


การพัฒนาชุดตรวจ one step multiplex RT-PCR เพื่อวินิจฉัย avian influenza A virus
สายพันธุ์ H5, H7 และ H9



นางสาว อัญญรัตน์ ตันธีรวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN: 974-17-3704-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE DEVELOPMENT OF ONE STEP MULTIPLEX RT-PCR ASSAY FOR H5, H7 AND H9
AVIAN INFLUENZA A VIRUS DETECTION



Miss Aunyaratana Thontiravong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Microbiology (Inter-Department)

Graduate School


Chulalongkorn University

Academic Year 2005

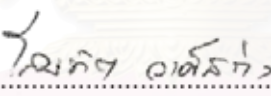
ISBN: 974-17-3704-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาชุดตรวจ one step multiplex RT-PCR เพื่อวินิจฉัย
avian influenza A virus สายพันธุ์ H5, H7 และ H9
โดย นางสาว อัญญรัตน์ ตันธีรวงศ์
สาขาวิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.คณิตศักดิ์ อรวีระกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

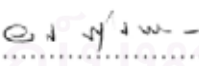
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการ
ศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. กัลยา ติงศภัதிய)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. โสมทัต วงศ์สว่าง)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.คณิตศักดิ์ อรวีระกุล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)


..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ
(สัตวแพทย์หญิง ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนาโกติน)

อัญญรัตน์ ตันธีรวงศ์: การพัฒนาชุดตรวจ one step multiplex RT-PCR เพื่อวินิจฉัย avian influenza A virus สายพันธุ์ H5, H7 และ H9 (THE DEVELOPMENT OF ONE STEP MULTIPLEX RT-PCR ASSAY FOR H5, H7 AND H9 AVIAN INFLUENZA A VIRUS DETECTION) อ.ที่ปรึกษา: รศ.น.สพ.ดร.คณิตศักดิ์ อรวิระกุล อ.ที่ปรึกษาร่วม: ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ 74 หน้า. ISBN: 974-17-3704-1

เชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5 และ H7 มักทำให้เกิดโรครุนแรงในสัตว์ปีกหลายชนิด นอกจากนี้เชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5 H7 และ H9 มีรายงานว่าสามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้อีกด้วย ในงานวิจัยครั้งนี้ได้มีการพัฒนาวิธี one step multiplex RT-PCR เพื่อประกอบการตรวจวินิจฉัย avian influenza A virus สายพันธุ์ H5 H7 และ H9 ในตัวอย่างที่แยกได้จากสัตว์ปีกที่มีประวัติอาการสงสัยการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ชุด primers ที่ได้ทำการออกแบบนั้นให้ผลผลิตขนาดต่างกันดังนี้คือ 157 คู่เบส (H5), 326 คู่เบส (H7) และ 231 คู่เบส (H9) วิธี one step multiplex RT-PCR นี้มีความไวและความจำเพาะสูงเนื่องจากให้ผลลบต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจที่สำคัญในไก่และในมนุษย์รวมถึงเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์อื่นๆด้วย และความไวของวิธี one step multiplex RT-PCR เมื่อทำการทดสอบแยกปฏิกิริยากันสำหรับ H5 H7 และ H9 RNA transcripts คือ 10^3 copies/ μ L นอกจากนี้ความไวของวิธี one step multiplex RT-PCR เมื่อทำการทดสอบ H5 H7 และ H9 RNA transcripts ในปฏิกิริยาเดียวกันคือ 10^4 copies/ μ L ดังนั้นวิธี one-step multiplex RT-PCR นี้จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ที่สามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้แก่ สายพันธุ์ H5 H7 และ H9 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีกได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ทำให้มีความเหมาะสมที่สำหรับใช้ในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังและเป็นสัญญาณเตือนก่อนที่จะมีการแพร่ระบาดไปยังคน

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2548

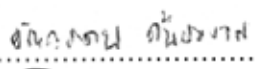

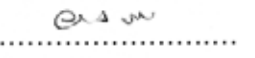
ลายมือชื่อนิสิต..... กนกนที กิ่งงามศรี
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4689193920 : MAJOR Medical Microbiology

KEYWORDS: H5, H7 AND H9 AVIAN INFLUENZA VIRUSES, ONE STEP MULTIPLEX RT-PCR ASSAY AUNYARATANA THONTIRAVONG: THE DEVELOPMENT OF ONE STEP MULTIPLEX RT-PCR ASSAY FOR H5, H7 AND H9 AVIAN INFLUENZA A VIRUS DETECTION. THESIS ADVISOR: KANISAK ORAVEERAKUL Ph.D., THESIS COADVISOR: YONG POOVORAWAN, 74 PP. ISBN: 974-17-3704-1

Avian influenza A virus subtype H5 and H7 have caused severe diseases in domestic poultry. Moreover, H5, H7 and H9 avian influenza A viruses have been proven capable of infecting humans. In the present study, we report the development of a one-step multiplex RT-PCR assay for detecting H5, H7 and H9 avian influenza A viruses. Three-subtype specific primer sets capable of producing PCR products of 157, 326 and 231 base pairs corresponding to avian influenza A virus H5, H7 and H9 subtypes, respectively, were utilized together in a one-step, one-tube, reaction. The one-step multiplex RT-PCR assay developed in this study was found to be sensitive and specific. These primer sets did not amplify genomic DNA or RNA from other human and avian respiratory viruses or other subtypes of avian influenza A virus in one-step multiplex RT-PCR assays performed as a control. The sensitivity of this assay was 10³ RNA copies/μL each for H5, H7 and H9 subtypes. In addition, the one-step multiplex RT-PCR assay allowed for simultaneous detection of 10⁴ copies/μL of *in vitro* transcribed RNA of the H5, H7 and H9 subtypes. Taken together, these findings clearly indicated that this novel one-step multiplex RT-PCR is a simple assay with high potential for rapid, sensitive, specific and cost effective laboratory diagnosis of H5, H7 and H9 avian influenza A virus isolates from clinical specimens of poultry.

Inter-Department Medical Microbiology
Field of study Medical Microbiology
Academic year 2005

Student's signature..... 
Advisor's signature..... 
Co-advisor's signature..... 

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.คณิตศักดิ์ อรวิระกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรสหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณอาจารย์ สัตวแพทย์หญิง จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือความรู้ ตลอดจนคำแนะนำในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสุมิตรา วัฒนินทร และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสัณชัย พงษ์ภร และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา และหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ เพื่อนนิสิตปริญญาโทและปริญญาเอก สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และเพื่อนนิสิตปริญญาโท คณะสัตวแพทยศาสตร์ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆตลอดการวิจัยจนสำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจ กำลังใจ และช่วยเหลือตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เชื้อไวรัส.....	5
2.1.1 การจำแนกและคุณสมบัติของเชื้อ avian influenza A virus.....	5
2.1.2 แอนติเจนของเชื้อ avian influenza A virus.....	9
2.1.3 การเพิ่มจำนวนของเชื้อ avian influenza A virus.....	14
2.2 การเปลี่ยนแปลงแอนติเจน.....	17
2.3 แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติของเชื้อ influenza A virus.....	18
2.4 พยาธิกำเนิด.....	20
2.5 ลักษณะอาการทางคลินิก.....	21
2.6 การติดต่อของเชื้อ avian influenza A virus จากสัตว์สู่คน.....	21
2.7 การตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus.....	22
2.8 วิธี Multiplex RT-PCR.....	24
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	27
3.1 รูปแบบการวิจัย.....	27
3.2 วัสดุ.....	27
3.3 วิธีการทดลอง.....	28

บทที่	หน้า
3.3.1 ออกแบบ สังเคราะห์ และทดสอบ primer ที่จำเพาะต่อยีน H5 H7 และ H9 ของ avian influenza A virus.....	28
3.3.2 การ clone ชิ้นส่วนยีนของ avian influenza A virus สายพันธุ์ H7 และ H9 เข้าสู่ cloning vector และทำ <i>in vitro</i> transcription เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมบวก.....	28
3.3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำ one-step multiplex RT-PCR.....	33
3.3.4 การทดสอบความจำเพาะของวิธี one step multiplex RT-PCR.....	33
3.3.5 การทดสอบความไวของวิธี one step multiplex RT-PCR.....	33
3.3.6 การทดสอบระบบ one step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น.....	33
4 ผลการทดลอง.....	38
4.1 ผลการออกแบบ สังเคราะห์ และทดสอบ primer ที่จำเพาะต่อยีน H5, H7 และ H9 ของ avian influenza A virus.....	38
4.2 ผลการ clone ชิ้นส่วนยีนของ avian influenza A virus สายพันธุ์ H7 และ H9 เข้าสู่ cloning vector และทำ <i>in vitro</i> transcription เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมบวก.....	38
4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี one step multiplex RT-PCR.....	51
4.4 ผลการทดสอบความไวของวิธี one step multiplex RT-PCR.....	53
4.5 ผลการทดสอบระบบ one step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น.....	56
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	58
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	70
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	74

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	แสดงองค์ประกอบของเชื้อ influenza A virus.....6
2	แสดงคุณสมบัติของเชื้อ highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus และ low pathogenic avian influenza (LPAI) virus.....13
3	แสดงรายละเอียดของ primer ที่จำเพาะกับส่วนของยีน H5, H7 และ H9 ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....41
4	แสดงการเลือกใช้ชุด primer ทั้งสิ้น 14 ระบบ ในการทำ Multiplex RT-PCR.....43
5	แสดงรายละเอียดของชุด primer ระบบที่ XII ซึ่งเหมาะสมที่สุด ในการพัฒนา.....48
6	แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR.....50
7	แสดงอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR.....50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	แบบจำลองแสดงส่วนประกอบของเชื้อ influenza A virus.....8
2	แสดงแบบจำลองของ influenza virus haemagglutinin.....11
3	แสดงแบบจำลองการเพิ่มจำนวนของ influenza A virus.....16
4	แสดงแหล่งที่อยู่ของ influenza A virus.....19
5	แสดงขั้นตอนของวิธี multiplex RT-PCR.....26
6	แสดงวิธีการ clone ชิ้นส่วนยีน haemagglutinin ของเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H7 และ H9 เข้าสู่ cloning vector และทำ <i>in vitro</i> transcription.....29
7	แสดงขั้นตอนการสกัด RNA.....35
8	แสดง plasmid DNA ของยีน H7 และ H9 ที่ clone ได้.....39
9	แสดง primer ที่จำเพาะกับยีน H5, H7 และ H9.....40
10	แสดงผลการทดสอบชุด primer ทั้ง 14 ระบบใน Multiplex RT-PCR เพื่อคัดเลือก ชุด primer ที่ให้ band patterns ที่ชัดเจนและเหมาะสมในการอ่านผล.....44
11	แสดงชุด primer ระบบที่ XII ซึ่งเหมาะสมที่สุดในการพัฒนา.....49
12	แสดงการทดสอบความจำเพาะของวิธี Multiplex RT-PCR.....52
13	แสดงความไวของวิธี Multiplex RT-PCR.....54
14	แสดงผลการทดสอบระบบ one-step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่าง ส่งตรวจจากปอดหรืออวัยวะภายในจากสัตว์ปีก.....57

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไข้หวัดนก (Avian influenza หรือ Bird flu) เป็นโรคติดต่อร้ายแรงที่มีผลต่อระบบทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร หรือระบบประสาท ในสัตว์ปีกหลายชนิด โดยการติดเชื้อในสัตว์ปีกมีความหลากหลายตั้งแต่การติดเชื้อเฉพาะแบบไม่รุนแรง เช่น การติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจ ไขลด จนถึง การติดเชื้อแบบรุนแรงหลายระบบ ที่ทำให้มีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Swayne and Senne, 2003) โรคนี้พบเป็นครั้งแรกในปีค.ศ. 1878 โดยรู้จักกันในชื่อของ fowl plague (Alexander, 2000; Branson, 1996) ต่อมาในปี ค.ศ. 1901 พบว่าสาเหตุของโรคนี้เกิดจากเชื้อไวรัส และพบว่าเชื้อนี้มีความสัมพันธ์กับ mammalian influenza A virus ในปี ค.ศ. 1955 (Alexander, 2000; Branson, 1996) และในปีค.ศ. 1961 มีการตรวจพบเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 เป็นครั้งแรกในนกทะเลที่ทวีปแอฟริกา เชื้อไวรัสดังกล่าวแพร่กระจายอยู่ในนกเป็ดน้ำหลายชนิด (wild waterfowl) นกทะเล (shorebird) และนกนางนวล (gull) ซึ่งเป็นสัตว์เจ้าบ้านตามธรรมชาติ (natural reservoir) ของเชื้อไวรัสนี้ โดยไม่ทำให้สัตว์ปีกเหล่านี้แสดงอาการป่วย แต่สามารถทำให้สัตว์ปีกที่เป็นสัตว์เลี้ยง เช่น ไก่ ไก่วง ป่วยหนักและตายทำให้เกิดความสูญเสียในทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Suarez, 2000) ดังเช่นการแพร่ระบาดของเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 ในประเทศไทยในช่วงปลายปีค.ศ. 2003 ถึงต้นปีค.ศ. 2004 ทำให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมากต่ออุตสาหกรรมไก่ไข่ ไก่เนื้อ เป็ด และสัตว์ปีกหลายชนิด ปกติแล้วเชื้อไวรัสนี้ไม่ติดต่อโดยตรงและไม่ระบาดในมนุษย์ (CDC, 2004) อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีรายงานการติดต่อและการระบาดในคนหลายกรณี โดยเกิดจาก avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 นับตั้งแต่ช่วงปีค.ศ. 1997 เป็นต้นมา ซึ่งเป็นครั้งแรกที่พบว่าเชื้อไวรัสนี้สามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้ในฮ่องกง โดยมีผู้ติดเชื้อจำนวน 18 คน เสียชีวิต 6 คน (Claas et al, 1998; Tam, 2002; Zhou et al, 1999) ต่อมาในปีค.ศ. 2003 มีรายงานการติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 สองรายในครอบครัวชาวฮ่องกงที่เดินทางไปสาธารณรัฐประชาชนจีน (Weir, Wong and Gemmill, 2004) ต่อมาในเดือนมกราคม ค.ศ. 2004 ประเทศเวียดนามยืนยันการป่วยตายของคน เกี่ยวข้องกับไก่ที่ล้มตายจำนวนมากจากเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 (Tran et al, 2004) สำหรับในประเทศไทยมีการระบาดและล้มตายของสัตว์ปีกและไก่จำนวนมากใน

ภาคเหนือตอนล่าง ภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 2003 และในเดือนมกราคม ค.ศ. 2004 ได้มีการยืนยันการป่วยตายของคนๆ หนึ่งที่ไปสัมผัสกับสัตว์ปีกที่ติดเชื้อจากเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 โดยปัจจุบันในประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อทั้งหมด 22 คน เสียชีวิต 14 คน (WHO, 2006) นอกจากนี้เชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 แล้วเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีรายงานว่าสามารถติดต่อสู่คนได้คือ สายพันธุ์ H7N7 สายพันธุ์ H9N2 และสายพันธุ์ H7N3 ในปีค.ศ. 1996 สามารถเพาะแยกเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H7N7 ได้จากตาของผู้หญิงเลี้ยงเป็ดชาวอังกฤษที่ป่วยเป็นโรคเยื่อตาขาวอักเสบ (conjunctivitis) (Kurtz, Manvell and Banks, 1996) ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 มีรายงานการติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H7N7 ในคนมากกว่า 80 ราย และผู้ป่วยหนึ่งรายเสียชีวิต โดยผู้ป่วยและตายเกี่ยวข้องกับสัตว์ปีกหรือกำจัดสัตว์ปีกในระหว่างการระบาดของไข้หวัดนกในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Fouchier et al, 2004; Koopmans et al, 2004) และพบว่าในปีค.ศ. 1998 1999 และ 2003 สามารถแยกเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H9N2 ได้ในผู้ป่วยชาวฮ่องกง ซึ่งพบว่ามีลักษณะการป่วยไม่รุนแรง (influenza-like symptom) และหายเองได้ (Nicholson et al, 2003; Peiris et al, 1999; Saito et al, 2001) ล่าสุดในช่วงต้นปีค.ศ. 2004 มีรายงานพบผู้ป่วย 2 รายติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H7N3 ในขณะที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวในสัตว์ปีกที่เมือง British Columbia ประเทศ Canada โดยพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีลักษณะอาการป่วยที่ไม่รุนแรง (mild influenza like illness) และหายเองได้ (Hirst et al, 2004)

วิธีการวินิจฉัย avian influenza A virus มีหลายวิธีได้แก่ การเพาะแยกเชื้อไวรัส (Virus isolation) ในไข่ไก่ฟัก (Embryonated fowl's egg) หรือในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เช่น Mardin-Darby canine kidney cell (MDCK cell) ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูงจึงได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัย influenza A virus ในปัจจุบัน (Shan et al, 2003; Sugimura, Murakami and Ogawa, 2000) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือมีราคาแพง ใช้เวลานาน (1-2 สัปดาห์) และสิ้นเปลืองแรงงานมาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัส ซึ่งได้แก่ Enzyme-linked immunoassay, Immunofluorescence assay และพบว่าสามารถตรวจหา influenza A virus ได้เร็วกว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะต่ำกว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส (Boivin, Hardy and Kress, 2001) การวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาทำได้โดยการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีต่อสายพันธุ์นั้นๆ ได้แก่ วิธี Haemagglutination-inhibition (HI) และ Neuraminidase inhibition (NI) assay ใช้ในการกำหนดสายพันธุ์ของ influenza A virus อย่างไรก็ตาม

ตามการเตรียม antisera ที่ใช้ใน HI และ NI assay ต้องใช้เวลานานและการแยกสายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ บางครั้งอาจให้ผลผิดพลาดได้ (Hoffmann et al, 2001) ปัจจุบันมีการนำเอาวิธี RT-PCR มาใช้ในการวินิจฉัย influenza A virus ในตัวอย่างส่งตรวจจากคอและจมูกที่เก็บจากคน สุนัข และม้า (Oxburgh and Hagstrom, 1999; Schorr, Wentworth and Hinshaw, 1994) ซึ่งวิธีนี้ทราบผลเร็วแต่ความไวสูง การเพาะแยกเชื้อไวรัสไม่ได้ (Cherian et al, 1994) และมีความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธีอื่นๆ ที่กล่าวมา (Atmar et al, 1996; Boivin et al, 2001) ต่อมาจึงได้มีการนำเอา RT-PCR มาใช้ในการวินิจฉัย avian influenza A virus ในสัตว์ปีก (Dybkaer et al, 2004; Lee et al, 2001; Munch et al, 2001) และใช้ในการบอกลายพันธุ์ย่อยของ influenza A virus ทั้ง 15 subtype (Hoffmann et al, 2001; Poddar, 2002) อย่างไรก็ตามขั้นตอนในการทำ RT-PCR ที่รายงานก่อนหน้านี้ต้องทำสองขั้นตอน ซึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างขั้นตอนการทำได้ (Poddar, 2002) วิธี one step Multiplex RT-PCR เป็นวิธีตรวจหาหลักฐานการติดเชื้อที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหลายชนิดในขณะเดียวกัน ทำให้สามารถลดปัญหาการปนเปื้อนที่เกิดจากการทำ PCR หลายขั้นตอนได้ (Spackman et al, 2003) โดยสามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อ influenza A virus สายพันธุ์ต่างๆที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในคน (Payungporn et al, 2004; Stockton et al, 1998) ในงานวิจัยครั้งนี้ได้มีการพัฒนาวิธี one-step multiplex RT-PCR เพื่อประกอบการตรวจวินิจฉัย avian influenza A virus สายพันธุ์ที่สามารถติดต่อสู่คนได้ ได้แก่ H5, H7 และ H9 ในตัวอย่างที่แยกได้จากสัตว์ปีกที่มีประวัติอาการสงสัยการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ เพื่อเฝ้าระวังและเป็นสัญญาณเตือนก่อนที่จะมีการแพร่ระบาดไปยังคน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิค one step multiplex RT-PCR เพื่อประกอบการตรวจวินิจฉัย avian influenza A virus สายพันธุ์ที่สามารถติดต่อถึงคนได้ ได้แก่ H5 H7 และ H9 ในตัวอย่างที่แยกได้จากสัตว์ปีกที่มีประวัติอาการสงสัยการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และจากตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่ได้จากการเฝ้าระวังด้านระบาดวิทยาของ Avian influenza ในประเทศไทย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไข้หวัดนก (Avian influenza หรือ Bird flu) เป็นโรคติดต่อร้ายแรงที่มีผลต่อระบบทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร หรือระบบประสาท ในสัตว์ปีกหลายชนิด โดยการติดเชื้อในสัตว์ปีกมีความหลากหลายตั้งแต่การติดเชื้อเฉพาะที่แบบไม่รุนแรง เช่น การติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจ ความสามารถในการวางไข่ลดลง จนถึงการติดเชื้อแบบรุนแรงหลายระบบ ที่ทำให้มีอัตราการตายสูงถึง 100% (Swayne and Senne, 2003) โรคนี้พบเป็นครั้งแรกที่ประเทศอิตาลีในปีค.ศ. 1878 โดยรู้จักกันในชื่อของ fowl plague (Alexander, 2000; Branson, 1996) ต่อมาในปี ค.ศ. 1951 พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคนี้อยู่ในกลุ่ม influenza A virus และในปีค.ศ. 1961 มีการตรวจพบเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 เป็นครั้งแรกในนกทะเลที่ทวีปแอฟริกา เชื้อไวรัสดังกล่าวแพร่กระจายอยู่ในนกเป็ดน้ำหลายชนิด (wild waterfowl) นกทะเล (shorebird) และนกนางนวล (gull) ซึ่งเป็นสัตว์เจ้าบ้านตามธรรมชาติ (natural reservoir) ของเชื้อไวรัสนี้ โดยไม่ทำให้สัตว์ปีกเหล่านี้แสดงอาการป่วย แต่สามารถทำให้สัตว์ปีกที่เป็นสัตว์เลี้ยง เช่น ไก่ ไก่วง เป็ด และนกทำให้เกิดความสูญเสียในทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Suarez, 2000) ดังเช่นการแพร่ระบาดของเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 ในประเทศไทยในช่วงปลายปีค.ศ. 2003 ถึงต้นปีค.ศ. 2004 ทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ปีกอย่างมาก โดยทำให้ต้องมีการทำลายสัตว์ปีกไปมากกว่า 26 ล้านตัว และทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจคิดเป็นจำนวนเงินไม่ต่ำกว่า 250 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ปกติเชื้อไวรัสนี้ไม่ติดต่อโดยตรงและไม่ระบาดในมนุษย์ (CDC, 2004) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันมีรายงานการติดต่อและการระบาดในคนหลายกรณี (Rezza, 2005) โดยเกิดจาก avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 นับตั้งแต่ช่วงปีค.ศ. 1997 เป็นต้นมา ซึ่งเป็นครั้งแรกที่พบว่าเชื้อไวรัสนี้สามารถติดต่อสู่คนได้ในฮ่องกง โดยมีผู้ติดเชื้อจำนวน 18 คน เสียชีวิต 6 คน (Claas et al, 1998; Tam, 2002; Zhou et al, 1999) ต่อมาในปีค.ศ. 2003 มีรายงานการติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 สองรายในครอบครัวชาวฮ่องกงที่เดินทางไปสาธารณรัฐประชาชนจีน (Weir, Wong and Gemmill, 2004) ต่อมาในเดือนมกราคม ค.ศ. 2004 ประเทศเวียดนามยืนยันการป่วยตายของคนเกี่ยวข้องกับไก่ที่ล้มตายจำนวนมากจากเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 (Tran et al, 2004) สำหรับในประเทศไทยมีการระบาดและล้มตายของสัตว์ปีกและไก่จำนวนมากในภาคเหนือตอนล่าง ภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือหลายจังหวัดนับตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 2003

และในเดือนมกราคม ค.ศ. 2004 ได้มีการยืนยันการป่วยตายของคนที่ไม่สัมผัสกับสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 โดยปัจจุบันในประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อทั้งหมด 22 คน เสียชีวิต 14 คน (WHO, 2006) นอกจากนี้เชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 แล้วเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์อื่นๆที่มีรายงานว่าสามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้คือ สายพันธุ์ H7N7 (Fouchier et al, 2004; Kurtz, Manvell and Banks, 1996; Koopmans et al, 2004) สายพันธุ์ H9N2 (Nicholson, Wood and Zambon, 2003; Peiris et al, 1999; Saito et al, 2001) และสายพันธุ์ H7N3 (Hirst et al, 2004) ดังนั้นโรคไข้หวัดนกนอกจากเป็นปัญหาสำคัญทางเศรษฐกิจแล้วยังเป็นปัญหาสำคัญในทางสาธารณสุขเป็นอย่างมากในช่วงที่ผ่านมา

2.1 เชื้อไวรัส

2.1.1 การจำแนกและคุณสมบัติของเชื้อ avian influenza A virus

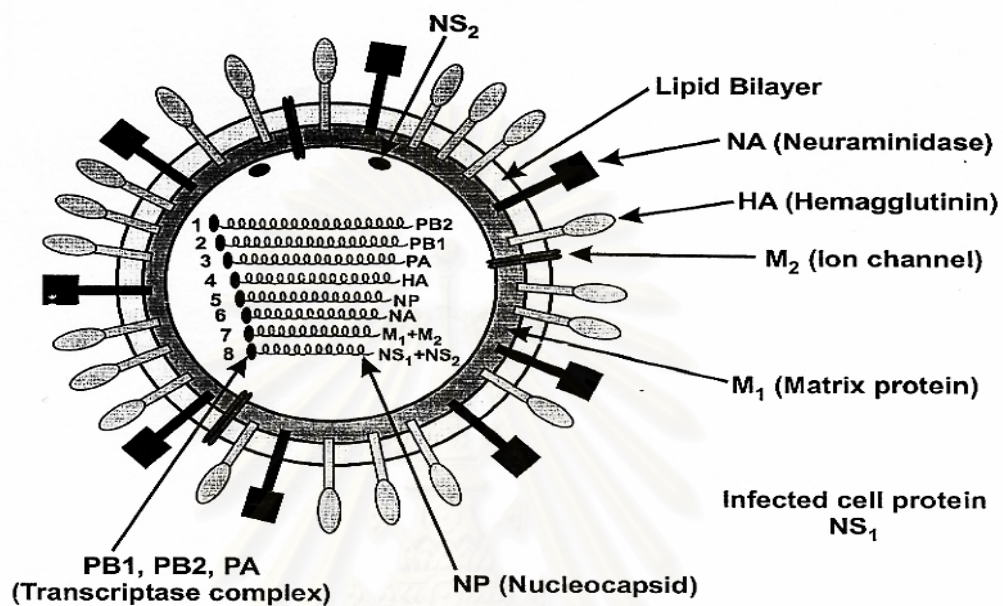
โรคไข้หวัดนก (Avian influenza / AI หรือ Bird flu) เกิดจากเชื้อไวรัส *Influenzavirus A* จัดอยู่ในตระกูล *Orthomyxoviridae* ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสชนิดมีเปลือกหุ้ม (enveloped) ตัวไวรัสมีรูปร่างหลายแบบเช่น กลม (spherical form) หรือเป็นสายยาว (filamentous form) (Murray et al, 2003) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 80-120 นาโนเมตร และมีลักษณะสายพันธุกรรมเป็นแบบ single stranded RNA สายลขขนาดประมาณ 13,600 นิวคลีโอไทด์ ที่มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆจำนวน 8 ท่อน (segmented RNA genome) โดยแต่ละท่อนมีหนึ่งยีนที่เป็นต้นแบบในการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบต่างๆของเชื้อไวรัส ซึ่งยีนทั้ง 8 ท่อนถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน 10 ชนิดได้แก่ โปรตีน PB1, โปรตีน PB2, โปรตีน PA, โปรตีน HA, โปรตีน NP, โปรตีน NA, โปรตีน M1, โปรตีน M2, โปรตีน NS1 และโปรตีน NS2 (Webster et al, 1992; Lamb and Kung, 2001) (ตารางที่1), (รูปที่1)

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของเชื้อไวรัส influenza A virus (ดัดแปลงจาก Lamb and Krug, 2001)

Segment	Length (nucleotides)	mRNA length (nucleotides)	Encoded polypeptide	Nascent polypeptide length (aa)	Molecular weight predicted	หมายเหตุ
1	2,341	2,320	PB2	759	85,700	M ⁷ -GpppX ^m N ^m (cap) recognition of host cell RNA; component of RNA transcriptase complex
2	2,341	2,320	PB1	757	86,500	Endonuclease activity
3	2,233	2,211	PA	716	84,200	Component of RNA transcriptase and replication complex
4	1,778	1,757	HA	566	61,468	Major surface glycoprotein; trimer; receptor (sialic acid) binding; proteolytic cleavage activation; low-pH-induced conformational change and fusion activity; major antigenic determinant
5	1,565	1,540	NP	498	56,101	Associated with RNA and polymerase protein; helical structure
6	1,413	1,392	NA	454	50,087	Surface glycoprotein; neuraminidase activity; tetramer; antigenic determinant

Segment	Length (nucleotides)	mRNA length (nucleotides)	Encoded polypeptide	Nascent polypeptide length (aa)	Molecular weight predicted	หมายเหตุ
7	1,027	1,005	M1	252	27,801	Major protein of virion, underlies lipid bilayer; interacts with RNPs and NS2
		315	M2	97	11,010	Integral membrane protein; ion channel activity
8	890	868	NS1	230	26,815	Nonstructural protein; inhibits nuclear export of mRNAs
		395	NS2	121	14,216	Minor component of virions; interacts with M1 and involved in nuclear export of RNPs

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แบบจำลองแสดงส่วนประกอบของเชื้อ influenza A virus (ดัดแปลงจาก Lamb and Krug, 2001)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 แอนติเจนของเชื้อ avian influenza A virus

เชื้อ avian influenza A virus มีโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิดอยู่บริเวณเปลือกหุ้มของไวรัสได้แก่ haemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) เป็นโครงสร้าง spikes และเนื่องจากโปรตีนทั้งสองชนิดเป็นโปรตีนหลักบนเปลือกหุ้มไวรัสดังนั้นจึงเป็นแอนติเจนสำคัญที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์ใช้เป็นเป้าหมายในการโจมตีเพื่อต่อสู้กับการติดเชื้อไวรัสอีกด้วย

1) โปรตีน HA

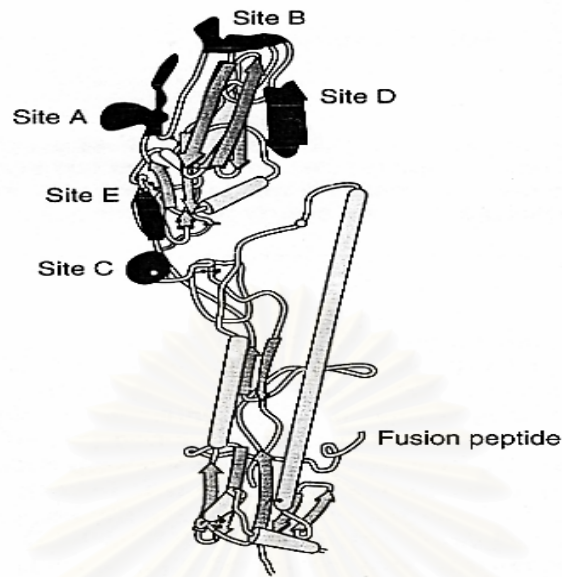
โปรตีน HA มีคุณสมบัติในการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงและมีหน้าที่สำคัญในการจับกับโครงสร้าง sialic acid ของตัวรับบนผิวเซลล์ของโฮสต์เพื่อเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ต่อไป นอกจากนี้พบว่าภูมิคุ้มกันต่อ HA มีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อ influenza A virus และความหลากหลายของโมเลกุลนี้ทำให้ไวรัสสามารถหลบหลีกจากภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ อีกด้วย (Murray et al, 1999)

โปรตีน HA สร้างมาจาก RNA ท่อนที่ 4 (HA gene) ซึ่งมีความยาวประมาณ 1,742-1,778 นิวคลีโอไทด์ (Lamb and Krug, 2001) โดยโปรตีนนี้มีรูปร่างเป็นแท่ง (trimeric rod-shaped spike) และมีขนาดประมาณ 562-566 กรดอะมิโน (Brooks, Butel and Morse, 2001) ซึ่งถูกเรียกว่า HAO จากนั้นก่อนไวรัสเข้าสู่เซลล์ HAO ถูกตัด (cleaved) โดยเอนไซม์ protease จากโฮสต์ (เช่น serine protease) ได้เป็น HA1 และ HA2 ซึ่งเชื่อมติดกันด้วยพันธะ disulfide โดย amino terminus ของ HA2 เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เปลือกหุ้มของไวรัส (viral envelope) เชื่อมติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้เชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ได้ โปรตีน HA แต่ละโมเลกุลประกอบด้วย globular head domain และ fibrous stem domain (stalk) โดยส่วน globular head หรือ HA1 ประกอบด้วยจุดที่ใช้จับกับตัวรับบนเซลล์โฮสต์ (receptor-binding site) และมี antigenic site 5 จุดซึ่งอยู่รอบๆ receptor-binding site ซึ่ง antigenic site ทั้ง 5 จุดนี้เป็นตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ได้มากที่สุดของยีน HA ในขณะที่ส่วนอื่นๆ ของยีนจะมีความคงตัว (conserved) ในแต่ละ subtype ของยีน HA (รูปที่ 2) ส่วน fibrous stem domain ประกอบด้วยส่วน HA2 และ HA1 บางส่วน (Webster et al, 1992) ปัจจุบันพบว่าลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณ HA1 แสดงถึงความเป็น

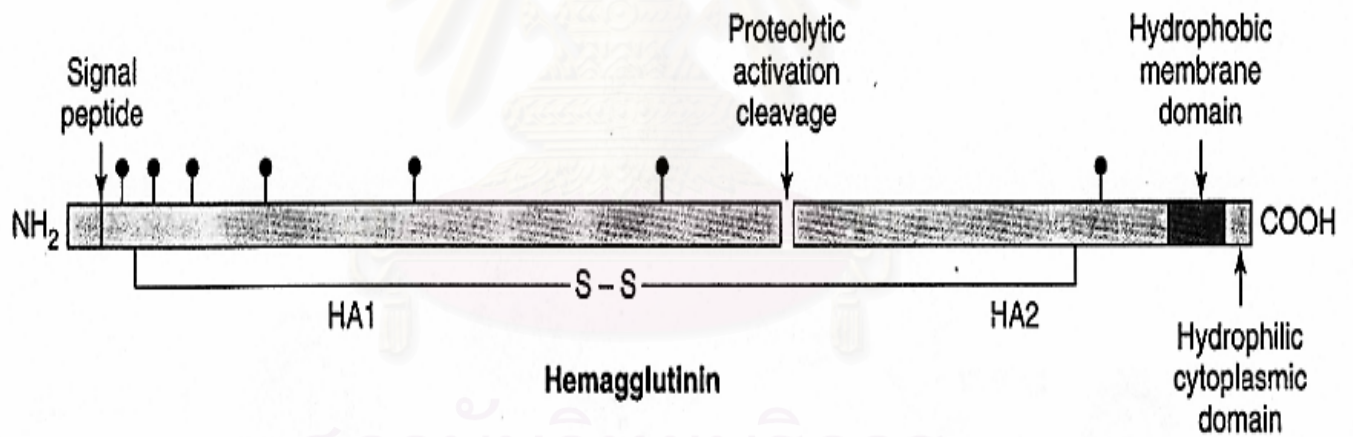
แอนติเจนของ HA (HA antigenicity) โดยพบว่าแต่ละ subtype ของ HA มีลำดับกรดอะมิโน
ที่บริเวณ HA1 แตกต่างกันประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ (Horimoto and Kawaoka, 2001)
นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ HA2 มีความคงตัว (conserved) ในขณะที่บริเวณ
HA1 มีความหลากหลาย (variability) มากกว่า (Kovacova et al, 2002)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก.



ข.

รูปที่ 2 แสดงแบบจำลองของ influenza virus haemagglutinin

- ก. แสดงส่วนประกอบของโปรตีน haemagglutinin และ major antigenic site 5 จุด (A-E) ที่อยู่บนโปรตีน haemagglutinin
- ข. แสดงโครงสร้างของ haemagglutinin polypeptide (ดัดแปลงจาก Brooks, Butel and Morse, 2001)

2) โปรตีน NA

โปรตีน NA สร้างมาจาก RNA ที่ 6 และมีรูปร่างเหมือนดอกเห็ด (mushroom-shaped tetramer) (Murray et al, 1999) โดยโปรตีนนี้มีคุณสมบัติเป็น sialidase enzyme ทำหน้าที่ย่อยกรด sialic ออกจาก glycoproteins หรือ glycolipids ซึ่งเป็นจุดจับ (receptor site) บนผิวเซลล์ ทำให้ไวรัสหลุดเป็นอิสระจากเซลล์โฮสต์ได้ นอกจากนี้แล้วโปรตีน NA ช่วยในการป้องกันการเกาะกลุ่มของไวรัสและช่วยย่อย mucous ที่ปกคลุมเยื่อทางเดินหายใจ ทำให้ไวรัสสามารถสามารถยึดเกาะและบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ได้อีกด้วย (Brooks, Butel and Morse, 2001; Lamb and Krug, 2001)

นอกจากนี้ลักษณะความเป็นแอนติเจนของโปรตีน HA และ NA นำมาใช้ในการจัดกลุ่มสายพันธุ์ย่อย (subtype) ของ influenza A virus ได้ โดยปัจจุบันมีสายพันธุ์ย่อยในกลุ่ม HA อยู่ด้วยกันทั้งหมด 16 subtypes (H1-16) (Fouchier et al, 2005) และสายพันธุ์ย่อยในกลุ่ม NA 9 subtypes (N1-N9) (Webster, Shortridge and Kawaoka, 1997; Webster et al, 1992) ทุกสายพันธุ์ย่อยดังกล่าวพบได้ในนกตระกูลนกเป็ดน้ำ (Rohm et al, 1996) โดยใน HA ทั้ง 16 subtypes พบว่าชนิดที่ก่อโรครุนแรงในสัตว์ปีกจำกัดที่ H5 และ H7 (Alexander and Brown, 2000) ส่วนในมนุษย์พบ HA 3 subtypes คือ H1 H2 และ H3 และ NA 2 subtypes คือ N1 และ N2 เท่านั้น แต่ในปัจจุบัน influenza A virus subtype อื่นสามารถติดต่อกันได้ (Rohm et al, 1996) ได้แก่ H5N1 (Claas et al, 1998; Tam, 2002; Zhou et al, 1999) , H7N7 (Fouchier et al, 2004; Kurtz, Manvell and Banks, 1996; Koopmans et al, 2004) , H9N2 (Nicholson, Wood and Zambon, 2003; Peiris et al, 1999; Saito et al, 2001) และ H7N3 (Hirst et al, 2004)

นอกจากนี้มีการจัดแบ่งกลุ่ม avian influenza A virus ตามความรุนแรงในการเกิดโรคโดยทำการทดลองฉีดเชื้อเข้าในไก่ หรือพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง cleavage site ของยีน HA แบ่งได้เป็น highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus และ low-pathogenic avian influenza (LPAI) virus โดย HPAI ทำให้สัตว์ปีกที่ติดเชื้อมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และพบ multiple basic amino acid ตรงตำแหน่ง cleavage site ของยีน HA ทำให้สามารถถูกตัด (cleaved) โดยเอนไซม์ protease ที่พบได้ทุกแห่งในร่างกาย (ubiquitous protease) ทำให้เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ทั่วร่างกายของโฮสต์ โดย HPAI พบอยู่ใน subtype H5 และ H7

อย่างไรก็ดีไม่ใช่ไวรัสทุกตัวใน subtype ทั้งสองนี้เป็น HPAI ทั้งหมด ส่วน LPAI ทำให้สัตว์ปีกที่ติดเชื้อแสดงอาการไม่รุนแรงเช่น อาการทางระบบทางเดินหายใจ, ซึม, ความสามารถในการวางไข่ลดลง เป็นต้น (ตารางที่ 2) (Alexander and Brown, 2000; Capua and Alexander, 2004; Zambon, 1999)

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติของเชื้อ highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus และ low-pathogenic avian influenza (LPAI) virus (ดัดแปลงจาก Horimoto and Kawaoka, 2001)

คุณสมบัติ	LPAI	HPAI
HA subtype	H1-H15	H5, H7
ตำแหน่งที่มีการเพิ่มจำนวน	ระบบทางเดินหายใจและ/หรือระบบทางเดินอาหาร	อวัยวะส่วนใหญ่ในร่างกาย
การก่อโรค	ไม่ก่อโรคหรือก่อโรคไม่รุนแรง	ก่อโรคแบบรุนแรงหลายระบบ (fowl plague symptom)
อัตราการตาย	ต่ำ	สูง (ประมาณ 100%)
HA cleavage by intracellular proteases	ไม่ใช่	ใช่
HA cleavage site sequence	Single arginine	Multiple basic amino acid
Endoproteases responsibility for HA cleavage	Factor Xa-like protease (in vivo)	Intracellular proteases ที่อยู่ในทั่วไปในเนื้อเยื่อ

2.1.3 การเพิ่มจำนวนของเชื้อ avian influenza A virus

การเพิ่มจำนวนของเชื้อ influenza virus มีความแตกต่างจาก RNA virus ชนิดอื่น โดยพบว่า ขั้นตอนการ transcription และการเพิ่มจำนวนของ RNA นั้นเกิดขึ้นในนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ (Brooks, Butel and Morse, 2001)

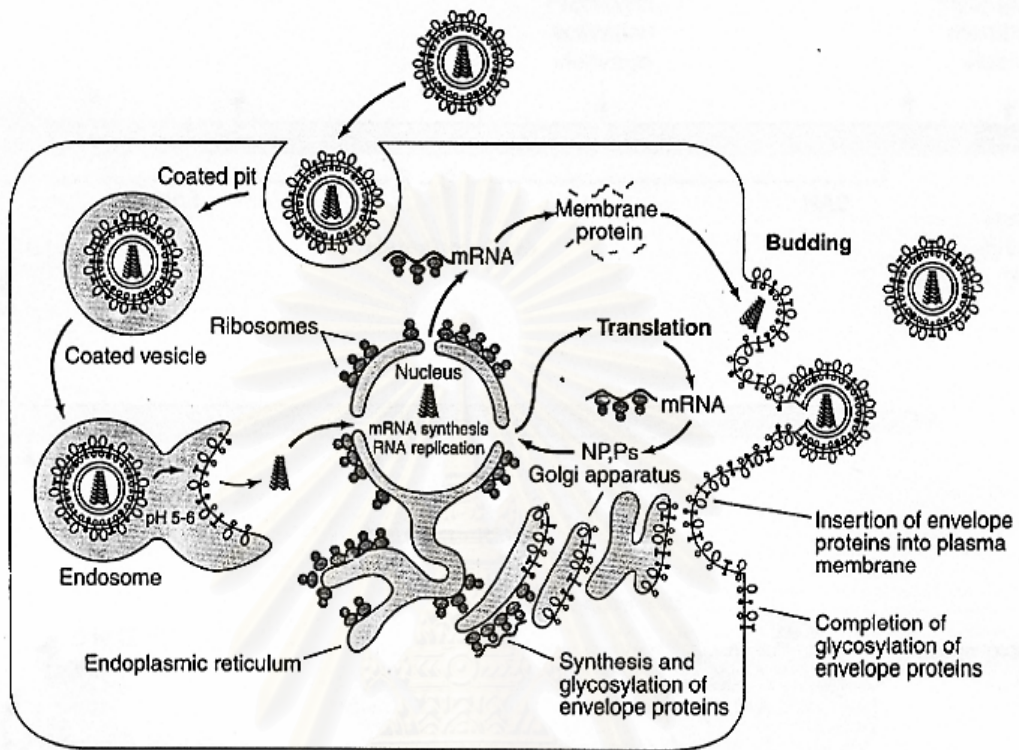
โปรตีน HA ของ influenza A virus จับกับกรด sialic ที่อยู่บนตัวรับของเซลล์โฮสต์ จากนั้นไวรัสจะเข้าสู่เซลล์โฮสต์โดยขบวนการ receptor-mediated endocytosis โดยภายใน endosome มีสภาวะความเป็นกรด (pH 5.5) ซึ่งเหนี่ยวนำทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน HA เป็นผลให้เปลือกหุ้มของไวรัส (viral envelope) เชื่อมติดกับเยื่อหุ้มของ endosome (endosomal membrane) ทำให้เกิดการปลดปล่อยส่วนประกอบของเชื้อไวรัส (ribonucleoprotein หรือ RNP) เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ จากนั้น RNP เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ซึ่งเป็นจุดที่ RNA ของไวรัสนี้เกิดขบวนการ transcription และเพิ่มจำนวน (replication)

ขั้นตอน primary transcription ของ influenza virus มีลักษณะพิเศษเฉพาะตัวแตกต่างจาก RNA virus อื่นๆโดย influenza virus มีขบวนการ Cap snatching ซึ่งเป็นขบวนการที่ viral endonuclease (PB2) ตัด 5' cap (10-13 นิวคลีโอไทด์) จากนิวเคลียส RNA ของเซลล์โฮสต์เพื่อนำไปใช้เป็น primer ในขั้นตอน transcription ของไวรัส ซึ่งขั้นตอนนี้อาศัยเอนไซม์ viral transcriptase (PB1) หลังจากนั้น RNA 6 ท่อนถูก transcribed เป็น monocistronic mRNAs ซึ่งถูก translated เป็นโปรตีน HA, NA, NP, PA, PB1 และ PB2 ส่วน RNA อีกสองท่อนคือยีน M และ NS ถูก transcribed เป็น mRNA อย่างละ 2 ชนิดโดยขบวนการ splicing จากนั้น mRNA จะถูก translated เป็นโปรตีน M1, M2 และ NS1, NS2 ตามลำดับ (White and Fenner, 1994) ปัจจุบันมีความเชื่อว่าปริมาณโปรตีน NP ที่เพิ่มขึ้นเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากการสังเคราะห์ mRNA ไปเป็นการสังเคราะห์ cRNA (Complementary RNA) และ vRNA (Virion RNA) แทน โดย vRNA ที่สร้างขึ้นมานั้นถูก encapsidated ด้วยโปรตีน NP ที่อยู่ในนิวเคลียส และ vRNA นี้ทำหน้าที่เป็นต้นแบบ (template) สำหรับขั้นตอน secondary transcription ของ viral mRNAs ต่อไป ในการติดเชื้อช่วงท้ายพบว่าผลผลิตหลักที่ได้จากขบวนการ translation คือโปรตีน M1, HA และ NA โดยโปรตีน HA และ NA ถูก glycosylated ใน rER และผ่านขบวนการใน Golgi apparatus จากนั้น

เคลื่อนที่ไปยังนิวเคลียสและสอดแทรกเข้าไปอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (Webster et al, 1992) จากนั้น RNP เคลื่อนที่ออกจากนิวเคลียสเข้าสู่ไซโตพลาสซึมเพื่อเกิดการ assembly เป็นไวรัสลูกหลาน (progeny virion) โดยอาศัยคุณสมบัติ nuclear localization ของโปรตีน M1 และ NS2 จากนั้นไวรัสลูกหลาน เกิดการ budding ออกจากเซลล์โฮสต์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งไวรัสลูกหลานนี้ถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (envelope) ซึ่งมีโปรตีน HA และ NA กระจายอยู่บน envelope นี้ (Horimoto and Kawakami, 2001) (รูปที่3)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 แสดงแบบจำลองการเพิ่มจำนวนของ influenza A virus (ดัดแปลงจาก Brooks, Butel and Morse, 2001)

2.2 การเปลี่ยนแปลงแอนติเจน (Antigenic variation)

Influenza virus มีคุณสมบัติพิเศษแตกต่างจากไวรัสอื่นกล่าวคือ influenza virus มีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนที่บริเวณ HA และ NA ได้บ่อยครั้งเรียกว่าเกิด Antigenic variation เนื่องจากเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ของ influenza virus ขาดคุณสมบัติ proofreading (5'-3' exonuclease activity) (Brooks, Butel and Morse, 2001; Zambon, 1999)

การเปลี่ยนแปลงแอนติเจนมี 2 แบบคือ

1) Antigenic shift

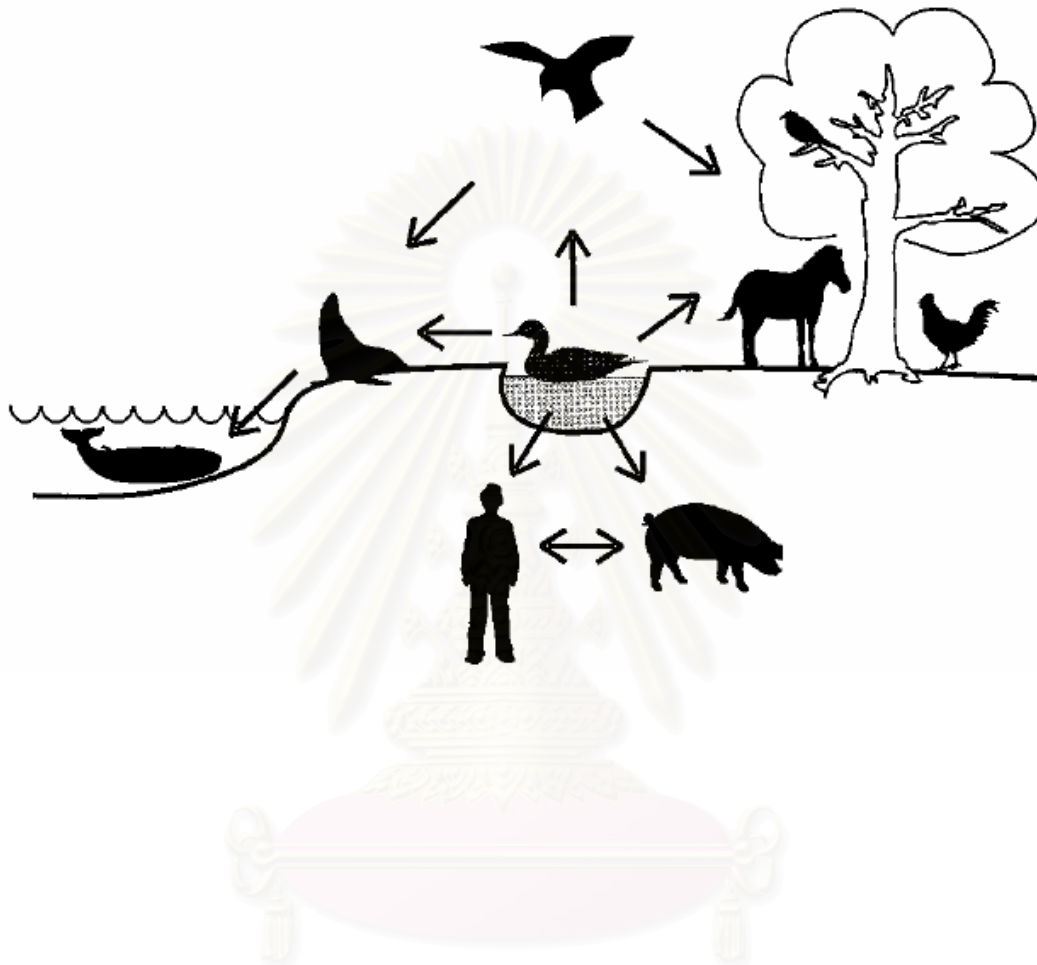
คือการสอดแทรกชิ้นส่วนพันธุกรรม (genetic reassortment) ระหว่างยีนของ influenza virus ด้วยกันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของไวรัสปรากฏเป็นคู่หมายเลขใหม่ของ H และ N ทำให้เกิดเป็น influenza A virus สายพันธุ์ใหม่ได้เร็วยิ่งขึ้น ซึ่งทำให้เกิดโรครุนแรงในมนุษย์และสัตว์เนื่องจากไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสสายพันธุ์ใหม่นั้น และทำให้เกิดการระบาดที่รุนแรงและกว้างขวางขึ้นได้ ดังปรากฏเป็นการระบาดของไข้หวัดใหญ่ของโลกในอดีต ได้แก่ ในปีค.ศ. 1918 เป็นสายพันธุ์ H1N1 (Spanish flu) ในปีค.ศ. 1957 เป็นสายพันธุ์ H2N2 (Asian flu) ปีค.ศ. 1968 เป็นสายพันธุ์ H3N2 (Hong Kong flu) และในปีค.ศ. 1977 เป็นสายพันธุ์ H1N1 (Russian flu) (Nicholson, Wood and Zambon, 2003; WHO, 2004)

2) Antigenic drift

คือการที่ไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เป็นผลมาจากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของ RNA ของไวรัสที่เกิดขบวนการ point mutation อย่างค่อยเป็นค่อยไป ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงหมายเลข H และ N ทำให้ไวรัสสามารถหลบหลีกจากภูมิคุ้มกันของ host ได้ จึงทำให้เกิดการระบาดย่อยที่ไม่รุนแรงในพื้นที่ไม่กว้างนัก (Nicholson, Wood and Zambon, 2003)

2.3 แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติของเชื้อ influenza A virus

Influenza A virus สามารถติดต่อกับและทำให้เกิดโรครุนแรงได้ในสัตว์หลายชนิดได้แก่ สัตว์ปีก สุนัขจิ้งจอก หนู สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อยู่ในทะเล mustelid มิงค์ เสือ เสือดาว (Keawchareon et al, 2004) รวมถึงคนด้วย โดยในนกตระกูลนกเป็ดน้ำ (waterfowl), นกทะเล (shorebird) และนกนางนวล (gull) เป็นแหล่งรังโรคหลักของเชื้อ influenza A virus และสามารถพบเชื้อ influenza A virus ได้ทุกสายพันธุ์ย่อย (subtype) อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่ก่อโรคในนกเหล่านี้เนื่องจากเป็นสัตว์เจ้าบ้านตามธรรมชาติ (natural reservoir) ของเชื้อไวรัสชนิดนี้ โดยในนกเป็ดน้ำเชื้อไวรัสชนิดนี้มีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่ระบบทางเดินอาหารทำให้มีการปล่อยเชื้อไวรัสออกมากับอุจจาระในปริมาณสูงและสามารถติดต่อไปยังสัตว์ชนิดอื่นได้ ขณะที่ในคนเชื้อไวรัสชนิดนี้ก่อโรคและทำให้คนที่ติดเชื้อแสดงอาการทางคลินิกโดยเชื้อไวรัสชนิดนี้มีการเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินหายใจ (รูปที่ 4) (Webby and Webster, 2001; Horimoto and Kawaoka, 2001; Webster, Shortridge and Kawaoka, 1997)



รูปที่ 4 แสดงแหล่งที่อยู่ของ influenza A virus จากการศึกษาด้านนิเวศวิทยาและการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่านกเป็ดน้ำเป็นแหล่งรังโรคหลักของเชื้อ influenza A virus และทำให้เชื้อไวรัสแพร่กระจายไปยังสัตว์ชนิดอื่นได้เช่น สัตว์ปีก สุนัข ม้า สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อยู่ในทะเล mustelid รวมถึงคนด้วย ก่อให้เกิดการระบาดของเชื้อไวรัสในสัตว์ชนิดนั้นๆ (ดัดแปลงจาก Horimoto and Kawaoka, 2001)

2.4 พยาธิกำเนิด (Pathogenesis)

โปรตีน HA ของเชื้อ avian influenza A virus ถูกตัด (cleaved) โดยเอนไซม์ protease ที่อยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อเป้าหมายของโฮสต์ทำให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์โฮสต์ได้ โดยโปรตีน HA ของเชื้อ avian influenza A virus ทุกสายพันธุ์ถูกตัดโดยเอนไซม์ protease ที่บริเวณเซลล์เยื่อบุ (epithelial cell) ที่ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร ในขณะที่โปรตีน HA ของเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง (highly pathogenic avian influenza virus หรือ HPAI) ถูกตัดโดยเอนไซม์ protease ที่บริเวณเนื้อเยื่ออื่นๆในร่างกายโฮสต์นอกเหนือจากที่ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร ทำให้ HPAI สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบรุนแรงหลายระบบและทำให้มีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ได้

พยาธิกำเนิดของเชื้อ avian influenza A virus ในสัตว์ปีกมีความแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือการเพิ่มจำนวนของไวรัสในสัตว์ปีกเกิดได้ทั้งที่ระบบทางเดินอาหาร และระบบทางเดินหายใจ โดยการติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงทำให้เกิด viremia และพบเนื้อตายที่ lymphoid และอวัยวะภายในแบบกระจายเป็นหย่อมๆ (Multifocal lymphoid and visceral necrosis) ซึ่งทำให้เกิดตับอ่อนอักเสบ (pancreatitis), กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis), กล้ามเนื้ออักเสบ (myositis) และเนื้อเยื่อสมองอักเสบ (encephalitis) ตามมา โดยในไก่และไก่วงพบ petechial hemorrhage และ serous exudate ที่เนื้อเยื่อในระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร (Murphy et al, 1999) ไวรัสนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในผนังหลอดเลือดชั้นใน (vascular endothelium) และ perivascular parenchymatous cell ซึ่งมีความสำคัญในการแพร่กระจายของไวรัส (viral dissemination) และทำให้เกิดการติดเชื้อหลายระบบ นอกจากนี้สามารถพบแอนติเจนของไวรัสได้ใน necrotic cardiac myocytes รวมถึงเซลล์ในอวัยวะอื่นๆที่มีเนื้อเยื่อตายและอักเสบ (Horimoto and Kawaoka, 2001) ในสัตว์ปีกทุกสายพันธุ์สามารถพบ neutralizing antibody ได้ในเวลา 3 ถึง 7 วันหลังแสดงอาการและพบว่ามีปริมาณสูงในช่วงอาทิตย์ที่สองและสามารถคงอยู่ได้นาน 18 เดือน (Murphy et al, 1999)

2.5 ลักษณะอาการทางคลินิก (Clinical features)

ลักษณะอาการทางคลินิกของสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ avian influenza A virus มีความหลากหลาย และขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยได้แก่ อายุและชนิดของสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ, ความรุนแรง, การติดเชื้ออื่นร่วมด้วย รวมถึงปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เป็นต้น (Chowton, 1996; Jordan, 1990) ปกติแล้วเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงทำให้สัตว์ปีกที่ติดเชื้อตายอย่างรวดเร็วโดยไม่แสดงอาการ อย่างไรก็ตามในการระบาดของเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงส่วนใหญ่สัตว์ปีกที่ติดเชื้อแสดงอาการเด่นที่ระบบทางเดินหายใจ, ความสามารถในการวางไข่ลดลง, มีเสียงหายใจผิดปกติ (rale), หงอนและเหนียงมีสีคล้ำ, มีอาการบวมที่หัวและหน้า, ขนหยอง, ท้องเสียและแสดงอาการผิดปกติที่ระบบประสาท (Horimoto and Kawaoka, 2001) ส่วนเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง (LPAI) สามารถทำให้เกิดความสูญเสียเป็นอย่างมากได้เช่นกันเนื่องจากสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ LPAI แสดงอาการเบื่ออาหาร (anorexia), ความสามารถในการวางไข่ลดลง, ซึม และแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจ (Murphy et al, 1999; Jordan, 1990)

2.6 การติดต่อของเชื้อ avian influenza A virus จากสัตว์สู่คน (Zoonotic aspects)

ปกติแล้วเชื้อไวรัสนี้ไม่ติดต่อโดยตรงและไม่ระบาดในมนุษย์ (CDC, 2004) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันเป็นที่แน่ชัดแล้วว่าเชื้อ avian influenza A virus สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ (zoonosis) ซึ่งมีรายงานการติดต่อและการระบาดในคนหลายกรณี โดยเกิดจากเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1, H7N7, H9N2 และ H7N3 (Rezza, 2005) มีรายงานว่าเชื้อ avian influenza A virus สามารถติดต่อสู่คนได้เป็นครั้งแรกที่ฮ่องกงในปี ค.ศ. 1997 โดยเกิดจากเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 โดยพบว่ามีผู้ติดเชื้อทั้งหมด 18 คน เสียชีวิต 6 คน (Claas et al, 1998; Tam, 2002; Zhou et al, 1999) ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 มีรายงานการติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 สองรายในครอบครัวชาวฮ่องกงที่เดินทางไปสาธารณรัฐประชาชนจีน (Weir, Wong and Gemmill, 2004) ต่อมาในเดือนมกราคม ค.ศ. 2004 ประเทศเวียดนามยืนยันการป่วยตายของคนที่เกี่ยวข้องกับไก่ที่ล้มตายจำนวนมากจากเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 (Tran et al, 2004) สำหรับในประเทศไทยในเดือนมกราคม ค.ศ. 2004 ได้มีการยืนยันการป่วยตายของคนที่ไม่สัมผัสกับสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 โดยปัจจุบันในประเทศไทยพบมีผู้

ติดเชื้อทั้งหมด 22 คน เสียชีวิต 14 คน (WHO, 2006) นอกจากเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 แล้วเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์อื่นๆที่มีรายงานว่าสามารถติดต่อสู่คนได้คือ สายพันธุ์ H7N7 สายพันธุ์ H9N2 และสายพันธุ์ H7N3 ในปีค.ศ. 1996 สามารถเพาะแยกเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H7N7 ได้จากตาของผู้หญิงเลี้ยงเป็ดชาวอังกฤษที่ป่วยเป็นโรคเยื่อตาขาวอักเสบ (conjunctivitis) (Kurtz, Manvell and Banks, 1996) ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 มีรายงานการติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H7N7 ในคนมากกว่า 80 ราย และผู้ป่วยหนึ่งราย เสียชีวิต โดยผู้ป่วยและตายเกี่ยวข้องกับสัตว์ปีกหรือกำจัดสัตว์ปีกในระหว่างการระบาดของไข้หวัดนกในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Fouchier et al, 2004; Koopmans et al, 2004) และพบว่าในปีค.ศ. 1998 1999 และ 2003 สามารถแยกเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H9N2 ได้ในผู้ป่วยชาวฮ่องกงซึ่งมีลักษณะการป่วยไม่รุนแรง (influenza-like symptom) และหายเองได้ (Nicholson, Wood and Zambon, 2003; Peiris et al, 1999; Saito et al, 2001) ล่าสุดในช่วงต้นปีค.ศ. 2004 มีรายงานพบผู้ป่วย 2 รายติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H7N3 ในขณะที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวในสัตว์ปีกที่เมือง British Columbia ประเทศ Canada โดยผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีลักษณะอาการป่วยที่ไม่รุนแรง (mild influenza like illness) และหายเองได้ (Hirst et al, 2004) จะเห็นได้ว่าการติดต่อของเชื้อ avian influenza A virus จากสัตว์สู่คนนั้นถึงแม้ว่าพบได้ค่อนข้างยากแต่สามารถเกิดขึ้นได้โดยเกิดจากการติดเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ดังกล่าวไว้ข้างต้น

2.7 การตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus

เนื่องจากโรคไข้หวัดนกมีลักษณะอาการทางคลินิก (clinical symptom) ที่หลากหลายทำให้การวินิจฉัยโรคโดยพิจารณาจากอาการทางคลินิกนั้นทำได้ยาก (Swayne and Senne, 2003) ดังนั้นจึงต้องใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการเข้ามาช่วยในการวินิจฉัยโรค ซึ่งวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกในปัจจุบันคือ การเพาะแยกเชื้อไวรัส (Virus isolation) ในไข่ไก่ฟัก (Embryonated fowl's egg) หรือในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เช่น Mardin-Darby canine kidney cell (MDCK cell) ตามด้วยวิธี Hemagglutination inhibition test (HI) เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสดังกล่าว ซึ่งวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูง (Shan et al, 2003; Sugimura, Murakami and Ogawa, 2000; Murray et al, 1999) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือมีราคาแพง ใช้เวลานาน (1-2 สัปดาห์) และสิ้นเปลืองแรงงานมาก

วิธีการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ avian influenza A virus มีอยู่ด้วยกันหลายวิธีได้แก่ Enzyme-linked immunoassay, Immunofluorescence assay โดยวิธีนี้สามารถรายงานผลได้ในเวลารวดเร็วกว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะต่ำกว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส (Boivin, Hardy and Kress, 2001; Murray et al, 1999; Hayden and Palese, 1997)

การวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาทำได้โดยดูการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีต่อสายพันธุ์นั้นๆ โดยสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้หลังจากมีการติดเชื้อไปแล้วประมาณ 7-10 วัน (Swayne and Senne, 2003) ซึ่งวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องเก็บซีรัมจากสัตว์ป่วยสองช่วงเวลาคือระยะเฉียบพลัน (acute) และระยะพักฟื้น (convalescence) ทำให้วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมนักเมื่อต้องการตรวจวินิจฉัยโรคให้ได้ผลภายในเวลารวดเร็ว (Lamb and Krug, 2001) วิธีทางซีรัมวิทยาที่ใช้กันมากคือ วิธี Haemagglutination-inhibition (HI) และ Neuraminidase inhibition (NI) assay ซึ่งมักใช้ในการกำหนดสายพันธุ์ของ influenza A virus อย่างไรก็ตามการเตรียม antisera ที่ใช้ใน HI และ NI assay ต้องใช้เวลานานและการแยกสายพันธุ์ด้วยวิธีนี้บางครั้งอาจให้ผลผิดพลาดได้ (Hoffmann et al, 2001) วิธีวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาอื่นๆที่นำมาใช้ในการวินิจฉัย avian influenza A virus ได้แก่ single radial hemolysis, radial immunodiffusion, passive hemagglutination และ complement fixation เป็นต้น (Lamb and Krug, 2001; Swayne and Senne, 2003)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology techniques) มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ avian influenza A virus กันอย่างกว้างขวาง โดยพบว่ามี การนำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้แทนวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส ซึ่งถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus เนื่องจากวิธีทางอณูชีววิทยาทราบผลเร็ว แต่ความไวสูงการเพาะแยกเชื้อไวรัสไม่ได้ (Cherian, 1994) และมีความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธี อื่นๆที่กล่าวมา (Atmar et al, 1996; Boivin, Hardy and Kress, 2001) ซึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ วิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), วิธี multiplex RT-PCR, วิธี real-time RT-PCR และวิธี microarray มีการนำเอาวิธี RT-PCR มาใช้ในการ ตรวจวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1991 (Zhang and Evans, 1991) จากนั้นมีรายงานการนำวิธี RT-PCR มาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ influenza A virus กันอย่างแพร่หลาย (Claas et al, 1993; Claas et al, 1992; Wright et al, 1995) มีการนำเอาวิธี RT-PCR มาใช้ในการ

วินิจฉัย influenza A virus ในตัวอย่างส่งตรวจจากคอและจมูกที่เก็บจากคน สุนัข และม้า (Schorr, Wentworth and Hinshaw, 1994; Oxburgh and Hagstrom, 1999) ต่อมาจึงนำเอาวิธี RT-PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus ในสัตว์ปีก (Dybkaer et al, 2004; Lee et al, 2001; Munch et al, 2001) และใช้ในการบอกลายพันธุ์ย่อยของ influenza A virus ทั้ง 15 subtypes (Hoffmann et al, 2001; Poddar, 2002) เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการพัฒนาวิธี multiplex RT-PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ influenza A virus ในคน (Stockton et al, 1998; Payungporn et al, 2004) ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus ด้วยกันอีกหลายวิธีได้แก่ real-time RT-PCR (Spackman et al, 2002), NASBA (Collins et al, 2003), microarray (Li, Chen and Evans, 2001), fluorescent resonance energy transfer (FRET) probe (Smith et al, 2003) และ molecular beacon (Templeton et al, 2004) ซึ่งวิธีเหล่านี้สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus ได้อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะมากกว่าสองวิธีแรกที่กล่าวมา อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ทำให้ห้องปฏิบัติการที่ขาดแคลนเครื่องมือเหล่านี้ไม่สามารถใช้วิธีดังกล่าวในการตรวจวินิจฉัยได้

2.8 วิธี Multiplex RT-PCR

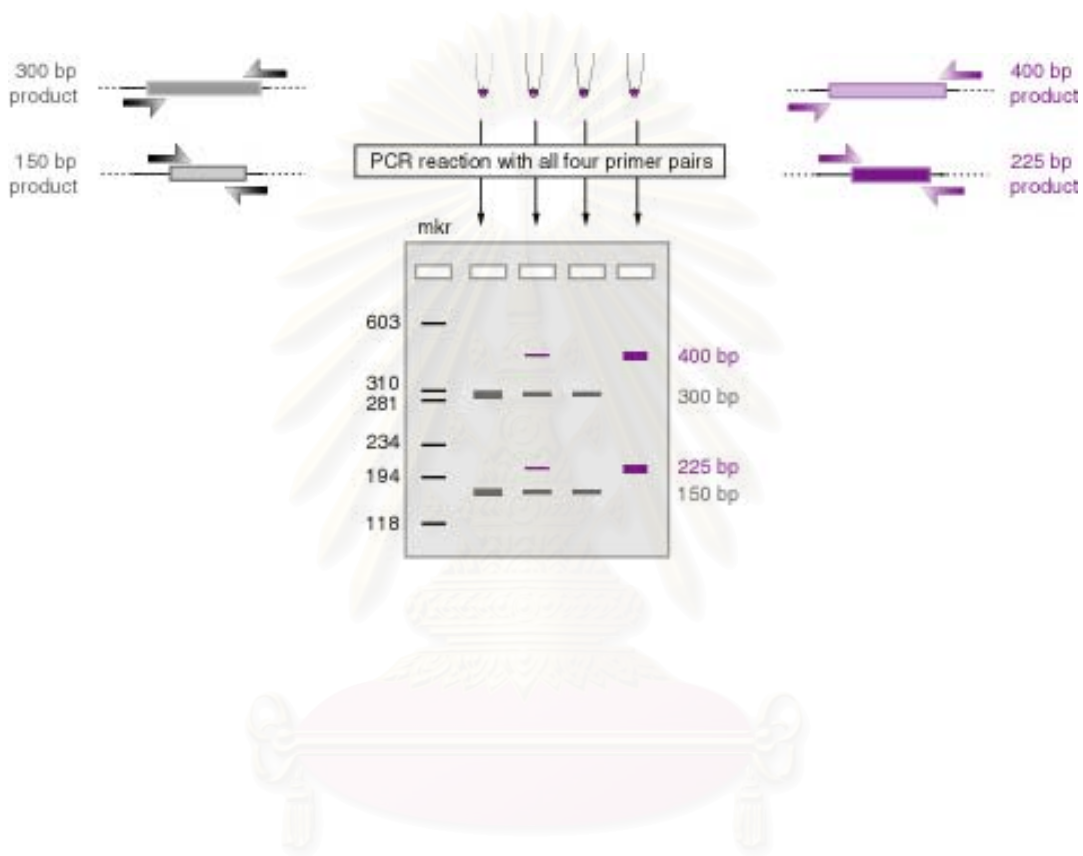
วิธี Multiplex RT-PCR เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธี PCR พื้นฐานโดยให้สามารถเพิ่มขยายหลายๆ target DNAs ด้วย primers หลายคู่พร้อมๆ กันในปฏิกิริยาเดียวกัน ปัจจุบันได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อทางไวรัสโดยสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหลายชนิดได้ในขณะเดียวกัน (Daum et al, 2002; Phan et al, 2005; Rohayem et al, 2004) โดยวิธี multiplex RT-PCR มีข้อดีกว่าวิธี RT-PCR ทั่วไปได้แก่ ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธี RT-PCR, ลดโอกาสการปนเปื้อนที่เกิดจากการทำ PCR หลายขั้นตอน รวมถึงวิธีนี้ทำให้ประสิทธิภาพของการทดสอบสูงขึ้นเนื่องจากสามารถตรวจหาเชื้อหลายชนิดได้ในการตรวจเพียงครั้งเดียวแทนที่การตรวจหลายครั้งเมื่อใช้วิธี RT-PCR ทั่วไป อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีนี้มีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ทั่วไป (Spackman et al, 2003)

ปัจจุบันได้มีการนำเอาวิธี multiplex RT-PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสหลายชนิด โดยวิธีดังกล่าวสามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสได้หลายชนิดในการตรวจเพียงครั้งเดียว (Malik et al, 2004; Caterina et al, 2004) ต่อมาได้มีการนำเอาวิธี multiplex RT-PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ

influenza A virus สายพันธุ์ต่างๆที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในคน พบว่าวิธีดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะสูงและสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ influenza A virus ในตัวอย่างส่งตรวจจากคนได้เป็นอย่างดี (Stockton et al, 1998; Payungporn et al, 2004)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนของวิธี multiplex RT-PCR (Miesfeld, 2005)

สงวนลิขสิทธิ์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive research)

3.2 วัตถุประสงค์

3.2.1 เชื้อไวรัสอ้างอิง

Avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 ที่แยกได้ในประเทศไทย (A/chicken/ Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04(H5N1)) และ cDNA ของ Avian influenza A virus สายพันธุ์ H7N7(A/chicken/Netherland/1/03(H7N7)) และ สายพันธุ์ H9N2 (influenza/A/turkey/Wisconsin/66(H9N2)) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Albert Osterhaus จาก Department of Virology, Erasmus Medical Centre, Rotterdam, The Netherlands, standard strains ของกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และเชื้อ Newcastle disease virus (NDV), Infectious bronchitis virus (IBV) , Infectious laryngotracheitis virus (ILT), Infectious bursal disease virus (IBD), Human respiratory syncytial virus (HRSV) และ Human metapneumovirus (hMPV)

3.2.2 ตัวอย่างที่นำมาทำการศึกษา

เชื้อไวรัสที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากชิ้นเนื้อจากปอดหรืออวัยวะภายในจากสัตว์ปีกที่มีประวัติอาการหรือรอยโรคสงสัยว่ามีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ avian influenza A virus และตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่ได้จากการเฝ้าระวังด้านระบาดวิทยาของ Avian influenza ในประเทศไทย โดย

ตัวอย่างเหล่านี้ให้ผลบวกต่อการทดสอบ influenza A virus จากการปรากฏของ matrix (M) gene ของไวรัสดังกล่าวด้วยวิธี RT-PCR (Payungporn et al, 2004) จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยมียีน Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็น internal control gene ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวประกอบด้วยตัวอย่างจากเบ็ด 16 ตัวอย่าง, ไก่ 11 ตัวอย่าง, นกพิราบ, นกปากห่าง และนกกระทาอย่างละ 1 ตัวอย่าง

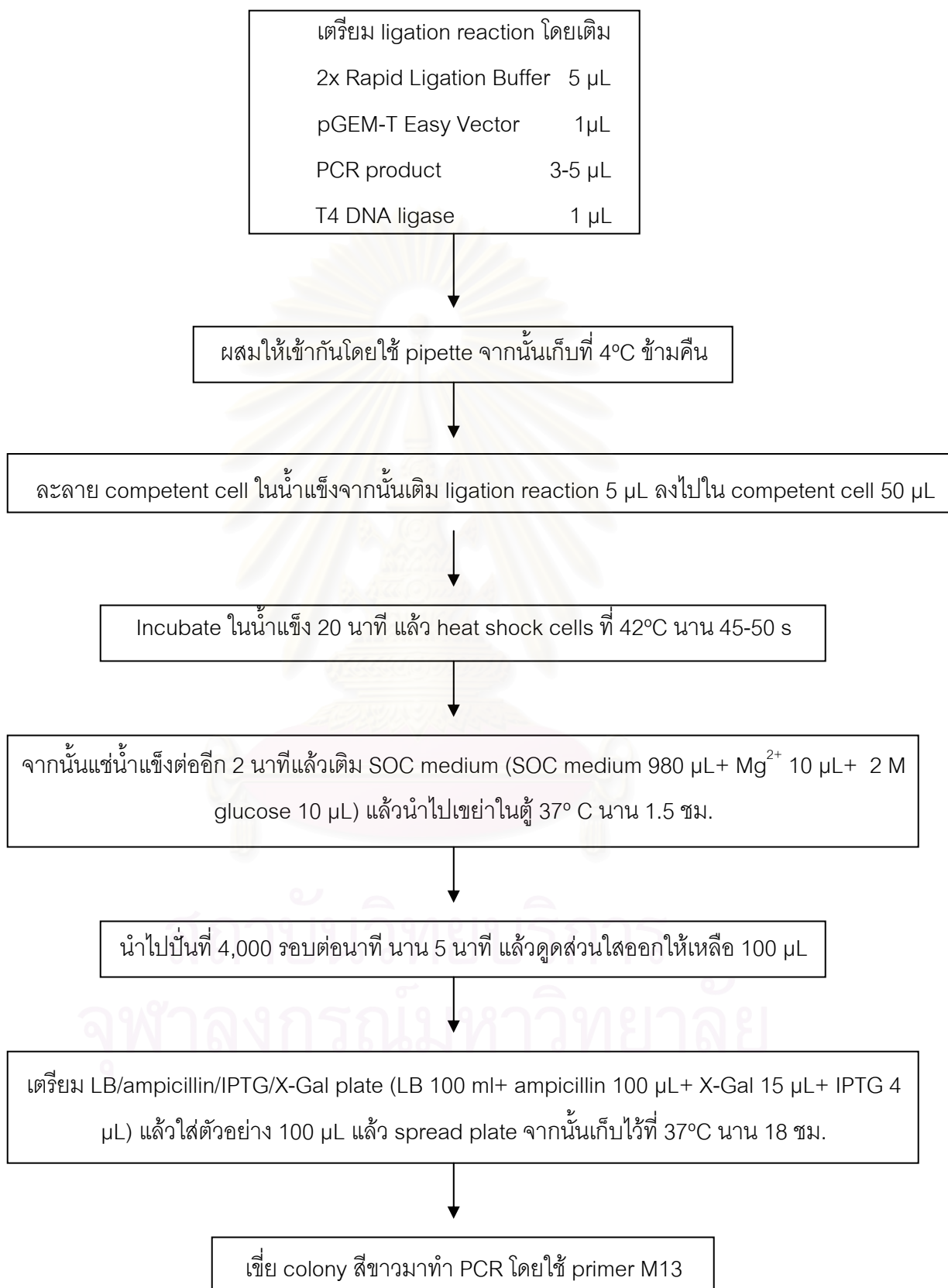
3.3 วิธีการทดลอง

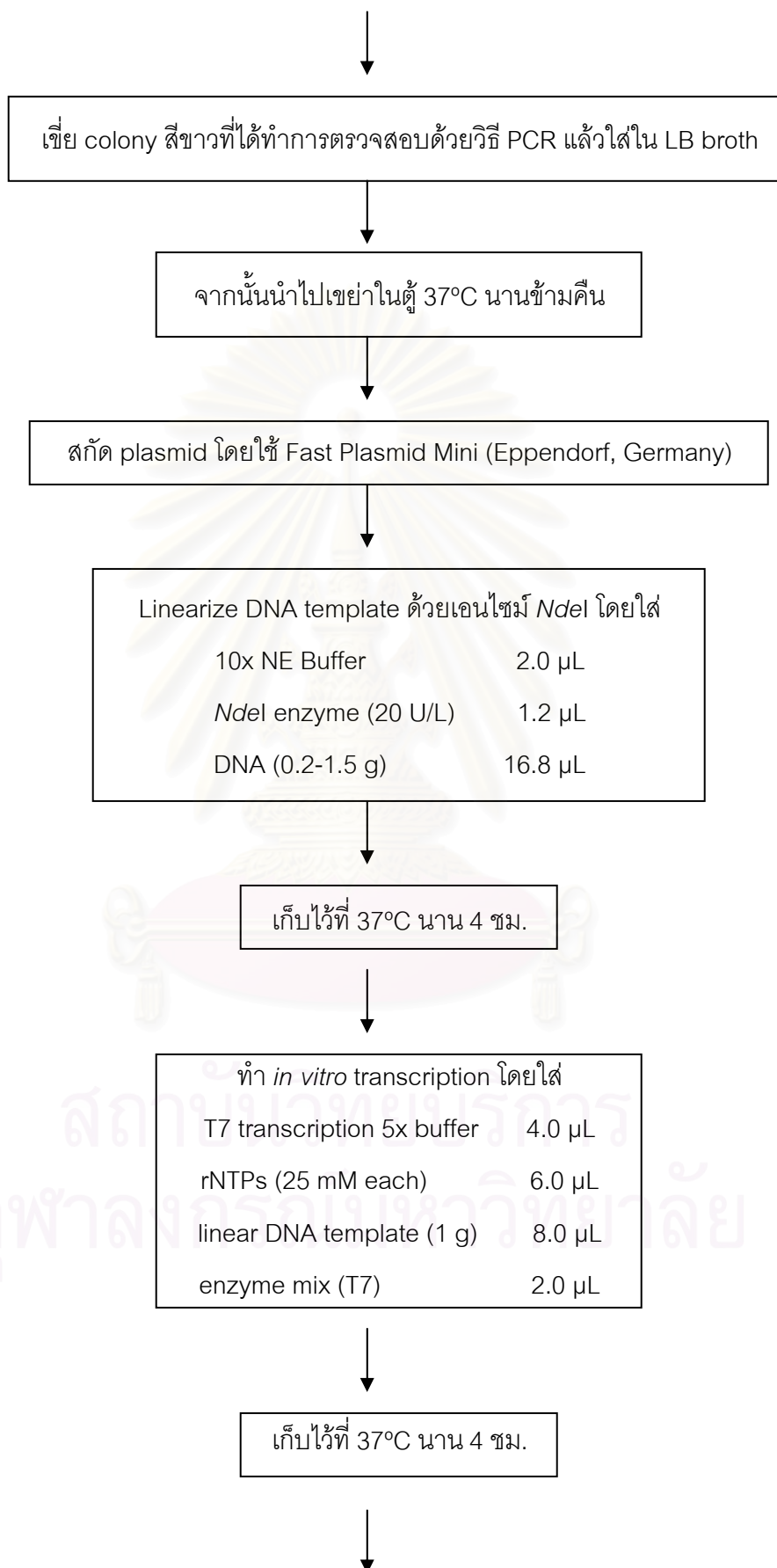
3.3.1 ออกแบบ สังเคราะห์ และทดสอบ primer ที่จำเพาะต่อยีน H5 H7 และ H9 ของ avian influenza A virus

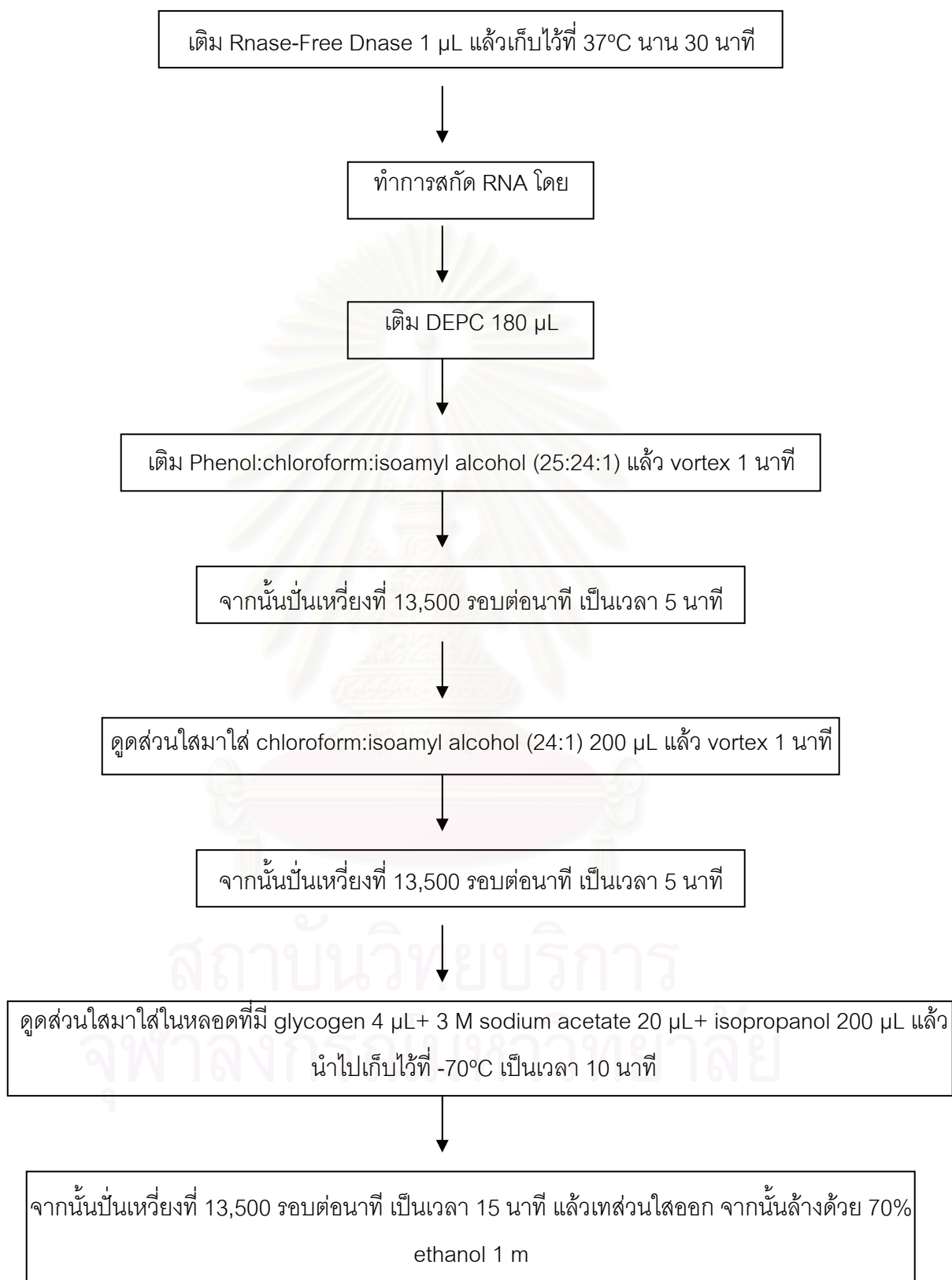
หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน H5 H7 และ H9 ของ avian influenza A virus จาก GenBank data base (www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยเลือกส่วนที่เป็น conserved region ของแต่ละยีน เพื่อใช้เป็น specific primer จากนั้นทำการทดสอบด้วยโปรแกรม Oligo เพื่อใช้ในการคัดเลือกชุด primers ที่ไม่ทำให้เกิด primer dimer, self-complementary และ hair pin loop แล้วจึงนำชุด primers ที่เหมาะสมมาทดสอบใน Multiplex RT-PCR เพื่อคัดเลือกชุด primers ที่ให้ band ที่ชัดเจนและเหมาะสมในการอ่านผล

3.3.2 การ clone ชิ้นส่วนยีนของ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5 H7 และ H9 เข้าสู่ cloning vector และทำ *in vitro* transcription เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมบวก

ทำการ clone ยีน H5, H7 และ H9 เข้าสู่ cloning vector (pGEM-T Easy Vector, Promega, USA) ตามคำแนะนำของบริษัท และทำ *in vitro* transcription (RiboMAX™ Large scale RNA production system SP6 and T7, Promega, USA) ดังรูปที่ 6 เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมบวก สำหรับการใช้ในการพัฒนาวิธี one step multiplex RT-PCR









นำไปทำให้แห้งโดยใช้ vacuum แล้วละลายตะกอนด้วย DEPC 20 μ L จากนั้นเก็บไว้ที่ -70°C

รูปที่ 6 แสดงวิธีการ clone ชิ้นส่วนยีน haemagglutinin ของเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5, H7 และ H9 เข้าสู่ cloning vector และทำ *in vitro* transcription



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำ one step multiplex RT-PCR

โดยทำการทดสอบกับตัวควบคุมบวกของ avian influenza A virus subtype H5, H7 และ H9 ที่กล่าวมาข้างต้น

3.3.4 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธี one step multiplex RT-PCR

ทำการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธี one step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น โดยทำการทดสอบกับไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจที่สำคัญในไก่และมนุษย์ ได้แก่ Newcastle disease virus (NDV), Infectious bronchitis virus (IBV), Infectious laryngotracheitis virus (ILT), Infectious bursal disease virus (IBD), Human respiratory syncytial virus (HRSV), Human metapneumovirus (hMPV) และ non-inoculated allantoic fluid นอกจากนี้ทำการทดสอบกับ avian influenza A virus subtype อื่นๆ H1 ถึง H15 นอกเหนือจาก H5, H7 และ H9 (standard strains จากกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

3.3.5 การทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธี one step multiplex RT-PCR

จากการวัดความเข้มข้นของ *in vitro* transcribed RNA ของ H5 H7 และ H9 โดยการทำ *in vitro* transcription (RiboMAX™ Large scale RNA production system SP6 and T7, Promega, USA) แล้วทำการคำนวณเป็นหน่วย copies/ μ L จากนั้นทำ 10-fold serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ $10 \cdot 10^7$ copies/ μ L แล้วนำมาทดสอบความไวด้วยวิธี Multiplex RT-PCR

3.3.6 การทดสอบระบบ one step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น

เชื้อไวรัสที่แยกได้จากชิ้นเนื้อจากปอดหรืออวัยวะภายในจากสัตว์ปีกที่มีประวัติอาการหรือรอยโรคสงสัยว่ามีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ avian influenza A virus และตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่ได้จากการเฝ้าระวังด้านระบาดวิทยาของ Avian influenza ในประเทศไทย โดยตัวอย่างเหล่านี้ให้ผลบวกต่อการทดสอบ influenza A virus จากการปรากฏของ matrix (M) gene ของไวรัสดังกล่าว

ด้วยวิธี RT-PCR (Payungporn et al, 2004) จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยมียีน Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็น internal control gene

ขั้นตอนการทำ one step multiplex RT-PCR

ทำการทดสอบระบบ one step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นกับเชื้อไวรัสที่แยกได้จากชิ้นเนื้อจากปอดหรืออวัยวะภายในที่มีรอยโรคจากสัตว์ปีกและตัวอย่างส่งตรวจที่ได้จากการเฝ้าระวังด้านระบาดวิทยาของ Avian influenza ในประเทศไทย จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างที่ได้มาเพาะแยกเชื้อในไข่ไก่ฟักโดยทำการฉีด supernatant fluid ของ specimen suspension เข้าใน allantoic cavity ของไข่ไก่ฟักที่มีอายุ 9 วัน จากนั้นเก็บไว้ที่ 37°C นาน 48-72 ชั่วโมง แล้วนำเอา allantoic fluid ที่เก็บได้มาทำการสกัด RNA ด้วยวิธี QIAamp® viral RNA Mini kit (QIAGEN, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังรูปที่ 7 แล้วนำ RNA ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี one step multiplex RT-PCR โดยใช้ AccessQuick™ RT-PCR system (Promega, USA) และเครื่อง Thermocycle (Perkin Elmer Cetus 9600, CA, USA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Allantoic fluid 140 μ L+ buffer AVL containing carrier RNA 560 μ L

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

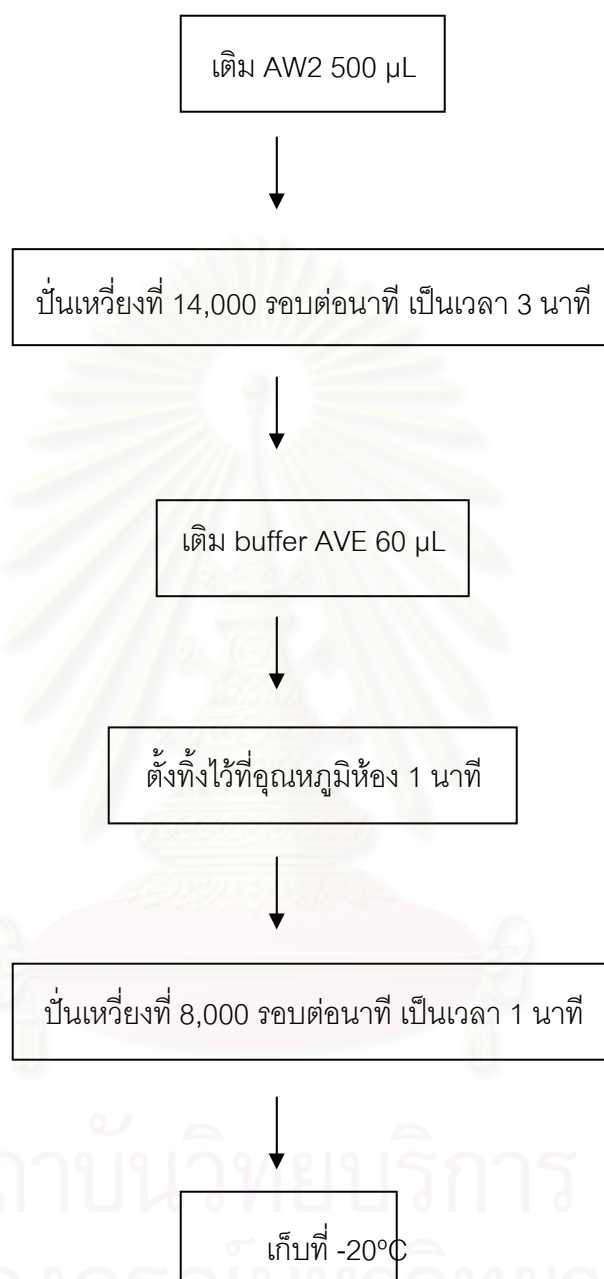
เติม 100% ethanol 560 μ L (vortex)

นำสารละลายที่ได้ใส่ลงใน QIASpin column

ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

เติม AW1 500 μ L

ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที



รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการสกัด RNA

การตรวจหา RT-PCR product

นำผลผลิตที่ได้จำนวน 10 μ L ไปวิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis โดยมี 100 bp DNA ladder (GIBCO BRL life Technologies Inc., Gaithersburg) เป็น marker เปรียบเทียบ และย้อมด้วย Ethidium bromide (2 μ L/ml) ดูผลด้วยกล้อง UV transilluminator ซึ่งจะให้ band ที่มีขนาดตามที่ได้คาดหมายไว้ในแต่ละ subtype ของ avian influenza A virus



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการออกแบบ สังเคราะห์ และทดสอบ primer ที่จำเพาะต่อยีน H5 H7 และ H9 ของ avian influenza A virus

ทำการออกแบบ primers ที่จำเพาะต่อยีน H5 จำนวน 10 สาย, H7 จำนวน 7 สาย และ H9 จำนวน 4 สาย ดังรูปที่ 9 จากนั้นทำการทดสอบด้วยโปรแกรม Oligo เพื่อใช้ในการคัดเลือกชุด primers ที่ไม่ทำให้เกิด primer dimer, self-complementary และ hair pin loop รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3 แล้วจึงนำชุด primers ที่เหมาะสมมาทดสอบใน Multiplex RT-PCR เพื่อคัดเลือกชุด primers ที่ให้ band patterns ที่ชัดเจนและเหมาะสมในการอ่านผล ซึ่งจากการทดลองชุด primers ทั้งสิ้น 14 ระบบ ซึ่งมีรายละเอียดของชุด primers ดังตารางที่ 4 พบว่าชุด primers ระบบที่ II, IX และ XII ให้ band patterns ที่ชัดเจนและเหมาะสมในการอ่านผลมากที่สุด ดังรูปที่ 10 แต่เนื่องจากพบว่าชุด primers ระบบที่ II สามารถเกิด cross-reactivity กับ Newcastle disease virus (NDV) และชุด primers ระบบที่ IX สามารถเกิด cross-reactivity กับ influenza A virus สายพันธุ์ H10 ได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ชุด primers ระบบที่ XII ในการศึกษาทดลองต่อไป ซึ่งชุด primers ระบบที่ XII ให้ผลผลิตขนาดต่างๆกันดังนี้ H5 (157 bp), H7 (326 bp) และ H9 (231 bp) ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 11 รายละเอียดของส่วนประกอบและอุณหภูมิในการทำ PCR แสดงในตารางที่ 6 และ 7

4.2 ผลการ clone ชิ้นส่วนยีนของ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5 H7 และ H9 เข้าสู่ cloning vector และทำ *in vitro* transcription เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมบวก

ได้ทำการ clone ยีน H5(nt 409-565), H7(nt 465-1630) และ H9(nt 170-1340) เข้าสู่ cloning vector (pGEM-T Easy Vector, Promega, USA) ตามคำแนะนำของบริษัท (รูปที่ 8) และทำ *in vitro* transcription (RiboMAX™ Large scale RNA production system SP6 and T7, Promega, USA) เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมบวกสำหรับการพัฒนาวิธี one step multiplex RT-PCR



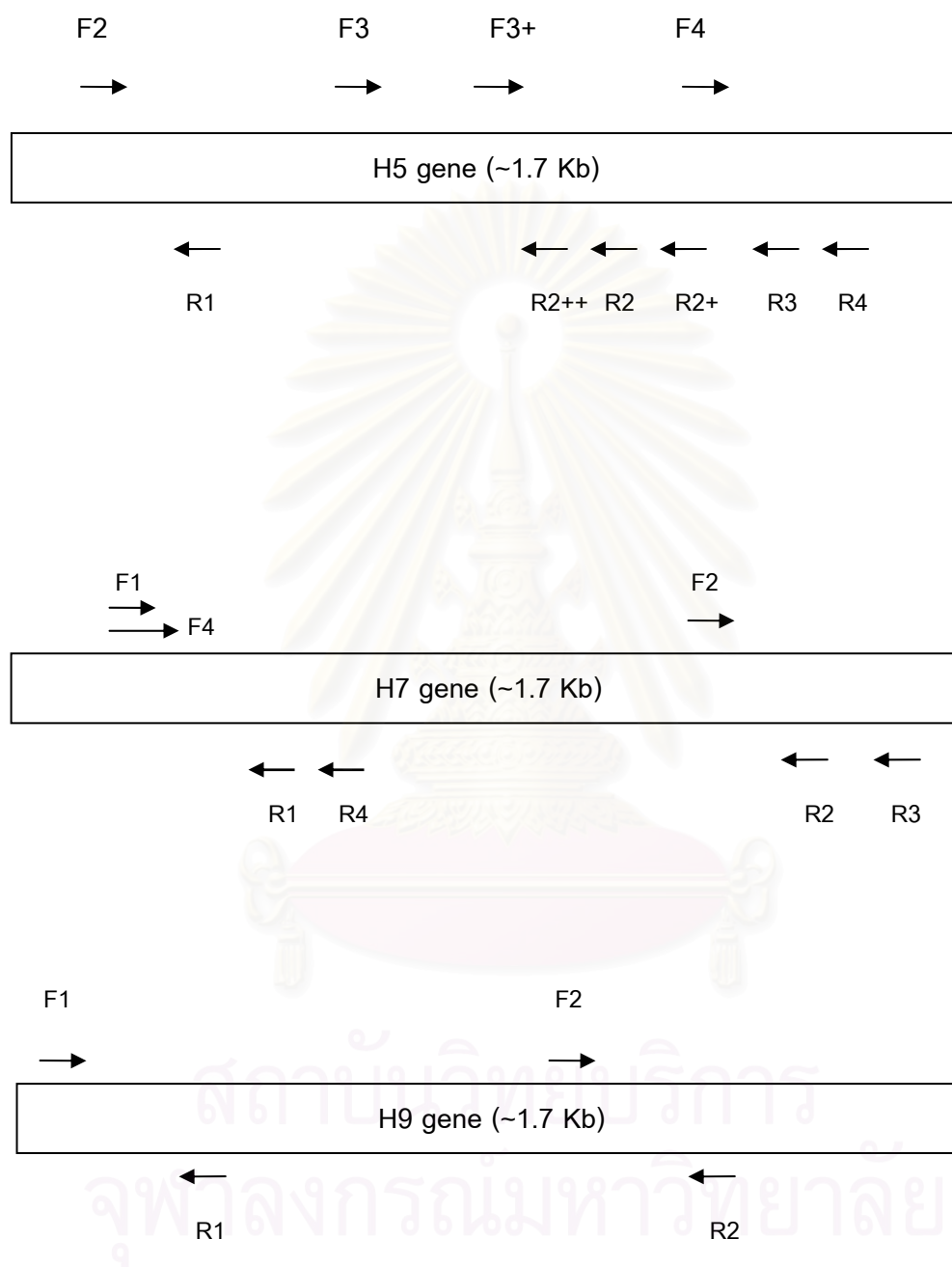
Lane 1: 100 bp ladder marker

Lane 2: H7 plasmid DNA

Lane 3: H9 plasmid DNA

รูปที่ 8 แสดง Plasmid DNA ของยีน H7 และ H9 ที่ clone ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูป 9 แสดง primers ที่จำเพาะกับตำแหน่งของยีน H5, H7 และ H9

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดของ primers ที่จำเพาะกับส่วนของยีน H5, H7 และ H9 ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

Gene target	Primer name	Position	Primer sequence	Amplicon length (bp)
H5	H5-F4	1400-1422	5'-GACTCAAATGTCAAGAACCTTTA-3'	189
	H5-R3	1577-1554	5'- CCACTTATTTCTCTCTGTTTAG-3'	
	H5-F3	898-919	5'- ACTCCAATGGGGGCGATAAAC-3'	352
	H5-R2	1265-1245	5'- TGTTGACAAAATGACCATCG-3'	
	H5-F2	409-430	5'- TGAGAAAATTCAGATCATCCCC-3'	157
	H5-R1	565-543	5'- GCTCCTCTTTATTGTTGGGTATG-3'	
	H5-F4	1400-1422	5'-GACTCAAATGTCAAGAACCTTTA-3'	327
	H5-R4	1748-1706	5'- CAAATTCTGCATTGTAACGATCC-3'	
	H5-F3+	1001-1021	5'- AACAGATTAGTCCTTGCGACTG-3'	264
	H5-R2	1265-1245	5'- TGTTGACAAAATGACCATCG-3'	
	H5-F3	898-919	5'-ACTCCAATGGGGGCGATAAAC-3'	205
	H5-R2+	1124-1103	5'-CATCTACCATTCCCTGCCATCC-3'	
	H5-F3	898-919	5'-ACTCCAATGGGGGCGATAAAC-3'	187
	H5-R2++	1101-1080	5'-CCCTCTATAAACCTGCTATAG-3'	
	H5-F3+	1001-1021	5'- AACAGATTAGTCCTTGCGACTG-3'	123
	H5-R2+	1124-1103	5'-CATCTACCATTCCCTGCCATCC-3'	
H7	H7-F1	466-488	5'- AGATCAGGTTCTTCTTTCTATGC-3'	300
	H7-R1	765-743	5'- AAGTGAAAGTCACTGTGTCATTG-3'	
	H7-F2	1460-1480	5'- GGAGAATGCTGRAGAAGATGG-3'	170
	H7-R2	1630-1610	5'- TGATGCCCCGAAGCTAAACCA-3'	
	H7-F2	1460-1480	5'- GGAGAATGCTGRAGAAGATGG-3'	280
	H7-R3	1740-1716	5'-CTTCAAACCTATATACAAATAGTGC-3'	
	H7-F4	465-487	5'-AAGATCAGGTTCTTCTTTCTATG-3'	326
	H7-R4	790-768	5'-TGAAAGTGAAGGTCCTGTGTC-3'	

Gene target	Primer name	Position	Primer sequence	Amplicon length (bp)
H9	H9-F1	170-192	5'- TGCCAAAGAATTGCTCCACACA-3'	120
	H9-R1	290-269	5'- AAGTGAAAGTCACTGTGTCATTG-3'	
	H9-F2	1110-1131	5'-ATTCAAATGATCAAGGGGTTGG-3'	231
	H9-R2	1340-1318	5'- GTGTTTTCTGGTTTTCAAGCAG-3'	

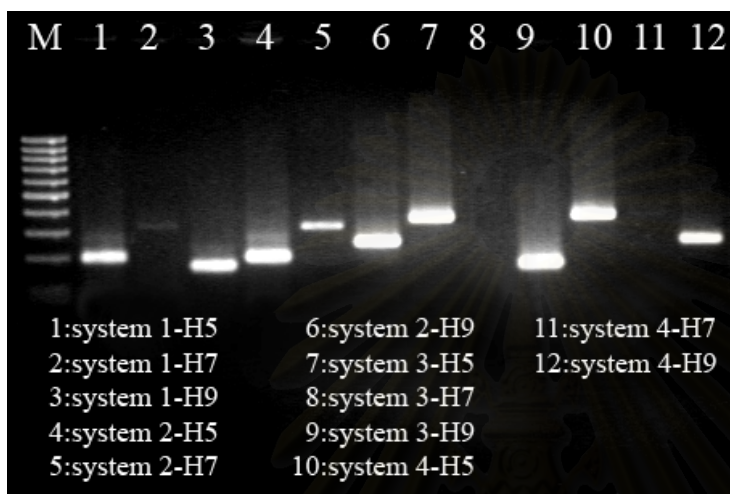


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงการเลือกใช้ชุด primers ทั้งสิ้น 14 ระบบ ในการทำ Multiplex RT-PCR

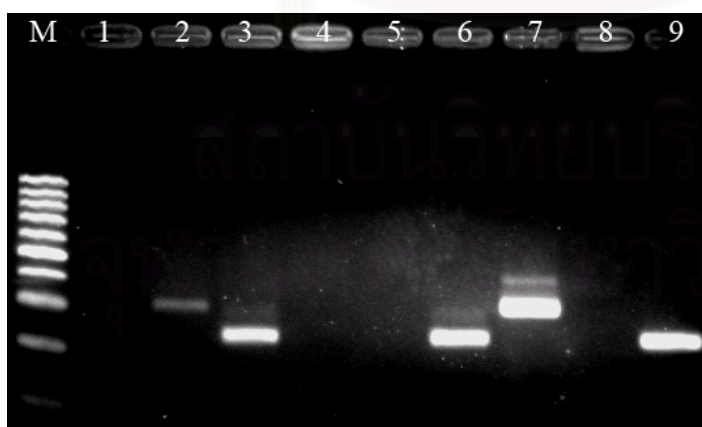
System	H5	H7	H9
I	F4/R3 (189)	F1/R1 (300)	F1/R1 (120)
II	F4/R3 (189)	F1/R1 (300)	F2/R2 (231)
III	F3/R2 (352)	F1/R1 (300)	F1/R1 (120)
IV	F3/R2 (352)	F1/R1 (300)	F2/R2 (231)
V	F2/R1 (157)	F1/R1 (300)	F2/R2 (231)
VI	F2/R1 (157)	F2/R3 (280)	F2/R2 (231)
VII	F4/R4 (327)	F2/R3 (280)	F2/R2 (231)
VIII	F3+/R2 (264)	F2/R2 (170)	F2/R2 (231)
IX	F3+/R2 (264)	F2/R2 (170)	F1/R1 (120)
X	F3/R2+ (205)	F4/R4 (326)	F1/R1 (120)
XI	F3+/R2+ (123)	F4/R4 (326)	F2/R2 (231)
XII	F2/R1 (157)	F4/R4 (326)	F2/R2 (231)
XIII	F3/R2++ (187)	F4/R4 (326)	F1/R1 (120)
XIV	F3+/R2 (264)	F4/R4 (326)	F1/R1 (120)

(ก) ชุด primers ระบบที่ I-IV



1: system I- H5	7: system III- H5
2: system I- H7	8: system III- H7
3: system I- H9	9: system III- H9
4: system II- H5	10: system IV- H5
5: system II- H7	11: system IV- H7
6: system II- H9	12: system IV- H9

(ข) ชุด primers ระบบที่ V-VII



1: system V- H5	7: system VII- H5
2: system V- H7	8: system VII- H7
3: system V- H9	9: system VII- H9
4: system VI- H5	
5: system VI- H7	
6: system VI- H9	

(ค) ชุด primers ระบบที่ VIII



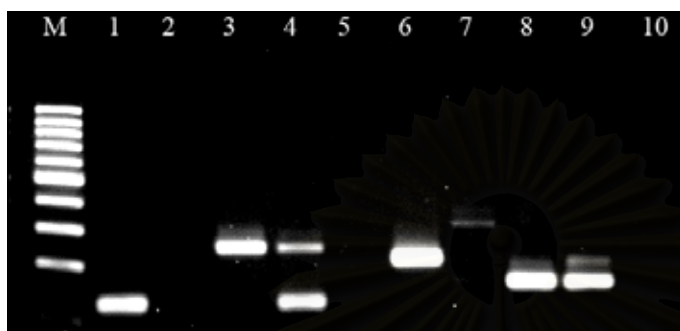
1: system VIII- H5
2: system VIII- H7
3: system VIII- H9

(ง) ชุด primers ระบบที่ IX



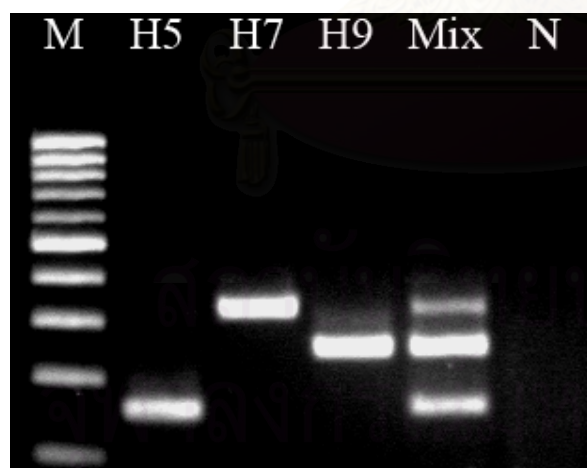
1: system IX- H5
2: system IX- H7
3: system IX- H9

(จ) ชุด primers ระบบที่ X-XI



- 1: system X- H5
- 2: system X- H7
- 3: system X- H9
- 4: system X- mix templates
- 5: system X- ตัวควบคุมลบ
- 6: system XI- H5
- 7: system XI- H7
- 8: system XI- H9
- 9: system XI- mix templates
- 10: system XI- ตัวควบคุมลบ

(ข) ชุด primers ระบบที่ XII



- Lane 1: system XII- H5
- Lane 2: system XII- H7
- Lane 3: system XII- H9
- Lane 4: system XII-mix templates
- Lane 5: system XII-ตัวควบคุมลบ

(ข) ชุด primers ระบบที่ XIII-XIV



- 1: system XIII- H5
- 2: system XIII- H7
- 3: system XIII- H9
- 4: system XIII-mix templates
- 5: system XIII-ตัวควบคุมลบ
- 6: system XIV-H5
- 7: system XIV-H7
- 8: system XIV-H9
- 9: system XIV-mix templates
- 10: system XIV-ตัวควบคุมลบ

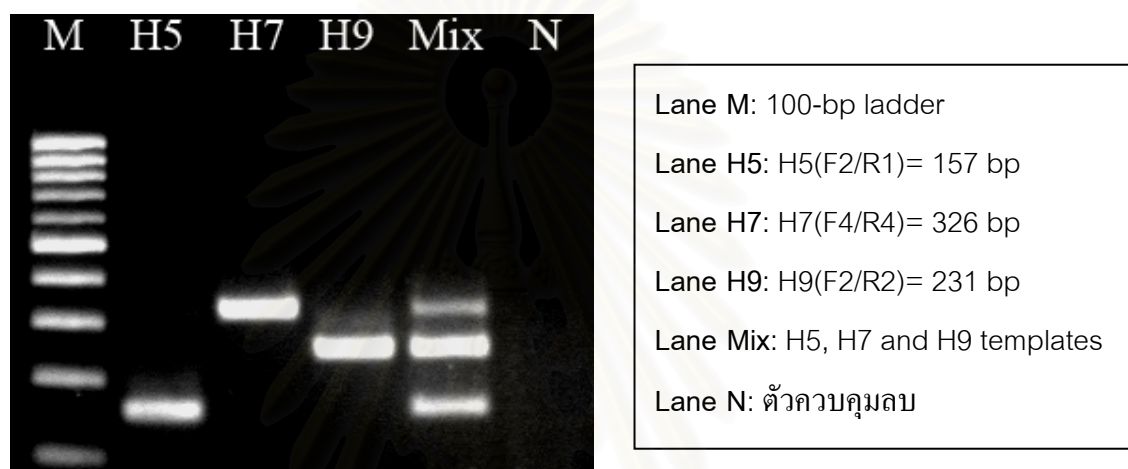
รูปที่10 แสดงผลการทดสอบชุด primers ทั้ง 14 ระบบใน Multiplex RT-PCR เพื่อคัดเลือกชุด primers ที่ให้ band patterns ที่ชัดเจนและเหมาะสมในการอ่านผล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดของชุด primers ระบบที่ XII ซึ่งเหมาะสมที่สุดในการพัฒนา มีรายละเอียดดังนี้

Primer name	Primer sequence	Position	Amplicon length (bp)
H5-F2	5'-TGAGAAAATTCAGATCATCCCC-3'	409-430	157
H5-R1	5'-GCTCCTCTTTATTGTTGGGTATG-3'	565-543	
H7-F4	5'-AAGATCAGGTTCTTCTTTCTATG-3'	465-487	326
H7-R4	5'-TGAAAGTGAAGGTCAGTGTCA-3'	790-768	
H9-F2	5'-ATTCAAATGATCAAGGGGTTGG-3'	1110-1131	231
H9-R2	5'-GTGTTTTCTGGTTTTCAAGCAG-3'	1340-1318	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แสดงชุด primers ระบบที่ XII ซึ่งเหมาะสมที่สุดในการพัฒนา

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR

Component	Volume (μ l)
AccessQuick (2x Master Mix) (Promega)	12.5
Forward primer (H5,H7,H9) 0.25/0.75 μ M each	0.25,0.75,0.25
Reverse primer (H5,H7,H9) 0.25/0.75 μ M each	0.25,0.75,0.25
AMV reverse transcriptase (5U)	0.5
RNA template	5
Rnase-free water to a final volume of	25

ตารางที่ 7 แสดงอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR

Step	Temperature/Time
Reverse Transcription	48°C/45 min
Initial denaturation	94°C/3 min
Denaturation	94°C/30 sec
Annealing	55°C/30 sec
Extension	72°C/30 sec
Final Extension	72°C/7 min

} 40 cycles

4.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธี one step multiplex RT-PCR

ทำการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธี one step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น โดยทำการทดสอบกับไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจที่สำคัญในไก่และมนุษย์ ได้แก่ Newcastle disease virus (NDV), Infectious bronchitis virus (IBV) , Infectious laryngotracheitis virus (ILT), Infectious bursal disease virus (IBD), Human respiratory syncytial virus (HRSV), Human metapneumovirus (hMPV) และ non-inoculated allantoic fluid นอกจากนี้ยังทำการทดสอบกับ avian influenza A virus subtype อื่นๆ H1 ถึง H15 นอกเหนือจาก H5, H7 และ H9 โดยพบว่าชุด primers ระบบที่ XII ให้ผลลบต่อไวรัสทุกชนิดที่กล่าวมาในข้างต้น ดังแสดงในรูปที่ 12



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

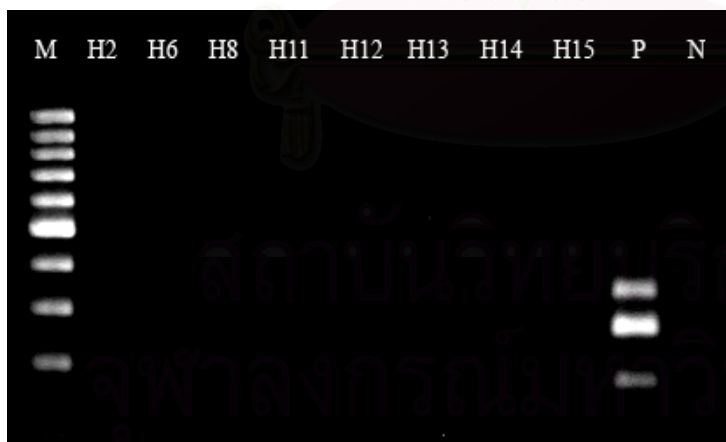
(ก) แสดงความจำเพาะของวิธี Multiplex RT-PCR ต่อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจที่สำคัญในไก่และมนุษย์ ได้แก่ Newcastle disease virus (ND), Infectious bronchitis virus (IB) , Infectious laryngotracheitis virus (ILT), Infectious bursal disease virus (IBD), Human respiratory syncytial virus (RSV), Human metapneumovirus (MPV) และ non-inoculated allantoic fluid (AF) และ avian influenza A virus subtype H1, H3, H4 และ H10



Lane P : ตัวควบคุมบวก

Lane N: ตัวควบคุมลบ

(ข) แสดงความจำเพาะของวิธี Multiplex RT-PCR ต่อ avian influenza A virus subtype H2, H6, H8, H11, H12, H13, H14 และ H15



Lane P : ตัวควบคุมบวก

Lane N: ตัวควบคุมลบ

รูปที่ 12: การทดสอบความจำเพาะของวิธี Multiplex RT-PCR

4.4 การทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธี one step multiplex RT-PCR

จากการวัดความเข้มข้นของ *in vitro* transcribed RNA ของ H5 H7 และ H9 โดยการทำ *in vitro* transcription (RiboMAX™ Large scale RNA production system SP6 and T7, Promega, USA) แล้วทำการคำนวณเป็นหน่วย copies/ μ L จากนั้นทำ 10-fold serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-10} - 10^{-7} copies/ μ L แล้วนำมาทดสอบความไวด้วยวิธี Multiplex RT-PCR พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจทดสอบได้คือ 10^4 copies/ μ L เมื่อทำการวัดความเข้มข้นของ *in vitro* transcribed RNA ของ H5 H7 และ H9 ในปฏิกิริยาเดียวกัน แต่เมื่อทำการแยกวัดความเข้มข้นของ *in vitro* transcribed RNA ของ H5 H7 และ H9 พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีดังกล่าวสามารถตรวจทดสอบได้คือ 10^3 copies/ μ L ดังแสดงในรูปที่ 13

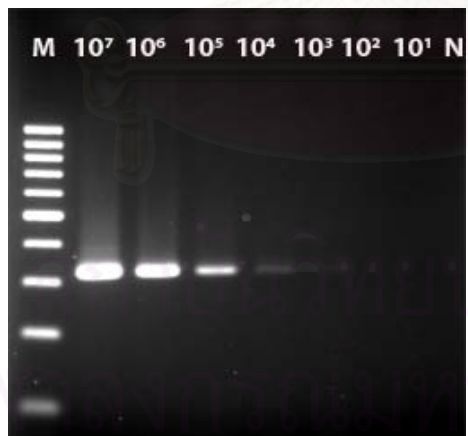


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

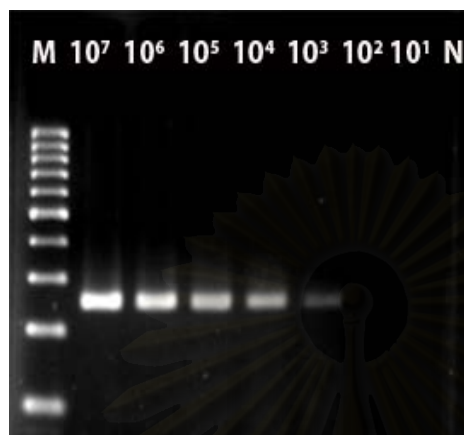
(ก) Avian influenza A virus สายพันธุ์ H5



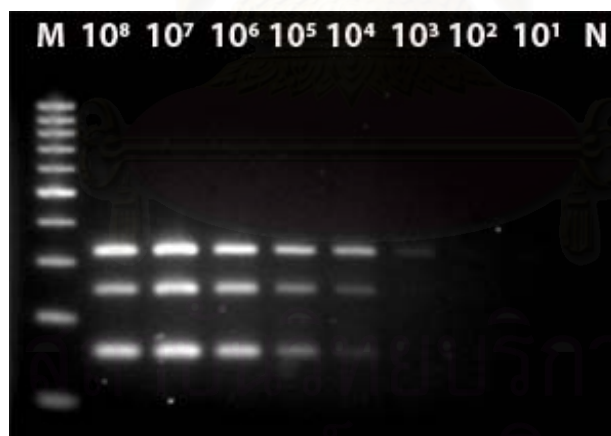
(ข) Avian influenza A virus สายพันธุ์ H7



(ค) Avian influenza A virus สายพันธุ์ H9



(ง) Avian influenza A virus สายพันธุ์ H5, H7 และ H9



รูปที่ 13: แสดงความไวของวิธี one step multiplex RT-PCR ในการตรวจหา *in vitro* transcribed RNA ของ H5, H7 และ H9 AIVs ที่ความเข้มข้นเจือจางทีละ 10 เท่าจาก 10 copies/ μ L จนถึง 10⁷ copies/ μ L (lane 2-lane 8) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ (N) และ 100 bp ladder marker (M)

4.5 การทดสอบระบบ one step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น

ทำการทดสอบระบบ one step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นกับเชื้อไวรัสที่แยกได้จากชิ้นเนื้อจากปอดหรืออวัยวะภายในจากสัตว์ปีกที่มีประวัติอาการหรือรอยโรคสงสัยว่ามีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ avian influenza A virus และตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่ได้จากการเฝ้าระวังด้านระบาดวิทยาของ Avian influenza ในประเทศไทย โดยตัวอย่างเหล่านี้ให้ผลบวกต่อการทดสอบ influenza A virus จากการปรากฏของ matrix (M) gene ของไวรัสดังกล่าวด้วยวิธี RT-PCR (Payungporn et al, 2004) จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างดังกล่าวประกอบด้วยตัวอย่างจากเป็ด 16 ตัวอย่าง, ไก่ 11 ตัวอย่าง, นกพิราบ, นกปากห่างและนกกระทาอย่างละ 1 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบ avian influenza A virus subtype H5 (29 ตัวอย่าง) และ H7 (1 ตัวอย่าง) จากสัตว์ปีกชนิดต่างๆได้อย่างชัดเจนและถูกต้อง ดังแสดงในรูปที่ 14 โดยตัวอย่างดังกล่าวได้ถูกยืนยันชนิดของ subtype ด้วยวิธีการหาลำดับเบส (DNA sequencing) (Keawcharoen et al, 2005 ; Payungporn et al, 2004)



รูปที่ 14: แสดงผลการทดสอบระบบ one step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นกับเชื้อไวรัสที่แยกได้จากชิ้นเนื้อจากปอดหรืออวัยวะภายในจากสัตว์ปีก (M= 100 bp ladder marker, lane 1-10= RNA จากตัวอย่างส่งตรวจที่แยกได้จากสัตว์ปีกในประเทศไทย , P= ตัวควบคุมบวก และ N= ตัวควบคุมลบ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี one step multiplex RT-PCR เพื่อนำมาใช้ประกอบการตรวจวินิจฉัย avian influenza A virus สายพันธุ์ที่สามารถติดต่อสู่คนได้คือ H5, H7 และ H9 ในตัวอย่างที่แยกได้จากสัตว์ปีกที่มีประวัติอาการสงสัยการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ เพื่อเฝ้าระวังและเป็นสัญญาณเตือนก่อนที่จะมีการแพร่ระบาดของลามถึงคน โดยชุด primers ที่ได้ทำการออกแบบมานี้ให้ผลผลิต (PCR product) ขนาดต่างๆกันดังนี้คือ H5 (157 bp), H7 (326 bp) และ H9 (231 bp) ซึ่งชุด primers นี้ให้ band pattern ที่ชัดเจนและเหมาะสมในการอ่านผล (รูปที่ 11) นอกจากนี้แล้ววิธี one step multiplex RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นมาเป็นการทำ PCR เพียงขั้นตอนเดียวทำให้ลดปัญหาการปนเปื้อนที่เกิดจากการทำ PCR สองขั้นตอนได้อีกด้วย และวิธี one step multiplex RT-PCR นี้ไม่มีความจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ในการตรวจวินิจฉัยที่มีราคาแพง ทำให้สามารถนำเอาวิธีดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้

เชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5 และ H7 เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงในสัตว์ปีก (Highly pathogenic AIV) มักทำให้เกิดโรครุนแรงในสัตว์ปีกหลายชนิดโดยพบว่าทำให้มีอัตราการตายสูงในสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Suarez, 2000) นอกจากนี้แล้วเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 (Claas et al, 1998; Tam, 2002; Zhou et al, 1999) , H7N7 (Fouchier et al, 2004; Kurtz, Manvell and Banks, 1996; Koopmans et al, 2004) , H9N2 (Nicholson, Wood and Zambon, 2003; Peiris et al, 1999; Saito et al, 2001) และ H7N3 (Hirst et al, 2004) สามารถติดต่อสู่คนได้อีกด้วย ดังนั้นการพัฒนาวิธีในการตรวจวินิจฉัยไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวให้ได้ผลรวดเร็วจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการป้องกันและเฝ้าระวังไม่ให้เชื้อดังกล่าวแพร่สู่คนอีกทั้งยังลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ปีกอีกด้วย ที่ผ่านมาได้มีการใช้วิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส (Virus isolation) ในไข่ไก่ฟัก (Embryonated fowl's egg) หรือในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เช่น Mardin-Darby canine kidney cell (MDCK cell) และวิธีทางชีววิทยาเป็นมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัย influenza A virus เนื่องจากวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูง (Shan et al, 2003; Sugimura, Murakami and Ogawa, 2000) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือมีราคาแพง ใช้เวลานาน (1-2 สัปดาห์) และสิ้นเปลืองแรงงานมากอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ

ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัส ซึ่งได้แก่ Enzyme-linked immunoassay, Immunofluorescence assay และพบว่าสามารถตรวจหา influenza A virus ได้เร็วกว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส แต่วิธีดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะต่ำกว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส (Boivin, Hardy and Kress, 2001) ปัจจุบันได้มีการนำเอาวิธี RT-PCR มาใช้ในการวินิจฉัย influenza A virus ในตัวอย่างส่งตรวจจากคน สุนัข ม้าและสัตว์ปีก (Oxburgh and Hagstrom, 1999; Schorr, Wentworth and Hinshaw, 1994) แต่ยังไม่สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสหลายชนิดพร้อมกันได้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธี multiplex RT-PCR ขึ้นโดยวิธีดังกล่าวสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกันโดยการใช้ primer มากกว่า 1 คู่ วิธี multiplex RT-PCR มีข้อดีกว่าวิธี RT-PCR ปกติคือประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธี RT-PCR ปกติรวมถึงลดโอกาสการปนเปื้อนที่เกิดจากการทำ PCR หลายขั้นตอน (Spackman et al, 2003) โดยปัจจุบันวิธีดังกล่าวสามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อ influenza A virus สายพันธุ์ต่างๆที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในคน (Payungporn et al, 2004; Stockton et al, 1998)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการออกแบบชุด primers ที่จำเพาะต่อยีน Haemagglutinin ของเชื้อ avian influenza A virus ซึ่งยีนดังกล่าวมีอัตราการเปลี่ยนแปลงสูงสุดเมื่อเทียบกับยีนอื่นๆของเชื้อ avian influenza A virus (Webster et al, 1992) จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการประเมินลำดับเบสของ primer อย่างสม่ำเสมอเพื่อปรับให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic variation) ของเชื้อ influenza A virus นอกจากนี้ตำแหน่งของยีน Haemagglutinin ที่ใช้ในการออกแบบ primer H5 และ H7 ในครั้งนี้ได้เลือกใช้ตำแหน่ง HA1 ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะมีความแตกต่างกันในแต่ละ subtype ของเชื้อ avian influenza A virus มากกว่าตำแหน่ง HA2 (Kovacova et al, 2001) ทำให้ primer ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อ subtype นั้นๆสูง ลดโอกาสที่ primer จะเกิด cross-reactivity ระหว่าง subtype ได้ อย่างไรก็ตามได้ทำการออกแบบ primer H9 ที่ตำแหน่ง HA2 ซึ่งเป็นบริเวณที่ conserved ระหว่าง subtype ของ avian influenza A virus ทำให้มีโอกาสที่ primer จะเกิดการ cross-reactivity ระหว่าง subtype ของ avian influenza A virus ได้ แต่เมื่อนำ primer นี้ไปทดสอบกับ avian influenza A virus สายพันธุ์ H1-H15 แล้วพบว่าไม่เกิด cross-reactivity กับสายพันธุ์อื่นของเชื้อ avian influenza A virus

สำหรับการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของวิธี one step multiplex RT-PCR นั้นได้ทำการทดสอบกับเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจที่สำคัญในไก่และมนุษย์ได้แก่ Newcastle disease virus (NDV), Infectious bronchitis virus (IBV) , Infectious laryngotracheitis

virus (ILT), Infectious bursal disease virus (IBD), Human respiratory syncytial virus (HRSV), Human metapneumovirus (hMPV) และ non-inoculated allantoic fluid นอกจากนี้ยังทำการทดสอบกับ avian influenza A virus subtype อื่น คือ H1 ถึง H15 นอกเหนือจาก H5, H7 และ H9 โดยพบว่าวิธีดังกล่าวให้ผลลบต่อไวรัสทุกชนิดที่กล่าวมาในข้างต้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธี one step multiplex RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะและเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5, H7 และ H9 นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบความไว (Sensitivity) ของวิธี one step multiplex RT-PCR โดยทำการวัดความเข้มข้นของ *in vitro* transcribed RNA ของ H5, H7 และ H9 avian influenza A virus ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ถึง 10^7 copies/ μ L พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้เมื่อทำการแยกวัด H5, H7 และ H9 RNA transcripts คือ 10^3 copies/ μ L ในขณะที่เมื่อทำการวัดความเข้มข้นของ H5, H7 และ H9 RNA transcripts ในปฏิกิริยาเดียวกัน พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 10^4 copies/ μ L ซึ่งต่ำกว่าเมื่อทำการแยกวัดประมาณ 10 เท่า (รูปที่ 13) นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธี simplex RT-PCR พบว่าวิธี one step multiplex RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นมีความไวเท่ากับวิธี simplex RT-PCR ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าวิธี one step multiplex RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะสูงเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5, H7 และ H9 ได้เป็นอย่างดี

ได้มีการนำเอาวิธี one step multiplex RT-PCR นี้มาทดสอบกับเชื้อไวรัสที่แยกได้จากชิ้นเนื้อปอดหรืออวัยวะภายในจากสัตว์ปีกที่มีประวัติอาการหรือรอยโรคสงสัยว่ามีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ avian influenza A virus เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีดังกล่าวสามารถนำมาใช้กับตัวอย่างส่งตรวจได้จริง โดยพบว่าสามารถตรวจพบ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5 และ H7 จากตัวอย่างที่แยกได้จากสัตว์ปีกได้อย่างชัดเจนและถูกต้อง (รูปที่ 14) ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบผลการตรวจที่ได้กับวิธีการหาลำดับเบส (DNA sequencing) พบว่าได้ผลเหมือนกัน ซึ่งเป็นการยืนยันว่าวิธีนี้สามารถนำไปใช้กับตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจได้จริง แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษารั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักมาก่อนแล้ว ยังมีได้มีการนำวิธีดังกล่าวไปใช้กับตัวอย่างส่งตรวจโดยตรง ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไปจึงควรนำวิธีดังกล่าวไปทดสอบกับตัวอย่างที่ได้จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ซึ่งทำให้ได้ผลในการตรวจวินิจฉัยรวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ข้อจำกัดในการศึกษารั้งนี้คือไม่สามารถหาตัวอย่างส่งตรวจที่แยกเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H9 ได้ เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาทำการทดสอบในครั้งนี้เป็นตัวอย่างที่แยกได้จากชิ้นเนื้อของสัตว์ตายซึ่งยังไม่ได้ลองนำวิธีดังกล่าวไปใช้กับตัวอย่างจากอุจจาระหรือสิ่งคัดหลั่ง (secretion) ของสัตว์ปีกตามธรรมชาติซึ่งน่าจะพบสายพันธุ์ของ avian

influenza A virus ที่หลากหลายมากกว่านี้ วิธี one step multiplex RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวินิจฉัย cDNA ของ avian influenza A virus สายพันธุ์ H9N2 (influenza/A/turkey/Wisconsin/66(H9N2)) ได้ อย่างไรก็ตาม primer H9 ในงานวิจัยนี้เป็น primer ที่ได้ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H9 ที่มีรายงานล่าสุดใน GenBank ซึ่ง primer นี้สามารถใช้ตรวจวินิจฉัย cDNA ของเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H9N2 ที่แยกได้ในปีค.ศ. 1966 (influenza/A/turkey/Wisconsin/66(H9N2)) แต่เนื่องจากไม่สามารถหาตัวอย่างที่แยกเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H9 ที่มีการระบาดในปัจจุบันได้ ทำให้ไม่สามารถยืนยันได้ว่า primer H9 สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H9 ที่เพิ่งมีการระบาดได้

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธี one step multiplex RT-PCR ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถใช้ประกอบการตรวจวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ที่สามารถติดต่อสู่คนได้ ได้แก่ สายพันธุ์ H5, H7 และ H9 ในตัวอย่างที่แยกได้จากสัตว์ปีกได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ทำให้มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังและเป็นสัญญาณเตือนก่อนที่จะมีการแพร่ระบาดลามไปยังคน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- Alexander, D.J. 2000. A review of avian influenza in different bird species. Vet. Microbiol. 74(1-2):3-13.
- Alexander, D.J., Brown, I.H. 2000. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. Rev. Sci. Tech. 19 (1):197-225.
- Atmar, R.L., Baxter, B.D., Dominguez, E.A., Taber, L.H. 1996. Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. J. Clin. Microbiol. 34 (10): 2604-6.
- Boivin, G., Hardy, I., Kress, A. 2001. Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 39 (2): 730-2.
- Branson, W.R. 1996. Orthomyxoviridae. In: Avian viruses function and control, Florida: Wingers Publishing. 351-364.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A. 2001. Orthomyxoviruses. In: Medical Microbiology, 22th ed, USA: Appleton & Lange. 459-469.
- Capua, I., Alexander, D.J. 2002. Avian influenza and human health. Acta. Tropica. 83:1-6.
- Caterina, K.M., Frasca, S. Jr., Girshick, T., Khan, M.I. 2004. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. Mol. Cell. Probes. 18 (5):293-8.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2004. Cases of Influenza A (H5N1)--Thailand, 2004. MMWR. 53 (05): 100-103.
- Cherian, T., Bobo, L., Steinhoff, M.C., Karron, R.A., Yolken, R.H. 1994. Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. J. Clin. Microbiol. 32 (3):623-8.
- Chowton, B.R. 1996. Avian influenza. In: Avian disease manual, 4th ed, USA: American association at avian pathologists. 17-20.

- Claas, E.C., Sprenger, M.J., Kleter, G.E., van Beek, R., Quint, W.G., Masurel, N. 1992. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 39 (1-2):1-13.
- Claas, E.C., van Milaan, A.J., Sprenger, M.J., Ruiten-Stuiver, M., Arron, G.I., Rothbarth, P.H., Masurel, N. 1993. Prospective application of reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosing influenza infections in respiratory samples from a children's hospital. J. Clin. Microbiol. 31 (8):2218-21.
- Claas, E.C., Osterhaus, A.D., van Beek, R., De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Senne, D.A., Krauss, S., Shortridge, K.F., Webster, R.G. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to highly pathogenic avian influenza virus. Lancet. 351:472-477.
- Collins, R.A., Ko, L.S., Fung, K.Y., Chan, K.Y., Xing, J., Lau, L.T., Yu, A.C. 2003. Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 300 (2):507-15.
- Daum, L.T., Canas, L.C., Schadler, C.A., Ujimori, V.A.H, Huff, W.B., Barnes, W.J., Lohman, K.L. 2002. A rapid, single-step multiplex reverse transcription-PCR assay for the detection of human H1N1, H3N2, and B influenza viruses. J. Clin. Virol. 25 (3):345-50.
- Dybkaer, K., Munch, M., Handberg, K.J., Jorgensen, P.H. 2004. Application and evaluation of RT-PCR-ELISA for the nucleoprotein and RT-PCR for detection of low-pathogenic H5 and H7 subtypes of avian influenza virus. J. Vet. Diagn. Invest. 16 (1):51-6.
- Fouchier, R.A., Schneeberger, P.M., Rozendaal, F.W., Broekman, J.M., Kemink, S.A., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., Schutten, M., Van Doornum, G.J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M., Osterhaus, A.D. 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101 (5):1356-61.
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J. Virol. 79 (5): 2814-22.

- Hayden, F.G., Palese, P. 1997. Influenza Virus. In: Clinical Virology, New York: Churchill Livingstone. 911-942
- Hirst, M., Astell, C.R., Griffith, M., Coughlin, S.M., Moksa, M., Zeng, T., Smailus, D.E., Holt, R.A., Jones, S., Marra, M.A., Petric, M., Kraiden, M., Lawrence, D., Mak, A., Chow, R., Skowronski, D.M., Tweed, S.A., Goh, S., Brunham, R.C., Robinson, J., Bowes, V., Sojony, K., Byrne, S.K., Li, Y., Kobasa, D., Booth, T., Paetzel, M. 2004. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. Emerg. Infect. Dis. 10 (12):2192-5.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch. Virol. 146 (12):2275-89.
- Horimoto, T., Kawaoka, Y. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. Clin. Microbiol. Rev. 14(1):129-49.
- Jordan, F.T.W. 1990. Orthomyxoviridae. In: Poultry disease, 2nd ed, London: Bailliere Tindall. 137-146.
- Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier, R.A., Amonsin, A., Payungporn, S., Noppornpanth, S., Wattanodorn, S., Theambooniers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsarn, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, D.M., Poovorawan, Y. 2004. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerg. Infect. Dis. 10 (12):2189-91.
- Keawcharoen, J., Amonsin, A., Oraveerakul, K., Wattanodorn, S., Papravit, T., Karnda, S., Pattanarangsarn, R., Noppornpanth, S., Fouchier, R.A., Osterhaus, D.M., Payungporn, S., Theambooniers, A., Poovorawan, Y. 2005. Characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of recent influenza virus isolates from different avian species in Thailand. Acta Virol. 49 (4):277-80.
- Koopmans, M., Wilbrink, B., Conyn, M., Natrop, G., van der Nat, H., Vennema, H., Meijer, A., van Steenbergen, J., Fouchier, R., Osterhaus, A., Bosman, A. 2004. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet. 363 (9409):587-93.

- Kovacova, A., Ruttkay-Nedecky, G., Haverlik, I.K., Janecek, S. 2002. Sequence similarities and evolutionary relationships of influenza virus A hemagglutinins. Virus Genes. 24 (1):57-63.
- Kurtz, J., Manvell, R.J., Banks, J. 1996. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. Lancet. 348: 901-02.
- Lamb, R.A., Krug, R.M. 2001. *Orthomyxoviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, D.M., eds. Fields Virology. 1487-1531.
- Lau, L.T., Banks, J., Aherne, R., Brown, I.H., Dillon, N., Collins, R.A., Han, K.Y., Fung, Y.W., Xing, J., Yu, A.C. 2004. Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313 (2): 336-42.
- Lee, C.W., Suarez, D.L. 2004. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. J. Virol. Methods. 119 (2):151-8.
- Li, J., Chen, S., Evans, D.H. 2001. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. J.Clin. Microbiol. 39 (2):696-704.
- Miesfeld, R.L. 1999. Applied molecular genetics. (online). Available from:
http://www.wiley.com/legacy/products/subject/life/genetics/miesfeld_figures.html
[2005, December 20]
- Munch, M., Nielsen, L.P., Handberg, K.J., Jorgensen, P.H. 2001. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. Arch. Virol. 146 (1):87-97.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. 1999. Orthomyxoviridae. In: Veterinary virology, 3rd ed, USA: A Division of Harcourt Brace & Company.459-469.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Yolken, R.H. 1999. Influenza viruses. In: Manual of Clinical Microbiology, 7th ed, USA: American Society for Microbiology.928-935.

- Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Yolken, R.H. 1999. Influenza viruses. In: Manual of Clinical Microbiology, 8th ed, USA: American Society for Microbiology.1360-1367.
- Nicholson, K.G., Wood, J.M., Zambon, M. 2003. Influenza. Lancet. 362 (9397):1733-45.
- Oxburgh, L., Hagstrom, A. 1999. A PCR based method for the identification of equine influenza virus from clinical samples. Vet. Microbiol. 67(3):161-74.
- Payungporn, S., Phakdeewirot, P., Chutinimitkul, S., Theamboonlers, A., Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Amonsin, A., Poovorawan, Y. 2004. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. Viral. Immunol. 17(4): 588-93.
- Peiris, M., Yuen, K.Y., Leung, C.W., Chan, K.H., Ip, P.L., Lai, R.W., Orr, W.K., Shortridge, K.F. 1999. Human infection with influenza H9N2. Lancet. 354 (9182): 916-7.
- Phan, T.G., Nguyen, T.A., Yan, H., Okitsu, S., Ushijima, H. 2005. A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. Arch. Virol. 150 (6):1175-85.
- Poddar, S.K. 2002. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. J. Virol. Methods. 99 (1-2):63-70.
- Rezza, G. 2004. Avian influenza: a human pandemic threat?. J. Epidemiol. Community Health. 58 (10):807-8.
- Rohm, C., Zhou, N., Suss, J., Mackenzie, J., Webster, R.G. 1996. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. Virology 217(2): 508-16.
- Rohayem, J., Berger, S., Juretzek, T., Herchenroder, O., Mogel, M., Poppe, M., Henker, J., Rethwilm, A. 2004. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. J. Virol. Methods. 118 (1):49-59.

- Saito, T., Lim, W., Suzuki, T., Suzuki, Y., Kida, H., Nishimura, S.I., Tashiro, M. 2001. Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. Vaccine. 20 (1-2):125-33.
- Schorr, E., Wentworth, D., Hinshaw, V.S. 1994. Use of polymerase chain reaction to detect swine influenza virus in nasal swab specimens. Am. J. Vet. Res. 55 (7):952-6.
- Shan, S., Ko, L.S., Collins, R.A., Wu, Z., Chen, J., Chan, K.Y., Xing, J., Lau, L.T., Yu, A.C. 2003. Comparison of nucleic acid-based detection of avian influenza H5N1 with virus isolation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 302 (2): 377-83.
- Smith, A.B., Mock, V., Melear, R., Colarusso, P., Willis, D.E. 2003. Rapid detection of influenza A and B viruses in clinical specimens by Light Cycler real time RT-PCR. J. Clin. Virol. 28 (1):51-8.
- Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L. 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. J. Clin. Microbiol. 40 (9):3256-60.
- Stockton, J., Ellis, J.S., Saville, M., Clewley, J.P., Zambon, M.C. 1998. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. J. Clin. Microbiol. 36 (10):2990-5.
- Suarez, D.L. 2000. Evolution of avian influenza viruses. Vet. Microbiol. 74:15-27.
- Sugimura, T., Murakami, Y., Ogawa, T. 2000. The susceptibility of culture cells to avian influenza viruses. J. Vet. Med. Sci. 62 (6):659-60.
- Swayne, D.L., Senne, D.A. 2003. Influenza. In: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.R., Saif, Y.M. (Eds.), Diseases of Poultry, USA.135-160.
- Tam, S.T. 2002. Influenza A (H5N1) in Hong Kong: an overview. Vaccine. 20:77-81.
- Templeton, K.E., Scheltinga, S.A., Beersma, M.F. 2004. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. Clin. Microbiol. 42:1564-1569.

- Tran, T.H., Nguyen, T.L., Nguyen, T.D., Luong, T.S., Pham, P.M., Nguyen, V.C., Pham, T.S., Vo, C.D., Le, T.Q., Ngo, T.T., Dao, B.K., Le, P.P., Nguyen, T.T., Hoang, T.L., Cao, V.T., Le, T.G., Nguyen, D.T., Le, H.N., Nguyen, K.T., Le, H.S., Le, V.T., Christiane, D., Tran, T.T., Menno, de. J., Schultz, C., Cheng, P., Lim, W., Horby, P., Farrar, J. 2004. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N. Engl. J. Med. 18:1179-88.
- Vey, M., Orlich, M., Adler, S., Klenk, H.D., Rott, R., Garten, W. 1992. Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. Virology. 188 (1):408-13.
- Webby, R.J., Webster, R.G. 2001. Emergence of influenza A viruses. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 356 (1416):1817-28.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol. Rev. 56 (1): 152-79.
- Webster RG, Shortridge KF, Kawaoka Y. 1997. Influenza: interspecies transmission and emergence of new pandemics. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 18 (4):275-9.
- Weir, E., Wong, T., Gemmill, I. 2004. Avian influenza outbreak: update. CMAJ. 170 (5):785-6.
- White, D.O., Fenner, F.J. 1994. Orthomyxoviridae. In: Medical virology, California: Academic Press. 489-498.
- World Health Organization (WHO), 2006. Update on Avian Flu Influenza- 7 January 2005: Thailand, available from <http://w3.who.sea.org/> (update January 7, 2006, cited January 8, 2006).
- Wright, K.E., Wilson, G.A., Novosad, D., Dimock, C., Tan, D., Weber, J.M. 1995. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. J. Clin. Microbiol. 33 (5):1180-4.
- Zambon, M.C. 1999. Epidemiology and pathogenesis of influenza. J. Antimicrob. Chemother. 44 Suppl B:3-9.
- Zhang, W.D., Evans, D.H. 1991. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 33 (1-2):165-89.

Zhou, N.N., Shortridge, K.F., Claas, E.C.J., Krauss, S.L., Webster, R.G. 1999. Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chickens in Hong Kong. J. Virol. 73:3366-3374.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₃ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม

เติม sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม 10x Tris-borate EDTA buffer (TBE)

Tris base	10.8	กรัม
Boric acid	5.5	กรัม
Na ₂ EDTA	9.3	กรัม

เติม sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม 1x TBE

นำ 10x TBE 100 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม 2% Agarose gel

ชั่ง Agarose 2 กรัม ละลายใน 1x TBE ให้มีปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

Bubble plastic rack, Scienceware, USA

Refrigerated Universal Centrifuge, Hermle Labortechnik, Germany

Mini-Centrifuge, Quick spin, LABNET, USA

Vortex mixer, Genie-2™, Scientetific Industries, USA

Freezer-20°C, Sanyo, Japan

Freezer-70°C, Forma Scientific, USA

Power supplies, C.B.S. Scientific, USA

Microcentrifuge tube 1.5 ml, Axygen, USA

Microcentrifuge tube 0.5 ml, Elkay, USA

Microcentrifuge tube 0.2 ml, Axygen, USA

Pipette tips 0.5-10 ul, Axygen, USA

Filter pipette tips 200 ul, Axygen, USA

Filter pipette tips 200-1000 ul, Axygen, USA

Thermal cycler 9600/Perkin-Elmer, Cetus, USA

Timer, Citizen, Japan

Dyna Cjill Portable Cooler, LABNET, USA

Refrigerator, Mitsubishi Electric, Japan

Water bath, Bosstech, England

UV-visible recording spectrophotometer, UV-160A, Shimadzu, Japan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี

EDTA

Tris base

Agarose

Boric acid

Ethidium bromide

QIAamp® viral RNA Mini Kit

Oligonucleotide primer

AccessQuick™ RT-PCR system

pGEM-T Easy Vector

RiboMAX™ Large scale RNA production system SP6 and T7

QIAquick PCR purification Kit

100 bp DNA ladder

แหล่ง

Sigma, Germany

Amersham, USA

Gibco BRL, USA

Merck, Germany

Sigma, Germany

QIAGEN, USA

Proligo, USA

Promega, USA

Promega, USA

Promega, USA

QIAGEN, USA

Fermentus, USA



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอัญญรัตน์ ต้นธีรวงศ์ เกิดวันที่ 19 มีนาคม พ.ศ. 2521 ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย