



แบบสรุปผู้บริหาร

แผนงานวิจัยการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประเทศไทย:
เชื้อไวรัสไข้หวัดนก และไข้หวัดใหญ่สุกร

**Research program on the study of influenza A in Thailand:
avian influenza and swine influenza viruses**

โดย

อลงกร อมรศิลป์ และ คณะ

กันยายน 2554

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยบูรณาการ จากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
และผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของผู้วิจัยแต่ผู้เดียว

ปีงบประมาณ 2553

แบบสรุปผู้บริหาร
(Executive Summary)
สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

ภาษาไทย	แผนงานวิจัยการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประเทศไทย: เชื้อไวรัส ไข้หวัดนก และไข้หวัดใหญ่สุกร
ภาษาอังกฤษ	Research program on the study of influenza A in Thailand: avian influenza and swine influenza viruses

แผนงานวิจัยนี้ประกอบด้วย 4 โครงการวิจัยคือ

โครงการที่ 1 การศึกษาบทบาทของนกกระทาในการทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสม
ชนิดใหม่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่
(Genetic reassortment of influenza viruses using quail as mixing vessel model)

โครงการที่ 2 การสำรวจหาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ
(Investigation of cross-species transmission of avian, human & swine influenza A
viruses)

โครงการที่ 3 การศึกษานำร่องในการพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ: ชุดตรวจสอบสารพันธุกรรม
และชุดตรวจแอนติบอดี
(Preliminary study on the development of test kits for influenza A viruses: nucleic acid
and antibody tests)

โครงการที่ 4 การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในฟาร์มสุกรในปี
2010
(Monitoring of genetic changes of 2010 swine influenza viruses in swine farms)

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

ผู้อำนวยการแผนงาน	รศ. น.สพ. ดร. อลงกร อมรศิลป์
	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	ถนน อังรีตุนันท์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
	โทรศัพท์ 0-2218-9577 โทรสาร 0-2218-9577
	Email: Alongkorn.a@chula.ac.th

ที่ปรึกษาแผนงานวิจัย

ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศ. น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวัฒน์

หน่วยชั้นสูติโรคลัสต์ และภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมงานวิจัย**หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 1** รศ. น.สพ. ดร. สมศักดิ์ ภัคภิบาล

หน่วยโรคผิวหนัง ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 2 รศ. น.สพ. ดร. อลงกร อมรศิลป์

หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ อ. สพ.ญ ดร. จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ

หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 3 รศ. น.สพ. ดร. อลงกร อมรศิลป์

หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 4 รศ. สพ.ญ ดร. สันนิภา สุรชาติ

หัวหน้าศูนย์วิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2553.....งบประมาณที่ได้รับ.....4,300,000.....บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย.....1.ปี..... ตั้งแต่....7..พฤษภาคม..2553..ถึง..6..พฤษภาคม..2554

2. สรุปโครงการวิจัย

ความเป็นมาของแผนงานวิจัย

โรคไข้หวัดใหญ่ (Influenza) เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Influenza type A virus) ในประเทศไทยเชื้อไข้หวัดใหญ่ทำให้เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดรวมทั้งคน แผนงานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประเทศไทย ทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกและไข้หวัดใหญ่สุกร เพื่อนำไปสู่การเฝ้าระวัง การควบคุมและการป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ในคนและสัตว์ แผนงานวิจัยนี้ประกอบด้วยโครงการวิจัย 4 โครงการเพื่อศึกษาข้อมูล 1) บทบาทของนกกระทาในการทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ 2) อุบัติการณ์ของการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ โดยเฉพาะในประชากรสัตว์และคนที่เป็นกลุ่มเสี่ยง 3) การพัฒนานำร่องชุดตรวจสอบพันธุกรรมแบบง่ายด้วยวิธี PCR-LAMP และชุดตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี NP-ELISA 4) การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในช่วงปี 2553-2554

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย คือการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประเทศไทย ทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกและไข้หวัดใหญ่สุกร เพื่อนำไปสู่การเฝ้าระวัง การควบคุมและการป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ในคนและสัตว์ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของแต่ละโครงการประกอบด้วย

โครงการวิจัยที่ 1. การศึกษาบทบาทของนกกระทาในการทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่

วัตถุประสงค์เชิงกิจกรรมของโครงการประกอบด้วย

- 1.1 การเตรียมสัตว์ทดลองและการให้เชื้อไวรัส
- 1.2. การสังเกตอาการทางคลินิก การตรวจทางพยาธิวิทยา การศึกษาการปลดปล่อยไวรัส
- 1.3. การศึกษาไวรัสลูกผสม

โครงการวิจัยที่ 2. การสำรวจหาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

วัตถุประสงค์เชิงกิจกรรมของโครงการประกอบด้วย

- 2.1 การคัดเลือกกลุ่มเป้าหมาย (ประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อ)
- 2.2 การเก็บตัวอย่างเลือดในคนและสุกร
- 2.3 การตรวจตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี hemagglutination-inhibition (HI) test

- โครงการวิจัยที่ 3. การศึกษานำร่องในการพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ: ชุดตรวจสอบพันธุกรรม และชุดตรวจแอนติบอดี
วัตถุประสงค์เชิงกิจกรรมของโครงการประกอบด้วย
- 3.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบสารพันธุกรรมแบบง่าย เพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ
 - 3.2 การพัฒนาชุดตรวจแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสัตว์หลายชนิด
- โครงการวิจัยที่ 4. การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในฟาร์มสุกรในปี 2010
วัตถุประสงค์เชิงกิจกรรมของโครงการประกอบด้วย
- 4.1 เก็บตัวอย่างจากสุกรในฟาร์ม และเพาะแยกเชื้อและตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร
 - 4.2 ถอดรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร
 - 4.3 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย

ผลการวิจัย กลุ่มเป้าหมาย ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการ และการนำไปใช้ประโยชน์

ผลการวิจัยการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประเทศไทย ทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกและไข้หวัดใหญ่สุกร เมื่อศึกษาบทบาทของนกกระทาต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ พบว่านกกระทามีความไวและสามารถติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ได้ โดยที่เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในนกกระทา และนกกระทาปลดปล่อยไวรัสในระบบทางเดินหายใจ นอกจากนี้ยังพบว่านกกระทาสามารถทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ได้ เมื่อศึกษาการติดเชื้อหรือการมีแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรและเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน ในสุกรและคนในฟาร์มสุกรในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554 พบว่าสุกรมีแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1, H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 เช่นเดียวกับคนในฟาร์มสุกรมีแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1, H3N2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสุกรและคนสามารถติดเชื้อข้ามระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรและเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน (โดยเฉพาะเชื้อไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009) และประชากรคนกลุ่มเสี่ยงที่พบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่มาก คือกลุ่มที่ทำงานใกล้ชิดกับสุกร เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในฟาร์มสุกรในประเทศไทยระหว่างปีพ.ศ. 2553-2554 พบว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสได้ 4 ตัวอย่างและจำแนกสายพันธุ์เป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรประจำถิ่น (swH1N1) จำนวน 2 ตัวอย่าง และเป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่ 2009 (pH1N1) จำนวน 2 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าในปีพ.ศ. 2553-2554 สุกรในฟาร์มส่วนใหญ่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรประจำถิ่น (swH1N1) และเชื้อไข้หวัดใหญ่ 2009 (pH1N1) โดยที่เชื้อไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้มีรหัสพันธุกรรมที่หลากหลายและแตกต่างกัน เมื่อศึกษาพัฒนานำร่องชุดตรวจสอบสารพันธุกรรมและชุดตรวจแอนติบอดี สำหรับตรวจพิสูจน์เชื้อไข้หวัดใหญ่ พบว่าได้พัฒนานำร่องชุดตรวจสอบสารพันธุกรรมแบบง่าย (PCR-LAMP) ซึ่งทดสอบแล้วว่าเป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะ

และความแม่นยำในระดับสูง แต่มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับที่ไม่น่าพอใจ ดังนั้นจึงยังไม่ควรนำชุดตรวจไปทดสอบยังสถานที่จริงหรือในฟาร์ม และควรมีการปรับปรุงวิธี PCR-LAMP ให้คงที่ นอกจากนี้ยังพัฒนานำร่องชุดตรวจแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไขหวัดใหญ่ชนิดเอ (NP-ELISA) โดยได้โปรตีน NP สำหรับพัฒนา ELISA ต่อไป อย่างไรก็ตามการวิจัยครั้งนี้ยังไม่ได้พัฒนาเป็นชุดตรวจ NP-ELISA เนื่องจากโปรตีนที่ได้ มีความจำเพาะต่ำและมีปริมาณน้อย

ผลการวิจัยครั้งนี้กลุ่มเป้าหมายที่จะได้รับประโยชน์จากแผนงานวิจัย คือหน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้อง เช่น กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช โดยสามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยไปใช้ในการประกอบการวางแผนการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคไขหวัดใหญ่ในคนและสัตว์ เช่น ข้อมูลนกกระทาสามารถทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ได้ ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคไขหวัดใหญ่ควรมุ่งเน้นไปยังการเฝ้าระวังเชื้อไขหวัดใหญ่ในนกกระทา รวมทั้งข้อมูลสุกรและคนสามารถติดเชื้อข้ามระหว่างเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรและเชื้อไขหวัดใหญ่ในคน ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังโรคไขหวัดใหญ่ในประชากรคนกลุ่มเสี่ยงและสุกรอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้สุกรในฟาร์มสามารถติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรประจำถิ่นและเชื้อไขหวัดใหญ่ H1N1 2009 ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคในสุกรก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน การพัฒนานำร่องชุดตรวจเพื่อการตรวจพิสูจน์เชื้อไขหวัดใหญ่ จะมีประโยชน์ต่อหน่วยงานต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน รวมทั้งสถาบันการศึกษา เมื่อมีการถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อสามารถนำไปใช้และปฏิบัติงานได้จริงในอนาคต

ผลงานวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ โดยนำเสนอข้อมูลที่ได้ไปยังหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการวางแผนควบคุมป้องกันการระบาดของเชื้อไขหวัดใหญ่ชนิดเอทั้งในสัตว์และมนุษย์ โดยให้ข้อเสนอที่สำคัญคือ การเฝ้าระวังโรคไขหวัดใหญ่ นอกจากจะให้ความสำคัญในการเฝ้าระวังโรคไขหวัดใหญ่ในไก่และเป็ดแล้ว ควร มุ่งเน้นการเฝ้าระวังโรคไขหวัดใหญ่ในนกกระทาและสุกร ทั้งนี้เนื่องจากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่า นกกระทาเมื่อติดเชื้อไขหวัดใหญ่สัตว์ปีกและเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรแล้ว สามารถปลดปล่อยเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ และนกกระทาสามารถทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ได้ เช่นเดียวกับสุกรที่สามารถติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรและเชื้อไขหวัดใหญ่ในคน และสุกรก็มีรายงานว่า เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ได้เช่นกัน นอกจากนี้ผลการวิจัยยังชี้ถึงการติดเชื้อข้ามระหว่างเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรและเชื้อไขหวัดใหญ่ในคนในสุกรและคนในฟาร์ม ซึ่งแสดงถึงปัจจัยเสี่ยงด้านอาชีพต่อการเกิดโรคไขหวัดใหญ่ ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคในคนในประชากรกลุ่มเสี่ยงก็มีความสำคัญและต้องคำนึงถึง การพัฒนานำร่องของชุดตรวจสารพันธุกรรมและชุดตรวจแอนติบอดีเพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อไขหวัดใหญ่ จะเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาชุดตรวจที่มีประสิทธิภาพและมีประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรคในสัตว์ปีกและสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะสำหรับการต่อยอดผลงานวิจัย ควรสนับสนุนการเฝ้าระวังโรคและเชื้อไขหวัดใหญ่อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะสัตว์ที่มีความไวต่อโรคไขหวัดใหญ่ (สัตว์ปีก) สัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค (เป็ด นกน้ำ และนกป่า) และสัตว์ที่สามารถเป็นโฮสต์ตัวกลาง (นกกระทาและสุกร) โดยเฉพาะการเฝ้าระวังโรคไขหวัดใหญ่ในสุกร ซึ่งมี

ความสำคัญและมีหลักฐานเด่นชัดในการติดเชื้อข้ามระหว่างเชื้อไข้วัดใหญ่ในสุกรและคน นอกจากนี้การสนับสนุนต่อยอดการพัฒนาชุดตรวจสอบสารพันธุกรรมและชุดตรวจแอนติบอดีเพื่อการตรวจพิสูจน์เชื้อไข้วัดใหญ่ จะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรคไข้วัดใหญ่ และอาจพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

ชื่อแผนงานวิจัย แผนงานวิจัยการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประเทศไทย: เชื้อไวรัส ไข้หวัดนก และไข้หวัดใหญ่สุกร

บทคัดย่อ

โรคไข้หวัดใหญ่ (Influenza) เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Influenza type A virus) ในประเทศไทยเชื้อไข้หวัดใหญ่ทำให้การระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดรวมทั้งคน แผนงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประเทศไทย ทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกและไข้หวัดใหญ่สุกร เพื่อนำไปสู่การเฝ้าระวัง การควบคุมและการป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ในคนและสัตว์ในอนาคต วิธีดำเนินแผนงานวิจัยประกอบด้วยโครงการวิจัย 4 โครงการ คือ โครงการที่ 1 การศึกษาบทบาทของนกกระทาในการทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ โครงการที่ 2 การสำรวจหาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ โครงการที่ 3 การศึกษานำร่องในการพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ: ชุดตรวจสอบสารพันธุกรรมและชุดตรวจแอนติบอดี โครงการที่ 4 การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในฟาร์มสุกรในปี 2010 ผลของแผนงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า 1) เชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 สามารถเพิ่มจำนวนได้ในนกกระทา และนกกระทาสสามารถปลดปล่อยไวรัสออกมาทางระบบทางเดินหายใจ และสรุปได้ว่า นกกระทาสสามารถทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ได้ 2) สุกรและคนสามารถติดเชื้อข้ามระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรและเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน (โดยเฉพาะเชื้อไข้หวัดใหญ่ 2009) และประชากรคนกลุ่มเสี่ยงที่พบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่มาก คือกลุ่มที่ทำงานใกล้ชิดกับสุกร 3) สามารถพัฒนานำร่อง ชุดตรวจสอบสารพันธุกรรมแบบง่าย (PCR-LAMP) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำในระดับสูง แต่มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับที่ไม่น่าพอใจ และพัฒนานำร่องชุดตรวจแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (NP-ELISA) โดยได้โปรตีน NP สำหรับพัฒนา ELISA assay ต่อไป 4) ในปีพ.ศ. 2553-2554 ได้ตรวจพบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรประจำถิ่น (swH1N1) และเชื้อไข้หวัดใหญ่ 2009 (pH1N1) ในฟาร์มสุกรโดยที่เชื้อไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้มีรหัสพันธุกรรมที่หลากหลายและแตกต่างกัน โดยสรุปประโยชน์ของแผนงานวิจัยครั้งนี้ คือได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประเทศไทย ทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกและไข้หวัดใหญ่สุกร เช่น 1) ได้ทราบความไวของนกกระทาต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ และได้ข้อมูลในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในนกกระทา 2) ได้ข้อมูลของขอบเขตและแนวโน้มของปัญหาโรคไข้หวัดใหญ่สุกรสุคนและโรคไข้หวัดใหญ่ในคนสู่สุกร รวมทั้งปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค 3) ได้พัฒนานำร่องชุดตรวจสอบเพื่อไปใช้ได้จริงในห้องปฏิบัติการ และนำไปใช้ในการเฝ้าระวังโรคไข้หวัดใหญ่ในสัตว์และคน 4) ได้ข้อมูลการเกิดโรค ชนิดสายพันธุ์ การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ ระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย อันจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการเฝ้าระวัง การควบคุมและการป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ในคนและสัตว์ในอนาคต

Research program: Research program on the study of influenza A in Thailand: avian influenza and swine influenza viruses

Abstract

Influenza is caused by influenza type A virus. In Thailand, influenza A viruses cause disease outbreaks in avian and mammal species as well as human. The objective of this research program is to study influenza A viruses in Thailand including avian influenza and swine influenza viruses for the overall goal of monitoring, control and prevention of influenza in human and animals. This research program composes of 4 projects following: project 1: Genetic reassortment of influenza viruses using quail as mixing vessel model, project 2: Investigation of cross-species transmission of influenza A viruses, project 3: Preliminary study on the development of test kits for influenza A viruses: nucleic acid and antibody tests, and project 4: Monitoring of genetic changes of 2010 swine influenza viruses in swine farms. The results of the research projects were 1) Low pathogenic avian influenza H3N2 and swine influenza H1N1 viruses can replicate in quails. The viruses were released and shed in respiratory tract of the birds. Moreover, reassortment of influenza viruses was found in quails as mixing vessel model. 2) Serological study showed interspecies transmission of influenza viruses (especially pandemic H1N1 2009) between pigs and human. Occupational risk of influenza transmission was identified. Humans who were in close contact with animals had high risk. 3) The PCR-LAMP assay was developed. The assay had high sensitivity, specificity and validity with moderate reliability. In addition, the cloned NP protein was available for the development of NP-ELISA. 4) In 2010-2011, the endemic swine influenza viruses (swH1N1) and pandemic H1N1 2009 (pH1N1) were isolated from swine farms. The viruses were clustered into different groups with some nucleotide polymorphisms. In summary, the benefit of this research program is providing the useful information of influenza A viruses in Thailand (both avian influenza and swine influenza). For examples 1) quail susceptibility to influenza infection and role of quail as mixing vessel were clearly shown. 2). Information of interspecies transmission of swine influenza in human and human influenza in swine was shown. Moreover, occupational risk of influenza interspecies transmission was identified. 3). Nucleic acid and antibody test kits for influenza detection were preliminarily developed and used in the laboratory. In addition, application to the field for monitoring of influenza in animals and human will be very useful. 4). Information of swine influenza viruses, subtype, genetic changes and mutation as well as molecular epidemiology of the viruses in Thailand was provided. In conclusion, the information gained from this research program will be very useful for planning and development of the monitoring, control and prevention programs of influenza in human and animals in the future.

โครงการวิจัยที่ 1

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาบทบาทของนกกระทาในการทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัส ลูกผสมชนิดใหม่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่

บทคัดย่อ

เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (influenza virus type A) เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกหลายชนิด การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในนกกระทา และศึกษาบทบาทของนกกระทาในการทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ วิธีดำเนินการวิจัยประกอบด้วย ระยะที่ 1 การเตรียมสัตว์ทดลองและการให้เชื้อไวรัส ระยะที่ 2 การสังเกตอาการทางคลินิก การตรวจทางพยาธิวิทยา การศึกษาการปลดปล่อยไวรัส และระยะที่ 3 การศึกษาไวรัสลูกผสม โดยการวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองให้เชื้อไวรัสแก่นกกระทาจานวน 6 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกชนิดไม่รุนแรง H3N2 (n=15) กลุ่มที่ 2 ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 (n=15) กลุ่มที่ 3 กลุ่ม co-infection (H1N1 & H3N2) (n=15) กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุมลบ (n=15) กลุ่มที่ 5 กลุ่มการติดต่อเชื้อจากนกในกลุ่มที่ 1 (n=5) กลุ่มที่ 6 กลุ่มการติดต่อเชื้อจากนกในกลุ่มที่ 2 (n=5) ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 รวมทั้งการติดเชื้อร่วมทั้งสองสายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อและไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ในนกกระทา โดยนกกระทาที่ได้รับเชื้อมีอาการปกติและไม่พบการป่วยตายจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง นกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดชนิดไม่รุนแรง H3N2 และนกกระทาที่ได้รับเชื้อ co-infection พบมีรอยโรคทางพยาธิและจุลพยาธิรุนแรงกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งนกกระทาที่ได้รับเชื้อ co-infection จะปลดปล่อยไวรัสออกมาปริมาณสูงกว่านกกระทาที่ได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และนกกระทาที่เป็น contact birds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ผลการวิจัยพบว่านกกระทาสามารถทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ได้ โดยพบเชื้อไวรัสลูกผสม (reassortant genotype) จากการปลดปล่อยไวรัสออกมาทางท่อลมของนกกระทาจานวน 1 isolate จาก plaque-purified viruses ซึ่งเชื้อไวรัสลูกผสมเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H3N1 ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน 7 ยีนมาจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกชนิดไม่รุนแรง H3N2 ยกเว้นยีน NA ของเชื้อไวรัสลูกผสมที่มาจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 การวิจัยครั้งนี้มีประโยชน์คือ ทำให้ทราบความไวของนกกระทาต่อการติดเชื้อและเกิดโรคจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกชนิดไม่รุนแรง H3N2 และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 รวมทั้งได้ข้อมูลในการผลิตไวรัสลูกผสมชนิดใหม่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในนกกระทา และสามารถนำข้อมูลที่ได้มาประกอบการวางแผนควบคุมป้องกันการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ทั้งในประชากรสัตว์และประชากรมนุษย์ต่อไป

Project 1: Genetic reassortment of influenza viruses using quail as mixing vessel model**Abstract**

Influenza A virus causes influenza in several avian species. The objectives of this study are to study influenza A virus infection in quails and role of quails as mixing vessel for new influenza reassortant. The study consisted of 3 steps including 1) animal and influenza virus preparations and challenges 2) clinical, pathological and viral shedding observations 3) genetic reassortment observation. In this study, quails were divided into 6 groups and challenged with: group 1) low pathogenic avian influenza H3N2 (n=15), group 2) swine influenza H1N1 (n=15), group 3) co-infection (H1N1 & H3N2) (n=15), group 4) negative control (n=15), group 5) contact birds in group 1 (n=5) and group 6) contact birds in group 2 (n=5). The results showed that low pathogenic avian influenza virus (H3N2) and swine influenza virus (H1N1) as well as co-infection (H3N2 & H1N1) could infect and replicate in quails. Quails showed no clinical signs and no mortality by the end of the experiment (day 7). Quails in group 1 (low pathogenic avian influenza H3N2) and group 3 (co-infection) showed more severe pathogenic and histopathogenic lesions than animals in group 2 (swine influenza H1N1), group 5 and 6 (contact birds), with statistically significant. In addition, quails in co-infection group (group 3) had higher viral shedding than quails infected with low pathogenic avian influenza H3N2 (group 1) and swine influenza H1N1 (group 2) and contact birds (group 5 and 6). The results from the study also confirmed that quails could serve as mixing vessel for new influenza reassortants. One new reassortant genotype, H3N1, was identified from tracheal swab of a quail by plaque-purification. The genetic of H3N1 virus revealed that 7 genes were acquired from low pathogenic avian influenza H3N2, while NA gene was acquired from swine influenza H1N1. In summary, this study provided information of sensitivity of quails with the infection of low pathogenic avian influenza H3N2 and swine influenza H1N1 viruses as well as the information of new influenza reassortant from quails as mixing vessel. The information gained from the study can be used for the prevention and control influenza A virus infection in both human and animal populations.

โครงการวิจัยที่ 2

ชื่อโครงการวิจัย การสำรวจหาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

บทคัดย่อ

เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ 3 สายพันธุ์ H1N1 H1N2 และ H3N2 ทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ในสุกรทั่วโลก และสามารถติดเชื้อและทำให้เกิดโรคได้ในคน การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ โดยเฉพาะการติดเชื้อข้ามในสุกรและคนในฟาร์มสุกร ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรและเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน วิธีดำเนินการวิจัยประกอบด้วย ระยะที่ 1 การคัดเลือกกลุ่มเป้าหมาย (ประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อ) ระยะที่ 2 การเก็บตัวอย่างเลือดในคนและสุกร และระยะที่ 3 การตรวจตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี hemagglutination-inhibition (HI) test โดยการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างซีรัมสุกรจำนวน 501 ตัวอย่าง จากฟาร์มสุกร 11 ฟาร์มในจังหวัดสระบุรี ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี นครสวรรค์ พิษณุโลก ชลบุรี และปราจีนบุรี ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่น และตัวอย่างซีรัมคนจำนวน 301 ตัวอย่าง จากฟาร์มสุกรจำนวน 2 ฟาร์มในจังหวัดราชบุรีและชลบุรี เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร (swH1N1-06, swH3N2-07, pH1N1-09) และเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน (huH1N1-07) รวมทั้ง homologous strains (SA43-H1N1-09, RC15-H1N1-09 และ PS73-H1N1-10) ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า สุกรมีแอนติบอดีต่อ swH1N1-06 มากที่สุด (62%) รองลงมาเป็น homologous strains ในฟาร์มสุกร และ pH1N1-09 ในขณะที่พบสุกรมีแอนติบอดีต่อ swH3N2-07 น้อยที่สุด เมื่อวิเคราะห์ตามกลุ่มอายุสุกร พบการกระจายของสุกรที่มีแอนติบอดีต่อ swH1N1-06 สูงในทุกกลุ่มอายุ นอกจากนี้ ผลการวิจัยยังพบว่า คนในฟาร์มสุกรมีแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร (swH1N1-06, swH3N2-07 และ pH1N1-09) มากกว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน (huH1N1-07) และพบว่าพนักงานทุกกลุ่มหน้าที่ในฟาร์ม มีแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร (swH1N1-06) โดยที่สัตว์แพทย์มีแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมากที่สุด รองลงมาเป็นพนักงานในเล้าสุกร โดยสรุปผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สุกรและคนสามารถติดเชื้อข้ามระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรและเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน และประชากรคนกลุ่มเสี่ยงที่พบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่มาก คือกลุ่มที่ทำงานใกล้ชิดกับสุกร ประโยชน์ของการวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลของขอบเขตและแนวโน้มของปัญหาโรคไข้หวัดใหญ่สุกรสู่คนและโรคไข้หวัดใหญ่ในคนสู่สุกร รวมทั้งแสดงปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค โดยเฉพาะการแพร่กระจายของโรคที่อาจมีผลมาจากปัจจัยด้านอาชีพ เพื่อวางแผนแนวทางการจัดการเพื่อลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค และวางแผนควบคุมและป้องกันการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสุกรและคนต่อไป

Project 2: Investigation of cross-species transmission of avian, human & swine influenza A viruses

Abstract

Influenza A virus subtype H1N1, H1N2 and H3N2 cause influenza in swine worldwide and can infect and cause influenza in humans. The objective of this project is to investigate the cross-species transmission of influenza viruses in swine and human in swine farms. This project composed of 3 phases including phase 1) selection of target population (high risk population), phase 2) blood sample collection from humans and swines, and phase 3) serum testing by using hemagglutination-inhibition (HI) test. Five hundred and one swine serum samples were collected from 11 swine farms in the provinces with high density of swine populations (Saraburi, Ratchaburi, Nakhon Pathom, Suphanburi, Nakhon Sawan, Phitsanulok, Chonburi and Prachinburi). Three hundred and one human serum samples were also collected from 2 swine farms in Ratchaburi and Chonburi. All serum samples were subjected for antibody titer test against swine influenza viruses (swH1N1-06, swH3N2-07, pH1N1-09), human influenza virus (huH1N1-07) and homologous viruses (SA43-H1N1-09, RC15-H1N1-09, PS73-H1N1-10). The result showed that swine had highest antibody titer against swH1N1-06 (62%) and then homologous strains, pH1N1-09 and swH3N2-07, respectively. Swine of all age groups had highest antibody titer against swH1N1-06. The results also showed that human working in swine farms had antibody against swH1N1-06, swH3N2-07, pH1N1-09 more than huH1N1-07. In addition, human of all occupations had antibody against swH1N1-06. The highest antibody titers were found in veterinarian and swine caretakers, respectively. In summary the results showed the evidence of cross-species transmission of swine influenza and human influenza viruses. High risk populations were those who in direct contact with the animals. The benefit of the study is baseline information of inter-species transmission of swine influenza virus in humans and human influenza virus in swine. Occupational risk for influenza infection was also identified and should be focused to reduce the risks. The information gained from the study can be used for planning influenza prevention and control strategies in swine and human in the future.

โครงการวิจัยที่ 3

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษานำร่องในการพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไขหวัดใหญ่ชนิดเอ: ชุดตรวจสอบ
พันธุกรรม และชุดตรวจแอนติบอดี

บทคัดย่อ

การตรวจหาเชื้อไขหวัดใหญ่สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ การตรวจพิสูจน์แอนติเจนของเชื้อไวรัส และการตรวจพิสูจน์แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไขหวัดใหญ่ชนิดเอ ประกอบด้วย 1) การพัฒนาชุดตรวจสอบสารพันธุกรรมแบบง่ายเพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อไขหวัดใหญ่ชนิดเอ (PCR-LAMP) และ 2) การพัฒนาชุดตรวจแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไขหวัดใหญ่ชนิดเอในสัตว์หลายชนิด (NP-ELISA) วิจัยดำเนินการวิจัยการพัฒนาชุดตรวจสอบสารพันธุกรรมประกอบด้วย ระยะที่ 1 การเตรียมเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง ระยะที่ 2 การพัฒนาชุดตรวจสอบ (M gene) และระยะที่ 3 การทดสอบการใช้งานชุดตรวจสอบสำหรับใช้ในฟาร์มและสถานที่จริง โดยผลการวิจัยครั้งนี้ได้ออกแบบ primers จำนวน 4 สายที่จำเพาะต่อยีน M และได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธี PCR-LAMP คือ อุณหภูมิ 63 ° C 60 นาที และความเข้มข้นของ *Bst* DNA polymerase 1 Unit และ MgSO_4 6 mM วิธี PCR-LAMP นี้มีความสามารถในการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสได้ในปริมาณ 10^2 EID 50 หรือเทียบเท่ากับ RNA ที่ 1.7 pg และผลการทดสอบพบว่า วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูง 100% และมีความแม่นยำสูง 88-100% และความน่าเชื่อถือถึง 83.33% และเมื่อนำชุดทดสอบไปใช้งานกับตัวอย่างจากสถานที่จริง ชุดตรวจสอบให้ผลสอดคล้องกับวิธีมาตรฐานที่ปฏิบัติในห้องปฏิบัติการเพียง 76.92% ซึ่งถือว่าน้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้ โดยสรุปสามารถพัฒนานำร่องชุดตรวจสอบสารพันธุกรรมแบบง่าย ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำในระดับสูง แต่มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับที่ไม่น่าพอใจ ทั้งนี้ควรมีการปรับปรุงวิธี PCR-LAMP ให้คงที่ สำหรับวิธีดำเนินการวิจัยการพัฒนาชุดตรวจแอนติบอดี ประกอบด้วยระยะที่ 1 การออกแบบ primers และการ cloning NP gene ระยะที่ 2 การทำ protein expression และระยะที่ 3 ELISA preparation โดยผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า ได้ clone NP gene ใน vector system และได้โปรตีนขนาด 68 kDa และได้ทดสอบ NP- expressed protein เบื้องต้นกับ positive และ negative control serum อย่างไรก็ตามผลการทดสอบพบว่า NP- expressed protein มีความจำเพาะต่ำและมีปริมาณน้อย โดยสรุปการศึกษานี้ได้ผลิต และทดสอบ NP- expressed protein แต่ยังไม่สามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไขหวัดใหญ่ชนิดเอ (NP-ELISA) ได้เสร็จสมบูรณ์ ประโยชน์ของการวิจัยครั้งนี้คือ 1) การพัฒนาชุดตรวจสอบสารพันธุกรรมแบบง่าย จะสามารถนำชุดตรวจสอบไปใช้ได้จริงในห้องปฏิบัติการและในพื้นที่จริงในอนาคต และจะมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจคัดกรองโรคไขหวัดใหญ่ในสัตว์ปีกและนกอพยพ 2) การพัฒนาชุดตรวจแอนติบอดี จะสามารถนำชุดตรวจสอบไปใช้ได้กับสัตว์หลายชนิด และมีประโยชน์ในการศึกษาการติดเชื้อข้ามในสัตว์และคน

Project 3: Preliminary study on the development of test kits for influenza A viruses: nucleic acid and antibody tests

Abstract

Detection of influenza A virus can be applied by 2 major approaches, the identification of antigen and antibody. The objectives of this study is to develop test kits for influenza A viruses including 1) the development of rapid nucleic acid test for influenza A virus (PCR-LAMP) and 2) the development of antibody test for influenza A virus infection (NP-ELISA). The PCR-LAMP development composes of 3 phases including, phase 1) preparation of reference influenza strains, phase 2) development of nucleic acid test for M gene, and phase 3) application of nucleic acid test in the farms. PCR-LAMP was developed by designing 4 M-gene specific primers and testing for optimized conditions. The optimized conditions for PCR-LAMP was incubation at temperature 63 ° C for 60 min with *Bst* DNA polymerase 1 Unit and MgSO₄ 6 mM. The minimum detectable concentration for the PCR-LAMP was 10² EID₅₀ or 1.7 pg of RNA. This assay had high sensitivity and specificity (100%) with 88-100% validity and 83.33% reliability. However, PCR-LAMP had moderate concordance with standard tests (76.92%) when applied to field samples. In summary, this study had developed rapid nucleic acid test with high sensitivity, high specificity and high validity with moderate reliability. However, evaluation of conditions and reagents for PCR-LAMP should be conducted for improving the assay. The NP-ELISA development composes of 3 phases including, phase 1) cloning of NP gene, phase 2) protein expression, and phase 3) ELISA preparation. The results showed that NP gene had been cloned into vector system and expressed expected NP-protein of 68 kDa. The NP-expressed protein was examined with positive and negative control serum. However, the result showed that NP-expressed protein had low specificity and only small amount of protein was produced. In summary, this study had provided NP-expressed protein, however the NP-ELISA was not yet available, since the protein had low specificity and low yield. The benefits of the study are 1) rapid nucleic acid test (PCR-LAMP) can be applied for the laboratories and fields in the future and can be used as rapid influenza screening test for monitoring of influenza in avian and wild bird species, 2 antibody test (NP-ELISA) can be used for testing influenza infection in several animal species and will be useful for monitoring inter-species transmission.

โครงการวิจัยที่ 4

ชื่อโครงการวิจัย การเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรในฟาร์มสุกร ในปี 2010

บทคัดย่อ

โรคไขหวัดใหญ่สุกรเกิดจากเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร โดยในสุกรพบเชื้อไขหวัดใหญ่ชนิดเอสายพันธุ์ H1N1, H1N2 และ H3N2 แพร่ระบาดอยู่ในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรในฟาร์มสุกร โดยการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มสุกร ตรวจพิสูจน์และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรที่แยกได้จากฟาร์มสุกรในประเทศไทยระหว่างปีพ.ศ. 2553-2554 วิธีดำเนินการวิจัยประกอบด้วย ระยะที่ 1 การเก็บตัวอย่างจากสุกรในฟาร์ม และเพาะแยกเชื้อและตรวจพิสูจน์เชื้อไขหวัดใหญ่สุกร ระยะที่ 2 การถอดรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร และระยะที่ 3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย โดยผลการวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างจากการป้ายจมูกจำนวน 600 ตัวอย่าง และปอดจำนวน 14 ตัวอย่าง จากฟาร์มสุกร 13 ฟาร์ม ใน 7 จังหวัด ในเขตภาคกลางและภาคตะวันออก ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไขหวัดใหญ่สุกรพบว่า มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ M gene ของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรจำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.3% และเมื่อเพาะแยกเชื้อไวรัสสามารถแยกเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรได้ 4 ตัวอย่าง คือ A/swine/Thailand/CU-SPL2/2010 (H1N1), A/swine/Thailand/CU-SPL4/2010 (H1N1), A/swine/Thailand/CU-SPN47/2010 (H1N1) และ A/swine/Thailand/CU-SPN65/2010 (H1N1) และสามารถแยกสายพันธุ์ได้เป็น เชื้อไขหวัดใหญ่สุกรประจำถิ่น H1N1 (swH1N1) จำนวน 2 ตัวอย่าง และเป็นเชื้อไขหวัดใหญ่ H1N1 2009 (pH1N1) จำนวน 2 ตัวอย่าง และสามารถถอดรหัสพันธุกรรมทั้งหมด (8 ยีน) ของเชื้อไวรัสทั้ง 4 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพบว่า เชื้อไวรัสทั้ง 4 ตัวอย่างมีลักษณะการจัดกลุ่มในแบบเดียวกันคือ HA gene เป็น classic swine lineage และ NA gene เป็น avian-like swine lineage อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ในรายละเอียดกลุ่มย่อยพบว่า กลุ่มเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรประจำถิ่น (swH1N1) และเชื้อไขหวัดใหญ่ 2009 (pH1N1) สามารถแยกกลุ่มย่อยจากกันอย่างชัดเจน ผลการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรได้วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ HA-cleavage site, receptor binding sites, glycosylation sites และ antigenic sites พบว่าเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนสูงที่ antigenic sites ประโยชน์ของการวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลลักษณะของการเกิดโรคไขหวัดใหญ่สุกร ซึ่งทำให้ทราบชนิดสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในฟาร์มสุกร ทราบข้อมูลการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร ทราบข้อมูลทางระบาดวิทยาาระดับโมเลกุลถึงที่มาของเชื้อ ซึ่งผลการเฝ้าระวังเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรนี้ทำให้สามารถที่จะวางแผนป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในฝูงสุกรได้ในอนาคต

Project 4: Monitoring of genetic changes of 2010 swine influenza viruses in swine farms**Abstract**

Swine influenza virus (SIV) causes influenza in swine population. SIV commonly found in swine are influenza A subtypes H1N1, H1N2 and H3N2 and spread in several countries worldwide. The objective of this project is to monitor genetic changes or mutations of SIV from swine farms during 2010-2011. This project composes of 3 phases including phase 1) sample collection from swine farms and SIV isolation and identification, phase 2) whole genome sequencing of the SIVs, and phase 3) analysis of genetic changes or mutations of SIV from Thailand. In this study, 600 nasal swab samples and 14 lung samples were collected from 13 swine farms in 7 provinces in central and eastern parts of Thailand. The results showed that 8 samples (1.3%) were positive for influenza virus (M gene). Four out of 8 samples were isolated and designated as A/swine/ Thailand/CU-SPL2/2010 (H1N1), A/swine/Thailand/CU-SPL4/2010 (H1N1), A/swine/Thailand/CU-SPN47 /2010 (H1N1) and A/swine/Thailand/CU-SPN65/2010 (H1N1). In detail, two isolates were identified as influenza virus subtype H1N1 circulating in Thai swine population (swH1N1) and 2 isolates were identified as pandemic influenza H1N1 2009 (pH1N1). In addition, whole genome sequences of all 4 SIV from the study were elucidated and subjected for genetic analysis. Phylogenetic analysis showed that HA gene of all 4 SIV were grouped into classic swine lineage and NA gene were clustered into avian-like swine lineage. However the swH1N1 and pH1N1 can be further separated into 2 subgroups of classic swine lineage. Genetic analysis showed that amino acids at HA cleavage site, receptor binding sites, glycosylation sites were conserved, while antigenic sites of the SIV contained high polymorphic amino acids. The benefits of the study include the information of SIV infection and subtype of SIV circulating in Thai swine farms, the information of genetic changes or mutations of SIV and the information of epidemiological origin of the viruses. The information gained from the study can be used for the prevention of SIV infection and transmission in swine.