

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก ใน 3 จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
โดยการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1
ปี พ.ศ. 2554-2555

**Monitoring of Bird flu in the 3 Northeastern Provinces of Thailand by
Detecting Antibody specific to H5N1 Influenza virus in Poultry
in the years 2011-2012**

กชกร ดิเรกศิลป์¹ มนตรา มานะกุล² อารินี ชัชวาลชลธีระ³

1 ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2 นักวิชาการสัตวบาล ชำนาญการ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดกาฬสินธุ์

3 ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการวิจัยย่อยภายใต้ชุดโครงการ

การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเกษตรเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตสัตว์ปีก
อย่างยั่งยืนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

**Research and development of agricultural technology to increase the
potential of sustainable poultry production in the northeast of
Thailand**

ทุนวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2554

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักบริหารการวิจัย ฝ่ายวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ทุนสนับสนุน ทุนอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2554 ขอขอบคุณสำนักงานและเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดกาฬสินธุ์ ที่ให้ข้อมูลและการประสานงานความร่วมมือกับเกษตรกรในพื้นที่ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2555

บทคัดย่อ

การศึกษครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเฝ้าระวังการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ซึ่งก่อให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงในสัตว์ปีกและมนุษย์ ในพื้นที่ 3 จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การติดเชื้อนี้ในคนส่วนใหญ่พบว่ามีประวัติสัมผัสกับสัตว์ปีกที่ป่วยและตาย ภายหลังจากเกิดการติดเชื้อ สัตว์ปีกที่รอดตายอาจมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสซึ่งไม่แสดงอาการป่วยแต่อาจเป็นพาหะของโรคที่สามารถแพร่กระจายไวรัสไปสู่คนได้ ดังนั้นเราจึงค้นหาแหล่งรังโรคหรือพาหะนำโรคโดยการตรวจทางซีรัมวิทยา การศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ปีกที่เลี้ยงโดยเกษตรกรรายย่อย รวมทั้งสิ้น 794 ตัวอย่าง ในจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์ โดยแบ่งออกเป็น จังหวัดขอนแก่น จำนวนทั้งหมด 381 ตัวอย่าง เก็บในช่วงเดือน สิงหาคม กันยายน ตุลาคม พฤศจิกายน และ ธันวาคม พศ. 2554 เป็นเลือดไก่ จำนวน 344 ตัวอย่าง และเป็นเลือดจากเป็ด จำนวน 37 ตัวอย่าง ในจังหวัดมหาสารคามเก็บในเดือนสิงหาคม พศ. 2554 จำนวนทั้งหมด 78 ตัวอย่าง ทั้งหมดเป็นเลือดจากไก่ และในจังหวัดกาฬสินธุ์ เก็บตัวอย่างในช่วงเดือน มิถุนายน กรกฎาคม สิงหาคม และกันยายน พศ. 2554 และ มกราคม พศ. 2555 จำนวนทั้งหมด 355 ตัวอย่าง เป็นเลือดไก่ จำนวน 331 ตัวอย่าง และเป็นเลือดจากเป็ด จำนวน 4 ตัวอย่าง เมื่อตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดย H5 AIV Ab ELISA kit (Anigen Animal Genetics Inc., Korea) และฮีแมกกลูตินินชันอินฮิบิชั่น (HI test) ทุกตัวอย่างให้ผลลบต่อแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5 ในทั้งสองวิธีที่ตรวจแสดงให้เห็นว่าไม่พบหลักฐานของการติดเชื้อในไก่และเป็ดในพื้นที่ดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดยทีมวิจัยในชุดโครงการเดียวกันนี้ที่ตรวจไม่พบไวรัสในเป็ดและไก่เช่นกัน สัตว์ปีกที่มีสุขภาพปกติจึงไม่น่าจะเป็นพาหะนำโรคไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์รุนแรง

บทนำ

โรคไข้หวัดนกมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Avian Influenza A ในตระกูล Orthomyxoviridae มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid; RNA) ไวรัสมีเปลือกหุ้ม (Envelope) โดยผิวด้านนอกของไวรัสจะมีโปรตีน 2 ชนิดซึ่งเป็นส่วนที่ยื่นออกมาด้านนอกได้แก่ Hemagglutinin (H) สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 15 types และ Neuraminidase (N) สามารถแบ่งย่อยเป็น 9 types เชื้อไวรัส Influenza type A สามารถแบ่งย่อยได้หลายสายพันธุ์ (subtypes) ตามความแตกต่างของชนิดของแอนติเจน (antigens) H และ N โดยพบการก่อโรคในสัตว์ต่างๆ เช่น สุกร ม้า สัตว์ปีกทุกชนิด และในคน (รายงานการเฝ้าระวัง 2547 และ พงศ์พิพัฒน์ 2547) เชื้อ Avian Influenza A virus มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของ H และ N antigens ได้สูงจนระบบภูมิคุ้มกันเดิมที่เคยมีของโฮสต์ไม่สามารถป้องกันโรคได้ หากไวรัสมีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ ก็อาจทำให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ก่อให้เกิดการระบาดของโรคขึ้นใหม่และอาจมีความรุนแรงยิ่งขึ้น (Tam 2002 และ พงศ์พิพัฒน์ 2547) ปัจจุบันเชื้อไข้หวัดนกชนิดหรือสายพันธุ์ที่ก่อโรคแบบรุนแรงมาก (highly pathogenic strains) ได้แก่ สายพันธุ์ H1 H5 H7 H9 (พบในไก่), สายพันธุ์ H3 H4/6 (พบในเป็ด) และ สายพันธุ์ H1 H2 H3 (พบในคน) (Alexander 2003; Tiensin et al.,

2004; Viseshakul et al., 2004; พงศ์พิพัฒน์ 2547) สายพันธุ์ชนิดที่ก่ออาการรุนแรงน้อย (low pathogenic strains) เช่น สายพันธุ์ H2 H3 H4/6 H8 H10/11 H13 (พบในไก่), สายพันธุ์ H1 H2 H5 H7 H8 H9 H10/11 H12 H14 H15 (พบในเป็ด) และ สายพันธุ์ H5 H7 H9 (พบในคน) (Alexander 2003; Tiensin et al., 2004; Viseshakul et al., 2004; พงศ์พิพัฒน์ 2547) สัตว์ที่สามารถแพร่เชื้อไวรัสนี้ได้แก่ ไก่ทุกชนิด เป็ดเนื้อ เป็ดไข่ นกธรรมชาติ และนกเลี้ยง การแพร่ระบาดพบหลายรูปแบบทั้งจากภายในสัตว์ฝูงเดียวกันจากไก่สู่ไก่ ฝูงสัตว์ต่างชนิดกัน นกธรรมชาติสู่ไก่ หรือจากสุกรสู่คน ในปี พ.ศ. 2547 พบการระบาดจากสัตว์ปีกสู่คนในประเทศฮ่องกง ไทย และ เวียดนาม จากรายงานการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดนกจากไก่สู่คน ในช่วงเดือนมกราคม ถึง สิงหาคม 2547 โดยคนติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากการสัมผัสสัตว์ป่วยหรือซากสัตว์ปีก (Li, 2004; Puthavathana et al., 2005) นอกจากนี้แหล่งแพร่กระจายเชื้อไวรัสทางอื่นๆ ที่สำคัญคือมูลนกเพราะมีการขับไวรัสออกมาทางอุจจาระเป็นเวลานานถึง 7-14 วันหลังติดเชื้อ และเชื้อไวรัสยังสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานถึง 105 วันโดยเฉพาะในบริเวณมีอุณหภูมิต่ำและความชื้นสูง (พงศ์พิพัฒน์ 2547) ระยะฟักตัวของโรคในสัตว์ค่อนข้างสั้นคือไม่กี่ชั่วโมงแต่อาจนานถึง 3 วัน ในคนระยะเวลาฟักตัวของโรคยังไม่ทราบแน่ชัดขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อไวรัสที่ได้รับ ระดับภูมิคุ้มกันของร่างกาย และสายพันธุ์หรือความรุนแรงของเชื้อ

ในประเทศไทยการระบาดเป็นครั้งแรกในฟาร์มสัตว์ปีกเกิดจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 ทำให้เกิดความสูญเสียด้านเศรษฐกิจการค้าสัตว์ปีก และการท่องเที่ยว นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่รุนแรงนี้ในคน ในประเทศฮ่องกง (Li, 2004; Puthavathana et al., 2005) จำนวนทั้งสิ้น 6 ราย ช่วงอายุผู้ป่วยในการระบาดครั้งนี้คือ 1-60 ปี พบว่าทำให้ผู้ป่วยปอดอักเสบอย่างรุนแรงและเสียชีวิตจากระบบหายใจล้มเหลว ซึ่งผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมดเป็นเด็กอายุระหว่าง 4-12 ปี ส่วนในประเทศไทย จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 18 ราย พบการเสียชีวิต 7 ราย เป็นผู้ป่วยเด็กจำนวน 5 ราย ซึ่งมีอายุระหว่าง 6-7 ปี และผู้ใหญ่จำนวน 2 ราย อายุ 39 และ 58 ปี ในประเทศเวียดนาม พบผู้ป่วยจำนวน 10 ราย มีอายุระหว่าง 5-24 ปี และเสียชีวิตด้วยระบบหายใจล้มเหลวจำนวน 8 ราย ส่วนในทวีปยุโรป พบผู้ติดเชื้อไวรัส จำนวน 5 ราย ซึ่งเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของการระบาดอย่างรุนแรงในประเทศเนเธอร์แลนด์ คือสายพันธุ์ H7N7 (CDC, 2004; Tinh, 2004; Koopman, 2004)

การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกตามวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (WHO, 2008) คือการเพาะแยกเชื้อไวรัส ซึ่งทำโดยเพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟักหรือเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (Mardin derby canine kidney; MDCK) แล้วสังเกตพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect) หากไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง ให้ทำการตรวจซ้ำอีกอย่างน้อย 1 ครั้ง และหากเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง ต้องทำการตรวจเพื่อยืนยันชนิดของไวรัส ด้วยวิธีฮีแมกกลูตินินชันอินฮิบิชัน (Hemagglutination inhibition; HI test) ซึ่งเป็นการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงเมื่อไวรัสถูกจับหรือทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะ หรือในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจยืนยันหาเชื้อไวรัสโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Reverse transcriptase polymerase chain reaction

(RT-PCR) และวิธี Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RRT-PCR) ซึ่งสามารถตัดขั้นตอนการเพาะเชื้อในไข่ไก่ฟักออกไป เพราะ RRT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูงและสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดนกได้แม้ว่าจะมีปริมาณน้อยมากๆ (Payungporn et al., 2004) ส่วนวิธีทางอ้อมที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อไวรัสคือการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นวิธีทางซีรัมวิทยา (Serology) โดยการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี HI test หรือ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Gavin, 2003) อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถแยกผลบวกจากวัคซีนกับการติดเชื้อได้ แต่มีข้อดีคือ แอนติบอดีที่เกิดขึ้นสามารถคงอยู่ในกระแสเลือดได้เป็นระยะเวลานานหลังจากเกิดการติดเชื้อ

จากรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนกที่กล่าวมา พบว่าแหล่งรังโรคที่สำคัญต่อการระบาดในมนุษย์คือสัตว์ปีก ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคนี้ในสัตว์ปีกจึงมีความสำคัญต่อการป้องกันการเกิดโรคในคน วิธีวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีกดังที่กล่าวมาแล้วนั้นคือการตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งอาจพบได้ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ หรือในช่วงที่สัตว์กำลังแสดงอาการของโรคเท่านั้น ถ้าหากรอดตายหลังจากการติดเชื้อร่างกายของสัตว์ป่วยจะมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสซึ่งเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และแอนติบอดีนี้จะคงอยู่ในร่างกายได้ค่อนข้างนาน ดังนั้น วิธีทางซีรัมวิทยาจึงเพิ่มโอกาสที่จะตรวจพบการติดเชื้อในสัตว์ที่เป็นพาหะหรืออมโรค การศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกวิธีค้นหาหรือสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยการตรวจแอนติบอดีในซีรัมของสัตว์ปีกในพื้นที่ที่เคยเกิดการตายของสัตว์ปีกเป็นจำนวนมาก หรือเคยมีประวัติการระบาดของโรค และเป็นพื้นที่ที่ไม่มีการใช้วัคซีน โดยศึกษาใน 3 จังหวัดของภาคอีสานตอนบน คือ ขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีกใน 3 จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีกต่อเนื่องจากปี พ.ศ. 2550-2551 เพื่อเป็นการเฝ้าระวังไข้หวัดนกซึ่งอาจเกิดการระบาดซ้ำได้อีกในอนาคต

ระเบียบวิธีวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ปีก

สัตว์ปีก ซึ่งได้แก่ ไก่ และเป็ด ที่เลี้ยงรายย่อยตามหมู่บ้านต่างๆ ตั้งแต่อายุรุ่น ไปจนถึงโตเต็มวัย โดยเน้นการเก็บตัวอย่างเลือดสัตว์ปีกในพื้นที่เดิมหรือใกล้เคียงกับการสำรวจเมื่อปี พ.ศ. 2550-2551 ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เคยเกิดการตายของไก่เป็นจำนวนมาก (นับตั้งแต่ช่วงปี พ.ศ. 2547-2550) ใน 3 จังหวัด คือ ขอนแก่น กาฬสินธุ์ และ มหาสารคาม (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ปีก ใน 3 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำแนกออกเป็น ตำบล และอำเภอ

เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
สิงหาคม /2554	พระลับ	เมือง	ขอนแก่น
สิงหาคม /2554	ศิลา	เมือง	ขอนแก่น
สิงหาคม /2554	โคกสี	เมือง	ขอนแก่น
สิงหาคม /2554	ในเมือง	เมือง	ขอนแก่น
สิงหาคม /2554	สำราญ	เมือง	ขอนแก่น
สิงหาคม /2554	บึงเนียม	เมือง	ขอนแก่น
กันยายน/2554	คูคำ	ซำสูง	ขอนแก่น
ตุลาคม/2554	ท่ากระเสริม	น้ำพอง	ขอนแก่น
พฤศจิกายน/2554	ดอนคู	หนองสองห้อง	ขอนแก่น
พฤศจิกายน/2554	โคกสี	เมือง	ขอนแก่น
พฤศจิกายน/2554	ในเมือง	เมือง	ขอนแก่น
ธันวาคม/2554	โนนอุดม	ชุมแพ	ขอนแก่น
ธันวาคม/2554	นาหนองทุ่ม	ชุมแพ	ขอนแก่น
พฤศจิกายน/2554	ห้วยขวาง	โกสุม	มหาสารคาม
พฤศจิกายน/2554	ลาดพัฒนา	เมือง	มหาสารคาม
พฤศจิกายน/2554	กู่ทอง	เขียงยืน	มหาสารคาม
มิถุนายน/2554	คำสร้างเที่ยง	สามชัย	กาฬสินธุ์
กรกฎาคม/2554	กุงเก่า	ท่าคันโท	กาฬสินธุ์
กรกฎาคม/2554	นาตาล	ท่าคันโท	กาฬสินธุ์
สิงหาคม/2554	กุงเก่า	ท่าคันโท	กาฬสินธุ์
กันยายน/2554	ยางฮ่อม	ท่าคันโท	กาฬสินธุ์
มกราคม/2555	กุงเก่า	ท่าคันโท	กาฬสินธุ์
มกราคม/2555	กุงเก่า	ท่าคันโท	กาฬสินธุ์
มกราคม/2555	ดงสมบุรณ์	ท่าคันโท	กาฬสินธุ์
มกราคม/2555	นาตาล	ท่าคันโท	กาฬสินธุ์

2. ตรวจแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยใช้วิธี ELISA ซึ่งเป็นชุดตรวจสำเร็จรูป (Test kit) และวิธี Hemagglutination Inhibition test (HI)

2.1 เมื่อได้ตัวอย่างเลือดในแต่ละครั้งที่ลงพื้นที่ดังกล่าว ทำการปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เพื่อเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นซีรัม แบ่งเก็บเป็น 2 ชุด สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีทั้งสองวิธี ลงบันทึกหมายเลขและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (C) จนกว่าจะทำการตรวจหาแอนติบอดีพร้อมๆกันทุกตัวอย่าง

2.2 ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 โดยใช้ H5 AIV Ab ELISA (Anigen Animal Genetics, Inc., Korea) Cat. No. EB45-03 ซึ่งใช้หลักการของ Competitive enzyme linked immunosorbent assay และเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปที่สามารถตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม พลาสมา หรือไข จากไก่ เป็ด และนกได้ ระยะเวลาที่ใช้ตรวจจนกระทั่งทราบผลประมาณ 45 นาที และวิธีนี้สามารถตรวจพบแอนติบอดีในสัตว์ปีกที่ติดเชื้อได้เร็วที่สุดคือ 7 วันหลังจากการติดเชื้อเป็นต้นไป (จากผลการวิจัยของ Anigen Animal Genetics, Inc., Korea)

ในชุดตรวจสำเร็จรูปประกอบไปด้วย ไมโครเพลต (microplate) ที่เคลือบด้วยแอนติเจนจากไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 (recombinant protein H5 antigen) การตรวจทำโดยเติมซีรัมที่ต้องการทดสอบลงไปในแต่ละหลุมของไมโครเพลต ลงไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส (C) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำปฏิกิริยากับแอนติเจน (H5 antigen) หลังจากล้างเพลตด้วยบัฟเฟอร์แล้วจึงเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่คอนจูเกต (conjugate) อยู่กับเอ็นไซม์ (Mab-HRP) แล้วบ่มที่ 37 C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อไปแข่งกับแอนติบอดีในซีรัม เพื่อจับกับแอนติเจนบนไมโครเพลต ดังนั้นปฏิกิริยาการเกิดสีเมื่อเติมซับสเตรต (substrate) ลงไปทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์จึงเป็นสัดส่วนตรงกันข้าม (inversely proportion) กับปริมาณแอนติบอดีในซีรัม ขั้นตอนสุดท้ายคือเติมสารเคมีลงไปในแต่ละหลุมของไมโครเพลตเพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วจึงอ่านค่าดูดกลืนแสง (optical density; OD) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ช่วงแสง 450nm และ 620nm

การแปลผล คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างลบควบคุม (negative control) เปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (PI; percent inhibition) ถ้าค่า PI น้อยกว่า 75 ถือว่าเป็นลบ ถ้าเท่ากับหรือมากกว่า 75 ถือว่าให้ผลบวก โดยสูตรดังนี้

$$PI \text{ value} = [1 - (OD_{450} \text{ sample} \div \text{mean } OD_{450} \text{ negative})] \times 100$$

2.3 ตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธีฮีแมกกลูตินินชันอินฮิบิชั่น (Hemagglutination inhibition test) โดยปฏิบัติตามวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการกรมปศุสัตว์ (ศูนย์ควบคุมโรคไข้หวัดนก, 2549) โดยใช้ไวรัสสายพันธุ์ H5N1 ที่แยกได้จากสัตว์ปีกในประเทศไทย (ไม่เปิดเผยแหล่งที่มาของไวรัส) ทำการตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ตำบลท่าพระ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ใช้ไวรัส ในปริมาณ 4 HA units ผสมกับซีรัมเพื่อทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดี

กับแอนติเจน ถ้าในซีรัมมีแอนติบอดีที่สามารถจับไวรัสทำให้หมดสภาพหรือไวรัสไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มตกตะกอนได้ ดังนั้น การอ่านผลบวกคือเมื่อซีรัมที่เจือจางตั้งแต่ 1:16 ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ (World Organisation for Animal Health, 2008).

ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ปีกรวมทั้งสิ้น 794 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็นจังหวัดขอนแก่น จำนวนทั้งหมด 381 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างในระหว่างเดือน สิงหาคม กันยายน ตุลาคม พฤศจิกายน และธันวาคม 2554 เป็นเลือดจากไก่จำนวน 344 ตัวอย่าง และเป็นเลือดจากเป็ดจำนวน 37 ตัวอย่าง (ดังตารางที่ 2) ในจังหวัดมหาสารคามเก็บในเดือนสิงหาคม 2554 จำนวนทั้งหมด 78 ตัวอย่าง เป็นเลือดจากไก่จำนวน 78 ตัวอย่าง ไม่มีตัวอย่างจากเป็ด (ดังตารางที่ 3) และในจังหวัดกาฬสินธุ์ เก็บตัวอย่างในช่วงเดือน มิถุนายน กรกฎาคม สิงหาคม และกันยายน 2554 และเดือนมกราคม 2555 จำนวนทั้งหมด 355 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากไก่จำนวน 331 ตัวอย่าง และเป็นเลือดจากเป็ดจำนวน 4 ตัวอย่าง (ดังตารางที่ 4)

เมื่อตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดย H5 AIV Ab ELISA kit (Anigen Animal Genetics Inc., Korea) และฮีแมกกลูตินินชันอินฮิบิชั่น (HI test) ทุกตัวอย่างให้ผลลบต่อแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5 ในทั้งสองวิธีที่ตรวจ

ตารางที่ 2. แสดงพื้นที่เป็นตำบล อำเภอในจังหวัดขอนแก่น และจำนวนตัวอย่างเลือดจากสัตว์ปีก ที่เก็บในช่วงระหว่างเดือนสิงหาคม ถึงเดือนธันวาคม พศ.2554

ตำบล	อำเภอ	หมู่ที่	วัน/เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง	ไก่ (ตัว)	เป็ด (ตัว)	รวม (ตัว)
พระลับ	เมือง	9	19 สิงหาคม 255	21	0	21
ศิลา	เมือง	9, 13, 16, 25	24, 26 สิงหาคม 2554	30	5	35
โคกสี	เมือง	3, 4	26 สิงหาคม 2554	5	15	20
ในเมือง	เมือง	9	24 สิงหาคม 2554	8	12	20
สำราญ	เมือง	3	27 สิงหาคม 2554	10	1	11
ในเมือง	เมือง	ไม่ทราบหมู่ ถนนรอบเมือง	11 พฤศจิกายน 2554	8	0	8
โคกสี	เมือง	13, 14	19 พฤศจิกายน 2554	24	0	24
บึงเนียม	เมือง	8	20 พฤศจิกายน 2554	40	0	40
คูคำ	ชำสูง	5	13 ธันวาคม 2554	39	0	39
ท่ากระเสริม	น้ำพอง	4, 10, 11,	15 ธันวาคม 2554	40	0	40

คอนคู่	หนองสองห้อง	12	16 ธันวาคม 2554	35	0	35
โนนอุดม	ชุมแพ	11	23 ธันวาคม 2554	44	0	44
นาหนองทุ่ม	ชุมแพ	5	24 ธันวาคม 2554	40	5	45
รวม				344	37	381

ตารางที่ 3. แสดงพื้นที่เป็นตำบล อำเภอในจังหวัดมหาสารคาม และจำนวนตัวอย่างเลือดจากสัตว์ปีก ที่เก็บในช่วงเดือนสิงหาคม พศ. 2554

ตำบล	อำเภอ	หมู่ที่	วัน/เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง	ไก่ (ตัว)	เป็ด (ตัว)	รวม (ตัว)
ลาดพัฒนา	เมือง	2	24 สิงหาคม 2554	20	0	20
กู่ทอง	เชียงยืน	1, 2	24 สิงหาคม 2554	8	0	8
ห้วยขวาง	โกสุม	3, 4	25 สิงหาคม 2554	50	0	50
รวม				78	0	78

ตารางที่ 4. แสดงพื้นที่เป็นตำบล อำเภอ ในจังหวัดกาฬสินธุ์ และจำนวนตัวอย่างเลือดจากสัตว์ปีก ที่เก็บในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงเดือนกันยายน พศ. 2554 และเดือนมกราคม พศ. 2555

ตำบล	อำเภอ	หมู่ที่	วัน/เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง	ไก่ (ตัว)	เป็ด (ตัว)	รวม (ตัว)
คำสร้างเที่ยง	สามชัย	1-2	16 มิถุนายน 2554	48	0	48
กุงเก่า	ท่าคันโท	1, 4	19 กรกฎาคม 2554	44	4	48
นาตาล	ท่าคันโท	6	25 กรกฎาคม 2554	49	0	49
กุงเก่า	ท่าคันโท	4	23 สิงหาคม 2554	25	0	25
ยางอุ้ม	ท่าคันโท	6	20 กันยายน 2554	38	0	38
กุงเก่า	ท่าคันโท	4, 9	18 มกราคม 2555	50	0	50
กุงเก่า	ท่าคันโท	5	25 มกราคม 2555	20	0	20
ดงสมบูรณ์	ท่าคันโท	2	25 มกราคม 2555	36	0	36
นาตาล	ท่าคันโท	6	25 มกราคม 2555	20	0	20
รวม				331	4	335

สรุปและวิจารณ์

โรคไข้หวัดนก (Avian influenza virus) เป็นโรคติดต่อร้ายแรงและส่งผลกระทบทางเศรษฐกิจและการเลี้ยงสัตว์ปีกของประเทศไทย รวมทั้งทำให้เกิดความหวาดวิตกของประชาชนเป็นอย่างมาก นโยบายในการควบคุมโรคระดับประเทศและระดับสากลคือ การฆ่าและทำลายสัตว์ปีก และการจัดระเบียบการเลี้ยงสัตว์ปีก ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งรังโรคที่อาจแพร่กระจายมายังมนุษย์ได้ง่าย เพราะในคนที่ป่วยมักมีประวัติสัมผัสกับสัตว์ปีกหรือซากสัตว์ปีกที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก นอกจากการฆ่าและทำลายสัตว์ปีกแล้ว ควรมีวิธีวินิจฉัยโรคที่มีความไวสูง และตรวจสอบได้ทุกระยะของการติดเชื้อ เพื่อรู้เท่าทันต่อการเกิดโรค การวินิจฉัยโรคในปัจจุบันมีวิธีมาตรฐานคือ ตรวจหาเชื้อไวรัส Avian Influenza Virus โดยการเพาะเลี้ยงในไข่ไก่ฟัก ซึ่งใช้เวลานานถึง 4-7 วันกว่าจะทราบผลการตรวจ และวิธีที่รวดเร็ว เช่น direct ELISA โดยตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัส และนอกจากนี้องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาจีโนม (อาร์เอ็นเอ) ของเชื้อไวรัสโดยวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่จำเพาะ สามารถจำแนกสายพันธุ์ (subtype) ได้อย่างแม่นยำ และยิ่งไปกว่านั้นคือการตรวจหาจีโนมของไวรัสด้วยวิธี Real time RT-PCR (RRT-PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็วทั้งสามารถแยกความแตกต่างสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงออกจากสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรงได้ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีเทคนิคการตรวจหาไวรัสที่มีความไวและจำเพาะสูง แต่ระยะเวลาที่ไวรัสอยู่ในร่างกายพบได้ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ หรือในช่วงที่สัตว์กำลังแสดงอาการของโรคเท่านั้น ภายหลังจากการติดเชื้อ ร่างกายของสัตว์ป่วยจะมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส ซึ่งเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และแอนติบอดีนี้จะคงอยู่ในร่างกายได้นานกว่าไวรัส ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการค้นหาการติดเชื้อโดยการตรวจแอนติบอดีในซีรัมของสัตว์ปีก เพื่อสำรวจหรือตรวจสอบการเป็นพาหะนำโรคของเป็ดและไก่ นับว่าเป็นการเฝ้าระวังการติดเชื้อในสัตว์ปีกที่อยู่ในพื้นที่ที่เคยเกิดการตายของสัตว์ปีกเป็นจำนวนมาก ผลการศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีก แสดงให้เห็นว่ายังไม่พบร่องรอยของการติดเชื้อในสัตว์ปีกที่เลี้ยงใหม่ภายหลังจากนโยบายการฆ่าและทำลายสัตว์ป่วยอย่างเข้มงวดของกรมปศุสัตว์ อย่างไรก็ตามหากมองในอีกแง่มุมหนึ่งคือสายพันธุ์ H5 เป็นไวรัสไข้หวัดนกที่มีความรุนแรงมาก เมื่อเกิดการติดเชื้อจึงทำให้มีอัตราการรอดชีวิตน้อยหรืออาจไม่มีเลย ดังนั้นสัตว์ปีกที่มีอาการปกติจึงไม่พบหลักฐานของการติดเชื้อไวรัส

ในช่วงที่ศึกษานั้น ในจังหวัดกาฬสินธุ์พบอัตราการป่วยด้วยโรคทางเดินหายใจและมีการตายของสัตว์ปีกค่อนข้างสูง จึงเก็บตัวอย่างซีรัมเพิ่มมากขึ้นกว่าที่ตั้งเป้าหมายไว้ อย่างไรก็ตามผลการตรวจชันสูตรโรคในภายหลังพบว่าไก่ป่วยด้วยโรคทางเดินหายใจเรื้อรัง (Chronic respiratory disease) และตายด้วยโรคแทรกซ้อนชนิดต่างๆที่ไม่เกี่ยวข้องกับโรคไข้หวัดนก และจากตัวอย่างป้ายเชื้อจากโคลเอกา (Cloacal swab) ให้ผลลบต่อการตรวจหาไวรัส w-hs;yfod ทั้งวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟักและ RRT-PCR

ผลของการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับทีมวิจัยกลุ่มอื่นที่ตรวจไม่พบไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ปีกในเขตภาคอีสานตอนบน และการศึกษาในภาคกลางก็พบว่าไก่เป็นพาหะนำโรคไข้หวัดนกได้ค่อนข้างน้อย

ผลการศึกษานี้ช่วยให้เกษตรกรมีความมั่นใจในการกลับมาเลี้ยงสัตว์ปีก ดังจะเห็นได้จากจำนวนสัตว์ปีกที่เกษตรกรเลี้ยงมีเพิ่มมากขึ้นกว่าการศึกษาในครั้งแรก

เอกสารอ้างอิง

- 1 Alexander DJ. 2003. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74, 3-13.
- 2 Gavin P. Review of rapid diagnostic tests for influenza. 2003. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4, 151-72.
- 3 <http://www.cdc.gov/flu/index.htm>. Cases of influenza (H5N1)—Thailand, 2004. *MMWR weekly report*. February 13, 2004. 53, 100-103.
- 4 Koopman SM, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, Nat HVD, Vennema H, Meijer A, Steenbergen JV, Fouchier R, Osterhaus A and Bosman A. 2004. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*. 363, 587-593.
- 5 Lee CW and Suarez DC. 2004. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *J. Virol. Methods*. 119, 151-158.
- 6 Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepongastie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG and Peiris JS. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 430 (6996), 209-213.
- 7 Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenying PC, Sangsiriwut K, Pooruk P, Boonnak K, Khanyok R, Thawachsupha P, Kijphati R, Sawanpanyalert P. 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol*. 2005 Feb;86 (Pt 2), 423-33.
- 8 Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, Theamboonlers A, Keawcharoen J, Oraveerakul K. 2004. Single-step multiplex reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. *Viral immunology*. 17, 588-93.
- 9 Spackman E, Seene DA, Meyers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT and Suarez DL. 2002. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR assay for type A

- influenza virus and the avian H5 and H7 Hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3256-3260.
- 10 Tam JS. 2002. Note Influenza A (H5N1) in Hong Kong : an overview. *Vaccine*, s77-s81.
 - 11 Tiensin T, Chaitaweesub P, Songserm T, Chaisingh A, Hoonsuwan W, Buranathai C. 2004. Highly pathogenic avian influenza H5N1, Thailand, 2004. *Emerging infectious disease.* 11(11), 1664-72.
 - 12 Tinh T, Liem NT, Dung NT, San LT, Mai PP, Chau NV, and et.al ; WHO international Avian influenza investigation team : Shulstz C, Cheng P, Lim W, Horby P and Farrar J. 2004. Avian influenza A(H5N1) in 10 patients in Vietnam. *New England J. Med.* 350, 1179-1188.
 - 13 Viseshakul N, Thanawongnuwech R, Amonsin A, Suradhat S, Payungporn S, Kaewchareon J. 2004. The genome sequence analysis of H5N1 avian influenza A virus isolated from the outbreak among poultry populations in Thailand. *Virology.* 328(1), 169-176.
 - 14 World Organization for Animal Health (2008). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees).
 - 15 ใช้หวัดนกและความสำคัญของการแพร่เชื้อสู่คน Avian influenza (bird flu) รายงานการเฝ้าระวังทางด้านระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ ปีที่35: ฉบับที่4: 30 มกราคม 2547, หน้า 49-52.
 - 16 โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก. รายงานการเฝ้าระวังทางด้านระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ ปีที่35: ฉบับที่ 4:30 มกราคม 2547, หน้า 52-55.
 - 17 พงศ์พิพัฒน์ ปริชาดินทร์. โรคไข้หวัดนก. 2547. บริษัทเมเรียล (ประเทศไทย)
 - 18 ศูนย์ควบคุมโรคไข้หวัดนก. 2549. คู่มือการปฏิบัติงานควบคุมโรคไข้หวัดนก. กรุงเทพฯ: กรมปศุสัตว์. 58 หน้า.
 - 19 กรมปศุสัตว์. 2551. รายงานสถานการณ์โรคไข้หวัดนก. <http://www.dld.go.th/birdflu>. [เข้าฐานข้อมูลเมื่อเดือนเมษายน 2551].