



วิทยานิพนธ์

ความสำคัญของไข้หวัดใหญ่สุกรในการก่อโรกระบบทางเดินหายใจ
ซับซ้อนในสุกร

**Significance of Swine Influenza Virus on Porcine Respiratory
Disease Complex**

นางสาวฉัตรศิริินทร์ นาคหยุดภัย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความสำคัญของไข้หวัดใหญ่สุกรในการก่อโรกระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร

Significance of Swine Influenza Virus on Porcine Respiratory Disease Complex

โดย

นางสาวฉัตรศิรินทร์ นาคหฤทัย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์

จุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความสำคัญของไข้หวัดใหญ่สุกรในการก่อโรกระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร

Significance of Swine Influenza Virus on Porcine Respiratory Disease Complex

นามผู้วิจัย นางสาวฉัตรศิรินทร์ นาคเหตุทัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์รววิทย์ วัชชวัลคุ, D.M.S.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์มลิวัลย์ ชุนถนอม, Dr.Met.Vet)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ปฐมพร เอมะวิศิษฐ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ฉัตรศิรินทร์ นาคฤทธิ์ 2551: ความสำคัญของไข้หวัดใหญ่สุกรในการก่อโรคระบบ
ทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D. 93
หน้า

โรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร (PRDC) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายใน
อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรอย่างมาก โดยสาเหตุของโรคเกิดจากการติดเชื้อจุลชีพหลายชนิด
ร่วมกันรวมทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (SIV) ในรายงานฉบับนี้จะกล่าวถึงผลกระทบของเชื้อ
ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในการก่อโรค PRDC โดยทำการสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร
สุ่มเก็บตัวอย่างจากปอด และ nasal swab จำนวน 106 ตัวอย่าง จากลูกสุกรที่ป่วยด้วยอาการของ
โรคระบบทางเดินหายใจ จำนวน 30 ฟาร์ม ในภาคกลางของประเทศไทย โดยทำการเพาะแยกเชื้อ
ไวรัสจากเซลล์ MDCK และตรวจยืนยันด้วยวิธี IFA และ RT – PCR ด้วย primer ซึ่งมีความ
จำเพาะต่อ M gene พบตัวอย่างที่ให้ผลบวก 3 ตัวอย่าง เมื่อนำไปตรวจเพื่อหา subtype ด้วย
วิธี RT – PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ HA และ NA พบว่าตัวอย่างทั้ง 3 เป็นเชื้อไวรัสไข้หวัด
ใหญ่สุกร subtype H3N2 ถึงแม้ว่าจะพบเชื้อ SIV เพียง 2.8% ของสุกรที่ป่วยเป็นโรคระบบทางเดิน
หายใจทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรอาจจะไม่ใช่เชื้อตัวหลักในการก่อโรค
PRDC แต่เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรปรากฏอยู่ 10% ของฟาร์มที่ทำการสำรวจ (30 ฟาร์ม) ซึ่งเป็น
อัตราที่ไม่ควรจะมีสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสุกรสามารถรับการติดเชื้อจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ใน
คนและสัตว์ปีก อีกทั้งยังเป็นสัตว์ที่ใกล้ชิดกับมนุษย์และสัตว์ปีก จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งใน
การศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบหมุนเวียนในประเทศไทยเพื่อเป็นการเฝ้าระวังอุบัติการณ์
ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรและศึกษาพันธุกรรมอย่างต่อเนื่องเพื่อติดตามการอุบัติของเชื้อ
ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ๆ ให้ทันทั่วถึง

Chatsirin Nakharuthai 2008: Significance of Swine Influenza Virus on Porcine Respiratory Disease Complex. Master of Science (Veterinary Microbiology), Major Field: Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Microbiology and Immunology. Thesis Advisor: Associate Professor Porn Tippa Lekcharoensuk, Ph.D. 93 pages.

Porcine respiratory disease complex (PRDC) is one of the most important diseases affecting swine industry worldwide. The disease causes by various pathogens including swine influenza virus (SIV). In this paper, we study an influence of SIV on PRDC by surveying SIV infection in piglets with respiratory symptoms. A total of 106 samples including nasal swab and lung suspension from sick piglets were collected from 30 farms of medium size in the central and eastern parts of Thailand during August 2006 to February 2007. Samples were inoculated onto MDCK cells and SIV infection was confirmed by an immunofluorescent assay (IFA) and RT-PCR specific for M gene. Out of 106 samples, three pigs from three different farms were found to be SIV positive in all assays. The positive samples were further identified as H3N2 subtype by RT-PCR using specific primers for hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes. The SIV infection has been found only 2.8% of the swine suffering from respiratory distress suggesting that SIV may not be the major pathogen of PRDC in the central and eastern parts of Thailand. However, SIV was presented in three out of 30 farms (10%) indicating that prevalence of SIV in these regions is considerable. Since, pigs are vulnerable to infection of both human and avian influenza viruses, it is essential for continual surveillance and monitoring of SIV infection in swine population.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ.ดร.พรทิพา เล็กเจริญสุข ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลักที่ให้ความช่วยเหลือในการวางแผนการทำวิจัย ตลอดจนคอยให้คำแนะนำและ
ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.มลิวัลย์ ชุนถนอม
และ รศ.ดร.วรวิทย์ วัชชวัลคุ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและ
ช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. เฉลิมพล เล็กเจริญสุข ในการออกแบบวิธีเก็บตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้การสนับสนุน
ทุนวิจัย

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร.กิจจา อุไรรงค์ ผศ. ดร. ปวีวรรณ พูลเพิ่มและ อ. อลงกต บุญสูงเนิน
ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ที่
ให้การสนับสนุนด้านการวิจัย ขอขอบพระคุณ นางวิไลรัตน์ น้่าสิงห์ และบุคลากรในหน่วยชั้นสูตร
โรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความ
อนุเคราะห์ด้านสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบุคลากรของภาควิชาที่ให้ความอนุเคราะห์
สถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้
อบรมและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

ฉัตรศิรินทร์ นาคฤทัย

เมษายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	45
อุปกรณ์	45
วิธีการ	45
ผลและวิจารณ์	54
ผล	54
วิจารณ์	68
สรุปและข้อเสนอแนะ	71
สรุป	71
ข้อเสนอแนะ	72
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	73

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ที่ใช้ในการแยกชนิดของ SIV	52
2	แสดงผลการเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้วัดใหญ่สุกรจาก nasal swab และ lung suspension โดยมีการตัดสินผลบวกหรือลบจากการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพภายในเซลล์ (CPE) และการทดสอบปฏิกิริยาจำเพาะต่อโปรตีน NP ด้วยวิธี IFA	55
3	ปริมาณไวรัสใน passage ที่ 1 เปรียบเทียบกับ passage ที่ 3	68

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพแสดงเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Hong kong/1/68	3
2	แสดงโครงสร้างอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A	6
3	ภาพแสดงโครงสร้าง 3 มิติ ของ cleaved hemagglutinin (HA) trimer	9
4	ภาพแสดงโครงสร้างโมเลกุลของ nucleoprotein ที่จับกับ RNA	10
5	ภาพแสดงโครงสร้างของ neuraminidase	12
6	ภาพแสดงโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน matrix	14
7	ภาพแสดงโปรตีน M2 ion channel	15
8	ภาพวาดจากการวิเคราะห์ข้อมูลจาก x – ray crystallography ของโครงสร้างและการเปลี่ยนแปลง conformation ของ HA2	18
9	ภาพแสดงความแตกต่างกันระหว่าง RNA ของอนุภาคเชื้อไวรัส (vRNA), mRNA และ full – length cRNA	19
10	ภาพแสดงลักษณะทางกายวิภาคของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่	34
11	ภาพแสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคจากเนื้อเยื่อปอดที่ถูกย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E)	35
12	แผนภาพแสดงการเพาะแยกเชื้อไวรัส (Virus isolation)	48
13	แผนภาพแสดงการวิเคราะห์หาแอนติเจนโดยทดสอบด้วยวิธี Immunofluorescent assay (IFA)	49
14	แผนภาพแสดงการหาปริมาณของไวรัส	51
15	แผนภาพแสดงการจำแนก subtype ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยการทดสอบโดยวิธี RT – PCR	53
16	ผลการแยกเชื้อไวรัส SIV จากตัวอย่างในเซลล์ MDCK	64
17	ลักษณะของเซลล์ที่ติดสี fluorescein เมื่อทดสอบด้วยวิธี IFA	65
18	ผลการตรวจสอบแถบ DNA ที่ได้จากการทำ RT – PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ M gene	66
19	ผลการตรวจสอบแถบ DNA ที่ได้จากการทำ RT – PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ HA (H1, H3) และ NA (N1, N2)	67

ความสำคัญของไข้หวัดใหญ่สุกรในการก่อโรกระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร

Significance of Swine Influenza Virus on Porcine Respiratory Disease Complex

คำนำ

โรคไข้หวัดใหญ่ในสุกรเป็นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม การเลี้ยงสุกรโรคหนึ่ง โดยเกิดจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร [swine influenza virus (SIV)] ซึ่งเป็นเชื้อ ไวรัสในวงศ์ *Orthomyxoviridae* ที่สามารถแบ่ง subtype ออกตามลักษณะแอนติเจนคือในส่วนฮีแม็ก กลูตินิน (hemagglutinin หรือ H) แบ่งเป็น 16 subtype และส่วนนิวรามินิเดส (neuraminidase หรือ N) แบ่งเป็น 9 subtype ซึ่งในสุกร subtype ที่พบและก่อให้เกิดปัญหา มี 3 subtype ได้แก่ H1N1, H3N2 และ H1N2 ซึ่งความหุกของโรคก็จะพบแตกต่างกันในแต่ละประเทศ โดยมีลักษณะอาการคือ มีไข้ เชื่องซึม อ่อนเพลีย หายใจลำบาก เบื่ออาหารทำให้สุกรเจริญเติบโตช้า และพบว่าหากมีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรเพียงลำพังจะไม่ก่อให้เกิดปัญหามากมายเนื่องมาจากร่างกาย ของสัตว์สามารถต่อสู้กับเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ โดยทั่วไปมีอัตราการตายน้อยกว่า 5% (Kida *et al.*, 1994) แต่การติดเชื้อแทรกซ้อนระหว่าง SIV กับเชื้อก่อโรคอื่นๆ หลายชนิดร่วมกัน เช่น porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, porcine circovirus type 2 (PCV2), *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* และ *Haemophilus parasuis* อาจจะทำให้อาการรุนแรงและกลายเป็นโรกระบบ ทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร [porcine respiratory disease complex (PRDC)] ซึ่งโรค PRDC ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรที่พบได้บ่อยในประเทศไทยแต่ยังไม่ทราบว่ามีเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรร่วมก่อให้เกิดความเสียหายด้วยหรือไม่อย่างไร

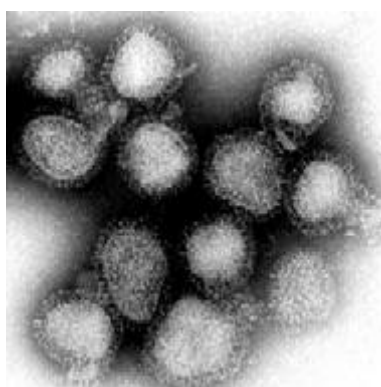
ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่การศึกษาในสุกรที่ป่วยเป็นโรค PRDC เพื่อดูว่าเชื้อไวรัส ไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นสาเหตุร่วมของการติดเชื้อ PRDC ในสุกรของประเทศไทยหรือไม่ และศึกษา สายพันธุ์ย่อยหรือ subtype ของเชื้อที่หมุนเวียน (circulation) ในสุกรของประเทศไทย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นสาเหตุร่วมของการติดเชื้อ PRDC ในสุกรของประเทศไทยหรือไม่
2. เพื่อศึกษา subtype ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่หมุนเวียนในฝูงสุกรของประเทศไทย

การตรวจเอกสาร

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Orthomyxoviridae* มีสายพันธุกรรมเป็น RNA สายลบเส้นเดี่ยว อนุภาคไวรัสมีเยื่อหุ้ม (envelope) ล้อมรอบ มีรูปพรรณสัณฐานเป็นสองแบบ แบบแรกเป็นรูปทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 80-120 นาโนเมตร (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ภาพแสดงเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Hong kong/1/68 ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด H3N2 เป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดไปทั่วโลกในปี ค.ศ. 1968 ในภาพแสดงส่วน surface ของอนุภาคไวรัสที่ประกอบด้วย receptor ซึ่งเชื้อไวรัสใช้เกาะติดกับ เซลล์เยื่อปิวระบบทางเดินหายใจของเจ้าบ้าน (host) (กำลังขยาย = 70,000X)

ที่มา: Murphy (2000)

ส่วนแบบที่สองเป็นสายยาว (filamentous form) หากเพาะเลี้ยงเชื้อไปนาน ๆ ตรงใจกลางของอนุภาคไวรัสจะมีสารพันธุกรรมซึ่งเป็นกรดไรโบนิวคลีอิก (RNA) โดยเป็น RNA สายเดี่ยว (single stranded RNA) ที่แยกกันอยู่ 7-8 แท่ง (segment) และเป็นสายลบ (negative stranded) (Easterday and Van Reeth, 1999) ส่วน messenger RNAs (mRNAs) เป็นสายบวก (positive stranded) จะถูกถอดรหัส (transcribed) จากชิ้นส่วน RNA ของไวรัส

สายพันธุกรรม RNA ที่เป็นสายลบมีหน้าที่ 2 อย่างคือ เป็นแม่แบบ (template) สำหรับการสังเคราะห์ mRNA และเป็นแม่แบบ สำหรับการสังเคราะห์ antigenome ซึ่งเป็นสายบวก

RNA จะขดเป็นรูปบันไดเวียนอยู่ซึ่งมี nucleoprotein เกาะอยู่และเรียกชื่อรวมว่า ribonucleoprotein (RNP) การที่มีสายพันธุกรรมแยกกันเป็นแท่งๆ หลายแท่งทำให้มีโอกาสที่จะเกิด recombination และ reassortment ทำให้เกิดสายพันธุ์หรือ subtype ใหม่ ๆ ได้เสมอ เปลือกหุ้มสองชั้นของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ประกอบด้วยชั้นในคือ โปรตีน M หรือ matrix protein ที่วางตัวอยู่ได้ชั้นเยื่อหุ้มซึ่งเป็นไขมัน (lipid bilayer) ส่วนเยื่อหุ้มชั้นนอกจะมีปุ่มยื่นออกไป 2 ชนิด มีคุณสมบัติทางเคมีเป็น glycoprotein ซึ่งทางอิมมูโนเคมีถือว่า มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน และแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ชนิดที่หนึ่งเรียกชื่อว่า hemagglutinin หรือ HA สามารถแยกความแตกต่างได้อีกเป็น 16 subtypes ชนิดที่ 2 เรียกว่า neuraminidase หรือ NA สามารถแยกความแตกต่างได้อีกเป็น 9 subtypes โดยการแยก subtype จะอาศัยคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนและลักษณะทางพันธุศาสตร์เป็นตัวกำหนด (Scholtissek *et al.*, 1985) ทั้ง HA และ NA มีความสำคัญในการติดเชื้อ (infectivity) และมีความสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน

1. การจัดหมวดหมู่ (Classification)

วงศ์ *Orthomyxoviridae* (Orthos มาจากภาษากรีก ซึ่งตรงกับคำในภาษาอังกฤษที่ว่า standard, correct และ myxa ตรงกับคำว่า mucus) ประกอบด้วย 4 สกุล ที่กำหนดอยู่ใน International committee for the Taxonomy of viruses ในรายงานลำดับที่ 7 นั่นคือ Influenza A, B และ C และ Thogotovirus (บางครั้งเรียก Influenza D viruses) (Strauss and Strauss, 2002)

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Orthomyxoviridae* เนื่องจากมีความสามารถในการจับกับเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) ซึ่งลักษณะเช่นนี้เป็นลักษณะพิเศษซึ่งแตกต่างจากวงศ์อื่นๆ ของไวรัสพวกที่เป็น RNA สายลบยกเว้นไวรัสในวงศ์ *Paramyxoviridae* ส่วนชื่อสกุล Influenza มาจากภาษาอิตาลีจากคำว่า Latin *influentia* ที่มีความหมายว่า โรคระบาด (epidemic) ที่ใช้คำนี้เพราะว่าการระบาดนี้เป็นการระบาดที่ไม่สามารถอธิบายได้มีความลึกลับยากแก่การเข้าใจ

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A, B และ C สามารถแยกกันได้โดยอาศัยลักษณะความแตกต่างของแอนติเจนระหว่าง nucleoprotein (NP) และ matrix (M) proteins (Lamb and Krug, 2001) โดยในเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด A มีลักษณะเพิ่มเติมในการแบ่ง subtypes อีกคือ อาศัยพื้นฐานทางธรรมชาติของแอนติเจนของ hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) glycoproteins ส่วนลักษณะสำคัญอื่นๆ ที่เป็นลักษณะเด่นของเชื้อ Influenza A, B และ C ได้แก่

1. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A มีการติดเชื้อตามธรรมชาติอย่างกว้างขวางและหลากหลายในสัตว์ปีก มนุษย์ และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ ซึ่งประกอบด้วย สุกกร และ ฆ่า เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด B จะพบการติดเชื้อตามธรรมชาติในมนุษย์ ส่วนเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด C แยกได้จากมนุษย์เป็นหลักแต่ก็เคยพบในสุกรของประเทศจีน (Guo *et al.*, 1983)

2. Surface glycoproteins ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด A (HA, NA) ส่วนมากเป็น amino acid sequence ที่มีการเปลี่ยนแปลงบ่อย ไม่คงที่ (McGeoch *et al.*, 1976) มากกว่าของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด B ส่วนเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด C มี single glycoprotein ที่มีหน้าที่หลากหลาย ซึ่งมีลักษณะร่วมกันของ hemagglutinin – esterase fusion protein (HEF)

3. ลักษณะรูปร่าง (morphologic) ที่พิเศษคือ ลักษณะของเชื้อไข้หวัดใหญ่ A และ B จะแตกต่างกับเชื้อชนิด C โดยอนุภาคของไวรัสไข้หวัดใหญ่ A และ B มีโครงสร้างที่ยากต่อการจำแนกออกจากกัน ในขณะที่อนุภาคของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ C มีลักษณะเด่นสามารถแยกออกจากเชื้อในตระกูลอื่นๆได้เพราะว่าส่วน glycoprotein spike จัดเรียงตัวเป็นรูป 6 เหลี่ยม (Compans, 1973)

4. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A, B และ C มีโปรตีนที่คล้ายคลึงกันแต่จะมีกลไกพิเศษเฉพาะตัวในการถอดรหัสโปรตีน (encoding protein) ที่แตกต่างกัน (Lamb and Krug, 2001)

5. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และ B จะประกอบด้วย RNA 8 แท่ง (Lamb and Krug, 2001) ขณะที่ C มี RNA 7 แท่ง

ส่วนไวรัสในสกุล *Thogotovirus* ยังไม่เป็นที่ทราบกันดี แต่พบว่า *Thogotovirus* ประกอบด้วย tickborne viruses ที่มีโครงสร้างและลักษณะทางพันธุกรรมสัมพันธ์กับเชื้อไข้หวัดใหญ่ A, B และ C (Leahy *et al.*, 1997) และประกอบด้วย glycoprotein เพียงชนิดเดียว (Morse *et al.*, 1992)

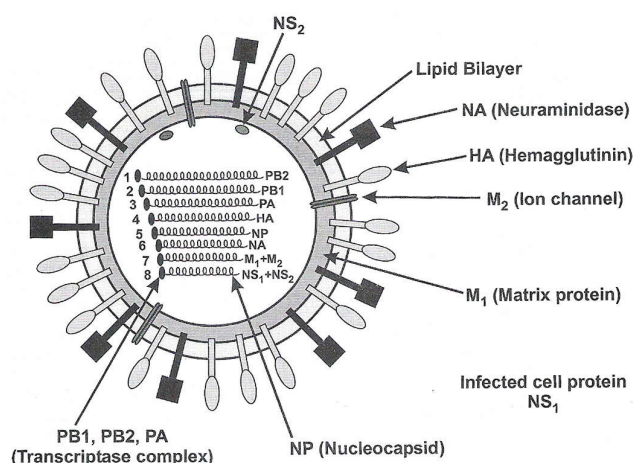
2. โครงสร้างของอนุภาคไวรัส (Virion structure)

Orthomyxoviridae ประกอบด้วย RNA 1% โปรตีน 70% ไขมัน 20% และคาร์โบไฮเดรต 5 – 8% โดยส่วนไขมันที่ห่อหุ้มเชื้อไวรัสได้มาจากส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของเซลล์เจ้าบ้านที่ไวรัสใช้ในการเจริญเติบโต (Lamb and Krug, 2001)

ลักษณะเด่นของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A คือ การมี glycoprotein ยื่นออกมา (spike) 500 อัน กระจายเป็นรัศมีรอบตัวอนุภาคด้านนอก (10 -14 nm) จากชั้น lipid envelope โดย spike เหล่านี้มี 2 ชนิด คือ

1. rod – shaped spike ของ HA มีลักษณะเป็นรูปแท่ง
2. mushroom – shaped spike ของ NA มีลักษณะเป็นรูปดอกเห็ด

โดยอัตราส่วนของ HA: NA มีความแปรผันตามชนิดของไวรัสแต่โดยทั่วไปจะอยู่ที่ 4: 1 – 5: 1 (Lamb and Krug, 2001) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ซึ่งประกอบด้วย integral membrane protein 3 ชนิด คือ hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA) และ โปรตีน M2 ซึ่งเป็น ion channel ที่แทรกผ่านชั้นเยื่อหุ้มซึ่งเป็นไขมันของชั้น membrane โดย matrix protein (M1) ของอนุภาคไวรัสที่อยู่ใต้ชั้นเยื่อหุ้มซึ่งเป็นไขมันมีปฏิสัมพันธ์กับ helical RNPs ภายในเยื่อหุ้มมีสารพันธุกรรมชนิด single – stranded RNA 8 แท่ง (มีนิวคลีโอไทด์เฉลี่ย 2,341 – 890 นิวคลีโอไทด์) พันรอบ nucleoprotein ประกอบขึ้นเป็น RNP นอกจากนั้นยังมี transcriptase complex ที่ประกอบด้วยโปรตีน PB1, PB2 และ PA โดย RNA แท่งที่ 7 และ 8 สามารถแปลรหัสโปรตีนได้มากกว่า 1 ชนิด (M1, M2 และ NS1, NS2 ตามลำดับ)

ที่มา: Lamb and Krug (2001)

3. โปรตีนที่ถูกถอดรหัสจาก RNA ทั้ง 8 แห่งของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สังเคราะห์โปรตีนจากสายพันธุกรรมทั้ง 8 แห่ง ประกอบด้วย

1. โปรตีนที่จำเป็นต่อการจำลองตัวเอง (polymerase) 3 ชนิด คือ PB2, PB1 และ PA ซึ่งถูกสังเคราะห์จาก RNA แห่งที่ 1, 2 และ 3
2. โปรตีน hemagglutinin หรือ HA ซึ่งถูกสังเคราะห์จาก RNA แห่งที่ 4
3. nucleoprotein หรือ NP ซึ่งถูกสังเคราะห์จาก RNA แห่งที่ 5
4. neuraminidase หรือ NA ซึ่งถูกสังเคราะห์จาก RNA แห่งที่ 6
5. โปรตีน matrix หรือ M1 และ M2 ซึ่งถูกสังเคราะห์จาก RNA แห่งที่ 7
6. โปรตีน nonstructural (NS)1 และ NS2 ซึ่งถูกสังเคราะห์จาก RNA แห่งที่ 8

3.1 โปรตีน Polymerase สร้างมาจากสายพันธุกรรม RNA ขนาดใหญ่ 3 ชนิดที่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน PB1, PB2 และ PA ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล (MR) 96,000, 87,000 และ 85,000 Da ตามลำดับ (Inglis *et al.*, 1976) โดยเป็นโปรตีนที่ถูกแปลรหัสจากสายพันธุกรรม RNA แห่งที่ 1, 2 และ 3 ชื่อของโปรตีนเหล่านี้จะถูกตั้งจากคุณสมบัติของโปรตีนบน isoelectric focusing gel นั้นคือเป็นโปรตีนที่มีสภาพเป็นด่าง 2 ตัว คือ PB1, PB2 และโปรตีนที่มีสภาพเป็นกรด 1 ตัว คือ PA (Horisberger, 1980)

สายพันธุกรรม RNA แห่งที่ 1 และ 2 มีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ 2,341 นิวคลีโอไทด์ และถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 759 ตัวใน PB2 และ 757 ตัวใน PB1 โดย PB1 และ PB2 คือโปรตีนที่เป็นเบส มีประจุสุทธิเป็นบวก (+28) ที่ pH 6.5 เนื่องจากขนาดของสาย polypeptide ทั้ง PB1 และ PB2 มีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นเป็นการยากที่จะแยกความแตกต่างของโปรตีนทั้งสองด้วย polyacrylamide gel electrophoresis จึงต้องอาศัยปัจจัยอื่นๆ พิจารณาร่วมด้วย

สายพันธุกรรม RNA แท่งที่ 3 มีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ 2,233 นิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสไปเป็นโปรตีน PA ที่มีกรดอะมิโน 716 ตัว มีประจุสุทธิเป็นลบ (-13.5) ที่ pH 6.5

โปรตีน polymerase ทั้ง 3 ชนิดจะประกอบตัวเป็น complex ในไซโตพลาสซึมและเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียส อย่างไรก็ตามการแสดงออกของโปรตีน polymerase จาก cDNA แสดงให้เห็นว่าโปรตีน polymerase มี karyophilic signal ซึ่งเคลื่อนที่ไปในนิวเคลียส (Akkina *et al.*, 1987)

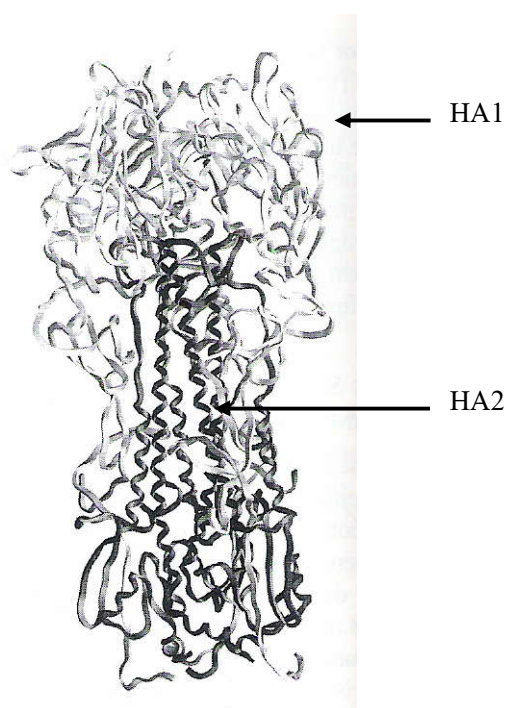
ยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B และ C ที่ถอดรหัสโปรตีน polymerase ทั้ง 3 ชนิด มีลำดับคู่เบสขนาดใหญ่และมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (homology) กับเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด A จึงสันนิษฐานได้ว่าโปรตีนเหล่านี้มีบทบาทหน้าที่คล้ายคลึงกันเช่นเดียวกับโปรตีน polymerase ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A

3.2 โปรตีน Hemagglutinin หรือ HA เรียกเช่นนี้เนื่องมาจากความสามารถของไวรัสในการทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) ของเม็ดเลือดแดง (Hirst, 1941) โดยจับกับ receptor ที่มี sialic acid เป็นส่วนประกอบที่มีความจำเพาะ

HA มีบทบาทที่สำคัญ 3 อย่างในวัฏจักรการจำลองสายพันธุกรรม (replication) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Lamb and Krug, 2001) ดังนี้คือ

1. HA จับกับตัวรับที่มี sialic acid เป็นส่วนประกอบบนผิวเซลล์และทำให้เกิดการเกาะติดของชิ้นส่วนไวรัสกับเซลล์
2. HA มีหน้าที่ในการบุกรุก (penetration) ของเชื้อไวรัสเข้าไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์ โดยเป็นสื่อกลางในการทำให้เกิดการหลอมรวมกันระหว่าง membrane ของอนุภาคไวรัสกับของโฮสต์ โดยผลที่ตามมาคือ RNP ของเชื้อไวรัสถูกปล่อยเข้าไปในไซโตพลาสซึมของโฮสต์
3. HA เป็นแอนติเจนตัวหลักของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในการต่อสู้กับ neutralizing antibody ที่ถูกผลิตขึ้นจากการติดเชื้อในคนและสัตว์ในขณะที่เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส และมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแอนติเจนของตัวมันเอง

HA จะถูกแปลรหัสโดย RNA แท่งที่ 4 และถูกสังเคราะห์บน membrane bound ribosome และถูกเคลื่อนย้าย (translocate) เข้าไปในช่องว่าง (lumen) ของ endoplasmic reticulum (ER) ของเซลล์ที่ติดเชื่อในรูปแบบของเปปไทด์สายเดี่ยว (single peptide) HA0 (Mr ~ 76,000) ส่วน HA spike glycoprotein เป็น homotrimer (Wiley *et al.*, 1977) ของ monomer ที่จับกันด้วยพันธะนอนโควาเลนต์ (non-covalent) (ภาพที่ 3)



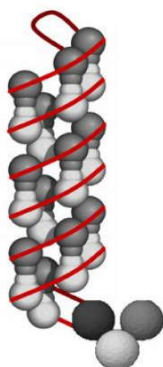
ภาพที่ 3 ภาพแสดงโครงสร้าง 3 มิติ ของ cleaved hemagglutinin (HA) trimer ที่ได้ข้อมูล มาจากการทำ x-ray diffraction

ที่มา: Lamb and Krug (2001)

สายโพลีเปปไทด์ของ HA ที่เป็นชนิด H3 แต่ละสายประกอบด้วยส่วน ectodomain ที่มีความยาวของกรดอะมิโนจำนวน 512 ตัว ส่วน transmembrane domain ซึ่งอยู่ทางปลายคาร์บอกซีมีกรดอะมิโน 27 ตัว และส่วน cytoplasmic tail ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 10 ตัว (Verhoeven *et al.*, 1980) มีการเติมสาย oligosaccharide เพิ่มในส่วน ectodomain ของ HA และเติม palmitate residue เข้ากับ cysteine residue ที่ปลายสุดของปลายคาร์บอกซี ผ่านการเชื่อมของ thioether linkage (Naim and Roth, 1993)

สายพันธุ์ไวรัสขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์เจ้าบ้านและสภาวะการเจริญเติบโต HA ที่พบได้จะมีอยู่ทั้งในรูปแบบดั้งเดิมที่ไม่มีการตัดขาดที่ส่วนใด (uncleaved precursor form; HA0) หรือในรูปที่ถูกตัดออกเป็น HA1 และ HA2 (cleave form) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ disulfide – linked (HA1 Mr ~ 47,000 และ HA2 Mr ~ 29,000) การที่ไวรัสจะสามารถทำให้เซลล์ติดเชื้อมันนั้น HA0 จะต้องถูกตัดออกเป็น HA1 และ HA2 เสียก่อน (Steinhauer, 1999) ซึ่งจะทำให้ส่วนปลายอะมิโน (N – terminus) ของ HA2 ซึ่งเรียกว่า fusion peptide โผล่ออกมา fusion peptide เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) มีความเหมือนกัน (conserve) อย่างมากใน HAs ของสายพันธุ์ไวรัสที่แตกต่างกัน และเป็นส่วนที่จำเป็นในการหลอมรวม (fusion) ของ เยื่อหุ้มของอนุภาคไวรัสและของเซลล์

3.3 Nucleoprotein (NP) เป็น โปรตีน โครงสร้างหลักที่มีมากที่สุดของอนุภาคไวรัสซึ่งทำปฏิกิริยากับสายพันธุกรรม RNA เพื่อประกอบขึ้นเป็น ribonucleoprotein (RNP) (Lamb and Krug, 2001) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ภาพแสดงโครงสร้างโมเลกุลของ nucleoprotein ที่จับกับ RNA ของเชื้อไวรัสเพื่อประกอบกันเป็น ribonucleoprotein complex ที่มีลักษณะขดเป็นเกลียว

ที่มา: Tao (2006)

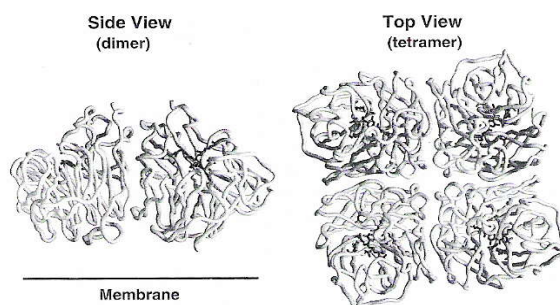
โดย NP เป็นแอนติเจนชนิดหนึ่งที่เฉพาะสำหรับไวรัสไข้หวัดใหญ่แต่ละชนิด (type – specific antigen) ซึ่งเหมือนกันในกลุ่มแต่แตกต่างกันระหว่างชนิด A, B และ C นอกจากนี้ NP เป็นตัวหลักในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross – reaction) ของ cytotoxic T lymphocytes ต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่หลายๆ สายพันธุ์ย่อยที่ศึกษาในหนูขาวและมนุษย์ (Yewdell and Hackett, 1989)

NP ถูกแปลรหัสจากสายพันธุกรรม RNA แท่งที่ 5 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยในชนิด A จะมีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ 1,565 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 490 ตัว โปรตีนส่วนใหญ่ คือ arginine และมีประจุสุทธิเป็นบวก (+14) มี pH 6.5 (Winter and Fields, 1981) ซึ่งคาดว่าโปรตีนเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับ acidic phosphate residue ของ RNA ซึ่งสิ่งเหล่านี้สามารถบอกเป็นนัยๆ ได้ว่าตำแหน่ง basic residue จำนวนมากมายบนโมเลกุลของ NP อาจจะเป็นตัวให้ RNA เกาะ การสังเคราะห์ NP เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม แล้วถูกส่งไปในนิวเคลียส ซึ่งสัญญาณที่นำโปรตีนเข้าสู่ในนิวเคลียสของ NP ก็คือ คุณสมบัติของโปรตีนที่มันมีอยู่ในตัวเองอยู่แล้ว (Lin and Lai, 1983) โดยในนิวเคลียสจะให้สภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการสังเคราะห์ชิ้นส่วนต่างๆ ของไวรัส จึงสามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และแอนติเจนของมัน ได้ทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะแตกต่างจากไวรัสชนิด RNA ตัวอื่นๆ

ในช่วงท้ายของการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ NP ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ถูกตัดจากโปรตีนขนาด 56 kd เหลือเป็นโปรตีนขนาด 53 kd โดย cellular caspase ซึ่งขนาดของ NP ที่ลดลงนี้สามารถเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าระยะนั้นคือระยะเริ่มต้นของการเกิดภาวะ apoptosis ในเซลล์ที่ติดเชื้อ หรือมีหน้าที่จำเพาะในปฏิกิริยาระหว่างโฮสต์กับไวรัส (Zhirnov *et al.*, 1999) ส่วน NP ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B ประกอบด้วยกรดอะมิโน 560 ตัว ในขณะที่ NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด C ประกอบด้วยกรดอะมิโน 565 ตัว

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใน nucleocapsid gene ของเชื้อ SIV ชนิด A จะแตกต่างกับในเชื้อชนิดอื่นๆ โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 60% แต่ภายในชนิด A ด้วยกันที่ต่าง strain กันจะมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงประมาณ 90% (Olsen *et al.*, 2000)

3.4 โปรตีน Neuraminidase (NA) เป็น subtype – specific glycoprotein ตัวที่ 2 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และ B โดย NA เป็น homotetramer (Mr ~ 220,000) ประกอบด้วยส่วน head domain ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ (ภาพที่ 5) และส่วนก้าน (stalk) เป็นที่เกาะกับ membrane โดย NA มีความสำคัญทั้งทางด้านการกิจกรรมทางชีววิทยาในการเคลื่อนย้าย sialic acid ออกจาก glycoprotein (Palese *et al.*, 1974) และเป็นแอนติเจนหลักที่มีความหลากหลาย



ภาพที่ 5 ภาพแสดงโครงสร้างของ neuraminidase ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A รูปซ้าย แสดงมุมมองทางด้านข้างของ NA dimer รูปด้านขวาแสดงมุมมองทางด้านบนของ NA tetramer

ที่มา: Lamb and Krug (2001)

NA (acylneuraminyl hydrolase, EC 3.2.1.18) เป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดการ cleavage ของ α - ketosidic linkage ระหว่าง ปลาย sialic acid ที่เชื่อมกับ D - galactose หรือ D - galactosamine (Gottschalk, 1975) ส่วนบทบาทของ NA ในวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ยังคงไม่เป็นที่ชัดเจน

NA ยังเป็น โปรตีนที่ใช้ในการกำหนด subtype ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A โดยในปัจจุบันมีทั้งหมด 9 subtype (Colman, 1989) RNA แห่งที่ 6 นี้มีขนาดยาว 1,413 นิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ขนาด 453 กรดอะมิโน โดยสายโพลีเปปไทด์ของ NA มี hydrophobic domain ซึ่งฝังอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มซึ่งเป็นไขมันที่ติดต่อกับปลายอะมิโน (N - terminus) (residue ที่ 7 - 35) การแสดงออกของ domain เหล่านี้ เป็นที่รวมของ uncleavage signal และ anchor domain ซึ่งทั้งคู่เป็นตำแหน่งเป้าหมายของ NA ในการจับกับ membrane ของ ER ทำให้เกิดการเกาะติดกันอย่างเสถียรใน membrane

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NA ในเชื้อไข้หวัดใหญ่ทั้ง 9 subtype ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A และ B แสดงให้เห็นความแปรผันของระดับความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ในส่วน cytoplasmic tail, transmembrane (TM) domain, stalk, head domain และ catalytic active site โดยส่วน cytoplasmic tail ซึ่งมีกรดอะมิโน N-Met-Asn-Pro-Asn-Gly-Lys มีความคงที่มากภายใน

เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด A ใน subtype ต่างๆ แต่ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และ B พบว่ามีความแตกต่างกัน

3.5 โปรตีน Matrix (M1) และ M2 ถูกสังเคราะห์โดย RNA แ่งที่ 7 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A โดยโปรตีน M1 จะวางตัวอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มซึ่งเป็นไขมันและประกอบกันเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในอนุภาคไวรัส ส่วนโปรตีน M2 เป็นองค์ประกอบส่วนน้อยในอนุภาคไวรัสและทำหน้าที่เป็น Ion channel

อันที่จริงแล้ว RNA แ่งที่ 7 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A บรรจุรหัสของ mRNA transcript 3 ชนิดคือ

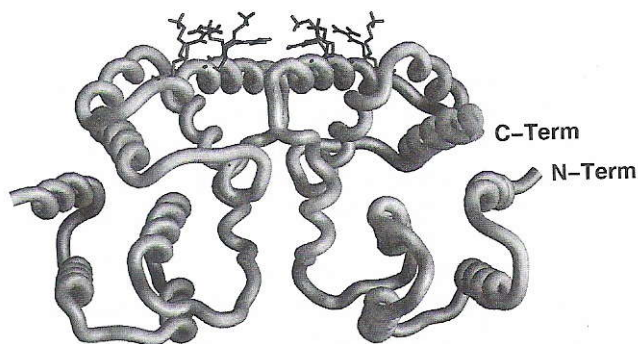
1. colinear transcript แปลรหัสโปรตีน M1
2. spliced mRNA แปลรหัสโปรตีน M2
3. mRNA3 ซึ่งเป็น mRNA ที่ได้มาจาก alternative spliced มีศักยภาพในการแปลรหัสเป็นเปปไทด์ขนาด 9 กรดอะมิโน แต่ไม่เคยพบในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส

ส่วน RNA แ่งที่ 7 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B แปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ 2 สาย นั่นก็คือโปรตีน M1 และ BM2 ซึ่งมีกรดอะมิโนจำนวน 109 ตัว โดยใช้ชุดการถอดรหัสที่ซ้ำกัน (tandem cistron) ซึ่งยังคงไม่รู้หน้าที่ของมัน และ RNA แ่งเดียวกันนี้ในเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด C (RNA แ่งที่ 6) ถูกถอดรหัสเป็น mRNA 2 สาย สายแรกเป็น colinear mRNA ซึ่งถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด p42 โดย p42 จะถูกตัดโดย peptidase และได้ผลผลิตเป็นโปรตีนขนาด 31 kDa (p31) และโปรตีน CM2 ส่วน mRNA อีกหนึ่งสายมีขนาดเล็กกว่าและถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน CM1 โปรตีน PB1 จะมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ CM1 ปลายด้าน C – terminal จะมีกรดอะมิโนยาวกว่า 5 ตัว

โปรตีน Matrix หรือ M1 จะวางตัวอยู่ใต้ชั้นเยื่อหุ้มซึ่งเป็นไขมันในอนุภาคไวรัส และสร้างความแข็งแรงให้กับ membrane นอกจากนั้นมีความเชื่ออย่างมากว่าโปรตีน M1 ทำปฏิกิริยากับ cytoplasmic tail ของ HA, NA และโปรตีน M2 และทำปฏิกิริยากับ RNP

โปรตีน M1 บริสุทธิ์สามารถยับยั้งการถอดรหัสของไวรัสในหลอดทดลองได้ (Ye *et al.*, 1989) และถ้าโปรตีน M1 ไม่ได้ถูกแยกออกจาก RNPs ภายในไซโตพลาสซึม RNP ก็จะไม่สามารถถูกส่งเข้านิวเคลียสได้ (Martin and Helenius, 1991) แต่หลังจากการติดเชื้อ การส่งโปรตีน M1 เข้าไปในนิวเคลียสเป็นสิ่งที่จำเป็นในการขนส่ง assemble RNPs ตัวใหม่ออกนอกนิวเคลียส (Martin and Helenius, 1991)

การศึกษาโครงสร้างผลึกของ M1 โดยวิธี X-ray crystallography ของส่วนปลายอะมิโนของโปรตีน M1 (residue 2 – 158) ที่ระดับ pH ต่ำ ส่วนของโปรตีน M1 จะประกอบขึ้นเป็น dimer ที่ pH 4.0 จากโครงสร้างที่ไม่ใช่ผลึกที่แกนหมุน 2 เท่า (2 fold axis) พบว่าชิ้นส่วนโปรตีน M1 จะ form ตัวเป็น dimer ซึ่งมีโครงสร้างสัมพันธ์ noncrystallographic twofold axis ที่ pH 4.0 แต่ละ monomer ประกอบด้วย α – helices 9 ชุด มีตำแหน่ง loop 8 loop และไม่มี β – strands (Sha and Luo, 1997) (ภาพที่ 6) มีบริเวณที่เป็นประจุบวกสูง (10 residue จากแต่ละ monomer) บนพื้นผิว dimer คือตำแหน่งที่เหมาะสมกับการจับ RNA ขณะที่บริเวณ hydrophobic surface จะตรงข้ามกับตำแหน่งที่จับกับ RNA และเป็นไปได้ว่าบริเวณ hydrophobic surface อาจจะถูกฝังอยู่ข้างในหรือโผล่ออกมาได้หลังจากเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 3 มิติ (conformation change)



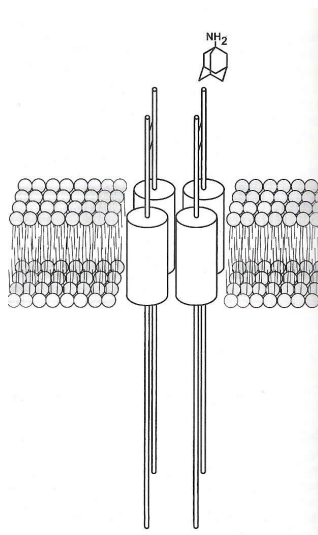
ภาพที่ 6 ภาพแสดงโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน matrix ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A โดยแสดงโครงสร้าง dimer ของ M1 residue 1 – 158

ที่มา: Lamb and Krug, 2001

โปรตีน M1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ประกอบด้วย zinc – binding motif (Cys – Cys – His – His) อยู่ระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 148 – 162 อย่างก็ตามโครงสร้างของผลึก M1 (crystallographic structure) ชี้ชัดว่าลำดับกรดอะมิโนเหล่านี้จะไม่ประกอบตัวขึ้นทำหน้าที่ zinc finger

โปรตีน M2 ทำหน้าที่เป็น ion channel เป็น integral membrane protein ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 97 ตัว ถูกแปลรหัสโดย spliced mRNA ที่ได้มาจาก RNA แท่งที่ 7 (Lamb and Choppin, 1981) โปรตีน M2 ปรากฏอยู่มากมายที่บริเวณเยื่อหุ้มของเซลล์ที่ติดเชื้อ ใน polarized cell นั้น โปรตีน M2 จะปรากฏอยู่บน apical cell surface (Hughey *et al.*, 1992) ซึ่งเป็นพื้นผิวที่อนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่โผล่ (budding) ออกมา โปรตีน M2 มีส่วนปลายอะมิโนที่อยู่ภายนอกเซลล์ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 24 ตัว กรดอะมิโนของ TM domain มีจำนวน 19 ตัว และ cytoplasmic tail มีจำนวน 54 ตัวตามลำดับ (Lamb *et al.*, 1985) (ภาพที่ 7)

รูปแบบโดยธรรมชาติของโปรตีน M2 คือ homotetramer ขนาดเล็กมาก ประกอบด้วยคู่ของ disulfide – linked dimer หรือ disulfide – linked tetramer ใดๆอย่างหนึ่ง (Bauer *et al.*, 1999) ซึ่งประกอบขึ้นเป็นสายสี่สายพันกัน ในลักษณะเกลียวหมุนด้านซ้าย (left – handed four – helix bundle) ที่มีมุมในการเอียงของเกลียว (interhelix tilt) 20 – 30 องศา (Kovacs *et al.*, 2000)



ภาพที่ 7 ภาพแสดงโปรตีน M2 ion channel ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยโปรตีน M2 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีลักษณะเป็น disulfide – linked homotetramer

ที่มา: Lamb and Krug, 2001

TM domain ของโปรตีน M2 เป็นเป้าหมายของยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ (anti – influenza virus drug) amantadine (1- aminoadamantane hydrochloride) โดย amantadine แสดงบทบาทในการเป็นยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Davies *et al.*, 1964) ที่มีความจำเพาะและใช้ในการป้องกันโรคและรักษาการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A พบว่าการกลายพันธุ์ที่ต่อต้านต่อ amantadine ประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในส่วน TM domain ของโปรตีน M2 (Hay *et al.*, 1985)

จากการศึกษาผลของยา amantadine ต่อการจำลองสายพันธุกรรมของไวรัส ทำให้มีการตั้งสมมติฐานว่าโปรตีน M2 ทำหน้าที่เป็น ion channel ที่ยอมให้ ion ผ่านเข้าไปในอนุภาคไวรัส ในขณะที่มีการถอดเปลือกหุ้มของไวรัส (uncoating) และยังทำหน้าที่เป็น ion channel ซึ่งจะควบคุม pH ของ golgi apparatus ส่วนความสามารถในการเลือก ion พบว่ามีความจำเพาะสูงสำหรับ H⁺ ion (Chizhnikov *et al.*, 1996)

3.6 โปรตีน NS1 และ NS2 จะถูกแปลรหัสมาจาก unspliced mRNA และ spliced mRNA ตามลำดับ ซึ่งถอดรหัสมาจาก RNA แ่งที่ 8 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และ B หรือ RNA แ่งที่ 7 ซึ่งมีขนาดเล็กที่สุดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด C โดย NS1 จะถูกแปลรหัสจาก colinear mRNA ในขณะที่ NS2 จะถูกแปลรหัสจาก spliced mRNA

โปรตีน NS₁ (Mr ~ 26,000) พบในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จำนวนมากแต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในอนุภาคไวรัส ดังนั้นจึงระบุว่า NS1 ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง (non – structural protein) (Krug and Etkind, 1973) NS1 พบในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อและพบอยู่บน polysome (Compans, 1973)

โปรตีน NS1 ประกอบด้วย nuclear export signal (NES) ที่เป็นกรดอะมิโนลำดับสั้นๆ ที่มี leucine จำนวนมาก (leucine – rich sequence) ซึ่งเป็นสื่อกลางของการขนส่งโปรตีนออกนอกนิวเคลียส (Gorlich and Mattaj, 1996)

โปรตีน NS2 เป็นโปรตีนที่ถูกแปลรหัสโดย spliced mRNA ของ RNA แ่งที่ 8 มีอยู่ภายในอนุภาคไวรัสในปริมาณ 130 – 200 โมเลกุลต่อ 1 อนุภาค และ form ตัวสัมพันธ์กับโปรตีน M1 (Ritchey *et al.*, 1976) ซึ่งมีความจำเป็นในการทำปฏิกิริยาเพื่อการส่ง RNP complex ออกจากนิวเคลียสในวัฏจักรชีวิตของไวรัส โดย NS2 ถูกเรียกชื่อใหม่ว่า nuclear export protein หรือ NEP

(O'Neill *et al.*, 1998) สามารถพบโปรตีน NS2 ได้ทั้งในนิวเคลียส (Greenspan *et al.*, 1985) และไซโตพลาสซึม (Smith *et al.*, 1987)

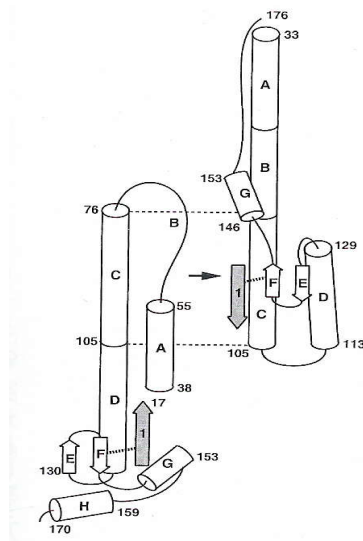
4. ขั้นตอนการจำลองสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

ในการเกาะติด การเข้าสู่เซลล์และการถอดเปลือกหุ้ม (virus adsorption, entry, and uncoating) นั้น เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะจับกับ sialic acid residue ที่ปรากฏอยู่บน glycoprotein หรือ glycolipid บนผิวของเซลล์ (cell surface) ผ่าน receptor – binding site ในส่วนปลายโมเลกุล HA โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แตกต่างกันจะมีความจำเพาะกับ sialic acid ที่เชื่อมกับ galactose ที่ต่างกัน โดยอาจเชื่อมด้วยพันธะ α 2, 3 หรือ α 2, 6 ซึ่งสิ่งเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ residue ที่จำเพาะใน receptor – binding pocket ของ HA (Weis *et al.*, 1988) ยกตัวอย่างเช่น ถ้าเป็นสายคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate chain) ในลำไส้ของสัตว์ปีกจะประกอบด้วย sialic acid ที่เชื่อมกับ galactose ด้วยพันธะ α 2, 3 ส่วนในหลอดลมสุกรประกอบด้วย sialic acid ที่เชื่อมกับ galactose ด้วยพันธะ α 2, 3 และพันธะ α 2, 6 และในหลอดลมของมนุษย์สายคาร์โบไฮเดรตจะประกอบด้วย sialic acid ที่เชื่อมกับ galactose ด้วยพันธะ α 2, 6 (Ito *et al.*, 1998) ในภายหลังพบว่าเซลล์เยื่อปอดลม (pneumocyte type II) ซึ่งอยู่ส่วนลึกของปอดมี receptor ชนิด α 2, 3 galactoside ด้วย ซึ่งความจำเพาะของ HA ตรงส่วน sialic acid ไม่ว่าจะเป็นการเชื่อมกับ galactose ด้วยพันธะ α 2, 3 หรือพันธะ α 2, 6 สิ่งเหล่านี้เป็นกุญแจสำคัญในการจำกัดการถ่ายทอดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ในบริเวณ HA sialic acid – binding site จากสัตว์ปีกสู่มนุษย์โดยตรง

หลังจากที่เชื้อไวรัสสามารถจับกับตัวรับที่จำเพาะไม่ว่าจะจับผ่านพันธะ α 2, 3 หรือ α 2, 6 จะเกิดขบวนการ receptor - mediated endocytosis ซึ่งนำอนุภาคไวรัสเข้าสู่เซลล์ในลักษณะ endosomal vesicle โดยจะมีการพับเข้าไปของส่วน clathrin – pit domain ของเยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากที่มีการเข้าสู่เซลล์ (internalization) แล้วส่วน clathrin coat จะถูกเคลื่อนย้ายออกและ vesicle จะหลอมรวมกับ endosome ความเป็นกรดจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยจะเริ่มเป็นกรดอ่อนๆก่อนเรียกช่วงนี้ว่า primary endosome และกระบวนการจะดำเนินไปจนถึงช่วง late endosome การทำให้เกิดกรดใน endosome โดยการทำงานของ H^+ ATPase การเปลี่ยนแปลงของประจุภายในถุงทำให้มีภาวะความเป็นกรดเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นการกระตุ้นการเชื่อมรวมกันระหว่างเยื่อหุ้มส่วนของไวรัสกับเยื่อหุ้ม vesicle ของเซลล์ หลังจากนั้นจะเกิดขบวนการถอดเปลือกหุ้มของอนุภาคไวรัสใน endosome เพื่อปล่อย RNPs ออกสู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์โดยอาศัยค่าความเป็นกรดขององค์ประกอบ

ต่างๆ ซึ่งตัวที่ทำให้เกิดกรด คือ acidotropic weak bases (ammonium chloride, chloroquine) ส่วน carboxylic ionophores (monesin และ nigericin) ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของค่า pH ใน endosome ซึ่งจะเป็นการขัดขวางขั้นตอนการถอดเปลือกหุ้ม (Matlin *et al.*, 1982)

สำหรับการแทรกผ่านของส่วน RNPs ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ภายใน cytosol จะมีการข้ามผ่านเยื่อหุ้มของอนุภาคไวรัสและเยื่อหุ้มของ endosome โดยการแทรกผ่านนี้จะต้องอาศัยการทำงานของ HA เป็นตัวกลางในการหลอมรวมของเยื่อหุ้มไวรัสกับเยื่อหุ้มของเซลล์ซึ่ง pH ต่ำจะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างสามมิติของ HA (hemagglutinin conformational change) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ภาพวาดจากการวิเคราะห์ข้อมูลจาก x - ray crystallography ของโครงสร้างและการเปลี่ยนแปลง conformation ของ HA₂ เมื่อ pH ลดลง โดยโครงสร้างทางซ้ายเป็นโครงสร้างของ HA₂ ใน pH ที่เป็นกลาง เมื่อ pH ลดลงจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโครงสร้างทางขวา โดย loop B จะกลายเป็น helix B ทำให้มีการเหยียดของปลาย N - terminus ของโมเลกุลออกไป

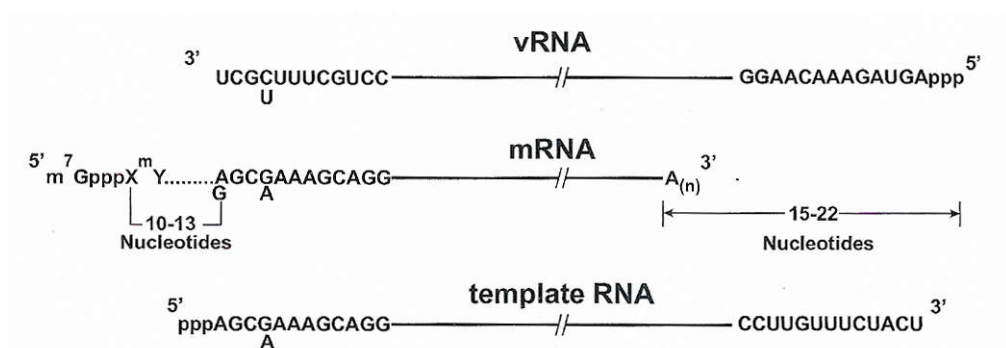
ที่มา: Lamb and Krug, 2001

ส่วนเวลาและตำแหน่งในการแทรกผ่านขึ้นอยู่กับค่า pH ที่ต่ำลง ตัวอย่างเช่นในเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคน (A/Japan/305/57) พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่

ต่ำลงจนไปเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของ HA นั้นอยู่ที่ pH 5.3 ซึ่งอยู่ในช่วง late endosome และเกิดขึ้นที่ครึ่งชีวิต 20–35 นาที หลังจากที่เชื้อไวรัสเข้าไปในเซลล์ (Stegman *et al.*, 1987)

เมื่ออนุภาคไวรัสถูก endocytose ไปแล้วจะมีการทำงานของ ion channel ที่ pH ต่ำ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน M2 (Holsinger *et al.*, 1994) โดยจะทำให้เกิดการไหลของ ion จาก endosome ไปยังในอนุภาคไวรัสเพื่อทำลายปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (protein – protein interaction) และเป็นการทำให้ RNPs เป็นอิสระจากโปรตีน M1 (Lamb *et al.*, 1994) ดังนั้นโปรตีน M2 จึงทำหน้าที่เป็น ion channel ในระหว่างกระบวนการถอดเปลือกหุ้ม

โดยเมื่อ RNPs เข้าสู่เซลล์แล้วจะเกิดการสังเคราะห์ mRNA และการ replication ของอนุภาคไวรัสต่อไป ซึ่งสายพันธุกรรมของไวรัสที่เข้าไปเป็น RNA สายลบ ดังนั้นไวรัสจึงต้องนำเอาเอนไซม์ RNA polymerase เข้ามาพร้อมกับอนุภาคไวรัสด้วย ซึ่งจะไปสร้าง RNA สายบวกที่มีลำดับ ribonucleotide ตรงข้ามกัน (complementary RNA) ซึ่งมี 2 ชนิด คือ 1) mRNA ที่มี 5' cap และ poly A tail และ 2) template RNA ที่ใช้เป็นแม่แบบของการสร้าง genomic RNA (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ภาพแสดงความแตกต่างกันระหว่าง RNA ของอนุภาคเชื้อไวรัส (vRNA), mRNA และ full-length cRNA หรือ template RNA โดย vRNA มีนิวคลีโอไทด์ 12 นิวคลีโอไทด์ ที่มีความอนุรักษ์ที่ปลาย 3' และ 13 นิวคลีโอไทด์ ที่ปลาย 5' ของ vRNA แต่ละแห่ง ส่วน mRNAs ประกอบด้วยโครงสร้าง m⁷GpppN^m cap เฉลี่ยแล้ว 10–13 นิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจาก RNAs ของเซลล์เข้าบ้านการเกิด polyadenylation ของ mRNA เกิดขึ้นบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 15–22 ก่อนถึงปลาย 5' ของแต่ละ vRNA ส่วน template RNA ประกอบด้วย 5'-terminus pppA โดย template RNA คือส่วนที่คัดลอกมาจากแห่ง vRNA โดยสมบูรณ์

ที่มา: Lamb and Krug, 2001

ในการเติม 5' cap มีกลไกที่พิเศษแตกต่างจากทั่วไป คือ เอนไซม์ polymerase จะตัดเอาส่วน 5' ของ mRNA ของเซลล์เจ้าบ้านที่มี cap ออกมาเป็นสายสั้นๆ ใช้เป็น primer สำหรับการเริ่มต้นสังเคราะห์ mRNA ของอนุภาคไวรัส โดย primer ก็คือ ชิ้นส่วนของปลาย 5' ของ RNA ของเซลล์เจ้าบ้านที่มี capped ตามด้วย RNA ซึ่งมีความยาว 10 – 13 นิวคลีโอไทด์ จากปลาย 5' ($m^7\text{GpppX}^m$ – containing RNA) ซึ่งเป็นที่อยู่ของเบส purine (Plotch *et al.*, 1981) โดยได้มาจากการ cleavage ของ RNA polymerase II transcript ของเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้น mRNA ของไวรัสจึงมี cap มาตั้งแต่เริ่มแรกไม่ต้องเติม cap เข้าไปภายหลัง หลังจากที่ได้ primer มาแล้วสาย mRNA จะถูกทำให้ยาวขึ้น (elongation) โดยการคัดลอกจะทำงานถึงจุดหนึ่งที่มี uridine residue อยู่ต่อเนื่องกัน 15 – 22 นิวคลีโอไทด์ ก่อนที่จะถึงปลาย 5' ของ vRNA ช่วงสุดท้ายของการถอดรหัสคือการเติมสาย polyadenylate residue [poly (A)] ในสาย mRNA (Hay *et al.*, 1997) โดยการสร้าง mRNA ของไวรัสทั้งหมดจะเกิดขึ้นในนิวเคลียส (Cros and Palese, 2003)

โปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาสร้างมาจากสายพันธุกรรมทั้ง 8 สาย ได้โปรตีน 8 ตัวที่ทำหน้าที่ต่างๆ มีการรวมส่วนประกอบต่างๆ ของ RNP ขึ้นมาในนิวเคลียสก่อนที่จะถูกส่งผ่านออกมาสู่ไซโตพลาสซึมโดยการทำงานของโปรตีน NS2 และ M1 ในขณะที่โปรตีนที่อยู่ตรงส่วนเยื่อหุ้มจะถูกสร้างขึ้นใน endoplasmic reticulum และผ่านออกมาทาง golgi apparatus ผู้ผิวเซลล์จากนั้น RNP ที่เคลื่อนออกมาจากนิวเคลียสก็จะมารวมกันได้ผิวเซลล์เกิด assembly และ budding ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมี HA และ NA spike แทรกอยู่

5. พยาธิวิทยาของโรคไข้หวัดใหญ่

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจซึ่งโดยทั่วไปมีลักษณะการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและเฉพาะที่ไม่พบพยาธิสภาพที่ขยายออกไปมากจะพบมีการอักเสบหรือการหลุดออกของเซลล์เยื่อทางเดินหายใจตั้งแต่ทางเดินหายใจส่วนต้นจนถึงหลอดลม โดยทางจุลกายวิภาคเชื้อไวรัสทำให้เกิดการเสื่อม (degeneration) และ การตาย (necrosis) ของเซลล์แพร่กระจายออกไปในบริเวณเยื่อหลอดลม (bronchiol) และหลอดลมฝอย (bronchiolar) (Jung *et al.*, 2005) ส่วนที่บริเวณช่อง (lumina) ของหลอดลม หลอดลมฝอย และถุงลม (alveoli) จะมีของเหลวที่ซึมออกมาจากเส้นเลือดซึ่งภายในของเหลวประกอบด้วยเซลล์ที่หลุดลอกออกมา (desquamated), neutrophils และ monocytes (Easterday and Van Reeth, 1999) โดยที่บริเวณปอดน่าจะเป็นบริเวณหลักในการจำลองสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ สามารถพบกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัส

ในบริเวณเยื่อหุ้มของหลอดลมและหลอดลมฝอย พบ pneumocytes และ macrophage บริเวณถุงลม และช่องระหว่างเนื้อปอด (interstitial) แต่การกระจายตัวของเชื้อไวรัสมีความหลากหลายในแต่ละช่วงเวลาของการติดเชื้อที่ต่างกัน ดังนั้นในช่วงต้นของการติดเชื้อจึงสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดลมและหลอดลมฝอยได้เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่ช่วงท้ายของการติดเชื้อสามารถตรวจพบ pneumocytes และ macrophage ได้เป็นส่วนใหญ่ การพบเชื้อไวรัสใช้หัดใหญ่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อ mucociliary clearance mechanism ที่แสดงบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อที่ปอดสามารถตรวจพบการที่เชื้อไวรัสทำลายซีเรียของหลอดลมฝอยและการเกิดช่องว่างขึ้นในเซลล์เยื่อหุ้มได้โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Winkler and Cheville, 1986) การทำลาย mucociliary clearance mechanism สร้างความเสียหายให้กับการทำหน้าที่ของปอดและเพิ่มความเสียหายที่เกิดจากการติดเชื้อ (Rubin, 2002) การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้อาจจะนำไปสู่การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียตัวที่ 2 ได้ ตัวอย่างเช่น PRRSV, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae* และ *P. multocida* เป็นต้น (Dungworth, 1993) การรวมกันของเชื้อก่อโรคนี้อีกกับเชื้อไวรัสใช้หัดใหญ่สุกรทำให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจที่แตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสใช้หัดใหญ่อย่างเดียวซึ่งการติดเชื้อที่ซับซ้อนจะทำให้อัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น

6. ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อใช้หัดใหญ่

กลไกการต่อต้านเชื้อไวรัสใช้หัดใหญ่ในสัตว์จะเกิดขึ้นทันทีตั้งแต่บริเวณที่ได้รับเชื้อไวรัส การติดเชื้อไวรัสใช้หัดใหญ่ในขั้นต้นเกิดขึ้นบริเวณส่วนบนของระบบทางเดินหายใจ การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่พื้นผิวเยื่อเมือกจึงถือว่าเป็นด่านป้องกันการติดเชื้อด่านแรก Secretory IgA (sIgA) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการควบคุมโรคใช้หัดใหญ่และมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเชื้อเข้าสู่ร่างกาย sIgA จะถูกขนส่งข้ามพื้นผิวเยื่อเมือก โดย IgA หนึ่งมาในรูปแบบโมเลกุล dimeric จาก plasma cell ซึ่งพบในชั้น lamina propria ที่วางตัวอยู่ใต้ชั้น basement membrane ของ surface epithelium โดย dimeric IgA จะจับกับ poly – Ig receptor บน basement surface ของ epithelial cell และถูกขนส่งจากในส่วน vesicle จาก basal ไป luminal surface ในกระบวนการที่เรียกว่า transcytosis

sIgA สามารถจับกับเชื้อไวรัสเพื่อป้องกันการเกาะติด (viral attachment) และ/หรือการหลอมรวมของไวรัส (viral fusion) ได้โดยสมบูรณ์จึงเป็นการลดโอกาสการเข้าสู่ร่างกายของเชื้อไวรัส (Armstrong and Dimmock, 1992) ทั้งในมนุษย์และหนู mice มีหลักฐานแสดงว่าการ

ตอบสนองของ sIgA ในระบบทางเดินหายใจส่วนบนเป็นกลไกสำคัญสำหรับการป้องกันต่อสู้กับการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ (Liew *et al.*, 1984) จากการศึกษาในมนุษย์เกี่ยวกับแอนติบอดีในน้ำล้างจมูก (nasal washes) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ พบว่ามี sIgA เค้นชัดหลังจากการติดเชื้อครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 (Clements *et al.*, 1986) และพบว่า sIgA ที่เยื่อเมือกมีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันการติดเชื้อ (Clements *et al.*, 1983) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าระดับของ sIgA ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการต่อต้านเชื้อไวรัส (Liew *et al.*, 1984) ในสัตว์ทดลองมีข้อมูลชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการต่อต้านการติดเชื้อไวรัสในสัตว์จะขึ้นอยู่กับระดับของ sIgA ที่อยู่ในระบบทางเดินหายใจมากกว่าในระดับของแอนติบอดีในซีรัม (Asahi *et al.*, 2002) แต่ถ้าหากเชื้อไวรัสมีการเจริญที่รุกออกไปนอกเหนือพื้นผิวเยื่อเมือกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์จะกลายเป็นส่วนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการกำจัดเชื้อไวรัส

6.1 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Cell – mediated protection in influenza infection)

วัคซีนที่กระตุ้นการต่อสู้กับการติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ เช่น ไข้หวัดใหญ่ จะกระตุ้นการสังเคราะห์และหลั่งแอนติบอดีเพื่อการป้องกันต่อสู้การติดเชื้อไวรัสโดยการทำให้อนุภาคไวรัสหมดฤทธิ์ (neutralizing) หรือขัดขวางการเข้าไปภายในเซลล์ของอนุภาคไวรัส เป้าหมายการตอบสนองทาง humoral immunity อยู่ที่โปรตีนที่ปกคลุมอยู่ด้านนอก (external coat protein) ซึ่งมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่ไป (given strain) ความคุ้มโรคโดยอาศัยการทำงานของแอนติบอดี (antibody – mediated protection) จะมีประสิทธิภาพในการต่อสู้กับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน (homologous viral strain) แต่ไม่มีความสามารถที่จะต่อสู้กับการติดเชื้อไวรัสข้ามสายพันธุ์ (heterologous viral strain) ด้วยคุณสมบัติที่เฉพาะของ coat protein ทำให้การกลายพันธุ์อย่างรวดเร็วที่บริเวณ coat protein ของไวรัสมีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีนที่มีพื้นฐานในการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ humoral ต่อเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนบนผิวอนุภาค ซึ่งอาจจะไม่มีประสิทธิภาพในการต่อสู้กับความผันแปรของเชื้อไวรัสในฤดูกาลต่อไป ในทางตรงกันข้าม T – cell ซึ่งเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระดับเซลล์จะมีเป้าหมายไปที่โปรตีนภายใน (internal protein) ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมือนกันในไวรัสสายพันธุ์ที่ต่างกัน คุณสมบัติเหล่านี้ทำให้วัคซีนที่เหนี่ยวนำการป้องกันการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระดับเซลล์มีศักยภาพในการป้องกันและต่อสู้กับสายพันธุ์ไวรัสที่ต่างกันได้

การจับกันของแอนติเจนซึ่งจำเพาะกับ T – cell receptor จะเหนี่ยวนำกลไกการตอบสนองที่บรรลุผล (effector mechanism) โดยจะไปส่งเสริมให้เซลล์ที่ติดเชื้อแตก (lysis) ทั้งทางตรงและทางอ้อม T – cell subset สามารถถูกแบ่งแยกหน้าที่โดยรวมๆ ตามความแตกต่างของโมเลกุลที่ปรากฏบนผิวอันได้แก่ CD4 และ CD8 ซึ่งเป็น coreceptor โดย CD4⁺ T – cell หรือ T helper cell (T_H) มีหน้าที่รับผิดชอบในการช่วยเหลือเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ผ่านปฏิกิริยาระหว่างเซลล์โดยตรง (direct cell – cell interaction) หรือการหลั่งของ cytokine หลังจากการจดจำเปปไทด์ของเชื้อไวรัสที่จับกับโมเลกุลของ MHC class II ส่วน cytotoxic T lymphocyte (CTLs) ซึ่งมี CD8 ปรากฏบนผิวเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ที่นำเสนอเปปไทด์แอนติเจนที่จำเพาะบน โมเลกุลของ MHC class I ซึ่งเป็นการป้องกันต่อสู้กับเชื้อก่อโรคที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular pathogen) เช่น เชื้อไวรัส

โดยหลังจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ครั้งแรกในโพรงจมูกจะเกิดการกระตุ้นการทำงานของ dendritic cell ในปอดให้เคลื่อนที่เข้าสู่วัฏเวียนน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง (draining mediastinal lymph node) ส่งผลในการกระตุ้นการทำงานของ naïve CD8⁺ T – cell ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยจะเริ่มพบการทำงานของ CD8⁺ CTL ประมาณ 3 – 4 วันหลังจากการติดเชื้อ (Lawrence and Braciale, 2004) ซึ่งจะพบพร้อมกับการลดลงของ NK cell ที่มีบทบาทสำคัญใน innate immunity ที่เกิดขึ้นก่อนหน้านี้ ความสามารถในการต่อต้านเชื้อไวรัสโดย CD8 T – cell ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเข้าไปในปอดและการติดเชื้อที่บริเวณเยื่อหุ้มทางเดินหายใจ (Cerwenka *et al.*, 1999) เชื้อไวรัสจะปรากฏในระบบทางเดินหายใจส่วนต้นในเวลา 5 – 7 วันหลังการติดเชื้อ (Lawrence *et al.*, 2005) CD8 T cells ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะหลั่ง cytokine และทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ ดังนั้นการจำลองตัวเองของเชื้อไวรัสจะถูกจำกัดเฉพาะในเซลล์เยื่อหุ้มของระบบทางเดินหายใจ การทำลายเซลล์เยื่อหุ้มที่ติดเชื้อเกิดขึ้นจากฤทธิ์ของ exocytosis granule ที่บรรจุ perforin และ granzyme การปล่อย perforin และ granzyme จะถูกควบคุมอย่างเข้มงวด โดยเกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาสั้นๆ และการหลั่งจะเกิดขึ้นบริเวณที่พบ CTLs และเซลล์เป้าหมายที่ติดเชื้อไวรัสหรือบริเวณใกล้เคียงเท่านั้น (Prendergast *et al.*, 1992) การเพิ่มจำนวนของ CTLs อย่างมีประสิทธิภาพต้องอาศัยสัญญาณความช่วยเหลือจาก CD4⁺ T – cell (Riberdy *et al.*, 2000)

ในการทำงาน CD4⁺ T – cell มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นภายหลังได้รับเชื้อไวรัส 6 – 7 วันในหนูทดลอง (Brown *et al.*, 2004) ส่วนในสุกรทดลองพบว่ามีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นภายใน 4 – 11 วัน

(Heinen *et al.*, 2001) โดย T_H จะสร้าง cytokine ที่อยู่ในกลุ่มของ T_H1 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของ effector CTLs และ B – cell ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และยังช่วยรักษาระดับการทำงานของ memory cell อีกด้วย (Kalams and walker, 1998) มีรายงานยืนยันว่า $CD4^+$ T_H มีความสำคัญต่อการสร้าง neutralizing antibody ที่จำเป็นต่อการหายจากโรคลงหลังการได้รับเชื้อไวรัส (Scherle and Gerhard, 1986) และ cytokine ที่สร้างโดย T_H อาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในปอดโดยตรงอีกด้วย (Graham and Braciale, 1997) โดย IFN gamma ออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสโดยการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ที่ติดเชื้อ กระตุ้นกระบวนการ antigen processing and presentation และกระตุ้นให้ NK cell และ macrophage ทำงานได้ดีขึ้น (Janeway, 2005)

ภายหลังการได้รับเชื้อไวรัสครั้งแรกระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์จะพัฒนา memory cell ซึ่งสามารถทำงานได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่าเดิมเมื่อถูกกระตุ้นซ้ำ นอกจากนั้นยังมี neutralizing antibody ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อและลดจำนวนของเชื้อไวรัส การตอบสนองของ CTLs ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในครั้งที่ 2 เพิ่มขึ้นภายในเวลาประมาณ 2 วัน ซึ่งรวดเร็วกว่าการตอบสนองในครั้งแรกและด้วยระดับที่สูงกว่า อย่างไรก็ตาม ภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell – mediated immunity) สามารถส่งเสริมการกำจัดไวรัสแต่ไม่ได้ทำให้เกิดภูมิคุ้มกันที่สามารถกำจัดเชื้อได้อย่างหมดสิ้น (sterile resistance) ในมนุษย์ระดับ CTLs ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เกี่ยวข้องกับอัตราของการกำจัดเชื้อไวรัสแต่ไม่เกี่ยวข้องกับความเร็วในการติดเชื้อหรือการป่วยที่เกิดขึ้นในภายหลัง (McMicheal *et al.*, 1986)

6.2 Heterosubtypic immunity

Heterosubtypic immunity คือ ภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ โดยสามารถคุ้มกันได้ในต่าง subtype ที่อยู่ใน type เดียวกัน ซึ่งภายหลังได้รับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ครั้งแรกจะมีการทำงานของ memory CTLs ภายหลังได้รับเชื้อไวรัสประมาณ 3 วัน โดย CTLs เป็นตัวสื่อกลางหลักของ heterosubtypic immunity มีการศึกษามากมายแสดงให้เห็นว่า CTLs ให้การป้องกันในหนู (Epstein *et al.*, 2000; Mozdzanowska *et al.*, 2000; Topham and Doherty, 1998) นอกจากนั้นการศึกษาก่อนหน้านี้ยังพบว่า CTLs ก็มีบทบาทในสุกรด้วยเช่นกัน (Heinen *et al.*, 2001) หลังจากการติดเชื้อ CTLs จำนวนมากสามารถจดจำ epitope ที่มีความคงที่ของ NP ในหนู โดยมี CTLs ในปอดมากกว่า 15% หลังจากการติดเชื้อครั้งแรกและมีมากกว่า 65% หลังจากการติดเชื้อครั้งที่ 2 ด้วย อาจเป็นไปได้

ว่าการเพิ่มของ Heterosubtypic immune mechanism สามารถเกิดขึ้นได้ในการติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่อยู่ใน type เดียวกันแต่ต่าง subtype

7. การตรวจวินิจฉัยไข้หวัดใหญ่ในห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยโรคการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทางห้องปฏิบัติการมีหลายแนวทาง ประกอบด้วย

7.1 การเพาะแยกเชื้อไวรัส ซึ่งถือเป็นวิธี gold standard ใช้ในการบ่งบอกชนิดของเชื้อก่อโรคที่ได้ผลภายใน 10 – 14 วัน การเพาะแยกเชื้อไวรัสในเซลล์มีความสะดวกสบายมากกว่าการใช้ไข่ไก่ฟัก เซลล์ที่ใช้ในการเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ คือ เซลล์ MDCK (Madin – Darby canine kidney cells) ซึ่งสามารถตรวจดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Cytopathic effect) ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสแต่บางครั้งเซลล์ติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการ ในการวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดใหญ่สามารถใช้ไข่ไก่ฟักแทนการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง โดยฉีดเข้าทาง amniotic cavity และ/หรือ allantoic cavity แล้วจึงอบไว้ที่อุณหภูมิ 33 – 35 °C วิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่นี้ถือเป็นงานที่ทำกันเป็นประจำแต่เป็นวิธีที่มีความยากลำบากและต้องทำหลาย passage จึงจะสามารถวินิจฉัยได้ว่าตัวอย่างนั้นๆ ให้ผลลบ ซึ่งก่อให้เกิดความล่าช้ากว่าที่จะบอกผลได้ (Palmer *et al.*, 1975) นอกจากนั้นเชื้อไวรัสอาจเกิดการเจริญเติบโตที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการอีกด้วย

7.2 การวิเคราะห์ที่หลากหลายทางซีรัมวิทยา ซึ่งใช้สำหรับการตรวจสอบแอนติบอดีที่ต่อต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เช่น การทดสอบ hemagglutination inhibition (HI), serum – virus neutralization test และ indirect fluorescent antibody test (IFA) (Esterday and Van Reeth, 1999)

7.2.1 HI การวิเคราะห์ด้วยวิธี HI ถือเป็นวิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไปมากที่สุดในห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยทางสัตวแพทย์เพื่อการตรวจสอบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และถูกพิจารณาว่าเป็นวิธีการทดสอบมาตรฐานสำหรับการค้าระหว่างประเทศ (International trade) ของสัตว์ โดย Office International des Epizootic (OIE Standards Commission, 2000) เป็นวิธีการตรวจสอบหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HA ซึ่งสามารถยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของสัตว์ปีกโดยไวรัสจากน้ำเลี้ยงเซลล์หรือ allantoic fluid การทำ HI เพื่อแยก subtype จะทำโดยใช้สายพันธุ์อ้างอิงของไวรัส (reference strain) การทดสอบด้วยวิธี HI เป็นการวิเคราะห์ทางซีรัมวิทยาซึ่งมีราคา

ไม่แพงมากนัก โดยทั่วไปการที่สัตว์มีแอนติบอดีที่ตรวจพบด้วยการทำ HI บ่งบอกถึงสถานะของภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการติดเชื้อซึ่งเป็น subtype เดียวกับที่ถูกใช้ในการทดสอบ และระดับแอนติบอดีที่ได้จากการทดสอบ HI ที่ปรากฏจะสัมพันธ์กับระดับการป้องกันการติดเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามผู้ปฏิบัติงานที่ไม่ชำนาญในการทดสอบอาจทำให้ผลของ HI คลาดเคลื่อนไม่เป็นที่น่าเชื่อถือ นอกจากนั้นการทดสอบ HI ใช้เวลานานและมีหลายขั้นตอน ต้องการการเจือจางเป็นลำดับขั้น (serial dilution) ของตัวอย่างซีรัม การเตรียม reagent การทำให้เป็นมาตรฐาน (standardization) ของเชื้อไวรัส และการอ่านเพลทที่ถูกต้อง (Rothbarth *et al.*, 1999)

7.2.2 Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ได้รับความนิยมเพื่อใช้ตรวจสอบแอนติบอดี เนื่องจากสามารถทดสอบซีรัมได้ถึง 92 ตัวอย่างต่อเพลท ในเวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมงและมี reagent ที่พร้อมใช้งาน ยกเว้นน้ำยาล้าง (wash solution) ที่ต้องเตรียมโดยการเจือจางด้วย distilled/deionized water ให้มีความเข้มข้น 1: 10 โดยการทำให้ ELISA ต้องการเพียงการเจือจางซีรัมหนึ่งครั้งเท่านั้น (1: 40) ค่า optical density ในหลุมจะถูกวัดประเมินค่าและคำนวณผลอัตโนมัติโดยใช้ commercial software จากการทดลองของ Skibbe *et al.* (2004) ทำการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบ indirect ELISA เฉพาะต่อไข้หวัดใหญ่ subtype H1N1 ที่มีใช้ทางการค้า กับวิธี HI พบว่า วิธี ELISA ใช้ประโยชน์ได้ดีในการตรวจทางซีรัมวิทยาแบบ screening ที่ระดับฝูงสัตว์เพื่อหาแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสที่แยกได้ในปัจจุบันและหมุนเวียนอยู่ จำเป็นต้องใช้การทดสอบทั้งวิธี HI และ ELISA ร่วมกันเพื่อเพิ่มความถูกต้องในการวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

7.3 Indirect immunofluorescent assay (IFA) การตรวจวิเคราะห์หาแอนติเจนในเซลล์ที่ติดเชื้อจากสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี IFA เป็นการตรวจหาแอนติเจนในเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยวิธีย้อมดูการเรืองแสง โดยสามารถทราบผลการทดสอบได้ภายใน 2 – 3 ชั่วโมง ซึ่งแอนติบอดีทุติยภูมิจะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง การอ่านผลของปฏิกิริยาจะใช้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) ดูการเรืองแสงภายในเซลล์ อาจพบการเรืองแสงในนิวเคลียสหรือไซโตพลาสซึม โดยวิธี IFA จะมีความไวมากกว่า direct immunofluorescent assay (DFA) เนื่องจาก DFA ย้อมเพียงขั้นตอนเดียว อีกทางเลือกหนึ่งในการยืนยันการปรากฏของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในเนื้อเยื่อ คือ การใช้เทคนิค immunohistochemistry วิธีการตรวจสอบวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถทำให้สำเร็จลุล่วงได้ภายในเวลา 1 วัน การหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสจะทำโดยใช้ frozen tissue section และแอนติบอดีจะถูกติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) การทดสอบนี้ก็มีข้อเสียซึ่งต้องใช้กล้อง

จุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent microscope) ในการตรวจวินิจฉัยและไม่สามารถทำการย้อมสี 2 ครั้ง (counterstain) ซึ่งทำให้ไม่สามารถทำการตรวจสอบและประเมินค่าทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ (histological) ได้ แต่ข้อเสียเหล่านี้สามารถถูกปรับปรุงได้เมื่อมีการติดฉลาก secondary antibody ด้วยเอนไซม์ เช่น peroxidase ซึ่งสามารถย้อมด้วยสี hematoxylin และสามารถดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาได้ โดยการย้อมสีทาง immunohistochemistry สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเป็นสิ่งที่สะดวกถ้าสามารถใช้กับ formalin – fixed paraffin embedded tissue ได้ (Haines and Clark, 1991) โดย formalin เป็นสาร fixative ที่ใช้ในงานประจำทางการตรวจสอบทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ นอกจากนั้นในการส่งสิ่งส่งตรวจ (fresh specimen) สามารถขนส่งโดยไม่ต้องรีบเร่งได้และไม่ต้องกังวลเรื่องอุณหภูมิแวดล้อมอีกด้วย

7.4 Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (RT – PCR) การตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT – PCR จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจหรือจากการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส เป็นวิธีใช้สนับสนุนและยืนยันการติดเชื้อ นอกจากนั้นยังสามารถแบ่ง subtype ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยการใส่ primer ที่เหมาะสม จากการทดลองของ Choi *et al.* (2002) ได้มีการพัฒนาใช้วิธี two multiplex RT – PCR เพื่อให้สามารถ identify และแบ่ง subtype ของเชื้อชนิด H1 หรือ H3 และ N1 หรือ N2 โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก ซึ่งวิธีนี้จะใช้ oligonucleotide primer 2 ชุด ที่เหมาะสมกับสายพันธุกรรม HA ซึ่งใช้เพิ่มจำนวนส่วนของสารพันธุกรรมชนิด H1 (H1F/H1R) และ H3 (H3F/H3R) และใช้ primer อีก 2 ชุดที่ใช้เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม NA แบ่งเป็น N1 (N1F/N1R) และ N2 (N2F/N2R) ซึ่ง primer ที่ออกแบบใช้ข้อมูลของ DNA จากฐานข้อมูล Genbank พบว่าผลของ two multiplex RT – PCR ให้ผลตรงกับผลบวกที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อไวรัส 100% นอกจากนั้นยังสามารถแบ่งแยก subtype ของเชื้อไวรัสและเป็นวิธีที่ถือว่ามีความจำเพาะสูงอีกด้วย

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น

1. ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้ตั้งแต่ระยะฟักตัว ซึ่งระยะที่มีอาการปรากฏเป็นระยะที่พบเชื้อได้สูงสุด ดังนั้นจึงควรเก็บตัวอย่างภายใน 3 วันหลังมีอาการของโรค หลังจากนั้นเชื้อจะค่อยๆ ลดจำนวนลงในระยะเวลาต่อมา
2. คุณภาพของตัวอย่าง โดยหลังจากการเก็บตัวอย่างแล้ว ควรแช่ใน viral transport media ซึ่งมีส่วนประกอบของ isotonic salt, โปรตีนจากซีรัม, pH เป็นกลาง (~ 7.2) และมียา

ปฏิชีวนะในน้ำยาเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียและรา ขณะนำส่งควรแช่เย็นและควรส่งทันทีหลังการเก็บตัวอย่าง

3. ความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

8. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร คือ เชื้อไวรัสที่ติดในเซลล์เยื่อ (epithelial cell) ของระบบทางเดินหายใจและปอดของสุกร การติดเชื้อของเซลล์เหล่านี้โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทำให้เกิดการตายและความเสียหายของเซลล์ อย่างไรก็ตามเซลล์เหล่านี้สามารถเกิดขึ้นทดแทนได้ใหม่อย่างรวดเร็วถ้าไม่มีการติดเชื้อแทรกซ้อนในอวัยวะอื่นร่วมด้วย เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจะถูกกำจัดได้อย่างรวดเร็วในระบบทางเดินหายใจ (Thacker, 2001) โดยทั่วไปเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรก่อให้เกิดอัตราการตายน้อยกว่า 5% (Kida *et al.*, 1994) พบว่าเชื้อไวรัสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและมีการแพร่กระจายกว้างขึ้นก่อให้เกิดการตายของส่วนเยื่อในบริเวณหลอดลมใหญ่และหลอดลมฝอย ส่วนบริเวณช่องของหลอดลมใหญ่ หลอดลมฝอยและถุงลมจะเต็มไปด้วยของเหลวที่ซึมออกมาประกอบด้วยชิ้นส่วนเล็กๆของเซลล์ (desquamate cell) neutrophils และ monocytes (Brown *et al.*, 1993) โดยสามารถตรวจพบ RNA และแอนติเจนของเชื้อไวรัส SIV ได้ในเซลล์ส่วนต้นของเยื่อของหลอดลมใหญ่และหลอดลมฝอยซึ่งมี sialyoligosaccharide สำหรับจับกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

นอกจากนี้ยังมีการทดลองศึกษากลไกการก่อโรคด้วยวิธี *In situ* hybridization และ immunohistochemistry ซึ่งชี้ให้เห็นว่าบริเวณหลักของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรอยู่ที่ส่วนเยื่อของหลอดลมใหญ่และหลอดลมฝอย การติดเชื้อที่เยื่อเมือกส่วนปลายของระบบทางเดินหายใจสุกรมีความสำคัญในเบื้องต้นสามารถพัฒนาให้เกิดโรคปอดอักเสบ (pneumonia) โดยเชื้อไวรัสที่เข้าไปจะไปทำลาย macrophage ในปอด ซึ่งการทำลายเหล่านี้คือผลกระทบการก่อโรคโดยตรงของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้ในปอดของเจ้าบ้านเป็นกลไกการป้องกันตัวเองและจะนำไปสู่การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียแทรกซ้อน โดยมักจะพบร่วมกับเชื้อไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ เช่น porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine respiratory coronavirus (PRCV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus spp.* และ *Pasteurella multocida* (Easterday *et al.*, 1999) การติดเชื้อร่วมกันของ pathogen เหล่านี้กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจที่รุนแรงเพิ่มมากขึ้นและมีอัตราการตายที่

สูงขึ้นด้วยเมื่อเทียบกับการติดเชื้อแบบไม่ซับซ้อน เช่นกรณีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเพียงอย่างเดียว

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่ก่อให้เกิดโรคในสุกรของแต่ละประเทศพบเพียง 3 subtypes คือ H1N1, H1N2 และ H3N2 (Olsen, 2002)

8.1 วิวัฒนาการของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรถูกสังเกตพบครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาปี ค.ศ. 1918 ฮังการี และจีน (Chun, 1919; Koen, 1919; Beveridge, 1977) ซึ่งตรงกับการระบาดครั้งใหญ่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์ซึ่งมีความรุนแรงมากโดยทำให้ผู้คนเสียชีวิตกว่า 20 ล้านคนทั่วโลก โดยก่อนปี ค.ศ. 1968 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ที่ถูกแยกจากสุกรพบว่าเชื้อไวรัสมี surface glycoprotein ซึ่งจัดอยู่ในสายพันธุ์ H1N1 หลังจากการเกิด antigenic shift ในปี ค.ศ. 1968 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากสุกรในเอเชียเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 (Kundin, 1970; Shortridge *et al.*, 1977) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 สายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถพบได้ในยุโรปซึ่งมีรายงานตั้งแต่ปี ค.ศ. 1941 – 1950 และหายไปนานถึง 20 ปี จากนั้นพบครั้งสุดท้ายที่อิตาลี ในปี ค.ศ. 1976 (Brown *et al.*, 2000) ในปี ค.ศ. 1978 ถึง 1979 มีรายงานเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทางตอนเหนือของยุโรปอีกครั้ง โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ซึ่งมี HA ที่คล้ายคลึงกับ H1 ของสัตว์ปีกและมีความแตกต่างอย่างชัดเจนจาก H1 glycoprotein ของมนุษย์และสุกรดั้งเดิม (Scholtissek *et al.*, 1983; Hinshaw *et al.*, 1984) ดังนั้นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรมี HA ที่แตกต่างกันถึง 3 แบบหมุนเวียนแพร่กระจายอยู่ คือ classical H1, avian – like H1 และ human – like H3

Spanish Flu ในปี ค.ศ. 1918/19 และไข้หวัดใหญ่สุกรมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันหรือมีบรรพบุรุษร่วมกัน ซึ่งเชื่อนั้นคงอยู่เป็นเวลายาวนานในสุกร การศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (genetic sequencing) ของสายพันธุ์กรรม HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์คาดว่าไวรัสน่าจะแพร่กระจายจากมนุษย์สู่สุกรเป็นส่วนใหญ่และสิ่งเหล่านี้ได้รับการสนับสนุนเนื่องจากการกล่าวถึงโรคนี้ในสุกรจากสัตวแพทย์ จนกระทั่งหลังจากที่มันปรากฏในมนุษย์ ถึงแม้ว่าโรคในสุกรจะมีการกล่าวถึงในระหว่างปีถัดๆมา (Dorset *et al.*, 1922; McBryde, 1927) แต่ไม่ได้ถูกอธิบายว่าเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จนกระทั่งปี ค.ศ. 1930 ที่สามารถเพาะแยกเชื้อและเสนอว่าน่าจะเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Shop, 1931) โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

สุกรตัวแรกที่เพาะแยกได้คือ A/SW/IA/15/30 ที่มีลักษณะทางแอนติเจนคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์ในปี ค.ศ. 1918 นอกจากนั้นมีการเสนอแนะว่าการเกิด strong selection pressure อาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนสายพันธุกรรม NP ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ดั้งเดิม (classical swine virus) ที่แยกได้ในปี ค.ศ. 1931 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรซึ่งได้รับสายพันธุกรรมจากสัตว์ปีกโดยเกิดจากการผสมรวม (reassortment) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1918 (Gammelín *et al.*, 1989) หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1920 คาดการณ์ได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์เริ่มเข้าสู่ประชากรสุกรซึ่งเกิดจาก human – specific selection pressure โดยในเวลานั้นเป็นช่วงที่เชื้อไวรัสมีวิวัฒนาการที่เหมาะสม

สุกรมีลักษณะพิเศษในตัวคือ ค่อนข้างจะมีความทนทานต่อการติดเชื้อ โดยเชื้อไวรัสในสัตว์ปีกและเชื้อไวรัสมนุษย์ (เกิดการติดเชื้อขึ้นเป็นครั้งคราว) โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมีความจำเพาะต่อ sialyl α 2,6 – galactose oligosaccharide side chain ซึ่งเป็นตัวรับบน cell surface ของเจ้าบ้าน (Roger *et al.*, 1983) นอกจากนั้นเซลล์ของสุกรยังมี sialyl α 2,3 – galactose – linkage ที่เป็นตัวรับสำหรับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกอีกด้วย มีหลักฐานทางการทดลองและหลักฐานทางระบาดวิทยาแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดสัตว์ปีกในหลากหลายสายพันธุ์สามารถจำลองตัวเองในสุกรได้ (Guan *et al.*, 1996) ดังนั้นสุกรจึงได้รับความสนใจในแง่ที่เป็นตัวกลางในการผสมรวมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดต่างๆ (mixing vessels) สำหรับการสร้างเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ๆที่สามารถทำให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ได้ (Scholtissek, 1985)

8.2 การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในภูมิภาคต่างๆของโลก

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร subtype ที่พบกว้างขวางทั่วโลกมี 3 subtype ได้แก่ H1N1, H3N2 และ H1N2 (Olsen *et al.*, 2002) ในยุโรปเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 เป็นเชื้อสายพันธุ์แรกที่แพร่ระบาดบนแผ่นดินยุโรปอย่างรวดเร็ว ในปี ค.ศ. 1979 (Pensaert *et al.*, 1981) โดยสายพันธุกรรมทั้ง 8 แห่งของเชื้อไวรัสที่แยกได้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกับเชื้อ H1N1 ของเป็ดป่า ส่วนเชื้อไวรัส H3N2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสในมนุษย์ปี ค.ศ. 1968 (Hong Kong virus) ที่ข้ามสายพันธุ์ไปสู่สุกรรอบๆยุโรปและเอเชีย โดยสามารถแยกเชื้อไวรัสได้ครั้งแรกในเอเชียปี ค.ศ. 1970 (Brown, 2000) จากนั้นเชื้อไวรัส H3N2 ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากปี ค.ศ. 1985 ถึงปัจจุบันเกิดจากการผสมรวมกันระหว่างเชื้อไวรัสที่มีสายพันธุกรรมคล้ายคลึงกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคน (human – like virus) และไวรัสที่มีสายพันธุกรรมคล้ายคลึงกับไวรัสไข้หวัดนก (avian –

like virus) (Castrucci *et al.*, 1993) เชื้อ H1N2 ถูกพบครั้งแรกในการระบาดของโรกระบบทางเดินหายใจในสุกรแถบเกาะอังกฤษ ในปี ค.ศ. 1994 (Brown *et al.*, 1995) ต่อมามีการแพร่ไปยังประเทศต่างๆของยุโรป (Marozin *et al.*, 2002) โดยเชื้อ H1N2 ที่ปรากฏมีส่วนประกอบของสายพันธุกรรมที่เกิดจากการผสมรวมกันถึง 2 ครั้ง (double reassortant) จากไวรัส 3 ตัว คือ HA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคนชนิด H1N1, NA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (H3N2) และสายพันธุกรรมที่บรรจุนิวคลีโอโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่ HA และ NA จากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (H1N1) ซึ่งมีสายพันธุกรรมทั้ง 8 แห่ง คล้ายคลึงกับไวรัสไข้หวัดนก (avian – like swine H1N1 virus) (Marozin *et al.*, 2002)

ในอเมริกาเหนือพบว่าเชื้อไวรัส H1N1 เป็นเชื้อสายของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรดั้งเดิมซึ่งลักษณะทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคน (H1N1) ที่ทำให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ในปี ค.ศ. 1918 (Spanish influenza pandemic) (Reid *et al.*, 1999) โดยมีการวิจัยของ Sheerar *et al.* (1989) แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ดั้งเดิมที่แยกได้ในอเมริกานั้นยังคงรักษาลักษณะความเป็นแอนติเจนและลักษณะทางพันธุกรรมไว้ดั้งเดิมจากปี ค.ศ. 1965 จนกระทั่งถึงปี ค.ศ. 1980 ในช่วงปี ค.ศ. 1998 ในเดือนพฤศจิกายน ถึง ธันวาคม พบว่าเกิดการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (H3N2) ในสุกรแถบ Minnesota, Iowa, Texas และ North Carolina ของสหรัฐอเมริกา โดยเชื้อไวรัสที่แยกได้จาก North Carolina ประกอบด้วยสายพันธุกรรม HA, NA และ PB1 ที่เหมือนกับเชื้อไวรัสในคน ส่วนสายพันธุกรรม NS, NP, M, PB2 และ PA เหมือนกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ดั้งเดิมในเวลาใกล้เคียงกันกับที่มีรายงานมีการพบเชื้อไวรัสที่แยกได้จาก Minnesota, Iowa และ Texas ประกอบด้วยสายพันธุกรรม HA, NA และ PB1 ที่ได้มาจากมนุษย์ NS, NP และ M จากสุกร และ PB2 และ PA จากสัตว์ปีก (Zhou *et al.*, 1999) ในเดือนพฤศจิกายนปี ค.ศ. 1999 เกิดการระบาดของโรกระบบทางเดินหายใจซึ่งทำให้เกิดการแท้งในแม่สุกรใน Indiana จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HI และ NI และการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมระบุว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 โดยได้ยีน NA, PB1, M, NS, PA และ PB2 มาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (H3N2) ตามที่กล่าวข้างต้น และยีน HA (H1) ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ HA จากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ดั้งเดิมที่แยกได้ในปี ค.ศ. 1997 – 1998 (Karasin *et al.*, 2002)

ในเอเชียพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในสุกรเป็นส่วนใหญ่ (Guan *et al.*, 1996) ส่วนเชื้อไวรัส H3N2 นั้น พบว่าสามารถแยกได้เช่นกันในประเทศต่างๆในเอเชีย อาทิเช่น ญี่ปุ่น (Ito *et al.*, 1998b) จีน (Yu *et al.*, 2007) และ เกาหลี (Jung

and Chae, 2004) เป็นต้น การหมุนเวียนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศต่างๆ แถบเอเชีย ได้แก่ ในญี่ปุ่นสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้ครั้งแรกปี ค.ศ. 1978 และพบอีกครั้งปี ค.ศ. 1980 โดยพบว่าเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่เกิดจากการผสมรวมกัน (reassortant H1N2 swine viruses) ซึ่งประกอบด้วย HA มาจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ดั้งเดิมของสุกร และ NA มาจากเชื้อไวรัส H3N2 ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสในมนุษย์ (human – like H3N2 virus) ในปี ค.ศ. 1991 และ ค.ศ. 1992 พบเชื้อไวรัส H1N2 ซึ่งถูกแยกได้จากปอดของสุกรที่แสดงลักษณะอาการของโรกระบบทางเดินหายใจจากฟาร์มใน Chiba และ Kanagawa ซึ่งเป็นเขตปกครองในญี่ปุ่น เชื้อไวรัสที่เพาะแยกได้ถูกนำไปวิเคราะห์ทาง phylogenetic เพื่อวิเคราะห์หาต้นกำเนิดของสายพันธุ์ในบางส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์กรรมเหล่านั้นผลชี้ชัดว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ NA มาจากเชื้อไข้หวัดใหญ่มนุษย์ (human influenza virus) ส่วนสายพันธุ์กรรมอื่นๆ อีก 7 แห่ง มาจาก เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ถูกเพาะแยกได้ครั้งแรกในปี 1980 และกลายเป็นสายพันธุ์ที่คงอยู่ในประชากรสุกรของญี่ปุ่นตลอดมา (Ito *et al.*, 1998b) ในประเทศเกาหลีพบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัส H1N2 จากสุกรได้ในช่วงที่มีการระบาดครั้งใหญ่ของโรกระบบทางเดินหายใจอย่างรุนแรงในฝูงสุกรเกาหลีปี ค.ศ. 2003 โดยพบว่า NA, PB1 เป็นของเชื้อ H1N2 ที่มีต้นกำเนิดมาจากมนุษย์ ขณะที่ HA, M, NP และ NS มีต้นกำเนิดมาจากสุกร ส่วน PA และ PB2 มีต้นกำเนิดมาจากสัตว์ปีก ผลทาง phylogenetic ชี้ชัดว่าเชื้อ H1N2 ในเกาหลีที่แยกได้มานั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อไวรัส H1N2 ที่เพาะแยกได้เมื่อเร็ว ๆ นี้จากสุกรในสหรัฐอเมริกา (Jung and Chae, 2004)

ในจีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งทางตอนใต้ของประเทศจีนได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นศูนย์กลางการระบาดครั้งใหญ่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตลอดมา ในอดีตเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จำนวนหนึ่งเคยถูกเพาะแยกได้จากสุกรในประเทศจีน เชื้อที่พบเป็นสายพันธุ์หลักๆ ได้แก่ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อไวรัสสุกรที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสในสัตว์ปีก (Classical และ avian – like swine H1N1 viruses), เชื้อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส A/Hong Kong/2/68 (A/HK/2/68), A/Victoria/3/75 และ A/Sydney/5/96, เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H9N2 ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสในสัตว์ปีก (avian – like swine H9N2 viruses) และ เชื้อไวรัส H1N1 ที่มีการผสมรวมกัน 2 ครั้ง (double reassortant H1N1 viruses) ซึ่งบรรจุสายพันธุ์กรรมที่คล้ายกับเชื้อไวรัสของมนุษย์และสุกร (Shortridge and Webster, 1979) ในปี 2005 – 2006 ได้มีการเฝ้าระวังเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ใน 8 จังหวัดของประทศจีนพบเชื้อไวรัส H1N2 ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์ (human – like influenza H1N2

virus) จากสุกรในจังหวัดกวางตุ้งทางตอนใต้ของประเทศจีน นอกจากนี้ยังพบเชื้อไวรัส H3N2 ที่ถูกแยกได้อีก 4 ตัว ซึ่ง 3 ตัวมาจากจังหวัด กวางตุ้ง และอีก 1 ตัวมาจากจังหวัดไฮลองเจียน ส่วนในประเทศไทยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H3N2 (A/swine/Bangkok/9/78) จากสุกรที่ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ในเดือนพฤศจิกายน ปี ค.ศ. 1978 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันอย่างมากกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร subtype H3N2 ที่มาจากมนุษย์ในระยะเวลาเดียวกัน (Nerome *et al.*, 1983) ส่วนการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร subtype H1N1 มีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1991 (Kupradinun *et al.*, 1991) จากการศึกษาโดยสุจิราและคณะ (2548) พบว่าสุกรในประเทศไทยมีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่น้อย 2 subtype คือ H1N1 และ H3N2 จากการตรวจทางซีรัมวิทยา ซึ่งในการศึกษาของสุจิราและคณะ (2548) ได้ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในไข่ไก่ฟักและพบผลบวกเฉพาะ subtype H1N1 นอกจากนี้ยังพบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเอเชียอีกมากมายหลายประเทศ อาทิเช่น ฮองกง (Yip, 1976) อินเดีย (Das *et al.*, 1981) และไต้หวัน (Shortridge and Webster, 1979) เป็นต้น

8.3 การถ่ายทอดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร

สุกรเป็นตัวกักโรคหลักๆ ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 และพบว่าสุกรเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดระหว่างสปีชีส์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่อยู่บ่อยครั้ง การคงอยู่ของเชื้อไวรัสเหล่านี้ในสุกรเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดไวรัสชนิดใหม่ๆ ที่สามารถก่อให้เกิดสายพันธุ์ที่การระบาดครั้งใหญ่ในมนุษย์ได้ (Brown, 2000) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีการถ่ายตอในเบื้องต้นจากสุกรสู่สุกรทางจมูกและคอ (nasopharyngeal) โดยสิ่งคัดหลั่งในจมูกจะมีเชื้อไวรัสในระยะที่สุกรเป็นไข้แบบเฉียบพลัน (acute febrile) (Carol, 1996)

8.4 ลักษณะอาการทางคลินิกของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร

อาการทางคลินิกของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจะเหมือนกับอาการของไข้หวัดทั่วไป โดยสุกรจะมีไข้ (40.50 °C – 41.70°C) พบสิ่งคัดหลั่งในจมูกและตาและมีการไอแบบรุนแรงฉับพลัน มีไข้ อาการเซื่องซึม อ่อนเพลีย หายใจลำบาก ไอเสียงดัง นอนคว่ำ (prostration) (Easterday and Hinshaw, 1992) (ภาพที่ 10) ต่อมาน้ำหนักจะลดลง เนื่องจากสุกรอาจจะเบื่ออาหารเป็นเวลายาวนานถึง 1 – 2 สัปดาห์ ก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจก่อให้เกิดความลำบากกับผู้เลี้ยงสุกรเพราะต้องใช้เวลาในการเลี้ยงยาวนานขึ้น การส่งขายช้าลง (Jake, 1998) พบว่าโรคนี้อมี

อัตราการป่วยสูงแต่อัตราการตายต่ำหากไม่มีการติดเชื้อซ้ำซ้อน สุกรสามารถฟื้นตัวจากไข้ได้อย่างรวดเร็วภายใน 2 – 6 วัน หากไม่มีการติดเชื้อซ้ำซ้อน โดยโรคนี้อาจเกิดในช่วงฤดูฝนและหนาวแต่ในปัจจุบันพบว่าเกิดได้ตลอดทั้งปี การแพร่กระจายของเชื้อจากสุกรสู่สุกรผ่านทางสิ่งคัดหลั่งจากบริเวณจมูกและคอ สัตว์ที่เป็นพาหะจะเป็นตัวยินยอมให้เชื้อคงอยู่ในฝูง พบได้บ่อยมากในลูกสุกรจนถึงช่วงอายุของสุกร



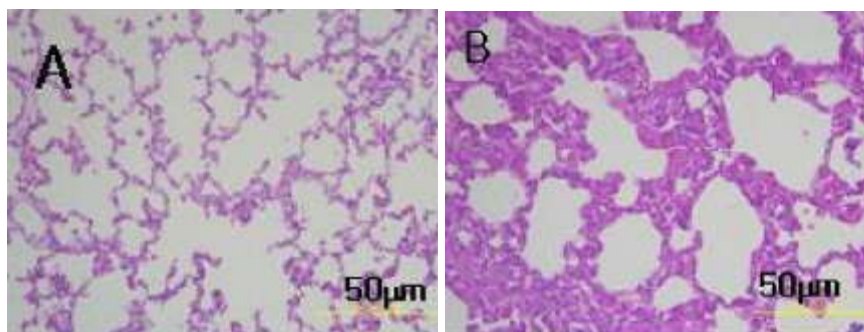
ภาพที่ 10 ภาพแสดงลักษณะทางกายวิภาคของสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยมีลักษณะอาการ คือ มีไข้ เชื่องซึม อ่อนเพลีย หายใจลำบาก ไอเสียงดัง และนอนคว่ำ

ที่มา: โชคชัยและคณะ, 2549

8.5 การก่อโรคและพยาธิวิทยาของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร

คาดการณ์ว่าการหมุนเวียนของเชื้อในฝูงสุกรเกิดขึ้นโดยผ่านลูกสัตว์ที่มีความไวต่อการติดเชื้อ ระยะเวลาการฟักตัวของเชื้อไวรัสอยู่ในช่วง 1 – 3 วัน เชื้อไวรัสจะถูกสูดเข้าไปในปอดและสะสมไว้บริเวณผิวของระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง โดยปัญหาหลักที่มีความสำคัญของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรคือก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจทำให้การเจริญเติบโตของสุกรเป็นไปอย่างไม่สม่ำเสมอและระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น โดยสุกรจะสูญเสียน้ำหนักตัว (body weight) ประมาณ 5 – 12 ปอนด์ ติดต่อกัน 3 – 4 สัปดาห์

โดยทั่วไปการติดเชื้อแบบไม่ซับซ้อนมีโอกาสพบใน cranial ventral lung lobe โดยสามารถแยกแยะระหว่างปอดปกติกับปอดที่มีวิธีการได้ พื้นที่ที่ติดเชื้อนั้นจะเป็นสีม่วงและแข็งอาจมีการบวมน้ำระหว่าง lobe ด้วย ทางเดินอากาศ (airway) เต็มไปด้วยเส้นใยเลือดสีจางๆไหลซึมออกมาบริเวณหลอดเลือดและ mediastinal lymph node ขยายใหญ่ขึ้น ในกรณีที่เป็นรุนแรงจะทำให้เกิดเชื้อหุ้มปอดอักเสบชนิดมีไฟบริน (fibrinous pleuritis) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าทางเดินอากาศเต็มไปด้วยสิ่งคัดหลั่ง (ภาพที่ 11) ปอดแฟบ ปอดอักเสบและถุงลมโป่งพอง โดยเชื้อไวรัสจะเกาะติดกับซีเรียและการจำลองตัวของไวรัส (viral replication) เริ่มต้นที่บริเวณเยื่อบุผิวของโพรงจมูกและหลอดลม หลังจาก inoculation 2 ชั่วโมง การติดเชื้อจะแพร่กระจายไปในหลอดลมและหลอดลมฝอย เมื่อผ่านไป 8 ชั่วโมง ซีเรียบริเวณนี้จะถูกทำลายเสียหาย มีการทำลายเซลล์เยื่อบุผิวและเมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง เยื่อบุทางเดินหายใจเกิดเนื้อตายและลอกหลุด (sloughing) เกิดการเคลื่อนย้าย leukocyte เข้าไปในช่องทางเดินหายใจ (airway lumen) และปอดแฟบ



ภาพที่ 11 ภาพแสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคจากเนื้อเยื่อปอดที่ถูกย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) (400X) ของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Swine/Korea/55/05 (H1N2) โดยภาพ 11A คือ เนื้อเยื่อปอดปกติของสุกรที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส ภาพ 11B คือ เนื้อเยื่อปอดของสุกรที่ติดเชื้อไวรัสในวันที่ 3 หลังได้รับเชื้อไวรัส

ที่มา: Jo *et al.*, 2007

8.6 การวินิจฉัยเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกร

การวินิจฉัยอยู่บนพื้นฐานลักษณะอาการทางคลินิก ประกอบด้วย การแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) การยืนยันวิการด้วยวิธีการทางพยาธิวิทยาทางเนื้อเยื่อ (Histopathology) การตรวจทางซีรัมวิทยาและการตรวจสอบแอนติเจน

โดยทั่วไปการวินิจฉัยอาศัยพื้นฐานทางซีรัมวิทยา เช่น การวิเคราะห์ด้วยวิธี HI ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ทั่วไปเป็นส่วนใหญ่และรวดเร็วในห้องปฏิบัติการทางสัตววิทยาเพื่อตรวจสอบซีรัมของสุกรต่อเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกร (Skibbe *et al.*, 2004) หรือการตรวจสอบเนื้อเยื่อปอดผ่านวิธีการทาง immunohistochemistry ขณะที่การแยกเชื้อไวรัสสามารถกระทำได้โดยต้องเก็บตัวอย่างในเบื้องต้นของการติดเชื้อ คือ หลังจากการที่ติดเชื้อครั้งแรก 7 วัน การตรวจด้วยวิธี RT - PCR ในการตรวจสอบวินิจฉัยโรคก็มีใช้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (Choi *et al.*, 2002)

8.7 การควบคุมรักษาโรคไวรัสไขหวัดใหญ่สุกร (Carol, 1997)

ทางที่ดีที่สุดในการจัดการกับเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร คือ การป้องกันการเกิดและแพร่ระบาดของโรค โดยจำกัดการเคลื่อนย้ายในฝูงสัตว์ พยายามหลีกเลี่ยงการซื้อสัตว์ใหม่มาเพิ่มในฝูง และหลีกเลี่ยงการนำสัตว์มาแสดงในที่ซึ่งสัตว์สามารถสัมผัสกับสัตว์อื่นๆ ถ้ามีการเพิ่มสัตว์ฝูงใหม่เข้าไปในฝูงก็ต้องแยกให้แน่ใจก่อนว่าสัตว์นั้นไม่มีความผิดปกติใดๆ โดยสร้างพื้นที่สำหรับกักสัตว์ไว้

การรักษาในขั้นแรก คือ จะต้องจัดการกับสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยให้แห้ง สะอาด และปราศจากฝุ่นละออง ลดเศษขยะในโรงเรือน หลีกเลี่ยงความเครียดใดๆ ที่อาจเกิดขึ้นกับสัตว์ เช่น ไม่เคลื่อนย้ายสัตว์หรือนำสัตว์จากต่างคอกเข้ามารวมกัน การใช้ยาปฏิชีวนะมีความจำเป็นต่อการติดเชื้อแบคทีเรียตัวแทรกซ้อนซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เสมอ

การประเมินค่าทางสาธารณสุขสูงขึ้นพื้นฐานจะสามารถช่วยป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสสามารถทำให้อ่อนกำลังได้โดยสบู ความร้อน และ formalin การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคบริเวณรถบรรทุก รถพ่วงและเครื่องมือต่างๆ เป็นสิ่งที่ทำให้แน่ใจ

ได้ว่าจะไม่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อ ถ้ากลุ่มของสุกรที่ส่งมามีเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจะต้องทำความสะอาดและฆ่าเชื้อในโรงเรือนให้แน่ใจก่อนจะเลี้ยงสุกรรุ่นต่อไป

8.8 บทบาทของภูมิคุ้มกันจากแม่สุกรสู่ลูกสุกร

การศึกษาช่วงต้นทศวรรษ 70 แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ได้รับมาจากแม่ (maternally derived antibodies: MDA) สามารถป้องกันการแสดงอาการทางคลินิกของโรคหลังจากการติดเชื้อไวรัสได้ (Blaskovic *et al.*, 1970) ถึงแม้ว่าการศึกษาอื่นๆ จะพบว่า MDA ไม่สามารถป้องกันโรคได้ (Mensik and Pokorny, 1971) หรือระดับการป้องกันขึ้นอยู่กับระดับของ MDA (Renshaw *et al.*, 1975) ข้อขัดแย้งเหล่านี้ อาจเกิดมาจากความแตกต่างในระดับของ MDA ที่ช่วงอายุของลูกขณะที่มีการติดเชื้อ หรือสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ก็อาจจะมีผลกระทบในการศึกษาเหล่านี้ แต่ในงานวิจัยที่ผ่านมา มีความเห็นที่ตรงกันเกี่ยวกับความจริงของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ซึ่งเกี่ยวข้องกับ MDA ที่ว่าการได้รับ MDA ไม่ได้เป็นสาเหตุของการเพิ่มระดับแอนติบอดี (Blaskovic *et al.*, 1970; Mensik and Pokorny, 1971; Mensik *et al.*, 1971; Renshaw *et al.*, 1975) จากการทดลองเพื่อตัดสินบทบาทของ MDA ที่ต่อสู้กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ในการป้องกันอาการทางคลินิกในลูกสุกรและผลกระทบของ MDA ในการพัฒนาของ active immunity (Loeffen *et al.*, 2003) พบว่าลูกสุกรที่มี MDA มีภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันอาการทางคลินิกของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในครั้งแรกได้แต่การป้องกันเหล่านี้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากพบว่า อณูภูมิร่างกายของลูกสุกรสูงขึ้นในช่วงสั้นๆ และการเจริญของลูกสุกรดูเหมือนจะถูกยับยั้งเนื่องจากการติดเชื้อ ในลูกสุกรที่ได้รับ MDA จะยับเชื้อไวรัสเป็นระยะเวลายาวนานหลังจากการติดเชื้อมากกว่าลูกสุกรที่ไม่มี MDA นอกจากนี้ในลูกสุกรที่มีและไม่มี MDA จะมีภูมิคุ้มกันโรคที่สามารถป้องกันกับอาการทางคลินิกหลังจากการติดเชื้อครั้งที่ 2 ได้ ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการตอบสนองภูมิคุ้มกันหลังจากการติดเชื้อครั้งที่ 1 และ 2 ซึ่งให้เห็นว่าในลูกสุกรที่มี MDA จะมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอกว่าลูกสุกรที่ไม่มี MDA

8.9 วัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่สุกร

ส่วนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunogenic) ที่คืออยู่ในส่วนของ transmembrane protein คือ HA และ NA ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความผันแปรสูง ในมนุษย์ พบการระบาดของสายพันธุ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นทุกๆ 1 – 2 ปี เป็นผลมาจากการเกิด selected point

mutations บนพื้นผิว glycoprotein ของทั้ง HA และ NA ซึ่งรู้จักกันในขบวนการที่เรียกว่า antigenic drift แต่ในบางครั้งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วนของยีน HA และ/หรือ NA ทั้งแห่งของไวรัสไข้หวัดใหญ่เรียกว่าเกิด antigenic shift ซึ่งสิ่งเหล่านี้อาจจะเป็นผลทำให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ของเชื้อได้

วัคซีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรถูกจัดใบบอนุญาดครั้งแรกในยุโรปช่วงกลางทศวรรษ 80 โดยทำจากเชื้อไวรัสทั้งอนุภาคที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลงหรือชิ้นส่วนของเชื้อที่ถูกตัดแยกออกมา (split virus) เพื่อการฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ (intramuscular administration) วัคซีนเหล่านี้บรรจุตัวแทนของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ที่รวมอยู่กับ oil adjuvant เช่นประกอบด้วยไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Port/Chalmers/1/73 (H3N2) และ A/New Jersey/8/76 (H1N1) หรือ A/Sw/Netherlands/25/80 (H1N1) อย่างไรก็ตาม การเกิด antigenic drift ในส่วน HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์สามารถนำไปสู่ความล้มเหลวของการทำวัคซีนและเป็นสาเหตุที่องค์การอนามัย (The world Health Organisation; WHO) ต้องมีการแนะนำสายพันธุ์ไวรัสสำหรับการทำวัคซีนในทุกๆ ปี และการรวบรวมสายพันธุ์ใหม่ๆ ตั้งแต่ 1 สายพันธุ์หรือมากกว่านั้นเพื่อการผลิตวัคซีนในแต่ละปี

จากการศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติแอนติเจนของไวรัส (classical antigenic analysis) พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่แยกได้ในยุโรปช่วงปี ค.ศ. 1981 – 1998 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนแบบ antigenic drift ให้เห็นอย่างเด่นชัดซึ่งแตกต่างจากที่พบในไวรัสไข้หวัดใหญ่ของคน (Brown *et al.*, 1997) พบว่าวัคซีนป้องกันเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลามากกว่า 15 ปีที่ผ่านมา แต่อย่างไรก็ตามซีรัมจากสุกรที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่เก็บได้ในช่วงปี ค.ศ. 1997 – 1998 จะทำปฏิกิริยากับไวรัสที่แยกได้ในเวลาใกล้เคียงกับช่วงที่เก็บซีรัมได้ดีกว่าไวรัส A/SW/Belgium/1/83 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงเชิงวิวัฒนาการของแอนติเจน (Gillis *et al.*, 1999) ปัจจุบันวัคซีนป้องกันเชื้อไข้หวัดใหญ่มนุษย์มีการเปลี่ยนแปลงปรับปรุงไปทุกๆ ปี เพื่อให้เกิดการเหนี่ยวนำทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะสำหรับสายพันธุ์ที่กำลังแพร่ระบาดอยู่ วัคซีนเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพเมื่อ HA ของสายพันธุ์ที่ใช้ทำวัคซีนตรงกับเชื้อไวรัสที่กำลังหมุนเวียนอยู่แต่จะไม่ได้ผลเมื่อมีความแตกต่างของ HA จากผลของการเกิด antigenic drift หรือ antigenic shift

ส่วน transmembrane อื่นๆ คือ โปรตีน M2 ซึ่งมีความคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างสายพันธุ์ และมีการศึกษาอย่างมากมาแสดงให้เห็นว่ามันมีศักยภาพในการเป็น broad – spectrum immunogen ด้วย การให้วัคซีนซึ่งมีเฉพาะ โปรตีน M2 ที่ไม่มีโปรตีนอื่นๆของเชื้อไข้หวัดใหญ่ทำให้สัตว์มีความไวรับต่อเชื้อลดลง (Frace *et al.*, 1999) และจากการทดลองให้ MAbs ที่จำเพาะสำหรับ extracellular domain ของ M2 (M2e) กับหนูขาว (mice) แสดงให้เห็นว่าปริมาณไวรัสในปอดลดลง 10 -100 เท่า (Mozdzanowska *et al.*, 1999) นอกจากนั้นมีการทดลองก่อนหน้านี้ในสุกรแสดงให้เห็นว่ามีการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ M2e ในระดับต่ำหลังจากการติดเชื้อ H3N2 ครั้งแรก แต่การตอบสนองจะถูก boost อีกครั้งได้ด้วยการติดเชื้อ H1N1 ซึ่งให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อ M2e อาจจะมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันข้าม subtype (heterosubtypic immunity) (Heinen *et al.*, 2001a) เมื่อเปรียบเทียบกับกับแอนติบอดีต่อ HA พบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน M2 ไม่สามารถผลิตได้ง่ายๆ และไม่สามารถทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ได้ (virus – neutralizing) อย่างไรก็ตามแอนติบอดีต่อ M2 สามารถจับ M2 ของไวรัสบนเซลล์ของเจ้าบ้านที่ติดเชื้อได้และลดการจำลองตัวเองของไวรัสโดยขัดขวางการ budding ของเชื้อไวรัส (Zebedee & Lamb, 1989) และทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการฆ่าเซลล์เชื้อบุหลอดลมที่ติดเชื้อในปอดโดย complement หรือ โดยเซลล์ของระบบ innate immunity (antibody – dependent cytotoxicity) (Mazdzanowska *et al.*, 1999) นอกจากนี้แอนติบอดีซึ่งจับก่อนการ budding ของอนุภาคไวรัสสามารถขัดขวางการติดเชื้อของเซลล์หรือสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ phagocytic cells ผ่าน Fc receptor

อย่างไรก็ตามการทำวัคซีนป้องกันเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในภาคสนามส่วนใหญ่ มักได้ผลที่ไม่น่าพอใจและพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ก็ยังคงระบาดอยู่อย่างสม่ำเสมอในฟาร์มที่มีการทำวัคซีน จึงเกิดคำถามอย่างมากมาว่าควรมีการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อไวรัสที่ใช้ทำวัคซีนไข้หวัดใหญ่สุกรให้เหมาะสมกับช่วงเวลาหรือไม่อย่างไร และเป็นคำถามที่ถกกันอยู่ช้ำๆในกลุ่มผู้ผลิตวัคซีน โดยวัคซีนจะต้องเตรียมจากสายพันธุ์ที่กำลังระบาดอยู่ในขณะนั้น หรือประกอบด้วยหลายๆ สายพันธุ์ที่คิดว่าจะมีการระบาดต่อไปด้วย นอกจากการให้วัคซีนและการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแล้วการปรับเปลี่ยนการจัดการภายในฟาร์มก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการควบคุมโรค เพราะถ้าไม่มีการจัดการที่ดีการรักษาต่างๆก็จะล้มเหลว

9. โรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร

โรคระบบทางเดินหายใจเป็นโรคที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลกเป็นอย่างมาก โดยในปี ค.ศ. 1995 The National Animal Health Monitoring System รายงานว่าโรคนี้เป็นสาเหตุนำไปสู่การตายของลูกสุกรและสุกรโตเต็มวัย (growing – finish) เนื่องจากทำให้เกิดปัญหาทางด้านสุขภาพกับสุกรและยังส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตสุกรในปัจจุบันอีกด้วย โดยการเกิดโรคแบบซับซ้อนนี้เกิดจากจุลชีพหลากหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งมีการติดเชื้อตัวแรกตามมาด้วยเชื้อฉวยโอกาสซ้ำอีก โดยมักเกิดการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อไวรัส PRRSV, SIV, PRCV, PCV2 และเชื้อแบคทีเรีย เช่น *M. hyopneumoniae*, *B. bronchiseptica*, *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae*, *S. suis* และ *H. parasuis* ก็อาจตรวจพบร่วมด้วย (Thacker *et al.*, 1999) ส่วนปัจจัยร่วมอื่นๆที่ทำให้เกิดโรคนี้ได้แก่ ปัจจัยด้านการดูแลจัดการ และสภาพแวดล้อม ซึ่งจะเพิ่มโอกาสในการถ่ายทอดและการแพร่กระจายของโรค ถึงแม้ว่าสมมติฐานของโรค PRDC จะเกี่ยวข้องกับเชื้อจุลชีพหลายตัวแต่พบว่าเชื้อ *M. hyopneumoniae*, PRRSV และ SIV คือ เชื้อจุลชีพที่พบบ่อยที่สุดในสุกรอายุ 10 – 22 สัปดาห์ ที่ปรากฏอาการทางคลินิกของโรค PRDC (Halbur, 1998) โดยจากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่า การติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ร่วมกับ PRRSV เป็นระยะเวลายาวนานเหนี่ยวนำให้เกิดโรคปอดอักเสบ (pneumonia) (Thacker *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าสุกรที่แสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจที่มีเชื้อ PRRSV เป็นสาเหตุของโรค หากได้รับการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรร่วมด้วยจะทำให้อาการของโรครุนแรงยิ่งขึ้น (Van Reeth *et al.*, 1996)

9.1 เชื้อไวรัสที่มีส่วนร่วมในการก่อโรค PRDC

9.1.1 PRRSV คือ RNA virus ขนาดเล็กที่มีเปลือกหุ้ม ภายในบรรจุสายพันธุกรรมชนิดของ RNA สายเดี่ยวซึ่งเป็น positive sense มีขนาด 15 kb เชื้อชนิดนี้อยู่ใน family *Arteriviridae* ถูกวินิจฉัยได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1990 โดยเชื้อชนิดนี้ได้รับความสนใจทั้งจากนักวิจัยทางสุกร ผู้รักษาโรค และบุคคลที่เกี่ยวข้องในแวดวงการผลิตเนื้อสุกร โดยเชื่อว่าแสดงบทบาทสำคัญในการเกิดโรค PRDC ลักษณะของการก่อโรค PRRS ประกอบด้วยพบอาการที่ตับ พบมีจุดเลือดออกแดงค้ำ (patchy) ที่บริเวณปอด การทำงานของปอดล้มเหลว ปอดยุบตัวลง เนื่องจากเกิด interstitial pneumonia (Halbur *et al.*, 1995) ในกรณีของโรค PRDC เชื้อ PRRSV เป็นสาเหตุของการทำลาย macrophage ในปอด ซึ่ง macrophage คือ เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ทำการเขมือบกินสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกายและทำให้สิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นแตกเป็นชิ้นเล็กกลองโดยขบวนการ

phagocytosis เพื่อนำเสนอให้กับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่รุกรานเข้าสู่ร่างกาย การสูญเสียหรือการทำงานที่ผิดปกติของ macrophage มีนัยสำคัญในด้านความสามารถของสุกรในการต่อสู้กับการติดเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ และเป็นการเพิ่มความไวในการเกิดโรคซึ่งสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียตัวที่ 2 ซ้ำ นอกจากนี้การติดเชื้อ PRRSV ในสุกรยังมีนัยสำคัญด้านความสามารถของสุกรในการตอบสนองต่อการให้วัคซีนและยาปฏิชีวนะโดย PRRSV อาจลดประสิทธิภาพของวัคซีนและยาปฏิชีวนะ

9.1.2 PRCV เป็นเชื้อไวรัสที่มีสายพันธุกรรมชนิด RNA สายเดี่ยว แบบ positive sense มีเยื่อหุ้ม มีสมมาตรแบบ helical ขนาดสายพันธุกรรมประมาณ 16 – 31 kb อยู่ใน family *Coronaviridae* ถูกเพาะแยกได้ครั้งแรกในเบลเยียมปี ค.ศ. 1986 เชื้อชนิดนี้บางสายพันธุ์อาจจะเหนี่ยวนำโรกระบบทางเดินหายใจได้เพียงลำพังหรือเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเชื้อไวรัสตัวอื่นๆ แบคทีเรีย หรือ *Mycoplasma* ลักษณะอาการทางคลินิกประกอบด้วย เชื่องซึม หายใจลำบาก หายใจเร็ว (หอบ) เป็นระยะเวลา 3 – 10 วัน เชื้อจำลองตัวเองครั้งแรกในเยื่อบุผิวของระบบทางเดินหายใจส่วนบนต่อมาเชื้อจะรุกรานเข้าสู่เยื่อบุผิวของหลอดลมและหลอดลมฝอย และขยายไปสู่ peribronchiolar และถุงลม เชื้อไวรัส PRCV ถูกขับออกมา (shed) กับสิ่งคัดหลั่งที่จมูกในวัน 10 หลังจากติดเชื้อขึ้นไป

9.1.3 PCV2 เป็นเชื้อไวรัสที่มีสายพันธุกรรมชนิด DNA สายเดี่ยว (single stranded DNA) ไม่มีเยื่อหุ้ม สายพันธุกรรมมีลักษณะเป็นวงกลมไม่แยกเป็นชิ้น (non – segmented circular genome) โดยเชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดโรค Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) ลักษณะอาการทางคลินิกประกอบด้วย สุขภาพร่างกายเสื่อมโทรม (wasting) ผิวหนังซีด (paleness) และบางครั้งเกิดภาวะตัวเหลืองในสุกรอย่างรุนแรง (icterus) (Kim *et al.*, 2002) ส่งผลกระทบต่อสุกรทำให้เกิดอาการในเนื้อเยื่อที่สลับซับซ้อน (multisystemic) โดยส่วนใหญ่เกิดในอวัยวะน้ำเหลือง

9.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคร่วมกับเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกร

9.2.1 *M. hyopneumoniae* คือ เชื้อแบคทีเรียที่มีขนาดเล็ก ไม่มีผนังเซลล์ พวกมันจึงไม่ได้รับผลกระทบจากยาปฏิชีวนะบางชนิดเช่น penicillin ซึ่งมีเป้าหมายในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ เชื้อถูกจัดอยู่ใน family *Mycoplasmataceae* มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบช้าๆ เป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ (Ross, 1992) เนื่องจากในเชื้อ

บุหลอดลมและหลอดลมฝอย (tracheal and bronchial epithelium) มีซีเรีย (cilia) เกาะติดอยู่ซึ่งซีเรียมีลักษณะคล้ายนิ้วมือเล็กๆที่ทำหน้าที่คอยป้องกันการติดเชื้อและมีการเคลื่อนไหวแบบลูกคลื่นเพื่อช่วยเคลื่อนย้ายฝุ่นละออง สิ่งแปลกปลอมและแบคทีเรียออกจากปอด หลังจากการเกาะของ *M. hyopneumoniae* เป็นสาเหตุทำให้ซีเรียจับกันเป็นกลุ่มก้อนจนในที่สุดหลุดออกเหลือจำนวนน้อยลง ทำให้หน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อก็ลดน้อยลงด้วย การติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* อัตราการตายส่วนใหญ่จะต่ำหากไม่มีการติดเชื้อตัวอื่นๆ ซ้ำซ้อน แต่อัตราการป่วยค่อนข้างสูง ลักษณะอาการของปอด พบพื้นที่สีม่วงเทาวมกันด้าน cranial และ ventral lung lobe ส่วนใหญ่เนื้อปอดจะถูกทำลายมีอาการปอดแฟบหรือปอดยุบตัว อวัยวะที่สามารถเพาะแยกเชื้อได้แก่ บริเวณโพรงจมูก (nasal passage) ของสุกรที่ติดเชื้อ การแพร่กระจายของเชื้อเกิดจากการติดต่อกันจากสุกรสู่อสุกร โดยตรงผ่านทางสิ่งคัดหลั่งในระบบทางเดินหายใจ โรคส่วนใหญ่จะรุนแรงในลูกสุกรโดยจะเป็นที่อยู่อาศัยของเชื้อและถ่ายทอดไปยังสุกรที่โตกว่าผ่านระบบไหลเวียนของอากาศ (Stevenson, 1993) ส่วนใหญ่การติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* มักเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียตัวที่สองซ้ำร่วมด้วย โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ถูกแยกได้คือ *P. multocida*

9.2.2 *P. multocida* คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ non - motile เป็นพวก facultative anaerobe (Hunt *et al.*, 2000) สามารถแยกได้จากโพรงจมูกของสุกรเกือบทุกตัวไม่ว่าจะมีสุขภาพดีหรือสุกรป่วย เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคปอดอักเสบในสุกรแต่เชื้อเหล่านี้ไม่ใช่เชื้อตัวแรกที่ก่อโรค เป็นพวกแบคทีเรียที่ติดเชื้อซ้ำซ้อน อย่างไรก็ตามเชื่อนี้เป็นเชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้จากสุกรที่ได้นำหนักก่อนส่งฆ่าซึ่งเป็นโรคปอดอักเสบ (Gois, 1980)

9.2.3 *A. pleuropneumoniae* (APP) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็น coccobacillus ขนาดเล็ก มี 12 serotype อาการทางคลินิกมีน้อยมาก โดย serotype 1, 5 และ 7 พบได้ทั่วไปเป็นส่วนใหญ่ในสหรัฐอเมริกา (Dubreuil *et al.*, 2000) เชื้อชนิดนี้แพร่กระจายจากการติดต่อโดยตรงหรือผ่านทางอากาศในระยะสั้นๆ โดยเชื้อนี้อาศัยอยู่ในต่อมทอนซิล เนื้อเยื่อปอดที่เกิดเนื้อตาย (necrotic lung tissue) และโพรงจมูก เชื้อเหล่านี้มีลักษณะความรุนแรงแตกต่างกันระหว่าง serotype และ สายพันธุ์ (strain) ภายใน serotype ปัจจัยความรุนแรง (Virulence factor) ประกอบด้วย hemolysin/cytolysin (Apx) ซึ่งเป็นผลเกี่ยวกับลักษณะ necrosis และ haemorrhage การปล่อย LPS เป็นผลให้เกิด endotoxemia ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกลุ่ม (coagulation) และกระบวนการอักเสบโดย capsule ของ APP เป็นตัวยับยั้ง phagocytosis การระบาดของ APP เกิดจาก

ความเครียดลักษณะอาการประกอบด้วย มีไข้ เชื้องซึม หายใจลำบาก ผิวน้ำซีด (cyanosis) และมีน้ำมูก

9.2.4 *S. suis* (SS) คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก facultative anaerobe รูปร่างแบบ coccoid หรือ ovoid อยู่ใน family *Streptococcaceae* (Gottschalk *et al.*, 1989) มีมากกว่า 29 serotype โดย type 2 เป็นชนิดที่เพาะแยกได้ทั่วไปเป็นส่วนใหญ่ เชื้อจะรุกรานเข้าไปในต่อมทอนซิล และไปถึง lymph node ผ่านต่อมน้ำเหลือง (lymphatic) โดยส่วน capsule ของเชื้อจะยับยั้ง phagocytosis ส่วนแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงประกอบด้วย muraminidase – release protein (MRP) และ extra – cellular factor (EF) เชื้อนี้อยู่ในต่อมทอนซิลและ nasal cavity ของสุกรที่เป็นพาหะ ลักษณะอาการทางคลินิกมีลักษณะคือ มีไข้ เสรีาซึม หายใจลำบาก ไขข้ออักเสบ อาจจะมีอาการทางระบบประสาทส่วนกลางร่วมด้วยมีการอักเสบของปอดและหลอดลมเล็ก (bronchopneumonia) มีหนองจากเยื่อปอดอักเสบการอักเสบของเยื่อช่องอกและเยื่อหุ้มปอด (polyserositis) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) (Staats *et al.*, 1997)

9.2.5 *H. parasuis* (HPS) คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็น coccobacillus อยู่ใน family *Pasteurellaceae* (Biberstein and White, 1969) มีมากกว่า 15 serotype ลักษณะอาการทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับ HPS ประกอบด้วย มีไข้ เสรีาซึม ผิวน้ำม่วงคล้ำ (cyanosis) หายใจลำบาก อาการของระบบประสาทส่วนกลางและไขข้ออักเสบ HPS ติดเชื้อที่จมูกและคอ ตามมาด้วยการเข้าไปในกระแสเลือดผ่านต่อมทอนซิล หรือ turbinate และมีการติดเชื้อในกระแสเลือดกระจายไปทั่วร่างกาย ลักษณะอาการทางมหกายวิภาค (gross) และจุลกายวิภาค (microscopic) คือ เยื่อหุ้มปอดและเยื่อช่องอกอักเสบแบบมีหนองและมี fibrin (fibrinosuppurative polyserositis) ไขข้ออักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และปอดและหลอดลมเล็กอักเสบแบบมีหนอง (suppurative bronchopneumonia) (Amano *et al.*, 1994)

การรักษาและควบคุมโรคนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และไวรัส ระยะเวลาที่เชื้อพักตัวและความรุนแรงของโรค ซึ่งขั้นตอนการป้องกันและรักษาอยู่ภายใต้การจัดการฟาร์มที่ดี การให้วัคซีน และการใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม นอกจากนั้นเมื่อเกิดลักษณะอาการผิดปกติกับสุกรแล้ว การวินิจฉัยโรคนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาการรักษาให้ประสบความสำเร็จ การจำแนกเชื้อ (identify) อาจทำได้โดยการเพาะเชื้อ วินิจฉัยทาง immunohistochemistry ในตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บมา เทคนิค PCR และการตรวจทางซีรัมวิทยา ส่วนการรักษาสัตว์แต่ละตัวอาจจะทำได้ถ้าสัตว์มี

จำนวนน้อย แต่โดยทั่วไปจะใช้วิธีการเติมยาปฏิชีวนะเข้าไปในอาหารสัตว์หรือน้ำเพื่อให้เกิดความ สะดวกสบายในกรณีที่สัตว์มีจำนวนมากๆ

9.3 การจัดการกับโรค PRDC (Battrell, 2002)

9.3.1 ต้องตรวจหาให้ได้ว่ามีเชื้อจุลินทรีย์อะไรบ้างเกี่ยวข้อง ซึ่งจะทำให้สำเร็จต้อง อาศัยการรวบรวมประวัติ อาการทางคลินิก และการวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการร่วมด้วย

9.3.2 ต้องพิจารณาการถ่ายทอดของโรค ประเมินค่าด้าน biosecurity เพื่อลดการแพร่ ของโรค ร่วมกับการจัดการทางด้านสิ่งแวดล้อม

9.3.3 ทำโปรแกรมวัคซีนโดยตัดสปีชีจาก maternal antibody

9.3.4 ทำตามแผนงานที่วางไว้และประเมินผลงานที่ได้ทำไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และการตรวจสอบด้วยวิธี Immunofluorescent assay
 - 1.1 Class I Laminar flow
 - 1.2 CO₂ Incubator
 - 1.3 เครื่อง Centrifuge
 - 1.4 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ
 - 1.5 กล้องฟลูออเรสเซนซ์

2. อุปกรณ์ในการทำ RCR
 - 2.1 เครื่อง PCR
 - 2.2 Heat block
 - 2.3 Water bath
 - 2.4 Electrophoresis unit
 - 2.5 Power supply

วิธีการ

1. ทำการหา sample size

ใช้โปรแกรม Win Episcope 2.0 โดยคาดว่าใน 1 ฟาร์ม จะมีความชุกเท่ากับ 70% โดยใช้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จำนวนตัวอย่างจากโปรแกรมได้ 3 ตัวอย่าง ดังนั้นในแต่ละฟาร์มจึงสุ่มเลือก 3 – 5 ตัวต่อฟาร์ม

คาดว่าความชุกที่ระดับฟาร์มเท่ากับ 10% โดยใช้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จำนวนตัวอย่างจากโปรแกรมได้ 29 ฟาร์ม ดังนั้นถ้าระดับความชุก 10% สุ่ม 29 – 30 ฟาร์ม สามารถเป็นตัวแทนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. การเก็บตัวอย่าง

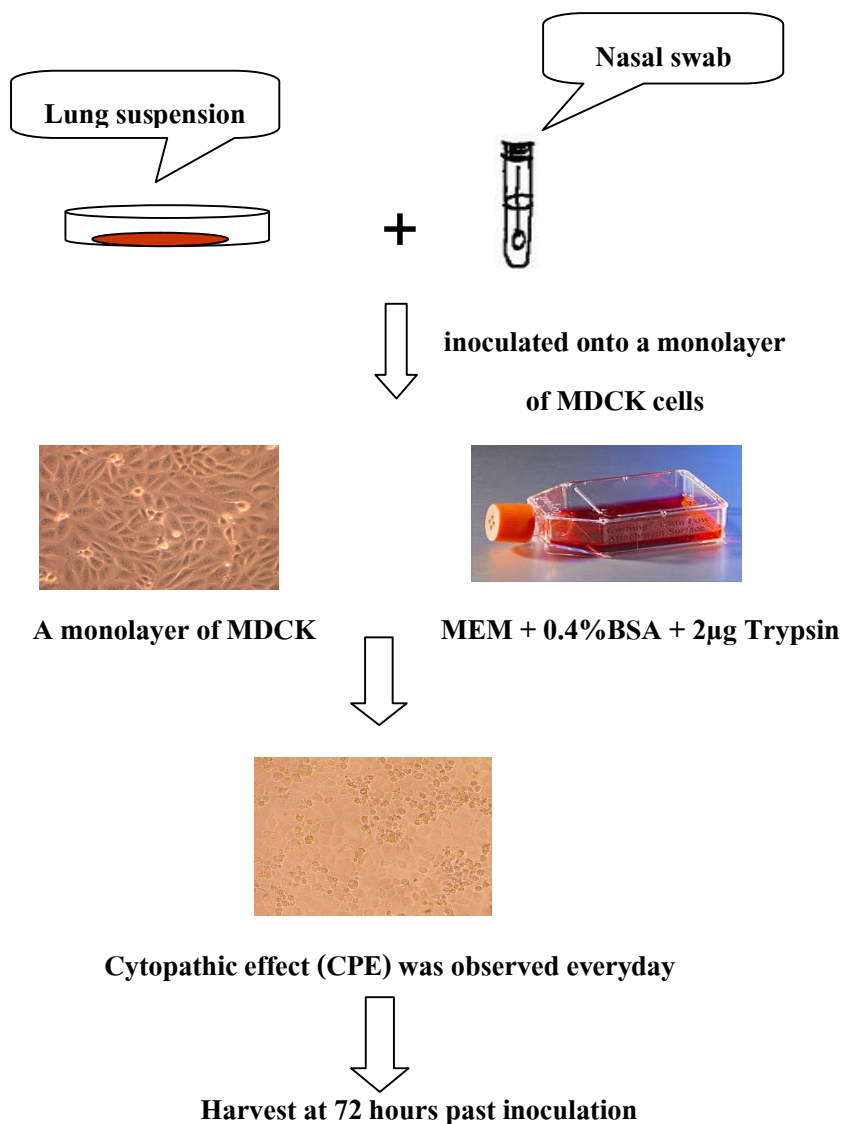
ทำการสุ่มลูกสุกรช่วงอายุ 5 – 8 สัปดาห์ ที่ป่วยด้วยอาการมีไข้สูงประมาณ 40 – 41 °C มีอาการของโรคระบบทางเดินหายใจและมีความสูญเสียมากกว่า 5 % จาก 30 ฟาร์ม ในภาคกลางและตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างจากสุกรจำนวน 3 - 5 ตัวต่อฟาร์ม รวมสุกร 106 ตัว นำมาผ่าพิสูจน์ซากที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จากนั้นเก็บตัวอย่าง nasal swab ใส่ virus transport media และชิ้นเนื้อเยื่อปอดบริเวณ apical lobe เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะใช้ในการเพาะเชื้อ

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์และการแยกเชื้อไวรัส

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell passage) นำเซลล์ MDCK ที่เลี้ยงใน flask T25 นำมาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก โดยล้างเซลล์ด้วย 1xPBS (phosphate buffer saline) ซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงใช้ไปเปิดขวดเอา PBS ที่เติม trypsin จากนั้นเอียง flask ไปมาเพื่อให้ trypsin กระจายคลุมทั่วทั้ง flask คลายเกลียว บ่มทิ้งไว้ 5 นาที ที่ 37 °C เคาะ flask เบบ่า จนกระทั่งเซลล์หลุดออกจากผิวของ flask เติม MEM + 10%FBS ลงไป 3 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาในการย่อยเซลล์ของ trypsin จากนั้นใช้ไปเปิดขวดอาหารที่มีเซลล์และ trypsin ปนอยู่ขึ้นลงเพื่อล้างเซลล์ที่อาจเกาะติดอยู่บนผิว flask ออกให้หมด แล้วจึงดูดใส่ tube ใหม่เพื่อนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จะได้ชั้นของตะกอนที่มีเซลล์อยู่ด้านล่างส่วนด้านบนคือชั้นน้ำใสที่ประกอบด้วย MEM กับ trypsin แล้วจึงใช้ไปเปิดค่อยๆ ดูดชั้นน้ำใสด้านบนทิ้งไปจะเหลือแต่ส่วนตะกอนด้านล่าง เติม complete MEM (MEM + 10% FBS + 2% L – glutamine + 1% antibiotic - antimycotics) 4 ml ใช้ไปเปิดขวดอาหารที่มีเซลล์อยู่ขึ้นลงหลายๆ ครั้ง เพื่อแตกเซลล์ที่เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ให้หลุดออกจากกัน จากนั้นย้าย cell suspension 1 ml ลงใน flask T25 แล้วเติม complete MEM ลงไป 5 ml (split ratio 1: 4)

3.2 การเพาะแยกเชื้อไวรัส (Virus isolation) (ภาพที่ 12) ทำการบดเนื้อเยื่อปอดเพื่อทำเป็น 10% lung suspension ดังนี้ เลือกตัดชิ้นเนื้อเยื่อปอดบริเวณที่พบอาการของปอดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.5 mm³ จำนวน 1 กรัม ใส่ในโกร่งที่มีทรายอยู่ เติม MEM+10%FBS 5 ml บดให้เนื้อปอดละเอียดละลายเข้ากับน้ำเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเซลล์อีก 5 ml บดละลายให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปปั่นในเครื่อง refrigerate centrifuge ที่ 12,000 – 13,000 rpm เพื่อให้เศษเนื้อปอดตกตะกอนอยู่ด้านล่าง ดูดเอาเฉพาะน้ำใสด้านบนเก็บไว้ หากยังไม่ใช้เก็บไว้ที่ -80 °C จนกว่าจะใช้งาน ในการ

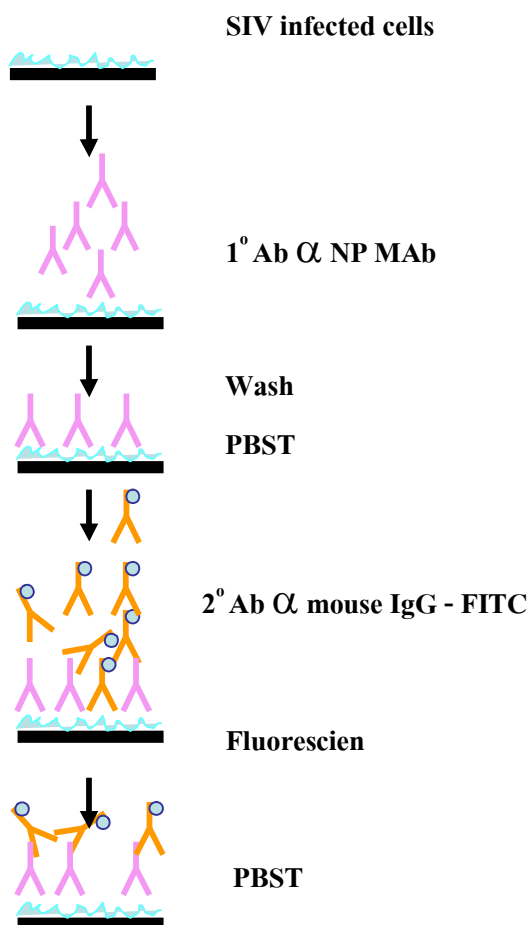
เพาะแยกเชื้อไวรัสได้นำ 10 % lung suspension ใน MEM และ nasal swab ที่กรองผ่านแผ่นกรอง (syringe filter) ขนาด 0.2 μm ไปเพาะแยกเชื้อในเซลล์ MDCK ที่มีลักษณะเป็น monolayer มีการเจริญเติบโตประมาณ 80% ของพื้นที่ flask โดยใช้ไปเปิดดูอาหารเลี้ยงเซลล์ใน flask ที่ตั้ง แล้วล้างด้วย 1xPBS ซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นดูดตัวอย่างที่สงสัยจาก lung suspension หรือ nasal swab ที่ต้องการเพาะแยกเชื้อลงไปใน flask อีกร่าง flask ไปมาเพื่อให้ตัวอย่างกระจายปกคลุมทั่วทั้ง flask นำไปบ่มในตู้อบอุณหภูมิ 37°C ที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์ จากนั้นเติมอาหารในการเพาะแยกเชื้อไวรัส (innoculating media) ซึ่งก็คือ MEM ที่ประกอบด้วย trypsin (Sigma) 2 $\mu\text{g/ml}$, bovine serum albumin fraction IV (Invitrogen) 0.3%, L – glutamine 2% และ Antibiotic - antimycotics 1% หลังจากนั้นเฝ้าสังเกตผลทางพยาธิวิทยาในเซลล์ (cytopathic effect; CPE) ทำการถ่าย (passage) น้ำเลี้ยงที่เซลล์ถูก inoculate ด้วยตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าตัวอย่างที่ให้ผลลบไม่มีไวรัสแน่นอน และนำน้ำเลี้ยงไปทดสอบด้วยวิธี immunofluorescent assay (IFA) กับโมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody: MAb) ต่อ nucleoprotein (NP) ของไวรัสใช้หัวคำใหญ่เพื่อยืนยันการติดเชื้อ



ภาพที่ 12 แผนภาพแสดงการเพาะแยกเชื้อไวรัส (Virus isolation)

4. Immunofluorescent assay (IFA)

นำเซลล์ MDCK ที่ถูก inoculate ด้วยตัวอย่าง 48 ชั่วโมง มาตรึงด้วย absolute methanol แล้วล้างด้วย PBST (1xPBS + 0.05% tween20) และบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ต่อ NP ที่ถูกเจือจางใน PBST ในอัตราส่วน 1: 500 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 °C จากนั้นล้างด้วย PBST ซ้ำ 3 ครั้ง เติมนอนแอนติบอดีทุติยภูมิซึ่งเป็น MAb ต่อ IgG ของหนูขาวที่ติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) ซึ่งเจือจางใน PBST ในอัตราส่วน 1: 100 บ่ม 30 นาที ที่ 37 °C ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 แผนภาพแสดงการวิเคราะห์หาแอนติเจน โดยทดสอบด้วยวิธี immunofluorescent assay (IFA)

5. การหาปริมาณของไวรัส

ทำการเจือจางเชื้อไวรัสเป็นลำดับ (serial dilution) โดยนำตัวอย่างไวรัสที่เพาะแยกได้ทำ serial dilution เริ่มต้นจากที่ 10^{-1} ไปจนถึง 10^{-10} (ten fold dilution) แต่ละ dilution ทำซ้ำทั้งหมด 4 ครั้ง ใน 96 well plate การเจือจางจะใช้ตัวอย่างไวรัส 25 μ l เจือจางใน MEM 225 μ l mix ใน vortex จะได้ dilution ที่ 10^{-1} จากนั้นนำตัวอย่างไวรัสจาก dilution 10^{-1} 25 μ l เจือจางใน MEM 225 μ l mix ใน vortex จะได้ dilution ที่ 10^{-2} ทำต่อไปเรื่อยๆ จนถึง dilution ที่ 10^{-10} เมื่อทำการเจือจางไวรัสเสร็จแล้วจึงใช้ไมโครไปเปิดชุดเชื้อไวรัสตั้งแต่ที่ dilution 10^{-3} ถึง 10^{-10} ใส่ใน 96 well plate ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ MDCK ซึ่งมีลักษณะเป็น monolayer มีการเจริญเติบโตประมาณ 80% ของ well โดยทำ

ทั้งหมด 4 ซ้ำ ใส่ในหลุมๆ ละ 50 μ l เซลล์ MDCK ที่ใช้เพาะแยกเชื้อไวรัสจะถูกเคาะเอาน้ำเลี้ยง เซลล์ออกแล้วล้างด้วย 1xPBS 1 ครั้ง ก่อนที่จะหยอดเชื้อไวรัสลงไป บ่มในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C ที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม inoculating media ลงไปหลุมละ 150 μ l ในการทดลองนี้ มีการทำ negative และ positive control ไวรัสที่หลุมแรกและหลุมสุดท้ายตามลำดับ หลังจากนั้นสังเกต ผลทางพยาธิวิทยาในเซลล์ (cytopathic effect; CPE) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 14) ก็จะ สามารถ สังเกตเห็น viral infection และ replication ได้ titer ของไวรัสคือ ส่วนกลับ (reciprocal) ของ dilution ที่ทำให้ 50% ของโฮสต์ที่ถูก inoculated มีการติดเชื้อซึ่งถูกคำนวณด้วยวิธีของ Reed และ Muench และมีหน่วยเป็น tissue culture infective dose (TCID₅₀)

วิธีของ Reed และ Muench เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการคำนวณ 50% endpoint เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก

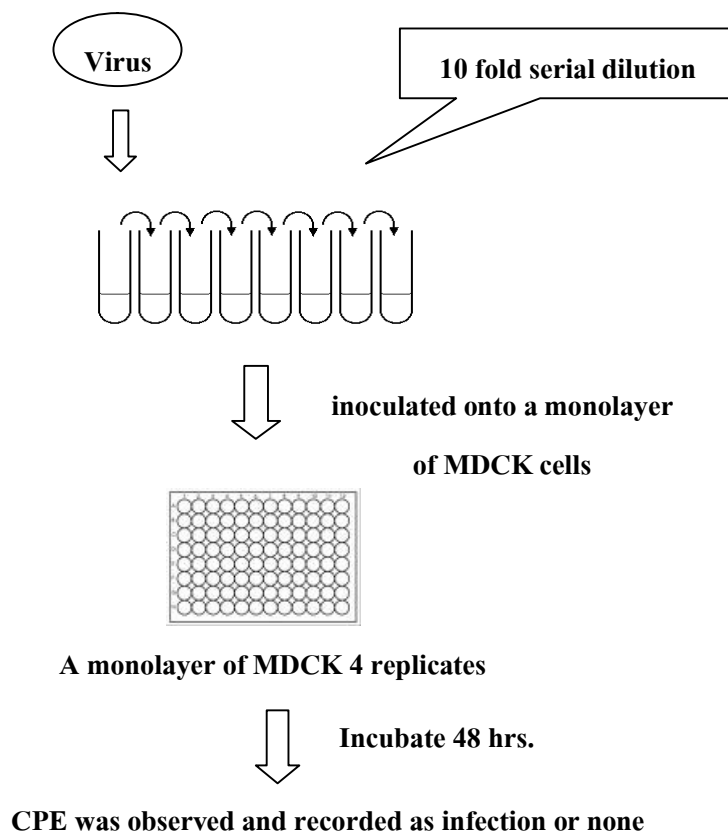
$$\frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

= proportionate distance

$$(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)$$

$$(\text{Log dilution above } 50\%) + (\text{proportionate distance} \times \text{Log dilution factor}) = \text{Log ID}_{50}$$

Log ID₅₀ = endpoint dilution (dilution ซึ่งทำให้ 50% ของเข้าบ้านเกิดการติดเชื้อ) ส่วนกลับ (reciprocal) ของจำนวนดังกล่าวจะเป็น titer ของ infectious dose ต่อปริมาตร ถ้า inoculum ที่ใส่ลงไปในแต่ละหน่วยที่ทดสอบ (test unit; well ของ cell culture) คือ 0.05 ml titer ของไวรัสที่ใช้จะได้ หน่วยเป็น TCID₅₀/ml



ภาพที่ 14 แผนภาพแสดงการหาปริมาณของไวรัส

6. SIV subtyping

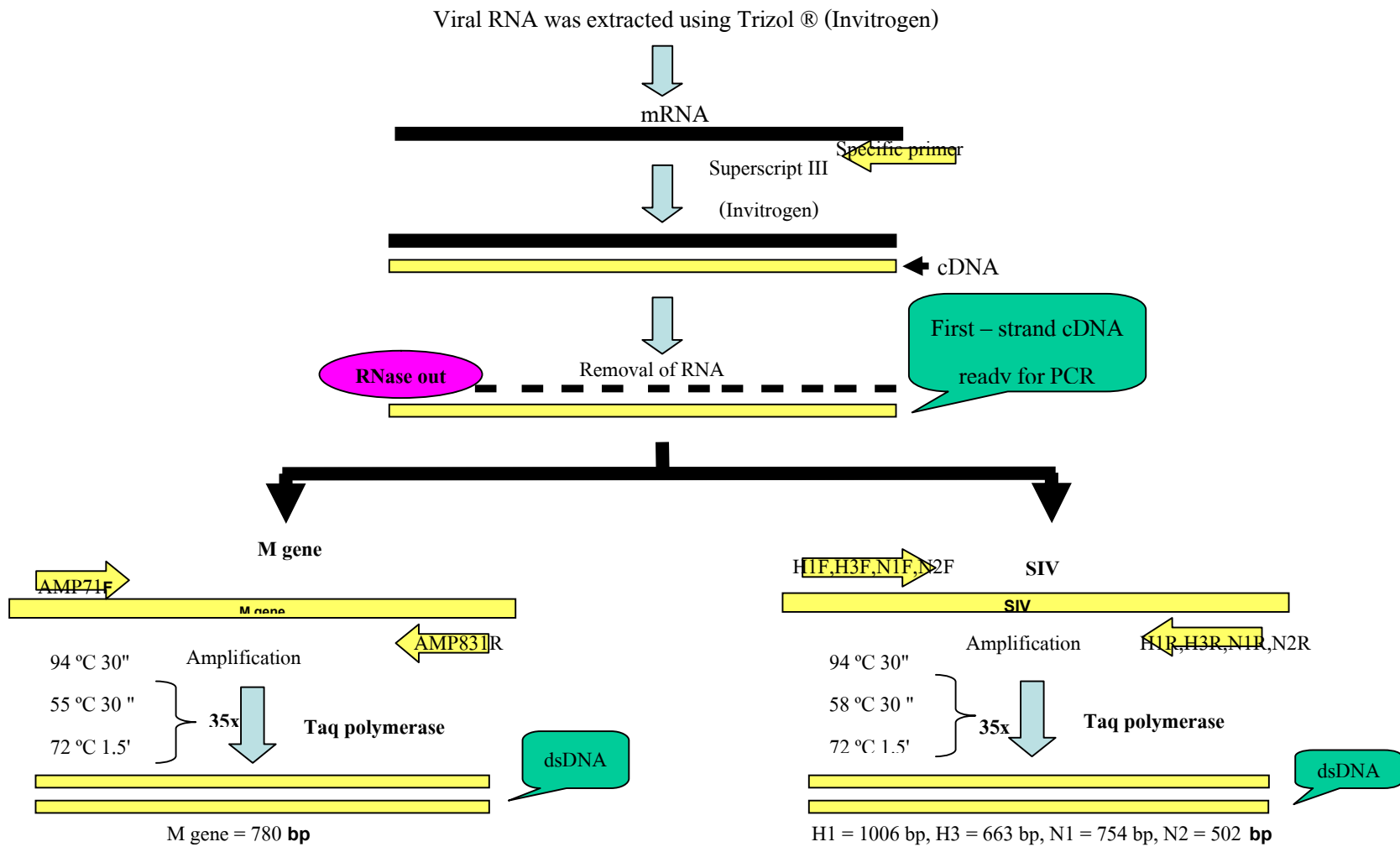
วิธีการนี้จะสกัด RNA จากส่วน supernatant ของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยการใช้อยู่ Trizol[®] (Invitrogen) จากนั้นสังเคราะห์ cDNA จาก RNA โดยใช้ specific primer ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase (superscript III ; Invitrogen) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ซึ่งในปฏิกิริยา 20 μ l ประกอบด้วย 5 μ l RNA, 10 mM dNTPs, 0.1 M DTT, 0.5 μ g specific primer, 20 U RNase inhibitor ใน RT buffer (3.75 mM KCl, 2.5 mM Tris, pH 8.3) หลังจากแยกสาย RNA ที่ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที จึงทำการสังเคราะห์ cDNA ที่ 42 °C นาน 50 นาที ก่อนที่จะทำลายเอนไซม์ ที่ 70 °C นาน 15 นาที

จากนั้นนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาเป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยการใช้ primers ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสายพันธุกรรม M ของไวรัสไข้หวัดใหญ่และ primers ที่จำเพาะต่อแต่ละ subtype ของ HA และ NA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR) ซึ่งสามารถแบ่ง primers ออกเป็น 3 ชุด (ตารางที่ 1) ชุดแรกใช้ตรวจหาสายพันธุกรรม M จากตัวอย่างที่มี CPE ปรากฏทั้งหมด ชุดที่ 2 ให้ตรวจหา subtype ของ HA (H1, H3) ส่วนอีกชุดหนึ่งใช้แยก subtype ของ NA (N1, N2) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 1 ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 2 μ l แม่แบบ cDNA, 2 mM MgCl₂, 5 mM dNTPs, 5 pmol ของแต่ละ primer, 1 U Taq polymerase ใน buffer (5 mM KCl, 1 mM Tris – HCl, pH 8.3) จากนั้นหลอดปฏิกิริยาจะถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 3 นาที เพื่อแยกสาย DNA จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที, 58 °C 30 วินาที และ 72 °C 1 นาที ทำซ้ำ 35 รอบ ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ให้สมบูร์นที่ 72 °C นาน 7 นาที นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 15)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ที่ใช้ในการแยกชนิดของ SIV

Primers	Sequence (5' - 3')	Positions	SIV subtypes	Ref.
MF	CCGTCAGGCCCCCTCAAAGC	70 – 89	-	Ellis &
MR	AGGCGATCAAGAATCCACAA	830 – 849		Zambon., 2001
H1F	GGG ACA TGT TAC CCA GGA GAT	345 – 365	H1	Choi <i>et</i>
H1R	GCA TTG TAT GTC CAA ATA TCC A	1351 – 1330		<i>al.</i> , 2002
H3F	TAT GCC TGG TTT TCG CTC AA	61 – 80	H3	Choi <i>et</i>
H3R	TTC GGG ATT ACA GTT TGT TG	724 – 705		<i>al.</i> , 2002
N1F	GGT TCC AAA GGA GAC ATT TTT G	324 – 346	N1	Choi <i>et</i>
N1R	CTA TCC AAA CAC CAT TGC CAT A	1078 – 1057		<i>al.</i> , 2002
N2F	TGC GAT CCT GAC AAG TGT TAT C	364 – 385	N2	Choi <i>et</i>
N2R	CAG ACA CAT CTG ACA CCA GGA T	866 - 845		<i>al.</i> , 2002



ภาพที่ 15 แผนภาพแสดงการจำแนก subtype ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยการทดสอบโดยวิธี RT – PCR

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ความชุกของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในลูกสุกรที่มีปัญหาโรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อน

การเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร จากตัวอย่างทั้งหมด 106 ตัวอย่างจาก lung suspension และ nasal swab ในเซลล์ MDCK พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลทางพยาธิสภาพในเซลล์มีทั้งหมด 3 ตัวอย่าง โดยให้ผลบวกตั้งแต่ใน passage ที่ 1 ส่วนตัวอย่างที่ไม่ให้ผลทางพยาธิสภาพในเซลล์ใน passage ที่ 1 จะทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจนถึง passage ที่ 3 เพื่อให้แน่ใจว่าตัวอย่างนั้นเป็นลบจริงๆ แต่จากการทดลองพบว่าตัวอย่างที่ไม่ให้ผลทางพยาธิสภาพในเซลล์ใน passage ที่ 1 ใน passage ที่ 2 และ 3 ก็ไม่ให้ผลทางพยาธิสภาพในเซลล์เช่นกัน นอกจากนี้ยังมี 14 ตัวอย่างที่ให้ผลทางพยาธิสภาพในเซลล์ (ตัวอย่างที่สงสัยว่าบวก) แต่เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี IFA แล้วกลับไม่พบการเรืองแสงในเซลล์

ตารางที่ 2 แสดงผลการเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจาก nasal swab และ lung suspension โดยมีการตัดสินผลบวกหรือลบจากการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพ ภายในเซลล์ (CPE) และการทดสอบปฏิกิริยาจำเพาะต่อโปรตีน NP ด้วยวิธี IFA

Sample no.	ฟาร์มที่	ที่อยู่ (จังหวัด)	Virus isolation (Nasal swab)						Virus isolation (Lung suspension)					
			Passage1		Passage2		Passage3		Passage1		Passage2		Passage3	
			CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA
1.	1	สุพรรณบุรี	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-
2.	1	สุพรรณบุรี	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-
3.	1	สุพรรณบุรี	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-
4.	2	เพชรบุรี	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-
5.	2	เพชรบุรี	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-
6.	2	เพชรบุรี	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-
7.	3	ราชบุรี	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-
8.	3	ราชบุรี	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-
9.	3	ราชบุรี	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-
10.	4	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.	4	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
12.	4	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.	5	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Sample no.	ฟาร์มที่	ที่อยู่ (จังหวัด)	Virus isolation (Nasal swab)						Virus isolation (Lung suspension)					
			Passage1		Passage2		Passage3		Passage1		Passage2		Passage3	
			CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA
14.	5	ชลบุรี	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
15.	5	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.	6	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.	6	ชลบุรี	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.	6	ชลบุรี	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.	7	ราชบุรี	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20.	7	ราชบุรี	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21.	7	ราชบุรี	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
22.	8	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23.	8	ราชบุรี	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24.	8	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25.	9	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26.	9	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27.	9	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Sample no.	ฟาร์มที่	ที่อยู่ (จังหวัด)	Virus isolation (Nasal swab)						Virus isolation (Lung suspension)					
			Passage1		Passage2		Passage3		Passage1		Passage2		Passage3	
			CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA
28.	10	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29.	10	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30.	10	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31.	11	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32.	11	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33.	11	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34.	12	นครปฐม	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35.	12	นครปฐม	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36.	12	นครปฐม	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37.	13	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38.	13	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39.	13	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40.	13	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41.	13	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Sample no.	ฟาร์มที่	ที่อยู่ (จังหวัด)	Virus isolation (Nasal swab)						Virus isolation (Lung suspension)					
			Passage1		Passage2		Passage3		Passage1		Passage2		Passage3	
			CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA
42.	14		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43.	14		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44.	14		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45.	14		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
46.	15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47.	15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48.	15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49.	15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50.	16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51.	16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52.	16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53.	16		+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54.	17		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55.	17		+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Sample no.	ฟาร์มที่	ที่อยู่ (จังหวัด)	Virus isolation (Nasal swab)						Virus isolation (Lung suspension)					
			Passage1		Passage2		Passage3		Passage1		Passage2		Passage3	
			CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA
56.	17		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57.	18		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58.	18		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
59.	19		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60.	19		-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61.	19		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62.	20	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63.	20	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64.	20	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65.	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66.	21		+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67.	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68.	22	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69.	22	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Sample no.	ฟาร์มที่	ที่อยู่ (จังหวัด)	Virus isolation (Nasal swab)						Virus isolation (Lung suspension)					
			Passage1		Passage2		Passage3		Passage1		Passage2		Passage3	
			CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA
70.	22	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71.	22	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
72.	23	นครปฐม	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
73.	23	นครปฐม	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74.	23	นครปฐม	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75.	23	นครปฐม	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
76.	24	นครปฐม	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
77.	24	นครปฐม	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78.	24	นครปฐม	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79.	25	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80.	25	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81.	25	ราชบุรี	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82.	26		-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
83.	26		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Sample no.	ฟาร์มที่	ที่อยู่ (จังหวัด)	Virus isolation (Nasal swab)						Virus isolation (Lung suspension)					
			Passage1		Passage2		Passage3		Passage1		Passage2		Passage3	
			CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA
84.	26		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85.	26		-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
86.	26		+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87.	27	อ.จอมบึง ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88.	27	อ.จอมบึง ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89.	27	อ.จอมบึง ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90.	27	อ.จอมบึง ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91.	28	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92.	28	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93.	28	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94.	28	ราชบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

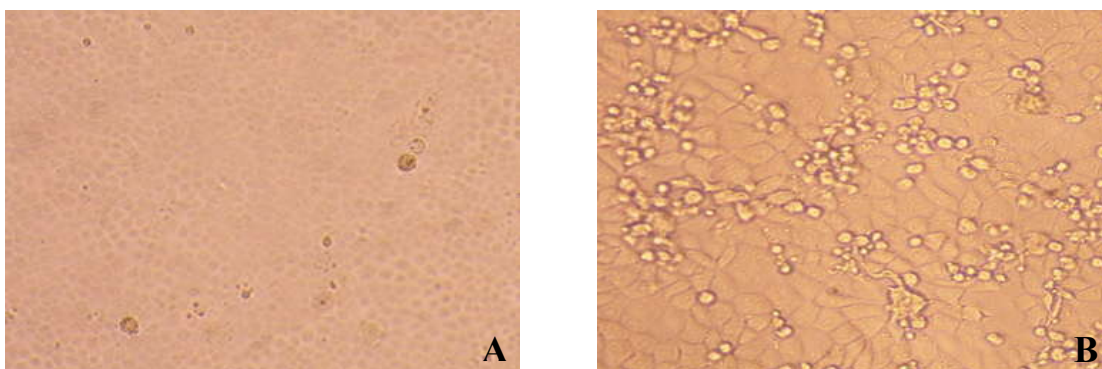
Sample no.	ฟาร์มที่	ที่อยู่ (จังหวัด)	Virus isolation (Nasal swab)						Virus isolation (Lung suspension)					
			Passage1		Passage2		Passage3		Passage1		Passage2		Passage3	
			CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA
95.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102.	29	ฉะเชิงเทรา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103.	30	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104.	30	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Sample no.	ฟาร์มที่	ที่อยู่ (จังหวัด)	Virus isolation (Nasal swab)						Virus isolation (Lung suspension)					
			Passage1		Passage2		Passage3		Passage1		Passage2		Passage3	
			CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA	CPE	IFA
105.	30	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106.	30	ชลบุรี	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

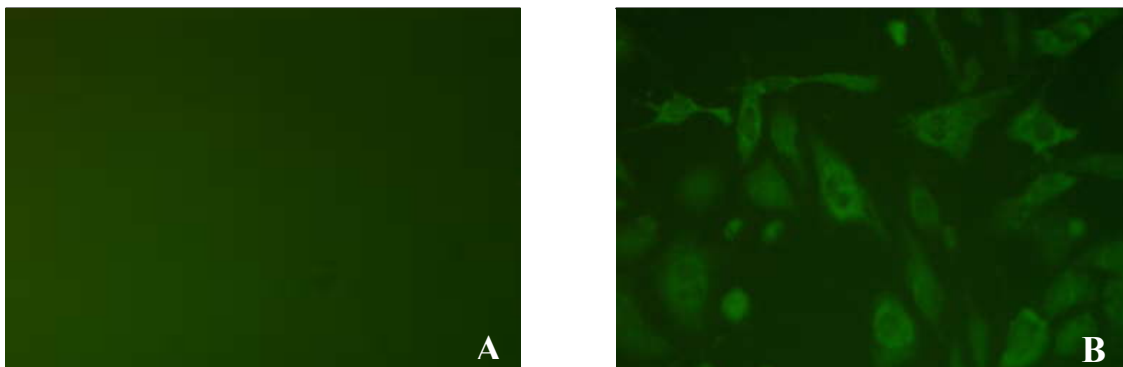
หมายเหตุ - = ตัวอย่างที่ให้ผลลบ
 + = ตัวอย่างที่ให้ผลบวก
 +/- = ตัวอย่างที่สงสัยว่าบวก
 M = ไม่มีตัวอย่างส่งตรวจ (missing data)

ลักษณะพยาธิสภาพในเซลล์ที่ได้จากตัวอย่างในกลุ่มที่สงสัยว่าบวมมีดังต่อไปนี้คือ เซลล์จะมีกลุ่มที่ตายเพียงกลุ่มเดียวใน plate แต่ในส่วนของเซลล์บริเวณอื่นพบว่ายังคงสามารถเจริญเติบโตได้ดี แต่เมื่อทิ้งไว้หลายวันพบว่าเซลล์บริเวณที่ตายนั้น มีการขยายวงกว้างเพิ่มขึ้น พบเซลล์ลอยตายด้านบนเพิ่มขึ้น สภาพเซลล์โดยทั่วไปเริ่มแยลง แต่ความเปลี่ยนแปลงของเซลล์จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ โดยเฉลี่ยประมาณ 96 ชั่วโมง แต่ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรนั้นพบว่าเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตทั่วทั้ง plate หลังจากนั้นเซลล์จะเริ่มตายเห็นเป็นช่องว่างใน plate กระจายทั่ว แล้วพบว่าเกิด CPE ขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยพบตั้งแต่ 24 ชั่วโมง หลังจากการทำให้เซลล์ติดเชื้อ (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 ผลการแยกเชื้อไวรัส SIV จากตัวอย่างในเซลล์ MDCK จากรูป (A) เซลล์ควบคุมมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ (B) เซลล์ที่มีการติดเชื้อจะมี CPE ปรากฏ

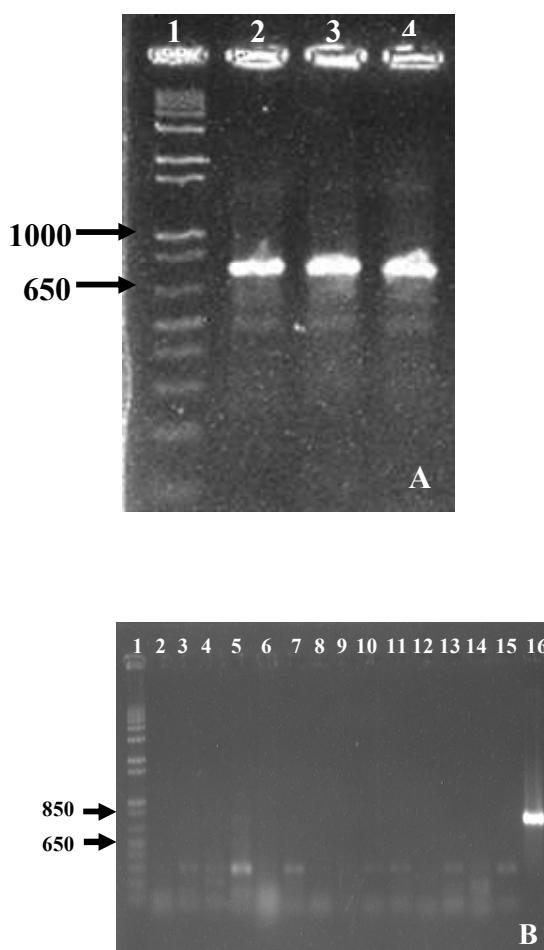
การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี IFA โดยนำเซลล์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากสารเรืองแสง ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะเห็นการเรืองแสงภายในเซลล์ ส่วนเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสจะไม่เห็นการเรืองแสงดังภาพที่



ภาพที่ 17 ลักษณะของเซลล์ที่ติดสี fluorescein เมื่อทดสอบด้วยวิธี IFA (B) เซลล์ควบคุมจะไม่มี การเรืองแสงปรากฏให้เห็น (A)

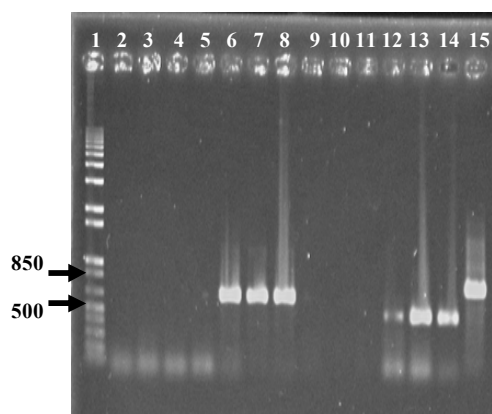
2. ผลการวิเคราะห์สารพันธุกรรมและ subtype ของ SIV

หลังจากที่ได้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกในเซลล์เพาะเลี้ยงจึงได้นำตัวอย่างเหล่านั้นจากเซลล์เพาะเลี้ยงใน passage ที่ 1 ไปทดสอบด้วยวิธี RT – PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อสายพันธุกรรม M ซึ่งจะต้องให้แถบ DNA ขนาด 780 bp เพื่อเป็นการตรวจสอบอย่างรวดเร็วในเบื้องต้นให้แน่ใจว่าตัวอย่างที่ได้เหล่านั้นเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจริงๆ โดยผลการทดลองพบว่าไวรัสที่ให้ผลบวก IFA ทั้ง 3 ตัวนั้นคือเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร เนื่องจากให้แถบ DNA ขนาด 780 bp ทั้ง 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 18A) ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลบวก CPE แต่ IFA เป็นลบจะไม่มี DNA ขนาด 780 bp ปรากฏ (ภาพที่ 18B) จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างดังกล่าวไม่ใช่เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร



ภาพที่ 18 ผลการตรวจสอบแถบ DNA ที่ได้จากการทำ RT – PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ M gene จากนั้น electrophoresis ผ่าน 1.2 % gel A) แถวที่ 1 DNA marker, แถวที่ 2, 3 และ 4 เป็นตัวอย่างหมายเลข 21, 45 และ 58 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลบวกปรากฏแถบ DNA ขนาด 780 bp B) แถวที่ 1 DNA marker แถวที่ 2 – 15 เป็นตัวอย่างหมายเลขที่สงสัยว่าจะบวกส่วนแถวที่ 16 เป็น positive control ที่ให้แถบ DNA ขนาด 780 bp

จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ primer M gene ทั้ง 3 ตัวอย่างไปวิเคราะห์หาค่า subtype โดยใช้วิธี RT – PCR ด้วย primer ที่จำเพาะต่อ HA (H1, H3) และ NA (N1, N2) ซึ่งหากให้ผลบวกจะได้ แถบ DNA ซึ่งจำเพาะต่อ H1, H3, N1 และ N2 มีขนาด 1006, 663, 754 และ 502 ตามลำดับ (ภาพที่ 19) โดยผลการทดลองพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทั้ง 3 ตัวนั้นเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ทั้งหมด



ภาพที่ 19 ผลการตรวจสอบแถบ DNA ที่ได้จากการทำ RT – PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ HA (H1, H3) และ NA (N1, N2) จากนั้น electrophoresis ผ่าน 1.2% agarose gel แถวที่ 1 DNA marker, แถวที่ 2 negative control, แถวที่ 3, 4 และ 5 เป็นตัวอย่างหมายเลข 21, 45 และ 58 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลลบต่อ primer H1, แถวที่ 6, 7 และ 8 เป็นตัวอย่างหมายเลข 21, 45 และ 58 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลบวกต่อ primer H3 ซึ่งปรากฏแถบ DNA ขนาด 663 bp, แถวที่ 9, 10 และ 11 เป็นตัวอย่างหมายเลข 21, 45 และ 58 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลลบต่อ primer N1, แถวที่ 12, 13 และ 14 เป็นตัวอย่างหมายเลข 21, 45 และ 58 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลบวกต่อ primer N2 แถวที่ 15 เป็น positive control ต่อ primer M

3. ปริมาณของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรใน passage 1 และ 3

จากการศึกษาพบว่าไวรัสที่ให้ผลทางพยาธิวิทยาในเซลล์ใน passage ที่ 1 ใน passage ที่ 2 และ 3 ก็จะทำให้ผลเช่นเดียวกัน จึงน่าสนใจที่จะทราบว่าปริมาณไวรัสใน passage ที่ 1 และ 3 จะมีความแตกต่างกันหรือไม่มากนักหรือเพียงใด จึงทำการหาปริมาณของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้จากตัวอย่างด้วยวิธี quantal assay และเปรียบเทียบปริมาณไวรัสใน passage ที่ 1 และ 3 โดยทำการวัด titer ของไวรัสซึ่งดูได้จากการมีหรือไม่มี CPE

ผลการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อไวรัสใน passage 1 และ passage 3 พบว่าเมื่อเทียบจากค่า TCID₅₀ แล้วตัวอย่างหมายเลข 21 และ 45 มีปริมาณไวรัสใน passage 1 และ passage 3 ใกล้เคียงกันมาก ค่า TCID₅₀ เท่ากันในทั้ง 2 passage โดยค่า TCID₅₀ ในตัวอย่างหมายเลข 45 มีมากกว่าใน

หมายเลข 21 (ตารางที่ 3) ส่วนหมายเลขที่ 58 นั้นไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากไม่มี inoculum ซึ่ง เป็น passage ที่ 1 เหลืออยู่

ตารางที่ 3 ปริมาณไวรัสใน passage ที่ 1 เปรียบเทียบกับ passage ที่ 3

Titers	หมายเลข 21 Passage 1	หมายเลข 21 Passage 3	หมายเลข 45 Passage 1	หมายเลข 45 Passage 3
(TCID ₅₀ /ml)	$> 2 \times 10^9$	$> 2 \times 10^9$	$> 2 \times 10^{10}$	$> 2 \times 10^{10}$

วิจารณ์

PRDC เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความสูญเสียให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรอย่างมาก ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในยุโรป อเมริกา และเอเชีย (Thacker, 2001; Van Gucht *et al.*, 2004; Segales *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003) รวมทั้งประเทศไทย สาเหตุของ PRDC เกิดจากปฏิกริยาร่วมกันของเชื้อก่อโรคหลายชนิดรวมทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (Thacker, 2001) การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาผลกระทบของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรต่อการก่อโรค PRDC และศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อที่พบหมุนเวียนในสุกรของประเทศไทยด้วย โดยพบว่าจากการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่เลี้ยงสุกรในภาคกลางของประเทศไทยซึ่งมีลูกสุกรที่มีอาการของโรกระบบทางเดินหายใจและมีความสูญเสียมากกว่า 5% จำนวน 30 ฟาร์มๆ ละ 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างปอดและ nasal swab พบว่าจากการเพาะแยกเชื้อไวรัสจากเซลล์ MDCK ซึ่งเป็นเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ มีสุกรที่ติดเชื้อไวรัสทั้งสิ้นจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์แล้วอาจจะเห็นว่า มีปริมาณเพียง 2.8% ของสุกรที่ป่วยเป็นโรกระบบทางเดินหายใจทั้งหมด จะเห็นได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรอาจจะไม่ใช่เชื้อก่อโรคหลักที่ทำให้เกิด PRDC เนื่องจากโดยธรรมชาติเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (acute infection) ซึ่งสุกรสามารถกำจัดไวรัสไปจากระบบทางเดินหายใจส่วนต้นได้อย่างรวดเร็ว จากการทดลองทำให้สุกรติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่พบว่ารอยโรคจากปอดจะเริ่มคืนสู่สภาพเดิมและไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดลมขนาดเล็กและกลาง ในวันที่ 7 หลังจากการติดเชื้อ (Thacker *et al.*, 2001) จากการทดลองทำให้เกิดการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร และ *M. hyopneumoniae* นั้น ปฏิกริยาร่วมระหว่างเชื้อก่อโรคสองชนิดทำให้โรกระบบทางเดินหายใจรุนแรงขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่ทำให้ระยะเวลาของการเจ็บป่วยยาวนานออกไป (Thacker *et al.*,

2001) การทดลองในการศึกษาผลกระทบร่วมกันของเชื้อทั้งสองต่อระบบทางเดินหายใจยังไม่แน่นอน มีความผันแปรสูงมากทั้งในการทดลองเดียวกันหรือต่างการทดลองก็ตาม (Van Gucht *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ในระดับฟาร์มพบว่าฟาร์มที่มีสุกรติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรมี 3 ฟาร์มจากทั้งหมด 30 ฟาร์มคิดเป็น 10% ของฟาร์มทั้งหมด โดยอัตราส่วนนี้สอดคล้องกับผลจากการสำรวจสุกรจำนวน 105 ตัวที่มีปัญหา PRDC ด้วยวิธี *in situ hybridization* และ *immunohistochemistry* พบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเพียง 13% โดยเชื้อ PRRSV และ PCV2 เป็นเชื้อก่อโรคที่พบบมากที่สุด (Kim *et al.*, 2002)

การพบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นสาเหตุร่วมของ PRDC เพียง 2.8% นั้นอาจจะน้อยกว่าความเป็นจริงเนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจะปรากฏในระบบหายใจส่วนต้น และในสิ่งคัดหลั่งเป็นระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้น ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นสุกรที่มีปัญหา PRDC ซึ่งระยะเวลาจากการเจ็บป่วยอาจจะยาวนานเกินระยะเวลาที่จะสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้ โดยอาจเป็นไปได้ว่าลูกสุกรบางตัวในกลุ่มนี้อาจจะติดเชื้อในระยะแรกๆของการเจ็บป่วยแต่ตัวอย่างถูกเก็บมาในขณะที่ไวรัสถูกขับออกจากตัวสัตว์แล้ว แต่อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในการศึกษาครั้งนี้อาจจะสูงกว่าอัตราส่วนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้จากสุกรปกติดังที่มีการศึกษาเพื่อสำรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร จาก nasal swab ของสุกรปกติในประเทศไทย ซึ่งทำการเพาะแยกเชื้อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้ผลบวก 2 ใน 359 ตัวอย่าง (สุจิรา และคณะ 2548) และ 5 ใน 500 ตัวอย่าง จาก nasal swab, ปอด และหลอดลมจากสุกรปกติทางตอนใต้ของประเทจีน (Yu *et al.*, 2007)

ในประเทศไทยพบการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็นครั้งคราวในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยซึ่งเป็นพื้นที่ในการเลี้ยงสุกรของประเทศไทย โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 เเพาะแยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1978 ซึ่งมีลักษณะของแอนติเจนสัมพันธ์กับไวรัสไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์สายพันธุ์ H3N2 ที่พบในช่วงเวลาเดียวกัน (Nerome *et al.*, 1983) ส่วนเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 พบครั้งแรกในสุกรทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในปี ค.ศ. 1988 (Kupradinun *et al.*, 1991) ซึ่งการสำรวจทางซีรัมวิทยาเมื่อเร็วๆนี้พบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง 2 สายพันธุ์ 0.5% ของสุกรปกติจาก 5 จังหวัดในภาคกลางของประเทศไทย ในการศึกษาค้นคว้านี้สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 ได้จากสุกรที่ป่วยเป็นโรค PRDC ในประเทศไทย ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ยังคงพบบนหมูเวียนอยู่ในสุกรของประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง

ถึงแม้ว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจะไม่ใช่เชื้อก่อโรคตัวหลักที่เป็นสาเหตุของ PRDC แต่เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ที่มีโอกาสแลกเปลี่ยนพันธุกรรมกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ในสัตว์สี่ขี้อื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในคนและสัตว์ปีก เนื่องจากสุกรมี receptor ที่จำเพาะต่อทั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนและสัตว์ปีกในปริมาณเท่าๆกัน (Ito *et al.*, 1998a) และสุกรยังมีโอกาสใกล้ชิดกับคนและสัตว์ปีกอีกด้วย จึงควรมีการศึกษาเพื่อเฝ้าระวังอุบัติการณ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรและศึกษาพันธุกรรมของไวรัสอย่างต่อเนื่องเพื่อให้สามารถติดตามอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ๆ ให้ทันทั่วถึง

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างปอดและ nasal swab จากลูกสุกรที่มีอาการของโรกระบบทางเดินหายใจและมีความสูญเสียมากกว่า 5% จำนวน 106 ตัวอย่าง พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จากเซลล์ MDCK ได้ทั้งสิ้น 3 ตัวอย่าง และเมื่อนำไปยืนยันผลด้วยวิธี IFA พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่าง พบการเรืองแสงภายในเซลล์ โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกคิดเป็น 2.8% ของสุกรที่แสดงอาการของโรกระบบทางเดินหายใจทั้งหมด ซึ่งผลที่ได้นี้อาจจะน้อยกว่าความเป็นจริงเนื่องมาจากข้อจำกัดด้านระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะปรากฏในระบบทางเดินหายใจส่วนต้นและในสิ่งคัดหลั่งในระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้น แต่ตัวอย่างที่ถูกเก็บมาเพื่อศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่ได้มาจากลูกสุกรที่มีปัญหาของโรกระบบทางเดินหายใจซับซ้อนที่มีระยะเวลาการเจ็บป่วยมายาวนานเกินเวลาที่จะสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้

ส่วนการแยก subtype จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการเพาะเลี้ยงในเซลล์ MDCK ทั้ง 3 ตัวอย่างพบว่าเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ subtype H3N2 ซึ่งในประเทศไทยพบว่าเป็น subtype ที่มีการแพร่ระบาดร่วมกับ subtype H1N1 (สุจิรา และคณะ, 2548; Kupradinun *et al.*, 1991) ส่วนในเอเชียพบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทั้ง 3 subtype คือ H1N1, H1N2 และ H3N2 ซึ่งเป็น subtype ที่มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก โดยพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร subtype H1N1 เป็น subtype หลักที่แพร่กระจายในประชากรสุกรเอเชีย (Guan *et al.*, 1996)

จากการศึกษาถึงสมมติฐานของโรกระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกรก่อนหน้านี้พบว่าโรคนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อก่อโรคหลายชนิดร่วมกัน (Thacker *et al.*, 2001) โดยในการศึกษานี้พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรไม่ใช่เชื้อหลักในการก่อโรคแต่การ फैาระวังการอุบัติของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นระยะๆ เป็นสิ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากสุกรเป็นตัวกลางที่สามารถทำให้เกิดการผสมรวมกันของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A จากสัตว์ต่างสปีชีส์ ซึ่งจะนำไปสู่การอุบัติของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่อาจทำให้เกิดความรุนแรงถึงขั้นก่อให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ในอนาคตต่อไปได้

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดด้านระยะเวลาในการสุ่มเก็บตัวอย่างจากสุกรที่ป่วยเป็นโรค ดังนั้นหากต้องการหาว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นสาเหตุของโรกระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในระดับใดจึงควรเก็บตัวอย่างจากสุกรในช่วงระยะเวลาแรกๆ หลังจากพบสุกรแสดงอาการของโรกระบบทางเดินหายใจ ซึ่งอาจจะทำให้สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

มีชัย นกเทศ, สุदारัตน์ คำรงวัฒนโกคิน, วันทนีย์ เนรมิตมานสุข, ชิต ศิริวรรณ, จิรา คงครอง, สุจิรา ปาจริยานนท์, ปฏิพร ฐาปนกุลศักดิ์, พัชรี ทองคำคุณ, กิตติชัย อุ่นจิต, และรัฐพงษ์ รัตนกุมมะ. 2550. โรคสัตว์เล็ก: สุกร. ชุมนุมเกษตรกรรมกรการเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ

สุจิรา ปาจริยานนท์, สุदारัตน์ คำรงวัฒนโกคิน, วาสนา ภิญโญชนม์, ชีรศักดิ์ ชักนำ, เสาวพัทธ์ อื่นน้อย, และประวิทย์ ชุมเกษียร. 2547. การสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ไทป์ A ในสุกรจาก 5 จังหวัดที่มีรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนกในปี 2004. สัตวแพทย์สาร 57 (3)

Akkina, R.K., T.M. Chambers, D.R. Londo and D.P. Nayak. 1987. Intracellular localization of the viral polymerase proteins in cells infected with influenza virus and cells expressing PB1 protein from cloned cDNA. **J. Virol.** 61: 2217 – 2224.

Amano, H., M. Shibata, N. Kajio and T. Morozumi. 1994. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. **J. Vet. Med. Sci.** 56: 639 – 644.

Armstrong, S.J. and N.J. Dimmock. 1992. Neutralization of influenza virus by low concentrations of hemagglutinin – specific polymeric immunoglobulin A inhibits viral fusion activity, but activation of the ribonucleoprotein is also inhibited. **J. Virol.** 66: 3823 – 3832.

Asahi, Y., T. Yoshiawa, I. Watanabe, I. Takuya, H. Hideki, S. Yuko, S. Shin-ichiro, N. Masanobu, M. Yoshiaki, O. Makoto, I. Yoichiro, S. Yujiro, A. Chikara, S. Tetutaro, K. Takeshi and T. Shin - ichi. 2002. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knock out mice immunized intranasally with adjuvant – combined vaccines. **J. Immunol.** 168: 2930 – 2938.

- Battrell, M.A. 2002. Managing swine respiratory disease. *In Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs seminar*. North Carolina swine veterinary group, Rose Hill.
- Bauer, C.M., L.H. Pinto, T.A. Cross and R.A. Lamb. 1999. The influenza virus M₂ ion channel protein: Probing the structure of the transmembrane domain in intact cells by using engineered disulfide cross – linking. **J. Virol.** 254: 196 – 209.
- Beveridge, W.I.B. 1977. **Influenza: the last great plague**. An unfinished story of discovery, Heinemann Educational Books, London, UK.
- Biberstein, E.L. and D.C. White. 1969. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. **J. Med. Microbiol.** 2: 75 – 77.
- Blaskovic, D., V. Rathova, D. Kociskova, O. Jamrichova, E. Sadecky and M.M. Kaplan. 1970. Experimental infection of weanling pigs with A/swine influenza virus. 3. Immunity in piglets farrowed by antibody-bearing dams experimentally infected a year earlier. **Bull. World Health Organ** 42: 771–777.
- Brown, D.M., E. Roman and S.L. Swain. 2004. CD4 T cell responses to influenza infection. **Semin. Immunol.** 16: 171–177.
- _____, I. H. 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Vet. Microbiol.** 74: 29 – 46.
- _____, I.H., 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.** 24: 598 – 602.

- Brown, P.A. Harris, J.W. McCauley and D.J. Alexander. 1995. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. **J. Gen. Virol.** 79: 2947 – 2955.
- _____, S. Ludwig, C.W. Olsen, C. Hannoun, C. Scholtissek, V.S. Hinshaw, P.A. Harris, J.W. McCauley, I. Strong and D.J. Alexander. 1997. Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs. **J. Gen. Virol.** 78: 553 – 562.
- Carol, G. 1997. Swine influenza. *In Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar.* College of veterinary medicine, North Carolina state university, Raleigh.
- Castrucci. M.R., I. Donatelli, L. Sidoli, G. Barigazzi, Y. Kawaoka and R.G. Webster. 1993. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. **J. Virol.** 193: 503 – 506.
- Cerwenka, A., T.M. Morgan and R.W. Dutton. 1999. Naïve, effector, and memory CD8 T cells in protection against pulmonary influenza virus infection: homing properties rather than initial frequencies are crucial. **J. Immunol.** 163: 5535 – 5543.
- Chizhmakov, I.V., F.M. Geraghty, D.C. Ogden, A. Hayhurst, M. Antoniou, and A.J. Hay. 1996. Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expressed in mouse erythroleukaemia cells. **J. Physiol.** 494: 329 – 336.
- Choi, Y.K., S.M. Goyal, S.W. Kang, M.W. Farnham and H.S. Joo. 2002. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical sample using two multiplex RT – PCR assays. **J. Virol. Methods** 102: 53 – 59.
- Chun, J. 1919. Influenza including its infection among pigs. **Natl. Med. J. China** 5: 34 – 44.

- Clements, S. O'Donnell, M.M. Levine, R.M. Chanock and B.R. Murphy. 1983. Dose response of A/Alaska/6/77 (H3N2) cold-adapted reassortant vaccine virus in adult volunteers: role of local antibody in resistance to infection with vaccine virus. **Infect. Immun.** 40: 1044 – 1051.
- _____, M. L., R.F. Betts, E.L. Tierney and B.R. Murphy. 1986. Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus. **J. Clin. Microbiol.** 24: 157 – 160.
- Colman, P.M. 1989. The influenza viruses. **Plenum Press**: 175-218.
- Compans, R.W. 1973. Influenza virus proteins. II. Association with component of the cytoplasm. **J. Virol.** 51: 56 – 70.
- Cros, J.F. and P. Palese. 2003. Trafficking of viral genomic RNA into and out of nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. **Virus Res.** 95: 3 – 12.
- Das, K.P., B.B. Mallick and K. Das. 1981. Note on the prevalence of influenza antibodies in swine. **Indian J. Anim. Sci.** 51: 907 – 908.
- Davies, W.L., R.R. Grunent and R.F. Haff. 1964. Antiviral activity of 1 - adamantanamine (amantadine). **Science** 144: 862 – 863.
- Dorset, M., C.N. McBryde and W.B. Niles. 1922. Remarks on Hog Flu. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 62: 162 – 171.
- Dubreuil, J.D., M. Jacques, K.R. Mittal and M. Gottschalk. 2000. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. **Anim. Health Res. Rev.** 1: 73 – 93.

- Dungworth, D.L. 1993. The respiratory system. In: K.F.C. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer, Editors (4th Edit.), Academic Press, New York. **Pathol. Domestic Anim.** 2: 624–625.
- Easterday, B.C. and K. Van Reeth. 1999. Swine influenza. In **Disease of swine**, ed. Straw BE, D’Allaire S, Mengeling WL, and Taylor DJ, 8th ed, Iowa state University Press, Ames: 277 – 290.
- _____, and V.S. Hinshaw. 1992. Swine influenza. In: Lemaan, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D’Allaire, S.D., Taylor, D.J. Jr (Eds.), **Diseases of Swine**. Iowa State **Press**, **Ames, IA**: 349 – 357.
- 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: 4097 – 4102.
- Epstein, S.L., A. Stack, J.A. Misplon, C.Y. Lo, H. Mostowski, J. Bennink and K. Subbarao. 2000. Vaccination with DNA encoding internal proteins of influenza virus does not require CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes: either CD4⁺ or CD8⁺ T cells can promote survival and recovery after challenge. **International Immunity** 8: 683 – 691.
- Frace, A.M., A.I. Klimov, T. Rowe, R.A. Black and J.M. Katz. 1999. Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus. **Vaccine** 17: 2237 – 2244.
- Gammelin, M., J. Mandler and C. Scholtissek. 1989. Two subtypes of nucleoproteins (NP) of influenza A viruses. **J. Virol.** 170: 71 – 80.
- Gillis, K., K. Van Reeth and M. Pensaert. 1999. **Haemagglutination inhibition titers of swine sera against influenza virus isolates from 98 and from 83 – 84**. Abstracts ESVV Symposium on Animal Influenza Viruses, Gent, Belgium: 39.

- Gois, M., F. Kuksa and F. Sisak. 1980. Microbiological findings in the lungs of slaughter pigs. 214. *In proceeding of the 6th congress of the Pig Veterinary Society*, Copenhagen.
- Gorlich, D. and I.W. Mattaj. 1996. Nucleocytoplasmic transport. **Science** 271: 1513-1518.
- Gottschalk, A. 1975. The specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. **Biochim. Biophys. Acta.** 23: 645-646.
- _____, M., R. Higgins, M. Jacques, K.R. Mittal and J. Henrichsen. 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. **J. Clin. Microbiol.** 27: 2633 – 2636.
- Graham, M.B. and T.J. Braciale. 1997. Resistance to and recovery from lethal influenza virus infection in B lymphocyte deficient mice. **J. Exp. Med.** 186: 2063 – 2068.
- Greenspan, D., M. Krystal, S. Nakada, H. Arnheiter, D.S. Lyles and P. Palese. 1985. Expression of influenza virus NS2 nonstructural protein in bacteria and localization of NS2 in infected eucaryotic cells. **J. Virol.** 54: 833-843.
- Guan, Y. 1998. Porcine respiratory disease. 1 – 10. *In Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society*, Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom
- _____, 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: 8041 – 8046.
- Guo, Y., F. Jin, P.Wang, M.Wang, and J. Zhu. 1983. Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus **J. Gen. Virol.** 64: 177 – 182.
- Haines, D.M. and E.G. Clark. 1991. Enzyme immunochemical staining of formalin – fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. **Can. Vet. J.** 32: 51 – 62.

- Halbur, P.G., P.S. Paul, M.L. Frey, J. Landgraf, K. Eernisse, X.J. Meng, M.A. Lum, J.J. Andrews and J.A. Rathje. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. **Vet. Pathol.** 32: 648 – 660.
- Hay, G. Abraham, J.J. Skehel, J.C. Smith and P. Fellner. 1977. Influenza virus messenger RNAs are incomplete transcripts of the genome RNAs. **Nucleic Acids. Res.** 4: 4197 – 4209.
- _____, A.J., A.J. Wolstenholme, J.J. Skehel and M.H. Smith. 1985. The molecular basis of the specific anti – influenza action of amantadine. **EMBO. J.** 4: 3021 – 3024.
- Heinen, E.A. de Boer – Luijze and A.T.J. Bianchi. 2001. Respiratory and systemic humoral and cellular immune response of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. **J. Gen. Virol.** 82: 2697 – 2707.
- _____, P.P., A.P. Van Nieuwstadt, E.A. de Boer – Luijze and A.T. Bianchi. 2001. Analysis of the quality of protection induced by porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 83: 39 – 56.
- Hinshaw, V.S., D.J. Alexander, M. Aymard, P.A. Bachmann, B.C. Easterday, C. Hannoun, H. Kida, M. Lipkind, J.S. Mackenzie, K. Nerome, G.C. Schild, C. Scholtissek, D.A. Senne, K.F. Shortridge, J.J. Skehel and R.G. Webster. 1984. Antigenic comparison of swine – influenza – like H1N1 isolates from pigs, birds and humans: An international collaborative study. **Bull. World Health Organ** 62: 871 – 878.
- Hirst, G.K. 1941. Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. **Science** 94: 22-23.

- 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: 1551 – 1563.
- Horisberger, M.A. 1980. The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. **J. Virol.** 107: 302 – 305.
- Hughey, P.G., R.W. Compans, S.L. Zebedee and R.A. Lamb. 1992. Expression of the influenza A virus M2 protein is restricted to apical surfaces of polarized epithelial cells. **J. Virol.** 66: 5542 – 5552.
- Hunt, M.L., B. Adler and K.M. Townsend. 2000. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. **Vet. Microbiol.** 72: 3 – 25.
- Inglis, S.C., A.R. Carroll, R.A. Lamb and B.W. Mahy. 1976. Polypeptides specified by the influenza virus genome. I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plaque virus. **J. Virol.** 74: 489 – 503.
- 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. 1998a. Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Viruses with Pandemic Potential. **J. Virol.** 72: 7367 – 7373.
- _____, T., Y. Kawaoka, A. Vines, H. Ishikawa, T. Asai and H. Kida. 1998b. Continued circulation of reassortant H1N2 influenza viruses in pigs in Japan. **Arch. Virol.** 143: 1773 – 1782.
- Janeway, C. 2004. **Immunobiology: the immune system in health and disease.** 6th ed. New York: Garland Sci.
- Janke, B.H. 1998. Classic swine influenza. **Large An. Pract.** 19: 24 – 29.

- Jo, S.K., H.S. Kim, S.W. Cho, S.H. Seo. 2007. Pathogenesis and inflammatory responses of swine H1N2 influenza viruses in pigs. **Virus Res.** 129: 64 – 70.
- Jung, Y. Ha and C. Chae. 2005. Pathogenesis of Swine Influenza Virus Subtype H1N2 Infection in Pigs. **J. Comp. Pathol.** 132: 179 – 184.
- _____, K. and C. Chae. 2004. Phylogenetic analysis of an H1N2 influenza A virus isolated from a pig in Korea. **Arch. Virol.** 149: 1415 – 1422.
- Kalams, S.A. and B.D. Walker. 1998. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. **J. Exp. Med.** 188: 2199 – 2204.
- Karasin, A.I., J. Landgraf, S. Swenson, G. Erickson, S.M. Goyal, M. Woodruff, G. Scherba, G. Anderson and C.W. Olsen. 2002. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United states. **J. Clin. Microbiol.** 40: 1073 – 1079.
- Kida, H., T. Ito, J. Yasuda, Y. Shimizu, C. Itakura, K.F. Shortridge, Y. Kawaoka and R.G. Webster. 1994. Potential for transmission of avian influenza viruses to pig. **J. Gen. Virol.** 75: 2183 – 2188.
- Kim, J., H.K. Chung and C. Chae. 2003. Association of porcine respiratory disease complex. **Vet. J.** 166: 251 – 256.
- _____, T. Jung, W.S. Cho, C. Choi and C. Chae. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. **J. Vet. Med. Sci.** 64: 57 – 62.
- Koen, J.S. 1919. A practical method for the field diagnosis of swine diseases. **Am. J. Vet. Med.** 14: 468.

- Kovacs, F.A., J.K. Denny, Z. Song, J.R. Quine and T.A. Cross. 2000. Helix tilt of the M2 transmembrane peptide from influenza A virus: An intrinsic property. **J. Mol. Biol.** 295: 117 – 125.
- Krug, R.M. and P.R. Etkind. 1973. Cytoplasmic and nuclear virus specific protein in influenza virus – infected MDCK cells. **J. Virol.** 56: 334 – 348.
- Kundin, W.D. 1970. Hong kong A – 2 influenza virus infection among swine during a human epidemic in Taiwan. **Nature** 288: 857.
- 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: 289 – 97.
- Lamb, S.L. Zebedee, C.D. Richardson. 1985. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected – cell surface. **Cell** 40: 627 – 633.
- _____, and P.W. Choppin. 1981. Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. **J. Virol.** 112: 729 – 737.
- _____, and R.M. Krug. 2001. **Orthomyxoviridae: The viruses and their replication.** In: Knipe M.D., editors. *Fields Virology*, 4th edition. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, USA.
- _____, R.A., L.J. Holsinger and L.H. Pinto. 1994. **The influenza A virus M2 ion channel protein and its role in the influenza virus life cycle.** In: Wimmer E., editor. *Receptor-mediated virus entry into cells.* Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Press: 303–321.

- Lawrence, and T.J. Braciale. 2004. Activation, differentiation, and migration of naive virus-specific CD8⁺ T cells during pulmonary influenza virus infection. **J. Immunol.** 173: 1209 – 1218.
- _____, C.W., R.M. Ream and T.J. Braciale. 2005. Frequency, specificity, and sites of expansion of CD8⁺ T cells during primary pulmonary influenza virus infection. **J. Immunol.** 174: 5332 – 5340.
- Leahy, M.B., J.T. Dessens, F. Weber, G. Kochs and P.A. Nuttall. 1997. The fourth genus in the *Orthomyxoviridae*: sequence analyses of two Thogoto virus polymerase proteins and comparison with influenza viruses. **Virus Res.** 50: 215 – 224.
- Liew, F.Y., S.M. Russell, G. Appleyard, C.M. Brand and J. Beale. 1984. Cross – protection in mice infected with influenza A virus by the respiratory route is correlated with local IgA antibody rather than serum antibody or cytotoxic T cell reactivity. **Eur. J. Immunol.** 14: 350 – 356.
- Lin, B.C. and C.J. Lai. 1983. The influenza virus nucleoprotein synthesized from clones DNA in a simian virus 40 vector is detected in the nucleus. **J. Virol.** 45: 434 – 438.
- Loeffen, W.L.A., P.P. Heinen, A.T.J. Bianchi, W.A. Hunneman and J.H.M. Verheijden. 2003. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 92: 23 – 35.
- 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, K. and A. Helenius. 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. **Cell** 67: 117 – 130.
- Matlin, K.S., H. Reggio, A. Helenius and K. Simons. 1982. The entry of enveloped viruses into an epithelial cell line. **Prog. Clin. Biol. Res.** 91: 599 – 611.
- McBryde, C.N. 1927. Some observations on 'hog flu' and seasonal prevalence in Iowa. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 71: 368 – 377.
- McGeoch, D., P. Fellner and C. Newton. 1976. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 73: 3045 – 3049.
- McMichael, A.J., C.A. Michie, F.M. Gotch, G.L. Smith and B. Moss. 1986. Recognition of influenza A virus nucleoprotein by human cytotoxic T lymphocytes. **J. Gen. Virol.** 67: 719 – 726.
- Mensik, L. Valicek and Z. Pospisil. 1971b. Pathogenesis of swine influenza infection produced experimentally in suckling piglets III. Multiplication of virus in the respiratory tract of suckling piglets in the presence of colostrum-derived specific antibody in their blood stream. **Zentralbl. Veterinarmed.** 18: 665–678.
- _____, J. and J. Pokorny. 1971a. Development of antibody response to swine influenza virus in pigs. I. The influence of experimental infection of pregnant sows on serum antibody production by their progeny during postnatal development. **Zentralbl. Veterinarmed.** 18: 177–189.
- Morse, M.A., A.C. Marriott and P.A. Nuttall. 1992. The glycoprotein of Thogoto virus (a tick – borne orthomyxo – like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64. **J. Virol.** 186: 640 – 646.

- Mozdzanowska, and K. Gerhard. 2000. Th cell – deficient mice control influenza virus infection more effectively than Th – and B cell – deficient mice: evidence for a Th – independent contribution by B cells to virus clearance. **J. Immunol.** 164: 2635 – 2643.
- _____, K., K. Maiese, M. Furchner and W. Gerhard. 1999. Treatment of influenza virus – infected SCID mice with nonneutralizing antibodies specific for the transmembrane proteins matrix 2 and neuraminidase reduces the pulmonary virus titer but fails to clear the infection. **J. Virol.** 254: 138 – 146.
- Murphy, F.A. 2000. **Influenza virus.** Diagram illustrating the shapes and sizes of viruses of families that include animal, zoonotic and human pathogens. Available Source: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Images/Murphy.htm>, March 20, 2008.
- Naim, H.Y. and M.G. Roth. 1993. Basis for selective incorporation of glycoproteins into the influenza virus envelope. **J. Virol.** 67: 4831 – 4841.
- 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: 2611 – 2620.
- 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: 288 – 296.
- OIE Standards Commission: 2000. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, 4th ed. Office International des Epizooties, Paris,France.
- Olsen, S. Carey, L. 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.

- Olsen, C.W. 2002. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. **Virus Res.** 85: 199 – 210.
- Palese, P., K. Tobita, M. Ueda and R.W. Compans. 1974. Characterization of a temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. **J. Virol.** 61: 397 – 410.
- Palmer D.F., M.T. Coleman, WR. Dowdle and G.S. Schild. 1975. **Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis.** US Department of Health, Education and welfare, Immunology Series no. 6, Washington DC.
- Pensaert, M., K. Ottis, J. Vandeputte, M.M. Kaplan and P.A. Bachmann. 1981. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential for man. **Bull. World Health Organ** 59: 75 – 78.
- Plotch, S.I., M. Bouloy, I. Ulmaner and R.M. Krug. 1981. A unique cap (m⁷ GpppXm) – dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. **Cell** 23: 847 – 858.
- Prendergast, J.A., C.D. Helgason and R.C. Bleackley. 1992. A comparison of the flanking regions of the mouse cytotoxic cell proteinase genes. **Biochim. Biophys. Acta.** 1131: 192 – 198.
- Reid, A. H., T. G. Fanning, J. V. Hultin and J. K. Taubenberger. 1999. Origin and evolution of the 1918 “Spanish” influenza virus hemagglutinin gene. **J. Microbiol.** 96: 1651 – 1656.
- Renshaw, H.W. 1975. Influence of antibody – mediated immune suppression on clinical, viral, and immune responses to swine influenza infection. **Am. J. Vet. Res.** 36: 5 – 13.

- Riberdy, J.M., J.P. Christensen, K. Branum and P.C. Doherty. 2000. Diminished primary and secondary influenza virus-specific CD8(+) T-cell responses in CD4-depleted Ig(-/-) mice. **J. Virol.** 74: 9762 – 9765.
- Ritchey, M.B., P. Palese and E.D. Kilbourne. 1976. RNAs of influenza A, B and C viruses. **J. Virol.** 18: 738 – 744.
- Roger, G.N., T.J. Pritchette, J.L. Lane and J.C. Paulson. 1983. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor infection: selection of receptor specific variants. **J. Virol.** 131: 394 – 408.
- Ross, R.F. 1992. **Mycoplasmal diseases.** In: Diseases of Swine 7th ed., eds. Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Alaire S, Taylor DJ, Iowa State University Press, Ames, IA: 537 – 551.
- 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: 163 – 169.
- Rubin, B.K. 2002. Physiology of airway mucus clearance. **Respir. Care** 47: 761 – 768.
- Scherle, P.A. and W. Gerhard. 1986. Function analysis of influenza – specific helper T cell clones in vivo. T cells specific for internal viral proteins provide cognate help for B cell responses to hemagglutinin. **J. Exp. Med.** 164: 1114 – 1128.
- Scholtissek, C, H. Burger, O. Kistner and K.F. Shortridge. 1985. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. **J. Virol.** 147: 287 – 294.

- Scholtissek, P.A. Bachman and C. Hannoun. 1983. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. **J. Virol.** 129: 521 – 523.
- Segalés, J., C. Rosell and M. Domingo. 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Vet. Microbiol.** 98: 137 – 149.
- Sha, B. and M. Luo. 1997. Structure of a bifunctional membrane – RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. **Nat. Struct. Biol.** 4: 239 – 244.
- Sheerar, M.G., B.C. Easterday and V.S. Hinshaw. 1989. Antigenic conservation of H1N1 swine influenza viruses. **J. Gen. Virol.** 70: 3297 – 3303.
- Shope, and R. G. Webster. 1979. Geographical distribution of swine (Hsw1N1) and Hong Kong influenza virus variants in pigs. **Intervirolog.** 11: 9 – 15.
- Shope, R.G. Webster, W.K. Butterfield and C.H. Campbell. 1977. Persistence of Hong Kong influenza virus variants in pigs. **Science** 196: 1454 – 1455.
- _____, R.E. 1931. Swine influenza III: Filtration experiments and etiology. **J. Exp. Med.** 54: 373 – 385.
- Shvartsman, Y.S., E.A. Agranovskaya and M.P. Zykov. 1977. Formation of secretory and circulating antibodies after immunization with live and inactivated influenza viruses vaccines. **J. Infect. Dis.** 135: 697 – 705.
- Skibbe D., E.M. Zhou and B.H. Janke. 2004. Comparison of a commercial enzyme – linked immunosorbent assay with hemagglutination inhibition assay for serodiagnosis of swine influenza virus (H1N1) infection. **J. Vet. Diagn. Invest.** 16: 86 – 89.

- Smith, G.L., J.Z. Levin, P. Palese and B. Moss. 1987. Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses. **J. Virol.** 160: 336 – 345.
- Staats, J.J., I. Feder, O. Okwumabua and M.M. 1997. Chengappa, *Streptococcus suis*: past and present. **Vet. Res.** 21: 381 – 407.
- Stegmann, T., H.W. Morselt, J. Scholma and J. Wilschut. 1987. Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. **Biochim. Biophys. Acta.** 904: 165 – 170.
- Steinhauer, D.A. 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of the influenza virus. **J. Virol.** 258: 1 – 20.
- Stevenson, G.W. 1993. Bacterial contributors to the porcine respiratory disease complex (PRDC). **Proc Am. Assoc. Swine Pract.:** 351 – 365.
- Strauss, J.H. and E.G. Strauss. 2002. Viruses and human disease: family Orthomyxoviridae: 147 – 156.
- Tao, J. 2006. **Nucleoprotein molecules bind viral RNA.** Protein's tail may be flu virus's Achilles heel. Available source: <http://www.physorg.com/news84633075.html>, March 30, 2008.
- Thacker, B.J. Thacker and B.H. Janke. 2001. Interaction between Mycoplasma hyopneumoniae and Swine Influenza Virus. **J. Clin. Microbiol.** 39: 2525 – 2530.
- _____, E.L. 2001. Porcine respiratory disease complex – what is it and why does it remain a problem?. **Pig J.** 48: 66 – 70.

- Thacker, E.L., P.G. Halbur, R.F. Ross, R. Thanawongnuwech and B.J. Thacker. 1999. Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus – induced pneumonia. **J. Clin. Microbiol.** 37: 620 – 627.
- Topham, D.J. and P.C. Doherty. 1998. Clearance of an influenza A virus by CD8+ T cells is inefficient in the absence of B cells. **J. Virol.** 72: 882 – 885.
- Van Gucht, S., G. Labarque and K. Van Reeth. 2004. The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 102: 78 – 165.
- Van Reeth, K., H. Nauwynck and M. Pensaert. 1996. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. **Vet. Microbiol.** 48: 325 – 335.
- Verhoeven, M., R. Fang, W. Min Jou, R. Devos, D. Huylebroeck, E. Saman and W. Fiers. 1980. Antigenic drift between the haemagglutinin of the Hong Kong influenza strains A/Aichi/2/68 and A/Victoria/3/75. **Nature** 286: 771 – 776.
- 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.
- Wiley, D.C. and J.J. Skehel. 1977. Crystallization and x – ray diffraction studies on the haemagglutinin glycoprotein from the membrane of influenza virus. **J. Mol. Biol.** 112: 343 – 347.

- Winkler, G.C. and N.F. Cheville. 1986. Ultrastructural morphometric investigation of early lesions in the pulmonary alveolar region of pigs during experimental swine influenza infection. **Am. J. Pathol.** 122: 541–552.
- 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.
- Ye, Z.P., N.W. Baylor and R.R. Wagner. 1989. Transcription – inhibition and RNA – binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti – idiotypic antibodies and synthetic peptide. **J. Virol.** 63: 3586 – 3594.
- Yewdell, J.W. and C.J. Hackett. 1989. **Specificity and function of T lymphocytes induced by influenza A viruses**, In: Krung RM, ed. The influenza viruses. New York: Plenum: 361 – 429.
- Yip, T.K.S. 1976. Serological survey on the influenza antibody status in pigs of the Takwuling pig breeding centre. **Agric. Hong Kong** 1: 446 – 458.
- Yu, H., G.H. Zhang, R.H. Hua, Q. Zhang, T.Q. Liu, M. Liao and G.Z. Tong. 2007. Isolation and genetic analysis of human origin H1N1 and H3N2 influenza viruses from pigs in China. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 356: 91 – 96.
- Zebedee, S.L. and R.A. Lamb. 1989. Growth restriction of influenza A virus by M2 protein antibody is genetically linked to the M1 protein. **National Academy of Science, U.S.A.** 86: 1061 – 1065.
- Zhirnov, O.P., T.E. Konakova, W. Garten, and H.D. Klenk. 1999. Caspase – dependent N – terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. **J. Virol.** 73: 10158 – 10163.

Zhou, N.N., D.A.Senne, J.S. Landgraf, S.L. Swenson, G. Erickson, K. Rossow, L. Liu, K. J. Yoon, S. Krauss and R.G. Webster. 1999. Genetic reassortment of avian, swine and human influenza A viruses in American pigs. **J. Virol.** 73: 8851 – 8556.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นัฏศิริรินทร์ นาคเหตุทัย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	5 พฤษภาคม 2526
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลมหาราช นครราชสีมา
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการสัตวแพทย์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-