USE OF SEMICONDUCTOR-BASED OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAYS FOR IDENTIFICATION AND MONITORING OF H5N1 AVIAN INFLUENZA A VIRUS MUTATION

SUPAPORN KAEWPONGSRI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(CLINICAL PATHOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

การตรวจติดตาม และบ่งชี้การกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ เอช5เอ็น1 โดยเทคนิคของเซมิคอนดักเตอร์ เบสโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไมโครอะเรย์

(USE OF SEMICONDUCTOR-BASED OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAYS FOR IDENTIFICATION AND MONITORING OF H5N1 AVIAN INFLUENZA A VIRUS MUTATION)

สุภาพร แก้วผ่องศรี 4836324 RACP/M

วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วสันต์ จันทราทิตย์, Ph.D., สุรางค์รัตน์ ศรีสุรภานนท์, Ph.D ชลภัทร สุขเกษม, Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ เอช 5 เอ็น 1 เป็นโรคติดต่อที่ พบการระบาดทุกภูมิภาคทั่วโลก การเฝ้าระวังและการจัดการควบคุมการแพร่ระบาดที่ได้ผล ต้องอาศัยการตรวจวัดที่รวดเร็วและทันการ จึงจะสามารถควบคุมการระบาดที่รุนแรงของไวรัสไข้หวัดนก ดังนั้นเพื่อจัดการและควบคุมการแพร่ระบาดที่รุนแรงของไวรัสไข้หวัดนกอย่างได้ผล จะต้องอาศัยเทคโนโลยีในการตรวจจับที่รวดเร็ว การนำเทคโนโลยีเซมิคอนดักเตอร์ เบสโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไมโครอะเรย์ เป็นเทคโนโลยีร่วมของการผลิตชิปวงจรรวมและสารกึ่งตัวนำ มาใช้ระบุสายพันธุ์และครอบคลุมการติดตามการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดนก โดยอาศัยเทคโนโลยีนี้สามารถระบุชนิดของไวรัสอินฟลูเอนซาตามคุณสมบัติแอนติเจนฮีมากลูตินินได้ 16 ชนิด และ นิวรามินิเดสได้ 9 ชนิด

โดยการศึกษานี้ได้นำตัวอย่าง อาร์เอ็นเอเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ เอช 5 เอ็น 1 ที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจจากนกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ระบาดในปี 2003-2006 มาทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีดังกล่าว ซึ่งสามารถระบุซับไทป์ของตัวอย่างทั้ง 8 ได้อย่างถูกต้อง แต่เพื่อให้ครอบคลุมการตรวจติดตามการเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกระดับโมเลกุล จึงมีการใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ ร่วมกับผลการตรวจจับสัญญาณของเซมิคอนดักเตอร์ เบสโอลิโกนิวคลีโอไทด์ เพื่อที่จะหาลำดับเบสที่จะบ่งถึงความจำเพาะต่อสายพันธุ์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ เอช 5 เอ็น 1 โดยวิธีดังกล่าวสามารถถอดรหัสพันธุกรรมของฮีมากลูตินินและนิวรามินิเดสได้ถูกต้องและสอดคล้องกับผล จากวิธีการหาลำดับเบสด้วยวิธีดั้งเดิม จากตัวอย่าง 4 ใน 5 ตัวอย่าง

ถึงแม้การหาลำดับเบสด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ จะสะดวกกว่าวิธีการถอดรหัสพันธุกรรมด้วยวิธีดั้งเดิม แต่ข้อจำกัดของของวิธีนี้ คือ จะต้องปรับข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูลให้ทันสมัยอย่างสม่ำเสมอ เพื่อรองรับการตรวจติดตามการกลายพันธุ์ไข้หวัดนกสายพันธุ์

101 หน้า

Copyright by Mahidol University

USE OF SEMICONDUCTOR-BASED OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAYS FOR IDENTIFICATION AND MONITORING OF H5N1 AVIAN INFLUENZA A VIRUS MUTATION

SUPAPORN KAEWPONGSRI 4836324 RACP/M

M.Sc. (CLINICAL PATHOLOGY)

THESIS ADVISORS: WASUN CHANTRATITA, Ph.D.,
SURANGRAT SRISURAPANON, Ph.D., CHONLAPHAT SUKASEM, Ph.D.

ABSTRACT

Global surveillance of influenza A/H5N1 is critical for improvement in disease management, and is especially important for early detection, rapid intervention, and a possible reduction of the impact of an influenza pandemic. There is a great demand for new technological methods for viral discovery. We described a semiconductor-base oligonucleotide microarray for influenza A virus identification and monitoring. Central to this approach was microarray designed to identify influenza A virus hemagglutinin subtypes 1 through 16 and neuraminidase subtypes 1 through 9. To further characterize this influenza A virus, we proposed Bioedit program for accurately identifying viral sequences by discovering sequence signature, which was enough distinctive information for the sequence identification.

The 8 H5N1-RNA samples were collected and extracted from birds and mammal samples between 2003 to 2006, which were used to analyze H5N1 genotypic testing with semiconductor-base oligonucleotide microarray. One hundred percent (8/8) of the samples tested were subtyped correctly as H5N1. After absolutely correct subtyping from microarray signal intensity result, the method used microarray output combined with Bioinformatic tool for identification and monitoring of genetic variations of H5N1. The outstanding feature of this assay is its capability to distinguish different strains of H5N1. Ninety percent HA (4/5) and ninety percent NA (4/5) genes were sequenced correctly in accordance with previous examinations performed by classical diagnostic methods.

This assay was a convenient and practical tool for the study of avian influenza viruses, providing important HA and NA data more rapidly than conventional methods. However, the protocol monitoring of the new strain H5N1 is recommended for further study.

KEY WORDS: H5N1 VIRUS / SEMICONDUCTOR-BASED OLIGONUCLEOTIDE / MICROARRAY / MUTATION

101 pp.

Copyright by Mahidol University