



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาการติดและการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่
ชนิดเอที่เพาะแยกจากเปิดและสุกรในนกกกระทา

โดย

คณิตศักดิ์ อรวีระกุล

กุมภาพันธ์ 2555



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาการติดและการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่
ชนิดเอที่เพาะแยกจากเปิดและสุกรในนกอกระทา

โดย

คณิตศักดิ์ อรวีระกุล

กุมภาพันธ์ 2555

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2554 เพื่อทำการศึกษาคัดและการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่เพาะแยกจากเปิดและสุกรในนกกกระทา รวมทั้งขอขอบพระคุณท่านคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้เสียสละเวลาพิจารณาอ่านผลงานวิจัยนี้และได้ให้ข้อเสนอเพื่อเพิ่มคุณค่าของงานให้มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณทีมงานของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งนิสิต สัตวแพทย์ นักวิทยาศาสตร์และคณาจารย์ผู้ร่วมงานทุกท่านในหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

ชื่อโครงการวิจัย	การศึกษาการติดและการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่เพาะแยกจากเป็ดและสุกรในนกกกระทา (The infection and transmission study of influenza A virus isolated from duck and pig in quails)
ชื่อผู้วิจัย	รศ.น.สพ.ดร. คณิศศักดิ์ อรวิระกุล และคณะ
เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ	มีนาคม 2554

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัส Influenza type A เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ในสัตว์หลายชนิด ปัจจุบันมีความเชื่อว่านกกกระทาสามารถทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการติดต่อข้ามสายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ อย่างไรก็ตามปัจจุบันการศึกษาความไวต่อการติดเชื้อและลักษณะทางพยาธิวิทยาของเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรงและเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในนกกกระทามีจำนวนน้อย งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาความสามารถในการรองรับการติดเชื้อ ลักษณะทางพยาธิวิทยา และความสามารถในการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่มีต้นกำเนิดจากเป็ดและสุกรในนกกกระทา โดยหลังจากการให้เชื่อดังกล่าวในนกกกระทาแล้วทำการประเมินลักษณะการแสดงอาการทางคลินิก การปลดปล่อยไวรัส การติดต่อและแพร่กระจายเชื้อ ลักษณะทางพยาธิวิทยา รวมถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 สามารถติดเชื้อและเพิ่มจำนวนได้ในนกกกระทา โดยนกกกระทาที่ได้รับเชื้อมีอาการปกติและไม่พบการป่วยตายจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง นกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 จะปลดปล่อยไวรัสออกมาทางระบบทางเดินหายใจในปริมาณสูงกว่านกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและสามารถติดต่อไปยังนกกกระทาที่เป็น contact birds ได้ นอกจากนี้พบรอยโรคทางพยาธิและจุลพยาธิโดยมากที่ระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหารของนกกกระทาที่ได้รับเชื้อและพบว่านกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 มีรอยโรครุนแรงกว่านกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกกระทาที่เป็น contact birds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีในนกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 รวมถึงนกกกระทาที่เป็น contact birds ได้ ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่านกกกระทามีความไวต่อการติดเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 มากกว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1

คำสำคัญ: นกกกระทา ไข้หวัดนก ไข้หวัดใหญ่สุกร การติดเชื้อ การแพร่กระจายเชื้อ

Project title	The infection and transmission study of influenza A virus isolated from duck and pig in quails
Name of the investigators	Associate Professor Kanisak Oraveerakul
Year	March, 2011

Abstract

Influenza A viruses infect wide ranges of animal species. Quail has been proposed to be an intermediate host of influenza A viruses for the generation of novel reassortant viruses for interspecies transmission. However, the detailed information on the susceptibility and the pathogenesis of low pathogenic avian influenza and swine influenza viruses in quails is limited. In this study, the replication, pathogenicity and transmission characteristics of a low pathogenic avian H3N2 virus (dkH3N2) and a Eurasian-like swine H1N1 virus (swH1N1) in quails were determined and compared. Quails were inoculated intranasally and orally with each virus and evaluated for clinical sign, virus shedding, virus transmission, pathological change and serological response. All of the infected and contact quails did not develop any clinical signs. Quails infected with dkH3N2 shed significantly higher virus titers predominantly from the oropharynx than those of swH1N1, and transmitted to naive contact quails via direct contact. Gross and histopathological lesions were observed mainly in the respiratory and the intestinal tracts of infected quails which dkH3N2 were significantly more pathogenic than swH1N1 and contact quails. Seroconversions were detected in most of swH1N1 infected and contact quails. Taken together, this study demonstrated that quails are more susceptible to infection with the dkH3N2 compared with swH1N1.

Keywords: Quail, avian influenza virus, swine influenza virus, infection, transmission

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีการวิจัย	6
ผลการวิจัย	9
การอภิปรายผล	23
ข้อสรุป	26
ข้อเสนอแนะ	27
บรรณานุกรม	28

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1	แสดงเชื้อไวรัสและปริมาณของเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาวิจัย 9
2	แสดงขนาดของท่อนพันธุกรรมทั้ง 8 ของเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาวิจัย 10
3	Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/CU-CB1/06(H1N1) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank 10
4	Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/duck/Thailand/AY-354/08(H3N2) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference avian influenza virus ใน GenBank 10
5	อาการทางคลินิกของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds 13
6	แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ของค่า score ของรอยโรคทาง macroscopic และจำนวนนกกระทาที่มีรอยโรคทาง macroscopic หลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds 14
7	ผลทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds 17
8	แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ของค่า score ของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของทอลม ปอดและลำไส้ของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds 17
9	ผลการปลดปล่อยไวรัสมาในทอลมและช่องทวารร่วมของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds 20

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1 การให้เชื้อไวรัสแก่นกกระทาญี่ปุ่นอายุ 5 สัปดาห์ ณ ห้องปฏิบัติการปลอดเชื่อนิรภัยชีวภาพระดับ 3 (BSL3)	12
2 ลักษณะทาง macroscopic lesions ของตัวอย่างจากนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds	15
3 ลักษณะทาง microscopic lesions ของตัวอย่างจากนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1	18
4 ลักษณะการติดสีของโปรตีนของไวรัสในในลำไส้ของนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2	19
5 แผนภูมิแสดงการปลดปล่อยไวรัสมาในท่อลมของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds	21
6 แผนภูมิแสดงการปลดปล่อยไวรัสมาในช่องทวารร่วมของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds	22

บทนำ

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอมีสารพันธุกรรมที่มีลักษณะเป็นท่อน (segmented genome) จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อชนิดที่เรียกว่า antigenic shift ซึ่งเกิดจากการแลกเปลี่ยนท่อนพันธุกรรม (genetic reassortment) ระหว่างยีนโนมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสองชนิดที่แตกต่างกันแต่มีการติดเชื้อพร้อมๆ กันในหนึ่งเซลล์ โดยเหตุการณ์นี้มักจะเกิดขึ้นในสัตว์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกลาง (intermediate host) ในการผลิตไวรัสลูกผสม (mixing vessel for human-avian influenza reassortant virus) ซึ่งข้อมูลงานวิจัยในอดีตที่ผ่านมาพบว่าสุกรเป็นสัตว์ชนิดหนึ่งที่น่าจะทำหน้าที่ดังกล่าว (Castrucci et al., 1993; Kida et al., 1994) โดยพบว่าสุกรมีความไวต่อการติดเชื้อทั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่คน ไวรัสไข้หวัดสุกร รวมถึงไวรัสไข้หวัดนก (Choi et al., 2005; Olsen et al., 2000) เนื่องจากในหลอดลมของสุกรนั้นมีตัวรับ (receptor) ทั้งสองชนิดคือตัวรับที่ sialic acid เชื่อมด้วย α -2,3 linkage ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและไวรัสไข้หวัดมาและตัวรับที่ sialic acid เชื่อมด้วย α -2,6 linkage ซึ่งจำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรและไวรัสไข้หวัดใหญ่คน (Ito et al., 1998) เมื่อไม่นานมานี้พบว่า นกกระทาก็เป็นสัตว์อีกชนิดหนึ่งที่มีตัวรับทั้งสองชนิดเช่นเดียวกับกับสุกร (Wan and Perez, 2006) นอกจากนี้หลักฐานทางระบาดวิทยาที่ผ่านมาพบว่า สามารถเพาะแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอได้หลายสายพันธุ์จากนกกระทาในทวีปอเมริกาเหนือ ยุโรปและเอเชีย ตัวอย่างเช่น สายพันธุ์ H5N2 H7N3 H9N2 และ H10N8 (Guo et al., 2000; Suarez et al., 1999) ที่น่าสนใจคือ นกกระทาสามารถติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 และ H9N2 ได้โดยไม่แสดงอาการป่วย ในขณะที่สามารถปลดปล่อยเชื้อออกมาทางระบบทางเดินหายใจได้ในปริมาณสูง (Guan et al., 1999) และข้อมูลที่ผ่านมายังพบว่า นกกระทาแสดงการติดเชื้อตามด้วยการกลายพันธุ์ของเชื้อ H9N2 ที่แยกได้จากเป็ด ซึ่งการกลายพันธุ์ดังกล่าวมีผลที่ทำให้เชื้อไวรัสมีความสามารถในการติดและเพิ่มจำนวนได้ดียิ่งขึ้น (Perez et al., 2003a) รายงานต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นต่างก็สนับสนุนความเชื่อที่ว่า นกกระทามีความสามารถเป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอได้ ซึ่งเมื่อประกอบกับข้อมูลการติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 แบบไม่แสดงอาการในนกกระทาแล้วนั้น ส่งผลให้เกิดความหวาดวิตกเป็นอย่างสูงในด้านการสาธารณสุขและการเฝ้าระวังโรคระบาดของเชื้อไข้หวัดนก นอกเหนือจากการติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในนกกระทาดังกล่าวแล้ว โอกาสที่นกกระทาจะเป็นแหล่งแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในธรรมชาติก็มีความเป็นไปได้สูง (Webster et al., 2002) เนื่องจากนกกระทามีตัวรับทั้งสองชนิดที่จำเพาะต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (รวมถึงไข้หวัดใหญ่ในคน) ความเป็นไปได้ที่ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและ/หรือไข้หวัดใหญ่สุกรและ/หรือไข้หวัดใหญ่ในคนจะเกิดการติดเชื้อพร้อมกันในนกกระทาและสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมเกิดเป็นไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ขึ้นได้ ซึ่งไวรัสลูกผสมใหม่นี้ก็มีโอกาสที่จะมีการปรับตัวและสามารถแพร่กระจายไปสู่สัตว์ปีกชนิดอื่นหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ ที่รวมถึงคนได้มากขึ้นด้วยเช่นกัน

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันงานวิจัยที่ศึกษาการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรรวมทั้งการติดต่อของเชื้อในนกกระทามีจำนวนน้อย ส่วนการศึกษาการเกิดไวรัสลูกผสมของไวรัสสองสายพันธุ์ในนกกระทา (*In vivo study*) ยังไม่มี ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาบทบาทของนกกระทาในการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่ก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยจะใช้ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นต้นแบบในการศึกษาการติดเชื้อในนกกระทา และศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรไปยังนกกระทาตัวอื่น ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำมาสู่การศึกษาบทบาทการเป็นโฮสต์ตัวกลางของนกกระทา (establish *in vivo* quail influenza A virus infection and co-infection model) ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะมี

ประโยชน์อย่างยิ่งต่อวงการสัตวแพทย์และการแพทย์ เนื่องจากสามารถประยุกต์ใช้เพื่อการศึกษาวิจัยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอด้านอื่นๆ เช่น reassorted-virus pathogenesis adaptation and transmission หรือ reassorted-virus-host interaction ต่อไป

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรกระบบทางเดินหายใจได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด โดยเชื้อนี้สามารถทำให้เกิดโรกระบบทางเดินหายใจรุนแรงและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตในคนทั่วโลกถึง 500,000 คนต่อปี (Horimoto and Kawaoka, 2005) นอกจากนี้เชื้อไวรัสดังกล่าวยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ในมนุษย์ (pandemic influenza) ได้แก่ เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสายพันธุ์ H1N1, H2N2, และ H3N2 (Horimoto and Kawaoka, 2005) และล่าสุดในปีพ.ศ. 2552 (ค.ศ. 2009) พบว่ามีการะบาดของครั้งใหญ่ของโรคไข้หวัดใหญ่ในคนคือ ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) ซึ่งกำลังเป็นโรคที่สำคัญและเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขขณะนี้ (Smith et al., 2009) การที่มีเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอติดเชื้อในสัตว์หลายชนิด ประกอบกับการมีการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกอย่างต่อเนื่องถึงปัจจุบัน อาจทำให้มีการเพิ่มโอกาสในการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัส หรืออาจเกิดไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ได้ในอนาคต

เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ จัดอยู่ในตระกูล Orthomyxoviridae มีรูปร่างทรงกลม (spherical) หรือบางครั้งมีรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 80-120 นาโนเมตร ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสชนิดมีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) และมีลักษณะสายพันธุกรรมเป็นแบบ single stranded RNA สายลบขนาดประมาณ 13,600 นิวคลีโอไทด์ ที่มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ จำนวน 8 ท่อน โดยแต่ละท่อนมีหนึ่งยีนที่เป็นต้นแบบในการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบต่างๆ ของเชื้อไวรัส ซึ่งยีนทั้ง 8 ท่อนสามารถถอดรหัสเป็นโปรตีน 10 ชนิดได้แก่ โปรตีน Polymerase Basic 1 and 2 (PB1) (PB2) โปรตีน Polymerase (PA) โปรตีน Hemagglutinin (HA) โปรตีน Nucleoprotein (NP) โปรตีน Neuraminidase (NA) โปรตีน Matrix (M) และ โปรตีน Nonstructure (NS) (Webster et al., 1992) เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสามารถแบ่งออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ (subtype) ขึ้นอยู่กับลักษณะของ glycoprotein ที่ผิวนอกของเชื้อไวรัสคือ โปรตีน Hemagglutinin (HA) และโปรตีน Neuraminidase (NA) โดยที่มี HA จำนวน 16 subtypes และ NA จำนวน 9 subtypes เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอทุกสายพันธุ์สามารถพบได้ในนกน้ำ บางสายพันธุ์พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น สุนัข ม้า ลิง ปลาฉลาม มิงค์ และในมนุษย์ รวมทั้งในสัตว์ปีกหลายชนิด (Webster et al., 1992; Webster et al., 2006)

การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ (species) ไปยังสัตว์ต่างชนิดได้ และสามารถพบได้บ่อยครั้ง อย่างไรก็ตามการที่เชื้อไวรัสสายพันธุ์หนึ่งจะคงวนเวียนอยู่ในสัตว์ชนิดหนึ่งแล้วเกิดการติดต่อแพร่กระจายไปยังสัตว์ชนิดอื่นเป็นไปได้ยาก ตัวอย่างเช่นในนกน้ำชนิดต่างๆ (aquatic bird) ซึ่งเป็นสัตว์รังโรคตามธรรมชาติของเชื้อไวรัส (Webster et al., 1992) โดยเชื้อจะเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารและติดต่อผ่านทาง การขับถ่ายและการกิน (fecal-oral route) (Hinshaw et al., 1980) มักพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอจากนกน้ำนั้น สามารถเพิ่มจำนวนได้ไม่ดีในคนและ primate (Beare and Webster, 1991) ในทางกลับกันเชื้อไข้หวัดใหญ่จากคนไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในสัตว์ปีกเช่นกัน (Hinshaw et al., 1983)

ดังนั้นเชื้อไวรัสดังกล่าวที่ติดเชื่อในนกน้ำจึงต้องมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมก่อนติดต่อไปยังสัตว์ชนิดอื่นได้

เนื่องจากเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอมีสารพันธุกรรมที่มีลักษณะเป็นท่อน (segmented genome) จึงสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนท่อนสารพันธุกรรมระหว่างระหว่างยีนโนมของเชื้อไวรัสด้วยกันได้ (genetic reassortment) โดยพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่คนสามารถรับยีนจากเชื้อไข้หวัดนกผ่านทางกลไกการแลกเปลี่ยนท่อนสารพันธุกรรม (reassortment) ในโฮสต์ตัวกลาง (intermediate host) ตัวอย่างเช่น เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่แยกได้จากการระบาดในปีค.ศ. 1957 (Asian influenza virus) และปีค.ศ. 1968 (Hong Kong influenza virus) นั้นเกิดจากการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างยีนของเชื้อไข้หวัดนกและไวรัสไข้หวัดใหญ่คน (Webster et al., 2002) นอกจากนี้เชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) ที่ทำให้เกิดการระบาดใหญ่ในคน เกิดจากการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างยีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร ไวรัสไข้หวัดนกและไวรัสไข้หวัดใหญ่คน (Smith et al., 2009) ปัจจุบันจึงมีแนวคิดว่าจะมีสัตว์ที่ทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลาง (intermediate host) ในการผลิตไวรัสลูกผสม (reassortant virus) ซึ่งได้แก่สุกร (Castrucci et al., 1993) และนกกระทา (Perez et al., 2003b) โดยในสุกรพบว่าสุกรมีความไวต่อการติดเชื่อทั้งเชื้อไข้หวัดใหญ่คน ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร รวมถึงไวรัสไข้หวัดนก (Choi et al., 2005) เนื่องมาจากในท่อลม (trachea) ของสุกรนั้นมีตัวรับ (receptor) 2 ชนิดคือตัวรับ α -2,3 linkage sialic acid และตัวรับ α -2,6 linkage sialic acid ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดนกและไวรัสไข้หวัดใหญ่คนตามลำดับ (Ito et al., 1998) อย่างไรก็ตามจากเหตุการณ์การติดเชื่อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากสัตว์ปีกมาสู่คนได้โดยตรงโดยไม่ผ่านโฮสต์ตัวกลาง รวมถึงเหตุการณ์ที่เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H9N2 ซึ่งระบาดอยู่ในสัตว์ปีกในทวีปเอเชียสามารถติดต่อสูคนและสุกรได้ (Peiris et al., 1999) ซึ่งจากเหตุการณ์ทั้งสองนี้ทำให้มีความเป็นไปได้ว่าสัตว์ปีก (land-based poultry) สามารถทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการทำให้เชื้อไข้หวัดนกสามารถติดต่อข้ามสายพันธุ์ไปยังคนได้เช่นกัน (Peiris et al., 1999; Shortridge et al., 1998)

บทบาทของนกกระทาในการเป็นโฮสต์ตัวกลาง

ปัจจุบันมีความเชื่อว่านกกระทาสามารถทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการติดต่อข้ามสายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ เนื่องจากพบว่านกกระทามีตัวรับทั้งสองชนิดบนหลอดลมและทางเดินอาหาร (Wan and Perez, 2006) จากหลักฐานทางระบาดวิทยาที่ผ่านมาพบว่า เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในนกกระทามีรายงานครั้งแรกที่ประเทศอิตาลีในปีค.ศ. 1966 ถึง 1968 (Nardelli et al., 1970) ต่อมาได้มีการเพาะแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอหลายสายพันธุ์ได้จากนกกระทาในทวีปอเมริกาเหนือ ยุโรปและเอเชีย ได้แก่ เชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N2, H7N3, H9N2, และ H10N8 (Guan et al., 1999; Guo et al., 2000; Saito et al., 1993; Suarez et al., 1999) นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยว่า นกกระทาสามารถติดเชื่อไข้หวัดนกชนิดรุนแรงสายพันธุ์ H5N9 โดยไม่แสดงอาการป่วยและสามารถติดต่อไปยังไก่และทำให้ไก่ตายได้ (Tashiro et al., 1987) และมีรายงานว่าเชื้อไข้หวัดนกในนกกระทามีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกับเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 และ H9N2 ที่ระบาดอยู่ในคนเช่นกัน (Guan et al., 1999) และเป็นที่น่าสนใจว่านกกระทาสามารถติดเชื่อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 และ H9N2 ได้โดยไม่แสดงอาการป่วย และสามารถปลดปล่อยเชื้อออกมาทางระบบทางเดินหายใจได้ในปริมาณสูง (Perez et al., 2003b) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาพบว่านกกระทามีความไวต่อการติดเชื่อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 มากกว่าไก่ โดยเชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนใน

ทางเดินหายใจของนกกระทาและติดต่อผ่านทางหายใจ เป็นการเพิ่มโอกาสที่จะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อได้ (Saito et al., 2009; Webster et al., 2002)

ข้อมูลงานวิจัยที่สนับสนุนบทบาทของนกกระทาในการเป็นโฮสต์ตัวกลางของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ดังเช่น พบว่าเชื้อไข้หวัดนก 14 สายพันธุ์ (H1-14) จากนกน้ำสามารถเพิ่มจำนวนได้ในทางเดินหายใจของนกกระทาซึ่งเป็นตำแหน่งที่เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอเพิ่มจำนวนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อีกทั้งยังพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรและเชื้อไวรัสลูกผสมระหว่างสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (avian / mammalian reassortant virus) ที่มียีน HA และ NA เป็นของไวรัสชนิดนกกระทาในขณะที่ยีนพันธุกรรมอื่นๆ เป็นของไวรัสชนิดสามารถเพิ่มจำนวนและติดต่อแพร่กระจายในนกกระทาได้เช่นกัน (Makarova et al., 2003) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อไข้หวัดนกและไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจะเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกันในนกกระทา

เป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H9 ที่แยกได้จากนกน้ำไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพในนกกระทา (Makarova et al., 2003) ทั้งที่เชื้อสายพันธุ์ H9 นี้ระบาดอยู่ในสัตว์ปีกและสามารถติดต่อสู่คนและสุกรได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสายพันธุ์ H9 สามารถจับกับตัวรับ α -2,6 linkage sialic acid ได้ (Matrosovich et al., 2001) จะเห็นได้ว่าการที่เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนและติดต่อในนกกระทาได้ จำเป็นที่เชื้อต้องมีการปรับตัวในนกกระทาก่อน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่าเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H2N2 ที่แยกได้จากเป็ดเมื่อมีการปรับตัว (adaptation) ในนกกระทาแล้วสามารถติดต่อไปยังไก่และทำให้ไก่แสดงอาการป่วยได้ (Perez et al., 2003b; Sorrell and Perez, 2007)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาสรุปได้ว่านกกระทาสามารถทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการทำให้เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอจากสัตว์ปีกสามารถปรับตัวกลายเป็น *virus variant* และสามารถติดต่อข้ามสู่สัตว์ปีกชนิดอื่นได้ เนื่องจากนกกระทามีตัวรับที่จำเพาะต่อไวรัสทั้งไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่สุกร ดังนั้นจึงมีโอกาสเป็นไปได้ที่เชื้อไวรัสทั้งสองชนิดจะเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกันในนกกระทา และสามารถเกิดการติดต่อข้ามไปยังสัตว์ชนิดอื่นได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาหาความสามารถในการรองรับการติดเชื้อและความสามารถในการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่มีต้นกำเนิดจากเป็ดและสุกรไปสู่ นกกระทาตัวอื่นๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

มีสามประการหลักด้วยกันดังต่อไปนี้

1. ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 เพื่อยืนยันต้นกำเนิดพันธุกรรมของไวรัสที่ใช้ในการศึกษาทั้งสอง
2. ศึกษาความสามารถของนกกระทาในการติดเชื้อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1
3. ศึกษาความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ไปยังนกกระทาตัวอื่น

วิธีการวิจัย

การศึกษาการติดและการแพร่กระจายของเชื้อไขหวัดใหญ่ชนิดเอที่เพาะแยกจากเปิดและสุกรในนกกกระทา ประกอบด้วยขั้นตอนในการศึกษาวิจัย 2 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ ระยะที่ 2 การติดเชื้อไวรัสในนกกกระทา ดังแสดงในหน้าที่ 8

ระยะที่ 1 ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

การเตรียมเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่ชนิดเอที่จะนำมาใช้ในการศึกษานี้มี 2 isolates คือ เชื้อไวรัสไขหวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ที่เพาะแยกจากเปิด (dkH3N2) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจาก รศ.น.สพ.ดร.ทวิศักดิ์ ส่งเสริม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกร H1N1 (swH1N1) ที่เพาะแยกจากสุกรในประเทศไทย โดยหน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผู้เพาะแยกในปีพ.ศ. 2549 เชื้อไวรัสทั้งสองชนิดจะถูกเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักและเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง (MDCK cells) ตามลำดับและทำการหาปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยวิธีของ Reed and Meunch (Reed, 1938) ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง (MDCK cells) และในไข่ไก่ฟัก แล้วจึง aliquot ไวรัสเก็บไว้ในอุณหภูมิ -80°C เพื่อใช้ในการศึกษาระยะที่ 1 และ 2 ต่อไป

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

นำเชื้อ H3N2 จากเปิดและเชื้อ H1N1 จากสุกร มาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของท่อนยีนทั้ง 8 ท่อน ด้วยวิธี complete gene sequencing (Karasin et al., 2000) สำหรับเชื้อ H3N2 จากเปิด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ทำการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของยีนแล้วทั้งหมด 5 ท่อนจาก 8 ท่อน ได้แก่ ท่อน hemagglutinin (HA) nucleoprotein (NP) neuraminidase (NA) matrix (M) nonstructural (NS) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการตรวจวิเคราะห์ท่อนพันธุกรรมที่เป็น polymerase genes (PB1, PB2, PA) อีก 3 ท่อน ส่วนเชื้อ H1N1 จากสุกรขณะนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์แล้ว 2 ท่อนจาก 8 ท่อน ได้แก่ ท่อน HA และ NA แต่ยังคงขาดการศึกษาท่อนพันธุกรรมอีก 6 ท่อนที่เหลือ

ระยะที่ 2 การติดเชื้อไวรัสในนกกกระทา

นกกกระทาและการจัดกลุ่มทดลอง

นกกกระทาญี่ปุ่น อายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 65 ตัว เก็บตัวอย่างเลือดจากนกจำนวน 10 ตัว เพื่อตรวจระดับแอนติบอดีด้วยวิธี Hemagglutination inhibition (HI) ต่อเชื้อ H3N2 และ H1N1 นกที่เหลือจะตีติดหมายเลขประจำตัวที่ขา และถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม (กลุ่มละ 15 ตัว) สำหรับกลุ่มที่ 3 และ 4 (กลุ่มละ 5 ตัว) ดังต่อไปนี้

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มให้เชื้อไขหวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 (dkH3N2)
- กลุ่มที่ 2 กลุ่มให้เชื้อไขหวัดใหญ่สุกร H1N1 (swH1N1)
- กลุ่มที่ 3 กลุ่ม contact birds ใช้ศึกษาการติดต่อเชื้อ H3N2 จากนกในกลุ่มที่ 1 (cH3N2)
- กลุ่มที่ 4 กลุ่ม contact birds ใช้ศึกษาการติดต่อเชื้อ H1N1 จากนกในกลุ่มที่ 2 (cH1N1)
- กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมลบ (NEG)

การให้เชื้อไวรัสจะทำในตู้เลี้ยงสัตว์ทดลองนิกายชีวภาพระดับ 3 โดยนกกระทาในกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับเชื้อปริมาณ 10^6 ELD₅₀/ml โดยการหยอดปาก 200 μ l และจุ่มข้างละ 50 μ l และจะนับวันที่ให้เชื้อเป็นวันที่ศูนย์ (Day 0) ของการทดลอง ส่วนนกกระทาอีก 10 ตัว ซึ่งเป็น contact birds ถูกนำเข้าไปรวมในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับภายหลังจากให้เชื้อไวรัสแล้ว 24 ชั่วโมง (Day 1) เพื่อศึกษาโอกาสในการติดต่อและแพร่กระจายเชื้อไข้หวัดนก H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ในนกกระทา

การสังเกตอาการแสดงทางคลินิกและการเก็บตัวอย่างสัตว์

บันทึกอาการทางคลินิก อัตราการป่วย และ อัตราการตาย วันละครั้งทุกวันเป็นเวลา 7 วันหลังได้รับเชื้อ หากสัตว์ตายก่อนกำหนดการผ่าซาก (วันที่ 3, 5 และ 7) จะทำการผ่าซากเพื่อเก็บตัวอย่างสำหรับแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัส และการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาทันที ทำการเก็บตัวอย่าง tracheal และ cloacal swabs ทุกวัน (เก็บตัวอย่างหนึ่งครั้งก่อนการให้เชื้อ) เป็นเวลา 7 วันหลังจากให้เชื้อ จากนั้นในวันที่ 3, 5 และ 7 หลังให้เชื้อไวรัส ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและ put to sleep นกครั้งละ 5 ตัวของแต่ละกลุ่มทดลอง เพื่อผ่าซากเก็บตัวอย่างจากอวัยวะต่างๆ

การตรวจทางพยาธิวิทยา

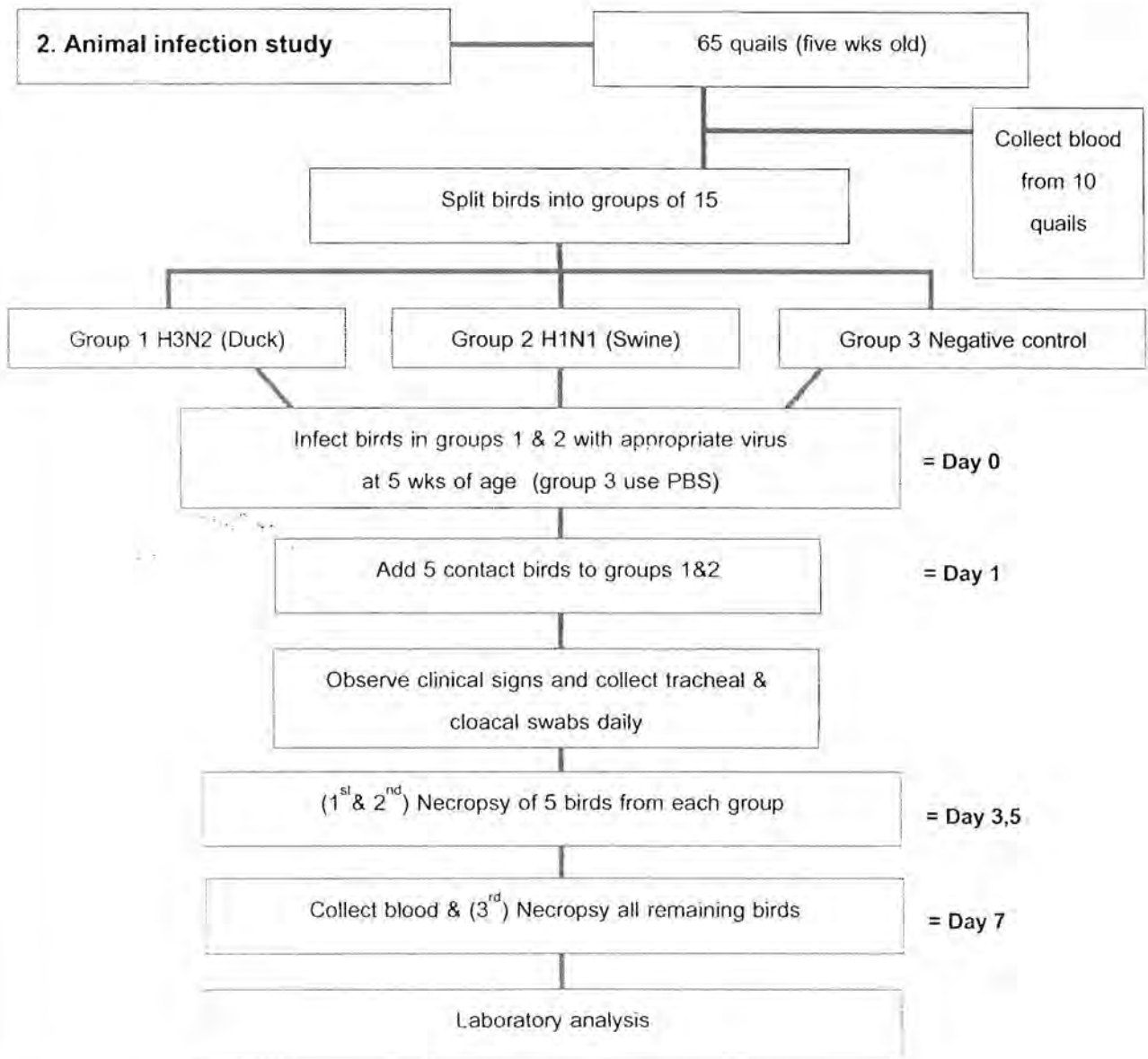
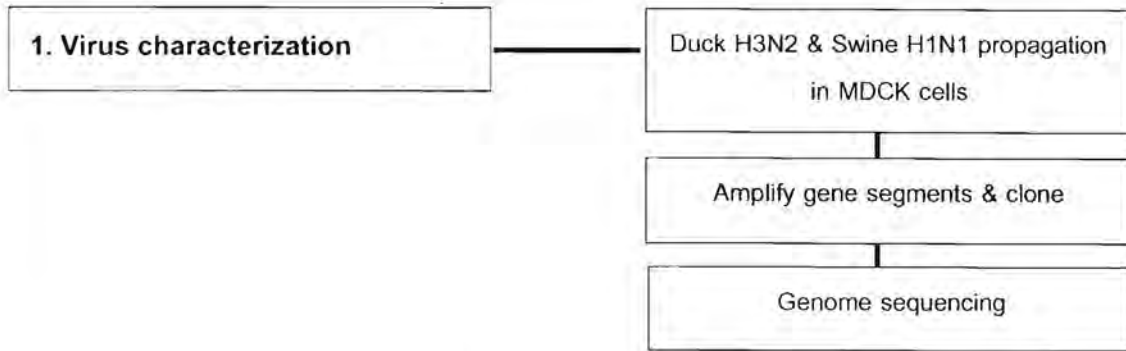
นำตัวอย่างทอลม ปอด หัวใจ ม้าม ตับอ่อน ไต ตับ สมองและลำไส้ มาตรวจทางจุลพยาธิวิทยา เพื่อดูลักษณะที่ผิดปกติของเนื้อเยื่อ และทำการให้ score ตามระดับความรุนแรงของรอยโรค (score 0 = no lesions, score 1 = mild lesion, score 2 = moderate lesion and score 3 = severe lesion) รวมทั้งทำ immunostaining ด้วย Influenza A specific antibody เพื่อดูการติดสีของแอนติเจนของไวรัสในเนื้อเยื่อเพื่อแสดงถึงการติดเชื้อ (infectivity) ของไวรัสในเนื้อเยื่อ

การศึกษาการปลดปล่อยไวรัส

ตรวจหาปริมาณไวรัสที่ถูกปลดปล่อยมาในทอลมและทอวารร่วม โดยการนำตัวอย่างจากทอลมและทอวารร่วมจากกลุ่ม 1-5 มาทำการเพาะแยก (virus isolation) และหาปริมาณของเชื้อ (virus titration) ใน MDCK cells (Kitikoon et al., 2006)

วิเคราะห์ผลการทดลอง

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) ผลการปลดปล่อยไวรัสที่ได้ระหว่างแต่ละกลุ่มด้วยวิธี one way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) ผลค่า score ของรอยโรคทางพยาธิวิทยา ระหว่างกลุ่มด้วยวิธี non-parametric Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums) โดยใช้ JMP 5.1 software (SAS Institute, Cary, North Carolina) ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$



Outcomes:

Objective 1: Obtained genotypic data of both influenza A virus subtypes

Objective 2: Gain knowledge of the clinical disease caused by Influenza A viruses of duck and pig origins in quails

Objective 3: Gain knowledge of the ability of quails to support and transmit Influenza A viruses of duck & swine

ผลการวิจัย

ระยะที่ 1 ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

การเตรียมเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 2 isolates คือ เชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ที่เพาะแยกจากเป็ด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจาก รศ.น.สพ.ดร.ทวิศักดิ์ สังเสริม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ที่เพาะแยกจากสุกรในประเทศไทย โดยหน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผู้เพาะแยกในปี พ.ศ. 2549 (ตารางที่ 1) เชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้ถูกทำการเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักและเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง (MDCK cells) ตามลำดับ และทำการหาปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยวิธีของ Reed and Meunch (Reed, 1938) ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง (MDCK cells) และในไข่ไก่ฟัก แล้วจึง aliquot ไวรัสเก็บไว้ในอุณหภูมิ -80°C เพื่อใช้ในการศึกษาระยะที่ 1 และ 2 ต่อไป

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

นำเชื้อ H3N2 จากเป็ดและเชื้อ H1N1 จากสุกร มาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของท่อนยีนทั้ง 8 ท่อน ด้วยวิธี complete gene sequencing (Karasin et al., 2000) สำหรับเชื้อ H3N2 จากเป็ด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ทำการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของยีนแล้วทั้งหมด 5 ท่อนจาก 8 ท่อน ได้แก่ ท่อน hemagglutinin (HA) nucleoprotein (NP) neuraminidase (NA) matrix (M) nonstructural (NS) ในงานวิจัยนี้ทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมท่อนพันธุกรรมที่เหลืออีก 3 ท่อน คือ polymerase genes (PB1, PB2, PA) ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 4 นอกจากนี้ทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อ H1N1 จากสุกรครบทั้ง 8 ท่อนดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 1 แสดงเชื้อไวรัสและปริมาณของเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

Virus name	Nomenclature	Infectivity or lethal dose	
		$\text{Log}_{10}\text{ELD}_{50}/\text{ml}$	$\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$
Duck H3N2	A/duck/Thailand/AY-354/08(H3N2)	8.23	5.5
Swine H1N1	A/sw/Thailand/CU-CB1/06(H1N1)	7.16	7.33

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของท่อนพันธุกรรมทั้ง 8 ของเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

Gene segment	Swine H1N1 (base pair)	Duck H3N2 (base pair)
PB2	2249	2268
PB1	2247	2253
PA	2134	2166
HA	1636	1739
NP	1482	1504
NA	1414	1411
M	994	978
NS	835	871

ตารางที่ 3 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/CU-CB1/06(H1N1) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank

Gene	Nucleotide positions	Virus with highest degree of homology	Nucleotide identity (%)	Influenza virus lineage
PB2	1-2254	A/swine/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	98%	Eurasian (Avian-like)
PB1	1-2247	A/swine/Chonburi/NIAH9469/2004(H1N1)	99%	Eurasian (Avian-like)
PA	1-2127	A/swine/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	99%	Eurasian (Avian-like)
HA	1-1636	A/swine/Chonburi/05CB1/2005(H1N1)	99%	Classical swine
NP	1-1482	A/swine/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	99%	Eurasian (Avian-like)
NA	1-1383	A/swine/Chonburi/05CB1/2005(H1N1)	100%	Eurasian (Avian-like)
M	27-994	A/swine/Chonburi/NIAH9469/2004(H1N1)	99%	Eurasian (Avian-like)
NS	30-835	A/swine/Chonburi/NIAH9469/2004(H1N1)	99%	Classical swine

ตารางที่ 4 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/duck/Thailand/ay-354/08(H3N2) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference avian influenza virus ใน GenBank

Gene	Nucleotide positions	Virus with highest degree of homology	Nucleotide identity (%)	Influenza virus lineage
PB2	10-2278	A/duck/Zhejiang/11/2000(H5N1)	96%	Avian
PB1	1-2253	A/red-necked stint/Australia/4/2004(H4N8)	97%	Avian
PA	5-2166	A/spot-billed duck/Korea/537/2008(H6N1)	99%	Avian
HA	1-1739	A/Pigeon/Nanchang/9-058/2000(H3N3)	94%	Avian
NP	8-1504	A/garganey/SanJiang/160/2006(H5N2)	97%	Avian
NA	1-1411	A/mallard/Xuyi/10/2005(H5N2)	97%	Avian
M	1-978	A/duck/Mongolia/54/2001(H5N2)	99%	Avian
NS	10-871	A/Anasquerquedula/Astrakhan/3091/2002(H4N8)	99%	Avian

ระยะที่ 2 การติดเชื้อไวรัสในนกกระทา

นกกระทาและการจัดกลุ่มทดลอง

1. การติดต่อหาฟาร์มนกกระทาที่ปลอดภัยต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดไม่รุนแรงสายพันธุ์ H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1

ได้ติดต่อฟาร์มนกกระทาที่มีประวัติการปลอดภัยต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่ก่อโรคในนกกระทา ฟาร์มที่ติดต่อได้แก่ ฟาร์มในจังหวัดอ่างทอง ซึ่งเป็นฟาร์มที่มีการเลี้ยงนกกระทาที่มีระบบมาตรฐาน และเป็นฟาร์มรายใหญ่ที่สุดในประเทศไทย

2. การสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากนกกระทา เพื่อตรวจระดับแอนติบอดีด้วยวิธี Hemagglutination inhibition (HI) ต่อเชื้อ H3N2 และ H1N1

ได้สุ่มเก็บเลือดนกกระทา (n= 10) ที่มีอายุประมาณ 4-5 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงอายุของนกกระทาที่จะใช้ในงานวิจัยนี้จากฟาร์มดังกล่าว จากนั้นตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี Hemagglutination inhibition (HI) ต่อเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรงสายพันธุ์ H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ผลการศึกษาพบว่า นกกระทาเหล่านี้ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่านกกระทาจากฟาร์มดังกล่าวไม่เคยสัมผัสหรือรับเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์รวมทั้งไวรัสคชิน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถนำนกกระทาจากฟาร์มดังกล่าวมาใช้ในงานวิจัยได้ในขั้นตอนต่อไป

3. เตรียมสถานที่เลี้ยงและทดสอบเชื้อในนกกระทา

ได้เตรียมสถานที่เลี้ยงนกกระทา ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำนกกระทาที่มีอายุประมาณ 2-3 สัปดาห์ มาเลี้ยงต่อที่ห้องดังกล่าวเพื่อปรับสภาพนกกระทาก่อนทำการทดลอง

ได้เตรียมห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อชีวภาพระดับ 3 (BSL3) ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยห้องปฏิบัติการจะประกอบด้วย animal isolators จำนวน 2 เครื่อง Biosafety cabinet จำนวน 1 เครื่อง ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมสำหรับการทดสอบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในนกกระทา

4. การให้เชื้อไวรัสในนกกระทา

นกกระทาผู้ป่วน อายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 65 ตัว เก็บตัวอย่างเลือดจากนกจำนวน 10 ตัว เพื่อตรวจระดับแอนติบอดีด้วยวิธี Hemagglutination inhibition (HI) ต่อเชื้อ H3N2 และ H1N1 นกที่เหลือจะติดหมายเลขประจำตัวที่ขา และถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม (กลุ่มละ 15 ตัว) สำหรับกลุ่มที่ 3 และ 4 (กลุ่มละ 5 ตัว) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มให้เชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 (dkH3N2)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มให้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 (swH1N1)

กลุ่มที่ 3 กลุ่ม contact birds ใช้ศึกษาการติดต่อเชื้อ H3N2 จากนกในกลุ่มที่ 1 (cH3N2)

กลุ่มที่ 4 กลุ่ม contact birds ใช้ศึกษาการติดต่อเชื้อ H1N1 จากนกในกลุ่มที่ 2 (cH1N1)

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมลบ (NEG)

การให้เชื้อไวรัสจะทำในตู้เลี้ยงสัตว์ทดลองนรีภยชีวภาพระดับ 3 โดยนกกระทาในกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับเชื้อปริมาณ 10^6 ELD₅₀/ml โดยการหยอดปาก 200 μ l และจุ่มข้างละ 50 μ l และจะนับวันที่ให้เชื้อเป็นวันที่ศูนย์ (Day 0) ของการทดลอง ส่วนนกกระทาอีก 10 ตัว (กลุ่มที่ 3 และ 4) ซึ่งเป็น contact birds ถูกนำไปรวมในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับภายหลังจากให้เชื้อไวรัสแล้ว 24 ชั่วโมง (Day 1) เพื่อศึกษาโอกาสในการติดต่อและแพร่กระจายเชื้อไข้หวัดนก H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ในนกกระทา (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 การให้เชื้อไวรัสแก่นกกระทาผู้ปุ่นอายุ 5 สัปดาห์ ณ ห้องปฏิบัติการปลอดเชื่อนรีภยชีวภาพระดับ 3 (BSL3)

ตู้เลี้ยงสัตว์ทดลองนรีภยชีวภาพระดับ 3



การให้เชื่อนกกระทาโดยการหยอดปาก



ผู้เลี้ยงสัตว์ทดลองและการป้องกันตน



การสังเกตอาการทางคลินิก



ผลการสังเกตอาการแสดงทางคลินิก

สังเกตอาการทางคลินิก อัตราการป่วย และอัตราการตาย วันละครั้งทุกวันเป็นเวลา 7 วันหลังได้รับเชื้อ พบว่านกกระทาทูกลุ่มที่ได้รับเชื้อรวมถึงนกกระทาที่เป็น contact birds ยังคงปกติและไม่พบการป่วยตายจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 7) อย่างไรก็ตามพบว่านกกระทาบางตัวในกลุ่มที่ได้รับเชื้อใช้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และรวมถึงนกกระทาที่เป็น contact birds ของไวรัสกลุ่มดังกล่าวแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจแบบไม่รุนแรงได้แก่ มีน้ำมูก (nasal discharge) ในขณะที่นกกระทาในกลุ่มที่ได้รับเชื้อใช้หวัดใหญ่สุกร H1N1 รวมถึงนกกระทาที่เป็น contact birds ไม่แสดงอาการทางคลินิกจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 อาการทางคลินิกของนกกระทาหลังได้รับเชื้อใช้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อใช้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds

กลุ่มที่	การทดลอง	จำนวนสัตว์แสดงอาการทางคลินิก*
1	กลุ่มให้เชื้อใช้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 (n=15)	4/15 (mild nasal discharge)
2	กลุ่มให้เชื้อใช้หวัดใหญ่สุกร H1N1 (n=15)	0/15
3	กลุ่ม contact birds ของเชื้อ H3N2 (n=5)	4/5 (mild nasal discharge)
4	กลุ่ม contact birds ของเชื้อ H1N1 (n=5)	0/5
5	กลุ่มควบคุมลบ (n=15)	0/15

* = No. of birds showed clinical signs / total of inoculated birds.

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา

1. ผลทาง macroscopic lesions

ลักษณะรอยโรคของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไวรัสพบว่า รอยโรคส่วนใหญ่พบที่ระบบทางเดินหายใจซึ่งได้แก่ mild to severe lung congestion, mild tracheitis และที่ระบบทางเดินอาหารซึ่งได้แก่ mild to severe congestion at serosal surface of duodenum and upper jejunum นอกจากนี้แล้วยังพบว่า ริงไข่มีการเจริญช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 พบว่ามีรอยโรครุนแรงกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่านกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 จะพบรอยโรคจนถึงวันที่ 7 หลังการให้เชื้อ โดยจะพบรอยโรคที่ระบบทางเดินอาหารในวันที่ 7 หลังการให้เชื้อรุนแรงกว่าในวันที่ 3 และ 5 หลังการให้เชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 2 และตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ของค่า score ของรอยโรคทาง macroscopic และจำนวนนกกระทาที่มีรอยโรคทาง macroscopic หลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds

กลุ่มที่	การทดลอง	Macroscopic lesions					
		Lung congestion			Intestinal congestion		
		3 DPI (n=5)	5 DPI (n=5)	7 DPI (n=5)	3 DPI (n=5)	5 DPI (n=5)	7 DPI (n=5)
1	กลุ่มให้เชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 (n=15)	1.0 ^a 5/5	0.8 ^a 4/5	1.0 ^a 5/5	0 0/5	0 0/5	1.0 ^a 5/5
2	กลุ่มให้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 (n=15)	0.4 ^b 2/5	0 ^b 0/5	0.2 ^c 1/5	0 0/5	0 0/5	0.2 ^b 0/5
3	กลุ่ม contact birds ของเชื้อ H3N2 (n=5)	ND ^{***}	ND	0.6 ^b 3/5	ND	ND	0.8 ^a 4/5
4	กลุ่ม contact birds ของเชื้อ H1N1 (n=5)	ND	ND	0.2 ^b 1/5	ND	ND	0.2 ^b 1/5
5	กลุ่มควบคุม (n=15)	0 ^b 0/5	0 ^b 0/5	0 ^c 0/5	0 0/5	0 0/5	0 ^b 0/5

^a = Means of macroscopic lesion scoring

^{***} = No. of birds found lesions / total no. of necropsy birds

^{***} = Not determined

Different superscript letters indicate statistical difference ($p < 0.05$) among groups for each DPI.

ภาพที่ 2 ลักษณะทาง macroscopic lesions ของตัวอย่างจากนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds

กลุ่มที่ 1: รอยโรคทาง macroscopic lesions ของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2

Severe lung congestion



Intestinal congestion



กลุ่มที่ 2: รอยโรคทาง macroscopic lesions ของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1

Mild lung congestion



Mild intestinal congestion



กลุ่มที่ 3: รอยโรคทาง macroscopic lesions ของนกกระทาในกลุ่มควบคุมลบ

Normal lung



Normal intestine



2. ผลทางจุลพยาธิวิทยา (microscopic lesions)

นำตัวอย่างทอลม ปอด หัวใจ ม้าม ตับอ่อน ไต ตับ สมองและลำไส้ มาตรวจทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อดูลักษณะที่ผิดปกติของเนื้อเยื่อ พบว่ารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบมากที่สุดที่ทอลม turbinate bone ปอด และลำไส้ ซึ่งได้แก่ slightly tracheitis with infiltration of inflammatory cells in the submucosa, deciliation and sloughing of epithelial cells in trachea, mild to moderate bronchitis and peribronchiolar cuffing characterized by infiltration of inflammatory cells surrounding the bronchioles, mild to moderate diffuse pulmonary congestion and hemorrhage และ mild to moderate duodenitis with inflammatory cells infiltration ส่วนอวัยวะอื่นพบรอยโรคได้น้อยหรือไม่พบรอยโรคเลย ได้แก่ mild congestion and hemorrhage in the kidney and the pancreas และ mild hepatic congestion โดยตลอดการทดลองหลังได้รับเชื้อพบว่านกกระทาที่ได้รับเชื้อไขหวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 มีรอยโรครุนแรงกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าโดยนกกระทาที่ได้รับเชื้อไขหวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และนกกระทาที่ได้รับเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร H1N1 จะพบรอยโรคในวันที่ 7 หลังการให้เชื้อรุนแรงกว่าในวันที่ 3 และ 5 หลังการให้เชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 7 และ 8 และภาพที่ 3)

นำตัวอย่างทอลม ปอด หัวใจ ม้าม ตับอ่อน ไต ตับ สมองและลำไส้ มาทำ immunostaining ด้วย Influenza A specific antibody เพื่อดูการติดสีของแอนติเจนของไวรัสในเนื้อเยื่อเพื่อแสดงถึงการติดเชื้อ (infectivity) ของไวรัสในเนื้อเยื่อ พบว่ามีการติดสีของแอนติเจนของไวรัสใน macrophage ในลำไส้ส่วน duodenum ของนกกระทาที่ได้รับเชื้อไขหวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 (ภาพที่ 4) ส่วนนกกระทาที่ได้รับเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds ไม่พบการติดสีของแอนติเจนของไวรัสในอวัยวะที่นำมาทดสอบ

ตารางที่ 7 ผลทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds

กลุ่ม	รายละเอียด	DPI ⁱ	Tr ⁱⁱⁱ	Lu	H	Sp	P	K	L	B	D
1	กลุ่มให้เชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ^a	3	4/5 ⁱⁱⁱ	5/5	2/5	0/5	3/5	5/5	3/5	0/5	1/5
		5	5/5	5/5	2/5	1/5	1/5	2/5	3/5	0/5	2/5
		7	5/5	5/5	2/5	1/5	5/5	5/5	3/5	0/5	5/5
2	กลุ่มให้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ^b	3	3/5	5/5	0/5	2/5	0/5	5/5	4/5	0/5	0/5
		5	3/5	4/5	0/5	1/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5
		7	5/5	5/5	0/5	1/5	1/5	4/5	1/5	0/5	2/5
3	กลุ่ม contact birds ของเชื้อ H3N2 ^b	7	1/5	5/5	0/5	1/5	0/5	3/5	5/5	0/5	1/5
4	กลุ่ม contact birds ของเชื้อ H1N1 ^b	7	3/5	5/5	0/5	1/5	0/5	5/5	1/5	0/5	2/5
5	กลุ่มควบคุมลบ ^b	3	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		7	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5

ⁱ Day of post inoculation

ⁱⁱ No. of birds found lesions / total No. of necropsy birds

ⁱⁱⁱ Tr trachea, Lu lung, H heart, Sp spleen, P pancreas, K kidney, L liver, B brain, D duodenum

Different superscript letters indicate statistical difference ($p < 0.05$) among groups.

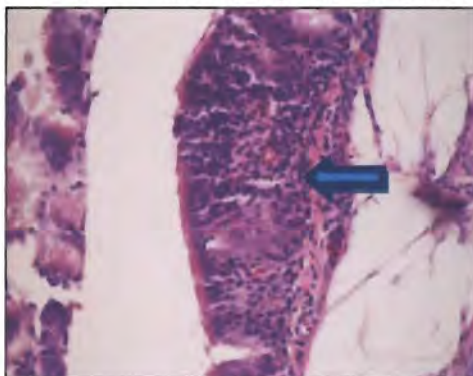
ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ของค่า score ของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลม ปอดและลำไส้ของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds

กลุ่ม	รายละเอียด	Trachea	Lung	Duodenum
1	กลุ่มให้เชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2	1.27 ^a	1.0 ^a	0.8 ^a
2	กลุ่มให้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1	1.0 ^b	0.93 ^a	0.26 ^c
3	กลุ่ม contact birds ของเชื้อ H3N2	0.2 ^c	1.0 ^a	0.4 ^b
4	กลุ่ม contact birds ของเชื้อ H1N1	0.6 ^c	1.0 ^a	0.4 ^b
5	กลุ่มควบคุมลบ	0 ^c	0 ^b	0 ^c

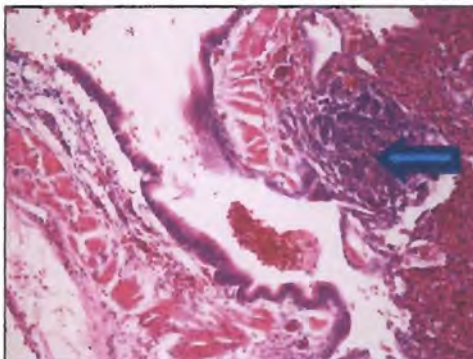
Different superscript letters indicate statistical difference ($p < 0.05$) among groups.

ภาพที่ 3 ลักษณะทาง microscopic lesions ของตัวอย่างจากนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1

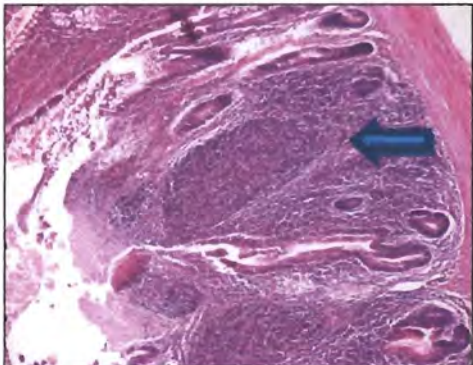
Moderate tracheitis with influx of inflammatory cells within the submucosa (arrow)



Moderate bronchitis and peribronchiolar cuffing (arrow)

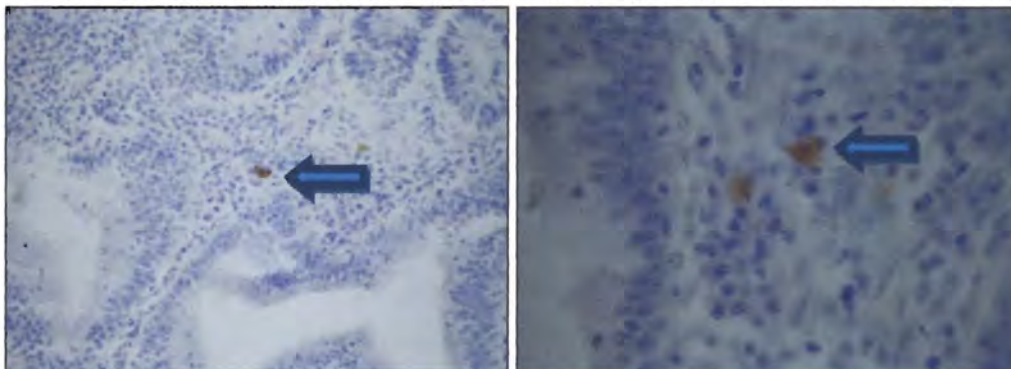


Moderate enteritis with inflammatory cells infiltration (arrow)



ภาพที่ 4 ลักษณะการติดสีของแอนติเจนของไวรัสในโนล้าไส้ของนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2

Viral antigen in macrophages in intestinal epithelium of a quail infected with duck H3N2 (arrow)



ผลการศึกษาการปลดปล่อยไวรัส

ตรวจหาปริมาณไวรัสที่ปลดปล่อยในท่อลมและช่องทวารร่วม โดยนำตัวอย่างจากท่อลมและช่องทวารร่วมจากกลุ่ม 1-5 มาเพาะแยกเชื้อ (virus isolation) และหาปริมาณของเชื้อ (virus titration) ใน MDCK cells โดยพบว่า กลุ่มนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 มีการปลดปล่อยไวรัสออกมาในท่อลมในปริมาณที่มากกว่าและนานกว่ากลุ่มนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 โดยพบว่ากลุ่มนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 มีการปลดปล่อยไวรัสออกมาในท่อลมในปริมาณที่ต่ำและมีการปลดปล่อยไวรัสออกมาในวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 หลังการให้เชื้อ ในขณะที่กลุ่มนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 มีการปลดปล่อยไวรัสออกมาในปริมาณมากและมีการปลดปล่อยไวรัสออกมาตั้งแต่ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 หลังการให้เชื้อ ซึ่งกลุ่มนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 จะปลดปล่อยไวรัสออกมาปริมาณสูงกว่านกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 5) นอกจากนี้พบว่ากลุ่มนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และกลุ่มนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 สามารถปลดปล่อยไวรัสออกมาทางช่องทวารร่วมได้ในปริมาณต่ำและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 6) ส่วนนกกระทาที่เป็น contact birds ทั้งสองกลุ่มสามารถปลดปล่อยไวรัสออกมาทางท่อลมได้ในวันที่ 2 หลังการให้เชื้อ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลการปลดปล่อยไวรัสมาในท่อลมและช่องทวารร่วมของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds

Virus	Group	Swab	Virus isolation							HI titer ^a		
			1 DPI ^b	2 DPI	3 DPI	4 DPI	5 DPI	6 DPI	7 DPI	3 DPI	5 DPI	7 DPI
dkH3N2	Infected	TS ^c	2.5-3.5 ^e (3/5) ^f	0.5-2.5 (3/5)	3.66 (1/5)	0.5-3.33 (2/5)	3.0 (1/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)
		CS ^d	0.5 (1/5)	0 (0/5)	0.5-1.33 (2/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)			
	Contact	TS	ND ^g	0.5-1.0 (2/5)	ND	0 (0/5)	ND	ND	ND	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)
		CS	ND	0 (0/5)	ND	0 (0/5)	ND	ND	ND			
swH1N1	Infected	TS	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	0.5 (1/5)	0.5 (1/5)	0.5 (1/5)	0.5 (1/5)	10-20 ^h (3/5)	10-20 (5/5)	10 (3/5)
		CS	0 (0/5)	0 (0/5)	0.5 (2/5)	0.5 (1/5)	3.0 (1/5)	0 (0/5)	0 (0/5)			
	Contact	TS	ND	0.5 (1/5)	ND	0 (0/5)	ND	ND	ND	ND	ND	10 (4/5)
		CS	ND	0 (0/5)	ND	0 (0/5)	ND	ND	ND			

^a Range HI titer of the sera

^b Day of post inoculation

^{c,d} Virus titer determined from tracheal and cloacal swab fluid

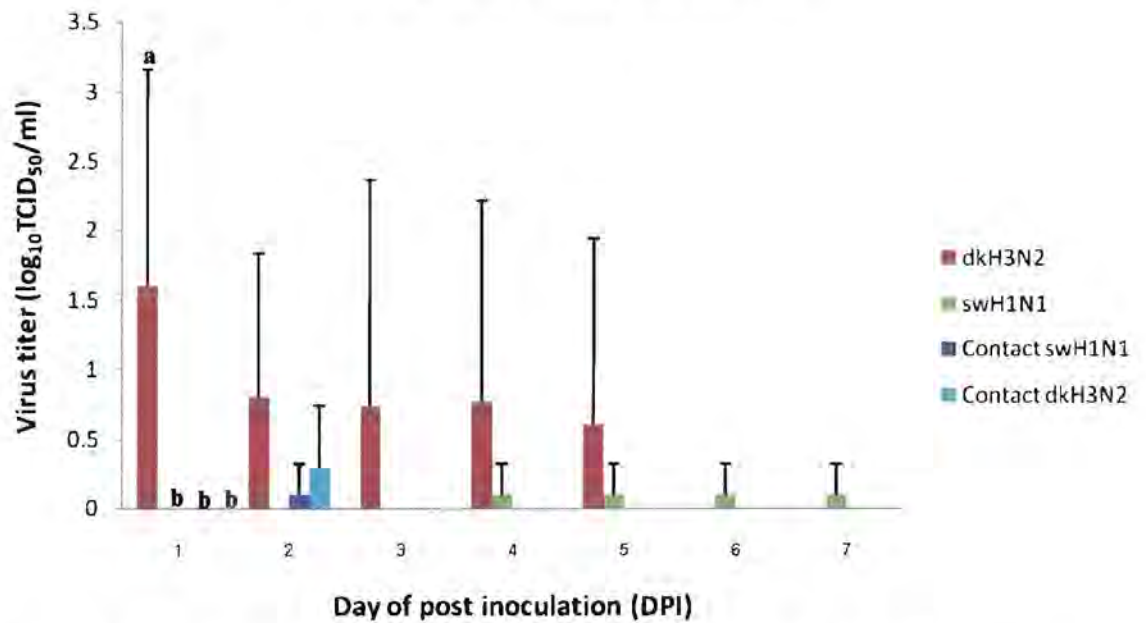
^e Range virus titer expressed as log₁₀TCID₅₀/ml of swab fluid

^f No. of positive samples/total number of tested samples

^g Not determined. ^h Range HI titer of the sera against homologous virus

ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงการปลดปล่อยไวรัสมาในทอลมของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds

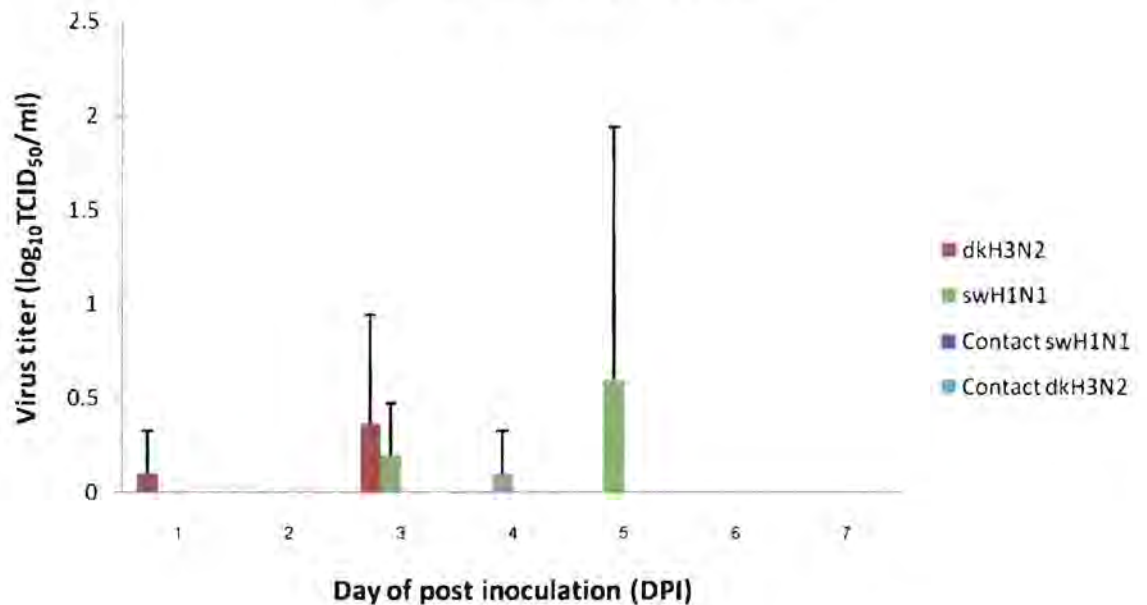
Tracheal swab titration



* Different letters indicate statistical difference ($p < 0.05$) among groups for each DPI. Error bars indicate standard deviation of virus titers.

ภาพที่ 6 แผนภูมิแสดงการปลดปล่อยไวรัสในช่องทวารร่วมของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds

Cloacal swab titration



* There are no statistical differences ($p < 0.05$) among groups for each DPI. Error bars indicate standard deviation of virus titers.

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) ผลการปลดปล่อยไวรัสที่ได้ระหว่างแต่ละกลุ่มด้วยวิธี one way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) ผลค่า score ของรอยโรคทางพยาธิวิทยา ระหว่างกลุ่มด้วยวิธี non-parametric Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums) โดยใช้ JMP 5.1 software (SAS Institute, Cary, North Carolina) ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

การอภิปรายผล

นกกระทามีความสามารถเป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสายพันธุ์ต่างๆได้ เนื่องจากนกกระทาไวต่อการติดเชื้อไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่สุกร (Makarova et al., 2003) รวมทั้งมีตัวรับที่จำเพาะต่อไวรัสทั้งสองชนิด (Wan and Perez, 2006) จึงมีโอกาที่เชื้อไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่สุกรจะเกิดการติดเชื้อพร้อมกันในนกกระทาและเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกันได้ ส่งผลให้เกิดการติดต่อข้ามไปยังสัตว์ชนิดอื่นได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันการศึกษาความไวต่อการติดเชื้อและลักษณะทางพยาธิวิทยาของเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรงและเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมีจำนวนน้อย งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาหาความสามารถในการรองรับการติดเชื้อและความสามารถในการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่มีต้นกำเนิดจากเป็ดและสุกรในนกกระทา โดยศึกษาจากลักษณะทางพยาธิวิทยา การติดต่อและแพร่กระจายเชื้อ รวมถึงการปลดปล่อยไวรัส

วัตถุประสงค์ของการทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมก่อนพันธุกรรมที่เหลือของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เพื่อเป็นการยืนยันต้นกำเนิดของยีนที่ต่างกันต่างๆว่ามาจากสุกรและสัตว์ปีกตามลำดับ โดยผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมพบว่าไวรัสที่ใช้ในการศึกษาทั้งสองชนิดมีที่มาจากสุกรและสัตว์ปีกตามที่ตั้งสมมติฐานไว้

จากการศึกษาความไวของนกกระทาต่อการติดเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 พบว่าเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์สามารถเพิ่มจำนวนในนกกระทาได้และมีการปลดปล่อยเชื้อออกมทางทางเดินหายใจและทางเดินอาหารโดยนกจะไม่แสดงอาการป่วยตาย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่านกกระทาสามารถปลดปล่อยเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรงสายพันธุ์ H1-H15 รวมถึงเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1, H1N2 และ H3N2 โดยไม่แสดงอาการทางคลินิก (Makarova et al., 2003) นอกจากนี้นกกระทาสามารถปลดปล่อยไวรัสโดยมากออกมทางระบบทางเดินหายใจ ดังนั้นตำแหน่งที่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ในนกกระทาจะอยู่ที่ระบบทางเดินหายใจซึ่งคล้ายคลึงกับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีความแตกต่างจากสัตว์ปีกชนิดอื่นๆเช่น เป็ด นกน้ำ ที่ตำแหน่งการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอจะอยู่ที่ระบบทางเดินอาหารเป็นส่วนมาก (Webster et al., 1978) ซึ่งผลการปลดปล่อยไวรัสดังกล่าวสอดคล้องกับการพบตัวรับ α -2,3 linkage sialic acid และตัวรับ α -2,6 linkage sialic acid ที่บริเวณท่อนลมและปอดของนกกระทา (Yu et al, 2011) การศึกษครั้งนี้พบว่านกกระทามีความไวต่อการติดเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 มากกว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 เนื่องจากนกกระทามีการปลดปล่อยเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ออกมทางทางเดินหายใจในปริมาณที่มากกว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้จากการที่เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 สามารถเพิ่มจำนวนในนกกระทาได้ ถึงแม้ว่าจะมีการปลดปล่อยไวรัสออกมาในปริมาณต่ำ อาจมีความเป็นไปได้ที่เชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 จะสามารถเกิดการติดเชื้อพร้อมกันในนกกระทาและเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกันได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้มีสารพันธุกรรมก่อนโน (internal genes) มาจากสัตว์ปีก (avian origin) จึงอาจเป็นข้อได้เปรียบทำให้เชื่อดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนในสัตว์ปีกได้ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Makarova และคณะ (2003) และ Perez และคณะ (2003) อย่างไรก็ตามเนื่องจากนกกระทาปลดปล่อย

เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ออกมาในปริมาณที่ต่ำกว่าเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 มาก แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นที่เชื่อดังกล่าวต้องมีการปรับตัวหรือเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนในนกกระทาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้จากการที่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 จากทอลมของนกกระทาในวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 หลังการให้เชื้อ อาจเนื่องมาจากนกกระทาอาจมีการปลดปล่อยไวรัสออกมาในปริมาณที่ต่ำมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี virus titration หรืออาจเกิดจากนกกระทามีการปลดปล่อยไวรัสออกมาเป็นช่วงๆ จากผลการศึกษาการติดต่อและการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ในนกกระทา พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถติดต่อไปยังนกกระทาที่เป็น contact bird บางตัวได้ในวันที่ 2 หลังการให้เชื้อ ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Liu และคณะ (2003) พบว่าเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ที่แยกได้จากไก่ สามารถติดต่อไปยังนกกระทาที่เป็น contact bird ได้ และผลการศึกษาของ Perez และคณะ (2003a) พบว่าเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H9 ที่แยกได้จากเป็ด สามารถติดต่อไปยังนกกระทาที่เป็น contact bird ได้ อย่างไรก็ตามผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกับผลการศึกษาของ Makarova และคณะ (2003) ที่พบว่าเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N8 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ไม่สามารถติดต่อไปยังนกกระทาที่เป็น contact bird ได้

จากผลการสังเกตอาการทางคลินิก อัตราการป่วย และอัตราการตาย พบว่านกกระทาทุกกลุ่มที่ได้รับเชื้อรวมถึงนกกระทาที่เป็น contact birds ยังคงปกติและไม่พบการป่วยตายจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Makarova และคณะ (2003), Liu และคณะ (2003) และ Perez และคณะ (2003) นอกจากนี้ลักษณะรอยโรคของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไวรัสพบว่า รอยโรคส่วนใหญ่พบที่ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหารของนกกระทา ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีการรายงานว่าเป็นอวัยวะแรก (primary site) ที่เชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรงใช้ในการเพิ่มจำนวนในสัตว์ปีก (Mo et al., 1997; Spickler et al., 2008; Swayne, 1997) ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Nili และคณะ (2007) พบว่าเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H9N2 สามารถทำให้เกิดรอยโรคที่ระบบทางเดินหายใจของนกกระทาที่ได้รับเชื้อ ได้แก่ moderate-to-severe lung hemorrhage และ infiltration of inflammatory cells in the lung อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการติดสีของโปรตีนของไวรัสในเนื้อเยื่อเพื่อแสดงถึงการติดเชื้อ (infectivity) ของไวรัสในเนื้อเยื่อในนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรงและเชื้อไข้หวัดสุกร ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการติดสีของโปรตีนของไวรัสใน macrophage ในลำไส้ส่วน duodenum ของนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ขณะเดียวกับผลการศึกษาของ Jeong และคณะ (2009) พบการติดสีของโปรตีนของไวรัสใน parenchyma cells ในอวัยวะต่างๆของนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H5N1 ยกเว้นอวัยวะในระบบทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่พบการติดสีของโปรตีนของไวรัสในนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดสุกร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าไม่พบการติดสีของโปรตีนของไวรัสในสัตว์ปีกที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง (Mo et al., 1997; Mutinelli et al., 2003; Pillai et al., 2010; Pillai et al., 2008) จากผลการศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยาและผลการแสดงอาการทางคลินิกในนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 จะเห็นได้ว่านกกระทาที่ได้รับเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ โดยเฉพาะเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ไม่พบการป่วยตายหรือแสดงอาการทางคลินิก รวมถึงไม่พบการติดสีของโปรตีนของไวรัสในอวัยวะต่างๆ อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการให้เชื้อ บ่งบอกว่ามีการติดเชื้อ

ไวรัสดังกล่าวในนกกระทาแต่เป็นการติดเชื้อที่ไม่รุนแรงจนทำให้สัตว์แสดงอาการทางคลินิก (subclinical infection) อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ในนกกระทาที่ได้รับเชื้อได้ ทั้งที่นกกระทากลุ่มที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 มีการปลดปล่อยไวรัสออกมาทางระบบทางเดินหายใจในปริมาณที่ค่อนข้างสูงและพบว่ามีรอยโรคทางพยาธิวิทยาในนกกระทากลุ่มดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ตรวจไม่พบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดนกในเป็ดทดลอง (Kida et al., 1980) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมสัตว์ปีกด้วยวิธี HI นั้นมีความไวต่ำเนื่องมาจากความหลากหลายของ IgY (Warr et al., 1995) และอาจเนื่องมาจากการใช้เม็ดเลือดแดงจากไก่ในการทำ HI เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดนก เนื่องจากมีรายงานว่าบนผิวเม็ดเลือดแดงจากไก่มีตัวรับทั้ง α -2,3 linkage sialic acid และ α -2,6 linkage sialic acid ในขณะที่ผิวเม็ดเลือดแดงจากไก่วงมีแต่ตัวรับทั้ง α -2,3 linkage sialic acid (Suzuki et al., 2000) ทำให้เม็ดเลือดแดงไก่วงมีความไวในการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดนกมากกว่าเม็ดเลือดแดงไก่ สอดคล้องกับการทดลองของ Humbert และคณะ (2006) ซึ่งพบว่าการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดนกด้วยวิธี HI โดยใช้เม็ดเลือดแดงไก่วงใน ring-necked pheasants และ chukar partridges ให้ผลบวกมากกว่าการใช้เม็ดเลือดแดงไก่ โดยรวมการศึกษารุ่นนี้พบว่าเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ทำให้เกิดรอยโรคทางพยาธิวิทยาในนกกระทาที่ได้รับเชื้อรุนแรงกว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1

จากผลการศึกษาความไวของนกกระทาต่อการติดเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 รวมถึงลักษณะทางทางพยาธิวิทยา การติดต่อและแพร่กระจายเชื้อ สนับสนุนบทบาทการเป็นโฮสต์ตัวกลางของนกกระทาในการผลิตไวรัสลูกผสมของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสายพันธุ์ต่างๆได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่เชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 จะสามารถเกิดการติดเชื้อพร้อมกันในนกกระทาและเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกันได้ ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังและทำสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในนกกระทาอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการลดโอกาสการเกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรงและมีโอกาสทำให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ต่อไป

ข้อสรุป

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาความสามารถในการรองรับการติดเชื้อและความสามารถในการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่มีต้นกำเนิดจากเปิดและสุกรในนกกกระทา ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยของโครงการนี้สรุปได้ดังนี้

ผลการวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาความไวของนกกกระทาต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ 2 สายพันธุ์ คือเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 พบว่าเชื้อไวรัสทั้งสองสามารถเพิ่มจำนวนได้ในนกกกระทา และนกกกระทาสามารถปลดปล่อยไวรัสโดยมากออกมาทางระบบทางเดินหายใจ

- ผลการสังเกตอาการทางคลินิก อัตราการป่วย และอัตราการตาย พบว่า
 - นกกกระทาที่ได้รับเชื้อมีอาการปกติและไม่พบการป่วยตายจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 7)
 - นกกกระทาบางตัวในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และรวมถึงนกกกระทาที่เป็น contact birds ของไวรัสกลุ่มดังกล่าว แสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจแบบไม่รุนแรง ได้แก่ มีน้ำมูก (nasal discharge)
- ผลการตรวจทางพยาธิและจุลพยาธิ พบว่า
 - นกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 พบว่ามีรอยโรคทางพยาธิรุนแรงกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกกระทาที่เป็น contact birds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
 - นกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 มีรอยโรคทางจุลพยาธิรุนแรงกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกกระทาที่เป็น contact birds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
 - รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบมากที่สุดที่ ท่อลม turbinate bone ปอด และลำไส้ ส่วนอวัยวะอื่นพบรอยโรคได้น้อยหรือไม่พบรอยโรคเลย
 - ผลการตรวจการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี immunostaining ต่อ Influenza A specific antibody พบว่ามีการติดสีของโปรตีนของไวรัสของเซลล์ macrophage ในลำไส้ส่วน duodenum ของนกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2
- ผลการศึกษาการปลดปล่อยไวรัส พบว่า
 - นกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 มีการปลดปล่อยไวรัสออกมาในท่อลมในปริมาณที่มากกว่าและนานกว่ากลุ่มนกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1
 - นกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 จะปลดปล่อยไวรัสออกมาปริมาณสูงกว่านกกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกกระทาที่เป็น contact birds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ข้อเสนอแนะ

ประโยชน์ของการวิจัยครั้งนี้ ทำให้ทราบความไวของนกกระทาต่อการติดเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 โดยพบว่าเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 สามารถเพิ่มจำนวนและก่อโรคในนกกระทาได้ ทำให้มีโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อพร้อมกันในนกกระทาและอาจเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกันได้ นอกจากนี้สามารถนำผลการวิจัยมาเป็น *in vivo* quail influenza A virus infection model เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ็ด้านต่างๆ สามารถนำข้อมูลโดยรวมที่ได้มาประกอบการวางแผนควบคุมป้องกันการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ็ดังในประชากรสัตว์และประชากรมนุษย์ต่อไป

บรรณานุกรม

- Beare, A.S., Webster, R.G., 1991, Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* 119, 37-42.
- Castrucci, M.R., Donatelli, I., Sidoli, L., Barigazzi, G., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1993, Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 193, 503-506.
- Choi, Y.K., Nguyen, T.D., Ozaki, H., Webby, R.J., Puthavathana, P., Buranathal, C., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Hanh, N.T., Ma, S.K., Hui, P.Y., Guan, Y., Peiris, J.S., Webster, R.G., 2005, Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *J Virol* 79, 10821-10825.
- Guan, Y., Shortridge, K.F., Krauss, S., Webster, R.G., 1999, Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9363-9367.
- Guo, Y.J., Krauss, S., Senne, D.A., Mo, I.P., Lo, K.S., Xiong, X.P., Norwood, M., Shortridge, K.F., Webster, R.G., Guan, Y., 2000, Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology* 267, 279-288.
- Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Webster, R.G., Sriram, G., 1980, Genetic reassortment of influenza A viruses in the intestinal tract of ducks. *Virology* 102, 412-419.
- Hinshaw, V.S., Webster, R.G., Naeve, C.W., Murphy, B.R., 1983, Altered tissue tropism of human-avian reassortant influenza viruses. *Virology* 128, 260-263.
- Horimoto, T., Kawaoka, Y., 2005, Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 3, 591-600.
- Ito, T., Couceiro, J.N., Kelm, S., Baum, L.G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J.C., Webster, R.G., Kawaoka, Y., 1998, Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72, 7367-7373.
- Karasin, A.I., Schutten, M.M., Cooper, L.A., Smith, C.B., Subbarao, K., Anderson, G.A., Carman, S., Olsen, C.W., 2000, Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res* 68, 71-85.
- Kida, H., Ito, T., Yasuda, J., Shimizu, Y., Itakura, C., Shortridge, K.F., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1994, Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol* 75 (Pt 9), 2183-2188.
- Kida, H., Yanagawa, R., Matsuoka, Y., 1980, Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect Immun* 30, 547-553.
- Kitikoon, P., Nilubol, D., Erickson, B.J., Janke, B.H., Hoover, T.C., Sornsen, S.A., Thacker, E.L., 2006, The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1

- swine influenza virus infection following vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 112, 117-128.
- Makarova, N.V., Ozaki, H., Kida, H., Webster, R.G., Perez, D.R., 2003, Replication and transmission of influenza viruses in Japanese quail. *Virology* 310, 8-15.
- Matrosovich, M.N., Krauss, S., Webster, R.G., 2001, H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* 281, 156-162.
- Mo, I.P., Brugh, M., Fletcher, O.J., Rowland, G.N., Swayne, D.E., 1997, Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Dis* 41, 125-136.
- Mutinelli, F., Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., 2003, Clinical, gross, and microscopic findings in different avian species naturally infected during the H7N1 low- and high-pathogenicity avian influenza epidemics in Italy during 1999 and 2000. *Avian Dis* 47, 844-848.
- Nardelli, L., Rinaldi, A., Pereira, H.G., Mandelli, G., 1970, [Influenza virus infections in Japanese quails]. *Arch Exp Veterinarmed* 24, 231-249.
- Olsen, C.W., Carey, S., Hinshaw, L., Karasin, A.I., 2000, Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States. *Arch Virol* 145, 1399-1419.
- 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, 916-917.
- Perez, D.R., Lim, W., Seiler, J.P., Yi, G., Peiris, M., Shortridge, K.F., Webster, R.G., 2003a, Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens. *J Virol* 77, 3148-3156.
- Perez, D.R., Webby, R.J., Hoffmann, E., Webster, R.G., 2003b, Land-based birds as potential disseminators of avian mammalian reassortant influenza A viruses. *Avian Dis* 47, 1114-1117.
- Pillai, S.P., Pantin-Jackwood, M., Suarez, D.L., Saif, Y.M., Lee, C.W., 2010, Pathobiological characterization of low-pathogenicity H5 avian influenza viruses of diverse origins in chickens, ducks and turkeys. *Arch Virol* 155, 1439-1451.
- Pillai, S.P., Suarez, D.L., Pantin-Jackwood, M., Lee, C.W., 2008, Pathogenicity and transmission studies of H5N2 parrot avian influenza virus of Mexican lineage in different poultry species. *Vet Microbiol* 129, 48-57.
- Reed, L.J.a.M., H., 1938, A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.
- Saito, T., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1993, Phylogenetic analysis of the N8 neuraminidase gene of influenza A viruses. *Virology* 193, 868-876.
- Saito, T., Watanabe, C., Takemae, N., Chaisingh, A., Uchida, Y., Buranathai, C., Suzuki, H., Okamatsu, M., Imada, T., Parthariyanon, S., Traivanatam, N., Yamaguchi, S., 2009,

- Pathogenicity of highly pathogenic avian influenza viruses of H5N1 subtype isolated in Thailand for different poultry species. *Vet Microbiol* 133, 65-74.
- Shortridge, K.F., Zhou, N.N., Guan, Y., Gao, P., Ito, T., Kawaoka, Y., Kodihalli, S., Krauss, S., Markwell, D., Murti, K.G., Norwood, M., Senne, D., Sims, L., Takada, A., Webster, R.G., 1998, Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* 252, 331-342.
- Smith, G.J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghvani, J., Bhatt, S., Peiris, J.S., Guan, Y., Rambaut, A., 2009, Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459, 1122-1125.
- Sorrell, E.M., Perez, D.R., 2007, Adaptation of influenza A/Mallard/Potsdam/178-4/83 H2N2 virus in Japanese quail leads to infection and transmission in chickens. *Avian Dis* 51, 264-268.
- Spickler, A.R., Trampel, D.W., Roth, J.A., 2008, The onset of virus shedding and clinical signs in chickens infected with high-pathogenicity and low-pathogenicity avian influenza viruses. *Avian Pathol* 37, 555-577.
- Suarez, D.L., Garcia, M., Latimer, J., Senne, D., Perdue, M., 1999, Phylogenetic analysis of H7 avian influenza viruses isolated from the live bird markets of the Northeast United States. *J Virol* 73, 3567-3573.
- Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R.E., Jr., Chambers, T.M., Kiso, M., Ishida, H., Kawaoka, Y., 2000, Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol* 74, 11825-11831.
- Swayne, D.E., 1997, Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza virus infections of chickens. *Vet Pathol* 34, 557-567.
- Tashiro, M., Reinacher, M., Rott, R., 1987, Aggravation of pathogenicity of an avian influenza virus by adaptation to quails. *Arch Virol* 93, 81-95.
- Wan, H., Perez, D.R., 2006, Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. *Virology* 346, 278-286.
- Warr, G.W., Magor, K.E., Higgins, D.A., 1995, IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 16, 392-398.
- 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, 152-179.
- Webster, R.G., Guan, Y., Peiris, M., Walker, D., Krauss, S., Zhou, N.N., Govorkova, E.A., Ellis, T.M., Dyrting, K.C., Sit, T., Perez, D.R., Shortridge, K.F., 2002, Characterization of H5N1 influenza viruses that continue to circulate in geese in southeastern China. *J Virol* 76, 118-126.
- Webster, R.G., Peiris, M., Chen, H., Guan, Y., 2006, H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerg Infect Dis* 12, 3-8.

Webster, R.G., Yakhnó, M., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Murti, K.G., 1978, Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84, 268-278.