

ผลการวิจัย

ระยะที่ 1 ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

การเตรียมเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 2 isolates คือ เชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ที่เพาะแยกจากเป็ด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจาก รศ.น.สพ.ดร.ทวีศักดิ์ ส่งเสริม 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 มาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนทั้ง 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 ซึ่งเป็นฟาร์มที่มีการเลี้ยงนกกระทาที่มีระบบมาตรฐานและเป็นฟาร์มรายใหญ่ที่สุดในประเทศไทย

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

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

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

กลุ่มที่ 1 กลุ่มให้เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดไม่รุนแรง 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)

การให้เชื้อไวรัสจะทำในตู้เลี้ยงสัตว์ทดลองนรีภัยชีวภาพระดับ 3 โดยนกกระทาในกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับเชื้อปริมาณ 10^6 ELD₅₀/ml โดยการหยอดปาก 200 μ l และจุ่มขางละ 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 การให้เชื้อไวรัสแก่นกกระทาญี่ปุ่นอายุ 5 สัปดาห์ ณ ห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อนรีภัยชีวภาพระดับ 3 (BSL3)

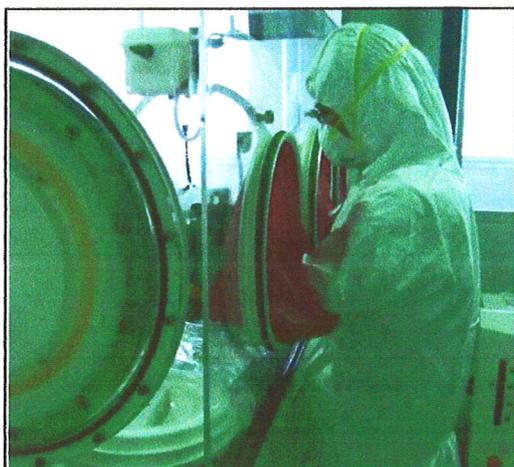
ตู้เลี้ยงสัตว์ทดลองนรีภัยชีวภาพระดับ 3



การให้เชื่อนกกระทาโดยการหยอดปาก

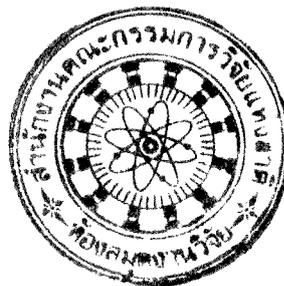


ผู้เลี้ยงสัตว์ทดลองและการป้องกันตน



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.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดมหาวิทยาลัย
วันที่..... 6 ส.ย. 2555

เลขทะเบียน..... 246005

เลขเรียกหนังสือ.....

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 รั้งไข่มีการเจริญช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 พบว่ามีรอยโรครุนแรงกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่านกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 จะพบรอยโรคจนถึงวันที่ 7 หลังการให้เชื้อ โดยจะพบรอยโรคที่ระบบทางเดินอาหารในวันที่ 7 หลังการให้เชื้อ รุนแรงกว่าในวันที่ 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	0.8 ^a	1.0 ^a	0	0	1.0 ^a
		5/5 ^{**}	4/5	5/5	0/5	0/5	5/5
2	กลุ่มให้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 (n=15)	0.4 ^b	0 ^b	0.2 ^c	0	0	0.2 ^b
		2/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
3	กลุ่ม contact birds ของเชื้อ H3N2 (n=5)	ND ^{***}	ND	0.6 ^b	ND	ND	0.8 ^a
				3/5			4/5
4	กลุ่ม contact birds ของเชื้อ H1N1 (n=5)	ND	ND	0.2 ^b	ND	ND	0.2 ^b
				1/5			1/5
5	กลุ่มควบคุม (n=15)	0 ^b	0 ^b	0 ^c	0	0	0 ^b
		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

^a = Means of macroscopic lesion scoring

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

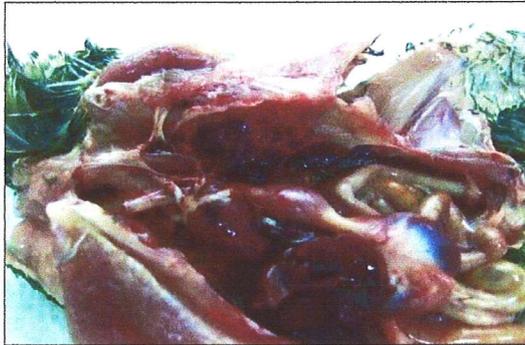
^{***} = Not determined

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

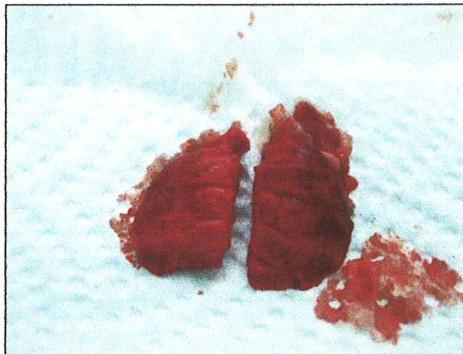


Intestinal congestion



กลุ่มที่ 2: รอยโรคทาง macroscopic lesions ของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1

Mild lung congestion



Mild intestinal congestion



กลุ่มที่ 3: รอยโรคทาง macroscopic lesions ของนกกระทาในกลุ่มควบคุม

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 ผลทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไขหวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไขหวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds

กลุ่ม	รายละเอียด	DPI	Tr ^{***}	Lu	H	Sp	P	K	L	B	D
1	กลุ่มให้เชื้อไขหวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ^a	3	4/5	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	กลุ่มให้เชื้อไขหวัดใหญ่สุกร 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

Day of post inoculation

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

^{***} 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.

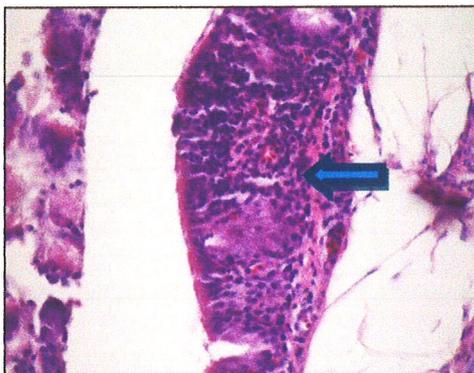
ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ของค่า score ของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของท่อลม ปอดและลำไส้ของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไขหวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไขหวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds

กลุ่ม	รายละเอียด	Trachea	Lung	Duodenum
1	กลุ่มให้เชื้อไขหวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2	1.27 ^a	1.0 ^a	0.8 ^a
2	กลุ่มให้เชื้อไขหวัดใหญ่สุกร 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

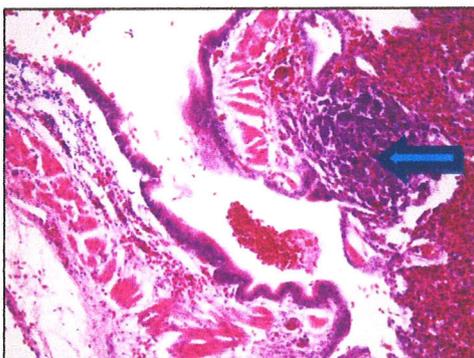
Different superscript letters indicate statistical difference ($p < 0.05$) among groups.

ภาพที่ 3 ลักษณะทาง microscopic lesions ของตัวอย่างจากนกระทาลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1

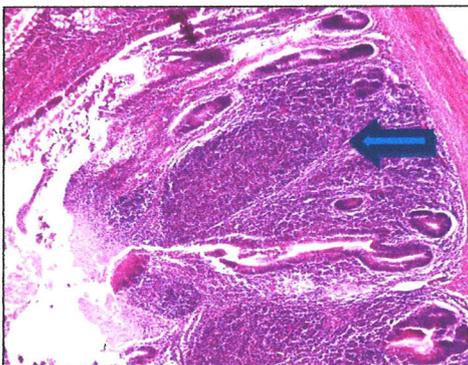
Moderate tracheitis with influx of inflammatory cells within the submucosa (arrow)



Moderate bronchitis and peribronchiolar cuffing (arrow)

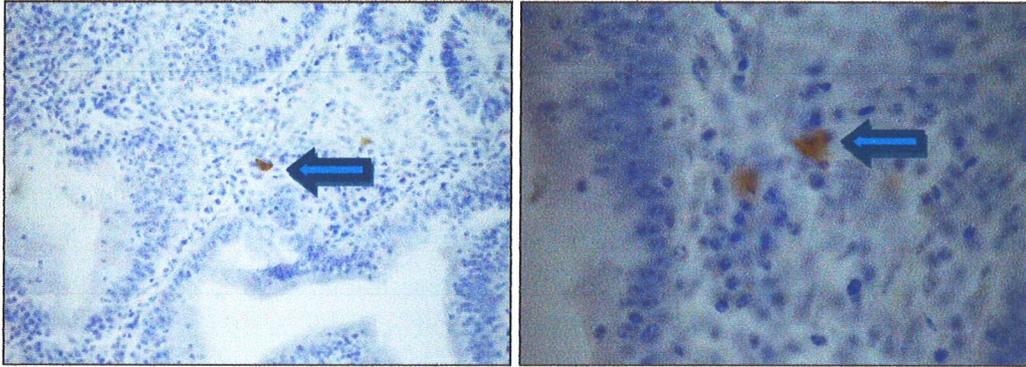


Moderate enteritis with inflammatory cells infiltration (arrow)



ภาพที่ 4 ลักษณะการติดสีของแอนติเจนของไวรัสในในลำไส้ของนกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง 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 ผลการปลดปล่อยไวรัสในท่อลมและช่องทวารร่วมของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง 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

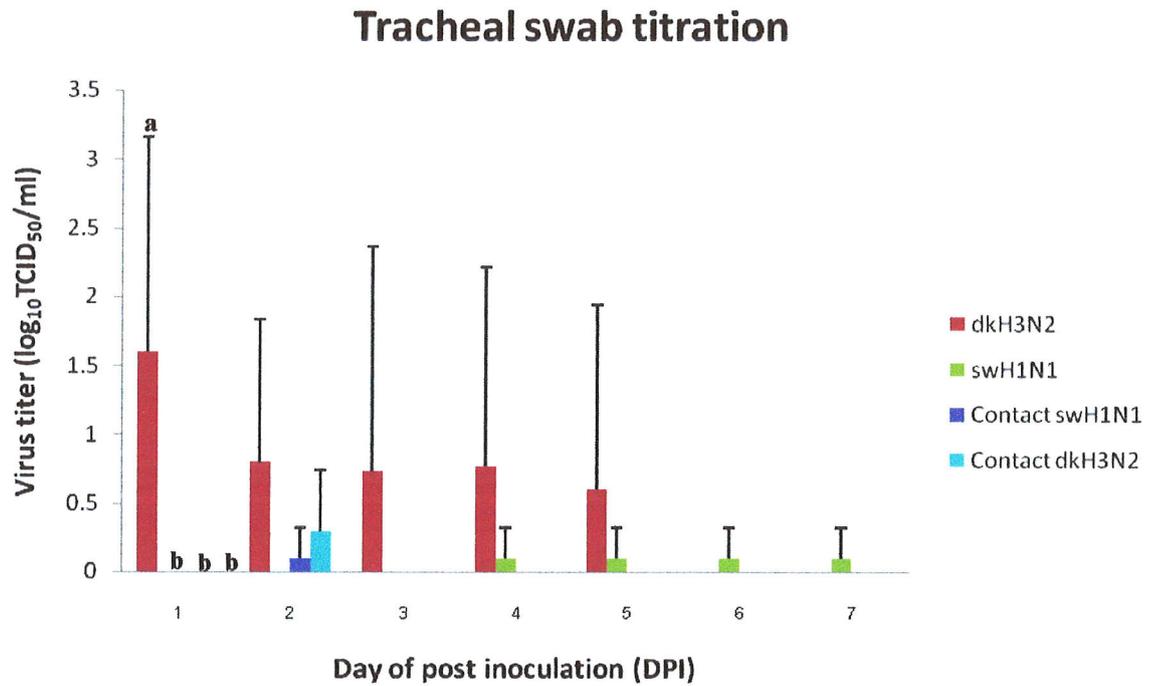
^{c,d} Virus titer determined from tracheal and cloacal swab fluid

^e Range virus titer expressed as \log_{10} TCID₅₀/ml of swab fluid

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

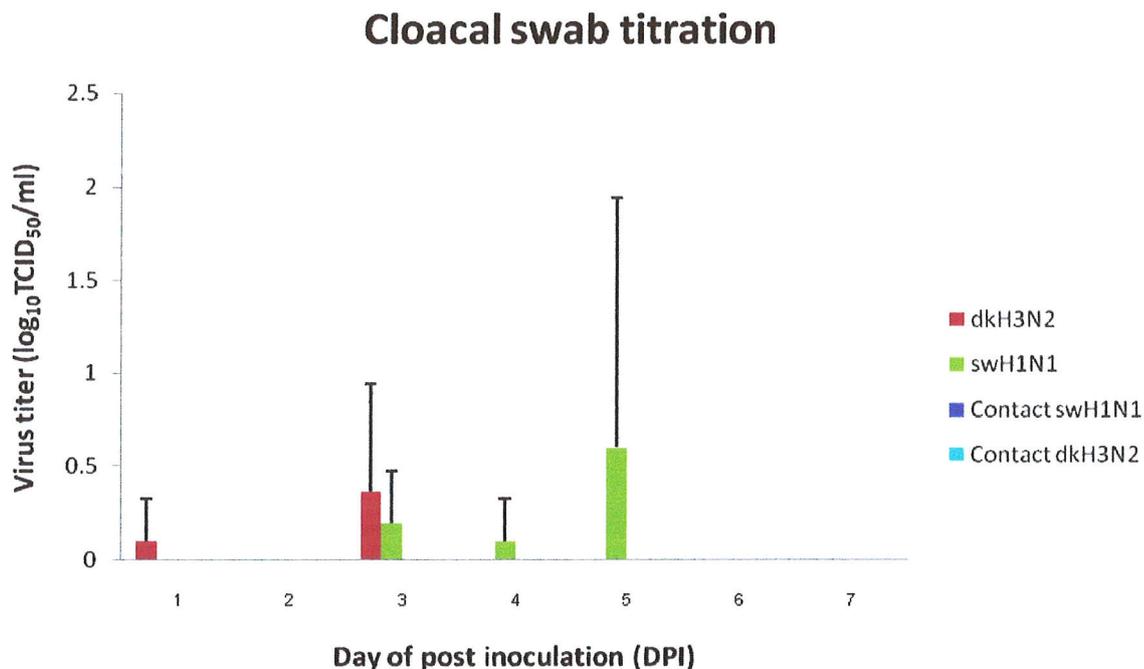
^g Not determined, ^h Range HI titer of the sera against homologous virus

ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงการปลดปล่อยไวรัสมาในทอลมของนกกระทาหลังได้รับเชื้อไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds



* 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



* 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 $p < 0.05$

