



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์

จุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนา Nucleoprotein ELISA เพื่อติดตามรูปแบบของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร

Development of Nucleoprotein ELISA to Monitor Swine Influenza Virus
Infection in Thailand

นามผู้วิจัย นางสาวอารีรัตน์ แพงเพ็ง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รงศาสตราจารย์ พรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เฉลิมพล เล็กเจริญสุข, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รงศาสตราจารย์รองอาจ เลาหวิณีจ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รงศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนา Nucleoprotein ELISA เพื่อติดตามรูปแบบของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร

Development of Nucleoprotein ELISA to Monitor
Swine Influenza Virus Infection in Thailand

โดย

นางสาวอารีรัตน์ แพงเพ็ง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อารีรัตน์ แพงเพ็ง 2555: การพัฒนา Nucleoprotein ELISA เพื่อติดตามรูปแบบของ
การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D.
131 หน้า

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ในขณะที่สุกรเป็นตัวกลางใน
การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์และสัตว์ปีก การเฝ้าระวังและติดตาม
การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกรในฟาร์มมีความสำคัญในการควบคุมและป้องกันไวรัสไข้หวัดใหญ่ โปรตีน
Nucleoprotein (NP) เป็นแอนติเจนเฉพาะกลุ่มของไข้หวัดใหญ่ชนิด A ทุก subtype
การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนา NP ELISA เพื่อศึกษารูปแบบของการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่
สุกรในประเทศไทย โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ของไวรัสไข้หวัดสุกรถูกผลิตในแบคทีเรีย
Escherichia coli (*E. coli*) ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนคือ การเหนี่ยวนำด้วย IPTG
เข้มข้น 0.2 mM ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง NP มีขนาด 56 KDa และทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะ
กับแอนติบอดีต่อ histidine tag และซีรัมสุกรที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร โปรตีนในรูปที่ละลายน้ำได้ถูก
ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography และใช้เป็นแอนติเจนสำหรับพัฒนา NP ELISA
ทำการแยกซีรัมบวกและซีรัมลบของแม่สุกรด้วยวิธี IFA และใช้ซีรัมชุดดังกล่าวในการตั้งค่า cutoff
ของ NP ELISA โดยวิธี Receiver operating characteristic (ROC) analysis เมื่อเปรียบเทียบผล
ของ NP ELISA กับ IFA พบค่าการยอมรับทางสถิติ (Kappa value) เท่ากับ 0.568 ($p < 0.01$)
NP ELISA มี diagnostic sensitivity และ specificity เท่ากับ 93.4% และ 80.0% ตามลำดับ
นำ NP ELISA มาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกรในซีรัมแม่สุกรจำนวน 1,548 ตัวอย่างที่
เก็บจากฟาร์มต่างๆ ใน 5 จังหวัดที่ตั้งอยู่ในแต่ละภาคของประเทศไทย ในช่วงปี 2552 และปี 2553
พบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร ในฟาร์มเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กลาง
ตะวันออกเฉียงใต้ และเหนือเท่ากับ 96.88, 94.52, 93.90, 93.27 และ 89.92% ตามลำดับ ซึ่งไม่
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยภาพรวมสุกรส่วนใหญ่ของประเทศมีภูมิคุ้มกันต่อ NP สูง
ที่สุดในช่วงเดือนกรกฎาคม ยกเว้นในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน
ต่อ NP สูงที่สุดในช่วงเดือนพฤษภาคม ทั้งสองเดือนเป็นช่วงเริ่มต้นฤดูฝน ซึ่งมีปัจจัยที่ช่วยส่งเสริม
การแพร่กระจายเชื้อแบบ contact transmission ได้ดีซึ่งเป็นลักษณะเด่นของการแพร่กระจายเชื้อ
ในประเทศเขตร้อน

Areerat Pangpeng 2012: Development of Nucleoprotein ELISA to Monitor Swine Influenza Virus Infection in Thailand. Master of Science (Veterinary Microbiology), Major Field: Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Microbiology and Immunology. Thesis Advisor: Associate Professor Porn Tippa Lekcharoensuk, Ph.D. 131 pages.

Swine influenza virus (SIV) is caused by influenza A virus while swine is a genetic-mixing vessel for human and avian influenza viruses. Thus, surveillance of SIV in swine is crucial for prevention and control of influenza A viruses. Nucleoprotein (NP) is a group specific antigen for all subtypes of influenza A viruses. The objective of this study was to develop NP ELISA to investigate the SIV infection in Thailand. Recombinant NP was produced in *E. coli* which was cultured at 37°C for 16-18 hours with 0.2 mM IPTG induction. The recombinant NP had a molecular weight of 56 kDa and reacted specifically with antibodies to histidine tag and the SIV convalescent swine sera. The soluble form of NP was purified by using affinity chromatography and the protein was used as antigen for NP ELISA. Swine sera were classified as positive and negative using IFA and used for cutoff setting. The cutoff of NP ELISA was determined using receiver operating characteristic (ROC) analysis. Comparison of results between NP ELISA and IFA revealed an acceptable agreement of tests with the kappa value equal 0.568 ($p < 0.01$). In addition, diagnostic sensitivity and specificity of NP ELISA were 93.4 and 80%, respectively. NP ELISA was used to examine SIV infection from 1,548 sow-serum samples collected from farms in five provinces located in different parts of Thailand during 2009-2010. The results showed that antibodies to SIV were detected in 96.88, 94.52, 93.90, 93.27 and 89.92% of sows from Northeast, Central, East, South and North of Thailand, respectively. The ratios of SIV infection among pigs from different parts of Thailand were not significantly different. In conclusion, sows in the south Thailand appeared to have the highest level of antibodies to SIV in May while more anti-SIV was found in sows from the other parts of Thailand in July. Both months are at the beginning of the rainy season in Thailand that provides the environment for contact transmission of SIV. This mode of transmission is the most suitable mean for influenza A virus spreading in tropical countries.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วย的帮助เหลือเป็นอย่างดีของอาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข ผู้ที่อบรมสั่งสอนให้คำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัย ผู้มอบความรู้อันเป็นประโยชน์ยิ่งและเป็นแบบอย่างที่ดีในการทำงาน ตลอดจนการตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์เฉลิมพล เล็กเจริญสุข ที่ช่วยเหลือเกี่ยวกับการวิเคราะห์ทางสถิติ ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณ นันทวรรณ เพชรรัตน์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ และเพื่อนๆในห้อง PL lab ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจซึ่งกันและกันตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ น.สพ. นรินทร์ ร่มลำดวน และ น.สพ. ไชยรงค์ กฤษณเกรียงไกร สำนักเทคนิคและวิชาสัตวบาล ในการเก็บตัวอย่างซีรัมสุกร

ขอกราบขอพระคุณ น.สพ. สิ้นสมุทร นิลฉวี, น.สพ. วรากิจ จันทรรักษ์มี, น.สพ. นริศ ว่องวัฒนากุล, น.สพ. สมเกียรติ เพชรวานิชกุล และเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ผู้ให้การสนับสนุนด้านการศึกษา

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแต่คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวแพ่งเพ็ง ผู้คอยสนับสนุนและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

อารีรัตน์ แพ่งเพ็ง
กันยายน 2555

สารบัญ

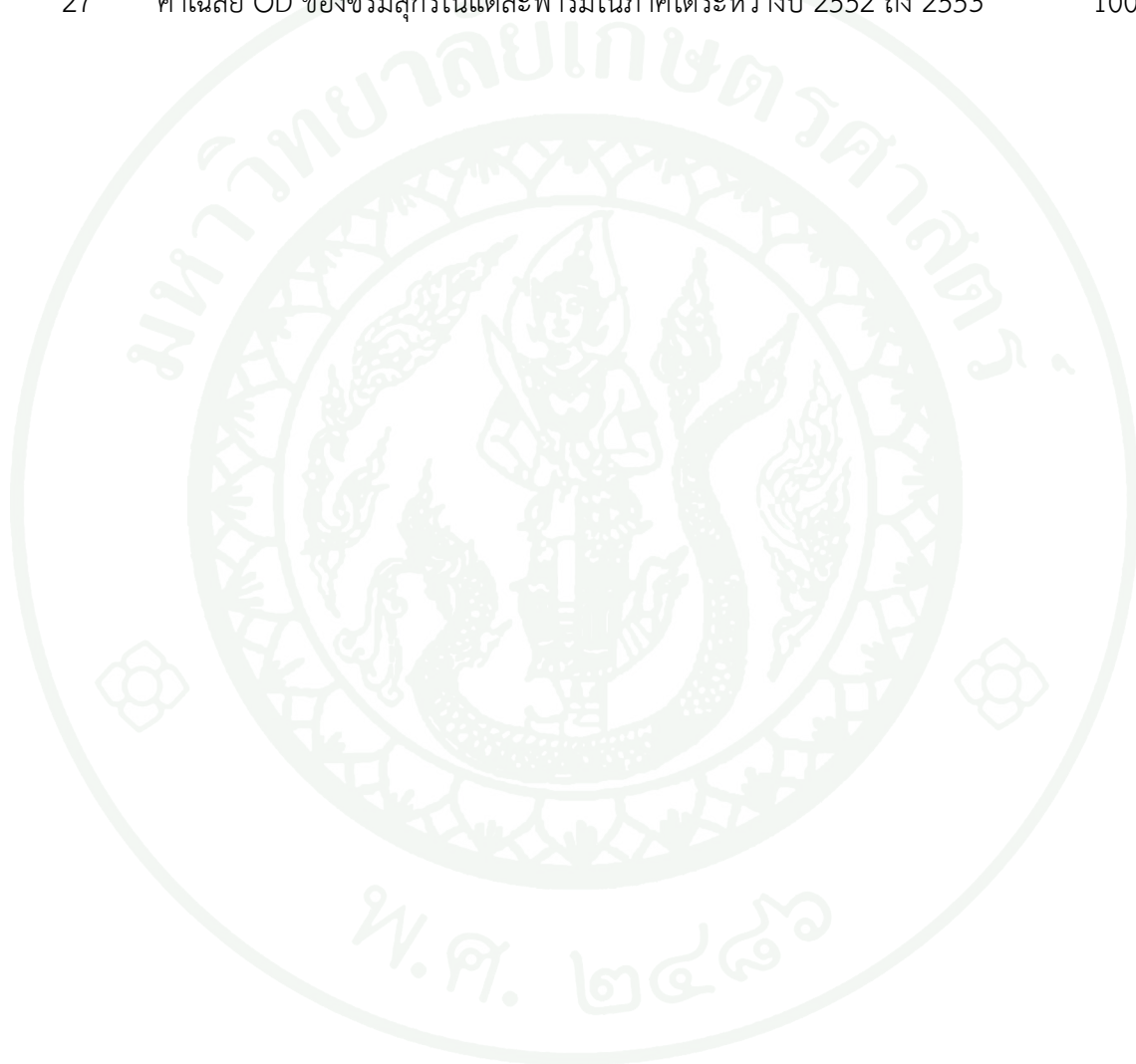
	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	54
ผล	54
วิจารณ์	102
สรุปและข้อเสนอแนะ	107
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	109
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	129

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณลักษณะของ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A, B และ C	5
2	คุณสมบัติและโปรตีนที่สร้างจากสารพันธุกรรมของ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	8
3	จำนวนตัวอย่างซีรัมแม่สุกรจากจังหวัดต่างๆ	35
4	การเตรียมความเข้มข้นของอัลบูมินมาตรฐาน (µg/ml)	45
5	ค่าสมมุติในการคำนวณค่า kappa (K)	53
6	ผลการตรวจหาแอนติบอดีของตัวอย่างซีรัมแม่สุกรจากจังหวัดต่างๆ ต่อ SIV โดยวิธี IFA	70
7	ค่า OD ₄₀₅ ของการตรวจสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติเจน NP และ ซีรัมสุกรด้วยวิธี checkerboard titration	72
8	แผนผังตัวอย่างซีรัมบวกและลบที่ใช้ทดสอบหาความเข้มข้นของ สารละลายเจือจางที่เหมาะสม	74
9	ค่า OD ของซีรัม ตามแผนผังในตารางที่ 5 ถูกเจือจางใน 0.1% milk diluents	75
10	ค่า OD ของซีรัม ตามแผนผังในตารางที่ 5 ถูกเจือจางใน 0.1% Skim milk	76
11	ค่า OD ของซีรัม ตามแผนผังในตารางที่ 5 ถูกเจือจางใน 1% Skim milk	77
12	ค่า OD ของซีรัม ตามแผนผังในตารางที่ 5 ถูกเจือจางใน 2% Skim milk	78
13	ค่า OD ของซีรัม ตามแผนผังในตารางที่ 5 ถูกเจือจางใน 5% Skim milk	79
14	ค่าความคงที่ภายในเพลต ด้วยวิธี Intra assay	81
15	ค่าความคงที่ระหว่างเพลต ด้วยวิธี Inter assay	82
16	การเปรียบเทียบผลการตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SIV ด้วยเทคนิค IFA และชุดทดสอบ NP ELISA	84
17	เปอร์เซ็นต์ผลตรวจภูมิคุ้มกันต่อ SIV และค่าเฉลี่ย OD ของตัวอย่างซีรัม ที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในแต่ละภาค ระหว่างปี 2552-2553	86
18	ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในแต่ละเดือนในภาคกลาง ระหว่างปี 2552 ถึง 2553	87
19	ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในแต่ละฟาร์มในภาคกลางระหว่างปี 2552 ถึง 2553	87
20	ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมจากสุกรในแต่ละเดือนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี 2552 ถึง 2553	90
21	ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในแต่ละฟาร์มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือระหว่างปี 2552 ถึง 2553	90
22	ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในแต่ละเดือนในภาคเหนือ ระหว่างปี 2552 ถึง 2553	93
23	ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในแต่ละฟาร์มในภาคเหนือระหว่างปี 2552 ถึง 2553	94
24	ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในแต่ละเดือนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี 2552 ถึง 2553	96

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
25	ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในแต่ละฟาร์มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างปี 2552 ถึง 2553	97
26	ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในแต่ละเดือนในภาคใต้ ระหว่างปี 2552 ถึง 2553	99
27	ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในแต่ละฟาร์มในภาคใต้ระหว่างปี 2552 ถึง 2553	100



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A	7
2	โครงสร้างสามมิติของโปรตีน HA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่	10
3	โครงสร้างของโปรตีน Neuraminidase (N9)	11
4	การจัดเรียงโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน NP	13
5	โครงสร้างการเรียงตัว ribonucleoprotein (RNP)	14
6	รูปแบบการสังเคราะห์ vRNA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่	17
7	กระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่	18
8	ที่มาของ host และ ยีนต่างๆ ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009	23
9	ภาพวาดแสดงขั้นตอนการโคลนพลาสมิด pQE80_NP เพื่อใช้ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	38
10	แผนผังการเพาะไวรัสลงในเพลตทดสอบ	46
11	แผนผังการเคลือบเพลต (coat plate) ด้วยสารละลายโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
12	แผนผังการเจือจางซีรัมของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร (SIV strong positive serum)	48
13	แผนภาพเพลต NP ELISA	50
14	แผนภาพเพลตการทดสอบความคงที่ภายในเพลต ของ NP ELISA	51
15	1% agarose gel electrophoresis ของยีน NP	54
16	1% gel electrophoresis (A) การคัดเลือกโคลนีของ pNP จากแบคทีเรีย <i>E. Coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	55
17	แถบพลาสมิด pQE_NP_5	56
18	แผนภาพของพลาสมิด pQE_NP_5	56
19	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน NP ที่เชื่อมกับส่วนของ histidine 6 โมเลกุล	57
20	8% SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในเซลล์แบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ที่บรรจุพลาสมิด pQE_NP_5 ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 °C	59
21	8% SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในเซลล์แบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ที่บรรจุพลาสมิด pQE_NP ที่ช่วงระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 °C	60
22	การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่ผลิตได้จากเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	61

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	8% SDS-PAGE แสดงผลการแยกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ให้บริสุทธิ์ ในสถานะเสียสภาพธรรมชาติ	63
24	Western blot analysis ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาระหว่าง antibody ต่อ histidine tag และซีรัมสุกรที่ได้รับเชื้อ SIV (SIV covalent serum) และโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในสถานะเสียสภาพธรรมชาติบนแผ่น membrane	64
25	8% SDS-PAGE แสดงผลการแยกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ให้บริสุทธิ์ในสภาพธรรมชาติ	66
26	Western blot analysis ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของ antibody ต่อ Histidine tag และซีรัมสุกรที่ได้รับเชื้อ SIV (SIV convalescent serum) ต่อโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในสภาพธรรมชาติ	67
27	ลักษณะของ MDCK cells	68
28	ลักษณะของเซลล์ที่ติดสี fluorescein เมื่อทดสอบด้วยวิธี IFA	68
29	ผล ELISA แสดงสีของปฏิกิริยาแอนไวมในตัวอย่างลบ (คอลัมน์ที่ 1-6) และ ตัวอย่างบวก (คอลัมน์ที่ 7-12) ที่ถูกเจือจางด้วย 5% skim milk	80
30	กราฟ ROC แสดงจุดตัดของเส้น sensitivity และ 1-specificity เพื่อหาค่า cut-off ที่ เหมาะสมของ NP ELISA	83
31	ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างซีรัมแม่สุกรในจังหวัดต่างๆ ของแต่ละภาคของประเทศไทย	85
32	รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างผล ELISA (OD) ของตัวอย่างซีรัม ที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ในภาคกลางในแต่ละช่วงเดือน	89
33	รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างผล ELISA (OD) ของตัวอย่างซีรัม ที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในแต่ละช่วงเดือน	92
34	รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างผล ELISA (OD) ของตัวอย่างซีรัม ที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ในภาคเหนือในแต่ละช่วงเดือน	95
35	รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างผล ELISA (OD) ของตัวอย่างซีรัม ที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในแต่ละช่วงเดือน	98
36	รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างผล ELISA (OD) ของตัวอย่างซีรัม ที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ในภาคใต้ในแต่ละช่วงเดือน	101

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

m ⁷ GpppX ^m	=	7-methylguanosine
Ala, A	=	Alanine
α	=	alpha
Arg, R	=	Arginine
Asn, N	=	Asparagine
Asp, D	=	Aspartic acid
bp	=	base pairs
β	=	beta
BAT1/UAP56	=	bidirectional amino acid transporter 1
BSA	=	Bovine serum albumin
CO ₂	=	carbon dioxide
CRM1	=	Chromosome Region Maintenance 1
CV	=	coefficient of variation
cELISA	=	competitive ELISA
cDNA	=	complementary DNA
cRNA	=	complementary RNA
CYS, C	=	Cysteine
CPE	=	Cytophatic effect
°C	=	degree Celsius
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
DTT	=	DL-dithiothreitol
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
FITC	=	Fluorescein isothiocyanate
Glu, E	=	Glutamic acid
Gln, Q	=	Glutamine
Gly, G	=	Glycine
HI	=	Haemagglutination inhibition
HA	=	Haemagglutinin
His, H	=	Histidine
IFA	=	Indirect immunofluorescent assay
Ile, I	=	Isoleucine
IPTG	=	isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

kDa	=	kilo Dalton
Leu, L	=	Leucine
LB	=	Luria-Bertani broth
Lys, K	=	Lysine
MgCl ₂	=	magnesium chloride
MDCK	=	Martin-Darby canine kidney
M	=	Matrix
mRNA	=	Messenger RNA
Met, M	=	Methionine
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µM	=	micromolar
ml	=	milliliter
M	=	molar
NaH ₂ PO ₄	=	Monosodium phosphate
ng	=	nanogram
nm	=	nanometer
NCBI	=	Nation Center for Biotechnology Information
NC	=	negative control
NS	=	Non-structural protein
NEP	=	Nuclear export protein
NLS	=	Nuclear localization signal
NP	=	Nucleoprotein
NA	=	Nuraminidase
OD	=	Optical density
Phe, F	=	Phenylalanine
PMSF	=	phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride
pM	=	picomolar
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PRDC	=	Porcine respiratory disease complex
PC	=	positive control
Pro, P	=	Proline
PA	=	Protein Acid

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PB1	=	Protein Base 1
PB2	=	Protein Base 2
RT-PCR	=	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
RNase	=	ribonuclease
RNA	=	ribonucleic acid
RNP	=	Ribonucleoprotein
rpm	=	round per minute
Ser, S	=	Serine
SNT	=	Serum neutralization test
NaCl	=	sodium chloride
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SD	=	Standard deviation
SIV	=	Swine influenza virus
Thr, T	=	Threonine
TBS	=	Tris-buffered saline
Trp, W	=	Tryptophan
Tyr, Y	=	Tyrosine
Val, V	=	Valine
vRNA	=	viral RNA

การพัฒนา Nucleoprotein ELISA เพื่อติดตามรูปแบบของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร

Development of Nucleoprotein ELISA to Monitor Swine Influenza Virus Infection in Thailand

คำนำ

โรคไข้หวัดใหญ่ในสุกรเป็นโรกระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันที่สามารถพบในสุกรทุกช่วงอายุ ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A (Influenza A virus) ตระกูล *Orthomyxoviridae* เป็นไวรัสชนิด RNA สายเดี่ยว, มีเปลือกหุ้ม และมีสารพันธุกรรมเป็นท่อนๆ ทั้งสิ้น 8 ท่อน โดยสุกรติดเชื้อจะมีอาการทางคลินิกเช่นเดียวกับคนที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ กล่าวคือ มีไข้สูง, ซึม, เบื่ออาหาร และน้ำหนักลด โดยสุกรในฝูงมีอัตราการป่วยอาจสูงถึง 100% แต่สุกรจะฟื้นและหายป่วยอย่างรวดเร็วภายใน 5-7 วัน มักไม่พบการตาย อย่างไรก็ตาม โรคมีผลทำให้ลูกสุกรหลังหย่านมเจริญเติบโตช้า สำหรับแม่สุกรตั้งท้องอาจทำให้แท้งได้ นอกจากนี้ เชื้ออาจเหนี่ยวนำให้สุกรเป็นโรคแทรกซ้อนอื่นที่รุนแรงกว่าได้ง่าย ซึ่งส่งผลกระทบต่อการศึกษาวิจัยด้านเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

ปัจจุบันไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่มีรายงานพบการระบาดหมุนเวียนทั่วโลกมี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ H1N1, H3N2 และ H1N2 (Olsen *et al.*, 2002) โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรถูกสังเกตพบครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาปี ค.ศ. 1918 ซึ่งตรงกับการระบาดครั้งใหญ่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์ซึ่งมีความรุนแรงมากโดยทำให้ผู้คนเสียชีวิตมากกว่า 20 ล้านคนทั่วโลก จนกระทั่งปี ค.ศ. 1930 ที่สามารถเพาะแยกเชื้อได้ครั้งแรกและระบุว่าเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 (A/SW/A/15/30) ซึ่งมีลักษณะทางแอนติเจนคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์ในปี ค.ศ. 1918 (Shope, 1931) ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 เป็นที่รู้จักในนาม classical SIV พบเป็นสายพันธุ์หลักที่มีการระบาดหมุนเวียนในอเมริกาและแพร่ระบาดสูงในประชากรสุกรทั่วโลก (Chutinimitkul *et al.*, 2008) ต่อมาการระบาดได้แพร่กระจายตามประเทศต่างๆ ของยุโรปและในเอเชีย โดยพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้น ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์และการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมทั้งสายพันธุ์ที่มาจากมนุษย์, สัตว์ปีก และสุกร สำหรับข้อมูลอุบัติการณ์ของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยที่ผ่านมา มีรายงานการพบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรได้ทั้ง 3 สายพันธุ์เช่นเดียวกับที่พบในประชากรสุกรของประเทศอื่น (Damrongwatanapokin *et al.*, 2006) นอกจากนี้ ผลการสำรวจทางซีรัมวิทยาที่ผ่านมาตั้งแต่ปี 2003 ยืนยันอุบัติการณ์ของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ทั้งในแม่สุกรและสุกรขุนมีระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Damrongwatanapokin *et al.*, 2003; Damrongwatanapokin *et al.*, 2006)

ทั้งนี้สุกรจัดเป็นสัตว์สี่อกลางที่ดีที่สามารถรับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ทั้งจากคนและสัตว์ปีกได้ในคราวเดียวกัน เนื่องจากเซลล์ของสุกรมีตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีก (α -2, 3 sialic acid) และคน (α -2, 6 sialic acid) ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่า สุกรทำหน้าที่เปรียบเสมือนถึงผสม “mixing vessel” ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Ma *et al.*, 2009) เมื่อมีการเพิ่มจำนวนของไวรัส ซึ่งต้องมีการบรรจุจีโนมทั้ง 8 ท่อนลงไปในอนุภาคใหม่ หากมีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สองสายพันธุ์ในสุกรตัวเดียวกัน อาจมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนจีโนมของไวรัสทั้งสองสายพันธุ์เกิดเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่หรือไวรัสลูกผสมขึ้นที่อาจก่อให้เกิดการระบาดของโรคที่รุนแรง เช่นเมื่อที่ผ่านมา การระบาดของไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ 2009 ซึ่งมีสาเหตุมาจากไวรัสไข้หวัดสุกรสร้างความตื่นตระหนกไปทั่วโลกทั้งภาคสาธารณสุข, การท่องเที่ยว, การศึกษา และการปศุสัตว์ต่างได้รับผลกระทบอย่างมาก ด้วยเวลาสั้นช่วงไม่กี่เดือน (เมษายน-กันยายน 2009) ไข้หวัด 2009 คร่าชีวิตผู้คนไปกว่า 3,200 คนทั่วโลก (Schnitzler และ Schnitzler, 2009)

ข้อมูลสำรวจทางชีววิทยาในระยะยาวเพื่อติดตามรูปแบบการเกิดโรค จึงมีความสำคัญในแง่การตรวจจับการระบาด หรือการเฝ้าระวัง และการติดตามโอกาสการเกิดโรค เพื่อให้ทราบถึงปัญหาที่แท้จริงที่นำไปสู่การแก้ไขปัญหาแต่แรกได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถนำมาประกอบการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งในประชากรสุกร และรวมถึงการป้องกันการติดเชื้อในคนได้ด้วยเช่นกัน

ทั้งนี้การตรวจหาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสไข้หวัดสุกรส่วนใหญ่นิยมใช้วิธี Hemagglutination inhibition test (HI) ซึ่งเป็นการวัดแอนติบอดีต่อแอนติเจน HA โดยอาศัยการยับยั้งการจับกันระหว่างเม็ดเลือดแดงกับ Hemagglutinin (HA) ด้วยซีรัมที่นำมาทดสอบ ส่งผลให้ไม่เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination) โดยที่สายพันธุ์ของแอนติเจนที่ใช้ตรวจด้วยวิธี HI ต้องตรงกับสายพันธุ์ที่ติดเชื้อ และเทคนิคการเขย่าเพื่ออ่านผล ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญ และต้องมีประสบการณ์สูงโดยเฉพาะปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกอย่างอ่อน (weak reaction) ข้อเสียในการเตรียมแอนติเจนที่ต้องเพาะลงในไข่ไก่ฟัก ซึ่งต้องคำนึงเรื่องความปลอดภัยและหากจำเป็นต้องทดสอบกับตัวอย่างจำนวนมากจะต้องเตรียมเม็ดเลือดที่มาทดสอบมากตามไปด้วย ซึ่งอาจต้องใช้เวลานานโดยรวมนานเป็นสัปดาห์ ดังนั้น จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโดยอาศัยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เข้ามาประยุกต์ใช้มากขึ้น ซึ่งวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะ ลดขั้นตอนที่ยุ่งยากและเสี่ยงลง แต่สามารถทดสอบกับซีรัมจำนวนมากในคราวเดียว และมีการอ่านผลแบบอัตโนมัติและแม่นยำมากขึ้น (Lee *et al.*, 1993; Allwinn *et al.* 2002; Ellis and Zambon, 2002)

ดังนั้น การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการโคลนยีน NP ของไวรัสไข้หวัดสุกร ผลิตโปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* และทำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP เป็นแอนติเจนสำหรับการพัฒนาชุดทดสอบเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคและติดตามรูปแบบของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกรชนิด A ในภาคต่างๆ ของประเทศไทย

วัตถุประสงค์

1. ผลิต recombinant nucleoprotein (NP) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร
2. พัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูปอีไลซ่า (ELISA) สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไข้หวัดสุกรทางซีรัมวิทยา
3. ศึกษารูปแบบการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย



การตรวจเอกสาร

ไวรัสไข้หวัดใหญ่

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ เป็นไวรัสที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Orthomyxoviridae* ซึ่งเป็นคำที่มาจากภาษากรีก 2 คำ คือ *orthos* หมายถึง straight และ *myxo* หมายถึง mucus และคำว่า influenza มาจากภาษาละติน แปลว่า ระบาด (epidemic) ประกอบด้วย 5 genus ได้แก่ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A (*Influenzavirus A*), ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B (*Influenzavirus B*), ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด C (*Influenzavirus C*), *Thogotovirus* ซึ่งบางครั้งเรียกว่า ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด D (*Influenzavirus D*) หรือ tickborne virus และ *Isavirus* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุก่อโรค salmon anaemia (Alexander, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Bouvier and Palese, 2008)

ไวรัสที่มีความสำคัญในวงศ์นี้ คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A, B และ C โดยสามารถแยกกันได้ในโดยอาศัยคุณสมบัติหลายประการ ดังตารางที่ 1 (ภาวพันธ์ และ ประเสริฐ, 2549) ได้แก่

1. จำนวนสารพันธุกรรมที่อยู่ภายในอนุภาค คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และ B มีจำนวนสารพันธุกรรม 8 ท่อน ส่วนไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด C มีจำนวน 7 ท่อน (ไม่มียีน NA) (Bouvier and Palese, 2008)
2. ลักษณะความแตกต่างของแอนติเจนของโปรตีน nucleoprotein (NP) และ matrix (M)
3. ความแตกต่างของ Surface glycoproteins ซึ่งพบว่ายีน HA และ NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบ่อยมากกว่าของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B ส่วนไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด C นั้น โปรตีนที่มีหน้าที่เหมือน HA และ NA จะเป็น single glycoprotein ที่มีหน้าที่หลายอย่างร่วมกันเรียกว่า โปรตีน hemagglutinin-esterase fusion (HEF) (McGeoch *et al.*, 1976; ภาวพันธ์ และ ประเสริฐ, 2549)
4. ชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ไวรัสสามารถเข้าไปเจริญเติบโตได้ เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A (*Influenzavirus A*) เป็นไวรัสที่มีการติดเชื้อตามธรรมชาติอย่างกว้างขวางและหลากหลายในสัตว์ปีก, มนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B (*Influenzavirus B*) พบการติดเชื้อตามธรรมชาติในมนุษย์เท่านั้น ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด C (*Influenzavirus C*) พบว่า แยกจากมนุษย์เป็นหลัก แต่ก็เคยพบในสุกรของประเทศจีน (Brown, 2000; Guo *et al.*, 1983)
5. ความแตกต่างของขบวนการสร้างโปรตีนจำเพาะในไวรัสที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส ดังตารางที่ 1 (Sandrock and Kelly, 2007; Bouvier and Palese, 2008)

นอกจากนี้ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ยังถูกแบ่งออกเป็นชนิดย่อย (subtype) โดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของแอนติเจนบนโปรตีน HA และ NA ที่อยู่บนผิวเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัส ปัจจุบันมี HA 16 ชนิด เรียงตามลำดับ H1-H16 และมี NA อยู่ 9 ชนิด คือ N1-N9 การเรียกชื่อสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เริ่มจากชนิดไวรัส ชื่อของสิ่งมีชีวิตที่แยกได้ (กรณีที่แยกได้จากคนไม่ต้องระบุตำแหน่งของสิ่งมีชีวิต) สถานที่แยกเชื้อได้ครั้งแรก เลขสายพันธุ์ (กรณีที่มี) ปีที่แยกเชื้อได้ และ subtype ตามลำดับ ตัวอย่างเช่น A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1) คือ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร แยกเชื้อครั้งแรกได้ที่รัฐ Iowa สายพันธุ์ที่ 15 ปีที่แยกได้คือ ค.ศ. 1930 subtype H1N1 เป็นต้น

ตารางที่ 1 แสดงคุณลักษณะของ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A B และ C

คุณลักษณะ	ไวรัสไข้หวัดใหญ่		
	ชนิด A	ชนิด B	ชนิด C
โครงสร้างพันธุกรรม (genetic structure)	8 แท่ง	8 แท่ง	7 แท่ง
จำนวนโปรตีน (viral protein)	11 ชนิด (รวม PB1-F2)	11 ชนิด	9 ชนิด
โปรตีนจำเพาะ (unique viral protein)	M2	NB matrix protein	HEF
ลักษณะทางแอนติเจน (antigenic determination)	HA และ NA	HA และ NA	HA และ NA
การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic change)	Antigenic shift และ antigenic drift	antigenic drift	antigenic drift
การติดเชื้อไวรัสในสิ่งมีชีวิตอื่น (host range)	มนุษย์, สัตว์ปีก, สุกร, ม้า, สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	มนุษย์	มนุษย์ และสุกร

ที่มา: Sandrock and Kelly (2007); Bouvier and Palese (2008)

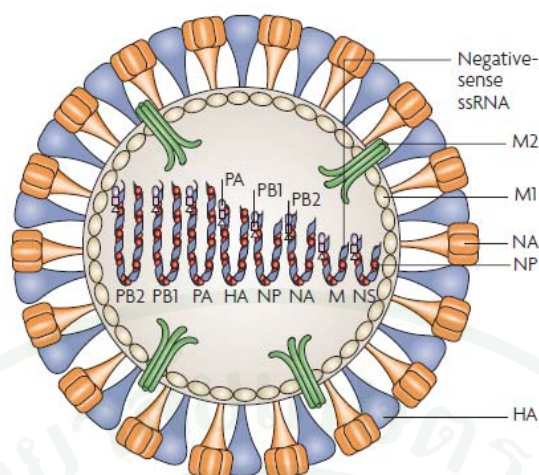
1. สัณฐานวิทยาของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A มีโครงสร้างประกอบด้วย RNA 1% โปรตีน 70% ไขมัน 20% และคาร์โบไฮเดรต 5-8% โดยส่วนไขมันที่ห่อหุ้มเชื้อไวรัสได้มาจากส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของเซลล์เจ้าบ้านที่ไวรัสใช้ในการเจริญเติบโต เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบไวรัสมีลักษณะรูปร่างมาตรฐานได้ 2 แบบ (form) กล่าวคือ มีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical form) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100 นาโนเมตร และสามารถยืดออกเป็นสายยาว (filamentous form) ที่มีขนาดยาวถึง 300 นาโนเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (strain) และจำนวนรอบในการเพาะเลี้ยง (passage history) (Webster *et al.*, 1992; Lamb and Krug, 2001; Bouvier and Palese, 2008)

ลักษณะผิวภายนอกชั้นเยื่อหุ้ม (envelop) ของอนุภาคไวรัสจะมีปุ่มของ glycoprotein ยื่นออกมา (spike) อย่างน้อย 500 อัน โดย spike เหล่านี้มี 2 ชนิด คือ HA spike มีลักษณะเป็นรูปแท่ง (rod-shaped) และ NA spike จะมีลักษณะคล้ายรูปดอกเห็ด (mushroom-shaped) กระจายเป็นรัศมีรอบตัวอนุภาคด้านนอก โดยอัตราส่วนของ HA : NA มีความแปรผันตามชนิดของไวรัสแต่โดยทั่วไปจะอยู่ที่ 4 : 1-5 : 1 (Lamb and Krug, 2001) และบริเวณผนังด้านในของเยื่อหุ้มจะมีโปรตีนที่เรียกว่า Matrix (M) หรือ M1 เรียงตัวอยู่ ทำหน้าที่ membraneprotein สร้างความแข็งแรง และคงรูปร่างให้กับผนังเยื่อหุ้มที่เป็นชั้นไขมัน ขณะที่ M2 ทำหน้าที่เป็น ion channel พบแทรกตัวอยู่ระหว่างผนังเยื่อ (Martin and Helenius, 1991a)

ภายในอนุภาคไวรัสประกอบด้วย สารพันธุกรรมชนิดกรดไรโบนิวคลีอิก (RNA) โดยมีลักษณะเป็น RNA สายเดี่ยว (single stranded RNA) ที่แยกออกจากกันเป็นแท่งๆ (segment) ประมาณ 8 แท่ง (ภาพที่ 1) ที่มีขนาดแตกต่างกัน และเป็นชนิดสายลบ (negative stranded) ที่จะถูกถอดรหัส (transcribed) เป็น messenger RNAs (mRNAs) ซึ่งเป็นสายบวก (positive stranded) และเป็นแม่แบบสำหรับการสังเคราะห์ antigenome ซึ่งเป็นสายบวกเช่นกัน สายพันธุกรรมแต่ละแท่งจะถูกพันล้อมรอบด้วย nucleoprotein (NP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญ ทุกๆ 24 นิวคลีโอไทด์ของ (RNP) จะมี NP 1 โมเลกุล นอกจากนี้ ภายในอนุภาคไวรัสยังบรรจุเอนไซม์ RNA dependent RNA polymerase ที่ประกอบด้วย โปรตีน 3 ชนิด คือ PB1, PB2 และ PA ที่จะรวมตัวกันเป็น trimeric RNA polymerase complex ซึ่งมีอยู่ประมาณ 30-60 โมเลกุลต่ออนุภาคไวรัสหนึ่งอนุภาค ขณะเดียวกันบางส่วนของ NP จะเกิดพันธะกับโปรตีน PB1 และ PB2 ด้วย ซึ่งโครงสร้างนี้รวมเรียกว่า ribonucleoprotein (RNP) (Nelson and Holmes, 2007; Portela and Digard, 2002)

โดยปลายสายของ RNP จะพับเป็น loop และบิดกลับเข้ามาพันกับสายอีกด้านหนึ่งของ RNP เดียวกัน เกิดการจัดเรียงตัวเป็นแท่งเกลียว (twin stand helical) การทำงานของ RNP ในขบวนการ replication และ transcription เกิดขึ้นได้อย่างอิสระในเซลล์เจ้าบ้าน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase complex ที่มีอยู่ในอนุภาคของไวรัสนั่นเอง (Baudin *et al.*, 1994, Coloma *et al.*, 2009) นอกจากนี้ภายในอนุภาคไวรัสยังมี NS2 ประมาณ 130-200 โมเลกุลอยู่ด้วย โดย NS2 จะจับกับ M1 เพื่อช่วยในการเคลื่อนย้าย RNP ออกจากนิวเคลียสในขบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส ซึ่ง NS2 มีอีกชื่อเรียกว่า Nuclear Export Protein (NEP) (ภาวพันธ์ และ ประเสริฐ, 2549; Yasuda *et al.* 1993; O'Neill *et al.*, 1998)



ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ประกอบขึ้นจากโปรตีน 10 ชนิด ได้แก่ ส่วนของ glycoprotein 2 ชนิดที่เยื่อหุ้มชั้นนอก คือ HA และ NA โดยมีโปรตีน M1 เรียงตัวอยู่บริเวณผนังชั้นในของเยื่อหุ้ม และ M2 แทรกอยู่ระหว่างผนังเยื่อหุ้ม ภายในอนุภาคบรรจุสารพันธุกรรมจำนวน 8 แห่ง ที่รวมเรียกว่า ribonucleoprotein (RNP) complex ที่ประกอบด้วย โปรตีน NP, PA, PB1, PB2 และสารพันธุกรรม นอกจากนี้ ยังมีโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง คือ NS1 และ NS2 ซึ่งไม่ปรากฏในภาพ

ที่มา: Nelson and Holmes (2007)

สารพันธุกรรมแต่ละแห่งของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนได้ 11 ชนิด ที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2 โดยแบ่งเป็น 3 ส่วนใหญ่ๆ (Portela and Digard, 2002) ได้แก่

1. โปรตีนที่จำเป็นต่อการจำลองตัวเอง (polymerase) 3 ชนิด คือ โปรตีน PB2, PB1 และ PA ซึ่งถูกสังเคราะห์จาก RNA แห่งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ
2. โปรตีนโครงสร้างหลักของอนุภาค ได้แก่ โปรตีน hemagglutinin หรือ HA, โปรตีน nucleoprotein หรือ NP, โปรตีน neuraminidase หรือ NA, โปรตีน matrix (M) 1 และ M2 ซึ่งถูกสังเคราะห์จาก RNA แห่งที่ 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ
3. โปรตีนที่ทำหน้าที่อื่นๆ คือ โปรตีน nonstructural (NS) 1 และ NS2 ซึ่งถูกสังเคราะห์จาก RNA แห่งที่ 8 และโปรตีน PB1-F2 ที่สังเคราะห์จากยีน PB1

ตารางที่ 2 คุณสมบัติและโปรตีนที่สังเคราะห์จากสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่
A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

ตอนที่	ขนาด (นิวคลีโอไทด์)	ชนิด ของโปรตีน	จำนวน กรดอะมิโน	หน้าที่
1	2,341	PB2	759	- เป็นส่วนประกอบของ RNA polymerase - จัดจำ M7-GpppXm Nm(cap) RNA ของ host
2	2,341	PB1	757	- เป็นส่วนประกอบของ RNA polymerase และ replication complex - เร่งปฏิกิริยาการต่อสายยาวของนิวคลีโอไทด์
		PB1-F2	90	- เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค โดยกลไกที่ยังไม่ทราบ
3	2,233	PA	716	- เป็นส่วนประกอบของ RNA polymerase และ replication complex
4	1,778	HA	550	- เป็นไกลโคโปรตีนหลักบนผิวอนุภาคไวรัส - เป็นแอนติเจนที่สำคัญ - เป็นบริเวณที่จับกับ receptor (sialic acid) - ช่วยในการ binding และ fusion
5	1,565	NP	498	- จับกับ RNA ประกอบขึ้นเป็น ribonucleoprotein - เกี่ยวข้องกับกลไกการนำ RNA เข้าสู่นิวเคลียสและการสังเคราะห์ RNA ของไวรัส
6	1,413	NA	454	- เป็นไกลโคโปรตีนบนผิวหน้าของอนุภาคไวรัส - ช่วยในขบวนการปลดปล่อยไวรัส (viral release)
7	1,027	M1	252	- เป็นโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ RNP - เกี่ยวข้องกับการนำ RNA ออกจากนิวเคลียส
		M2	97	- ช่วยในขบวนการ budding - ทำหน้าที่เป็น ion channel - เกี่ยวข้องกับขบวนการ uncoating และ assembly
8	890	NS1	230	- ยับยั้งการทำงานของ interferon - ควบคุมการแสดงออกของยีนเจ้าบ้าน
		NEP/NS2	121	- ช่วยในการเคลื่อนย้าย RNP ออกจากนิวเคลียส

หมายเหตุ M2 และ NEP/NS2 สังเคราะห์จากขบวนการ mRNAs splicing

ที่มา: Bouvier and Palese (2008); Varga and Palise (2011)

2. หน้าที่ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัส

2.1 โปรตีน RNA-dependent RNA polymerase complex (RNA Polymerase)

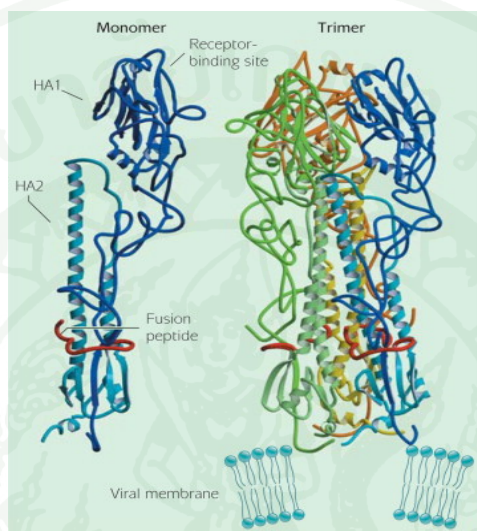
RNA polymerase ประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ Protein Base 2 (PB2), Protein Base 1 (PB1) และ Protein Acid (PA) ซึ่งถูกแปลรหัสมาจากยีนแ่งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยโปรตีนทั้ง 3 ชนิดมีปฏิสัมพันธ์ต่อกันอย่างใกล้ชิดและประกอบกับ NP และ RNA เกิดเป็นรูปร่างที่เรียกว่า panhandle (Shimizu *et al.*, 1994) โปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญในการจำลองสายพันธุกรรม (replication) และกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของไวรัส โดยโปรตีน PB2 มีหน้าที่จดจำ 5' cap บน pre-mRNA ของ host เซลล์ และตัด RNA ของ host ที่ตำแหน่ง 10-13 nucleotide หลังปลาย 5' มาเป็น primer สำหรับการสร้าง mRNA ของไวรัส เรียกขบวนการนี้ว่า cap-snatching ทั้งนี้ การศึกษาในหนู mice และ ferret แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 627 ในยีน PB2 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วย ส่วนโปรตีน PB1 มีหน้าที่นำนิวคลีโอไทด์เข้ามาต่อให้เป็นสายยาว (polymerization) ในขั้น elongation ของการสร้าง mRNA ของไวรัส สำหรับโปรตีน PA ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน แต่พบว่าโปรตีน PA มีบริเวณ endonuclease active site ซึ่งช่วยในขบวนการ cap-snatching (Infante *et al.*, 2011) นอกจากนี้ โปรตีน PA อาจเกี่ยวข้องในกระบวนการต่อสายยาว (elongation) ระหว่างการสังเคราะห์ RNA ของไวรัส (Fodor *et al.*, 1994)

ทั้งนี้ การทำงานของโปรตีนเหล่านี้เกิดขึ้นในเซลล์ และน่าจะมีปฏิสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับเซลล์ จึงมีความเป็นไปได้ว่า อาจต้องมีความเข้ากันได้ระหว่างเอนไซม์ของไวรัส และโปรตีนของโฮสต์ เพื่อที่ไวรัสจะสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเนื่องจากความสามารถในการเพิ่มจำนวนเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการที่ไวรัสจะติดเชื้อในเซลล์ได้ ความแตกต่างของเอนไซม์นี้จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดความจำเพาะต่อ host ได้ (Amonsin *et al.*, 2005)

2.2 โปรตีน Hemagglutinin (HA)

โปรตีน HA ถูกแปลรหัสจากสารพันธุกรรมแ่งที่ 4 เป็น integral membrane protein ที่ถูกสังเคราะห์บน membrane bound ribosome และถูกเคลื่อนย้ายเข้าไปใน endoplasmic reticulum (ER) ของเซลล์ที่ติดเชื้อ ในรูปโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวเรียกว่า HA0 (Palese and Shaw, 2007) ต่อมาโปรตีน HA0 จะถูกตัด (cleaved) ด้วยเอนไซม์ protease (trypsin-like หรือ furin-like protease) ของเซลล์ (Guo *et al.*, 2008) ให้แยกเป็นสองโมเลกุล คือ HA1 และ HA2 ซึ่งขบวนการ cleavage จำเป็นต่อการทำให้เซลล์ติดเชื้อไวรัส (Steinhauer, 1999) จากนั้น ทั้งสองส่วนนี้จะประกอบกันขึ้นเป็น trimer ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์และถูกส่งไปปรากฏอยู่บนชั้น envelop ของไวรัส ในโมเลกุลของ HA แต่ละ monomer ประกอบด้วยสาย polypeptide ของ HA1 ที่พันกันเป็นลักษณะทรงกลม (globular head) อยู่บนส่วนที่เป็นก้าน (stalk) ของ HA2 และบางส่วนของ HA1 โดยด้านบนสุดของ globular head มีลักษณะเป็นหลุมที่

ปรากฏอยู่ที่ผิวด้านนอกของ HA1 trimer ทำหน้าที่เป็น receptor-binding site สำหรับจับกับตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์ ส่วนปลายอะมิโนของ HA2 เป็นบริเวณของ fusion peptide ที่มีลักษณะ hydrophobic สามารถแทรกสอดเข้าไปใน lipid membrane ได้ (ภาพที่ 2) โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 3 มิติ (conformation) ในแบบที่เรียกว่า spring-loaded model จากการลดลงของ pH ภายใน endosome (Carr *et al.*, 1997; Taubenberger, 1998, Hernandez *et al.*, 1996; Swalley *et al.*, 2004)



ภาพที่ 2 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน HA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยด้านซ้าย คือ HA monomer ซึ่งประกอบด้วย ส่วน HA1 (สีน้ำเงินเข้ม) ที่มีลักษณะเป็นทรงกลม (globular domain) ซึ่งมีบริเวณของ receptor binding site อยู่ปลายสุด ส่วน HA2 (สีฟ้า) มีบริเวณของ fusion peptide (สีแดง) และด้านขวา คือ โครงสร้าง trimeric ของ HA

ที่มา: Skehel and Weis (2000)

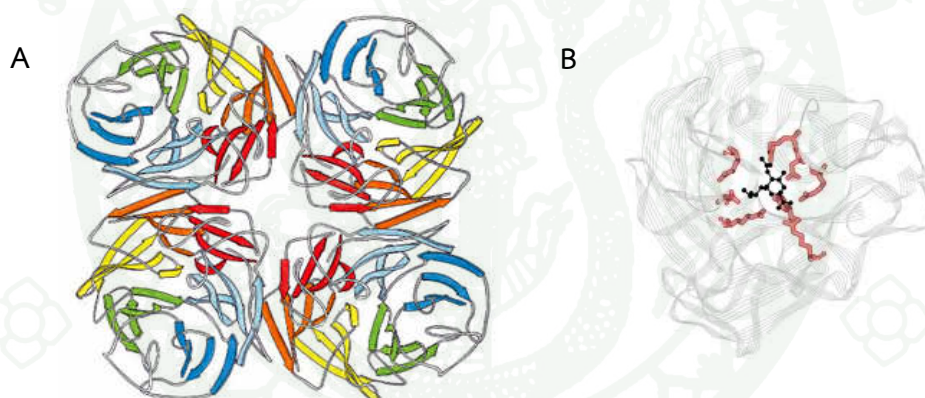
HA เป็นแอนติเจนบนผิวที่สำคัญของไวรัส สามารถจับกับตัวรับที่มี sialic acid เป็นส่วนประกอบบนผิวเซลล์ และทำให้เกิดการเกาะติด (attachment) ของ receptor binding site ของไวรัสกับเซลล์ และทำให้ไวรัสเข้าไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์ในลักษณะของ endosome ภายใน endosome ที่มี pH ต่ำลง จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ HA ซึ่ง HA2 เป็นสื่อกลางในการทำให้เกิดการหลอมรวมกันระหว่าง membrane ของอนุภาคไวรัสกับของ host โดยผลที่ตามมาคือ RNP ของเชื้อไวรัสถูกปล่อยเข้าไปในไซโตพลาสซึมของ host นอกจากนี้ HA เป็นแอนติเจนตัวหลักของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในการกระตุ้น neutralizing antibody และเป็นแอนติเจนที่มีความผันแปรมากที่สุด (Hernandez *et al.*, 1996; Swalley *et al.*, 2004)

2.3 โพรตีน Nucleoprotein (NP)

ถูกแปลรหัสมาจากสายพันธุกรรมสายที่ 5 รายละเอียดจะอธิบายในส่วนถัดไป

2.4 โพรตีน Neuraminidase (NA)

NA เป็นไกลโคโพรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีรูปร่างคล้ายดอกเห็ด (mushroom-shaped) อยู่บนอนุภาคของไวรัสซึ่งถูกสังเคราะห์มาจากสายพันธุกรรมสายที่ 6 NA 4 โมเลกุลประกอบขึ้นเป็น tetrameric protein ประกอบด้วย ส่วนหัว (Head) และส่วนก้าน (Stalk) โดยบริเวณที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ (active site) จะอยู่กึ่งกลางส่วนหัวด้านที่หันออกไปจากอนุภาคไวรัส การจัดเรียงตัวของ NA อยู่ในลักษณะ tetramer มีรูปร่างทั่วไปคล้ายกล่องสี่เหลี่ยม (ภาพที่ 3) โดยแต่ละ monomer มีการเรียงตัวแบบสมมาตร คือ โมเลกุลที่อยู่ทแยงมุมกันจะวางตัวสมมาตรกัน ส่วนโมเลกุลที่อยู่ข้างกันไม่สมมาตรกัน (German and Laver, 2005)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของโปรตีน Neuraminidase (N9) A) ในลักษณะ tetramer และ B) บริเวณ active site บน NA monomer

ที่มา: German and Laver (2005)

NA มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการปลดปล่อยไวรัสอนุภาคใหม่ โดยมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ในการตัด sialic acid ออกจาก HA ในขั้นตอนการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์ และป้องกันการเกาะติดระหว่าง HA ของอนุภาคไวรัสใหม่กับ sialic acid ของเซลล์เดิม นอกจากนี้ ยังอาจเป็นได้ว่า NA ช่วยให้ไวรัสผ่านเยื่อเมือก mucin ในช่องทางเดินหายใจ ทำให้ไวรัสจับกับเซลล์เป้าหมายได้ดี (Ferraris and Lina, 2008; Wang *et al.*, 2012)

2.5 โปรตีน Matrix 1 (M1) และ Matrix 2 (M2)

โปรตีนที่ถูกแปลรหัสจากสายพันธุกรรมสายที่ 7 ของไวรัส ซึ่งเป็นแบบ bicistronic ที่สามารถแปลรหัสได้โปรตีนสองชนิด คือ M1 จะถูกแปลรหัสออกมาจาก mRNA เต็มสาย แต่ M2 ถูกแปลรหัสจาก spliced mRNA

โปรตีน M1 จะอยู่ระหว่างด้านในของผิวเยื่อหุ้มไวรัส มีหน้าที่ในการทำให้โครงสร้างของอนุภาคไวรัสแข็งแรงและคงรูปร่าง (Webster and Hinshaw, 1977) M1 ยังมีส่วนเกี่ยวข้องที่สำคัญในขั้นตอนการประกอบขึ้นเป็นอนุภาค (assembly) และ budding ของไวรัส (Steinhauer and Skehel, 2002) โดย M1 สามารถจับกับ RNP เพื่อช่วยในการเคลื่อนย้าย RNP ผ่านออกจากนิวเคลียส และถ้าโปรตีน M1 ไม่ได้ถูกแยกออกจาก RNPs ภายในไซโตพลาสซึม RNP ก็จะไม่สามารถถูกส่งเข้านิวเคลียสได้ แต่หลังจากการติดเชื้อการส่งโปรตีน M1 เข้าไปในนิวเคลียสเป็นสิ่งที่จำเป็นเนื่องจาก M1 ช่วยในการขนส่ง assemble RNPs โมเลกุลใหม่ออกนอกนิวเคลียส (Martin and Helenius, 1991; Cao *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 1991b) และที่สำคัญ M1 เป็นโปรตีนภายในอนุภาคที่มีปริมาณมากที่สุด และมีบริเวณอนุรักษ์ (conserve) ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนไม่มากในไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A

โปรตีน M2 เป็นโปรตีนที่ถูกแปลรหัสจาก mRNA ที่มีการ splicing ทำให้โปรตีน M2 มีขนาดเล็กกว่าโปรตีน M1 และสามารถพบ M2 กระจายอยู่บนผิวเยื่อหุ้มไวรัส โดยทำหน้าที่เป็นช่องผ่านของประจุต่างๆ (ion channel) เพื่อช่วยในขบวนการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสในขั้นตอนการแทรกไวรัสเข้าสู่เซลล์ (penetration) และการถอดเปลือกหุ้ม (uncoating) การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในส่วน TM domain ของโปรตีน M2 ทำให้ไวรัสต่อต้านยา amantadine ซึ่งเป็นยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ (Holsinger *et al.*, 1994; Zebedee and Lamp, 1988)

2.6 โปรตีน Nonstructural (NS)

NS ถูกแปลรหัสจากสารพันธุกรรมสายที่ 8 ได้โปรตีนสองชนิด คือ NS1 และ NS2 หรือ nuclear export protein (NEP) โดย NS1 จะถูกถอดรหัสออกมาจาก mRNA เต็มสาย แต่ NS2 ถูกถอดรหัสจาก spliced mRNA เช่นเดียวกับกับโปรตีน matrix (M1 และ M2)

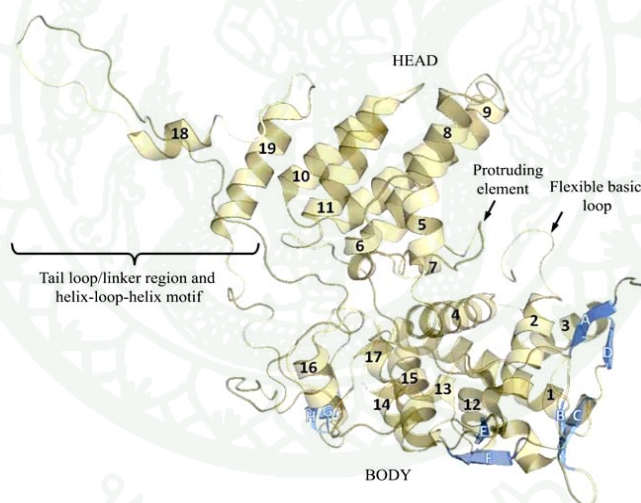
NS1 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทส่งเสริมความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัส โดยมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานในหลายๆ กระบวนการของเซลล์ เช่น ยับยั้งการตัด (splicing) mRNA ของเซลล์เจ้าบ้าน, ยับยั้งการเติมอะดีนีนที่ปลาย 3' (polyadenylation), การส่ง mRNA ของเจ้าบ้านเองออกนอกนิวเคลียส, กระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis (Lam *et al.*, 2008; Zhirnov *et al.*, 2002) และยับยั้งการสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ของ type I (α/β) interferon (IFN) (Benjamin *et al.*, 2008) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดใน

การต่อต้านการติดเชื้อไวรัส มีการศึกษาการแทนที่กรดอะมิโน Asp ด้วย Glu ในตำแหน่งที่ 92 ของ NS1 จาก A/HK/156/97 (H5N1) ซึ่งเป็นไวรัสของมนุษย์ พบว่า เมื่อแทนที่แล้วไวรัสมีการก่อโรคอย่างรุนแรงในหนู mice ได้ (Lipatov *et al.*, 2005)

3. โปรตีน Nucleoprotein

NP ซึ่งถูกแปลรหัสมาจากสายพันธุกรรมสายที่ 5 ที่มีความยาวเต็มสายประมาณ 1,565 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแปลเป็นโปรตีนขนาด 498 กรดอะมิโนและมีน้ำหนักโมเลกุล 56 กิโลดาลตัน (Munch *et al.*, 2001)

จากการวิเคราะห์โครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน NP สามารถแบ่งโครงสร้างออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (head domain), ส่วนตัว (body domain) และส่วนหางที่เป็น loop (tail loop) หรือเรียกอีกอย่างว่า linker region (ภาพที่ 4) NP แต่ละโมเลกุลประกอบด้วย โครงสร้างที่เป็น helix จำนวน 19 แห่ง (242 residues, 48%), β -stand 8 สาย (24 residues, 4.8 %) และบริเวณที่เกิด loop 232 residue (46.6%) (Portela and Digard, 2002)

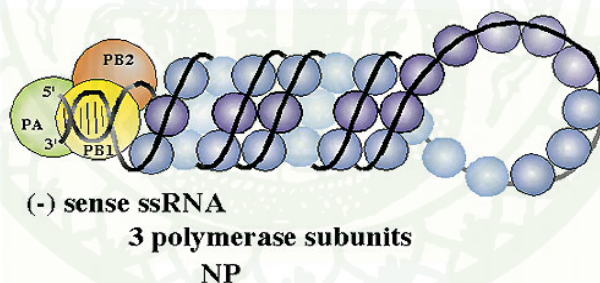


ภาพที่ 4 การจัดเรียงโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน NP ที่เกิดจากสาย polypeptide พับม้วนวนกลับไปมาประกอบขึ้นเป็นส่วน head body และ tail loop ทั้งโครงสร้างมีการเรียงตัวเป็น helix 19 แห่ง และเป็นสาย β -stands 8 สาย ซึ่งพบได้เฉพาะบริเวณ body domain เท่านั้น ขณะที่ tail loop เป็นส่วนที่จะยื่นเข้าไป link กับ NP โมเลกุลข้างเคียงได้ และระหว่าง groove ของ head และ body domain จะมีส่วนของ protruding element และ flexible basic loop ซึ่งเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโน arginine อยู่มาก

ที่มา: NG *et al.* (2009)

Ng *et al.* (2009) ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีน NP ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 2,500 ตัวอย่าง พบว่า บริเวณอนุรักษ์ที่สมบูรณ์ที่สุดอยู่ที่โครงสร้าง helix ที่ 6 และ 7 ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการคงรูปร่างของโครงสร้าง โดยส่วน head domain เป็นบริเวณที่เกิด helix สูงกว่าส่วนอื่นและไม่พบโครงสร้างแบบ β -stand ในส่วนของ head domain ของ NP ถือว่าเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูง (highly conserve) ในกลุ่มของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สำหรับส่วนของ body domain ประกอบด้วย บริเวณ helix และ strand ทำให้โครงสร้างมีความยืดหยุ่นและมีปฏิสัมพันธ์ (interact) กับโปรตีนอื่นของเซลล์และของไวรัสเอง เช่น PB2 จะมีปฏิสัมพันธ์กับ NP บริเวณ residue 1-161 และ 255-465 (Ye *et al.*, 2006; Portela and Digard, 2002)

NP เป็นโปรตีนส่วนประกอบหลักที่สำคัญของไวรัสที่จะพันล้อมรอบอยู่กับสาย viral RNA และเรียงตัวเป็นแบบ homo-oligomer เพื่อช่วยคงรูปของ RNP ไว้ (ภาพที่ 5) โดย NP จะเกิดพันธะกับบริเวณ phosphate backbone เท่านั้นและไม่สร้างพันธะกับบริเวณ nitrogenous base ของ RNA โปรตีน NP มีบริเวณที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโน arginine lysine และ serine อยู่สูงซึ่งเป็น basic residues และมีประจุสุทธิเป็นบวกซึ่งคาดว่าโปรตีนเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับ acidic phosphate residue ของ RNA ทำให้สามารถจับกับ RNA ได้โดยอาศัยความชอบ (affinity) มากกว่าความจำเพาะ (specific) (Digard *et al.*, 1999) ในปริมาณสัดส่วนของ NP1 โมเลกุลต่อ 24 นิวคลีโอไทด์ของ RNA โดยแต่ละ monomer ของ NP จะสร้างพันธะต่อกัน (NP-NP interaction) คล้ายลูกปัดที่ถูกร้อยเป็นสาย (beads on the string) (Elton *et al.*, 1999a; Ye *et al.*, 2006)



ภาพที่ 5 โครงสร้างการเรียงตัว ribonucleoprotein (RNP) โดยโปรตีน NP (ทรงกลมสีฟ้า) แต่ละโมเลกุลจับล้อมรอบสาย viral RNA (เส้นสีดำ) และบิดพันตัวเป็นแบบ hairpin ช่วงสั้นๆ ของบริเวณทางด้านปลาย 5' และ 3' จับเข้าคู่กันเกิดเป็น binding site สำหรับ polymerase complex มาเกาะ

ที่มา: Porrela and Digard (2002)

นอกจากนี้ โปรตีน NP สามารถสร้างพันธะกับโปรตีนอื่นๆ ได้หลายชนิด ทั้งกับโปรตีนของไวรัสเอง ได้แก่ การสร้างพันธะต่อ PB2, PB1, PA และ RNA ซึ่งโครงสร้างนี้รวมเรียกว่า ribonucleoprotein (RNP) complex และยังสร้างพันธะอิสระกับ PB2 ด้วย NP สร้างพันธะกับ M1 ขณะที่การสร้างพันธะกับโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ importin A class ซึ่งเกี่ยวข้องกับการนำสารเข้านิวเคลียส filamentous (F) actin พบใน cytoplasm CRM1 เกี่ยวข้องกับการนำสารออกจากนิวเคลียส และ BAT₁/UAP₅₆ เกี่ยวข้องกับ transcription (O'Neill *et al.*, 1995; Digard *et al.*, 1999; Elton *et al.*, 2001; Momose *et al.*, 2001)

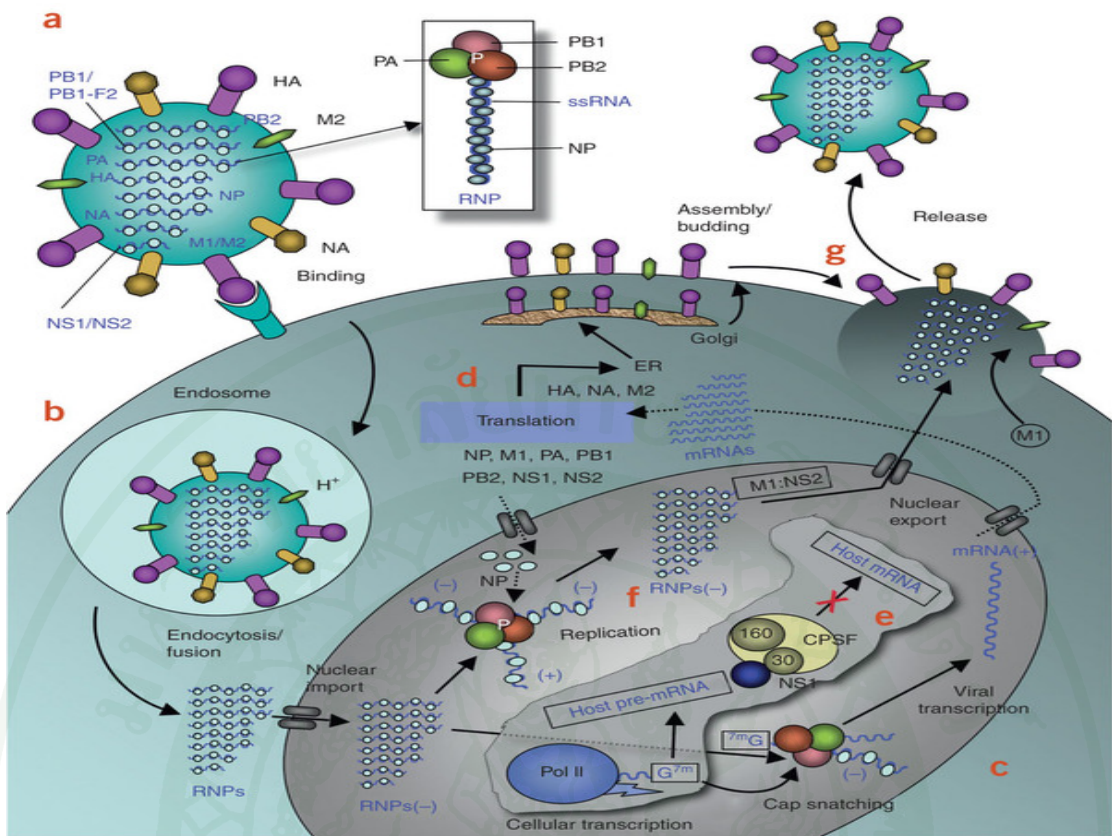
บทบาทของ NP มีส่วนเกี่ยวข้องที่สำคัญตลอดทั้งวงจรชีวิตของไวรัส เมื่อ NP ถูกสังเคราะห์เป็นโปรตีนในไซโตพลาซึมแล้ว บนโปรตีน NP มีส่วนของ nuclear localization signal (NLS) และ RNA binding domain จากนั้น NP จะอาศัย NLS เพื่อผ่านเข้าไปยังนิวเคลียสและหลังจากการแปลรหัสโปรตีน NP จะรวมตัวกับสาย RNA และ polymerase complex กลายเป็น RNP-complex ถูกส่งออกจากนิวเคลียสไปสู่ cytoplasm ด้วยการทำงานของ matrix protein (M1) และ NS2 โดยพบว่า NP อิสระจะจับกับ สาย vRNA และสายแม่แบบ (cRNA) ของไวรัส แต่ mRNA ของไวรัสจะไม่จับกับ NP อิสระ (Palese and Shaw, 2007) ทำให้เกิดกลไกการเปลี่ยนสลับ (switch) จากกระบวนการสังเคราะห์ RNA (transcription) ไปเป็นการจำลองตัวเอง (replication) ดังนั้น ปริมาณของ NP อิสระในเซลล์ที่ติดเชื้อจะเป็นตัวควบคุมว่าควรจะมีการสังเคราะห์ mRNA หรือจำลอง vRNA ซึ่งหากไม่มีโปรตีน NP กระบวนการสังเคราะห์ viral RNA จะไม่เกิดขึ้นเลย แต่ทั้งนี้ NP ไม่สามารถปกป้อง RNA จากเอนไซม์ RNase ได้ (Biswas *et al.*, 1998; Porrela and Digard, 2002) อีกทั้งในกลุ่มของโปรตีนจากเชื้อ influenza ทั้งหมด โปรตีน NP เป็นโปรตีนหลักที่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reaction) ของ cytotoxic T lymphocytes (CTL) (Yewdell *et al.*, 1985)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ (Phylogenic) ของยีน NP ที่ถูกแยกจากโฮสต์ที่หลากหลายในภูมิภาคที่ต่างๆ กัน พบว่า NP มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนน้อยกว่า 11% (Shu *et al.*, 1993) แสดงให้เห็นว่า โดยธรรมชาติไวรัสจะอนุรักษ์โปรตีน NP ซึ่งสอดคล้องกับหลายๆ งานวิจัยที่กล่าวอ้างว่า โปรตีน NP เป็นโปรตีนที่อนุรักษ์ในกลุ่มของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ด้วยคุณสมบัตินี้ โปรตีน NP จึงมีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยเพื่อบ่งบอก type ของเชื้อต้นเหตุได้ (Voeten *et al.*, 1998; Wagaman *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007; Upadhyay *et al.*, 2009)

4. การเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่

ไวรัสเริ่มเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับ sialic acid residue ที่ปรากฏอยู่บน glycoprotein หรือ glycolipid บนผิวของเซลล์ผ่าน receptor-binding site ในส่วนปลายโมเลกุล HA โดยที่ sialic acid อาจเชื่อมกับ galactose ด้วยพันธะ α -2, 3 หรือ α -2, 6 การที่ไวรัสจะจับกับโมเลกุลใดขึ้นอยู่กับความจำเพาะใน receptor-binding pocket ของ HA (Weis *et al.*, 1988) ซึ่งไวรัสของสัตว์ปีกจะจับกับโมเลกุลแบบ α -2, 3 ขณะที่ไวรัสของมนุษย์และสุกรจะจับกับ receptor แบบ α -2, 6 โดยที่

α -2, 3 พบในลำไส้ของสัตว์ปีก ส่วนพันธะ α -2, 6 พบในหลอดเลือดของมนุษย์ ขณะที่ในหลอดเลือดสุกร พบได้ทั้งพันธะ α -2,3 และพันธะ α -2, 6 (Bouvier and Palese 2008; Ito *et al.*, 1998) ความสามารถของไวรัสในการจับ receptor ที่มีพันธะแบบต่างๆ เป็นการกำหนดความสามารถในการเจริญของไวรัสในสิ่งมีชีวิต (host range) เมื่อไวรัสเกาะเซลล์แล้ว จะเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการ receptor-mediated endocytosis (ภาพที่ 6) ซึ่งนำอนุภาคไวรัสเข้าสู่เซลล์ในลักษณะ endosomal vesicle โดยอาศัย clathrin pathway จากนั้นภายใน endosome มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นการกระตุ้นการเชื่อมรวมกัน (fusion) ระหว่างเยื่อหุ้มส่วนของไวรัสกับเยื่อหุ้มของเซลล์ หลังจากนั้นจะเกิดขบวนการถอดเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัสใน endosome เพื่อปล่อย RNPs ออกสู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ โดยเมื่อ RNPs เข้าสู่นิวเคลียสแล้วจะเกิดการสังเคราะห์ mRNA และ template RNA ที่ใช้เป็นแม่แบบของการสร้าง genomic RNA เนื่องจากสายพันธะของไวรัสเป็น RNA สายลบ ดังนั้น ไวรัสจึงต้องนำเอาเอนไซม์ RNA polymerase เข้ามาพร้อมกับอนุภาคไวรัสด้วยโดยเอนไซม์ polymerase จะตัดเอาส่วน 5' m⁷GpppX^m ของ mRNA ของเซลล์เจ้าบ้านที่มี cap ออกมาเป็นสายสั้นๆ (ความยาว 10–13 นิวคลีโอไทด์) ใช้เป็น primer สำหรับการเริ่มต้นสังเคราะห์ mRNA ของอนุภาคไวรัสเรียกขบวนการนี้ว่า cap-snatching (NG *et al.*, 2008) ดังนั้น mRNA ที่สร้างขึ้นจึงมี cap มาตั้งแต่เริ่มแรกไม่ต้องเติม cap อีกไปภายหลัง การสังเคราะห์ mRNA เริ่มที่ปลาย 3' ขณะที่ปลาย 5' ของ vRNA ถูกจับไว้บน PB1 ทำให้การสังเคราะห์ mRNA เคลื่อนไปทางปลาย 5' ในลักษณะการรูดผ่าน (corkscrew) เพื่อต่อสาย mRNA ให้ยาวขึ้น (elongation) จนกระทั่งถึงตำแหน่งบน vRNA ที่มี uridine อยู่ต่อเนื่องกัน (poly-U) เป็นผลทำให้การ polymerization เกิดย้อนกลับไปที่ตำแหน่ง poly-U ก่อให้เกิดการใส่ poly-A บนสาย mRNA ซึ่งเป็นสัญญาณการหยุดสังเคราะห์ mRNA ดังนั้น mRNA ของไวรัสจะประกอบด้วย 5' cap และ 3' poly-A ขบวนการสร้าง mRNA จะเกิดขึ้นในนิวเคลียสภาพที่ 7 (Hay *et al.*, 1997; Infante *et al.*, 2011; Portela and Digard, 2002)

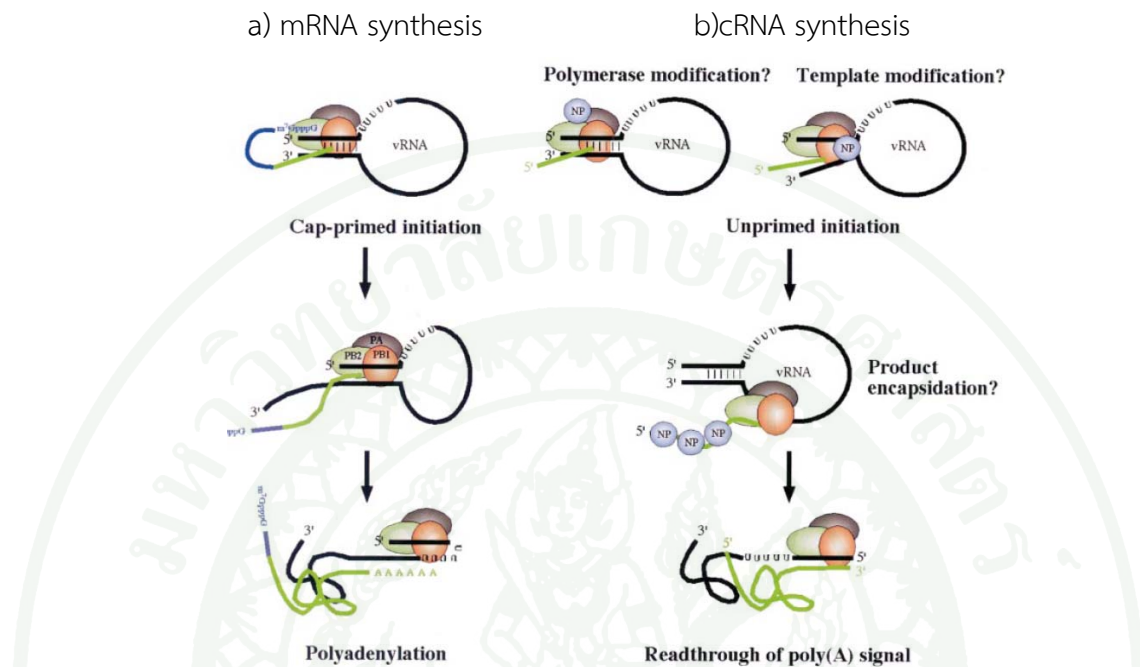


ภาพที่ 6 กระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยเริ่มจากไวรัสเกาะติดเซลล์จนถึงการปลดปล่อยอนุภาคใหม่

ที่มา: Das *et al.* (2010)

โปรตีนต่างๆ จะถูกแปลรหัสมาจากสายพันธุกรรมทั้ง 8 แห่ง ได้โปรตีนที่ทำหน้าที่ต่างๆ กัน รวมทั้งนำมาประกอบเป็นโครงสร้างของอนุภาคไวรัสใหม่ด้วย และมีการจำลอง vRNA เพื่อบรรจุลงในอนุภาคใหม่ การจำลอง vRNA มี 2 ขั้นตอนหลักๆ คือ การสังเคราะห์ template RNA จาก vRNA และการสังเคราะห์ vRNA จาก template ซึ่งทั้ง 2 สายนี้ปราศจาก 5' cap และ 3' poly-A แต่กลไกการสังเคราะห์ที่ปราศจาก primer ยังไม่ทราบแน่นอน สันนิษฐานว่า NP อาจมีส่วนเกี่ยวข้อง เช่น NP อาจเกิดพันธะกับ polymerase complex ทำให้เปลี่ยนแปลงรูปแบบ polymerase complex หรือ NP ไปขัดขวาง vRNA และกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ cRNA โดยปราศจาก primer ขึ้นได้ ในการสังเคราะห์ vRNA ต้องการ NP อิสระ เพื่อล้อมรอบสาย vRNA ที่เพิ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่และประกอบขึ้นเป็น RNP ที่ยาวขึ้นเรื่อยๆ และจะหยุดก็ต่อเมื่อไม่มี NP อิสระเหลืออยู่ จากนั้น RNP ที่สังเคราะห์โดยสมบูรณ์ในนิวเคลียสก็จะถูกส่งผ่านออกมาสู่ไซโตพลาสซึม โดยการทำงานของโปรตีน NS2 และ M1 ในขณะที่โปรตีนที่อยู่ตรงส่วนเยื่อหุ้มจะถูกสร้างขึ้นใน endoplasmic reticulum และผ่านออกมาทาง golgi apparatus สู่ผิวเซลล์ จากนั้น RNP ที่เคลื่อนออกมาจากนิวเคลียสจะมารวมกันได้ผิวเซลล์เกิด assembly และ budding ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมี HA และ NA spike แทรกอยู่

เกิดเป็นอนุภาคไวรัสใหม่ (progeny viral particle) ภาพที่ 6 (Bouvier and Palese 2008; Hutchinson *et al.*, 2010; Kawakami *et al.*, 2011; Robb *et al.*, 2009)



ภาพที่ 7 รูปแบบการสังเคราะห์ vRNA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่

- การสังเคราะห์ mRNA โดยใช้ capped-mRNA (เส้นสีฟ้า) ของเซลล์เจ้าบ้านเป็น primer ในการเริ่มต้นสังเคราะห์ mRNA จากปลาย 3' ไปยังปลาย 5' ของ vRNA (เส้นสีดำ) ในลักษณะ corkscrew
- การสังเคราะห์ cRNA ที่ปราศจาก primer โดยมีโปรตีน NP มาเกี่ยวข้องและขบวนการสังเคราะห์ cRNA ยุติลงเมื่อเคลื่อนผ่าน poly-U

ที่มา: Portela and Digard (2002)

5. การเกิด antigenic shift และ antigenic drift ในเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลง และวิวัฒนาการอยู่บ่อยครั้งจนอาจกล่าวได้ว่า การเปลี่ยนแปลงตัวเองอยู่ตลอดเวลาเป็นหัวใจของการดำรงอยู่ และการแพร่ระบาดของไข้หวัดใหญ่ (ภาวพันธ์ และ ประเสริฐ, 2549) และโดยทั่วไปความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สำคัญ ได้แก่ การกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งเกิดขึ้นได้ง่ายเนื่องจากขบวนการ replication อาศัยเอนไซม์ RNA polymerase ซึ่งไม่มี proof reading activity ทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่าย ทำให้ไวรัสที่สร้างขึ้นใหม่มีโอกาส mutation ได้ทีละน้อย แต่ไม่มากพอที่จะทำให้เกิด subtype ใหม่ การเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์เพียงเล็กน้อยระหว่างที่เกิดการเพิ่มจำนวนของไวรัสกระบวนกรนี้ในบางครั้งเรียกว่า antigenic drift โดยทั่วไปพบว่ายีนที่เป็น antigen epitope เช่น HA และ NA มี

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและอัตราการการกลายพันธุ์สูง ซึ่งเป็นผลมาจากแรงกดดันที่ทำให้เกิดการคัดเลือก (selection pressure) เพื่อให้ได้ไวรัสที่สามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ (Chan and Deng, 2009)

อีกประการหนึ่ง คือ การเปลี่ยนแปลงอย่างทันที ซึ่งเกิดขึ้นจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (genetic reassortment) ระหว่างไวรัสต่างสายพันธุ์ เรียกว่า การผสมข้ามสายพันธุ์ (reassortment) อาจเกิดได้เมื่อเชื้อไวรัสใช้หวัดใหญ่ที่แตกต่างกัน 2 ชนิดติดเข้าสู่เซลล์ฯ หนึ่งพร้อมกัน เมื่อมีการประกอบขึ้นเป็นไวรัสอนุภาคใหม่อาจมีการแลกเปลี่ยนชิ้น genome ของไวรัสต่างสายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิด และบรรจุเข้าไปในไวรัสอนุภาคใหม่ได้ การเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้เรียกว่า antigenic shift การเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ที่แตกต่างกันจะทำให้เกิดสายพันธุ์ชนิดใหม่ขึ้นอยู่เป็นระยะๆ ทั้งนี้ การเปลี่ยนแปลงแอนติเจนทั้งแบบ antigenic drift และ antigenic shift ส่งผลให้เกิดเชื้อไวรัสใช้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ที่เป็นสาเหตุการระบาดแบบ epidemic และ pandemic ได้ เนื่องจากร่างกายไม่มีภูมิคุ้มกันของต่อไวรัสชนิดใหม่ (Arikawa *et al.*, 1982; Yu *et al.*, 2008)

6. การค้นพบและการระบาดของโรคไข้หวัดสุกร

เมื่อปี ค.ศ. 1918-1919 การระบาดของไวรัส influenza A (Spanish flu) ในอเมริกาเป็นการระบาดใหญ่ของโรคติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่รุนแรงที่สุด ซึ่งคร่าชีวิตผู้คนไปกว่า 20 ล้านคน (Brown, 2000) และในช่วงเวลาเดียวกันนั้นมียางานการตรวจพบไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรร่วมไปด้วย แต่ก็ไม่ได้ได้รับความสนใจจากสัตวแพทย์มากนัก ต่อมากระทั่งในปี ค.ศ. 1930 สามารถแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ที่พบในสุกรได้จากคนป่วยได้เป็นครั้งแรก เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรตัวแรกที่เพาะแยกได้คือ A/SW/IA/15/30 และชี้ชัดว่าเป็นไวรัส swine influenza A H1N1 (H1N1) ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา และพันธุกรรมใกล้ชิดกับ Spanish flu (Shape, 1931; Chutinimitkul *et al.*, 2008) จากนั้นไวรัส SIV H1N1 ยังคงหมุนเวียนและระบาดอยู่ในประชากรสุกรในแถบอเมริกาตอนเหนืออย่างต่อเนื่อง ซึ่งจัดเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ดั้งเดิม (classical H1N1; cH1N1) จนกระทั่งในช่วง ปี 1998 ไวรัสสายพันธุ์ใหม่อุบัติขึ้นใหม่อีกครั้งในอเมริกา ซึ่งเกิดจากการแลกเปลี่ยนผสมยีน (reassortment) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน, สุกร และสัตว์ปีก โดยได้ยีน HA, NA และ PB1 มาจากไวรัสในคนส่วน PB2 และ PA มาจากไวรัสในสัตว์ปีกซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางอเมริกาตอนเหนือ ในขณะที่ NP, M และ NS ยังคงเป็นของเชื้อไวรัส classical SIV H1N1 ผสมรวมเป็นไวรัส triple reassortment H3N2 ซึ่งมีความคล้ายคลึงของแอนติเจนกับเชื้อไวรัสในคน (Hong Kong flu) ทั้ง classical H1N1 และ triple reassortment H3N2 ก็ยังปรากฏอยู่ในประชากรสุกรในแถบอเมริกาเรื่อยมา (Schnitzler and Schnitzler, 2009)

ในประเทศแถบยุโรปมีรายงานการระบาดของในสุกรตั้งแต่ปี ค.ศ. 1941 ของ classical H1N1 แต่การระบาดนั้นเกิดเป็นครั้งคราว กระทั่งในราวปี ค.ศ. 1994 เชื้อ H1N2 ถูกแยกได้ครั้งแรกจากผิวเยื่อระบบทางเดินหายใจของสุกรในแถบเกาะอังกฤษ จากนั้นเชื้อก็แพร่ระบาดไปยังประเทศต่างๆ ของยุโรป โดยเชื้อ H1N2 ที่ปรากฏมีส่วนประกอบของสายพันธุกรรมที่เกิดจากการผสมรวมกันถึง 2 ครั้ง (double reassortant) จากไวรัส 3 ชนิด คือ HA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคนชนิด H1N1, NA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H3N2 และสายพันธุกรรมที่บรรจุรหัสของโปรตีนอื่น PB2, PB1, PA, NP, M และ NS จากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ซึ่งมีสายพันธุกรรมทั้ง 8 ท่อน คล้ายคลึงกับไวรัสไข้หวัดนก (avian-like swine H1N1 virus) (Marozin *et al.*, 2002; Vincent *et al.*, 2009)

นอกจากนั้น มีรายงานการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ในหลายประเทศแถบเอเชีย เช่น ฮองกง, ญี่ปุ่น, อินเดีย, จีน, ไต้หวัน และไทย (Guan *et al.*, 1996) กระทั่งในราว ค.ศ. 1979 สามารถแยกเชื้อไวรัส H3N2 ได้ครั้งแรกในเอเชีย (Shortridge *et al.*, 1979) ต่อมาพบเชื้อไวรัสลูกผสมชนิดย่อย H1N2 ซึ่งญี่ปุ่นสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้เป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1978 โดยพบว่า เป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่เกิดจากการผสมรวมกัน (reassortant H1N2 swine viruses) ซึ่งประกอบด้วย HA มาจากเชื้อไวรัส classical H1N1 ของสุกรและ NA มาจากเชื้อไวรัส H3N2 ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสในมนุษย์ (human-like H3N2 virus) ต่อมาราวปี ค.ศ. 1992 พบเชื้อไวรัส H1N2 ซึ่งแยกได้จากปอดของสุกรที่แสดงลักษณะอาการของโรคระบบทางเดินหายใจจากฟาร์มสุกรในประเทศญี่ปุ่นเชื้อไวรัสที่เพาะแยกได้ถูกนำไปวิเคราะห์ทาง phylogenetic เพื่อหาต้นกำเนิดของสายพันธุ์ ผลชี้ชัดว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ NA มาจากเชื้อไข้หวัดใหญ่มนุษย์ (human influenza virus) ส่วนสายพันธุกรรมอื่นๆ อีก 7 ท่อนมาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ถูกเพาะแยกได้ครั้งแรก (classical H1N1) และกลายเป็นสายพันธุ์ที่คงอยู่ในประชากรสุกรของญี่ปุ่นตลอดมา (Ito *et al.*, 1998b) เมื่อปี ค.ศ. 2003 ในประเทศเกาหลี สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัส H1N2 จากสุกรช่วงที่มีการระบาดครั้งใหญ่ของโรคระบบทางเดินหายใจอย่างรุนแรงในฝูงสุกรเกาหลี โดยพบว่า ยีน NA และ PB1 เป็นของเชื้อ H1N2 ที่มีต้นกำเนิดมาจากมนุษย์ ขณะที่ HA, M, NP และ NS มีต้นกำเนิดมาจากสุกร ส่วน PA และ PB2 มีต้นกำเนิดมาจากสัตว์ปีก ผลทาง phylogenetic ระบุว่าเชื้อ H1N2 ที่เกาหลีที่แยกได้นั้น มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อไวรัส H1N2 ที่เพาะแยกได้เมื่อเร็วๆ นี้จากสุกรในสหรัฐอเมริกา (Jung and Chae, 2004a) การหมุนเวียนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในแถบเอเชียมีความหลากหลายมากขึ้น ตั้งแต่มีการระบาดใหญ่ของ Asian flu ในปี ค.ศ. 1957 และ Hong Kong flu ในปี ค.ศ. 1968 โดยไวรัส H2N2 และ H3N2 ตามลำดับ (Maet *et al.*, 2009) ไวรัสทั้งสองชนิดนี้เชื่อว่าเป็น reassortants ที่ได้ยีน HA และยีนบางยีนมาจากไวรัสไข้หวัดนก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางตอนใต้ของประเทศจีน ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเป็นศูนย์กลางการระบาดครั้งใหญ่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Ito *et al.*, 1998a)

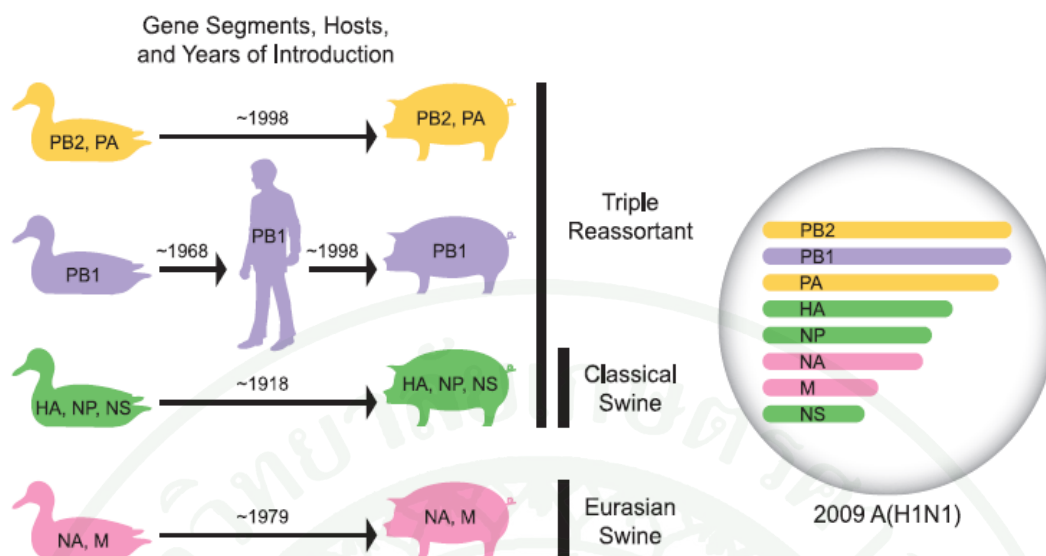
เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์หลักๆ ที่เพาะแยกได้จากสุกรในประเทศจีนนั้น ได้แก่ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ดั้งเดิม (cH1N1) และเชื้อไวรัสสุกรที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสในสัตว์ปีก (Classical และ avian-like swine H1N1 viruses), เชื้อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส A/Hong Kong/2/68, A/Victoria/3/75 และ A/Sydney/5/96 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H9N2 ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสในสัตว์ปีก (avian-like swine H9N2 viruses) และเชื้อไวรัส H1N1 ที่มีการผสมรวมกัน 2 ครั้ง (Double reassortant H1N1 viruses) ซึ่งบรรจุกายพันธุ์กรรมที่คล้ายกับเชื้อไวรัสของมนุษย์และสุกร (Shortridge and Webster, 1977; Yu *et al.*, 2008) นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์อื่นๆ ในสุกรเพิ่มขึ้น ในปี 2006 มีรายงานเพาะแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N1 เป็นครั้งแรกจากสุกรในอเมริกาเหนือ (Lekcharoensuk *et al.*, 2006) เป็นการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์สายพันธุ์ H3N2 และไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ cH1N1 (Ma *et al.*, 2006) ขณะที่ไวรัสไข้หวัดสายพันธุ์ H3N1 ที่เพาะแยกได้จากสุกรในเกาหลีและอิตาลีมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากที่พบในอเมริกา ทั้งนี้ยังพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ (reassortant) (rH1N1) (Webby *et al.*, 2004) เป็นต้น

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรส่วนใหญ่จะติดต่อสู่คนจากการสัมผัสใกล้ชิดเท่านั้นเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสัตว์สามารถติดต่อข้ามสู่สัตว์ชนิดอื่น เช่น สัตว์ปีก (Avian influenza) และม้า (equine influenza) ในขณะที่เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน (human influenza) สามารถติดต่อข้ามชนิดสัตว์ (cross-species) ได้ในบางครั้ง ในปีค.ศ. 1918 ที่มีการระบาดครั้งรุนแรงของไข้หวัดใหญ่ทั่วโลก (Spanish Flu, H1N1) มีผู้เสียชีวิตถึง 20 ล้านคนนั้นอาจเกี่ยวข้องข้องกับการที่สุกรในประเทศสหรัฐอเมริกาฮังการี และจีนป่วยด้วยอาการของระบบทางเดินหายใจในช่วงเวลาเดียวกัน ซึ่งซีรัมจากสุกรป่วยมีปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสที่ก่อให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ในคน ในปี ค.ศ. 1918 ต่อมาในปี ค.ศ. 1976 มีรายงานการระบาดของไข้หวัดใหญ่ที่ Ford Dix สหรัฐอเมริกา ซึ่งสามารถแยกเชื้อไวรัส H1N1 จากผู้เสียชีวิต 1 ราย และผู้ป่วยอีก 5 รายเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยเหมือนกับเชื้อไวรัส H1N1 ที่แยกได้จากสุกรการตรวจทางซีรัมวิทยาก็บ่งชี้ว่า มีผู้ติดเชื้ออีก 500 คน (Brown, 2000; Pospisil *et al.*, 2001) นอกจากนั้น ยังมีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสสุกรชนิด H1 จากผู้ที่ทำงานใกล้ชิดกับสุกร (Schnurrenberger *et al.*, 1970; Ma *et al.*, 2009) และในที่สุดก็สามารถยืนยันได้ว่า “เชื้อไวรัสInfluenza ของสุกรสามารถติดต่อสู่คนได้” จากการพบเชื้อไวรัสในสุกรและผู้เลี้ยงสุกรที่เป็นเชื้อชนิดเดียวกัน และมีคุณสมบัติทางแอนติเจนและพันธุกรรมเหมือนกันกับเชื้อไวรัสสุกรชนิด H1N1 หลังจากนั้น ก็มีรายงานการแยกเชื้อ influenza สุกรได้จากคนป่วยด้วยอาการของระบบหายใจ (Dasco *et al.*, 1984; Vincent *et al.*, 2009) บางครั้งก็ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต (Wentworth *et al.*, 1994) ผู้ป่วยทุกรายเคยสัมผัสกับสุกรป่วยและเชื้อ H1N1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีความใกล้ชิดกับ classical swine influenza virus H1N1 (Brown, 2000)

7. ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009

เมื่อปลายเดือนเมษายน 2009 องค์การอนามัยโลกได้รายงานการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการว่า ไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดเป็นโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ในมนุษย์ เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ H1N1 ซึ่งเป็นเชื้อตัวใหม่ที่ไม่เคยพบมาก่อน เป็นเชื้อที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ และแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่มนุษย์, ไข้หวัดใหญ่สุกร และไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกด้วย กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยใช้ชื่อโรคนี้นี้ว่า “ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ ชนิดเอ เอช1เอ็น1” (A/H1N1) และใช้ชื่อย่อว่า “ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009” (novel H1N1 swine-origin virus (H1N1 S-OIV) in 2009)

การวิเคราะห์แบบแผนผังวิวัฒนาการของ H1N1 S-OIV พบว่า ไวรัสนี้เป็นลูกผสม (reassortant) ระหว่างไวรัสไข้หวัดสุกรสายพันธุ์ H1N2 ซึ่งพบอยู่ในประชากรสุกรในทวีปอเมริกาเหนือที่เรียกว่า triple reassortant และไวรัสไข้หวัดสุกรสายพันธุ์ H1N1 ที่พบอยู่ในประชากรสุกรในยุโรปและเอเชีย (Eurasian lineage) ซึ่งเป็นไวรัสที่มีบรรพบุรุษสายตรงมาจากสัตว์ปีกอีกทีหนึ่ง โดย H1N1 S-OIV ได้ยีน NA และ M มาจากไวรัสไข้หวัดสุกรสายพันธุ์ Eurasian ที่มีบรรพบุรุษมาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีก ส่วนยีนอีก 6 แห่ง (HA, NP, PB1, PB2, PA และ NS) ได้มาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ triple reassortant สายพันธุ์ H1N2 ซึ่งพบอยู่ในประชากรสุกรในทวีปอเมริกาเหนือ โดย triple reassortant ประกอบด้วย ส่วนยีน HA NP และ NS ได้จากไวรัสไข้หวัดสุกรสายพันธุ์ดั้งเดิม (cH1N1) สำหรับยีน PB1 ได้มาจากไวรัสไข้หวัดสุกรสายพันธุ์ดั้งเดิมและยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ของมนุษย์สายพันธุ์ H3N2 ที่มีกระแอบอยู่ในขณะนั้น (ปี ค.ศ. 1997-1998) ส่วนยีน PB2 และ PA ได้มาไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกที่ผสมข้ามพันธุ์ไปยังสุกรในเหตุการณ์เดียวกัน (Gerten *et al.*, 2009) ภาพที่ 8 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ triple reassortment ได้หมุนเวียนในสุกรมานานกว่า 10 ปี (Ciccozzi *et al.*, 2011) และมีรายงานอ้างว่ามีการแพร่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ triple reassortment จากสุกรไปยังมนุษย์ได้เกิดขึ้นหลายเดือนก่อนการระบาดของโรค H1N1 S-OIV (Fraser *et al.*, 2009) ซึ่งไวรัสมีการพัฒนาตัวเองอย่างรวดเร็ว อันเนื่องมาจาก positive selection (Liet *et al.*, 2011, Moncorgé *et al.*, 2010) โดย H1N1 S-OIV มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง D190 และ D225 ของยีน HA ที่สนับสนุนการติดต่อกับประสิทธิภาพระหว่างมนุษย์ แต่บางสายพันธุ์ล่าสุดมีการกลายพันธุ์ของยีน HA ที่ตำแหน่ง D225G/E ซึ่งช่วยให้ไวรัสติดเชื้อได้ทั้งในสุกรและมนุษย์ (Christman *et al.*, 2011) นอกจากนี้ การกลายพันธุ์ของยีน HA ที่ตำแหน่ง D222G มีส่วนสนับสนุนให้การติดเชื้อในมนุษย์รุนแรงขึ้น (Chenet *et al.*, 2010; Kilander *et al.*, 2010) ในขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน HA ตำแหน่ง E391K ได้รับการเชื่อมโยงกับ fitness ของไวรัส (Maket *et al.*, 2011; Maurer *et al.*, 2010) และมีรายงานว่า H1N1 S-OIV ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน PB2 ทั้งที่ตำแหน่ง E627K และ D701N (Chutinimitkul *et al.*, 2010; Herfst *et al.*, 2010)



ภาพที่ 8 ที่มาของ host และ ยีนต่างๆของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009

ที่มา: Gerten *et al.*(2009)

8. ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย

สำหรับข้อมูลอุบัติการณ์ของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยที่ผ่านมา มีรายงานพบการแยกไวรัสได้ครั้งแรกในสุกรในปี ค.ศ. 1978 และ 1988 โดยระบุว่า เป็นไข้หวัดใหญ่สุกร H3N2 และ H1N1 ตามลำดับ (Nerome *et al.*, 1983; Kupradinun *et al.*, 1991) และต่อมาจนกระทั่งในปี ค.ศ. 2005 มีรายงานการแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H3N2 ได้จากสุกรในจังหวัดสระบุรี จึงเป็นไปได้ว่า มีการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรได้ทั้ง 3 subtype ในสุกรของประเทศไทย เช่นเดียวกับที่พบในประชากรสุกรของประเทศอื่น ได้แก่ H1N1, H3N2 และ H1N2 (Kanai *et al.*, 1981; Damrongwatanapokin *et al.*, 2006; Kupradinun *et al.*, 1991) จากรายงานของ Chutinimitkul *et al.* (2008) ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1, H3N2 และ H1N2 ที่พบในประเทศไทย พบว่า phylogenetic tree ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 มียีน HA จัดอยู่ในกลุ่ม (cluster) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ดั้งเดิม (cH1N1) ซึ่งระบาดอยู่ในแถบอเมริกา, ญี่ปุ่นและจีน ส่วนยีน NA อยู่ใน cluster ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ยุโรป ขณะที่ยีน HA และ NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 มีทั้งหมด 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่คล้ายกับไข้หวัดใหญ่สุกรในแถบอเมริกาเหนือ, กลุ่มที่คล้ายกับไวรัสสุกรในยุโรป และกลุ่มที่คล้ายกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลที่เคยระบาดเมื่อปี 1970 ส่วนไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดย่อย H1N2 มีส่วนของยีน HA มาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ที่คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ที่ระบาดในทวีปอเมริกาและเอเชีย ส่วนยีน NA ได้รับมาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 ที่ระบาดในยุโรป ซึ่งผลการศึกษานี้ทั้ง 8 ยีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H3N2 จากประเทศไทย (Lekcharoensuk *et al.*, 2010) พบว่า ไวรัสที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี มียีน HA และ NA ใกล้เคียงกับไวรัสไข้หวัดใหญ่

ตามฤดูกาลที่แยกได้หลังปี ค.ศ. 1990, ยีน NP และ NS ใกล้ชิดกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ cH1N1 และยีน PB2, PB1, PA และ M ใกล้ชิดกับ avian like swine influenza virus จากยุโรป

นอกจากนี้ มีการศึกษาเกี่ยวกับอุบัติการณ์ของโรคในประเทศไทย Damrongwatanapokin *et al.* (2003) ได้รายงานผลการสำรวจทางซีรัมวิทยาต่อ SIV สายพันธุ์ H1N1 ของสุกรจาก 15 จังหวัดในช่วงเดือนตุลาคม 2002 ถึงเดือนมกราคม 2003 จากตัวอย่างทั้งหมด 1,610 ตัวอย่าง โดยแยกเป็นซีรัมแม่สุกรจำนวน 859 ตัวอย่าง จาก 33 ฟาร์ม, ซีรัมสุกรขุนจำนวน 367 ตัวอย่าง จาก 29 ฟาร์ม และซีรัมที่หลากหลายช่วงอายุสุกรที่เก็บได้ ณ ขณะนั้นจำนวน 354 ตัวอย่าง โดยตรวจด้วยวิธีชุดทดสอบสำเร็จรูป H1N1 ELISA (IDEXX laboratories, Maine, USA) พบการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ SIV ในฝูงแม่สุกรและสุกรขุนมีความชุกในระดับฝูงร้อยละ 44 และ 20 ตามลำดับ (S/P ratio > 0.4) โดยจังหวัดนครปฐมและราชบุรีมีอุบัติการณ์ของโรคสูงสุด Damrongwatanapokin *et al.* (2006) ทำการสำรวจทางซีรัมวิทยาและไวรัสวิทยาของ SIV อีกครั้ง ระหว่างเดือนตุลาคม 2003 ถึงเดือนมีนาคม 2004 จากสุกรใน 35 จังหวัด พบการตอบสนองของแอนติบอดีจากฝูงแม่สุกรต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ร้อยละ 91 และ 52 ตามลำดับ และพบแอนติบอดีในซีรัมสุกรขุนต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ร้อยละ 55 และให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ร้อยละ 31 และผลการเพาะแยกเชื้อจากน้ำป้ายจมูก (nasal swab) ระบุว่า พบไวรัสทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ H1N1, H3N2 และ H1N2 ในครั้งนี้ถือเป็นการแยกไวรัสสายพันธุ์ H1N2 ในประเทศไทยได้เป็นครั้งแรกด้วย Parchariyanon (2006) ทำการสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทูป A ในสุกรระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม 2004 โดยเก็บตัวอย่างป้ายหลอดลมและซีรัมจำนวน 359 และ 553 ตัวอย่างตามลำดับ จากสุกรใน 5 พื้นที่ที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 (ฉะเชิงเทรา, กาญจนบุรี, ขอนแก่น, สุโขทัย และสุพรรณบุรี) ผลการแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างป้ายหลอดลมด้วยวิธีฉีดเข้าไปไก่ฟักและตรวจทางซีรัมวิทยา ปรากฏว่า ไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 และเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกร H3N2 จากตัวอย่างทั้งหมดได้ แต่สามารถแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกร H1N1 ได้จาก 2 ตัวอย่าง ผลการตรวจทางซีรัมด้วยวิธี serum neutralization test (SNT) ไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 แต่พบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกร H1N1 7.9% และ H3N2 20.6% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการตรวจซีรัมด้วยวิธี haemagglutination inhibition (HI) และ SNT ต่อเชื้อ H1N1 และ H3N2 พบว่า วิธี HI ให้ผลบวกสูงกว่าวิธี SNT ในปีเดียวกัน Nakharuthai *et al.* (2008) ทำการสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกรจากตัวอย่างป้ายจมูกและปอดของสุกรที่ป่วยด้วยโรคระบบหายใจซับซ้อน (porcine respiratory disease complex; PRDC) พบว่า 2.8% ของสุกรที่ป่วยด้วยโรค PRDC มีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกรและสามารถเพาะแยกเชื้อได้และพบว่าทั้งหมดเป็นชนิด H3N2

Thippamom *et al.* (2010) ทำการศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน Nucleoprotein (NP) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน, สุกร และสัตว์ปีก ที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 49 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจำนวน 18 ตัวอย่าง, เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจำนวน 16 ตัวอย่าง และเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic analysis) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน

ในตำแหน่งต่างๆ ที่มีความสำคัญและจำเพาะต่อโฮสต์ ผลการศึกษาพบว่า ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสที่แยกได้จากสัตว์ต่างชนิดสามารถแยกกันอย่างชัดเจนซึ่งประกอบด้วย สายพันธุ์ของม้า สัตว์ปีก, มนุษย์, สุนัขและยุโรป และสุนัขสายพันธุ์ดั้งเดิม (cH1N1) ขณะที่เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนมากที่สุด และในสัตว์ปีกมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนน้อยที่สุด โดยที่เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนมีกรดอะมิโน 5 ตัวที่มีความอนุรักษ์ต่อเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในคน (human-like amino acid) คือ D16, P283, K293, D372 และ K422 ส่วนไข้หวัดใหญ่สุนัขและสัตว์ปีกนั้น ต่างก็มีกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์ปีก (avian-like amino acid; V105) ส่วนกรดอะมิโนที่อนุรักษ์สำหรับไวรัสสุนัขทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ K/T350, V/M371, V/I444 และ L/V456 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในคน, สุนัข และสัตว์ปีกที่แยกได้ในประเทศไทยมีความแตกต่างกันตามชนิดของโฮสต์ และยังสามารถบ่งชี้ถึงการติดเชื้อข้ามชนิดของโฮสต์ได้

Takemae *et al.* (2011) ทำการศึกษาติดตามข้อมูลระยะยาวของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุนัขในฟาร์มที่เลี้ยงแบบครบวงจร (farrow-to-finish farms) ในภาคกลางของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2008 ถึง 2009 โดยเก็บตัวอย่างน้ำป้ายจมูก (nasal swab) และตัวอย่างซีรัมจากสุนัข 4 กลุ่ม ได้แก่ แม่สุนัขอายุ 1-2 ปี, สุนัขขุนอายุ 3-4 เดือน, ลูกสุนัขหย่านมอายุ 4-10 สัปดาห์ และสุนัขที่เพิ่งนำเข้าสู่ฟาร์ม วิเคราะห์คุณสมบัติทางไวรัสวิทยาและซีรัมวิทยาของสุนัข พบว่า สามารถแยกเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ได้จำนวน 10 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ H3N2 จำนวน 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างน้ำป้ายจมูกของสุนัขหลังหย่านมอายุ 4-12 สัปดาห์ ขณะที่การตรวจทางซีรัมวิทยาเพื่อจำแนก subtype ของไวรัสด้วยวิธี HI และ ELISA (IDEXX Laboratories, Maine, USA) พบความชุกของโรคมามากที่สุดในฝูงสุนัขขุน แต่ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อจากฝูงสุนัขขุนได้ แต่อย่างไรก็ตาม การพบแอนติบอดีต่อ SIV ในสุนัขขุนอาจเป็นสัญญาณที่บ่งถึงการมีการติดเชื้อในฟาร์มสุนัข ในขณะที่การติดตามการติดเชื้อในแม่สุนัขอาจจะไม่สามารถให้ข้อมูลทางระบาดวิทยาได้ เนื่องจากแม่สุนัขเกือบทุกตัวเคยสัมผัสเชื้ออย่างน้อย 1 ครั้งในช่วงชีวิต

ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุนัขที่พบหมุนเวียนแพร่กระจายอยู่อย่างกว้างขวางทั่วโลกมี 3 subtype ได้แก่ H1N1, H3N2 และ H1N2 ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกเกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมของยีนที่มาจากต้นกำเนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุนัข (classical swine influenza) ยีนของไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกที่เข้ามาติดต่อกับสุนัข (avian-like swine) และยีนของไข้หวัดใหญ่ในคนที่เข้ามาติดต่อกับสุนัข (human-like swine) (Chutinimitkul *et al.*, 2008)

9. โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza)

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร เป็นโรคทางระบบทางเดินหายใจอย่างเฉียบพลันมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (Swine influenza virus; SIV) ที่แพร่ระบาดเป็นวงกว้างหรือระบาดเป็นครั้งคราวในฝูงสุกรทั่วโลก รวมทั้งยังเป็นโรคสัตว์ติดคน (zoonotic disease) (Sreta *et al.*, 2009)

สุกรที่ติดเชื้อมักแสดงอาการภายใน 24 ชั่วโมง หลังติดเชื้อโดยสุกรจะมีอาการไข้สูงประมาณ 40.5-41.7°C เบื่ออาหาร, น้ำหนักลด, หายใจลำบาก, โกงหลัง, ไอด้วยความเจ็บปวด ร่วมกับการจามเป็นช่วงๆ มีน้ำมูกใส น้ำตาไหล หากได้รับการดูแลที่ดี และไม่มีการติดเชื้อแทรกซ้อนสุกรป่วยจะหายได้เองภายใน 5-7 วันสุกรที่เป็นโรคนี้อัตราการป่วยสูงถึง 100% แต่อัตราการป่วยตายต่ำ (Reeth, 2007; Simon-Grife *et al.*, 2012) บางครั้งเชื้อไวรัสแพร่กระจายอยู่ในกลุ่มสุกรโดยแสดงอาการทางคลินิกน้อยมาก หรือไม่แสดงอาการทางคลินิกเลย (Brown, 2000) เป็นไปได้ว่า โอกาสการนำสุกรที่เป็นตัวอมโรคเข้ามาในฟาร์มที่ไม่เคยสัมผัสเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (SIV) เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคในฝูงได้ นอกจากนี้ สุกรที่น้ำหนักลดลงจะทำให้ระยะเวลาการขุนและต้นทุนการเลี้ยงเพิ่มขึ้น อีกทั้งการมีไข้สูงอาจทำให้แม่สุกรแท้งได้ก่อให้เกิดการสูญเสียในอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรอย่างมากได้เช่นกัน

ความรุนแรงของโรคเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ภูมิคุ้มกันที่ได้จากแม่ (maternal immunity), สายพันธุ์เชื้อ (strain), ทางที่ติดเชื้อ (route) และโรคแทรกซ้อน เป็นต้น โดยเชื้ออาจเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนระหว่าง SIV กับเชื้อก่อโรคอื่นๆ หลายชนิดร่วมกัน เช่น porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Aujeszky's disease virus, porcine respiratory coronavirus (PRCV), *Mycoplasma hyopneumoniae* เป็นต้น อันเป็นสาเหตุให้เกิดโรคแทรกซ้อนของระบบทางเดินหายใจซับซ้อน (porcine respiratory disease complex; PRDC) ที่รุนแรงขึ้นกว่าเดิม (Heinen, 2003; Gjerset *et al.*, 2011)

10. พยาธิสภาพ

สุกรเป็นสัตว์ที่ไวต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร เนื่องจากบริเวณหลอดลมของสุกรมีตัวรับบนผิวเซลล์สองชนิด คือ α -2,3 และ α -2,6 sialic acid linkage ที่สามารถจับกับ HA ของไวรัสได้ การกระจายตัวของตัวรับทั้งสองในระบบทางเดินหายใจส่วนต้นและปลาย เมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจของสุกร โดยผ่านเซลล์เยื่อจมูกทางเดินหายใจ, เยื่อจมูก, หลอดคอ (pharynx) และหลอดลม (trachea) ซึ่งในระยะแรกของการติดเชื้อสามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ในเซลล์ส่วนต้นของเยื่อของหลอดลมใหญ่และหลอดลมฝอยเป็นส่วนใหญ่ (Jung *et al.*, 2005) การเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายของไวรัสทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อจะบวม, อักเสบ hyperemia เซลล์เยื่อจมูกเยื่อเซลล์เหล่านี้จะตายและหลุดลอกในที่สุด บริเวณที่มีการติดเชื้อจะมีของเหลวที่ซึมออกมา โดยพบสิ่งคัดหลั่งปนเศษเซลล์ตาย และมีการสะสมของเซลล์ neutrophils และ

monocytes เกิดเป็นจุดหนอง (Ma *et al.*, 2006) จากนั้นเชื้อจะลุกลามและแพร่กระจายไปยังเยื่อหุ้มสมองส่วนอื่นๆ โดยตรวจพบรอยโรคที่สำคัญในหลอดลม (bronchus) ต่อมน้ำเหลืองบริเวณซั้วปอด และปอดส่วนต้นเป็นอวัยวะเป้าหมายของเชื้อ (De Vleeschauwer *et al.*, 2009) ในรายที่รุนแรงพบปอดอักเสบมีสีแดงคล้ำและปอดบวม (Brown *et al.*, 1993) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาพยากรณ์การเกิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 และ H1N2 ในสุกรหลังหย่านมของประเทศไทย สุกรแสดงอาการทางคลินิกคล้ายโรคไข้หวัดใหญ่ในวันที่ 1-4 หลังการติดเชื้อ รอยโรคทางมคพวิทยาพบปอดอักเสบแบบ cranioventral pneumonia มีลักษณะเป็นลายคล้ายตารางหมากรุก และมีความเสียหายของเซลล์บุผิวหลอดลม, หลอดลมอุดตันร่วมกับการแทรกของเซลล์อักเสบรอบหลอดลมและหลอดเลือด มีการกระจายแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในเนื้อเยื่อปอด, นิวเคลียสของเซลล์บุผิวหลอดลม, เซลล์บุผิวถุงลมปอด และมาโครฟาจ (Sreta *et al.*, 2009)

11. การติดต่อและการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นโรคติดต่อระบบทางเดินหายใจ สุกรมักได้รับเชื้อจากการสูดหายใจและการสัมผัส โดยรูปแบบการแพร่กระจายมีหลายวิธี ได้แก่ การแพร่กระจายทางอากาศ (Airborne Transmission) โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะติดไปกับฝุ่นละอองฝอยขนาดเล็ก (aerosol) ละอองเสมหะขนาดใหญ่ (large droplet/droplet nuclei) ที่เกิดจากการไอและจาม น้ำมูก น้ำลาย และสารคัดหลั่ง เป็นต้น ละอองฝอยจะนำพาเชื้อไวรัสให้แขวนลอยอยู่ในอากาศอยู่ได้เป็นระยะเวลาานาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างขนาดและความเร็วของอนุภาคในการตกของอนุภาค (settling velocity) เช่น อนุภาคขนาด 20 ไมครอนจะล่องลอยในอากาศได้นาน 4 นาที, อนุภาคขนาด 10 ไมครอนจะล่องลอยได้นาน 17 นาที และอนุภาคขนาด 5 ไมครอนจะล่องลอยได้นาน 67 นาที นอกจากนี้ อนุภาคขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับ 5 ไมครอนยังสามารถแทรกเข้าสู่ทางเดินหายใจไปสิ้นสุดยังบริเวณถุงลม (alveolar) ได้ประมาณ 30% ส่วนอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นขนาด 5-10 ไมครอน จะแทรกเข้าสู่หลอดลมฝอย (tracheobronchial) ได้ถึง 50% ส่วนอนุภาคขนาด 20 ไมครอนจะแทรกเข้าถึงบริเวณหลอดลมคอ (trachea) อย่างไรก็ตาม การไหลเวียนของอากาศ, อุณหภูมิและความชื้น ก็มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้ด้วย ถ้าการไหลเวียนมีมากก็อาจทำให้การแพร่กระจายโรคเป็นไปได้ไกลมากขึ้น (Tellier, 2009) ขณะที่ปัจจัยของอุณหภูมิที่ต่ำ (5°C) เหนียวน้ำให้เกิด droplet มากขึ้น แต่การแพร่กระจายทางอากาศ (airborne transmission) ที่อุณหภูมิ 30°C จะลดลงไม่ว่าระดับความชื้นสัมพัทธ์จะเป็นอย่างไรก็ตาม แต่ที่สภาวะอุณหภูมิ 20°C การแพร่กระจายเชื้อทางอากาศจะเกิดได้ดีเมื่อความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 20-30% หรือ 65% และการแพร่กระจายทางอากาศจะลดลงเมื่อความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเป็น 50% และไม่พบการแพร่กระจายที่ความชื้นสัมพัทธ์สูงถึง 80% (Lowen *et al.*, 2008)

อีกวิธีหนึ่งคือ การติดต่อทางการสัมผัส (Contact Transmission) เป็นการแพร่โรคจากการสัมผัส ซึ่งแบ่งเป็นการสัมผัสโดยตรง (direct contact) จากสิ่งคัดหลั่ง การดมกลิ่นเลียปัสสาวะ-อุจจาระ หรือการกินอาหารและน้ำร่วมกัน โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถทนอยู่ในตะกอนของเสีย

(slurry) ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เช่น สามารถทนและมีชีวิตรอดในตะกอนของเสียที่อุณหภูมิ 5°C ได้นาน 9 สัปดาห์ อุณหภูมิ 20°C นาน 2 สัปดาห์ อุณหภูมิ 35-40°C มีชีวิตรอดได้มากกว่า 24 ชั่วโมง และมีชีวิตรอดได้มากกว่า 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50-55°C (Desrosiers, 2004; Martin *et al.*, 2011) อีกแบบคือ การสัมผัสโดยอ้อม (indirect contact) เช่น สัมผัสกับสิ่งปนเปื้อนผ่านวัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ ที่มีการปนเปื้อนภายในฟาร์ม พาหนะและสัตว์เลี้ยงอื่นๆ ที่เลี้ยงในฟาร์ม หรือใกล้เคียง นอกจากนี้ ยังสามารถติดต่อกันเชื้อไวรัสสามารถแพร่ระบาดจากฟาร์มหนึ่งไปยังอีกฟาร์มหนึ่งได้ โดยการเคลื่อนย้ายสุกรป่วยหรือสุกรที่เป็นพาหะนำโรคเข้ามาในฝูง (Kitikoon *et al.*, 2012; Brown 2001)

12. การตรวจวินิจฉัยไข้หวัดใหญ่ในห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรนั้น สุกรอาจแสดงอาการของโรคน้อยมาก หรือไม่แสดงอาการทางคลินิกเลยไม่มีรอยโรคที่เฉพาะ การวินิจฉัยโดยการซักประวัติร่วมกับการสังเกตอาการจึงไม่เพียงพอจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลด้วยวิธีการทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ และนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการตรวจสอบที่เหมาะสมกับงาน และศักยภาพของห้องปฏิบัติการ การทดสอบมีหลายวิธี ซึ่งมีลักษณะและวัตถุประสงค์ของวิธีการแตกต่างกันไป ดังนี้

12.1 การเพาะแยกเชื้อไวรัส

การเพาะแยกเชื้อไวรัสถือเป็นวิธีมาตรฐาน หรือ gold standard สำหรับใช้ในการบ่งบอกชนิดของเชื้อก่อโรคที่ได้ผลภายใน 10-14 วัน การเพาะแยกเชื้อไวรัสจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนไวรัสลงในไข่ไก่ฟัก หรือเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเซลล์เพาะเลี้ยงที่นิยมใช้ คือ เซลล์ MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) ไวรัสมีความไว (sensitive) ต่อการติดเชื้อในไข่ไก่ฟักมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยง (Clavijo *et al.*, 2002) แต่การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมีความสะดวกสบายมากกว่าการใช้ไข่ไก่ฟัก และสามารถตรวจดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Cytopathic effect; CPE) อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่จะ inoculate ลงในเซลล์ หรือไข่ไก่ฟักจะต้องปราศจากเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ มิฉะนั้น อาจทำให้เซลล์หรือตัวอ่อนในไข่ฟักตาย ดังนั้น อาจต้องใช้การกรอง และการปั่นเหวี่ยงรอบต่ำ รวมถึงการใส่ยาปฏิชีวนะร่วม (Shih *et al.*, 1999)

การเพาะเชื้อในไข่ไก่ฟักใช้ไข่อายุ 10-11 วัน โดยฉีดเชื้อเข้าบริเวณ amniotic cavity หรือ allantoic sac โดยทั่วไป มักฉีดเข้า allantoic sac เพราะมีช่องขนาดใหญ่และเก็บไวรัสได้ในปริมาณมากกว่า จากนั้นจึงอบไข่ไว้ที่อุณหภูมิ 33-35°C แล้วจึงดูดน้ำเลี้ยงจากไข่ไปตรวจหาไวรัสได้ เช่นเดียวกับในการเพาะเชื้อลงในเซลล์จะต้องเพาะขยายเซลล์ให้เกาะเป็น monolayer ในปริมาณที่เหมาะสม ก่อนจะ inoculate เชื้อลงในเซลล์ อบที่อุณหภูมิ 37°C และสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ที่เรียกว่า CPE ทุกวัน จึงจะทำการเก็บน้ำเลี้ยงไปตรวจหาไวรัสต่อไป (Swenson *et al.*, 2001; Weinberg *et al.*, 2005)

การตรวจหาเชื้อไวรัสทำได้หลายวิธีแต่ที่ง่ายและนิยม คือ การทดสอบ Hemagglutination (HA) เป็นการทดสอบหาคุณสมบัติของ hemagglutinin ที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ซึ่งจะสามารถบอกว่ามีไวรัสหรือไม่ และบอกปริมาณไวรัสจากการทำ titration นอกจากวิธี HA แล้ว ยังสามารถตรวจโดยวิธี immunofluorescent staining เพื่อหาแอนติเจนไวรัสภายในเซลล์ นอกจากนี้ ยังมีการใช้เทคนิคทางอณูวิทยาเข้ามาช่วย เช่น เทคนิค Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT–PCR)

RT-PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มขยาย (amplification) สารพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจและเซลล์ติดเชื้อ เทคนิคนี้สามารถยืนยันการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็วและมีความไวสูง ซึ่งปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น นอกจากนี้ ยังสามารถแบ่ง subtype ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยเทคนิคนี้จะใช้ primer ที่เหมาะสมต่อสารพันธุกรรมของไวรัสโดยได้ผลการทดสอบภายใน 2-3 ชั่วโมง แต่มีต้นทุนในการลงทุนสูง เนื่องจากเครื่องมือมีราคาแพง จึงเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมทั้งอุปกรณ์และเครื่องมือ (Taubenberger and Layne, 2001; Pachuckiet al., 2004)

วิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีข้อจำกัดบางประการ เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจ ซึ่งจำเป็นต้องรอเวลาให้เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนโดยเฉลี่ยประมาณ 4 วัน เนื่องจากไวรัสแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อเซลล์แต่ละชนิดแตกต่างกัน การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจควรเก็บจากบริเวณหรือตำแหน่งที่มีโอกาสพบเชื้อมากที่สุด และควรรับนำส่งห้องปฏิบัติการ อีกทั้งการดูแลเซลล์มีความยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายสูง และต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ (Palmer et al., 1975; Ellis and Zambon, 2002)

12.2 การตรวจวินิจฉัยทางซีรัม

การวิเคราะห์ทางซีรัมวิทยามีหลายวิธีซึ่งใช้สำหรับการตรวจสอบแอนติบอดีที่ต่อต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เช่น การทดสอบ hemagglutination inhibition (HI), serum–virus neutralization test และ indirect fluorescent antibody test (IFA) (Esterday and Van Reeth, 1999; Gavin and Thomson, 2003)

12.2.1 Hemagglutination inhibition (HI)

การวิเคราะห์ด้วยวิธี HI เป็นวิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไปมากที่สุดในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นวิธีการทดสอบมาตรฐานสำหรับองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ Office International des Epizootic (OIE Standards Commission, 2008) เพื่อตรวจวัดแอนติบอดีต่อ HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ที่สามารถบ่งบอกถึงสถานะของการมีภูมิคุ้มกันได้ และแอนติบอดีที่พบมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของไวรัส เนื่องจาก HI เป็นการตรวจหาแอนติบอดี ดังนั้น จึงต้องมี

การเตรียมแอนติเจน (HA) เพื่อใช้ในการทดสอบ โดยเฉพาะเลี้ยงสายพันธุ์อ้างอิงของไวรัส (reference strain) ใน allantoic fluids ของไข่ไก่ฟัก หรือเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่ง HA ที่ได้จากน้ำเลี้ยงจะถูกใช้เป็นแอนติเจน โดยผสมตัวอย่างซีรัมกับแอนติเจนและปล่อยให้ทำปฏิกิริยา จากนั้น เติมน้ำเกลือแดง HA ของไวรัสไข่หวัดใหญ่จะจับกับตัวรับบนผิวของเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มแบบ agglutination ถ้าในซีรัมมีแอนติบอดีอยู่ก็จะจับกับ HA ทำให้ไม่มี HA เหลือไปจับกับเม็ดเลือด ซึ่งเป็นที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

การทดสอบด้วยวิธี HI เป็นการวิเคราะห์ทางซีรัมวิทยาที่ง่าย ราคาไม่แพงมาก แม้จะเป็นวิธีที่ไว มีความจำเพาะ และให้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือ แต่สายพันธุ์ของแอนติเจน HI ต้องตรงกับสายพันธุ์ที่ติดเชื้อ และเทคนิคการเขย่าเพื่ออ่านผล ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญและต้องมีประสบการณ์สูงโดยเฉพาะปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกอย่างอ่อน (weak reaction) ข้อเสียในการเตรียมแอนติเจนที่ต้องเพาะลงในไข่ไก่ฟัก ซึ่งต้องคำนึงเรื่องความปลอดภัยและหากจำเป็นต้องทดสอบกับตัวอย่างจำนวนมากจะต้องเตรียมเม็ดเลือดที่มาทดสอบมากตามไปด้วย ซึ่งอาจต้องใช้เวลาดูรวมนานเป็นสัปดาห์ (Rothbarth *et al.*, 1999; Gavin and Thomson, 2003; Song *et al.*, 2009)

12.2.2 Indirect immunofluorescent assay (IFA)

วิธี IFA เป็นการตรวจวิเคราะห์หาแอนติบอดีจากซีรัม หรือแอนติเจนในเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยวิธีย้อมดูการเรืองแสง โดยสามารถทราบผลการทดสอบได้ภายใน 2-3 ชั่วโมง โดยเตรียมเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสบนสไลด์ หรือเพลตชนิดหลายหลุม และให้ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจ แล้วใช้ anti-immunoglobulin ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เข้าไปทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง โดยแต่ละขั้นตอนต้องบ่มเป็นเวลา 30-60 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อกัน จากนั้นอ่านผลของปฏิกิริยาด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) ดูการเรืองแสงสีเขียว แอปเปิล (bright apple-green fluorescence) ภายในเซลล์อาจพบการเรืองแสงในนิวเคลียสหรือไซโตพลาสซึมโดยวิธี IFA จะมีความไวมากกว่า direct immunofluorescent assay (DFA) เนื่องจาก DFA ย้อมเพียงขั้นตอนเดียว (Yoon *et al.*, 1992; Reina *et al.*, 1998; Gavin and Thomson, 2003)

12.2.3 Complement fixation (CF)

CF เป็นวิธีที่ใช้วัดแอนติบอดี โดยอาศัยคุณสมบัติของคอมพลีเมนต์ในซีรัม ซึ่งตามปกติจะอยู่ในสภาพ inactive form จะถูกกระตุ้นให้ทำงานด้วย immune complex ที่เกิดจากการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจึงจะทำให้ไม่มี complement ไปเกาะเม็ดเลือดแดง หากตัวอย่างซีรัมไม่มีแอนติบอดี immune complex ก็จะไม่เกิดขึ้น ดังนั้น complement อิสระก็จะไปตรึงกับ sensitized cell ซึ่งก็คือเม็ดเลือดแดงเกาะ เป็นผลทำให้เกิดการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงเกาะในที่สุด วิธีนี้ต้องเตรียมแอนติเจนในไข่ไก่ฟัก ใช้น้ำยาหลายชนิด และมีความไวต่ำ ปัจจุบันจึงไม่เป็นที่นิยม (Prince and Leber, 2003; Taggart *et al.*, 2006)

12.2.4 Neutralization test (NT)

NT เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อ HA ไวรัส ซึ่งคล้ายกันกับวิธี HI โดย NT อาศัยความสามารถของแอนติบอดีจากซีรัมในการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์และไม่สามารถทำให้เซลล์ติดเชื้อได้ ทำได้โดยผสมซีรัมกับไวรัสใช้หลอดใหญ่ที่มีชีวิต ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา และนำไป inoculate ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงประมาณ 1-3 วัน หากในซีรัมมีแอนติบอดีต่อไวรัส จะไม่พบการติดเชื้อในเซลล์ และถ้าไม่มีแอนติบอดีในซีรัมไวรัสยังมีชีวิตอยู่ได้และทำให้เซลล์ติดเชื้อในที่สุด วิธีนี้มีความไวและจำเพาะต่อสายพันธุ์ของไวรัสคล้ายกับวิธี HI (Rowe *et al.*, 1999)

อย่างไรก็ตาม วิธีที่กล่าวมาข้างต้น มีข้อจำกัดที่พึงระวัง ได้แก่ (Gavin and Thomson, 2003)

ก. การเตรียมเซลล์ติดเชื้อหรือตัวอย่างซีรัมส่งตรวจ อาจพบปัญหาของปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะจากเยื่อเมือกที่ปนมา ทำให้ผลการอ่านได้เป็นผลบวกปลอม การล้างเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะชะเอาสิ่งแปลกปลอมอื่นออกได้มากที่สุด

ข. ควรมีการตรวจเซลล์ติดเชื้อในขั้นต้นก่อนถึงความพอเพียงของจำนวนเซลล์ทดสอบ และระดับการเกิด CPE เนื่องจากเซลล์ที่มีการติดเชื้อมักไม่เสถียรและถูกทำลายได้ง่าย

ค. เทคนิคการอ่านผลของ HI เป็นการอ่านด้วยตาเปล่า และ IFA จะต้องอ่านจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ จึงควรมีผู้ตรวจสอบอีกครั้งก่อนรายงานผลและผลการทดสอบขึ้นอยู่กับตัวบุคคล ดังนั้น บุคลากรจึงต้องมีศักยภาพประสบการณ์และความชำนาญสูง

12.2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA เป็นการตรวจวิเคราะห์ที่ได้รับความนิยมสำหรับใช้ตรวจสอบแอนติบอดี เนื่องจาก ELISA มีความไวและความจำเพาะสูงมากกว่า HI สามารถลดขั้นตอนที่ยุ่งยาก และสามารถทดสอบกับซีรัมจำนวนมากในคราวเดียวได้ถึง 92 ตัวอย่างต่อเพลท อีกทั้งการอ่านวัดประเมินค่าและคำนวณผลอัตโนมัติโดยใช้ commercial software ซึ่งอัตโนมัติและแม่นยำมากขึ้น (Lee *et al.*, 1993; Allwin *et al.* 2002; Ellis and Zambon, 2001) หลักการของวิธีนี้ คือ อาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี และตรวจวัดระดับแอนติบอดีโดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ เทคนิค ELISA มีหลายแบบ เช่น indirect ELISA double sandwich ELISA และ Competitive ELISA เป็นต้น ในที่นี้ขอยกตัวอย่างวิธีการของ indirect ELISA กล่าวคือ เริ่มจากการเคลือบแอนติเจนไว้บน solid phase เช่น microtiter plate, bead หรือ disk เป็นต้น เติมน้ำแอนติบอดี (primary antibody) ที่ต้องการตรวจสอบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับแอนติเจน จากนั้น

ใส่แอนติบอดีต่อ immunoglobulin เป็น secondary antibody ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์เพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับ primary antibody อีกชั้นหนึ่ง โดยแต่ละขั้นตอนจะต้องมีการล้างเพื่อเอาส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก สุดท้ายเติม substrate และวัดผลจากความเข้มของสี (Optical Density : OD) ที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อย substrate ผลที่ได้แสดงสัดส่วนโดยตรงกับระดับแอนติบอดี (primary antibody) เอ็นไซม์ที่นิยมใช้ใน ELISA ได้แก่ pig conjugated IgG Horseradish peroxidase substrate ที่นิยมใช้ คือ hydrogen peroxide + o-phenylenediamine ให้สีน้ำตาล alkaline phosphatase (substrate ที่นิยมใช้ คือ p-nitrophenylphosphate ให้สีเหลือง) เป็นต้น

ข้อดีของการตรวจหาแอนติบอดี นอกเหนือจากการใช้วินิจฉัยคัดกรองโรคในห้องปฏิบัติการ ยังสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อที่ผ่านมาเพื่อเฝ้าระวังการเกิดโรค และติดตามรูปแบบการเกิดโรค รวมถึงการวัดการตอบสนองหลังการฉีดวัคซีนได้อีกด้วย และในกรณีที่ไม่สามารถแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจได้ การตรวจหาแอนติบอดีจึงเป็นวิธีที่นิยมและเหมาะสมมากกว่า (Allwin *et al.*, 2002)

13. การควบคุมโรค

โรคไข้หวัดใหญ่ในสุกรไม่มีการรักษาที่จำเพาะการให้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อนจะช่วยลดความรุนแรงได้การป้องกันอาจทำได้โดยการฉีดวัคซีนชนิดเดียวกับไวรัสสายพันธุ์ที่มีภาวะระบาดในฟาร์มนั้นๆ ร่วมกับการจัดการและการสุขาภิบาลฟาร์ม สภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยให้แห้งสะอาดและปราศจากฝุ่นละอองลดเศษขยะในโรงเรือน ควรแยกเครื่องมือต่างๆ ในแต่ละโรงเรือน และหลีกเลี่ยงความเครียดใดๆ ที่อาจเกิดขึ้นกับสัตว์ ควบคู่กับการป้องกันการเกิดและแพร่ระบาดของโรค โดยจำกัดการเคลื่อนย้ายในฝูงสัตว์ถ้ามีการนำสัตว์เข้าทดแทนต้องกักโรคให้แน่ใจก่อนว่าสัตว์นั้นไม่เป็นโรค อีกทั้งควรทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคภายในโรงเรือนให้แน่ใจก่อนจะเลี้ยงสุกรรุ่นต่อไป ควรควบคุมและทำการฆ่าเชื้อพาหะเข้าออกฟาร์มด้วย รวมถึงป้องกันและกำจัดสัตว์เลี้ยงที่จะเป็นพาหะหรือถ่ายทอดเชื้อ เช่น สัตว์ปีก หนู สุนัข เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงานด้านชีวโมเลกุล และงานโปรตีน
 - 1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermocycler) (Biometra T1, Germany)
 - 1.2 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสแนวตั้ง (Slab gel electrophoresis instrument) (Bio-RAD, USA)
 - 1.3 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสแนวนอน (Submarine electrophoresis instrument) (Hofer, USA)
 - 1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (High speed centrifuge) (Kubota 6900, Japan)
 - 1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro centrifuge) (Denville260D, USA)
 - 1.6 เครื่องฉายอุลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) (Geliance 200, Perkin Elmer, USA)
 - 1.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Mettler, Germany)
 - 1.8 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α (NEB, USA)
 - 1.9 พลาสมิด pGEM-T \oplus easy vector (promega, USA)
 - 1.10 พลาสมิด pQE-80L expression vector (Qiagen, USA)
 - 1.11 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด *Kpn I* และ *Sal I* (NEB, USA)
 - 1.12 เอนไซม์ T4 DNA ligase และ *Taq* polymerase (Invitrogen, USA)
 - 1.13 ชุดสกัดสำเร็จรูป QIA prep \oplus Spin Miniprep Kit (Qiagen, USA)
 - 1.14 ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)
 - 1.15 เครื่องแตกเซลล์คลื่นความถี่สูง (Ultrasonicator) (Ultrasonic processor XL 2020, Heat System, Inc., USA)
 - 1.16 Protino \oplus Ni-IAD Resin (Macherey-NaGel, Germany)
 - 1.17 Automatic pipette ขนาด 1-20, 20-200 และ 100-1,000 ml. (Gilson, France)
 - 1.18 หลอด PCR ขนาด 0.2 ml (Axygen, USA)
 - 1.19 หลอดขนาด 1.5, 2, 12 และ 50 ml (Corning, USA)
 - 1.20 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria-Bertani broth (LB broth)
 - 1.21 Lactose (Sigma, USA)
 - 1.22 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (BIO Basic INC)
 - 1.23 Imidazole (Sigma, USA)
 - 1.24 β -mercaptoethanol (BIO Basic INC)
 - 1.25 Bovine serum albumin (Sigma, USA)
 - 1.26 Coomassie brilliant blue-R250 (Sigma, USA)

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเตรียมไวรัสและการเพาะเลี้ยงเซลล์
 - 2.1 ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1A/swine/IA/15/30
 - 2.2 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 A/swine/Thailand/KU-1/09
 - 2.3 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H3N2 A/swine/Thailand/KU 21/07
 - 2.4 เซลล์ Mardin-Darby Canine Kindey (MDCK)
 - 2.5 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar flow hood) (Astec SC 1800, England)
 - 2.6 ตู้อบเพาะเซลล์ควบคุมอุณหภูมิและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ Incubator) (Themo, USA)
 - 2.7 เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter) (Consort, Belgium)
 - 2.8 เครื่องชั่งสาร (Electrical balance) (Ohaus, USA)
 - 2.9 เครื่องดูด-ปล่อยสารละลายอัตโนมัติชนิดใช้กับไปเปต (Pipette aid)
 - 2.10 เครื่องแก้วสำหรับใช้วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
 - 2.11 อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (Invitrogen, USA)
 - 2.12 Fetal Bovine Serum (Invitrogen, USA)
3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงานตรวจวิเคราะห์อิมมูโนวิทยา
 - 3.1 ELISA plate ขนาด 96 หลุม (Corning, USA)
 - 3.2 เครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Multimode reader) (Beckmann, USA)
 - 3.3 เครื่องเขย่าเพลต (Microtiter plate shaker) (Fine PCR, Korea)
 - 3.4 กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) (Olympus CKX41, Japan)
 - 3.5 กล้องฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope) (Olympus IX50, Japan)
 - 3.6 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex genie, USA)
 - 3.7 Anti-Pig IgG (whole molecule)-FITC antibody produced in rabbit (Sigma, USA)
 - 3.8 Anti-Pig IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in rabbit (Sigma, USA)
 - 3.9 ABTS® Peroxidase Substrate System (2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (KPL, USA)
 - 3.10 anti-histidine tag monoclonal IgG antibody (US biologiced, USA)
 - 3.11 3,3-diaminobenzidine (DAB; Amresco, USA)
 - 3.12 Skim milk (Difco, USA)
 - 3.13 Tween 20 (Sigma, USA)
 - 3.14 Phosphate buffer saline (PBS)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างซีรัม

เก็บเลือดแม่สุกรจำนวน 5 ตัวอย่าง จากฟาร์มต่างๆ ในจังหวัดลพบุรี, นครราชสีมา, ชลบุรี, เชียงใหม่ และสงขลา ซึ่งเป็นตัวแทนของสุกรในภาคกลาง, ตะวันออกเฉียงเหนือ, ตะวันออก, เหนือ และใต้ ตามลำดับ โดยเก็บจากแม่สุกรตัวเดิมทุกๆ 3 เดือน เป็นเวลา 2 ปี รวมทั้งสิ้น 1,548 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3 แยกเก็บซีรัมโดยปั่นเลือดที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm นาน 30 นาที เก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 และ H3N2 โดยวิธี Immunofluorescent assay (IFA) และวิธี Enzyme Linked Immuno Absorbent (ELISA)

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างซีรัมแม่สุกรจากจังหวัดต่างๆ

จังหวัด	จำนวน						
	ปี 2552				ปี 2553		
	ม.ค.	พ.ค.	ก.ค.	ต.ค.	มี.ค.	มิ.ย.	พ.ย.
ลพบุรี	60	50	38	27	19	14	11
สงขลา	60	56	56	47	49	38	10
ชลบุรี	60	60	52	52	39	38	31
เชียงใหม่	60	62	60	55	53	53	43
นครราชสีมา	60	56	48	39	37	23	32
รวม	300	284	254	220	197	166	127
รวมทั้งสิ้น	1,548 ตัวอย่าง						

2. การโคลนยีน NP เต็มสายของไวรัสไข้หวัดสุกร ชนิด H1N1 A/swine/IA/15/30

2.1 การสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA

ทำการสกัด RNA จาก allantoic fluid ของไข่ไก่ฟักที่ถูก inoculate ด้วยไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1A/swine/IA/15/30 โดยใช้ Trizol reagent[®] (Invitrogen) จากนั้นทำการถอดรหัสย้อนกลับ RNA มาเป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase (SuperScrip III, Invitrogen) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต โดยใช้ specific primer (Hoffmann *et al*, 2001) ในปฏิกิริยาประกอบด้วย RNA 9 μl , 200 U Superscript III (Invitrogen) 0.5 μM dNTP, 40 U RNase inhibitor (Invitrogen) และ 5 mM DTT เริ่มจากแยกสาย RNA ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นสังเคราะห์ cDNA ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 50 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 นาที และเก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

2.2 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้ลำดับเบสของ NP ของ A/swine/IA/15/30 (accession number 43453) เป็นแม่แบบ โดยออกแบบให้มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) *Kpn*I และ *Sal* I ที่ปลายด้าน 5' และ 3' ของยีน NP ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้

NP_*Kpn* I_forward primer 5' -CGC GGG TAC CGC GTC TCA AGG CAC C- 3' โดยลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn* I

NP_*Sal* I_reverse primer 5'-GCA GAT GTC GAC TTA ATT GTC ATA CTC CTC TGC- 3' โดยลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal* I

2.3 การเพิ่มจำนวนยีน NP

ทำการเพิ่มจำนวนยีน NP ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย cDNA ซึ่งเป็นดีเอ็นเอแม่แบบจำนวน 2 μ l 10 pM ของไพรเมอร์ NP-*Kpn*I_F และ NP-*Sal* I_R 1x Expand high fidelity buffer without MgCl₂ (Roche) 10 mM dNTPs 2 mM MgCl₂ และ 1.75 U Tag DNA polymerase (Roche) จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องขยายสารพันธุกรรม (PCR System, Biometra T1 Thermocycler) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR ดังนี้

ขั้น pre-denaturation	94°C	5 นาที
ขั้น denaturation	94°C	30 วินาที
ขั้น annealing	55°C	30 วินาที
ขั้น extension	72°C	90 วินาที
โดยทำปฏิกิริยา PCR 35 รอบ		
ขั้น last-extension	72°C	7 นาที

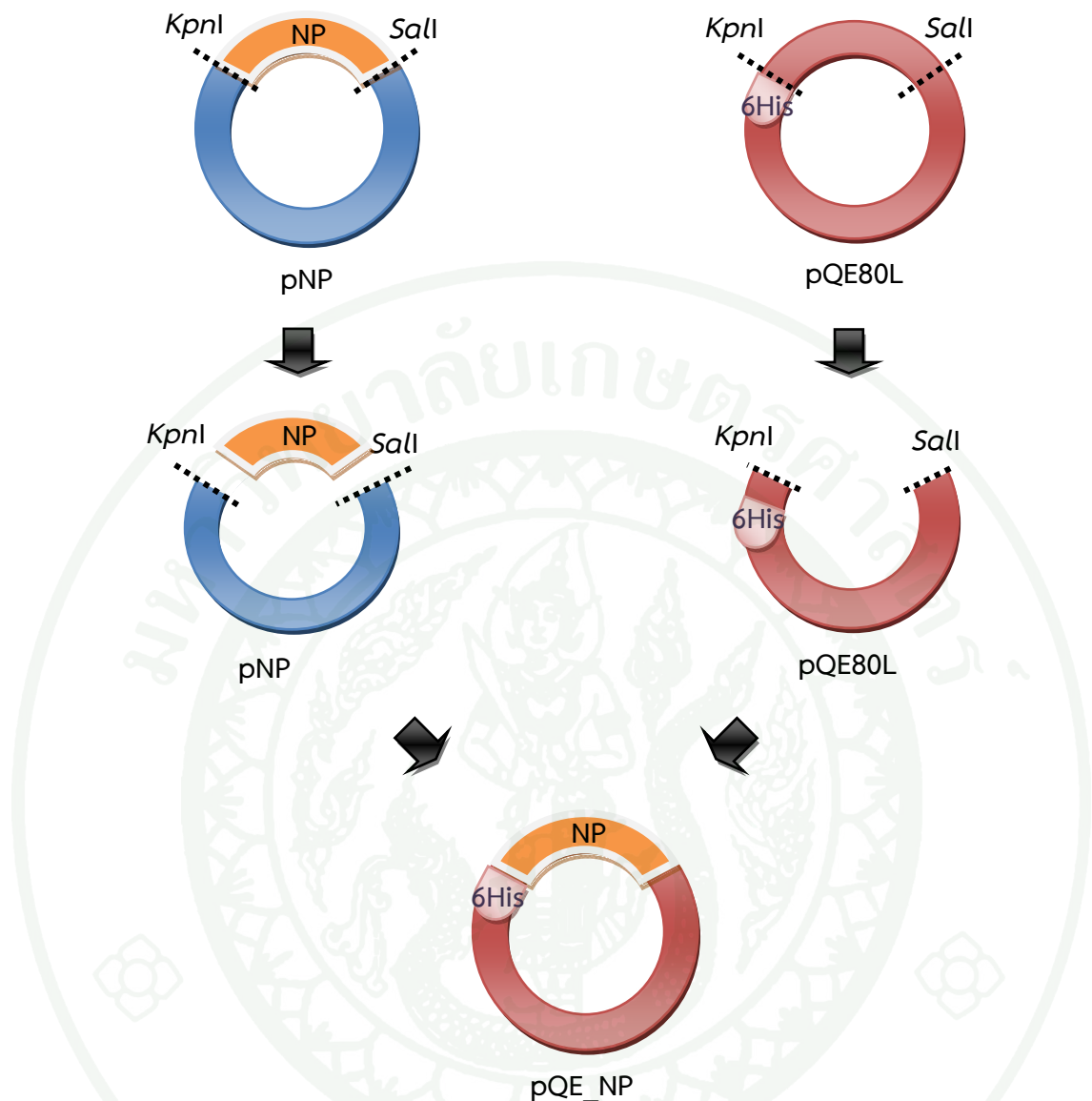
ทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis และทำให้ดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป QIAEXII agarose Gel Extraction Kit (Qiagen)

2.4 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pNP

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เชื่อมต่อกับ pGEMT[®] โดยใช้ pGEMT[®]-easy vector kit (Promega) โดยในปฏิกิริยา ligation 10 µl ประกอบด้วย ชิ้นส่วน DNA ของยีน NP ที่ความเข้มข้น 150 ng/ml 50 ng pGEMT[®]-easy vector ปริมาณ 0.5 µl 2X Rapid Ligation Buffer ปริมาณ 5 µl และ 1U T4 DNA ligase (Promega) ปริมาณ 1 µl ทำการผสมส่วนผสมให้เข้ากันป่มไว้ที่ 23°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host) *E. Coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation และนำส่วนผสม DNA และ *E. coli* ปริมาณ 250 µl มา spread บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 µg ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ml, สาร 100 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) และ X-Gal บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำคืน เพื่อจะคัดเลือกโคโลนีสีขาว ซึ่งเป็นโคโลนีที่มียีน NP ในพลาสมิด จากนั้นตรวจสอบโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี colony PCR screening และเลือก positive clone มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ผสม Ampicillin 100 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อสกัดแยกพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIA prep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN) และส่งพลาสมิดไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen)

2.5 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pQE80L เป็นดีเอ็นเอพาหะ (pQE_NP)

ตัดพลาสมิด pNP และ pQE 80L ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *Sall* (ภาพที่ 9) โดยแยกตัดดังนี้ ปฏิกิริยาแรกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย พลาสมิด pNP หรือ pQE80L ปริมาณ 15 µl, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* ปริมาณ 5 µl, 10X buffer *KpnI* (Fermentas) ปริมาณ 5 µl และน้ำปริมาณ 25 µl บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น แยกพลาสมิด DNA ที่ถูกตัดด้วย *KpnI* ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) และตัดพลาสมิดครั้งที่ 2 ด้วยเอนไซม์ *Sall* ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย พลาสมิด pNP ที่ผ่านการตัดครั้งแรกปริมาณ 15 µl, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SalI* ปริมาณ 2 µl และ 10X restriction buffer ปริมาณ 5 µl และน้ำ 28 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้น แยกชิ้นส่วนยีน NP และ pQE80L ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองด้วย 1% agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) ต่อมาชิ้นนำยีน NP ที่แยกได้มาเชื่อมต่อ (ligation) กับตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ *KpnI* และ *SallI* ของพลาสมิด pQE80L โดยในปฏิกิริยา ligation ปริมาณ 10 µl ประกอบด้วย พลาสมิด pQE80L ปริมาณ 2 µl, ชิ้นยีน NP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะปริมาณ 5 µl, 5X ligation buffer ปริมาณ 2 µl และ T4 DNA ligase 1 U (Invitrogen) บ่มที่ 23°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งพลาสมิด pQE80L มีส่วนของ 6XHis-tag ในโครงสร้างสามารถเชื่อมยีน NP และแสดงออกในลักษณะของรีคอมบิแนนท์โปรตีน NP ที่เชื่อมต่อกับ polyhistidine-tagged (6xHis fusion protein) ในกรอบการอ่านรหัสเดียวกัน



ภาพที่ 9 ภาพวาดแสดงขั้นตอนการโคลนพลาสมิด pQE80_NP เพื่อใช้ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

นำส่วนผสม ligation ที่ได้มาผสมลงในหลอดบรรจุ *E. coli* competent cells สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งใช้เป็น expression host สำหรับการแสดงออกของโปรตีน ด้วยวิธี heat shock transformation จากนั้น นำส่วนผสมดังกล่าวปริมาณ 50 μ l มา spread บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่ผสม Ampicillin ปริมาตร 1 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm เป็นเวลาข้ามคืน คัดเลือก positive colony ด้วยวิธี colony PCR screening และเลือกหนึ่งโคลนมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ผสม Ampicillin ปริมาตร 1 μ g/ml บ่มภายใต้สภาวะเดิมนานข้ามคืน เพื่อสกัดแยกพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIA prep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN) และส่งพลาสมิดไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์

ความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี Clustral W ซึ่งอยู่ในโปรแกรม Lasergene (DNA Star) นำโคลนที่ได้ไปทดสอบการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป

3. การตรวจสอบแสดงออกโปรตีนและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP

3.1 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน NP เบื้องต้น

เพาะเลี้ยงโคลนแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ที่บรรจุพลาสมิด pQE_NP และโคลน pQE ที่ไม่มียีน NP ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 ml ที่ผสม Ampicillin ปริมาตร 1 μ g/ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm เป็นเวลาข้ามคืน สำหรับใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (starter) จากนั้นถ่ายเชื้อตั้งต้น (subculture) ในอัตราส่วน 1:20 ลงในอาหารเหลว LB หลอดใหม่ ปริมาตร 5 ml เลี้ยงเชื้อต่อภายใต้สภาวะเดิมเป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าเชื้อมีความเข้มข้นเพียงพอ เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ได้ประมาณ 0.5-0.7 จึงเติมสารละลาย IPTG ที่ปรับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 mM เพื่อเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน NP เลี้ยงเชื้อต่อที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ (clude cell) จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วย cleaning buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 8.0) ในสัดส่วนเซลล์ 1 กรัมต่อ buffer 5 ml ทำการ vortex ให้เซลล์กระจายตัวและละลายเข้ากันดีในสารละลาย จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที และดูส่วน cleaning buffer ออกให้เหลือไว้เพียงเล็กน้อยเพื่อละลายตะกอนเซลล์ นำส่วนละลายตะกอนดังกล่าวผสมกับ laemmli sample buffer (Bio-RAD, USA) ในอัตราส่วน 1 : 1 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-10 นาที และนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้น ตรวจสอบหาโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ใช้ 4% stacking gel และ 8% separating gel จากนั้นปล่อยกระแสไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ นาน 50 นาที เมื่อครบเวลาย้อมเจลด้วย coomassie brilliant blue-R250 (Sigma) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย destaining solution I นาน 15 นาที และ destaining solution II จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

3.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเหนี่ยวนำ

ทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเหนี่ยวนำต่อการสังเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ด้วยการเติมสารละลาย IPTG (Sigma) ในแต่ละหลอด โดยปรับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 1 mM ตามลำดับ ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่วัดค่า OD ด้วยความยาวคลื่น 600 nm ได้ประมาณ 0.5-0.7 จากนั้นเลี้ยงเชื้อต่อที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลายำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วย cleaning buffer และแบ่ง

ส่วนละลายตะกอนผสมกับ laemmli sample buffer ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที และตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

3.3 การหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทดสอบหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยหลังจากเติมสารเหนี่ยวนำในน้ำเลี้ยงเชื้อที่วัดค่า OD ด้วยความยาวคลื่น 600 nm ได้ประมาณ 0.5-0.7 นั้น นำเชื้อแต่ละหลอดไปบ่มที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 16, 25 และ 37°C ตามลำดับ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วย cleaning buffer และแบ่งส่วนละลายตะกอนผสมกับ laemmli sample buffer ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที และตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

3.4 การหาระยะเวลาที่เหมาะสม

ทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสม โดยหลังจากเติมสารเหนี่ยวนำในน้ำเลี้ยงเชื้อ และนำเชื้อไปบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 0, 4, 6, 8, 10, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลานำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วย cleaning buffer และแบ่งส่วนละลายตะกอนผสมกับ laemmli sample buffer ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที และตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

4. การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในสภาวะ ธรรมชาติ (Native condition)

เตรียมเชื้อตั้งต้น transformant *E. coli* DH5α ที่บรรจุ pQE_NP โดยเฉพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่ผสม Ampicillin ปริมาตร 1 µg/ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นถ่ายเชื้อตั้งต้น (subculture) ในอัตราส่วน 1 : 20 ลงในอาหารเหลว LB ขวดใหม่ และเลี้ยงเชื้อต่อภายใต้สภาวะเดิมเป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าเชื้อมีความเข้มข้นเพียงพอ เมื่อวัดค่า OD ของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ได้ประมาณ 0.5-0.7 จึงเติมสารละลาย 0.2 mM IPTG และเลี้ยงเชื้อต่อภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 225 rpm เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลาทำการปั่นเก็บเซลล์ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งนำหนักตะกอนเซลล์เปียก และล้างด้วย cleaning buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0) ในสัดส่วนเซลล์ 1 กรัมต่อ buffer 5 ml ทำการ vortex ให้เซลล์กระจายตัวและละลายเข้ากันดีในสารละลาย จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูด cleaning buffer ออกแล้วเติม lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF; Protease inhibitor) 1 mg/ml lysozyme 0.1% TritonX, pH 8.0) บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียง Ultrasonic Sonicator (Ultrasonic processor XL, Heat System, Inc., USA) โดยใช้กำลัง 200-250 วัตต์ pulsing 10 วินาที พัก 5 วินาที รวมเวลาทั้งหมด

20 นาที หรือจนกระทั่งสารละลายใสขึ้น โดยต้องรักษาความเย็นของสารละลายตลอดเวลา เมื่อครบกำหนดนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 45 นาที เก็บส่วนใส (soluble protein) ที่อุณหภูมิ 4°C และตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

5. การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในสภาวะเสียสภาพธรรมชาติ (Denaturing condition)

นำส่วนตะกอน (inclusion body) ที่ได้หลังแยกออกจากส่วนใส (soluble protein) ไปละลายด้วย denaturing solubilization buffer (DSB; 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 8 M Urea; pH 8.0) ในสัดส่วนเซลล์ 1 กรัมต่อ buffer 10 ml บ่มสารละลายเซลล์เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงในน้ำแข็ง โดยนำสารละลายมา vortex ทุกๆ 15 นาที หรือบ่มที่ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง (Ultrasonicator) (Ultrasonic processor XL 2020, Heat System, Inc., USA) pulsing นาน 10 วินาที สลับกับการบ่มนาน 10 วินาที รวมเวลา 20 นาที โดยรักษาความเย็นไว้ตลอดเวลา นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 45 นาที เก็บส่วนใส (insoluble protein) ที่อุณหภูมิ 4°C และตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

6. การทำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ให้บริสุทธิ์ในสภาวะเสียสภาพธรรมชาติ (Denature condition) ด้วยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (Affinity chromatography)

6.1 การเตรียมคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี

ขั้นแรกจะทำการซั่ง Protino[®] Ni-IAD Resin (Macherey-NaGel) 1 กรัม (capacity ของ resin 1 g ต่อโปรตีน 20 mg) ลงใน Protino[®] column ใช้แท่งแก้วกดอัด เพื่อให้ resin เรียงตัวกันแน่น และปิดทับด้วย pre-filter จากนั้นปรับสถานะในคอลัมน์ให้มีค่า pH เท่ากับ 8 ด้วย denaturing washing buffer (DSB, 0.05% β-mercaptoethanol, pH 8.0) ปริมาตร 20 ml และปล่อยให้ไหลผ่านคอลัมน์ตามแรงโน้มถ่วง (gravity flow) โดยตลอดการใช้งานต้องไม่ปล่อยให้คอลัมน์แห้ง

6.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

เติมสารละลายโปรตีนส่วนใสที่ถูกละลายด้วย urea ความเข้มข้นสูง (insoluble protein) ลงในคอลัมน์ที่ถูกปิดจุกด้านปลายไว้ บ่มสารละลายโปรตีนในคอลัมน์นานประมาณ 30 นาที และปล่อยให้ไหลผ่านคอลัมน์ เก็บโปรตีนส่วนไหล (flow through) ไว้ทดสอบล้างคอลัมน์ด้วย denaturing washing buffer ปริมาตร 500 ml โดยค่อยๆ เติมและปล่อยให้ไหลผ่านคอลัมน์ตามแรงโน้มถ่วงเพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไปให้มากที่สุด ต่อมาทำการล้างด้วย denaturing washing buffer ผสม 50 mM Imidazole (pH 8.0) ปริมาตร 2 ml โดยแบ่งเก็บสารละลายจากคอลัมน์เป็นช่วง (fraction) ช่วงละ 1 ml ต่อมาทำการล้างด้วย denaturing

washing buffer ผสม 100 mM imidazole (pH 8.0) ปริมาตร 3 ml แบ่งเก็บสารละลายจากคอลัมน์เป็นช่วง (fraction) ช่วงละ 1 ml จากนั้นชะโปรตีนออกด้วย denaturing washing buffer ผสม 250 mM imidazole (pH 8.0) ปริมาตร 8 ml โดยเติมและเก็บสารละลายที่ชะออกมาเป็นช่วง (fraction) ช่วงละ 1 ml จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ถูกชะทิ้ง 8 fraction มารวมกันใส่ในหลอดทำความเข้มข้น Ultrafiltration (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter, Millipore) ขนาดรูเยื่อกรองเลือกผ่าน (cut off) 30 kDa นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าสารละลายเหลือปริมาณประมาณ 1 ml จากนั้นกำจัด imidazole และ β -mercaptoethanol ออก โดยการเจือจางสารละลายโปรตีนด้วย denaturing washing buffer ที่ปราศจาก 0.05% β -mercaptoethanol ลงไปในสารละลายโปรตีนโดยค่อยๆ เติมน้ำฟอสเฟต ครั้งละ 8 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที เติมสารละลายสลับการปั่นเหวี่ยงซ้ำจนกระทั่งเติม denaturing washing buffer ปริมาณโดยรวมเท่ากับ 20 เท่าของสารละลายโปรตีนเริ่มต้น (1 ml) ดูดเก็บสารละลายโปรตีนในหลอดสะอาด และผสม Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) 1 μ g/ml และ 20% glycerol แบ่งเก็บโปรตีนเพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE

6.3 การปรับลดความเข้มข้นของ Urea ด้วยวิธี step-wise dilution

นำสารละลาย insoluble protein ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (จากข้อ 6.2) หยดลงใน dilution buffer (50mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.4M L-Arginine) ที่ผสม 6 M Urea ปริมาตร 5 ml โดยค่อยๆ หยดสารละลายโปรตีนที่ละน้อยลงในหลอดจนหมด ทำการกวนบับเบิลเบาๆ และรักษาความเย็นไว้ตลอดเวลา บ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลายที่อยู่ใน 6 M Urea dilution buffer ลงใน dilution buffer ที่ผสม 4 M Urea ปริมาตร 5 ml ทำซ้ำตามวิธีข้างต้น โดยลดความเข้มข้นของ urea ใน dilution buffer จาก 4 M และ 2 M ตามลำดับ จนกระทั่งความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนผสมอยู่ใน 2 M urea dilution buffer นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงผ่านหลอดทำความเข้มข้น Ultrafiltration (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter, Millipore) ขนาดรูเยื่อกรองเลือกผ่าน (cut off) 30 kDa ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าสารละลายเหลือปริมาณประมาณ 1-1.5 ml และดูดสารละลายใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 2 ml นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสใส่หลอดสะอาด ผสม PMSF 1 μ g/ml และ 20% glycerol แบ่งโปรตีนไปทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA protein assay coloric method โดยใช้ชุดสำเร็จรูป (BCA, PIERCE) และยืนยันความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot ต่อไป

7. การทำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ให้บริสุทธิ์ในสภาวะธรรมชาติ (Native condition) ด้วยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (Affinity chromatography)

หลังจากเตรียมคอลัมน์และปรับสภาวะภายในคอลัมน์ด้วย native washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0.05% β-mercaptoethanol, pH 8.0) แล้ว จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย soluble protein ลงในคอลัมน์ที่ถูกปิดจุกด้านปลายไว้ บ่มสารละลายโปรตีนในคอลัมน์นานประมาณ 30 นาที จากนั้นปล่อยสารละลายไหลผ่านคอลัมน์ เก็บโปรตีนส่วนไหล (flow through) ไว้ทดสอบ ล้างคอลัมน์ด้วย native washing buffer ปริมาตร 500 ml โดยค่อยๆ เติมและปล่อยให้ไหลผ่านคอลัมน์ตามแรงโน้มถ่วงเพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไป ต่อมาทำการชะล้างด้วย native washing buffer ผสม 50 mM Imidazole (pH 8.0) ปริมาตร 2 ml โดยแบ่งเก็บสารละลายจากคอลัมน์เป็นช่วง (fraction) ช่วงละ 1 ml ต่อมาทำการชะล้างด้วย native washing buffer ผสม 100 mM imidazole (pH 8.0) ปริมาตร 3 ml แบ่งเก็บสารละลายจากคอลัมน์เป็นช่วง (fraction) ช่วงละ 1 ml จากนั้นชะโปรตีนออกด้วย native washing buffer ผสม 250 mM imidazole (pH 8.0) ปริมาตร 8 ml โดยเติมและเก็บสารละลายที่ชะออกมาเป็นช่วง (fraction) ช่วงละ 1 ml จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ถูกชะทิ้ง 8 fraction มารวมกันใส่ในหลอดทำความเข้มข้น Ultrafiltration (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter, Millipore) ขนาดรูเยื่อกรองเลือกผ่าน (cut off) 30 kDa. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm อุณหภูมิ 4°C จนกว่าสารละลายเหลือปริมาณประมาณ 1 ml จากนั้นกำจัด imidazole และ β-mercaptoethanol ออก โดยการเจือจางสารละลายโปรตีนด้วย native washing buffer ที่ปราศจาก 0.05% β-mercaptoethanol ปริมาณโดยรวมเท่ากับ 20 เท่าของสารละลายโปรตีนเริ่มต้น ลงไปในสารละลายโปรตีน และนำไปปั่นเหวี่ยงในหลอดทำความเข้มข้น Ultrafiltration ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที โดยค่อยๆ เติมบัฟเฟอร์ ครั้งละ 10 ml สลับการปั่นเหวี่ยง ทำซ้ำจนกระทั่งได้สารละลายโปรตีนประมาณ 1-1.5 ml ดูดเก็บสารละลายโปรตีนในหลอด Microcentrifuge และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ถ่ายสารละลายโปรตีนส่วนใสใส่ในหลอดสะอาด ผสม PMSF 1 μg/ml และ 20% glycerol เพื่อช่วยรักษาสภาพโปรตีน จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่ได้มาทำการแยกตามขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA protein assay coloric method โดยใช้ชุดสำเร็จรูป (BCA, PIERCE) และยืนยันความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot ต่อไป

8. การวิเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ด้วยเทคนิค Western blot

ทำการตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และทดสอบความจำเพาะของโปรตีนด้วยเทคนิค Western Blot โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ histidine tag และแอนติบอดีซีรัมที่ได้จากสุกรที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร ในการยืนยันว่า โปรตีนที่ถูกผลิตได้นั้นเป็นโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP โดยโปรตีนที่มีการแสดงออกมานั้น จะเชื่อมติดอยู่กับ Histidine 6 โมเลกุลทางด้านปลาย N ซึ่งจะใช้

antibody ที่จำเพาะต่อ Histidine tag (anti-Histag) ในการยืนยันการแสดงออกของ Fusion protein และตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนต่อแอนติบอดีของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร โดยเริ่มจากแยกโปรตีนตามขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE ผ่าน 8% polyacrylamide gel ปล่อยกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาทำการย้าย 8% polyacrylamide gel และวางลงบน nitrocellulose membrane (Bio-RAD) ที่มีขนาดรูพรุน 0.2 μm จากนั้น ประกอบเครื่องส่งถ่ายโปรตีน และเติม transfer blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Methanol, pH 8.2) ที่เย็นลงใน chamber และปล่อยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที โปรตีนจะถูกส่งถ่ายจาก polyacrylamide gel ไปสู่ Nitrocellulose membrane เมื่อครบเวลาล้าง Nitrocellulose membrane ด้วย western blot washing buffer (TBST; 50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) ปริมาตร 10 ml โดยบ่มบน rocking platform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้งเท washing buffer ออก และเติม blocking buffer ซึ่งประกอบด้วย TBST และ 3% BSA ปริมาตร 10 ml หรือให้ท่วมแผ่น membrane เพื่อป้องกันการจับที่ไม่จำเพาะของ antibody โดยบ่มที่ 4°C ซ้ำคืน จากนั้น เท blocking buffer ทิ้ง และเติม primary antibody ซึ่งเป็น anti-histidine tag monoclonal IgG antibody (USbiological) ที่เจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1 : 1,000 หรือแอนติบอดีของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA เจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1 : 200 ปริมาตร 10 ml หรือให้ท่วมแผ่น membrane บ่มบน rocking platform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย western blot washing buffer ปริมาตร 10 ml บ่มบน rocking platform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้งและเติม secondary antibody โดยใช้ anti mouse IgG ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (Sigma) ที่เจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1 : 1,000 สำหรับการตรวจสอบ His-tag หรือ anti pig IgG ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (Sigma) ที่เจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1 : 500 สำหรับการตรวจสอบแอนติบอดีของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร ปริมาตร 10 ml บ่มบน rocking platform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย western blot washing buffer ปริมาตร 10 ml บ่มบน rocking platform ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง และบ่มด้วย TBS ปริมาตร 10 ml นาน 5 นาที ตรวจสอบปฏิกิริยาของเปอร์ออกซิเดสด้วย 3,3-diaminobenzidine (DAB; Amresco, USA) ปริมาตร 10 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนกว่าจะสังเกตเห็นแถบสีน้ำตาลเข้มของโปรตีนเกิดขึ้นแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

9. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA protein assay colorimetric method

เตรียมโปรตีนมาตรฐานจาก Bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 2 mg/ml ให้มีความเข้มข้นครอบคลุมสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยการเจือจางด้วย PBS ดังตารางที่ 4 สำหรับการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นที่ 25-2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ และเตรียมความเข้มข้นโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่เจือจาง 2 เท่า (two-fold dilutions) ดังนี้ 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 และ 1 : 10 หรือพิจารณาจากความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างว่ามีความเข้มข้นสูงหรือไม่

ตารางที่ 4 แสดงการเตรียมความเข้มข้นของอัลบูมินมาตรฐาน ($\mu\text{g/ml}$)

หลอด	ปริมาตรของสารเจือจาง(μl)	ปริมาตรของ BSA	ความเข้มข้นสุดท้ายของ BSA ($\mu\text{g/ml}$)
A	0	300 μl ของ stock	2,000
B	125	375 μl ของ stock	1,500
C	325	325 μl ของ stock	1,000
D	175	175 μl ของหลอด B	750
E	325	325 μl ของหลอด C	500
F	325	325 μl ของหลอด E	250
G	325	325 μl ของหลอด F	125
H	400	100 μl ของหลอด G	25

ทดสอบการหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ชุดตรวจ BCA (Pierce) แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) โดยเริ่มจากเติม diluent ที่ใช้เป็น blank ลงใน microplate ขนาด 96 หลุม จำนวน 3 หลุมๆ ละ 25 μl หลุมถัดมาเติมอัลบูมินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น ตามลำดับ และหลุมถัดมาเติมโปรตีนตัวอย่างหลุมละ 25 μl เช่นกัน จากนั้นผสม reagent A และ B ในอัตราส่วน 50 : 1 เข้าด้วยกัน และเติมลงในหลุมทดสอบแต่ละหลุมๆ ละ 200 μl เขย่าๆ เบาลให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลุมที่มีโปรตีนจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง และนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง Multimode reader (Bacmann) ซึ่งหลักการทำงาน คือ ให้แสงอัลตราไวโอเล็ตหรือแสงในช่วงที่มองเห็นได้ฉายผ่านสารละลายชีวโมเลกุล พลังงานแสงจะกระตุ้นอิเล็กตรอนของสารชีวโมเลกุล ทำให้ดูดพลังงานแสงบางส่วนไว้ ดังนั้นแสงที่ผ่านออกมาจึงมีความเข้ม (intensity) น้อยลง นอกจากนี้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) หรือ OD ยังมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้น (c) ของชีวโมเลกุลในสารละลายตามกฎของ Beer-Lambert ดังนี้

$$A = \log_{10} (I_0/I) = Kcl$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงและไม่มีหน่วย

I_0 และ I = ความเข้มของแสงที่ฉายเข้าไปและที่ผ่านออกมาตามลำดับ

c = ความเข้มข้นของชีวโมเลกุลเป็น Molar (M)

l = ความหนาของสารละลายที่แสงผ่านเป็นเซนติเมตร

k = ค่าคงที่เรียกว่า molar extinction coefficient

เมื่อ l = 1cm (k มีหน่วยเป็น $\text{K}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

จากนั้น นำค่า OD ความเข้มข้นของอัลบูมินมาตรฐานมาคำนวณหาความสัมพันธ์กับค่า OD ของความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง

10. การเพาะเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 และ H3N2

เลี้ยงเซลล์ Mardin-Darby Canine Kinney (MDCK) ให้มีลักษณะเป็น monolayer ใน 96 well plate ให้มีการเจริญเติบโตประมาณ 80% ของพื้นที่หลุมเคาะเอาน้ำเลี้ยงเซลล์ออกและล้างด้วย 1X PBS 1 ครั้ง โดยในการทดลองออกแบบให้แต่ละตัวอย่างซีรัม ต้องทดสอบต่อทั้งไวรัสไข้หวัดสุกร A/swine/Thailand/KU-1/09 (H1N1) และ A/swine/Thailand/KU 21/07 (H3N2) ดังนั้นจึงต้องเพาะเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดแยกกัน และในขณะเดียวกันไวรัสจะถูก inoculate ลงเฉพาะในหลุมคอลัมน์เลขคี่ของเพลตเท่านั้น หลุมละ 50 μ l สำหรับเป็นหลุมทดสอบ (positive well) โดยที่หลุมคอลัมน์เลขคู่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสเป็นหลุมควบคุม (negative well) แสดงแผนผังการเพาะไวรัสในเพลตทดสอบดังภาพที่ 10 ทำเช่นนี้ทั้งเพลตของไวรัส H1N1 และเพลตไวรัส H3N2 จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้บอดูอุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจึงเติม inoculating media (MEM, 2 μ g/ml trypsin, 0.3% Bovine serum albumin และ 2% L-glutamine) ลงไปหลุมละ 150 μ l นำไปเลี้ยงที่สภาวะเดิมและสังเกตผลทางพยาธิวิทยาในเซลล์ (cytopathic effect; CPE) เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะเกิด CPE ประมาณ 50-60% ในแต่ละหลุม จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติม absolute methanol หลุมละ 200 μ l บ่มนาน 20 นาที เพื่อตรึงเซลล์ เมื่อครบเวลาเท absolute methanol ทิ้งแล้วจึงปล่อยให้เพลตแห้งประมาณ 10 นาที สามารถเก็บเพลตไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอทดสอบต่อไป

	V ₁	C ₂	V ₃	C ₄	V ₅	C ₆	V ₇	C ₈	V ₉	C ₁₀	V ₁₁	C ₁₂
A	T1	T1	T9	T9	T17	T17	T25	T25	T33	T33	T41	T41
B	T2	T2	T10	T10	T18	T18	T26	T26	T34	T34	T42	T42
C	T3	T3	T11	T11	T19	T19	T27	T27	T35	T35	T43	T43
D	T4	T4	T12	T12	T20	T20	T28	T28	T36	T36	T44	T44
E	T5	T5	T13	T13	T21	T21	T29	T29	T37	T37	T45	T45
F	T6	T6	T14	T14	T22	T22	T30	T30	T38	T38	T46	T46
G	T7	T7	T15	T15	T23	T23	T31	T31	T39	T39	NC	NC
H	T8	T8	T16	T16	T24	T24	T32	T32	T40	T40	PC	PC

V หมายถึง เซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส ด้วยไวรัสและเกิด CPE (หลุมทดสอบ)

C หมายถึง เซลล์ปกติ (หลุมควบคุม)

T หมายถึง ตัวอย่างซีรัมที่จะทำการทดสอบ

NC หมายถึง ซีรัมควบคุมลบ

PC หมายถึง ซีรัมควบคุมบวก

ภาพที่ 10 แผนผังการเพาะไวรัสลงในเพลตทดสอบ

11. การทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อ SIV ในซีรัมสุกรด้วยวิธี Immunofluorescent assay (IFA)

ล้างเซลล์ MDCK ที่ถูกตรึงเซลล์แล้วด้วย PBST washing buffer (PBS, 0.1% tween 20) หลุมละ 200 μ l ซ้ำ 5 ครั้ง และเติมตัวอย่างซีรัมแม่สุกรที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 100 ด้วย PBST washing buffer หลุมละ 40 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST washing buffer ปริมาตร 200 μ l นาน 30 วินาที ซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นเจือจาง secondary antibody ในอัตราส่วน 1 : 200 ด้วย PBST washing buffer ซึ่งเป็น Polyclonal antibody ต่อ IgG ของสุกรที่ติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (anti-Pig IgG-FITC) เติม หลุมละ 40 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วย PBST washing buffer ปริมาตร 200 μ l นาน 30 วินาที ซ้ำ 5 ครั้ง และอ่านผลภายใต้กล้อง fluorescent microscope โดยตัดสีนผลบวกจากเซลล์ในหลุมทดสอบที่เรืองแสงสีเขียวสว่าง (bright apple green fluorescence) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์หลุมควบคุมที่ไม่ติดสีเรืองแสง ขณะที่ผลลบจะตัดสีนจากการที่เซลล์ไม่เรืองแสงสีเขียวเช่นเดียวกับเซลล์ในหลุมควบคุม ทั้งนี้หลังจากอ่านผลสามารถเก็บเพลตทดสอบไว้ที่ 4°C โดยเติม steriled glycerol ที่เจือจางด้วยน้ำ Distilled water (DW) ในอัตราส่วน 1 : 50 หลุมละ 50 μ l และห่อเพลตทดสอบด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เพื่อป้องกันแสง

12. การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของ NP ELISA ด้วยวิธี checker-board titration

12.1 การหาปริมาณแอนติเจน NP และซีรัมที่เหมาะสม

นำสารละลายโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP บริสุทธิ์ ซึ่งใช้เป็น แอนติเจน NP มาเจือจางด้วย coating buffer (carbonate buffer, pH 9.6) ให้มีความเข้มข้น 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 μ g/ml (ภาพที่ 11) จากนั้นเติมสารละลายโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ปริมาตร 100 μ l ลงในแต่ละหลุมของ ELISA plate ขนาด 96 หลุม โดยเติมสารละลายโปรตีนจากความเข้มข้นมากไปน้อยในแต่ละแถวของเพลตจากแถว A ถึง H ตามลำดับ ดังภาพที่ 11 บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และล้างเพลตด้วย PBST washing buffer ปริมาตร 200 μ l นาน 30 วินาที ซ้ำ 5 ครั้ง

เติม conjugate ซึ่งเป็น anti-pig IgG ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (Sigma) ที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 2,000 ใน 0.1% milk diluent หลุมละ 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย washing buffer ปริมาตร 200 μ l นาน 30 วินาที ล้างซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นเติม substrate (ABTS[®] Peroxidase Substrate System, KPL) หลุมละ 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate โดยการเติม 1% SDS ปริมาณ 100 μ l ในแต่ละหลุม แล้วนำไปอ่านผลค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง Multimode ELISA reader (Beckmann) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อประเมินอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างซีรัมและแอนติเจน NP

12.3 การหาความเข้มข้นของสารละลายเจือจาง (Diluent) ที่เหมาะสม

เคลือบเพลตด้วยสารละลายโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่เจือจางด้วย coating buffer (pH 9.6) ให้มีความเข้มข้น 1 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเพลตด้วย washing buffer ซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นเจือจางตัวอย่างซีรัมสุกรที่ติดเชื้อไวรัสไขหวัดสุกรในอัตราส่วน 1 : 100 ด้วยสารละลายเจือจาง ดังนี้

- ก. 0.1% milk diluent ใน PBST, pH 7.2-7.4
- ข. 0.1% Skim milk ใน PBST, pH 7.5-7.6
- ค. 0.5 % Skim milk ใน PBST, pH 7.5-7.6
- ง. 1% Skim milk ใน PBST, pH 7.5-7.6
- จ. 2% Skim milk ใน PBST, pH 7.5-7.6
- ฉ. 5% Skim milk diluent ใน PBST, pH 7.5-7.6

เติมซีรัมสุกรที่เจือจางแล้วลงในหลุมๆ ละ 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย PBST washing buffer ซ้ำ 5 ครั้ง และเติม anti-pig IgG ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (Sigma) ที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 2,000 ด้วย diluents ชนิดเดียวกันกับที่เจือจางซีรัม หลุมละ 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย washing buffer ซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นเติม substrate ปริมาตรหลุมละ 100 μ l บ่มอุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate โดยการเติม 1% SDS ปริมาณ 100 μ l ในแต่ละหลุมแล้วนำไปอ่านผลค่า OD ที่ 405 nm ด้วยเครื่อง Multimode ELISA reader (Beckmann)

13. การตรวจหาแอนติบอดี IgG ต่อเชื้อไข้หวัดสุกร ไทป์ A โดยวิธี Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

นำสารละลายโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในสภาวะธรรมชาติมาเจือจางด้วย coating buffer (carbonate buffer, pH 9.6) ให้มีความเข้มข้น 1 µg/ml จากนั้นเติมสารละลายโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ลงในหลุมของ ELISA plate ขนาด 96 หลุมๆ ละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และล้างเพลตด้วย PBST washing buffer ปริมาตร 200 µl นาน 30 วินาที ล้างซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นเติมตัวอย่างซีรัมสุกรที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 100 ด้วย 5% Skim milk diluents (5% skim milk ใน PBST, pH 7.5-7.6) หลุมละ 100 µl ตามแผนผังในภาพที่ 13 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย PBST washing buffer ปริมาตร 200 µl นาน 30 วินาที ล้างซ้ำ 5 ครั้ง และเติม conjugate ที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 2,000 ด้วย 5% Skim milk diluent หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย PBST washing buffer ปริมาตร 200 µl นาน 30 วินาที ล้างซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นเติม substrate (ABTS[®] Peroxidase Substrate System, KPL) หลุมละ 100 µl บ่มอุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate โดยการเติม 1% SDS ปริมาณ 100 µl ในแต่ละหลุมแล้วนำไปอ่านผลค่า OD ที่ 405 nm ด้วยเครื่อง Multimode ELISA reader (Beckmann)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	T3	T7	T11	T15	T19	T23	T27	T31	T35	T39	T43
B	NC	T3	T7	T11	T15	T19	T23	T27	T31	T35	T39	T43
C	PC	T4	T8	T12	T16	T20	T24	T28	T32	T36	T40	T44
D	PC	T4	T8	T12	T16	T20	T24	T28	T32	T36	T40	T44
E	T1	T5	T9	T13	T17	T21	T25	T29	T33	T37	T41	T45
F	T1	T5	T9	T13	T17	T21	T25	T29	T33	T37	T41	T45
G	T2	T6	T10	T14	T18	T22	T26	T30	T34	T38	T42	T46
H	T2	T6	T10	T14	T18	T22	T26	T30	T34	T38	T42	T46

ภาพที่ 13 แผนผังเพลต NP ELISA โดยหนึ่งเพลตประกอบด้วย หลุมสำหรับซีรัมควบคุมบวก (PC), ซีรัมควบคุมลบ (NC), และหลุมสำหรับซีรัมจำนวน 46 หลุม (T)

14. การประเมินความคงที่ของผลตรวจโดย NP ELISA (Measurement of Repeatability)

14.1 ความคงที่ของผลการตรวจภายในเพลต

เริ่มจากเคลือบเพลตด้วยโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ให้มีความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ ใน coating buffer (pH 9.6) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเพลตด้วย washing buffer ซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นเติมตัวอย่างซีรัมสุกรเจือจางในอัตราส่วน 1 : 100 ด้วย 5% skim milk diluent (7.5-7.6) โดยเลือกตัวอย่างซีรัมของสุกร จำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง ทำ 3 ซ้ำภายใน plate เดียวกัน แต่ตำแหน่งต่างกัน ดังภาพที่ 14 หลุมละ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย PBST washing buffer ปริมาตร 200 μl นาน 30 วินาที ล้างซ้ำ 5 ครั้งและเติม anti-pig IgG ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (Sigma) ที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 2,000 ด้วย 5% skim milk diluent (7.5-7.6) หลุมละ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ล้างเพลตด้วย PBST washing buffer ซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นเติม substrate หลุมละ 100 μl บ่มอุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที เติม 1% SDS ปริมาณ 100 μl เพื่อหยุดปฏิกิริยาในแต่ละหลุม นำไปอ่านผลค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง Multimode ELISA reader คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ (%) ค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร (CV) ของแต่ละตัวอย่าง

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	T3	T7	T11	T15	T4	T8	T12	T1	T5	T9	T13
B	NC	T3	T7	T11	T15	T4	T8	T12	T1	T5	T9	T13
C	PC	T4	T8	T12	T1	T5	T9	T13	T2	T6	T10	T14
D	PC	T4	T8	T12	T1	T5	T9	T13	T2	T6	T10	T14
E	T1	T5	T9	T13	T2	T6	T10	T14	T3	T7	T11	T15
F	T1	T5	T9	T13	T2	T6	T10	T14	T3	T7	T11	T15
G	T2	T6	T10	T14	T3	T7	T11	T15	T4	T8	T12	
H	T2	T6	T10	T14	T3	T7	T11	T15	T4	T8	T12	

ภาพที่ 14 แผนภาพเพลตการทดสอบความคงที่ภายในเพลตของ NP ELISA ประกอบด้วยหลุมสำหรับซีรัมควบคุมบวก (PC), ซีรัมควบคุมลบ (NC), และหลุมสำหรับซีรัมตัวอย่าง (S) ซึ่งแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำในตำแหน่งที่ต่างกัน

14.2 ความคงที่ของผลการตรวจระหว่างเพลต

การทดสอบความคงที่ของผลตรวจตัวอย่างซีรัมระหว่างเพลต ใช้ตัวอย่างซีรัมของสุกรชุดเดียวกันกับการทดสอบความคงที่ภายในเพลต และหยอดซีรัมที่ตำแหน่งเดียวกัน แต่ต่าง Plate กันตามวิธีข้างต้น อ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ (%) CV ระหว่างเพลตของแต่ละตัวอย่าง โดยใช้สูตรดังนี้

$$CV = \sigma/\mu; \sigma = \text{standard deviation}, \mu = \text{mean}$$

15. การกำหนดค่า cut off ของ NP ELISA

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไขหวัดสุกรไพบี A ด้วยวิธี IFA ซึ่งใช้เป็นวิธีตรวจมาตรฐาน (Gold standard) ในการแยกซีรัมลบบอกจากซีรัมบวก โดยมีจำนวนซีรัมบวกและลบที่นำมาคำนวณทั้งสิ้น 1,230 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลค่า OD ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี Indirect NP ELISA เพื่อกำหนดค่าจุดตัดที่เหมาะสม (cut off) ด้วยวิธี Receiver operating characteristic (ROC) analysis และคำนวณค่าความถูกต้องในการวินิจฉัย (accuracy) ความไวในการวินิจฉัย (diagnostic sensitivity; DSN) และความจำเพาะในการวินิจฉัย (diagnostic specificity; DSP) ของชุดตรวจ NP ELISA โดยใช้ cutoff ที่คำนวณได้ซึ่งค่าต่างๆมีสูตรในการคำนวณดังนี้

$$DSN = TP/(TP+FN) \times 100$$

เมื่อ TP คือ ค่าที่ให้ผลบวกของวิธีการทดสอบแบบ NP ELISA ตรงค่ากับวิธีมาตรฐาน และ FN คือ ค่าที่ให้ผลลบของวิธีการทดสอบแบบ NP ELISA แต่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน

$$DSP = TN/(TN+FP) \times 100$$

เมื่อ TN คือ ค่าที่ให้ผลลบของวิธีการทดสอบแบบ NP ELISA ตรงค่ากับวิธีมาตรฐาน และ FP คือ ค่าที่ให้ผลบวกของวิธีการทดสอบแบบ NP ELISA แต่ให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน

$$\text{Accuracy} = (TP+TN)/\text{จำนวนซีรัมทั้งหมดที่ทำกรทดสอบ} \times 100$$

16. คำนวณหา degree of agreement หรือ Kappa (κ) value

ตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SIV จากตัวอย่างซีรัมสุกรด้วยชุดตรวจสอบ NP ELISA ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค IFA นำข้อมูลการเปรียบเทียบที่ได้มาวิเคราะห์หาค่า kappa (κ) value โดยมีวิธีการดังนี้โดยคำนวณตามตารางที่ 5 และสูตรข้างล่าง

ตารางที่ 5 ค่าสมมุติในการคำนวณค่า κ

	IFA positive	IFA negative	Total
NP positive	P11	P12	P1.
NP negative	P21	P22	P2.
Total	P.1	P.2	1

P = cell probability

$$p_o = P_{11} + P_{22}$$

$$p_e = P_{.1}P_{1.} + P_{.2}P_{2.}$$

$$\text{Kappa value } (\kappa) = (p_o - p_e) / (1 - p_e)$$

โดยที่ $\kappa = 0.21-0.40$ = Fair

$\kappa = 0.41-0.60$ = Moderate

$\kappa = 0.61-0.80$ = Substantial

$\kappa = 0.81-1.00$ = Almost perfect

17. การคำนวณทางสถิติ

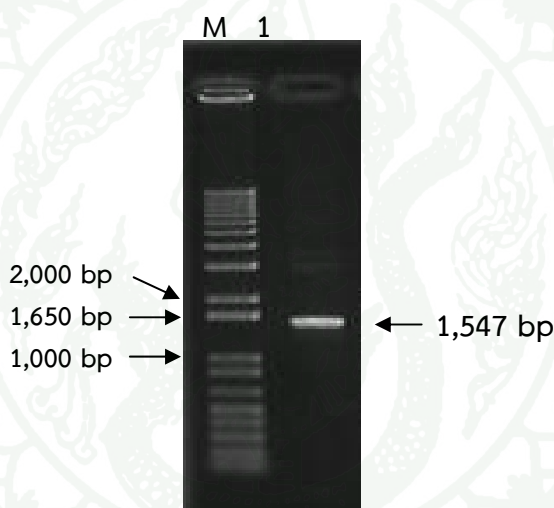
ทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างค่าเฉลี่ย OD ของแต่ละฟาร์มในแต่ละภาคในปี 2552 ถึง 2553 โดยใช้วิธี Generalized linear model ซึ่งปรากฏอยู่ใน GLM procedure ของ SAS version 9.2 หลังจากที่ได้ผล ANOVA ปรากฏความแตกต่างของค่าเฉลี่ย OD ทำการวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยในเดือนนั้นๆ หรือฟาร์มนั้นๆ โดยวิธี Tukey's post-hoc comparison

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การโคลนยีน NP เต็มสายของไวรัสไข้หวัดสุกรชนิด H1N1 A/swine/IA/15/30

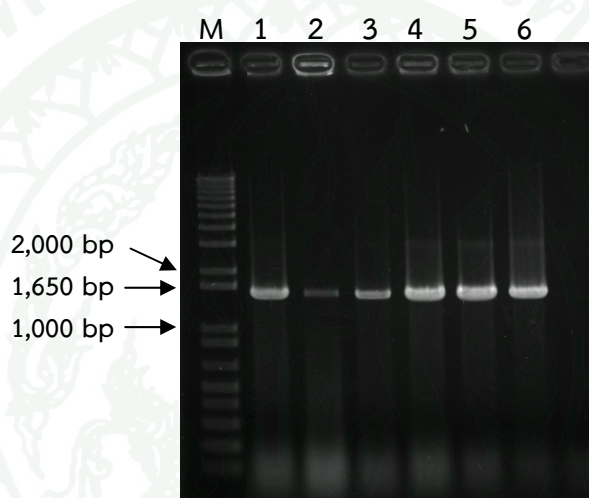
การสังเคราะห์ cDNA สำหรับใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน NP โดยใช้ไพรเมอร์ NP_KpnI_forward primer และ NP_SalI_reverse primer ซึ่งออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน NP และมีตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ KpnI ที่ปลายด้าน 5' และเอนไซม์ SalI ที่ปลายด้าน 3' ของสายแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ปรากฏว่า เมื่อนำมาแยกขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบแถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 1,547 คู่เบส (bp) ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ผลผลิตของ PCR ของยีน NP ผ่าน 1% agarose gel electrophoresis โดย M คือ 1Kb Plus DNA ladder และช่องที่ 1 คือ ผลของชิ้นยีน NP ขนาดประมาณ 1,547 คู่เบส

นำชิ้น DNA ที่ได้เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pGEM_T easy ซึ่งเป็น TA cloning vector โดยอาศัยการเชื่อมกันระหว่างเบส deoxythymidine (T) ที่ปลายด้าน 3' ของพลาสมิด กับเบส deoxyadenosine (A) ที่ปลายด้าน 3' ของชิ้น DNA ที่ได้จากปฏิกิริยา nontemplate-dependent activity จากการทำงานของ Taq polymerase ได้เป็นพลาสมิด pNP จากนั้นจึงถ่ายฝาก pNP เข้าสู่แบคทีเรีย *E. Coli* สายพันธุ์ DH5 α ทำการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด (transformant) โดยดูจากสีของโคโลนี (Blue-white colony screening) และความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินซึ่งโคโลนีที่มียีน NP สอดแทรก (insert) เข้าไปอยู่ในพลาสมิดจะให้โคโลนีสีขาวเนื่องจาก NP ถูกแทรกเข้าไปในยีน β -galactosidase (lac Z) ทำให้เอนไซม์สูญเสียหน้าที่จึงไม่สามารถย่อยยาสาร X-gal เป็นสารสีฟ้าได้ส่วนโคโลนีที่ไม่มียีน NP สอดแทรกเข้าไปจะให้โคโลนีเป็นสีฟ้าซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินได้เช่นเดียวกัน ดังนั้น

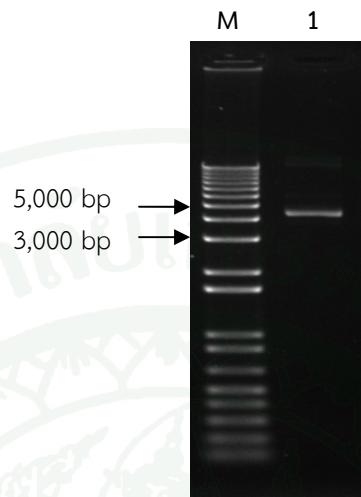
จึงเลือกโคลนีสี่ขวามายืนยันการปรากฏของยีน NP ด้วยเทคนิค colony PCR ได้ผลการคัดเลือกโคลนของ pNP ดังภาพที่ 16 ซึ่งทุกโคลนที่เลือกมาให้ผลบวก (positive clone) ทั้งหมด จึงเลือกโคลนที่ 6 ให้ชื่อว่า pNP_6 มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิด ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรวจสอบความถูกต้องด้วยโปรแกรม EditSeq (DNASTAR) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NP และกรอบการอ่านรหัส (open reading frame) มีความถูกต้อง และพบจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แทรกในสายพันธุกรรมของยีน NP เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NP โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ Nation Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) พบมีความคล้ายคลึงกับยีน NP ของ A/swine/lowa/15/1930 มากที่สุด



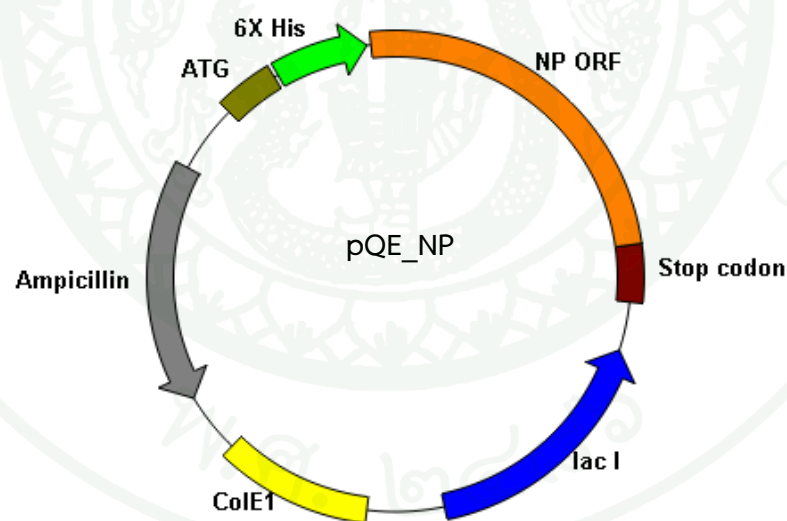
ภาพที่ 16 1% gel electrophoresis (A) การคัดเลือกโคลนของ pNP จากแบคทีเรีย *E. Coli* สายพันธุ์ DH5 α โดย M คือ 1Kb Plus DNA ladder และ ช่องที่ 1-6 ซึ่งปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 1,547 bp คือ โคลนที่ให้ผลบวก (positive clone)

จากนั้นอาศัยแบคทีเรียเพิ่มจำนวนพลาสมิด pNP_6 สกัดแยกพลาสมิดจาก *E. coli* และตัดพลาสมิด pNP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *SalI* เพื่อแยกยีน NP สำหรับเชื่อมต่อกับพลาสมิด pQE80L expression บริเวณตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *SalI* ทำการถ่ายฝากพลาสมิด pQE_NP เข้าสู่ *E. Coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่ออาศัยการแสดงออกของโปรตีนผ่านระบบ prokaryotic cell ตรวจสอบโคลนนี้ด้วยวิธี colony PCR ซึ่งทุกโคลนที่เลือกมาให้ผลบวก (positive clone) ทั้งหมด จึงเลือกโคลนที่ 5 และให้ชื่อว่า pQE_NP_5 มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิด ดังภาพที่ 17 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเลือกโคลนที่ให้ผลบวกมาเพิ่มจำนวนสกัดแยกพลาสมิดเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนพบว่าได้ลำดับเบสของ NP ที่ถูกต้อง และกำหนดรหัสการสร้างโปรตีนขนาด 516 กรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสและกรดอะมิโนกับที่มีรายงานใน GenBank ด้วยโปรแกรม Clustal

W พบว่า อยู่ภายใน open reading frame ที่เชื่อมเข้า histidine tag ของ pQE-80L อย่างถูกต้อง ดังภาพที่ 18และ19



ภาพที่ 17 แลบบลาสมิติ pQE_NP_5 ขนาดประมาณ 6,200 bp โดย M คือ 1Kb Plus DNA ladder และ ช่องที่ 1 คือ พลาสมิติ pQE80L ซึ่งสอดแทรกยีน NP



ภาพที่ 18 พลาสมิติ pQE_NP_5 ซึ่งประกอบด้วยจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ (ColE1), lac operon, ampicillin resistant gene, 6xHistag ที่สามารถเชื่อมต่อกับยีน NP (1,547 bp) เป็นกรอบการอ่านรหัสเดียวกัน

1 atgagaggatcgcatcaccatcaccatcacggatccgcatgagctcggtagcgtaccgctct
 M R G S H H H H H H G S A C E L G T A S
 61 caaggcaccacaaacgatcatacgaacaaatggaaactggtaggagaacgccagaatgccacg
 Q G T K R S Y E Q M E T G G E R Q N A T
 121 gaaatcagagcatctgtcggagaatgattggtaggaattggaagattctacatccaaatg
 E I R A S V G R M I G G I G R F Y I Q M
 181 tgcaccgaactcaaactcagtgattatgagggacggctgattcagaacagcataacaata
 C T E L K L S D Y E G R L I Q N S I T I
 241 gagagaatggtagctctctgcttttgacgagaggaggaacaaatctggaagaacatcca
 E R M V L S A F D E R R N K Y L E E H P
 301 agcgtcgggaaagaccctaagaaaactggaggacccatatacaggagaatagacggaaag
 S A G K D P K K T G G P I Y R R I D G K
 361 tggataagagaactcatcctttatgacaaaagaagaataaggagaatctggcgccaagcc
 W I R E L I L Y D K E E I R R I W R Q A
 421 aacaatggtaggatacaacagccggtctgactcacatgatgatctggcattccaatttg
 N N G E D T T A G L T H M M I W H S N L
 481 aatgatgccacttatcagaggacaagagctcttgttcgcaccggaatggatcccaggatg
 N D A T Y Q R T R A L V R T G M D P R M
 541 tgctctctgatgcagggttcaactctccccaggagggtccggagccgcaggtgctgcagtc
 C S L M Q G S T L P R R S G A A G A A V
 601 aaaggagttgggacagtggtgatggagttgatcagaatgatcaaactggaatcaatgat
 K G V G T V V M E L I R M I K R G I N D
 661 cggaaacttctggaggggtgaaaatggacgaaggacaagaattgcctatgaaagaatgtgc
 R N F W R G E N G R R T R I A Y E R M C
 721 aacattctcaaagggaaatttcaaacagctgcacagagagcaatgatgattcaagtgaga
 N I L K G K F Q T A A Q R A M M D Q V R
 781 gagagccgaaacccaggaaatgctgaaatcgaagatctcatcttctggcacgatccgca
 E S R N P G N A E I E D L I F L A R S A
 841 ctcatattacgaggatcagttgcacacaagtcctgtctgctgctgtgtgtatggactt
 L I L R G S V A H K S C L P A C V Y G L
 901 gctgtagccagtgacatgactttgaaagagaggggtactctctggtagcgaatagacct
 A V A S G H D F E R E G Y S L V G I D P
 961 ttcagactgcttcaaacagccaagtattcagcctaatacagacaaatgaaacccagcgc
 F R L L Q N S Q V F S L I R P N E N P A
 1021 cacaagagtcaattagtggtggatggcatgccattctgctgcatttgaagatttaagggtta
 H K S Q L V W M A C H S A A F E D L R V
 1081 tcaagcttcataagaggggaaaagagtggttccaagaggggcagctttccaccagaggggtt
 S S F I R G K R V V P R G Q L S T R G V
 1141 cagattgcttccaatgagaacatggagactatggactctagtactcttgaactgagaagc
 Q I A S N E N M E T M D S S T L E L R S
 1201 agatactgggacataaggaccagaagtggaggaaacactaatcaacagagggcatctgagc
 R Y W A I R T R S G G N T N Q Q R A S A
 1261 ggccaaatcagcgtgcaacctacattctcggtagcagagaaatctcccttttgagagagca
 G Q I S V Q P T F S V Q R N L P F E R A
 1321 accgttatggcagcattcactgggaacacagaggggaagaacatcagacatgagaaccgaa
 T V M A A F T G N T E G R T S D M R T E
 1381 atcataaggataatggaaagtgcaagaccagaagatgtgtctttccaggggcccgggagtc
 I I R I M E S A R P E D V S F Q G R G V
 1441 ttcgagctctcggacgaaaaggcaacgagcccgatcgtgccttccctttgacatgagtaac
 F E L S D E K A T S P I V P S F D M S N
 1501 gaaggatcttatttcttcggagacaatgcagaggagatgacaattaa 1548
 E G S Y F F G D N A E E Y D N *

ภาพที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน NP ที่เชื่อมกับส่วนของ histidine 6 โมเลกุล
 (แถบสีเทา)เป็นกรอบการอ่านรหัสเดียวกัน โดย * หมายถึง Stop codon

2. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน NP

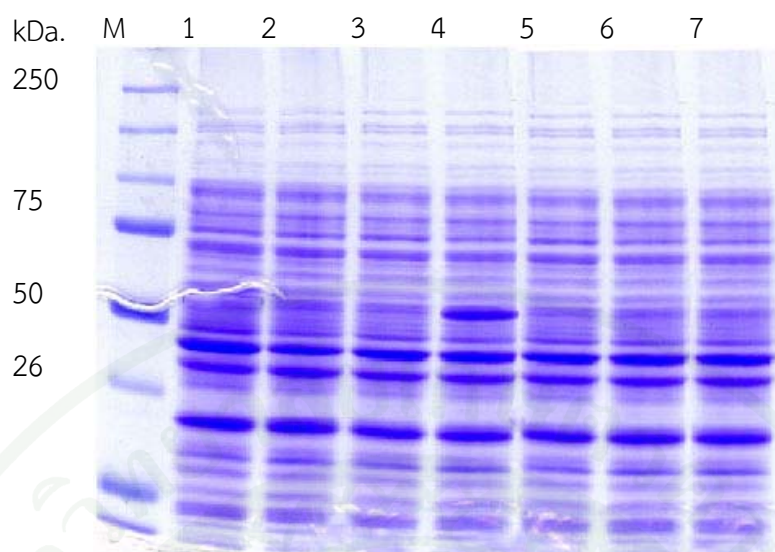
เมื่อได้เชื้อแบคทีเรีย transformant *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่บรรจุพลาสมิด pQE_NP จึงเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Ampicillin 1 μ g/ml ประมาณ 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะมีค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 nm ประมาณ 0.5-0.7 จึงเติมสารเหนี่ยวนำ IPTG ที่ปรับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 mM เพื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน NP เปรียบเทียบกับพลาสมิดควบคุม (control) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่บรรจุพลาสมิด pQE ที่ไม่มียีน NP เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบเขย่า 225 rpm ผลจากการเก็บตะกอนจากตะกอนเซลล์ที่ 6 ชั่วโมง มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS PAGE ปรากฏว่า โปรตีนจากแบคทีเรียที่บรรจุพลาสมิด pQE_NP_5 แสดงแถบโปรตีนขนาดประมาณ 56 kDa ขณะที่ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าวในตัวควบคุม ซึ่งในเบื้องต้นคาดว่าแถบโปรตีนที่พบเป็นโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่เกิดจากการแสดงออกของพลาสมิด pQE_NP_5 ซึ่งจะยืนยันด้วยวิธี Western blotting ต่อไป

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ใน *E. coli*

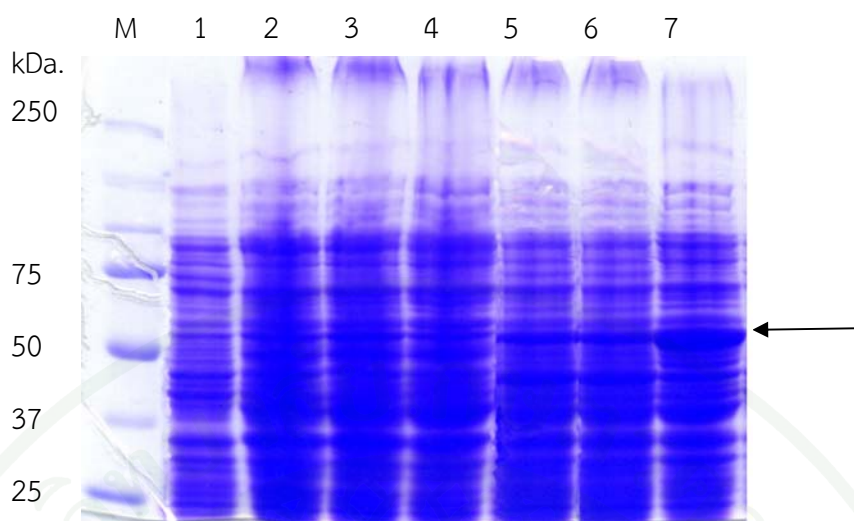
เมื่อพบว่า pQE_NP_5 มีการแสดงออกของโปรตีน NP ใน *E. coli* ได้ทำการทดสอบหาความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของสาร IPTG ที่ระดับ 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 1 mM ตามลำดับภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และความเร็วรอบเขย่า 225 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บตะกอนมาตรวจวิเคราะห์ด้วย 8% SDS PAGE (ภาพที่ 20) พบว่า แถบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่ถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้น 0.2 mM IPTG มีความเข้มและชัดเจนมากที่สุด ขณะที่แถบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่ถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้นอื่นๆ จางกว่ามาก ดังนั้น ระดับความเข้มข้น 0.2 mM IPTG จึงเหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP

จากการทดสอบเปรียบเทียบสภาวะอุณหภูมิแถบโปรตีนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ โดยการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ด้วย 0.2 mM IPTG ความเร็วรอบเขย่า 225 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ได้ชัดเจนที่สุดที่อุณหภูมิ 37°C ขณะที่อุณหภูมิ 16 และ 25°C มีการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP น้อยมาก

จากนั้น ทำการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมภายใต้สภาวะการเหนี่ยวนำด้วย 0.2mM IPTG ที่อุณหภูมิ 37°C และความเร็วรอบเขย่า 225 rpm สำหรับเลี้ยงเชื้อโดยใช้ทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสม พบว่า แถบของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP มีความเข้มและปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ดังภาพที่ 21 จากผลการทดลองที่ได้สรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. Coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่บรรจุพลาสมิด pQE_NP_5 คือ การเหนี่ยวนำด้วย 0.2 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 37°C และความเร็วรอบเขย่า 225 rpm นาน 18-24 ชั่วโมง



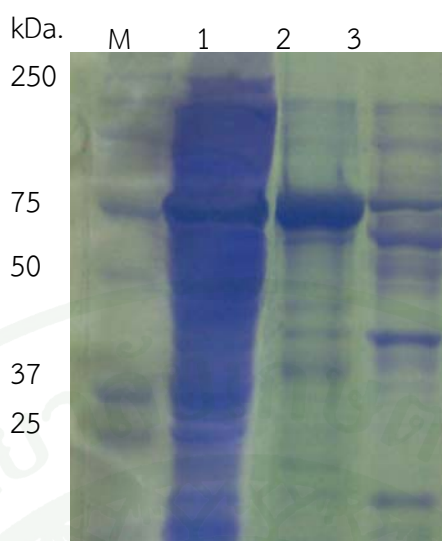
ภาพที่ 20 8% SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่บรรจุพลาสมิด pQE_NP_5 ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยช่อง M แถบโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Protein marker) ช่องที่ 1 แถบโปรตีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ช่องที่ 2 แถบโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.05 mM IPTG ช่องที่ 3 แถบโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.1 mM IPTG ช่องที่ 4 แถบโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.2 mM IPTG ช่องที่ 5 แถบโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.4 mM IPTG ช่องที่ 6 แถบโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.6 mM IPTG ช่องที่ 7 แถบโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG



ภาพที่ 21 8% SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่บรรจุพลาสมิด pQE_NP ที่ช่วงระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°C และกระตุ้นด้วย 0.2 mM IPTG โดยช่อง M แถบโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Protein marker) ช่องที่ 1-7 แถบโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำเป็นเวลา 0, 4, 6, 8, 10, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

4. การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนเบื้องต้น

หลังจากเหนี่ยวนำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ให้เกิดการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ด้วยการเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 0.2 mM ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบรูปแบบการผลิตโปรตีนโดยวิธี 8% polyacrylamide gel electrophoresis พบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ซึ่งมีขนาดประมาณ 56 kDa โปรตีนที่ผลิตได้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสารที่ไม่ละลายน้ำ insoluble protein เนื่องจากแถบโปรตีนปรากฏชัดเจนในส่วนของตะกอนเซลล์ ซึ่งเป็นตัวแทนของ inclusion body ที่ต้องอาศัย Urea ความเข้มข้นสูงในการทำละลาย แต่ทั้งนี้ยังสามารถตรวจพบแถบโปรตีนในส่วนที่ละลายน้ำ (soluble protein) ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่ผลิตได้จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยช่อง M แถบโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Protein marker) ช่องที่ 1 แถบโปรตีนตะกอนเซลล์แบคทีเรีย (crude cell) ช่องที่ 2 แถบโปรตีนที่ส่วนที่ละลายน้ำได้ (soluble protein) ช่องที่ 3 แถบโปรตีนที่ส่วนที่ละลายน้ำในสารละลาย 8 M Urea (insoluble protein)

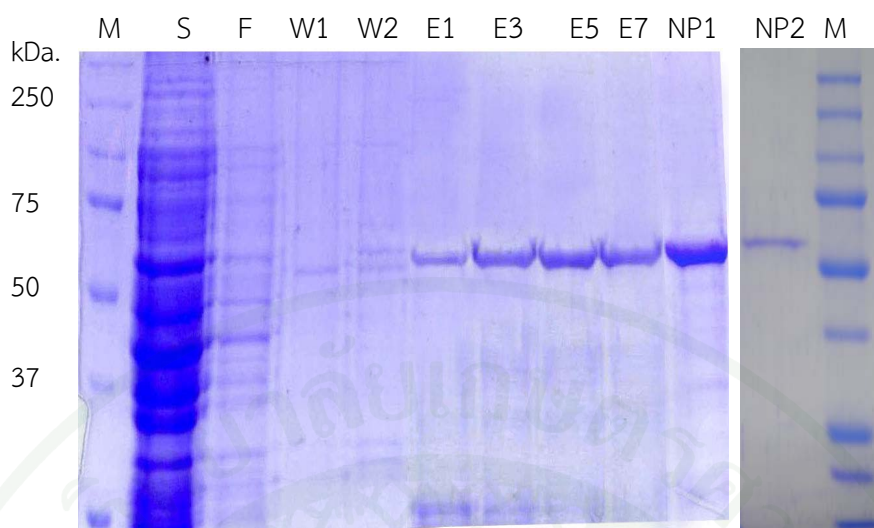
5. การแยกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ให้บริสุทธิ์ในสภาวะเสียสภาพธรรมชาติ (denaturing condition)

ผลการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีผ่าน Nickle (Ni^{2+}) column ในสภาวะเสียสภาพธรรมชาติด้วย denaturing buffer ที่มีส่วนประกอบของ 8 M urea ใน washing buffer และ elution buffer หลังจากทำการแบ่งเก็บเป็นช่วงๆ (fraction) ได้แก่ สารละลายโปรตีนทั้งที่ยังไม่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ (fraction S), ส่วนไหลหลังผ่านคอลัมน์ (fraction F), ส่วนไหลหลังจากล้างคอลัมน์ (fraction W1-W6) และส่วนไหลที่ได้จากการชะโปรตีน (fraction E1-E8) นำมาตรวจสอบด้วย 8% SDS-PAGE ได้ผลดังภาพที่ 23 พบว่า แถบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ใน fraction F เข้มน้อยกว่า fraction S มาก แสดงว่า โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่เชื่อมต่อกับ polyhistidine-tagged สามารถยึดจับกับ Ni^{2+} ในคอลัมน์ได้ ขณะที่การล้างคอลัมน์สามารถลดปริมาณโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ (unwanted protein) ออกได้มาก และเมื่อทำการชะ (elute) โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP จะเริ่มหลุดออกจากคอลัมน์ตั้งแต่ความเข้มข้นของ imidazole เป็น 50 mM พร้อมกับโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ ที่หลงเหลือบางส่วนก็หลุดออกมาด้วยเช่นกัน และเมื่อชะโปรตีนด้วยความเข้มข้นของ imidazole เป็น 100 และ 250mM ตามลำดับ จะเห็นว่า โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในแต่ละ fraction เริ่มบริสุทธิ์มากขึ้น ดังนั้น จึงเลือก fraction ที่ปนเปื้อนโปรตีนอื่นน้อยที่สุดนำมารวมกันเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านรูเยื่อกรองขนาด cut off 30 kDa ซึ่งยอมให้โมเลกุลที่มีขนาดเล็ก

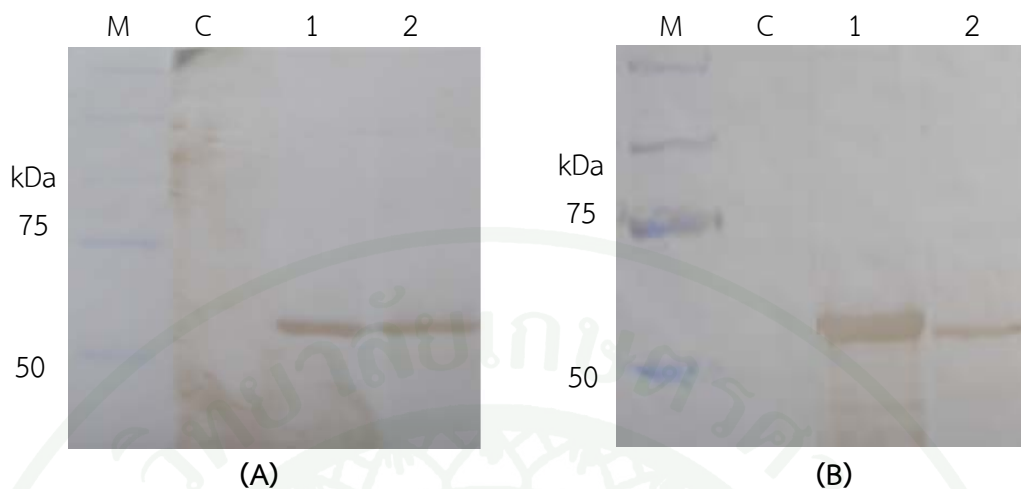
กว่า 30,000 kDa ผ่าน ขณะที่โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ซึ่งมีขนาด 56 kDa และโปรตีนปนเปื้อนที่มีขนาดมากกว่าไม่สามารถผ่านได้ จึงทำให้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอ

โปรตีนในสภาวะที่เสียสภาพธรรมชาติละลายอยู่ในสารละลาย urea ที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ อีกทั้งความเข้มข้นของ urea ยังรบกวนปฏิกิริยาในการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford จึงต้องทำการปรับลดความเข้มข้นของ urea ลง เพื่อให้โปรตีนจะสามารถคืนสภาพธรรมชาติได้ แต่จากการปรับลดความเข้มข้นของสารละลาย 8 M urea จนเหลือเท่ากับ 2 M urea กลับพบว่า โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP บางส่วนเกิดการตกตะกอน (partial aggregation) ทำให้โปรตีนส่วนที่สามารถนำไปใช้ต่อมีปริมาณความเข้มข้นน้อยลงมากจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford พบว่า ได้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ประมาณ 0.3 mg/ml

เมื่อนำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์มาตรวจสอบความจำเพาะกับทั้ง antibody ต่อ anti-histidine tag และซีรัมแม่สุกรที่ได้รับเชื้อ SIV (SIV convalescent serum) ด้วยวิธี Western blot analysis พบว่า antibody ทั้งสองเกิดปฏิกิริยากับตำแหน่งของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ได้เช่นกัน แม้โปรตีนจะมีลักษณะแบบ partial purification ก็ตาม ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 23 8% SDS-PAGE แสดงผลการแยกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ให้บริสุทธิ์ในสถานะเสียสภาพธรรมชาติ โดยช่อง M แถบโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Protein marker) ช่อง S แถบโปรตีนที่ยังไม่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ ช่อง F แถบโปรตีนหลังจากโคลัมน์ ช่อง W1 แถบโปรตีนส่วนไหลหลังจากล้างคอลัมน์ด้วย denaturing washing buffer ผสม 50 mM imidazole ช่อง W2 แถบโปรตีนส่วนไหลหลังจากล้างคอลัมน์ด้วย denaturing washing buffer ผสม 100 mM imidazole ช่อง E1, E3, E5 และ E7 แถบโปรตีนส่วนไหลหลังจากล้างคอลัมน์ด้วย denaturing washing buffer ผสม 250 mM imidazole ช่อง NP1 แถบโปรตีนเข้มข้นที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ใน 8 M Urea ช่อง NP2 แถบโปรตีนเข้มข้นที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ใน 2 M Urea



ภาพที่ 24 Western blot analysis ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในสภาวะเสียสภาพธรรมชาติ และ (A) antibody ต่อ histidine tag และ (B) ซีรัมสุกที่ได้รับเชื้อ SIV (SIVcoalescent serum) บนแผ่น membrane โดยช่อง M แถบโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Protein marker) ช่อง C แถบโปรตีน *E. coli* ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.2 mM IPTG (โปรตีนควบคุม) ช่อง 1 แถบโปรตีนที่ยังไม่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ และช่อง 2 แถบโปรตีนเข้มข้นที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์

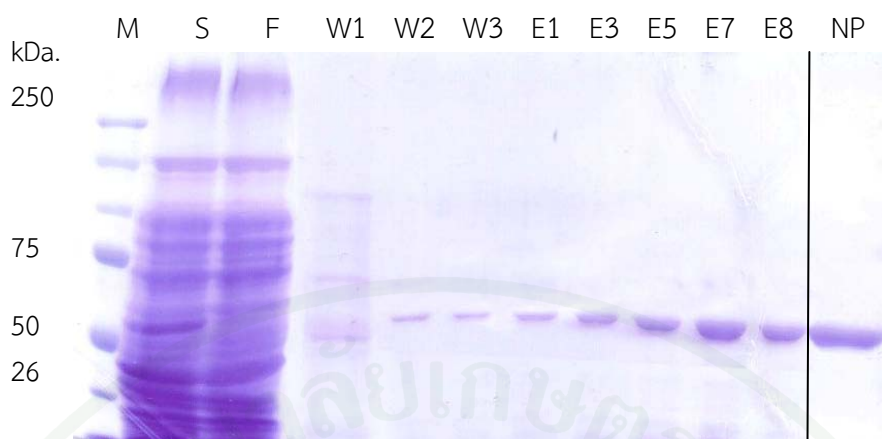
6. การแยกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ให้บริสุทธิ์ในสภาพธรรมชาติ (native condition)

เนื่องจากคุณลักษณะของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่แยกได้ในสภาวะเสียสภาพธรรมชาตินั้นไม่สามารถคืนสภาพธรรมชาติในสภาวะที่ปราศจาก 8 M urea ได้ และไม่เหมาะสมในการใช้แอนติเจนสำหรับ ELISA ดังนั้น จึงนำโปรตีนส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble protein) มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแอฟิไนตีโครมาโตกราฟีในสภาวะรักษาสภาพธรรมชาติที่ปราศจากสารละลาย urea ใน washing buffer และ elution buffer โดยหลังจากเตรียมคอลัมน์และปรับสภาวะคอลัมน์ด้วย native washing buffer แล้ว ปล่อยสารละลาย soluble protein ผ่านลงในคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วย native washing buffer อย่างน้อย 500 ml และเริ่มทำการชะโปรตีนด้วยสารละลาย imidazole โดยค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของ imidazole เป็น 50, 100 และ 250 mM ตามลำดับ และแบ่งเก็บเป็นช่วงๆ (fraction) นำมาตรวจสอบด้วย 8% SDS-PAGE ปรากฏว่า สารละลายโปรตีนก่อนการทำ purification จะมีแถบความเข้มของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ปริมาณเล็กน้อยและมีโปรตีนอื่นๆ (unwanted protein) ปนเปื้อนจำนวนมาก แต่หลังจากผ่าน Nickle column และล้างคอลัมน์ด้วย native washing buffer โปรตีนที่ปนเปื้อนส่วนใหญ่จะถูกล้างออกมาพร้อม native washing buffer เมื่อทำการชะล้างด้วยสารละลายที่มีความเข้มข้นของ imidazol เท่ากับ 50 และ 100 mM จะเห็นสารละลายโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP บางส่วนเริ่มหลุดออกมา (ภาพที่ 25) เมื่อชะล้างด้วยความเข้มข้นของ imidazol เท่ากับ 250 mM โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ส่วนใหญ่จะ

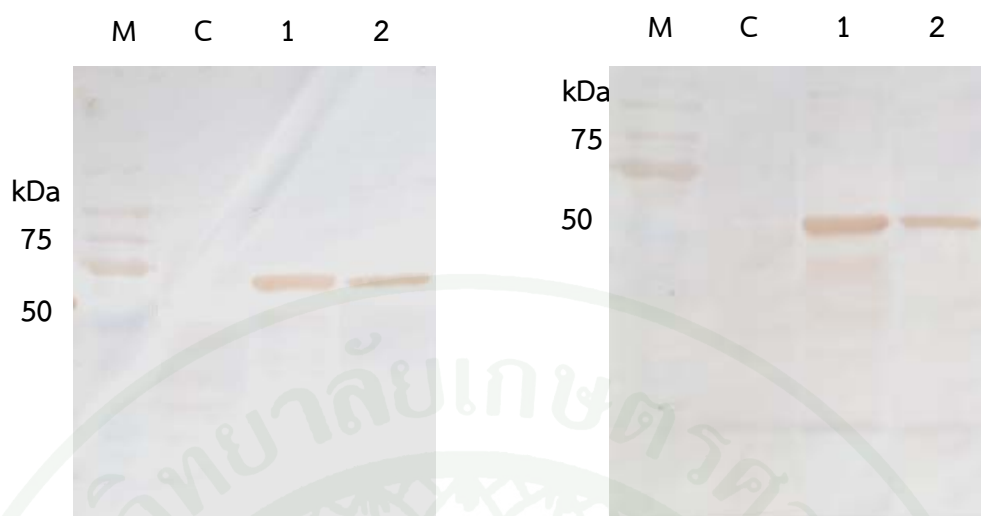
หลุดออกมาจากคอลัมน์และมีความบริสุทธิ์มาก จากนั้นจึงเก็บช่วง(fraction) โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มากมารวมกันเพื่อเพิ่มความเข้มข้น (concentrate) และกำจัดความเข้มข้นของ imidazole และ β -mercaptonethanol ผ่านหลอดทำความเข้มข้น (Ultrafiltration) ที่มีขนาดรูเยื่อกรองเลือกผ่าน (cut off) 30 kDa นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที จะได้สารละลายโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น ซึ่งเก็บรักษาสภาพด้วยสาร PMSF และ 20% glycerol จากนั้นทำการวัดโปรตีนด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป BCATM Protein Assay Kit ได้ค่าความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1.5 mg/ml

การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ในสภาพธรรมชาติมีปริมาณโปรตีนที่สามารถนำไปใช้ได้ (1.5 μ g/ml) มากกว่าการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ในสภาวะเสียสภาพธรรมชาติ (0.3 μ g/ml จากปริมาณ *E. coli* culture เริ่มต้น 2 ลิตร) เมื่อนำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ในสภาพธรรมชาติมาตรวจสอบความจำเพาะต่อ antibody ต่อ histidine tag และ ซีรัมแม่สุกรที่ได้รับเชื้อ SIV (SIV covalent serum) ด้วยวิธี Western blot analysis พบว่า antibody ทั้งสองเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับตำแหน่งของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ขนาด 56 kDa เพียงแถบเดียว ดังภาพที่ 26

ผลทดสอบชี้ให้เห็นว่า โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่แยกให้บริสุทธิ์ในสภาพธรรมชาตินั้นสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมแม่สุกรที่ได้รับเชื้อ SIV ได้ดี ดังนั้น จึงสามารถนำมาใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการพัฒนาชุดทดสอบ NP ELISA เพื่อตรวจวินิจฉัยซีรัมของสุกรที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อ SIV



ภาพที่ 25 8% SDS-PAGE แสดงผลการแยกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ให้บริสุทธิ์ในสภาพธรรมชาติ โดยช่อง M แถบโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Protein marker) ช่อง S แถบโปรตีนที่ยังไม่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ ช่อง F แถบโปรตีนหลังจากคอลัมน์ ช่อง W1 แถบโปรตีนส่วนที่เหลือหลังจากล้างคอลัมน์ด้วย native washing buffer ช่อง W2 แถบโปรตีนส่วนที่เหลือหลังจากล้างคอลัมน์ด้วย native washing buffer ผสม 50mM imidazole ช่อง W3 แถบโปรตีนส่วนที่เหลือหลังจากล้างคอลัมน์ด้วย native washing buffer ผสม 100 mM imidazole ช่อง E1, E3, E5, E7 และ E8 แถบโปรตีนที่ถูกชะด้วย native washing buffer ผสม 250 mM imidazole และช่อง NP แถบโปรตีนเข้มข้นที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์



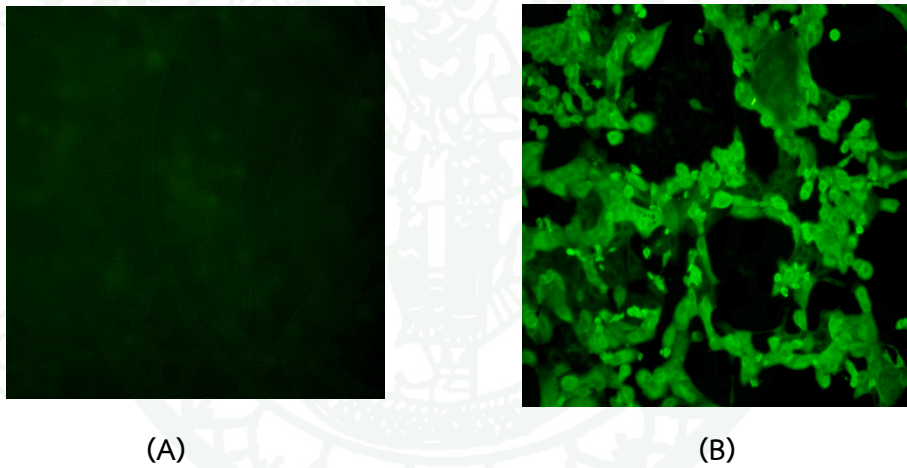
ภาพที่ 26 Western blot analysis ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในสภาพธรรมชาติและ (A) antibody ต่อ Histidine tag และ (B) ซีรัมสุกรที่ได้รับเชื้อ SIV (SIVconvalescent serum) โดยช่อง M แถบโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Protein marker) ช่อง C แถบโปรตีน *E. coli* ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.2 mM IPTG (โปรตีนควบคุม) ช่อง 1 แถบโปรตีนที่ยังไม่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ และช่อง 2 แถบโปรตีนเข้มข้นที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์

7. การทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อ SIV ในซีรัมสุกรด้วยวิธี Immunofluorescent assay (IFA)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกร A/swine/Thailand/KU-1/09(H1N1) และ A/swine/Thailand/KU21/07 (H3N2) ในเซลล์ MDCK ซึ่งมีลักษณะเป็น monolayer และตรวจลักษณะพยาธิสภาพในเซลล์ ดังภาพที่ 27 ปรากฏว่า เซลล์ที่ติดเชื้อ SIV ชนิด H1N1 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ (cytopathic effect; CPE) ขึ้นอย่างรวดเร็วโดยพบตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรก ขณะที่เซลล์ที่ติดเชื้อ SIV ชนิด H3N2 เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพของเซลล์อย่างช้าๆ หลังการติดเชื้อ โดยเฉลี่ยประมาณ 48 ชั่วโมงเมื่อเซลล์เกิด CPE ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ทำการตรึงเซลล์ด้วย absolute methanol และนำมาตรวจสอบการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างซีรัมสุกรด้วยวิธี IFA อ่านผลภายใต้กล้อง fluorescent microscope โดยพบว่า ซีรัมสุกรที่สงสัยว่าได้รับเชื้อ SIV จะทำปฏิกิริยากับเชื้อ SIV ที่อยู่ภายในเซลล์ MDCK จะเห็นได้จากเซลล์ติดเชื้อไวรัสจะเรืองแสงสีเขียวสว่าง (bright green apple fluorescence) ขณะที่ซีรัมแม่สุกรที่ปลอดการติดเชื้อ SIV จะไม่พบการเรืองแสงภายในเซลล์ ดังภาพที่ 28



ภาพที่ 27 (A) ลักษณะของ MDCK cells ปกติและ (B) เซลล์ MDCK ที่ติดเชื้อไวรัส SIV และเกิดลักษณะ CPE



ภาพที่ 28 ลักษณะของเซลล์ที่ติดสี fluorescein เมื่อทดสอบด้วยวิธี IFA (A) เซลล์ MDCK ที่ไม่มีการติดเชื้อเมื่อทดสอบ IFA จะไม่มีการเรืองแสงและ (B) เซลล์ MDCK ที่ติดเชื้อไวรัส SIV เกิดลักษณะ CPE เมื่อทดสอบ IFA จะมีการเรืองแสงสีเขียวสว่าง (bright green apple fluorescence)

8. ผลการคัดเลือกซีรัมสุกรด้วย IFA

ตัวอย่างซีรัมแม่สุกรที่เก็บระหว่างปี พ.ศ. 2552-2553 จากฟาร์มต่างๆ ในจังหวัดลพบุรี จำนวน 219 ตัวอย่าง, นครราชสีมา จำนวน 315 ตัวอย่าง, ชลบุรี จำนวน 332 ตัวอย่าง, เชียงใหม่ จำนวน 386 ตัวอย่าง และสงขลา จำนวน 296 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวแทนของสุกรในแต่ละภาค รวมจำนวนทั้งสิ้น 1,548 ตัวอย่าง ผลการคัดเลือกซีรัมว่า เป็นลบหรือบวกด้วยวิธี IFA (ตารางที่ 6) พบว่า ตัวอย่างซีรัมที่แสดงผลบวกชัดเจน (SIV positive) จำนวน 1,154 ตัวอย่าง, แสดงผลลบ (SIVnegative) จำนวน 91 ตัวอย่าง, แสดงผลที่ไม่ชัดเจน (unclear) จำนวน 290 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างสูญหาย (missing) จำนวน 13 ตัวอย่าง

ตารางที่ 6 ผลการตรวจหาแอนติบอดีของตัวอย่างซีรัมแม่สุกรจากจังหวัดต่างๆต่อ SIV โดยวิธี IFA

ปี (พ.ศ.)	จำนวนตัวอย่างซีรัมแม่สุกร (ตัวอย่าง)					
	จังหวัด	ผลบวก	ผลลบ	ไม่ชัดเจน	สูญหาย	รวม
2552	ลพบุรี	138	10	27	0	175
	สงขลา	175	8	35	1	219
	ชลบุรี	196	7	19	2	224
	เชียงใหม่	105	33	97	2	237
	นครราชสีมา	160	10	29	4	203
2553	ลพบุรี	39	0	4	0	43
	สงขลา	83	5	8	0	96
	ชลบุรี	68	9	28	4	109
	เชียงใหม่	109	4	36	0	149
	นครราชสีมา	81	5	7	0	93
	รวม	1,154	91	290	13	1,548

9. การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยากันระหว่างแอนติเจน NP และซีรัมด้วยวิธี checkerboard titration

แอนติเจน NP ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ถูกนำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในซีรัมสุกรที่ให้ผลเป็นบวกอย่างแรง (strong positive serum) ด้วยวิธี checker-board titration โดยแอนติเจน NP ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 32, 16, 8, 4, 2, 1 0.5 และ 0.25 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ขณะที่ strong positive serum ถูกเจือจางแบบ serial two-fold dilution ตั้งแต่ที่ระดับการเจือจาง 1 : 10 ถึง 1 : 10,240 ดังตารางที่ 7 พบว่า ความเข้มข้นของแอนติเจน NP ที่ระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจพบปฏิกริยาที่ให้ผลบวกอย่างชัดเจนในการทดสอบกับ strong positive serum คือ ที่ความเข้มข้นแอนติเจน NP ที่ 1 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งแสดงค่า OD 405 ที่แตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุม (control) ดังนั้น จึงใช้แอนติเจนที่ 1 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับเคลือบเพลต

ตารางที่ 7 แสดงค่า OD₄₀₅ ของการตรวจสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติเจน NP และ ซีรัมสุกร (strong positive serum) ของ NP ELISA ด้วยวิธี checkerboard titration

NP Ag (µg/ml)	ซีรัมสุกร (strong positive serum)											
	1: 10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	C
32	3.06	2.996	2.825	2.695	2.509	2.019	1.802	1.709	1.549	1.422	1.406	0.509
16	2.815	2.695	2.534	2.441	2.184	1.729	1.521	1.299	1.137	1.128	1.138	0.573
8	2.768	2.62	2.509	2.341	2.157	1.618	1.414	1.122	1.104	0.934	0.915	0.511
4	2.659	2.495	2.504	2.244	2.05	1.49	1.168	1.011	0.863	0.828	0.795	0.519
2	2.572	2.425	2.376	2.196	1.993	1.35	1.039	0.932	0.858	0.773	0.742	0.517
1	2.652	2.519	2.429	2.198	2.024	1.395	1.125	0.981	0.898	0.844	0.869	0.513
0.5	2.589	2.413	2.358	2.187	1.905	1.203	0.913	0.832	0.824	0.741	0.789	0.495
0.25	2.68	2.413	2.467	2.082	2.078	1.26	1.038	0.969	0.903	0.881	0.807	0.493

C หมายถึง ชุดควบคุม (Control) ซึ่งไม่เติมซีรัมสุกร

10. การหาความเข้มข้นของสารละลายเจือจาง (Diluent) ที่เหมาะสม

เมื่อเคลือบเพลตด้วยแอนติเจน NP ความเข้มข้น 1 µg/ml บ่มให้ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างซีรัม SIV ที่เจือจางด้วยสารเจือจาง (diluent) ดังนี้ 0.1% milk diluents (Sigma) 0.1, 1, 2 และ 5% Skim milk ในอัตราส่วน 1 : 100 และจับอย่างจำเพาะกับ conjugate ซึ่งเจือจางด้วย diluents ชนิดเดียวกัน ซึ่งได้ทำการทดลองตามแผนผังของตารางที่ 8 พบว่า ทุกความเข้มข้นของ skim milk diluents สามารถลด background ได้ดีกว่า milk diluents และ skim milk ที่ความเข้มข้น 5% สามารถลด background ได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างซีรัม SIV เป็นบวกและลบได้ชัดเจนขึ้น (ตารางที่ 9-13) ผลของ ELISA เมื่อใช้ 5% skim milk เป็นสารเจือจางได้แสดงไว้ในภาพที่ 29



ตารางที่ 8 แผนผังตัวอย่างซีรัมบวก (Pos) และลบ (Neg) ที่ใช้ทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลายเจือจางที่เหมาะสม

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl	Neg 4	Neg 8	Neg 12	Neg16	Neg 20	Pos 1	Pos 5	Pos 9	Pos 13	Pos 17	Pos 21
B	Ctrl	Neg 4	Neg 8	Neg 12	Neg16	Neg 20	Pos 1	Pos 5	Pos 9	Pos 13	Pos 17	Pos 21
C	Neg 1	Neg 5	Neg 9	Neg 13	Neg 17	Neg 21	Pos 2	Pos 6	Pos 10	Pos 14	Pos 18	Pos 22
D	Neg 1	Neg 5	Neg 9	Neg 13	Neg 17	Neg 21	Pos 2	Pos 6	Pos 10	Pos 14	Pos 18	Pos 22
E	Neg 2	Neg 6	Neg 10	Neg 14	Neg 18	Neg 22	Pos 3	Pos 7	Pos 11	Pos15	Pos19	Pos 23
F	Neg 2	Neg 6	Neg 10	Neg 14	Neg 18	Neg 22	Pos 3	Pos 7	Pos 11	Pos15	Pos19	Pos 23
G	Neg 3	Neg 7	Neg 11	Neg 15	Neg 19	Neg 23	Pos 4	Pos 8	Pos 12	Pos 16	Pos 20	Pos 24
H	Neg 3	Neg 7	Neg 11	Neg 15	Neg 19	Neg 23	Pos 4	Pos 8	Pos 12	Pos 16	Pos 20	Pos 24

หมายเหตุ Ctrl = หลุมควบคุม

Neg = ซีรัมลบ

Pos = ซีรัมบวก

ตารางที่ 9 ค่า OD ของซีรัม ตามแผนผังในตารางที่ 8 ถูกเจือจางด้วย 0.1% milk diluents

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.1223	0.6986	0.8942	0.9109	0.7552	0.9394	2.2223	1.8978	1.7556	1.7263	1.9224	1.7927
B	0.1139	0.6654	0.8596	0.8375	0.7136	1.0035	2.0154	1.6729	1.8151	1.7115	1.8976	1.7585
C	0.3517	0.6683	1.2752	0.838	0.8192	1.0564	1.9826	1.5275	1.7556	1.4903	1.3747	1.9758
D	0.3293	0.7057	1.2887	0.7935	0.7977	1.0455	1.7292	1.6677	1.672	1.551	1.3493	1.8254
E	0.5566	0.7924	0.9169	0.8076	0.726	1.2209	2.0459	1.9605	1.8573	1.7572	1.8173	1.8892
F	0.638	0.7572	0.9215	0.7982	0.7113	1.1648	1.9418	1.7525	1.6066	1.7997	1.8514	1.8365
G	0.8106	0.7666	0.9282	0.8747	0.5952	0.9933	1.9543	1.792	1.9959	2.0021	1.7327	2.0547
H	0.7881	0.7367	0.8875	0.8521	0.6088	0.9641	1.8568	1.905	1.9531	1.895	1.8174	2.0918

ตารางที่ 10 ค่า OD ของซีรัม ตามแผนผังในตารางที่ 8 ถูกเจือจางด้วย 0.1% Skim milk

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0738	0.531	0.9564	0.5621	0.296	0.4265	1.4133	1.7107	1.4612	1.6144	1.6869	1.1172
B	0.0699	0.5877	0.9247	0.5392	0.2827	0.3883	1.3245	1.561	1.3331	1.5375	1.6327	1.0975
C	0.3933	0.4343	0.4314	0.4533	0.3165	0.3651	0.8928	1.4912	1.3884	1.6237	1.5864	1.1721
D	0.3938	0.4411	0.4499	0.4582	0.3243	0.3604	0.8938	1.5093	1.4115	1.6336	1.5635	1.202
E	0.3101	0.3863	0.6027	0.3639	0.2836	0.7245	1.2382	1.315	1.4282	1.5101	1.149	1.6531
F	0.3148	0.4549	0.6030	0.3716	0.2896	0.764	1.294	1.2537	1.4329	1.4323	1.1554	1.6376
G	0.4105	0.4416	0.2567	0.2866	0.2953	0.1356	1.4236	1.6623	1.3491	1.469	1.1525	1.757
H	0.4127	0.7931	0.2895	0.2923	0.293	0.131	1.4381	1.739	1.4301	1.4668	1.186	1.7753

ตารางที่ 11 ค่า OD ของซีรัม ตามแผนผังในตารางที่ 8 ถูกเจือจางด้วย 1% Skim milk

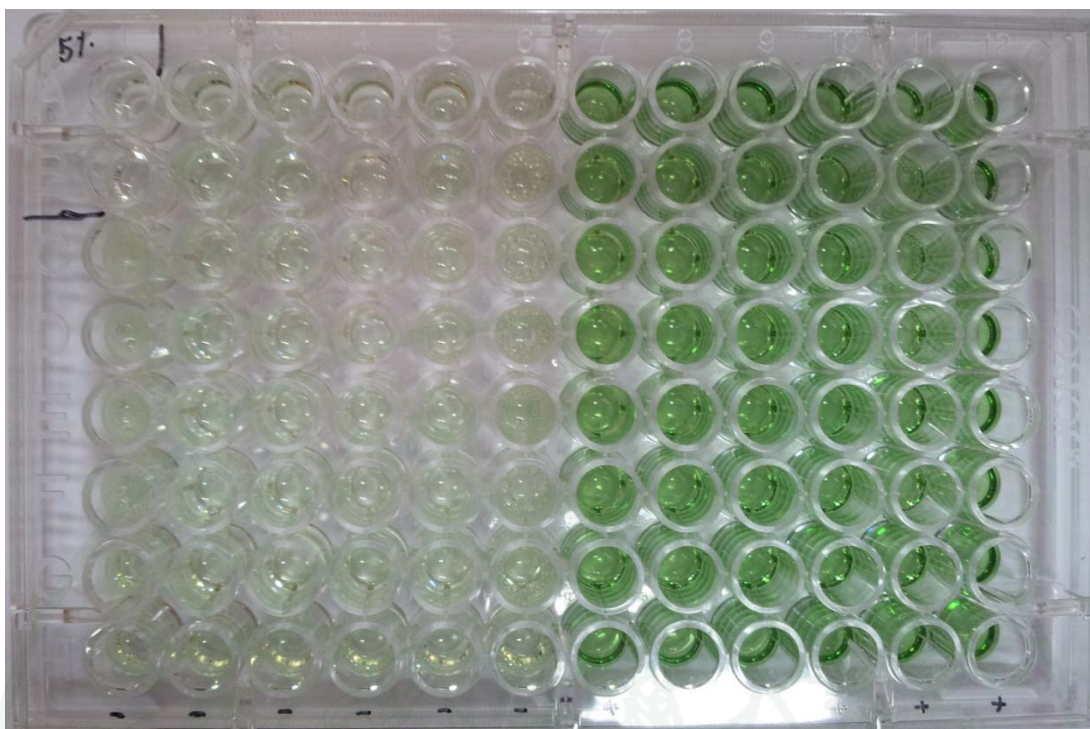
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.065	0.6081	0.8522	0.8477	0.5526	1.0569	1.8943	1.5159	1.3691	1.4665	1.4557	1.394
B	0.0708	0.6145	0.8314	0.867	0.589	1.1715	1.753	1.4831	1.4123	1.5014	1.3367	1.3869
C	0.2894	0.7785	0.5707	0.7145	0.7074	0.7762	1.4478	1.2023	1.39	1.0458	0.9076	1.3216
D	0.2618	0.7644	0.5612	0.7163	0.8135	0.7824	1.3643	1.1824	1.3133	0.9892	0.9092	1.2936
E	0.5793	1.019	0.7242	0.7	0.641	1.0717	1.3584	1.3989	1.5554	1.2348	1.4278	1.4426
F	0.6052	0.9735	0.7263	0.6816	0.5708	1.0498	1.3409	1.3532	1.4344	1.1772	1.3931	1.4099
G	0.6875	0.6756	0.7707	0.6478	0.561	0.7864	1.1391	1.2449	1.6264	1.1263	1.3224	1.2522
H	0.6831	0.6929	0.8299	0.6581	0.5186	0.7342	1.2624	1.2224	1.529	1.1854	1.3195	1.2686

ตารางที่ 12 ค่า OD ของซีรัม ตามแผนผังในตารางที่ 8 ถูกเจือจางด้วย 2% Skim milk

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0649	0.5013	0.6213	0.5116	0.5314	0.7554	1.619	1.4429	1.3255	1.268	1.3259	1.6311
B	0.0583	0.4627	0.6476	0.5033	0.4922	1.0312	1.557	1.3508	1.2703	1.4696	1.3183	1.253
C	0.2231	0.6302	0.4477	0.6123	0.5023	0.612	1.249	0.9973	1.3296	0.9725	1.0133	1.521
D	0.2137	0.6159	0.4647	0.6113	0.5022	0.6221	1.3041	1.003	1.2045	0.9499	1.0834	1.5273
E	0.5007	0.7447	0.5736	0.5843	0.4947	1.009	1.0871	1.3948	1.2626	1.1939	1.5391	1.482
F	0.4779	0.7529	0.5822	0.5827	0.5066	0.9798	1.143	1.3216	1.2191	1.1304	1.5549	1.4818
G	0.587	0.6047	0.7444	0.5447	0.4898	0.7405	1.1759	1.1508	1.3093	1.2263	1.3721	1.2889
H	0.6118	0.5463	0.7314	0.5046	0.517	0.6842	1.1071	1.161	1.4391	1.0404	1.4412	1.2823

ตารางที่ 13 ค่า OD ของซีรัม ตามแผนผังในตารางที่ 8 ถูกเจือจางด้วย 5% Skim milk

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0674	0.441	0.4555	0.4255	0.3758	0.6253	1.1233	1.07	0.9434	1.0545	0.8396	1.5362
B	0.0558	0.4491	0.479	0.4838	0.4047	0.7376	1.2441	1.1288	0.8649	1.1295	0.8308	1.229
C	0.1831	0.5311	0.3253	0.551	0.5069	0.5565	0.9931	0.6527	0.9914	0.6115	0.5401	1.4736
D	0.1624	0.494	0.3398	0.5427	0.5032	0.5736	0.9619	0.6774	1.0768	0.6194	0.5401	1.6883
E	0.403	0.6048	0.5957	0.4683	0.3437	0.6321	1.1979	1.1876	0.9504	0.9035	1.0332	1.0581
F	0.3752	0.5587	0.5616	0.4458	0.3154	0.616	1.1578	1.0862	1.0421	0.8446	1.053	1.0864
G	0.4928	0.4492	0.6165	0.4607	0.398	0.5426	0.8021	0.8337	1.3244	0.7223	1.0678	0.8247
H	0.4891	0.4208	0.6483	0.433	0.3797	0.4529	0.7473	0.7698	1.2259	0.5731	0.9546	0.8799



ภาพที่ 29 ผล ELISA แสดงสีของปฏิกิริยาเอนไซม์ในตัวอย่างลบ (คอลัมน์ที่ 1-6) และ ตัวอย่างบวก (คอลัมน์ที่ 7-12) ที่ถูกเจือจางด้วย 5% skim milk

11. การประเมินความคงที่ของ NP ELISA โดยวิธีการทดสอบซ้ำ (Measurement of repeatability)

เมื่อประเมินค่าความคงที่จากการทดสอบซ้ำด้วยวิธี intra-assay โดยใช้ทั้งซีรัมสุกที่ให้ผลบวก และผลลบต่อเชื้อ SIV ซึ่งทดสอบด้วยเทคนิค IFA มาตรวจสอบด้วย NP ELISA พบว่าค่าความคงที่ที่เกิดขึ้นภายใน plate เดียวกันมีค่า % CV ซึ่งเป็นค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ยของทั้ง 3 ซ้ำในเพลตเดียวกันเท่ากับ 4 โดยมีค่าผลต่าง OD อยู่ระหว่าง 0.2327 ถึง 1.3184 (ตารางที่ 14)

ค่าความคงที่ที่เกิดขึ้นกับตัวอย่างเดียวกันซึ่งถูกทดสอบใน plate อื่นที่ได้จากการทดสอบซ้ำด้วยวิธี inter-assay นั้น มีค่าเฉลี่ย %CV เฉลี่ยเท่ากับ 10 ตารางที่ 15 แสดงถึง ค่าผลต่าง OD ทั้ง 3 ซ้ำ ที่อยู่ต่าง plate กันของซีรัมจำนวน 15 ตัวอย่าง ทั้งนี้ค่า CV ที่ได้จากการทดสอบทั้งสองนั้น อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (acceptable level)

ตารางที่ 14 ค่าความคงที่ภายในเพลต ด้วยวิธี Intra-assay

หมายเลข ตัวอย่าง	ค่า OD ₄₀₅			ค่าเฉลี่ย OD	%CV
	ตำแหน่งที่ 1	ตำแหน่งที่ 2	ตำแหน่งที่ 3		
1 ⁻	0.2897	0.3023	0.3218	0.3045±0.016	5%
2 ⁻	0.2872	0.2327	0.2737	0.2645±0.028	11%
3 ⁻	0.3490	0.3525	0.3266	0.3427±0.014	4%
4 ⁻	0.3237	0.3414	0.3385	0.3345±0.009	3%
5 ⁻	0.3295	0.3074	0.3031	0.3133±0.014	5%
6 ⁻	0.3307	0.3318	0.3547	0.3390±0.013	4%
7 ⁻	0.2888	0.3049	0.2950	0.2962±0.008	3%
8 ⁻	0.3726	0.3555	0.3963	0.3747±0.020	5%
9 ⁻	0.3046	0.2861	0.3036	0.2980±0.014	3%
10 ⁺	0.9860	1.0724	1.0595	1.0393±0.046	4%
11 ⁺	0.9499	1.0748	1.0741	1.0329±0.071	7%
12 ⁺	0.8785	0.9672	0.8479	0.8978±0.062	7%
13 ⁺	0.9571	0.9591	0.9837	0.9666±0.014	2%
14 ⁺	0.9662	0.9578	0.9597	0.9612±0.004	0%
15 ⁺	1.3184	1.2652	1.2807	1.2881±0.027	2%
ค่า OD ต่ำสุด	0.2327			% CV ต่ำสุด = 0	
ค่า OD สูงสุด	1.0748			% CV สูงสุด = 11	
ค่า OD เฉลี่ยรวม	0.6537			% CV เฉลี่ย = 4	

หมายเหตุ (+) ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวก (-) ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลลบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี IFA

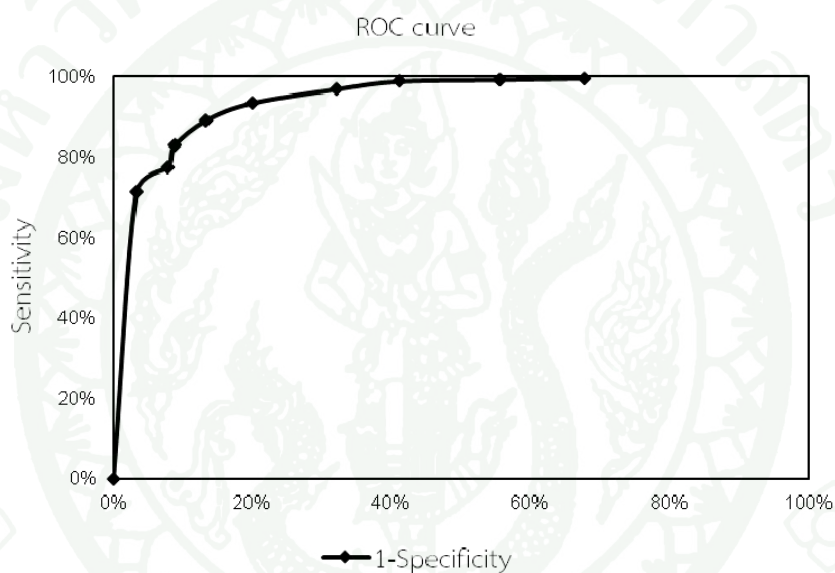
ตารางที่ 15 ค่าความคงที่ระหว่างเพลต ด้วยวิธี Inter-assay

หมายเลข ตัวอย่าง	เพลตที่ 1		เพลตที่ 2		เพลตที่ 3	
	ค่าเฉลี่ย OD±SD	%CV	ค่าเฉลี่ย OD±SD	%CV	ค่าเฉลี่ย OD±SD	%CV
1 ⁻	0.3045±0.016	5%	0.3022±0.006	2%	0.3218±0.035	11%
2 ⁻	0.2645±0.028	30%	0.2327±0.004	2%	0.2736±0.026	10%
3 ⁻	0.3427±0.014	18%	0.3525±0.005	2%	0.3266±0.030	9%
4 ⁻	0.3345±0.009	15%	0.3413±0.002	1%	0.3385±0.043	13%
5 ⁻	0.3133±0.014	13%	0.3074±0.020	7%	0.3030±0.022	8%
6 ⁻	0.3390±0.013	6%	0.3318±0.016	5%	0.3547±0.019	5%
7 ⁻	0.2962±0.008	15%	0.3048±0.006	2%	0.2949±0.018	6%
8 ⁻	0.3747±0.020	6%	0.3555±0.006	4%	0.3963±0.074	19%
9 ⁻	0.2980±0.014	10%	0.2860±0.014	5%	0.3036±0.014	5%
10 ⁺	1.0393±0.046	2%	1.0724±0.013	8%	1.0595±0.098	9%
11 ⁺	1.0329±0.071	13%	1.0748±0.083	5%	1.0741±0.162	15%
12 ⁺	0.8978±0.062	28%	0.9672±0.052	24%	0.8478±0.228	27%
13 ⁺	0.9666±0.014	13%	0.9591±0.111	12%	0.9837±0.183	19%
14 ⁺	0.9612±0.004	9%	0.9578±0.120	13%	0.9596±0.049	5%
15 ⁺	1.2881±0.027	3%	1.2652±0.048	4%	1.2807±0.075	6%
	% CV ต่ำสุด = 2		% CV ต่ำสุด = 1		% CV ต่ำสุด = 5	
	% CV สูงสุด = 30		% CV สูงสุด = 24		% CV สูงสุด = 27	
	% CV เฉลี่ย = 12		% CV เฉลี่ย = 6		% CV เฉลี่ย = 11	

หมายเหตุ (+) ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวก (-) ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลลบ เมื่อทดสอบด้วยวิธี IFA

12. การประเมินค่า cut-off ของ NP ELISA

จากการคำนวณหาค่าจุดตัด (cut off) ที่เหมาะสมของ NP ELISA จากตัวอย่างซีรัมแม่สุกรที่ถูกคัดแยกด้วยวิธี IFA (Gold standard) ซึ่งให้ผลบวกจำนวน 1,140 ตัวอย่าง และผลลบชัดเจนจำนวน 90 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Receiver operating characteristic (ROC) analysis ซึ่งเป็นการวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟที่เกิดจากการ plot ระหว่าง sensitivity และ specificity ของ NP ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับ IFA จากนั้นพิจารณาพื้นที่ใต้จุดตัดกันของเส้น sensitivity และ 1-specificity ซึ่งอยู่ภายในเส้น intermediate range ดังภาพที่ 30 พบว่า ค่า cut-off ที่เหมาะสมในการกำหนดผลการตรวจว่าเป็นบวกหรือลบคือ 0.5 ซึ่งมีค่า sensitivity เท่ากับ 93.4% และค่า specificity เท่ากับ 80.0 % ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับที่ยอมรับได้



ภาพที่ 30 กราฟ ROC แสดงจุดตัดของเส้น sensitivity และ 1-specificity เพื่อหาค่า cut-off ที่เหมาะสมของ NP ELISA

13. การเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ NP ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค IFA

เมื่อทดสอบตัวอย่างซีรัมจำนวน 1,230 ตัวอย่าง ($n = 1,230$) ด้วย NP ELISA จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลจากเทคนิค IFA และคำนวณเพื่อหาค่า degree of agreement หรือ Kappa (κ) value (ตารางที่ 16) พบว่า ตัวอย่างที่ให้ผลบวกเหมือนกันมีจำนวน 1,065 ตัวอย่าง ให้ผลลบเหมือนกันจำนวน 72 ตัวอย่าง และให้ผลการตรวจที่แตกต่างกันจำนวน 93 ตัวอย่าง โดยกลุ่มที่ให้ผลบวกกับ IFA แต่ให้ผลลบกับ NP ELISA มีจำนวน 75 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลลบกับ IFA แต่ให้ผลบวก NP ELISA มีเพียง 18 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกและลบตรงกันกับการทดสอบทั้งสองวิธีมี 1,065 และ 72 ตัวอย่าง ตามลำดับ และเมื่อนำผลการตรวจสอบจากทั้งสองวิธีมาคำนวณค่า kappa value พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.568 โดยมีค่าความถูกต้อง (accuracy) เท่ากับ 92.4%

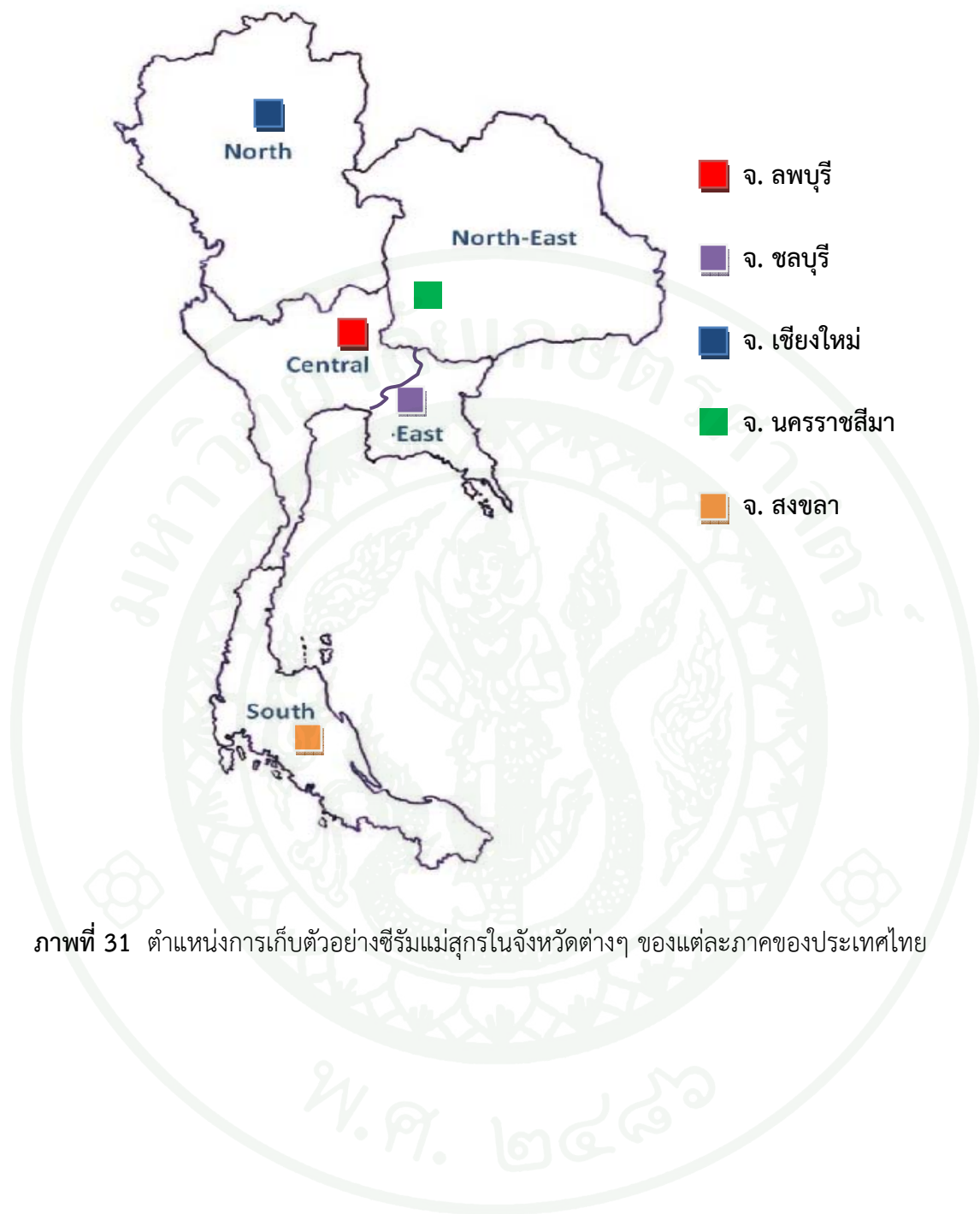
($P < 0.01$) ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับที่ยอมรับได้แสดงให้เห็นว่า NP ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการจำแนกซีรัมบวกและลบต่อเชื้อ SIV ได้ในระดับที่ยอมรับได้

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบผลการตรวจการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SIV ด้วยเทคนิค IFA และชุดทดสอบ NP ELISA

		IFA (Gold standard)			
		Cut off	+	-	Total
ELISA	> 0.5	+	1,065	18	1,083
	≤ 0.5	-	75	72	147
Total			1,140	90	1,230
K			0.568		

14. รูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคต่างๆ ของประเทศไทย

จากการตรวจหาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SIV ด้วย NP ELISA ในซีรัมแม่สุกรที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ใน 5 จังหวัด ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละภาคในประเทศไทย (ภาพที่ 31) ในช่วงปี 2552-2553 ทั้งหมด 1,548 ตัวอย่าง โดยแยกเป็นภาคกลาง เก็บตัวอย่างจาก 6 ฟาร์ม ในเขตจังหวัดลพบุรี คือ ฟาร์มหมายเลข 3, 7, 9, 15, 26 และ 34 จำนวนรวม 219 ตัวอย่าง, ภาคตะวันออก เก็บตัวอย่างจาก 6 ฟาร์ม ในเขตจังหวัดชลบุรี คือ ฟาร์มหมายเลข 5, 10, 11, 12, 22 และ 27 จำนวนรวม 328 ตัวอย่าง, ภาคเหนือ เก็บตัวอย่างจาก 9 ฟาร์มในเขตจังหวัดเชียงใหม่ คือ ฟาร์มหมายเลข 2, 6, 12, 14, 16, 21, 23, 25 และ 32 จำนวนรวม 369 ตัวอย่าง, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเก็บตัวอย่างจาก 7 ฟาร์ม ในเขตจังหวัดนครราชสีมา คือ ฟาร์มหมายเลข 8, 13, 18, 19, 20, 29 และ 33 จำนวนรวม 288 ตัวอย่าง และภาคใต้ เก็บตัวอย่างจาก 6 ฟาร์มในเขตจังหวัดสงขลา คือ ฟาร์มหมายเลข 1, 4, 24, 28, 30 และ 31 จำนวนรวม 312 ตัวอย่าง ทั้งนี้มีตัวอย่างสุญหายรวมทั้ง 5 ภาค จำนวน 32 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างซีรัมแม่สุกรในแต่ละภาคมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SIV สูงมากกว่า 90% (cut off OD ≥ 0.5) ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยพบซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ SIV ในภาคกลาง 94.52%, ภาคตะวันออก 93.90%, ภาคเหนือ 89.97%, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 96.88% และภาคใต้ 93.27% ตามลำดับ ขณะที่ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมในแต่ละภาคดังกล่าวนี้ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 17)



ภาพที่ 31 ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างซีรัมแม่สุกรในจังหวัดต่างๆ ของแต่ละภาคของประเทศไทย

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบผลตรวจการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ SIV และค่าเฉลี่ย OD จากผล NP ELISA ของตัวอย่างซีรัมที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในแต่ละภาคของปี 2552 และปี 2553

จังหวัด/ภาค (จำนวนฟาร์ม)	ผลตรวจภูมิคุ้มกันต่อ SIV		รวม (ตัวอย่าง)	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
	ด้วย NP ELISA			
	ตัวอย่างลบ (%)	ตัวอย่างบวก (%)		
ลพบุรี / กลาง (6)	12 (5.48%)	207(94.52%)	219	0.865 \pm 0.18
ชลบุรี / ตะวันออก (6)	20 (6.10%)	308 (93.90%)	328	0.860 \pm 0.15
เชียงใหม่ / เหนือ (9)	37 (10.03%)	332 (89.97%)	369	0.661 \pm 1.4
นครราชสีมา / ตะวันออกเฉียงเหนือ (7)	9 (3.13%)	279 (96.88%)	288	0.834 \pm 1.6
สงขลา / ใต้ (6)	21 (6.73%)	291 (93.27%)	312	0.822 \pm 0.15
รวม	99	1,417	1,516	

จากการเปรียบเทียบค่า OD จากผลการตรวจ NP ELISA เป็นคู่ในแต่ละเดือนหรือตามรายฟาร์มด้วยวิธี Tukey's Studentized Range (HSD) HOC comparison โดยแยกผลการวิเคราะห์เป็นภาคได้ผล ดังนี้

14.1 รูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคกลาง

เก็บตัวอย่างซีรัมจากฟาร์มต่างๆ ในจังหวัดลพบุรี ซึ่งเป็นตัวแทนภาคกลาง ได้แก่ ฟาร์มหมายเลข 3, 7, 9 และ 15 อยู่ในเขตตำบลเดียวกัน ในขณะที่ฟาร์มหมายเลข 26 และ 34 อยู่ในเขตตำบลเดียวกัน ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย OD จากผลการตรวจ NP ELISA ในแต่ละเดือน พบว่าปี 2552 มีตัวอย่างทั้งหมด 175 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ย OD รวมเท่ากับ 0.883 และแต่ละช่วงเดือนมีค่าเฉลี่ย OD แตกต่างกัน ($P < 0.05$) โดยที่ค่าเฉลี่ย OD สูงสุด (1.070) อยู่ที่เดือนกรกฎาคมซึ่งแตกต่างจากเดือนมกราคม, พฤษภาคม และตุลาคม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนค่าเฉลี่ย OD ของเดือนมกราคม, พฤษภาคม และตุลาคม ไม่มีความแตกต่างกัน ($P < 0.05$) และในปี 2553 มีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 44 ตัวอย่างค่าเฉลี่ย OD รวมทั้งปีเท่ากับ 0.851 โดยที่ค่าเฉลี่ย OD ของเดือนมีนาคม มิถุนายน และ และตุลาคมไม่มีความแตกต่างกัน ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในภาคกลาง ของปี 2552 และปี 2553

เดือน	ปี 2552		เดือน	ปี 2553	
	จำนวน ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD		จำนวน ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
มกราคม	60	0.793 ^b \pm 0.28	มีนาคม	19	0.873 \pm 0.31
พฤษภาคม	50	0.895 ^b \pm 0.22	มิถุนายน	14	0.832 \pm 0.36
กรกฎาคม	38	1.070 ^a \pm 0.23	กันยายน	11	0.836 \pm 0.30
ตุลาคม	27	0.801 ^b \pm 0.43			
รวม	175	0.883		44	0.851

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$)

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย OD ตามรายฟาร์ม ในปี 2552 (ตารางที่ 18) พบว่าค่า OD ของฟาร์ม 9 และฟาร์ม 26 มีค่าเฉลี่ย OD ต่ำที่สุด และแตกต่างจากฟาร์ม 3 ซึ่งมีค่าเฉลี่ย OD สูงที่สุดอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$) ถึงแม้ว่า ที่ตั้งของฟาร์ม 26 และ 34 จะอยู่ในตำบลเดียวกัน แต่มีค่า OD แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ในปี 2553 พบว่า ค่าเฉลี่ย OD ในแต่ละฟาร์มไม่มีความแตกต่างกัน ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในแต่ละฟาร์มในภาคกลางระหว่างปี 2552 ถึง 2553

หมายเลขฟาร์ม	2552		2553	
	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
3	30	0.988 ^b \pm 0.30	-	-
7	27	0.920 ^{bc} \pm 0.25	14	0.694 \pm 0.25
9	30	0.793 ^{ac} \pm 0.32	3	0.822 \pm 0.45
15	31	0.923 ^{bc} \pm 0.28	3	0.831 \pm 0.43
26	28	0.727 ^a \pm 0.33	13	1.030 \pm 0.21
34	29	0.943 ^{bc} \pm 0.25	11	0.852 \pm 0.38

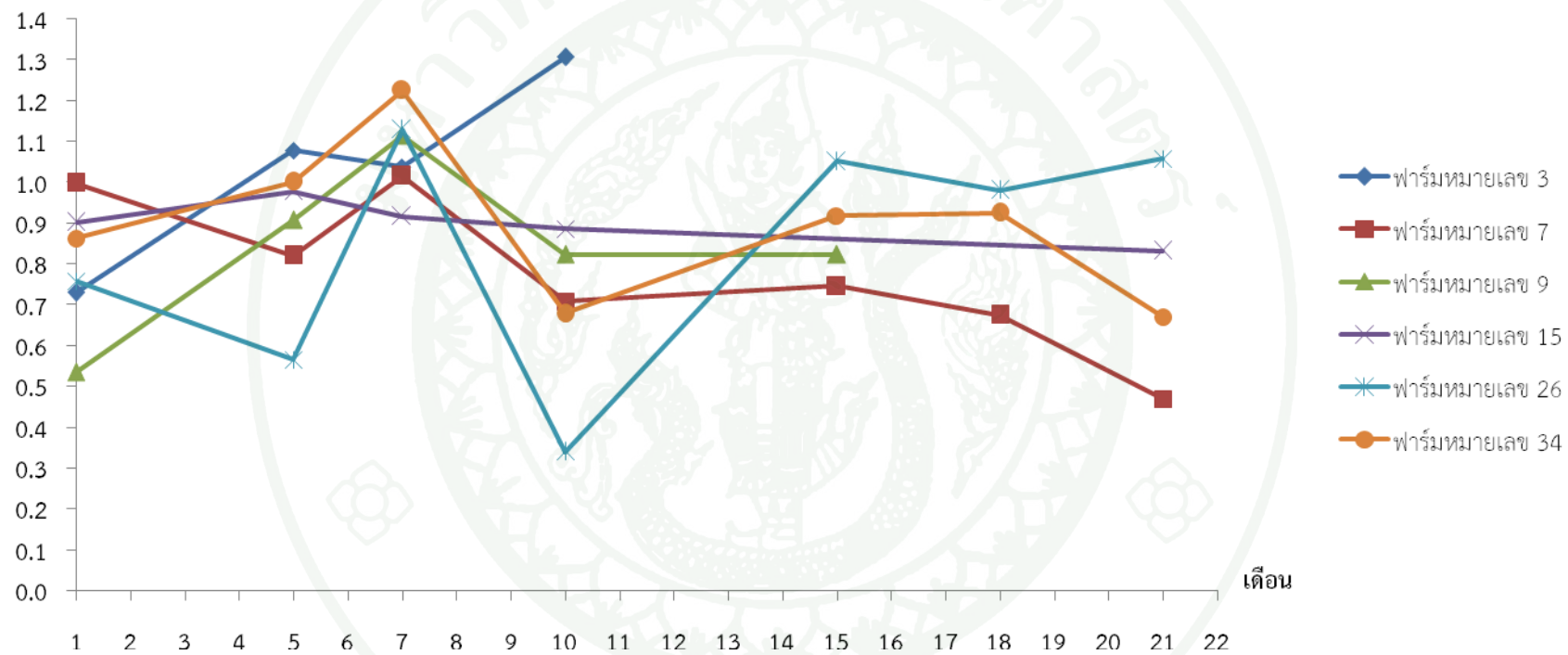
หมายเหตุ ตัวอักษร a, b และ c ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD ของแต่ละฟาร์มในเดือนที่เก็บตัวอย่างเพื่อแสดงรูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคกลาง พบว่า มีรูปแบบดังภาพที่ 32 ซึ่งเห็นชัดว่าสุกรมี

ภูมิคุ้มกันต่อ NP ทุกช่วงของปี โดยจะมีระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงที่สุดในช่วงเดือน
กรกฎาคม



ค่าเฉลี่ย OD



ภาพที่ 32 รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างผล ELISA (OD) ของตัวอย่างซีรัมที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ในภาคกลางในแต่ละช่วงเดือน

14.2 รูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคตะวันออกเฉียง

จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย OD ของภาคตะวันออกเฉียง โดยเก็บตัวอย่างจากฟาร์มต่างๆ 6 ฟาร์ม ได้แก่ ฟาร์ม 5, 11, 22 และ 27 อยู่ในเขตอำเภอเดียวกัน และฟาร์ม 10 และ 17 อยู่ในเขตอำเภอเดียวกัน พบว่า ปี 2552 มี 224 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของ OD ของซีรัมที่เก็บในช่วงเดือนต่างๆ พบว่า มีค่าเฉลี่ย OD รวมเท่ากับ 0.948 โดยเดือนพฤษภาคม 2552 มีค่าเฉลี่ย OD ต่ำที่สุด และแตกต่างจากเดือนกรกฎาคมซึ่งมีค่าเฉลี่ยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่ เดือนมกราคมและตุลาคมไม่มีความแตกต่างกัน ($P < 0.05$) และในปี 2553 มี 104 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ย OD รวมเท่ากับ 0.689 และมีค่าเฉลี่ยสูงสุดในเดือนกันยายนซึ่งแตกต่างจากเดือนมีนาคมและมิถุนายน ดังตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย OD ตามรายฟาร์ม พบว่า ในปี 2552 ฟาร์ม 5 และฟาร์ม 10 มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ขณะที่ในปี 2553 ค่าเฉลี่ย OD ของแต่ละฟาร์มไม่แตกต่างต่อกัน ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 20 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมจากสุกรในภาคตะวันออกเฉียง ของปี 2552 และปี 2553

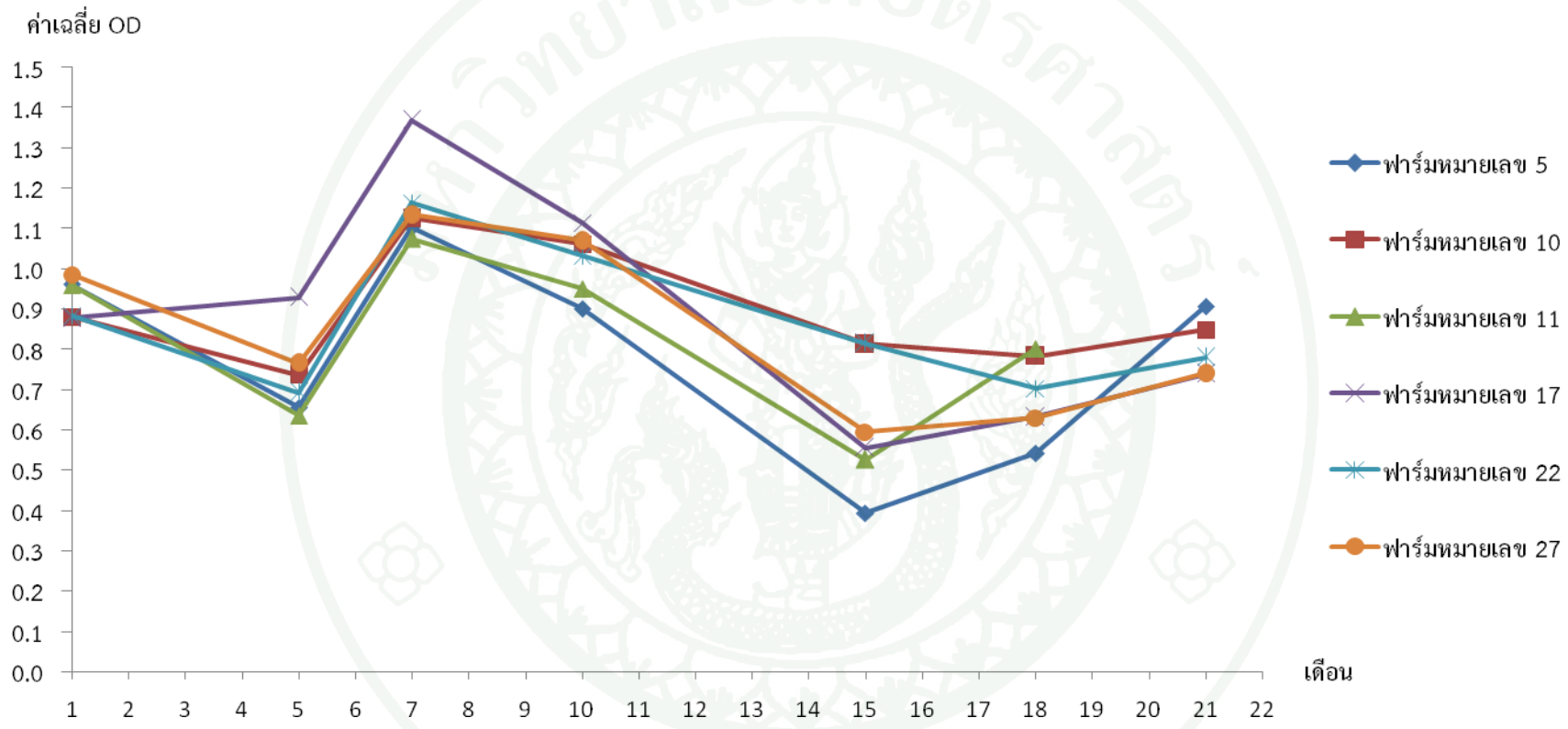
เดือน	ปี 2552		เดือน	ปี 2553	
	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD		จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
มกราคม (1)	58	0.922 ^b \pm 0.22	มีนาคม (3)	39	0.606 ^b \pm 0.27
พฤษภาคม (5)	62	0.736 ^c \pm 0.24	มิถุนายน (6)	34	0.664 ^b \pm 0.27
กรกฎาคม (7)	52	1.157 ^a \pm 0.25	กันยายน (9)	31	0.821 ^a \pm 0.19
ตุลาคม (10)	52	1.021 ^b \pm 0.28			
รวม	224	0.948		104	0.689

ตารางที่ 21 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรของฟาร์มในภาคตะวันออกเฉียงของปี 2552 และปี 2553

หมายเลขฟาร์ม	2552		2553	
	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
5	38	0.613 ^a \pm 0.26	27	0.898 ^a \pm 0.25
10	42	0.815 ^b \pm 0.34	23	0.931 ^a \pm 0.23
11	35	0.648 ^{ab} \pm 0.26	9	0.894 ^a \pm 0.30
17	36	0.629 ^{ab} \pm 0.28	15	1.053 ^a \pm 0.26
22	38	0.724 ^{ab} \pm 0.28	12	0.943 ^a \pm 0.21
27	35	0.654 ^{ab} \pm 0.30	18	0.975 ^a \pm 0.31

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD ของแต่ละฟาร์มในแต่ละเดือนเพื่อแสดงรูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า มีรูปแบบดังภาพที่ 33 ซึ่งเห็นชัดว่า สุกรการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ NP ทุกช่วงของปี โดยจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงที่สุดในช่วงเดือนกรกฎาคม





ภาพที่ 33 รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างผล ELISA (OD) ของตัวอย่างซีรัมที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในแต่ละช่วงเดือน

14.3 รูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคเหนือ

ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย OD ในแต่ละเดือนของภาคเหนือ โดยเก็บตัวอย่างจากฟาร์มต่างๆ 9 ฟาร์ม ได้แก่ ฟาร์ม 2,12, 21 และ 32 อยู่ในเขตอำเภอเดียวกัน ฟาร์ม 6 และ 12 อยู่ในเขตอำเภอเดียวกัน และฟาร์ม 14 และ 23 อยู่ในเขตอำเภอเดียวกัน พบว่า ปี 2552 มี 229 ตัวอย่างค่าเฉลี่ย OD รวมของซีรัมที่เก็บในช่วงเดือนต่างๆ เท่ากับ 0.628 โดยเดือนพฤษภาคมและตุลาคมมีค่าเฉลี่ย OD ต่ำสุด และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งแตกต่างจากเดือนมกราคมและกรกฎาคมที่มีค่าเฉลี่ย OD สูงกว่าอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$) และในปี 2553 มี 140 ตัวอย่างค่าเฉลี่ย OD รวมเท่ากับ 0.730 และในเดือนมิถุนายนมีค่าเฉลี่ยสูงแตกต่างจากเดือนมีนาคมและกันยายน ดังตารางที่ 22 เมื่อวิเคราะห์ผลค่าเฉลี่ย OD ของแต่ละฟาร์ม พบว่า ในปี 2552 พบว่า ฟาร์ม 6 และฟาร์ม 14 มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.05$) ขณะที่ในปี 2553 แต่ละฟาร์มไม่มีความแตกต่างต่อกันแต่อย่างใด ดังตารางที่ 23

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD ของแต่ละฟาร์มในแต่ละเดือนเพื่อแสดงรูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคเหนือ พบว่า มีรูปแบบดังภาพที่ 34 ซึ่งเห็นชัดว่าสุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ NP ทุกช่วงของปี โดยจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงในช่วงเดือนมกราคม และกรกฎาคม

ตารางที่ 22 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในภาคเหนือของปี 2552 และปี 2553

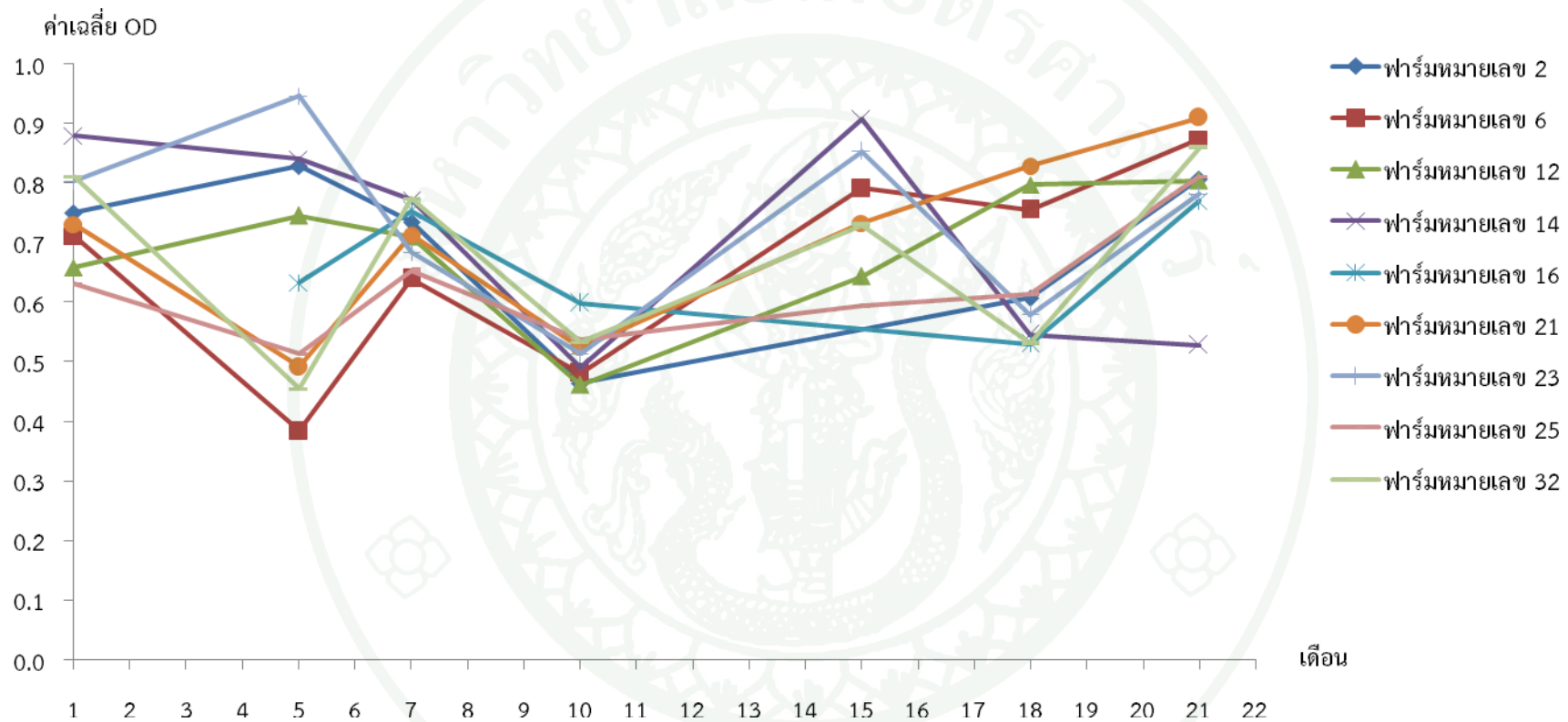
เดือน	ปี 2552		เดือน	ปี 2553	
	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD		จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
มกราคม (1)	59	0.723 ^a \pm 0.22	มีนาคม (3)	45	0.723 ^{ab} \pm 0.26
พฤษภาคม (5)	57	0.555 ^b \pm 0.23	มิถุนายน (6)	52	0.551 ^a \pm 0.23
กรกฎาคม (7)	60	0.703 ^a \pm 0.18	กันยายน (9)	43	0.832 ^b \pm 0.17
ตุลาคม (10)	53	0.515 ^b \pm 0.14			
รวม	229	0.628		140	0.730

หมายเหตุ ตัวอักษร a, และ b ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 23 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรของฟาร์มในภาคเหนือ ของปี 2552 และปี 2553

หมายเลขฟาร์ม	2552		2553	
	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
2	12	0.694 ^{ab} \pm 0.21	5	0.687 ^a \pm 0.18
6	36	0.554 ^a \pm 0.19	23	0.803 ^a \pm 0.24
12	8	0.644 ^{ab} \pm 0.15	11	0.743 ^a \pm 0.28
14	16	0.745 ^b \pm 0.22	6	0.723 ^a \pm 0.24
16	9	0.678 ^{ab} \pm 0.15	8	0.620 ^a \pm 0.20
21	40	0.615 ^{ab} \pm 0.19	22	0.807 ^a \pm 0.26
23	12	0.736 ^{ab} \pm 0.22	6	0.783 ^a \pm 0.22
25	57	0.592 ^{ab} \pm 0.20	37	0.666 ^a \pm 0.18
32	39	0.646 ^{ab} \pm 0.27	22	0.713 ^a \pm 0.24

หมายเหตุ ตัวอักษร a, และ b ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 34 รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างผล ELISA (OD) ของตัวอย่างซีรัมที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ในภาคเหนือในแต่ละช่วงเดือน

14.4 รูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย OD ในแต่ละเดือนของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเก็บตัวอย่างจากฟาร์มต่างๆ 7 ฟาร์ม ได้แก่ ฟาร์ม 8, 18, 20 และ 33 ซึ่งอยู่ในเขตอำเภอเดียวกัน และฟาร์ม 13 และ 29 ซึ่งอยู่ในเขตอำเภอเดียวกัน พบว่า ปี 2552 มี 198 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ย OD รวมที่วิเคราะห์ตามเดือนที่เก็บเท่ากับ 0.858 โดยเดือนมกราคมและพฤษภาคมมีค่าเฉลี่ย OD สูงกว่า และแตกต่างจากเดือนกรกฎาคมและตุลาคมอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$) และในปี 2553 มี 90 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ย OD รวมเท่ากับ 0.811 และในเดือนมิถุนายนมีค่าเฉลี่ยต่ำแตกต่างจากเดือนมีนาคมและกันยายน ดังตารางที่ 24 เมื่อวิเคราะห์ผลค่าเฉลี่ย OD ตามรายฟาร์ม พบว่า ในปี 2552 ฟาร์ม 29 และฟาร์ม 33 มีค่าเฉลี่ย OD แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากฟาร์มอื่น ขณะที่ปี 2553 ที่ฟาร์ม 29 มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกับฟาร์ม 13 อย่างมีนัย ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 25

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD ของแต่ละฟาร์มในแต่ละเดือนเพื่อแสดงรูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า มีรูปแบบดังภาพที่ 35 ซึ่งเห็นชัดว่า สุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ NP ทุกช่วงของปี โดยจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงที่สุดในช่วงเดือนมีนาคม

ตารางที่ 24 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของปี 2552 และ 2553

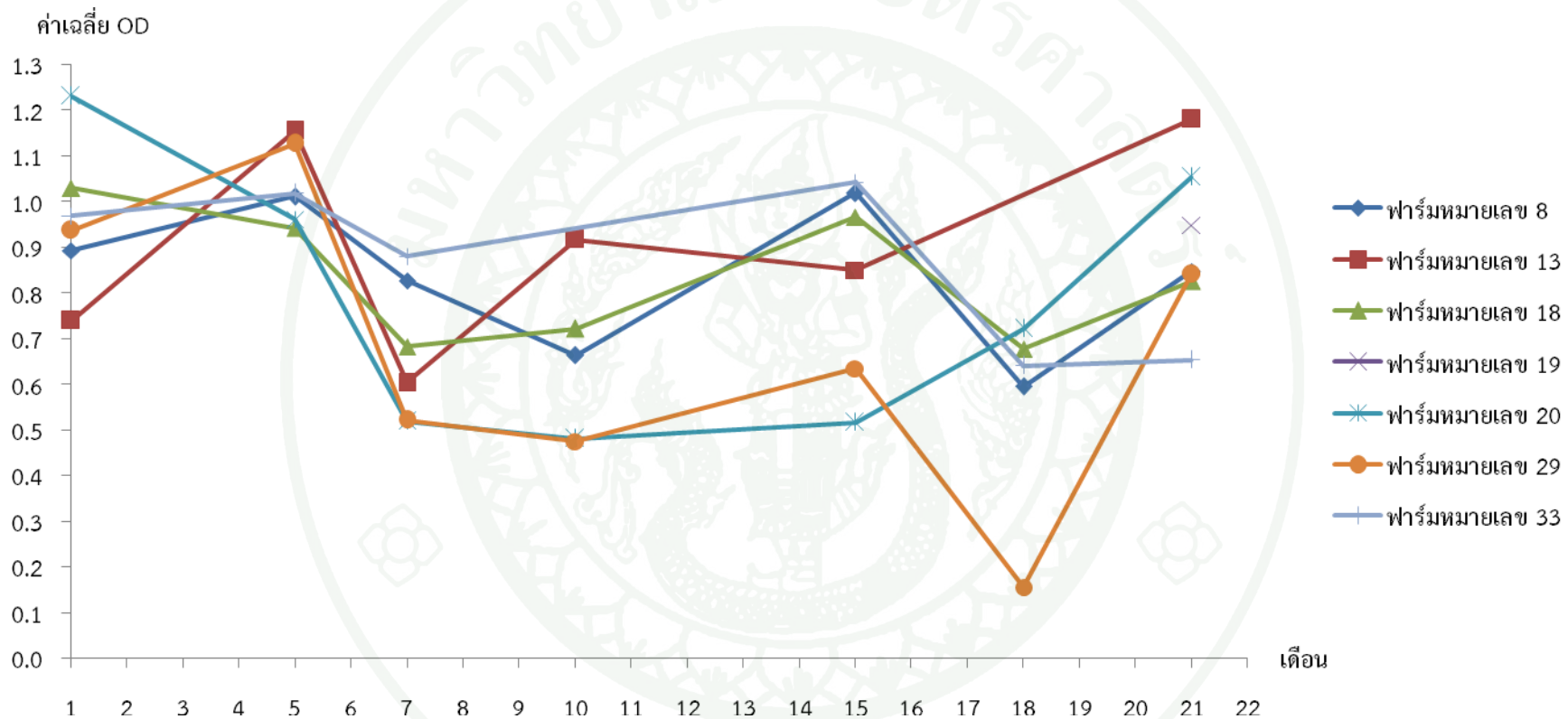
เดือน	ปี 2552		เดือน	ปี 2553	
	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD		จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
มกราคม (1)	60	0.966 ^a \pm 0.25	มีนาคม (3)	37	0.825 ^a \pm 0.30
พฤษภาคม (5)	54	1.041 ^a \pm 0.23	มิถุนายน (6)	23	0.645 ^b \pm 0.22
กรกฎาคม (7)	46	0.654 ^b \pm 0.18	กันยายน (9)	30	0.919 ^a \pm 0.27
ตุลาคม (10)	38	0.674 ^b \pm 0.24			
รวม	198			90	

หมายเหตุ ตัวอักษร a, และ b ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 25 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรของฟาร์มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของปี 2552 และปี 2553

หมายเลขฟาร์ม	2552		2553	
	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
8	32	0.874 ^{ab} \pm 0.22	15	0.837 ^{ab} \pm 0.26
13	40	0.853 ^{ab} \pm 0.28	11	0.999 ^a \pm 0.23
18	32	0.865 ^{ab} \pm 0.21	19	0.837 ^{ab} \pm 0.29
19	-	-	2	0.948 ^{ab} \pm 0.15
20	33	0.848 ^{ab} \pm 0.37	19	0.733 ^{ab} \pm 0.32
29	37	0.787 ^a \pm 0.36	11	0.666 ^a \pm 0.34
33	24	0.957 ^b \pm 0.14	13	0.798 ^{ab} \pm 0.22

หมายเหตุ ตัวอักษร a, และ b ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 35 รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างผล ELISA (OD) ของตัวอย่างซีรัมที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในแต่ละช่วงเดือน

14.5 รูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคใต้

ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย OD ในแต่ละเดือนของภาคใต้ โดยเก็บตัวอย่างจากฟาร์มต่างๆ 6 ฟาร์ม ได้แก่ ฟาร์ม 1, 24 และ 31 อยู่ในเขตอำเภอเดียวกัน และฟาร์ม 4, 28 และ 30 อยู่ในเขตอำเภอเดียวกัน พบว่า ปี 2552 มี 216 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ย OD รวมของซีรัมที่เก็บในแต่ละเดือนเท่ากับ 0.857 โดยค่าเฉลี่ย OD สูงสุดอยู่ที่เดือนกรกฎาคม และต่ำสุดที่เดือนมกราคม ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P < 0.05$) ขณะที่เดือนพฤษภาคมและตุลาคมไม่แตกต่างกัน ในปี 2553 มี 96 ตัวอย่างค่าเฉลี่ย OD รวมเท่ากับ 0.743 โดยแต่ละเดือนไม่แตกต่างกัน (P < 0.05) ดังตารางที่ 26 เมื่อวิเคราะห์ผลค่าเฉลี่ย OD ตามรายฟาร์ม พบว่า ในปี 2552 ฟาร์ม 4 และฟาร์ม 30 มีค่าเฉลี่ย OD แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีความแตกต่างจากฟาร์มอื่น (P < 0.05) ขณะที่ปี 2553 แต่ละฟาร์มมีความแตกต่างกันมาก โดยฟาร์ม 1 มีค่าเฉลี่ย OD แตกต่างจากฟาร์ม 28 แต่ไม่แตกต่างจากฟาร์มอื่น และฟาร์ม 28 เป็นฟาร์มเดียวที่มีค่าเฉลี่ย OD น้อยกว่า 0.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ซีรัมส่วนใหญ่เป็นลบ และมีค่าเฉลี่ย OD แตกต่างกับฟาร์ม 13 อย่างมีนัยทางสถิติ (P < 0.05) ดังตารางที่ 27

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD ของแต่ละฟาร์มในแต่ละเดือนเพื่อแสดงรูปแบบการติดเชื้อ SIV ของสุกรในภาคใต้ พบว่า มีรูปแบบดังภาพที่ 36 ซึ่งเห็นชัดว่าสุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ NP ทุกช่วงของปี โดยจะมีระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงสุดในช่วงเดือนกรกฎาคม

ตารางที่ 26 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรในภาคใต้ของปี 2552 และปี 2553

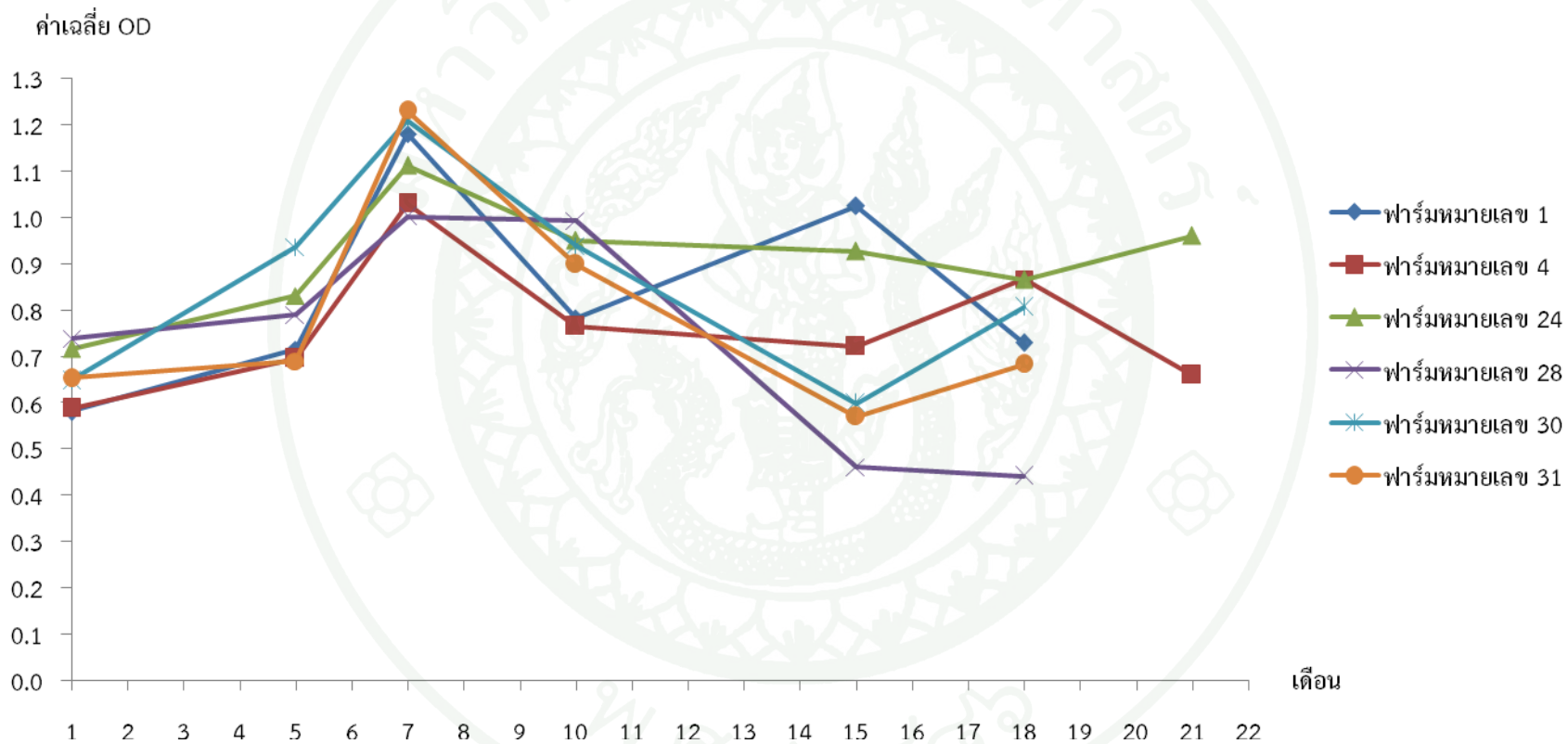
เดือน	ปี 2552		เดือน	ปี 2553	
	จำนวน ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD		จำนวน ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
มกราคม (1)	60	0.653 ^a \pm 0.18	มีนาคม (3)	49	0.730 \pm 0.34
พฤษภาคม (5)	56	0.781 ^c \pm 0.25	มิถุนายน (6)	37	0.735 \pm 0.26
กรกฎาคม (7)	54	1.130 ^b \pm 0.21	กันยายน(9)	10	0.839 \pm 0.31
ตุลาคม (10)	46	0.896 ^c \pm 0.30			
รวม	216	0.857		96	0.743

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b และ c ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ (P < 0.05)

ตารางที่ 27 ค่าเฉลี่ย OD ของซีรัมสุกรของฟาร์มในภาคใต้ของปี 2552 และปี 2553

หมายเลขฟาร์ม	2552		2553	
	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย OD \pm SD
1	36	0.817 ^{ab} \pm 0.29	17	0.920 ^{ac} \pm 0.36
4	37	0.769 ^a \pm 0.30	18	0.755 ^{abc} \pm 0.25
24	36	0.883 ^{ab} \pm 0.27	20	0.910 ^{abc} \pm 0.23
28	36	0.866 ^{ab} \pm 0.26	15	0.452 ^d \pm 0.24
30	39	0.932 ^b \pm 0.35	12	0.701 ^{abc} \pm 0.24
31	32	0.875 ^{ab} \pm 0.27	14	0.617 ^{bcd} \pm 0.24

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c และ d ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ (P < 0.05)



ภาพที่ 36 รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างผล ELISA (OD) ของตัวอย่างซีรัมที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ในภาคใต้ในแต่ละช่วงเดือน

โดยภาพรวมแล้วพบว่า สรุปรส่วนใหญ่ของประเทศมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ NP ของ SIV สูงที่สุดในช่วงเดือนกรกฎาคม ยกเว้น ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ NP สูงที่สุดในช่วงเดือนพฤษภาคม ซึ่งทั้งสองเดือนเป็นช่วงฤดูฝน (ภาพที่ 32-36)

วิจารณ์

ในการศึกษานี้ เป็นการพัฒนาชุดทดสอบ NP ELISA ทางเทคนิคพันธุวิศวกรรม โดยอาศัยการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ในระบบของ prokaryotic cell (*E. coli*) เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ปริมาณมาก, สะดวก, ประหยัด และเป็นระบบที่นิยมใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยยีน NP ถูกสอดแทรกเข้าสู่พลาสมิด pQE80L และเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนด้วย 0.2 mM IPTG ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบการเขย่า 225 rpm เป็นเวลาข้ามคืน เนื่องจากปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP (recombinant protein) ที่ผลิตได้มีน้ำหนักเท่ากับ 56 kDa และส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ inclusion bodies ซึ่งเกิดจากการม้วนพับของโปรตีนที่ผิดปกติ และรวมกันเป็นโปรตีนที่ไม่ละลาย (insoluble protein) (Baneyx, 1999) สอดคล้องกับการศึกษาของ Sianglum *et al* (2010) ที่ทำการแสดงออกโปรตีน NP ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ใน *E. coli* พบว่า โปรตีน NP ที่ได้ผลิตส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งต่อมาได้พยายามศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการแสดงออกโปรตีนในรูปที่ละลายน้ำ โดยพบว่า ที่สภาวะอุณหภูมิ 25°C และเวลา 7 ชั่วโมง นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ soluble NP อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธี affinity chromatography เนื่องจากโปรตีนที่แยกได้มีปริมาณโปรตีนอื่นของ *E. coli* ปนเปื้อนอยู่มาก

เบื้องต้นได้เลือกศึกษาโปรตีนที่อยู่ในรูปของ inclusion body โดยแยกให้บริสุทธิ์ภายใต้สภาวะเสียสภาพธรรมชาติ (denaturant condition) ด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของ 8 M urea ซึ่งสามารถทำให้คุณสมบัติของโปรตีนเปลี่ยนสภาพ และสามารถละลายได้ (Bennion and Daggett, 2003) การแยกโปรตีนภายใต้สภาวะเสียสภาพนั้น ผู้วิจัยสามารถทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้บางส่วน (partial purification) และโปรตีนลักษณะนี้จำเป็นต้องทำการคืนสภาพ (refolding) เพื่อให้สามารถทำหน้าที่ (functional activity) ได้ดีเหมือนสภาพธรรมชาติของโปรตีนเดิมมากที่สุด ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการคืนสภาพโปรตีน โดยการลดปริมาณ urea เป็นลำดับ พบว่า ปริมาณ urea ที่ต่ำที่สุดซึ่งสามารถช่วยให้โปรตีนละลายได้คือ 2 M การทำ refolding ให้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ค่อนข้างยาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายสภาวะปัจจัยที่เหมาะสม เช่น สารละลายโปรตีน (buffer), ความเข้มข้นของโปรตีน และอุณหภูมิ เป็นต้น และปริมาณโปรตีนบางส่วนสูญเสียไปหลังจากการ refolding (Yang *et al.*, 2011; Singh and Panda, 2005) ถึงแม้ว่าโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่ได้รับการคืนสภาพใน 2 M urea จะทำปฏิกิริยาต่อแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ SIV ในการทดลองใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ดังกล่าวใน ELISA พบว่า โปรตีนสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนที่ใช้ในการตรวจแอนติบอดีต่อ NP ดังนั้น โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ที่แยกให้บริสุทธิ์ภายใต้สภาวะเสียสภาพธรรมชาตินี้ จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการพัฒนา ELISA

ขณะเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP บางส่วนถูกแสดงออกในรูปโปรตีนที่ละลายน้ำ (soluble protein) และเมื่อนำโปรตีนดังกล่าวมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ภายใต้สภาวะธรรมชาติ (native condition) สามารถแยกโปรตีนได้ปริมาณ 1.5 µg/ml ต่อการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 2 ลิตร ในการเพิ่มปริมาณโปรตีนในรูปที่ละลายน้ำได้อาจทำได้ถ้าการลดอัตราการสังเคราะห์โปรตีนโดยการลดอุณหภูมิการเพาะเลี้ยง, ความเข้มข้นของสารเหนียวน้ำ และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง จะช่วยกระตุ้นให้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่แสดงออกใน *E. coli* อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้มากขึ้น ซึ่งโปรตีนลักษณะดังกล่าว จะเหมาะสมที่จะใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจวิเคราะห์ทางซีรัมวิทยา แต่ในการแยกให้บริสุทธิ์ยังเป็นไปได้ยาก (Molinkova, 2001; Wang *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011) ในการศึกษาครั้งนี้ การแยกโปรตีนและทำให้บริสุทธิ์ภายใต้สภาวะธรรมชาตินี้มีโปรตีนของ *E. coli* ปนเปื้อนอยู่บ้าง แต่เมื่อทดสอบความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี western blot แสดงให้เห็นว่า anti-histidine tag และ antiserum ที่ได้จากสุกรที่ติดเชื้อใช้หวัดสุกร (SIV convalescent serum) นั้นเกิดปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับตำแหน่งของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP ซึ่งแสดงว่าโปรตีนมีความบริสุทธิ์และมีประสิทธิภาพในระดับที่สามารถนำไปใช้เป็นแอนติเจนได้

ในการพัฒนาชุดตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SIV แบบ indirect NP-ELISA ใช้แอนติเจน NP ที่ความเข้มข้น 1 µg/ml ในการทำปฏิกิริยากับซีรัมที่ได้รับการเจือจาง 1 : 100 และ blocking buffer ที่เหมาะสม คือ 5% skim milk เนื่องจากสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (nonspecific reaction) ได้ดี โดยปกติซีรัมแม่สุกรจะมี nonspecific signal ต่อการทดสอบด้วย ELISA เป็นผลให้เกิด background สูงได้ (Konishi and Yamaoka, 1982) ในทำนองเดียวกันกับ Sullivan *et al.* (2009) ได้พัฒนาชุดทดสอบ bELISA เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ในสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า โดยเคลือบเพลตด้วยแอนติเจนรีคอมบิแนนท์ NP เซิงพาณิชย์ที่ความเข้มข้น 143 µg/ml เพื่อทำปฏิกิริยากับซีรัมเจือจาง 1 : 10 และใช้ 5% skim milk สำหรับเป็น blocking buffer ขณะที่ Pinto *et al.* (2000) ได้เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของ blocking buffer พบว่า 5% skim milk สามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะในซีรัมสุกรได้ดีกว่า 1% bovine albumin และ 1% gelatin blocking buffer เช่นเดียวกับ Yang *et al.* (2006) เลือกใช้แอนติเจนที่แยกให้บริสุทธิ์ร่วมกับการ blocking ด้วย 5% skim milk เพื่อช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะในซีรัมแม่สุกรเช่นกัน นอกจากนี้ บางรายงานก่อนหน้านี้แก้ปัญหาการเกิด background reactivity จากการทำปฏิกิริยากันระหว่างซีรัมกับแอนติเจนด้วยการใช้สารดูดซับ background ที่เตรียมได้จากโปรตีนของเชื้อ *E. coli* จับกับแอนติบอดีอื่นๆ ก่อนนำซีรัมมาตรวจสอบ หรือการใช้โปรตีนของเชื้อ *E. coli* เป็นแอนติเจนควบคุม (Rayment *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 2005)

การแปลผลการทดสอบใช้วิธีตัดสินผลการตรวจว่า เป็นบวกหรือลบ (cut-off) ที่เหมาะสมของ indirect NP ELISA คือ OD เท่ากับ 0.5 ซึ่งมีค่าไว (sensitivity) เท่ากับ 93.4% และค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 80 % ซึ่งถือว่า อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (acceptable level) ขณะที่ความคงที่จากการทดสอบซ้ำด้วยวิธี intra และ inter assay มีค่า % CV เท่ากับ 4 และ 10 ตามลำดับนั้นอยู่ในระดับดีเป็นที่ยอมรับโดยที่ค่า CV ที่ต่ำแสดงให้เห็นว่า ชุดทดสอบมีความคงที่สูงด้วย เมื่อตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ SIV ด้วย NP ELISA และเปรียบเทียบกับผลการตรวจหา

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วยวิธี IFA ได้ค่า kappa value เท่ากับ 0.568 ที่ $P < 0.01$ และค่าความถูกต้องเท่ากับ 92.4% ($P < 0.01$) ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับที่ยอมรับได้เช่นกัน

Tse *et al.* (2012) ทำการประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบ blocking-ELISA สำเร็จรูปที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ competitive ELISAs IDEXX[®] Influenza A, IDEXX AI Multi-Screen[®] และ IDVet ID Screen[®] influenza A antibody cELISA สำหรับตรวจวินิจฉัยซีรัมของสุกรที่ติดเชื้อ SIV ชนิด A ตามธรรมชาติ โดยปฏิบัติและตัดสินผลการตรวจตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตผลดังกล่าวแสดงค่า sensitivity และ specificity ของ cELISAs IDEXX[®] Influenza A เท่ากับ 86% และ 89% ตามลำดับ สำหรับ IDEXX AI Multi-Screen[®] มีค่าเท่ากับ 91% และ 87% ตามลำดับ ขณะที่ IDVet ID Screen[®] influenza A antibody cELISA มีค่าเท่ากับ 95% และ 79% ตามลำดับ โดยแสดงให้เห็นว่า indirect NP ELISA มี sensitivity และ specificity ใกล้เคียงกับชุดตรวจสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน และบางชุดตรวจมีค่า sensitivity ต่ำกว่า indirect NP ELISA ที่พัฒนาขึ้น หลายรายงานก่อนหน้านี้ยอมรับว่า ELISA เป็นเครื่องมือที่มีความเหมาะสมในการตรวจทางซีรัมวิทยามากกว่าทั้ง HI และ IFA (Saijo *et al.* 2002, Yahara *et al.* 2002, Racine *et al.* 2004) เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง ขณะที่การตรวจวินิจฉัยด้วย IFA มีข้อจำกัดที่ควรคำนึง คือ การควบคุมคุณภาพเซลล์และระยะเวลาการ infection ที่เหมาะสมรวมถึงความชำนาญในการตรวจผลล้วนอาจส่งผลให้การแปลผลที่ผิดพลาดได้

ถึงแม้ว่า Indirect NP ELISA ที่พัฒนาขึ้นจะมีประสิทธิภาพในการตรวจหาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SIV เพื่อจำแนกซีรัมบวกและลบต่อเชื้อ SIV ในระดับที่ยอมรับได้ (acceptable level) อย่างไรก็ตาม สามารถพัฒนาประสิทธิภาพของ indirect NP ELISA ให้มากขึ้นได้ โดยการพัฒนาปรับปรุงวิธีการแยกแอนติเจนให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นและเพิ่มจำนวนซีรัมบวกแท้จริง (true positive) และลบแท้จริง (true negative) หรือมีการเก็บซีรัมในแต่ละช่วงอายุสุกรให้หลากหลายมากขึ้นอาจทำให้ค่า sensitivity และ specificity สูงขึ้นได้

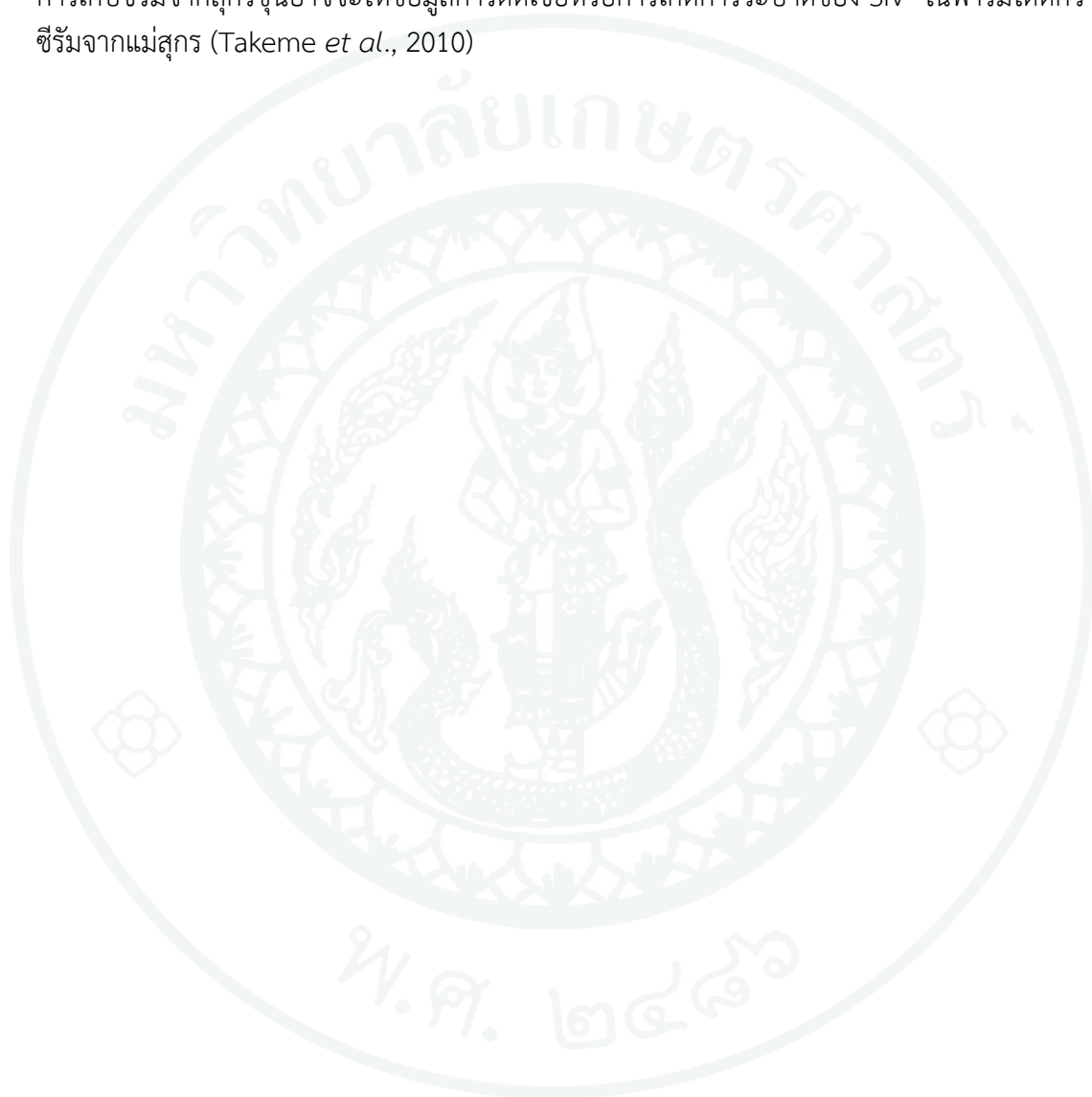
การศึกษาครั้งนี้ได้การพัฒนาชุดทดสอบ NP ELISA เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ NP ของ SIV ในตัวอย่างซีรัมแม่สุกรตัวเดียวกันทุกๆ 3-4 เดือนของปี 2552 และปี 2553 เพื่อติดตามรูปแบบการติดเชื้อ SIV ของซีรัมแม่สุกรที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ใน 5 จังหวัดของแต่ละภาคในประเทศไทยทั้งหมด 1,230 ตัวอย่าง พบว่า ความชุกทางซีรัมวิทยาในแต่ละจังหวัดของแต่ละภาคของไทยเฉลี่ยร้อยละ 90 แสดงว่า แม่สุกรมีการสัมผัสเชื้อ SIV แม้จะไม่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคนี้อีก่อน แสดงว่า SIV เป็นเชื้อไวรัสที่สามารถพบได้บ่อยในสุกรของประเทศไทย (ubiquitous pathogen) ใช้หวัดใหญ่สุกรอาจเป็นโรคประจำถิ่น (endemic) ในฟาร์มสุกรที่มีการระบาดและเกิดได้อย่างต่อเนื่อง และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ SIV ในแต่ละภาคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ช่วงฤดูร้อน (เดือนเมษายน) และมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงที่สุดในช่วงกลางฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม) และค่อยๆ ลดลงแต่ยังอยู่ในระดับที่แสดงว่ามีการติดเชื้อ ยกเว้นภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ SIV สูงสุดในเดือนพฤษภาคม โดยการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงในช่วงฤดูฝน ซึ่งแตกต่างกับ

รายงานการระบาดก่อนหน้าในประเทศ เช่น Damrongwatanapokin *et al.* (2003) ทำการสำรวจทางซีรัมวิทยาต่อ SIV สายพันธุ์ H1N1 ในเดือนตุลาคม 2002 ถึงเดือนมกราคม 2003 จากสุกรใน 15 จังหวัด ด้วยวิธี ELISA พบผู้แม่สุกรและสุกรขุนมีความชุกในระดับผู้เลี้ยง 44 และ 20 ตามลำดับ และในปีเดียวกัน Pachariyanon (2006) ทำการศึกษาสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกรระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม 2003 จากสุกรใน 5 จังหวัดด้วยวิธี haemagglutination inhibition (HI) และ serum neutralization test (SNT) พบว่า ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ SIV สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 เพียง 7.9% และ 20.6% ตามลำดับโดยต่อเนื่อง Damrongwatanapokin *et al.* (2006) การสำรวจทางซีรัมวิทยาของ SIV อีกครั้งในระหว่างเดือนตุลาคม 2003 ถึงเดือนมีนาคม 2004 จากสุกรใน 35 จังหวัด พบซีรัมจากผู้แม่สุกรให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ร้อยละ 91 และ 52 ตามลำดับ สังเกตได้ว่ารายงานการสำรวจส่วนใหญ่ มักจะทำการศึกษาในช่วงฤดูหนาวที่มีอากาศหนาวเย็น

เนื่องจากไข้หวัดใหญ่ในสุกรเป็นโรคระบบทางเดินหายใจ ดังนั้น ตัวการสำคัญของการเกิดอุบัติการณ์ของโรค คือ การแพร่กระจายของเชื้อในอากาศซึ่งสามารถติดต่อกันโดยหายใจเอาเชื้อไวรัสที่ฟุ้งกระจายอยู่ในเสมหะ น้ำมูก น้ำลายของสัตว์ป่วยที่ไอหรือจามออกมาที่อุณหภูมิ 30°C และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 20-80% เชื้อไข้หวัดใหญ่สามารถแพร่กระจายผ่าน airborne transmission ได้เช่นกัน (Lowen *et al.* 2008) ถึงแม้ว่า ในเขตที่มีอากาศอบอุ่น (Temperate climates) ช่วงที่พบการระบาดมาก คือ ฤดูหนาว (Lee *et al.*, 1993) จากการศึกษาการติดต่อของโรคไข้หวัดใหญ่ในหนูตะเภา พบว่า วิธีของการติดต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในเขตอบอุ่นและเขตร้อนนั้น ต่างกัน (Lowen and Palese, 2009) ในเขตอบอุ่นการติดต่ออย่างมีประสิทธิภาพเกิดการหายใจ (aerosol transmission) และมักจะเกิดในช่วงฤดูหนาวที่มีอากาศเย็นและความชื้นต่ำ เพราะ aerosol transmission จะถูกยับยั้งเมื่อความชื้นสูงขึ้น (80% relative humidity) หรืออากาศร้อนขึ้น (39°C) ในขณะที่ ในเขตร้อนการติดต่อโดยการสัมผัสจะเป็นวิถีทางการติดต่อของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่สำคัญ ซึ่งจะเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อมีความชื้นสัมพัทธ์สูงและมีอุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบการติดเชื้อ SIV ในประเทศไทยที่พบแอนติบอดีต่อ NP สูงที่สุดในฤดูฝน ในทุกภาคของประเทศไทยนอกจากนั้น ทางภาคใต้ของไทยไม่มีช่วงของฤดูหนาว มีเพียงฤดูฝนและร้อนเท่านั้นยังสามารถตรวจพบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ SIV ในระดับสูงได้ใกล้เคียงกับภาคอื่นๆ นอกจากนี้ การระบาดของไข้หวัดใหญ่ในคนที่เกิดในประเทศไทยก็มักพบการระบาดได้ในคนสูงที่สุดในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝนของไทยเช่นกัน (Simmerman *et al.*, 2008, Youthoa *et al.*, 2007) ดังนั้น การแพร่กระจายของเชื้อทางการสัมผัสทางตรงและทางอ้อมอาจเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคในช่วงฤดูกาลเช่นนี้ในประเทศเขตร้อน (tropical regions) (Lowen *et al.* 2008) ซึ่งประเทศไทยก็ถูกจัดอยู่ในเขตร้อนด้วย

ผลการวิจัยครั้งนี้ พบว่า การตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SIV ในแม่สุกรอาจไม่สามารถยืนยันได้อย่างแน่ชัดถึงอุบัติการณ์ของโรคที่เกิดขึ้นในช่วงเวลานั้นๆ เนื่องจากแม่สุกรมีวงจรชีวิตที่ยาวจึงมีโอกาสติดเชื้อ SIV ได้บ่อยครั้ง และภายหลังจากติดเชื้อระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันก็อาจคงอยู่ได้นานถึง 28 เดือน (Martin *et al.*, 2011) อีกทั้งการตรวจวินิจฉัยด้วย ELISA

มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถตรวจหาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในระยะแรกของการติดเชื้อได้ จึงไม่สามารถบอกถึงการติดเชื้อที่เพิ่งเกิดขึ้น (recent infection) ได้ จากการศึกษาเปรียบเทียบ การตรวจหาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ SIV ด้วยวิธี HI และ ELISA โดยหลังจากได้รับการฉีดเชื้อ SIV ในสุกรและทำการเก็บซีรัมในวันที่ 7, 14 และ 28 ตามลำดับ พบซีรัมผลบวกต่อ SIV ด้วย ELISA เท่ากับ 0%, 75%, และ 100% ตามลำดับ วันที่เก็บตัวอย่าง (Yoon *et al.*, 2004) นอกจากนี้ การเก็บซีรัมจากสุกรขุนอาจจะให้ข้อมูลการติดเชื้อหรือการเกิดการระบาดของ SIV ในฟาร์มได้ดีกว่า ซีรัมจากแม่สุกร (Takeme *et al.*, 2010)



สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้สามารถโคลนยีน NP ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร A/swine/IA15/ 1930 ที่สอดแทรกอยู่ในพลาสมิด pQE80L Expression vector ได้สำเร็จและถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อผลิต 6XHis-NP recombinant protein และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP คือ การเหนี่ยวนำด้วย 0.2 mM IPTG เพาะเลี้ยงโดยระบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 225 rpm ด้วยอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาข้ามคืน โปรตีน NP ที่ผลิตได้มีขนาด \sim 56 kDa อยู่ในทั้งรูปแบบ inclusion body ของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble protein) และโปรตีนที่ละลายน้ำ (soluble protein) โปรตีนที่อยู่ในรูป soluble protein เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ภายใต้สภาวะธรรมชาติมีความบริสุทธิ์และอยู่ในสภาพที่เหมาะสมกว่าจึงเหมาะนำไปใช้เป็นแอนติเจน และโปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP สามารถจับอย่างจำเพาะกับ antibody ที่ได้จากสุกรที่ติดเชื้อไข้หวัดสุกร จากผลดังกล่าวแสดงถึงความสำเร็จของการโคลนสังเคราะห์และแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ NP ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A/swine/IA1930

ชุดตรวจสอบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกรชนิด A แบบ indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้น (NP ELISA) โดยใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NP เป็นแอนติเจนที่ความเข้มข้น 1 μ g /ml มีอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่างซีรัมและโปรตีนแอนติเจนที่ dilution 1 : 100 โดยสารละลาย 5% skim milk (blocking buffer) สามารถลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะได้ดี ส่วนค่า cut-off ที่เหมาะสมในการใช้เป็นค่ากำหนดผลการตรวจว่าเป็นบวกหรือลบ คือ 0.5 ซึ่งมีค่า sensitivity เท่ากับ 93.4% และค่า specificity เท่ากับ 80.0 % ซึ่งถือว่า อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ และการทดสอบความคงที่ภายในเพลต (intra assay) และระหว่างเพลต (inter plate) มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 แสดงให้เห็นว่าการทดสอบมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือดีเป็นที่ยอมรับ (acceptable level) คือ ไม่เกิน 30% (Jacobson, 1998) เมื่อนำชุดทดสอบ indirect NP ELISA มาตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดสุกรชนิด A ในซีรัมแม่สุกรจำนวน 1,230 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบค่าความสัมพันธ์กันของผลการตรวจสอบด้วยวิธี IFA ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า มีค่าการยอมรับทางสถิติ (kappa value) คือ 0.568 ที่ $p < 0.01$ โดยมีค่าความถูกต้อง (accuracy) เท่ากับ 92.4% ($P < 0.01$) ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ แสดงให้เห็นว่า ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพในตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อโรคไข้หวัดสุกรชนิด A แทนวิธี IFA ที่มีข้อจำกัดในด้านความชำนาญในการตรวจผลได้

ทั้งนี้แม้ประสิทธิภาพของเครื่องมือที่พัฒนาขึ้นยังอยู่ในระดับที่ยอมรับได้เท่านั้น หากมีการพัฒนาประสิทธิภาพในด้านการเตรียมแอนติเจน ความไว และความจำเพาะให้สูงขึ้น อาจเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในเชิงการตรวจคัดกรอง และเฝ้าระวังโรคไข้หวัดใหญ่ในสุกรติดเชื้อ หรือติดเชื้อ แต่อาจไม่แสดงอาการก่อนนำเข้าสู่ฟาร์มเพื่อป้องกันการระบาดของโรคสู่ฟาร์มได้ อีกทั้งสามารถนำข้อมูลจากผลการตรวจวินิจฉัยมาประกอบการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งในประชากรสุกร และรวมถึงการป้องกันการติดเชื้อในคนด้วยเช่นกัน เนื่องจาก NP ELISA เป็นเครื่องมือที่ผลิตขึ้นจากเทคนิคทางพันธุกรรม จึงสามารถพัฒนาและควบคุมการผลิตให้ดีขึ้นได้ง่าย

นอกจากนี้ วิธีการตรวจสอบยังทำได้หลายตัวอย่างในคราวเดียว รวดเร็ว มีความไวสูง และให้การแปลผลที่น่าเชื่อถือได้

รูปแบบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากการตรวจหาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยชุดทดสอบ NP ELISA ที่พัฒนาขึ้นในซีรัมแม่สุกรที่เก็บจากฟาร์มต่างๆ ใน 5 จังหวัด ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละภาคในประเทศไทย ในช่วงปี 2552 และปี 2553 ทั้งหมด 1,548 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างซีรัมแม่สุกรในแต่ละภาคมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด A สูง (OD > 0.5) หรือมากกว่า 90% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบค่า OD เป็นคู่ในแต่ละเดือนหรือตามรายฟาร์มด้วยวิธี Tukey's Studentized Range (HSD) HOC comparison โดยภาพรวมแล้ว พบว่า สุกรส่วนใหญ่ของประเทศมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ NP สูงที่สุดในช่วงเดือนกรกฎาคม ซึ่งเป็นฤดูฝน ยกเว้น ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีระดับภูมิคุ้มกันต่อ NP สูงที่สุดในช่วงเดือนพฤษภาคม

การศึกษารูปแบบการติดเชื้อ SIV ในสุกรครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า SIV เป็นไวรัสที่พบได้บ่อยในสุกรจากทุกภาคของประเทศไทย ซีรัมแม่สุกรในแต่ละจังหวัดของแต่ละภาคในประเทศไทย มีระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ SIV จากการตรวจด้วย NP ELISA ตลอดทั้งปีและระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจะสูงที่สุดในเดือนกรกฎาคม ทั้งนี้ ปัจจัยการเกิดโรคอาจเป็นด้วยหลายสาเหตุ เช่น การสุขาภิบาล, ความหนาแน่นในคอก, การใช้อุปกรณ์เครื่องมือร่วมกัน, การเคลื่อนย้ายสุกร และการนำสุกรใหม่เข้าทดแทน การควบคุมสัตว์อื่นเข้าฟาร์มเช่น นก, หนู และสุนัข รวมทั้งคนด้วย ดังนั้น เพื่อให้ข้อมูลการติดตามรูปแบบการเกิดโรคเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ควรมีการวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคร่วมกับการสำรวจทางไวรัสวิทยาซีรัมวิทยา และการออกแบบสำรวจสอบถาม (questionnaires) เพิ่มเติมด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ภาวพันธ์ ภัทรโกศล และ ประเสริฐ เอื้อวรากุล. 2549. **ไขหวัดใหญ่/ไขหวัดนก**. บริษัทโนว์เลจด์เพรส จำกัด, กรุงเทพฯ.
- Alexander, D. J. 2007. An overview of the epidemiology of avian influenza. **Vaccine** 25(30): 5637-5644.
- Allwinn, A., W. Preiser, H. Rabenau, S. Buxbaum, M. Sturmer and H.W. Doerr. 2002. Laboratory diagnosis of influenza—virology or serology?. **J. Med Microbiol Immunol Rev.** 191: 157–160.
- Amonsin, A, S. Payungporn, A.Theamboonlers, R. Thanawongnuwech, S. Suradhat, N. Pariyothorn, R. Tantilertcharoen, S. Damrongwattanapokin, C. Buranathai, A. Chaisingh, T. Songserm and Y. Poovorawan. 2005. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. **J Virol** (in press)
- Arikawa, J., N. Yamane, K. Totsukawa and N. Ishida. 1982. The follow-up study of swine and Hong Kong influenza virus infection among Japanese hogs. **Tohoku J Exp Med** 136(4): 353-358.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol** 10(5): 411-421.
- Baudin, F., C. Bach, S. Cusack and R. W. H. Ruigrok. 1994. Structure of influenza RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to solvent. **J EMBO**13: 3158-3165.
- Benjamin, G. Hale, R.E.R., Juan Ortiin and David Jackson. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. **J Gen Virol** 89: 2359–2376.
- Bennion, B.J. and V. Daggett. 2003. The Molecular Basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proc Natl Acad Sci USA** 100(9): 5142-5147.
- Biswas, S.K., P.L. Boutz and D.P. Nayak. 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. **J. Virol.** 7: 5493-5501.

- Bouvier, N and P. Palese. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4: D49–D53
- Brown, I. H. 2001. The pig as an intermediate host for influenza A viruses between birds and humans. *Int Congr Ser* 1219, 173–178.
- _____. 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet. Microbiol.* 74(1-2): 29–46.
- _____, S.H. Done, Y.I. Spencer, W.A. Cooley, P.A. Harris and D.J. Alexander. 1993. Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. *Vet Rec* 132(24): 598–602.
- Cao, S. X. Liu, M. Yu, J. Li, X. Jia, Y. Bi, L. Sun, G.F. Gao and W. Liu. 2012. A Nuclear Export Signal in the Matrix Protein of Influenza A Virus Is Required for the Efficient Virus Replication. *J. Virol* 86(9): 4883-4891.
- Carr, C.M., C. Chaudhry, P.S. Kim. 1997. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14306–14313
- Chen, J. and Y.M. Deng. 2009. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. *J Virol* 6: 30.
- Chen, H, X. Wen, K.K. To, P. Wang, H. Tse, J.F. Chan, H.W. Tsoi, K.S. Fung, C.W. Tse, R.A. Lee K.H. Chan and K.Y. Yuen. 2010. Quasispecies of the D225G substitution in the hemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus from patients with severe disease in Hong Kong, China. *J Infect Dis* 201(10): 1517–1521.
- Christman, M.C., A. Kedwaii, J. Xu, R.O. Donis and G. Lu. 2011. Pandemic (H1N1) 2009 virus revisited: an evolutionary retrospective. *Infect Genet Evol* 11(5): 803-811.

- Chutinimitkul, S, S. Herfst, J. Steel, A.C Lowen, J. Ye, V.D. Riel, E.J. Schrauwen, T.M. Bestebroer, B. Koel, D.F. Burke, K.H. Sutherland-Cash, C.S. Whittleston, C.A. Russell, D.J. Wales, D.J. Smith, M. Jonges, A. Meijer, M. Koopmans, G.F. Rimmelzwaan, T. Kuiken, A.D. Osterhaus, A. G. Sastre, D.R. Perez and R.A.Fouchier. 2010. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus affects receptor binding. **J Virol** 84(22): 11802-11813.
- _____, N. Thippamom, S. Damrongwatanapokin, S. Payungporn, R. Thanawongnuwech, A. Amonsin, P. Boonsuk, D. Sreta, N. Bunpong, R. Tantilertcharoen, P. Chamnanpood, S. Parchariyanon, A. Theamboonlers and Y. Poovorawan. 2008. Genetic characterization of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza virus in Thailand. **Arch Virol** 153(6): 1049–1056.
- Ciccozzi M, M.B. Mina, A.L. Presti, F. Marcuccilli, C.F. Perno and M. Ciotti. 2011. Phylogenesis and Clinical Aspects of Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) Virus Infection. **Virol J** 5: 22–26
- Clavijo, A., D.B. Tresnan, R. Jolie, and E. M. Zhou. 2002. Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. **Can J Vet Res** 66(2): 117–121.
- Coloma, R., J.M. Valpuesta, R. Arranz, J.L. Carrascosa, J. Ortin and J. Martin-Benito. 2009. The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. **PLoS Pathog** 5(6): e1000491.
- Damrongwatanapokin, S., S. Pachariyanon and W. Pinyochon. 2003. Serological study of swine influenza virus H1N1 infection in pigs of Thailand, p. 261. *In* P. Martelli, S. Cavarani and A. Lavazza, eds. **Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig diseases**. 29 June-2 July 2003, University of Parma, Rome.
- _____, W. Pinyochon., S. Pachariyanon and T. Damrongwatanapokin. 2006. Serological study and isolation of influenza A virus infection of pigs in Thailand, p. 136. *In* **Proceedings of the 19th IPVS Congress**. 16-19 July 2006, International Pig Veterinary Society, Copenhagen, Denmark.

- Das, K., J.M. Aramini, L.C. Ma, R.M. Krug and E. Arnold. 2010. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. **Nat Struct Mol Biol** 17(5): 530-538.
- Dasco, C.C., R.B. Couch, H.R. Six, W.F. Young, J.M. Quarles and J.A. Kasel. 1984. Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections. **J Clin.Microbiol** 20: 833-835.
- Desrosier, R. 2004. Epidemiology, diagnosis and control of swine diseases. **Proc Annu Meet Am Assoc Swine**: 9-37.
- De Vleeschauwer, A., K Atanasova, S. V. Borm, T V. D. Berg, T.B. Rasmussen, A.S. Uttenthal, and K. V. Reeth. 2009. Comparative Pathogenesis of an Avian H5N2 and a Swine H1N1 Influenza Virus in Pigs. **PLoS ONE** 4(8): 6662
- Digard, P., D. Elton, K. Bishop, E. Medcalf, A. Weeds and B. Pope. 1999. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. **J Virol** 73(3): 2222-2231.
- Easterday, B.C. and K. Van Reeth. 1999. Swine influenza, 277–290. *In* B.E. Straw, S. D’Allaire, W.L. Mengeling, and D.J. Taylor, eds. **Disease of swine**. 8th ed. Wiley & Sons, New York.
- Ellis, J.S. and M.C. Zambon. 2001. Combined PCR–Heteroduplex mobility assay for detection and differentiation of influenza A viruses from different animal species. **J Clin Microbiol** 39(11): 4097–4102.
- _____. 2002. Molecular diagnosis of influenza. **Rev. Med. Virol** 12: 375–389.
- Elton, D., L. Medcalf, K. Bishop, D. Harrison and P. Digard. 1999a. Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. **J Virol** 73(9): 7357-7367.
- _____, M Simpson-Holley, K. Archer, L. Medcalf, R. Hallam, J. McCauley, and P. Digard. 2001. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. **J Virol** 75: 408-419.

- Ferraris, O. and B. Lina. 2008. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. **J Clin Virol** 41(1): 13-19.
- Fodor, E., D. C. Pritlove and G. G. Brownlee. 1994. The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. **Virol** 68: 4092-4096.
- Fraser, C., C.A. Donnelly, S. Cauchemez, W.P. Hanage, M.D. Van Kerkhove, T.D. Hollingsworth, J. Griffin, R.F. Baggaley, H.E. Jenkins, E.J. Lyons, T. Jombart, W.R. Hinsley, N.C. Grassly, F. Balloux, A.C. Ghani, N.M. Ferguson, A. Rambaut, O.G. Pybus, H. Lopez-Gatell, C.M. Alpuche-Aranda, I.B. Chapela, E.P. Zavala, D.M. Guevara, F. Checchi, E. Garcia, S. Hugonnet and C. Roth 2009. WHO Rapid Pandemic Assessment Collaboration. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. **Science**. 324(5934): 1557-1561.
- Garman, E and G. Laver. 2005. The Structure, Function, and Inhibition of Influenza Virus Neuraminidase, 247-267. *In* W. Fischer, ed. **Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design**. Plenum Publishers, New York.
- Garten, R.J., C.T. Davis, C.A. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, W.M. Sessions, X. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J. Barnes, C.B. Smith, S.L. Emery, M.J. Hillman, P. Rivailler, J. Smagala, M. de Graaf, D.F. Burke, R.A.M. Fouchier, C. Pappas, C.M. Alpuche-Aranda, H. López-Gatell, H. Olivera, I. López, C.A. Myers, D. Faix, P.J. Blair, C. Yu, K.M. Keene, P.D. Dotson Jr., D. Boxrud, A.R. Sambol, S.H. Abid, K. St. George, T. Bannerman, A.L. Moore, D.J. Stringer, P. Blevins, G.J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, S. Waterman, S. Smole, H.F. Guevara, E.A. Belongia, P.A. Clark, S.T. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, C.B. Bridges, M. Shaw, D.B. Jernigan, T.M. Uyeki, D.J. Smith, A.I. Klimov and N.J. Cox. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. **Science** 325(593): 197–201.
- Gavin, P.J. and R.B. Thomson. 2003. Review of Rapid Diagnostic Tests for Influenza. **Clin Applied Immunol Rev** 4: 151–172.

- Gjerset, B., C. Er. S. Løtvedt, A. Jørgensen, O. Hungnes, B. Lium and A. Germundsson. 2011. Experiences after Twenty Months with Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Infection in the Naïve Norwegian Pig Population. **Influenza res treat** 2011(206975): 1-7.
- Guo, Y., F. Jin, P.Wang, M.Wang, and J. Zhu. 1983. Isolation of influenza C virus from piggand experimental infection of pigs with influenza C virus. **J. Gen. Virol.** 64: 177-182.
- _____, X. L, L. Li, D.Q. Wei, Y.S. Zhu and K.C. Chou. 2008. Cleavage mechanism of the H5N1 hemagglutinin by trypsin and furin. **Amino Acids** 35: 375-382.
- Guan, Y., K.F. Shortridge, S. Krauss, P.H. Li, Y. Kawaoka, R.G. Webster. 1996. Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. **J Virol** 70(11): 8041-8046.
- Haye, K., S. Burmakina, T. Moran, A. García-Sastre and A. Fernandez-Sesma. 2009. The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. **J Virol** 83(13): 6849-6862.
- Heinen, P. 2003. **Swine influenza: a zoonosis.** Veterinary Sciences Tomorrow. Available Source: <http://www.vetscite.org>, 20, September, 2012.
- Herfst, S, S. Chutinimitkul, J. Ye, E. de Wit, V.J. Munster, E.J.A. Schrauwen, T.M. Bestebroer, M. Jonges, A. Meijer, M. Koopmans, G.F. Rimmelzwaan, A.D.M.E. Osterhaus, D.R. Perez and R.A.M. Fouchier. 2010. Introduction of virulence markers in PB2 of pandemic swine-origin influenza virus does not result in enhanced virulence or transmission. **J Virol** 84(8): 3752-3758.
- Hernandez, L.D., L.R. Hoffman, T.G. Wolfsberg and J.M. White. 1996. Virus-cell and cell-cell fusion. **Annu Rev Cell Dev Biol** 12:627-661
- Holsinger, L.J., D. Nichani, L.H. Pinto and R.A. Lamb. 1994. Influenza A virus M2 ion channel protein: A structure function analysis. **J virol** 68(3): 1551-1563.

- Huang, L, S. Mollet, S. Souquere, F. Le Roy, M. Ernoult-Lange, G. Pierron, F. Dautry and D. Weil. 2011. Mitochondria associate with P-bodies and modulate microRNA-mediated RNA Interference. **J Biol Chem** 286: 24219–24230.
- Hutchinson, E.C., J.C. von Kirchbach, J.R.Gog and P. Digard. 2010. Genome packaging in influenza A virus. **J Gen Virol.** 91(2): 313–328.
- Infante, P.R., N. Jorba, R. Coloma and J. Ortín. 2011. The influenza RNA synthesis machine: Advances in its structure and function. **RNA Biol.** (2): 207–215.
- Ito, T., J.N. Couceiro, S. Kelm, L.G. Baum, S. Krauss, M.R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J.C. Paulson, R.G. Webster and Y. Kawaoka. 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. **J. Virol** 72(9): 7367-7373.
- _____, Y. Kawaoka, A. Vines, H. Ishikawa, T. Asai and H. Kida. 1998. Continued Circuration of reassortant H1N2 influenza virus in pig in Japan. **Arch Virol** 143(9): 1773-1782.
- Jacobson, R.H. 1998. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.** 17(2): 469-486.
- Jung, K. and C. Chae. 2004. Phylogenetic analysis of an H1N2 influenza A virus isolated from pig in korea. **Arch viral.** 149(7): 1415-1422.
- Jung, Y. Ha and C. Chae. 2005. Pathogenesis of Swine Influenza Virus Subtype H1N2 Infection in Pigs. **J Comp Pathol** 132(2-3): 179–184.
- Kanai, C.K., S. Suwicha, K. Nadhirat, M. Nerome, M. Nakayama and A. Oya. 1981. Isolation and serological characterization of influenza A virus from a pig in Thailand. **J. Med Sci Biol** 34(3): 175-178.
- Kawakami, E., T. Watanabe, K. Fujii, H. Goto, S. Watanabe, T. Noda and Y. Kawaoka. 2011. Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA. **J Virol Methods** 173(1): 1–6.

- Kilander A, R. Rykkvin, S. Dudman and O. Hungnes. 2010. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010. **Euro Surveill** 15: 19498.
- Kitikoon, P., A.L. Vincent, P.C. Gauger, S.N. Schlink, D.O. Bayles, M.R. Gramer, D. Darnell, R.J. Webby, K.M. Lager, S.L. Swenson and A. Klimov. 2012. Pathogenicity and transmission in pigs of the novel A (H3N2) v influenza virus isolated from humans and characterization of swine H3N2 viruses isolated in 2010-2011. **J Virol** 86(12): 6804-6814.
- Konishi, E. and M. Yamaoka. 1982. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to Japanese encephalitis virus in swine sera. **J Virol Methods** 5: 247-253.
- Kupradinun, S., P. Peanpijit, C. Bhodhikosoom, Y. Yoshioka, A. Endo and K. Nerome. 1991. The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. **Arch Virol** 118(3-4): 289-97.
- Lam, W.Y., J.W. Tang, A.C.M. Yeung, Chiu, L.C.M. Chiu, J.J.Y. Sung, and P.K.S. Chan. 2008. Avian influenza virus A/HK/483/97(H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells. **J Virol** 82(6): 2741-2751.
- Lamb, R. A. and R.M. Krung. 2001. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*, pp.1353-1395. In D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. **Field virology**. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia.
- Lee, B.W., R.F. Bey, M.J. Baarsch and R.R. Simonson. 1993. ELISA method for detection of influenza A infection in swine. **J. Vet Diag Invest** 5: 510-515.
- Lekcharoensuk, P, K.M. Lager, R. Vemulapalli, M. Woodruff, A.L. Vincent, and J.A. Richt. 2006. Novel swine influenza virus subtype H3N1, United States. **Emerg Infect Dis** 12(5): 787-794.
- Lekcharoensuk, P., J. Nanakorn, W. Wajjwalku, R. Webby and W. Chumsing. 2010. First whole genome characterization of swine influenza virus subtype H3N2 in Thailand. **Vet Microbiol** 145: 1230-244.

- Li, W., W. Shi, H. Qiao, S.Y. Ho, A. Luo, Y. Zhang and C. Zhu. 2011. Positive selection on hemagglutinin and neuraminidase genes of H1N1 influenza viruses. **Virology** 8:183.
- Lipatov A.S., S. Andreansky., R.J. Webby, D.J. Hulse., J.E. Rehg., S. Krauss., D.R. Perez, P.C. Doherty, R.G. Webster and M. Y. Sangster. 2005. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B-and T-cell responses. **J Gen Virol** 86: 1121–1130.
- Lowen, A.C., S. Mubareka, J. Steel, and P. Palese. 2007. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. **PLoS Pathog** 3(10): 1470-1476.
- _____, J. Steel, S. Mubareka and P. Palese. 2008. High temperature (30°C) blocks aerosol but not contact transmission of influenza virus. **J Virol** 82(11): 5650–5652.
- _____ and P. Palese. 2009. Transmission of influenza virus in temperate zones is predominantly by aerosol, in the tropics by contact: a hypothesis. **Plos Curr.** 17(1): RRN 1002.
- Ma, W., M. Gramer, K. Rossow and K.-J. Yoon. 2006. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the Midwestern United States. **J Virol** 80(10): 5092–5096.
- _____, R.E. Kahn and J.A. Richt. 2009. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary Implications. **J. Mol Genet Med** 3(1): 158-166.
- Maeda, N. and T. Uede. 2010. Swine-origin influenza-virus-induced acute lung injury: Novel or classical pathogenesis? **World J Biol Chem** 1(5): 85-94.
- Mak, G.C., C.K. Leung, K.C. Cheng, K.Y. Wong, W. Lim. 2011. Evolution of the haemagglutinin gene of the influenza A (H1N1) 2009 virus isolated in Hong Kong, 2009-2011. **Euro Surveill** 16(9): pii=19807.

- Marozin, S., V. Gregory, K. Cameron, M. Bennett, M. Valette, M. Aymard, E. Foni, G. Barigazzi, Y. Lin and A. Hay. 2002. Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. **J. Gen Virol** 83: 735–745.
- Martin, C., C. Letellier, B. Caij, D. Gauthier, N. Jean, A. Shaffii and C. Saegerman. 2011. Epidemiology of Pestivirus infection in wild ungulates of the French South Alps. **Vet Microbiol** 147(3-4): 320–328.
- _____, P.P. Pastoret, B. Brochier, M.F. Humblet and C. Saegerman. 2011. A survey of the transmission of infectious diseases/infections between wild and domestic ungulates in Europe. **Vet Res** 42(1): 70.
- Martin, K. and A. Helenius. 1991a. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. **Cell** 67(1): 117–130.
- _____ and A. Helenius. 1991b. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. **J Virol** 65(1): 232–244.
- Mateo RI, Xiao SY, Lei H, DA Rosa AP, Tesh RB. 2007. Dhori virus (Orthomyxoviridae: Thogotovirus) infection in mice: a model of the pathogenesis of severe orthomyxovirus infection. **Am J Trop Med Hyg.** 76(4): 785-90.
- Maurer S.S., Lee R.T.C., F. Eisenhaber, L. Cui, S.P. Phuah and R.T.P. Lin. 2010. A new common mutation in the hemagglutinin of the 2009 (H1N1) influenza A virus. **PLoS Curr** 2: 1162
- McGeoch, D., P. Fellner and C. Newton. 1976. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 73(3): 3045–3049.
- Molinkova, D. 2001. Purification of Escherichia coli-expressed HIS-tagged Maedi-Visna p25 core antigen by Ni²⁺-chelate affinity chromatography. **Vet Med-Cz** 46(2): 50-54.

- Momose, F., C.F. Basler, R.E. O'Neill, A. Iwamatsu, P. Palese and K. Nagata. 2001. Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. **J Virol** 75(4): 1899-1908.
- Moncorgé, O., M. Mura, W.S. Barclay. 2010. Evidence for avian and human host cell factors that affect the activity of influenza virus polymerase. **J Virol** 84(19): 9978-9986.
- Munch, M., L.P. Nielsen, K.J. Handberg and P.H. Jorgensen. 2001. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. **Arch Virol** 146(1): 87-97
- Myers, K. P., C. W. Olsen, S. F. Setterquist, A. W. Capuano, K. J. Donham, E. L. Thacker, J. A. Merchant, and G. C. Gray. 2006. "Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus?". **Clin Infect Dis** 42: 14-20.
- Nakharuthai, C., A. Boonsoongnern, P. Poolperm, W. Wajjwalku, K. Urairong, W. Chumsing, P. Lertwittcharasarakul, P. Lekcharoensuk. 2008. Occurrence of swine influenza virus Infection in swine with porcine respiratory disease complex. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 39(6): 1045-1053.
- Nelson, M.I. and E.C. Holmes. 2007. The evolution of epidemic influenza. **Nat Rev Genet** (3): 196-205.
- Nerome, K., S. Sakamoto, N. Yano, T. Yamamoto, S. Kobayashi, R.G. Webster and A. Oya. 1983. Antigenic Characteristics and Genome Composition of a Naturally Occurring Recombinant Influenza Virus Isolated from a Pig in Japan. **J Gen Virol** 64(12): 2611-2620.
- Ng A.K., H. Zhang, K. Tan , Z. Li, J.H. Liu, P.K. Chan, S.M. Li, W.Y. Chan, S.W. Au, A. Joachimiak, T. Walz, J.H. Wang and P.C. Shaw. 2008. Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization and vaccine design. **J FASEB.** (10): 3638-3647.

- Ng A.K., J.H. Wang and P.C. Shaw. 2009. Structure and sequence analysis of influenza A virus nucleoprotein. **Sci China C Life Sci** 52(5): 439-449.
- O'Neill, R.E., J.Talon and P. Palese. 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. **EMBO J.** 17(1): 288–296.
- _____, R. Jaskunas, G. Blobel., P. Palese and J. Moroiianu. 1995. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. **J Biol Chem** 270: 22701-22704.
- Olsen, S. L. Carey. Hinshaw and A.I. Karasin. 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.
- Pachucki, C. T., M. A. Khurshid and J. Nawrocki. 2004. Utility of Reverse Transcriptase PCR for Rapid Diagnosis of Influenza A Virus Infection and Detection of Amantadine-Resistant Influenza A Virus Isolates. **J Clin Microbiol** 42(6): 2796–2798.
- Palese, P. and M. L. Shaw. 2007. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*, pp. 1647-1689. In D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. **Field virology**. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia.
- Parchariyanon, S. 2006. Investigation of influenza A virus infection in pigs from 5 reported AIV outbreak provinces in 2004. **J.Thai. Vet. Med. Assoc** 57(3): 16–25 (in Thai).
- Pinto, P.S.A., A.J. Vaz, P.M.L. Germano and P.M. Nakamura. 2000. ELISA test for the diagnosis of cysticercosis in pigs using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 42(4): 71-79.
- Portela, A., P. and Digard. 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. **J.Gen Virol** 83: 723–734.

- Pospíšil, Z., P. Láng, P. Jahn and D. Zendulková. 2002. Equine influenza in the Czech Republic between 1995 and 2000, n.d. *In Proc. 27th World Veterinary Congress*. The Research and Development and Innovation Information System of the Czech Republic, Tunis.
- Prince, H.E. and A.L. Leber. 2003. Comparison of Complement Fixation and Hemagglutination Inhibition Assays for Detecting Antibody Responses following Influenza Virus Vaccination. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(3): 481–482.
- Prokudina, E.N., N. Semenova, V. Chumakov and L. Stitz. 2008. An antigenic epitope of influenza virus nucleoprotein (NP) associated with polymeric forms of NP. *J Virol* 5: 37.
- Racine, S., A. Kheyar, C.A. Gagnon, B. Charbonneau, S. Dea. 2004. Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use of the protein in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(4): 736-741.
- Rayment, F.B., E. Crosdale, D.J. Morris, J.R. Pattison, P. Talbot and J.J. Clare. 1990. The production of human parvovirus capsid proteins in Escherichia coli and their potential as diagnostic antigens. *J Gen Virol* 71(11): 2665–2672.
- Reeth, K.V. 2007. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet. Res* 38 :243–260 243.
- Reina, J., J. Saurina, V. Fernandez-Baca and M. Munar. 1998. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay and two cell lines in the detection of influenza B virus in nasopharyngeal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17(7): 532-534.
- Robb, N.C., M. Smith, F.T. Vreede and E. Fodor. 2009. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol* 90(6): 1398–1407.

- Song D. S., Y. J. Lee, O. M. Jeong, Y. J. Kim, C. H. Park, J. E. Yoo, W. J. Jeon, J. H. Kwon, G. W. Ha, B. K. Kang, C. S. Lee, H. K. Kim, B.Y.Jung, J. H. Kim and J. S. Oh. 2009. Evaluation of a competitive ELISA for antibody detection against avian influenza virus. **J Vet Sci** December 10(4): 323–329.
- Rothbarth, P.H., J. Groen, A.M. Bohnen, R. de Groot and A.D. Osterhaus. 1999. Influenza virus serology—a comparative study. **J Virol Methods** 78(1-2): 163–169.
- Rowe, T., R.A. Abernathy, J. Hu-Primmer, W.W. Thompson, X. Lu, W. Lim, K. Fukuda, N.J. Cox and J.M. Katz. 1999. Detection of antibody to avian Influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. **J Clin Microbiol** 37(4): 937–943.
- Saijo, M, T. Qing, M. Niikura, A. Maeda, T. Ikegami, C. Prehaud, I. Kurane and S. Morikawa. 2002. Recombinant nucleoprotein-based enzymelinked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. **J Clin Microbiol** 40: 1587–1591.
- Sandrock, C. and Kelly, T. 2007. Clinical review: update of avian influenza A infections in humans. **Crit Care** 11(2): 209.
- Schnitzler, S.U. and P. Schnitzler. 2009. An update on Swine-Origin influenza virus A/H1N1: a review. **Virus Genes** 39(3): 279–292.
- Schnurrenberger, P.R., G.T. Woods and R.J. Martin. 1970. Serologic evidence of human infection with swine influenza virus. **Am. Rev. Respiratory Dis.** 102: 356-361.
- Sianglum A., W. Namwat, S. Chareonsudjai, and V. Lulitanond. 2010. Cloning and expression of nucleoprotein of influenza virus in *Escherichia coli*, 967-973. *In Proceedings of the 11th Graduate Research Conference.* Khonkean University, Khonkean.

- Shih, S.R., K.C. Tsao, H.C. Ning, Y.C. Huang and T.Y. Lin. 1999. Diagnosis of respiratory tract viruses in 24 h by immunofluorescent staining of shell vial cultures containing Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) cells. **J Virol Methods** 81(1-2): 77–81.
- Shimizu, K., H. Handa, S. Nakada and K. Nagata. 1994. Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. **Nucleic Acids Res** 22 :5047-5053.
- Shope, R.E. 1931. Swine influenza: III. Filtration experiments and etiology. **J. Experiment Med** 54(3): 373-385.
- Shortridge, K.F., R.G. Webster, W.K. Butterfield and C.H. Campbell. 1977. Persistence of Hong Kong influenza virus variants in pigs. **Science** 196(4297): 1454-1455.
- _____, A. Cherry and A.P. Kendal. 1979. Further studies of the antigenic properties of H3N2 strains of influenza A isolated from swine in Southeast Asia. **J Gen Virol** 44(1): 251-254.
- Shu, L. L., W. J. Bean and R. G. Webster. 1993. Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. **J Virol** 67: 2723-2729.
- Simmerman, J.M. and T.M. Uyeki. 2008. The burden of influenza in East and South-East Asia: a review of the English language literature. **Influenza Other Respi Viruses** 2(3): 81–92.
- Simon-Grifé, M., G.E. Martin-Valls, M.J. Vilar.,N. Busquets, M. Mora-Salvatierra, T.M. Bestebroer, R.A. Fouchier, M. Martín, E. Mateu and J. Casal. 2012. Swine influenza virus infection dynamics in two pig farms; results of a longitudinal assessment. **Vet Res** 43(1): 24.
- Singh, S.M. and A.K Panda. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **J Biosci Bioeng** 99(4): 303-310.

Skehel J.J. and D.C. Wiley. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. **Annu Rev Biochem.** 69:531-69.



- Sreta, D., R. Kedkovid, S. Tuamsang, P. Kitikoon and R. Thanawongnuwech. 2009. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. **J. Virol** 6: 34-45
- Steinhauer, D.A. 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of the influenza virus. **J. Virol.** 258(1): 1–20.
- _____ and J.J. Skehel. 2002. Genetics of influenza viruses. **Annu Rev Genet** 36: 305-332.
- Sullivan, H.J., B.J. Blitvich, K. VanDalen, K.T. Bentler, A.B. Franklin and J. J. Root. 2009. Evaluation of an epitope-blocking enzymelinked immunosorbent assay for the detection of antibodies to influenza A virus in domestic and wild avian and mammalian species. **J Virol Methods** 161(1): 141-146.
- Swalley, S.E., B.M. Baker, L.J. Calder, S.C. Harrison, J.J. Skehel and D.C. Wiley. 2004. Full-length influenza hemagglutinin HA2 refolds into the trimeric low-pH-induced conformation. **Biochemistry** 43(19): 5902-11.
- Swenson, S.L., L.L. Vincent, B.M. Lute, B.H. Janke, K.F. Lechtenberg, J.G. Landgraf, B.J. Schmitt, D.R. Kinker and J.K. McMillen. 2001. A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. **J Vet Diagn Invest** 13(1): 36–42.
- Taggart, E.W. H.R. Hill, T.B. Martins, and C.M. Litwin. 2006. Comparison of Complement Fixation with Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Antibodies to Respiratory Viral Antigens. **Am J Clin Pathol** 125(3): 460-466.
- Takemae, N., S. Parchariyanon, R. Ruttanapumma, Y. Hiromoto, T. Hayashi, Y. Uchida and T. Saito. 2011. Swine influenza virus infection in different age groups of pigs in farrow-to-finish farms in Thailand. **J Virol** 8: 537.
- Taubenberger, J.K. 1998. Influenza hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: no laughing matter. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.** 95: 9713-9715.

- Taubenberger, J.K. and S.P. Layne. 2001. Diagnosis of influenza virus: coming to grips with the molecular era. **Mol Diagn** 6(4): 291-305.
- Tellier, R. 2009. Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies. **J R Soc Interface** 6 Suppl 6: S783-S790.
- Thippamom, N, D. Sreta, P. Kitikoon, R. Thanawongnuwech, Y. Poovorawan, A. Theamboonlers, K. Suwannakarn, S. Parchariyanon, S. Damrongwatanapokin, A. Amonsin. 2010. Genetic variations of nucleoprotein gene of influenza A viruses isolated from swine in Thailand. **J Virol** 7: 185.
- Townsend, A. R. M. J. Rothbard, F. M. Gotch, G. Bahadur, D. Wraith, and A. J. Mcklichael. 1986. The Epitopes of Influenza Nucleoprotein Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes Can Be Defined with Short Synthetic Peptides. **Cell** 44: 959-968.
- Tse, M, M. Kim, C.H. Chan, P.L. Ho, S.K. Ma, Y. Guan and J.S. Peiris. 2012. Evaluation of three commercially available influenza a type-specific blocking enzyme-linked immunosorbent assays for seroepidemiological studies of influenza a virus infection in pigs. **Clin Vaccine Immunol.** 19(3): 334-347.
- Upadhyay, C., A. Ammayappan and V.N. Vakharia. 2009. Detection of NP, N3 and N7 antibodies to avian influenza virus by indirect ELISA using yeast-expressed antigens. **J Virol** 6: 158-167.
- Varga, Z.T. and P. Palese. 2011. The influenzaA virus protein PB1-F2: killing two birds with one stone?. **Virulence** (6):542-6.
- Vincent, A.L., S.L. Swenson, K.M. Lager, P.C. Gauger, C. Loiacono and Y. Zhang. 2009. Characterization of an influenza A virus isolated from pigs during an outbreak of respiratory disease in swine and people during a county fair in the United States. **Vet Microbiol** 137(1-2): 51-59.

- Voeten, J.T.M, J. Groen, D. van Alphen, E.C.J. Claas, R. de Groot, A.D.M.E. Osterhaus and G.F. Rimmelzwaan. 1998. Use of Recombinant Nucleoproteins in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Virus-Specific Immunoglobulin A (IgA) and IgG Antibodies in Influenza Virus A-or B-Infected Patients. **J. Clin. Microbiol** 36(12): 3527–3531.
- Wagaman, P.C., M.A Leong and K.A. Simmen. 2002. Development of a novel influenza A antiviral Assay. **J Virol Methods** 105(1): 105–114.
- Wang, C., R. Vernon, O. Lange, M. Tyka and D. Baker. 2010. Prediction of structures of zinc-binding proteins through explicit modeling of metal coordination geometry. **Protein Sci** 19(3): 494-506.
- Wang, S., H. Li, Y. Chen, H. Wei, G.F. Gao, H. Liu, S. Huang and J.L. Chen. 2012. Transport of Influenza Virus Neuraminidase (NA) to Host Cell Surface Is Regulated by ARHGAP21 and Cdc42 Proteins. **J Biol Chem** 287(13): 9804-9816.
- Webby, R.J., K. Rossow, G. Erickson, Y. Sims and R. Webster. 2004. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. **Virus Res** 103(1-2): 67–73.
- Webster, R.G. and V.S. Hinshaw. 1977. Matrix protein from influenza A virus and its role in cross-protection in mice. **Infect Immunol** 17(3): 561–566.
- _____, W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers and Y. Kawaoka. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiol Rev.** 56(1): 152–179.
- Weinberg, A., and M.L. Walker. 2005. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B. **Clin Vaccine Immunol** 12(3): 367-370.
- Weis, W., J.H. Brown, S. Cusack, J.C. Paulson, J.J. Skehel and D.C. Wiley. 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. **Nature** 333: 426–431.

- Wentworth, D.E., B.L. Thompson, X. Xu, H.L. Regnery, A.J. Cooley, M.W. McGregor, N.J. Cox and V.S. Hinshaw. 1994. An influenza A (H1N1) virus, closely related to swine influenza virus, responsible for a fatal case of human influenza. **J. Virol.** 68: 2051-2058.
- Winter, G. and S. Fields. 1981. The structure of the gene encoding the nucleoprotein of human influenza virus A/PR/8/34. **J. Virol.** 114: 423-428.
- OIE Standards Commission. 2008. **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines.** 6th ed. Office International des Epizooties, Paris, France.
- Wu, R., S. Hu, Y. Xiao, Z. Li, D. Shi and D. Bi. 2007. Development of Indirect Enzyme-Linked immunosorbent Assay with Nucleoprotein as Antigen for Detection and Quantification of Antibodies against Avian Influenza Virus. **Vet Res Commun** 31(5): 631-641.
- Yahara, Y., Y. Ohkubo, H. Kariwa and I. Takashima. 2002. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescent antibody (IFA) test for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibody in pigs from conventional farms. **J Vet Med Sci** 64: 583-588.
- Yang D.K., B.H. Kim, S. I. Lim, J. H. Kwon, K. W. Lee, C. U. Choi and C. H. Kweon. 2006. Development and evaluation of indirect ELISA for the detection of antibodies against Japanese encephalitis virus in swine. **J. Vet. Sci.** 7(3): 271-275.
- Yang Z., Zhang L., Zhang Y., Zhang T., Feng Y., Lu X., Lan W., Wang J., Wu H., Cao C., and Wang X. 2011. Highly Efficient Production of Soluble Proteins from Insoluble Inclusion Bodies by a Two-Step-Denaturing and Refolding Method. **PLoS ONE** 6(7): 22981
- Yasuda, J., S. Nakada, A. Kato, T. Toyoda, and A. Ishihama. 1993. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. **J Virol** 196: 249-255.
- Ye, Q., R.M. Krug and Y.J. Tao. 2006. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. **Nature** (7122): 1078-1082.

- Yewdell, J.W., J.R. Bennink, G.L. Smith, and B. Moss. 1985. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci USA** 82(6): 1785-1789.
- Yoon, I.J., H.S. Joo, W.T. Christianson, H.S. Kim, J.E. Collins, R.B. Morrison and G.D. Dial. 1992. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine serum. **J Vet Diagn Invest** 4: 144-147.
- Yoon, K.J., B.H. Janke, R.W. Swalla and G. Erickson. 2004. Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses. **J Vet Diagn Invest** 16: 197-201.
- Youthao, S., M. Jaroensutasinee and K. Jaroensutasinee. 2008. Analysis of Influenza Cases and Seasonal Index in Thailand. **Int J Biol Sci** 4(2): 113-116.
- Yu, H., R.-H.Hua, Q. Zhang, T.Q. Liu, H.-L.Liu, G.-X.Li, G.-Z.Tong. 2008. Genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in China from 1970 to 2006. **J Clin Microbiol** 46(3):1067-1075.
- Zebedee, S.L. and R.A. LAMB. 1988. Influenza A Virus M2 Protein: Monoclonal Antibody Restriction of Virus Growth and Detection of M2 in Virions. **J Virol** 62(8): 2762-2772
- Zhirnov, O.P., T.E. Konakova, T. Wolff, and H.-D.Klenk. 2002. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. **J Virol** 76(4): 1617-1625.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวอารัตน์ แพงเพ็ง
เกิดวันที่	13 ธันวาคม 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดนครราชสีมา
ประวัติการศึกษา	วท.บ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ตำแหน่งปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์กรมปศุสัตว์ ต. ปากช่อง อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-