

ระบาควิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสไข้หวัดสุนัขในประเทศไทย

นางสาว นวรัตน์ โปธิสุวรรณ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**PREVALENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
CANINE INFLUENZA VIRUS IN THAILAND**

Miss Nawarat Posuwan

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

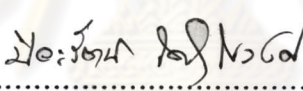
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ระบาดวิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของ  
เชื้อไวรัสไข้หวัดสุนัขในประเทศไทย  
โดย นางสาวนวรรตน์ โพธิ์สุวรรณ  
สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์.ดร. สัตยชัย พงุภกร  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

---

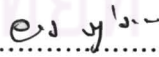
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


  
..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ ไตสุโขวงศ)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร. สัตยชัย พงุภกร)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

  
..... กรรมการ  
(สัตวแพทย์หญิง ดร. ประวีณา กิติคุณ)

  
..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. ณัฐนันท์ ปัญจวรรณ)

นวรรค์ โปธิสุวรรณ : ระบาดวิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัส  
ไข้หวัดสุนัขในประเทศไทย (PREVALENCE AND MOLECULAR  
CHARACTERIZATION OF CANINE INFLUENZA VIRUS IN THAILAND) อ.ที่  
ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ.ดร. สัตย์ชัย พยุภกร, อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ.นพ.ยง  
ภูววรรณ, 68 หน้า

ไข้หวัดสุนัข (Canine influenza A virus subtype H3N8) มีการรายงานการติดเชื้อครั้งแรกในพ.ศ. 2548 ซึ่งเป็นการข้ามสายพันธุ์จากไข้หวัดม้า (Equine influenza virus subtype H3N8) มาสู่สุนัขพันธุ์ Greyhound ในรัฐ Florida, US ต่อมาในปี พ.ศ. 2551 มีการรายงานการระบาดของเชื้อไข้หวัดสุนัขมาสู่สุนัขพันธุ์อื่นๆ นอกจากสุนัขพันธุ์ Greyhound นอกจากนี้ยังมีรายงานการระบาดของไข้หวัดสุนัขโดยเกิดจากการข้ามสายพันธุ์จาก Avian influenza virus subtype H3N2 มาสู่สุนัขในประเทศเกาหลีใต้ ถึงแม้ว่ายังไม่มีการรายงานของการข้ามสายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดสุนัขมาสู่มนุษย์ แต่เชื้อไข้หวัด (Influenza A virus) มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ค่อนข้างสูง นอกจากนี้สุนัขยังเป็นสัตว์เลี้ยงที่ใกล้ชิดกับมนุษย์มาก จึงควรเฝ้าระวังการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ของไข้หวัดสุนัข Canine influenza A virus มาสู่มนุษย์ ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการติดเชื้อและระบาดวิทยาของ Canine Influenza Virus (CIV) และไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจชนิดต่าง ๆ ในสุนัข ได้แก่ Canine Adenovirus (CAV), Canine Parainfluenza Virus (CPIV) และ Canine Distemper Virus (CDV) ในประชากรสุนัขปกติ 102 ตัวอย่าง และสุนัขที่เป็นโรคระบบทางเดินหายใจ 109 ตัวอย่าง และการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไข้หวัดสุนัขที่พบในประเทศไทย เพื่อค้นหาโอกาสการติดเชื้อไข้หวัดสุนัขข้ามสายพันธุ์มายังมนุษย์ ผลการตรวจสอบด้วยวิธี nested-PCR และ Nucleotide sequencing พบว่าระบาดของเชื้อ CAV, CPIV, CDV และ CIV ในสุนัขปกติเท่ากับ 0%, 0.98%, 2.94% และ 2.94% ตามลำดับ และการระบาดในสุนัขที่เป็นโรคระบบทางเดินหายใจเท่ากับ 9.17%, 11.93%, 1.83% และ 2.75% ตามลำดับ นอกจากนี้ในสุนัขปกติยังพบการติดเชื้อร่วมระหว่าง CPIV กับ CDV 0.98% ในขณะที่สุนัขที่เป็นโรคระบบทางเดินหายใจพบการติดเชื้อร่วมระหว่าง CAV กับ CIV 1.83%, CIV กับ CPIV 0.92%, CAV กับ CPIV 1.83% และ CAV, CDV กับ CPIV 0.92% จากนั้นนำตัวอย่างที่ติดเชื้อ CIV ทั้ง 9 ตัวอย่าง มาจำแนกสายพันธุ์เชื้อไข้หวัดสุนัขในประเทศไทยด้วยวิธี nested-PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ subtype H1, H3 และ H5 พบว่ามีสุนัขปกติ 3 ตัวอย่างและสุนัขป่วย 2 ตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจสอบสายพันธุ์ได้ จึงจำแนกเป็น unclassified subtype ซึ่งจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป สำหรับสุนัขป่วยอีก 4 ตัวอย่างสามารถจำแนกเป็นสายพันธุ์ H1 จำนวน 3 ตัวอย่างและ H3 จำนวน 1 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree และ % sequence identity matrix พบว่า CIV subtype H1 มีความใกล้เคียงกับไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล seasonal human influenza virus (H1N1) ส่วน CIV subtype H3 มีความใกล้เคียงกับ canine influenza virus (H3N8) ซึ่งอาจเกิดจากการนำเข้าสู่สุนัขมาจากประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนบริเวณ Receptor binding site และ Cleavage site ของ HA gene พบว่า CIV ทั้ง H1 และ H3 เป็นเชื้อไวรัสชนิดก่อโรคไม่รุนแรง โดยจะมีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในบริเวณระบบทางเดินหายใจเท่านั้น นอกจากนี้เชื้อ CIV สายพันธุ์ H1 มี receptor binding site ที่สามารถจับกับ receptor บนผิวเซลล์ของคนได้ จึงมีโอกาสนในการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์มาสู่มนุษย์ด้วย ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้มีประโยชน์ต่อการวางแผนรับมือ และการวางมาตรการเพื่อป้องกันหรือควบคุมการระบาดของไวรัสในอนาคตต่อไป

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต..... นวรรค์ โปธิสุวรรณ  
สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##5174784030: MAJOR: MIDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: Influenza A virus/ Canine/ Respiratory disease/ Detection

NAWARAT POSUWAN: PREVALENCE AND MOLECULAR  
CHARACTERIZATION OF CANINE INFLUENZA VIRUS IN THAILAND. THESIS  
PRINCIPAL ADVISOR: SUNCHAI PAYUNGORN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR:  
PROF. YONG POOVORAWAN, Ph. D., 68 pp

In 2004, canine influenza A virus (H3N8) has been reported to infect and cause respiratory illness in dogs in Florida as a result of direct transmission from equine influenza virus (H3N8) to greyhounds. In 2005, canine influenza viruses (H3N8) were also isolated from non-greyhound dogs with respiratory disease in Florida. Although, no report of canine influenza virus transmission to human but influenza A virus has high rate of mutation and dogs are also closely contact with human. Thus, inter-transmission of canine influenza virus between dog and human should be considered. This study described the molecular characterization of canine influenza virus in Thailand and prevalence of canine respiratory viruses including Canine Adenovirus (CAV), Canine Parainfluenza Virus (CPIV), Canine Distemper Virus (CDV) and Canine Influenza Virus (CIV). Nasal swab samples collected from 102 healthy dogs and 109 dogs with respiratory disease and then canine respiratory viruses were detected by nested PCR and further confirmed by nucleotide sequencing. The prevalence of CAV, CIV, CDV and CPIV in healthy dogs was 0%, 2.94%, 2.94% and 0.98%; whereas that found in dogs with respiratory diseases was 9.17%, 2.75 %, 1.83% and 11.93%, respectively. In healthy dogs, co-infection with CPIV and CDV was detected in only 0.98%. On the other hand, dogs with respiratory symptoms showed multiple infections with CAV and CIV in 1.83%, CIV and CPIV in 0.92%, CAV and CPIV in 1.83% and CAV, CDV and CPIV in 0.92%. Furthermore, 9 samples of CIV were characterized by nested PCR using primer specific to H1, H3 and H5 subtypes. The result showed that 3 samples from normal dogs and 2 samples from sick dogs were unclassified subtype; whereas another 4 samples from dogs with respiratory disease can be classified into H1 (3 samples) and H3 (1 sample) subtypes. Phylogenetic analysis and sequence identity matrix showed that each of CIV subtype H1 was closely related to seasonal human influenza virus (H1N1) whereas CIV subtype H3 was highly similar with canine influenza virus (H3N8). Finally, analysis of amino acids within the receptor binding site and cleavage site implied that CIV subtype H1 and H3 were low pathogenic (LPA1) and can be localized only in the respiratory system. However, CIV subtype H1 had receptor binding site that can interact with receptor on human host cells implying the possibility of inter-transmission between human and dogs. The results obtained from this study are useful for preparation in order to prevent or control the outbreak of this virus in the future.

Department: Biochemistry

Field of Study: Medical Biochemistry

Academic Year: 2009

Student's Signature.....*Nawarat Posuwan*.....

Advisor's Signature.....*Sunchai Payungporn*.....

Co-Advisor's Signature.....*Yong Pau*.....

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ อ.ดร. สัตยชัย พยุงกร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียบพร้อม และที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้และแก้ไขเนื้อหาใจโครงสร้างวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ สพ.ญ. อัญญรัตน์ ดันธีรวงศ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ในการเก็บตัวอย่าง ให้ความรู้ในการเลี้ยงเซลล์ แยกและเพิ่มจำนวนไวรัส รวมถึงกันตรวจสอบไวรัสหลังจากเลี้ยงในเซลล์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาทางคลินิก ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ตลอดจน ดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาดังแต่แรกเข้าศึกษากระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัว เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ง
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ท
บทที่ 1 บทนำ.....	1
— ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
— คำถามของการวิจัย.....	2
— วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
— สมมติฐาน.....	3
— ขอบเขตของการวิจัย.....	4
— ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
— คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	5
— คำสำคัญ.....	5
— ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	6
— การค้นพบ canine influenza virus.....	6
— ไวรัสวิทยาของเชื้อ influenza virus.....	6
— การจำแนกสายพันธุ์และการกลายพันธุ์ของเชื้อ Influenza A virus.....	8
— กระบวนการกลายพันธุ์ของเชื้อ Influenza virus.....	9
— วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ influenza A virus.....	10
— การติดเชื้อ Influenza A virus.....	11
— พยาธิสภาพจากการติดเชื้อ canine influenza virus.....	12
— วิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อไวรัส Influenza A virus.....	12
— หลักการของ Polymerase Chain Reaction (PCR).....	13
— ไวรัสวิทยาของเชื้อ Canine Parainfluenza virus.....	13

	หน้า
– วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ parainfluenza virus.....	15
– การติดเชื้อ canine parainfluenza virus.....	16
– พยาธิสภาพเมื่อติดเชื้อ canine parainfluenza virus.....	16
– วิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อ canine parainfluenza virus.....	16
– ไวรัสวิทยาของเชื้อ canine Adenovirus.....	17
– วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ Adenovirus .....	18
– การติดเชื้อ canine adenovirus.....	19
– พยาธิสภาพจากการติดเชื้อ canine adenovirus.....	19
– วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ canine adenovirus.....	19
– ไวรัสวิทยาของเชื้อ canine distemper virus.....	20
– การติดเชื้อ canine distemper virus.....	21
– พยาธิสภาพจากการติดเชื้อ canine distemper virus.....	21
– วิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อ canine distemper virus.....	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
– รูปแบบการวิจัย.....	22
– วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	22
– อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเก็บตัวอย่าง Nasal swab.....	22
– สารเคมีสำหรับการสกัด nucleic acid.....	22
– สารเคมีสำหรับการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription.....	23
– สารเคมีสำหรับการตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR.....	23
– วัสดุและสารเคมีสำหรับ cloning และ transformation ใน <i>E.coli</i> .....	23
– สารเคมีสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing) .....	23
– วัสดุและสารเคมีสำหรับการแยกและเพิ่มจำนวนไวรัส (virus isolation) .....	24
– โปรแกรมสำหรับ bioinformatic และการวิเคราะห์ข้อมูล.....	24
– วัสดุที่ใช้สำหรับการวิจัย.....	24
– อุปกรณ์สำหรับงานวิจัย.....	25
– วิธีการดำเนินวิจัย.....	25
– การเก็บตัวอย่าง Nasal swab.....	25
– การสกัด RNA.....	26



— การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription โดยใช้ Random hexamer.....	26
— การสกัด DNA.....	26
— การเตรียม Positive control ด้วยวิธี cloning.....	27
— การออกแบบไพรเมอร์ (primer) .....	28
— การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบ canine influenza virus ที่บริเวณยีน matrix (M) .....	28
— การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบ canine distemper virus ที่บริเวณยีน nucleoprotein (NP) .....	30
— การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบ Canine parainfluenza virus ที่บริเวณยีน nucleoprotein (NP) .....	31
— การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบ Canine adenovirus ที่บริเวณยีน E3...	33
— การเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR amplification.....	35
— การหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	39
— การแยกและเพิ่มจำนวนไวรัสด้วย MDCK cell culture.....	39
— Hemagglutination test.....	40
— Immunostaining test.....	40
— การทำ Real-time PCR เพื่อหา viral load ของไวรัส.....	41
— การเพิ่มจำนวนยีน HA และ NA ที่จำเพาะด้วยวิธี PCR amplification.....	42
— การทำ phylogenetic analysis ในส่วนของยีน HA ของ canine influenza virus สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ.....	45
— การทำ Sequence Identity Matrix ในส่วนของยีน HA ของ canine influenza virus สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่าง ๆ.....	45
<b>บทที่ 4 ผลการทดลอง.....</b>	<b>46</b>
— ผลการตรวจสอบไวรัสระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี nested PCR.....	46
— การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จาก positive PCR product ของแต่ละตัวอย่าง.....	46
— การยืนยันผลการตรวจ CIV ด้วยเทคนิคอื่น ๆ.....	47
— ผลการแยกและเพิ่มจำนวนไวรัส (Virus isolation) ด้วย MDCK cell culture.....	47
— ผลการตรวจ Immunostaining test .....	47
— ผลการตรวจสอบปริมาณไวรัส (viral load) ด้วยวิธี real-time PCR.....	47

	หน้า
— ระบาดวิทยาของไวรัสระบบทางเดินหายใจในสุนัขที่พบในประเทศไทย.....	48
— การติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจชนิดเดียวในสุนัข (Single infection with canine respiratory viruses) .....	48
— การติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจอย่างน้อยสองชนิดในสุนัข (Multiple infections with canine respiratory viruses) .....	49
— ลักษณะอาการของสุนัขที่มีอาการของโรคในระบบทางเดินหายใจจากไวรัสในระบบทางเดินหายใจ (Clinical symptoms observed in dogs with respiratory diseases) .....	50
— การตรวจสอบ HA Subtype จากตัวอย่างที่พบ canine influenza A virus.....	50
— ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree (HA gene) ของไข้หวัดสุนัขในประเทศไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ ๑.....	51
— ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในส่วน Receptor binding site ของ HA.....	55
— ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในส่วน Cleavage site ของ HA.....	56
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	57
รายการอ้างอิง.....	61
ภาคผนวก.....	64
ภาคผนวก ก.....	65
ภาคผนวก ข.....	67
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	68

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดง Primers ที่ใช้ในการทำ PCR ของ Canine influenza virus (M gene).....	35
2. แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ PCR.....	35
3. แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ Canine influenza virus.....	35
4. แสดง Primers ที่ใช้ในการทำ PCR ของ Canine distemper virus (NP gene).....	36
5. แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ PCR ของ Canine distemper virus.....	36
6. แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ Canine distemper virus.....	36
7. แสดงลำดับของ Primer ที่ใช้ในการทำ PCR ของ Canine parainfluenza virus.....	37
8. แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ PCR ของ Canine parainfluenza virus.....	37
9. แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ Canine parainfluenza virus.....	37
10. แสดงลำดับของ Primer ที่ใช้ในการทำ PCR ของ Canine adenovirus (E3 gene).....	38
11. แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ PCR ของ Canine adenovirus.....	38
12. แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ Canine adenovirus.....	38
13. แสดง Primers ที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ M gene.....	41
14. แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ real-time PCR ของ M gene.....	41
15. แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ M gene.....	42
16. แสดง Primers ที่ใช้ในการทำ PCR ของ H1 gene.....	42
17. แสดง Primers ที่ใช้ในการทำ PCR ของ H3 gene.....	42
18. แสดง Primers ที่ใช้ในการทำ PCR ของ H5 gene.....	43
19. แสดง Primers ที่ใช้ในการทำ PCR ของ N1 gene.....	43
20. แสดง Primers ที่ใช้ในการทำ PCR ของ N2 gene.....	43
21. แสดง Primers ที่ใช้ในการทำ PCR ของ N8 gene.....	44
22. แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ PCR ของ HA และ NA gene.....	44
23. แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ HA และ NA gene.....	44
24. แสดงผลการระบาดวิทยาของ canine respiratory viruses ในสุนัขปกติ และสุนัขป่วย	49
25. ผลการเปรียบเทียบค่า % sequence identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน H1 และ H3 ของไข้หวัดสุนัขในประเทศไทย เปรียบเทียบกับ Influenza A virus สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank.....	53
26. ผลการเปรียบเทียบค่า % sequence identity matrix ของลำดับกรดอะมิโนของยีน H1 และ H3 ของไข้หวัดสุนัขในประเทศไทย เปรียบเทียบกับ Influenza A virus สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank.....	53

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะสารพันธุกรรมและโปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อ Influenza A virus.....	9
2. วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ Influenza A virus.....	11
3. ลักษณะสารพันธุกรรมและโปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อ canine parainfluenza virus.....	14
4. วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ canine parainfluenza virus.....	15
5. ลักษณะสารพันธุกรรมและโปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อ canine adnevirus.....	17
6. วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ canine adenovirus.....	19
7 ลักษณะสารพันธุกรรมและโปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อ canine distemper virus	20
8. ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CDC_MF3' กับ CDC_MR3'.....	29
9. ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ M_F5กับ M_R276.....	29
10. ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ nested PCR ของ canine influenza virus.....	29
11. แสดงการเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ CDV.....	30
12. ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CDV_F768 กับ CDV_R1057.....	31
13. ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CDV_F838 กับ CDV_R1057.....	31
14. ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR ของ canine distemper virus.	31
15. แสดงการเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ CPIV.....	32
16. ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CPIV_F363 กับ CPIV_R614.....	32
17. ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CPIV_F428 กับ CPIV_R614.....	32
18. ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR ของ canine parainfluenza virus.....	33
19. แสดงการเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ CAV.....	33
20. ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CAV_F73 กับ CAV_R629.....	34
21. ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CAV_F249 กับ CAV_R629.....	34
22. ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR ของ canine adenovirus.....	34
23. แสดงผลการตรวจสอบ canine respiratory viruses ด้วยวิธี nested PCR.....	46
24. แสดงผล real-time PCR จากตัวอย่างที่ตรวจสอบพบ canine influenza virus.....	48
25. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct กับจำนวน viral load ของ Influenza A virus	48
26. ผลการ BLAST ของตัวอย่างที่ตรวจพบ H1.....	50
27. ผลการ BLAST ของตัวอย่างที่ตรวจพบ H3.....	51

28. แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของ canine influenza A virus subtype H1และ H3 เปรียบเทียบกับ influenza A virus สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีรายงานใน GenBank Database.....	52
29. ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง Receptor binding site และ Cleavage site ของ HA จากตัวอย่างสายพันธุ์ต่าง ๆ.....	54



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
CAV	Canine adenovirus
CIV	Canine influenza virus
CDV	Canine distemper virus
CPIV	Canine parainfluenza virus
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EtOH	Ethanol
HA	Hemagglutinin
M	Matrix
μl	Microliter
ml	Mililiter
μM	Micromolar
mM	Milimolar
NA	Neuraminidase
NS1	Nonstructural protein 1
NS2	Nuclear export protein
NP	Nucleoprotein
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
PA	Polymerase acid
PB2	Polymerase basic 2
PB1	Polymerase basic 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
NaOAc	Sodium acetate

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในปี พ.ศ. 2548 มีรายงานการข้ามสายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ (Influenza A virus) สายพันธุ์ H3N8 จากม้ามาสู่สุนัขพันธุ์เกรย์ฮาว (greyhounds) ที่รัฐฟลอริดา ในประเทศสหรัฐอเมริกา เรียกเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์นี้ว่า canine influenza virus subtype H3N8 อาการของสุนัขที่ติดเชื้อมีลักษณะมีไข้ ไอเป็นเวลา 10 – 14 วัน จากนั้นบางรายหายจากอาการป่วย (recovery) หรือเสียชีวิต (1) ต่อมาในปี พ.ศ. 2551 มีรายงานการแพร่กระจายของเชื้อ canine influenza virus ในประชากรสุนัขพันธุ์อื่น นอกจากสุนัขพันธุ์เกรย์ฮาว (2) ถึงแม้ยังไม่มีการรายงานของการข้ามสายพันธุ์จาก canine influenza virus subtype H3N8 ของสุนัขมาสู่มนุษย์ นอกจากนี้ในปีเดียวกันมีรายงานการพบ canine influenza virus subtype H3N2 ที่ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งเป็นการข้ามสายพันธุ์จาก avian influenza virus subtype H3N2 มาสู่สุนัข (3) แต่เชื้อไวรัสชนิดนี้มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ค่อนข้างสูง ทำให้มีโอกาสการข้ามสายพันธุ์ของไวรัสจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปสู่อีกสิ่งมีชีวิตหนึ่งได้ด้วยการสัมผัสและการใกล้ชิดกัน ซึ่งสุนัขเป็นสัตว์เลี้ยงที่มีโอกาสใกล้ชิดกับมนุษย์มาก จึงอาจเกิดการข้ามสายพันธุ์ของ canine influenza virus มาสู่มนุษย์ได้ โดยที่ canine influenza virus มี H3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถติดเชื้อในมนุษย์ได้ จึงควรเฝ้าระวังสุนัขซึ่งอาจจะเป็นพาหะในการนำเชื้อ canine influenza A virus subtype H3N8 มาสู่มนุษย์ ในประเทศไทยได้นำเข้าสุนัขมาจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากประเทศอเมริกา จึงอาจมีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุนัขสายพันธุ์ H3N8 มายังประเทศไทยได้

นอกจากเชื้อ canine influenza virus ยังมีไวรัสที่ก่อให้เกิดโรกระบบทางเดินหายใจในสุนัข ได้แก่ canine adenovirus, canine parainfluenza virus, canine distemper virus เป็นต้น สุนัขที่เป็นโรกระบบทางเดินหายใจอาจไม่แสดงอาการ หรือมีอาการไอแห้ง ปวดบวม และมีโอกาสเสียชีวิตได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการติดเชื้อและระบาดวิทยาของเชื้อ canine influenza A virus ของสุนัขในประเทศไทย เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อไวรัสในประชากรสุนัขทั้งสุนัขป่วยและสุนัขปกติ และการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุล เพื่อเปรียบเทียบโอกาสการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์มายังมนุษย์ นอกจากนี้ได้ทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่อาจก่อให้เกิดโรคทางระบบทางเดินหายใจในสุนัขด้วย ได้แก่ canine adenovirus, canine parainfluenza virus และ canine distemper virus เป็นต้น

### คำถามของการวิจัย (Research Question)

- **คำถามหลัก**

1. สุนัขในประเทศไทยเป็นพาหะของเชื้อ canine influenza virus หรือไม่ อย่างไร
2. สายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดสุนัขที่พบในประเทศไทย เป็นสายพันธุ์ใด

- **คำถามรอง**

1. สุนัขในประเทศไทยมีอาการป่วยจากการติดเชื้อ canine influenza virus หรือไม่ อย่างไร
2. สายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดสุนัขประเทศไทยมีความใกล้เคียงกับที่ระบาดในต่างประเทศหรือไม่ อย่างไร
3. สายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดสุนัขที่พบในประเทศไทย มีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่พบในมนุษย์หรือไม่ และมีโอกาสติดเชื้อข้ามสายพันธุ์มาสู่มนุษย์ได้มากน้อยเพียงใด
4. อัตราการติดเชื้อ respiratory virus ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ canine distemper virus, canine parainfluenza virus และ canine adenovirus ของสุนัขในประเทศไทยเป็นอย่างไร

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- **วัตถุประสงค์หลัก**

1. ศึกษาการติดเชื้อและความเป็นพาหะของเชื้อ canine influenza virus ของสุนัขในประเทศไทย
2. จำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อ canine influenza virus ที่แยกได้จากสุนัขในประเทศไทย

- **วัตถุประสงค์รอง**

1. ศึกษาระบาดวิทยา อัตราการก่อโรค และลักษณะอาการที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อ canine influenza virus ของสุนัขในประเทศไทย
2. เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างระดับโมเลกุลระหว่างสายพันธุ์ canine influenza virus ที่พบในประเทศไทย และสายพันธุ์ที่พบในต่างประเทศ
3. วิเคราะห์และทำนายความเสี่ยงในการติดเชื้อ canine influenza virus ข้ามสายพันธุ์มาสู่มนุษย์
4. ศึกษาการติดเชื้อและระบาดวิทยาของ respiratory virus ชนิดอื่น ๆ ที่อาจก่อให้เกิดอาการของโรคระบบทางเดินหายใจในสุนัขที่คล้ายคลึงกับการติดเชื้อ canine influenza virus ได้แก่ canine distemper virus, canine parainfluenza virus และ canine adenovirus



## สมมติฐาน (Hypothesis)

### ● สมมติฐานหลัก

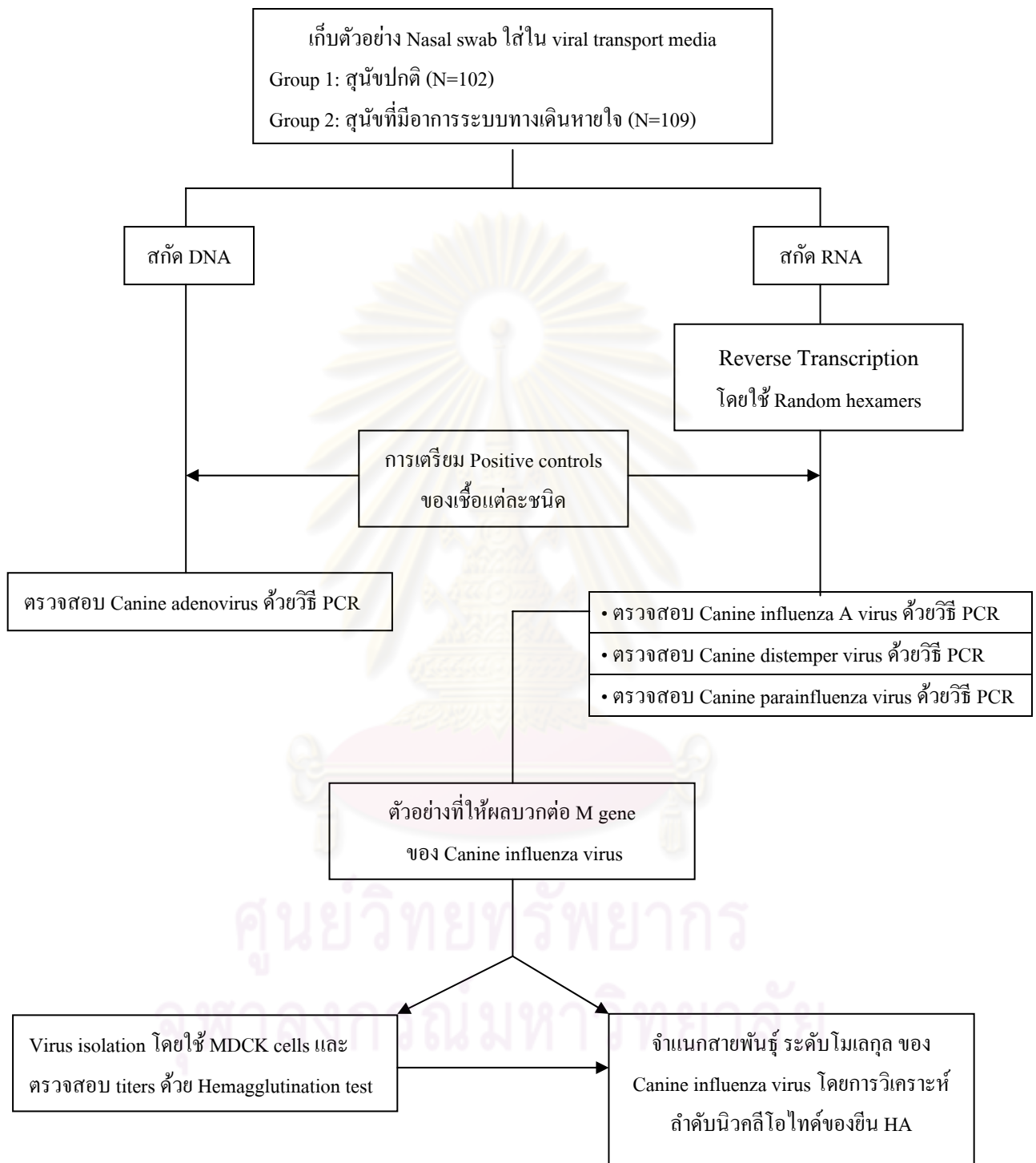
1. ถ้าพบการติดเชื้อ canine influenza virus ในสุนัขปกติแล้วแสดงว่าสุนัขในประเทศไทยสามารถเป็นพาหะของเชื้อ canine influenza virus ได้
2. ถ้าสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน hemagglutinin (HA) ได้ แล้วสามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุนัขที่พบในประเทศไทย

### ● สมมติฐานรอง

1. ถ้าพบการติดเชื้อ canine influenza virus ในสุนัขที่ป่วยเป็นโรกระบบทางเดินหายใจแล้วสามารถศึกษาระบาดวิทยา อัตราการก่อโรค และลักษณะอาการที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อเชื้อ canine influenza virus ได้
2. ถ้าสายพันธุ์ canine influenza virus ที่พบในประเทศไทย และสายพันธุ์ที่พบในต่างประเทศมีความเหมือน (% Similarity) ในระดับโมเลกุลของ HA ค่อนข้างมากแล้ว แสดงว่า การติดเชื้อ canine influenza virus ที่พบในประเทศไทยอาจมีต้นกำเนิดมาจากการนำเข้าสู่สุนัขจากต่างประเทศ
3. ถ้าสายพันธุ์ canine influenza virus ที่พบในสุนัข และสายพันธุ์ไข้หวัดใหญ่ที่พบในมนุษย์มีความเหมือน (% Similarity) ในระดับโมเลกุลของ HA ค่อนข้างมากแล้ว แสดงว่าอาจมีความเสี่ยงในการติดเชื้อ canine influenza virus ข้ามสายพันธุ์มาสู่มนุษย์
4. ถ้าพบการติดเชื้อ canine distemper virus, canine parainfluenza virus และ canine adenovirus ในสุนัขที่ป่วยเป็นโรกระบบทางเดินหายใจแล้วสามารถศึกษาระบาดวิทยา อัตราการก่อโรค และลักษณะอาการที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อเชื้อ canine distemper virus, canine parainfluenza virus และ canine adenovirus ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ขอบเขตของการวิจัย



### ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากตัวอย่างที่ได้ต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ที่มีประสบการณ์ในการ swab เอาเยื่อเมือกในโพรงจมูก สุนัขเพื่อหาการติดเชื้อไวรัส ตัวอย่างที่ทำการทดสอบจึงอาจมีจำนวนไวรัสน้อย และมีปริมาณจำกัด

### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Subtype คือ สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ซึ่งจำแนกโดยการตรวจทางซีรัมวิทยา (Antigen-Antibody) แต่ในปัจจุบันนิยมการถอดรหัสพันธุกรรมในส่วนของยีน Hemagglutinin (HA) และ Neuraminidase (NA) แล้วเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับ และสะดวกกว่า Serology test

### คำสำคัญ

Influenza A virus, Canine, Respiratory disease และ Detection

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบระบาดวิทยาของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุนัขในประเทศไทย
2. ทราบถึงข้อมูลโอกาสการข้ามสายพันธุ์จากไข้หวัดใหญ่สุนัขมายังมนุษย์ เพื่อเฝ้าระวัง และป้องกัน การเกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่
3. สามารถนำข้อมูลมาใช้เพื่อพิจารณาการวางแผนเพื่อเลือกใช้ และพัฒนาวัคซีนเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่อไปในอนาคต
4. ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง โดยตีพิมพ์ในวารสารที่เกี่ยวกับด้านไวรัสวิทยา หรือ โรคอุบัติใหม่ เช่น Virus Research, Infection หรือ Emerging Infectious Diseases
5. ผล nucleotide sequences ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะถูกเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank database เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิงต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### การค้นพบ Canine influenza virus

Canine influenza virus subtype H3N8 จัดอยู่ใน influenza A virus พบครั้งแรกในสุนัขพันธุ์เกรย์ฮาว (greyhounds) ในปี พ.ศ. 2548 ที่รัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ equine influenza virus subtype H3N8 มากกว่า 96% สันนิษฐานว่าเกิดการข้ามสายพันธุ์จากม้า equine influenza virus มาสู่สุนัข นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2551 มีรายงานการพบ canine influenza virus subtype H3N2 ที่ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งเป็นการข้ามสายพันธุ์จาก avian influenza virus subtype H3N2 มาสู่สุนัข

#### ไวรัสวิทยาของเชื้อ Influenza A Virus

อยู่ในตระกูล *Orthomyxoviridae* แบ่งออกได้เป็น influenza A, B และ C viruses เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้มมี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 80-120 nm ลักษณะจีโนมเป็น negative-single strand RNA (-ssRNA) ลักษณะเป็นท่อน (segment) ซึ่ง influenza A, B และ C viruses แบ่งออกโดยใช้หลักความแตกต่างของแอนติเจนบน nucleoprotein (NP) และ matrix (M) proteins โดย influenza A virus ยังแบ่งออกเป็น Subtype โดยใช้หลักความแตกต่างของไกลโคโปรตีน 2 ชนิดที่อยู่บนผิวอนุภาคไวรัส คือ hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) influenza A virus สามารถก่อให้เกิดโรคได้หลายสิ่งมีชีวิต เช่น สัตว์ปีกหลายชนิด และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกหลายชนิดอย่าง มนุษย์, หมู, ม้า และสุนัข เป็นต้น (4)

Influenza A virus รอบนอกของอนุภาคไวรัสถูกล้อมรอบด้วยลิปิด (lipid envelope) ซึ่งได้มาจาก plasma membrane ในขั้นของการ budding ออกจากของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) (5) ที่ผิว lipid envelope มีแท่งไกลโคโปรตีน 2 ชนิดที่ยื่นออกมาจากอนุภาค เรียกว่า spikes ชนิดที่หนึ่งคือ hemagglutinin (HA) มีลักษณะแท่งเรียว และชนิดที่สองคือ neuraminidase (NA) ที่มีลักษณะเป็นแท่งคล้ายเห็ด โดยอัตราส่วนของ HA: NA คือ 4:1 หรือ 5:1 นอกจากนี้ยังมี M2 ซึ่งเป็น integral membrane proteins อยู่ด้านนอกอนุภาคไวรัส ถัดเข้ามาจากชั้นลิปิดเป็นชั้นของโปรตีน matrix (M1) เป็นโครงสร้างหลักภายในอนุภาคไวรัส และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการร่วมตัวของสารพันธุกรรมและโปรตีนต่างๆ ในขั้น viral assembly ภายในสุดของอนุภาคไวรัสประกอบด้วย ribonucleoproteins (RNP) ซึ่งเป็นการร่วมตัวของสาย negative single strand RNA และโปรตีนต่างๆ มีลักษณะเป็นท่อนที่มีขนาดต่างกันจำนวน 8 ท่อน แต่เมื่อแปลรหัสพันธุกรรมจะสร้างโปรตีนได้ 10 ชนิดดังนี้ Polymerase basic 2 (PB2), Polymerase basic 1 (PB1), Polymerase acid (PA), Hemagglutinin (HA), Nucleoprotein (NP), Neuraminidase (NA), Matrix (M1), M2-Ion channel (M2), Nonstructural protein 1 (NS1) และ Nuclear export protein (NEP หรือ NS2) เป็นต้น

- Hemagglutinin (HA) เป็นไกลโคโปรตีนที่อยู่บริเวณเปลือกผิวชั้นนอกของอนุภาคไวรัส มีความเกี่ยวข้องในการจับกับ Sialic acid receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ ซึ่งลักษณะการจับนี้ค่อนข้างมีความจำเพาะสูง หากโปรตีน HA ของไวรัสไม่สามารถจับกับ receptor บนผิวเซลล์ได้อย่างจำเพาะ ไวรัสก็จะไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ก็จะไม่เกิดการติดเชื้อ ในทางกลับกันถ้าโปรตีน HA ของไวรัสสามารถจับกับ receptor บนผิวเซลล์ได้ดี ไวรัสก็จะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายด้วย ดังนั้นลักษณะความจำเพาะนี้เองที่เป็นตัวกำหนดการติดเชื้อไวรัสในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เช่น มนุษย์ สัตว์ปีก สุนัข เสือ แมว หรือสุนัข เป็นต้น เนื่องจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดก็จะมีลักษณะของ receptor บนผิวเซลล์ที่แตกต่างกันไป ต่อจากนั้นจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวของเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัส (Viral envelop) และเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ซึ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้นที่ทำให้ไวรัสติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ในรูปของ Endosome โดยอาศัยกลไกที่เรียกว่า Receptor-mediated endocytosis
- M2-ion channel เป็น transmembrane protein ขนาดเล็กซึ่งทำหน้าที่ปั๊มโปรตอน ( $H^+$ ) เข้าสู่อนุภาคของไวรัสทำให้ภายในอนุภาคของไวรัสมีความเป็นกรดมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเกิดการแตกตัวของอนุภาคของไวรัส (Uncoating) ทำให้สารพันธุกรรมและโปรตีนต่าง ๆ ของไวรัสปล่อยออกมาในไซโตพลาสซึมของเซลล์
- Nucleoprotein (NP) เป็นโปรตีนที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรม (RNA) ของไวรัส รวมเรียกว่า ribonucleoproteins (RNPs) เพื่อเพิ่มเสถียรภาพของสารพันธุกรรม นอกจากนี้ NP เป็นโปรตีนที่ช่วยในการขนส่งสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสให้เคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ด้วย และยังช่วยทำให้ Polymerase complex สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง RNA ของไวรัสและ RNA ของเซลล์เจ้าบ้านได้
- Polymerase complex ประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิดคือ PB2, PB1 และ PA ซึ่งร่วมกันทำหน้าที่ในกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) เพื่อสร้าง messenger RNA (mRNA) ซึ่งจะถูกลำเลียงไปแปลรหัสพันธุกรรม (translation) สร้างเป็นโปรตีนชนิดต่าง ๆ ต่อไป นอกจากนี้ Polymerase complex ยังทำหน้าที่ในการจำลองตัวของสารพันธุกรรม เพื่อสร้างสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (Viral RNA) เพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นส่วนประกอบในอนุภาคไวรัสที่จะเกิดขึ้นใหม่
- Nuclear export protein (NEP หรือ NS2) ทำหน้าที่ขนส่งและชักนำสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่อยู่ในรูป Ribonucleoproteins (RNPs) ซึ่งถูกสร้างขึ้นใหม่ จากนิวเคลียสออกสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์

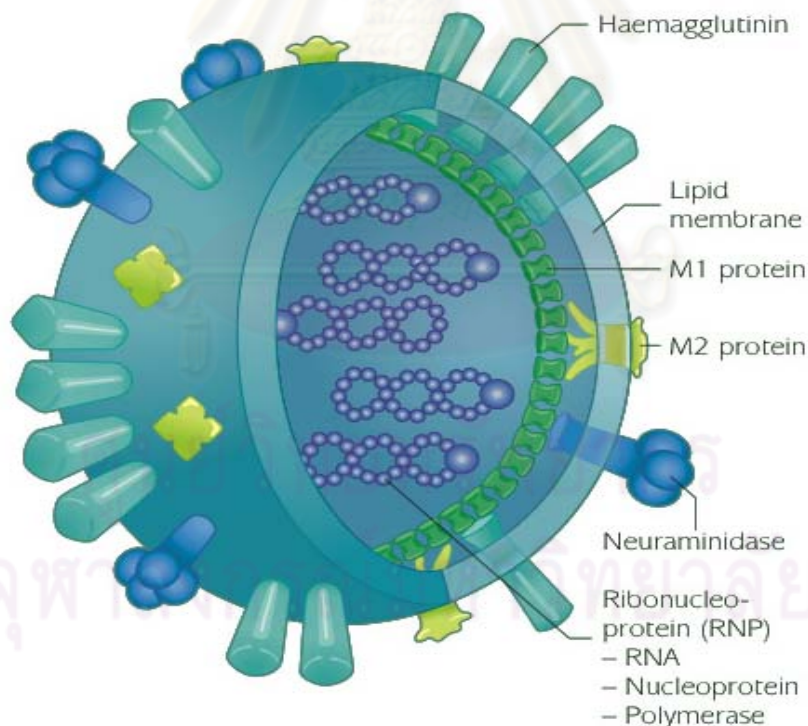
- M1-matrix protein เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักบริเวณผนังชั้นในของอนุภาคไวรัส ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในการรวมตัวกันของสารพันธุกรรมและโปรตีนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อไวรัส (Viral assembly) บริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของเซลล์ เพื่อเกิดเป็นอนุภาคไวรัสตัวใหม่
- Neuraminidase (NA) หรือเรียกว่าเอนไซม์ Sialidase ทำหน้าที่ตัด Sialic acid ซึ่งยึดอนุภาคไวรัสไว้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลทำให้มีการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสตัวใหม่ (Budding) ออกจากเซลล์ตั้งต้น และแพร่กระจายไปติดเชื้อสู่เซลล์ข้างเคียงต่อไป
- Non-structural protein 1 (NS1) เป็นโปรตีนที่ไม่ปรากฏอยู่ในอนุภาคของเชื้อไวรัส แต่จะพบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีหน้าที่หลายอย่างที่เกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการ RNA splicing และ translation นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งระบบ interferon response ซึ่งเป็นกลไกต้านการติดเชื้อไวรัสของเซลล์อีกด้วย

#### การจำแนกสายพันธุ์และการกลายพันธุ์ของเชื้อ Influenza A virus

ในปัจจุบันสามารถแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ได้โดยอาศัยความแตกต่างของไกลโคโปรตีนสำคัญ 2 ชนิดที่อยู่บนเปลือกผิวชั้นนอกของเชื้อไวรัส ได้แก่ Hemagglutinin (HA) ซึ่งแบ่งออกเป็น 16 ชนิด (H1-H16) และ Neuraminidase (NA) ซึ่งแบ่งออกเป็น 9 ชนิด (N1-N9) ดังนั้นในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ จึงต้องมีการระบุทั้งชนิดของ HA และ NA ควบคู่กัน เช่น H1N1, H3N2 หรือ H5N1 เป็นต้น ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะมีความจำเพาะในการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ แยกต่างหากออกไป โดยทั่วไปแล้วเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ทุกสายพันธุ์ (H1-H16 และ N1-N9) สามารถพบได้ในสัตว์ปีกจำพวกนกน้ำ สำหรับในมนุษย์พบว่าตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันมีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7 และ H9N2 เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้วไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลที่ระบาดในมนุษย์เป็นประจำทุกปี (Seasonal human influenza A virus) นั้นจะเป็น H1N1 และ H3N2 เท่านั้น ส่วนสายพันธุ์ H5N1, H7N7 และ H9N2 นั้นพบว่าเป็นการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์จากสัตว์ปีกมาสู่คน แต่โอกาสการติดเชื้อนั้นค่อนข้างยาก สำหรับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (Swine influenza A virus) ซึ่งในที่นี้หมายถึงเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกรที่มีการระบาดโดยทั่วไปในสุกร ประกอบด้วยสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้ H1N1, H1N2, H3N2 และ H4N6 เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ H1N1 ที่พบในมนุษย์และสุกร หรือสายพันธุ์ H3N2 ที่พบในมนุษย์และสุกรนั้นก็ จะมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังนั้นมิใช่เชื้อไวรัสทุกสายพันธุ์ในสุกรจะสามารถติดเชื้อข้ามสายพันธุ์มาสู่มนุษย์ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไปความจำเพาะในการติดเชื้อนี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ต่าง ๆ มีอัตราการกลายพันธุ์และวิวัฒนาการค่อนข้างรวดเร็ว

กระบวนการกลายพันธุ์ของเชื้อ **Influenza virus** แบ่งออกได้ 2 กระบวนการได้แก่

- Antigenic drift เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA จึงมีอัตราการกลายพันธุ์เปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมได้ง่าย เมื่อไวรัสมีการสะสมการกลายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นก็จะทำให้มีโปรตีนที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง HA และ NA ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องในการติดเชื้อ) จึงทำให้เชื้อไวรัสสามารถหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน และก่อให้เกิดการติดเชื้อระบาดเป็นประจำทุกปี ดังที่พบในกรณีไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล นอกจากนี้การกลายพันธุ์แบบนี้สามารถทำให้เชื้อไวรัสติดเชื้อข้ามสายพันธุ์จากสัตว์ปีกมาสู่คนได้ ดังที่พบในกรณีของไวรัสไข้หวัดนก เป็นต้น
- Antigenic shift เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีสารพันธุกรรมที่มีลักษณะเป็นท่อน ๆ จำนวน 8 ท่อนที่เป็นอิสระต่อกัน ดังนั้นเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส 2 สายพันธุ์ในเซลล์เดียวกัน ก็จะทำให้ไวรัสสามารถแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (Genetic reassortment) กลายเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ลูกผสม (Reassortant virus) ที่มีสารพันธุกรรมแบบผสมผสาน ทำให้มีคุณสมบัติแตกต่างไปจากเชื้อไวรัสตั้งต้น เป็นผลทำให้อาจมีการระบาดของเชื้อไวรัสได้อย่างกว้างขวาง (6)



ภาพที่ 1: ลักษณะสารพันธุกรรมและโปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อ Influenza A virus  
วงชีวิตของไวรัส Influenza A virus

[ภาพจาก <http://www.flucentre.org/files/Model-of-influenza-virus.jpg>,

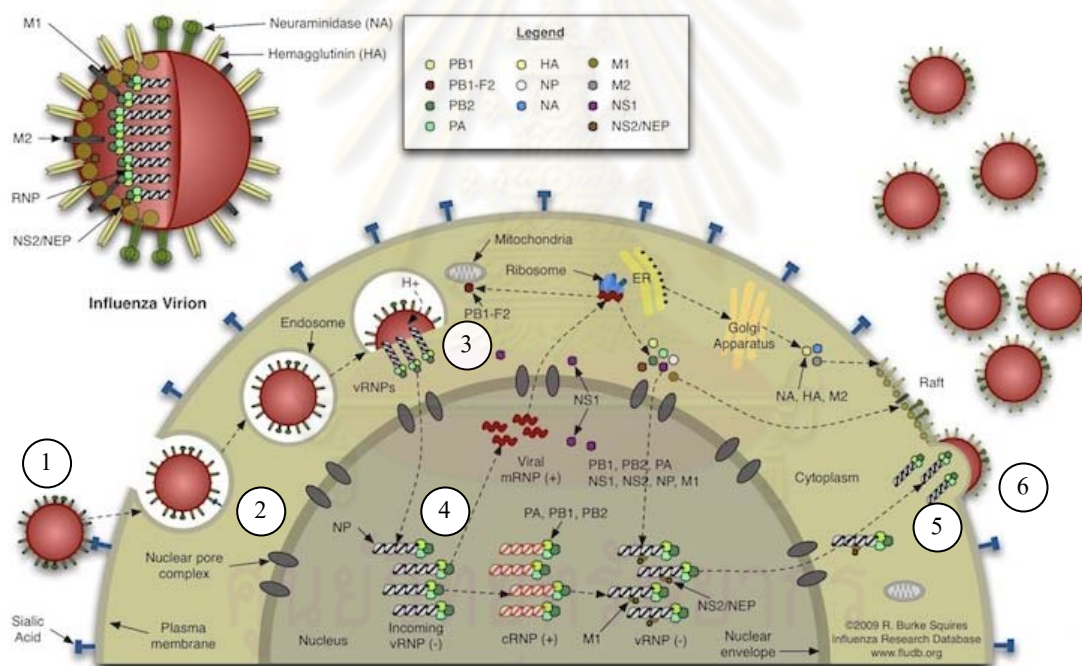
สืบค้น ณ วันที่ 4 เมษายน 2553]

วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ **influenza A virus** (Viral replication) ประกอบด้วย 6 ขั้นตอนได้แก่

- การยึดเกาะระหว่างโปรตีน HA ของไวรัส และ Sialic acid receptor ซึ่งเป็นการเรียงตัวของน้ำตาลกาแลคโตสบน sialic acid บนผิวเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นการจับของ HA จึงมีความจำเพาะค่อนข้างสูง ถ้า HA ของไวรัสไม่สามารถจับการ receptor ของเซลล์เจ้าบ้านได้ ไวรัสก็ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์และไม่ก่อให้เกิดโรคได้ Sialic acid receptor ในมนุษย์พบในระบบทางเดินหายใจส่วนต้นเป็น  $\alpha$ -2,6 (SA  $\alpha$ 2,6 Gal) และทางเดินหายใจส่วนล่างเป็น  $\alpha$ -2,3 (SA  $\alpha$ 2,3 Gal) และสัตว์ปีกส่วนใหญ่เป็น  $\alpha$ -2,3 (SA  $\alpha$ 2,3 Gal) (7)
- การเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัส ด้วยกระบวนการ endocytosis (Receptor mediated endocytosis)
- การแตกตัวของอนุภาคไวรัส (Uncoating) เมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน อนุภาคของไวรัสจะถูกล้อมรอบด้วย endosome โดยภายใน endosome มีภาวะความเป็นกรด และ M2 ion channel ทำหน้าที่ปั๊ม  $H^+$  ion จาก endosome เข้าสู่ภายในอนุภาคไวรัส ส่งผลให้โครงสร้างหลักภายในอนุภาคไวสนั้นคือโปรตีน M1 เสียสมดุลการยึดติดกันระหว่างโปรตีน ทำให้อนุภาคไวรัสกลายเป็นอนุภาคเปิด (uncoating) ดังนั้น vRNAs (viral ribonucleoproteins complexes) หลุดออกมาซึ่งไซโตรพลาสซึม และเคลื่อนย้ายไปยังนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน (8,9)
- การสังเคราะห์สารพันธุกรรมและโปรตีนของเชื้อไวรัส (Transcription and translation) vRNAs ประกอบด้วย -ssRNA ที่มี NP (nucleoprotein) เกาะตลอดสาย RNA และมี polymerase complex อยู่ที่ปลายสาย เมื่อเข้ามาสู่นิวเคลียส จะเกิดกระบวนการ transcription สร้าง +ssRNA ซึ่งก็คือ mRNA โดยมี -ssRNA เป็นแม่แบบ ด้วย viral polymerase complex ได้แก่ PB1, PB2 และ PA ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการ transcription (10) กระบวนการนี้แบ่งออก 2 ชั้น คือ early transcripts เมื่อเริ่มจำลองสารพันธุกรรมได้ mRNA แล้วเกิดการแปลรหัสพันธุกรรมสร้างโปรตีน (translation) จะสร้างโปรตีนจำพวก inner proteins เช่น PB1, PB2, PA, NP เป็นต้น กลับเข้าไปสู่นิวเคลียสเพื่อช่วยในการจำลองสารพันธุกรรมให้มีจำนวนมากขึ้นทั้งที่เป็น -ssRNA และ mRNA ของไวรัส(11) ขั้นตอนต่อมาคือ late transcripts เมื่อมีสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองแบบมากขึ้น ส่งผลให้มีการแปลรหัสพันธุกรรม (translation) มากขึ้น มีการสร้างโปรตีนทั้ง 10 ชนิดของไวรัส โดยโปรตีน PB1, PB2, PA และ NP จะกลับเข้าไปในนิวเคลียสเพื่อร่วมตัวกัน -ssRNA ส่วนโปรตีนโครงสร้างไวรัสอย่างเช่น HA, NA และ M2 จะถูกสร้างที่ ER เคลื่อนต่อไปยัง Golgi apparatus และส่งไปยัง plasma membrane



- การรวมตัวกันของสารพันธุกรรมและโปรตีนของเชื้อไวรัส (Assembly) สารพันธุกรรม (vRNAs) ทั้ง 8 ท่อนของไวรัสเคลื่อนจากนิวเคลียสมายัง plasma membrane เพื่อรวมตัวกับโปรตีนโครงสร้างอย่าง HA, NA และ M2 ทางด้าน apical plasma membrane (12)
- การปลดปล่อยอนุภาคไวรัสตัวใหม่ไปสู่เซลล์ข้างเคียง (Budding) โดยการเรียงตัวของโปรตีน M1 โครงสร้างหลักภายในของอนุภาค (virion core) (13) เป็นปัจจัยหลักของการเกิด bud formation เพื่อปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์เจ้าบ้าน โดยเกิดการร่วมตัวของ lipid membrane ล้อมรอบ virion core เมื่อไวรัสกำลังหลุดออกจากเซลล์เจ้าบ้าน โปรตีน HA จะจับกับ sialic acid receptors บน plasma membrane ทำให้โปรตีน NA ทำหน้าที่ตัด sialic acid receptors จึงทำให้ไวรัสหลุดออกจากเซลล์เจ้าบ้าน และเคลื่อนย้ายไปติดยังเซลล์ข้างเคียงต่อไป (14)



ภาพที่ 2 วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ Influenza A virus

[ภาพจาก [http://www.reactome.org/cgi-bin/eventbrowser?DB=gk\\_current&ID=168255](http://www.reactome.org/cgi-bin/eventbrowser?DB=gk_current&ID=168255),

สืบค้น ณ วันที่ 27 มีนาคม 2553]

### การติดเชื้อ Influenza A virus

โดยทั่วไปแล้วเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) สามารถแพร่กระจายติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ผ่านละอองน้ำ ในอากาศ (Droplet) ทางการไอ จาม หรือสัมผัสกับสารคัดหลั่งของระบบทางเดินหายใจ เช่น น้ำมูก และน้ำลาย เป็นต้น ซึ่ง influenza virus สามารถดำรงอยู่ได้ในสารคัดหลั่งเป็นเวลาหลายชั่วโมง โดยไวรัสจับกับ mucoprotein ซึ่งพบในเมือกที่ซีเลีย (cilia) ของระบบทางเดินหายใจเช่น epithelial cells และ goblet cells เมื่อกมีหน้าที่ป้องกันไม่ให้ไวรัสเข้าสู่

ร่างกาย แต่เมื่อไวรัสเข้ามาจับที่ mucoprotein แล้ว neuraminidase บนผิวของไวรัสจะย่อยให้เมื่อมีความหนืดลดลง ส่งผลให้ไวรัสเข้าไปเกาะบนผิวเซลล์ที่ sialic acid receptor ด้วย hemagglutinin ส่งผลให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ และเข้าไปเพิ่มจำนวน ในนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน จากนั้นก็ออกจากเซลล์เจ้าบ้านด้วยการ budding ไปติดเซลล์ข้างเคียงต่อไป สำหรับการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไข้หวัดสุนัข (canine influenza virus) ก็ถูกสันนิษฐานว่ามีกลไกเป็นเช่นเดียวกับการแพร่กระจายตัวของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) โดยสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในสุนัขได้ 7-10 วัน หลังจากมีการติดเชื้อ ประมาณ 20-25 % ของสุนัขที่ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการป่วยแต่จะเป็นพาหะในการแพร่กระจายเชื้อไวรัสได้ ส่วนระยะฟักตัวของเชื้อไวรัสไข้หวัดสุนัขใช้เวลาประมาณ 2-5 วัน

### พยาธิสภาพจากการติดเชื้อ canine influenza virus

ลักษณะอาการของสุนัขที่ติดเชื้อมีหลายรูปแบบ ได้แก่ ไม่แสดงอาการ มีอาการทางระบบทางเดินหายใจแบบไม่รุนแรง และมีอาการทางระบบทางเดินหายใจแบบรุนแรง เป็นต้น ในกรณีที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจแบบไม่รุนแรง (Mild respiratory disease) จะมีอาการคล้ายกับ infectious tracheobronchitis (kennel cough) โดยขั้นต้นจะมีไข้ ตามด้วยอาการไออย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10-14 วัน และในบางครั้งก็จะมีเสมหะออกมาด้วย ส่วนในกรณีที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจแบบรุนแรง (Severe respiratory disease) จะมีไข้สูงประมาณ 40-41 องศาเซลเซียส มีอัตราการหายใจถี่ขึ้น และมีอาการปอดบวมร่วมด้วย ซึ่งอาจทำให้ถึงขั้นเสียชีวิตได้ โดยมีอัตราการตายในสุนัขที่ติดเชื้ออยู่ที่ประมาณ 1-5 % จากการผ่าพิสูจน์ซากสุนัขที่เสียชีวิตจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุนัข (canine influenza virus) พบว่า มีเลือดออกตามอวัยวะภายใน ได้แก่ ปอด mediastinum และ pleural cavity เป็นต้น อาจพบลักษณะปอดบวมอย่างรุนแรงด้วย จากการตรวจทางด้าน histology ของอวัยวะในระบบทางเดินหายใจ พบว่ามี tracheitis, bronchitis, bronchiolitis และ severe interstitial หรือ bronchointerstitial pneumonia ด้วย จากอาการของโรคที่กล่าวข้างต้นนอกจากการติดเชื้อจาก Influenza A virus ในสุนัขแล้วยังอาจเกิดจากการติดเชื้อ canine adenovirus (CAV), canine parainfluenza virus (CPIV) และ canine distemper virus (CDV) ในสุนัขด้วย

### วิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อไวรัส Influenza A virus

เมื่อสุนัขติดเชื้อใน 7 วันแรกและแสดงอาการของโรกระบบทางเดินหายใจ สามารถตรวจสอบแอนติบอดีที่มีต่อเชื้อ CIV, viral isolation ด้วยวิธี tissue culture และการทำ reverse transcription (RT)-PCR หรือ real time PCR detection โดยในงานวิจัยนี้ใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นหลักในการตรวจสอบเชื้อไวรัส

## หลักการของ Polymerase Chain Reaction (PCR)

เป็นการจำลองหลักการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (replication) โดยที่มี DNA หรือ cDNA เป็นแม่แบบ (template), เอนไซม์ Taq DNA polymerase, ไพเมอร์ (primer) อย่างน้อย 1 คู่, dNTP ได้แก่ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP ร่วมถึงสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อทำหน้าที่เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่เราต้องการจะศึกษา เทคนิคนี้มีความจำเพาะเนื่องจากไพเมอร์ที่ใช้ในการจับกับแม่แบบนั้น ต้องจับเฉพาะกับแม่แบบ (template) ที่เราต้องการศึกษาเท่านั้น ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1. การแยกสาย DNA จากสายคู่เป็นสายเดี่ยว (Denaturation) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิระหว่าง 90-95°C

2. การจับระหว่างไพเมอร์กับแม่แบบ (annealing) ใช้อุณหภูมิในช่วงระหว่าง 45-60°C ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญต่อการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ถ้าอุณหภูมิในการจับของไพเมอร์กับแม่แบบสูงเกินไป จะส่งผลให้การจับระหว่างไพเมอร์กับแม่แบบเกิดได้ยาก แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปส่งผลให้ความจำเพาะต่อการจับลดลงไป

3. การเพิ่มความยาวของสายพันธุกรรม (extension) เมื่อไพเมอร์จับกับแม่แบบได้อย่างคู่สม (complement) แล้ว dNTP ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) จะเข้ามาเข้าคู่กับสายแม่แบบ ส่งผลให้สายพันธุกรรมใหม่ยาวขึ้นในทิศทาง 5' ไปทาง 3' ของสายพันธุกรรมใหม่ ในขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 70-75°C

โดยแต่ละขั้นตอนจะเกิดขึ้นซ้ำประมาณ 40 รอบ โดยแต่ละรอบเกิดการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมใหม่เป็น 2 เท่า ดังนั้นปริมาณของสารพันธุกรรมใหม่หลังจากสิ้นสุดเท่ากับ 2 ยกกำลังด้วยจำนวนรอบของการทำ PCR

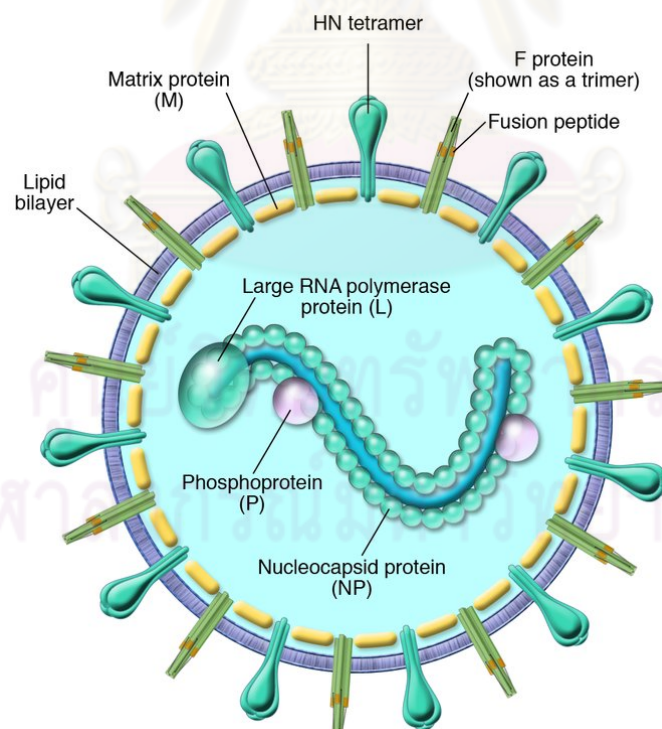
เมื่อทำการตรวจหาระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสไข้หวัดสุนัข (Canine influenza virus) แล้ว จากนั้นทำการวิเคราะห์ที่ยีน HA เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดสุนัขที่พบในประเทศไทย, เปรียบเทียบความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่พบในมนุษย์ และมีโอกาสติดเชื้อข้ามสายพันธุ์มาสู่มนุษย์ได้มากน้อย โดยการวิเคราะห์ยีน HA ที่บริเวณ Receptor binding site

## Canine parainfluenza virus

### ไวรัสวิทยาของเชื้อ Canine Parainfluenza Virus (CPIV)

เชื้อ parainfluenza virus จัดอยู่ใน family *Paramyxoviridae* ซึ่งเป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคไวรัสประมาณ 150-200 nm ลักษณะจีโนมเป็น negative single strand RNA สายเดี่ยวแบบ helix ยึดจับกับโปรตีน nucleocapsid ตลอดสาย RNA และเอนไซม์ polymerase ของไวรัส รวมเรียกว่า nucleocapsid (15) ประกอบด้วย 7 gene เมื่อเกิดการแปลรหัสพันธุกรรมสร้างโปรตีนได้ 8 ชนิด ดังนี้

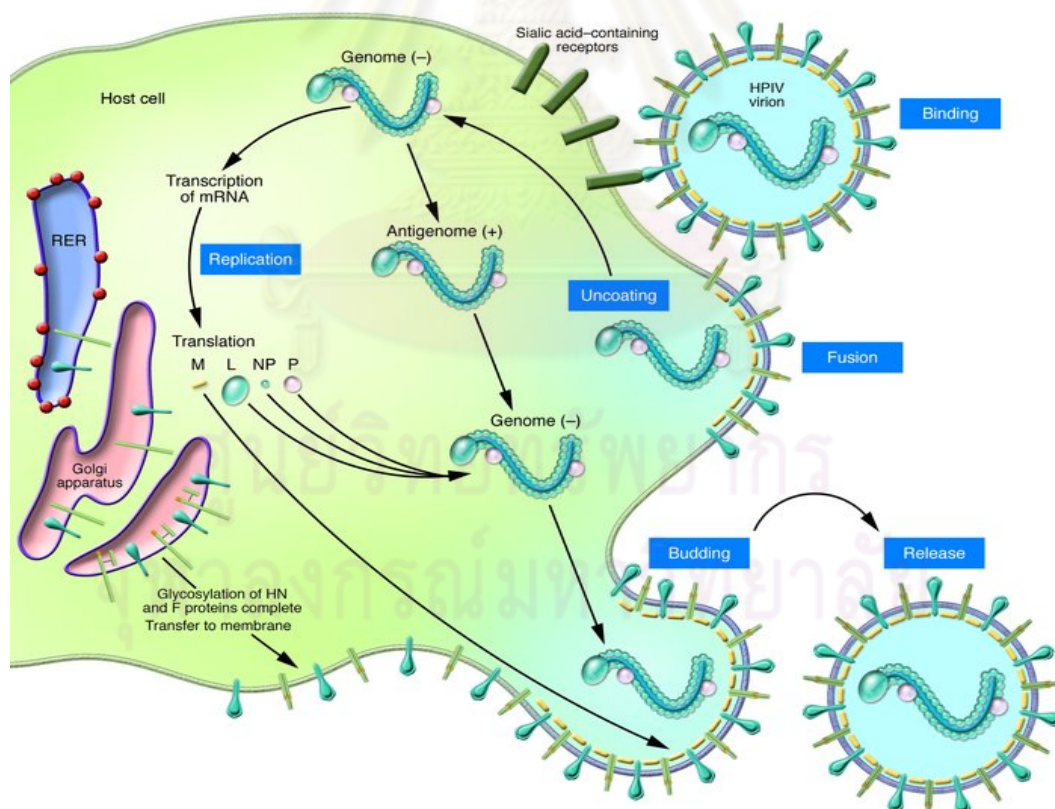
- Nucleoprotein (NP) gene สร้างโปรตีน nucleoprotein ที่เกาะตลอดสายพันธุกรรมของไวรัส เพื่อป้องกันสายพันธุกรรมไม่ให้เอนไซม์ nuclease มาย่อยสารพันธุกรรม
- V/phosphoprotein (V/P) gene สร้างโปรตีน phosphoprotein ที่จับระหว่างโปรตีน nucleoprotein (NP) กับ large protein (L) ซึ่งการร่วมตัวของโปรตีนเหล่านี้เพื่อทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ RNA polymerase complex
- Matrix (M) gene สร้างโปรตีน matrix ซึ่งเป็นโปรตีนโครงร่างหลักของไวรัสและยังทำหน้าที่ร่วมตัวกันของสารพันธุกรรม กับ envelope (assembly)
- Fusion (F) gene สร้างโปรตีน fusion ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยื่นออกนอกอนุภาคไวรัส ทำหน้าที่จับยึดกับผนังเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อให้ผนังของไวรัส (envelope) รวมตัวกับผนังเซลล์เจ้าบ้าน
- Small hydrophobic (SH) gene สร้างโปรตีน small hydrophobic ทำหน้าที่ให้ไวรัสหลบระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้าน
- Hemagglutinin–neuraminidase (HN) gene สร้างโปรตีน hemagglutinin–neuraminidase ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยื่นออกนอกอนุภาคไวรัส ทำหน้าที่จับกับ sialic acid receptor ของเซลล์เจ้าบ้าน
- large (L) genes สร้างโปรตีน large ทำหน้าที่เป็น catalytic ของเอนไซม์ RNA dependent RNA polymerase (RDRP)



ภาพที่ 3 ลักษณะสารพันธุกรรมและโปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อ canine parainfluenza virus  
 [ภาพจาก <http://www.jci.org/articles/view/25669/figure/1>, สืบค้น ณ วันที่ 27 มีนาคม 2553]

วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ **parainfluenza virus** (Viral replication) ประกอบด้วย 5 ขั้นตอนได้แก่

- โปรตีน HN (hemagglutinin-neuraminidase) บนผิวอนุภาคของไวรัสยึดเกาะกับ sialic acid receptor บนผิวเซลล์เจ้าบ้าน จากนั้น lipid envelope ของไวรัสจะรวมตัวกับ plasma membrane ของเจ้าบ้านด้วยโปรตีน F (Fusion protein) (16,17)
- สารพันธุกรรมของไวรัส (nucleocapsid) หลุดออกมาสู่ไซโตซอล (cytosol)
- การสังเคราะห์สารพันธุกรรมของไวรัส nucleocapsid ของไวรัส ประกอบด้วย -ssRNA (negative single strand RNA) ร่วมกับโปรตีนต่างๆ ดังนี้ large RNA polymerase (L), phosphoprotein (P), nucleoprotein (NP) เกาะอยู่ที่สายของ RNA เมื่อเกิดการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (transcription) สร้างสาย mRNA (+ssRNA) โดยมี -ssRNA เป็นสายแม่แบบ จากนั้น mRNA เป็นแม่แบบในการถอดรหัสพันธุกรรมสร้างโปรตีนทั้ง 8 ชนิดออกมา โดยโปรตีน L, P และ NP ที่สร้างใหม่จะเข้าไปจับกับสาย mRNA เพื่อเพิ่มจำนวนโปรตีน และจำลองสารพันธุกรรมของไวรัส (Replication) ได้เป็นสาย -ssRNA สายใหม่ ส่วนโปรตีนโครงสร้างของไวรัสเช่น M และ F จะถูกส่งไปยัง plasma membrane ส่วน HN จะถูกส่งไปยัง Golgi apparatus ก่อนแล้วจึงไปที่ plasma membrane



ภาพที่ 4 วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ canine parainfluenza virus

[ภาพจาก <http://www.jci.org/articles/view/25669/figure/2>, สืบค้น ณ วันที่ 27 มีนาคม 2553]

- การรวมตัวของไวรัสตัวใหม่ เมื่อได้สารพันธุกรรม nucleocapsid เส้นใหม่ จะเคลื่อนย้ายไปยัง plasma membrane ที่มีการรวมตัวของโปรตีน M, HN และ F จากนั้นโปรตีน M จับกับ nucleocapsid เพื่อยึดเหนี่ยวสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าในอนุภาคไวรัส และเกิดการเรียงตัวของโปรตีน M เป็นโครงสร้างภายในของอนุภาคไวรัส (18)
- เกิดการปล่อยไวรัสออกจากเซลล์เจ้าบ้าน ด้วยวิธีการ budding ออก โดยเกิดการรวมตัวของ lipid membrane ล้อมรอบ virion core เมื่อไวรัสกำลังหลุดออกจากเซลล์เจ้าบ้าน โปรตีน HN จะจับกับ sialic acid receptors บน plasma membrane ทำให้ neuraminidase ทำหน้าที่ตัด sialic acid receptors จึงทำให้ไวรัสหลุดออกจากเซลล์เจ้าบ้าน และเคลื่อนย้ายไปติดยังเซลล์ข้างเคียงต่อไป (19, 20)

### การติดเชื้อ canine parainfluenza virus

การแพร่กระจายของเชื้อ canine parainfluenza virus เกิดขึ้นได้สูงเมื่อจำนวนประชากรสุนัขอยู่อย่างหนาแน่น โดย CPIV ขับออกมาจากระบบทางเดินหายใจของสุนัขที่ติดเชื้อนี้แล้ว 8-10 วัน โดยติดต่อผ่านทางละอองอากาศ (aerosol) (21) เมื่อ CPIV เข้าไปในสิ่งมีชีวิตจะเข้าไปติดที่ระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory tract) ถ้าสุนัขมีการติดเชื้อ CPIV พร้อมกับเชื้อชนิดอื่น จะเกิดการแพร่กระจายของ CPIV ไปยังอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด, ม้าม, ไต และตับ เป็นต้น (16) ลักษณะอาการเมื่อติดเชื้อ CPIV อาจไม่แสดงอาการหรือมีอาการเช่น ตัวร้อน, ไอแห้ง, น้ำมูกไหล, เยื่อจมูกอักเสบ และต่อมทอนซิลอักเสบ (21) ถ้ามีการติดเชื้อร่วมกับเชื้อชนิดอื่นจะมีอาการเชื่องซึม, มีไข้, ไม่เจริญอาหาร และปอดบวม เป็นต้น

### พยาธิสภาพเมื่อติดเชื้อ canine parainfluenza virus

เมื่อสุนัขติดเชื้อ canine parainfluenza virus จะมีอาการ มีไข้, ไอแห้ง (dry cough), มีน้ำมูก ซึ่งอาการทั้งหมดนี้จะแสดงเพียงไม่กี่วัน (22,23,24) แต่ถ้า CPIV มีการติดเชื้อร่วมกับไวรัสชนิดอื่นหรือแบคทีเรียส่งผลให้อาการของโรคทางระบบทางเดินหายใจรุนแรงมากขึ้น

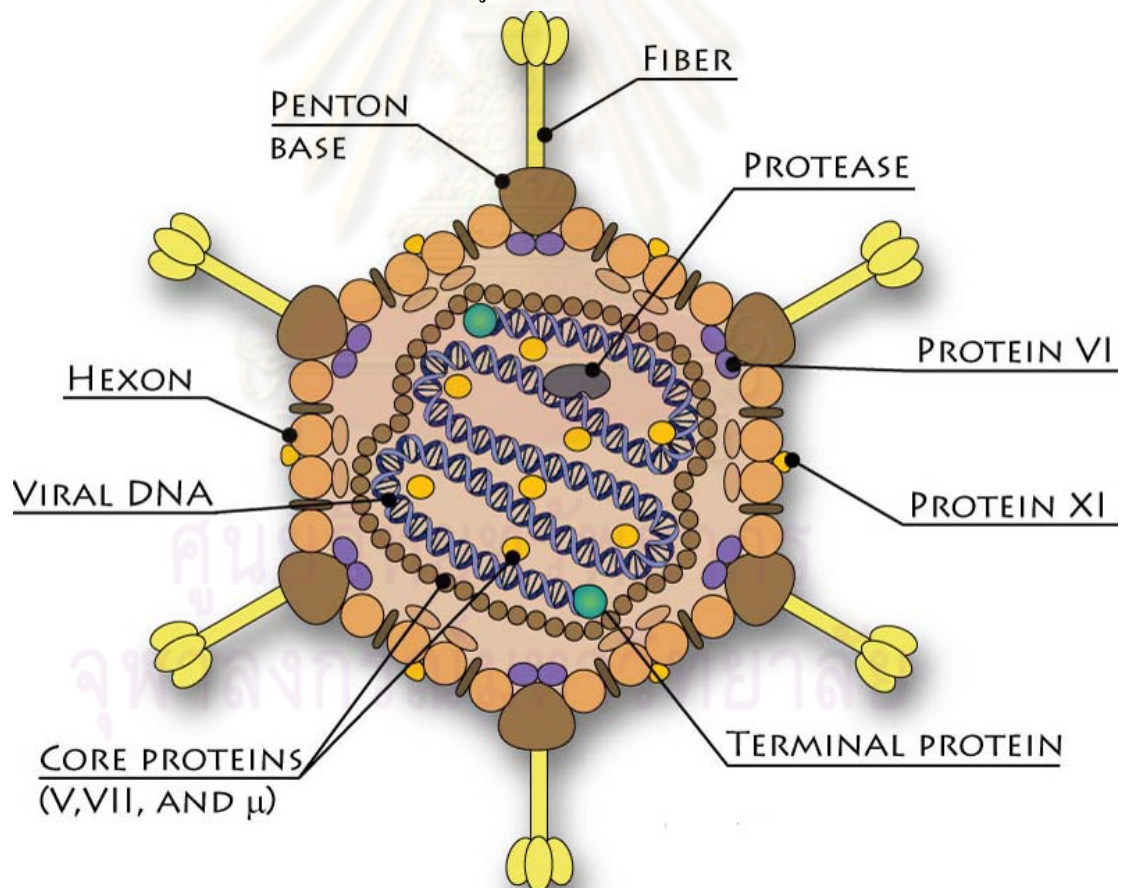
### วิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อ canine parainfluenza virus

วิธี virus isolate ด้วย primary cells หรือ cell line จากไตสุนัข (MDCK cell) จากตัวอย่างที่ swabs มาจากโพรงจมูกบริเวณคอหอยหรือ ที่กล่องเสียง ที่ passage แรกจะยังไม่เห็นพยาธิสภาพของ cell line (cytopathic effect) แต่สามารถตรวจสอบเชื้อได้จากการทำ hemadsorption หรือ immunofluorescence นอกจากนี้ยังสามารถตรวจด้วยวิธี RT-PCR จากสารคัดหลั่งของระบบทางเดินหายใจและเนื้อเยื่อจากหลอดลมหรือปอด (25) หรือวิเคราะห์เชื้อจากตัวอย่างที่เป็นเลือด (Serological) ด้วยวิธี hemagglutination inhibition (HI test) และ virus neutralization test ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส

## Canine adenoviruses

### ไวรัสวิทยาของเชื้อ Canine Adenovirus (CAV)

จัดอยู่ใน family *Adenoviridae* มีขนาดอนุภาคเส้นผ่าศูนย์กลาง 70 nm เป็นไวรัสที่ไม่มี envelope ลักษณะเป็น icosahedral ที่มีประกอบด้วย capsid protein 2 ชนิดคือ hexon กับ penton base โดยที่ hexon เป็นโปรตีนหลักของ viral capsid ส่วน penton base โปรตีนที่เป็นฐานของ fiber ที่ยื่นออกนอกตัวไวรัส และ fiber โดยที่ปลายของสายสร้าง knob domain ทำหน้าที่จับกับ receptor ของเซลล์เป้าหมาย (target cells) ลักษณะของสารพันธุกรรม เป็น dsDNA (double strand DNA) สายเดี่ยว (linear) inverted terminal repeat อยู่บริเวณนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 36-200 bp ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองรหัสพันธุกรรม (origin of replication), E1 gene เป็น intermediate genes ของ IX, E2B gene เป็นแม่แบบในการแปลรหัสพันธุกรรมสร้าง pre-terminal protein (pTP) และ DNA polymerase, E2A gene เมื่อแปลรหัสพันธุกรรมสร้าง DNA-binding protein (DBP), E3 gene ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ early gene , E4 gene เป็น intermediate genes ของ IVa2 และที่ปลาย 5' ของสายจีโนมมี terminal protein (TP) เกาะอยู่ (26)



ภาพที่ 5 ลักษณะสารพันธุกรรมและโปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อ canine adenovirus

[ภาพจาก <http://education.expasy.org/images/adenoviridaevirion.jpg>,

สืบค้น ณ วันที่ 22 เมษายน 2553]

Canine adenovirus (CAV) แยกออกได้เป็น 2 ชนิด คือ CAV-1 และ CAV-2 แตกต่างที่ชนิดของเนื้อเยื่อที่ CAV จะทำให้เกิดโรคโดย CAV-1 ยึดเกาะกับเยื่อผนังหลอดเลือด ตับ และไต ในขณะที่ CAV-2 ยึดเกาะกับเนื้อเยื่อผิวหนังระบบทางเดินหายใจ และลำไส้เล็ก นอกจากนี้ทั้ง 2 ชนิด มีกระบวนการสร้าง hemagglutinin ที่ต่างกันออกไป (27)

**วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ Adenovirus (Viral replication) แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน**

### **Early phase**

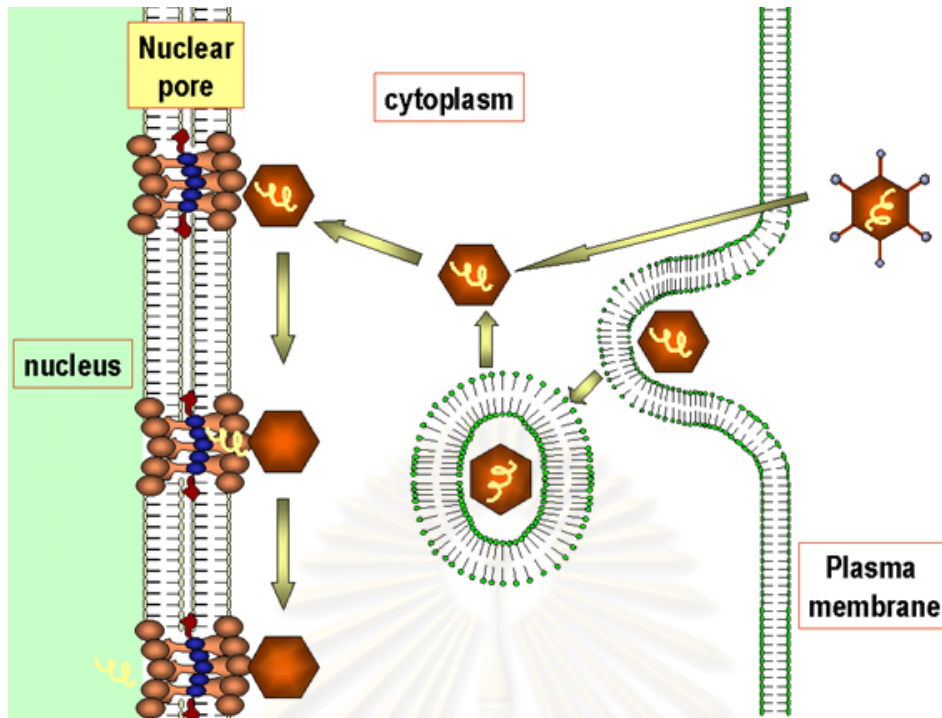
1) การยึดเกาะด้วยไฟเบอร์ (fiber) ของไวรัสกับโปรตีนตัวรับ (receptor) ของเซลล์เจ้าบ้าน ส่งผลให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี endocytosis เกิด endosome ล้อมรอบอนุภาคไวรัสเข้าสู่ไซโตซอล โดยภายใน endosome มีสถานะความเป็นกรด ส่งผลให้ไวรัสต้องหลบหนีออกจากภายใน endosome ก่อนที่ endosome จะเข้าไปยัง lysosome ที่ทำหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในเซลล์ โดยที่อนุภาคไวรัสยังคงสภาพของอนุภาคไว้ได้ จากนั้นอนุภาคไวรัสเคลื่อนตัวจากไซโตซอลไปยังนิวเคลียส

2) การเริ่มสังเคราะห์สารพันธุกรรม (early transcription) ด้วย RNA polymerase ของเจ้าบ้าน ในการสังเคราะห์สาย mRNA ของ early gene ภายในนิวเคลียส จากนั้น สาย mRNA ของ early gene เคลื่อนตัวออกไปยังไซโตซอล เพื่อแปลรหัสพันธุกรรมได้เป็นโปรตีน ที่เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรม เช่น E1A, การจำลองสารพันธุกรรม (DNA synthesis) เช่น DNA polymerase และโปรตีนที่ยับยั้งการเกิด apoptosis, ยับยั้งการขนส่ง mRNA ของเซลล์เจ้าบ้านเป็นต้น

### **Late phase**

มีการจำลองสารพันธุกรรมของไวรัสมากขึ้น (DNA replication) ด้วย DNA polymerase ของไวรัสจากขั้น early phase โดยมีโปรตีน terminal (TP) ที่ปลาย 5' ของสาย DNA ทำหน้าที่เป็นไพร์เมอร์ในการจำลองสารพันธุกรรม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำลองสารพันธุกรรม (DNA replication) และในขั้นการสร้างสารพันธุกรรมของไวรัส (late transcription) ของสาย mRNA ของ late gene ซึ่งจะแปลรหัสพันธุกรรมได้โปรตีนโครงสร้างอนุภาคไวรัส (capsids) และโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก (cell lysis) ที่บริเวณไซโตซอล แล้วโปรตีนโครงสร้างกลับเข้ามาในนิวเคลียส ในขั้นนี้มีการสร้างโปรตีนโครงสร้างของไวรัสมากเกินความต้องการของไวรัสส่งผลให้เกิดการสะสมของโปรตีนไวรัสภายในนิวเคลียสจำนวนมาก ทำให้เกิด inclusion bodies เป็นพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ เมื่อเกิดการรวมตัวของสารพันธุกรรมของไวรัสกับโปรตีนต่างๆของไวรัส (virion assembly) ขึ้นได้เป็นไวรัสตัวใหม่ (progeny virus) และออกจากเซลล์เจ้าบ้านด้วยการทำให้เซลล์แตก (cell lysis) (28)





ภาพที่ 6 วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อ canine adenovirus

[ภาพจาก <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna1.htm>, สืบค้น ณ วันที่ 12 เมษายน 2553]

### การติดเชื้อ canine adenovirus

พบมากในสุนัขที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ CAV-1 หรือ CAV-2 (29) ในสถานที่ที่มีประชากรสุนัขอยู่กันอย่างหนาแน่นเช่น ร้านขายสุนัข หรือห้องทดลอง โดยเชื้อจะเข้าไปติดที่เซลล์ของระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินหายใจ เช่น เยื่อเมือกที่จมูก, คอหอย, หลอดลม, ถุงลม, กระเพาะอาหาร และ ลำไส้เล็ก เป็นต้น

### พยาธิสภาพเมื่อติดเชื้อ canine adenovirus

ลักษณะอาการเมื่อติดเชื้อ CAV จะมีทั้งไม่แสดงอาการหรือเกิดการอักเสบที่หลอดลม, หลอดลมฝอย และ ถุงลมในปอด (30,31,32) เนื้อเยื่อปอดจะถูกทำลายเป็นบริเวณกว้าง ถ้าสุนัขติดเชื้ออื่นร่วมกับ CAV ด้วย (21,33)

### วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ canine adenovirus

ด้วยวิธี hemagglutination inhibition (HI test), virus precipitation, complement fixation, neutralization หรือ PCR นอกจากนี้ CAV สามารถ isolated ด้วย MDCK cell culture จากตัวอย่างที่ swab ได้ (34)

## Canine distemper virus

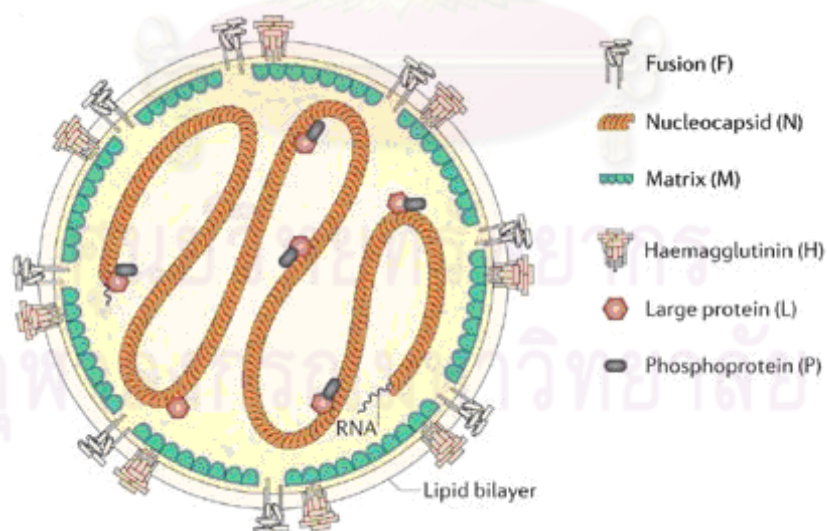
### ไวรัสวิทยาของเชื้อ Canine Distemper Virus (CDV)

จัดอยู่ใน family *Paramyxoviridae* มีขนาดอนุภาคเส้นผ่าศูนย์กลาง 100-300 nm เป็น envelope virus ลักษณะของสารพันธุกรรมเป็น –ssRNA (negative single strand RNA) แบบ helical เมื่อแปลรหัสพันธุกรรมสร้างโปรตีนได้ 6 ชนิดดังนี้

- Fusion Protein (F) เป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวอนุภาคไวรัส ทำหน้าที่รวม lipid envelope ของไวรัส กับ plasma membrane ของเซลล์เจ้าบ้านเข้าด้วยกัน
- Hemagglutinin (H) เป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวอนุภาคไวรัส ทำหน้าที่ยึดจับกับ receptor ของเซลล์เจ้าบ้าน

โปรตีนโครงสร้าง 2 ตัวนี้ถูกสร้างที่ ER จากนั้นเพิ่มน้ำตาล (glycosylation) บนโปรตีนที่ golgi apparatus และส่งไปยัง plasma membrane เพื่อรอการรวมตัวกับสารพันธุกรรมของไวรัสและเกิดเป็นไวรัสตัวใหม่

- Matrix protein (M) เป็นโปรตีนโครงสร้างที่ล้อมรอบอนุภาคไวรัสอยู่ถัดมาจากระดับ envelope และยังทำหน้าที่ในการรวมตัวของไวรัสใหม่
- Phosphoprotein (P) โปรตีนที่เกาะอยู่บนสายพันธุกรรมของไวรัส ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรม และการจำลองสารพันธุกรรม นอกจากนี้ยังเป็นองค์ประกอบของ nucleocapsid ด้วย



ภาพที่ 7 ลักษณะสารพันธุกรรมและ โปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อ canine distemper virus

[ภาพจาก <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n12/images/nrmicro1550-i1.jpg>,

สืบค้น ณ วันที่ 28 มีนาคม 2553]

- Large protein (L) โปรตีนที่เกาะอยู่บนสายพันธุกรรมของไวรัส ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งการทำงานของ viral polymerase ในกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรม, การจำลองสารพันธุกรรม และยังรวมตัวกับ phosphoprotein เพื่อจับกับสายพันธุกรรมของไวรัส (-ssRNA) ได้เป็น nucleocapsid
- Nucleocapsid protein (N) โปรตีนที่เกาะตลอดสายพันธุกรรมของไวรัส ทั้งที่เป็น +ssRNA และ -ssRNA

เนื่องจาก canine distemper virus จัดอยู่ในตระกูล *Paramyxoviridae* จึงมีวัฏจักรการจำลองตัวเองเหมือนกับเชื้อ parainfluenza virus

### การติดเชื้อ canine distemper virus

สุนัขติดเชื้อ CDV โดยผ่านทางละอองน้ำในอากาศ เมื่อ CDV เข้าสู่สิ่งมีชีวิตจะเข้าไปยึดเกาะกับเยื่อจมูกและเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณระบบทางเดินหายใจ เพื่อจำลองตัวไวรัสใหม่ เมื่อมีการเพิ่มจำนวนไวรัสแล้ว ไวรัสจะแพร่กระจายทางระบบไหลเวียนเลือดไปยังอวัยวะอื่นๆ เช่น ที่ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง, ระบบทางเดินอาหาร, ระบบน้ำเหลือง, ระบบทางเดินปัสสาวะ และระบบประสาท (35)

### พยาธิสภาพเมื่อติดเชื้อ canine distemper virus

ลักษณะอาการเมื่อติดเชื้อ CDV คือ ไอ, มีไข้, อาเจียน, ท้องเสีย, ไม่อยากอาหาร, ผิวที่บริเวณจมูก, ปาก, เปลือกตา, หู และที่อุ้งเท้าผิวหนังจะหนาขึ้น (36) ถ้ามีการติดเชื้อ CDV เรื้อรังจะแสดงอาการของระบบประสาทขึ้น

### วิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อ canine distemper virus

Immunofluorescence จากเนื้อเยื่อปอด, virus neutralization test หรือการทำ RT-PCR

### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Cross-sectional, descriptive research)

### วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

#### 1. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเก็บตัวอย่าง Nasal swab

- Dry cotton or polyester swab
- Polypropylene conical tube: 15 mL (AxyGen® Scientific)
- Phosphate Buffered Saline (PBS Tablets) (Bio Basic Inc., Cat no. D0435)
- Penicillin-Streptomycin (10,000 units/mL) (GIBCO, Cat no. 15140-122)

#### 2. สารเคมีสำหรับการสกัด nucleic acid

- SDS (Pharmacia Biotech, Cat no. 17-1313-01)
- Sodium acetate anhydrous (SIGMA, Cat no. S-2889)
- TRIZMA Hydrochloride (SIGMA, Cat no. T-7149)
- Glycogen (USB, Cat no. 16445)
- Guanidine Thiocyanate Ultrapure (USB, Cat no. 75818)
- Sodium chloride (BDH Laboratory Supplies, Cat no. 102415K)
- EDTA Tetrasodium Dihydrate (USB, Cat no. 15700)
- Tris, Ultra Pure, Molecular Biology Grade (Research Organics, Cat no. 9680T)
- Boric acid, ACS Reagent (Research Organics, Cat no. 1748B)
- Phenol, Saturated (PIERCE, Cat no. 17914)
- Ethanol (BDH Laboratory Supplies, Cat no. 10107)
- Isopropanol (SIGMA, Cat no. I-9516)
- Chloroform (SIGMA, Cat no. C-2432)
- Iso-Amyl alcohol (BDH Laboratory Supplied, Cat no. 27212)
- Mercaptoethanol (Pharmacia Biolab, Cat no. 17-1317-01)
- Diethylpyrocarbonate (DEPC)

### 3. สารเคมีสำหรับการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription

- M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Cat no. M1705)
- RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Cat no. N2115)
- Set of dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega, Cat no. U1240)
- Random Primers (Promega, Cat no. C1181)

### 4. สารเคมีสำหรับการตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR

- Eppendorf MasterMix (2.5X) (Eppendorf, Cat no. 0032 002.250)
- SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Cat no. 11732-020)
- GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Cat no. SM0321)
- Agarose, low EEO, Molecular Biology Grade (Research Organics, Cat no. 1170A)
- SeaKem LE agarose (BioWhittaker Molecular Applications, Cat no. 50004)
- Ethidium Bromide (SIGMA, Cat no. E-1510)

### 5. วัสดุและสารเคมีสำหรับ cloning และ transformation ใน *E.coli*

- One Shot TOP10 Chemically Competent E.Coli (Invitrogen, Cat no. C4040-03)
- pGEM-T Easy Vector System for T/A cloning strategy (Promega, Cat no. A1360)
- X-Gal (Promega, Cat no. V3941)
- IPTG (Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside) (Eppendorf, Cat no. 0032006.353)
- Tryptone powder (BIO BASIC INC., Cat no. G211)
- Yeast Extract (GIBCO, Cat no. 20047-056)
- Agar Bacteriological (GIBCO, Cat no. 20001-020)
- FastPlasmid Mini (Eppendorf, Cat no. 955150601)

### 7. สารเคมีสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing)

- Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf, Cat no. 955152000)
- ABI PRISM Bigdye Terminator v3.1 Kits (Applied Biosystems, Cat no. 4336917)
- 310 Genetic Analyzer Performance Optimized Polymer 6 (ABI, Cat no. 402837)
- Buffer (10X) with EDTA (Applied Biosystems, Cat no. 402824)
- Template Suppression Reagent (TSR) (Applied Biosystems, Cat no. 401674)

## 8. วัสดุและสารเคมีสำหรับการแยกและเพิ่มจำนวนไวรัส (virus isolation)

- MDCK (Madin-Darby canine kidney) cell lines
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (GIBCO, Cat no. 11965-084)
- Fetal Bovine Serum EU Approved Origin (GIBCO, Cat no. 10270-098)
- 0.05% Trypsin-EDTA (1X) (GIBCO, Cat no. 25300-054)
- Trypsin, TPKC treated, from bovine pancreas (SIGMA, Cat no. T-8642)
- Penicillin-Streptomycin (10,000 units/mL) (GIBCO, Cat no. 15140-122)
- Phosphate Buffered Saline (PBS Tablets) (Bio Basic Inc., Cat no. D0435)
- Bovine Albumin Fraction V Solution 7.5% (GIBCO, Cat no. 15260-037)
- Trypan blue solution 0.4% (SIGMA, Cat no. T8154)
- V-shaped 96-well microtiter plates (Costar, Cat no. 3897)
- Sterile 6-well cell culture cluster, flat bottom with lid (Costar, Cat no. 3516)
- Tissue Culture Flask 75 cm<sup>2</sup>, phenolic style cap (Corning, Cat no. 430725)
- Tissue Culture Flask 25 cm<sup>2</sup>, phenolic style cap (Corning, Cat no. 430372)
- Sterile pipette 2mL, 5 mL and 10 ml (Costar, Cat no. 4486, 4487 and 4488)

## 9. โปรแกรมสำหรับ bioinformatic และการวิเคราะห์ข้อมูล

- CLUSTAL X program (version 1.8)
- OLIGOS primer design software (version 9.1)
- BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1)
- Chromas Lite (version 2.01)
- TreeView (version 1.5.2)
- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 3.1)
- SPSS for Windows (version 11.5.0)

## 10. วัสดุที่ใช้สำหรับการวิจัย

- MicroAmp PCR tube (Perkin Elemer)
- Microcentrifuge tube: 0.5 and 1.5 mL (AxyGen® Scientific)
- Polypropylene conical tube: 50 and 15 mL (AxyGen® Scientific)
- Pipette tip: 10 µL, 200 µL and 1000 µL (AxyGen® Scientific)
- Microscope slide and cover slit (Sail brand)
- Glassware: Beaker, Flask, Cylinder and reagent bottles (Pyrex)

## 11. อุปกรณ์สำหรับงานวิจัย

- Centrifuge (Beckman GS-6R)
- Refrigerated microcentrifuge (Universal 16R Hettich)
- – 70 °C freezer (Forma Scientific)
- – 20 °C freezer (Philco)
- Inverted Light Microscopy (Nikon)
- Mastercycler personal (Eppendorf)
- Gel Doc 1000 UV transilluminator (Biorad)
- Bio Photometer (Eppendorf)
- Class II Microbiological Safety Cabinet (Envair)
- PCR Cabinet (Augusta)
- Orbital incubator S150 (Stuart)
- Perkin-Elmer 310 Sequencer (PE Applied Biosystems)
- CO<sub>2</sub> humidified incubator (TC2323 Shellab)
- Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey)
- Hot air oven (Mettmert)
- Multi-block heater (Lab-line)
- Balance (PB1502 Mettler Toledo)
- Microwave oven (Sanyo)

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### การเก็บตัวอย่าง Nasal swab

1. เก็บตัวอย่าง Nasal Swab จากจมูกสุนัข โดย 102 ตัวอย่างจากสุนัขปกติ และ 109 ตัวอย่างจากสุนัขที่ป่วยเป็นโรกระบบทางเดินหายใจ ในช่วงเวลา 1 ปี โดยขอความร่วมมือจากโรงพยาบาลสัตว์เล็กและแผนกสัตว์ป่วยฉุกเฉิน คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโรงพยาบาลสัตว์ทองหล่อ ในส่วนของการเก็บตัวอย่าง swab จมูกสุนัข โดยเก็บตัวอย่าง swab ใส่ใน transport media และบันทึกประวัติของสุนัขด้วย เก็บตัวอย่าง Nasal swab โดยใช้ไม้พันสำลี สอดเข้าไปในโพรงจมูกของสุนัข ปลดออกทิ้งไว้ประมาณ 2-3 วินาที จากนั้นหมุนไปมาเบา ๆ แล้วนำออกจากโพรงจมูกสุนัข จากนั้นเก็บลงใน Viral transport media 2 mL ขนส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการโดยแช่ใน Bio safety ice box
2. Mix ด้วยการ vortex 15 นาที จากนั้น Centrifuge 3,000 rpm 10 นาที แล้วดูดเก็บ supernatant ใส่ใน microtube 1.5 mL ให้ได้ประมาณ 1 หลอด เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C

### การสกัด RNA

สกัด RNA จากตัวอย่าง swab ด้วยวิธี Guanidium-isothiocyanate method

- เตรียม tubes ขนาด 1.5 mL ใส่ 500  $\mu$ L GTC Mix (GTC+2ME) [GTC 9000  $\mu$ L เดิม ME 70  $\mu$ L] จากนั้นใส่ตัวอย่าง 100  $\mu$ L แล้วนำไป vortex 15 วินาที
- เดิม 50  $\mu$ L 2M NaOAC, 500  $\mu$ L Phenol, 100  $\mu$ L CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> : IAA (49:1) ลงใน tubes
- Invert แต่ละ tubes แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 15 นาที
- นำ tubes ไป Centrifuge 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที
- เตรียม tube ใหม่ เดิม 4  $\mu$ L glycogen (20mg/mL) และเดิม Isopropanol 600  $\mu$ L
- ผสมให้สารภายใน tube เข้ากันด้วยการ invert 15 วินาที แล้วนำไปแช่ -70°C ข้ามคืน
- นำ tube ที่ไปแช่ -70°C ออกมา ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้จนละลายให้หมด
- จากนั้นนำไป Centrifuge 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที
- เทส่วน supernatant ที่เก็บ pallet ไว้
- เดิม 500  $\mu$ L 70% EtOH ลงใน pellet, กลั้วไปมา แล้วปั่น Speed centrifuge 5 นาที
- เทส่วน supernatant ที่แล้ว Spin 5 นาที
- ลูด 70% EtOH ออกให้หมด แล้ว Dry ด้วย Vacuum 5 นาที
- ละลาย RNA ด้วย DepC water 12  $\mu$ L และ Mix ได้ 12  $\mu$ L of RNA solution

### การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription โดยใช้ Random hexamer

เตรียม mixture ของ Reverse Transcription ในแต่ละ tube ดังนี้

- |                  |             |
|------------------|-------------|
| — 5x MMLV Buffer | 5.0 $\mu$ L |
| — 10 uM dNTP     | 5.0 $\mu$ L |
| — Random hexamer | 1.0 $\mu$ L |
| — RNA inhibit    | 1.0 $\mu$ L |
| — MMLV           | 1.0 $\mu$ L |

จากนั้นเติม RNA 12.0  $\mu$ L แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

### การสกัด DNA

สกัด DNA extraction จากตัวอย่าง swab ด้วยวิธี Phenol/Chloroform extraction

- เตรียม tubes ขนาด 1.5 mL แล้วใส่ 400  $\mu$ L Lysis buffer (Tris-HCl+EDTA+SDS), 10  $\mu$ L Proteinase K จากนั้นใส่ตัวอย่าง 100  $\mu$ L
- นำไป vortex และบ่มที่อุณหภูมิ 50°C, 1 ชั่วโมง
- เดิม 250  $\mu$ L Phenol, 250  $\mu$ L CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> : IAA (49:1)



- นำไป vortex และ centrifuge 13,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- เตรียม tube ใหม่ เติม 4  $\mu$ L glycogen(20mg/mL), 40  $\mu$ L 2M NaOAc, 800  $\mu$ L AbEtOH
- นำไปแช่  $-70^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำ tube ที่ไปแช่  $-70^{\circ}\text{C}$  ออกมา ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้จนละลายให้หมด
- จากนั้นนำไป Centrifuge 13,500 rpm, อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$ , 30 นาที
- เทส่วน supernatant ที่เก็บ pallet ไว้แล้วเติม 1 mL 70 % EtOH ลงใน pellet, กวักไปมา
- Centrifuge 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที
- เทส่วน supernatant ที่ Spin 5 นาที
- ล้าง 70% EtOH ออกให้หมด แล้ว Dry ด้วย Vacuum 5 นาที
- ละลาย DNA ด้วย DW 30  $\mu$ L และ Mix จะได้ 30  $\mu$ L of DNA solution

### การเตรียม Positive control ด้วยวิธี cloning

#### 1. Ligation ระหว่าง PCR product กับ plasmid (pGEM-T) เตรียม mixture ดังนี้

- 2x buffer 5.0  $\mu$ L
- T4 DNA ligase 1.0  $\mu$ L
- pGEM-T 1.0  $\mu$ L
- PCR product 3.0  $\mu$ L

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

#### 2. Transformation

- เตรียม complement cells ปริมาตร 50  $\mu$ L ใน tube 1.5 mL
- เติมสารละลาย ligation มาปริมาตร 2  $\mu$ L
- นำ tube ไป chill ice เป็นเวลา 20 นาที
- นำ tube ไป heat shock ที่อุณหภูมิ  $42^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 50 วินาที
- แล้วกลับมา chill ice อีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที
- เติม SOC medium ปริมาตร 950  $\mu$ L
- Shaking ที่ประมาณ 200 rpm ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง
- จากนั้นนำ tube ไป centrifuge 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- เท supernatant ที่ จะเหลือ pallet ประมาณ 45  $\mu$ L
- เติม x-gal 15  $\mu$ L และ IPGL 5  $\mu$ L mix ให้เข้ากัน
- Spread plate นำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  ซ้ำมคืน

### 3. Colony selection

- สังเกตดู colony ที่ขึ้นบน plate โดยจะเลือก colony ที่ใส
- Pick colony ใส ลงใน LB broth
- Shaking 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

### 4. Plasmid extraction

- นำ bacterial culture 1.5 mL มาใส่ลงใน tube 2 mL
- นำ tube ไป Centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- เท supernatant ที่ทิ้ง จะเหลือ pellet
- เติม lysis solution (แช่เย็น) ปริมาตร 400  $\mu$ L
- Vortex 30 วินาที
- บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที
- นำสารละลาย lysate ลงใน spin column
- นำ spin column ไป centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 1 นาที
- เติม diluted wash buffer ปริมาตร 400  $\mu$ L
- นำ spin column ไป centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 1 นาที
- เทส่วน filtrate ที่ทิ้ง และนำไป centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 1 นาที
- จากนั้นนำ spin column ลงใน collection tube
- เติม elution buffer ปริมาตร 50  $\mu$ L
- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 1 นาที
- ได้สารละลาย positive control เป็นปริมาตร 50  $\mu$ L

### การออกแบบไพรเมอร์ (primer)

#### 1. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบ canine influenza virus ที่บริเวณยีน matrix (M)

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อจำแนกเชื้อไข้หวัดสุนัขออกจากตัวอย่าง โดยทำการเพิ่มจำนวนที่บริเวณยีน matrix (M) เนื่องจากเป็นยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำ ดังนั้น matrix (M) จึงใช้สำหรับการตรวจสอบ influenza virus โดยนำยีน matrix (M) มาจากในฐานข้อมูล Genbank เพื่อเป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ โดยเลือกบริเวณช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุด, มีค่า GC content ประมาณ 50-60% และ ค่า melting temperature ( $T_m$ ) ของไพรเมอร์ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 55-75°C โดยที่ไพรเมอร์คู่เดียวกันควรมีค่า  $T_m$  เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน โดยค่า  $T_m$  มีสูตรในการคำนวณดังนี้  $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (G+C)$

ในงานวิจัยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่สำหรับการตรวจหา CIV ดังนี้ 1' PCR: CDC\_MF3' / CDC\_MR3' มีขนาด 1027 bp และ 2' PCR: M\_F56/M\_R256 มีขนาด 207 bp ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีการออกแบบสำหรับงานวิจัยก่อนหน้านี้

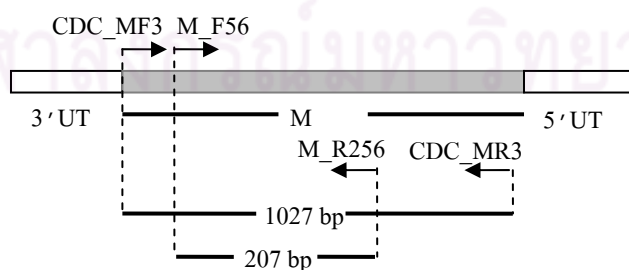
เมื่อตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo 1999-2001 v.9.1 ได้ผลดังนี้ (ภาพที่ 8-9)

The screenshot shows the Oligo software interface with two primer pairs entered. The first pair consists of the forward primer GATCGCTCTTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAG (Tm: 74.1, base: 30) and the reverse primer GGCTCTTCTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT (Tm: 54.8, base: 36). The calculated Tm for the pair is 57.88 and 61.59. The interface includes buttons for Link, Clear, and Exit.

ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CDC\_MF3' กับ CDC\_MR3'

The screenshot shows the Oligo software interface with two primer pairs entered. The first pair consists of the forward primer TCAGGCCCCCTCAAAGCCG (Tm: 61.3, base: 19) and the reverse primer AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA (Tm: 56.2, base: 24). The calculated Tm for the pair is 58.29 and 61.99. The interface includes buttons for Link, Clear, and Exit.

ภาพที่ 9 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ M\_F56 กับ M\_R256

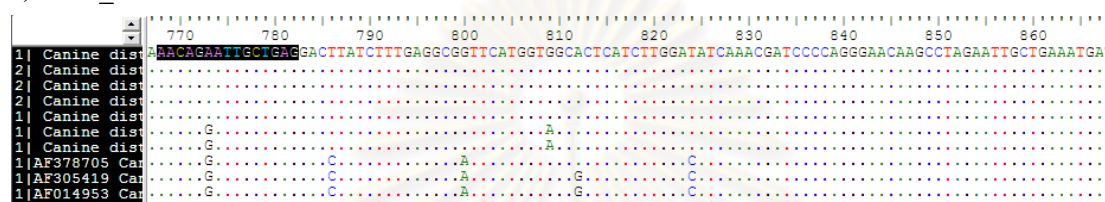


ภาพที่ 10 ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ nested PCR ของ canine influenza virus

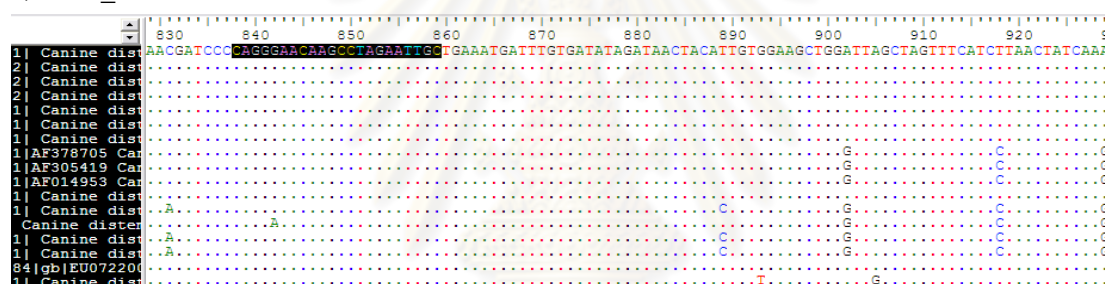
## 2. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบ canine distemper virus ที่บริเวณยีน nucleoprotein (NP)

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อจำแนกเชื้อ canine distemper virus ออกจากตัวอย่าง โดยทำการเพิ่มจำนวนที่บริเวณยีน nucleoprotein (NP) โดยในการศึกษาการระบาดของ CDV ก่อนหน้าได้ทำการศึกษาที่บริเวณยีน nucleoprotein (NP) จึงได้เลือกจำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nucleoprotein (NP) มาจากในฐานข้อมูล Genbank เพื่อเป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ (ภาพที่ 15)

### a) CDV\_F768



### b) CDV\_F838



### c) CDV\_R1057



ภาพที่ 11 แสดงการเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ โดยที่ a), b) และ

c) แสดงบริเวณที่ใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบ CDV\_F768, CDV\_F838 และ CDV\_R1057

ตามลำดับ ด้วยโปรแกรม BioEdit sequence alignment editor

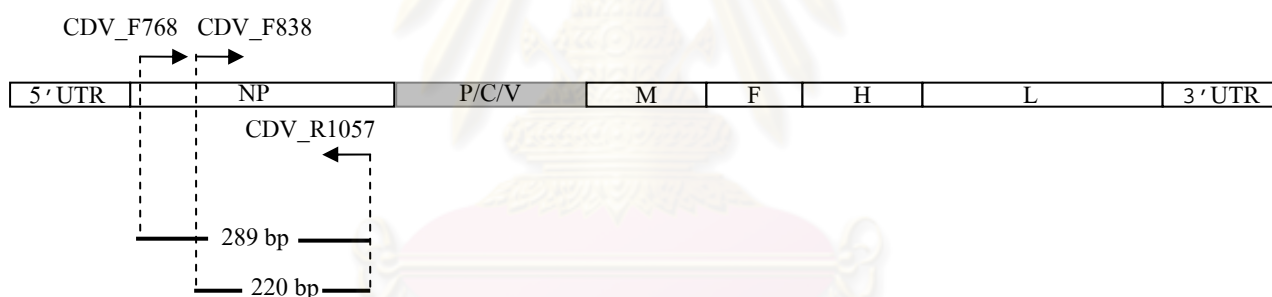
ซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ ดังนี้ 1' PCR: CDV\_F768/CDV\_R1057 มีขนาด 289 bp และ 2' PCR: CDV\_F838/CDV\_R1057 มีขนาด 220 bp เมื่อตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo 1999-2001 v.9.1 ได้ผลดังนี้ (ภาพที่ 12-13)

AACAGRATTGCTGAGGACYTAT	Tm: 45.9	base: 22	<input type="checkbox"/> Link
TCCARRATAACCATGTAYGGTGC	Tm: 49.3	base: 23	Clear
Ta: 55.2		58.91	Exit

ภาพที่ 12 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CDV\_F768 กับ CDV\_R1057

CAGGGAACAAGCCTAGAATTGC	Tm: 56.5	base: 22	<input type="checkbox"/> Link
TCCARRATAACCATGTAYGGTGC	Tm: 49.3	base: 23	Clear
Ta: 56.24		59.95	Exit

ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CDV\_F838 กับ CDV\_R1057



ภาพที่ 14 ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR ของ canine distemper virus

### 3. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบ canine parainfluenza virus ที่บริเวณยีน nucleoprotein (NP)

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อจำแนกเชื้อ canine parainfluenza virus ออกจากตัวอย่าง โดยทำการเพิ่มจำนวนที่บริเวณยีน nucleoprotein (NP) โดยในการศึกษาการระบาดของ CIPV ก่อนหน้าได้ทำการศึกษาที่บริเวณยีน nucleoprotein (NP) จึงได้เลือกจำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nucleoprotein (NP) มาจากในฐานข้อมูล Genbank เพื่อเป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ (ภาพที่ 15)

## a) CPIV\_F363

```

360 370 380 390 400 410 420 430
Canine parainfluenza AATCGAAGGGGTAGAGATCGATGGCTTTGAGGAGGGATCATTCGGCTTAATCCCCAATGCTCGTTCAGGTAATGAGCCGTGC
Canine parainfluenza .....
Canine parainfluenza .....

```

## b) CPIV\_F428

```

430 440 450 460 470 480 490 500
Canine parainfluenza AAGCCGTGGAGAGATCAATGCCTATGCTGCACCTTGCAGAAAGATCTACCTGACACACTAAACCATGCAACACCTTTCGTTG
Canine parainfluenza .....
Canine parainfluenza .....T...A...T...

```

## c) CPIV\_R614

```

550 560 570 580 590 600 610 62
Canine parainfluenza AGACTTTCTTAGATATGTGTTACAGTGTCCCTAATGCAGGCATGGATAGTGAAGCTTGCAAGTGCATGCACTGGGCAGACC
Canine parainfluenza .....
Canine parainfluenza .....T...

```

ภาพที่ 15 แสดงการเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ โดยที่ a), b) และ c) แสดงบริเวณที่ใช้เป็นต้นแบบของ CPIV\_F363, CPIV\_F428 และ CPIV\_R614 ตามลำดับ

ซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ ดังนี้ 1' PCR: CPIV\_F363/CPIV\_R614 มีขนาด 251 bp และ 2' PCR: CPIV\_F428/CPIV\_R614 มีขนาด 180 bp เมื่อตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo 1999-2001 v.9.1 ได้ผลดังนี้ (ภาพที่ 16-17)

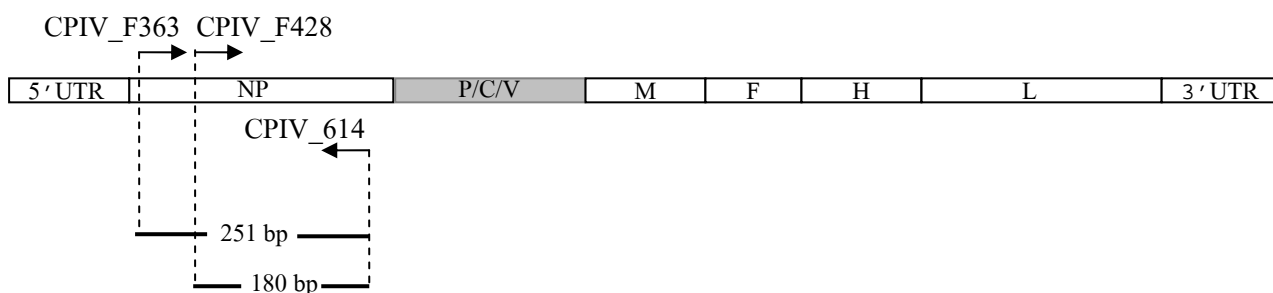
GGGTAGAGATCGATGGCTTTGA	Tm: 55.8	base: 22	<input type="checkbox"/> Link
CTCATCCCATGCAGTTCCCT	Tm: 53.5	base: 20	Clear
Ta: 57.48 61.18		Exit	

ภาพที่ 16 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CPIV\_F363 กับ CPIV\_R614

GCCGTGGAGAGATCAATGCCTAT	Tm: 59.2	base: 23	<input type="checkbox"/> Link
GCGCAGTCATGCACTTGCAAGT	Tm: 57.7	base: 22	Clear
Ta: 58.74 62.45		Exit	

**GCGCAGTCATGCACTTGCAAGT**  
 TGAACCTTCAGTACTGACCCG  
 Self-Complementary Primer

ภาพที่ 17 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CPIV\_F428 กับ CPIV\_R614



ภาพที่ 18 ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR ของ canine parainfluenza virus

#### 4. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบ canine adenovirus ที่บริเวณยีน E3

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อจำแนกเชื้อ canine adenovirus ออกจากตัวอย่าง โดยทำการเพิ่มจำนวนที่บริเวณยีน E3 โดยในการศึกษาการระบาดของ CAV ก่อนหน้าได้ทำการศึกษาที่บริเวณยีน E3 จึงได้เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E3 มาจากในฐานข้อมูล Genbank เพื่อเป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ (ภาพที่ 19)

##### a) CAV\_F73

```

25070 25080 25090 25100 25110 25120 25130 25140 25150 25160 25170
|AC 000020.1 |GTTGATATTCAGACCTCTACCAAGAGGSAACCGGTGTGGACATAGAAGTTAAGTGTCCCAACCACTCCAGCAAACGTGTCACCAATGGCCATGATATGATCTGCT
|S38212.1 |E .....T.....T.....A.TG.GA..A.A.C..T.....G.....A..C.....C.....G.A..A..T
|Y07760.1 |C .....C.....T.....A.TG.TA..A.A.C..T.....G.....A..C.....C.....G.A..A..T
|U55001.1 |CA .....C.....T.....A.TG.TA..A.A.C..T.....G.....A..C.....C.....G.A..A..T
|M60937.1 |AB .....C.....T.....A.TG.TA..A.A.C..T.....G.....A..C.....C.....G.A..A..T
|S38238 E3 re .....C.....T.....A.TG.GA..A.A.C..T.....G.....A..C.....C.....G.A..A..T
|EF057101.1 |

```

##### b) CAV\_F249

```

25250 25260 25270 25280 25290 25300 25310 2
|AC 000020.1 |CTCATTTGAGGCAGCCTGTTCTATGTATAACCTTAAGTACTAGATAAATATTTAATAAAGCTTGTTTTACAGCTACCCACCATAA
|S38212.1 |E .....G.....G.....G.....G.....G.....T.C..G.....G.G.....
|Y07760.1 |C .....A.....G.....G.....G.....G.....G.....T.C..G.....G.G.....
|U55001.1 |CA .....A.....G.....G.....G.....G.....G.....T.C..G.....G.G.....
|M60937.1 |AB .....A.....G.....G.....G.....G.....G.....T.C..G.....G.G.....
|S38238 E3 re .....A.....G.....G.....G.....G.....G.....T.C..G.....G.G.....
|EF057101.1 |

```

##### c) CAV\_R629

```

25600 25610 25620 25630 25640 25650 25660 25670 25680 25690 257
|ne adenovirus |CGAGGGGCGCTGAGCACACTACTCCCTGCTATATTTATGGAGACTGCTACCAAACTGCAGCAATGAGTCTGCCCCA-CGGGCTATTTCAC-GGCCCCCTCAACGAGATGCC
|on: pVIII, 4 |C.....T.....AGA.....C.....G.TGC.GT.....T.....CC.A.GG.ACA..GGCCA.A.A..GA.....TTC.AC..GTC
|adenovirus t |TC.T.C.....A..T.....AGA.....C.....G.TGC.GT.....T.....CC.A.GG.ACA..GGCCA.A.A..GA.....TTC.AC..GTC
|Canine aden |TC.T.C.....A..T.....AGA.....C.....G.TGC.GT.....T.....CC.A.GG.ACA..GGCCA.A.A..GA.....TTC.AC..GTC
|Canine aden |TC.T.C.....A..T.....AGA.....C.....G.TGC.GT.....T.....CC.A.GG.ACA..GGCCA.A.A..GA.....TTC.AC..GTC
|Canine aden |TC.T.C.....A..T.....AGA.....C.....G.TGC.GT.....T.....CC.A.GG.ACA..GGCCA.A.A..GA.....TTC.AC..GTC
|e adenovirus |TC.T.C.....A..T.....AGA.....C.....G.TGC.GT.....T.....CC.A.GG.ACA..GGCCA.A.A..GA.....TTC.AC..GTC

```

ภาพที่ 19 แสดงการเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ โดยที่ a), b) และ

c) แสดงบริเวณที่ใช้ในการออกแบบ CAV\_F73, CAV\_F249 และ CAV\_R629 ตามลำดับ

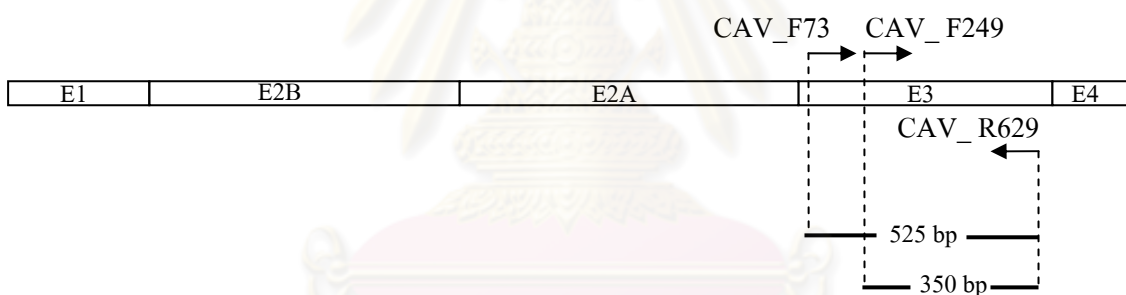
ซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ ดังนี้ 1' PCR: CAV\_F73/CAV\_R629 มีขนาด 525 bp และ 2' PCR: CAV\_F249/CAV\_R629 มีขนาด 350 bp เมื่อตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo 1999-2001 v.9.1 ได้ผลดังนี้ (ภาพที่ 20-21)

TATTCCAGACTCTTACCAAGAGG	Tm: 51.9	base: 23	<input type="checkbox"/> Link
ATAGACAAGGTAGTARTGYTCAG	Tm: 43.	base: 23	Clear
Ta: 54.33 58.04			Exit

ภาพที่ 20 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CAV\_F73 กับ CAV\_R629

AGGCRGCCTGTTCTATGTATAAC	Tm: 50.4	base: 23	<input type="checkbox"/> Link
ATAGACAAGGTAGTARTGYTCAG	Tm: 43.	base: 23	Clear
Ta: 54.33 58.04			Exit

ภาพที่ 21 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ CAV\_F249 กับ CAV\_R629



ภาพที่ 22 ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR ของ canine adenovirus

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## การเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR amplification

### a) Canine influenza virus

ตารางที่ 1 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของ canine influenza virus (M gene)

PCR	Primer's name	Sequence(5' →3')	Position	Size (bp)
1' PCR	CDC_MF3'	5'-GATCGCTCTTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAG-3'	1-30	1027
	CDC_MR3'	5'-ACTGGCTCTTCTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT-3'	1027-985	
2' PCR	M_F5	5'-TCAGGCCCCCTCAAAGCCG-3'	49-67	207
	M_R256	5'-AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA-3'	256-233	

ปีเปตสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมส่วนผสมสำหรับทำ PCR ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ PCR

สารเคมี	ปริมาณ (μL/tube)
Master mix (Eppendorf)	5
DW	6
MgCl <sub>2</sub>	0.5
10 μM Forward primer	0.25
10 μM Reverse primer	0.25
Template	1
Total	13

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ canine influenza virus

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
Pre-denaturation	94	3.00
Denaturation	94	0.30
Annealing	50	0.30
Extention	72	1.30
Post-extention	72	7.00
Hold	25	10.0

} ทำซ้ำ 40 รอบ

### b) Canine distemper virus

ตารางที่ 4 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของ canine distemper virus (NP gene)

PCR	Primer's name	Sequence(5' → 3')	Position	Size (bp)
1' PCR	CDV_F768	5'-AACAGRATTGCTGAGGACYTAT-3'	768-782	289
	CDV_R1057	5'-TCCARRATAACCATGTAYGGTGC-3'	1057-1035	
2' PCR	CDV_F838	5'-CAGGGAACAAGCCTAGAATTGC-3'	837-859	220
	CDV_R1057	5'-TCCARRATAACCATGTAYGGTGC-3'	1057-1035	

ปีเปตสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมส่วนผสมสำหรับทำ PCR ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ PCR ของ canine distemper virus

สารเคมี	ปริมาณ (μL/tube)
Master mix (Eppendorf)	5
DW	6
MgCl <sub>2</sub>	0.5
10 μM Forward primer	0.25
10 μM Reverse primer	0.25
Template	1
Total	13

จากนั้นนำ microtube ที่ได้ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ canine distemper virus

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
Pre-denaturation	94	3.00
Denaturation	94	0.30
Annealing	55	0.30
Extention	72	0.30
Post-extention	72	7.00
Hold	25	10.0

} ทำซ้ำ 40 รอบ

### c) Canine parainfluenza virus

ตารางที่ 7 แสดงลำดับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของ canine parainfluenza virus (NP gene)

PCR	Primer's name	Sequence(5' → 3')	Position	Size (bp)
1' PCR	CPIV_F363	5' -GGGTAGAGATCGATGGCTTTGA-3'	363-386	251
	CPIV_R614	5' - GCGCAGTCATGCACTTGCAAGT -3'	614-593	
2' PCR	CPIV_F428	5' -GCCGTGGAGAGATCAATGCCTAT-3'	428-451	180
	CPIV_R614	5' - GCGCAGTCATGCACTTGCAAGT -3'	614-593	

ปีเปตสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมส่วนผสมสำหรับทำ PCR ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ PCR ของ canine parainfluenza virus

สารเคมี	ปริมาณ (μL/tube)
Master mix (Eppendorf)	5
DW	6
MgCl <sub>2</sub>	0.5
10 μM Forward primer	0.25
10 μM Reverse primer	0.25
Template	1
Total	13

จากนั้นนำ microtube ที่ได้ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ canine parainfluenza virus

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
Pre-denaturation	94	3.00
Denaturation	94	0.30
Annealing	55	0.30
Extention	72	0.30
Post-extention	72	7.00
Hold	25	10.0

} ทำซ้ำ 40 รอบ

#### d.) Canine adenovirus

ตารางที่ 10 แสดงลำดับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของ canine adenovirus (E3 gene)

PCR	Primer's name	Sequence(5' → 3')	Position	Size (bp)
1' PCR	CAV_F73	5' - TATTCCAGACTCTTACCAAGAGG-3'	25073-25095	525
	CAV_R629	5' - ATAGACAAGGTAGTARTGYTCAG -3'	25623-25601	
2' PCR	CAV_F249	5' - AGGCRGCCTGTTCTATGTATAAC-3'	25249-25271	350
	CAV_R629	5' - ATAGACAAGGTAGTARTGYTCAG -3'	25623-25601	

ปิเปตสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมส่วนผสมสำหรับทำ PCR ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ PCR ของ canine adenovirus

สารเคมี	ปริมาณ (μL/tube)
Master mix (Eppendorf)	5
DW	6
MgCl <sub>2</sub>	0.5
10 μM Forward primer	0.25
10 μM Reverse primer	0.25
Template	1
Total	13

จากนั้นนำ microtube ที่ได้ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler personal) ในสถานะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ canine adenovirus

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
Pre-denaturation	94	3.00
Denaturation	94	0.30
Annealing	55	0.30
Extention	72	0.30
Post-extention	72	7.00
Hold	25	10.0

} ทำซ้ำ 40 รอบ

### การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

- หาขนาด PCR product (ผลิตภัณฑ์ PCR) ที่ต้องการด้วยวิธี agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ในการแยกขนาดของ PCR product และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker เพื่อตรวจสอบขนาดของ cDNA ที่ต้องการ และย้อมดูแถบ cDNA ที่ต้องการด้วย ethidium bromide
- ตัด gel โดยเลือกตัดในบริเวณที่มีแถบ PCR product ขนาดที่ต้องการ ดังนี้
- สกัด PCR product จาก gel ที่ตัดออกมาด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Bioscience)
- หาลำดับเบสโดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratories SDN BHD

### การแยกและเพิ่มจำนวนไวรัสด้วย MDCK cell culture

- a) เตรียม cell line ลงใน 24-wells plate
  - เท media เก่าออกจาก flask
  - ล้างเซลล์ด้วย 5 mL PBS (ล้าง 2 ครั้ง)
  - ใส่น้ำ 1 mL trypsin ลงใน flask
  - บ่มที่ตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5 นาที
  - ตรวจสอบเซลล์ด้วยกล้อง microscope ทุกๆ 5 นาที จนกระทั่งเซลล์หลุด
  - เติมน้ำ media ลงไป 5 mL, ปิดฝาทิ้ง-ลง เพื่อให้ได้ เซลล์เดี่ยวๆ
  - นำเซลล์แต่ละ flask ร่วมอยู่ในขวดเดียว และเติมน้ำ media ให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องใช้
  - ปิดฝาทิ้ง 1 mL ลงในแต่ละ well
  - เข้าสู่ตู้เลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ประกอบด้วย 5% CO<sub>2</sub> ข้ามคืน
- b) นำไวรัสลง MDCK cells
  - ทำ 2- fold serial dilution ของตัวอย่าง : ปิดฝาทิ้งตัวอย่าง 200 μL ใส่น้ำลงใน infect media 200 μL
  - ล้างเซลล์ใน 24 well plate ด้วย PBS 3 ครั้ง
  - นำตัวอย่างที่ทำ 2- fold serial dilution มาลงใน wells
  - ปล่อยให้ไวรัส adsorb เข้าสู่เซลล์โดยการบ่มที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 40-60 นาที
  - เติมน้ำ infect media 1 mL แต่ละ wells
  - เข้าสู่ตู้เลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 48 ชั่วโมง
  - ตรวจสอบ Cytopathogenic effect (CPE) ของ MDCK

## c) เก็บไวรัส

- นำ 24-wells plate ลงไปแช่ใน  $-20^{\circ}\text{C}$ , ข้ามคืน
- นำ 24-wells plate ออกจากตู้แช่ และให้ทุก well ละลายให้หมด
- จากนั้นนำแต่ละ well ของตัวอย่างมารวมกันใน tube เดียว
- Centrifuge 4,000 rpm, 20 นาที
- เก็บ supernatant ลงใน tube ใหม่

**Hemagglutination test**

- ปิเปต 1x PBS pH 7.4 50  $\mu\text{L}$  ลง 96 well plate
- เติมตัวอย่าง 50  $\mu\text{L}$  โดยปิเปตขึ้น-ลง
- แล้วปิเปตออก 50  $\mu\text{L}$
- เติม 0.5% เม็ดเลือดแดงของไก่ลง 50  $\mu\text{L}$
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40-60 นาที และสังเกตผล

**Immunostaining test**

## a) transfect cell ด้วย lived-virus จาก nasal-swab

- เติมตัวอย่าง 50  $\mu\text{L}$  ลง 96 well plate
- เติม infection media ลง well ละ 50  $\mu\text{L}$  โดยใช้ multichannel pipette
- แล้วปิดด้วย Paraffin ใต้ง incubate ที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จนเริ่มเกิด CPE

## b) การ fix เซลล์ ใน 96-well plate

- สะบัด media เก่าออกให้หมด ลงใน chlorox
- เติม 4% formalin ลงใน well ละ 100  $\mu\text{L}$  โดยใช้ multichannel pipette
- incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 นาที
- ล้างด้วย PBS-0.5% tween 20 3 ครั้ง โดยใช้ washing machine โดยเอียง plate แล้วไล่ได้

จาก dilution สูงไปต่ำ

- สะบัด plate ให้แห้ง แล้วปิดด้วย paraffin ใต้ง เก็บที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$

## c) ใสแอนติบอดี (monoclonal anti- NP protein)

- เติม monoclonal anti- NP protein ใน PBS-Tween 20 0.5% ที่มี 1% BSA well ละ 50  $\mu\text{L}$
- ล้างด้วย PBS-0.5% tween 20 3 ครั้ง โดยใช้ washing machine โดยเอียง plate แล้วไล่ได้

จาก dilution สูงไปต่ำ

- incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- d) ใส่ secondary mouse anti-IgG conjugated with peroxidase enzyme
- เติม secondary mouse anti-IgG conjugated with peroxidase enzyme ใน PBS-0.5% tween 20 ที่มี 1%BSA ลง well ละ 50  $\mu$ L
  - ล้างด้วย PBS-Tween 20 0.5% 3 ครั้ง โดยใช้ washing machine โดยเอียง plate แล้วใส่ได้ จาก dilution สูงไปต่ำ
  - เติม substrate AEC ลง well ละ 50  $\mu$ L
  - incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
  - ล้างด้วย tap water 3 ครั้ง สะบัด plate แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง
  - สังเกตสีที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลบวกจะให้สีส้ม ส่วนผลลบไม่เกิดสี

### การทำ Real-time PCR เพื่อหา viral load ของไวรัส

ตารางที่ 13 แสดงไพรเมอร์และ โพรบ (prob) ที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ M gene

Oligos	Sequence(5' $\rightarrow$ 3')	Position	Size (bp)
FluA_M_F	5' - CATGGARTGGCTAAAGACAAGACC-3'	56-75	220
FluA-M-R	5' - AGGGCATTYTGGACAAKCGTCTA-3'	276-258	
FluA-M-P	FAM-ACGCTCACCGTGCCAGT-BHQ1	151-170	

ปีเปตสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมส่วนผสมสำหรับทำ real-time PCR ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ real-time PCR ของ M gene

สารเคมี	ปริมาณ ( $\mu$ L/tube)
2x reaction buffer (invitrogen)	5
SuperScript III RT Platinum® Taq Mix	0.2
10 $\mu$ M Forward primer	0.33
10 $\mu$ M Reverse primer	0.33
probe (5 $\mu$ M)	0.35
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	0.75
Template	1

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของ M gene

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Reverse transcription	50	45 min
Initial denaturation	95	3 min
■ Denature	95	10 sec
■ Annealing	55	10 sec
■ Extension	60	40 sec
■ Fluorescent Detection	FAM	
Final extension	72	7 min

} ทำซ้ำ 40 รอบ

การเพิ่มจำนวนยีน HA และ NA ที่จำเพาะด้วยวิธี PCR amplification

a) HA gene: H1

ตารางที่ 16 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของ H1 gene

PCR	Primer's name	Sequence(5' → 3')	Position	Size (bp)
1' PCR	SWF/HMF_H1_717F	5' - CCRGAAATAGCMAWAAGACCCAA-3'	717-740	409
	SWF_R1126	5' - CATCCATCTACCATCCCTGTCCA-3'	1126-1148	
2' PCR	SWF/HMF_H1_717F	5' - CCRGAAATAGCMAWAAGACCCAA-3'	717-740	173
	SWF/HMF_H1_890R	5' - ATYTGAARTGATRATWCCWGATCC-3'	890-866	

b) HA gene: H3

ตารางที่ 17 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของ H3 gene

PCR	Primer's name	Sequence(5' → 3')	Position	Size (bp)
1' PCR	AvHmEqSw_H3_F384	5' - GCGCTTWCAGCAAYTGYTACCC-3'	384-410	930
	AvHmEqSw_H3_R1314	5' - CTGAGAATTCYTTYTCDATYTGATG-3'	1290-1314	
2' PCR	AvHmEqSw_H3_F384	5' - GCGCTTWCAGCAAYTGYTACCC-3'	384-410	747
	AvHmEqSw_H3_R1131	5' - GTTTTCTATGAANCCHGCKATTGC-3'	1113-1131	



**c) HA gene: H5**

ตารางที่ 18 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของ H5 gene

PCR	Primer's name	Sequence(5' → 3')	Position	Size (bp)
1' PCR	H5_F3	5' - ACTCCAATGGGGGCGATAAAC-3'	902-922	350
	H5_R2	5' - ACACTCAGTTTGAGGCCGTTG-3'	1252-1231	
2' PCR	H5_F3	5' - ACTCCAATGGGGGCGATAAAC-3'	902-922	230
	H5_R2+	5' - GGATGGCAGGGAATGGTAGATG -3'	1132-1110	

**d) NA gene: N1**

ตารางที่ 19 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของ N1 gene

PCR	Primer's name	Sequence(5' → 3')	Position	Size (bp)
1' PCR	N1_F671	5' - TRAGRACHCARGAGTCTGAATGTG-3'	671-695	765
	NA_all_R3'	5' - CCAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT-3'	1436-1413	
2' PCR	N1_F671	5' - TRAGRACHCARGAGTCTGAATGTG-3'	671-695	218
	N1_R889	5' - GCCARTTRTCYCTGCAHACACA-3'	889-867	

**e) NA gene: N2**

ตารางที่ 20 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของ N2 gene

PCR	Primer's name	Sequence(5' → 3')	Position	Size (bp)
1' PCR	AvHuSw_N2_F540	5' - AGCAAGTATGYATAGCATGGTC-3'	540-561	688
	AvHuSw_N2_R1128	5' - TTGCTGATTGTYCKTCCCATCCA-3'	1106-1128	
2' PCR	AvHuSw_N2_F744	5' -GTRATGACTGATGGRAGTGCATCA-3'	744-766	484
	AvHuSw_N2_R1128	5' - TTGCTGATTGTYCKTCCCATCCA-3'	1106-1128	

## f) NA gene: N8

ตารางที่ 21 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของ N8 gene

PCR	Primer's name	Sequence(5' → 3')	Position	Size (bp)
1' PCR	AvEq_N8_F571	5' - ATGCCATGAYGGRAARAARTGGAT-3'	571-595	800
	AvEq_R1371	5' - ACTCCACACATYACAAYRGAGCT-3'	1348-1371	
2' PCR	AvEq_F723	5' - CARGARTCDTCMTGCACCTGCAT-3'	732-755	639
	AvEq_R1371	5' - ACTCCACACATYACAAYRGAGCT-3'	1348-1371	

ปิเปตสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมส่วนผสมสำหรับทำ PCR ดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ PCR ของ HA และ NA gene

สารเคมี	ปริมาณ (μL/tube)
Master mix (Eppendorf)	5
DW	6
MgCl <sub>2</sub>	0.5
10 μM Forward primer	0.25
10 μM Reverse primer	0.25
Template	1
Total	13

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของ HA และ NA gene

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
Pre-denaturation	94	3.00
Denaturation	94	0.30
Annealing	50	0.30
Extention	72	1.30
Post-extention	72	7.00
Hold	25	10.0

} ทำซ้ำ 40 รอบ

### การทำ phylogenetic analysis ในส่วนของยีน HA ของ canine influenza virus สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างๆ

การวิเคราะห์นี้ใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor และ Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 3.1 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HA จากตัวอย่างที่พบ CIV ในประเทศไทยมาเปรียบเทียบกับ HA กับสายพันธุ์ที่พบในต่างประเทศ และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ human influenza virus เพื่อวิเคราะห์ความใกล้เคียงกันระหว่างไข้หวัดใหญ่ในสุนัขกับมนุษย์ โดยในการศึกษานี้กำหนดให้ใช้ค่าพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ Neighbor-joining method, Model แบบ Nucleotide: Maximum Composite Likelihood และค่า bootstrapping เท่ากับ 1,000

### การทำ Sequence Identity Matrix ในส่วนของยีน HA ของ canine influenza virus สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่าง ๆ

ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ HA จากตัวอย่างที่พบ CIV ในประเทศไทยมาเปรียบเทียบกับ HA กับสายพันธุ์ที่พบในต่างประเทศ และนำมาเปรียบเทียบกับ human influenza virus ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อวิเคราะห์ออกมาเป็นค่าตัวเลขแสดงเป็นค่าความใกล้เคียงกันระหว่างไข้หวัดใหญ่สุนัขในประเทศไทยกับต่างประเทศ รวมถึงความใกล้เคียงกับมนุษย์

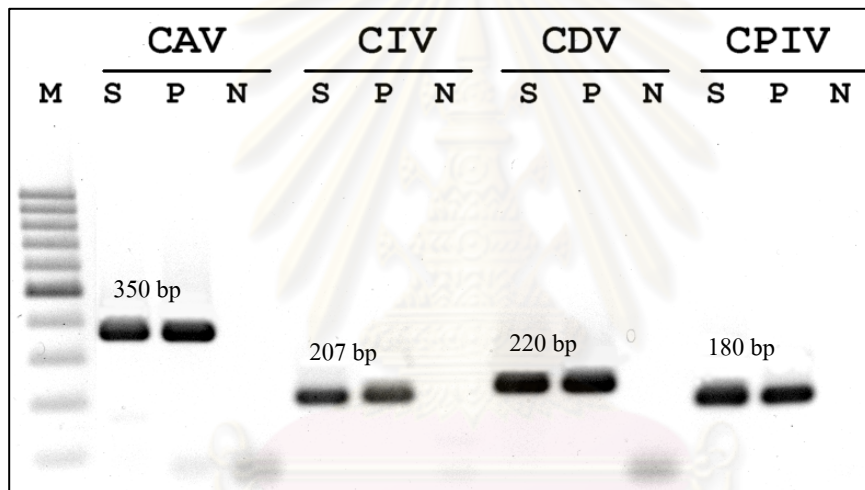
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1) ผลการตรวจสอบไวรัสก่อโรกระบบทางเดินหายใจในสุนัขด้วยวิธี nested PCR

เมื่อสกัดตัวอย่างได้ DNA หรือ cDNA จากนั้นเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี nested PCR โดยมีขนาดที่ถูกต้องของ PCR product มีค่าเท่ากับ 350, 207, 220 และ 180 bp ของ CAV, CIV, CDV และ CPIV ตามลำดับ (ภาพที่ 23) จากผลการตรวจสอบไวรัสในระบบทางเดินหายใจในสุนัข จากตัวอย่าง nasal swab พบว่ามีขนาด PCR product ตรงตามขนาดของ positive control ที่ได้มาจากวัคซีน NOBIVAC DHPPi (Intervet International B.V., Boxmeer, Holland) โดยที่ไม่มี PCR product ที่เป็น non-specific ขึ้นซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงความจำเพาะของ primer ที่มีต่อการตรวจสอบไวรัสในระบบทางเดินหายใจในสุนัข ด้วยวิธี nested PCR



ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบ canine respiratory viruses ด้วยวิธี nested PCR ของ CAV, CIV, CDV และ CPIV ตามลำดับ หมายถึง: S=sample, P= positive control และ N=negative control

#### 2) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จาก positive PCR product ของแต่ละตัวอย่าง

หลังจากที่ตรวจสอบไวรัสในระบบทางเดินหายใจในสุนัขด้วยวิธี nested PCR และนำ PCR product มาทำ agarose gel electrophoresis โดยไวรัสที่ผลของ PCR product เป็น positive จะนำมาทำให้ DNA บริสุทธิ์ ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit(Bioscience) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratories SDN BHD เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้โปรแกรม Chromas Lite version 2.01 และ BioEdit Sequence Alignment Editor ในการแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ได้รับการยืนยันและบ่งชี้ว่าเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใดในฐานข้อมูล โดยผลของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นการยืนยันถึงผล PCR product จากการทำ nested PCR

### 3) การยืนยันผลการตรวจ CIV ด้วยเทคนิคอื่น ๆ

#### ผลการแยกและเพิ่มจำนวนไวรัส (Virus isolation) ด้วย MDCK cell culture

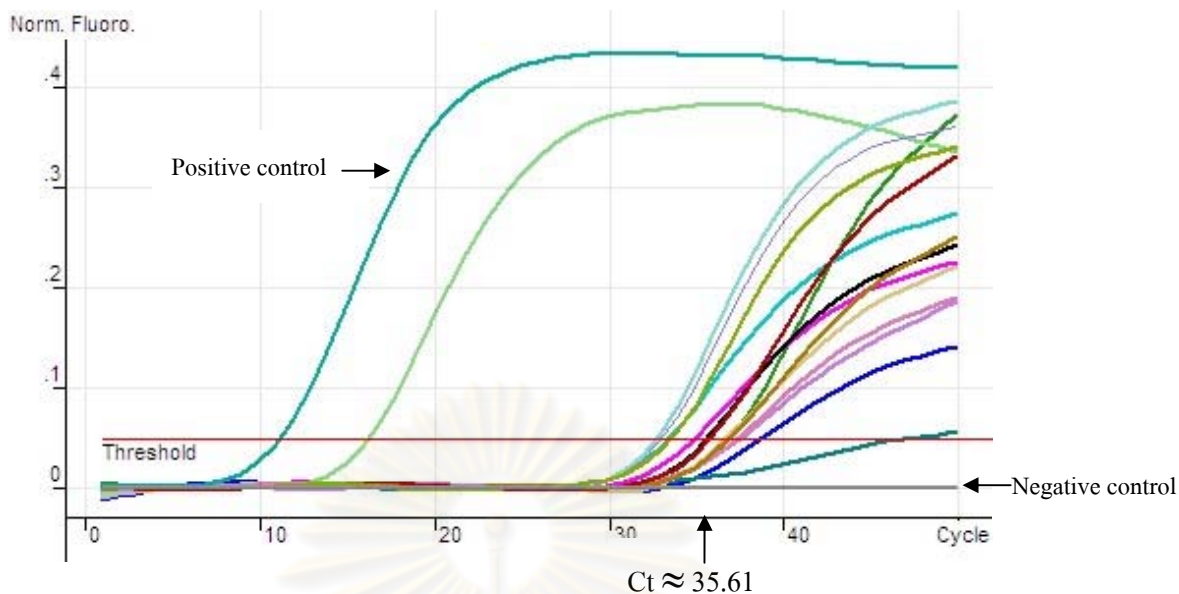
เมื่อนำ nasal swabs จากตัวอย่างที่ตรวจพบ CIV ด้วยวิธี nested PCR มาทำการแยกและเพิ่มจำนวนไวรัสด้วย MDCK cell culture พบว่าไม่เกิด Cytopathic effect (CPE) จากนั้นจึงเก็บเอา supernatant มาทำสอบ Hemagglutination test (HA test) เพื่อตรวจสอบว่าการทำ cell culture ด้วย MDCK cell แล้วนั้นมีไวรัสที่มี hemagglutinin เป็นองค์ประกอบบนอนุภาคไวรัสเพิ่มขึ้นหรือไม่ จากผลการทดลอง HA test พบว่าทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบนั้น ไม่เกิดการ agglutinate ของเม็ดเลือดแดงและให้ผลเป็นจุดที่กั้น well รูปทรงวี ซึ่งบ่งชี้ว่าไม่มีไวรัสเพิ่มจำนวนหลังจากการทำ virus isolation

#### ผลการตรวจ Immunostaining test

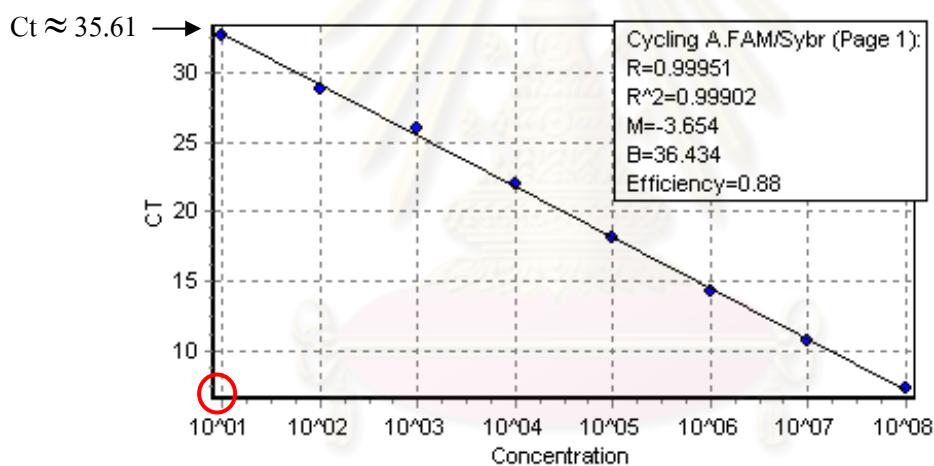
จากการนำ nasal swabs จากตัวอย่างที่ตรวจพบ CIV ด้วยวิธี nested PCR มาทำ virus infection เข้าสู่ MDCK cell culture แล้วตรวจสอบการติดเชื้อด้วย immunostaining test โดยใช้ primary monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ NP protein ของเชื้อ influenza A virus เพื่อตรวจสอบหาเชื้อ CIV จากนั้นติดตามสัญญาณโดยใช้ secondary mouse anti-IgG conjugated with peroxidase enzyme แล้วใส่ ACE substrate เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีส้ม จากผลการทดลองพบว่าทุกตัวอย่างที่นำมาเพื่อตรวจสอบ ไม่เกิดสีส้มบริเวณเซลล์ ซึ่งบ่งชี้ว่าไม่มีการติดเชื้อของ CIV จากตัวอย่าง nasal swabs ลงใน MDCK cell

#### ผลการตรวจสอบปริมาณไวรัส (viral load) ด้วยวิธี real-time PCR

จากการนำ cDNA ของตัวอย่างที่ตรวจพบ CIV ด้วยวิธี nested PCR เป็น template ในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบยืนยันผลการทดสอบให้มีความจำเพาะมากขึ้น โดยกำหนดค่า cut off ที่ค่า Ct เท่ากับ 40 ถ้าตัวอย่างใดเส้นกราฟขึ้นไม่ถึงค่า cut off ที่กำหนดไว้ ถือว่าตัวอย่างนั้นให้ผลว่าไม่มีสารพันธุกรรมของ influenza A virus พบว่าค่า Ct (threshold cycle) ของตัวอย่างที่ตรวจพบ CIV ส่วนใหญ่จะมีค่าเฉลี่ยประมาณ 35.61 (ภาพที่ 24) ซึ่งสามารถคำนวณหาปริมาณ viral load ด้วยวิธี relative quantitation โดยเมื่อนำค่า Ct ของตัวอย่างเทียบกับ standard curve ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct และความเข้มข้นของสารพันธุกรรมของเชื้อ influenza A virus พบว่ามีค่าประมาณ 10 copies/ $\mu$ L (ภาพที่ 25) ซึ่งบ่งชี้ว่ามีจำนวน copy สารพันธุกรรมของตัวอย่างมีปริมาณน้อยมาก เนื่องจากที่ HA titer เท่ากับ 1 นั้นมีค่าความเข้มข้นของสารพันธุกรรมของเชื้อ influenza A virus ประมาณ  $10^6$  copies/ $\mu$ L จึงจะสามารถตรวจสอบหาเชื้อ influenza A virus ได้ จึงอาจเป็นสาเหตุให้การตรวจสอบด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น virus isolation, Hemagglutination และ immunostaining test แล้วได้ผลเป็นลบ



ภาพที่ 24 แสดงผล real-time PCR จากตัวอย่างที่ตรวจสอบพบ canine influenza virus



ภาพที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct กับจำนวน viral load ของ Influenza A virus

#### 4) ระบาดวิทยาของไวรัสระบบทางเดินหายใจในสุนัขที่พบในประเทศไทย

- การติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจชนิดเดียวในสุนัข (Single infection with canine respiratory viruses)

จากการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA หรือ cDNA จากตัวอย่างของสุนัข ด้วยวิธี nested PCR และการยืนยันผลโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไม่มีการติดเชื้อของ CAV ในสุนัขปกติ แต่พบในสุนัขที่มีอาการของโรคระบบทางเดินหายใจ 10 ตัวอย่างคิดเป็น 9.17% จากสุนัขป่วย 109 ตัวอย่าง การติดเชื้อ CIV พบทั้งในสุนัขปกติ 3 ตัวอย่างจาก 102 ตัวอย่าง คิดเป็น 2.94% และสุนัขที่มีอาการของโรคระบบทางเดินหายใจ 3 ตัวอย่าง จาก 109 ตัวอย่าง คิดเป็น 2.75% ของสุนัขป่วย ในขณะที่พบการติดเชื้อของ CDV 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 2.94% ของสุนัขปกติและ 2 ตัวอย่างคิดเป็น 1.83% ของ

สุนัขที่มีอาการของโรกระบบทางเดินหายใจ และ CIPV พบในสุนัขปกติ 1 ตัวอย่าง จึงคิดเป็น 0.98% และในสุนัขที่มีอาการของโรคทางระบบทางเดินหายใจ 13 ตัวอย่างคิดเป็น 11.93%

■ การติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจอย่างน้อยสองชนิดในสุนัข (Multiple infections with canine respiratory viruses)

การติดเชื้อร่วมในสุนัขปกติเพียง 1 ตัวอย่างจาก 102 ตัวอย่างคิดเป็น 0.98% ซึ่งเป็นการติดเชื้อร่วมระหว่าง CPIV กับ CDV ในขณะที่สุนัขที่มีอาการของโรกระบบทางเดินหายใจ พบการติดเชื้อร่วมระหว่าง CIV กับ CAV 2 ตัวอย่างจาก 109 ตัวอย่างคิดเป็น 1.83%, การติดเชื้อร่วมระหว่าง CIV กับ CPIV พบ 1 ตัวอย่างคิดเป็น 0.92% จาก 109 ตัวอย่าง และพบ 2 ตัวอย่างจาก 109 ตัวอย่างคิดเป็น 1.83% เป็นการติดเชื้อร่วมระหว่าง CAV กับ CPIV นอกจากนี้ยังมีการติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจสามชนิดร่วมกันซึ่งพบได้เฉพาะสุนัขที่มีอาการของโรกระบบทางเดินหายใจ 1 ตัวอย่างคิดเป็น 0.92% โดยเป็นการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง CAV, CDV และ CPIV (จากตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 แสดงผลการระบาดวิทยาของ canine respiratory viruses ในสุนัขปกติ และสุนัขป่วย

	Normal dogs (n=102)	Dogs with respiratory disease (n=109)
<b>Single infection</b>		
CAV	0	10 (9.17%)
CIV	3 (2.94%)	3 (2.75%)
CDV	3 (2.94%)	2 (1.83%)
CPIV	1 (0.98%)	13 (11.93%)
<b>Dual-infection</b>		
CIV+CAV	0	2 (1.83%)
CIV+CPIV	0	1 (0.92%)
CAV+CPIV	0	2 (1.83%)
CPIV+CDV	1 (0.98%)	0
<b>Triple infection</b>		
CPIV+CAV+CDV	0	1 (0.92%)

## 5) ลักษณะอาการของสุนัขที่มีอาการของโรคในระบบทางเดินหายใจ

ลักษณะอาการของสุนัขที่มีอาการของโรคในระบบทางเดินหายใจ จากการติดเชื้อของไวรัสชนิดเดียวไม่ว่าจะเป็นเชื้อ CAD, CIV, CAD และ CPIV จะมีลักษณะคล้ายกันนั้นคือ อาการป่วย เช่น มีน้ำมูก, จาม, ไอ หรือมีการอักเสบของระบบทางเดินหายใจ เช่นเดียวกับการติดเชื้อร่วมของไวรัสในระบบทางเดินหายใจมีลักษณะอาการป่วยเหมือนกับการติดเชื้อของไวรัสชนิดเดียวแต่รุนแรงมากกว่า

## 6) การตรวจสอบ HA Subtype จากตัวอย่างที่พบ canine influenza A virus

จากผลการตรวจสอบ CIV ด้วยวิธี nested PCR และ real-time PCR โดยใช้ primers และ probe ที่จำเพาะกับ M gene พบว่ามีจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 9 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก จากนั้นจึงนำตัวอย่างดังกล่าวมาตรวจสอบหาสายพันธุ์ (subtypes) ด้วยวิธี nested-PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ subtype H1, H3 และ H5 โดยมี positive control จากการทำโคลนนิ่งพลาสมิดของทั้ง H1, H3 และ H5 พบว่ามี CIV ที่พบในสุนัขปกติ 3 ตัวให้ผลลบทั้ง H1, H3 และ H5 subtypes จึงจำแนกเป็น unclassified subtype ในสุนัขป่วยจำนวน 6 ตัวอย่างพบว่ามี 3 ตัวอย่างจำแนกเป็น H1 subtype ได้แก่ A/canine/Thailand/3/2008, A/canine/Thailand/5/2008 และ A/canine/Thailand/16/2008 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ nucleotide sequencing มาวิเคราะห์ด้วยวิธี BLAST analysis เปรียบเทียบกับในฐานข้อมูลใน GenBank database พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ A/Thailand/395/2006 (H1N1) ถึง 100% ของค่า Query coverage และ 99% ของค่า Max identity (ภาพที่ 26) และพบ 1 ตัวอย่างจากสุนัขป่วยจำแนกเป็น H3 subtype คือ A/canine/Thailand/74/2009 เมื่อนำลำดับ นิวคลีโอไทด์ BLAST เทียบกับในฐานข้อมูลพบว่าเหมือนกับ A/Canine/Florida/2003 (H3N8) ถึง 99% ของค่า Query coverage และ 99% ของค่า Max identity (ภาพที่ 27) นอกจากนี้จากสุนัขป่วยอีก 2 ตัวอย่างถูกจำแนกเป็น unclassified subtype

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AB501406.1</a>	Influenza A virus (A/Thailand/395/2006(H1N1)) HA gene for hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">FJ794127.1</a>	Influenza A virus (A/Jeju/244/2006(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">FJ794126.1</a>	Influenza A virus (A/Incheon/150/2006(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">FJ794125.1</a>	Influenza A virus (A/Jeonbuk/1096/2005(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">FJ794120.1</a>	Influenza A virus (A/Jeonbuk/1189/2005(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">FJ794119.1</a>	Influenza A virus (A/Gangwon/799/2005(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">FJ794118.1</a>	Influenza A virus (A/Gyeonggi/966/2005(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">FJ794116.1</a>	Influenza A virus (A/Ulsan/752/2005(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">FJ231784.1</a>	Influenza A virus (A/Niedersachsen/5/2006(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">FJ231783.1</a>	Influenza A virus (A/Niedersachsen/4/2006(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">EU021254.1</a>	Influenza A virus (A/Thailand/CU51/2006(H1N1)) hemagglutinin (HA) gene	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">EF566345.1</a>	Influenza A virus (A/Auckland/30/2006(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">AB255398.1</a>	Influenza A virus (A/Aichi/150/2006(H1N1)) HA1 gene for hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">AB255392.1</a>	Influenza A virus (A/Aichi/21/2006(H1N1)) HA1 gene for hemagglutinin	598	598	100%	8e-168	99%
<a href="#">AB501420.1</a>	Influenza A virus (A/Thailand/72/2006(H1N1)) HA gene for hemagglutinin	594	594	100%	1e-166	98%
<a href="#">AB501396.1</a>	Influenza A virus (A/Thailand/348/2006(H1N1)) HA gene for hemagglutinin	594	594	100%	1e-166	98%
<a href="#">FJ794124.1</a>	Influenza A virus (A/Chungbuk/1183/2005(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	594	594	100%	1e-166	98%
<a href="#">FJ794123.1</a>	Influenza A virus (A/Daejeon/41/2006(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	594	594	100%	1e-166	98%
<a href="#">FJ794122.1</a>	Influenza A virus (A/Incheon/1054/2005(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	594	594	100%	1e-166	98%
<a href="#">FJ794121.1</a>	Influenza A virus (A/Jeonnam/1094/2005(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	594	594	100%	1e-166	98%
<a href="#">FJ794095.1</a>	Influenza A virus (A/Chungnam/4547/2007(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	594	594	100%	1e-166	98%
<a href="#">FJ794093.1</a>	Influenza A virus (A/Chungbuk/4543/2007(H1N1)) segment 4 hemagglutinin	594	594	100%	1e-166	98%

ภาพที่ 26 ผลการ BLAST ของตัวอย่างที่ตรวจพบ H1



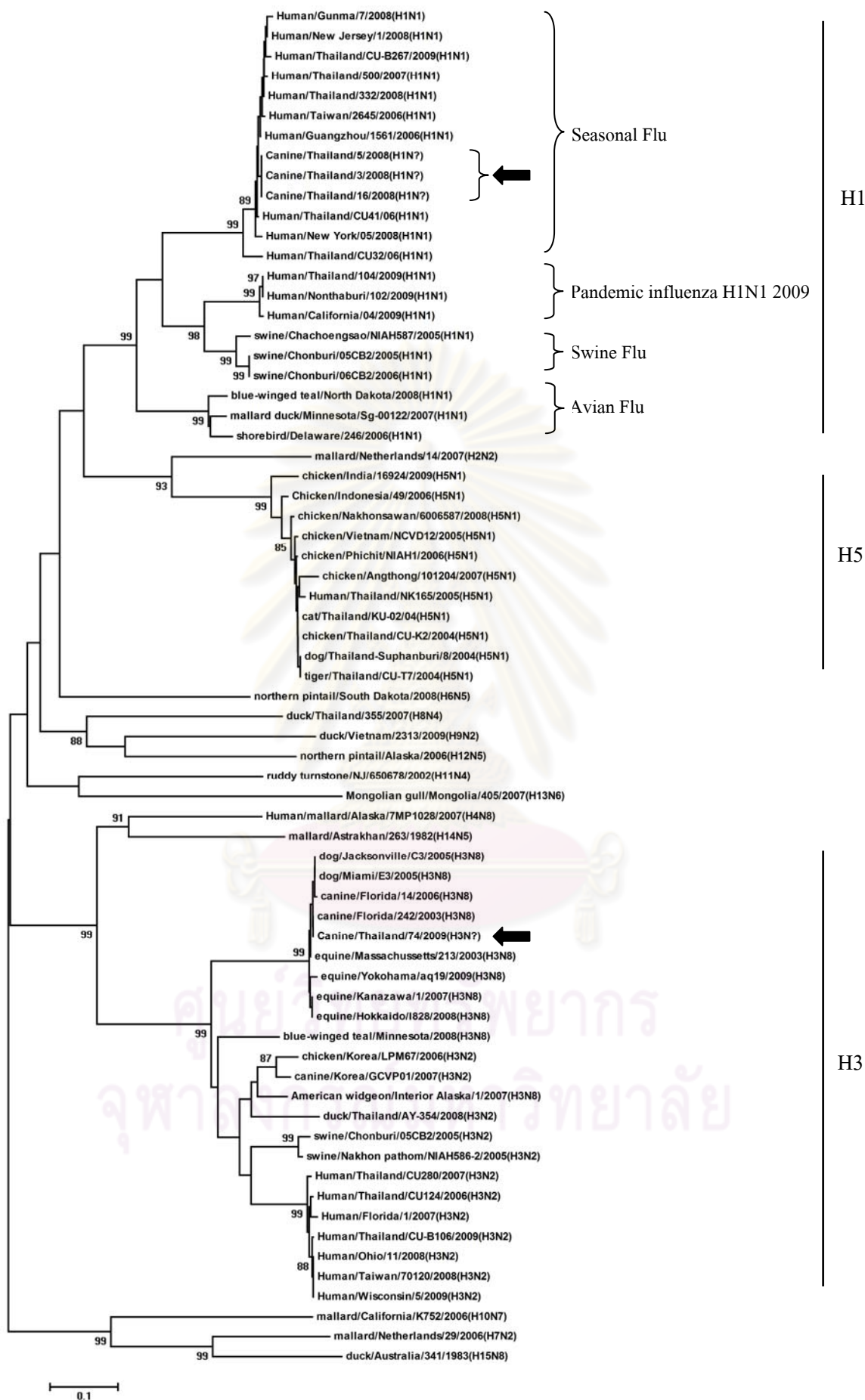
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">DQ124157.1</a>	Influenza A virus (A/canine/Florida/242/2003(H3N8)) hemagglutinin	1328	1328	99%	0.0	99%
<a href="#">DQ124193.1</a>	Influenza A virus (A/equine/Massachusetts/213/2003(H3N8)) hemagglutinin	1317	1317	99%	0.0	98%
<a href="#">DQ124190.1</a>	Influenza A virus (A/canine/Florida/43/2004(H3N8)) hemagglutinin	1317	1317	99%	0.0	99%
<a href="#">CY030759.1</a>	Influenza A virus (A/equine/California/8560/2002(H3N8)) segment 4	1315	1315	99%	0.0	98%
<a href="#">DQ222913.1</a>	Influenza A virus (A/equine/Wisconsin/1/03(H3N8)) hemagglutinin	1315	1315	99%	0.0	98%
<a href="#">DQ124192.1</a>	Influenza A virus (A/equine/Ohio/1/2003(H3N8)) hemagglutinin	1315	1315	99%	0.0	98%
<a href="#">EU855742.1</a>	Influenza A virus (A/equine/Guelph/G04-54701/2004(H3N8)) hemagglutinin	1310	1310	99%	0.0	98%
<a href="#">DQ124196.1</a>	Influenza A virus (A/canine/Texas/1/2004(H3N8)) hemagglutinin	1310	1310	99%	0.0	98%
<a href="#">DQ124191.1</a>	Influenza A virus (A/equine/Kentucky/5/2002(H3N8)) hemagglutinin	1310	1310	99%	0.0	98%
<a href="#">GU473367.1</a>	Influenza A virus (A/canine/Florida/14/2006(H3N8)) segment 4	1306	1306	99%	0.0	98%
<a href="#">EU855743.1</a>	Influenza A virus (A/equine/Guelph/G03-0250/2003(H3N8)) hemagglutinin	1306	1306	99%	0.0	98%
<a href="#">EU402408.1</a>	Influenza A virus (A/dog/Miami/E3/2005(H3N8)) hemagglutinin	1306	1306	99%	0.0	98%
<a href="#">DQ124195.1</a>	Influenza A virus (A/equine/California/191/2003(H3N8)) hemagglutinin	1306	1306	99%	0.0	98%
<a href="#">DQ124194.1</a>	Influenza A virus (A/equine/New York/452/2003(H3N8)) hemagglutinin	1306	1306	99%	0.0	98%
<a href="#">DQ124189.1</a>	Influenza A virus (A/equine/New York/1/1999(H3N8)) hemagglutinin	1306	1306	99%	0.0	98%
<a href="#">AY855341.1</a>	Influenza A virus (A/equine/Kentucky/5/02(H3N8)) hemagglutinin	1306	1306	99%	0.0	98%
<a href="#">FJ375213.1</a>	Influenza A virus (A/equine/Newmarket/5/2003(H3N8)) segment 4	1301	1301	99%	0.0	98%
<a href="#">EU402407.1</a>	Influenza A virus (A/dog/Jacksonville/C3/2005(H3N8)) hemagglutinin	1301	1301	99%	0.0	98%
<a href="#">DQ146419.1</a>	Influenza A virus (A/canine/Iowa/13628/2005(H3N8)) hemagglutinin	1301	1301	99%	0.0	98%
<a href="#">EU855741.1</a>	Influenza A virus (A/equine/Guelph/G03-55399/2003(H3N8)) hemagglutinin	1297	1297	99%	0.0	98%
<a href="#">AB360549.2</a>	Influenza A virus (A/equine/Ibaraki/1/07(H3N8)) HA gene for hemagglutinin	1292	1292	99%	0.0	98%

ภาพที่ 27 ผลการ BLAST ของตัวอย่างที่ตรวจพบ H3

## 7) ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree (HA gene) ของไข้หวัดสุนัขในประเทศไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างๆ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัย phylogenetic analysis ทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์และศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสได้ ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดสุนัขที่ได้จากงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่าง ๆ (H1-H15) โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ Neighbor-joining method, Model แบบ Nucleotide: Maximum Composite Likelihood และตั้งค่า bootstrapping เท่ากับ 1,000 ทำให้สามารถจำแนกไข้หวัดสุนัขที่พบในประเทศไทย ได้ดังนี้ เชื้อ CIV จำนวน 3 ตัวอย่างที่ตรวจสอบว่าเป็น H1 ได้แก่ A/canine/Thailand/3/2008, A/canine/Thailand/5/2008 และ A/canine/Thailand/16/2008 ถูกจัดจำแนกให้อยู่ในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ seasonal human influenza virus (H1N1) (ดังรูปที่ 28) เมื่อพิจารณาด้วยค่า % sequence identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในตัวอย่าง H1 ทั้งสามตัวนี้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.1% และ 97.18% เมื่อเทียบกับ seasonal human influenza virus (H1N1)

ส่วนตัวอย่าง CIV ที่ตรวจสอบว่าเป็นสายพันธุ์ H3 มีหนึ่งตัวอย่างคือ A/canine/Thailand/74/2009 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ equine influenza virus (H3N8) และ canine influenza virus (H3N8) (ดังภาพที่ 28) และเมื่อพิจารณาค่า % sequence identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในตัวอย่างดังกล่าวเปรียบเทียบกับ canine influenza virus (H3N8) พบว่ามีค่าเฉลี่ยประมาณ 98.82% และ 97.75% ตามลำดับ



ภาพที่ 28 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของ canine influenza A virus subtype H1 และ H3 เปรียบเทียบกับ influenza A virus subtype H1-H15 ที่มีรายงานใน GenBank Database ด้วยโปรแกรม MEGA

ตารางที่ 25 ผลการเปรียบเทียบค่า % sequence identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน H1 และ H3 ของไข้หวัดสุนัขในประเทศไทย เปรียบเทียบกับ Influenza A virus สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

	H1N1				H3N2/H3N8						H5N1				
	Avian	Seasonal	Pandemic	Swine	Avian	Canine		Equine	Human	Swine	Avian	Canine	Human	Swine	Tiger
		Human influenza	influenza 2009			H3N2	H3N8								
H1N?	72.20	<b>98.1</b>	74.00	76.40	52.67	52.90	52.96	52.90	52.24	51.85	57.75	57.70	58.00	58.00	57.70
H3N?	48.80	46.54	48.46	49.40	75.57	77.50	<b>98.82</b>	98.30	72.10	73.05	46.22	46.00	46.20	46.00	46.00

ตารางที่ 26 ผลการเปรียบเทียบค่า % sequence identity matrix ของลำดับกรดอะมิโนของยีน H1 และ H3 ของไข้หวัดสุนัขในประเทศไทย เปรียบเทียบกับ Influenza A virus สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

	H1N1				H3N2/H3N8						H5N1				
	Avian	Seasonal	Pandemic	Swine	Avian	Canine		Equine	Human	Swine	Avian	Canine	Human	Swine	Tiger
		Human influenza	influenza 2009			H3N2	H3N8								
H1N?	73.06	<b>97.18</b>	71.30	73.20	52.67	52.90	52.96	52.90	52.24	51.85	54.58	55.20	55.20	55.20	73.60
H3N?	25.03	22.90	21.73	22.25	51.42	53.00	<b>97.75</b>	95.65	51.75	50.35	21.41	21.70	21.50	21.10	21.40

		Receptor Binding site										Cleavage site																														
		220					230					320					330																									
H1N1 Pandemic	Human/Nonthaburi/102/2009 (H1N1)	P	E	I	A	I	R	P	K	V	R	D	Q	E	G	R	M	N	Y	Y	W	T	L	A	T	G	L	R	N	V	P	S	I	Q	~	~	~	~	~	S	R	G
	Human/Thailand/104/2009 (H1N1)	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....			
	Human/California/04/2009 (H1N1)	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....			
H1N1 Seasonal	Human/Thailand/CU32/2006 (H1N1)	.....	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	.....	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....			
	Human/Thailand/CU41/2006 (H1N1)	.....	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	V	.....	.....	.....	.....	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
H1N1 Swine	Swine/Chachoengsao/NIAH587/2005 (H1N1)	.....	E	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	.....	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
	Swine/Chonburi/05CB1/2005 (H1N1)	.....	E	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	.....	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
	Swine/Chonburi/06CB2/2006 (H1N1)	.....	E	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	.....	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
H1N1 Canine	Canine/Thailand/3/2008 (H1N?)	.....	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	V	.....	.....	.....	.....	S	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
	Canine/Thailand/5/2008 (H1N?) *	.....	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	V	.....	.....	.....	.....	S	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
	Canine/Thailand/16/2008 (H1N?)	.....	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	V	.....	.....	.....	.....	S	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
H3N2 Seasonal	Human/Thailand/CU124/2006 (H3N2)	N	G	S	.....	R	.....	N	I	P	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T	.....	
	Human/Thailand/CU280/2007 (H3N2)	N	G	S	.....	R	.....	N	I	P	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T	.....	
H3N8 Equine	Equine/Kanazawa/1/2007 (H3N8)	N	G	S	.....	W	.....	G	.....	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	I	.....	
	Equine/Hokkaido/I828/2008 (H3N8)	N	G	S	.....	W	.....	G	.....	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	I	.....	
	Equine/Yokohama/aq19/2009 (H3N8)	N	G	S	.....	W	.....	I	.....	G	.....	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	I	.....	
	Equine/Massachussetts/213/2003 (H3N8)	N	G	S	.....	W	.....	G	.....	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	I	.....
	Equine/California/191/2003 (H3N8)	N	G	S	.....	W	.....	G	.....	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	I	.....
H3N8 Canine	Canine/Florida/14/2006 (H3N8)	N	G	S	.....	L	.....	G	.....	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T	.....
	Canine/Jacksonville/C3/2005 (H3N8)	N	G	S	.....	L	.....	G	.....	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T	.....
	Canine/Florida/242/2003 (H3N8)	N	G	S	.....	L	.....	G	.....	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T	.....
	Canine/Miami/E3/2005 (H3N8)	N	G	S	.....	L	.....	G	.....	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T	.....
	Canine/Thailand/74/2009 (H3N?) *	N	G	S	.....	L	.....	G	.....	S	.....	I	S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....	.....	.....	.....	E	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T	.....
H5N1	Chicken/Thailand/CU-K2/2004 (H5N1)	R	.....	T	.....	S	.....	N	G	.....	S	.....	E	F	F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	S	Q	R	E	R	R	R	R	K	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	Tiger/Thailand/CU-T7/2004 (H5N1)	R	.....	T	.....	S	.....	N	G	.....	S	.....	E	F	F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	S	Q	R	E	R	R	R	R	K	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	Cat/Thailand/KU-02/04 (H5N1)	R	.....	T	.....	S	.....	N	G	.....	S	.....	E	F	F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	S	Q	R	E	R	R	R	R	K	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	Human/Thailand/NK165/2005 (H5N1)	R	.....	T	.....	S	.....	N	G	.....	S	.....	E	F	F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	S	Q	R	E	K	R	R	R	K	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	Dog/Thailand-Suphanburi/KU-08/2004 (H5N1)	R	.....	T	.....	S	.....	N	G	.....	S	.....	E	F	F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	S	Q	R	E	R	R	R	R	K	K	.....	.....	.....	.....	.....	.....

ภาพที่ 29 ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง Receptor binding site และ Cleavage site ของ HA จากตัวอย่างสายพันธุ์ต่าง ๆ

## 8) ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในส่วน Receptor binding site ของ HA

บริเวณ Receptor binding site บนโมเลกุล HA ของเชื้อไวรัสมีความสำคัญในการเกาะจับกับ Sialic acid receptor ของเซลล์ ซึ่งเป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการติดเชื้อของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ จากการศึกษาวิเคราะห์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 พบว่ามีส่วน receptor binding site ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน QSG (Glutamine-Serine-Glycine) ซึ่งทำให้เชื้อไวรัสไข้หวัดนก สามารถจับกับ Sialic acid receptor ที่มีอนุพันธ์ของน้ำตาลกาแลกโทสแบบ  $\alpha$  2, 3 (SA $\alpha$ 2,3Gal) ได้ดีกว่า Sialic acid receptor ที่มีอนุพันธ์ของน้ำตาลกาแลกโทสแบบ  $\alpha$ 2, 6 (SA $\alpha$ 2,6Gal) ดังนั้นเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจึงติดต่อกันได้ค่อนข้างยากเนื่องจากเซลล์บริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนบนของคนจะมี receptor แบบ SA $\alpha$ 2,6Gal เป็นส่วนใหญ่ และเซลล์ในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างของคนจะมี receptor แบบ SA $\alpha$ 2,3Gal ดังนั้นคนที่ได้รับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในปริมาณมาก หรือมีการสัมผัสใกล้ชิดและสูดลมหายใจเข้าอย่างรุนแรงทำให้อนุภาคไวรัสเข้าไปสู่ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง จึงจะมีโอกาสติดเชื้อได้ แต่สำหรับในสัตว์ปีกจะมีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกได้ง่ายกว่า เนื่องจากเซลล์ในระบบทางเดินหายใจของสัตว์ปีกส่วนใหญ่มี receptor แบบ SA $\alpha$ 2,3Gal

จากการศึกษาวิเคราะห์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H1N1 พบว่ามีส่วน receptor binding site ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน QAG (Glutamine-Alanine-Glycine) ซึ่งจะมีความจำเพาะกับ Sialic acid receptor ที่พบในเซลล์ระบบทางเดินหายใจของสุกร สำหรับเชื้อไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลในมนุษย์ (Seasonal human flu) สายพันธุ์ H1N1 มีส่วน receptor binding site ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน QEG (Glutamine-Glutamic acid-Glycine) ซึ่งสามารถจับกับ Sialic acid receptor แบบ SA $\alpha$ 2,6Gal ที่พบในเซลล์ระบบทางเดินหายใจส่วนบนของคนได้ดี จึงทำให้มีการติดเชื้อในคนได้ง่าย จากการเปรียบเทียบบริเวณ receptor binding site บนโมเลกุล HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) ที่ระบาดในประเทศต่าง ๆ พบว่าทุก isolates มีส่วน receptor binding site ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน QEG (Glutamine-Glutamic acid-Glycine) ซึ่งเหมือนกับที่พบในเชื้อไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์ (Seasonal human flu) สายพันธุ์ H1N1 ดังนั้นจึงบ่งชี้ได้ว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) มี receptor binding site บนโมเลกุล HA (รูปที่ 29) ที่สามารถจับกับ Sialic acid receptor บนเซลล์ระบบทางเดินหายใจส่วนบนของคนได้ดี จึงทำให้ติดเชื้อในคนได้ง่าย

จากภาพที่ 29 พบว่าลำดับกรดอะมิโนในช่วงระหว่าง 226-228 ซึ่งเป็นบริเวณ binding site ของ HA ต่อการจับกับ sialic acid receptor ของเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อวิเคราะห์จากตัวอย่าง H1 ที่พบในสุนัขคือ A/canine/Thailand/3/2008, A/canine/Thailand/5/2008 และ A/canine/Thailand/16/2008 พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 226-228 คือ QEG ซึ่งเหมือนกับ receptor binding site ของ Seasonal human influenza virus (H1N1) ที่สามารถจับกับ Sialic acid receptor แบบ SA $\alpha$ 2,6Gal ที่

พบในเซลล์ระบบทางเดินหายใจส่วนบนของคนได้ดี ดังนั้นจึงบ่งชี้ว่าเชื้อไวรัส CIV สายพันธุ์ H1 ที่พบในสุนัขมีความสามารถในการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์มาสู่มนุษย์ได้

ส่วนตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ CIV สายพันธุ์ H3 คือ A/canine/Thailand/74/ 2009 มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 226-228 คือ QSG ซึ่งเหมือนกับ receptor binding site ของ canine influenza virus (H3N8), equine influenza virus (H3N8) และ avian influenza A virus (H5N1) (ภาพที่ 29) ดังนั้นจึงบ่งชี้ว่าเชื้อไวรัส CIV สายพันธุ์ H3 ที่พบในสุนัขมีความสามารถในการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์มาสู่มนุษย์ได้ค่อนข้างยาก

### 9) ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในส่วน Cleavage site ของ HA

จากการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก พบว่าสามารถแบ่งตามความรุนแรงของการก่อโรคได้เป็น 2 ชนิดคือ ชนิดก่อโรคไม่รุนแรง (Low pathogenic avian influenza, LPAI) และชนิดก่อโรครุนแรง (High pathogenic avian influenza, HPAI) ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกันในส่วนของ Cleavage site บนโมเลกุลของ HA ซึ่งโดยทั่วไปแล้วโปรตีน HA ตั้งต้น (HA<sub>0</sub>) บนเปลือกผิวชั้นนอกของอนุภาคไวรัส ชนิดก่อโรคไม่รุนแรง (LPAI) จะถูกตัดโดยเอนไซม์ Tissue specific trypsin-like protease ซึ่งพบบริเวณระบบทางเดินหายใจ ดังนั้นจึงมีการติดเชื้อแบบไม่รุนแรงและมีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสบริเวณระบบทางเดินหายใจเท่านั้น (Mild localized infection) แต่ถ้าหากเป็นเชื้อไวรัสชนิดที่ก่อโรครุนแรง (HPAI) จะมี polybasic amino acid insertion (RRRKK) ที่บริเวณ cleavage site ของโปรตีน HA ตั้งต้น ซึ่งส่งผลให้โปรตีน HA ตั้งต้นนี้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin (Ubiquitous proteases) ซึ่งจะพบได้ในทุกอวัยวะของร่างกาย เป็นเหตุให้มีการติดเชื้อแบบรุนแรงและมีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไปทั่วทุกอวัยวะของร่างกาย (Systemic infection) จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในส่วนบริเวณ Cleavage site ของโปรตีน HA พบว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล และเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) ไม่มีลักษณะของ Polybasic amino acid insertion ที่บริเวณ cleavage site ดังกล่าว จึงบ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล รวมทั้งเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) เป็นเชื้อไวรัสชนิดก่อโรคไม่รุนแรง และจะมีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในบริเวณระบบทางเดินหายใจเท่านั้น

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในส่วนบริเวณ Cleavage site ของโปรตีน HA พบว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดสุนัขทั้ง H1 และ H3 ที่พบในประเทศไทย ไม่มีลักษณะของ polybasic amino acid insertion ที่บริเวณ cleavage site ดังกล่าวเช่นกัน จึงบ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดสุนัข เป็นเชื้อไวรัสชนิดก่อโรคไม่รุนแรง และจะมีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในบริเวณระบบทางเดินหายใจเท่านั้น

## บทที่ 5

### สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาระบาดของไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจของสุนัข ได้แก่ canine influenza virus (CIV), canine adenovirus (CAV), canine distemper virus (CDV) and canine parainfluenzavirus (CPIV) จากตัวอย่างที่เป็น nasal swab ของสุนัขปกติจำนวน 102 ตัวอย่าง และสุนัขที่มีอาการของโรคระบบทางเดินหายใจจำนวน 109 ตัวอย่าง วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบไวรัสในระบบทางเดินหายใจที่มีความไวและความจำเพาะคือ nested PCR นอกจากนี้ใช้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันผลของ nested PCR พบว่าผลของการทำ nested PCR นั้นแสดงว่า primer ที่ออกแบบมาสำหรับงานวิจัยนี้มีความจำเพาะในการเพิ่มจำนวนยีนของไวรัสแต่ละชนิด และไม่มี non-specific amplification นอกเหนือจาก PCR band ที่คาดไว้ นอกจากนี้ลักษณะของ Band PCR product ที่ได้จากการทำ electrophoresis นั้นมีความชัดเจน และทำให้สามารถนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นทำได้โดยตรง ไม่ต้องทำ DNA cloning นอกเหนือจากนั้น primer ที่ออกแบบสำหรับการเพิ่มจำนวนยีนของ เชื้อไวรัสแต่ละชนิด ยังสามารถใช้สภาวะ (สารเคมีต่าง ๆ และ อุณหภูมิ) ของระบบในการทำ PCR ร่วมกันได้ กล่าวคือสามารถทำ PCR พร้อมกันในเครื่องเดียวกันได้ ดังนั้น primer และระบบในการทำ nested PCR ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้สามารถเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจในสุนัขต่อไปได้

หลังจากที่ตรวจสอบพบเชื้อไวรัส CIV ในตัวอย่างต่าง ๆ ด้วยวิธี nested PCR แล้วผู้ทำการทดลองได้ทำการตรวจสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลด้วยเทคนิคอื่น ๆ ได้แก่ Virus isolation และ real-time PCR ซึ่งการเพิ่มจำนวนไวรัส (Virus isolation) ด้วย MDCK cell culture แล้วตรวจสอบปริมาณไวรัสที่เพิ่มขึ้นโดย Hemagglutination test และ immunostaining test นั้นเป็นการพิสูจน์ว่าตัวอย่าง Nasal swab ที่เก็บได้จากสุนัขนั้นมีเชื้อเป็น (live virus) อยู่หรือไม่ และถ้าหากยังมีเชื้อเป็นอยู่แล้วมีการเพิ่มจำนวนขึ้นก็จะสามารถตรวจสอบและวัดปริมาณได้ด้วยวิธี Hemagglutination test หรือ immunostaining test ส่วนการทำ real-time PCR เป็นการตรวจสอบเพื่อวัดปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่มีอยู่ในตัวอย่าง nasal swab ของสุนัขว่ามีปริมาณสารพันธุกรรมอยู่เท่าไร จากผลการนำ nasal swabs จากตัวอย่างที่ตรวจพบ CIV ด้วยวิธี nested PCR มาทำการแยกและเพิ่มจำนวนไวรัสด้วย MDCK cell culture พบว่าไม่เกิด Cytopathic effect (CPE) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ และเมื่อนำ supernatant จากการทำให้ cell culture มาทดสอบ Hemagglutination test (HA test) เพื่อตรวจสอบว่าการทำ cell culture ด้วย MDCK cell แล้วนั้น มีไวรัสที่มี hemagglutinin เป็นองค์ประกอบบนอนุภาคไวรัสเพิ่มขึ้นหรือไม่ จากผลการทดลอง HA test พบว่าทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบนั้น ไม่เกิดการ agglutinate ของเม็ดผลเลือดแดงเลย ดังนั้นจึงสรุปว่าไม่มีเชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนหลังจากการทำ virus isolation

ผลจากการทำ immunostaining test โดยใช้ primary monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ NP protein ของเชื้อ influenza A virus เพื่อตรวจสอบหาเชื้อ CIV ที่ติดเชื้อมีอยู่ใน MDCK cell พบว่าไม่มีการติดเชื้อของ CIV จากตัวอย่าง nasal swabs ใน MDCK cell ดังนั้นจากผลการทดลองพบแต่สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสแต่ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อหรือเพิ่มจำนวนไวรัสได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก nasal swabs ที่เก็บไว้นั้นไม่มีไวรัสที่มีชีวิต (lived virus) เหลืออยู่เนื่องจากเก็บตัวอย่างไว้ที่  $-70^{\circ}\text{C}$  แล้วนำตัวอย่างเข้าและออกจากตู้บ่ม (multiple freeze-thaw) ส่งผลให้เชื้อไวรัสในตัวอย่างที่เก็บในสารละลายนั้นถูกเกล็ดน้ำแข็งแทงเข้าไปในอนุภาคไวรัส ส่งผลให้ไวรัสตาย จึงไม่สามารถติดเชื้อเข้าสู่เซลล์และไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ หรือเป็นเพราะในการเก็บตัวอย่างจากสุนัขนั้นไวรัสอาจมีปริมาณน้อยเนื่องจาก influenza A virus จะมีปริมาณมากในช่วง 3 วันแรกหลังจากที่ไวรัสเข้าสู่เข้าบ้าน จึงอาจส่งผลให้ตัวอย่างที่เก็บมานั้นมีปริมาณไวรัสเล็กน้อยเกินกว่าที่จะตรวจสอบด้วยวิธีดังกล่าว แต่ยังคงมีสารพันธุกรรมของไวรัสอยู่ในสารละลายตัวอย่าง ดังนั้นจึงสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค nested PCR และ real-time PCR

จากผลการทำ real-time PCR เพื่อหาปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัส (viral load) ที่มีในตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ตรวจพบ CIV นั้น จะมีค่า Ct เฉลี่ยประมาณ 35.61 ซึ่งเมื่อนำค่า Ct ของตัวอย่างเทียบกับ standard curve ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ct และ ความเข้มข้นของสารพันธุกรรมของเชื้อ influenza A virus พบว่ามีค่าประมาณ 10 copies/ $\mu\text{L}$  เท่านั้น ซึ่งถือว่ามีปริมาณน้อยมากจนอาจทำให้การตรวจสอบด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น virus isolation, Hemagglutination test และ immunostaining test แล้วได้ผลเป็นลบด้วย

ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสก่อโรกระบบทางเดินหายใจชนิดต่าง ๆ พบว่าไม่มีการติดเชื้อของ CAV ในสุนัขปกติ ในขณะที่พบการติดเชื้อ CAV ในสุนัขที่มีอาการของโรกระบบทางเดินหายใจประมาณ 9.17% โดยเชื้อ CAV ที่พบในประเทศไทยนั้นมีความชุกมากกว่าที่พบในประเทศญี่ปุ่น (37) ซึ่งมีค่าประมาณ 2.9% แสดงว่าสุนัขในประเทศไทยนั้นมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ CAV มากกว่าที่ญี่ปุ่น อาจเนื่องจากตัวอย่างที่เก็บมาจากสุนัขนั้น ระบาดวิทยาของเชื้อ CDV ในประเทศไทย พบว่า 2.94% ของสุนัขปกติและ 1.83% ของสุนัขที่มีอาการของโรกระบบทางเดินหายใจมีการติดเชื้อ CDV และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระบาดวิทยาของ CDV กับรายงานก่อนหน้านี้ พบว่า 1.5% ของสุนัขที่มีอาการของโรกระบบทางเดินหายใจที่ญี่ปุ่นซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน (37) ส่วนระบาดวิทยาของ CPIV พบว่า 0.98% ของสุนัขปกติและ 11.93% ของสุนัขที่มีอาการของโรกระบบทางเดินหายใจในประเทศไทยมีการติดเชื้อ CPIV จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าระบาดวิทยาของ CPIV มีค่าประมาณ 7.4% ของสุนัขที่มีอาการของโรกระบบทางเดินหายใจในประเทศญี่ปุ่น (37) และ 19.09% ในสหรัฐอเมริกา (38) โดยจากรายงานของทั้งสองประเทศกล่าวว่า CPIV นั้นมีการระบาดสูงที่สุดเมื่อเทียบกับไวรัสในระบบทางเดินหายใจอื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดโรคในสุนัข ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้เช่นกัน



งานวิจัยนี้ยังรายงานถึงระบาดวิทยาของ CIV ซึ่งพบประมาณ 2.94% ในสุนัขปกติ โดยเป็นสุนัขที่ติดเชื้อ CIV แต่ไม่แสดงอาการของโรคออกมา จึงกลายเป็นพาหะ (carrier) นำเชื้อ CIV ไปติดยังสุนัขตัวอื่นๆได้ นอกจากนี้ยังพบ CIV ประมาณ 2.75% ของสุนัขที่มีอาการของโรคระบบทางเดินหายใจ ซึ่งมีลักษณะอาการดังนี้ มีน้ำมูกแบบ mucous nasal discharge, จาม, ไอ หรือมีการอักเสบของระบบทางเดินหายใจ ซึ่งลักษณะอาการของสุนัขที่ติดเชื้อ CIV ในประเทศไทยนั้นรุนแรงน้อยกว่าที่พบในรัฐ Florida ประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศเกาหลีใต้ (1,2,3)

จากผลการตรวจสอบ CIV ด้วยวิธี nested PCR และ real-time PCR โดยใช้ primers และ probe ที่จำเพาะกับ M gene พบว่ามีจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 9 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก จากนั้นจึงนำตัวอย่างดังกล่าวมาตรวจสอบหาสายพันธุ์ (subtypes) ด้วยวิธี nested-PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ subtype H1, H3 และ H5 แล้วทำการยืนยันผลโดยทำ nucleotide sequencing, BLAST analysis และ phylogenetic analysis โดยพบว่ามี 3 ตัวอย่างจากสุนัขปกติและ 2 ตัวอย่างจากสุนัขป่วยที่ให้ผลลบทั้ง H1, H3 และ H5 subtypes จึงจำแนกเป็น unclassified subtype ซึ่งอาจต้องทำการศึกษาในเชิงลึกเพื่อจำแนกสายพันธุ์ต่อไป

ในสุนัขป่วยพบว่า มี 3 ตัวอย่างถูกจำแนกเป็น H1 subtype เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ nucleotide sequencing มาวิเคราะห์ด้วยวิธี BLAST analysis เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank database พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ A/Thailand/395/2006 (H1N1) ถึง 100% ของค่า Query coverage และ 99% ของค่า Max identity จากผลการจำแนกใช้หัดสุนัขในประเทศไทย ด้วยวิธี phylogenetic analysis ของยีน HA พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ seasonal human influenza virus (H1N1) และค่า % sequence identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน มีค่าเท่ากับ 98.1% และ 97.18% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ seasonal human influenza virus (H1N1) นอกจากนี้เมื่อพิจารณา ลำดับกรดอะมิโนในส่วน receptor binding site (ตำแหน่ง 226-228) และที่ตำแหน่ง cleavage site ของ HA ใน CIV subtype H1 พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างนี้มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนในส่วนของ receptor binding site เป็นแบบ QEG (Glutamine-Glutamic acid-Glycine) ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับที่พบในเชื้อไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลในมนุษย์ (Seasonal human flu) สายพันธุ์ H1N1 ที่มีส่วน receptor binding site ซึ่งสามารถจับกับ Sialic acid receptor แบบ SA $\alpha$ 2,6Gal ที่พบในเซลล์ระบบทางเดินหายใจส่วนบนของคนได้ดี จึงทำให้มีการติดเชื้อในคนได้ง่าย สำหรับตำแหน่ง cleavage site นั้น ไม่มีลักษณะของ Polybasic amino acid insertion ที่บริเวณ ดังกล่าวซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดที่ก่อโรคไม่รุนแรง ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อไวรัส CIV สายพันธุ์ H1 ที่พบในประเทศไทยนี้ น่าจะเกิดจากการที่มนุษย์นำเชื้อไวรัสข้ามติดมายังสุนัข นอกจากนี้ยังมีโอกาสติดเชื้อข้ามสายพันธุ์จากสุนัขไปติดยังมนุษย์ได้ แต่อาจก่อโรคไม่รุนแรง และจะมีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในบริเวณระบบทางเดินหายใจเท่านั้น

นอกจากนี้พบ 1 ตัวอย่างจากสุนัขป่วยซึ่งถูกจำแนกเป็น CIV สายพันธุ์ H3 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยวิธี BLAST analysis เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank database พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ A/Canine/Florida/2003 (H3N8) ถึง 99% ของค่า Query coverage และ 99% ของค่า Max identity จากผลการจำแนกไข้หวัดสุนัขในประเทศไทยด้วยวิธี phylogenetic analysis ของยีน HA พบว่า A/canine/Thailand/74/2009 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคล้ายคลึงกับ canine influenza virus (H3N8) และเมื่อพิจารณาค่า % sequence identity matrix สำหรับลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ CIV subtype H3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.82% และ 97.75% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ canine influenza virus (H3N8) ซึ่งพบการระบาดครั้งแรกที่รัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปีพ.ศ. 2548 เนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้าสุนัขจากประเทศสหรัฐอเมริกาเข้ามา จึงบ่งชี้ได้ว่าสุนัขที่นำเข้ามาในครั้งนั้นอาจมีการติดเชื้อและเป็นพาหะนำเชื้อ CIV ชนิดนี้เข้ามาในประเทศไทย และทำให้สุนัขในประเทศไทยติดเชื้อ canine influenza virus (H3N8) ได้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนในส่วน receptor binding site (ตำแหน่ง 226-228) และที่ตำแหน่ง cleavage site ของ HA ใน CIV subtype H3 พบว่าตัวอย่างนี้มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนในส่วนของ receptor binding site เป็นแบบ QSG (Glutamine-Serine-Glycine) ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับที่พบใน canine influenza virus (H3N8) และ equine influenza virus (H3N8) ที่มีส่วน receptor binding site เป็น QSG ซึ่งไม่สามารถจับกับ Sialic acid receptor แบบ SA $\alpha$ 2,6Gal ที่พบในเซลล์ระบบทางเดินหายใจส่วนบนของคนได้ จึงทำให้มีการติดเชื้อในคนได้ยาก สำหรับตำแหน่ง cleavage site นั้น ไม่มีลักษณะของ Polybasic amino acid insertion ที่บริเวณดังกล่าวซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดที่ก่อโรคไม่รุนแรง ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อไวรัส CIV สายพันธุ์ H3 ที่พบในประเทศไทยนี้ เป็นเชื้อไวรัสก่อโรคไม่รุนแรง โดยจะมีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในบริเวณระบบทางเดินหายใจเท่านั้น และมีโอกาสติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ไปติดยังมนุษย์ได้น้อยมาก

โดยสรุป ผลจากงานวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจในสุนัข ได้แก่ canine influenza virus (CIV), canine adenovirus (CAV), canine distemper virus (CDV) and canine parainfluenzavirus (CPIV) โดยอาศัยการตรวจด้วยวิธี nested PCR และยืนยันผลโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งการศึกษาระบาดวิทยาของไวรัสในระบบทางเดินหายใจในสุนัขมีประโยชน์ต่อการวางแผนรับมือ และการวางมาตรการเพื่อป้องกันหรือควบคุมการระบาดของไวรัสในอนาคต นอกจากนี้การแยกสายพันธุ์ของไข้หวัดสุนัขในประเทศไทยพบว่าประกอบด้วยสายพันธุ์ H1 และ H3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคนิดไม่รุนแรง อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ H1 นี้ น่าจะเกิดจากที่มนุษย์นำเชื้อไวรัสข้ามติดมายังสุนัข และอาจมีแนวโน้มในการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์มาสู่มนุษย์ได้เช่นกัน ดังนั้นผู้เลี้ยงสุนัขจึงควรมีความตระหนักและระวังการสัมผัสอย่างใกล้ชิดกับสุนัขเพื่อหลีกเลี่ยงการติดเชื้อมาสู่มนุษย์

## รายการอ้างอิง

- [1] Crawford, P. C., et al. Transmission of equine influenza virus to dogs. Science 310 (2005): 482-5.
- [2] Payungporn, S., Crawford, P. C., Kouo, T.S., Chen, L., Pompey, J., et al. Influenza A Virus (H3N8) in Dogs with Respiratory Disease, Florida. Emerg Infect Dis 14 (2008): 902-8.
- [3] Song, D., Kang, B., Lee, C., et al. Transmission of Avian Influenza Virus (H3N2) to Dogs. Emerg Infect Dis 14 (2008): 741-6.
- [4] Robert, A. L. and Robert M. K. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: David M. K., Peter M. H., et al. (eds.), Fields virology, pp. 1487-90. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
- [5] Compans, R. W. and Choppin, P. W. Reproduction of myxoviruses. In: Fraenkel-Contrat, H., Wagner, R. R. (eds.), Comprehensive virology, pp. 179-252. New York: Plenum Press, 1975.
- [6] Influenza Viruses. How Influenza Viruses Change: Drift and Shift (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses.htm>). Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2005.
- [7] Mochalova, L., Gambaryan, A., Romanova, J., Tuzikov, A., Chinarev, A., et al. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. Virology 313 (2003): 473-80.
- [8] Stegmann, T., Morselt, H. W., Scholma, J., Wilschut, J. Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. Biochim Biophys Acta 904 (1987): 165-70.
- [9] Chizhnikov, I. V., Geraghty, F. M., Ogden, D. C., Hayhurst, A., Antoniou, M., Hay, A. J. Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expressed in mouse erythroleukaemia cells. J Physiol 494 (1996): 329-36.
- [10] Fodor, E. and Smith, M. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. J Virol 78 (2004): 9144-53.
- [11] Shapiro, G.I., Gurney, T. JR., Krug, R. M. Influenza Virus Gene Expression: Control Mechanisms at Early and Late Times of Infection and Nuclear-Cytoplasmic Transport of Virus-Specific RNAs. J Virol 61 (1987): 764-73.

- [12] Nayak, D.P., Hui, E.K., Barman, S. Assembly and budding of influenza virus. Virus Res 106 (2004):147-65.
- [13] Roberts, P.C., Lamb, R.A., Compans, R.W. The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. Virology 240 (1998): 127-37.
- [14] Palese, P., Compans, R.W. Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. J Gen Virol 33 (1976): 159-63.
- [15] Lamb, R. A. Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes. Virology 194 (1993): 828-32.
- [16] Binn, L. N., Alford, J. P., Marchwicki, R. H., Keefe, T. J., Beattie, R. J., Wall, H. G. Studies of respiratory disease in random-source laboratory dogs: viral infections in unconditioned dogs. Lab Anim Sci 29 (1979): 48–52.
- [17] Plemper, R. K., Lakdawala, A. S., Gernert, K. M., Snyder, J. P., Compans, R. W. Structural features of paramyxovirus F protein required for fusion initiation. Biochemistry 42 (2003): 6645-55.
- [18] Ali, A., Nayak, D. P. Assembly of Sendai virus: M protein interacts with F and HN proteins and with the cytoplasmic tail and transmembrane domain of F protein. Virology 276 (2000): 289-303.
- [19] Huberman, K., Peluso, R., Moscona, A. The hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza virus type 3: role of the neuraminidase in the viral life cycle. Virology 214 (1995): 294-300.
- [20] Porotto, M., Greengard, O., Poltoratskaia, N., Horga, M. A., Moscona, A. Human parainfluenza virus type 3 HN-receptor interaction: the effect of 4-GU-DANA on a neuraminidase-deficient variant. Virology 76 (2001): 7481-8.
- [21] Appel, M., Binn, L. N., Canine infectious tracheobronchitis. In short review: kennel cough. In: Appel, M. J. (Ed.), Virus infections of carnivores, pp. 201–211. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987.
- [22] Binn, L.N., Lazar, E.C., Rogul, M., Shepler, V.M., Swango, L.J., Claypoole T., et al. Upper Respiratory Disease in Military Dogs: Bacterial, Mycoplasma and Viral Studies. Amer J Vet Resear 29 (1968): 1809-15.
- [23] Appel, M. and Percy D.H. SV-5-like Parainfluenza Virus in Dogs. J Am Vet Med Assoc 156 (1970): 1778-81.

- [24] Appel, M. and Binn, L.N. Canine Parainfluenzavirus. In: Appel M (ed.), Virus infections of carnivores, pp. 125-32. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987.
- [25] Erles, K., Dubovi, E.J., Brooks, H.W., Brownlie, J. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. J Clin Microbiol 42 (2004): 4524–29.
- [26] Andrew, J. D., Ma' ria, B. and Bala' zs, H. Genetic content and evolution of adenoviruses. J Gen Viro 84 (2003): 2895–908.
- [27] Marusyk, R. G., Yamamoto, T. Characterization of canine adenoviruse hemagglutinin. Can J Microbiol 17 (1971): 151–5.
- [28] Richard, H. DNA virus replication strategies (<http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna1.htm>). Carolina: University of South Carolina School of Medicine, 2009.
- [29] Appel, M., Reovirus, In: Appel, M.J. (ed.), Virus infections of carnivores, pp. 95-6. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987.
- [30] Castleman, W.L. Bronchiolitis obliterans and pneumonia-induced in young dogs. Science 310 (2005): 482–5.
- [31] Curtis, R., Jemmet, J. E., Furminger, I. G. S. The pathogenicity of an attenuated strain of canine adenovirus type 2 (CAV-2). Vet Rec 103(1978): 380-1.
- [32] Koptopoulos, G., Cornwell, H. J. C. Canine adenoviruses: a review. Vet Bull 51 (1981): 135–42.
- [33] Appel, M., Canine adenovirus type 2(Infectious Laryngotracheitis Virus), In: Appel M.J. (ed.), Virus Infections of Carnivores, pp. 45–51. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987.
- [34] Ditchfield, J., MacPherson, L.W., Zbitnew, A. Association of a canine adenovirus (Toronto A26/61) with an outbreak of laryngotracheitis (kennel cough). Can Vet J 3 (1962): 238–47.
- [35] Appel, M. J. G., Canine distemper virus. In: Appel, M. J. G. (Ed.), Virus Infections of Carnivores. pp. 133–59. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987.
- [36] Williams, E. S. Canine distemper. In Williams E. S. and Barker I. K. (eds.), Infectious Diseases of Wild Mammals, pp. 50-63. Iowa: Iowa State University Press, 2001.
- [37] Mochizuki, M., Yachi, A., Ohshima, T., Ohuchi, A., Ishida, T. Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. J Vet Med Sci 70 (2008): 563-9
- [38] Erles, K., Dubovi, E. J., Brooks, H. W., Brownlie, J. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. J Clin Microbiol 42 (2004): 4524–9.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. การเตรียม Viral transport media

- 1) วัสดุสำหรับเก็บ nasal swabs และ 0.1% Phosphate Buffer Saline (PBS): เตรียมโดยละลาย PBS 10 เม็ด (Phosphate 10 mM/tablet) ในน้ำกลั่น 1,000 mL
- 2) แล้วนำไปผ่านการ autoclave
- 3) จากนั้นเติม Penicillin G (2x10<sup>6</sup> U/liter) และ Septomycin (200 mg/liter)
- 4) แล้วแบ่งใส่หลอดขนาด 15 mL หลอดละ 2 mL

#### 2. การเตรียมสารเคมีสำหรับสกัด RNA และ DNA

- 1) น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เตรียมโดยนำขวดน้ำบรรจุ น้ำกลั่นที่ต้องการใช้ไปผ่านการ autoclave
- 2) น้ำปราศจากเอ็นไซม์ RNase หรือ DEPC water เตรียมโดยเติม 0.1% DEPC ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปผ่านการ autoclave
- 3) Guanidine thiocyanate (GTC) : ชั่ง GTC 20 g เติมน้ำกลั่น 24.85 mL, เติม 0.75 M NaOAc 1.4 mL, 30% N-lauryl Sarcosine 0.71 mL และอุ่นที่ 65°C 1 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เก็บที่ 4°C
- 4) 2M Sodium Acetate (2M NaOAc): ชั่ง Sodium acetate 4.92 g เติมน้ำกลั่น 30 mL
- 5) Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) : Isoamyl Alcohol (IAA), 49:1 เตรียมโดยเปิด Isoamyl Alcohol 1 mL เติม Chloroform ให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 mL
- 6) 70% Ethanol : Absolute Ethanol 70 mL เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 mL

#### 3. วิธีการเตรียมสารเคมีในการทำ cloning

- 1) LB agar 100 mL : agar 1.5 g, yeast extract 0.5 g, peptone 1 g และ NaCl 0.5 g เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 mL แล้วนำไปผ่านการ autoclave จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลง เติม ampicilin 100 µg/mL แล้วเตรียมเทปริมาณ 35 mL ใส่ plate
- 2) LB broth 50 mL : yeast extract 0.25 g, peptone 0.5 g และ NaCl 0.25 g เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 mL แล้วนำไปผ่านการ autoclave
- 3) SOC medium 100 mL : yeast extract 0.5 g, peptone 2 g, NaCl 1 mL และ KCl 0.25 mK เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรเป็น 100 mL จากนั้นเติมกลูโคส 100 µL และ Mg<sup>2+</sup> ปริมาตร 100 µL

- 4) วัคซีนสำหรับทำ positive control ของเชื้อ canine distemper, parainfluenza และ canine adenovirus ผลิตจาก Intervet International B.V., Boxmeer, Holland

#### 4. วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับ cell culture และ Virus isolation

1. เตรียม media (1% MEM): 5x MEM 40 mL, DW 150 mL, 1% L-Glutamine 2 mL, FBS 10 mL, 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 6 mL และ Genta 260 µL เขย่าให้เข้ากัน
- 2) เตรียม infect media 200 mL: 5x MEM 40 mL, DW 150 mL, BSA 12 mL, 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 6 mL, Genta 260 µL และเพิ่ม 0.3% BSA MEM 194 µL, ABO 6 µL ต่อ 1 well, trysin 2 µL ต่อ media 5 mL

#### 5. การเตรียม 4% formalin ใน PBS-0.5% tween 20

โดย 1 plate ของ 96-well plate ใช้ PBS-0.5% tween 20 ปริมาตร 9.6 mL เติม 40% formalin ปริมาตร 0.4 mL

#### 6. การเตรียม 1% BSA ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ PBS-Tween 20 0.5% ปริมาตร 100 mL

โดย 1 plate ของ 96-well plate ใช้ PBS-0.5% tween 20 ปริมาตร 10 mL ใช้ BSA powder 0.1 g

#### 7. การเตรียม monoclonal anti- NP protein ใน PBS-0.5% tween 20 ที่มี 1% BSA

โดย 1 plate ของ 96-well plate ใช้ PBS-0.5% tween 20 ที่มี 1% BSA ปริมาตร 5 mL เติม monoclonal anti- NP protein ปริมาตร 0.05 mL

#### 8. การเตรียม conjugate mouse anti-IgG ใน PBS-0.5% tween 20 ที่มี 1% BSA

โดย 1 plate ของ 96-well plate ใช้ PBS-0.5% tween 20 ที่มี 1% BSA ปริมาตร 5 mL เตรียม conjugate mouse anti-IgG ปริมาตร 0.016 mL

#### 9. การเตรียม substrate AEC ใน acetate buffer

โดย 1 plate ของ 96-well plate ใช้ acetate buffer 4.75 mL เติม ACE ปริมาตร 0.25 mL และ 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ปริมาตร 5 µL



## ภาคผนวก ข

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

1. ผลงานวิจัยได้รับการตอบรับเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Asian Biomedicine ซึ่งเป็นวารสารระดับนานาชาติ ที่อยู่ในฐานข้อมูล ISI หัวข้อเรื่อง Prevalence of respiratory viruses isolated from dogs in Thailand during 2008-2009



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นวรัตน์ โพธิ์สุวรรณ เพศ หญิง

อายุ 24 ปี เกิด 26 สิงหาคม 2528

สถานที่เกิด โรงพยาบาลรามาริบัติ จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ 5/54 ถนนสามัคคี ตำบลบางตลาด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี 11120

### ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวិทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2550

ระดับปริญญาโท สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีทางการแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2552

### การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ

หัวข้อเรื่อง: Prevalence of respiratory viruses isolated from dogs in Thailand during 2008-2009.

ชื่อผู้พิมพ์: Nawarat Posuwan, Sunchai Payungporn, Aunyaratana Thontiravong, Pravina

Kitikoon, Alongkorn Amonsin and Yong Poovorawan

ตีพิมพ์ในวารสาร Asian Biomedicine ปี 2010 ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล ISI

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย