

การทำลายเชื้อไวรัสเอชไอวีอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 ที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทยด้วย
สารเคมีและวิธีทางกายภาพ



นางสาว สุวรักษ์ วรรณรัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2649-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE INACTIVATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE H5N1 ISOLATED FROM CHICKENS IN
THAILAND BY CHEMICAL AND PHYSICAL METHODS

Ms.SUWARAK WANNARATANA

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Avian Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

ISBN 974-14-2649-6

Copyright of Chulalongkorn University

490197

สุวรักษ์ วรรณรัตน์ : การทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 ที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทยด้วยสารเคมีและวิธีทางกายภาพ (THE INACTIVATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE H5N1 ISOLATED FROM CHICKENS IN THAILAND BY CHEMICAL AND PHYSICAL METHODS) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.น.สพ.ดร. สมศักดิ์ ภัคภิญโญ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศ.น.สพ.ดร. จิโรจ ศติปริยจันทร์ 59 หน้า. ISBN 974-14-2649-6.

การศึกษานี้ได้นำเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช 5 เอ็น 1 ที่แยกได้จากไก่ป่วยในเขตพื้นที่ระบาดในปีพ.ศ. 2547 เพื่อศึกษาหาวิธีการทำลายเชื้อไวรัสที่เหมาะสม โดยใช้เชื้อไวรัสที่ระดับความรุนแรง 10^9 50% embryonated lethal dose ต่อมิลลิลิตร (10^9 ELD₅₀/ml) มาทดสอบดูความทนทานของเชื้อไวรัสต่อน้ำยาฆ่าเชื้อ 4 ชนิด คือ น้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) น้ำยาฆ่าเชื้อฟีนอล (phenol) น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มควอเทอนารีแอมโมเนียม (quaternary ammonium compounds) ความเข้มข้นตามคำแนะนำของบริษัท และน้ำยาฆ่าเชื้อฟอร์มาลิน (formalin) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 5 7 และ 14 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทดสอบความทนทานของเชื้อไวรัสในสภาวะที่แตกต่างกันคือ ที่อุณหภูมิ 55 60 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 15 30 45 และ 60 นาทีตามลำดับ ที่สภาพความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 3 ถึง 12 ระยะเวลา 5 และ 10 นาที โดยนำเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาที่ผ่านการทำลายเชื้อไวรัสแล้วมาฉีดลงในไขไก่ฟักที่อายุ 11 วัน จำนวนอย่างละ 6 ฟอง และทำการสังเกตการรอดชีวิตและเสียชีวิตของไขไก่ฟักเป็นระยะเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการทดลองครั้งนี้คือน้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์และอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ในการทดลองครั้งนี้คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที หรืออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัสมีความทนทานต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 3 ถึง 12 ระยะเวลา 5 และ 10 นาที

ภาควิชา อายุรศาสตร์
สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตว์ปีก
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....*Sh. Wahn*.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*สมศักดิ์*.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*จิโรจ*.....

4775580831 : MAJOR AVIAN MEDICINE

KEY WORD: AVIAN INFLUENZA / INACTIVATION / DISINFECTANTS/ TEMPERATURE/ pH

SUWARAK WANNARATANA: THE INACTIVATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE H5N1 ISOLATED FROM CHICKENS IN THAILAND BY CHEMICAL AND PHYSICAL METHODS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SOMSAK PAKPINYO, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : PROF. JIROJ SASIPREEYAJAN, Ph.D., 59 pp. ISBN 974-14-2649-6.

This study was to determine the stability of 10^9 50% embryonated lethal dose per milliliter (ELD_{50}/ml) of isolated H5N1 avian influenza virus (AIV) from epidemic areas in Thailand in 2004 on various conditions including disinfectants (glutaraldehyde, phenol, benzalkonium chloride and formalin), temperature ($55^{\circ}C$, $60^{\circ}C$, $65^{\circ}C$, $70^{\circ}C$ and $75^{\circ}C$ for 10, 15, 30, 45 and 60 minutes) and pH (3, 5, 7, 9 and 12 for 5 and 10 min). The disinfectants were diluted according to the manufacturer's recommendations except formalin was diluted at 1% concentration. The diluted disinfectants were stored at $25^{\circ}C$ and $37^{\circ}C$ for 0, 5, 7 and 14 days. The treated H5N1 AIV was inoculated into six 11-day-old embryonated chicken eggs, which were observed for 7 days after inoculation. The results revealed that the H5N1 AIV (10^9 ELD_{50}/ml) was effectively inactivated by glutaraldehyde and by temperature at $60^{\circ}C$ for 60 minutes or higher than $60^{\circ}C$. All pH range could not inactivate the H5N1 AIV.

Department : Veterinary Medicine
Field of Study Avian Medicine
Academic Year 2006

Student's Signature :

Advisor's Signature :

Co-advisor's Signature :

Suwarak Wannaratana
Somsak Pakpinyo
Jiroj Sasipreeyajan

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือของ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ ศศ.น.สพ.ดร.สมศักดิ์ ภัคภิัญญู และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ศ.น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร. คณิตศักดิ์ อรวีระกุล ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ในการทำงานทางห้องปฏิบัติการ รวมทั้งคำปรึกษาแนะนำ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์ ประจำปีภาคต้น ปีการศึกษา 2548 ของบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้เงินทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีการเงิน 2548 ที่ให้เงินอุดหนุนบางส่วนในการทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนการวิจัยในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบคุณ หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รศ. น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช หัวหน้าหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ น.สพ.รชฎ ตันติเลิศเจริญ และบุคลากรอื่น ๆ ในหน่วยฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

ขอขอบคุณหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือด้านห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และสารเคมี คุณสมิตรา วัฒนโศธร ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือด้านการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ สพ.ญ. อัญญรัตน์ ต้นธีรวงศ์ ที่ให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งตลอดการศึกษา

ท้ายที่สุดนี้ใคร่ขอขอบคุณ ญาติพี่น้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบิดา มารดา และพี่ชายที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
เชื้อไวรัส.....	5
การจำแนกและคุณสมบัติของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา.....	5
แอนติเจนของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา.....	7
โปรตีนฮีแมกกลูตินิน.....	7
โปรตีนนิวรามิनिเดส.....	9
การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส.....	10
การเปลี่ยนแปลงของแอนติเจน.....	12
แอนติเจนคชิพท์.....	12
แอนติเจนครีฟท์.....	12
แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา.....	12
พยาธิกำเนิด.....	14
ลักษณะอาการทางคลินิก.....	14
คุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อไวรัส.....	14
การทำให้ปลอดเชื้อ.....	15
วิธีทางกายภาพ.....	15
การทำลายเชื้อโดยใช้ความร้อน.....	15

	๗
	หน้า
ความร้อนขึ้น.....	15
ความร้อนแห้ง.....	16
การกรอง.....	16
การใช้รังสี.....	16
วิธีทางเคมี.....	17
การออกฤทธิ์ต่อโปรตีนภายในเซลล์.....	17
การออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์.....	17
การออกฤทธิ์ต่อส่วนประกอบอื่น ๆ ของเซลล์.....	17
กลุ่มพีนอลและอนุพันธ์ของพีนอล.....	19
กลุ่มฮาโลเจน.....	19
ไอโอดีน.....	19
สารประกอบโลหะหนัก.....	20
กลุ่มสารลดแรงตึงผิว.....	20
อัลดีไฮด์.....	21
แอลกอฮอล์.....	22
กลุ่มสารออกซิไดซิง.....	22
ก๊าซ.....	23
กรดและด่าง.....	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
รูปแบบการวิจัย.....	24
แผนการวิจัย.....	24
การทดลองที่ 1. การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1.....	25
การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา.....	25
การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา.....	25
การตรวจพิสูจน์ยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่เตรียม.....	26
การตรวจหาเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาด้วย	
วิธีการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง.....	26
การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	27
การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	28

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	28
ฉบับที่กผลการทดลอง และรายงานผลการทดลอง.....	29
การทดลองที่ 2. การทดสอบความคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา	
สายพันธุ์ H5N1.....	29
การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ	
37 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการผสมน้ำยาฆ่าเชื้อแล้วเป็น	
เวลา 0, 5, 7 และ 14 วันต่อการทำลายเชื้อไวรัส.....	29
การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่ออุณหภูมิต่าง ๆ.....	30
การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ.....	31
ฉบับที่กผลการทดลองวิเคราะห์และรายงานผลการทดลอง.....	31
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	32
ผลการทดลองที่ 1 การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1.....	32
การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา.....	32
การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา.....	31
การตรวจพิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสที่เตรียม.....	33
ผลการทดลองที่ 2.การทดสอบความคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา	
สายพันธุ์ H5N1.....	37
การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อในการทำลายเชื้อไวรัส	
และระยะเวลาการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อภายหลังผสม.....	37
การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่ออุณหภูมิต่าง ๆ.....	41
การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ.....	42
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	44
รายการอ้างอิง.....	51
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	59

ตารางที่ 2.1 แสดงผลของสภาวะความเป็นกรด-ด่างต่อประสิทธิภาพของไอโอดีน.....	20
ตารางที่ 4.1 แสดงผลการฉีดไขไก่ฟักที่อายุ 11 วัน โดยฉีดที่ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-10}	33
ตารางที่ 4.2 แสดงผลวิธีการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง.....	34
ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่าง (pairwise distance) ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ในยีน H5 ของเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาที่เตรียมขึ้น.....	35
ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่าง (pairwise distance) ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ในยีน N1 ของเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาที่เตรียมขึ้น.....	36
ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนของไขไก่ฟักที่เสียชีวิต ภายหลังจากการฉีดเชื้อไวรัส เอเวียนอินฟลูเอนซาที่ผสมด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการเก็บน้ำยาฆ่าเชื้อที่ผสมแล้วเป็น ระยะเวลา 0 5 7 และ 14 วัน.....	38
ตารางที่ 4.6 แสดงผลการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงของไขไก่ฟักที่เสียชีวิต ในตารางที่ 4.5.....	38
ตารางที่ 4.7 แสดงจำนวนไขไก่ฟักที่เสียชีวิต เนื่องจากการฉีดไขไก่ฟักครั้งที่ 2 โดยใช้น้ำไขไก่ฟักจากไขไก่ฟักที่รอดชีวิตในการฉีดไขไก่ฟักจากตารางที่ 4.5.....	39
ตารางที่ 4.8 แสดงผลการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงของไขไก่ฟักที่เสียชีวิต ในตารางที่ 4.7.....	39
ตารางที่ 4.9 แสดงจำนวนไขไก่ฟักที่เสียชีวิต เนื่องจากการฉีดไขไก่ฟักครั้งที่ 2 โดยใช้น้ำไขไก่ฟักจากไขไก่ฟักที่เสียชีวิตในการฉีดไขไก่ฟักจากตารางที่ 4.5.....	40
ตารางที่ 4.10 แสดงผลการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงของไขไก่ฟักที่เสียชีวิต ในตารางที่ 4.9.....	40
ตารางที่ 4.11 แสดงจำนวนของไขไก่ฟักที่เสียชีวิต ภายหลังจากการฉีดเชื้อไวรัส เอเวียนอินฟลูเอนซา ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55 60 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาสั้น 10 15 30 45 และ 60 นาที และผลการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงของไขไก่ฟักที่เสียชีวิต....	41

- ตารางที่ 4.12 แสดงผลการฉีดไขไก่ฟักครั้งที่ 2 โดยใช้น้ำไขไก่ฟัก
จากไขไก่ฟักที่เสียชีวิตและรอดชีวิตจากการฉีดไขไก่ฟักครั้งแรก
ภายหลังจากการทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา โดยใช้อุณหภูมิ
55 60 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 15 30 45 และ 60 นาที และผลการทดสอบการจับกลุ่มตกตะกอน
ของเม็ดเลือดแดงของไขไก่ฟักที่เสียชีวิตจากการฉีดไขไก่ฟักในครั้งที่ 242
- ตารางที่ 4.13 แสดงจำนวนของไขไก่ฟักที่เสียชีวิต ภายหลังจากการฉีดเชื้อไวรัส
เอเวียนอินฟลูเอนซาที่ pH 3 5 7 9 และ 12 เป็นระยะเวลา 5
และ 10 นาทีและผลการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดงของ
ไขไก่ฟักที่เสียชีวิต.....43
- ตารางที่ 4.14 แสดงผลการฉีดไขไก่ฟักครั้งที่โดยใช้น้ำไขไก่ฟักจากไขไก่ฟักที่เสียชีวิต
จากการฉีดไขไก่ฟักครั้งแรกภายหลังจากการทำลายเชื้อไวรัสเอเวียน
อินฟลูเอนซาที่ pH 3 5 7 9 และ 12 เป็นระยะเวลา 5 และ 10 นาที
และผลการทดสอบการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงของไขไก่ฟัก
ที่เสียชีวิตจากการฉีดไขไก่ฟักครั้งที่ 2.....43

	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะโครงสร้างของเอเวียนอินฟลูเอนซา เอ ไวรัส	6
รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของ haemagglutinin polypeptide	8
รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะรูปร่างของ โปรตีน HA และ NA.....	9
รูปที่ 2.4 แสดงแบบจำลองการเพิ่มจำนวนของเชื้อ influenza A virus.....	11
รูปที่ 2.5 แสดงถึงสิ่งมีชีวิตที่สามารถติดเชื้อ influenza A virus.....	13
รูปที่ 2.6 แสดงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ.....	18
รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะโครงสร้างของฟีนอล.....	19
รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะตัวอย่างโครงสร้างของน้ำยาฆ่าเชื้อ ในกลุ่มสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์.....	21
รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะโครงสร้างของกลูตาไรลดีไฮด์.....	22
รูปที่ 4.1 แสดงผลิตภัณฑ์ของยีน hemagglutinin และ neuraminidase ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 ด้วยวิธี multiplex RT-PCR ซึ่งผลผลิตของ PCR ของ HA มีขนาด 351 bp และผลผลิต ของ PCR ของ NA มีขนาด 106 bp; M: Marker ขนาด 100 bp N: Negative control P: Positive control (A/chicken/Nakhon Pathom/Thailand/CU-K2/04(H5N1)) และ S: ตัวอย่างเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษา (A/chicken/Chonburi/Thailand/CU-7/04(H5N1)).....	37