดแบ่งเป็น HA1 และ HA2 ได้ง่ายด้วยเอนไซม์ subtilisin-like protease ที่พบได้ทั่วไปในเซลล์ของร่างกายโฮสต์บริเวณที่ถูกตัดเรียกว่า HA cleavage site (Stieneke-Grober et al., 1992) ส่งผลให้เชื้อสามารถเข้าสู่อวัยวะต่างๆ และเกิดการติดเชื้อได้ทั่วร่างกาย (Steinhauer, 1999) เชื้อไข้หวัดนกชนิดที่มีความรุนแรงสูง (HPAI) นั้นจะพบการเรียงตัวของกรดอะมิโนชนิดเบสจำนวนหลายตัว (multiple basic amino acids) คือมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนชนิด arginine (R) และ lysine (K) จำนวน 3-5 ตัว ที่บริเวณ HA cleavage site (Claas et al., 1998; Steinhauer, 1999)

รายงานการศึกษาเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากห่านที่มณฑลกวางตุ้ง ประเทศจีน ในปี ค.ศ. 1996 (A/Goose/Guangdong/96) มีลักษณะของ multiple basic amino acids ที่บริเวณ HA cleavage site บนยีน HA เช่นเดียวกับเชื้อไวรัสที่แยกได้จากผู้ติดเชื้อในประเทศฮ่องกงปี ค.ศ. 1997 (A/Hongkong/156/97) (Xu et al., 1999) เชื้อไวรัสที่พบในการระบาดในประเทศฮ่องกงปี ค.ศ. 2001 (Guan et al., 2002) เชื้อไวรัสที่แยกได้จากเนื้อเป็ดที่ถูกส่งจากประเทศจีนไปยังญี่ปุ่นและเกาหลี (Tumpey et al., 2002; Mase et al., 2005) และจากสัตว์ปีกมีชีวิตในตลาดที่เวียดนาม (Nguyen et al., 2005) การศึกษาเชื้อไข้หวัดนกในประเทศไทยพบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไก่ในจังหวัดนครปฐม (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) เป็นเชื้อไข้หวัดนกชนิด HPAI ที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ multiple basic amino acids ที่ HA cleavage site และยังมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่แยกได้จากประเทศจีน A/Duck/China/E319-2/03 (Viseshakul et al., 2004) ในปี ค.ศ. 2006 ได้มีรายงานถึงลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากการระบาดของประเทศไทยในปี ค.ศ. 2005 (Amonsin et al., 2006a) พบว่าที่บริเวณ HA cleavage site มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นแบบ multiple basic amino acids ต่อมา Chutinimitkul และคณะ (2007a) ได้รายงานผลการศึกษาเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไก่ในจังหวัดพิจิตร (A/chicken/Thailand/PC-168/2006 และ A/chicken/Thailand/PC-170/2006) ว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยและเวียดนามระหว่างปี ค.ศ. 2004-2005 ในทางตรงกันข้ามเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไก่ในจังหวัดนครพนม (A/chicken/Thailand/NP-172/2006) ซึ่งพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณ HA cleavage site (SPLRERRRK-R/G) จัดในกลุ่มเดียวกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศจีนและลาว ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เคยพบในเชื้อไวรัสที่แยกได้จากประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Receptor binding site

receptor binding site อยู่บนส่วน globular head เป็นตำแหน่งที่เข้าจับกับ sialic acid ซึ่งเป็นตัวรับบนเซลล์ในระบบทางเดินหายใจของคนและสัตว์ปีก โดยพบว่าเชื้อไข้หวัดในคน (สายพันธุ์ H1, H2 และ H3) จับกับตัวรับด้วยพันธะ α2-6 linkage ซึ่งพบในเซลล์ของระบบทางเดินหายใจในคน และเชื้อไข้หวัดนก (สายพันธุ์ H5 และ H7) จับกับตัวรับด้วยพันธะ α2-3 linkage ซึ่งพบในเซลล์ของระบบทางเดินหายใจของสัตว์ปีก (Gambaryan et al., 2006) ตำแหน่ง receptor binding site ของโปรตีน HA ของเชื้อไวรัสเป็นกรดอะมิโน glutamine (Q) และ glycine (G) ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 222-224 ตามลำดับ (Nobusawa et al., 1991)

รายงานการศึกษาเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 พบว่าตำแหน่ง receptor binding site ของเชื้อไวรัสคือบริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 222-224 (224-226 ใน H3 numbering) การแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเพียงตำแหน่งเดียวมีผลกับความจำเพาะของตัวรับในเชื้อไวรัสอย่างมีนัยสำคัญ และอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการจับกับตัวรับของเซลล์เป้าหมายเพิ่มมากขึ้น (Hulse et al., 2004) ดังตัวอย่างการแทนที่ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 222 (H5 numbering) (ตำแหน่งที่ 224 ใน H3 numbering) เป็น glutamine (Q) และตำแหน่ง 224 (ตำแหน่งที่ 226 ใน H3 numbering) เป็น glycine (G) ส่งผลให้เชื้อไวรัสสามารถก่อโรคได้ทั้งในสัตว์ปีกและคน (Vines et al., 1998; Li et al, 2004; Lee et al., 2005; Suzuki, 2005) และการแทนที่ของกรดอะมิโน serine (S) ที่ตำแหน่ง 227 เป็น asparagine (R) (Gambaryan et al., 2006) การระบาดในประเทศฮ่องกงปี ค.ศ. 1997 พบว่าเชื้อไวรัสที่มีลักษณะของ receptor binding site เหมือนกับสัตว์ปีกสามารถก่อให้เกิดโรคไข้หวัดในคนได้ (Matrosovich et al.,1999) จากการศึกษาเชื้อไวรัสที่แยกได้จากประเทศไทยในปี ค.ศ. 2005 พบกรดอะมิโน glutamine (Q) และ glycine (G) ที่ตำแหน่ง 222 และ 224 ตามลำดับ (Amonsin et al., 2006a) อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศไทยในปี ค.ศ. 2007 (Chutinimitkul et al., 2007a)

Glycosylation site

glycosylation site มีลักษณะเป็นสายคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมต่อด้วยพันธะ N-glycosidic linkage (Lamb and Krug, 2001) ซึ่งสามารถพบได้ 5-11 ตำแหน่งบนโปรตีน HA ขึ้นกับสเตรนของเชื้อไข้หวัด (Bright et al., 2003) และจากการศึกษาของ Amonsin และคณะ (2006b) พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากเสือในประเทศไทยมีตำแหน่ง glycosylation site บนโปรตีน HA อย่างน้อย 7 ตำแหน่ง การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณนี้ เช่น 154-156 (ตำแหน่งที่ 156-158 ใน H3 numbering) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงสูงและมีผลทำต่อความจำเพาะต่อการจับกับตัวรับของเชื้อไวรัส (Matrosovich et al., 1999) รายงานของ Chutinimitkul และคณะ (2007a) พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากจังหวัดพิจิตรในปี ค.ศ. 2006 มีกรดอะมิโน asparagine (N), sernine (S) และ threonine (T) ที่ตำแหน่ง 154-156 ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อไวรัสที่แยกได้จากจังหวัดนครพนมพบเป็น asparagine (N), threonine (T) และ threonine (T) ที่ตำแหน่ง 154-156 ตามลำดับ

2.3.2 การศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NA

โปรตีน NA มีลักษณะคล้ายเห็ด (mushrooms) มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ sialidase ทำหน้าที่ย่อยกรด sialic ออกจากโปรตีนบนผิวเซลล์ ทำให้เชื้อไวรัสหลุดออกจากเซลล์โฮสต์ได้ นอกจากนี้โปรตีน NA ช่วยในการป้องกันการเกาะกลุ่มของเชื้อไวรัสและช่วยย่อยเยื่อเมือกที่ปกคลุมเยื่อบุทางเดินหายใจ ทำให้เชื้อไวรัสสามารถยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ได้อีก โปรตีน NA มีตำแหน่งสำคัญอยู่ 2 ตำแหน่ง คือ

NA stalk region

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงความยาวของกรดอะมิโนบน NA stalk region สัมพันธ์กับวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสในการก่อโรคในสัตว์ปีก (Castrucci and Kawaoka, 1993) และส่งผลให้เชื้อไวรัสมีการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมใหม่และสามารถติดต่อไปยังสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (Bender et al., 1999; Suzuki, 2005)

รายงานการศึกษาของเชื้อไข้หวัดนก ในปี ค.ศ. 1996 ที่มณฑลกวางตุ้ง ประเทศจีน พบว่ายีน NA ของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากห่าน (A/Goose/Guangdong/96) ไม่พบความแตกต่างของกรดอะมิโนบนตำแหน่ง NA stalk region (Xu et al., 1999) การระบาดที่

ประเทศฮ่องกงในปี ค.ศ. 1997 พบการลดจำนวนกรดอะมิโน 19 ตัว (19-amino acid deletion) บน stalk region ของยีน NA (Subbarao et al., 1998) แตกต่างจากการระบาดในปี ค.ศ. 2001 ซึ่งพบการลดจำนวนกรดอะมิโน 20 ตัว (20-amino acid deletion) บน stalk region (Guan et al., 2002) ในประเทศไทยพบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไก่ช่วงต้นปี ค.ศ. 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) มีลักษณะ 20-amino acid deletion บน stalk region ของยีน NA ซึ่งคล้ายกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศฮ่องกงในปี ค.ศ. 2001 (Guan et al., 2002) และเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศเวียดนามในปี ค.ศ. 2004 (Nguyen et al., 2005; Viseshakul et al., 2004)

ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต้านเชื้อไข้หวัดนก

กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 119 (E119V), 275 (H275Y), 293 (R293K) และ 295 (N295S) บนโปรตีน NA เป็นตำแหน่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต้านเชื้อไวรัส oseltamivir (Brown, 2000; Gubareva, 2004; Kiso et al., 2004; Moscona, 2005) และจากความสำคัญของเชื้อไข้หวัดนกที่สร้างความเสียหายเป็นอย่างมากในทั่วโลก ดังนั้นการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต้านเชื้อไวรัสจึงมีความสำคัญมากในปัจจุบัน

การศึกษาเชื้อไข้หวัดนกที่พบในประเทศไทยในระหว่างปี พ.ศ. 2547-2549 พบว่ายังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต้านเชื้อไข้หวัด oseltamivir หรือกล่าวได้ว่าเชื้อไข้หวัดนกที่พบในประเทศไทยมีความไวต่อยาต้านเชื้อไข้หวัดชนิดดังกล่าว (Amonsin et al., 2006a; Chutinimitkul et al., 2007a) รายงานการศึกษาเชื้อไข้หวัดนกในประเทศเวียดนามพบว่าดื้อต่อยาต้านไวรัส oseltamivir (Li et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสที่ดื้อต่อยาต้านไวรัส oseltamivir เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในการเลือกยารักษาให้ถูกต้องและรวดเร็วในระหว่างที่เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนก (Chutinimitkul et al., 2007b)

2.4 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนก

การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดรวมถึงเชื้อไข้หวัดนกที่เกิดขึ้นส่วนหนึ่งมีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการเป็นเชื้อไวรัสชนิด RNA ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ของเชื้อไวรัส ส่งผลให้กระบวนการสร้างเชื้อไวรัสสามารถเกิดความผิดพลาดได้สูงทำให้เชื้อไข้หวัดเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (antigenic variation) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ antigenic drift และ antigenic shift

2.4.1 Antigenic drift

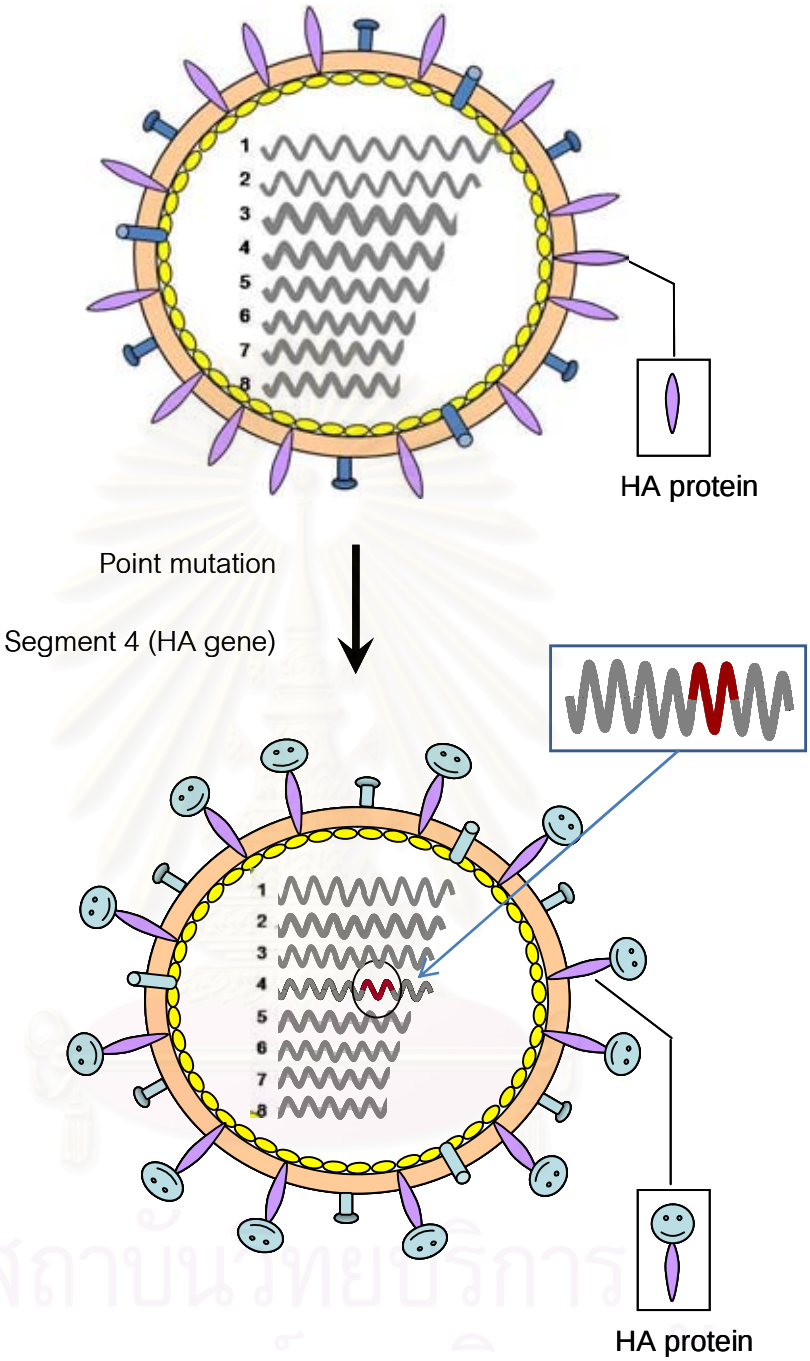
Antigenic drift พบได้ในเชื้อไข้หวัดทุกชนิด เป็นกระบวนที่มีการเปลี่ยนแปลงในบางจุดของยีน (point mutation) ซึ่งอาจเกิดจากการแทนที่ (substitution) การเอาออก (deletion) และการแทรกตัว (insertion) การเปลี่ยนแปลงนี้จะค่อยๆ เกิดอย่างต่อเนื่อง (Brown, 2000) โดยการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากความผิดพลาดในขั้นตอนการสร้าง RNA ของเชื้อไวรัส เนื่องจากการสร้าง RNA อาศัยเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ซึ่งขาดคุณสมบัติการตรวจสอบความถูกต้อง (proofreading) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสแต่ไม่มากพอที่จะเปลี่ยนเป็นเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ใหม่ (Wilschut and McElhaney, 2005) อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสยังสามารถหลบหลีกจากภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ และเกิดการระบาดย่อยที่ไม่รุนแรงในพื้นที่จำกัด (endemic) (Nicholson, Wood and Zambon, 2003)

การเปลี่ยนแปลงบางจุดบนยีน HA มีผลต่อโครงสร้าง antigenic epitope บนผิวโปรตีน HA ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนบริเวณผิวเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส และมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้โฮสต์ที่ติดเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงบนยีน HA ไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาต่อต้านเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ได้อย่างสมบูรณ์ รวมทั้งยังมีผลต่อความสามารถในการคุ้มโรคของวัคซีนหรือการเลือกใช้วัคซีน (De jong et al., 2000) ตัวอย่างการเกิด antigenic drift ของเชื้อไข้หวัด ดังแสดงในภาพที่ 2

2.4.2 Antigenic shift

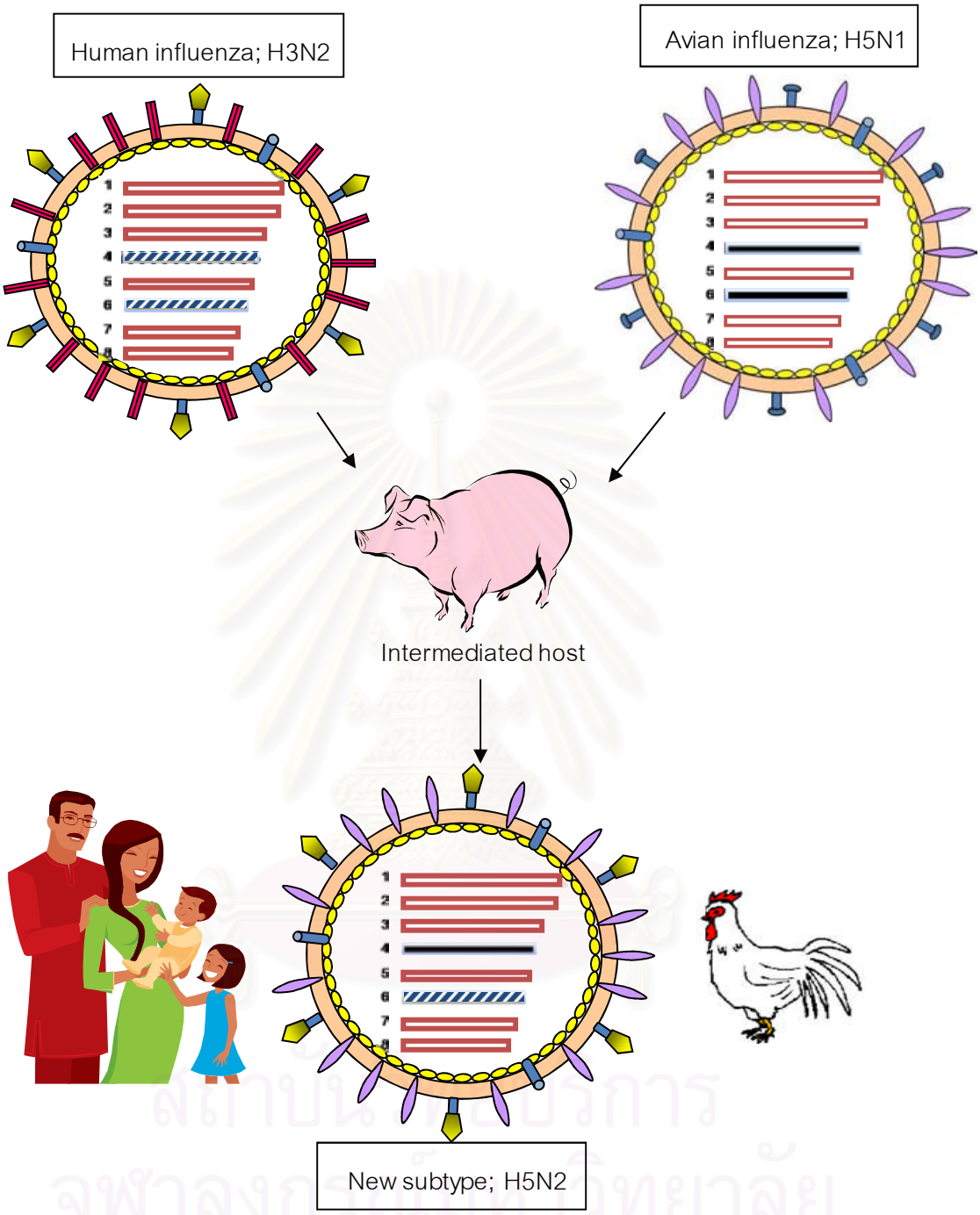
Antigenic shift เกิดจากการแลกเปลี่ยนท่อนยีนระหว่างเชื้อไวรัส 2 ชนิดที่ติดเชื้อในเซลล์โฮสต์เดียวกัน (genetic reassortment) และทำให้เกิดเชื้อไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ขึ้นมา ส่งผลให้คุณสมบัติของเชื้อไวรัสเปลี่ยนแปลงและอาจกลายเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงขึ้น จนทำให้เกิดการระบาดอย่างรุนแรงและกว้างขวางได้ (potential pandemic) เนื่องจากผู้ที่ได้รับเชื้อไวรัสไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้น ดังเช่นเหตุการณ์ในปี ค.ศ. 1957 และ ค.ศ. 1968 ซึ่งเป็นการระบาดครั้งรุนแรงของเชื้อไข้หวัด H2N2 และ H3N2 โดยพบว่าเชื้อไวรัสที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการเกิด genetic reassortment ระหว่างเชื้อไข้หวัดนกและเชื้อไข้หวัดที่พบในคน โดยอาศัยโฮสต์ตัวกลาง เช่น สุกร ซึ่งสามารถติดเชื้อไวรัสได้ทั้งเชื้อไวรัสในคนและในสัตว์ปีก ส่งผลให้เกิดเชื้อไวรัสชนิดใหม่และเกิดการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ (Brown., 2000; Wilschut and McElhaney., 2005) ตัวอย่างการเกิด antigenic shift ของเชื้อไข้หวัด ดังแสดงในภาพที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แสดงการเกิด antigenic drift ของเชื้อไข้หวัดบนยีนท่อนที่ 4 (HA gene) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการสร้างโปรตีน HA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3 แสดงการเกิด antigenic shift ของเชื้อไข้หวัดซึ่งเป็นผลจาก genetic reassortment ของยีน HA และ NA โดยอาศัยโฮสต์กึ่งกลาง เช่น สุกร ซึ่งสามารถติดเชื้อไข้หวัดนกและเชื้อไข้หวัดในคนได้ ส่งผลให้เกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ก่อโรคได้ทั้งในสัตว์ปีกและคน

2.5 การศึกษาเชื้อไข้หวัดในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสด

รายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนกในต่างประเทศ เช่นประเทศฮ่องกงและจีนพบประวัติผู้ป่วยส่วนใหญ่มีการสัมผัสหรือทำงานใกล้ชิดกับสัตว์ป่วยหรือเกี่ยวข้องกับฟาร์มหรือตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและการฆ่าสัตว์ปีกเพื่อบริโภค (Garber et al., 2007; Liu et al., 2003; Shortridge, 1999) ในประเทศเบลเยียมพบเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในนกอินทรีย์ที่ส่งมาจากประเทศไทย โดยซื้อจากร้านค้าสัตว์ปีกรายใหญ่แห่งหนึ่งในกรุงเทพมหานคร (Van Borm et al., 2005) รวมถึงรายงานการพบเชื้อไข้หวัดนกในเนื้อเป็ดที่ส่งออกจากประเทศจีนไปประเทศเกาหลีใต้ (Tumpey et al., 2002) และประเทศญี่ปุ่น (Mase et al., 2005) และการพบเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์ปีกมีชีวิตในตลาดค้าสัตว์ปีกที่ประเทศเวียดนาม (Nguyen et al., 2005) และการพบเชื้อไข้หวัดนกในตลาดสดในประเทศจีน (Wang et al., 2006) เป็นต้น ส่วนการระบาดของโรคไข้หวัดนกในประเทศไทยพบว่า ซากไก่และนกพิราบที่มีเชื้อไข้หวัดนกเป็นสาเหตุให้มีการติดเชื้อไข้หวัดนกในเสือ เสือดาว (Keawcharoen et al., 2004) และแมวเลี้ยง (Songsermn et al., 2006a) และจากการศึกษาของดารินทร์ และคณะ (2004) พบว่าผู้ป่วยติดเชื้อส่วนใหญ่มีประวัติการเก็บเนื้อไก่ที่ป่วยตายไว้ในบ้าน สัมผัสไก่ที่ตายและไก่ป่วย หรือมีประวัติเชือดและชำแหละไก่ป่วย

2.6 วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดนกทางห้องปฏิบัติการ

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดนกจำเป็นต้องอาศัยวิธีการต่างๆ ประกอบกัน นอกเหนือจากการซักประวัติ ลักษณะอาการทางคลินิก และสังเกตรอยโรคเบื้องต้น การตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นวิธีการที่จำเป็นเพื่อใช้ยืนยันการวินิจฉัย วิธีตรวจหาเชื้อไวรัสที่ได้รับการยอมรับโดยองค์กรโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties, OIE) ว่ามีความไวสูงและถือเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) คือ การเพาะแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) โดยวิธีฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก (embryonated egg inoculation) อายุประมาณ 9-11 วัน ที่ปลอดเชื้อและไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดนก แล้วฟักต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน จากนั้นดูดเก็บน้ำไข่ฟัก (allantoic fluid) มาตรวจลักษณะทางแอนติเจนด้วยวิธีทดสอบปฏิกิริยาจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination test; HA) ที่อาศัยคุณสมบัติของโปรตีน hemagglutinin (HA) ซึ่งจะเกาะติดกับเม็ดเลือดแดง และวิธีการตรวจการยับยั้งการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination inhibition test; HI) ถ้าพบผลบวกจากขั้นตอนนี้จะนำมาวินิจฉัยแยกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular technique) คือ เทคนิค RT-PCR เทคนิค real-time PCR ซึ่งจะตรวจความจำเพาะต่อยีน M, H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกชนิด เอ สายพันธุ์ H5N1

บทที่ 3

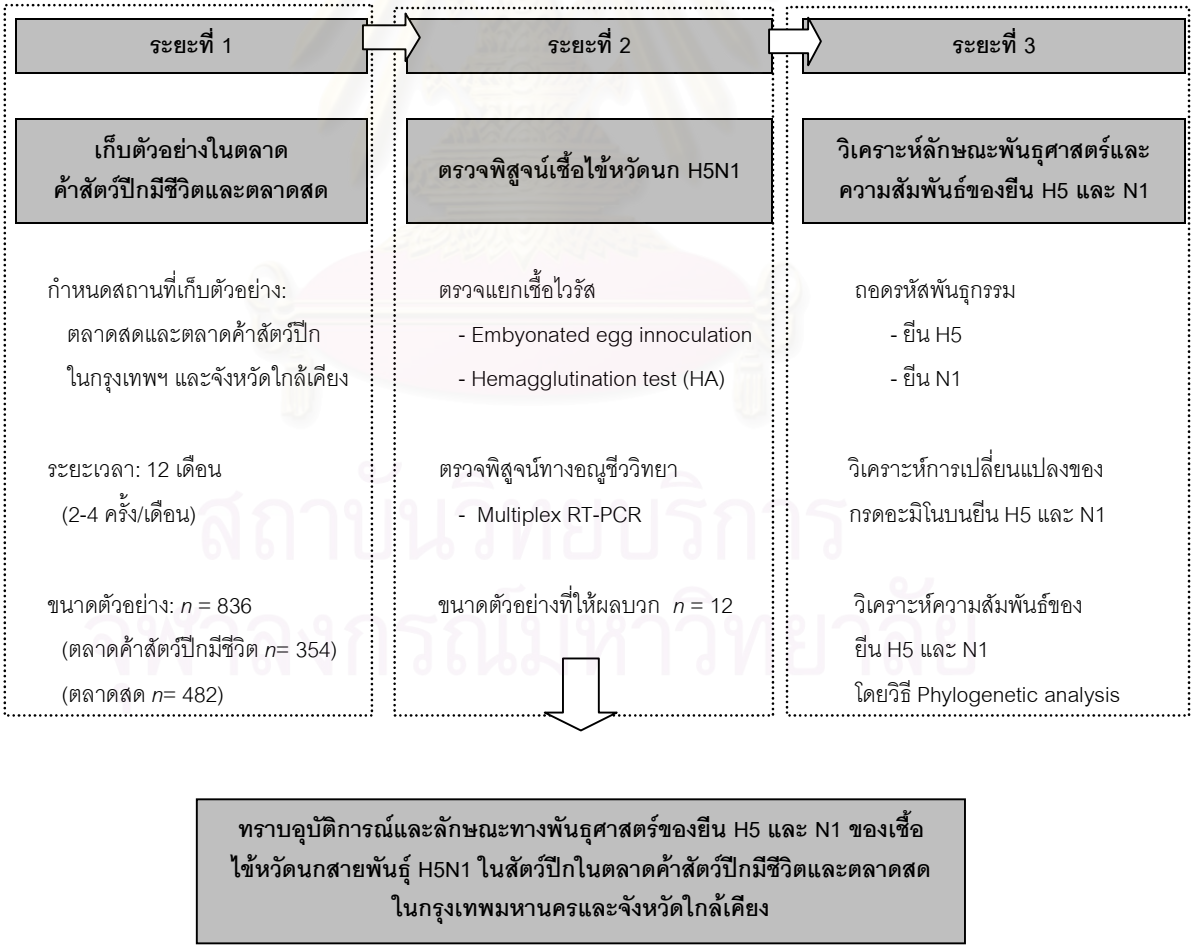
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ตรวจติดตามหาอุบัติการณ์การพบเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549–กรกฎาคม พ.ศ. 2550 และศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 จากเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว จึงแบ่งการดำเนินการออกเป็น 3 ระยะคือ (ภาพที่ 4)

ระยะที่ 1 เก็บรวบรวมตัวอย่างจากตลาดค้าสัตว์ปีกชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง

ระยะที่ 2 ตรวจพิสูจน์หาเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1

ระยะที่ 3 ศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนก H5N1



ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงวิธีการดำเนินการวิจัย

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างในตลาดค้าสัตว์ปีกชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง

1.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง

- พื้นที่ที่เข้าเก็บตัวอย่างคือกรุงเทพมหานครและจังหวัดรอบกรุงเทพมหานครในรัศมี 100 กิโลเมตร และเคยมีรายงานการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกรวม 8 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร ฉะเชิงเทรา นครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี สุพรรณบุรี อยุธยา และอ่างทอง (ภาพที่ 5)
- ในทุกเดือนได้เก็บตัวอย่างใน 3 จังหวัดหลัก คือ กรุงเทพมหานคร สุพรรณบุรี และปทุมธานี และจังหวัดอื่นๆ เพิ่มเติมเดือนละ 1-2 จังหวัด ได้แก่ อ่างทอง อยุธยา นนทบุรี ฉะเชิงเทรา และนครปฐม
- ตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดที่เลือกเข้าเก็บตัวอย่างในกรุงเทพมหานครเป็นตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดแหล่งใหญ่ เช่น ตลาดคลองเตย ตลาดมีนบุรี ตลาดสะพานใหม่ ตลาดเยาวราช และตลาดบางรัก ในอีก 7 จังหวัดเป็นตลาดสดเทศบาลขนาดใหญ่ ตลาดริมถนนและวัด

1.2 วิธีการเก็บตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนก

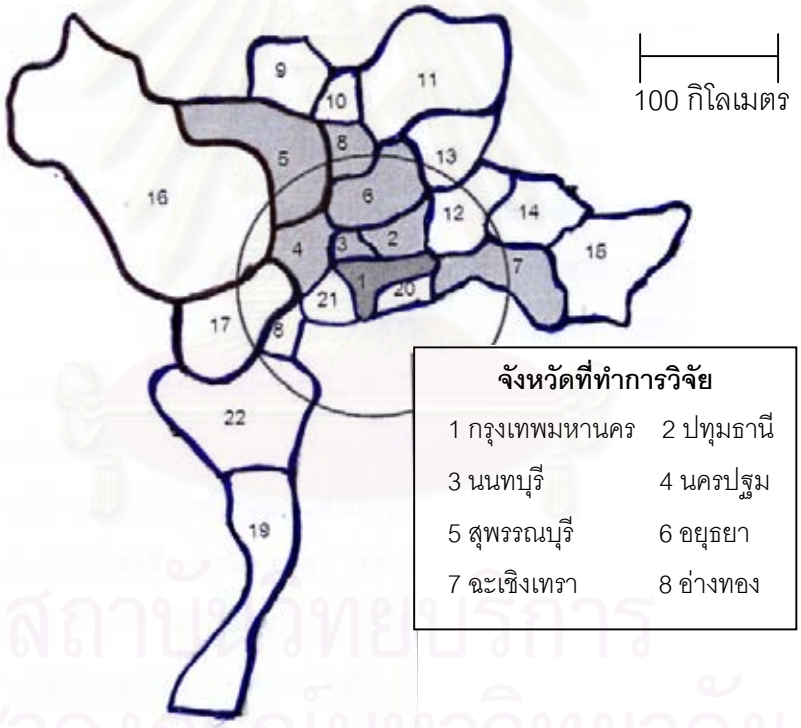
- สุ่มเก็บสัตว์ปีกมีชีวิตและสัตว์ปีกที่เสียชีวิตแล้ว (เนื้อสัตว์ปีก) ที่มีเพื่อการจำหน่ายในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสด จำนวนทั้งหมด 836 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากสัตว์ปีกมีชีวิตจำนวน 354 ตัวอย่าง และจากเนื้อสัตว์ปีกจำนวน 482 ตัวอย่าง
- กรณีสัตว์ปีกมีชีวิตนั้นสามารถเก็บตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกโดยใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อป้ายสิ่งคัดหลั่ง (swab) ให้สัมผัสกับบริเวณสองตำแหน่งคือ ร่องเพดานปาก (choanal slit) หรือช่องปากร่วมคอหอย (oro-pharyngeal) และช่องทวารร่วม (cloaca) ของสัตว์ปีกมีชีวิต หลังจากนั้นจุ่มไม้ลงในสารละลายสำหรับเก็บรักษาเชื้อไวรัส (viral transport media; VTM) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
- กรณีตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีกได้เก็บตัวอย่างอวัยวะภายใน ได้แก่ หลอดลม ปอด ตับ ไต และม้าม จากนั้นเก็บตัวอย่างลงในภาชนะปิดสนิท กันแสงแดด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ
- นำตัวอย่างที่เก็บเรียบร้อยส่งไปยังห้องปฏิบัติการที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (Biosafety level 3) ซึ่งมีการควบคุมการเข้า-ออกของตัวอย่าง อุปกรณ์และเครื่องมือ

การแต่งกายของผู้ปฏิบัติงานอย่างรัดกุม เพื่อตรวจพิสูจน์หาเชื้อไข้หวัดนกในขั้นตอนต่อไป

- กรณีที่ไม่สามารถส่งตรวจตัวอย่างได้ทันที ได้เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ไม่เกิน 48 ชั่วโมง

1.3 ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง

- ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดมีระยะเวลา 12 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 ถึง กรกฎาคม พ.ศ. 2550 โดยเก็บตัวอย่างเดือนละ 2-4 ครั้ง จำนวนตัวอย่างสัตว์ปีกครั้งละไม่น้อยกว่า 50 ตัวอย่าง



ภาพที่ 5 พื้นที่ที่เข้าเก็บตัวอย่าง พื้นที่สีเทาแสดงพื้นที่ที่เคยพบเชื้อไข้หวัดนก วงกลมแสดงพื้นที่ใกล้เคียงกรุงเทพมหานครในรัศมี 100 กิโลเมตร โดยมีกรุงเทพมหานคร (หมายเลข 1) เป็นจุดศูนย์กลาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะที่ 2 ตรวจพิสูจน์หาเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1

2.1 การเพาะแยกเชื้อไข้หวัดนก

- เพาะแยกเชื้อไข้หวัดนกจากตัวอย่างด้วยการนำตัวอย่างจากสารละลายสำหรับเก็บรักษาเชื้อไวรัสมาปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นแยกเย็น (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก
- ฉีดตัวอย่างเข้าไข่ไก่ฟักซึ่งเป็นไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free; SPF) และไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดนกที่มีอายุประมาณ 9-11 วัน จำนวน 2 ฟองต่อ 1 ตัวอย่าง และส่องไข่ไก่ฟักเพื่อตรวจดูการมีชีวิตของตัวอ่อนด้วยการส่องดูเงาการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนและการเจริญของหลอดเลือด จากนั้นเจาะรูที่บริเวณช่องว่าง (air cell) และฉีดตัวอย่างปริมาตร 0.15-0.3 มิลลิลิตร ต่อไข่ไก่ 1 ฟอง หลังจากฉีดไข่ไก่ฟักนำไข่ไก่ไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °ซ ต่อไปอีก 72 ชั่วโมง และตรวจดูการมีชีวิตอยู่ของไข่ไก่ฟักโดยการส่องไข่วันละ 2 ครั้ง ไข่ที่ตัวอ่อนตายจะสังเกตเห็นการหยุดเคลื่อนไหวของตัวอ่อนและหลอดเลือดสลายตัว โดยเชื้อไข้หวัดนกสามารถทำให้ตัวอ่อนของไข่ฟักตายภายใน 72 ชั่วโมง เมื่อฟักไข่จนครบ 72 ชั่วโมง จึงเก็บน้ำไข่ฟัก (allantoic fluid) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80 °ซ เพื่อรอการตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกในขั้นต่อไป
- ขั้นตอนนี้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (Biosafety level 3) ที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา

- นำตัวอย่างน้ำไข่ฟักที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อไวรัสทุกตัวอย่างมาตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา โดยการตรวจพิสูจน์หาแอนติเจนด้วยวิธี hemagglutination test (HA) ซึ่งใช้หลักการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของไก่เป็นร่างแหและตกตะกอนให้สังเกตเห็นได้ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำไข่ฟักที่ให้ผลบวกต่อ HA test มาทำให้เชื้อไวรัสตายโดยการใช้ความร้อนด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 56 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (OIE, 2005) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –80 °ซ จนกว่าจะนำไปแยกสกัด RNA เพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาต่อไป
- ขั้นตอนนี้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (Biosafety level 3) ที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกทางอณูชีววิทยา

2.3.1 การสกัด RNA ของเชื้อไข้หวัดนก

- นำตัวอย่างน้ำไข่ฟัก (allantoic fluid) ที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกและตรวจพิสูจน์เชื้อโดยวิธีการฉีดเข้าไข่ไก่ฟักและวิธี HA test มาแยกสกัด RNA ด้วยชุดแยกสกัดสำเร็จรูป QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) โดยอาศัยหลักการแยก RNA ด้วยแผ่น silica gel membrane ได้เป็น RNA ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายไม่น้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ในปริมาตรรวม 60 ไมโครลิตร (วิธีการแยกสกัด RNA ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก)

2.3.2 การเตรียม cDNA จากตัวอย่าง RNA

- สังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสในขั้นตอนต่อไป
- ขั้นตอนการเตรียม cDNA ทำได้โดยเตรียมส่วนผสม RNA และ random primers ดังต่อไปนี้

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
RNA	4 µl	>1.0 µg
0.5 µg Random primers	1 µl	0.1 µg
ปริมาตรรวม	5 µl	

จากนั้นนำสารละลายข้างต้นใส่ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) ที่ตั้งอุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 15 นาที และ 4 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดการจับกันระหว่าง RNA และ random primers หลังจากนั้นเตรียมส่วนผสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase ในการสร้าง cDNA จาก RNA ดังนี้

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
Improm-II ™ 5x Reaction buffer	4.0 µl	1x
25 mM $MgCl_2$	2.0 µl	2.5 mM
5 mM dNTPs	2.0 µl	0.5 mM
Recombinant RNAsin® Ribonuclease Inhibitor	0.3 µl	40.0 U/µl
Improm-II ™ Reverse transcriptase	1.0 µl	1U
Nuclease free water	5.7 µl	
ปริมาตรรวม	15.0 µl	

นำส่วนผสมระหว่าง RNA กับ random primer ที่เตรียมไว้ข้างต้นผสมรวมกับส่วนผสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA และนำไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งอุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5 นาที 42 °ซ เป็นเวลา 60 นาที และ 70 °ซ เป็นเวลา 15 นาที นำ cDNA ที่เตรียมได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อนำไปใช้ตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกในขั้นตอนต่อไป

2.3.3 การตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ด้วยวิธี multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (Multiplex RT-PCR)

- นำ cDNA ต้นแบบมาตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ด้วยวิธี multiplex RT-PCR ตามวิธีของ Payungporn และคณะ (2004) ซึ่งเป็นวิธีที่จำเพาะต่อการตรวจหายีนของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จำนวน 3 ยีน คือ M, H5 และ N1 ในปฏิกิริยาเดียวกัน ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ดังนี้

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
cDNA	1.0 µl	
10 µM ของ primers แต่ละตัว	1.5 µl	0.5 µM
25 mM $MgCl_2$	1.0 µl	1.0 mM
2.5 x Eppendorf MasterMix	10.0 µl	1x
Nuclease free water	11.5 µl	
ปริมาตรรวม	25.0 µl	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากนั้นนำส่วนผสมไปเพิ่มจำนวน DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยการทดลองแต่ละครั้งได้ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) และใช้ cDNA ที่ได้จากตัวอย่าง A/Chicken/Thailand/CU-K2/04 เป็นตัวควบคุมบวก (positive control)

<u>สภาวะเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RT-PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน M, H5 และ N1</u>

1.	Initial denaturation	94 ^{O}ซ	180 วินาที
2.	Denaturation	94 ^{O}ซ	30 วินาที
	Annealing	55 ^{O}ซ	30 วินาที
	Extension	72 ^{O}ซ	30 วินาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 40 รอบ		
3.	Final extension	72 ^{O}ซ	210 วินาที
	Holding temperature	25 ^{O}ซ	

2.3.4 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธีเจลแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)

- เตรียมเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 2% ในสารละลาย 1x Tris borate-EDTA (TBE) จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.2% Orange G loading dye ใน 50% glycerol (Carlo Ebra Reagent ®) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และแยก DNA บนแผ่นเจลโดยการใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นย้อม DNA บนแผ่นเจลด้วยสารเรืองแสงเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล และนำไปตรวจสอบขนาด PCR product ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

2.3.5 การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกด้วยวิธี multiplex RT-PCR

- การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนก ด้วยวิธี multiplex RT-PCR จะให้ผลการตรวจหายีน M, H5 และ N1 ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 276, 189 และ 131 bp ตามลำดับ และแสดงการแปลผลของวิธี multiplex RT-PCR ไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนก โดยวิธี Multiplex PCR

ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนก	ยีน		
	M	H5	N1
เชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1	+	+	+
เชื้อไข้หวัด (ไม่ใช่ H5N1)	+	-	-
เชื้อไข้หวัด สายพันธุ์ H5	+	+	-
เชื้อไข้หวัด สายพันธุ์ N1	+	-	+
ไม่พบเชื้อไข้หวัด และเชื้อไข้หวัดนก H5N1	-	-	-

เครื่องหมาย + หมายถึง ผลบวกของ PCR product ที่มีขนาดจำเพาะต่อยีน M, H5 และ N1

ระยะที่ 3 ศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนก H5N1

เมื่อตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสพบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีน M, H5 และ N1 ในปฏิกิริยา multiplex RT-PCR แล้วจึงนำ DNA นั้นมาถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 โดยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

3.1 **สารพันธุกรรมสังเคราะห์** (oligonucleotide; primers)

สารพันธุกรรมสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 มีทั้งหมด 3 คู่ ซึ่งสามารถเพิ่มขนาดพันธุกรรมได้เป็น 565 bp, 845 bp และ 855 bp ตามลำดับ และยีน NA มีจำนวน 2 คู่ ซึ่งสามารถเพิ่มขนาดพันธุกรรมได้เป็น 609 bp และ 919 bp ตามลำดับ

3.2 การเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 ด้วยปฏิกิริยา PCR

เตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร 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 MgCl2	2 µl	1.0 mM
2.5 x Eppendorf MasterMix	20 µl	1x
Nuclease free water	24 µl	
ปริมาตรรวม	50 µl	

นำส่วนผสมไปเพิ่มจำนวน DNA โดยใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิภายใต้สภาวะเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน H5 และยีน N1 และการทดลองแต่ละครั้งจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ

สภาวะเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน H5

1. Initial denaturation	94 ^{O}ซ	180 วินาที
2. Denaturation	94 ^{O}ซ	30 วินาที
Annealing	50 ^{O}ซ	30 วินาที
Extension	72 ^{O}ซ	90 วินาที
ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 40 รอบ		
3. Final extension	72 ^{O}ซ	210 วินาที
Holding tempurature	25 ^{O}ซ	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สภาวะเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน N1

1. Initial denaturation	94 ^{O}ซ	180 วินาที
2. Denaturation	94 ^{O}ซ	30 วินาที
Annealing	55 ^{O}ซ	30 วินาที
Extension	72 ^{O}ซ	90 วินาที
ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 40 รอบ		
3. Final extension	72 ^{O}ซ	210 วินาที
Holding temperature	25 ^{O}ซ	

3.3 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธีเจลแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า

- เตรียมเจลความเข้มข้น 2% ในสารละลาย 1x Tris borate-EDTA จากนั้นนำ PCR product ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.2% Orange G loading dye ใน 50% glycerol (Carlo Ebra Reagent®) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และหยอดลงในแผ่นเจลหลุมละ 25 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง แยก DNA บนแผ่นเจลโดยการใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45 นาที จากนั้นย้อม DNA บนแผ่นเจลด้วยสารเรืองแสงเอทิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล และนำไปตรวจสอบขนาด PCR product ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

3.4 การสกัดสารพันธุกรรมบริสุทธิ์และถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1

- นำแผ่นเจลที่มี PCR product ขนาดตรงตามที่กำหนด มาตัดเจลในส่วนที่มี PCR product ใส่ในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 2 มิลลิลิตร
- สกัดสารพันธุกรรมออกจากแผ่นเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Perfectprep Gel Cleanup kit® (Eppendorf®, Hamburg, Germany) ซึ่งอาศัยแผ่น glass fiber membrane ในการแยก DNA ออกจากสารอินทรีย์ต่างๆ ที่ปนอยู่ เพื่อให้ได้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ปริมาตร 35 ไมโครลิตร สำหรับใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรม
- นำตัวอย่าง DNA มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร พร้อมกับส่ง forward และ reverse primers ที่จำเพาะต่อยีน H5 และ N1 ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมล อย่างละ 10 ไมโครลิตร นำไปถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ด้วยวิธี dideoxynucleotide chain

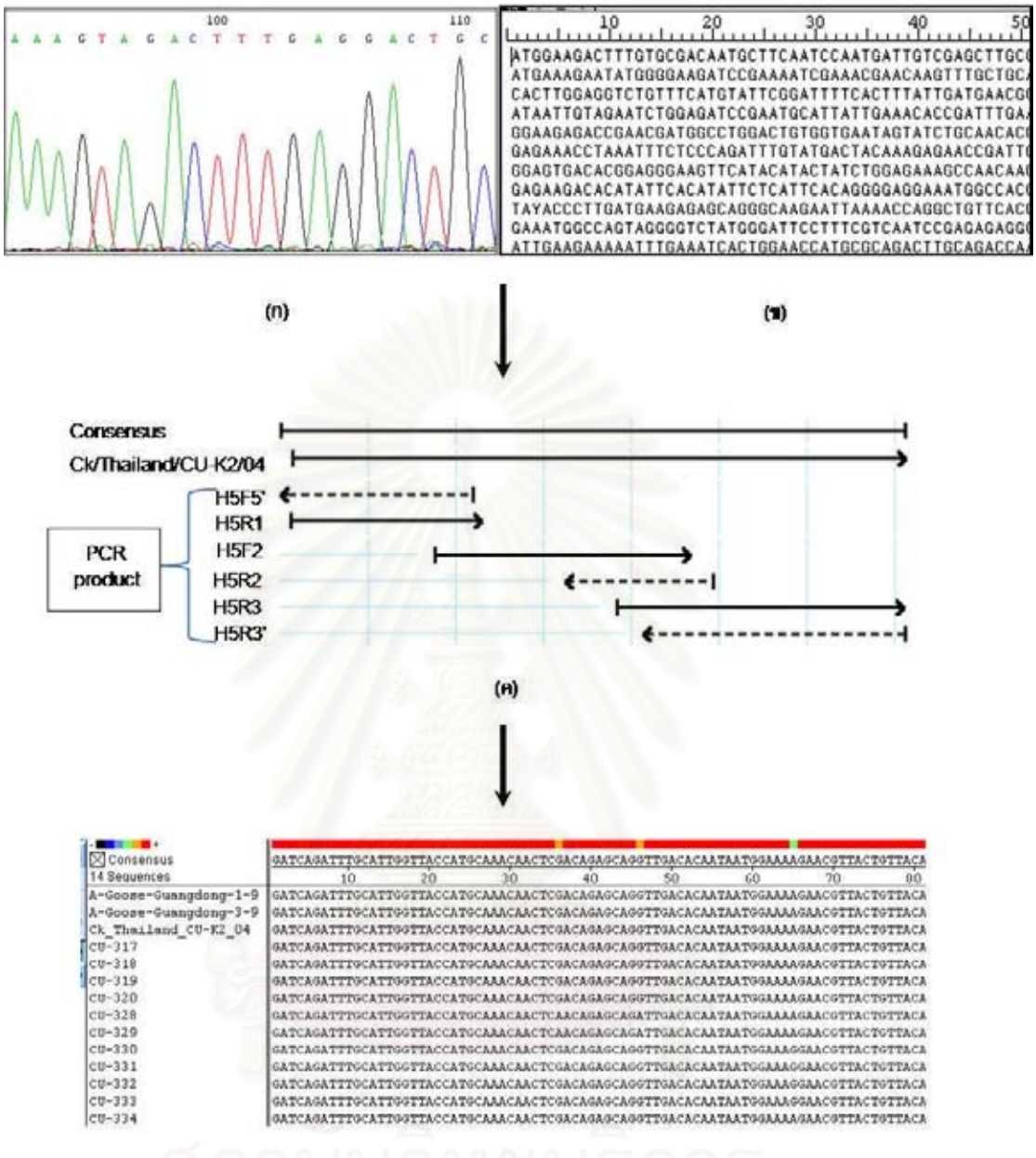
termination ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ/หรือบริษัท macrogen กรุงโซล ประเทศเกาหลีใต้

3.5 ตรวจสอบความถูกต้องและประกอบสายพันธุกรรม

- ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลรหัสพันธุกรรมทุกสายด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Chromas version 1.45 โดยข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้อยู่ในรูปของกราฟ Chromatogram (ABI file) และรหัสพันธุกรรม (Text file)
- ประกอบรหัสพันธุกรรม (assembly) เป็นสายของยีน H5 ขนาดประมาณ 1700 bp และ N1 ขนาดประมาณ1400 bp ด้วยโปรแกรม Seqman (DNASTAR, Madison, WI) (ภาพที่ 6)

3.6 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและหาความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1

- นำข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนก โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับรหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานการระบาดในประเทศไทยและรายงานจากประเทศในทวีปเอเชีย ซึ่งข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดนกมาจากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- หาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ในรูปของ phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining และ bootstrap analysis (1,000 replications) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ClustalX version 2.0 และ Mega version 4.0.1 และอ่านผลในรูปความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่ใช้ในการศึกษาจาก phylogenetic tree
- หาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีไทด์ของยีน H5 และ N1 ด้วยวิธี pair-wise comparison และแสดงผลในรูปเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MegAlign (DNASTAR, Madison, WI)
- เปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกร่วมกับเชื้อไข้หวัดนก ที่มีรายงานในประเทศไทยและประเทศในแถบทวีปเอเชีย เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ ของยีน H5 และ N1 ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ClustalX version 2.0 และ Mega version 4.0.1



ภาพที่ 6 ตัวอย่างการตรวจสอบความถูกต้องและประกอบสายพันธุกรรม ข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้ในรูปกราฟ Chromatogram (ก) ซึ่งอ่านผลโดยโปรแกรม Chromas version 1.45 และในรูป text file (ข) ผลรหัสพันธุกรรมได้จาก forward (F) และ reverse (R) primers ในแต่ละคู่ และตรวจสอบความถูกต้อง ยืนยันรหัสพันธุกรรม และประกอบรหัสพันธุกรรมให้ครบทั้งยีน โดยการใช้โปรแกรม Seqman (ค) จากนั้น วิเคราะห์การเลี่ยนแปลงของสายรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 โดยโปรแกรม Megalign (ง)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA

1.1 2,3-dideoxynucleoside triphosphate (dNTPS), 5mM (Fermentas®, USA)

1.2 Improm-II™ 5x Reaction buffer (Promega, Madison,WI, USA)

1.3 Improm-II™ Reverse transcriptase (Promega, Madison, WI,USA)

1.4 $MgCl_2$, 25 mM (Promega, Madison, WI, USA)

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

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

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

1.8 Ultrapure™ Distilled water DNAse, RNAse free (GIBCO®, USA)

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสและถอดรหัสพันธุกรรมของยีน

2.1 Agarose gel (Molecular grade)

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 % glycerol (Carlo Ebra Reagent®)

2.7 Perfectprep Gel Cleanup kit® (Eppendorf, Hamburg, Germany)

2.8 40x Tris-boric acid – EDTA (TBE) powder (Bio Basic Inc.®, USA)

2.9 Ultra Pure™ Distilled water DNAse, RNAse (GIBCO®, USA)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

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

3.2 Microcentrifuge tube 2 ml

3.3 Micropipette 0.5-2, 2-20, 20-200 and 100-1000 ul (Gilson®, France)

3.4 Micropipette tip 2, 200 และ 1000 ul

3.5 Glass ware

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. เครื่องมือที่ในการวิจัย

4.1 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermo cycler)
(Thermoelectron corporation®, USA)

4.2 เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis system)
(OWL Scientific Inc®, USA)

4.3 เครื่องตรวจสอบขนาดสารพันธุกรรมด้วยแสงอัลตร้าไวโอเล็ต
(UV transilluminator) (Vilber Lourmat®)

4.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Denville Scientific Inc®, USA)

4.5 ตู้รักษาอุณหภูมิ –20^{O} ซ และ –80^{O} ซ

4.6 เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง

5. สารพันธุกรรมสังเคราะห์ (primers) ที่ใช้ในงานวิจัย

สารพันธุกรรมสังเคราะห์สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 3 ชุด ได้แก่

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

5.2 Primers สำหรับการตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนก ด้วยวิธี multiplex RT-PCR ออกแบบโดยอาศัยข้อมูลจาก Payungporn และคณะ (2004) รายละเอียดของรหัสพันธุกรรม และขนาดของ PCR product แสดงไว้ในตารางที่ 3

5.3 Primers สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 เพื่อใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA sequencing) เป็น primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน H5 และ N1 primers ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 5 คู่ โดยยีน H5 ประกอบด้วย primers จำนวน 3 คู่ และยีน N1 ประกอบด้วย primers จำนวน 2 คู่ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะมีขนาด 500-800 bp เพื่อให้เหมาะสมต่อการถอดรหัสพันธุกรรม รายละเอียดของตำแหน่งของ primers ที่จับบนยีน H5 และ N1 และนิวคลีโอไทด์ของ primers แสดงดังภาพที่ 5 และตารางที่ 4

.

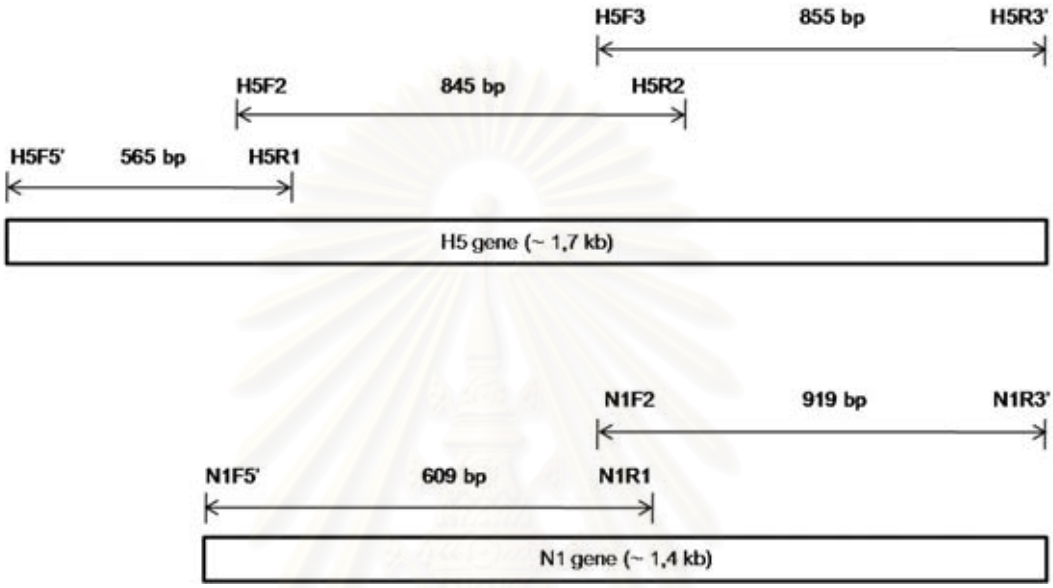
ตารางที่ 3 Primers ที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก ด้วย Multiplex RT-PCR (Payungporn et al., 2004)

Genes	Primer names	Nucleotides	primer site (bp)	PCR product site (bp)
M	MF	5'-TGATCTTCTTGAAAATTTGCAG-3'	22	276
	MR	5'-TGTTGACAAAATGACCATCG-3'	20	
H5	H5F	5'-GACTCAAATGTCAAGAACCTTTA-3'	23	189
	H5R	5'-CCACTTATTTCCTCTCTGTTTAG-3'	23	
N1	N1F	5'-GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC-3'	21	131
	N1R	5'-TGATAGTGTCTGTTATTATGCC-3'	21	

F = Forward primers, R= Reverse primers, bp= base pair

ตารางที่ 4 primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1

Genes	Primer names	Nucleotides	primer site (bp)	primer position	PCR product site (bp)
H5	H5-F5'	5'-AGCAAAAGCAGGGGTCTGATCTG-3'	23	1-23	565
	H5-R1	5'-GCTCCTCTTTATTGTTGGGTATG-3'	23	543-565	
	H5-F2	5'-TGAGAAAATTCAGATCATCCCC-3'	22	409-430	845
	H5-R2	5'-CAACGGCCTCAAACTGAGTGT-3'	21	1233-1253	
	H5-F3	5'-ACTCCAATGGGGGCGATAAAC-3'	21	914-934	855
	H5-R3'	5'-AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTAACTAC-3'	27	1742-1768	
N1	N1-F5'	5'-AGCAAAAGCAGGAGTTTAAAATG-3'	23	1-23	609
	N1-R1	5'-TGATAGTGTCTGTTATTATGCC-3'	22	588-609	
	N1-F2	5'-GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC-3'	21	479-499	919
	N1-R3'	5'-AGTAGAAACAAGGAGTTTTTTGAAC-3'	25	1374-1398	



ภาพที่ 7 ตำแหน่งของ primers และขนาดของ PCR product ที่ใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยครั้งนี้เป็นการตรวจติดตามและศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง โดยการวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างสัตว์ปีกชนิดต่างๆ จำนวน 836 ตัวอย่าง มาเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธีการฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก และตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยอาศัยวิธีทางซีรั่มวิทยา hemagglutination test (HA) และวิธีทางอณูชีววิทยา ผลการศึกษาพบเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จำนวน 12 ตัวอย่าง จากนั้นถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้ร่วมกับเชื้อไวรัสที่เคยพบในประเทศไทยและในต่างประเทศ

1. ข้อมูลตัวอย่างสัตว์ปีกในการศึกษาครั้งนี้

1.1 การศึกษาครั้งนี้เก็บรวบรวมตัวอย่างสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียงในรัศมี 100 กิโลเมตร ที่เคยมีรายงานการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 8 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร ฉะเชิงเทรา นครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี สุพรรณบุรี อยุธยา และอ่างทอง ในระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549–กรกฎาคม พ.ศ. 2550 เป็นระยะเวลา 12 เดือน รายละเอียดของตัวอย่างประกอบด้วย ชนิดสัตว์ปีก จำนวนตัวอย่างจากสัตว์ปีกมีชีวิตและอวัยวะภายในของสัตว์ปีก แสดงไว้ในตารางที่ 5

จากตารางที่ 5 สรุปได้ว่าจำนวนตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 836 ตัวอย่าง เป็นสัตว์ปีกมีชีวิตจำนวน 354 ตัว (42.4 เปอร์เซ็นต์) และอวัยวะภายในของสัตว์ปีกจำนวน 482 ตัว (57.6 เปอร์เซ็นต์) เมื่อแยกตามชนิดสัตว์ปีกมีทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ นกกระทา 333 ตัว (39.8 เปอร์เซ็นต์) ไก่ 192 ตัว (23.0 เปอร์เซ็นต์) นกกระจิบ 118 ตัว (14.1 เปอร์เซ็นต์) นกไก่นา 76 ตัว (9.1 เปอร์เซ็นต์) เป็ด 47 ตัว (5.6 เปอร์เซ็นต์) นกกวัก 33 ตัว (3.9 เปอร์เซ็นต์) นกอีลุ้ม 25 ตัว (3.0 เปอร์เซ็นต์) นกพิราบ 6 ตัว (0.7 เปอร์เซ็นต์) นกเป็ดแดง 3 ตัว (0.6 เปอร์เซ็นต์) นกอัญชัน 2 ตัว (0.2 เปอร์เซ็นต์) และนกอีโก้ง 1 ตัว (0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยตัวอย่างส่วนใหญ่ได้จากตลาดรายใหญ่ในกรุงเทพมหานคร และตลาดสดเทศบาล วัด ร้านค้าริมทางในจังหวัดสุพรรณบุรี ปทุมธานี นนทบุรี อยุธยา นครปฐม ฉะเชิงเทรา และอ่างทอง

ตารางที่ 5 จำนวนตัวอย่างสัตว์ปีกที่เก็บในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียงระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 – กรกฎาคม พ.ศ. 2550

ชนิดสัตว์ปีก	จำนวน		รวม
	สัตว์ปีกมีชีวิต	อวัยวะภายในสัตว์ปีก	
ไก่	189	3	192 (23.0%)
เป็ด	47	-	47 (5.6%)
นกกวัก	-	33	33 (3.9%)
นกอีโก้ง	-	1	1 (0.1%)
นกอีลุ้ม	-	25	25 (3.0%)
นกกระทา	-	333	333 (39.8%)
นกเป็ดแดง	-	3	3 (0.6%)
นกกระจิบ	112	6	118 (14.1%)
นกอัญชัน	-	2	2 (0.2%)
นกพิราบ	6	-	6 (0.6%)
นกไก่นา	-	76	76 (9.1%)
รวม	354 (42.4%)	482 (57.6%)	836 (100%)

2. ข้อมูลตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้

2.1 การตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยการเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธีการฉีดไข่ไก่ฟัก การทดสอบด้วยวิธี HA test และยืนยันผลด้วยการตรวจหายีน M, H5 และ N1 โดยวิธี multiplex RT-PCR โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกมีขนาด PCR product เท่ากับ 276, 189 และ 131 bp ตามลำดับ จึงยืนยันว่าเป็นเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5 และ N1

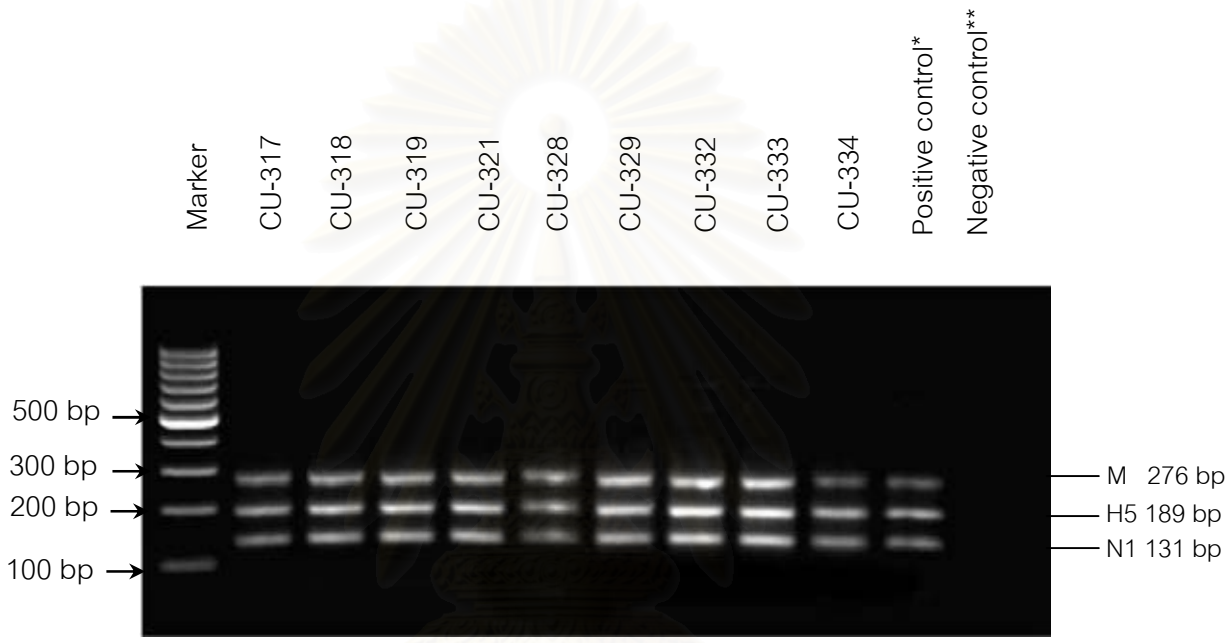
การศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างสัตว์ปีกในช่วงเวลาตั้งแต่เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2549 ถึง กรกฎาคม พ.ศ. 2550 เป็นตัวอย่างสัตว์ปีกรวมจำนวน 836 ตัวอย่าง และให้ผลการตรวจพิสูจน์เป็นเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จำนวน 12 ตัวอย่าง รายละเอียดของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกประกอบด้วย รหัสของตัวอย่าง ชนิดของสัตว์ปีก จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง เวลาที่เก็บตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 6 และ

ตัวอย่างผลของการตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดนกโดยวิธี multiplex RT-PCR ที่ให้ผลบวกต่อยีน M, H5 และ N1 แสดงไว้ในภาพที่ 8

จากตารางที่ 6 สรุปได้ว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากตัวอย่างสัตว์ปีกมีจำนวน 12 ตัวอย่าง (1.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นเชื้อไวรัสที่แยกได้จากนกกระทา 5 ตัวอย่าง (0.6 เปอร์เซ็นต์) เป็ด นกอีลุ้ม และนกไก่นา จำนวนอย่างละ 2 ตัวอย่าง (0.2 เปอร์เซ็นต์ต่อชนิดสัตว์ปีก) และไก่ 1 ตัวอย่าง (0.1 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อแยกตามชนิดตัวอย่างที่เก็บมาพบว่าเป็นเชื้อไวรัสที่แยกได้จากอวัยวะภายในของสัตว์ปีก 9 ตัวอย่าง (1.9 เปอร์เซ็นต์) และสัตว์ปีกมีชีวิต 3 ตัวอย่าง (0.8 เปอร์เซ็นต์) โดยเชื้อไวรัสที่แยกได้จากจังหวัดปทุมธานี 7 ตัวอย่าง (5.3 เปอร์เซ็นต์) กรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง (1.0 เปอร์เซ็นต์) และสุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง (0.9 เปอร์เซ็นต์) เมื่อแยกตามเวลาที่เก็บตัวอย่างพบตัวอย่างในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2549 จำนวน 5 ตัวอย่าง (10.9 เปอร์เซ็นต์) ธันวาคม พ.ศ. 2549 จำนวน 5 ตัวอย่าง (18.5 เปอร์เซ็นต์) และมกราคม พ.ศ. 2550 จำนวน 2 ตัวอย่าง (3.5 เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 6 ข้อมูลตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่แยกจากตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในการศึกษาครั้งนี้

รหัสของตัวอย่าง	ชนิดของสัตว์ปีก	ชนิดตัวอย่าง	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	เวลาที่เก็บตัวอย่าง
CU-317	นกไก่นา	อวัยวะภายใน	สุพรรณบุรี	พ.ย. 2549
CU-318	นกไก่นา	อวัยวะภายใน	สุพรรณบุรี	พ.ย. 2549
CU-319	นกอีลุ้ม	อวัยวะภายใน	ปทุมธานี	พ.ย. 2549
CU-320	นกกระทา	อวัยวะภายใน	ปทุมธานี	พ.ย. 2549
CU-321	ไก่	สัตว์ปีกมีชีวิต	กรุงเทพมหานคร	พ.ย. 2549
CU-330	นกกระทา	อวัยวะภายใน	ปทุมธานี	ธ.ค. 2549
CU-331	นกกระทา	อวัยวะภายใน	ปทุมธานี	ธ.ค. 2549
CU-332	นกกระทา	อวัยวะภายใน	ปทุมธานี	ธ.ค. 2549
CU-333	นกกระทา	อวัยวะภายใน	ปทุมธานี	ธ.ค. 2549
CU-334	นกอีลุ้ม	อวัยวะภายใน	ปทุมธานี	ธ.ค. 2549
CU-328	เป็ด	สัตว์ปีกมีชีวิต	กรุงเทพมหานคร	ม.ค. 2550
CU-329	เป็ด	สัตว์ปีกมีชีวิต	กรุงเทพมหานคร	ม.ค. 2550



* ตัวควบคุมบวก คือ A/Thailand/Nakorn-Pathom/CU-K2/04

** ตัวควบคุมลบ คือ น้ำกลั่น

ภาพที่ 8 แสดงตัวอย่างผลการตรวจโดยวิธี multiplex RT-PCR ที่ให้ผลบวกต่อยีน M, H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

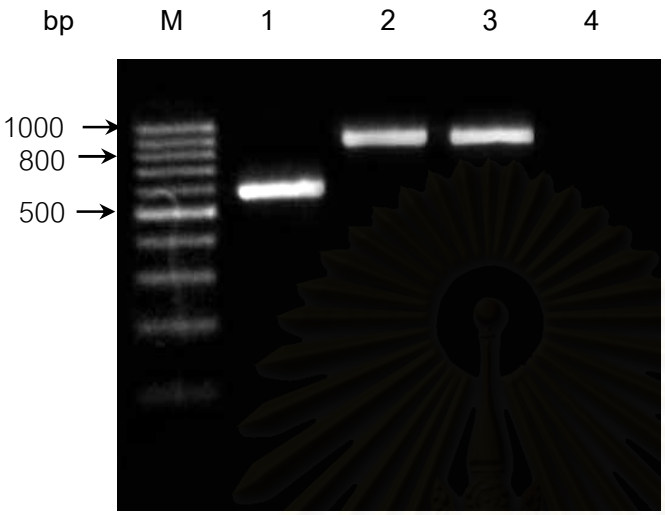
3. ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1

การศึกษารหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 โดยการนำตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่ให้ผลบวกต่อยีน M, H5 และ N1 จากวิธี multiplex RT-PCR มาเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน H5 และ N1 โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนทั้งสองชนิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (ตัวอย่างผลจากวิธี PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 ได้แสดงไว้ในภาพที่ 9) จากนั้นนำ PCR product ไปถอดรหัสพันธุกรรมด้วยวิธี dideoxynucleotide chain termination ผลข้อมูลการถอดรหัสพันธุกรรมที่ได้อยู่ในรูปกราฟ chromatogram และ text file นำรหัสพันธุกรรมที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องโดยการตรวจสอบลักษณะกราฟและนิวคลีโอไทด์ที่ระบุมาว่าถูกต้องหรือไม่ด้วยโปรแกรม Chromas version 1.45 และยืนยันผลของรหัสพันธุกรรมที่ได้จากการใช้ forward และ reverse primer ในแต่ละคู่เปรียบเทียบกัน จากนั้นนำรหัสพันธุกรรมที่ได้จาก primer แต่ละคู่มาประกอบให้ครบตลอดทั้งยีน H5 และ N1 โดยการใช้โปรแกรม Seqman (DNASTAR®)

การศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ทั้งหมด 24 เส้น (จำนวน 12 ตัวอย่าง) และนำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล Genbank ผ่านทาง http://www.ncbi.nlm.nih.gov รายละเอียดรหัสพันธุกรรมดังแสดงในตารางที่ 7

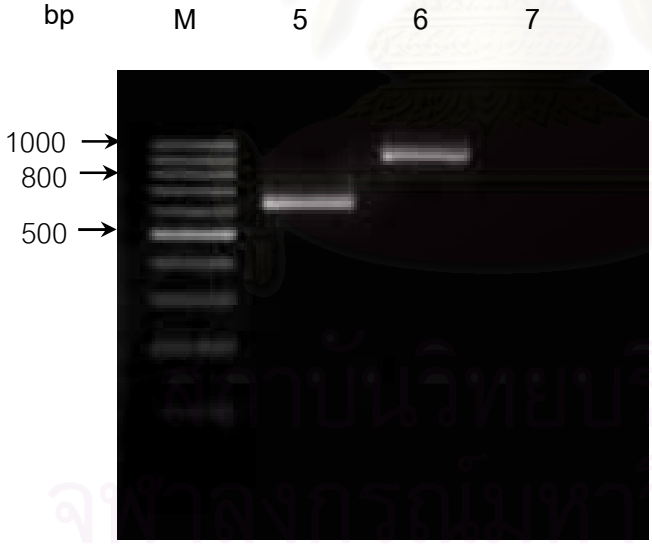
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก) แสดงตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่ให้ผลบวกในการเพิ่มจำนวนยีน H5 โดยการใช้ primer จำนวน 3 คู่



Lane 1; H5F5'/H5R1 = 565 bp
Lane 2; H5F2/H5R2 = 845 bp
Lane 3; H5F3/H5R3' = 855 bp
Lane 4; negative control
M; DNA ladder

(ข) แสดงตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่ให้ผลบวกในการเพิ่มจำนวนยีน N1 จาก primer จำนวน 2 คู่



Lane 5; N1F5'/N1R1 = 609 bp
Lane 6; N1F2/N1R3' = 919 bp
Lane 7; negative control
M; DNA ladder

ภาพที่ 9 รูปเจลแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าของตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1

ตารางที่ 7 แสดงรายละเอียดของรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนก จำนวน 12 ตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	ชนิดสัตว์ปีก	ปีที่เก็บตัวอย่าง (พ.ศ.)	ขนาดของยีน (bp)		หมายเลขของรหัสพันธุกรรมในฐานข้อมูล Genbank*	
			H5	N1	H5	N1
CU-317	นกไก่นา	2549	1667	1352	EU616825	EU616826
CU-318	นกไก่นา	2549	1709	1343	EU616827	EU616828
CU-319	นกอีลุ้ม	2549	1676	1333	EU616829	EU616830
CU-320	นกกระทา	2549	1693	1352	EU616831	EU616832
CU-321	ไก่	2549	1673	1339	EU616833	EU616834
CU-330	นกกระทา	2549	1719	1320	EU616851	EU616852
CU-331	นกกระทา	2549	1667	1348	EU616859	EU616860
CU-332	นกกระทา	2549	1715	1340	EU616867	EU616868
CU-333	นกกระทา	2549	1710	1322	EU616875	EU616876
CU-334	นกอีลุ้ม	2549	1714	1320	EU616883	EU616884
CU-328	เป็ด	2550	1696	1323	EU616835	EU616836
CU-329	เป็ด	2550	1707	1320	EU616843	EU616844

* รายละเอียดของรหัสพันธุกรรมที่แสดงในฐานข้อมูล Genbank แสดงในภาคผนวก ค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง

การศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกด้วยวิธี pair-wise comparison จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Megalign (DNASTAR®) ซึ่งสามารถบอกความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกเป็นเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (percentage of similarity) ของนิวคลีโอไทด์บนยีน H5 และ N1 และศึกษาความสัมพันธ์ในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี cluster analysis จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ClustalX version 2.0 และ Mega version 4.0.1 ซึ่งจัดกลุ่มของเชื้อไข้หวัดนกที่มีลักษณะใกล้เคียงกันไว้ด้วยกันและแสดงถึงวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้จำนวน12 ตัวอย่าง ร่วมกับเชื้อไข้หวัดนกที่เคยมีการระบาดในประเทศไทยในปีต่างๆ รวมทั้งวิเคราะห์ร่วมกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศต่างๆ ในแถบทวีปเอเชียที่อยู่ในฐานข้อมูล Genbank

4.1 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์บนยีน H5 และ N1

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่ามีความคล้ายกันของยีน H5 และ N1 มากกว่า 98.5 เปอร์เซ็นต์ และ 97.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์หาความคล้ายของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกในแต่ละจังหวัดพบว่าเชื้อไข้หวัดนกจากจังหวัดปทุมธานีจำนวน 7 ตัวอย่าง มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันมากกว่า 98.9 เปอร์เซ็นต์ และ 98.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากกรุงเทพมหานครจำนวน 3 ตัวอย่าง มีค่าระหว่าง 98.2-98.6 เปอร์เซ็นต์ และ 97.6-99.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสุพรรณบุรีจำนวน 2 ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 99.5 เปอร์เซ็นต์ และ 99.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 แยกตามชนิดสัตว์ปีกนั้นสามารถวิเคราะห์ได้ในกรณีที่มีสัตว์ปีกชนิดเดียวกันจำนวน 2 ตัวอย่างขึ้นไป จากผลการวิเคราะห์พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่พบในนกกระทาจำนวน 5 ตัวอย่าง มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันมากกว่า 99.0 เปอร์เซ็นต์ และ 98.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นกไก่นาจำนวน 2 ตัวอย่าง มีค่าเท่ากับ 99.5 เปอร์เซ็นต์ และ 99.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นกอีลุ้มจำนวน 2 ตัวอย่าง มีค่าเท่ากับ 99.2 เปอร์เซ็นต์ และ 98.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รายละเอียดผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์ของยีน H5 และ N1 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8 และ 9

การวิเคราะห์เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จำนวน 12 ตัวอย่าง กับเชื้อไข้หวัดนกที่คาดว่าเป็นเชื้อไวรัสต้นกำเนิดของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในประเทศแถบเอเชีย คือ A/Goose/Guangdong/1/96 พบว่าเชื้อไข้หวัดนกทั้ง 12 ตัวอย่าง มีความคล้ายกันของยีน H5 และ N1 คิดเป็น 95.7-96.7 เปอร์เซ็นต์ และ 94.5-95.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกที่เคยพบในประเทศไทยเมื่อต้นปี พ.ศ. 2547 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) และปี พ.ศ. 2548 (A/Chicken/Thailand /CU-162/05) และปี พ.ศ. 2549 (A/Chicken /Thailand/NP-172/06) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันของยีน H5 มากกว่า 98.0, 98.5 และ 95.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยีน N1 มากกว่า 98.2, 98.3 และ 94.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ของยีน H5 ของเชื้อไข้หวัดนก จำนวน 12 ตัวอย่าง

Virus	CU-317	CU-318	CU-319	CU-320	CU-321	CU-330	CU-331	CU-332	CU-333	CU-334	CU-328	CU-329
CU-317		99.5	99.4	99.0	99.4	98.8	98.9	98.8	98.8	99.1	99.1	98.4
CU-318			99.2	99.1	99.1	98.9	98.9	99.0	98.9	99.2	98.9	98.1
CU-319				98.9	99.3	98.9	99.0	98.9	98.9	99.2	98.6	98.3
CU-320					98.8	99.2	99.0	99.1	99.1	99.1	98.2	97.8
CU-321						99.4	99.4	99.3	99.4	99.3	98.6	98.1
CU-330							99.8	99.8	99.9	99.6	98.0	97.7
CU-331								99.8	99.8	99.6	98.0	97.7
CU-332									99.8	99.6	98.0	97.7
CU-333										99.6	98.0	97.7
CU-334											98.3	98.0
CU-328												99.3
CU-329												

วิเคราะห์รหัสพันธุกรรมในตำแหน่งที่ 49-1667

ตารางที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ของยีน N1 ของเชื้อไข้หวัดนก จำนวน 12 ตัวอย่าง

Virus	CU-317	CU-318	CU-319	CU-320	CU-321	CU-330	CU-331	CU-332	CU-333	CU-334	CU-328	CU-329
CU-317		99.8	99.5	99.9	99.5	98.9	98.9	98.7	98.8	98.6	98.3	98.0
CU-318			99.4	99.8	99.4	99.0	98.9	98.9	98.9	98.8	98.4	98.2
CU-319				99.5	99.8	98.6	98.6	98.4	98.5	98.3	97.8	97.6
CU-320					99.5	98.8	98.9	98.6	98.7	98.6	98.2	97.9
CU-321						98.7	98.8	98.6	98.6	98.5	97.8	97.6
CU-330							99.5	99.8	99.9	99.8	97.7	97.5
CU-331								99.5	99.4	99.4	97.6	97.4
CU-332									99.9	99.9	97.6	97.3
CU-333										99.8	97.6	97.4
CU-334											97.5	97.3
CU-328												99.8
CU-329												

วิเคราะห์รหัสพันธุกรรมในตำแหน่งที่ 5-1320

ตารางที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 12 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนก A/Goose/Guangdong /1/96 และเชื้อไข้หวัดนกที่เคยพบในประเทศไทยเมื่อต้นปี พ.ศ. 2547 (A/Chicken /Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) และปี พ.ศ. 2548 (A/Chicken/Thailand /CU-162/05) และปี พ.ศ. 2549 (A/Chicken /Thailand/NP-172/06)

Virus	Nucleotide identity (%)							
	Gs/1/96[a]		CU-K2/04[b]		CK-162/05[c]		NP-172/06[d]	
	H5	N1	H5	N1	H5	N1	H5	N1
CU-317	96.7	95.6	99.1	99.5	99.8	99.0	96.6	95.7
CU-318	96.5	95.7	98.8	99.7	99.6	99.2	96.3	95.8
CU-319	96.2	95.1	98.6	99.1	99.4	98.5	96.3	95.2
CU-320	96.0	95.4	98.3	99.5	98.9	98.9	95.9	95.6
CU-321	96.2	95.2	98.6	99.2	99.4	98.5	96.3	95.4
CU-330	95.7	94.5	98.0	98.4	98.8	98.9	95.9	94.7
CU-331	95.7	95.2	98.0	98.2	98.8	98.8	95.9	94.5
CU-332	95.7	95.1	98.0	99.0	98.8	98.5	95.9	95.3
CU-333	95.7	95.1	98.0	98.9	98.8	98.5	95.9	95.2
CU-334	95.9	95.0	98.3	98.8	99.0	98.4	96.0	95.2
CU-328	96.1	95.1	99.3	98.9	99.1	98.5	96.0	95.1
CU-329	95.6	94.9	99.0	98.8	98.5	98.3	95.6	95.1

หมายเหตุ วิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน H5 ในตำแหน่งที่ 49-1667 และวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน N1 ในตำแหน่งที่ 25-1320

[a] Gs/1/96 : Goose/Guangdong/1/96

[b] CU-K2/04 : Chicken/Thailand/CU-K2/04

[c] CK-162/05 : Chicken/Thailand/CK-162/05

[d] NP-172/06 : Chicken/Thailand/NP-172/06

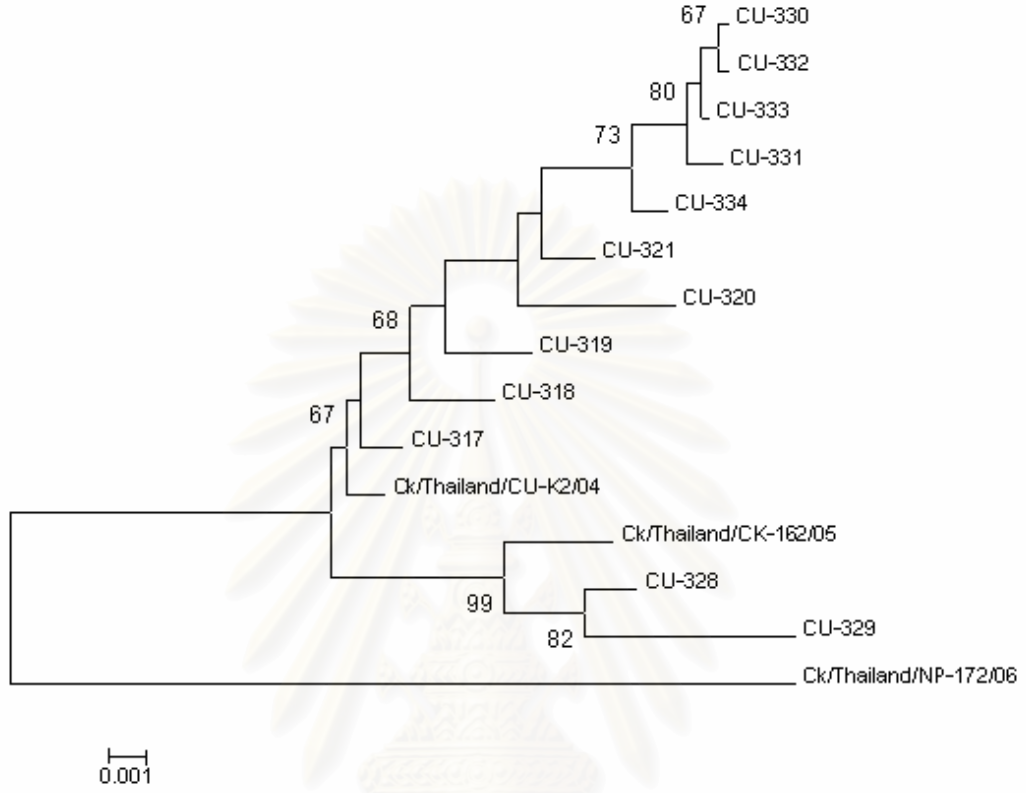
4.2 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1

ผลการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน HA และ NA ของเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง พบว่าเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 12 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (มีลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ใกล้เคียงกัน) และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้กับเชื้อไข้หวัดนกที่เคยพบในประเทศไทยเมื่อต้นปี พ.ศ. 2547 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) และปี พ.ศ. 2548 (A/Chicken/Thailand /CU-162/04) และปี พ.ศ. 2549 (A/Chicken/Thailand/NP-172/06) พบว่าเชื้อไข้หวัดนกในประเทศจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (ภาพที่ 10 และ 11)

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไข้หวัดนก 12 ตัวอย่าง กับเชื้อไข้หวัดนกที่มีรายงานในประเทศต่างๆ แถบทวีปเอเชีย พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่พบจากการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสที่พบในประเทศไทยและเวียดนามช่วงปี ค.ศ. 2004-2005 แต่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสที่พบในประเทศอินโดนีเซียปี ค.ศ. 2004-2005 และประเทศจีนทางตอนใต้ในปี ค.ศ. 1996-1997 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเชื้อไวรัสได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ เชื้อไวรัสในกลุ่มของประเทศไทยและเวียดนาม เชื้อไวรัสในกลุ่มอินโดนีเซีย และเชื้อไวรัสในกลุ่มประเทศจีนตอนใต้ ดังแสดงในภาพที่ 12 และ 13

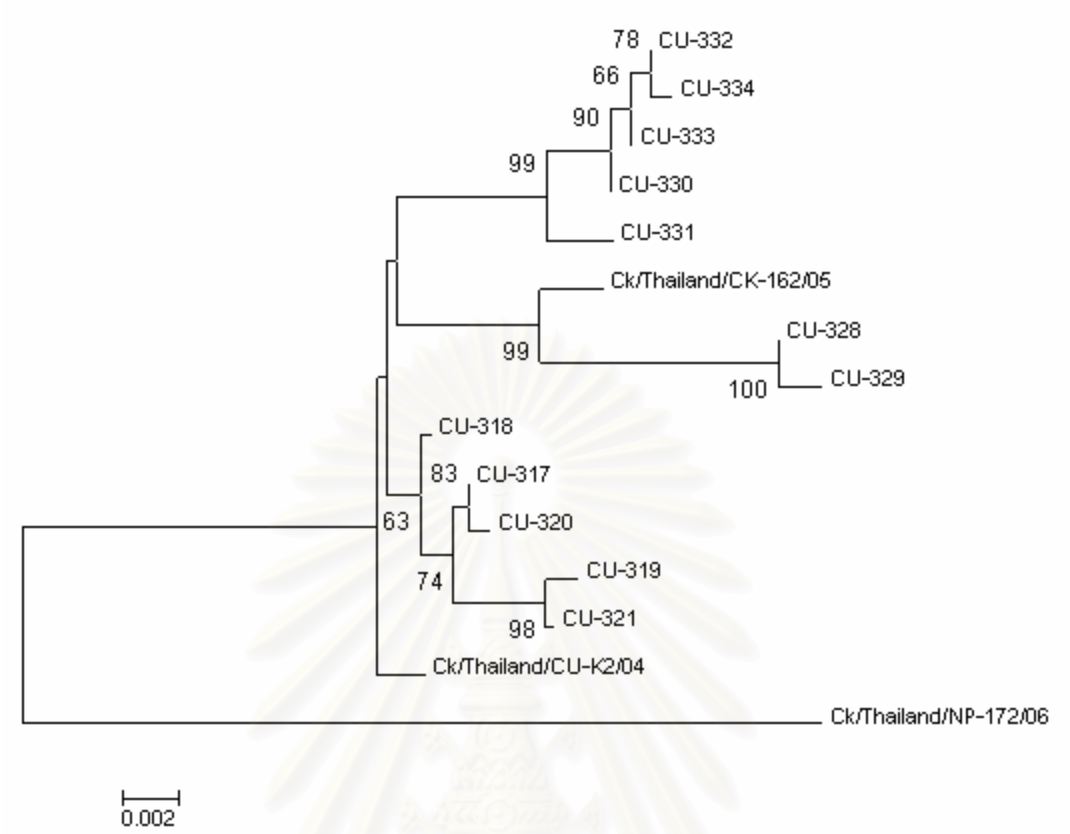
อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้เชื้อไข้หวัดนกที่นำมาศึกษาทั้งหมดเป็นเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 กลุ่ม genotype Z และเป็น genotype เดียวกันกับเชื้อที่พบในหลายประเทศในเอเชีย เช่น ประเทศจีน เวียดนาม อินโดนีเซีย ฮ่องกง รวมทั้งเชื้อที่พบในยุโรปและแอฟริกา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



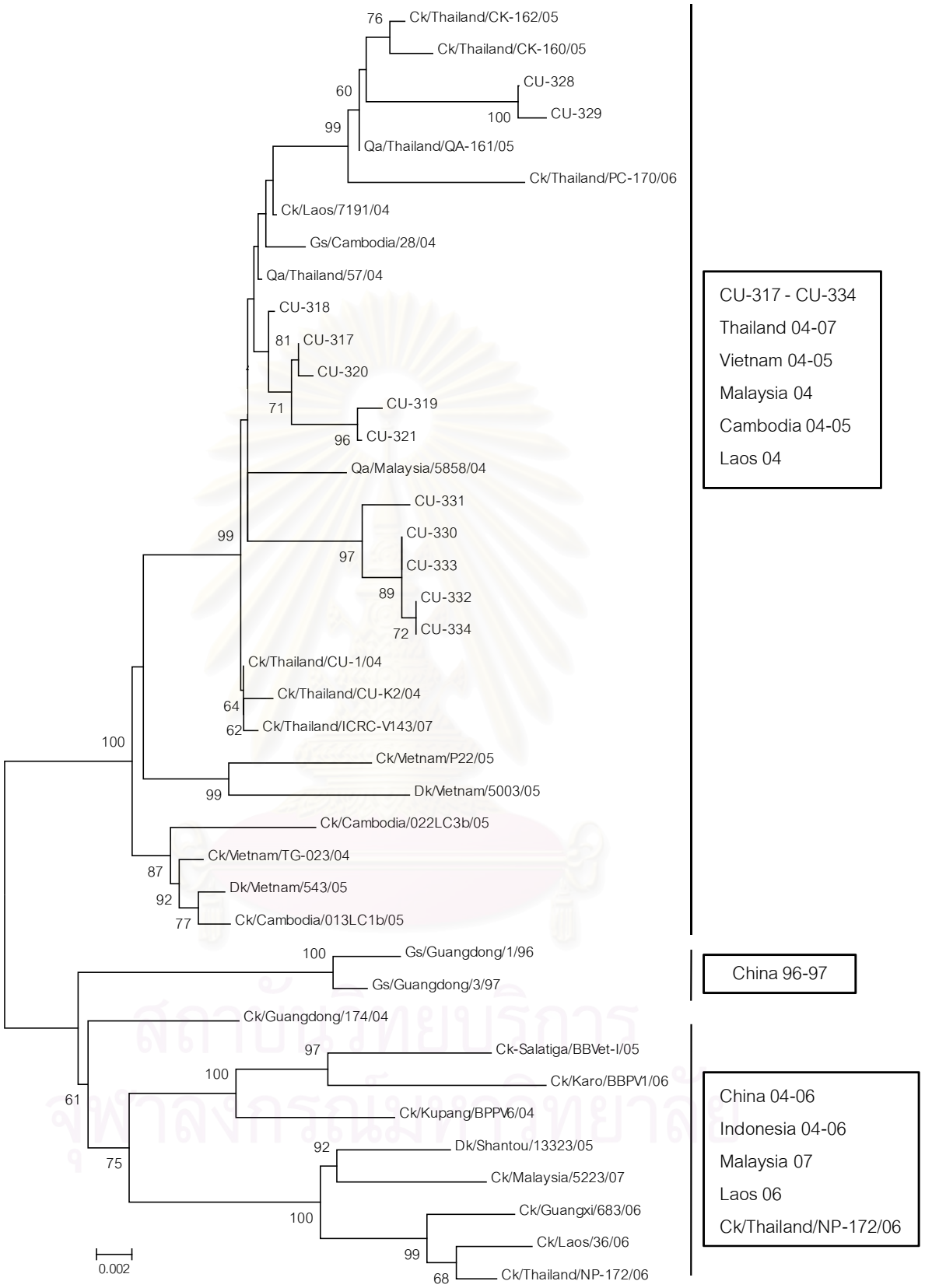
* ผลการวิเคราะห์ Bootstrap analysis แสดงเป็นตัวเลขบนแต่ละกิ่งและความยาวของเส้นแนวขวาง (horizontal lines) เป็นค่าสัดส่วนความแตกต่างของจำนวนนิวคลีโอไทด์ และในแต่ละกิ่งแทนด้วยชื่อของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ภาพที่ 10 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ในรูปแบบ phylogenetic analysis ของยีน H5 ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 49-1667 bp ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้กับเชื้อไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2547 (Chicken/Nakon-Pathom/Thailand/CU-K2/04) ปี พ.ศ. 2548 (Chicken/Nontaburi/Thailand/CK-162/05) และปี พ.ศ. 2549 (Chicken/Thailand/NP-172/2006)

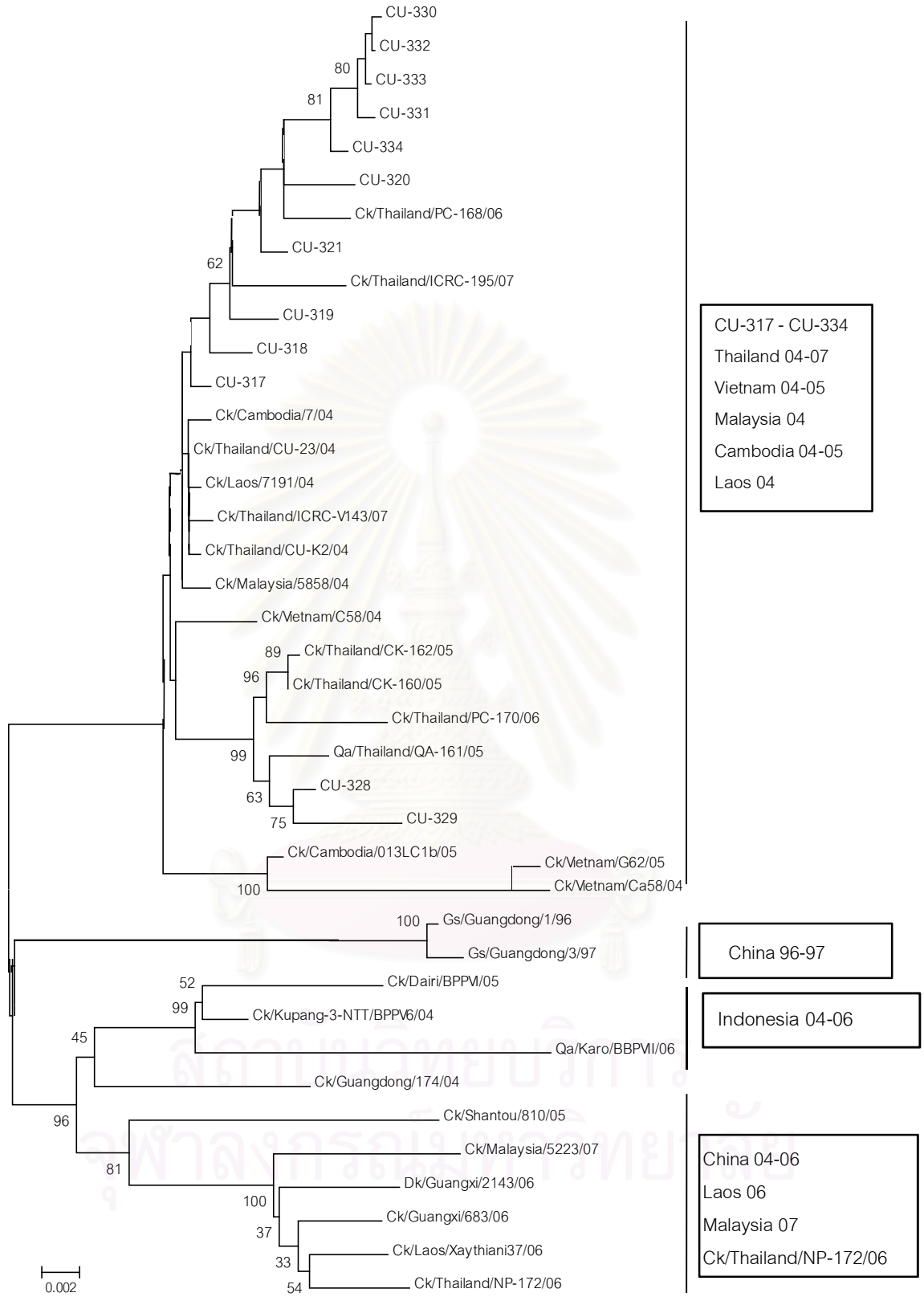


* ผลการวิเคราะห์ Bootstrap analysis แสดงเป็นตัวเลขบนแต่ละกิ่งและความยาวของเส้นแนวขวาง (horizontal lines) เป็นค่าสัดส่วนความแตกต่างของจำนวนนิวคลีโอไทด์ ในแต่ละกิ่งแทนด้วยชื่อของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ภาพที่ 11 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ในรูปแบบ phylogenetic analysis ของยีน N1 ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 25-1320 bp ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้กับเชื้อไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2547 (Chicken/Nakon-Pathom/Thailand/CU-K2/04) ปี พ.ศ. 2548 (Chicken/Nontaburi/Thailand/CK-162/05) และปี พ.ศ. 2549 (Chicken/Thailand/NP-172/2006)



ภาพที่ 12 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 ระหว่างเชื้อไข้หวัดนกในการศึกษาและที่เคยมีรายงานในทวีปเอเชีย ในปี ค.ศ. 2004-2007 ในรูปแบบ phylogenetic analysis



ภาพที่ 13 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน N1 ระหว่างเชื้อไข้หวัดนกในการศึกษาและที่เคยมีรายงานในทวีปเอเชีย ในปี ค.ศ. 2004-2007 ในรูปแบบ phylogenetic analysis

5. ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบนยีน H5 และ N1

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งที่มีความสำคัญของแต่ละยีน โดยวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมและลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสจำนวน 12 ตัวอย่าง ร่วมกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่เคยมีรายงานในประเทศต่างๆ ด้วยโปรแกรม ClustalX version 2.0 และ Mega version 4.0.1

5.1 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน H5

ยีน HA ของเชื้อไข้หวัดนกเป็นยีนที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อไวรัสในการเกิดโรคทั้งในสัตว์ปีกและคน การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของยีน HA ในจุดต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อความรุนแรงในการเกิดโรคได้แก่ 1.) Connecting peptide sequence (HA cleavage site) ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 320-330 2.) Receptor binding site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 222-224 และ 3.) Glycosylation site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 154-156

HA cleavage site

การเรียงตัวของกรดอะมิโนที่บริเวณ HA cleavage site สามารถใช้บ่งบอกถึงความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อไข้หวัดนก โดยพบว่าเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงต่ำจะมีลักษณะของกรดอะมิโนชนิดเบสที่บริเวณ HA cleavage site แบบ single basic amino acid แต่ในเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงสูงจะมีการเรียงตัวแบบ multiple basic amino acids (Wilschut and McElhaney, 2005)

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากตัวอย่างสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสด มีลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน cleavage site ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 320-330 เป็นแบบกรดอะมิโนชนิดเบสหลายตัว (multiple basic amino acids) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ในเชื้อไข้หวัดนกชนิดก่อโรครุนแรง (Highly Pathogenic Avian Influenza; HPAI) การศึกษาครั้งนี้สามารถแบ่งการเรียงตัวของกรดอะมิโนลักษณะดังกล่าวออกเป็น 2 แบบ คือ SPQRERRRKKR และ SPQREKRRKRR ดังแสดงในตารางที่ 11 และภาพที่ 14 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่บริเวณตำแหน่งที่ 320-330 บนยีน HA (HA cleavage site) โดยการเรียงตัวแบบ SPQRERRRKKR พบได้ในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากตัวอย่างสัตว์ปีก 11 ตัวอย่าง แบ่งเป็นนกกระทา (*n*=5) นกไก่นา (*n*=2) นกอีลุ้ม (*n*=2) เป็ด (*n*=1) และไก่ (*n*=1) และการเรียงตัวในลักษณะ SPQREKRRKRR พบได้ในเป็ด 1 ตัวอย่าง

อย่างไรก็ตามจะพบว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน HA cleavage site แบบ SPQRERRRKKR สามารถพบได้ในเชื้อไข้หวัดนกที่รายงานในประเทศจีน (ปี ค.ศ.1996-1997) ประเทศเวียดนาม อินโดนีเซียใน (ปี ค.ศ. 2004-2005) และการเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ SPQREKRRKRR สามารถพบได้ในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากเหยี่ยวที่ถูกส่งจากประเทศไทยไปยังประเทศเบลเยี่ยม (A/crested_eagle/Belgium/01/2004) และเชื้อที่แยกได้จากไก่และนกกระทาในประเทศไทย (ภาพที่ 14) และเมื่อนำลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนชนิดเบสหลายตัวแบบ SPQREKRRKRR ไปเปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (Genbank) พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่พบลักษณะการเรียงตัวแบบดังกล่าวข้างต้นสามารถพบได้ในเป็ด ไก่ อีกา นกกระทา นกนางนวล นกปากห่าง และเสือ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบการเรียงตัวของกรดอะมิโนชนิดเบสหลายตัวดังกล่าวในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้เช่นกัน

Receptor binding site

เชื้อไข้หวัดนกมีความสามารถก่อโรคในสัตว์หลายชนิด ส่วนหนึ่งมีผลจากตำแหน่ง receptor binding site รายงานปัจจุบันพบลักษณะของกรดอะมิโนบน receptor binding site แตกต่างกันซึ่งมีความความจำเพาะต่อการจับบน oligosaccharide receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ของโฮสต์ โดยเชื้อไข้หวัดนกที่ก่อโรคในสัตว์ปีกมีกรดอะมิโนชนิด glutamine (Q) และ glycine (G) ที่ตำแหน่ง 222 และ 224 บนยีน HA (Vines et al., 1998)

ผลการศึกษา receptor binding site ของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 222 และ 224 (Q222-G224) (ตารางสรุปที่ 11) และเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างเชื้อไวรัสจากประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชีย คือ จีน เวียดนาม อินโดนีเซีย พบว่าเชื้อไวรัสยังมีลักษณะของกรดอะมิโน Q และ G ที่ตำแหน่ง 222-224 ตามลำดับ เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของ receptor binding site ของเชื้อไข้หวัดนกที่ก่อโรคในสัตว์ปีก (ภาพที่ 13)

N-link glycosylation site

ตำแหน่งของ glycosylation site บนโปรตีน HA ประกอบด้วยสายคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อด้วยพันธะ N-glycosidic linkage (Lamb and Choppin,1983) โดยตำแหน่งดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อไวรัส (Hulse et al., 2004) โดยเฉพาะ glycosylation site ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกับ receptor binding site เช่น glycosylation site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 154-156

เชื้อไข้หวัดนกที่รายงานในประเทศจีนและฮ่องกงช่วงปี ค.ศ. 1996-1997 ประเทศในแถบยุโรปปี ค.ศ. 2004-2005 และเชื้อไวรัสบางตัวในประเทศอินโดนีเซีย (Quail/Tasikmalaya /BPPV4/04) ไม่พบ glycosylation site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 154-156 อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้พบกรดอะมิโน asparagine (N) threorine (T) และ serine (S) บน glycosylation site ตำแหน่งที่ 154-156 ในทุกตัวอย่างของเชื้อไข้หวัดนก (แสดงดังตารางสรุปที่ 11 และภาพที่ 16)

5.2 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน N1

NA stalk region

โปรตีน NA มีรูปร่างคล้ายเห็ด (mushroom) ซึ่งประกอบด้วยส่วนหัว และก้าน (stalk region) (Lamb and Choppin, 1983) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน stalk region ของยีน NA ส่งผลให้ไวรัสมีการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมใหม่และมีคุณสมบัติที่ทำให้ไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อไปยังสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้ (Bender et al., 1999; Suzuki, 2005)

จากการศึกษาครั้งนี้พบการลดจำนวนของกรดอะมิโนจำนวน 20 ตัว (20-amino acid deletion) ที่ตำแหน่ง 49-68 ของ NA stalk region ในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา (ตารางสรุปที่ 12) และวิเคราะห์เปรียบเทียบกับตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกในต่างประเทศตั้งแต่ปี ค.ศ. 2004 เป็นต้นมา พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ต่างไปจากเชื้อไข้หวัดนกจากจีนในปี ค.ศ. 1996-1997 (Gs/Gd/96 lineage) ซึ่งไม่พบการลดจำนวนของกรดอะมิโนที่บริเวณ NA stalk region (ภาพที่ 17)

NA active site

NA active site เป็นตำแหน่งที่อยู่บนส่วนหัวของโปรตีน NA ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน NA active site มีผลทำให้เชื้อไวรัสดื้อต่อยาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ neuraminidase (Moscona, 2005) ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน NA active site ที่มีผลต่อการดื้อยา oseltamivir จากผลการศึกษายังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 119, 275, 293 และ 295 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 12 ตัวอย่าง (ตารางสรุปที่ 12) เช่นเดียวกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในจีนตอนใต้ (Gs/Gd/96 lineage) อินโดนีเซีย และเวียดนาม ปี ค.ศ. 2004-2005 ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณ NA active site เช่นกัน (ภาพที่ 18, 19 และ 20) จึงกล่าว

ได้ว่าเชื้อไข้หวัดนกที่พบในประเทศไทย เวียดนาม อินโดนีเซีย และจีน มีความไวต่อยาฆ่าเชื้อไข้หวัด oseltamivir

ตารางที่ 11 สรุปผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน H5

ชื่อไวรัส	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของยีน H5*				
	Cleavage site	Receptor binding site		N-link glycosylation site	
	320-330	222	224	154-156	
Goose/Guangdong/1/96	SPQRERRRKKR	Q	G	-	(NSA)
Chicken/Thailand/CU-K2/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Chicken/Thailand/Ck-162/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Chicken/Thailand/NP-172/06	SPLRERRRKXX	Q	G	NNT	
Thailand/CU-317/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-318/06	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-319/06	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-320/06	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-321/06	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-330/06	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-331/06	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-332/06	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-333/06	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-334/06	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-328/07	SPQRERRRKKR	Q	G	NST	
Thailand/CU-329/07	SPQREKRRKKR	Q	G	NST	

* ชื่อเต็มของกรดอะมิแต่ละชนิดโนสามารถดูได้ที่ภาคผนวก

** การเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ SPQRERRRKKR พบจำนวน 11 ตัวอย่าง

*** การเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ SPQREKRRKKR พบจำนวน 1 ตัวอย่าง

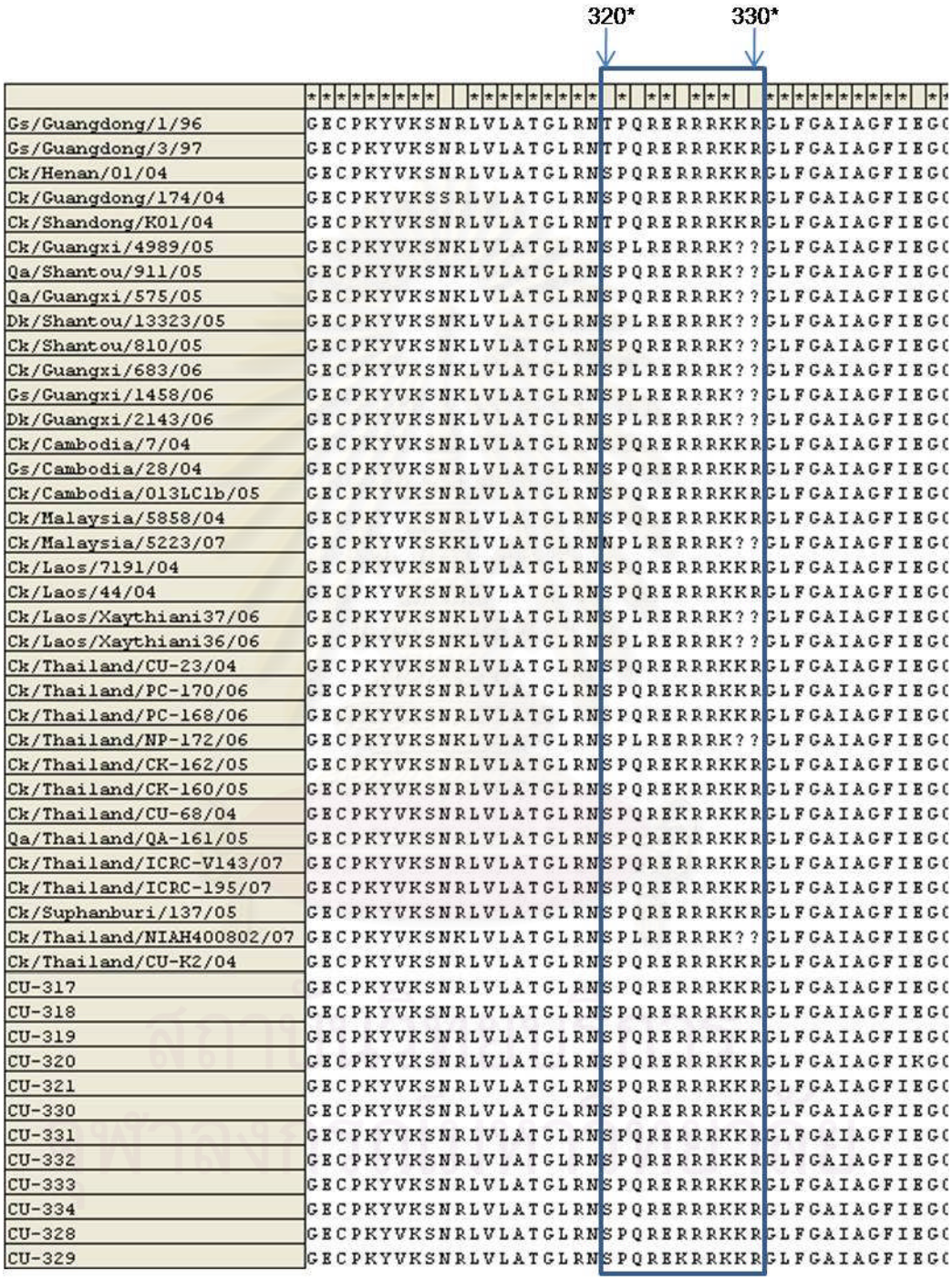
ตารางที่ 12 สรุปผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน N1

เชื้อไวรัส	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของยีน N1*				
	NA stalk region	NA active site			
	49-68	119	275	293	295
Goose/Guangdong/1/96	No deletion	E	H	R	N
Chicken/Thailand/CU-K2/04	20-aa deletion	E	H	R	N
Chicken/Thailand/Ck-162/05	20-aa deletion	E	H	R	N
Chicken/Thailand/NP-172/06	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-317/05	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-318/06	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-319/06	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-320/06	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-321/06	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-330/06	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-331/06	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-332/06	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-333/06	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-334/06	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-328/07	20-aa deletion	E	H	R	N
Thailand/CU-329/07	20-aa deletion	E	H	R	N

* ชื่อเต็มของกรดอะมิแต่ละชนิดโนสามารถดูได้ที่ภาคผนวก

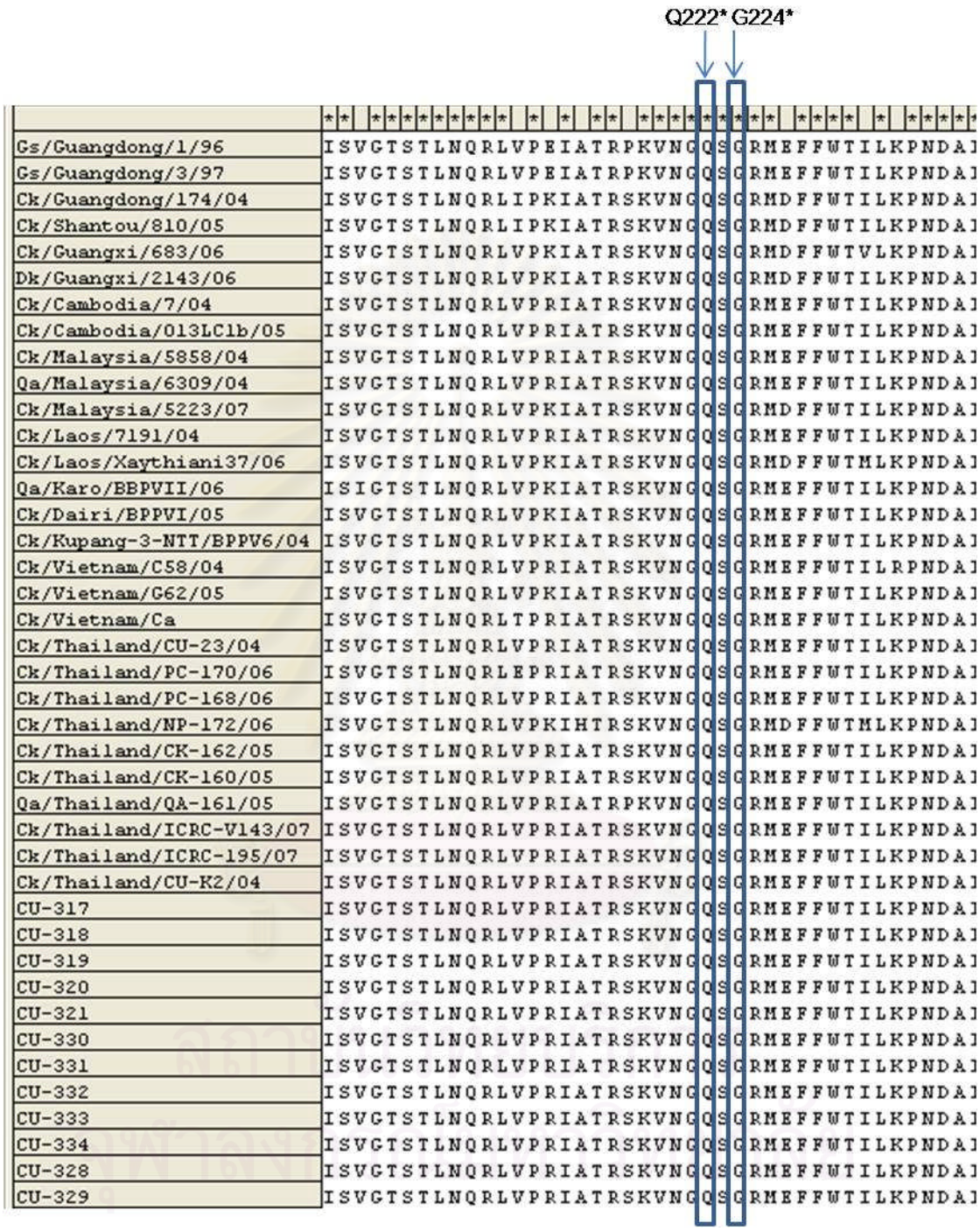
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 14 ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโน (amino acid alignment) บริเวณ HA cleavage site ที่ตำแหน่ง 320-330



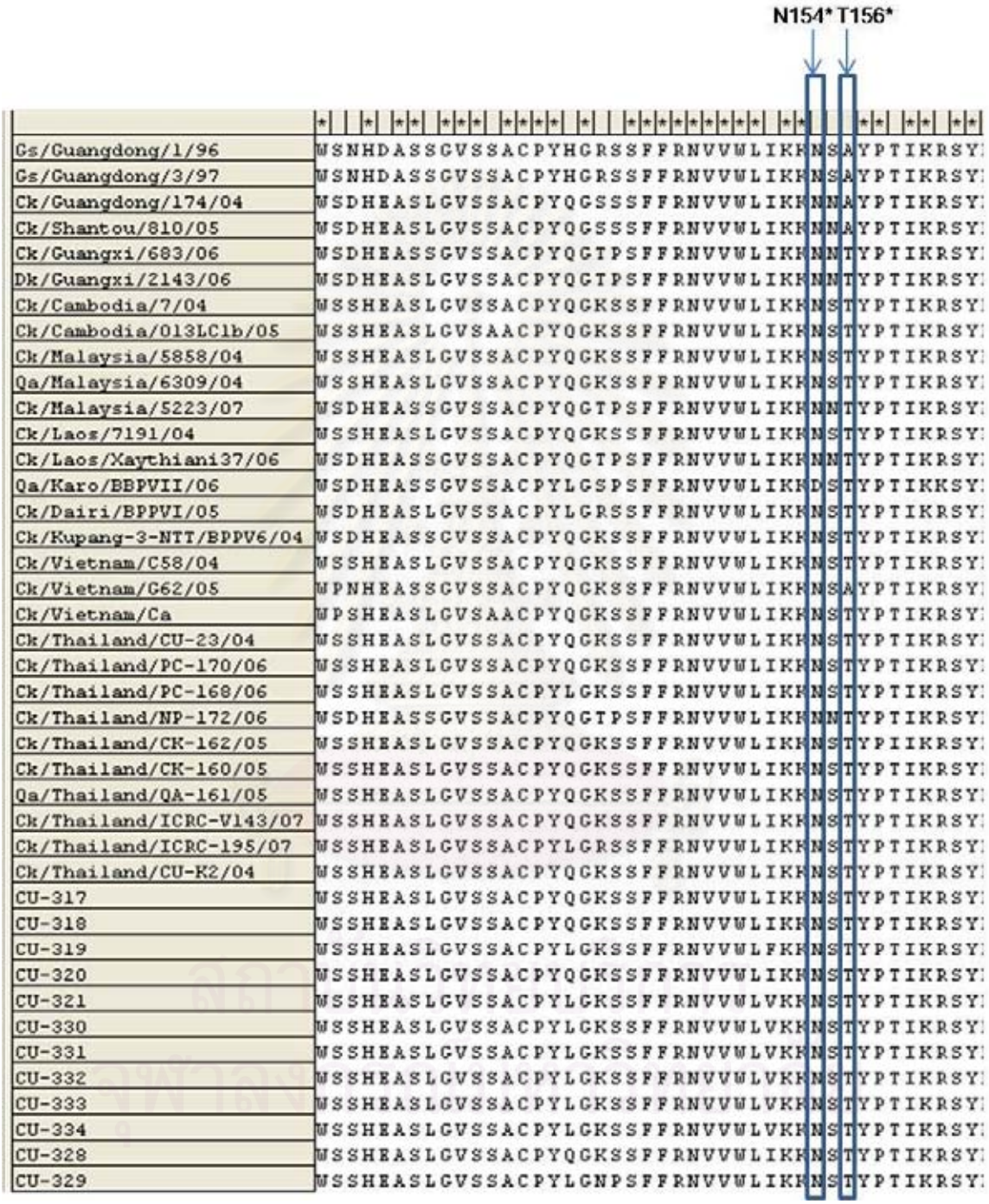
* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 49 - 68

ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ receptor binding site ที่ตำแหน่ง 222-224



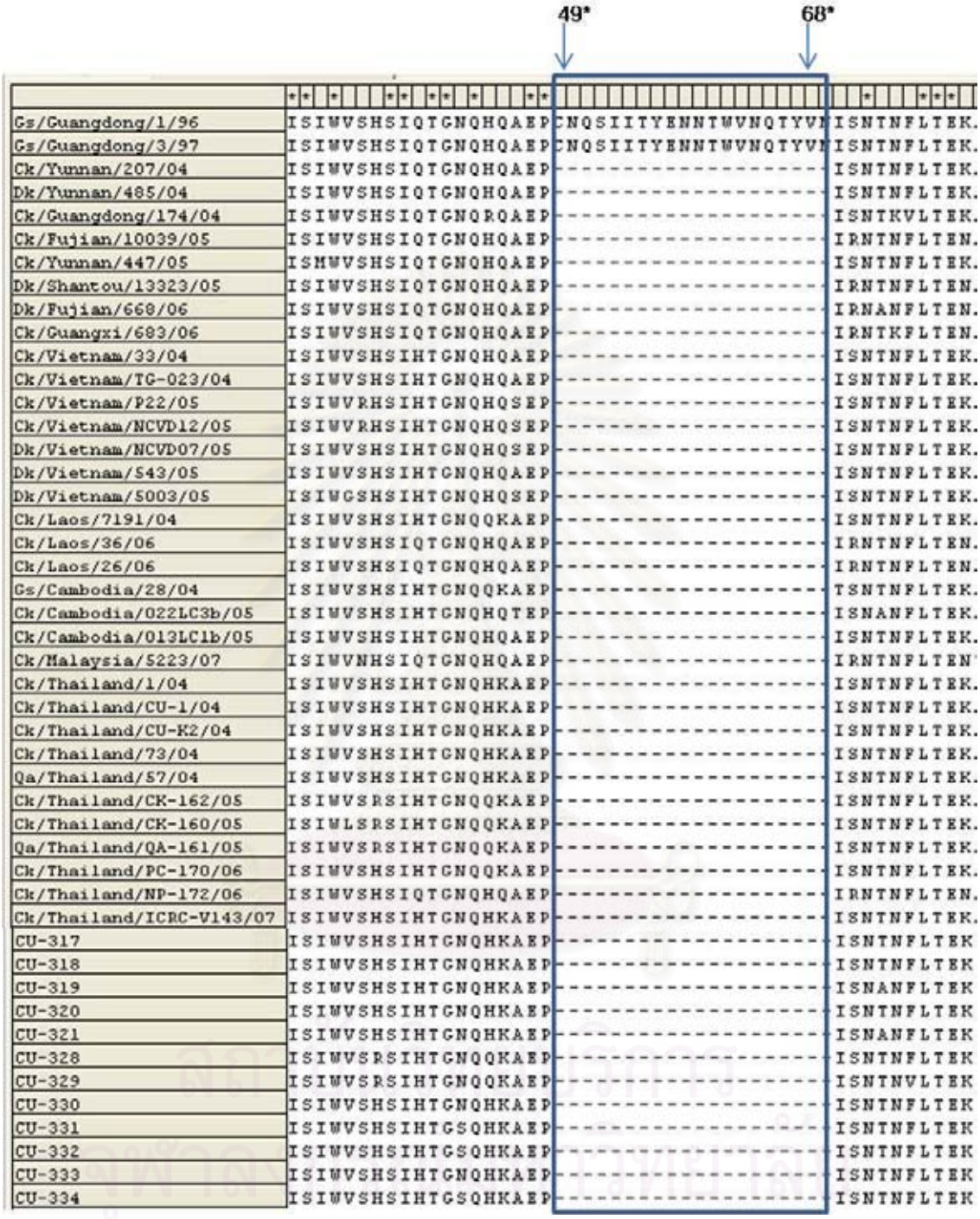
* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 49 - 68

ภาพที่ 16 ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโน (N-X-T) บริเวณ N-link glycosylation site ที่ตำแหน่ง 154-156



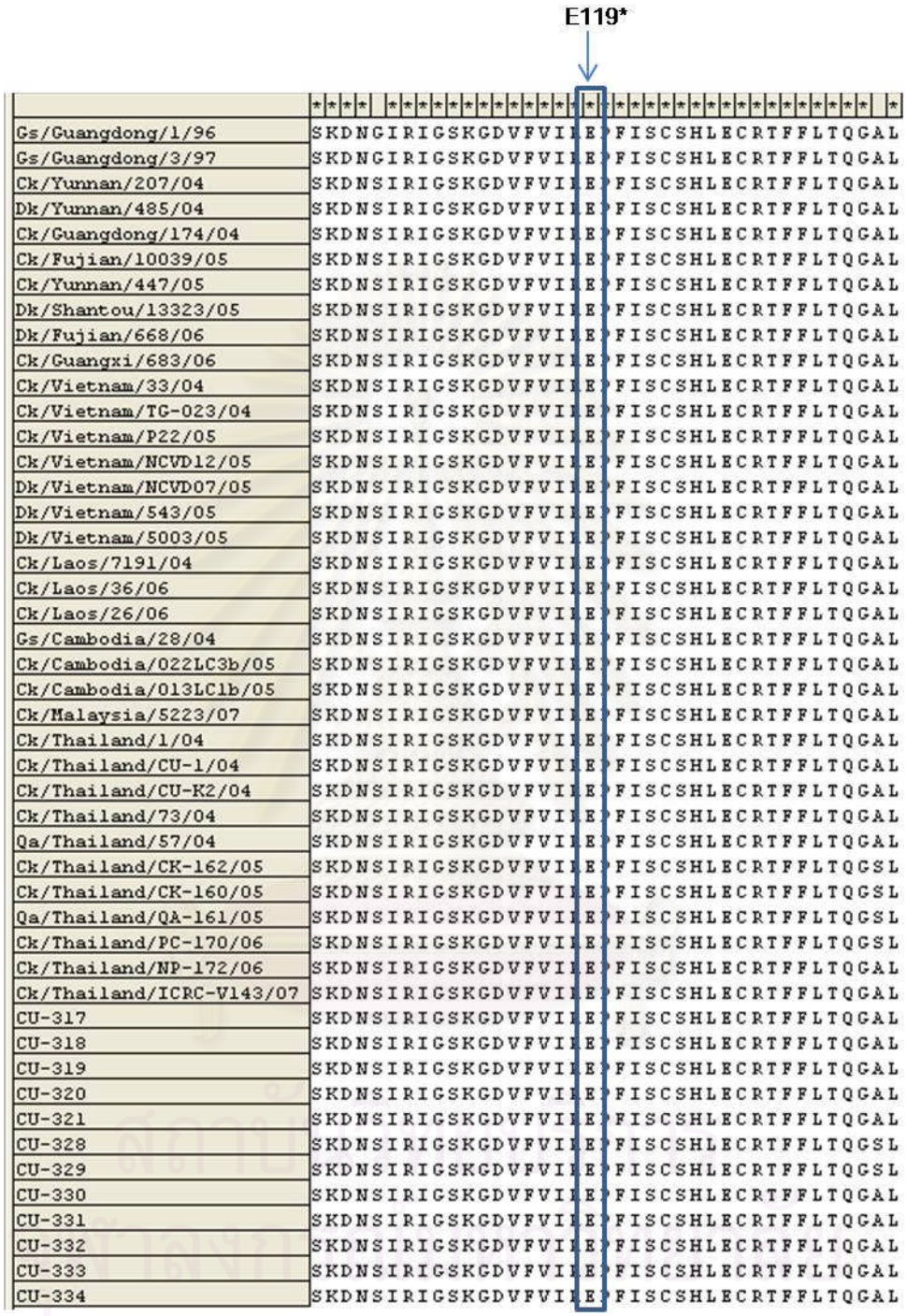
* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 49 - 68

ภาพที่ 17 ผลการเปรียบเทียบบริเวณ stalk region ที่ตำแหน่ง 49-68



* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 49 - 68

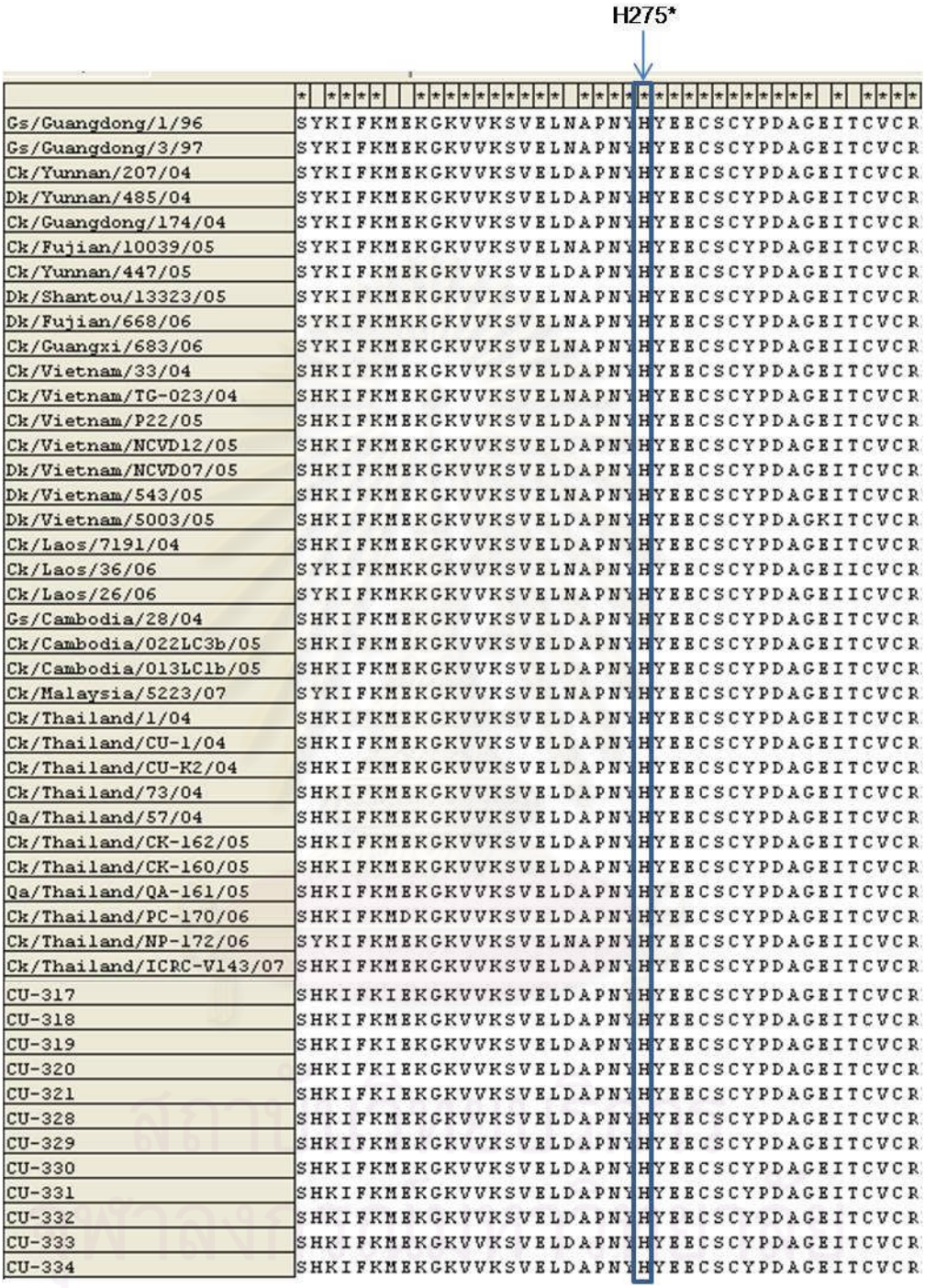
ภาพที่ 18 ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่งที่ 119



	****| ********** * ********** | *
Gs/Guangdong/1/96	SKDNGIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Gs/Guangdong/3/97	SKDNGIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Yunnan/207/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Dk/Yunnan/485/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Guangdong/174/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Fujian/10039/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Yunnan/447/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Dk/Shantou/13323/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Dk/Fujian/668/06	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Guangxi/683/06	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Vietnam/33/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Vietnam/TG-023/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Vietnam/P22/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Vietnam/NCVD12/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Dk/Vietnam/NCVD07/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Dk/Vietnam/543/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Dk/Vietnam/5003/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Laos/7191/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Laos/36/06	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Laos/26/06	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Gs/Cambodia/28/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Cambodia/022LC3b/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Cambodia/013LC1b/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Malaysia/5223/07	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Thailand/1/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Thailand/CU-1/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Thailand/CU-K2/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Thailand/73/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Qa/Thailand/57/04	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Thailand/CK-162/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGSL
Ck/Thailand/CK-160/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGSL
Qa/Thailand/QA-161/05	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGSL
Ck/Thailand/PC-170/06	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGSL
Ck/Thailand/NP-172/06	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
Ck/Thailand/ICRC-V143/07	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
CU-317	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
CU-318	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
CU-319	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
CU-320	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
CU-321	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
CU-328	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGSL
CU-329	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGSL
CU-330	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
CU-331	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
CU-332	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
CU-333	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL
CU-334	SKDNSIRIGSKGDVFVIKEPFISCSHLECRTFFLTQGAL

* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ E 119

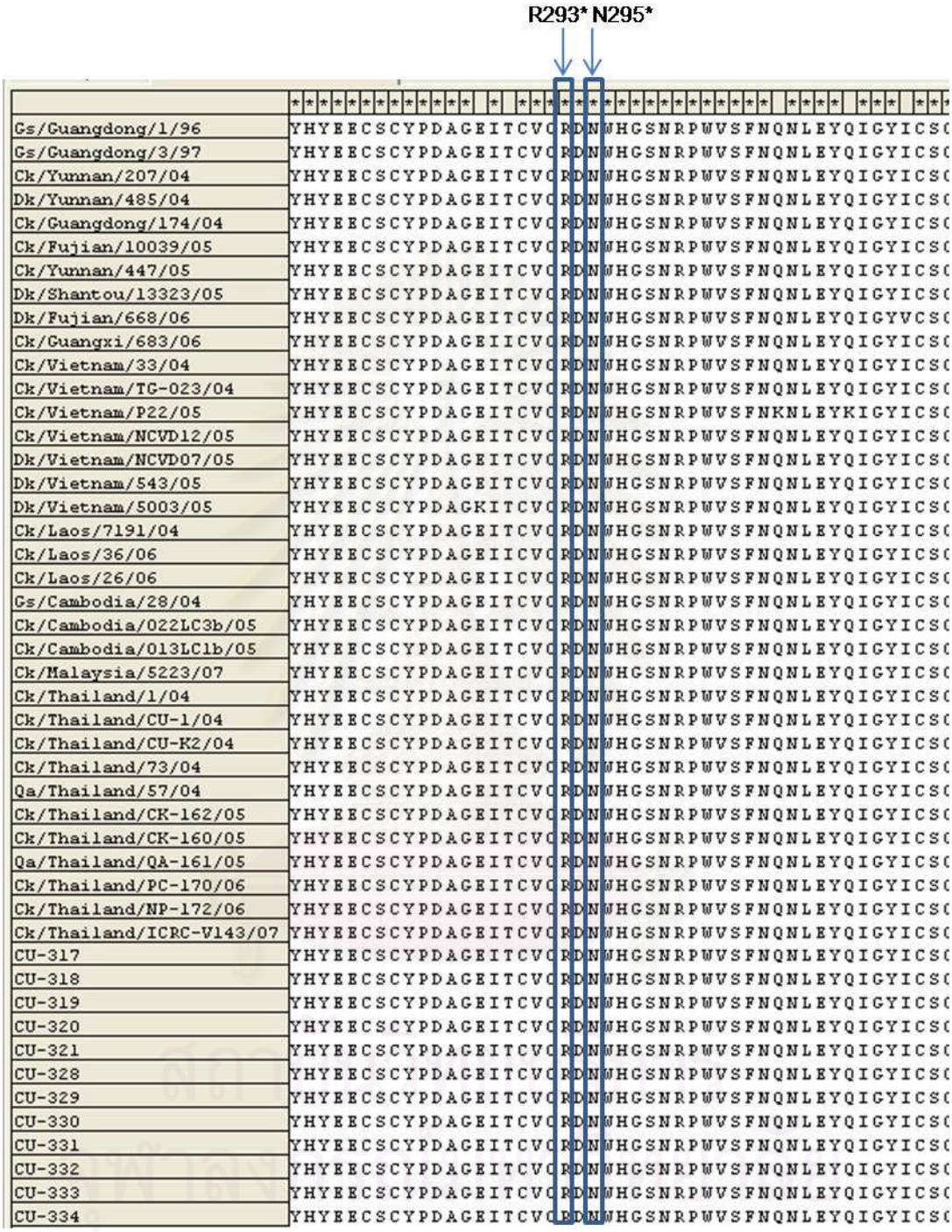
ภาพที่ 19 ผลแสดงการปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่ง 275



	* **** ********** **** ********** * ****
Gs/Guangdong/1/96	SYKIFKMEKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Gs/Guangdong/3/97	SYKIFKMEKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Yunnan/207/04	SYKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Dk/Yunnan/485/04	SYKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Guangdong/174/04	SYKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Fujian/10039/05	SYKIFKMEKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Yunnan/447/05	SYKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Dk/Shantou/13323/05	SYKIFKMEKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Dk/Fujian/668/06	SYKIFKMKKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Guangxi/683/06	SYKIFKMEKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEIICVCR
Ck/Vietnam/33/04	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Vietnam/TG-023/04	SHKIFKMEKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Vietnam/P22/05	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Vietnam/NCVD12/05	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Dk/Vietnam/NCVD07/05	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Dk/Vietnam/543/05	SHKIFKMEKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Dk/Vietnam/5003/05	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGKITCVCR
Ck/Laos/7191/04	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Laos/36/06	SYKIFKMKKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEIICVCR
Ck/Laos/26/06	SYKIFKMKKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEIICVCR
Gs/Cambodia/28/04	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Cambodia/022LC3b/05	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Cambodia/013LC1b/05	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Malaysia/5223/07	SYKIFKMEKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Thailand/1/04	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Thailand/CU-1/04	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Thailand/CU-K2/04	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Thailand/73/04	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Qa/Thailand/57/04	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Thailand/CK-162/05	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Thailand/CK-160/05	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Qa/Thailand/QA-161/05	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Thailand/PC-170/06	SHKIFKMDKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
Ck/Thailand/NP-172/06	SYKIFKMEKGKVVKSVELNAPNYHYEECSCYPDAGEIICVCR
Ck/Thailand/ICRC-V143/07	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-317	SHKIFKIEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-318	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-319	SHKIFKIEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-320	SHKIFKIEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-321	SHKIFKIEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-328	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-329	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-330	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-331	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-332	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-333	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR
CU-334	SHKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECSCYPDAGEITCVCR

* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ H275

ภาพที่ 20 ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ NA active site ที่ตำแหน่ง 293 และ 295



* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ R293 และ N295

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

โรคไข้หวัดนก (Avian influenza) เกิดจากเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 (Highly Pathogenic Avian Influenza; HPAI) ถือว่าเป็นโรคที่สร้างความเสียหายด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุขเป็นอย่างมาก การระบาดของเชื้อไข้หวัดนกในประเทศไทย จากรายงานการระบาดของกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เกิดขึ้นทั้งหมด 6 รอบ ได้แก่ ครั้งที่ 1 ระหว่างเดือนมกราคม-พฤษภาคม พ.ศ. 2547 ครั้งที่ 2 ระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2547–เมษายน พ.ศ. 2548 ครั้งที่ 3 ระหว่างเดือนกรกฎาคม–พฤศจิกายน พ.ศ. 2548 ครั้งที่ 4 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2549 ครั้งที่ 5 ระหว่างเดือนมกราคม–มีนาคม พ.ศ. 2550 และครั้งที่ 6 เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 (DLD, 2008) ในประเทศไทยนั้นประชาชนส่วนใหญ่นิยมเลือกซื้อสัตว์ปีกที่ชำแหละใหม่จากตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสด ลักษณะของตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดที่พบในประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นสถานที่ที่จำหน่ายสัตว์ปีกมีชีวิตและเนื้อสัตว์ปีกหลายชนิด ซึ่งมีความเหมาะสมกับการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดนก จนอาจนำไปสู่การกลายพันธุ์เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ได้ในอนาคต

ดังนั้นการตรวจหาและศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไวรัสจึงเป็นสิ่งที่สำคัญเพื่อที่จะได้ข้อมูลอุบัติการณ์ ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ การเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัส และเป็นการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในอนาคต การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจติดตามหาอุบัติการณ์และศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 – กรกฎาคม พ.ศ. 2550 การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปผลการทดลองแบ่งออกเป็น

- อุบัติการณ์การพบเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง
- ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1
- การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของโปรตีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนก

5.1 อุบัติการณ์การพบเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง

การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียงจำนวน 8 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร ฉะเชิงเทรา นครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี สุพรรณบุรี อยุธยา และอ่างทอง เป็นระยะเวลา 12 เดือน คือระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549–กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ได้ตัวอย่างจำนวน 836 ตัวอย่าง พบเชื้อไข้หวัดนก H5N1 จำนวน 12 ตัวอย่าง (1.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นตัวอย่างที่แยกได้จากสัตว์ปีกจำนวน 5 ชนิด แบ่งเป็นเป็ดจำนวน 2 ตัวอย่าง และไก่จำนวน 1 ตัวอย่าง และสัตว์ปีกประเภทนกธรรมชาติ (natural bird) จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ นกกระทาจำนวน 5 ตัวอย่าง นกไก่นาจำนวน 2 ตัวอย่าง นกอีลุ้มจำนวน 2 ตัวอย่าง เชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้พบในช่วงฤดูหนาวของประเทศไทยตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2549-มกราคม พ.ศ. 2550 ซึ่งเป็นช่วงฤดูเดียวกับที่ Li และคณะ (2004) ได้รายงานว่าเป็นฤดูที่พบเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในประเทศจีนตอนใต้ได้สูงสุด สอดคล้องกับรายงานการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 2004 ถึงปัจจุบัน ซึ่งพบการระบาดในช่วงอากาศเย็นของประเทศไทย (DLD, 2008) และสอดคล้องกับรายงานการพบเชื้อไข้หวัดนกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตในประเทศเวียดนามของ Nguyen และคณะ (2005) ที่รายงานการพบเชื้อไข้หวัดนกในช่วงเดือนตุลาคม การศึกษาครั้งนี้พบอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ทั้งหมดคิดเป็น 1.4 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานของ Nguyen และคณะ (2005) ในประเทศเวียดนามซึ่งรายงานการพบอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกคิดเป็น 1.1 เปอร์เซ็นต์ แต่รายงานของ Nguyen และคณะ (2005) ได้เก็บตัวอย่างเฉพาะในช่วงเดือนตุลาคมเท่านั้นจึงอาจมีผลต่อการรายงานการพบอุบัติการณ์เชื้อไข้หวัดนกได้ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกในตลาดค้าสัตว์ปีกชีวีตและตลาดสดพบได้ในช่วงที่มีอากาศเย็น

การวิเคราะห์ผลการพบเชื้อไข้หวัดนกจำแนกตามจังหวัดที่พบเชื้อไวรัส พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้เป็นตัวอย่างจากตลาดสดในจังหวัดปทุมธานีจำนวน 7 ตัวอย่าง ตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตในกรุงเทพมหานครจำนวน 3 ตัวอย่าง และร้านค้าในจังหวัดสุพรรณบุรีจำนวน 2 ตัวอย่าง ตลาดดังกล่าวมีลักษณะการจำหน่ายสินค้าตลอดทั้งวันอีกทั้งยังมีผู้บริโภคเข้าไปเลือกซื้อสินค้าเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตที่อยู่ในกรุงเทพมหานครนั้นถือเป็นตลาดศูนย์รวมสัตว์ปีกมีชีวิตที่มาจากหลายๆ แหล่ง ดังนั้นการพบเชื้อไข้หวัดนกในตลาดลักษณะดังกล่าวจึงอาจมีผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อจากสัตว์ปีกที่มีเชื้อไข้หวัดนกไปยังสัตว์ปีกตัว

ที่มาจากแหล่งอื่นได้ อีกทั้งผู้บริโภคและผู้ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสัตว์ปีกไม่ว่าจะเป็นผู้จำหน่ายหรือผู้เชือดและชำแหละสัตว์ปีกจึงมีโอกาสสัมผัสกับเชื้อไข้หวัดนกที่มากับสัตว์ปีกในตลาดได้เช่นกัน

การวิเคราะห์เชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ตามชนิดสัตว์ปีก พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 12 ตัวอย่าง เป็นสัตว์ปีกที่เป็นนกธรรมชาติและเป็ดมีจำนวน 11 ตัวอย่าง ซึ่งสัตว์ปีกชนิดดังกล่าวถือเป็นแหล่งสะสมเชื้อไวรัสตามธรรมชาติ (natural reservoir) ที่ไม่มีอาการป่วยแม้จะมีเชื้อไข้หวัดนกอยู่ในตัวสัตว์ (Webster, Shortridge and Kawaoka, 1997) อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสซึ่งอยู่ในสัตว์ปีกเหล่านี้ยังมีการเพิ่มจำนวนในตัวสัตว์และปลดปล่อยเชื้อไวรัสออกมากับสิ่งขับถ่ายและอาจติดต่อไปยังสัตว์ชนิดอื่นๆ และคนได้ (Webster, Shortridge and Kawaoka, 1997) เมื่อแยกเชื้อไข้หวัดนกตามชนิดตัวอย่างพบว่าเป็นตัวอย่างที่ได้จากเนื้อสัตว์ปีกจำนวน 9 ตัวอย่าง แบ่งเป็น นกกระทาจำนวน 5 ตัวอย่าง นกไก่นาจำนวน 2 ตัวอย่าง และนกอีลุ้มจำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากนกธรรมชาติทั้งหมด และแยกได้จากสัตว์ปีกมีชีวิตจำนวน 3 ตัวอย่าง แบ่งเป็น เป็ดจำนวน 2 ตัวอย่าง และไก่จำนวน 1 ตัวอย่าง การพบเชื้อไข้หวัดนกในตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีกสอดคล้องกับรายงานการพบเชื้อไข้หวัดนกในเนื้อเป็ดที่ถูกส่งออกจากประเทศจีนไปยังเกาหลี (Tumpey et al., 2002) และญี่ปุ่น (Mase et al., 2005) ส่วนสัตว์ปีกมีชีวิตที่พบเชื้อไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้เป็นสัตว์ปีกที่มีสุขภาพแข็งแรง สอดคล้องกับรายงานของ Nguyen และคณะ (2005) ที่พบเชื้อไข้หวัดนก H5N1 ซึ่งเป็นเชื้อไข้หวัดนกชนิดรุนแรงในห่านที่มีสุขภาพแข็งแรงในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตในประเทศเวียดนามเป็นครั้งแรก การศึกษาครั้งนี้บ่งบอกว่าเชื้อไข้หวัดนกอาจก่อโรคในสัตว์ปีกที่ไวต่อการเกิดโรค เช่น ไก่ ซึ่งแสดงอาการอย่างเด่นชัด แต่ไม่ก่อโรคหรือแสดงอาการในสัตว์ปีกบางชนิด ดังนั้นหากในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตที่มีสัตว์ปีกที่มีเชื้อไข้หวัดนกแต่ไม่แสดงอาการป่วยอยู่ในตลาดแล้ว สัตว์ปีกที่มีเชื้อไข้หวัดนกอาจปลดปล่อยเชื้อไวรัสออกมา สัตว์ปีกที่อยู่ในบริเวณกรงเดียวกันหรืออยู่ในบริเวณใกล้เคียงจึงมีโอกาสได้รับเชื้อไข้หวัดนกเข้าไปจนอาจส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์ปีกมีชีวิตในอนาคตได้ ดังนั้นการพบเชื้อไข้หวัดนกในตลาดจึงมีความสำคัญต่อการเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนกและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนก

5.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ด้วยวิธี cluster analysis ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้จำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่งแยกได้จากไก่ เป็ด นกกระทา นกไก่นา และนกอีลุ้ม ในช่วงปี พ.ศ. 2549 – 2550 พบว่าเชื้อไข้หวัดนกทั้ง 12 ตัวอย่างมีลักษณะทางพันธุศาสตร์ใกล้เคียงกัน โดยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และใกล้เคียงกับเชื้อไข้หวัดนกที่

เป็นตัวแทนของเชื้อในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2547 (A/Chicken/Nakornpanom/Thailand/CU-K2/04) ปี พ.ศ. 2548 (A/Chicken/Nontaburi/Thailand/CK-162/05) และปี พ.ศ. 2549 (A/Chicken/Thailand/NP-172/2006) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเชื้อไข้หวัดนกที่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547–2550 มีความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ใกล้เคียงกัน

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ระหว่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกจากการศึกษาครั้งนี้กับเชื้อไข้หวัดนกที่คาดว่าเป็นต้นกำเนิดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในประเทศแถบเอเชีย คือ A/goose/Guangdong/1/96 ที่พบในประเทศจีนตอนใต้ในปี ค.ศ. 1996 (Li et al., 2004) และเป็นเชื้อไวรัสต้นกำเนิดของการระบาดที่พบในประเทศฮ่องกงปี ค.ศ. 1997 (Xu et al., 1999) พบว่าเชื้อไข้หวัดนกทั้ง 12 ตัวอย่าง มีวิวัฒนาการมาจาก A/goose/Guangdong/1/96 (Gs/Gd-like lineage) และถูกจัดอยู่ใน genotype Z สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่รายงานว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากหลายประเทศทั้งในแถบเอเชียตะวันออก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งในแถบยุโรป และแอฟริกาเป็น genotype Z (Li et al., 2004; Chen et al., 2006; Zhou et al., 2006)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้ร่วมกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศต่างๆ พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความใกล้เคียงและถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไข้หวัดนกจากประเทศไทยและเวียดนาม (Thailand-Vietnam lineage) ในช่วงปี ค.ศ. 2004-2007 และแตกต่าง (ไม่จัดกลุ่ม) จากเชื้อไวรัสที่พบในประเทศอินโดนีเซียในช่วงปี ค.ศ. 2004-2007 ฮ่องกงและจีนในช่วงปี ค.ศ. 1997-2007 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Viseshakul และคณะ (2004) ที่แยกเชื้อไข้หวัดนกที่ระบาดในประเทศไทยปี พ.ศ. 2547 พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่แยกได้จากเวียดนามเช่นเดียวกัน (Thailand and Vietnam lineage) แต่ไม่จัดกลุ่มอยู่กับเชื้อที่พบในประเทศอินโดนีเซีย และจีนในช่วงปี ค.ศ. 2004-2005 และสอดคล้องกับรายงานของ Chen และ คณะ (2006) ที่หาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกที่ระบาดในประเทศแถบเอเชียในช่วงปี พ.ศ. 2547-2548 พบว่าเชื้อที่แยกได้จากประเทศไทย เวียดนาม มาเลเซีย จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (VTM lineage) แต่จัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อที่พบในประเทศอินโดนีเซีย (IND lineage) และสอดคล้องกับรายงานของ Smith และคณะ (2006) ที่พบว่าเชื้อไข้หวัดนกปี ค.ศ. 2003-2005 ที่แยกจากประเทศเวียดนามตอนเหนือจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อจากประเทศไทยและแยกกลุ่มออกจากอินโดนีเซีย

5.3 การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดนกบนตำแหน่งต่าง ๆ ของโปรตีน H5 และ N1

5.3.1 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์ของยีน H5 และ N1

จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 12 ตัวอย่าง มีค่ามากกว่า 98.5 เปอร์เซ็นต์ และ 97.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเมื่อวิเคราะห์แยกตามจังหวัดและตามชนิดสัตว์ปีกพบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในแต่ละจังหวัดมีความใกล้เคียงกันมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากเป็ดในเดือนมกราคม พ.ศ. 2550 ทั้ง 2 ตัวอย่างคือ CU-328 และ CU-329 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายที่ใกล้เคียงกันสูงแต่เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกอีก 10 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์ต่ำ จากผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน HA และ NA พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมเล็กน้อยเพียง 2-3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่พบได้ปกติในเชื้อไวรัสชนิด RNA

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นความคล้ายของนิวคลีโอไทด์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 12 ตัวอย่างกับตัวแทนเชื้อไข้หวัดนกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2547 (A/Chicken/Nakorn-Panom/Thailand/CU-K2/04) ปี พ.ศ. 2548 (A/Chicken/Nontaburi/Thailand/CK-162/05) และปี พ.ศ. 2549 (A/Chicken/Thailand/NP-172/2006) การวิเคราะห์พบว่าเชื้อไข้หวัดนกทั้งหมดจำนวน 12 ตัวอย่าง มีความคล้ายกับเชื้อไข้หวัดนกส่วนใหญ่ที่แยกได้ในประเทศไทยแต่มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์เมื่อเทียบเชื้อไข้หวัดนก A/Chicken/Thailand/NP-172/2006 พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายลดลง เนื่องจากตัวแทนเชื้อไข้หวัดนกในปี พ.ศ. 2549 นี้ มีลักษณะทางพันธุศาสตร์แตกต่างไปจากเดิมคือมีความคล้ายกับเชื้อไข้หวัดนกที่พบในประเทศจีน และอินโดนีเซีย

ทั้งนี้การศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในสัตว์ปีกที่มีจำหน่ายอยู่ในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดเท่านั้นโดยไม่ได้เปรียบเทียบตามชนิดสัตว์ปีกที่แยกมาได้เนื่องจากจำนวนเชื้อไข้หวัดนกในแต่ละชนิดสัตว์ปีกนั้นมีจำนวนน้อย ดังนั้นข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จึงถือเป็นฐานข้อมูลสำคัญที่นักวิทยาศาสตร์สามารถนำไปใช้ร่วมในการวิเคราะห์ต่อไปในอนาคต

5.3.2 การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน HA และ NA

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งต่างๆ บนยีน hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) ของเชื้อไข้หวัดนกนั้นมีความสำคัญในแง่การติดตามคุณสมบัติในการก่อโรคของเชื้อไข้หวัดนก

HA gene

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบนยีน hemagglutinin (HA) ของเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากตลาดในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าบริเวณ HA cleavage site (ตำแหน่ง 320 – 330) ของเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 12 ตัวอย่าง มีลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนชนิดเบสหลายตัว (multiple basic amino acids) การพบกรดอะมิโนชนิดเบสหลายตัวที่ HA cleavage site ถือเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการนิยาม (definition) ชนิดของเชื้อไข้หวัดนกว่าเป็นชนิดที่มีความรุนแรง (Highly Pathogenic Avian Influenza; HPAI) (Claas et al., 1998; Steinhauer, 1999) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อไข้หวัดนกชนิดก่อโรครุนแรง (HPAI) การศึกษาครั้งนี้ได้พบความหลากหลายของการเรียงตัวของกรดอะมิโนชนิด Arginine (R) และ Lysine (K) ที่ตำแหน่ง HA cleavage site ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ 2 แบบ คือ “SPQRERRRKKR” และ “SPQREKRRKRR” และจุดที่น่าสนใจคือในตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากกลุ่มนกธรรมชาติ (natural birds) จำนวน 9 ตัวอย่าง มีลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ HA cleavage site เช่นเดียวกับตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากไก่และเป็ด ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากเป็ดอีกจำนวน 1 ตัวอย่างได้พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับ กรดอะมิโนแทนที่จาก R เป็น K โดยกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่จำนวน 11 ตัวอย่าง มีลำดับกรดอะมิโนเป็น “SPQRERRRKKR” ได้แก่ นกกระทา (CU-320 และ CU-330-3) นกไก่นา (CU-317 และ CU-318) นกอีลุ้ม (CU-319 และ CU-334) ไก่ (CU-321) และเป็ด (CU-328) และตัวอย่างที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น “SPQREKRRKKR” คือเชื้อไข้หวัดนกจากเป็ด (CU-329) เมื่อได้นำลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนชนิดเบสหลายตัวแบบ “SPQREKRRKKR” ไปเปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (Genbank) พบว่าเชื้อไข้หวัดนกในฐานข้อมูลที่มีลักษณะข้างต้นสามารถพบได้ในเป็ด ไก่ อีกา นกกระทา นกนางนวล นกปากห่าง เหยี่ยว และเสือ ซึ่งยังคงความเป็น Highly

Pathogenic Avian Influenza (HPAI) ที่มีความสามารถในการก่อโรคอย่างรุนแรงจนทำให้สัตว์เสียชีวิต

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการแยกเชื้อไข้หวัดนกที่ได้จากประเทศต่างๆ ที่มีรายงานการระบาดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997-2007 ซึ่งจะพบลักษณะการเรียงตัวของ กรดอะมิโนชนิดเบสหลายตัวแบบ SPQRERRRKKR เป็นส่วนใหญ่ เช่นเชื้อไวรัสที่แยกได้ในฮ่องกง (Claas et al., 1998) เวียดนาม (Nguyen et al., 2005) อินโดนีเซีย (Smith et al., 2006) และจีน (Zhou et al.,2006) และสามารถพบความหลากหลายของการเรียงตัวของกรดอะมิโนได้ ได้แก่ การเพิ่มหรือขาดหายไปของกรดอะมิโน R หรือ K ในบางตำแหน่งบน HA cleavage site เช่น การขาดหายไปของกรดอะมิโนชนิดเบสจำนวน 1 ตัว (one-basic-amino acid deletion) ในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศเกาหลีใต้ (Lee et al., 2005) และเชื้อไข้หวัดนกจากเป็ดที่ไต้หวัน ประเทศจีน (A/Duck/China/E319-2/03) (Lee et al., 2007) ซึ่งพบการเรียงตัวเป็นแบบ SPQREKRKK-R โดยแม้ว่าได้พบการหายไปของกรดอะมิโน 1 ตัวดังกล่าวแล้ว แต่เชื้อไข้หวัดนกก็ยังคงทำให้เกิดโรคในสัตว์ปีกแบบรุนแรงได้เช่นกัน (Muramoto et al., 2006) สาเหตุที่ลักษณะการเรียงตัวแบบกรดอะมิโนชนิดเบสหลายตัวที่บริเวณ HA cleavage site มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อไข้หวัดนกมาจากบริเวณดังกล่าวมีผลให้การทำงานเอนไซม์ furin-like protease ของเซลล์เป้าหมายสามารถตัดย่อยโปรตีน HA0 ได้เป็นโปรตีน HA1 และ HA2 ได้ดีขึ้น ส่งผลต่อความสามารถในการติดเชื้อของเชื้อไวรัสโดยตรง (Martin et al., 1998)

Receptor binding site เป็นบริเวณของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 222-224 บนโปรตีน HA มีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการเกาะจับของเชื้อไข้หวัดนกกับตัวรับบนเซลล์เป้าหมายและความจำเพาะในการก่อโรคของเชื้อไวรัสในโฮสต์ชนิดต่างๆ โดยเชื้อไข้หวัดนกได้จับกับตัวรับ sialic acid และน้ำตาล galactose บนเซลล์เป้าหมายของสัตว์ปีกด้วยพันธะ α2-3 sialic acid-galactose linked (Shinya et al., 2006) ส่วนเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากคนนั้น มีรายงานว่าสามารถเข้าจับกับตัวรับในเซลล์เป้าหมายของคนด้วยพันธะ α2-6 sialic acid-galactose linked ได้ดี

การศึกษาครั้งนี้พบกรดอะมิโน Glutamine (Q) และ Glycine (G) ที่ตำแหน่ง 222 และ 224 ตามลำดับ (Q222-G224) บน receptor binding site สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่มี receptor binding site จำเพาะกับตัวรับใน

สัตว์ปีกนั้นมีลักษณะ Q222-G224 (Matrosovich et al., 1999; Ha et al., 2001) และสอดคล้องกับรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนกในประเทศฮ่องกงปี ค.ศ. 1997 ซึ่งพบว่าเชื้อไข้หวัดนก H5N1 ที่แยกได้จากคนมีลักษณะของ receptor binding site ที่จำเพาะกับในสัตว์ปีก (Claas et al., 1998) และรายงานในประเทศไทยซึ่งพบเชื้อไข้หวัดนก H5N1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีกรดอะมิโนที่บริเวณ receptor binding site ลักษณะเช่นเดียวกันกับเชื้อไข้หวัดนกที่พบในสัตว์ปีก (Puthavathana et al., 2005) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น เสือ (Amonsin et al., 2006b) เป็นต้น จึงเห็นได้ว่าเชื้อไวรัสที่มี receptor binding site จับกับตัวรับชนิด α2-3 linked sialic acid ซึ่งจำเพาะกับตัวรับในสัตว์ปีกนั้น สามารถเพิ่มจำนวนและทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้โดยไม่ต้องการพาหะตัวกลาง (Claas et al., 1998) ซึ่งขัดแย้งกับที่เคยมีรายงานว่าเชื้อไข้หวัดนก (H5N1) ต้องการพาหะตัวกลาง คือสุกร ในการติดเชื้อไข้หวัดนกจากไก่ไปสู่คน (Matrosovich et al., 1999; Osterhaus et al., 2002)

รายงานความแตกต่างของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 222-224 บน receptor binding site กล่าวคือการพบกรดอะมิโน glutamine (Q) ที่ตำแหน่ง 222 และ glycine (G) ที่ตำแหน่ง 224 (Q222-G224) ที่เป็นลักษณะจำเพาะกับเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์ปีกและสามารถเข้าจับกับตัวรับชนิด α2-3 linked sialic acid ที่พบในสัตว์ปีก แต่เชื้อไวรัสที่ก่อโรคในคนพบกรดอะมิโน leucine (L) ที่ตำแหน่ง 222 (226 in H3 numbering) ซึ่งสามารถเข้าจับกับตัวรับชนิด α2-6 linked sialic acid ได้ดี (Ha et al., 2001; Gambaryan et al., 2006)

N-link glycosylation site เป็นตำแหน่งที่มีลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นแบบ asparagine (N) –X- threonine (T)/serine (S) (N-X-T/S) X หมายถึงกรดอะมิโนใดก็ได้ (Robert et al., 1993) การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อไข้หวัดนกทั้ง 12 ตัวอย่างพบตำแหน่ง glycosylaiton site ทั้งหมด 7 ตำแหน่งบนโปรตีน HA1 และได้พบการเพิ่มขึ้นของ glycosylation site ที่ตำแหน่ง 154-156 (NST) สอดคล้องกับเชื้อไข้หวัดนกในประเทศฮ่องกงที่พบ glycosylation site ที่ตำแหน่ง 154-156 (NST) (Claas et al.,1998) และสอดคล้องกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากคน สัตว์ปีก และเสือในประเทศไทย (Puthavathana et al., 2005; Amonsin et al., 2006a, b) รวมทั้งเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศเวียดนามในช่วงปี ค.ศ. 2004-2005 ซึ่งพบการเพิ่ม glycosylation site ที่

บริเวณ 154-156 (Matrosovich et al., 1999) อย่างไรก็ตามไม่พบ glycosylation site ที่ตำแหน่งนี้ในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกจากประเทศจีนในปี ค.ศ. 1996 และ 1997

ปัจจุบันในประเทศไทยมีรายงานการพบ glycosylation site ทั้งหมด 7 ตำแหน่ง บนโปรตีน HA1 โดยทั้งนี้หากพบการเพิ่มขึ้นของ glycosylation site โดยเฉพาะที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 154-156 ซึ่งเป็นบริเวณใกล้เคียงกับ receptor binding site และ antigenic site บนโปรตีน HA อาจมีผลต่อการจับตัวรับของเซลล์โฮสต์ ทำให้เชื้อไวรัสสามารถหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อไวรัส (Matrosovich et al., 1999; Li et al., 2004)

NA gene

การศึกษาครั้งนี้พบลักษณะการลดจำนวนลงของกรดอะมิโนจำนวน 20 ตัว (20-amino acid deletion) ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 49-68 ซึ่งเป็นบริเวณที่เรียกว่า NA stalk region สอดคล้องกับการพบลักษณะการลดจำนวนลงของกรดอะมิโนจำนวน 20 ตัว ที่บริเวณ stalk region ในเชื้อไข้หวัดนกที่เคยแยกได้จากประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547-2548 (Amonsin et al., 2006a; Viseshakul et al., 2004) และในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากประเทศเวียดนาม (Muramoto et al., 2006) ซึ่งแตกต่างจากเชื้อไข้หวัดนกที่ระบาดก่อนปี ค.ศ. 2002 แสดงให้เห็นว่าเชื้อไข้หวัดนกมีการเปลี่ยนแปลงและการปรับตัวหรือวิวัฒนาการให้เหมาะสมต่อการติดเชื้อในสัตว์ปีกชนิดต่างๆ ตลอดเวลา

กรดอะมิโนบน NA stalk region ของโปรตีน NA มีความเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของ NA stalk (Castrucci and Kawaoka, 1993) การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน NA stalk region สัมพันธ์กับการปรับตัวหรือวิวัฒนาการของเชื้อไข้หวัดนกในการติดเชื้อจากนกน้ำ นกธรรมชาติ มายังสัตว์ปีกชนิดเลี้ยงหลังบ้าน เช่น ไก่ เป็ด (Matrosovich et al., 1999; Wan et al., 2005) รายงานการศึกษาเชื้อไข้หวัดนกจากห่านในประเทศจีนในปี ค.ศ. 1996-1997 (A/Goose/Guangdong/1/96 และ A/Goose/Guangdong/3/97) นั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่บริเวณ NA stalk region แต่เริ่มพบการเปลี่ยนแปลงโดยมีลักษณะการลดจำนวนลงของกรดอะมิโนจำนวน 19 ตัว (19-amino acid deletion) หรือการสั้นลงของ NA stalk region ในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากคนในฮ่องกงปี 1997 (A/HK/156/97) (Subbrarao et al.,1998) จากนั้นเริ่มมีรายงานการพบลักษณะการลดจำนวนกรดอะมิโนลงจำนวน 20 ตัว (20-amino acid deletion) ที่กรด

อะมิโนตำแหน่ง 49-68 จากเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2002 รวมทั้งเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในประเทศไทย (Amonsin et al., 2006a, Li et al., 2004)

การศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์กรดอะมิโนตำแหน่งต่างๆ ในยีน NA (บริเวณ NA active site) ได้แก่ กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 119, 275, 293 และ 295 ที่เป็นบริเวณที่มีความสำคัญต่อการที่เชื้อไข้หวัดนกสามารถดื้อยาต้านเชื้อไวรัส Oseltamivir (Oseltamivir resistance) ซึ่งเป็นยาที่ให้ได้ผลป้องกันและรักษาโรคไข้หวัดโดยเฉพาะในคนได้อย่างดีในปัจจุบัน (acute influenza) การศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ (119, 275, 293 และ 295) บนยีน NA อาจกล่าวได้ว่าเชื้อไข้หวัดนกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่มีกรดอะมิโนที่มีผลต่อการดื้อยา oseltamivir รายงานการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนหลายๆ ตำแหน่งบน NA active site ได้แก่ 119 (E119V), 275 (H275Y), 293 (R293K) และ 295 (N295S) (N1 numbering) อาจส่งผลให้เชื้อไข้หวัดนกดื้อต่อยา oseltamivir (Gubareva et al., 2000; Mc-Kimm Breschin et al., 2002; Kiso et al., 2004)

การรักษาผู้ติดเชื้อไข้หวัดนกโดยการใช้ยาในกลุ่ม neuraminidase inhibitor ได้แก่ oseltamivir และ zanamivir ซึ่งออกฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ neuraminidase ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อไข้หวัดนกไม่สามารถปล่อยเชื้อไวรัสออกจากเซลล์ได้ โดยปกติบริเวณ NA active site เป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ neuraminidase ในการปล่อยเชื้อไวรัสออกจากเซลล์ (Wilschut and Mc Elhaney, 2005) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณ NA active site มีผลต่อเอนไซม์ neuraminidase จนอาจส่งผลเชื้อไวรัสดื้อต่อยาต้านไวรัส รายงานการรักษาโดยใช้ยา oseltamivir ในผู้ป่วยชาวเวียดนามที่เสียชีวิตจากการติดเชื้อไข้หวัดนก พบว่าเชื้อไข้หวัดนกมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน NA active site ที่ตำแหน่ง H275Y ส่งผลให้เชื้อไข้หวัดนกดื้อต่อยา oseltamivir (de Jong et al., 2005)

ผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีกมีชีวิตและเนื้อสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อไข้หวัดนกที่พบนั้นเป็น สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงในสัตว์ปีก (HPAI) แต่ผู้วิจัยสามารถแยกเชื้อไข้หวัดนกนี้ได้จากสัตว์ปีกมีชีวิตที่มีสุขภาพแข็งแรงและจำหน่ายอยู่ในตลาดซึ่งมีสัตว์ปีกมีชีวิตชนิดอื่นๆ จำนวนมาก เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานการพบเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในนกน้ำเลี้ยงที่มีสุขภาพแข็งแรงในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตที่ประเทศ

เวียดนามในปี ค.ศ. 2001 (Nguyen et al., 2005) การพบเชื้อไข้หวัดนกชนิดก่อโรครุนแรงในสัตว์ปีกที่มีสุขภาพแข็งแรงในตลาดค้าสัตว์ปีกอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อไข้หวัดนกเริ่มมีการพัฒนาตัวเองให้สามารถอยู่ร่วมกันกับสัตว์ปีกหรือโฮสต์และสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเพื่อปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมได้ต่อไป ในปัจจุบันได้มีรายงานการติดเชื้อไข้หวัดนกของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตส่วนใหญ่มีประวัติสัมผัสหรืออยู่ใกล้ชิดกับสัตว์ปีกในตลาดสด จนกล่าวได้ว่ามีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อไข้หวัดนกจากตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดไปสู่คนได้ (Chan, 2002; Claas et al., 1998) ดังนั้นการพบอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดจึงเป็นข้อมูลสำคัญที่นำไปใช้ในการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกได้ต่อไปในอนาคต

โดยสรุปผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ปีกและสัตว์ปีกมีชีวิตในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ทราบถึงความเสี่ยงในการได้รับเชื้อไข้หวัดนกจากตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสด ทราบข้อมูลของรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 และนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้ไปเผยแพร่ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดนก ข้อมูลต่างๆ เหล่านี้สามารถนำไปใช้เฝ้าระวังการระบาดและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไข้หวัดนก ซึ่งนำมาใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดแนวทางการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากสัตว์ปีกที่จำหน่ายในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ระหว่างเดือนสิงหาคม 2006–กันยายน 2007 และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 จากเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ รวมทั้งวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่สำคัญซึ่งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนก ซึ่งจะนำมาใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดแนวทางการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า

1. อุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีกที่จำหน่ายในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียงในระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2006 – กันยายน 2007 คือ 1.4% (12 ตัวอย่างจากทั้งหมด 823 ตัวอย่าง)

2. ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 12 ตัวอย่างจากสัตว์ชนิดต่างๆ รวมเป็นสายรหัสพันธุกรรมจำนวน 24 สาย และได้นำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิทยาศาสตร์ในการศึกษาวิจัยเชิงลึกเกี่ยวกับเชื้อไข้หวัดนกต่อไป (รายละเอียดข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดนกแสดงไว้ในภาคผนวก ข)

3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรหัสพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไข้หวัดนก ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อไข้หวัดนกทั้ง 12 ตัวอย่าง จัดอยู่ใน genotype Z และมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไข้หวัดนกที่เคยมีพบในประเทศไทย และเคยระบาดในประเทศเวียดนาม แต่ไม่อยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไข้หวัดนกจากประเทศอินโดนีเซีย ฮ่องกง และจีน

4. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ ที่มีความสำคัญบนยีน H5 พบลักษณะ multiple basic amino acid ที่ HA cleavage site ทำให้ทราบว่าเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากตลาดในการศึกษาครั้งนี้เป็นชนิดที่ก่อโรครุนแรง และพบลักษณะ receptor binding site (Q222-G224) ที่สัมพันธ์กับการจับกับตัวรับด้วยพันธะ α2-3 sialic acid-galactose linked ซึ่งจำเพาะกับตัวรับในสัตว์ปีก รวมทั้งพบการเพิ่มของ glycosylation site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 154-156 (NST)

5. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ บนยีน N1 พบลักษณะ 20-amino acid deletion บน NA stalk region แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่มีผลต่อการดื้อยาต้านไวรัส Oseltamivir ของเชื้อไข้หวัดนก

การศึกษาครั้งนี้มีประโยชน์ในด้านการตรวจติดตามอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ข้อมูลรหัสพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงลักษณะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไข้หวัดนก ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการระบาดและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ และสามารถนำมาใช้ในการกำหนดแนวทางการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว และสามารถนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมไปเผยแพร่ไว้ในฐานข้อมูล Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลสำหรับนักวิทยาศาสตร์และผู้สนใจ เพื่อการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

การตรวจติดตามและศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัด H5N1 ในตลาดค้าสัตว์ปีกและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ในการศึกษาครั้งนี้ได้สุ่มเก็บตัวอย่างในตลาดค้าสัตว์ปีกและตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง โดยพบอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกในตัวอย่างสัตว์ปีกในตลาดค้าสัตว์ปีกและตลาดสดในพื้นที่ดังกล่าว ทำให้คาดการณ์ได้ว่ามีความเสี่ยงในการติดเชื้อของสัตว์ปีกตัวอื่นๆ และคนได้โดยตรง และอาจเกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ใหม่ที่มีความก่อโรครุนแรงในสัตว์และคนได้ต่อไป ดังนั้นจากความสำคัญของการพบอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดนกในตลาดดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงเสนอแนะให้มีการตรวจติดตามและศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อไข้หวัดนกในตลาดค้าสัตว์ปีกมีชีวิตและตลาดสดอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการระบาดและสังเกตการเปลี่ยนแปลงของยีนต่างๆ ซึ่งอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนก ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะสามารถบอกได้ว่าเชื้อไข้หวัดนกที่พบมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงหรือเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงจนกลายเป็นเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ใหม่ ทั้งนี้การเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสจะต้องทำการเก็บตัวอย่างอย่างต่อเนื่อง ทั้งในช่วงที่มีการระบาดและไม่มีการระบาด เพื่อเป็นการติดตามการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนกที่อาจเกิดขึ้นได้ และข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบคุณสมบัติหรือลักษณะของเชื้อไข้หวัดนก ซึ่งใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการวางนโยบายการควบคุมและป้องกันโรคได้ในอนาคต

นอกจากการศึกษาอย่างต่อเนื่องแล้ว การศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจติดตามเชื้อไข้หวัดนกเฉพาะในสัตว์ปีกเท่านั้นซึ่งในตลาดบางแห่งสามารถพบสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้ เช่น สุนัข และแมว เป็นต้น ดังนั้นการเก็บตัวอย่างชนิดสัตว์ให้มีความหลากหลายขึ้น จะสามารถบอกระดับการเคยสัมผัสเชื้อไข้หวัดนกในตลาดควรจะเป็นแนวทางในกาศึกษาในอนาคต

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์เฉพาะยีน H5 และ N1 ดังนั้นการศึกษาต่อไปอาจจะทำการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนทั้งหมดให้ครบทั้ง 8 ยีนร่วมด้วยเพื่อให้ทราบถึงลักษณะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชื้อไข้หวัดนกได้ชัดเจนมากขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ดารินทร์ อารีย์โชคชัย, ชุลีพร จิระพงษา, วรรณา หาญเชาวกุล, พจมาน ศิริอารยาภรณ์, ยงเจือ เหล่าศิริถาวร, Michael Oreilly, วีรยุทธ เจริญกิจไพศาล, ศุภเลิศ เนตรสุวรรณ, นิธิกุล เต็มเอี่ยม, ฐิติพงศ์ ยิ่งยง, กฤษณ์ นุรักษ์. 2004 (2547). ปัจจัยเสี่ยงของโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย พ.ศ. 2547 : รายงานการสัมมนาระบาดวิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 17. สำนักระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข.

ภาษาอังกฤษ

Amonsin, A., Chutinimitkul, S., Pariyothorn, N., Songserm, T., Damrongwantanapokin, S., Puranaveja, S., Jam-On, R., Sae-Heng, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Chaisingh, A., Tantilertcharoen, R., Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. and Poovorawan, Y. 2006a. Genetic characterization of influenza A viruses (H5N1) isolated from 3rd wave of Thailand AI outbreaks. Virus. Res. 122(1-2): 194-199.

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

Amonsin, A., Songserm, T., Chutinimitkul, S., Jam-On, R., Sae-Heng, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2007. Genetic analysis of influenza A virus (H5N1) derived from domestic cat and dog in Thailand. Arch. Virol. 152(10): 1925-1933.

Bender, C., Hall, H., Huang, J., Klimov, A., Cox, N., Hay, A., Gregory, V., Cameron, K., Lim, W. and Subbarao, K. 1999. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998. Virology. 254(1): 115-123.

Bright, R.A., Ross, T.M., Subbarao, K., Robinson, H.L. and Katz, J.M. 2003. Impact of glycosylation on the immunogenicity of a DNA-based influenza H5 HA vaccine. Virology. 308(2): 270-278.

Brown, E.G. 2000. Influenza virus genetics. Biomed. Pharmacother. 54(4): 196-209.

Castrucci, M.R. and Kawaoka, Y. 1993. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. J. Virol. 67(2): 759-764.

Chan, P.K. 2002. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. Clin. Infect. Dis. 34 Suppl 2S58-64.

Chen, H., Smith, G.J., Li, K.S., Wang, J., Fan, X.H., Rayner, J.M., Vijaykrishna, D., Zhang, J.X., Zhang, L.J., Guo, C.T., Cheung, C.L., Xu, K.M., Duan, L., Huang, K., Qin, K., Leung, Y.H., Wu, W.L., Lu, H.R., Chen, Y., Xia, N.S., Naipospos, T.S., Yuen, K.Y., Hassan, S.S., Bahri, S., Nguyen, T.D., Webster, R.G., Peiris, J.S. and Guan, Y. 2006. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103(8): 2845-2850.

Choi, Y.K., Nguyen, T.D., Ozaki, H., Webby, R.J., Puthavathana, P., Buranathal, C., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Hanh, N.T., Ma, S.K., Hui, P.Y., Guan, Y., Peiris, J.S. and Webster, R.G. 2005. Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. J. Virol. 79(16): 10821-10825.

Chotpitayasunondh, T., Ungchusak, K., Hanshaoworakul, W., Chunsuthiwat, S., Sawanpanyalert, P., Kijphati, R., Lochindarat, S., Srisan, P., Suwan, P., Osotthanakorn, Y., Anantasetagoon, T., Kanjanawasri, S., Tanupattarachai, S., Weerakul, J., Chaiwirattana, R., Maneerattanaporn, M., Poolsavathitikool, R., Chokephaibulkit, K., Apisarnthanarak, A. and Dowell, S.F. 2005. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. Emerg. Infect. Dis. 11(2): 201-209.

Chutinimitkul, S., Songserm, T., Amonsin, A., Payungporn, S., Suwannakarn, K., Damrongwatanapokin, S., Chaisingh, A., Nuansrichay, B., Chieochansin, T., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2007a. New strain of influenza A virus (H5N1), Thailand. Emerg. Infect. Dis. 13(3): 506-507.

Chutinimitkul, S., Suwannakarn, K., Chieochansin, T., Mai le, Q., Damrongwatanapokin, S., Chaisingh, A., Amonsin, A., Landt, O., Songserm, T., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2007b. H5N1 Oseltamivir-resistance detection by real-time PCR using two high sensitivity labeled TaqMan probes. J. Virol. Methods. 139(1): 44-49.

Claas, E.C., Osterhaus, A.D., van Beek, R., De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Senne, D.A., Krauss, S., Shortridge, K.F. and Webster, R.G. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet. 351(9101): 472-477.

De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A. and Osterhaus, A.D. 2000. Influenza virus: a master of metamorphosis. J. Infect. 40(3): 218-228.

de Jong, M.D. and Hien, T.T. 2006. Avian influenza A (H5N1). J. Clin. Virol. 35(1): 2-13.

de Jong, M.D., Tran, T.T., Truong, H.K., Vo, M.H., Smith, G.J., Nguyen, V.C., Bach, V.C., Phan, T.Q., Do, Q.H., Guan, Y., Peiris, J.S., Tran, T.H. and Farrar, J. 2005. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. N. Engl. J. Med. 353(25): 2667-2672.

Department of Livestock Development (DLD). 2008. “Avian Influenza situation and control measures.” [online]. Available: http://www.dld.go.th/home/bird_flu/16-10-49KAN/noetbook6.html

Easterday, B.C., Hinshaw, V.S. and Halverson, D.A. 1997. Influenza. In : Disease of poultry. B.W. Calnek, H. J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, Y.M. Saif (ed.) Iowa: Iowa State University Press. 583-608.

Fouchier, R.A., Schneeberger, P.M., Rozendaal, F.W., Broekman, J.M., Kemink, S.A., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., Schutten, M., Van Doornum, G.J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M. and Osterhaus, A.D. 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci U S A. 101(5): 1356-1361.

Gambaryan, A., Tuzikov, A., Pazynina, G., Bovin, N., Balish, A. and Klimov, A. 2006. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. Virology. 344(2): 432-438.

Gao, P., Watanabe, S., Ito, T., Goto, H., Wells, K., McGregor, M., Cooley, A.J. and Kawaoka, Y. 1999. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. J. Virol. 73(4): 3184-3189.

Garber, L., Voelker, L., Hill, G. and Rodriguez, J. 2007. Description of live poultry markets in the United States and factors associated with repeated presence of H5/H7 low-pathogenicity avian influenza virus. Avian. Dis. 51(1 Suppl): 417-420.

Giese, M., Harder, T.C., Teifke, J.P., Klopfleisch, R., Breithaupt, A., Mettenleiter, T.C. and Vahlenkamp, T.W. 2008. Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). Emerg Infect Dis. 14(2): 308-310.

Guan, Y., Peiris, M., Kong, K.F., Dyrting, K.C., Ellis, T.M., Sit, T., Zhang, L.J. and Shortridge, K.F. 2002. H5N1 influenza viruses isolated from geese in Southeastern China: evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. Virology. 292(1): 16-23.

Gubareva, L.V. 2004. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. Virus. Res. 103(1-2): 199-203.

Gubareva, L.V., Kaiser, L. and Hayden, F.G. 2000. Influenza virus neuraminidase inhibitors. Lancet. 355(9206): 827-835.

Gubareva, L.V., McCullers, J.A., Bethell, R.C. and Webster, R.G. 1998. Characterization of influenza A/HongKong/156/97 (H5N1) virus in a mouse model and protective effect of zanamivir on H5N1 infection in mice. J. Infect. Dis. 178(6): 1592-1596.

Ha, Y., Stevens, D.J., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. 2001. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98(20): 11181-11186.

Hughes, M.T., McGregor, M., Suzuki, T., Suzuki, Y. and Kawaoka, Y. 2001. Adaptation of influenza A viruses to cells expressing low levels of sialic acid leads to loss of neuraminidase activity. J. Virol. 75(8): 3766-3770.

Hulse, D.J., Webster, R.G., Russell, R.J. and Perez, D.R. 2004. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. J. Virol. 78(18): 9954-9964.

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

Kiso, M., Mitamura, K., Sakai-Tagawa, Y., Shiraishi, K., Kawakami, C., Kimura, K., Hayden, F.G., Sugaya, N. and Kawaoka, Y. 2004. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. Lancet. 364(9436): 759-765.

Kuiken, T., Rimmelzwaan, G., van Riel, D., van Amerongen, G., Baars, M., Fouchier, R. and Osterhaus, A. 2004. Avian H5N1 influenza in cats. Science. 306(5694): 241.

Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., Van Amerongen, G. and Osterhaus, A.D. 2003. Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in cynomolgus macaques (Macaca fascicularis). Vet. Pathol. 40(3): 304-310.

Lamb, R.A., Krug, R.M. 2001. Orthomyxviridae: The viruses and their replication. In: Fields virology. Knipe, D.M. , Howley, P.M. (eds.) Philadephia: Lippicott William & Wilkins. 1487-1531.

Lamb, R.A. and Choppin, P.W. 1983. The gene structure and replication of influenza virus. Annu. Rev. Biochem. 52467-506.

Lee, C.W., Suarez, D.L., Tumpey, T.M., Sung, H.W., Kwon, Y.K., Lee, Y.J., Choi, J.G., Joh, S.J., Kim, M.C., Lee, E.K., Park, J.M., Lu, X., Katz, J.M., Spackman, E., Swayne, D.E. and Kim, J.H. 2005. Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. J. Virol. 79(6): 3692-3702.

Lee, M.S., Deng, M.C., Lin, Y.J., Chang, C.Y., Shieh, H.K., Shiau, J.Z. and Huang, C.C. 2007. Characterization of an H5N1 avian influenza virus from Taiwan. Vet. Microbiol. 124(3-4): 193-201.

Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J., Xu, K.M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. and Peiris, J.S. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. Nature. 430(6996): 209-213.

Ligon, B.L. 2005. Avian influenza virus H5N1: a review of its history and information regarding its potential to cause the next pandemic. Semin Pediatr Infect. Dis. 16(4): 326-335.

Martin, J., Wharton, S.A., Lin, Y.P., Takemoto, D.K., Skehel, J.J., Wiley, D.C. and Steinhauer, D.A. 1998. Studies of the binding properties of influenza hemagglutinin receptor-site mutants. Virology. 241(1): 101-111.

Mase, M., Eto, M., Tanimura, N., Imai, K., Tsukamoto, K., Horimoto, T., Kawaoka, Y. and Yamaguchi, S. 2005. Isolation of a genotypically unique H5N1 influenza virus from duck meat imported into Japan from China. Virology. 339(1): 101-109.

Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y. and Webster, R. 1999. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. J. Virol. 73(2): 1146-1155.

McKimm-Breschkin, J.L. 2002. Neuraminidase inhibitors for the treatment and prevention of influenza. Expert. Opin. Pharmacother. 3(2): 103-112.

Moscona, A. 2005. Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. N. Engl. J. Med. 353(25): 2633-2636.

Muramoto, Y., Le, T.Q., Phuong, L.S., Nguyen, T., Nguyen, T.H., Sakai-Tagawa, Y., Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Kida, H. and Kawaoka, Y. 2006. Molecular characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 influenza A viruses isolated from poultry in Vietnam from 2004 to 2005. J. Vet. Med. Sci. 68(5): 527-531.

Nguyen, D.C., Uyeki, T.M., Jadhao, S., Maines, T., Shaw, M., Matsuoka, Y., Smith, C., Rowe, T., Lu, X., Hall, H., Xu, X., Balish, A., Klimov, A., Tumpey, T.M., Swayne, D.E., Huynh, L.P., Nghiem, H.K., Nguyen, H.H., Hoang, L.T., Cox, N.J. and Katz, J.M. 2005. Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001. J. Virol. 79(7): 4201-4212.

Nicholson, K.G., Wood, J.M., Zambon, M. 2003. Influenza. Lancet. 362(9397): 1733-1743.

Nobusawa, E., Aoyama, T., Kato, H., Suzuki, Y., Tateno, Y. and Nakajima, K. 1991. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. Virology. 182(2): 475-485.

Office International des Epizooties (OIE). 2005."Avian Influenza" [online]. Available: http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00037.htm

Osterhaus, A.D., de Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F. and Claas, E.C. 2002. H5N1 influenza in Hong Kong: virus characterizations. Vaccine. 20 Suppl 2S82-83.

Payungporn, S., Phakdeewirot, P., Chutinimitkul, S., Theamboonlers, A., Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Amonsin, A. and Poovorawan, Y. 2004. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. Viral. Immunol. 17(4): 588-593.

Puthavathana, P., Auewarakul, P., Charoenying, P.C., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Boonnak, K., Khanyok, R., Thawachsupa, P., Kijphati, R. and Sawanpanyalert, P. 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. J. Gen. Virol. 86(Pt 2): 423-433.

Rimmelzwaan, G.F., van Riel, D., Baars, M., Bestebroer, T.M., van Amerongen, G., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D. and Kuiken, T. 2006. Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. Am. J. Pathol. 168(1): 176-183; quiz 364.

Roberts, P.C., Garten, W. and Klenk, H.D. 1993. Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. J. Virol. 67(6): 3048-3060.

Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N. and Kawaoka, Y. 2006. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. Nature. 440(7083): 435-436.

Shortridge, K.F. 1999. Poultry and the influenza H5N1 outbreak in Hong Kong, 1997: abridged chronology and virus isolation. Vaccine. 17 Suppl 1S26-29.

Smith, G.J., Naipospos, T.S., Nguyen, T.D., de Jong, M.D., Vijaykrishna, D., Usman, T.B., Hassan, S.S., Nguyen, T.V., Dao, T.V., Bui, N.A., Leung, Y.H., Cheung, C.L., Rayner, J.M., Zhang, J.X., Zhang, L.J., Poon, L.L., Li, K.S., Nguyen, V.C., Hien, T.T., Farrar, J., Webster, R.G., Chen, H., Peiris, J.S. and Guan, Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. Virology. 350(2): 258-268.

Songserm, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Meemak, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2006a. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. Emerg. Infect. Dis. 12(4): 681-683.

Songserm, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Chutinimitkul, S., Thanawongnuwech, R. and Poovorawan, Y. 2006b. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. Emerg. Infect. Dis. 12(11): 1744-1747.

Steinhauer, D.A. 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. Virology. 258(1): 1-20.

Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.D. and Garten, W. 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. Embo. J. 11(7): 2407-2414.

Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. and

Cox, N. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. Science. 279(5349): 393-396.

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

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

Thiry, E., Zicola, A., Addie, D., Egberink, H., Hartmann, K., Lutz, H., Poulet, H. and Horzinek, M.C. 2007. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. Vet. Microbiol. 122(1-2): 25-31.

Tumpey, T.M., Suarez, D.L., Perkins, L.E., Senne, D.A., Lee, J.G., Lee, Y.J., Mo, I.P., Sung, H.W. and Swayne, D.E. 2002. Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. J. Virol. 76(12): 6344-6355.

Ungchusak, K., Auewarakul, P., Dowell, S.F., Kitphati, R., Auwanit, W., Puthavathana, P., Uiprasertkul, M., Boonnak, K., Pittayawonganon, C., Cox, N.J., Zaki, S.R., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Khontong, R., Simmerman, J.M. and Chunsutthiwat, S. 2005. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). N. Engl. J. Med. 352(4): 333-340.

Van Borm, S., Thomas, I., Hanquet, G., Lambrecht, B., Boschmans, M., Dupont, G., Decaestecker, M., Snacken, R. and van den Berg, T. 2005. Highly pathogenic H5N1 influenza virus in smuggled Thai eagles, Belgium. Emerg. Infect. Dis. 11(5): 702-705.

Vines, A., Wells, K., Matrosovich, M., Castrucci, M.R., Ito, T. and Kawaoka, Y. 1998. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. J. Virol. 72(9): 7626-7631.

Viseshakul, N., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Suradhat, S., Payungporn, S., Keawchareon, J., Oraveerakul, K., Wongyanin, P., Plitkul, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2004. The genome sequence analysis of H5N1 avian influenza A virus isolated from the outbreak among poultry populations in Thailand. Virology. 328(2): 169-176.

Wan, X.F., Ren, T., Luo, K.J., Liao, M., Zhang, G.H., Chen, J.D., Cao, W.S., Li, Y., Jin, N.Y., Xu, D. and Xin, C.A. 2005. Genetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in southern China during the 2003-04 avian influenza outbreaks. Arch. Virol. 150(6): 1257-1266.

Wang, M., Di, B., Zhou, D.H., Zheng, B.J., Jing, H., Lin, Y.P., Liu, Y.F., Wu, X.W., Qin, P.Z., Wang, Y.L., Jian, L.Y., Li, X.Z., Xu, J.X., Lu, E.J., Li, T.G. and Xu, J. 2006. Food markets with live birds as source of avian influenza. Emerg. Infect. Dis. 12(11): 1773-1775.

Wilchut, J and McElhaney, J.E. 2005. Antigenic Drift and Shift: Epidemic and Pandemic Influenza. In : Influenza. London. : Elsevier Limited. 47-53.

World Health Organization (WHO). 2008. “Cumulative number of confirmed human cases of Avian Influenza A/(H5N1) reported to WHO.” [Online]. Available: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_03_05/en/

Xu, X., Subbarao, Cox, N.J. and Guo, Y. 1999. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. Virology. 261(1): 15-19.

Zhou, H., Jin, M., Chen, H., Huag, Q. and Yu, Z. 2006. Genome-sequence analysis of the pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated in China in 2004. Virus. Genes. 32(1): 85-95.

Zitzow, L.A., Rowe, T., Morken, T., Shieh, W.J., Zaki, S. and Katz, J.M. 2002. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. J. Virol. 76(9): 4420-4429.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ ก

สารเคมีและการเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลาย 1x Tris-borate EDTA buffer (TBE)

นำ 10x TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

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

สารเคมี

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

การเตรียมสารเคมี

<u>การเตรียม AVL buffer</u>

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

<u>การเตรียม AW1 และ AW 2 buffer</u>

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

วิธีการสกัดแยก RNA

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

2. เติม 100% เอทานอล ปริมาณ 560 ไมโครลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง แล้วผสมให้เข้ากัน

3. ดูดสารลารละลายตัวอย่างปริมาณ 630 ไมโครลิตร ลงใน QIA spin column (อยู่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg (8000 rpm) 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ในหลอด 2 มิลลิลิตร ทิ้ง และเก็บส่วนของ QIA spin column ไว้

4. ดูดสารละลายตัวอย่างที่เหลือ แล้วทำซ้ำข้อ 3

5. เติม AW1 buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงใน QIA spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg (8000 rpm) 1 นาที เทของเหลวด้านล่างทิ้ง

6. เติม AW 2 buffer 500 ไมโครลิตร 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 มิลลิลิตร แล้วเติม AVE buffer ปริมาณ 60 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg (8000 rpm) 1 นาที

8. จากข้อ 7 จะได้ viral RNA ปริมาณ 60 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ^{O}ซ หรือ –80 ^{O}ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

สารเคมี

Binding buffer	130	มิลลิลิตร
Wash buffer concentration	50	มิลลิลิตร
Elution buffer	4	มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม Wash buffer concentration

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

วิธีการสกัด DNA ออกจากแผ่นอะกาโรสเจล

1. ตัด agarose gel ในส่วนที่มี PCR product ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Binding buffer ปริมาณเป็น 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดมา (เจล 1 มิลลิกรัม เท่ากับ 1 มิลลิลิตร)

2. นำตัวอย่างไปไว้ใน heat block ที่อุณหภูมิ 50 ^{O}ซ เป็นเวลาประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายจนหมด และควรทำให้เข้ากันทุกๆ 2-3 นาที

3. เมื่อเจลละลายจนสมบูรณ์แล้ว เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาณเท่ากับน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลง (inversion)

4. นำ spin column ซึ่งมีแผ่นเมมเบรนอยู่ตรงกลาง มาใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร

5. ทำการดูดตัวอย่างลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000-10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง

6. เติม Wash buffer ปริมาณ 750 ไมโครกรัม 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 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Elution buffer ปริมาณ 30 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000-10,000 x g 1 นาที

8. จากข้อ 7 จะได้ DNA บริสุทธิ์ปริมาตร 35 ไมโครลิตร 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	มิลลิลิตร
- Distrilled water	50	มิลลิลิตร

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนละลายเข้ากัน
2. แบ่งใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่ 4 ^{O}ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ ข

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ ค

รายละเอียดข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดนกที่เผยแพร่ในฐานข้อมูล Genbank **จำนวน 24 เส้น**

Hemagglutinin gene (H5)

CU-317: Hemagglutinin gene: EU616825

```
LOCUS       CU-317-HA               1667 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Moorhen/Thailand/CU-317/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1667)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1667)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1667
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Moorhen/Thailand/CU-317/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      582 a    302 c    386 g    397 t
ORIGIN
        1 atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
       61 attggttacc atgcaaacaa ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtt
      121 actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta
      181 gatggagtga agcctctaat tttgagagat tgtagtgtag ctggatggct cctcggaaac
      241 ccaatgtgtg acgaattcat taatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat
      301 ccagtcaatg acctctgtta cccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta
      361 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccagt
      421 catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc ctccttttc
      481 agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac
      541 aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtggggga ttcaccatcc taatgatgcg
      601 gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttccgttgg gacatcaaca
      661 ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga
      721 aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat
      781 ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt
      841 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg
      901 ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa
      961 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggctca gaaatagccc tcaaagagag
     1021 agaagaagaa aaaagagagg attatttgga gctatagcag gttttataga gggaggatgg
     1081 cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac
     1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg
     1201 atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa caacttagaa
     1261 aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat
     1321 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat
     1381 gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt
     1441 aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaac
     1501 ggaacgtatg actacccgca gtattcagaa gaagcaggac taaaaagaga ggaaataagt
     1561 ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg
     1621 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggat
```

CU-318: Hemagglutinin gene: EU616827

```
LOCUS       CU-318-HA               1667 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Moorhen/Thailand/CU-318/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1667)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1667)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1667
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Moorhen/Thailand/CU-318/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      582 a    302 c    386 g    397 t
ORIGIN
        1 atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
       61 attggttacc atgcaaacaa ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtt
      121 actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta
      181 gatggagtga agcctctaat tttgagagat tgtagtgtag ctggatggct cctcggaaac
      241 ccaatgtgtg acgaattcat taatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat
      301 ccagtcaatg acctctgtta cccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta
      361 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccagt
      421 catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc ctccttttc
      481 agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac
      541 aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtgggggа ttcaccatcc taatgatgcg
      601 gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttccgttgg gacatcaaca
      661 ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga
      721 aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat
      781 ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt
      841 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg
      901 ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa
      961 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggctca gaaatagccc tcaaagagag
     1021 agaagaagaa aaaagagagg attatttgga gctatagcag gttttataga gggaggatgg
     1081 cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac
     1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg
     1201 atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa caacttagaa
     1261 aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat
     1321 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat
     1381 gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt
     1441 aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaac
     1501 ggaacgtatg actacccgca gtattcagaa gaagcaggac taaaaagaga ggaaataagt
     1561 ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg
     1621 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggat
```

CU-319: Hemagglutinin gene: EU616829

```
LOCUS       CU-319-HA               1756 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Watercock/Thailand/CU-319/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1756)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1756)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1756
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Watercock/Thailand/CU-319/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      607 a    315 c    404 g    429 t
ORIGIN
        1 atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
       61 attggttacc atgcaaacaa atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg
      121 ttaaaagtga tcagatttgc attggttacc atgcaaacaa ctcgacagag caggttgaca
      181 caataatgga aaagaacgtt actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca
      241 acgggaagct ctgcgattta gatggagtga agcctctaat tttgagagat tgtagtgtag
      301 ctggatggct cctcggaaac ccaatgtgtg acgaattcat taatgtgccg gaatggtctt
      361 acatagtgga gaaggccaat ccagtcaatg acctctgtta cccaggggat ttcaatgact
      421 atgaagaatt gaaacaccta ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc
      481 ccaaaagttc ttggtccagt catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc
      541 tgggaaagtc ctccttttc agaaatgtgg tatggctttt caaaaagaac agtacatacc
      601 caacaattaa gaggagctac aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtggggga
      661 ttcaccatcc taatgatgcg gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctaya
      721 tttccgttgg gacatcaaca ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca
      781 aagtaaacgg gcaaagtgga aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg
      841 caatcaactt cgagagtaat ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca
      901 agaaagggga ctcaacaatt atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt
      961 gtcaaactcc aatgggggcg ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca
     1021 ccatcgggga atgccccaaa tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca actgggctca
     1081 gaaatagccc tcaaagagag agaagaagaa aaaagagagg attatttgga gctatagcag
     1141 gttttataga gggaggatgg cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca
     1201 atgagcaggg gagtgggtac gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag
     1261 tcaccaatga ggtcaactcg atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa
     1321 gggaatttaa caacttagaa aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt
     1381 tcctagatgt ctggacttat aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc
     1441 tagactttca tgactcaaat gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg
     1501 ataatgcaaa ggagctgggt aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat
     1561 gtatggaaag tgtgagaaac ggaacgtatg actacccgca gtattcagaa gaagcaagac
     1621 taaaaagaga ggaaataagt ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt
     1681 caatttattc tacagtggcg agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct
     1741 tatggatgtg ctccaa
```

CU-320: Hemagglutinin gene: EU616831

```
LOCUS       CU-320-HA               1693 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Quail/Thailand/CU-320/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1693)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1693)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1693
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Quail/Thailand/CU-320/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      591 a    307 c    387 g    408 t
ORIGIN
        1 gcttcttttt gcaatagtca gtcttgttaa aagtgatcag atttgcattg gttaccatgc
       61 aaacaactcg acagagcagg ttgacacaat aatggaaaag aacgttactg ttacacatgc
      121 ccaagacata ctggaaaaga cacacaacgg gaagctctgc gatctagatg gagtgaagcc
      181 tctaattttg agagactgta gtgtagctgg atggctcctc ggaaacccaa tgtgtgacga
      241 attcattaat gtgccggaat ggtcttacat agtggagaag gccaatccag tcaatgacct
      301 ctgttaccca ggggatttca atgactatga agaattgaaa cacctattga gcagaataaa
      361 ccattttgag aaaattcaga tcatccccaa aagttcttgg tccagtcatg aagcctcatt
      421 aggggtgagc tcagcatgtc cataccaggg aaagtcctcc tttttcagaa atgtggtatg
      481 gcttatcaaa aagaacagta catacccaac aataaagagg agctacaata ataccaacca
      541 agaagatctt ttggtactgt gggggattca ccatcctaat gatgcggcag agcagacaaa
      601 gctctatcaa aacccaacca cctacatttc cgttgggaca tcaacactaa accagagatt
      661 ggtaccaaga atagctacta gatccaaagt aaacgggcaa agtggaagga tggagttctt
      721 ctggacaatt ttaaaaccga atgatgcaat caacttcgag agtaatggaa atttcattgc
      781 tccagaatat gcatacaaaa ttgtcaagaa aggggactca acaattatga aaagtgaatt
      841 ggaatatggt aactgcaaca ccaagtgtca aactccaatg ggggcgataa actctagtat
      901 gccattccac aatatacacc ctctcactat cggggaatgc cccaaatatg tgaaatcaaa
      961 cagattagtc cttgcaactg ggctcagaaa tagccctcaa agagagagaa gaagaaaaaa
     1021 aagaggatta tttggagcta tagcaggttt tataaagggg ggatggcagg gaatggtaaa
     1081 tggttggtat gggtaccacc atagcaatga gcaggggagt gggtacgctg caaacaaaga
     1141 atccactcaa aaggcaatag atggagtcac caataaggtc aactcgataa ttgacaaaat
     1201 gaacactcat tttgaggccg ttggaaggga atttaacaac ttagaaagga gaatagagaa
     1261 tttaaacaag aagatggaag acgggttcct agatgtctgg acttataatg ctgaacttct
     1321 ggttctcatg gaaaatgaga gaactctaga ctttcatgac tcaaatgtca agaaccttta
     1381 cgacaaggtc cgactacagc ttagggataa tgcaaaggag ctgggtaatg gttgtttcga
     1441 gttctatcat aagtgtgata atgaatgtat ggaaagtgtg agaaacggaa cgtatgacta
     1501 cccgcagtat tcagaagaag caagactaaa aagagaggaa ataagtggag taaaattgga
     1561 atcaatagga atttaccaaa tattgtcaat ttattctaca gtggcgagtt ccctagcact
     1621 ggcaatcatg gtagctggtc tatccttatg gatgtgctcc aatgggtcgt tacaatgcag
     1681 aatttgcatt aaa
```

CU-321: Hemagglutinin gene: EU616833

```
LOCUS       CU-321-HA               1673 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Chicken/Thailand/CU-321/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1673)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1673)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1673
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Chicken/Thailand/CU-321/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      580 a    303 c    388 g    402 t
ORIGIN
        1 atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
       61 attggttacc atgcaaacaa ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaggaacgtt
      121 actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta
      181 gatggagtga agcctctaat tttgagagac tgtagtgtag ctggatggct cctcggaaac
      241 ccaatgtgtg acgaattcat taatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat
      301 ccagtcaatg acctctgtta cccagggaat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta
      361 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ctaaaagttc ttggtccagt
      421 catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc tgggaaagtc ctccttttc
      481 agaaatgtgg tatggcttgt caaaaagaac agtacatacc caacaattaa gaggagctac
      541 aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtgggggа ttcaccatcc taatgatgcg
      601 gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttccgttgg gacatcaaca
      661 ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga
      721 aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat
      781 ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt
      841 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg
      901 ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ctatcgggga atgccccaaa
      961 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggctca gaaatagccc tcaaagagag
     1021 agaagaagaa aaaagagagg attatttgga gctatagcag gttttataga gggaggatgg
     1081 cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac
     1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg
     1201 atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa caacttagaa
     1261 aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat
     1321 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat
     1381 gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt
     1441 aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaac
     1501 ggaacgtatg actacccgca gtattcagaa gaagcaagac taaaaagaga ggaaataagt
     1561 ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg
     1621 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctc
```

CU-328: Hemagglutinin gene: EU616835

```
LOCUS       CU-328-HA               1719 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Duck/Thailand/CU-328/07(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1719)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1719)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1719
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Duck/Thailand/CU-328/07(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      599 a    310 c    397 g    413 t
ORIGIN
        1 atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
       61 attggttacc atgcaaacaa ctcaacagag cagattgaca caataatgga aaagaacgtt
      121 actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgtgatcta
      181 gatggagtga agcctctaat tttgagagat tgtagtgtag ctggatggct ccttggaaac
      241 ccaatgtgtg atgaattcat caatgtgccg gaatggtcct acatagtgga gaaggccaat
      301 ccagccaatg acctctgtta cccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta
      361 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaaattc ttggtccagt
      421 catgaagcct cattgggagt gagctcagca tgtccatatc agggaaagtc ctccttttc
      481 agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac
      541 aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtgggggа ttcaccatcc taatgatgcg
      601 gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttccgttgg gacatcaaca
      661 ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga
      721 aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat
      781 ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt
      841 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaggt gtcaaactcc aatgggggcg
      901 ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa
      961 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggctca gaaatagccc tcaaagagag
     1021 agaagaagaa aaaagagagg attatttgga gctatagcag gttttataga gggaggatgg
     1081 cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac
     1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg
     1201 atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa caacttagaa
     1261 aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat
     1321 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat
     1381 gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt
     1441 aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaac
     1501 ggaacgtatg actacccgca gtattcagag gaagcaagac taaaaagaga ggaaataagt
     1561 ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg
     1621 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatggg
     1681 tcgctacaat gcagaatttg cattaaattg gagtcagat
```

CU-329: Hemagglutinin gene: EU616843

```
LOCUS       CU-329-HA               1667 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Duck/Thailand/CU-329/07(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1667)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1667)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1667
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Duck/Thailand/CU-329/07(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      587 a    303 c    379 g    398 t
ORIGIN
        1 atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
       61 attggttacc atgcaaacaa ctcaacagag cagattgaca caataatgga aaagaacgtt
      121 actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgtgatcta
      181 gatggagtga agcctctaat tttgagagat tgtagtgtag ctggatggct ccttggaaac
      241 ccaatgtgtg atgaattcat caatgtgccg gaatggtcct acatagtgga gaaggccaat
      301 ccagccaatg acctctgtta cccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta
      361 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaaattc ttggtccagt
      421 catgaagcct cattgggagt gagctcagca tgtccatatc tgggaaatcc ctccttttc
      481 agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac
      541 aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtgggggа ttcaccatcc taatgatgcg
      601 gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctaca tttccgttgg gacatcaaca
      661 ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct accagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga
      721 aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat
      781 ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacgatt
      841 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggagcg
      901 ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa
      961 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca actggactca gaaatagccc tcaaagagag
     1021 aaaagaagaa aaaagagagg attatttgga gctatagcag gttttataga gggaggatgg
     1081 cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac
     1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg
     1201 atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gctgttggaa gggaatttaa caacttagaa
     1261 aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat
     1321 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat
     1381 gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt
     1441 aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaac
     1501 ggaacgtatg actacccgca gtattcagag gaagcaagac taaaaagaga ggaaataagt
     1561 ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg
     1621 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggat
```

CU-330: Hemagglutinin gene: EU616851

```
LOCUS       CU-330-HA               1715 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Quail/Thailand/CU-330/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1715)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1715)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1715
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Quail/Thailand/CU-330/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      593 a    304 c    399 g    419 t
ORIGIN
        1 atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
       61 attggttacc atgcaaacaa ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaggaacgtt
      121 actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta
      181 gatggagtga agcctctaat tttgagagac tgtagtgtag ctggatggct cctcggaaac
      241 ccaatgtgtg acgaattcat taatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat
      301 ccagtcaatg acctctgtta cccagggaat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta
      361 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ctaaaagttc ttggtccagt
      421 catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc tgggaaagtc ctccttttc
      481 agaaatgtgg tatggcttgt caaaaagaac agtacatacc caacaattaa gaggagctac
      541 aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtgggggа ttcaccatcc taatgatgcg
      601 gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttctgttgg gacatcaaca
      661 ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga
      721 aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat
      781 ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt
      841 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg
      901 ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ctatcgggga atgccccaaa
      961 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca actgggctca gaaatagccc tcaaagagag
     1021 agaagaagaa aaaaaagagg attatttgga gctatagcag gttttataga ggggggatgg
     1081 cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtat
     1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg
     1201 ataattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa caacttagaa
     1261 aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat
     1321 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat
     1381 gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt
     1441 aatggttgtt tcgagttcta tcataagtgt gataatgaat gtatggaaag tgtgagaaac
     1501 ggaacgtatg actacccgca gtattcagaa gaagcaagac taaaaagaga ggaaataagt
     1561 ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatattgt caatttattc tacagtggcg
     1621 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatggg
     1681 tcgttacaat gcagaatttg cattaaattg gagtc
```

CU-331: Hemagglutinin gene: EU616859

```
LOCUS       CU-331-HA               1710 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Quail/Thailand/CU-331/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1710)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1710)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1710
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Quail/Thailand/CU-331/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      592 a    304 c    395 g    419 t
ORIGIN
        1 atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
       61 attggttacc atgcaaacaa ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaggaacgtt
      121 actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta
      181 gatggagtga agcctctaat tttgagagac tgtagtgtag ctggatggct cctcggaaac
      241 ccaatgtgtg acgaattcat taatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat
      301 ccagtcaatg acctctgtta cccagggaat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta
      361 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ctaaaagttc ttggtccagt
      421 catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc tgggaaagtc ctccttttc
      481 agaaatgtgg tatggcttgt caaaaagaac agtacatacc caacaattaa gaggagctac
      541 aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtgggggа ttcaccatcc taatgatgcg
      601 gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttctgttgg gacatcaaca
      661 ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga
      721 aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat
      781 ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt
      841 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg
      901 ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ctatcgggga atgccccaaa
      961 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca actgggctca gaaatagccc tcaaagagag
     1021 agaagaagaa aaaaaagagg attatttgga gctatagcag gttttataga ggggggatgg
     1081 cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtat
     1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg
     1201 atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa caacttagaa
     1261 aggagaatat agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat
     1321 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat
     1381 gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt
     1441 aatggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtgagaaac
     1501 ggaacgtatg actacccgca gtattcagaa gaagcaagac taaaaagaga ggaaataagt
     1561 ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatattgt caatttattc tacagtggcg
     1621 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatggg
     1681 tcgttacaat gcagaatttg cattaaattg
```

CU-332: Hemagglutinin gene: EU616867

```
LOCUS       CU-332-HA               1714 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Quail/Thailand/CU-332/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1714)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1714)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1714
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Quail/Thailand/CU-332/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      593 a    304 c    399 g    418 t
ORIGIN
        1 atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
       61 attggttacc atgcaaacaa ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaggaacgtt
      121 actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta
      181 gatggagtga agcctctaat tttgagagac tgtagtgtag ctggatggct cctcggaaac
      241 ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat
      301 ccagtcaatg acctctgtta cccagggaat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta
      361 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ctaaaagttc ttggtccagt
      421 catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc tgggaaagtc ctccttttc
      481 agaaatgtgg tatggcttgt caaaaagaac agtacatacc caacaattaa gaggagctac
      541 aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtgggggа ttcaccatcc taatgatgcg
      601 gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttctgttgg gacatcaaca
      661 ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga
      721 aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat
      781 ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt
      841 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg
      901 ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ctatcgggga atgccccaaa
      961 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca actgggctca gaaatagccc tcaaagagag
     1021 agaagaagaa aaaaaagagg attatttgga gctatagcag gttttataga ggggggatgg
     1081 cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtat
     1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg
     1201 ataattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa caacttagaa
     1261 aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat
     1321 aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat
     1381 gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt
     1441 aatggttgtt tcgagttcta tcataagtgt gataatgaat gtatggaaag tgtgagaaac
     1501 ggaacgtatg actacccgca gtattcagaa gaagcaagac taaaaagaga ggaaataagt
     1561 ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatattgt caatttattc tacagtggcg
     1621 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatggg
     1681 tcgttacaat gcagaatttg cattaaattg gagt
```

CU-333: Hemagglutinin gene: EU616875

```
LOCUS       CU-333-HA               1696 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Quail/Thailand/CU-333/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1696)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1696)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1696
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Quail/Thailand/CU-333/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      583 a    304 c    393 g    415 t
ORIGIN
        1 aatagtgctt ctttttgcaa tagtcagtct tgttaaaagt gatcagattt gcattggtta
       61 ccatgcaaac aactcgacag agcaggttga cacaataatg gaaaggaacg ttactgttac
      121 acatgcccaa gacatactgg aaaagacaca caacgggaag ctctgcgatc tagatggagt
      181 gaagcctcta attttgagag actgtagtgt agctggatgg ctcctcggaa acccaatgtg
      241 tgacgaattc attaatgtgc cggaatggtc ttacatagtg gagaaggcca atccagtcaa
      301 tgacctctgt tacccaggga atttcaatga ctatgaagaa ttgaaacacc tattgagcag
      361 ataaaccat tttgagaaaa ttcagatcat ccctaaaagt tcttggtcca gtcatgaagc
      421 ctcattaggg gtgagctcag catgtccata cctgggaaag tcctcctttt tcagaaatgt
      481 ggtatggctt gtcaaaaaga acagtacata cccaacaatt aagaggagct acaataatac
      541 caaccaagaa gatcttttgg tactgtgggg gattcaccat cctaatgatg cggcagagca
      601 gacaaagctc tatcaaaacc caaccaccta tatttctgtt gggacatcaa cactaaacca
      661 gagattggta ccaagaatag ctactagatc caaagtaaac gggcaaagtg gaaggatgga
      721 gttcttctgg acaattttaa aaccgaatga tgcaatcaac ttcgagagta atggaaattt
      781 cattgctcca gaatatgcat acaaaattgt caagaaaggg gactcaacaa ttatgaaaag
      841 tgaattggaa tatggtaact gcaacaccaa gtgtcaaact ccaatggggg cgataaactc
      901 tagtatgcca ttccacaata tacaccctct cactatcggg gaatgcccca aatatgtgaa
      961 atcaaacaga ttagtccttg caactgggct cagaaatagc cctcaaagag agagaagaag
     1021 aaaaaaaaga ggattatttg gagctatagc aggttttata gaggggggat ggcagggaat
     1081 ggtagatggt tggtatgggt accaccatag caatgagcag gggagtgggt atgctgcaga
     1141 caaagaatcc actcaaaagg caatagatgg agtcaccaat aaggtcaact cgatcattga
     1201 caaaatgaac actcagtttg aggccgttgg aagggaattt aacmacttag aaaggagaat
     1261 agagaattta aacaagaaga tggaagacgg gttcctagat gtctggactt ataatgctga
     1321 acttctggtt ctcatggaaa atgagagaac tctagacttt catgactcaa atgtcaagaa
     1381 cctttacgac aaggtccgac tacagcttag ggataatgca aaggagctgg gtaatggttg
     1441 tttcgagttc tatcataagt gtgataatga atgtatggaa agtgtgagaa acggaacgta
     1501 tgactacccg cagtattcag aagaagcaag actaaaaaga gaggaaataa gtggagtaaa
     1561 attggaatca ataggaattt accaaatatt gtcaatttat tctacagtgg cgagttccct
     1621 agcactggca atcatggtag ctggtctatc cttatggatg tgctccaatg ggtcgttaca
     1681 atgcagaatt tgcatt
```

CU-334: Hemagglutinin gene: EU616883

```
LOCUS       CU-334-HA               1707 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Watercock/Thailand/CU-334/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1707)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1707)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1707
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Watercock/Thailand/CU-334/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="HA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      587 a    304 c    397 g    419 t
ORIGIN
        1 gtgcttcttt ttgcaatagt cagtcttgtt aaaagtgatc agatttgcat tggttaccat
       61 gcaaacaact cgacagagca ggttgacaca ataatggaaa agaacgttac tgttacacat
      121 gcccaagaca tactggaaaa gacacacaac gggaagctct gcgatctaga tggagtgaag
      181 cctctaattt tgagagattg tagtgtagct ggatggctcc ttggaaaccc aatgtgtgac
      241 gaattcatta atgtgccgga atggtcttac atagtggaga aggccaatcc agtcaatgac
      301 ctctgttacc cagggaattt caatgactat gaagaattga aacacctatt gagcagaata
      361 aaccattttg agaaaattca gatcatcccc aaaagttctt ggtccagtca tgaagcctca
      421 ttaggggtga gctcagcatg tccatacctg ggaaagtcct ccttttcag aaatgtggta
      481 tggcttgtca aaaagaacag tacataccca acaattaaga ggagctacaa taataccaac
      541 caagaagatc ttttggtact gtgggggatt caccatccta atgatgcggc agagcagaca
      601 aagctctatc aaaacccaac cacctatatt tctgttggga catcaacact aaaccagaga
      661 ttggtaccaa gaatagctac tagatccaaa gtaaacgggc aaagtggaag gatggagttc
      721 ttctggacaa ttttaaaacc gaatgatgca atcaacttcg agagtaatgg aaatttcatt
      781 gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag aaaggggact caacaattat gaaaagtgaa
      841 ttggaatatg gtaactgcaa caccaagtgt caaactccaa tgggggcgat aaactctagt
      901 atgccattcc acaatataca ccctctcact atcggggaat gccccaaata tgtgaaatca
      961 aacagattag tccttgcaac tgggctcaga aatagccctc aaagagagag aagaagaaaa
     1021 aagagaggat tatttggagc tatagcaggt tttatagagg ggggatggca gggaatggta
     1081 gatggttggt atgggtacca ccatagcaat gagcagggga gtgggtatgc tgcagacaaa
     1141 gaatccactc aaaaggcaat agatggagtc accaataagg tcaactcgat cattgacaaa
     1201 atgaacactc agtttgaggc cgttggaagg gaatttaaca acttagaaag gagaatagag
     1261 aatttaaaca agaagatgga agacgggttc ctagatgtct ggacttataa tgctgaactt
     1321 ctggttctca tggaaaatga gagaactcta gactttcatg actcaaatgt caagaacctt
     1381 tacgacaagg tccgactaca gcttagggat aatgcaaagg agctgggtaa tggttgtttc
     1441 gagttctatc ataagtgtga taatgaatgt atggaaagtg tgagaaacgg aacgtatgac
     1501 tacccgcagt attcagaaga agcaagacta aaaagagagg aaataagtgg agtaaaattg
     1561 gaatcaatag gaatttacca aatattgtca atttattcta cagtggcgag ttccctagca
     1621 ctggcaatca tggtagctgg tctatcctta tggatgtgct ccaatgggtc gttacaatgc
     1681 agaatttgca ttaaattgga gtcagat
```

Neuraminidase gene (N1)

CU-317: Neuraminidase gene: EU616826

```
LOCUS       CU-317-NA               1352 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Moorhen/Thailand/CU-317/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1352)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1352)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1352
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Moorhen/Thailand/CU-317/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      401 a    244 c    342 g    365 t
ORIGIN
        1 atgaatccaa ataagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatggtt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca
      121 gggaatcaac acaaagctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaatggatg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacagaagcc ctcacagaac attaatgagt
      421 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg caccagttgg ttgacaattg gaatttctgg cccagacagt
      541 ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatagaaaaa
      721 ggaaaagtgg ttaaatcagt cgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgccggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccgtggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
     1321 gctgagttgc cattcaccat tgacaagtag tt
```

CU-318: Neuraminidase gene: EU616828

```
LOCUS       CU-318-NA               1343 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Moorhen/Thailand/CU-318/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1343)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1343)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1343
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Moorhen/Thailand/CU-318/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      396 a    243 c    342 g    362 t
ORIGIN
        1 atgaatccaa ataagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatggtt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca
      121 gggaatcaac acaaagctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaatggatg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacagaagcc ctcacagaac attaatgagt
      421 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg caccagttgg ttgacaattg gaatttctgg cccagacagt
      541 ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa
      721 gggaaagtgg ttaaatcagt cgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgccggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccgtggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
     1321 gctgagttgc cattcaccat tga
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CU-319: Neuraminidase gene: EU616830

```
LOCUS       CU-319-NA               1333 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Watercock/Thailand/CU-319/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1333)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1333)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1333
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Watercock/Thailand/CU-319/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      394 a    239 c    341 g    359 t
ORIGIN
        1 atgaatccaa ataagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatggtt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca
      121 gggaatcaac acaaagctga accaatcagc aatgctaatt ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcagtaa aattaacggg caattcatct ctttgcccca ttaatggatg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gagtgtcaaa gacagaagcc ctcacagaac attaatgagt
      421 tgccctgtgg gtgaggctcc ttccccgtat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg caccagttgg ttgacaattg gaatttctgg cccagacagt
      541 ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatagaaaaa
      721 ggaaaagtgg ttaaatcagt cgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgccggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccgtggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
     1321 gctgagttgc cat
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CU-320: Neuraminidase gene: EU616832

```
LOCUS       CU-320-NA               1352 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Quail/Thailand/CU-320/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1352)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1352)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1352
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Quail/Thailand/CU-320/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      400 a    244 c    343 g    365 t
ORIGIN
        1 atgaatccaa ataagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatggtt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca
      121 gggaatcaac acaaggctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaatggatg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacagaagcc ctcacagaac attaatgagt
      421 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg caccagttgg ttgacaattg gaatttctgg cccagacagt
      541 ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatagaaaaa
      721 ggaaaagtgg ttaaatcagt cgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgccggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccgtggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
     1321 gctgagttgc cattcaccat tgacaagtag tt
```

CU-321: Neuraminidase gene: EU616834

```
LOCUS       CU-321-NA               1339 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Chicken/Thailand/CU-321/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1339)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1339)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1339
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Chicken/Thailand/CU-321/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      397 a    242 c    339 g    361 t
ORIGIN
        1 atccaaataa gaagataata accatcggat caatctgtat ggtaactgga atggttagct
       61 taatgttaca aattgggaac ttgatctcaa tatgggtcag tcattcaatt cacacaggga
      121 atcaacacaa agctgaacca atcagcaatg ctaattttct tactgagaaa gctgtggctt
      181 cagtaaaatt aacgggcaat tcatctcttt gccccattaa tggatgggct gtatacagta
      241 aggacaacag tataaggatc ggttccaagg gggatgtgtt tgttataaga gagccattca
      301 tctcatgctc ccacttggaa tgcagaactt tcttttgac tcagggagcc ttgctgaatg
      361 acaagcactc caatgggagt gtcaaagaca gaagccctca cagaacatta atgagttgcc
      421 ctgtgggtga ggctccttcc ccatataact caaggtttga gtctgttgct tggtcagcaa
      481 gtgcttgcca tgatggcacc agttggttga caattggaat ttctggccca gacaatgggg
      541 ctgtggctgt attgaaatac aatggcataa taacagacac tatcaagagt tggaggaata
      601 acatactgag aactcaagag tctgaatgtg catgtgtaaa tggctcttgc tttactgtaa
      661 tgactgacgg accaagtaat ggtcaggcat cacataagat cttcaaaata gaaaaaggaa
      721 aagtggttaa atcagtcgaa ttggatgctc ctaattatca ctatgaggaa tgctcctgtt
      781 atcctgatgc cggcgaaatc acatgtgtgt gcagggataa ttggcatggc tcaaatcggc
      841 cgtgggtatc tttcaatcaa aatttggagt atcaaatagg atatatatgc agtggagttt
      901 tcggagacaa tccacgcccc aatgatggaa caggtagttg tggtccggtg tcctctaacg
      961 gggcatatgg ggtaaaaggg ttttcattta aatacggcaa tggtgtctgg atcgggagaa
     1021 caaaaagcac taattccagg agcggctttg aaatgatttg ggatccaaat gggtggactg
     1081 aaacggacag tagcttttca gtgaaacaag atatcgtagc aataactgat tggtcaggat
     1141 atagcgggag ttttgtccag catccagaac tgacaggact agattgcata agaccttgtt
     1201 tctgggttga gttgatcaga gggcggccca aagagagcac aatttggact agtgggagca
     1261 gcatatcttt ttgtggtgta aatagtgaca ctgtgggttg gtcttggcca gacggtgctg
     1321 agttgccatt caccattga
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CU-328: Neuraminidase gene: EU616836

```
LOCUS       CU-328-NA               1312 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Duck/Thailand/CU-328/07(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1312)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1312)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1312
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Duck/Thailand/CU-328/07(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      389 a    233 c    335 g    355 t
ORIGIN
        1 atgaatccaa acaagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatgatt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcgttc cattcacaca
      121 gggaatcaac agaaagctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcattaa aattggcggg caattcatct ctttgcccta ttaatgggtg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg atctttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacaggagcc ctcacagaac attaatgagt
      421 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg caccagttgg ttaacaattg gaatttctgg cccagacagt
      541 ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa
      721 gggaaagtgg ttaaatcagt tgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgccggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acactccgcg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacgggacat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga gcacgatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat cgttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gtgacaagta gt
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CU-329: Neuraminidase gene: EU616844

```
LOCUS       CU-329-NA               1348 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Duck/Thailand/CU-329/07(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1348)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1348)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1348
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Duck/Thailand/CU-329/07(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      392 a    243 c    348 g    365 t
ORIGIN
        1 atgaatccga acaagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatgatt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcgttc cattcacaca
      121 gggaatcaac agaaagctga accaatcagc aatactaatg ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcattaa aattggcggg caattcatct ctttgcccta ttaatgggtg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg atctttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacaggagcc ctcacagaac gttaatgagt
      421 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg caccagttgg ttaacaattg gaatttctgg cccagacagt
      541 ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa
      721 gggaaagtgg ttaaatcagt tgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgccggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acactccgcg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacgggacat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga gcacgatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat cgttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
     1321 gctgagttgc cattcaccat tgacaagt
```

CU-330: Neuraminidase gene: EU616852

```
LOCUS       CU-330-NA               1340 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Quail/Thailand/CU-330/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1340)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1340)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1340
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Quail/Thailand/CU-330/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      394 a    240 c    342 g    364 t
ORIGIN
        1 atgaatccaa ataagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatggtt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca
      121 gggaatcaac acaaagctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcagtga aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaatggctg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gagtgtcaaa gacaggagcc ctcacagaac attaatgagt
      421 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg cactagttgg ttgacaattg gaatttctgg cccagacaat
      541 ggggctgtgg ctgtgttgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa
      721 gggaaagtgg ttaaatcagt cgagttggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgctggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacggagcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaattgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcag cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
     1321 gctgagttgc cattcaccat
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CU-331: Neuraminidase gene: EU616860

```
LOCUS       CU-331-NA               1322 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Quail/Thailand/CU-331/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1322)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1322)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1322
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Quail/Thailand/CU-331/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      393 a    237 c    336 g    356 t
ORIGIN
        1 atgaatccaa ataagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatggtt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca
      121 gggagtcaac acaaagctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcagtga aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaatggctg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gagtgtcaaa gacaggagcc ctcacagaac attaatgagt
      421 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg cactagttgg ttgacaattg gaatttctgg cccagacaat
      541 ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa
      721 ggaaaagtag ttaaatcagt cgaattggat gctcccaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgccggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacggagcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaattgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcag cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat ctttttgtgg tgtaaatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
     1321 gc
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CU-332: Neuraminidase gene: EU616868

```
LOCUS       CU-332-NA               1320 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Quail/Thailand/CU-332/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1320)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1320)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1320
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Quail/Thailand/CU-332/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      388 a    234 c    340 g    358 t
ORIGIN
        1 atgaatccaa ataagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatggtt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca
      121 gggagtcaac acaaagctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcagtga aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaatggctg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gagtgtcaaa gacaggagcc ctcacagaac attaatgagt
      421 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg cactagttgg ttgacaattg gaatttctgg cccagacaat
      541 ggggctgtgg ctgtgttgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa
      721 gggaaagtgg ttaaatcagt cgagttggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgctggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacggagcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaattgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcag cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat ctttttgtgg tgtagatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CU-333: Neuraminidase gene: EU616876

```
LOCUS       CU-333-NA               1323 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Quail/Thailand/CU-333/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1323)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1323)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1323
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Quail/Thailand/CU-333/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      389 a    235 c    340 g    359 t
ORIGIN
        1 atgaatccaa ataagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatggtt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca
      121 gggaatcaac acaaagctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcagtga aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaatggctg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gagtgtcaaa gacaggagcc ctcacagaac attaatgagt
      421 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg cactagttgg ttgacaattg gaatttctgg cccagacaat
      541 ggggctgtgg ctgtgttgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa
      721 gggaaagtgg ttaaatcagt cgagttggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgctggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacggagcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaattgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcag cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat ctttttgtgg tgtagatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
     1321 gct
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CU-334: Neuraminidase gene: EU616884

```
LOCUS       CU-334-NA               1320 bp    DNA     linear       05-MAR-2008
DEFINITION  Influenza A virus strain A/Watercock/Thailand/CU-334/06(H5N1).
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus
  ORGANISM  Influenza A virus
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1320)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     H5N1 influenza virus in Live bird and Food markets in Thailand
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1320)
  AUTHORS   Choatrakol,C., Lapkuntod,J., Tantilertcharoen,R.,
            Thanawongnuwech,R., Suradhat,S., Suwannakarn,K., Theamboonlers,A.,
            Poovorawan,Y. and Amonsin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-MAR-2008) Faculty of Veterinary Science, Veterinary
            Public Health Department, Chulalongkorn University, Pathumwan,
            Bangkok 10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1320
                     /organism="Influenza A virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="A/Watercock/Thailand/CU-334/06(H5N1)"
                     /serotype="H5N1"
                     /segment="NA"
                     /country="Thailand"
BASE COUNT      388 a    233 c    340 g    359 t
ORIGIN
        1 atgaatccaa ataagaagat aataatcatc ggatcaatct gtatggtaac tggaatggtt
       61 agcttaatgt tacaaattgg gaacttgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca
      121 gggagtcaac acaaagctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg
      181 gcttcagtga aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaatggctg ggctgtatac
      241 agtaaggaca acagtataag gatcggttcc aaggggatg tgtttgttat aagagagcca
      301 ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg
      361 aatgacaagc actccaatgg gagtgtcaaa gacaggagcc ctcacagaac attaatgagt
      421 tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca
      481 gcaagtgctt gccatgatgg cactagttgg ttgacaattg gaatttctgg cccagacaat
      541 ggggctgtgg ctgtgttgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggagg
      601 aataacatac tgagaactca agagtctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact
      661 gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa
      721 gggaaagtgg ttaaatcagt cgagttggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc
      781 tgttatcctg atgctggcga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat
      841 cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtgga
      901 gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct
      961 aacggagcat atggggtaaa agggttttca tttaaatacg gcaatggtgt ctggatcggg
     1021 agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg
     1081 actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattggtca
     1141 ggatatagcg ggagttttgt ccagcatcca gaattgacag gactagattg cataagacct
     1201 tgtttctggg ttgagttgat cagagggcag cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg
     1261 agcagcatat ctttttgtgg tgtagatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggt
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชื่นสกนธ์ เชาว์ตระกูล เกิดเมื่อวันที่ 9 เมษายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2548 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย