บทที่ 4
ผลการทดลอง

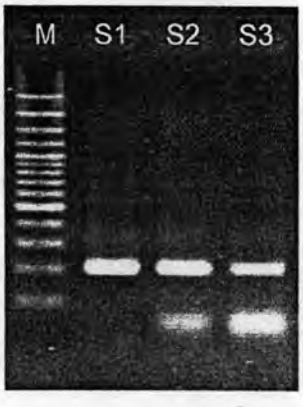
การศึกษาในครั้งนี้เป็นการพัฒนาการตรวจหาเชื้อ influenza A virus โดยการใช้เทคนิค multiplex RT-PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ matrix gene (M) ที่มีความ conserve ต่อ influenza A virus ทุกสายพันธุ์ (subtype) พร้อมกับแยกว่าเป็นสายพันธุ์ H1 H3 H5 โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ Hemagglutinin ของไวรัส ร่วมกับการตรวจหายีน GAPDH ซึ่งเป็น housekeeping gene ในเวลาเดียวกัน เพื่อเป็นการตรวจสอบว่ามีสาร RNA และสามารถเก็บตัวอย่างได้ถูกต้อง ช่วยในการวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้องแม่นยำลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น แล้วทดสอบไพรเมอร์ด้วย cDNA ของเชื้อไวรัสที่สกัดได้จากผู้ป่วยที่ตรวจพบว่าติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 จำนวน 8 ตัวอย่าง และ H3N2 จำนวน 11 ตัวอย่าง และสัตว์ที่ติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จำนวน 16 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยวิธี in silico PCR

จากการทดสอบด้วยโปรแกรม BLAST และการ alignment พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อยีนที่ออกแบบเท่านั้น

ผลการทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ด้วย monoplex PCR

1. การทดสอบไพรเมอร์ MF5/MR276

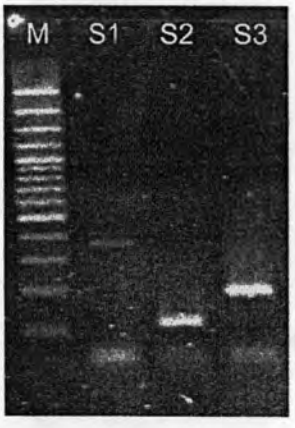


ภาพที่ 4 ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ MF5/MR276 โดยช่อง M คือ 100 bp DNA marker ช่อง S1-S2- คือ cDNA ที่สกัดได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ตามลำดับ ช่อง S3 คือ cDNA ที่สกัดได้จากสัตว์ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H5N1 ได้ PCR product ขนาด 214 bp

2. การทดสอบไพรเมอร์ GAPDHF85/GAPDHR191

ภาพที่ 5 ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ GAPDHF85/GAPDHR191 โดยช่อง M คือ 100 bp DNA marker **ช่อง** S1-S2- คือ cDNA ที่สกัดได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ตามลำดับ ช่อง S3 คือ cDNA ที่สกัดได้จากสัตว์ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H5N1 ได้ PCR product **ขนาด** 107 bp

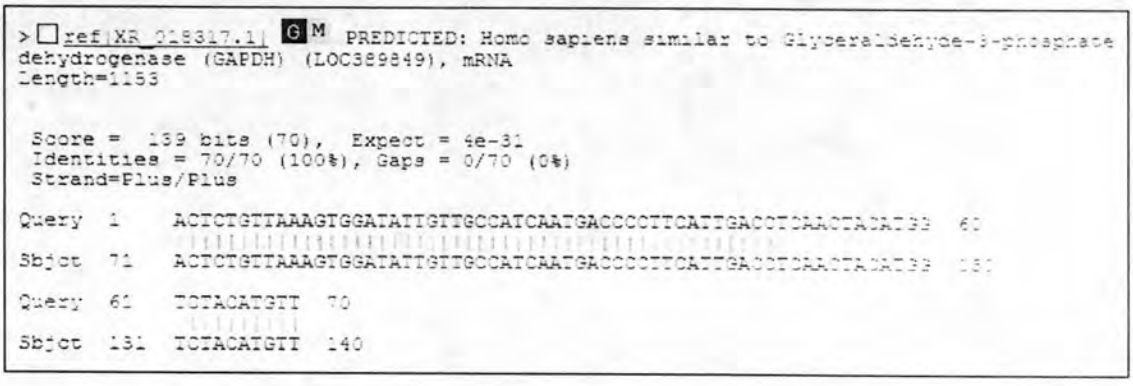
3. การทดสอบไพรเมอร์ H1F266/H1R627, H3F3/H3R2, H5F3, H5R2++



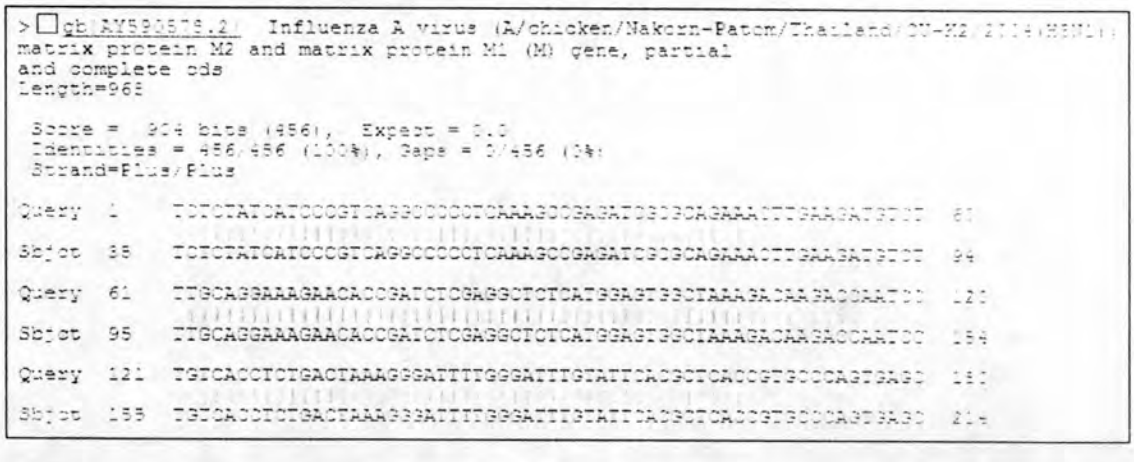
ภาพที่ 6 ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ H1F266/H1R627, H3F3/H3R2, H5F3/H5R2++ **โดยช่อง M คือ** 100 bp DNA marker ช่อง S1 คือ cDNA ที่สกัดได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1 กับไพรเมอร์ H1F266/H1R3 ได้ PCR product ขนาด 362 bp ช่อง S2 คือ cDNA ที่สกัดได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H3N2 กับไพรเมอร์ H3F3/H3R2 ได้ PCR product **ขนาด** 112 bp ช่อง S3 คือ cDNA ที่สกัดได้จากสัตว์ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H5N1 กับไพรเมอร์ H5F3/H5R2++ ได้ PCR product ขนาด 191 bp

ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของรีคอมบิแนนพลาสมิดที่ใช้เป็น positive control

ผลการตรวจสอบการถอดรหัสพันธุกรรมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ เพื่อยืนยันว่ายีนที่แทรกในพลาสมิดเป็นยีนที่ถูกต้อง โดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยการ BLAST จาก www.ncbi.nlm.gov/Blast พบว่าทุกยีนที่แทรกมีความถูกต้องทุกยีน ดังแสดงในภาพที่ 7 ถึงภาพที่ 11



ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน GAPDH ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ GAPDHF85



ภาพที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน M ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ MF5

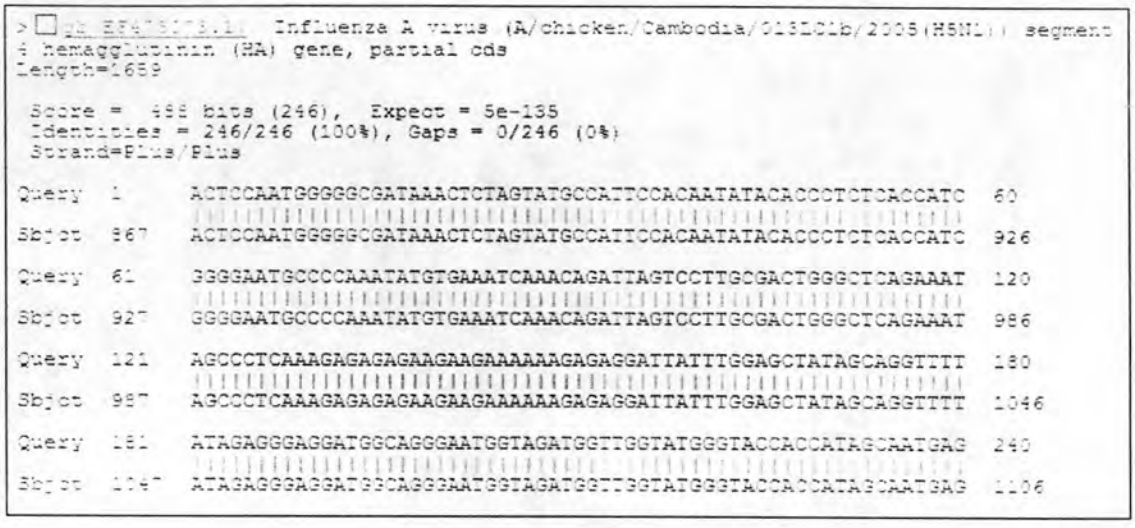
```
>☐gb|EF467365.1|  Influenza A virus (A/South Africa/65/2000(H1N1)) segment 4 hemagglutinin
(HA) gene, partial cds
Length=975

 Score =  353 bits (178),  Expect = 1e-94
 Identities = 187/190 (98%), Gaps = 0/190 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  2    TCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGCATTTCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCA  61
            ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  252  TCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGTATTTCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCA  311

Query  62   ATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCC  121
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  312  ATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCC  371

Query  122  CAACCACACCGCATCCGGAGTATCAGCATCATGCTCCCATAATGGGAAAAGCAGTTTTTA  181
            |||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  372  CAACCACACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCCATAATGGGAAAAGCAGTTTTTA  431

Query  182  CAAAAATTTG  191
            ||||||||||
Sbjct  432  CAAAAATTTG  441
```

ภาพที่ 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H1 ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ H1F266

```
>☐gb|CY020533.1|  Influenza A virus (A/New York/913/2005(H3N2)) segment 4, complete
sequence
Length=1722

 Score =  474 bits (239),  Expect = 7e-131
 Identities = 239/239 (100%), Gaps = 0/239 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    CTATGTCTGGTTTTCGCTCAAAAACTTCCCGGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  41   CTATGTCTGGTTTTCGCTCAAAAACTTCCCGGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGC  99

Query  61   CTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAAAACAATCACGAATGACCAAATT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  100  CTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAAAACAATCACGAATGACCAAATT  159

Query  121  GAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGGAATATGCGACAGT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  160  GAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGGAATATGCGACAGT  219

Query  181  CCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCC  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  220  CCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCC  278
```

ภาพที่ 10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H3 ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ H3F3

I25278186

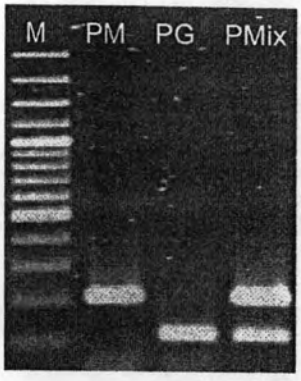


ภาพที่ 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ H5F3

ผลการปรับคอนดิชั่น multiplex PCR ด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

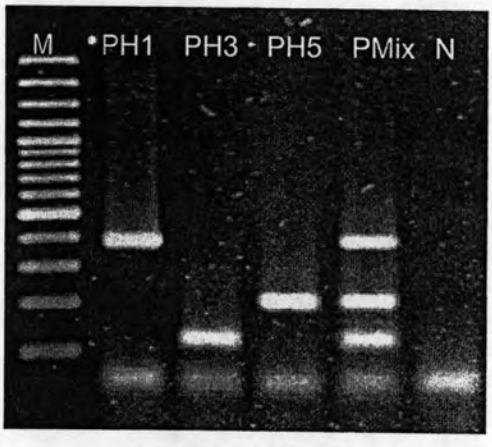
เมื่อได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการแล้ว จึงนำมาใช้ในการปรับสภาวะที่เหมาะสมในระบบ multiplex PCR ซึ่งในปริมาตรสุดท้าย 20 µl ประกอบด้วย cDNA 0.5-1 µl ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ใน PCR buffer ความเข้มข้น 1X PCR buffer ประกอบด้วย 10mM Tris-HCl(pH8.3), 50mM KCl, 2mM $MgCl_2$ และ 1 unit *i-Taq*™ DNA Polymerase 1mM dNTPs(0.25mM each) ไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 µM และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl แล้วนำไปทำ PCR ด้วยคอนดิชั่นดังนี้ 94°C 3 นาที ตามด้วย 40 cycle ของ 94°C 30 วินาที 58°C 30 วินาที 72°C 1 นาที แล้วต่อด้วย 72°C 10 นาทีและ 25°C 15 นาที

1. **ระบบ** multiplex M GAPDH



ภาพที่ 12 ผลการเพิ่มจำนวนพลาสมิด โดยการทำ multiplex PCR M GAPDH ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง PM และ PG คือรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน M และ GAPDH ตามลำดับ ช่อง PMix คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน M และ GAPDH ผสมกัน

2. **ระบบ** multiplex H1 H3 H5

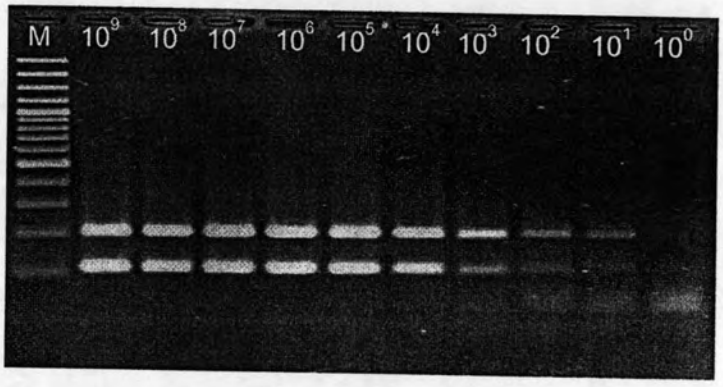


ภาพที่ 13 ผลการเพิ่มจำนวนพลาสมิด โดยการทำ multiplex PCR H1 H3 H5 ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง PH1 PH3 PH5 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 H3 H5 ตามลำดับ ช่อง PMix คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 H3 H5 ผสมกัน ช่อง N คือ DW

ผลการทดสอบความไว (Sensitivity)

1. **ระบบ multiplex M GAPDH**

ผลการทดสอบความไวโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน M GAPDH ที่มีความเขมข้นเท่ากัน ผสมกัน พบว่า multiplex M GAPDH มีความไวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 10^3 copies/µl ดังภาพที่ 14

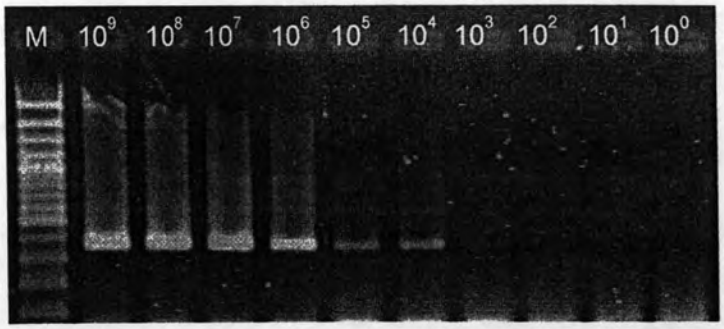


ภาพที่ 14 ผลการทดสอบความไวของ multiplex M GAPDH โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน M GAPDH รวมกัน โดยใช้พลาสมิดที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^9 จนถึง 10^0 copies/µl ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง N คือ DW

2. **ระบบ multiplex H1 H3 H5**

1.1 พลาสมิด H1

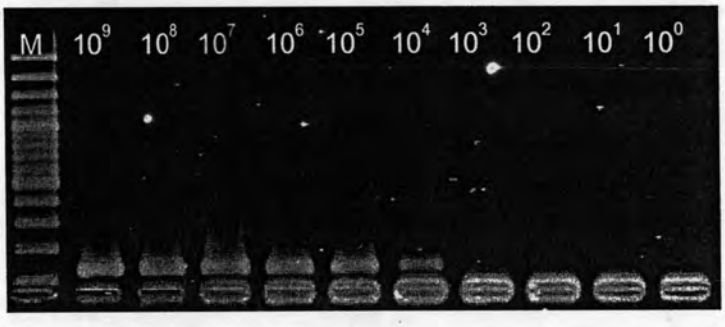
ผลการทดสอบความไวโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 อย่างเดียว พบว่า H1 H3 H5 มีความไวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 10^4 copies/µl ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^9 จนถึง 10^0 copies/µl ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง N คือ DW

1.2 พลาสมิด H3

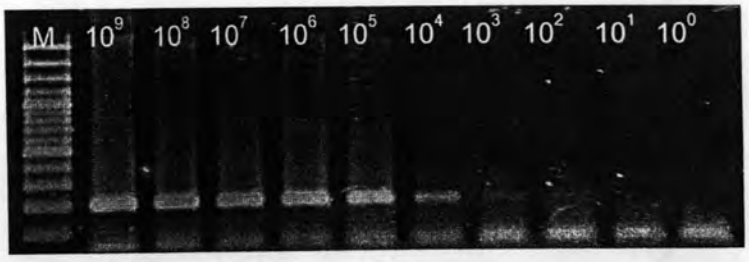
ผลการทดสอบความไวโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H3 อย่างเดียว พบว่า H1 H3 H5 มีความไวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 10^4 copies/µl ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H3 ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^9 จนถึง 10^0 copies/µl ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง N คือ DW

1.3 พลาสมิด H5

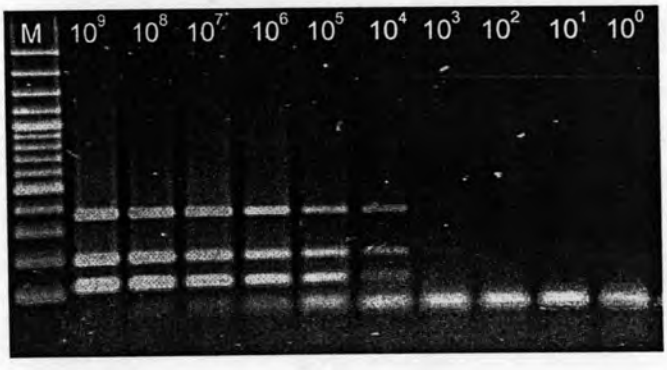
ผลการทดสอบความไวโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H5 อย่างเดียว พบว่า H1 H3 H5 มีความไวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 10^4 copies/µl ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H5 ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^9 จนถึง 10^0 copies/µl ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง N คือ DW

1.4 **รวมพลาสมิด** H1 H3 H5

ผลการทดสอบความไวโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 H3 H5 ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ผสมกัน พบว่า H1 H3 H5 มีความไวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของระบบ multiplex H1 H3 H5 เท่ากับ 10^4 copies/µl ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 H3 H5 รวมกัน โดยใช้พลาสมิดที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^9 จนถึง 10^0 copies/µl ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง N คือ DW

ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

1. **การทดสอบด้วยไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์**H1-H15

1.1. **ระบบmultiplex** M GAPDH

ผลการทดสอบความจำเพาะของระบบ multiplex M GAPDH โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15 ที่ได้จากไข่ไก่ฟัก (ยกเว้นสายพันธุ์ H1 และ H3 ที่ได้จากผู้ป่วย

และสายพันธุ์ H5 ที่ได้จากสัตว์ปีก) พบว่าไพรเมอร์ M สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ทุกสายพันธุ์ ในขณะที่ไพรเมอร์ GAPDH สามารถเพิ่มจำนวน ได้เฉพาะสายพันธุ์ H1 H3 H11 H13 เท่านั้น ดังภาพที่ 19

ภาพที่ 19 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15 ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง P คือ พลาสมิด M และ GAPDH ผสมกัน ช่อง N คือ DW

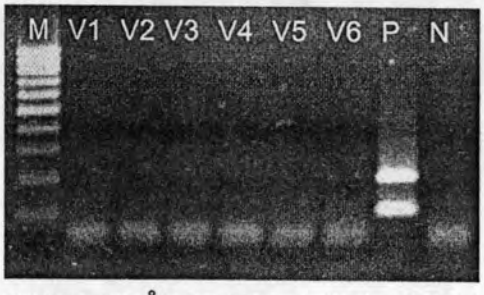
1.2. **ระบบ** multiplex H1 H3 H5

ผลการทดสอบความจำเพาะของระบบ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15 ที่ได้จากไข่ไก่ฟัก (ยกเว้นสายพันธุ์ H1 และ H3 ที่ได้จากผู้ป่วย และสายพันธุ์ H5 ที่ได้จากสัตว์ปีก) พบว่าไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้จำเพาะกับสายพันธุ์ของไพรเมอร์เท่านั้น ดังภาพที่ 20

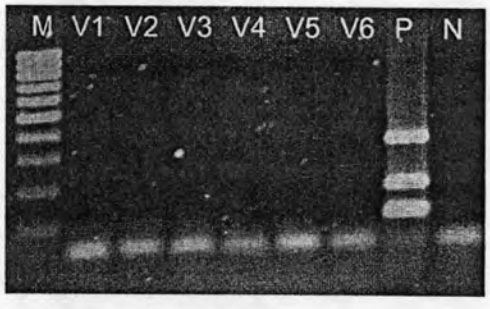
ภาพที่ 20 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15 ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง P คือ พลาสมิด H1 H3 และ H5 ผสมกัน ช่อง N คือ DW

การทดสอบด้วยไวรัสในระบบหายใจ

ผลการเพิ่มจำนวน cDNA หรือ DNA จากเชื้อ Influenza B virus, Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human parainfluenza viruses (HPIVs), Human metapneumovirus (hMPV), Adenovirus, Human bocavirus (HBoV) พบว่าไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ทั้งในระบบ multiplex M GAPDH และระบบ multiplex H1 H3 H5 ดังแสดงผลในภาพที่ 21 และภาพที่ 22



ภาพที่ 21 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ cDNA/DNA จากเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง V1-V6 คือ Influenza B virus, RSV, HPIVs, hMPV, Adenovirus, HBoV ตามลำดับ ช่อง P คือ พลาสมิด M และ GAPDH ผสมกัน ช่อง N คือ DW



ภาพที่ 22 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ cDNA/DNA จากเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง V1-V6 คือ Influenza B virus, RSV, HPIVs, hMPV, Adenovirus, HBoV ตามลำดับ ช่อง P คือ พลาสมิด H1 H3 และ H5 ผสมกัน ช่อง N คือ DW

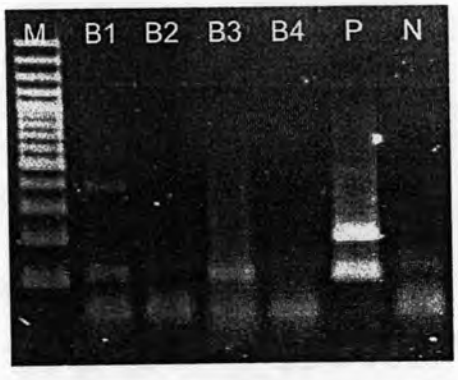
การทดสอบด้วยแบคทีเรียในระบบหายใจ

1.3. ระบบmultiplex M GAPDH

ผลการทดสอบความจำเพาะของระบบ multiplex M GAPDH โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ *Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus* พบว่า

- ไพรเมอร์ M ไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะกับไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้
- ไพรเมอร์ GAPDH มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะกับไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้กับดีเอ็นเอของ *Haemophilus influenzae* และ *Streptococcus pneumoniae*

ดังแสดงในภาพที่ 23

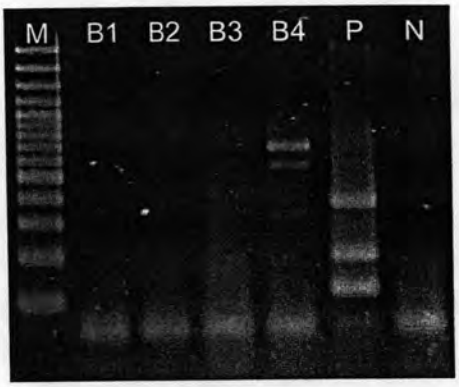


ภาพที่ 23 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง B1 B2 B3 B4 คือ *H.influenzae, S. pyogenes, S. pneumonia ,S. aureus* ตามลำดับ ช่อง P คือ พลาสมิด M และ GAPDH ผสมกัน ช่อง N คือ DW

1.4. ระบบ multiplex H1 H3 H5

ผลการทดสอบความจำเพาะของระบบ multiplex M GAPDH โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ *Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumonia, Staphylococcus aureus* พบว่าไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะกับไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ แต่มีการเพิ่มดีเอ็นเออย่างไม่จำเพาะกับดีเอ็นเอ

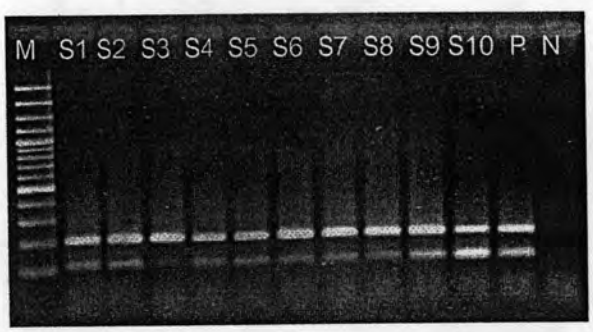
ของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งไม่ได้ PCR product เท่ากับขนาดที่ออกแบบไว้ ดังแสดงในภาพที่ 24



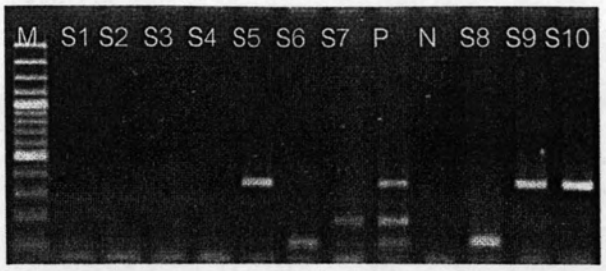
ภาพที่ 24 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง B1 B2 B3 B4 คือ *H.influenzae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* ตามลำดับ ช่อง P คือ พลาสมิด H1 H3 และ H5 ผสมกัน ช่อง N คือ DW

ผลการทดสอบด้วย Nasopharyngeal suction จากผู้ป่วย

พบว่าทั้ง multiplex M GAPDH และ multiplex H1 H3 H5 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ เมื่อเปรียบเทียบกับการทำ Whole gene sequencing เมื่อทดสอบด้วย RNA จาก Nasopharyngeal suction จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1(N=8), H3N2(N=11) cDNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากสัตว์(N=16)



ภาพที่ 25 ตัวอย่างการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้จากผู้ป่วยด้วย multiplex M GAPDH ช่องคือ 100 bp DNA Marker ช่อง S1-S10 คือ cDNA จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 ช่อง P คือ พลาสมิด M และ GAPDH ผสมกัน ช่อง N คือ DW



ภาพที่ 26 ตัวอย่างการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้จากผู้ป่วยด้วย multiplex H1 H3 H5 ช่องคือ 100 bp DNA Marker ช่อง S1-S4 คือ cDNA จากผู้ป่วยติดไม่พบเชื้อไวรัสก่อโรค ช่อง S5, S9, S10 คือ cDNA จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1, ช่อง S6, S8 คือ cDNA จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2และ ช่อง S7 คือ cDNA จากสัตว์ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 ช่อง P คือ พลาสมิด H1 H3 H5 ผสมกัน ช่อง N คือ DW