วิธีการวิจัย

การศึกษาการติดและการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่เพาะแยกจากเป็ดและสุกรในนกกระทา ประกอบด้วยขั้นตอนในการศึกษาวิจัย 2 ระยะ คือ **ระยะที่ 1** ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ **ระยะที่ 2** การติดเชื้อไวรัสในนกกระทา ดังแสดงในหน้าที่ 8

ระยะที่ 1 ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

การเตรียมเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่จะนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 2 isolates คือ เชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ที่เพาะแยกจากเป็ด (dkH3N2) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจาก รศ.น.สพ.ดร.ทวีศักดิ์ ส่งเสริม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร 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 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) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการตรวจวิเคราะห์ท่อนพันธุกรรมที่เป็น polymerase genes (PB1, PB2, PA) อีก 3 ท่อน ส่วนเชื้อ H1N1 จากสุกรขณะนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์แล้ว 2 ท่อนจาก 8 ท่อน ได้แก่ ท่อน HA และ NA แต่ยังขาดการศึกษาท่อนพันธุกรรมอีก 6 ท่อนที่เหลือ

ระยะที่ 2 การติดเชื้อไวรัสในนกกระทา

นกกระทาและการจัดกลุ่มทดลอง

นกกระทาญี่ปุ่น 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)

การให้เชื้อไวรัสจะทำในตู้เลี้ยงสัตว์ทดลองนิรภัยชีวภาพระดับ 3 โดยนกกระทาในกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับเชื้อปริมาณ 10^6 ELD_{50}/ml โดยการหยอดปาก 200 µl และจมูกข้างละ 50 µl และจะนับวันที่ให้เชื้อเป็นวันที่ศูนย์ (Day 0) ของการทดลอง ส่วนนกกระทาอีก 10 ตัว ซึ่งเป็น contact birds ถูกนำเข้าไปรวมในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับภายหลังให้เชื้อไวรัสแล้ว 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

นำตัวอย่างท่อลม ปอด หัวใจ ม้าม ตับอ่อน ไต ตับ สมองและลำไส้ มาตรวจทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อดูลักษณะที่ผิดปกติของเนื้อเยื่อ 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

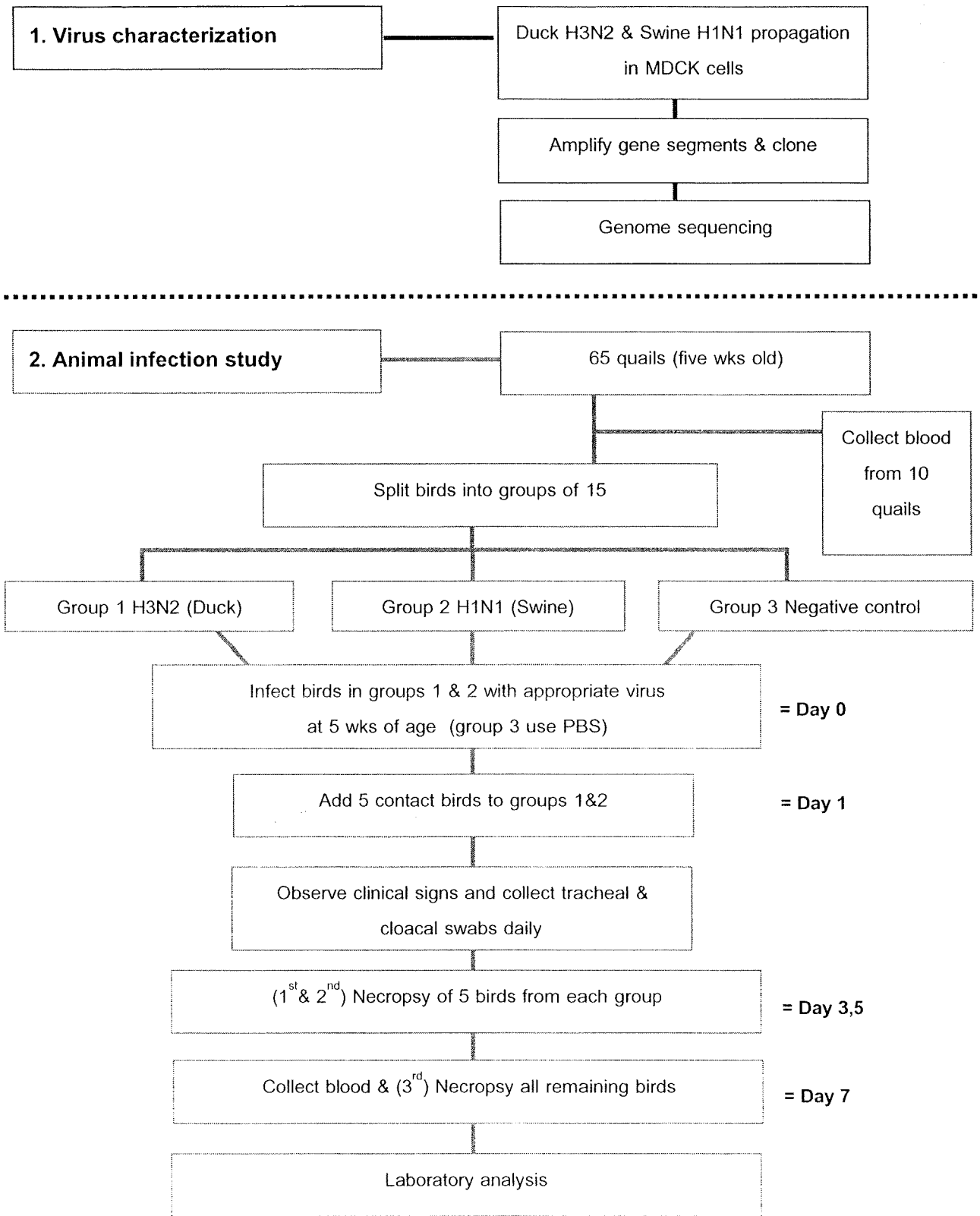
การศึกษาการปลดปล่อยไวรัส

ตรวจหาปริมาณไวรัสที่ถูกปลดปล่อยมาในท่อลมและท่อทวารร่วม โดยการนำตัวอย่างจากท่อลมและท่อทวารร่วมจากกลุ่ม 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 ของรอยโรคทางพยาธิวิทยาระหว่างกลุ่มด้วยวิธี non-parametric Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums) โดยใช้ JMP 5.1 software (SAS Institute, Cary, North Carolina) ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

กรอบแนวคิด (conceptual framework) ของโครงการวิจัย



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