



## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 1. ตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้

1.1 การศึกษาครั้งนี้เก็บรวบรวมเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ได้จากตัวอย่างน้ำไข่ฟักจากสัตว์ปีกในช่วงที่มีการระบาดในปี 2004-2005 โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจำนวน 43 ตัวอย่าง รายละเอียดของตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกประกอบด้วย รหัสของตัวอย่าง ชนิดของสัตว์ปีก พื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง และปีที่เก็บตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากสัตว์ปีกระหว่างปี 2004-2005 จำนวน 43 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

รหัสของตัวอย่าง	ชนิดสัตว์ปีก	พื้นที่ที่เก็บ	ปีที่เก็บตัวอย่าง
CU-1	ไก่	สุพรรณบุรี	2004
CU-2	เป็ด	ชลบุรี	2004
CU-3	ไก่	กรุงเทพฯ	2004
CU-4	อีเกา	กรุงเทพฯ	2004
CU-5	เป็ด	ชลบุรี	2004
CU-7	ไก่เนื้อ	ชลบุรี	2004
CU-8	ไก่เนื้อ	ปราจีนบุรี	2004
CU-9	ไก่เนื้อ	สุพรรณบุรี	2004
CU-10	ไก่เนื้อ	ฉะเชิงเทรา	2004
CU-11	ไก่ไข่	ฉะเชิงเทรา	2004
CU-12	ไก่ไข่	นครสวรรค์	2004
CU-14	ไก่ไข่	นครปฐม	2004
CU-15	อีเกา	กรุงเทพฯ	2004
CU-16	นกยูง	กรุงเทพฯ	2004
CU-17	ไก่	สระบุรี	2004
CU-18	ไก่ฟ้า	กรุงเทพฯ	2004
CU-19	นกกระเจอกเทศ	สมุทรปราการ	2004
CU-21	ไก่	กรุงเทพฯ	2004

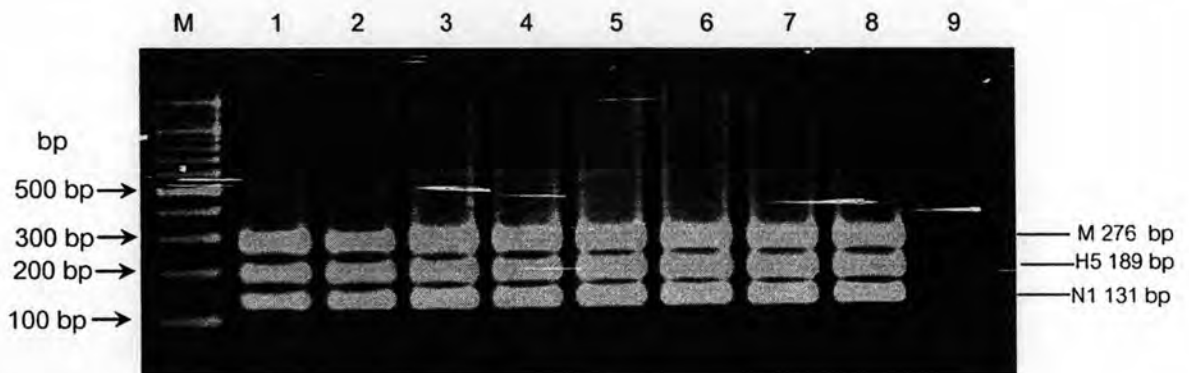
ตารางที่ 6 ตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากสัตว์ปีกระหว่างปี 2004-2005 จำนวน 43 ตัวอย่างที่ใช้  
ในการศึกษาครั้งนี้ (ต่อ)

รหัสของตัวอย่าง	ชนิดสัตว์ปีก	พื้นที่ที่เก็บ	ปีที่เก็บตัวอย่าง
CU-23	ไก่ไข่	อยุธยา	2004
CU-26	นกตะขาบทุ่ง	กรุงเทพฯ	2004
CU-31	นกกระจอกเทศ	สมุทรปราการ	2004
CU-35	อีเกา	กรุงเทพฯ	2004
CU-38	ไก่	ลพบุรี	2004
CU-39	ไก่	นครสวรรค์	2004
CU-71	เป็ด	นครปฐม	2004
CU-74	เป็ด	สระบุรี	2004
CU-76	เป็ด	ชลบุรี	2004
CU-77	เป็ด	ฉะเชิงเทรา	2004
CU-89	เป็ด	นครนายก	2004
CU-90	เป็ด	นครสวรรค์	2004
CU-93	เป็ด	ปทุมธานี	2004
CU-95	เป็ด	ปราจีนบุรี	2004
CU-98	เป็ด	นครปฐม	2004
CU-202	นกพิราบ	สมุทรปราการ	2004
CU-203	นกกระจอก	พังงา	2004
CU-209	นกเขี้ยว	ระนอง	2004
CU-130	เป็ดกาก็	สุพรรณบุรี	2005
CU-131	เป็ดกาก็	สุพรรณบุรี	2005
CU-160	ไก่	กาญจนบุรี	2005
CU-161	นกกระทา	นครปฐม	2005
CU-162	ไก่	นนทบุรี	2005
CU-258	นกกระทา	ปทุมธานี	2005
CU-259	นกกระทา	ปทุมธานี	2005

จากตารางที่ 6 สรุปได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ศึกษาครั้งนี้จำนวน 43 ตัวอย่าง เป็นเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไก่ 18 ตัวอย่าง (41.9%) เป็ด 13 ตัวอย่าง (30.2%) อีเกา 3 ตัวอย่าง (6.9%) นกกระทา 3 ตัวอย่าง (6.9%) นกกระจอกเทศ 2 ตัวอย่าง (4.7%) และนกกระจอก นกเอี้ยง นกตะขาบทุ่ง นกพิราบ นกยูง ไก่ฟ้า จำนวนอย่างละ 1 ตัวอย่าง (1% ต่อตัว) โดยตัวอย่างส่วนใหญ่แยกได้จากหลายจังหวัดในภาคกลาง ได้แก่ กาญจนบุรี กรุงเทพมหานคร นนทบุรี นครปฐม นครนายก นครสวรรค์ ปทุมธานี ลพบุรี สระบุรี สมุทรปราการ สุพรรณบุรี อุทัย ภาคตะวันออก ได้แก่ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ปราจีนบุรี และภาคใต้ ได้แก่ พังงา ระนอง

1.2 ผลการตรวจพิสูจน์และยืนยันเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยวิธี multiplex RT-PCR ซึ่งเป็นการตรวจหายีน M H5 และ N1 โดยตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจะให้ผลบวก (positive) ของยีน M H5 และ N1 ที่ขนาด 276 189 และ 131 bp ตามลำดับ

การศึกษานี้พบว่าตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนก 43 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อยีน M H5 และ N1 ตัวอย่างของการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธี multiplex RT-PCR ที่ให้ผลบวกต่อยีน M H5 และ N1 แสดงไว้ในรูปที่ 6

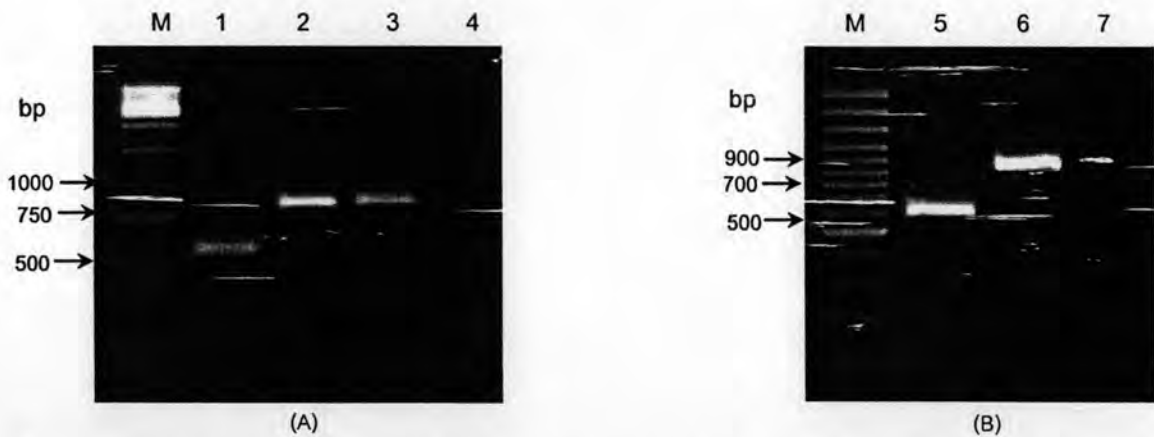


รูปที่ 6 รูปตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีน M H5 และ N1 ในตัวอย่างสัตว์ปีกแต่ละชนิดจำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ Lane 1; Duck/THA/CU-05/04, Lane 2; Peacock/THA/CU-16/04, Lane 3; Pheasant/THA /CU-18/04, Lane 4; Ostrich/THA /CU-19/04, Lane5; Chicken/THA /CU-23/04, Lane 6; Crow/THA /CU-35/04, Lane7; Chicken/THA /CU-10/04, Lane 8; Roller/THA /CU-26/04, Lane 9; negative control, M; DNA ladder

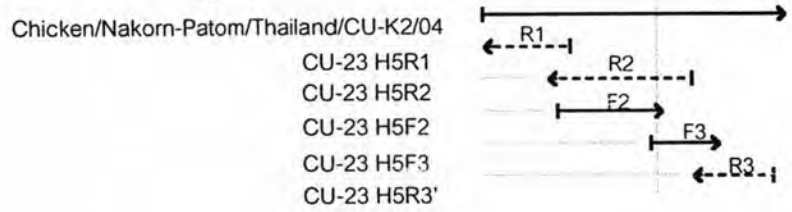
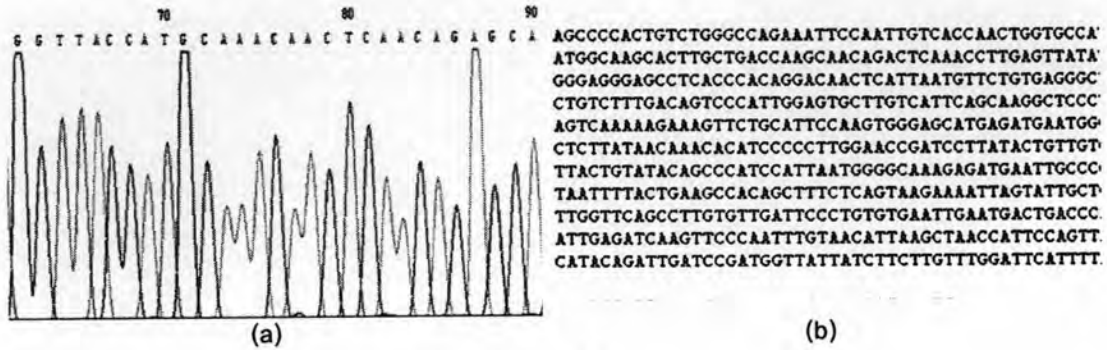
## 2. ผลการหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1

ในการหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1 ได้นำตัวอย่างเชื้อไวรัสใช้หัวดนกที่ให้ผลบวกต่อยีน M H5 และ N1 มาเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน H5 และ N1 โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละชนิด และตัวอย่างของผลการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 ได้แสดงไว้ในรูปที่ 7 และหลังจากนำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบส ผลการหาลำดับเบสจะอยู่ในรูปกราฟ chromatogram และ text file และนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องโดยทำการยืนยันผลของลำดับเบสที่ได้จาก forward และ reverse primers เปรียบเทียบกัน จากนั้นนำลำดับเบสมาประกอบให้ครบทั้งยีน H5 และ N1 โดยการใส่โปรแกรม Bioedit version 7.0.0 (รูปที่ 8)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลลำดับเบสของยีน H5 และ N1 ทั้งหมด 86 เส้น (จำนวน 43 ตัวอย่าง) และได้้นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ 64 เส้น (จำนวน 32 ตัวอย่าง) ไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล Genbank ซึ่งสามารถ down load ข้อมูลของลำดับเบสได้ตาม Genbank Accession Number โดยผ่านทาง <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ดังแสดงในตารางที่ 7 ทั้งนี้ตัวอย่างอีก 22 เส้น (จำนวน 11 ตัวอย่าง) ยังไม่ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูลไปยังฐานข้อมูล GenBank



รูปที่ 7 รูปตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 โดยรูป A แสดงตัวอย่าง CU-23 ที่ให้ผลบวกในการเพิ่มจำนวนยีน H5 โดยการใส่ primers จำนวน 3 คู่ คือ Lane 1; H5F5'/H5R1 ขนาด 565 bp, Lane 2; H5F2'/R2 ขนาด 845 bp; Lane 3; HF3'/R3' ขนาด 855 bp, Lane 4; negative control และรูป B แสดงตัวอย่าง CU-23 ที่ให้ผลบวกในการเพิ่มจำนวนยีน N1 จาก primer จำนวน 2 คู่ และให้ขนาด PCR product คือ Lane 5; N1F5'/R1 ขนาด 609 bp, Lane 6; N1F2'/R3' ขนาด 919 bp, Lane 7; negative control, M; DNA ladder



(d)

Mynas/THA/CU-209/04	GATCAGATTTGCATTGGCTATCATGCGAAACAACAGCACCGAACAGGTGGATACCATTtGAAAAAAACGTGACCGTGACC
Chicken/THA/CU-23/04	GATCAGATTTGCATTGGCTATCATGCGAAACAACAGCACCGAACAGGTGGATACCATTtGAAAAAAACGTGACCGTGACC
Chicken/THA/CU-21/04	GATCAGATTTGCATTGGCTATCATGCGAAACAACAGCACCGAACAGGTGGATACCATTtGAAAAAAACGTGACCGTGACC
Chicken/THA/CU-01/04	GATCAGATTTGCATTGGCTATCATGCGAAACTTATGACCGAACAGGTGGATACCATTtGAAAAAAACGTGACCGTGACC
Chicken/THA/CU-03/04	GATCAGATTTGCATTGGCTATCATGCGAAACAACAGCACCGAACAGGTGGATACCATTtGAAAAAAACGTGACCGTGACC
Chicken/THA/CU-07/04	GATCAGATTTGCATTGGCTATCATGCGAAACAACAGCACCGAACAGGTGGATACCATTtGAAAAAAACGTGACCGTGACC
Chicken/THA/CU-08/04	GATCAGATTTGCATTGGCTATCATGCGAAACAACAGCACCGAACAGGTGGATACCATTtGAAAAAAACGTGACCGTGACC
Chicken/THA/CU-09/04	GATCAGATTTGCATTGGCTATCATGCGAAACAACAGCACCGAACAGGTGGATACCATTtGAAAAAAACGTGACCGTGACC

รูปที่ 8 ตัวอย่างผลของลำดับเบสในรูปแบบกราฟ Chromatogram (a) ซึ่งอ่านผลโดยโปรแกรม Chromas 1.45 และ ผลลำดับเบสในรูปแบบ text file (b) ซึ่งเป็นผลลำดับเบสที่ได้จาก forward (F) และ reverse (R) primers ในแต่ละคู่ จากนั้นนำข้อมูลมาตรวจสอบความถูกต้องและยืนยันลำดับเบส (c) และนำลำดับเบสมาประกอบให้ครบทั้งยีน โดยการใช้โปรแกรม Bioedit version 7.0.0 (d)

ตารางที่ 7 ขนาดและหมายเลขประจำลำดับเบส (GenBank Accession No.) ของยีน H5 และ N1 ของตัวอย่างจำนวน 43 ตัวอย่าง

Isolated ID	ชนิดสัตว์ปีก	ขนาดของยีน ( bp)		GenBank Accession No.	
		H5	N1	H5	N1
CU-1	ไก่	1700	1407	<a href="#">AAZ29946</a>	<a href="#">AAZ29982</a>
CU-2	เป็ด	1653	1363	<a href="#">AAV48778</a>	<a href="#">AAV48779</a>
CU-3	ไก่	1712	1407	<a href="#">AAZ29947</a>	<a href="#">AAZ29983</a>
CU-4	อีเกา	1690	1407	<a href="#">AAZ29948</a>	<a href="#">AAZ29984</a>
CU-5	เป็ด	1697	1398	<a href="#">AAZ29949</a>	<a href="#">AAZ29985</a>
CU-7	ไก่เนื้อ	1688	1366	<a href="#">AAZ29951</a>	<a href="#">AAZ29987</a>
CU-8	ไก่เนื้อ	1656	1378	<a href="#">AAZ29952</a>	<a href="#">AAZ29988</a>
CU-9	ไก่เนื้อ	1660	1377	<a href="#">AAZ29953</a>	<a href="#">AAZ29989</a>
CU-10	ไก่เนื้อ	1666	1377	<a href="#">AAZ29954</a>	<a href="#">AAZ29990</a>
CU-11	ไก่ไข่	1670	1385	<a href="#">AAZ29955</a>	<a href="#">AAZ29991</a>
CU-12	ไก่ไข่	1649	1377	<a href="#">AAZ29956</a>	<a href="#">AAZ29992</a>
CU-14	ไก่ไข่	1649	1381	<a href="#">AAZ29958</a>	<a href="#">AAZ29994</a>
CU-15	อีเกา	1710	1405	<a href="#">AAZ29959</a>	<a href="#">AAZ29995</a>
CU-16	นกยูง	1712	1432	<a href="#">AAZ29960</a>	<a href="#">AAZ29996</a>
CU-17	ไก่	1713	1387	<a href="#">AAZ29961</a>	<a href="#">AAZ29997</a>
CU-18	ไก่ฟ้า	1660	1356	<a href="#">AAZ29962</a>	<a href="#">AAZ29998</a>
CU-19	นกกระจอกเทศ	1669	1383	<a href="#">AAZ29963</a>	<a href="#">AAZ29999</a>
CU-21	ไก่	1680	1364	<a href="#">AAV48780</a>	<a href="#">AAV48781</a>
CU-23	ไก่ไข่	1711	1342	<a href="#">AAV41002</a>	<a href="#">AAV41003</a>
CU-26	นกตะขาบทุ่ง	1652	1167	<a href="#">AAZ29967</a>	<a href="#">AAZ30003</a>
CU-31	นกกระจอกเทศ	1680	1366	<a href="#">AAZ29970</a>	<a href="#">AAZ30006</a>
CU-35	อีเกา	1645	1400	<a href="#">AAZ29971</a>	<a href="#">AAZ30007</a>
CU-38	ไก่	1668	1407	<a href="#">AAZ29972</a>	<a href="#">AAZ30008</a>
CU-39	ไก่	1664	1407	<a href="#">AAZ29973</a>	<a href="#">AAZ30009</a>
CU-71	เป็ด	1700	1360	<a href="#">AAZ29975</a>	<a href="#">AAZ30011</a>
CU-74	เป็ด	1700	1373	<a href="#">AAZ29977</a>	<a href="#">AAZ30013</a>
CU-76	เป็ด	1672	1373	N/A*	N/A
CU-77	เป็ด	1665	1368	N/A	N/A
CU-89	เป็ด	1696	1373	N/A	N/A
CU-90	เป็ด	1674	1381	N/A	N/A

\* N/A หมายถึง Not Available เนื่องจากยังไม่ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank



ตารางที่ 7 ขนาดและหมายเลขประจำลำดับเบส (GenBank Accession No.) ของยีน H5 และ N1 ของตัวอย่างจำนวน 43 ตัวอย่าง

Isolated ID	ชนิดสัตว์ปีก	ขนาดของยีน ( bp)		GenBank Accession No.	
		H5	N1	H5	N1
CU-93	เปิด	1664	1373	N/A*	N/A
CU-95	เปิด	1667	1407	N/A	N/A
CU-98	เปิด	1667	1377	N/A	N/A
CU-130	เปิดกาก็	1711	1412	N/A	N/A
CU-131	เปิดกาก็	1697	1412	N/A	N/A
CU-160	ไก่	1704	1347	<a href="#">ABC69216</a>	<a href="#">ABC69218</a>
CU-161	นกกระทา	1704	1347	<a href="#">ABC69224</a>	<a href="#">ABC69226</a>
CU-162	ไก่	1704	1344	<a href="#">ABC69232</a>	<a href="#">ABC69234</a>
CU-202	นกพิราบ	1712	1406	<a href="#">AAZ29979</a>	<a href="#">AAZ30015</a>
CU-203	นกกระจอก	1714	1406	<a href="#">AAZ29980</a>	<a href="#">AAZ30016</a>
CU-209	นกเขี้ยว	1712	1404	<a href="#">AAZ29981</a>	<a href="#">AAZ30017</a>
CU-258	นกกระทา	1720	1413	N/A	N/A
CU-259	นกกระทา	1718	1414	N/A	N/A

\* N/A หมายถึง Not Available เนื่องจากยังไม่ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank

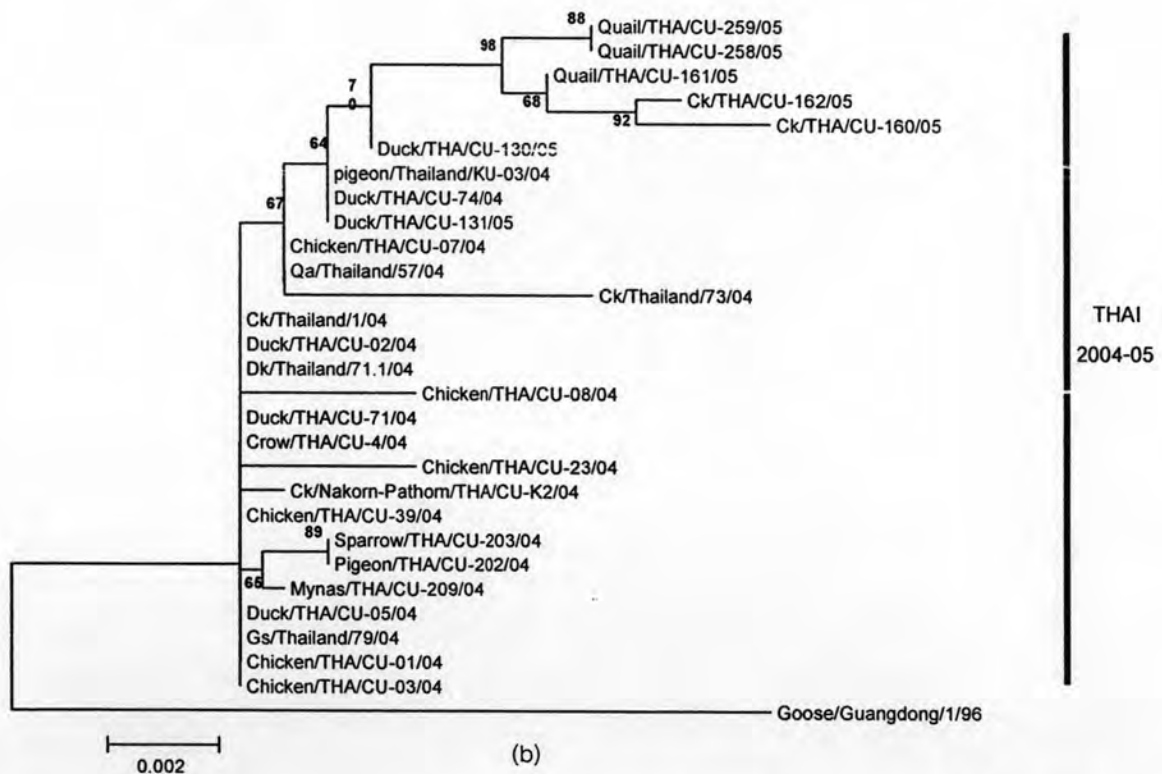
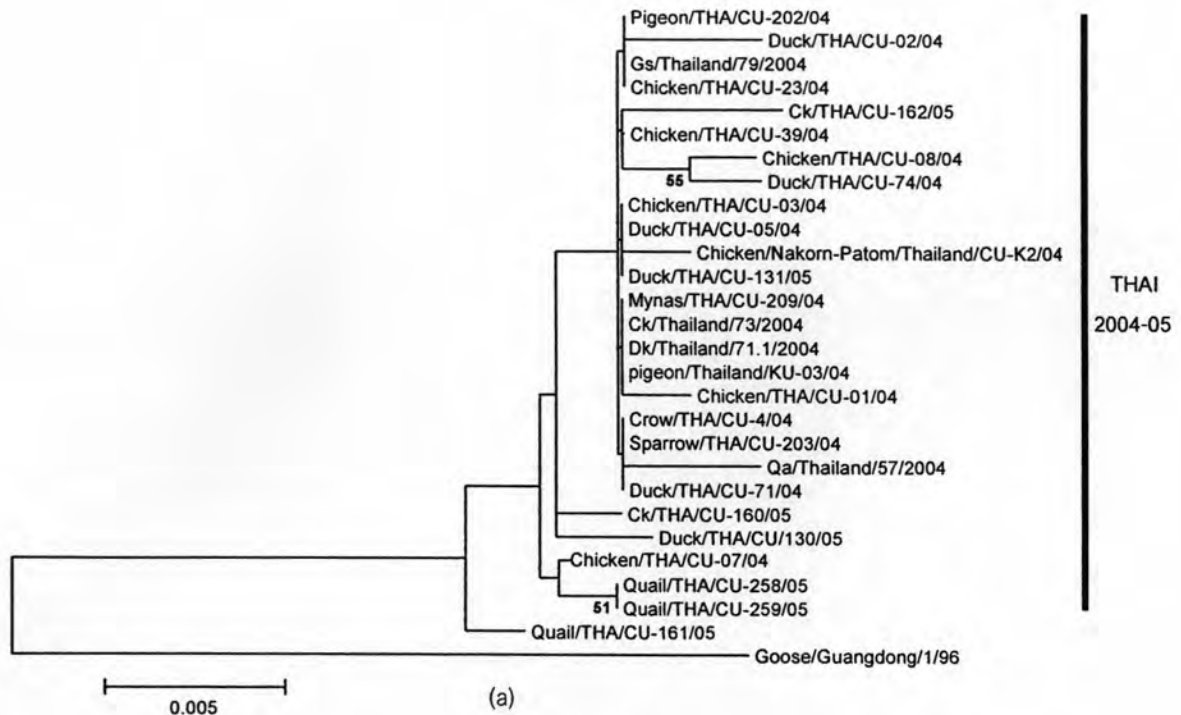
### 3. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้ในประเทศไทย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1 โดยวิธี cluster analysis และแสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในรูปแบบของ phylogenetic tree ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากการระบาดในปี 2004-2005 ผลการศึกษาค้นพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสที่เคยระบาดในประเทศไทยเมื่อต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) และกลางปี 2004 (A/Chicken/Thailand/CU-23/04) (รูปที่ 9)

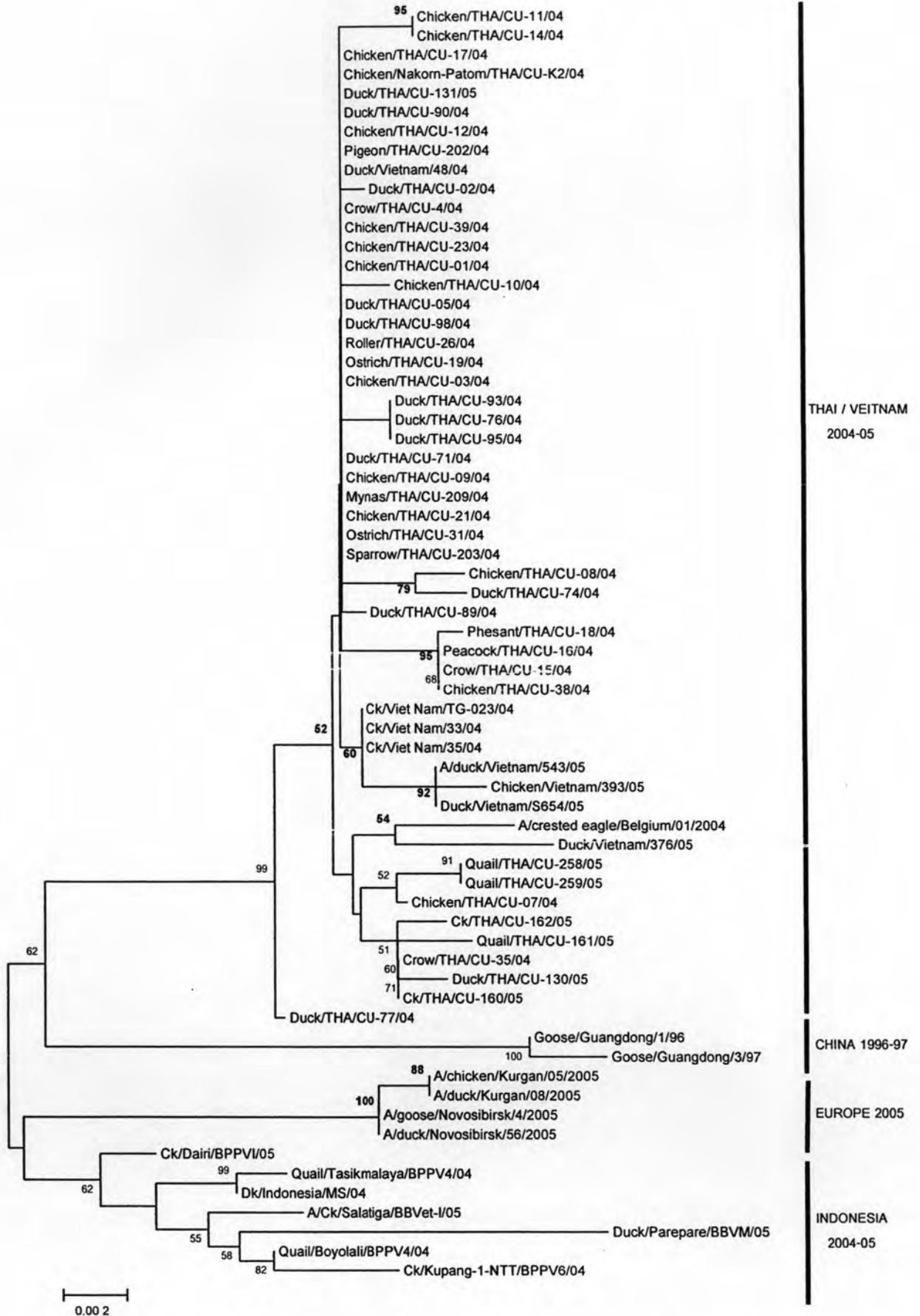
นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้กับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่มีรายงานในประเทศต่างๆ พบว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่พบจากการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสที่พบในประเทศเวียดนามช่วงปี 2004-2005 แต่แยกกลุ่มออกจากเชื้อไวรัสที่พบในประเทศอินโดนีเซีย ปี 2004-2005 ประเทศในแถบทวีปยุโรปปี 2005 และประเทศจีนทางตอนใต้ในปี 1996-1997 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเชื้อไวรัสได้ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ เชื้อไวรัสในกลุ่มของประเทศไทยและเวียดนาม เชื้อไวรัสในกลุ่มอินโดนีเซีย เชื้อไวรัสในกลุ่มประเทศทางยุโรป และเชื้อไวรัสในกลุ่มประเทศจีนตอนใต้ ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11

อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้เชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่นำมาศึกษาทั้งหมดเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 กลุ่ม genotype Z และเป็น genotype เดียวกันกับเชื้อที่พบในหลายประเทศในเอเชีย เช่น ประเทศจีน เวียดนาม อินโดนีเซีย ฮองกง รวมทั้งเชื้อที่พบในยุโรปและแอฟริกา

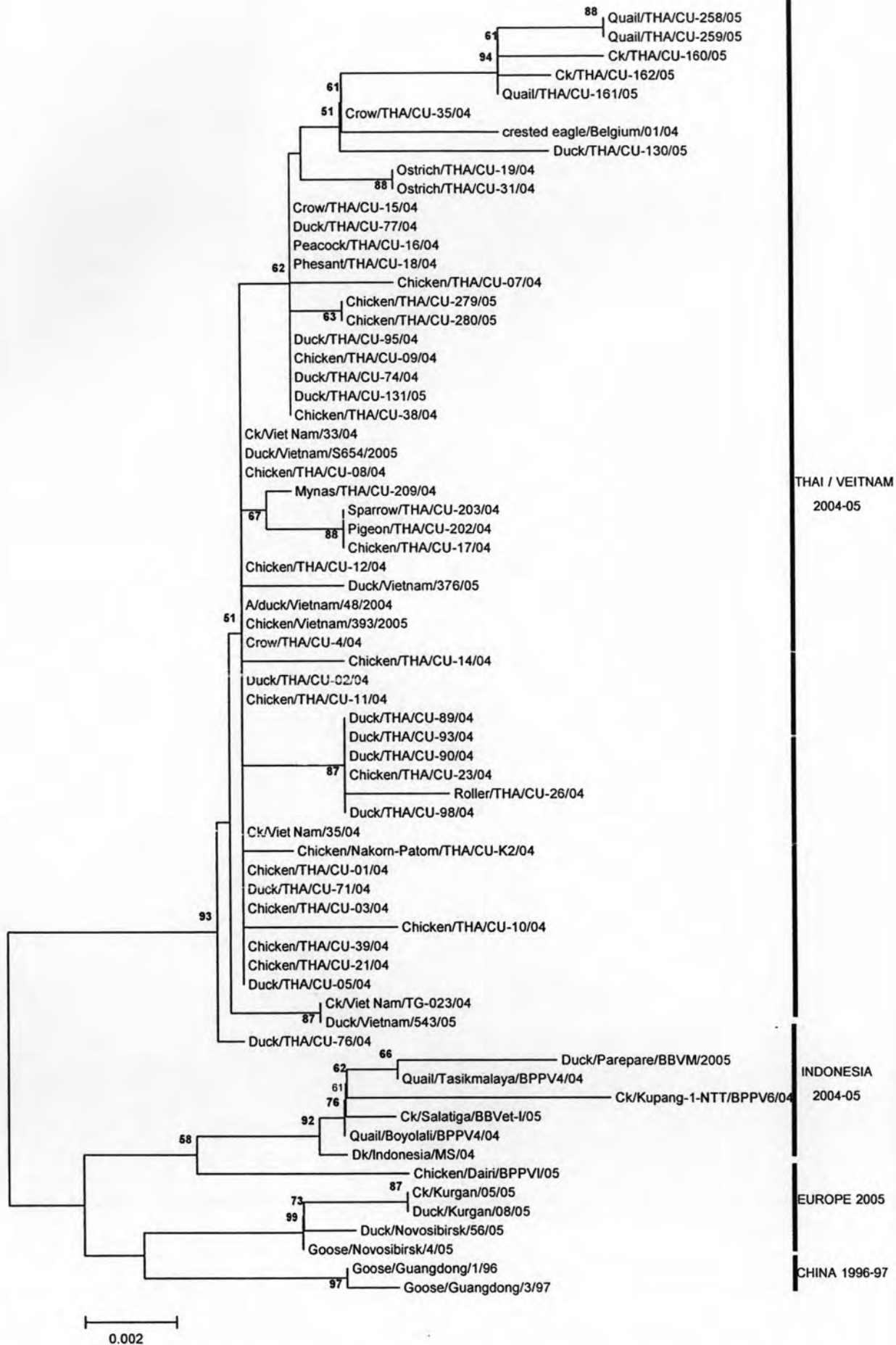




รูปที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน H5 (a) และ N1 (b) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้กับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในประเทศไทยช่วงต้นปี 2004 (Chicken/Nakon-Pathom/Thailand/CU-K2/04) ในรูปแบบ phylogenetic tree ของยีน H5 และ N1 โดยวิเคราะห์ nucleotide ของยีน H5 ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 49-1580 bp และ nucleotide ของยีน N1 ตั้งแต่ 1-1359 bp ผลการวิเคราะห์ bootstrap analysis แสดงเป็นตัวเลขบนแต่ละ branches และความยาวของเส้นแนวขวาง (horizontal lines) เป็นค่าสัดส่วนความแตกต่างของจำนวนนิวคลีโอไทด์ และในแต่ละ branches แทนด้วยชื่อของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา



รูปที่ 10 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน H5 ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษากับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในทวีปเอเชีย และยุโรปในปี 2004-2005 ในรูปแบบ phylogenetic tree



รูปที่ 11 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน N1 ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษากับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานในทวีปเอเชีย และยุโรปในปี 2004-2005 ในรูปแบบ phylogenetic tree

#### 4. ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน H5 และ N1

ข้อมูลลำดับเบสของยีน H5 และ N1 สามารถนำมาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้าย (identity) ของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของแต่ละยีน การวิเคราะห์ข้อมูลครั้งนี้ได้เปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสจำนวน 43 ตัวอย่าง ร่วมกับข้อมูลที่เคยมีรายงานในประเทศต่างๆ ด้วยโปรแกรม Mega 3.1

##### 4.1 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 และ N1

วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ similarity ในตัวแทนเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานคร ในเดือนกุมภาพันธ์ มีนาคม และ สิงหาคม 2004 จำนวน 7 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในช่วงต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) ผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 ในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้มีค่ามากกว่า 99 % และเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน N1 มีค่าประมาณ 97-99 % ดังแสดงตารางที่ 8

นอกจากนี้การศึกษาค้นครั้งนี้ได้วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากไก่ จำนวน 8 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้ในช่วงต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 ในเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้มีค่ามากกว่า 99 % ส่วนเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน N1 มีค่าประมาณ 96-97 % (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกจำนวน 7 ตัวอย่าง  
เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกแยกได้ในช่วงต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-  
Pathom/Thailand/CU-K2/04)

เชื้อไวรัสที่แยกได้	ความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ (bp)		ช่วงเวลา (เดือน)	% nucleotide identity (amino acid)	
	H5	N1		H5	N1
Chicken/THA/CU-03/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.9(99.8)	98.0(97.9)
Crow/THA/CU-04/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.9(99.8)	98.0(97.9)
Crow/THA/CU-15/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.6(99.4)	97.9(97.6)
Peacock/THA/CU-16/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.6(99.4)	97.9(97.6)
Pheasant/THA/CU-18/04	49-1578	1-1356	กุมภาพันธ์	99.6(99.2)	97.7(97.4)
Chicken/THA/CU-21/04	49-1578	16-1359	มีนาคม	99.9(99.8)	99.2(99.0)
Crow/THA/CU-35/04	49-1578	1-1359	สิงหาคม	99.7(99.6)	97.8(97.2)

ตารางที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของยีน H5 และ N1 ในตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกในไก่  
เปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดนกแยกได้ในช่วงต้นปี 2004 (A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-  
K2/04)

เชื้อไวรัสที่แยกได้	ความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ (bp)		ช่วงเวลา (เดือน)	% nucleotide identity (amino acid)	
	H5	N1		H5	N1
Chicken/THA/CU-01/04	49-1578	1-1359	มกราคม	99.7(99.6)	98.0(97.9)
Chicken/THA/CU-03/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.9(99.8)	98.0(97.9)
Chicken/THA/CU-10/04	49-1578	1-1359	กุมภาพันธ์	99.8(99.6)	97.8(97.6)
Chicken/THA/CU-21/04	49-1578	16-1359	มีนาคม	99.9(99.8)	99.2(99.0)
Chicken/THA/CU-23/04	49-1578	16-1356	กรกฎาคม	99.9(99.8)	98.6(98.3)
Chicken/THA/CU-39/04	49-1578	1-1359	กันยายน	99.9 (99.8)	98.0(97.9)
Chicken/THA/CU-160/05	49-1578	1-1359	ตุลาคม	99.6(99.2)	97.1(96.0)
Chicken/THA/CU-162/05	49-1578	1-1359	-	99.5(99.0)	97.3(96.3)

## 4.2 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน H5

### HA cleavage site

การเรียงตัวของกรดอะมิโนที่บริเวณ HA cleavage site สามารถใช้บ่งบอกถึงความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยพบว่าเชื้อไวรัสที่ก่อโรคที่มีความรุนแรงต่ำจะมีลักษณะของกรดอะมิโนบริเวณ HA cleavage site แบบ single basic amino acid แต่ในเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงสูงจะมีการเรียงตัวแบบ multiple basic amino acids (Wilschut and McElhane, 2005)

ผลการศึกษาค้นพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน cleavage site แบบ multiple basic amino acid ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดก่อโรครุนแรง และยังสามารถแบ่งการเรียงตัวของกรดอะมิโนออกได้เป็น 3 แบบ คือ RRRKKR, RKRKKR, KRRKRR ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 12 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่บริเวณตำแหน่งที่ 320-330 บนยีน HA (HA cleavage site)

การเรียงตัวแบบ RRRKKR พบได้ในสัตว์ปีกหลายชนิด โดยเฉพาะในไก่ (n=13) เป็ด (n=12) นอกจากนี้ยังพบได้ในอีกา (n=2) นกกระจอกเทศ(n=2) นกตะขาบทุ่ง (n=1) นกเอี้ยง (n=1) นกกระจอก (n=1) นกพิราบ (n=1) ส่วนการเรียงตัวแบบ RKRKKR พบในนกยูง อีกา ไก่ ไก่ฟ้า (ชนิดละ 1 ตัวอย่าง) และการเรียงตัวในลักษณะ KRRKRR พบได้ในนกกะทา (n=3) เป็ด (n=1) และไก่ (n=2)

อย่างไรก็ตามจะพบว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน HA cleavage site แบบ RRRKKR สามารถพบได้ในเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่รายงานในประเทศไทยในปี 1996-1997 ประเทศเวียดนาม อินโดนีเซียในปี 2004-2005 และประเทศในแถบยุโรปในปี 2005 ยกเว้นเชื้อไวรัสที่แยกจากประเทศเบลเยียม(A/crested\_eagle/Belgium/01/2004) จะเป็นการเรียงตัวแบบ KRRKRR (รูปที่ 12)

### Receptor binding site

เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ ก่อให้เกิดโรคในสัตว์หลายชนิด แต่มีรายงานลักษณะของกรดอะมิโนบน receptor binding site ที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดความจำเพาะต่อการจับบน oligosaccharide receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ host พบว่าเชื้ออินฟลูเอนซ่าที่ก่อโรคในสัตว์ปีกจะพบกรดอะมิโนชนิด glutamine (Q) และ glycine (G) ที่ตำแหน่ง 222 และ 224 บนยีน HA (Q226 และ G228 ของระบบ H3 numbering) (Vines et al., 1998 )



จากตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 222 และ 224 (Q222-G224) ดังตารางสรุปที่ 8 และเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างเชื้อไวรัสจากประเทศต่างๆ คือ จีน เวียดนาม อินโดนีเซีย ประเทศแถบยุโรป พบว่าเชื้อไวรัสยังมีลักษณะของกรดอะมิโนแบบ Q222 และ G224 เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของ receptor binding site ของเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์ปีก (รูปที่ 13)

#### N-link glycosylation site

ตำแหน่งของ glycosylation site บนยีน HA ประกอบด้วยสายของคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกับพันธะ N-glycosidic linkage (Lamb and Choppin, 1983) และ glycosylation site จะเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อไวรัส (Hulse et al., 2004) โดยเฉพาะ glycosylation site ที่บริเวณใกล้เคียงกับ receptor binding site เช่น ตำแหน่ง glycosylation site ที่ 154-156

เชื้อไวรัสใช้หวัดนกที่รายงานในประเทศจีนช่วงปี 1996-1997 ประเทศในแถบยุโรปปี 2004-2005 และเชื้อไวรัสบางตัวในประเทศอินโดนีเซีย (Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04) ไม่พบ glycosylation site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 154-156 อย่างไรก็ตามการศึกษาค้างนี้พบ glycosylation site แบบ NST ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 154-156 ในทุกตัวอย่างของเชื้อไวรัสใช้หวัดนก (แสดงดังตารางสรุปที่ 10 และรูปที่ 14)

### 4.3 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนยีน N1

#### NA stalk region

โปรตีน NA มีรูปร่างแบบ mushrooms ซึ่งประกอบด้วยส่วน head และ stalk region (Lamb and Choppin, 1983) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน stalk region ของยีน NA ส่งผลให้ไวรัสมีการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมใหม่และมีคุณสมบัติที่ทำให้ไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อไปยังสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆได้ (Bender et al., 1999; Suzuki, 2005)

จากการศึกษาค้างนี้พบการลดจำนวนของกรดอะมิโนจำนวน 20 ตัว ที่ตำแหน่ง 49-68 ของ NA stalk region ในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา (ตารางสรุปที่ 11) และวิเคราะห์เปรียบเทียบกับตัวอย่างเชื้อไวรัสใช้หวัดนกในต่างประเทศตั้งแต่ปี 2004 เป็นต้นมา พบว่าเชื้อไวรัสใช้หวัดนกที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ต่างไปจากเชื้อไวรัสใช้หวัดนกจากจีนในปี 1996-1997 (Gs/Gd/96 lineage) ซึ่งไม่พบการลดจำนวนของกรดอะมิโนที่บริเวณ NA stalk region (รูปที่ 15)

### NA active site

NA active site เป็นตำแหน่งที่อยู่บนส่วน head ของโปรตีน NA ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน NA active site มีผลทำให้เชื้อไวรัสต่อต้านยาที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวรามินิเดส (Moscona, 2005) ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบน NA active site ที่มีผลต่อการต้านยา oseltamevir ซึ่งจากผลการศึกษายังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 119, 293, 295, 275 ในตัวอย่างเชื้อไวรัสใช้หวัดนกจำนวน 43 ตัวอย่าง (ตารางสรุปที่ 11) เช่นเดียวกับเชื้อไวรัสใช้หวัดนกที่แยกได้ในจีนตอนใต้ (Gs/Gd/96 lineage) อินโดนีเซีย เวียดนาม และยุโรปปี 2004-2005 ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณ NA active site (รูปที่ 16, 17 และ 18 )

ตารางที่ 10 สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน H5

เชื้อไวรัส	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของยีน H5*			
	Cleavage site	Receptor binding site		N-link glycosylation site
		222	224	154-156
A/Goose/Guangdong/1/96	TPQRERRRKKR	Q	G	- (NSA)
A/Goose/Guangdong/3/97	TPQRERRRKKR	Q	G	- (NSA)
A/crested_eagle/Belgium/01/2004	SPQREKRRKKR	Q	G	NST
A/chicken/Kurgan/05/2005	SPQGERRRKKR	Q	G	- (DNA)
A/duck/Kurgan/08/2005	SPQGERRRKKR	Q	G	- (DNA)
A/duck/Novosibirsk/56/2005	SPQGERRRKKR	Q	G	- (NNA)
A/goose/Novosibirsk/4/2005	SPQRERRRKKR	Q	G	- (NNA)
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	SPQRERRRKKR	Q	G	- (NSA)
Quail/Boyolali/BPPV4/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/Kupang-1-NTT/BPPV6/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Dk/Indonesia/MS/04	SPQRERRRKKR	Q	G	- (NSA)
Duck/Parepare/BBVM/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/Dairi/BPPVI/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
A/Ck/Salatiga/BBVet-I/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NSS
Ck/Viet_Nam/33/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/Viet_Nam/35/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/Viet_Nam/TG-023/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/Vietnam/376/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/Vietnam/543/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/Vietnam/393/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/Vietnam/48/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/Vietnam/S654/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/Nakorn-Patom/THA/CU-K2/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Peacock/THA/CU-16/04	SPQRERKRKKR**	Q	G	NST
Crow/THA/CU-4/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Crow/THA/CU-15/04	SPQRERKRKKR**	Q	G	NST
Phesant/THA/CU-18/04	SPQRERKRKKR**	Q	G	NST
Ostrich/THA/CU-19/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Roller/THA/CU-26/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ostrich/THA/CU-31/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Crow/THA/CU-35/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Pigeon/THA/CU-202/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Sparrow/THA/CU-203/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Mynas/THA/CU-209/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST

\* ชื่อเต็มของกรดอะมิโนแต่ละชนิดสามารถดูได้ที่ภาคผนวก

ตารางที่ 10 สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน H5 (ต่อ)

เชื้อไวรัส	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของยีน H5*			
	Cleavage site	Receptor binding site		N-link glycosylation site
		222	224	154-156
Chicken/THA/CU-23/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-21/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-01/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-03/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-07/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-08/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-09/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-10/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-11/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-12/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-14/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-17/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-38/04	SPQRERKRKKR	Q	G	NST
Chicken/THA/CU-39/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-02/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-05/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-71/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-74/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-76/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-77/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-89/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-90/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-93/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-95/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Duck/THA/CU-98/04	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Quail/THA/CU-258/05	SPQREKRKKR***	Q	G	NST
Quail/THA/CU-259/05	SPQREKRKKR***	Q	G	NST
Duck/THA/CU-130/05	SPQREKRKKR***	Q	G	NST
Duck/THA/CU-131/05	SPQRERRRKKR	Q	G	NST
Ck/THA/CU-160/05	SPQREKRKKR***	Q	G	NST
Quail/THA/CU-161/05	SPQREKRKKR***	Q	G	NST
Ck/THA/CU-162/05	SPQREKRKKR***	Q	G	NST

\* ชื่อเต็มของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในสามารถดูได้ที่ภาคผนวก

การเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ RRRKKR พบจำนวน 33 ตัวอย่าง

\*\*การเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ RKRKKR พบจำนวน 4 ตัวอย่าง

\*\*\*การเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ RRRKKR พบจำนวน 6 ตัวอย่าง

ตารางที่ 11 สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน N1

เชื้อไวรัส	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของยีน N1*				
	NA stalk region	ตำแหน่งกรดอะมิโนบน NA active site			
		119	293	295	275
A/Goose/Guangdong/1/96	No deletion	E	R	N	H
A/Goose/Guangdong/1/97	No deletion	E	R	N	H
A/crested_eagle/Belgium/01/2004	20-aa deletion	E	R	N	H
A/chicken/Kurgan/05/2005	20-aa deletion	E	R	N	H
A/duck/Kurgan/08/2005	20-aa deletion	E	R	N	H
A/duck/Novosibirsk/56/2005	20-aa deletion	E	R	N	H
A/goose/Novosibirsk/4/2005	20-aa deletion	E	R	N	H
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Quail/Boyolali/BPPV4/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Kupang-1-NTT/BPPV6/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Dk/Indonesia/MS/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/Parepare/BBVM/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Dairi/BPPVI/05	20-aa deletion	E	R	N	H
A/Ck/Salatiga/BBVet-I/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Viet_Nam/33/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Viet_Nam/35/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Viet_Nam/TG-023/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/Vietnam/376/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/Vietnam/543/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/Vietnam/393/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/Vietnam/48/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/Vietnam/S654/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/Nakorn-Patom/THA/CU-K2/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Crow/THA/CU-4/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Crow/THA/CU-15/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Peacock/THA/CU-16/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Phesant/THA/CU-18/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Ostrich/THA/CU-19/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Roller/THA/CU-26/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Ostrich/THA/CU-31/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Crow/THA/CU-35/04	20-aa deletion	E	R	N	H

\* ชื่อเต็มของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในสามารถดูได้ที่ภาคผนวก

ตารางที่ 11 สรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ บนยีน N1 (ต่อ)

ชื่อไวรัส	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนตำแหน่งต่างๆ ของยีน N1*				
	NA stalk region	ตำแหน่งกรดอะมิโนบน NA active site			
		119	293	295	275
Pigeon/THA/CU-202/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Sparrow/THA/CU-203/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Mynas/THA/CU-209/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-23/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-21/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-01/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-03/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-07/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-08/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-09/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-10/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-11/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-12/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-14/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-17/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-38/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Chicken/THA/CU-39/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-02/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-05/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-71/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-74/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-76/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-77/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-89/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-90/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-93/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-95/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-98/04	20-aa deletion	E	R	N	H
Quail/THA/CU-258/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Quail/THA/CU-259/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-130/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Duck/THA/CU-131/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/THA/CU-160/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Quail/THA/CU-161/05	20-aa deletion	E	R	N	H
Ck/THA/CU-162/05	20-aa deletion	E	R	N	H

\* ข้อเติมของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในสามารถดูได้ที่ภาคผนวก



รูปที่ 12 ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโน (amino acid alignment) บริเวณ HA cleavage site  
ที่ตำแหน่ง 320-330

		320*	330*
Goose/Guangdong/1/96	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Goose/Guangdong/3/97	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
A/crested_eagle/Belgium/01/2004	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
A/chicken/Kurgan/05/2005	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
A/duck/Kurgan/08/2005	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
A/duck/Novosibirsk/56/2005	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
A/goose/Novosibirsk/4/2005	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Quail/Boyoalali/BPPV4/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Ck/Kupang-1-NIT/BPPV6/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Dk/Indonesia/MS/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/Parepare/BBVM/05	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Ck/Dairi/BPPVI/05	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
A/Ck/Salatiga/BBVet-I/05	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Ck/Viet_Nam/33/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Ck/Viet_Nam/35/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Ck/Viet_Nam/TC-023/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/Vietnam/376/05	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
A/duck/Vietnam/543/05	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/Vietnam/393/05	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/Vietnam/48/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/Vietnam/S654/05	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/Wakorn-Patom/THA/CU-K2/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Peacock/THA/CU-16/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Crow/THA/CU-4/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Crow/THA/CU-15/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Pheasant/THA/CU-18/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Ostrich/THA/CU-19/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Roller/THA/CU-26/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Ostrich/THA/CU-31/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Crow/THA/CU-35/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Pigeon/THA/CU-202/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Sparrow/THA/CU-203/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Mynas/THA/CU-209/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-23/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-21/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-01/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-03/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-07/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-08/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-09/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-10/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-11/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-12/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-14/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-17/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-38/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Chicken/THA/CU-39/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-02/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-05/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-71/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-74/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-76/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-77/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-89/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-90/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-93/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-95/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR
Duck/THA/CU-98/04	IHPLTIGECPKYVKS	NRLV	LATGLR

\* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 320-330



รูปที่ 14 ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ N-link glycosylation site ที่ตำแหน่ง 154-156 (N-T)

	154*	156*
Goose/Guangdong/1/96	S	S
Goose/Guangdong/3/97	S	S
A/crested_eagle/Belgium/01/2004	S	S
A/chicken/Kurgan/05/2005	S	S
A/duck/Kurgan/08/2005	S	S
A/duck/Novosibirsk/56/2005	S	S
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	S	S
A/goose/Novosibirsk/4/2005	S	S
Quail/Boyolali/BPPV4/04	S	S
Ck/Kupang-1-MIT/BPPV6/04	S	S
Dk/Indonesia/H5/04	S	S
Duck/Parepare/BBVH/05	S	S
Ck/Dairi/BPPVI/05	S	S
A/Ck/Salatiga/BBVet-I/05	S	S
Ck/Viet_Nam/33/04	S	S
Ck/Viet_Nam/35/04	S	S
Ck/Viet_Nam/TG-023/04	S	S
Duck/Vietnam/376/05	S	S
A/duck/Vietnam/543/05	S	S
Chicken/Vietnam/393/05	S	S
Duck/Vietnam/48/04	S	S
Duck/Vietnam/5654/05	S	S
Chicken/Nakorn-Patom/THA/CU-R2/04	S	S
Peacock/THA/CU-16/04	S	S
Crow/THA/CU-4/04	S	S
Crow/THA/CU-15/04	S	S
Pheasant/THA/CU-18/04	S	S
Crow/THA/CU-35/04	S	S
Pigeon/THA/CU-202/04	S	S
Sparrow/THA/CU-203/04	S	S
Mynas/THA/CU-209/04	S	S
Chicken/THA/CU-23/04	S	S
Chicken/THA/CU-21/04	S	S
Chicken/THA/CU-01/04	S	S
Chicken/THA/CU-03/04	S	S
Chicken/THA/CU-07/04	S	S
Chicken/THA/CU-08/04	S	S
Chicken/THA/CU-09/04	S	S
Chicken/THA/CU-10/04	S	S
Chicken/THA/CU-11/04	S	S
Chicken/THA/CU-12/04	S	S
Chicken/THA/CU-14/04	S	S
Chicken/THA/CU-17/04	S	S
Chicken/THA/CU-38/04	S	S
Chicken/THA/CU-39/04	S	S
Duck/THA/CU-02/04	S	S
Duck/THA/CU-05/04	S	S
Duck/THA/CU-71/04	S	S
Duck/THA/CU-74/04	S	S
Duck/THA/CU-76/04	S	S
Duck/THA/CU-77/04	S	S
Duck/THA/CU-89/04	S	S
Duck/THA/CU-90/04	S	S
Duck/THA/CU-93/04	S	S
Duck/THA/CU-95/04	S	S
Duck/THA/CU-98/04	S	S

\* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 154 - 156



รูปที่ 15 ผลการเปรียบเทียบบริเวณ stalk region ที่ตำแหน่ง 49-68

		49*	68*
Goose/Guangdong/1/96	G I S L M L Q I G N I I S I W V S H S I Q T G N Q H Q A E P C N Q S I I T Y E N N T W V N Q T Y V M		I S N T N F L T E K A V A S V T L /
Goose/Guangdong/3/97	G I V S L M L Q I G N I I S I W V S H S I Q T G N Q H Q A E P C N Q S I I T Y E N N T W V N Q T Y V M		I S N T N F L T E K A V A S V T L /
Quail/Tasikmalaya/BPPV4/04	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q T G N Q H R A E S		I S N T N F L T E K A V A S V T L /
Ck/Kupang-1-MT/BPPV6/04	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q T G N Q H Q A E S		I S N T N F L T E K A V A S V T L /
Quail/Bojolali/BPPV4/04	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q T G N Q H Q A E S		I S N N N P L T E K A V A S V T L /
Ck/Indonesia/KS/04	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q T G N Q H Q A E S		I S N T N F L T E K A V A S V T L /
Chicken/Dairi/BPPVI/05	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q T G N Q H Q A E S		I S N T N F L T E K A V A S V T L /
Ck/Salatiga/BBVer-1/05	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q K G N Q H Q A E S		I G N T N F L T E K A V A S V T L /
Duck/Parepare/BBVM/2005	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q T G N Q H Q A E S		I S N T N P L T D K A V A S V T L /
Duck/Vietnam/S654/2005	G I V S L M L Q V G N M I S I W V S H S I H T G N Q H Q A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Ck/Kurgan/05/05	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q T G N Q R Q A E P		I S N T K F L T E K A V A S V T L /
Duck/Kurgan/08/05	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q T G N Q R Q A E P		I S N T K F L T E K A V A S V T L /
crested_eagle/Belgium/01/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q Q K A E P		I S N T N F L T E K A V T S V K L /
Goose/Novosibirsk/4/05	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q T G N Q R Q A E P		I S N T K F L T E K A V A S V T L /
Duck/Novosibirsk/56/05	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I Q T G N Q R Q A E P		I S N T K F L T E K A V A S V T L /
Ck/Viet Nam/TG-023/04	G I V N L M L Q V G N M I S I W V S H S I H T G N Q H Q A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Ck/Viet Nam/33/04	G I V S L M L Q V G N M I S I W V S H S I H T G N Q H Q A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Ck/Viet Nam/35/04	G I V S L M L Q V G N M I S I W V S H S I H T G N Q H Q A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Duck/Vietnam/376/05	G I V S L M L Q V G N M I S I W V S H S I H T G N Q H Q A E P		I S N T N F L N E K A V A S V K L /
Duck/Vietnam/543/05	G I V S L M L Q V G N M I S I W V S H S I H T G N Q H Q A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/Vietnam/393/2005	G I V S L M L Q V G N M I S I W V S H S I H T G N Q H Q A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
A/duck/Vietnam/48/2004	G I V S L M L Q I G N M I S I W V S H S I H T G N Q H Q A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/Nakorn-Patom/THA/CU-K2/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Crow/THA/CU-4/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Crow/THA/CU-15/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Peacock/THA/CU-16/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Pheasant/THA/CU-18/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Ostrich/THA/CU-19/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q Q K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Roller/THA/CU-26/04	-----		-----A S V K L /
Ostrich/THA/CU-31/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q Q K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Crow/THA/CU-35/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q Q K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Pigeon/THA/CU-202/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S I K L /
Sparrow/THA/CU-203/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S I K L /
Mynas/THA/CU-209/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S L K L /
Chicken/THA/CU-23/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N L L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-21/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-01/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-03/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-07/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-08/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-09/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-10/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A P V K L /
Chicken/THA/CU-11/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-12/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-14/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-17/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S I K L /
Chicken/THA/CU-38/04	G T V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Chicken/THA/CU-39/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Duck/THA/CU-02/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Duck/THA/CU-05/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Duck/THA/CU-71/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Duck/THA/CU-74/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q Q K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Duck/THA/CU-76/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Duck/THA/CU-77/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S V H T G N Q Q K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Duck/THA/CU-89/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N L L T E K A V A S V K L /
Duck/THA/CU-90/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N L L T E K T V A S V K L /
Duck/THA/CU-93/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N L L T E K A V A S V K L /
Duck/THA/CU-95/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q Q K A E P		I S N T N F L T E K A V A S V K L /
Duck/THA/CU-98/04	G M V S L M L Q I G N L I S I W V S H S I H T G N Q H K A E P		I S N T N L L T E K A V A S V K L /

\* ลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 49 - 68







