



รายงานการวิจัย

การศึกษาความชุก ลักษณะทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์ถึงการติดเชื้อ
จากสัตว์สู่คนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกร
หนาแน่นในประเทศไทย

**The prevalence of swine influenza virus infection in pigs and genetic
characterization of the virus with evaluation of zoonotic potential in high pig
production provinces of Thailand**

โดย
ประวีณา กิตติคุณ และคณะ
กันยายน 2552

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
และผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของผู้วิจัยแต่ผู้เดียว
ปีงบประมาณ 2551

คำนำ

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร ทำให้สุกรมีการป่วยของระบบทางเดินหายใจได้โดยตรง และเมื่อมีการติดเชื้อร่วมกับเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียอื่นๆ ก็มักจะก่อความเสียหายในลักษณะของการเกิดการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจซับซ้อน ซึ่งโรคดังกล่าวก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในด้านการผลิตสุกรอย่างมาก นอกจากนี้โรคไข้หวัดใหญ่สุกรยังเป็นโรคสัตว์สู่คน ที่ทำให้ผู้ป่วยมีอาการทางระบบหายใจเช่นเดียวกัน และมีรายงานว่าทำให้คนป่วยถึงขั้นเสียชีวิตได้ การสำรวจเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมีความสำคัญยิ่ง เพราะสุกรถือเป็น intermediate host ระหว่างคนและสัตว์ปีก เนื่องจากสุกรมีความไวรับต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและไข้หวัดนก จึงทำให้โอกาสของการเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อทั้งสองในสุกรมีสูง และโอกาสในการแพร่กระจายของเชื้อจากสุกรสู่คนก็มีมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทราบข้อมูลพื้นฐานด้านความชุกและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย รายงานฉบับนี้รวบรวมข้อมูลจากการสำรวจติดตามเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรใน 4 จังหวัดของประเทศไทยที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น ได้แก่ ราชบุรี นครปฐม ชลบุรี และฉะเชิงเทรา โดยได้มีการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของเชื้อที่พบในปีปัจจุบัน และได้สำรวจทางซีรัมวิทยาเพื่อบ่งชี้ถึงปริมาณสุกร ฤดูกาลที่พบเชื้อ และกลุ่มอายุสุกรที่สัมผัสเชื้อ รวมทั้งได้ทำการสำรวจอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสู่คนในฟาร์มสุกรที่พบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการสำรวจและการรวบรวมข้อมูลงานวิจัยดังกล่าว จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการนำไปสู่การวางแผนเพื่อป้องกันและควบคุมการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรซึ่งจะนำไปสู่การวางแผนเพื่อลดโอกาสของการติดเชื้อข้ามระหว่างสุกรสู่คนได้ต่อไป

สพ.ญ.ดร. ประวีณา กิติคุณ

หัวหน้าโครงการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551 เพื่อการศึกษาโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในประชากรสุกรในจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่นของประเทศไทย รวมทั้งขอขอบพระคุณท่านคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้เสียสละเวลาพิจารณาอ่านผลงานวิจัยนี้และได้ให้ข้อเสนอแนะเพื่อเพิ่มคุณค่าของงานให้มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณทีมงานของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยซึ่งรวมทั้งนิสิต นักวิทยาศาสตร์ นายสัตวแพทย์และคณาจารย์ผู้ร่วมงานทุกท่านในภาควิชาพยาธิวิทยา หน่วยชันสูตรโรค สัตว์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณผู้ร่วมวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างเลือดจากคนที่เข้าร่วมโครงการวิจัยฯ

ขอขอบพระคุณสพ.ญ. เมตตา เมฆานนท์ ผศ.น.สพ.คัมภีร์ กอธีระกุล น.สพ. ชาณูณรงค์ โชติวรวิทย์ ศ.น.สพ.ดร.มงคล เดชะกำพุ รศ.น.สพ.ดร.เผด็จ ธรรมรักษ์ สพ.ญ. ช้องมาส อันตรเสน น.สพ. นันทศักดิ์ มุสิกศิลป์ สพ.ญ. สุชาติพิทย์ ประภัสสรภิญโญ สพ.ญ. อนิตา เสริมศักดิ์ศิริธร สพ.ญ. ชมพูนุท บุญยมณีนรัตน์ และ น.สพ.ธวัชชัย หุ่นสุวรรณที่ได้ให้ความร่วมในการเข้าฟาร์มสุกร รวมทั้งช่วยเหลือในด้านการเก็บตัวอย่างสุกร

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาความชุก ลักษณะทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์ถึงการติดเชื้อจากสัตว์สู่คนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นในประเทศไทย
The prevalence of swine influenza virus infection in pigs and genetic characterization of the virus with evaluation of zoonotic potential in high pig production provinces of Thailand

ชื่อผู้วิจัย อ.สพ.ญ.ดร. ประวีณา กิตติคุณ และคณะ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี..... 2551..... จำนวนเงิน 910,300..... บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย1.... ปี ตั้งแต่27.. ตุลาคม... พ.ศ. 2551... ถึง.... 27... กันยายน.. พ.ศ. 2552

บทคัดย่อ

เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรก่อโรคทางระบบทางเดินหายใจสุกร โดยเฉพาะโรคพอร์คไคซี (Porcine respiratory disease complex, PRDC) และยังเป็นโรคสัตว์สู่คน (Zoonosis) ที่มีผลต่อการสาธารณสุขอีกด้วย เนื่องจากปัจจุบันข้อมูลทางระบาดวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยมีน้อยมากและขาดช่วงการศึกษา งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งสำรวจเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรโดยศึกษาในระดับพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้จากภาคสนามและสำรวจอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสู่คน โดยได้ทำการศึกษาในฟาร์มสุกรใน 4 จังหวัดของประเทศไทยที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น ได้แก่ จังหวัดราชบุรี นครปฐม ชลบุรีและฉะเชิงเทรา ตั้งแต่เดือนกันยายนปี พ.ศ. 2551 ถึงสิงหาคมปี พ.ศ. 2552 โดยเก็บตัวอย่างซีรัมจากสุกรทุกกลุ่มอายุแบบตัดขวาง (Cross-sectional study) ในช่วงของการเปลี่ยนฤดูกาล เพื่อสำรวจหาความชุกของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1 และ H3 โดยการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อด้วยวิธียับยั้งการเกิดฮีโมแอกกลูตินิน และได้ทำการเก็บตัวอย่าง nasal swab และชิ้นเนื้อปอดจากสุกรที่แสดงอาการป่วยทางระบบทางเดินหายใจและสุกรปกติ เพื่อเพาะแยกและเพิ่มจำนวนเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร รวมทั้งทำการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการกลายพันธุ์กับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ได้เคยมีรายงานในอดีต ผลการวิเคราะห์ทางซีรัมวิทยาของซีรัมสุกรบ่งชี้ว่า สุกรที่สำรวจให้ผลบวกต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1 และ H3 ตลอดทั้งปี โดยระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H3 ไม่มีความแตกต่างกันในฤดูกาลหรือกลุ่มอายุสุกรที่สำรวจ ในขณะที่ผลบวกต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1 จะพบในฤดูหนาวสูงกว่าฤดูร้อน และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มอายุที่สำรวจเรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ แม่สุกร

สุกรขุนและลูกสุกรหย่านมตามลำดับ ผลการเพาะแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจากสุกรป่วย พบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรเฉพาะชนิด H1N1 และ H1N2 เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่เพาะแยกได้ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2552 พบว่า เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรยังคงมีทุกท่อนพันธุกรรมเป็นของสุกรซึ่งมีการผสมระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์สุกรในทวีปอเมริกาเหนือและในทวีปยุโรป เช่นเดียวกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ที่พบในประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2548-2549 ที่ผ่านมา แต่เชื้อที่ได้จากการศึกษามีความแตกต่างกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ที่ระบาดในคนเมื่อต้นปี พ.ศ. 2552 โดย ยีน HA ของเชื้อที่แยกได้ บ่งชี้ว่ามีการกลายพันธุ์และพบการดื้อต่อยา Oseltamivir ซึ่งแตกต่างกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร ในปี พ.ศ. 2548-2549 ที่ไม่พบการดื้อยาเลย ส่วนผลการศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสุคน พบว่าผู้ที่มีการสัมผัสสุกร ซึ่งรวมถึงผู้ที่อาศัยอยู่ในฟาร์มสุกร มีโอกาสในการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในฟาร์มได้สูงกว่าคนทั่วไปที่ไม่ได้สัมผัสสุกรหรือกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากคนที่อยู่ในเมืองมากกว่า 24 เท่า

ข้อมูลงานวิจัยทั้งหมดที่ได้กล่าวมานี้เป็นข้อมูลพื้นฐานของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในประเทศไทย ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งทางระบาดวิทยาของเชื้อ สามารถใช้ในการวางแผนป้องกันโรคระบบทางเดินหายใจในสุกรที่พบมากตามฤดูกาล ส่วนข้อมูลที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรข้ามสู่คนในกลุ่มคนที่ทำงานในฟาร์มสุกรในประเทศไทยเป็นหลักฐานที่สำคัญที่แสดงถึงการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ข้ามชนิดสัตว์ ซึ่งอาจนำไปสู่การระบาดใหญ่ของเชื้อทั้งในประชากรสุกรและประชาชนทั่วไปได้ เช่นเดียวกับการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ดังนั้นควรได้มีการวางมาตรการการเฝ้าระวังและป้องกันโรคในฟาร์มสุกรเพื่อลดอุบัติการณ์การติดเชื้อในบุคลากรที่ทำงานในฟาร์มต่อไป รวมทั้งศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในปัจจุบัน โดยเฉพาะสายพันธุ์ H1N2 ที่เกิดจากการผสมรวมกันของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ที่พบอยู่ในประเทศไทย

คำสำคัญ: ไข้หวัดใหญ่สุกร สุกรในประเทศไทย พันธุกรรมเชิงลึก การกลายพันธุ์ของเชื้อ โรคสัตว์สู่คน

Abstract

Swine influenza virus (SIV) cause respiratory disease especially porcine respiratory disease complex (PRDC) in pigs and has a zoonotic potential. Minimal data in the literature are available regarding the epidemiology and genetic characteristic of SIV currently circulating in the Thai swine population. This study was conducted to survey and genetically characterize SIVs in Thailand. Additionally, this study investigated the zoonotic potential of Thai SIV in the swine-exposed workers comparing to the serum samples of urban population. The surveillance took place in 4 provinces of Thailand with high density pig populations between September 2008 to August 2009. Serum samples were collected from pigs of all ages cross-sectionally during the seasonal change to evaluate the seroprevalence of H1 and H3 SIV using hemagglutination-inhibition (HI) test. Nasal swabs and lung tissues were collected from both pigs with and without respiratory signs. Virus isolation was performed and genetically characterized and analyzed with the SIV isolates reported previously. Serological results of pig sera revealed evidence of pigs being exposed to H1 and H3 SIV throughout the year. There were no significant differences between the seasons or age of pigs that were seropositive to H3 SIV. However, pigs seropositive to H1 SIV were found significantly higher during winter compared to summer season. H1-seropositive sows were significantly highest followed by growers and weaners. During the surveillance, only SIV subtypes H1N1 and H1N2 were identified from pigs with clinical signs. Genetic characterization of the H1N1 isolated in early 2009 demonstrated that the virus contained gene segments with the swine origin mixed with the North American and European lineage. The studied H1N1 SIVs were similar to the Thai SIVs found in 2005-2006 but was genetically different from the pandemic influenza A H1N1 2009 emerged in the human population early this year. Hemagglutinin gene analysis shows genetic drift of the current Thai SIVs from the older Thai SIVs. Interestingly, the current H1N1 SIVs contained oseltamivir resistant gene while the previous SIVs circulating in 2005 and 2006 did not. Serum samples from swine-exposed people were also investigated for the evidence of swine-to-human influenza virus transmission. Serological results showed that people exposed to swine had at least 24 times higher chance of elevated antibody titer to SIVs than those living in the urban.

The findings from this study provide significant evidence of SIV status in the studied pig population and may be useful for prevention and control respiratory diseases caused by SIVs. Moreover, the results from this study indicated that Thai swine workers and/or people living in the swine farms had

higher risk of SIV infection. It is important to continue this type of surveillance since SIV continuously mutates and may contain oseltamivir resistant gene posing the potential risk to the human population. Moreover pathogenesis study of the novel H1N2 derived from genetic reassortant between the local H1N1 and H3N2 is needed to determine the virulence and zoonotic potential. Data gained from this study will help identify efficient SIV prevention and control measurements both in the pig and human population.

Keywords: Swine influenza virus, Thai pigs, genetic characterization, genetic mutation, zoonosis

สารบัญเรื่อง

	หน้า
คำนำ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
บทคัดย่อภาษาไทย	iv
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	vi
สารบัญเรื่อง	viii
สารบัญตาราง	ix
สารบัญภาพ	xi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xii
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
สมมติฐานของการวิจัย	7
วัตถุประสงค์ของโครงการ	7
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	8
กรอบแนวความคิด	13
ผลการวิจัย	14
วัตถุประสงค์ที่ 1	14
วัตถุประสงค์ที่ 2	15
วัตถุประสงค์ที่ 3	29
วัตถุประสงค์ที่ 4	32
อภิปรายและวิจารณ์ผล	36
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	47
บรรณานุกรม	50
ภาคผนวก	54

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในโครงการวิจัยฯ	11
2 แสดงจำนวนตัวอย่างที่เก็บและผลการตรวจหาเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจาก ฟาร์มสุกรแยกตามจังหวัด	15
3 แสดง virus isolates ที่ทำการศึกษาพันธุกรรมเชิงลึกในโครงการวิจัยฯ นี้	16
4 แสดงขนาดของท่อนพันธุกรรมทั้งแปดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ได้ทำการ ถอดรหัสในโครงการวิจัยฯ นี้	16
5 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/HF6/05 (H1N1); H1N1(05) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank	17
6 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/CU-CB1 /06 (H1N1); H1N1(06) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank	18
7 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/CU-CB918 /09 (H1N1); H1N1(09) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank	18
8 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/S1/05 (H3N2); H3N2(05) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank	28
9 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/CU-CB8.4 /07 (H3N2); H3N2(07) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank	28
10 แสดงจำนวนตัวอย่างซีรัมที่เก็บได้ถึงปัจจุบันและผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 และ H3N2 ด้วยวิธี Hemagglutination -inhibition (HI)	30
11 แสดงผลการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและเชื้อไข้หวัด ใหญ่สุกรในตัวอย่างซีรัมที่ได้จากคนที่ทำงานในฟาร์ม A และคนที่ไม่เคยมี ประวัติสัมผัสสุกร	33

- | | | |
|----|--|----|
| 12 | แสดงผลการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้วัดใหญ่ในคนและเชื้อไข้วัดใหญ่สุกรในตัวอย่างซีรัมที่ได้จากคนที่ทำงานในฟาร์ม A แบ่งตามลักษณะการทำงานในฟาร์ม | 33 |
| 13 | แสดงผลการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้วัดใหญ่ในคนและเชื้อไข้วัดใหญ่สุกรในตัวอย่างซีรัมที่ได้จากคนที่ทำงานในฟาร์ม B และคนที่ไม่เคยมีประวัติสัมผัสสุกร | 34 |
| 14 | แสดงผลการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้วัดใหญ่ในคนและเชื้อไข้วัดใหญ่สุกรในตัวอย่างซีรัมที่ได้จากคนที่ทำงานในฟาร์ม B แบ่งตามลักษณะการทำงานในฟาร์ม | 35 |
| 15 | แสดงลักษณะของต้นกำเนิดพันธุกรรมของทุกท่อนยีนและการแบ่งกลุ่มย่อยของทุกท่อนยีน (phylogenetic origin and cluster of each RNA segment) ของเชื้อไข้วัดใหญ่สุกรที่พบในประเทศไทยระหว่างปีค.ศ. 2000-2005 | 41 |

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นที่สุดในประเทศไทยลำดับที่ 1-4	9
2 แสดงช่วงของเดือนที่จะทำการเก็บตัวอย่างสุกรในรอบ 1 ปี โดยจะทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมดฟาร์มละ 1 ครั้งต่อ 1 ช่วงเวลาที่กำหนด	10
3 กรอบแนวคิด (conceptual framework) ของโครงการวิจัย	13
4 Phylogenetic tree ของ H1 ยีน	20
5 แสดงความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมของท่อนพันธุกรรม HA โดยเชื้อลำดับที่ 1-3 คือ เชื้อ H1N1(05), H1N1(06) และ H1N1(09) ตามลำดับ	21
6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 119 (กรอบสี่เหลี่ยมสีเทา) ของเชื้อ H1N1(09) ซึ่งเปลี่ยนจาก Glutamine (E) เป็น Lysine (K) ส่งผลทำให้เชื้อยา Oseltamivir	21
7 Phylogenetic tree ของ N1 ยีน	22
8 Phylogenetic tree ของ PA ยีน	24
9 Phylogenetic tree ของ PB1 ยีน	25
10 Phylogenetic tree ของ PB2 ยีน	26
11 แสดงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31 ของเชื้อ H1N1(05), H1N1(06) และ H1N1(09) ซึ่งเปลี่ยนจาก Serine เป็น Asparagine ซึ่งส่งผลทำให้เชื้อยา Amantadine	26
12 แสดงเปอร์เซ็นต์สุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 (H1N1(06)) และ H3N2 (H3N2(07)) แบ่งตามฤดูกาลที่ทำการสำรวจ	31
13 แสดงเปอร์เซ็นต์สุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 (H1N1(06)) และ H3N2 (H3N2(07)) แบ่งตามกลุ่มอายุสุกรที่ทำการสำรวจ	31
14 แสดงลำดับการเกิดและลักษณะของท่อนพันธุกรรมที่พบในเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้ง 3 subtype ที่พบในทวีปยุโรป	38
15 แสดงลำดับของการเกิดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในทวีปอเมริกาเหนือ	39
16 แสดงการเกิด genetic reassortment และลักษณะของท่อนพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในทวีปอเมริกาเหนือ	39
17 แสดงการแบ่งกลุ่มย่อย (clade) ของท่อน hemagglutinin (HA) ยีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1 ในทวีปอเมริกาเหนือ	40

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

คำย่อ	คำอธิบาย
HA	Hemagglutinin
NA	Neuraminidase
PB1	Polymerase basic 1
PB2	Polymerase basic 2
PA	Polymerase acid
NP	Nucleoprotein
M	Matrix
NS	Nonstructural protein
SIV	Swine influenza virus
PRDC	Porcine respiratory disease complex
HI	Hemagglutination-inhibition
ELISA	Enzyme link immunosorbent assay
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
OR	Odds ratio
Sw	Swine
Hu	Human

บทนำ

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ซึ่งไวรัสในกลุ่มนี้จะก่อโรคระบบทางเดินหายใจทั้งในสัตว์ปีก สุกรและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกหลายชนิดรวมถึงคนด้วยเช่นกัน สำหรับโรคไข้หวัดใหญ่สุกรจะพบแพร่กระจายในฝูงสุกรทั่วโลก และมักจะพบว่าโรคไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจซับซ้อน ที่เรียกว่า “Porcine respiratory disease complex (PRDC)” ซึ่งเป็นกลุ่มอาการที่ก่อความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรอย่างชัดเจน ข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศแถบอเมริกาเหนือและยุโรป มีความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมมาก มีการกลายพันธุ์แบบ antigenic drift อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนฮีมากกลูตินิน (Hemagglutinin; HA) ของไวรัส จะส่งผลกระทบต่อควบคุมและป้องกันโรคเนื่องจากภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อชนิดเก่าไม่สามารถคุ้มต่อการติดเชื้อชนิดใหม่ในสุกรได้ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรยังเกิดการกลายพันธุ์ชนิด genetic reassortment ระหว่างท่อนพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร ไข้หวัดใหญ่ที่พบในสัตว์ปีกและในคน เนื่องจากสุกรเป็นสัตว์ที่ไวรับต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่ก่อโรคในสัตว์ชนิดต่างๆ ดังกล่าวแล้วข้างต้น ซึ่งแตกต่างกับสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่มักจะไวรับต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่เฉพาะชนิดสัตว์นั้นๆ สุกรจึงถือว่าเป็น mixing vessel ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ และสามารถเป็นสื่อกลางในการแพร่กระจายโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสู่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น โดยเฉพาะคนได้ดี

ข้อมูลในอดีตพบว่าไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นโรคสัตว์ติดคนที่มีผลกระทบทางด้านสาธารณสุขอย่างต่อเนื่อง การสำรวจในต่างประเทศพบหลักฐานการติดโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในคนชัดเจน โดยส่วนใหญ่แล้วบุคคลที่ติดเชื้อเหล่านั้นได้รายงานว่ามีสัมผัสกับสุกร แต่บางรายงานก็พบการติดเชื้อในคนที่ไม่ได้สัมผัสสุกรแต่ได้มีการคลุกคลีกับคนที่สัมผัสสุกร หลักฐานทางซีรัมวิทยาบ่งชี้ว่ากลุ่มคนที่มีวิชาชีพที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมผลิตสุกรเช่น คนที่ทำงานในฟาร์มสุกร คนเลี้ยงสุกร หรือสัตวแพทย์ประจำฟาร์ม มีอัตราความเสี่ยงในการติดเชื้อมากกว่าบุคคลทั่วไปที่ประกอบวิชาชีพอื่น ซึ่งการติดเชื่อนั้นจะส่งผลต่อปัญหาสุขภาพ ลดประสิทธิภาพการทำงานและเพิ่มค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล นอกจากนี้กลุ่มคนในวิชาชีพดังกล่าวยังมีโอกาสติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรซ้ำซ้อน ซึ่งมีโอกาสในการที่จะเป็นโฮสต์ให้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรดังกล่าวปรับตัวในมนุษย์ได้ดี เกิดเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ (novel progeny strain with pandemic potential) สามารถแพร่กระจายไปสู่บุคคลอื่นๆ ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรค และอาจกลายเป็นโรคระบาดใหญ่ในคนได้ในที่สุด

เมื่อต้นเดือนมีนาคมปีค.ศ. 2009 ได้มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้กำหนดให้เรียกเชื้อที่ระบาดนี้ว่า ‘Influenza A H1N1 2009’ เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ จึงพบลักษณะที่พิเศษคือ ท่อนพันธุกรรมของเชื้อที่พบเป็นสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างไข้หวัดใหญ่สุกร ไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์ เมื่อศึกษาท่อน

พันธุกรรม HA ของเชื้อ พบว่ามีความแตกต่างกับ HA ของเชื้อ H1N1 ที่ระบาดในประชากรมนุษย์ ณ ขณะนั้นและชนิดที่อยู่ในวัคซีนป้องกันเชื้อไข้หวัดใหญ่ จึงพอที่จะสรุปได้ว่า ประชากรโลกน่าที่จะไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้เลย ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหลักอันหนึ่งของการแพร่กระจายของเชื้ออย่างรวดเร็วทั่วโลกจนต้องประกาศภาวะโรคระบาดใหญ่ (pandemic) ในที่สุด เมื่อศึกษาท่อนพันธุกรรมทั้งหมด(แปลท่อน) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่นี้ จึงทำให้ทราบว่าในอดีต เคยพบท่อนพันธุกรรมต่างๆ ดังกล่าววนเวียนในเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ติดเชื้อในสุกรแถบทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือมาก่อน ดังนั้นจึงเชื่อว่าเชื้อไวรัสชนิดใหม่นี้มีต้นกำเนิดมาจากสุกร (swine origin) แต่เนื่องจากข้อมูลทางระบาดวิทยาทางด้านพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศต่างๆ ที่มีอยู่ไม่ต่อเนื่อง จึงไม่อาจที่จะประเมินได้ว่า เหตุการณ์ของการเกิดการกลายพันธุ์ชนิด genetic reassortment ที่ทำให้เกิดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 2009 นี้เกิดขึ้นเมื่อใด ที่ไหนและมีการติดเชื้อจากสัตว์สู่คนเมื่อไหร่ ทาง WHO และ The World Organisation for Animal Health (OIE) จึงได้รณรงค์ให้มีการเร่งสำรวจเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสัตว์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นโฮสต์ทางธรรมชาติของเชื้อ โดยเฉพาะการสำรวจในประชากรสุกร การติดต่อของเชื้อจากคนสู่สัตว์โดยเฉพาะจากคนสู่สุกร ก็สามารถเกิดขึ้นได้เช่นกัน ตัวอย่างเหตุการณ์ต่อเนื่องจากที่กล่าวข้างต้น ได้แก่ ที่ประเทศแคนาดาและอาร์เจนตินา ซึ่งพบสุกรฟาร์มป่วยจากการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 โดยสุกรติดจากคนเลี้ยงที่ป่วย ซึ่งรายงานข่าวล่าสุดจากรัฐ Alberta ประเทศแคนาดาก็ได้พบว่า มีกรณีของคนติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 กลับจากสุกรที่ป่วยจากการติดเชื้อสายพันธุ์นี้เกิดขึ้นแล้ว เนื่องจากสุกรเป็นสัตว์ที่ถือว่าเป็น ‘mixing vessel’ ดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นหากสุกรมีการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ต่างชนิดพร้อม ๆ กัน ก็จะเปิดโอกาสในการเกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ขึ้นได้ ซึ่งเชื่ออาจทวีความรุนแรงขึ้นได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างมากที่ติดตามและเฝ้าระวังการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์

สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศไทยพบว่า PRDC เป็นสาเหตุของความเสียหายได้ถึง 5-20% ในสุกรหลังหย่านม (personal communication) ถึงแม้จะทราบกันดีว่าโรคไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักอันหนึ่งของ PRDC แต่ข้อมูลการสำรวจความชุกของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยนั้นมีปริมาณน้อยและไม่ต่อเนื่อง ที่ผ่านมามีรายงานการพบเชื้อ H3N2 และ H1N1 ในสุกรในปีค.ศ. 1981 และ 1991 ตามลำดับ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 2003 มีรายงานพบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรได้ทั้ง 3 subtype เช่นเดียวกับที่พบในประชากรสุกรของประเทศอื่น ได้แก่ subtype H1N1, H3N2 และ H1N2 แต่ยังไม่มีการสำรวจหา subtype H2N3 หรือ subtype อื่นๆ ที่อาจมีแฝงอยู่ในฝูงสุกรได้ เนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้าสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ และลักษณะการเลี้ยงสุกรในบ้านเรามีความแตกต่างกับในต่างประเทศ คือยังมีการเลี้ยงสุกรหลังบ้าน พร้อมกับการเลี้ยงสัตว์เลี้ยงชนิดอื่นๆ เช่น ไก่หลังบ้าน ไก่ชน สุนัขและแมว โอกาสที่สุกรจะได้รับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ subtype อื่นๆ จึงมีอยู่มาก นอกจากนี้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้ในประเทศไทยในปัจจุบันนั้น ก็ยังขาดการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมในเชิงลึก (whole genome sequencing and phylogenetic analysis) ที่บ่งบอกถึงการเกิด reassortment ของเชื้อ และยังขาด

ข้อมูลความหลากหลายทาง antigenicity ของเชื้อ ซึ่งจะบ่งชี้ถึงความสามารถของการคุ้มโรคของสุกร ส่วนข้อมูลการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสู่คนในประเทศไทยนั้น ที่ผ่านมาพบเพียงหนึ่งรายงานในปีค.ศ. 2005 ซึ่งสามารถเพาะแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร subtype H1N1 จากเด็กอายุ 4 ปีที่ป่วยด้วยอาการไข้สูง ปวดกล้ามเนื้อและจมูกอักเสบ แต่โดยรวมแล้วรายงานติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรข้ามสู่คนในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมาก ปัญหาที่สำคัญอันหนึ่งที่น่าจะส่งผลให้การติดตามการติดเชื้อในลักษณะนี้มีจำนวนน้อยคือ คนที่ป่วยเป็นโรคไข้หวัดใหญ่หรือมีอาการป่วยทางระบบทางเดินหายใจส่วนใหญ่มักไม่พบแพทย์ หรือเมื่อพบแพทย์แล้วมักจะไม่ได้ประวัติการติดเชื้อที่ครบถ้วนและไม่นำไปสู่การเก็บตัวอย่างเพื่อการเพาะหาเชื้อหรือตรวจทางซีรัมวิทยาเพิ่มเติม ทำให้ไม่ทราบถึงขอบเขตความเสี่ยงทางด้านการแพร่ของโรคจากสัตว์สู่คนของเชื้อนี้ในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มคนที่มิวิชาชีพที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร

เนื่องจากคณะนักวิจัยและห้องปฏิบัติการคณะสัตวแพทยศาสตร์ และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีความพร้อมในด้านการเพาะแยกพิสูจน์เชื้อ และการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทางด้านซีรัมวิทยาด้วยวิธี hemagglutination-inhibition (HI) test ซึ่งเป็นวิธีที่ถือเป็น gold standard ในการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอทุกชนิด อีกทั้งทางคณะนักวิจัยยังมีความพร้อมในการตรวจวินิจฉัยพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในเชิงลึกเป็นอย่างดี โดยคณะนักวิจัยได้มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมเชิงลึกของเชื้อไข้หวัดนกมาแล้ว นอกจากนี้ยังมีข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการสำรวจฟาร์มสุกรแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรี ซึ่งพบการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 และ H3N2 อยู่อย่างต่อเนื่อง รวมทั้งข้อมูลทางซีรัมวิทยาเบื้องต้นก็บ่งชี้ถึงการสัมผัสเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการศึกษากครั้งนี้คณะนักวิจัย จึงมุ่งเน้นการสำรวจอย่างครบวงจรและต่อเนื่องโดยขยายบริเวณที่จะทำการสำรวจให้ครอบคลุมจังหวัดอื่นที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่นเช่นกัน โดยผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะได้ข้อมูลการสำรวจและวินิจฉัยถึงลักษณะทางระบาดวิทยาของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรหลายประการกล่าวคือ จะได้ค่าความชุกของการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจากจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น ได้ทราบการกลายพันธุ์ชนิด *antigenic drift* ของเชื้อไวรัสที่อาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการคุ้มโรคของสุกร ได้ข้อมูลด้านพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในลักษณะที่บ่งชี้ถึงการกลายพันธุ์ชนิด *genetic reassortment* ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอจากสัตว์ชนิดอื่น และท้ายที่สุดเปอร์เซ็นต์อุบัติการณ์ของการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสู่คนว่ามีอย่างน้อยเพียงใดในบริเวณที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการประเมินสถานภาพและผลกระทบของการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในสุกร สามารถนำมาใช้ในการวางแผนควบคุมและป้องกันการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งในสุกรและรวมถึงคนได้เป็นลำดับต่อไป

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร หรือ Swine influenza virus (SIV) จัดอยู่ในแฟมิลี Orthomyxoviridae กลุ่ม ไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Influenza virus A) ไวรัสสายพันธุ์ (Subtype) ที่มีรายงานพบการระบาดอย่างต่อเนื่องในสุกรมี 3 subtype ได้แก่ H1N1, H3N2 และ H1N2 โดยสุกรที่ติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน เช่น ไอ จาม มีไข้ หายใจหอบ เป็นต้น สุกรป่วยมักไม่เสียชีวิต แต่อาจทำให้ติดเชื้อโรคแทรกซ้อนได้ง่าย อัตราการป่วยของสุกรในฝูงอาจสูงถึงร้อยละ 100 โดยเฉพาะในกรณีที่สุกรฝูงนั้นไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อที่ระบาด สำหรับอัตราการตายมักจะต่ำประมาณร้อยละ 1 ของสุกรในฝูง โรคนี้ติดต่อทางการหายใจและการสัมผัสกับสิ่งปนเปื้อนเชื้อ (Olsen et al., 2006) การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการเพาะแยกและพิสูจน์เชื้อมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ สัตว์ที่ติดเชื้อจะปลดปล่อยเชื้อออกมาทางระบบทางเดินหายใจในระยะเวลาที่สั้นมากหลังการติดเชื้อ (ประมาณแค่ 1-3 วันหลังติดเชื้อ) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยจึงมักอาศัยการตรวจทางซีรัมวิทยา โดยวิธีที่เป็นมาตรฐานได้แก่ การตรวจด้วยวิธี hemagglutination-inhibition (HI) test ซึ่งใช้การตรวจวัดระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (HA) ที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอมีการกลายพันธุ์ที่ HA โปรตีนค่อนข้างสูง การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี HI จึงต้องมีการประเมินเป็นระยะๆ ถึงไวรัสที่ใช้ในการตรวจจับเพื่อให้คงความจำเพาะของวิธีตรวจ ชุดตรวจซีรัมชนิด enzyme link immunosorbant assay (Taubenberger and Layne, 2001) สำหรับตรวจระดับแอนติบอดีต่อ H1N1 และ H3N2 มีใช้กันอยู่ในต่างประเทศ แต่มีข้อจำกัดในการใช้คือไม่สามารถบอกระดับแอนติบอดีต่อเชื้อได้และอาจให้ผลลบล้อมเนื่องจากไวรัสในชุดตรวจเป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ต่างประเทศ ที่อาจไม่ให้ผลข้าม (cross reactivity) กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย ซึ่งหากนำ ELISA ที่มีไวรัสแอนติเจนในชุดทดสอบที่แตกต่างกับเสตรนในบ้านเรา ก็อาจจะทำให้ผลการสำรวจที่ได้ไม่บ่งชี้สภาพการจริงของอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย

ผลกระทบโดยตรงจากการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรคือ การทำให้สูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องจากอัตราการเพิ่มน้ำหนักของสุกรช้าลง จึงต้องใช้เวลาในการขุนนานมากขึ้น ทำให้ต้นทุนการผลิตสุกรสูงขึ้น นอกจากนี้ยังการติดเชื้อในฝูงยังเพิ่มค่าใช้จ่ายในการให้การบำรุงรักษาสุกรในกรณีที่มีการติดเชื้อแทรกซ้อนเกิดขึ้น (Olsen, 2002; Olsen et al., 2006) ในต่างประเทศพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรร่วมกับเชื้อ porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) และ porcine circovirus type 2 (PCV2) เป็นกลุ่มเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุหลักที่ก่อปัญหาโรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อน หรือ Porcine respiratory disease complex (PRDC) (Choi et al., 2003) รายงานในปีค.ศ. 2002 พบว่าเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกาประเทศเดียว PRDC ส่งผลให้เกิดความเสียหายในวงการการผลิตสุกรได้ถึงกว่า 210 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Provisions, 2003) สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศไทยนั้นมีปริมาณฟาร์มสุกรมากในจังหวัดในเขตภาคกลางและภาคตะวันออก (<http://www.dld.go.th/ict/yearly/yearly/50stock.50html>) ซึ่ง

ปัญหาของโรคระบบทางเดินหายใจนับว่าเป็นปัญหาหลักในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร และพบว่าก่อนความเสียหายในสุกรหย่านมได้มากถึง 20% (personal communication) โดยเฉพาะโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อร่วมกันระหว่างจุลชีพหลายชนิดรวมถึงเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร ซึ่งที่ผ่านมามีข้อมูลการสำรวจโรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีจำนวนน้อยมาก โดยมีรายงานการพบเชื้อ H3N2 และ H1N1 ในสุกรในปีค.ศ .1981 และ 1991 ตามลำดับ (Kupradinun et al., 1991; Nerome et al., 1981) จนกระทั่งถึงปีค.ศ .2003 จึงมีรายงานการพบเชื้อ H1N2 เนื่องจากการระยะเวลาที่สุกรจะปลดปล่อยไวรัสออกมาภายหลังการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นช่วงเวลาที่สั้นมาก จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การสำรวจความชุกของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีความลำบากและข้อมูลของสัตว์ติดเชื้อที่ได้ก็น้อยกว่าความเป็นจริง อย่างไรก็ตามข้อมูลอุบัติการณ์ของโรคโดยการสำรวจทางซีรัมวิทยาด้วยชุดตรวจ ELISA ชี้ให้เห็นว่า สุกรในประเทศไทยมีการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ร้อยละ 7.9 และ H3N2 ร้อยละ 20.6 จากตัวอย่างซีรัมทั้งหมด 533 ตัวอย่างจากสุกรในจังหวัดฉะเชิงเทรา กาญจนบุรี ขอนแก่น สุโขทัยและสุพรรณบุรี (Damrongwatanapokin et al., 2006)

เชื้อไข้หวัดใหญ่เป็นเชื้อที่มีความหลากหลายสูง ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของไวรัสสองวิธี ได้แก่ การกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ภายในยีนแต่ละท่อน เรียกว่า genetic drift และการแลกเปลี่ยนท่อนพันธุกรรม (gene reassortment) ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสองชนิดหรือมากกว่าที่ติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เดียวกัน หากไวรัสลูกหลานที่ได้มีคุณสมบัติทางแอนติเจนของโปรตีน HA และ NA ที่แตกต่างไปจากเดิมจะเรียกว่าเกิด antigenic shift ซึ่งจะสามารถก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อชนิดใหม่ในกลุ่มประชากรสัตว์ที่ติดเชื้อได้ เนื่องจากสัตว์ที่ติดเชื้อไม่เคยมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสตัวใหม่ สำหรับการเกิด antigenic drift นั้น ข้อมูลในอดีตชี้ให้เห็นว่าเมื่อมีการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ที่เป็นเป็น subtype เดียวกัน แต่ต่าง strain โฮสต์จะตอบสนองต่อการติดเชื้อโดยการสร้างแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติจำเพาะต่อสายพันธุ์นั้น (strain-specific antibody) และต่างสายพันธุ์ (cross-reactive antibody) (Tamura et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตามระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์มักจะเลือกสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับ epitope สำคัญเพียงไม่กี่ epitope ของเชื้อสายพันธุ์นั้น ซึ่งจะเป็นเหตุใ้มนำที่จะทำให้เกิด genetic drift ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่เป็น epitope สำคัญของเชื้อไวรัสนั้นได้เป็นอย่างดี (Lambkin et al., 1994) ในเด็กที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ มักจะมีโอกาสสร้างแอนติบอดีชนิด restricted strain-specific ได้มากกว่า cross-reactive antibody (Oxford et al., 1981) นอกจากนี้ยังสามารถพบ genetic drift ของเชื้อไวรัสอย่างต่อเนื่องในเด็กที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อได้ในระดับต่ำ และมีหลักฐานว่าไวรัสที่กลายพันธุ์ที่เพาะแยกได้จากเด็กที่ติดเชื้อเหล่านั้น มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสที่มีการแพร่กระจายทั่วไปในกลุ่มผู้อยู่อาศัยในชุมชนใกล้เคียง (McMinn et al., 1999) ดังนั้นจึงมีข้อสันนิษฐานว่าการเกิด genetic drift หรือ antigenic drift ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในมนุษย์ น่าจะมีสาเหตุหนึ่งมาจากกลุ่มของเด็กที่มีการติดเชื้อแล้วสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไม่สมบูรณ์และการติดเชื้อซ้ำซ้อนอย่างต่อเนื่อง

ในอดีตเชื่อกันว่าการเกิด antigenic drift ในสุกรไม่น่าจะสูงนักเนื่องจากอายุขัยของสุกรสั้นกว่าคนมากโอกาสในการติดเชื้อในช่วงชีวิตจึงมีน้อยกว่า แต่ข้อมูลจากยุโรปพบว่า ช่วงต้นของปีค.ศ. 1990 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H3N2 ที่แพร่กระจายอยู่ในฝูงสุกรมี antigenic drift ของ HA โปรตีน จนทำให้วัคซีนซึ่งมีเชื้อ H3N2 ที่เป็น human (influenza A/Port Chalmers/1/73)-like swine (เพาะแยกตั้งแต่ปีค.ศ. 1970) ที่ใช้อยู่ในขณะนั้นไม่ให้ความคุ้มโรค จนเป็นเหตุให้ต้องพิจารณาเปลี่ยนเชื้อไวรัสในวัคซีนให้ทันสมัยยิ่งขึ้น (de Jong et al., 2007) ในทวีปอเมริกาเหนือ เมื่อมีการวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนของเชื้อ H3N2 กว่า 300 isolate ที่มีการแพร่ระบาดในฝูงสุกร ซึ่งมีการใช้วัคซีนที่มีเชื้อ H3N2 (A/Swine/TX/98-like virus) เป็นเชื้อไวรัสวัคซีนตั้งแต่ปี ค.ศ. 2001-2005 พบว่าเชื้อวัคซีนสามารถให้ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อส่วนใหญ่ได้น้อยลง ซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิด antigenic drift ของ H3 ยีนอย่างต่อเนื่อง (Gramer, 2005) เมื่อนำเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1 ที่เพาะแยกได้ตั้งแต่ปีค.ศ. 1930-2004 มาฉีดให้สุกรทดลองเพื่อดูการก่อโรคและผลการให้ภูมิคุ้มกันของเชื้อโดยวิธีทางชีววิทยา พบว่าเชื้อ H1N1 รุ่นใหม่สามารถก่อโรคที่มีความรุนแรงมากขึ้น และสุกรที่ติดเชื้อจะปล่อยเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมในปริมาณที่มากกว่าเชื้อ H1N1 รุ่นเก่า นอกจากนี้ยังพบการลดลงของ cross-reactive antibody ระหว่างเชื้อ H1N1 รุ่นใหม่กับเชื้อ H1N1 รุ่นเก่า (Vincent et al., 2006) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามี antigenic drift เกิดขึ้นในส่วนยีน H1 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรได้เช่นกัน สาเหตุของการเกิด antigenic drift ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าจะเป็นเช่นเดียวกันกับในคนหรือไม่ แต่เป็นที่น่าติดตามว่าในลูกสุกรหย่านมที่ได้รับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ในระดับต่ำๆ หรือมี cross-reactive antibody ต่ำ จะทำการเร่งการกลายพันธุ์ของเชื้อในลูกสุกรเหล่านั้นได้หรือไม่ หรือในกรณีของการให้วัคซีนแก่แม่สุกร ที่ช่วงอายุขัยยาวกว่าสุกรขุนที่อยู่ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised) อาจกระตุ้นการสร้าง strain-specific antibody ที่ไม่สมบูรณ์ หากแม่สุกรมีการติดเชื้อไวรัสซ้ำ ก็อาจสามารถเร่งการเกิด genetic drift ได้ดังตัวอย่างในเด็กที่กล่าวข้างต้น

การ drift ของ HA โปรตีนมีผลต่อการป้องกันโรค เพราะคุณสมบัติและระดับของแอนติบอดีต่อโปรตีน HA ที่โฮสต์สร้างขึ้นต่อวัคซีนชนิดเชื้อตายถือเป็นหัวใจสำคัญต่อความสำเร็จของการทำวัคซีน พบว่าใน HA ยีนมีอัตราการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนประมาณ $4-5 \times 10^{-3}$ / ตำแหน่ง/ปี ซึ่งสูงกว่ายีนท่อนอื่นๆ ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Wilson and Cox, 1990) ดังนั้นระดับแอนติบอดีต่อโปรตีน HA และความใกล้เคียงของโปรตีน HA ของไวรัสที่ใช้ในวัคซีนกับไวรัสที่พบแพร่ระบาดอยู่ในฝูงสุกร (homologous vs. heterologous strain) จึงแปรผันตรงต่อความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มโรคของวัคซีน (de Jong et al., 2003; Haesebrouck and Pensaert, 1986) โดยทั่วไปวัคซีนไข้หวัดใหญ่สุกรชนิดเชื้อตายสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน HA ได้ในระดับที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามปัจจัยสำคัญต่อการทำวัคซีนชนิดเชื้อตายในลูกสุกรหย่านมหรือสุกรขุน คือระดับของภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่สุกร ซึ่งนอกจากจะมีผลลดประสิทธิภาพของวัคซีนได้แล้ว (Loeffen et al., 2003) ยังอาจก่อให้เกิด genetic drift ดังกล่าวข้างต้น และหลักฐานจากงานวิจัยพบว่า การให้วัคซีนในขณะที่สุกรมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดอาจ

ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงยิ่งขึ้น(enhanced disease) ได้ (Kitikoon et al., 2006) ลักษณะการเกิดโรคที่รุนแรงยิ่งขึ้นในลักษณะนี้ยังสามารถพบได้ในสุกรทดลอง ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ ที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย ชนิด H1N1 และตามด้วยการให้เชื้อ H1N2 ซึ่งคาดว่าอาจเกิดเนื่องจาก non-neutralizing antibodies ที่ถูกกระตุ้นขึ้นภายหลังการให้วัคซีน ที่ก่อให้เกิด enhanced disease ดังกล่าว (Vincent et al., 2007) จากตัวอย่างดังกล่าวทำให้ควรพิจารณาการใช้วัคซีนอย่างถี่ถ้วนและหากต้องใช้วัคซีนควรทำโดยประกอบกับข้อมูลการเฝ้าระวังและติดตามลักษณะของเชื้อที่พบในฝูงสุกรเสียก่อนจึงจะได้ประโยชน์สูงสุด

การติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรนอกจากผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรแล้ว โรคไขหวัดใหญ่สุกรยังเป็นโรคสัตว์คู่คนที่ปัญหาแอบแฝงทางด้านสาธารณสุขโรคหนึ่ง ที่ผ่านมามีตั้งแต่ปีค.ศ. 1958-2005 มีหลักฐานการติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรในคนอยู่จำนวนไม่น้อย (reviewed in(Myers et al., 2007)) จะเห็นได้ว่าข้อมูลจากการตรวจวินิจฉัยแยกเชื้อไวรัสทางห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมเชิงลึกของเชื้อไวรัส ร่วมกับการศึกษาทางชีววิทยาอย่างต่อเนื่อง มีความจำเป็นมากในการประเมินสถานภาพจริงของโรคไขหวัดใหญ่สุกรที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร และอัตราการกลายพันธุ์ของเชื้อในฝูงสุกรในประเทศไทย ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเหล่านี้จะทำให้ประเมินแนวโน้มของปัญหาเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรที่เป็นโรคสัตว์คู่คนด้วย ซึ่งการวนเวียนของเชื้อในฟาร์มสุกร จะสามารถส่งผลกระทบต่อมาตรฐานทางสาธารณสุขของเกษตรกรผู้ผลิตและเลี้ยงสุกร รวมถึงกลุ่มวิชาชีพอื่นที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อด้วยเช่น สัตวแพทย์ประจำฟาร์ม สัตวบาลและผู้แทนบริษัทขายยาสัตว์ในฟาร์มสุกรเป็นต้น

สมมติฐานของการวิจัย

คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานไว้ 2 ประการ

1. โรคไขหวัดใหญ่สุกรมีการระบาดในฝูงสุกรในบริเวณที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น โดยไวรัสที่มีการระบาดจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ของการระบาด
2. การติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรในคน จะขึ้นอยู่กับ การสัมผัสสุกร โดยบุคคลที่มีการสัมผัสสุกรมาก จะมีความเสี่ยงในการติดเชื้อที่สูงกว่าบุคคลทั่วไปที่ไม่สัมผัสสุกร

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ตรวจหาความชุกของการติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร โดยการเพาะแยกเชื้อไวรัสจากฟาร์มสุกรในจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นสูงที่สุดของประเทศไทย
2. ศึกษาเชิงลึกถึงระดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกรที่พบ เพื่อประเมินการเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ
3. ศึกษาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรทางชีววิทยาในสุกรทุกกลุ่มอายุ เพื่อศึกษา Seroprevalence ของการติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร
4. ดำรวจปฏิบัติการติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรสู่คน

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนที่ 1 เก็บตัวอย่างจากสุกร เพาะแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัส

- ทำการเก็บ nasal swab และซีรัม จากสุกรสาว สุกรแม่พันธุ์ สุกรอนุบาลและสุกรขุน จากฟาร์มสุกรที่มีขนาดอย่างน้อย 500 แม่ขึ้นไป จากจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นที่สุดในประเทศไทย (จังหวัดราชบุรี นครปฐมชลบุรีและฉะเชิงเทรา) ดังแสดงในภาพที่ 1 (<http://www.dld.go.th/ict/yearly/yearly/50stock.50html>) โดยสำรวจอย่างน้อย 2 ฟาร์มต่อจังหวัด แต่ละฟาร์มได้สุ่มเก็บตัวอย่าง Nasal swabs จากสุกรสาว สุกรนาง สุกรอนุบาลและสุกรขุนที่ 5 กลุ่มอายุได้แก่ ที่ 4, 8, 12, 18 และ 24 สัปดาห์ เป็นจำนวนทั้งหมด 35 ตัวอย่างต่อฟาร์ม
- การเก็บตัวอย่างจะแบ่งเป็น 2 กรณีคือ กรณีที่หนึ่ง (normal surveillance) สุกรในฟาร์มไม่มีอาการแสดงทางคลินิก การเก็บตัวอย่างก็จะแบ่งเป็น 3 ช่วง ได้แก่ ช่วงเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม ช่วงเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ และช่วงเดือนเมษายนถึงมิถุนายน ดังแสดงในภาพที่ 2 ส่วนกรณีที่สอง (active surveillance) สุกรในฟาร์มมีอาการแสดงทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจจะทำการเก็บตัวอย่างในสุกรกลุ่มอายุดังกล่าวทันที
- ทำการ pool ตัวอย่าง nasal swabs จำนวน 5 ตัวอย่างเป็น 1 ตัวอย่าง เพื่อสกัด RNA ไปตรวจเชื้อไวรัสเบื้องต้นด้วยวิธี RT-PCR ด้วย influenza A matrix gene specific primers ตามวิธีการของหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หากได้ผลบวก จะทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่าง nasal swab แต่ละตัวอย่างที่นำมา pool
- ทำการเพาะแยกและเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง Madin Darby Canine Kidney (MDCK) และพิสูจน์เชื้อ โดยการย้อมเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี immunocytochemistry test โดยใช้ Anti-influenza A specific antibody ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอได้ทุกชนิด (Kitikoon et al., 2006)
- พิสูจน์ subtype ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยวิธี Multiplex RT-PCR (Choi et al., 2002))ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสให้มีปริมาณมากขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนที่ 2, 3 และ 4

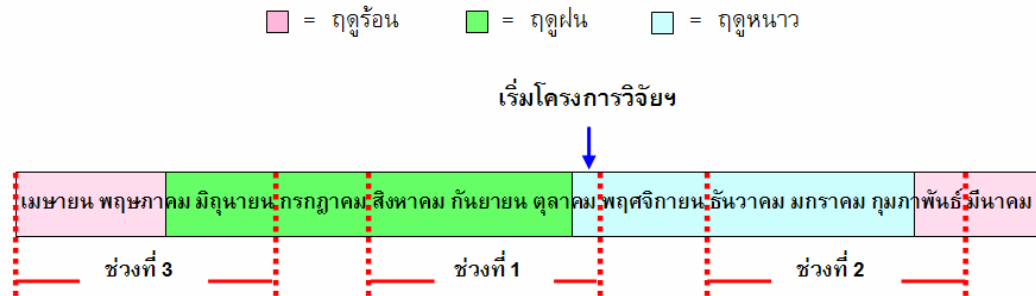
ต่อไป



ภาพที่ 1 แสดงจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นที่สุดในประเทศไทยลำดับที่ 1-4

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาพันธุกรรมเชิงลึกของเชื้อ

- นำเชื้อไวรัสที่ได้มาวิเคราะห์พันธุกรรมด้วยวิธี whole genome sequencing (Karasin et al., 2000) โดยทำการวิเคราะห์ HA gene เพื่อที่จะได้เปรียบเทียบเบื้องต้นถึงความแตกต่างกันของ HA โปรตีน (ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เป็น subtype เดียวกัน) แล้วนำเชื้อที่มีความแตกต่างกันจากการวิเคราะห์เบื้องต้นมาใช้วิเคราะห์ antigenic drift ในการศึกษาขั้นตอนที่ 3
- ศึกษาพันธุกรรมของทุกท่อนยีนที่เหลือ ด้วยวิธี gene sequencing (Karasin et al., 2000) โดยใช้ sequencing primer set (Zou, 1997) ดังแสดงในตารางที่ 1
- วิเคราะห์จุดต่างๆ ของท่อนพันธุกรรมที่มีลักษณะเฉพาะเช่น เกี่ยวข้องกับการดื้อยา antiviral หรือเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ หรือเป็น phenotypic marker
- วิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ ด้วย MEGA4 {Tamura, 2007 #1390} ตามด้วย neighbor-joining method with 1000 times bootstrapping replicates {Saitou, 1987 #1391} เพื่อเปรียบเทียบสายพันธุกรรม โดยเปรียบเทียบกับไวรัสที่มีข้อมูลใน GenBank เพื่อการวิเคราะห์หา genetic reassortant ของไวรัส (Karasin et al., 2006)



ภาพที่ 2 แสดงช่วงของเดือนที่จะทำการเก็บตัวอย่างสุรในรอบ 1 ปี โดยจะทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมดฟาร์มละ 1 ครั้งต่อ 1 ช่วงเวลาที่กำหนด

ขั้นตอนที่ 3 ตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร

- ตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกร โดยใช้ homologous virus ในการด้วยวิธี HI สำหรับฟาร์มที่ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกรได้ จะใช้เชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกรในห้องปฏิบัติการของหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
- ดำเนินการเกิด antigenic drift ของเชื้อไวรัส ด้วยการตรวจวัดระดับแอนติบอดีที่ให้ผลคุ้มข้ามชนิดของเชื้อ โดยใช้ไวรัสไขหวัดใหญ่สุกรในห้องปฏิบัติการ กับเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกรที่ได้คัดเลือกเบื้องต้น (ในขั้นตอนที่ 2) แล้วว่ามีลักษณะที่แตกต่างกัน (heterologous virus) มาตรวจด้วยวิธี HI (Skibbe et al., 2004)

ขั้นตอนที่ 4 ตรวจวิเคราะห์อุบัติการณ์การติดเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกรในคน

- ในกรณีที่สามารเพาะแยกเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกรจากฟาร์มสุกร จะทำการเก็บตัวอย่างซีรัมของคนทำงานในฟาร์มสุกรนั้น ๆ และใช้ age-matched sera จากกลุ่มคนที่ไม่เคยสัมผัสสุกรมาเป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control group)
- ทำการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกร ในตัวอย่างซีรัมของคนทำงานในฟาร์มและบุคคลากรที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร ด้วยการประยุกต์วิธี HI จาก CDC protocol (CDC. Laboratory Diagnostic Procedures for Influenza 2005.

<http://www.cdc.gov/flu/professionals/labdiagnosis.htm>.)

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในโครงการวิจัยฯ

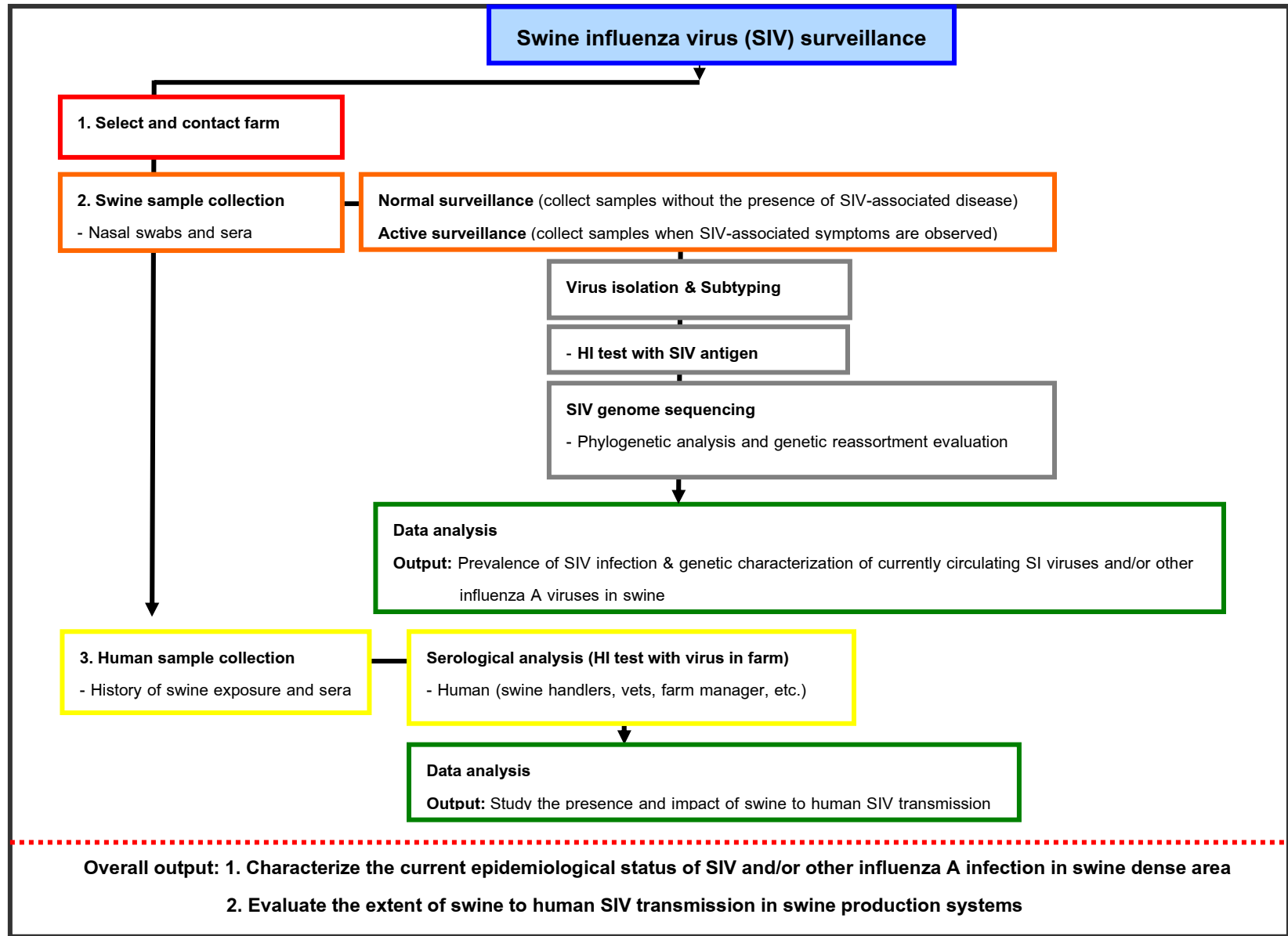
Primer sequence (5' → 3')	Gene	Amplicon length (bp)	Reference	
<u>Matrix gene RT-PCR</u>				
MF TCAGGCTAGGCAGATGGTG	Matrix	662-680	Chulalongkorn Veterinary Diagnostic laboratory (CU-VDL)	
MR AACCGTATTTAAGGCGACGAT		884-904		
<u>SIV Subtype Multiplex RT-PCR</u>				
H1F GGG ACA TGT TAC CCA GGA GAT	H1	345-365	(Choi et al., 2002)	
H1R GCA TTG TAT GTC CAA ATA TCC A		1351-1330		
H3F TAT GCC TGG TTT TCG CTC AA	H3	61-80		
H3R TTC GGG ATT ACA GTT TGT TG		724-705		
N1F GGT TCC AAA GGA GAC ATT TTT G	N1	324-346		
N1R CTA TCC AAA CAC CAT TGC CAT A		1078-1057		
N2F TGC GAT CCT GAC AAG TGT TAT C	N2	364-385		
N2R CAG ACA CAT CTG ACA CCA GGA T		866-845		
<u>SIV Sequencing Primers</u>				
SZAPB1 AGCAAAAAGCAGGCAAACCAT	PB1	3' end	(Zou, 1997)	
SZAPB1 AGTAGAAACAAGGCATTTTTTCAT		5' end		
SZAPB2 CTCGAGCAAAAAGCAGGTCAA	PB2	3' end	(Dr. Christopher Olsen personal communication)	
SZAPB2 AGTAGAAACAAGGTCGTTTTTAAAC		5' end		
SZAPA CTCGAGCAAAAAGCAGGTACTGAT	PA	3' end		
SZAPA AGTAGAAACAAGGTACTTTTTTGGAC		5' end		
H1-1.1F AAGCAAAAAGCAGGGAATAA	H1	}		
H1-1770R CAAGGGTGTTTTTCTCATGTCTC				
H3-7F ACTATCATTGCTTTGAGC	H3			
H3-1770R TCAAATGCAATGTTG				
SZANP1 CTCGAGAGCAAAAAGCAGGGT	NP	3' end	(Zou, 1997)	
SZANP2 AGTAGAAACAAGGTATTTTTC		5' end		
SZANA1 AGCAAAAAGCAGGAGTTTAAATG	NA	3' end		
SZANA2 AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT		5' end		
SZAM1 CTCGAGCAAAAAGCAGGTAGAT	M	3' end		
SZAM2 AGTAGAAACAAGGTAGTTTTT SZANS1		5' end		
AGCAAAAAGCAGGGTGACAAA	NS	3' end		
SZANS2 AGTAGAAACAAGGGTGTTTTT		5' end		

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากวัตถุประสงค์ข้อที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นข้อมูลจำนวนตัวอย่างเชื้อไวรัสที่เพาะแยกได้จากตัวอย่าง nasal swab และชิ้นเนื้อปอดจากการสำรวจแบบ normal และ active surveillances และข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้ ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของเชื้อและการสร้างแผนภูมิต้นไม้ ได้ใช้การวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา และนำเสนอข้อมูลเป็นร้อยละของตัวอย่าง
- การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากวัตถุประสงค์ข้อที่ 3 เป็นการนำตัวอย่างซีรัมสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 และ H3N2 มาศึกษาเปรียบเทียบหาความแตกต่างในฤดูกาลที่สำรวจและความแตกต่างที่พบในแต่ละกลุ่มอายุสุกร ได้ใช้สถิติเชิงวิเคราะห์หาค่าของความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลต่างๆ ด้วยวิธี Chi-Square และ Differences of Least Square Means โดยใช้โปรแกรมสถิติ SAS (SAS® Institute Inc., Cary, NC) ที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ $p \leq 0.05$
- การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากวัตถุประสงค์ข้อที่ 4 ซึ่งเป็นการศึกษาหาอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสูงในฟาร์มสุกร A และ ฟาร์มสุกร B ทำโดยการเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้จากฟาร์มสุกรนั้นๆ ของกลุ่มคนที่ทำงานในฟาร์มซึ่งมีการสัมผัสสุกรเปรียบเทียบกับระดับที่พบในกลุ่มควบคุมคือคนที่ไม่ได้สัมผัสกับสุกร โดยการเปลี่ยนค่า HI titer เป็น HI score ด้วยสูตรดังต่อไปนี้ ค่า HI score (n): $n = 2^n \times 5$ HI antibody titer (Kitikoon et al., 2006) แล้วจึงนำค่าเฉลี่ยของ HI score มาหาความแตกต่างทางสถิติของสองกลุ่มด้วยวิธี Two sample T test โดยใช้โปรแกรม JMP 5.1 Software (SAS Institute, Cary, NC) ที่จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ $p \leq 0.05$ โดยค่าที่แสดงในตารางที่ 11 และ 13 เป็นค่าที่ได้แปลงค่า HI score กลับเป็น HI antibody titer แล้ว นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการสัมผัสสุกรกับโอกาสการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร โดยนำจำนวนคนที่ให้ HI ที่เป็นบวกจากกลุ่มคนที่สัมผัสสุกรและไม่ได้สัมผัสสุกร (โดยถือค่า HI titer บวก = titer ≥ 40 ซึ่งบ่งชี้ว่าเคยได้มีการสัมผัสเชื้อไวรัสแอนติเจนที่นำมาทดสอบด้วยวิธี HI test (Olsen et al., 2002)) มาทำการวิเคราะห์เพื่อหา Odds Ratio (OR) และ ค่า Confidence intervals (CI) ด้วย Chi-square test ด้วยโปรแกรม OpenEpi Version 2 (Dean et al., 2009)

กรอบแนวความคิดของ (Conceptual Framework) ของโครงการวิจัยนี้ ได้แสดงไว้ในภาพที่ 3

ภาพที่ 3 กรอบแนวคิด (conceptual framework) ของโครงการวิจัย



ผลการวิจัย

วัตถุประสงค์ข้อที่ 1 ตรวจสอบความชุกของการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร โดยการเพาะแยกเชื้อไวรัสจากฟาร์มสุกรในจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นสูงที่สุดของประเทศไทย

ใน 1 ปีของการศึกษา โครงการวิจัยฯ ได้ทำการเก็บตัวอย่าง (Nasal swabs และชิ้นเนื้อปอด) จากสุกรในสองลักษณะคือ แบบ Normal และ Active surveillance

1. Normal surveillance ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มสุกรในจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นที่สุดลำดับที่ 1-4 ของประเทศไทย ซึ่งได้แก่จังหวัดราชบุรี นครปฐมและชลบุรีตามลำดับ โดยในแต่ละฟาร์มได้สุ่มเก็บตัวอย่าง Nasal swabs จากสุกรสาว สุกรนาง สุกรอนุบาลและสุกรขุนที่ 5 กลุ่มอายุได้แก่ ที่ 4, 8, 12, 18 และ 24 สัปดาห์ เป็นจำนวนทั้งหมด 35 ตัวอย่างต่อฟาร์ม และได้เข้าเก็บตัวอย่างในแต่ละฟาร์มอย่างน้อย 2 ครั้งต่อปี โดยจะเลือกสุ่มเก็บตัวอย่างในช่วงของการเปลี่ยนฤดู ซึ่งจำนวนตัวอย่าง nasal swab ทั้งหมดที่โครงการวิจัยฯ เก็บได้เท่ากับ 693 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งตัวอย่าง Nasal swabs ได้ถูกนำมา pool รวมกันจาก 5 ตัวอย่างรวมเป็น 1 pool เพื่อตรวจหาเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรด้วย วิธี RT-PCR ซึ่งผลการตรวจพบว่าจากจำนวน 143 pool ตรวจพบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งหมดเพียงแค่ 2 pool ซึ่งได้มาจากจังหวัดฉะเชิงเทรา คิดเป็น 1.4% ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผล RT-PCR บวกนี้เมื่อได้เพาะแยกเชื้อจากตัวอย่าง nasal swab ตั้งต้นก่อนที่จะ pool (รวม 10 ตัวอย่าง) พบว่าไม่สามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างได้เลย

2. Active surveillance คือการเก็บตัวอย่างจากสุกรที่แสดงอาการป่วยด้วยโรคระบบทางเดินหายใจ โดยได้ทำการเก็บตัวอย่าง Nasal swabs จากสุกรป่วย หรือในกรณีที่มีการผ่าซากจะเก็บตัวอย่างปอดที่มีรอยโรคที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร ซึ่งการสำรวจของโครงการวิจัยฯ ที่ผ่านมามีครั้งที่เป็น active surveillance คือ สองฟาร์มจากจังหวัดฉะเชิงเทรา และหนึ่งฟาร์มจากจังหวัดชลบุรี ซึ่งได้ปอดรวม 14 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากจังหวัดฉะเชิงเทราจำนวน 10 ตัวอย่าง และจากจังหวัดชลบุรีจำนวน 4 ตัวอย่างจากสุกรขุนที่แสดงอาการป่วยด้วยโรคระบบทางเดินหายใจ เมื่อช่วงปลายเดือนธันวาคมปีค.ศ. 2008 และต้นปี ค.ศ. 2009 ที่ผ่านมา ซึ่งผลการตรวจหาเชื้อไวรัสเบื้องต้นด้วยวิธี RT-PCR ให้ผลบวกในตัวอย่างปอดทั้งหมด 8 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) คิดเป็น 57.14% ของตัวอย่างปอดที่ส่งตรวจ และสามารถเพาะแยกเชื้อไวรัสได้ทั้งหมด 4 isolate คือ 50% ของตัวอย่างที่ทำการเพาะแยกเชื้อ โดยชนิดของไวรัสที่พบในระหว่างการสำรวจของโครงการวิจัยฯ ทั้งหมดเป็น H1

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างที่เก็บและผลการตรวจหาเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจากฟาร์มสุกรแยกตามจังหวัด

จังหวัด	ตัวอย่าง						
	Nasal swabs				Lung tissue		
	Numbers	swab pools [†]	RT-PCR ^{††} + pools	Virus isolated	Numbers	RT-PCR ^{††} + tissues	Virus isolated
ราชบุรี	210	42	0	0	0	0	0
นครปฐม	210	42	0	0	0	0	0
ชลบุรี	80	16	0	0	4	1 [‡]	1
ฉะเชิงเทรา	213	43	2	0	10 [‡]	7 ^{**}	3 [*]
รวม	693	143	2	0	14	8	4

[†] pool ตัวอย่าง Nasal swabs จำนวน 5 ตัวอย่าง (จากสุกรกลุ่มอายุเดียวกัน) รวมเป็น 1 ตัวอย่าง

^{††} ตรวจหา matrix gene ซึ่งเป็น conserved gene ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยวิธี reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR)

[‡] subtype H1N1

^{**} 2 samples are subtype H1N2 and 5 samples are H1 with unidentified NA

^{*} 2 isolates of H1N2 and 1 isolate of H1 with unidentified NA

วัตถุประสงค์ข้อที่ 2 ศึกษาเชิงลึกถึงระดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบ เพื่อประเมินการเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ

ได้ทำการศึกษาพันธุกรรมเชิงลึกของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้ง isolate ที่พบก่อนหน้านี้เริ่มโครงการวิจัยฯ คือ ปีค.ศ. 2005-2007 และระหว่างดำเนินการสำรวจของโครงการวิจัยฯ คือระหว่างปลายปีค.ศ. 2008 ถึงกลางปีค.ศ. 2009 โดย isolate ของเชื้อไวรัสที่ได้นั้น ได้ถูกนำมาทำการศึกษาพันธุกรรมเชิงลึกสอง subtype ด้วยกัน คือ H1N1 และ H3N2 เป็นจำนวน 3 และ 2 isolates ตามลำดับ โดยเชื้อทั้งหมดที่ถูกนำมาถอดรหัสเพื่อศึกษาถึงพันธุกรรมเชิงลึกเป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากฟาร์มสุกรในจังหวัดเดียวกันคือ ฟาร์มในเขตจังหวัดชลบุรี เท่านั้น โดยตัวอย่างไวรัสทั้งหมดได้ถูกเพาะแยกจากสุกรหย่านม ช่วงอายุ 4-8 สัปดาห์ ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนขนาดของท่อนพันธุกรรมของเชื้อแต่ละ isolate ที่ได้ทำการถอดรหัสถูกนำเสนอในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 แสดง virus isolates ที่ทำการศึกษาพันธุกรรมเชิงลึกในโครงการวิจัยฯ นี้

Virus name (subtype); common name	Date of isolation	Sample	Primary propagated host	Age of pigs isolated on the farm (Province)
A/sw/Thailand/HF6/05(H1N1); H1N1(05)	August 2005	NS*	CEE**	6 weeks (Chonburi)
A/sw/Thailand/S1/05(H3N2); H3N2(05)	August 2005	NS	CEE	4-8 weeks (Chonburi)
A/sw/Thailand/CU-CB1/06(H1N1); H1N1(06)	September 2006	Lung	MDCK***	Early growing (Chonburi)
A/sw/Thailand/CU-CB8.4/07(H3N2); H3N2(07)	September 2007	NS	MDCK	8 weeks (Chonburi)
A/sw/Thailand/CU-CB918/09(H1N1); H1N1(09)	January 2009	Lung	CEE	6 weeks (Chonburi)

* NS = Nasal swabs

** CEE = Chicken embryonated eggs

*** MDCK = Madin-Darby Canine Kidney cell line

ตารางที่ 4 แสดงขนาดของท่อนพันธุกรรมทั้งแปดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ได้ทำการถอดรหัสในโครงการวิจัยฯ นี้

Gene (length; base pair)	H1N1			H3N2	
	H1N1 (05) [†]	H1N1 (06) [†]	H1N1 (09) [†]	H3N2 (05) [†]	H3N2 (07) [†]
PB2 (2341)	2247	2249	2200	2244	2296
PB1 (2341)	2258	2247	2200	1334	2273
PA (2233)	2132	2134	2165	2177	2168
HA (1778)	1732 ^{††}	1636	1694	1778 ^{††}	706
NP (1565)	1489	1482	1530	1508	1565
NA (1413)	1409 ^{††}	1414	1378	1413 ^{††}	1410
M (1027)	989	994	987	1027	1027
NS (890)	846	835	843	841	864

[†] กำลังอยู่ในระหว่างการ submit sequence เข้าสู่ Genbank

^{††} (Sreta et al., 2009)

ผลการวิเคราะห์เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1

ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1(05), H1N1(06) และ H1N1(09) ทั้ง 3 ตัวอย่างที่เพาะแยกได้จากจังหวัดชลบุรีในปีค.ศ. 2005, 2006 และ 2009 ตามลำดับ ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยคอมพิวเตอร์โปรแกรม Bioedit และ MegAlign (DNASTAR, Madison, WI) เพื่อดูความเหมือนหรือแตกต่างของรหัสพันธุกรรม และเพื่อหาจุดที่มีความสำคัญของเชื้อและศึกษาทางระบาดวิทยาถึงต้นกำเนิดของท่อนพันธุกรรม (genetic lineage) ในทุกท่อนยีน (8 gene segments) ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้พบว่า ท่อนพันธุกรรมทั้งแปดท่อนของเชื้อ H1N1(05) H1N1(06) และ H1N1(09) ยังคงมีลักษณะของ genetic lineage ที่คล้ายคลึงกันคือ เชื้อทั้งสามมีท่อนพันธุกรรม hemagglutinin (HA) และ nonstructural (NS) ยีนที่มีต้นกำเนิดมาจากสุกร (Classical swine lineage) ซึ่งเป็นลักษณะเหมือนกันกับที่พบในเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ในทวีปอเมริกาเหนือ ในขณะที่ท่อนพันธุกรรมที่เหลืออีกหกท่อน ซึ่งได้แก่ polybasic 1 และ 2 (PB1 และ PB2) polyacid (PA) nucleoprotein (NP) neuraminidase (NA) และmatrix (M) มีต้นกำเนิดสายพันธุ์มาจาก Eurasian swine lineage ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากนก (Avian-like swine lineage) และคล้ายคลึงกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่พบในทวีปยุโรป ดังแสดงในตารางที่ 5, 6 และ 7 ซึ่งตารางยังได้บ่งชี้ชื่อของเชื้อ และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรหัสพันธุกรรม (nucleotide homology) ของท่อนพันธุกรรมที่นำไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ศึกษากับเชื้อ reference swine influenza viruses ใน GenBank

ตารางที่ 5 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/HF6/05 (H1N1); H1N1(05) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank

Gene	Nt* positions of H1N1(05) compared	Virus with the highest degree of Homology	Nt identity (%)	Influenza virus lineage
PB2	20-2280	A/sw/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	99	Eurasian (Avian-like)
PB1	1-2274	A/sw/Chonburi/NIAH9469/2004(H1N1)	99	Eurasian (Avian-like)
PA	1-2251	A/sw/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	99	Eurasian (Avian-like)
HA	1-1707	A/sw/Chonburi/05CB1/2005(H1N1)	100	Classical swine
NP	1-1443	A/sw/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	95	Eurasian (Avian-like)
NA	12-1718	A/sw/Chonburi/05CB1/2005(H1N1)	100	Eurasian (Avian-like)
M	29-996	A/sw/Chonburi/NIAH9469/2004(H1N1)	99	Eurasian (Avian-like)
NS	28-845	A/sw/Chonburi/NIAH9469/2004(H1N1)	99	Classical swine

* Nucleotide

ตารางที่ 6 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/CU-CB1/06 (H1N1); H1N1(06) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank

Gene	Nt* positions of H1N1(06) compared	Virus with the highest degree of Homology	Nt identity (%)	Influenza virus lineage
PB2	14-2268	A/sw/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	98	Eurasian (Avian-like)
PB1	25-2271	A/sw/Chonburi/NIAH9469/2004(H1N1)	99	Eurasian (Avian-like)
PA	25-2151	A/sw/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	99	Eurasian (Avian-like)
HA	65-1700	A/sw/Chonburi/05CB1/2005(H1N1)	99	Classical swine
NP	1-1482	A/sw/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	99	Eurasian (Avian-like)
NA	29-1410	A/sw/Chonburi/06CB2/2006(H1N1)	99	Eurasian (Avian-like)
M	27-994	A/sw/Chonburi/NIAH9469/2004(H1N1)	99	Eurasian (Avian-like)
NS	30-835	A/sw/Chonburi/NIAH9469/2004(H1N1)	98	Classical swine

* Nucleotide

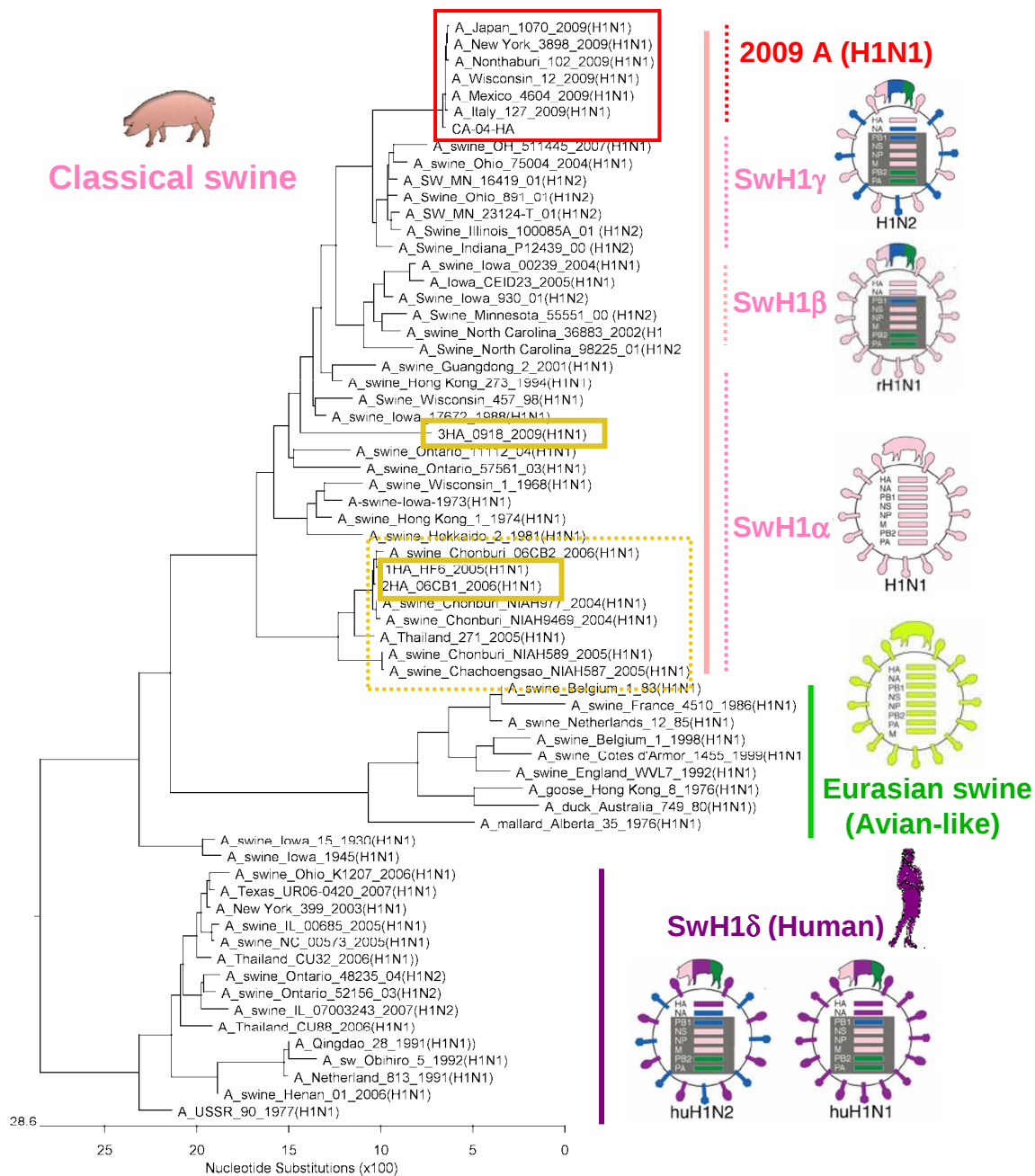
ตารางที่ 7 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/CU-CB918/09 (H1N1); H1N1(09) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank

Gene	Nt* positions of H1N1(09) compared	Virus with the highest degree of Homology	Nt identity (%)	Influenza virus lineage
PB2	24-2261	A/sw/Ratchaburi/NIAH1481/2000(H1N1)	95	Eurasian (Avian-like)
PB1	20-2274	A/sw/Udon Thani/NIAH464/2004(H3N2)	97	Eurasian (Avian-like)
PA	1-2151	A/sw/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	98	Eurasian (Avian-like)
HA	13-1694	A/sw/Ratchaburi/NIAH1481/2000(H1N1)	96	Classical swine
NP	2-1530	A/sw/Italy/839/1989(H1N1)	95	Eurasian (Avian-like)
NA	22-1431	A/sw/Ratchaburi/NIAH550/2003(H1N1)	97	Eurasian (Avian-like)
M	26-993	A/Thailand/271/2005(H1N1)	97	Eurasian (Avian-like)
NS	1-838	A/sw/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	98	Classical swine

* Nucleotide

เมื่อศึกษาเพิ่มเติมในแนวคิดของท่อนพันธุกรรม hemagglutinin (HA) โดยการทำ phylogenetic analysis จะพบว่า เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสามที่เพาะแยกจากจังหวัดชลบุรีในปีค.ศ. 2005, 2006 และ 2009 จะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Swine H1 alpha (SwH1 α) ซึ่งเป็นกลุ่มที่เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่มีต้นกำเนิดสายพันธุ์ของท่อนพันธุกรรมทุกท่อนมาจากสุกร (Classical swine lineage) ในขณะที่ HA ยีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ที่เกิดจากการ reassort ของท่อนพันธุกรรมที่มีต้นกำเนิดจากคนและนก (ท่อน PB1 จากคนและท่อน PB2 กับ PA จากนก) และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N2 ที่มีท่อน HA ยีนจากสุกรส่วนท่อน PB1 จากคน และท่อน PB2 กับ PA จากนก จะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม SwH1 β และ SwH1 γ ตามลำดับ (ภาพที่ 4) เมื่อดูตำแหน่ง enzyme cleavage site บนท่อน HA ยีนเพื่อหา virulent phenotype marker ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสามไม่พบ multiple basic amino acids insertion เช่นที่พบในเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์รุนแรงชนิด H5 และ H7 เมื่อวิเคราะห์ถึงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ของรหัสพันธุกรรม จะพบว่าท่อนพันธุกรรม H1 ของเชื้อ H1N1(05) และ H1N1(06) มีความเหมือนของรหัสพันธุกรรมถึง 99% และเหมือนกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่มีรายงานจากสุกรจังหวัดชลบุรีปีค.ศ. 2004 - 2006 มากกว่า 95% ในขณะเดียวกันเชื้อทั้งสองดังกล่าวมีความเหมือนกับเชื้อ H1N1(09) ที่เพาะแยกได้จากจังหวัดเดียวกันเพียง 84% ซึ่งบ่งชี้ถึงการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ในจังหวัดชลบุรี (ภาพที่ 5) จากการวิเคราะห์ข้อมูลการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์โดยดูจากการถอดรหัสของยีน ยังพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1(05) และ H1N1(06) ที่เพาะแยกจากสุกรในจังหวัดชลบุรีในปีค.ศ. 2005 และ 2006 มี 97.6% homology กับเชื้อ A/Thailand/271/2005 (H1N1) ที่มีรายงานว่าเพาะแยกได้ในปีเดียวกันจากเด็กชายอายุ 4 ปี ซึ่งป่วยด้วย rhinorrhea ร่วมกับอาการไข้ และปวดกล้ามเนื้อ อย่างไรก็ตามเมื่อนำเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสามตัวอย่างมาศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ที่กำลังแพร่ระบาดในประชากรมนุษย์อยู่ ณ ขณะนี้จะพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ทั้งสามและเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 มี HA ยีนที่มีต้นกำเนิดสายพันธุ์มาจากสุกร (classical swine lineage) เหมือนกัน แต่เมื่อพิจารณารหัสพันธุกรรมโดยรวมของ HA ยีนแล้วจะพบว่าเชื้อทั้งสามมีความแตกต่างกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 มากกว่า 17.8%

สำหรับท่อน neuraminidase (NA) ยีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสามที่เพาะแยกจากจังหวัดชลบุรีในปีค.ศ. 2005, 2006 และ 2009 พบว่าเชื้อ H1N1 ปี 2009 มีรหัสพันธุกรรมใกล้เคียงกับปี 2006 มากกว่าปี 2005 คือมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 93.1% และ 80.3% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อปี 2005 กับ 2006 มีความเหมือนกันอยู่ 86.9% เมื่อดูตำแหน่งที่บ่งชี้การดื้อต่อยา Oseltamivir จะพบว่าเชื้อ H1N1(05) และ H1N1(06) ไม่ดื้อต่อยา ในขณะที่เชื้อ H1N1(09) พบว่าดื้อต่อยา (ภาพที่ 6) เมื่อทำการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พบว่าเชื้อทั้งสาม (ภาพที่ 7) ได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีต้นกำเนิดเป็น Avian (Eurasian swine) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบในไข้หวัดใหญ่สุกรในทวีปยุโรปและเอเชียที่ท่อนพันธุกรรมมาจากนก เช่นเดียวกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่



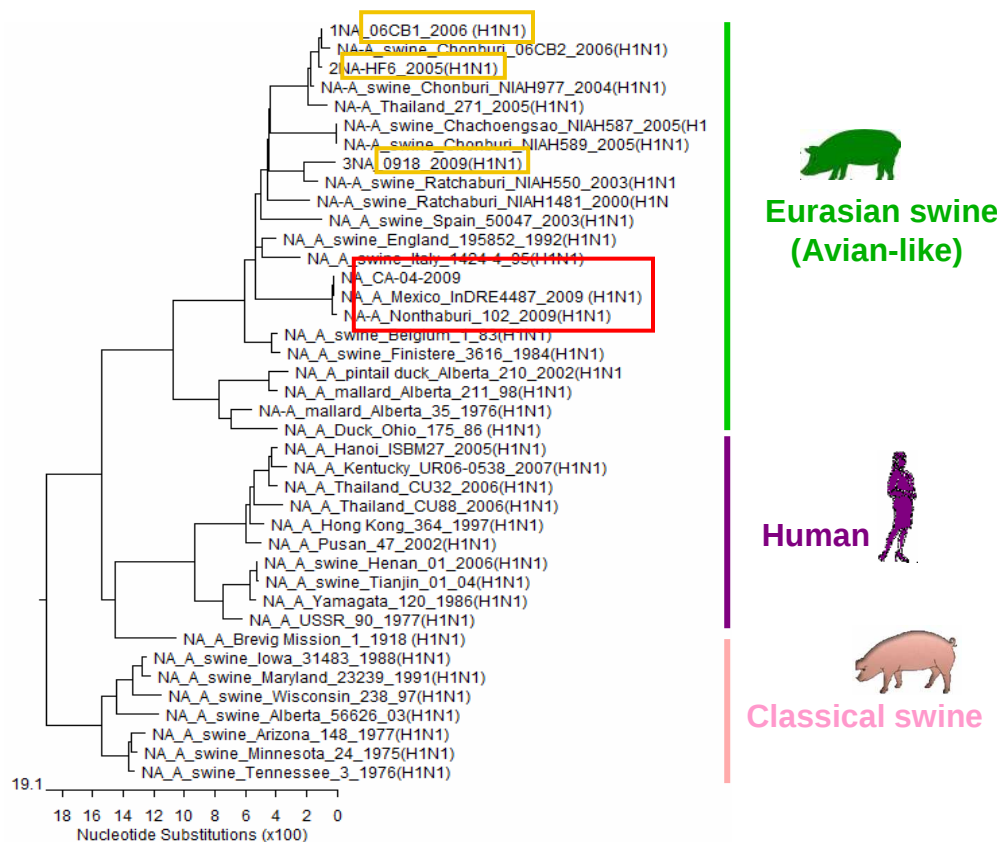
ภาพที่ 4 Phylogenetic tree ของ H1N1 ยีน แสดงวิวัฒนาการของไวรัสกับต้นกำเนิดสายพันธุ์ โดยสีชมพูแสดง ความจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจากสุกร (Classical swine) สีเขียวจากสัตว์ปีกที่เข้าสู่สุกรในทวีปยุโรป (Avian (Eurasian)) และสีม่วงจากมนุษย์ (Human) ไวรัสในสี่เหลี่ยมสีแดงคือ เชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ใน คน ไวรัสในสี่เหลี่ยมเส้นประสีทองคือไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกในประเทศไทยระหว่างปี 2000-2005 ไวรัสใน สี่เหลี่ยมสีทองคือไข้หวัดใหญ่สุกรที่ศึกษาในโครงการวิจัยฯ โดย HF5_2005(H1N1) = H1N1(05), 06CB1_2006 (H1N1) = H1N1(06) และ 0918_2009(H1N1) = H1N1(09) ภาพดัดแปลงมาจาก Vincent และคณะ (2008)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. swThai-HF6/05(H1N1)														
2. swThai-CB1/06(H1N1)	0.001													
3. swThai-CB918/09(H1N1)	0.159	0.160												
4. A/California09(H1N1)	0.176	0.178	0.154											
5. A/Mexico09(H1N1)	0.177	0.179	0.155	0.003										
6. A/Nonthaburi09(H1N1)	0.179	0.181	0.157	0.004	0.001									
7. A/Thailand05	0.024	0.024	0.159	0.171	0.172	0.173								
8. swChachoengsao05(H1N1)	0.043	0.043	0.154	0.181	0.182	0.184	0.046							
9. swChonburi04(H1N1) NIAH977	0.024	0.024	0.159	0.171	0.172	0.173	0.000	0.046						
10. swChonburi04(H1N1)	0.006	0.006	0.159	0.178	0.179	0.181	0.021	0.038	0.021					
11. swChonburi05(H1N1)	0.043	0.043	0.153	0.180	0.181	0.183	0.045	0.001	0.045	0.037				
12. swChonburi06(H1N1)	0.006	0.006	0.162	0.180	0.181	0.183	0.029	0.048	0.029	0.011	0.048			
13. swRatchaburi03(H1N1)	0.143	0.145	0.117	0.142	0.141	0.142	0.145	0.149	0.145	0.143	0.148	0.148		
14. swRatchaburi00(H1N1)	0.146	0.148	0.037	0.131	0.132	0.134	0.145	0.144	0.145	0.148	0.143	0.149	0.099	
15. A/Thailand06 CU41(H1N1)	0.328	0.328	0.354	0.371	0.373	0.373	0.333	0.332	0.333	0.333	0.333	0.332	0.322	0.336

ภาพที่ 5 แสดงความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมของท่อนพันธุกรรม HA โดยเชื้อลำดับที่ 1-3 คือ เชื้อ H1N1(05), H1N1(06) และ H1N1(09) ตามลำดับ

- 	
☒ Consensus	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
27 Sequences	120 130
06CB1 NA 2006 (H1N1) reversed and edited	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
0918 NA edited	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
HF6 NA 2005 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_swine_Chonburi_NIAH589_2005 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_swine_Chonburi_NIAH977_2004 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_swine_Chonburi_NIAH9469_2004 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_swine_Henan_01_2006 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_swine_Korea_CAS08_2005 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_swine_Ratchaburi_NIAH550_2003 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_swine_Ratchaburi_NIAH1481_2000 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_swine_Thailand_HF6_2005 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_swine_Tianjin_01_2004 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_swine_Zhejiang_1_2007 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_Thailand_39_2008 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_Thailand_104_2009 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_Thailand_271_2005 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_Thailand_CU41_2006 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_Thailand_CU53_2006 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_Thailand_CU67_2006 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
A_Thailand_CU88_2006 (H1N1)	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ
CA-04-NA	GDVVFVIREPFFISCSHLECRFTFFLTQ

ภาพที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 119 (กรดอะมิโนที่เปลี่ยนเป็นไทโรซีน) ของเชื้อ H1N1(09) ซึ่งเปลี่ยนจาก Glutamine (E) เป็น Lysine (K) ส่งผลทำให้ดื้อยา Oseltamivir

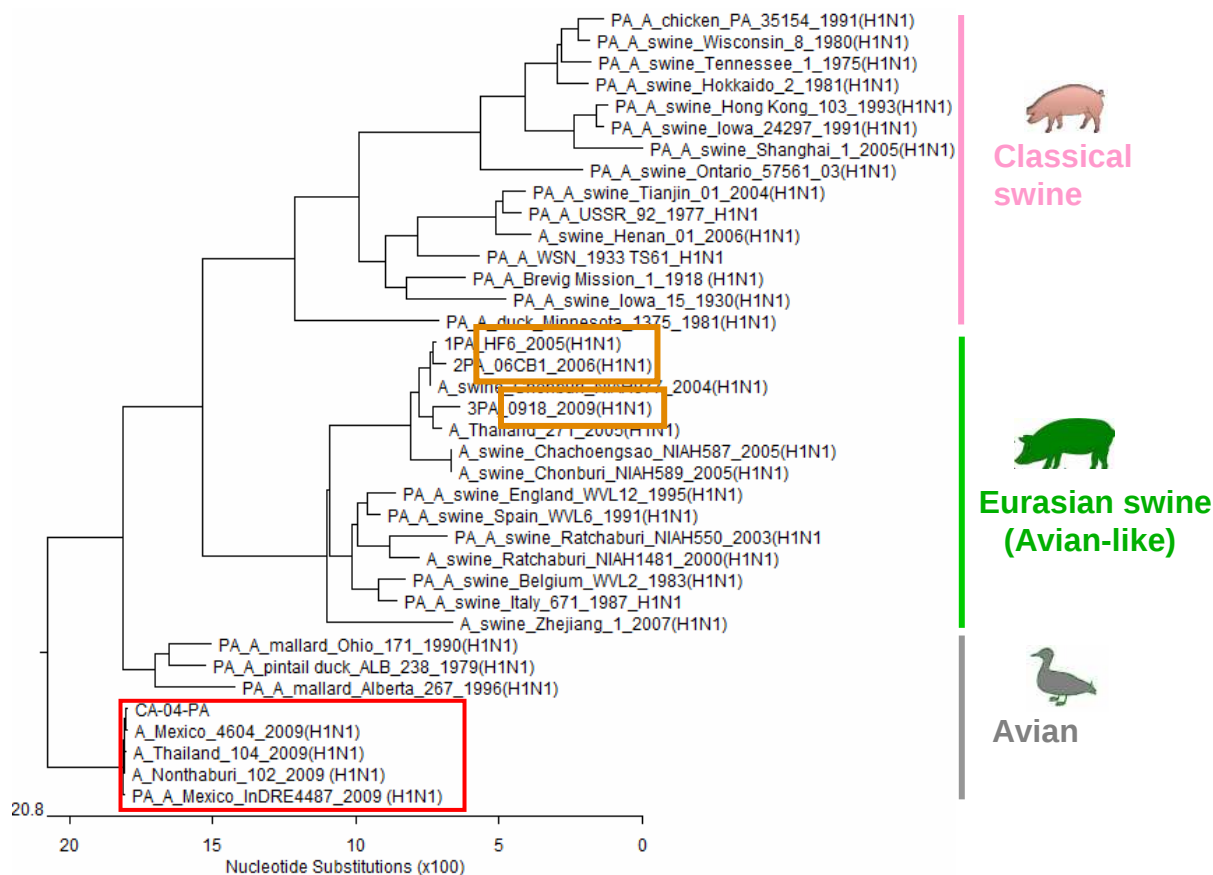


ภาพที่ 7 Phylogenetic tree ของ N1 ยีน แสดงวิวัฒนาการของไวรัสกับต้นกำเนิดสายพันธุ์ โดยสีชมพูแสดง ความจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจากสุกร (Classical swine) สีเขียวจากสัตว์ปีกที่พบในเชื้อไข้หวัดใหญ่ สุกรในทวีปยุโรป (Avian (Eurasian)) และสีม่วงจากมนุษย์ (Human) กลุ่มไวรัสในสีเหลี่ยมสีแดงคือ เชื้อไวรัส ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ในคน สีเหลี่ยมสีทองแสดงเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ศึกษาใน โครงการวิจัยฯ นี้ โดย HF5_2005(H1N1) = H1N1(05), 06CB1_2006(H1N1) = H1N1(06) และ 0918_2009(H1N1) = H1N1(09)

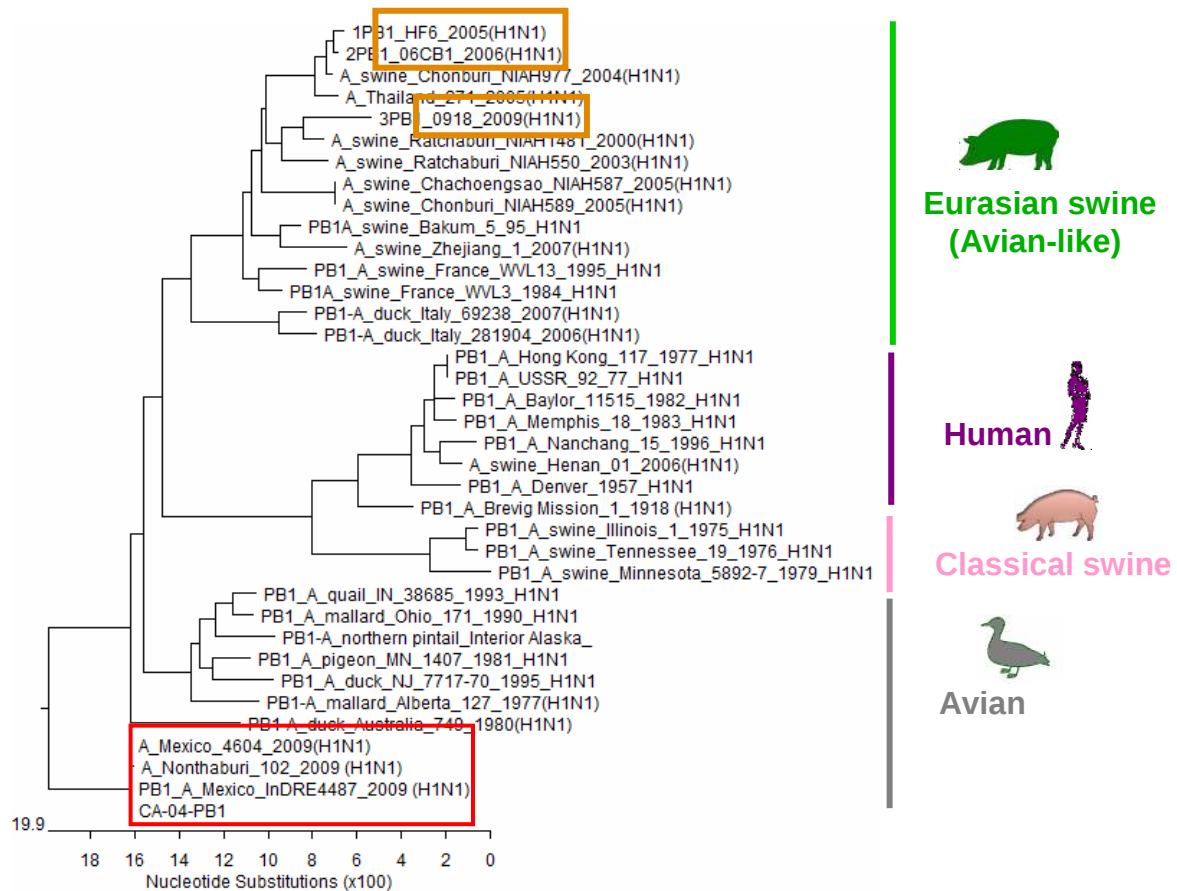
สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 และเชื้อไข้หวัดใหญ่ A/Thailand/271/2005 (H1N1) ที่พบในคนก็มีต้นกำเนิดสายพันธุ์ของท่อน NA ยีนมาจาก Avian (Eurasian swine) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสามกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 จะพบว่ามีเพียง 73.9-86.4% homology ในขณะที่เชื้อ H1N1(05) มีความเหมือนกับไข้หวัดใหญ่ A/Thailand/271/2005 (H1N1) ถึง 92.7%

ท่อน viral polymerases ยีนทั้งสามท่อน (PA, PB1 และ PB2) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสามที่ศึกษา มีความเหมือนของรหัสพันธุกรรมมากกว่า 93.5% โดยเชื้อ H1N1(05) จะใกล้เคียง (98% homology) กับเชื้อ H1N1(06) มากกว่า H1N1(09) เมื่อศึกษาแผนภูมิต้นไม้ของ PA, PB1 และ PB2 ยีนของเชื้อทั้งสาม จะเห็นว่ามีต้นกำเนิดของท่อนพันธุกรรมเป็น avian (Eurasian) คือสายพันธุ์ที่พบในเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในทวีปยุโรป และเอเชียส่วนใหญ่ที่ท่อนพันธุกรรมมาจากการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์จากนกสู่สุกร (ภาพที่ 8-10) ซึ่งเหมือนกับ viral polymerases ของเชื้อ A/Thailand/271/2005 (H1N1) ที่ติดในเด็กชายไทย แต่แตกต่างกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ที่กำลังระบาดใหญ่ในประชากรมนุษย์ ณ ขณะนี้

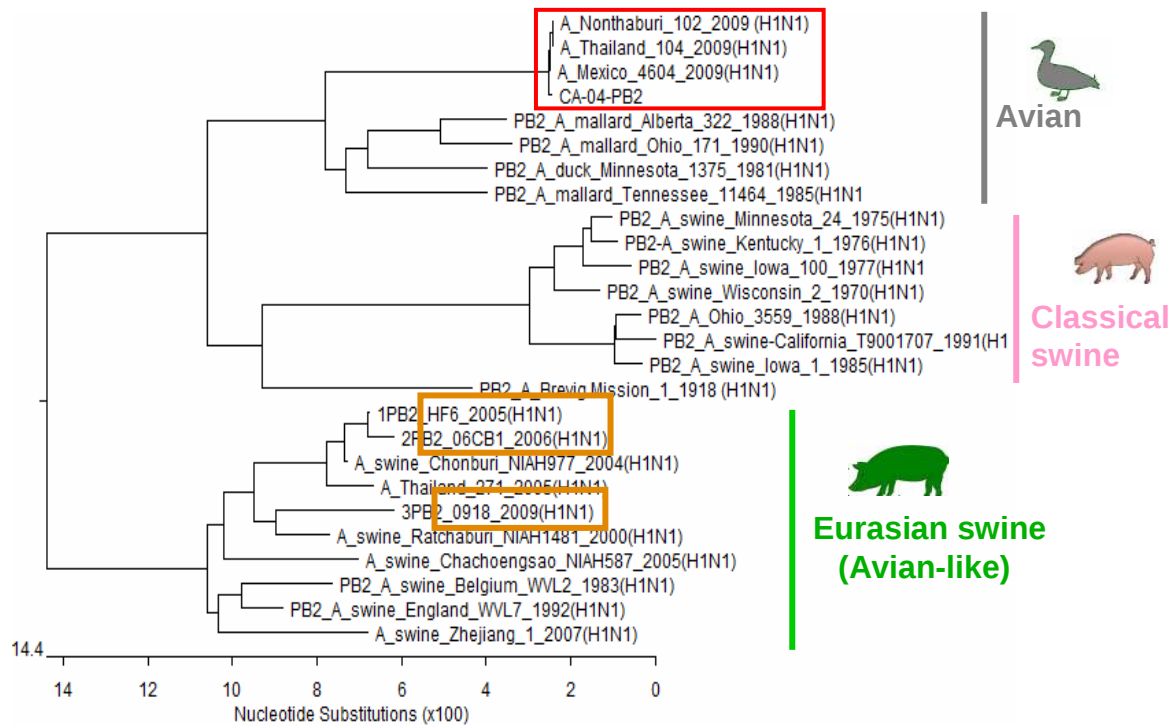
เมื่อศึกษาความเหมือนของท่อนพันธุกรรม nucleoprotein (NP), matrix (M) และ nonstructural protein (NS) ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสาม จะพบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 91.6% โดยท่อน NP, M และ NS มีเปอร์เซ็นต์ homology อย่างน้อยเท่ากับ 91.6, 97.2 และ 95.3 ตามลำดับ และเช่นเดียวกันกับท่อนพันธุกรรมอื่นๆ ที่ผ่านมา ท่อน NP, M และ NS ยีนของเชื้อ H1N1(05) มีรหัสพันธุกรรมที่คล้ายกับเชื้อ H1N1(06) มากกว่าเชื้อ H1N1(09) เมื่อทำการเปรียบเทียบท่อนพันธุกรรมทั้งแปดของเชื้อทั้งสามกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เคยเพาะแยกได้ในประเทศไทยจะพบว่าท่อน M ยีนมีความคงที่ที่สุด โดยเชื้อทั้งหมดจะมีความคล้ายคลึงกันของรหัสพันธุกรรมมากกว่า 93.4 % นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ท่อน M ยีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสามจะพบว่าทั้งหมดคือดื้อยา Amantadine เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโนที่ 31 ซึ่งบ่งชี้ถึงการดื้อยา (ภาพที่ 11) เมื่อดูต้นกำเนิดสายพันธุ์ของท่อน NP, M และ NS ยีนของเชื้อทั้งสามจะพบว่า NP และ M เป็น avian (Eurasian) ในขณะที่ NS เป็น classical swine ซึ่งแตกต่างกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ที่มีท่อน M เป็น avian (Eurasian) ในขณะที่ NP และ NS เป็น classical swine



ภาพที่ 8 Phylogenetic tree ของ PA ยีน แสดงวิวัฒนาการของไวรัสกับต้นกำเนิดสายพันธุ์ โดยสีชมพูแสดง ความจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจากสุกร (Classical swine) สีเขียวจากสัตว์ปีกที่พบในเชื้อไข้หวัดใหญ่ สุกรในทวีปยุโรป (Avian (Eurasian)) และสีเทาจากสัตว์ปีก (Avian) กลุ่มไวรัสในสีเหลี่ยมสีแดงคือ เชื้อไวรัส ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ในคน สีเหลี่ยมสีทองแสดงเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ศึกษาใน โครงการวิจัย นี้ โดย $HF5_2005(H1N1) = H1N1(05)$, $06CB1_2006(H1N1) = H1N1(06)$ และ $0918_2009(H1N1) = H1N1(09)$



ภาพที่ 9 Phylogenetic tree ของ PB1 ยีน แสดงวิวัฒนาการของไวรัสกับต้นกำเนิดสายพันธุ์ โดยสีชมพูแสดงความจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจากสุกร (Classical swine) สีเขียวจากสัตว์ปีกที่พบในเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในทวีปยุโรป (Avian (Eurasian)) สีเทาจากสัตว์ปีก (Avian) และสีม่วงจากคน กลุ่มไวรัสในสีเหลี่ยมสีแดงคือ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ในคน สีเหลี่ยมสีทองแสดงเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ศึกษาในโครงการวิจัยฯ นี้โดย HF5_2005(H1N1) = H1N1(05), 06CB1_2006(H1N1) = H1N1(06) และ 0918_2009(H1N1) = H1N1(09)



ภาพที่ 10 Phylogenetic tree ของ PB2 ขึ้น แสดงวิวัฒนาการของไวรัสกับต้นกำเนิดสายพันธุ์ โดยสีชมพูแสดงความจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจากสุกร (Classical swine) สีเขียวจากสัตว์ปีกที่พบในเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในทวีปยุโรป (Avian (Eurasian)) และสีเทาจากสัตว์ปีก (Avian) กลุ่มไวรัสในสีเขียวแสดงเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ในคน สีเหลี่ยมสีทองแสดงเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ศึกษาในโครงการวิจัยฯ นี้โดย HF5_2005(H1N1) = H1N1(05), 06CB1_2006(H1N1) = H1N1(06) และ 0918_2009(H1N1) = H1N1(09)

Consensus	WECRYSDSSDPLVIAANIIGI
8 Sequences	20 30
1M2_HF6_2005 (H1N1)	WECRYGDSSDPLVIAANIIGI
2 M2_06CB1_2006 (H1N1)	WECRYGDSSDPLVIAANIIGI
3 M2_09P18_2009 (H1N1)	WECRYSDSSDPLVTAANIIGI
M2_CA-04-M	WECRCSDSSDPLVIAANIIGI
M2_Brevig Mission_1_1918 (H1N1)	WGCRCDSSDPLVIAASIIGI

ภาพที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31 (กรอบสีเขียว) ของเชื้อ H1N1(05), H1N1(06) และ H1N1(09) ซึ่งเปลี่ยนจาก Serine (S) เป็น Asparagine (N) ซึ่งส่งผลทำให้ดื้อยา Amantadine

ผลการวิเคราะห์เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H3N2

ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H3N2(05) และ H3N2(07) ทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่เพาะแยกได้จากจังหวัดชลบุรีในปีค.ศ. 2005 และ 2007 ตามลำดับ ได้ถูกนำมาถอดรหัสพันธุกรรมของยีนอม โดยขนาดของท่อนพันธุกรรมที่สามารถถอดรหัสได้สมบูรณ์ของเชื้อทั้งสองมีจำนวน 6 ท่อน ได้แก่ PB2, HA, NP, NA, M และ NS ของเชื้อ H3N2(05) และ viral polymerase (PB2, PB1 และ PA), NA, M และ NS ของเชื้อ H3N2(07) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูลทำโดยการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของท่อนยีนที่ได้กับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรอื่นๆ จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยคอมพิวเตอร์โปรแกรม Bioedit และ MegAlign (DNASTAR, Madison, WI) เพื่อดูความเหมือนหรือแตกต่างของรหัสพันธุกรรม และเพื่อศึกษาทางระบาดวิทยาถึงต้นกำเนิดของท่อนพันธุกรรม (genetic lineage) เฉพาะท่อนยีนที่สามารถทำการถอดรหัสได้มากเพียงพอกับการนำไปวิเคราะห์ดังกล่าว ซึ่งผลการวิเคราะห์ถึงต้นกำเนิดสายพันธุ์และเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่มีท่อนพันธุกรรมเหมือนมากที่สุด (highest homology compared between gene segments) แสดงในตารางที่ 8 และ 9

พบว่า ท่อนพันธุกรรมหกท่อนของเชื้อ H3N2(05) ซึ่งเพาะแยกได้จากสุกรในจังหวัดชลบุรียังมีลักษณะของ genetic lineage ผสมระหว่างมนุษย์และสุกรสายยุโรป กล่าวคือ เชื้อมีท่อนพันธุกรรม HA และ NA ยีนที่มีต้นกำเนิดสายพันธุ์จากมนุษย์ ส่วนที่เหลืออีกสี่ท่อน (PB2, NP, NS และ M) มีต้นกำเนิดสายพันธุ์จากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในทวีปยุโรปและเอเชีย (Eurasian swine) ซึ่งถือว่าคล้ายคลึงกับนก (avian-like) รหัสพันธุกรรมของแต่ละท่อนพบว่าคล้ายคลึงกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในสุกรที่เพาะแยกได้ในประเทศไทย เมื่อปีค.ศ. 2005 จากจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา โดยรหัสพันธุกรรมของเชื้อเหมือนกันกว่า 97% สำหรับผลการวิเคราะห์เชื้อ H3N2(07) ในเบื้องต้นพบว่ามีความแตกต่างกันกับเชื้อ H3N2(05) ตรงที่ท่อน NS ยีนของเชื้อมีต้นกำเนิดสายพันธุ์มาจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในแถบทวีปอเมริกาเหนือ (classical swine) ในขณะที่เชื้อ H3N2(05) มีต้นกำเนิดสายพันธุ์จากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในทวีปยุโรปและเอเชีย (Eurasian swine) นอกจากนี้เมื่อดูเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของเชื้อ H3N2(07) จะพบว่าท่อนพันธุกรรมส่วนใหญ่จะมีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้จากจังหวัดราชบุรีในปีค.ศ. 2004 โดยมีความเหมือนมากกว่า 95%

ตารางที่ 8 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/S1/05 (H3N2); H3N2(05) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank

Gene	Nt* positions of H3N2(05) compared	Virus with the highest degree of homology	Nt identity (%)	Influenza virus lineage
PB2	8-2236	A/sw/Chonburi/NIAH589/2005(H1N1)	97	Eurasian (Avian-like)
PB1	832-2166	A/sw/Chonburi/NIAH9469/2004(H1N1)	98	-
PA	1-733	A/Thailand/271/2005(H1N1)	98	-
HA	3-1703	A/sw/Chonburi/05CB2/2005(H3N2)	100	Human-like
NP	2-1508	A/sw/Italy/839/1989(H1N1)	95	Eurasian (Avian-like)
NA	1-1407	A/sw/Chonburi/05CB2/2005(H3N2)	99	Human-like
M	29-997	A/sw/Chachoengsao/NIAH587/2005(H1N1)	97	Eurasian (Avian-like)
NS	1-838	A/sw/Chachoengsao/NIAH587/2005(H1N1)	97	Eurasian (Avian-like)

* Nucleotide

ตารางที่ 9 Sequence homology ของแต่ละท่อนพันธุกรรมของเชื้อ A/sw/Thailand/CU-CB8.4/07 (H3N2); H3N2(07) เมื่อเปรียบเทียบกับ reference swine influenza virus ใน GenBank

Gene	Nt* positions of H3N2(05) compared	Virus with the highest degree of homology	Nt identity (%)	Influenza virus lineage
PB2	19-2280	A/sw/Ratchaburi/NIAH59/2004(H3N2)	97	Eurasian (Avian-like)
PB1	1-2273	A/sw/Ratchaburi/NIAH59/2004(H3N2)	98	Eurasian (Avian-like)
PA	22-2165	A/sw/Ratchaburi/NIAH59/2004(H3N2)	98	Eurasian (Avian-like)
HA	152-858	A/sw/Ratchaburi/NIAH59/2004(H3N2)	100	-
NP	60-1556	A/sw/Ratchaburi/NIAH59/2004(H3N2)	95	-
NA	1-1410	A/sw/Ratchaburi/NIAH59/2004(H3N2)	99	Human-like
M	3-1011	A/sw/Gent/V230/92(H1N1)	97	Eurasian (Avian-like)
NS	16-852	A/sw/Ratchaburi/NIAH59/2004(H3N2)	97	Classical swine

* Nucleotide

วัตถุประสงค์ข้อที่ 3 ศึกษาาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทางชีรั่มวิทยาในสุกรทุกกลุ่มอายุ เพื่อศึกษาภาพรวมความคุ้มครองของการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร

โครงการวิจัยฯ ได้ทำการเก็บตัวอย่างชีรั่มจากสุกรในจังหวัดราชบุรี นครปฐม ชลบุรีและฉะเชิงเทรา เป็นจำนวน 3 ฟาร์มต่อจังหวัด ยกเว้นจังหวัดชลบุรีที่เก็บเพียง 2 ฟาร์ม โดยในแต่ละฟาร์มจะทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง เฉพาะกลุ่มอายุที่กำหนดคือ สุกรสาว สุกรนาง สุกรอนุบาลและสุกรขุนรวม เป็นจำนวนทั้งหมด 35 ตัวอย่างต่อฟาร์ม โดยเก็บตัวอย่างในแต่ละฟาร์มอย่างน้อย 2-3 ครั้งต่อปี ซึ่งรวมแล้วจำนวนตัวอย่างชีรั่มทั้งหมดได้ 862 ตัวอย่าง (ตารางที่ 10)

ตัวอย่างชีรั่มทั้งหมดได้ถูกนำมาสำรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งชนิด H1N1 และ H3N2 โดยมีความประสงค์ที่จะทำการตรวจตัวอย่างชีรั่มสุกรด้วยวิธี Hemagglutination inhibition (HI) test ต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในสองลักษณะคือ homologous virus ซึ่งจะใช้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้จาก ฟาร์มสุกรนั้นๆ ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อในตัวอย่างชีรั่มที่เก็บได้จากฟาร์มสุกรเดียวกันก่อน จึงทำการ ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อ heterologous virus ซึ่งจะใช้เชื้อที่เพาะแยกได้จากฟาร์มสุกรอื่นมาทำการตรวจวัด ระดับ HI titer โดยในเบื้องต้นหากไม่สามารถทำการเพาะแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจากฟาร์มที่เข้าไปเก็บ ตัวอย่างก็จะใช้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ได้ทำการเพาะแยกเชื้อจากสุกรในฟาร์ม A จังหวัด ชลบุรี ซึ่งได้แก่ เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 จำนวน 1 isolate ที่เพาะแยกไว้เมื่อปีค.ศ. 2005 (A/sw/Thailand/CU-CB1/06; H1N1(06)) และเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H3N2 จำนวน 2 isolate ที่เพาะแยกไว้ เมื่อปีค.ศ. 2005 (A/sw/Thailand/S1/05; H3N2(05)) และ 2007 (A/sw/Thailand/CU-CB8.4/07; H3N2(07))

ตารางที่ 10 แสดงจำนวนตัวอย่างชีรั่มสุกรและผลการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร ชนิด H1N1 และ H3N2 ด้วยวิธี HI พบว่าสุกรจากทั้งสี่จังหวัดมี HI titer ต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสองชนิด โดยจะพบว่าจำนวนสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H3N2 นั้นสูงกว่า H1N1 เปอร์เซนต์สุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H1N1 มีปริมาณใกล้เคียงกันในทุกจังหวัด ในขณะที่เปอร์เซนต์ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H3N2 มีความแตกต่างกัน ในแต่ละจังหวัด ปีที่เพาะแยกเชื้อน่าจะมีผลต่อความจำเพาะของระดับแอนติบอดีที่พบในสุกร เนื่องจากชีรั่ม สุกรโดยรวมจะจำเพาะต่อเชื้อ H3N2 ที่เพาะแยกได้ในปีค.ศ. 2007 (H3N2(07))มากกว่าปีที่เก่าแก่กว่าคือปีค.ศ. 2005 (H3N2(05)) โดยจังหวัดนครปฐมจะมีจำนวนสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H3N2(07) สูงที่สุดคือ 95.2% และ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับผลที่ได้จากการสำรวจชีรั่มสุกรจากจังหวัดอื่นๆ ที่เหลือ

ตารางที่ 10 แสดงจำนวนตัวอย่างซีรัมที่เก็บได้จนถึงปัจจุบันและผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไขหวัด

ใหญ่สุกรชนิด H1N1 และ H3N2 ด้วยวิธี Hemagglutination-inhibition (HI)

จังหวัด	จำนวน ตัวอย่าง	H1N1(06) [†]		H1N1(09)		H3N2(05) [‡]		H3N2(07) ^{‡‡}	
		ผลบวก [*]	%	ผลบวก	%	ผลบวก	%	ผลบวก	%
ราชบุรี	230	101/227	44.5	25/117	16.2	19/138	13.8	110/132	83.3 ^b
นครปฐม	232	103/231	44.6	33/207	15.9	24/127	18.9	158/166	95.2 ^c
ชลบุรี	96	40/71	56.3	8/81	9.9	4/62	6.5	38/55	69.1 ^a
ฉะเชิงเทรา	304	173/304	56.9	61/278	21.9	14/58	24.1	67/84	79.8 ^{a,b}
รวม	862	417/833	50.1	127/683	18.6	61/385	15.8	373/437	85.4

H1N1(06)[†] = เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์ม A จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ .2006

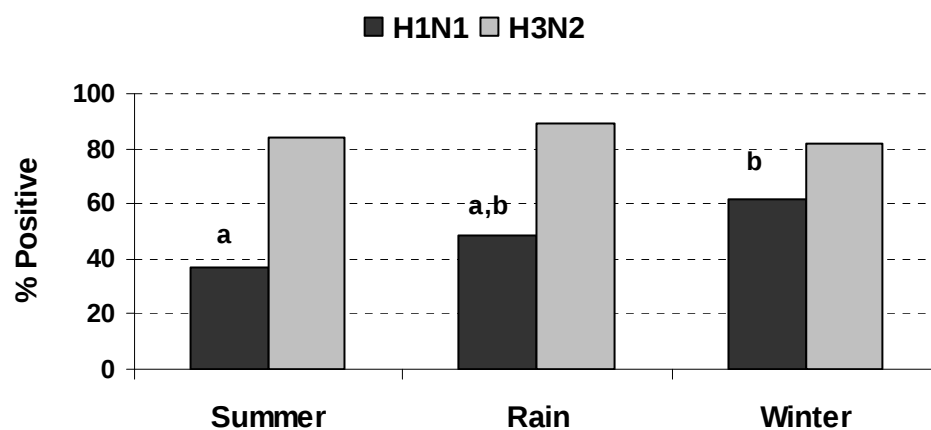
H1N1(09)[†] = เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์ม C จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ .2009

H3N2(05)[‡] = เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์ม A จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ .2005

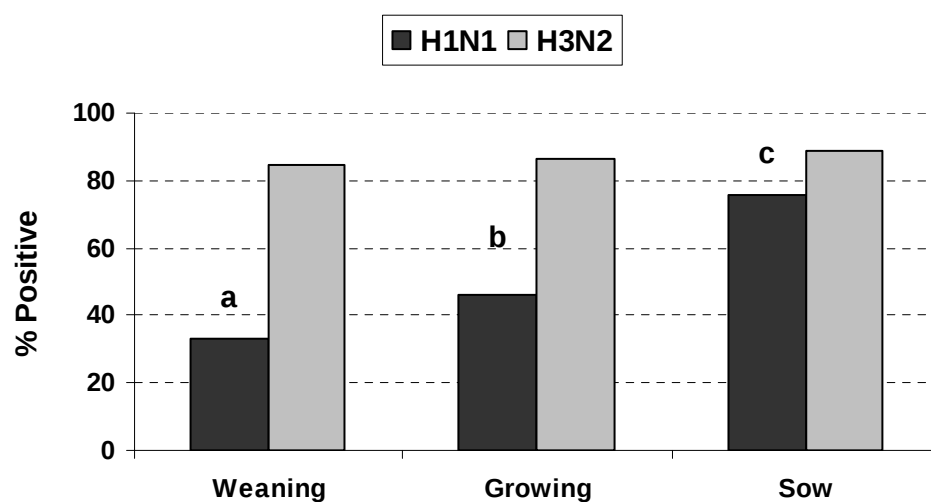
H3N2(07)^{‡‡} = เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์ม A จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ .2007

ผลบวก^{*} = HI titer $\geq$ 40

เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัม โดยแบ่งตามฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างในรอบ 1 ปีที่ผ่านมา จะพบว่า มีสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 และ H3N2 ตลอดทั้งปี โดยเปอร์เซ็นต์ของสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H3N2 ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างฤดูกาลอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H1N1 ในฤดูหนาวจะมากกว่าในช่วงฤดูร้อนอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12) ซึ่งเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร A/sw/Thailand/CU-CB918/09 ชนิด H1N1 ที่เพาะแยกได้ในระหว่างดำเนินโครงการวิจัยฯ ก็เป็นตัวอย่างที่ได้จากสุกรในช่วงฤดูหนาว (เดือนมกราคม ปีค.ศ. 2009) เมื่อพิจารณาผลตามกลุ่มอายุสุกรที่ทำการสำรวจซึ่งได้แก่ สุกรอนุบาล สุกรขุน และแม่สุกร จะพบว่าเปอร์เซ็นต์สุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H3N2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มอายุสุกร ในขณะที่เปอร์เซ็นต์สุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H1N1 นั้นจะพบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ กลุ่มสุกรนาง (แม่สุกร) จะมากกว่ากลุ่มสุกรขุนและสุกรอนุบาล โดยสุกรอนุบาลจะมีเปอร์เซ็นต์ที่บวกน้อยกว่าทั้งสองกลุ่มอายุที่เหลือ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์สุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 (H1N1(06)) และ H3N2 (H3N2(07)) แบ่งตามฤดูกาลที่ทำการสำรวจ (ผลบวก = HI titer $\geq$ 40) ($P < 0.0001$)



ภาพที่ 13 แสดงเปอร์เซ็นต์สุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 (H1N1(06)) และ H3N2 (H3N2(07)) แบ่งตามกลุ่มอายุสุกรที่ทำการสำรวจ (ผลบวก = HI titer $\geq$ 40) ($P < 0.01$)

วัตถุประสงค์ข้อที่ 4 ดำรวจอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรคู่คน ในลักษณะของ case-control study โดยตรวจทางซีรัมวิทยาในกลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรเทียบกับกลุ่มคนที่ไม่เคยมีประวัติการสัมผัสสุกร

เป้าหมายที่สำคัญอันหนึ่งของโครงการวิจัยฯ คือการสำรวจอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในคนที่ทำงานใกล้ชิดหรือมีการสัมผัสสุกร เพื่อศึกษา zoonotic potential ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยว่ามีมากน้อยเพียงใด โดยการสำรวจนี้จะใช้หลักฐานทางซีรัมวิทยา (serological evidence) เป็นตัวบ่งชี้ถึงการติดเชื้อหรือการสัมผัสเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร การดำเนินการศึกษาได้ทำเฉพาะในฟาร์มสุกรที่คณะผู้วิจัยฯ สามารถเพาะแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจากฟาร์มได้ โดยเมื่อทำการเพาะแยกเชื้อได้แล้วก็จะทำการเพิ่มจำนวนของเชื้อดังกล่าวเพื่อที่จะนำมาใช้ในการวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อที่เพาะแยกได้นั้นด้วยวิธี Hemagglutination-inhibition (HI) ซึ่งการสำรวจได้ทำการตรวจตัวอย่างซีรัมของคนทำงานหรืออยู่อาศัยในฟาร์ม เปรียบเทียบกับคนที่ได้จากการตรวจซีรัมของคนอายุใกล้เคียงกัน (age matched) แต่ไม่เคยมีประวัติการสัมผัสสุกรมาก่อนเลยในชีวิต นอกจากการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรดังกล่าวแล้ว โครงการวิจัยฯ ยังตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดที่พบในคนไทยด้วยเช่นกัน เพื่อดูสถานภาพการเกิดระดับภูมิคุ้มกันข้ามเชื้อ (Cross-reactive antibodies) โดยได้ใช้เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนที่มี Hemagglutinin (HA) ชนิด (subtype HA) เดียวกันกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้ในฟาร์ม

โครงการวิจัยฯ นี้ได้ทำการสำรวจคนงานในฟาร์มสุกร 2 แห่ง ซึ่งได้แก่ฟาร์ม A จังหวัดชลบุรี และฟาร์ม B จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยฟาร์มแรกสามารถเพาะแยกเชื้อ A/sw/Thailand/CU-CB1/06 (H1N1); H1N1(06) ในปีค.ศ. 2006 ส่วนฟาร์มที่สองได้เพาะแยกเชื้อ A/sw/Thailand/CU-CHK4/09 (H1N2); H1N2(09) คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเก็บตัวอย่างคนงานที่ทำงานในฟาร์มทั้งสองจำนวนตัวอย่าง 28 และ 50 ตัวอย่างตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้เก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครที่มาเป็นกลุ่มคนที่แข็งแรง ไม่เคยมีประวัติการสัมผัสสุกรและมาบริจาคโลหิต ณ สภากาชาดไทยจำนวน 30 ตัวอย่าง การสำรวจอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในคนที่ทำงานใกล้ชิดหรือมีการสัมผัสสุกรได้ทำโดยการตรวจ HI titer ต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้จากฟาร์ม รวมทั้งตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนไทย ชนิด H1N1 ที่เพาะแยกได้ในปีค.ศ. 2006 จากผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ การตรวจนี้จะช่วยในการพิจารณาถึงโอกาสของการเกิด cross-reactive แอนติบอดีจากการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนข้ามเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้จากฟาร์มสุกร

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมจากคนงานที่ทำงานในฟาร์ม A จังหวัดชลบุรี ในตารางที่ 11-12 พบว่าทั้งสองกลุ่มเคยสัมผัสเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน hH1N1(06) น้อยมาก มีเพียง 4 จาก 28 คนที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ hH1N1(06) ในกลุ่มผู้ที่สัมผัสสุกร ในขณะที่มีเพียงหนึ่งคนจาก 29 คนที่ไม่มีประวัติการสัมผัสสุกรที่ให้ผล

บวกต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน คนที่ทำงานในฟาร์มสุกรมีเปอร์เซ็นต์บวกต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร และมีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่สูงกว่าผู้ที่ไม่เคยมีประวัติสัมผัสสุกรอย่างมีนัยสำคัญ จากการคำนวณค่า Odds Ratio (OR) พบว่ามีค่าเท่ากับ 29 (95% CI, 3.5-243.2) ซึ่งแสดงว่ากลุ่มคนที่ทำงานในฟาร์มสุกร (มีประวัติการสัมผัสสุกร) มีโอกาสติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมากกว่าผู้ที่ไม่เคยสัมผัสสุกรถึง 29 เท่า เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรตามลักษณะงานของผู้ที่ทำงานในฟาร์มจะพบว่ากลุ่มที่ทำงานในสวน แม่บ้านและผู้เลี้ยงสุกรซึ่งใช้เวลาส่วนใหญ่ต่อวันในฟาร์มและสัมผัสกับสุกรโดยตรง มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูงกว่าสัตว์แพทย์และผู้ทำงานธุรการ ซึ่งมีโอกาสสัมผัสสุกรต่อวันน้อยกว่า

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมจากคนงานที่ทำงานในฟาร์ม B จังหวัดฉะเชิงเทรา ในตารางที่ 13-14 พบว่าคนที่ทำงานในฟาร์มสุกรมีเปอร์เซ็นต์บวกต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร และมีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่สูงกว่าผู้ที่ไม่เคยมีประวัติสัมผัสสุกรอย่างมีนัยสำคัญ จากการคำนวณค่า Odds Ratio (OR) พบว่ามีค่าเท่ากับ 24.8 (95% CI, 7.2-84.5) ซึ่งแสดงว่ากลุ่มคนที่ทำงานในฟาร์มสุกร (มีประวัติการสัมผัสสุกร) มีโอกาสติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมากกว่าผู้ที่ไม่เคยสัมผัสสุกรถึง 24.8 เท่า เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรตามลักษณะงานของผู้ที่ทำงานในฟาร์มจะพบว่ากลุ่มที่ทำงานในสวน แม่บ้านและผู้เลี้ยงสุกรซึ่งใช้เวลาส่วนใหญ่ต่อวันในฟาร์มและสัมผัสกับสุกรโดยตรง มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูงกว่าสัตว์แพทย์และผู้ทำงานธุรการ ซึ่งมีโอกาสสัมผัสสุกรต่อวันน้อยกว่า

ตารางที่ 11 แสดงผลการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในตัวอย่างซีรัมที่ได้จากคนที่ทำงานในฟาร์ม A และคนที่ไม่เคยมีประวัติสัมผัสสุกร

สถานภาพของตัวอย่าง	จำนวน	Human H1N1(06) [†]		Swine H1N1(06) ^{††}	
		ผลบวก [‡] (%)	ค่าเฉลี่ย titer	ผลบวก [‡] (%)	ค่าเฉลี่ย titer
ผู้มีประวัติสัมผัสสุกร	28	4 (14.3)	10	14 (50)	40 [*]
ผู้ไม่มีประวัติสัมผัสสุกร	30	1 (3.4)	10	0 (0)	2

[†] เชื้อ Human H1N1(06) เพาะแยกจากตัวอย่าง nasal swab จากผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ในปีค.ศ. 2007

^{††} เชื้อ Swine H1N1(06) เพาะแยกจากสุกรในฟาร์ม A จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ. 2005

[‡] ผลบวก = HI titer $\geq$ 40

^{*} แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.0001$ (Two-sample t-Test)

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในตัวอย่างซีรัมที่ได้จากคนที่ทำงานในฟาร์ม A แบ่งตามลักษณะการทำงานในฟาร์ม

สถานภาพของตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	Human H1N1(06) [†]		Swine H1N1(06) ^{††}	
		ผลบวก [‡]	%	ผลบวก	%
ผู้เลี้ยงสุกร	10	3	30	6	60
ทำงานธุรการฟาร์ม	8	0	0	2	25
คนสวน แม่บ้าน	4	0	0	4	100
สัตวแพทย์	6	1	16.7	2	25
รวม	28	4	14.3	14	50

[†] เชื้อ Human H1N1(06) เพาะแยกจากตัวอย่าง nasal swab จากผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ในปีค.ศ. 2006

^{††} เชื้อ Swine H1N1(06) เพาะแยกจากสุกรในฟาร์ม A จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ. 2006

[‡] ผลบวก = HI titer ≥ 40

ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในตัวอย่างซีรัมที่ได้จากคนที่ทำงานในฟาร์ม B และคนที่ไม่เคยมีประวัติสัมผัสสุกร

สถานภาพของตัวอย่าง	จำนวน	Human H1N1(06) [†]		Swine H1N2(09) ^{††}	
		ผลบวก [‡] (%)	ค่าเฉลี่ย titer	ผลบวก (%)	ค่าเฉลี่ย titer
ผู้มีประวัติสัมผัสสุกร	50	22 (44)	40 [*]	46 (92)	80 ^{**}
ผู้ไม่มีประวัติสัมผัสสุกร	30	1 (3.3)	10	8 (26.7)	20

[†] เชื้อ Human H1N1(06) เพาะแยกจากตัวอย่าง nasal swab จากผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ในปีค.ศ. 2006

^{††} เชื้อ Swine H1N2(09) เพาะแยกจากสุกรในฟาร์ม B จังหวัดฉะเชิงเทราในปีค.ศ. 2009

[‡] ผลบวก = HI titer ≥ 40

^{*,**} แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.0001$ (Two-sample t-Test)

ตารางที่ 14 แสดงผลการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในตัวอย่างซีรัมที่ได้จากคนที่ทำงานในฟาร์ม B แบ่งตามลักษณะการทำงานในฟาร์ม

สถานภาพของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	Human H1N1(06) [†]		Swine H1N2(09) ^{††}	
		ผลบวก [‡]	%	ผลบวก	%
ผู้เลี้ยงสุกร	42	18	42.9	40	95.2
ผสมอาหาร	2	1	50	0	0
อาศัยในฟาร์ม	3	0	0	2	66.7
สัตว์แพทย์	3	2	66.7	3	100
รวม	50	21	42	45	90

[†] เชื้อ Human H1N1(06) เพาะแยกจากตัวอย่าง nasal swab จากผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ในปีค.ศ. 2006

^{††} เชื้อ Swine H1N2(09) เพาะแยกจากสุกรในฟาร์ม B จังหวัดฉะเชิงเทราในปีค.ศ. 2009

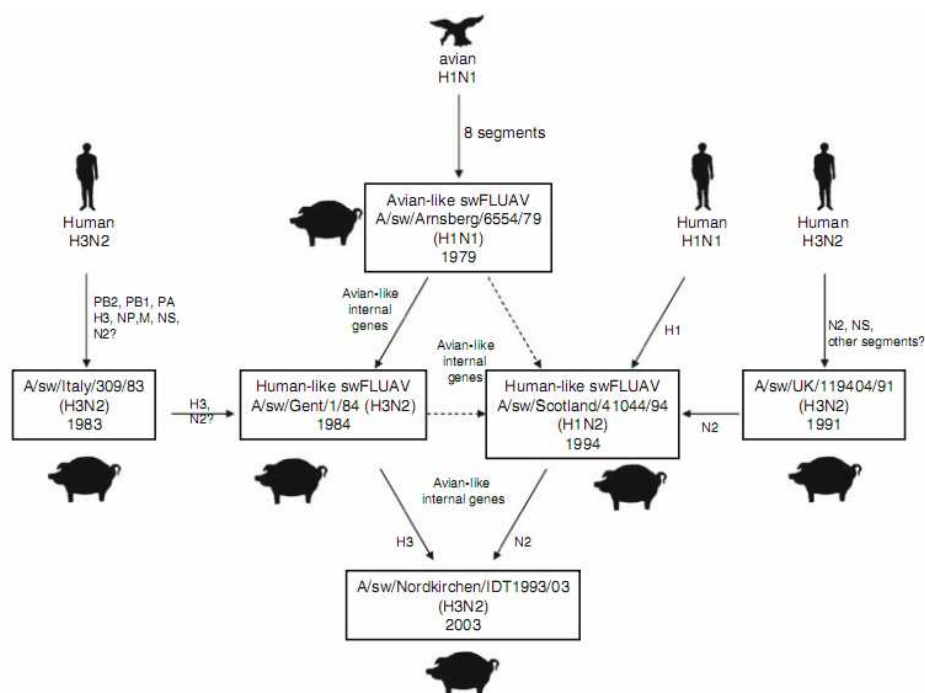
[‡] ผลบวก = HI titer $\geq$ 40

อภิปรายและวิจารณ์ผล

เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ถูกจัดอยู่ในแฟมิลี *Orthomyxoviridae* มีสายพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวที่มีลักษณะเป็นท่อน (segmented genome) 8 ท่อนด้วยกัน ได้แก่ PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M และ NS genes แยกออกเป็นกลุ่มย่อยของเชื้อหรือ subtype โดยโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสสองชนิด ได้แก่ hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) ในปัจจุบันเชื้อ influenza A) Murphy, 1996(สามารถจำแนกได้เป็น 16 HA (H1-H16) และ 9 NA (N1-N9) (Fouchier et al., 2005) เป็นเชื้อไวรัสที่พบแพร่ระบาดได้เป็นปกติในประชากรมนุษย์ (ไข้หวัดใหญ่คน) สัตว์ปีก (ไข้หวัดนก) และสุกร (ไข้หวัดใหญ่สุกร) และยังพบก่อโรคได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นเช่น ม้า ตัวมิงค์ แมวและสุนัข เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอนี้มีในน้ำและนกอป่าเป็นแหล่งรังโรคซึ่งมักจะปลดปล่อยเชื้อสู่สิ่งแวดล้อมในขณะที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกเมื่อติดเชื้อ ส่วนอาการป่วยจากการติดเชื้อในธรรมชาติของสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่รวมถึงคนมักจะเหมือนกันคือ มีอาการแสดงทางระบบทางเดินหายใจที่ผิดปกติ ไอ จาม ไข้สูง ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย โดยปกติแล้วสัตว์หรือผู้ป่วยที่แข็งแรงเมื่อติดเชื้อก็จะสามารถสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นเพื่อต่อต้านและจำกัดการติดเชื้อได้ดี ซึ่งสัตว์มักจะหายจากโรคได้เองภายในระยะเวลาเพียงสัปดาห์เดียว (Webster et al., 1992) แต่ในบางกรณีเช่นในกลุ่มสัตว์หรือคนที่อายุน้อยหรืออยู่ในวัยชรา หรือมีความบกพร่องของภูมิคุ้มกัน รวมทั้งกรณีที่เชื้อไวรัสที่ก่อโรคมีความรุนแรงสูงเช่น เชื้อไข้หวัดนกชนิด H5N1 หรือเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด H1N1 ที่ระบาดในปีค.ศ.1918 ก็อาจพบว่าการเกิดโรคที่รุนแรงและเสียชีวิตได้ในที่สุด สำหรับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร จะพบอยู่ 3 subtype คือ H1N1, H3N2, H1N2 ซึ่งเป็น subtype เดียวกันกับที่พบในคน และเช่นเดียวกันเชื้อจะก่อโรคทางระบบทางเดินหายใจและจะปลดปล่อยเชื้อออกมากับสิ่งคัดหลั่งเช่น น้ำมูก สุกรจะมีอาการทางคลินิกเช่นเดียวกับคนที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่คน คือมีไข้สูง เมื่อยล้า อ่อนแรง ไอ หายใจลำบาก เบื่ออาหารและน้ำหนักตัวลด สำหรับสุกรที่อาจแท้งได้ ส่งผลเสียหายต่อผลผลิตเพราะสุกรน้ำหนักเพิ่มช้าลง ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้นกว่าจะส่งสู่ตลาด นอกจากนี้อาจจะมีค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้นในด้านการควบคุมเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน(Olsen et al., 2006)

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรพบแพร่กระจายในฝูงสุกรทุกอายุทั่วโลก เมื่อศึกษาการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในฝูงสัตว์จะพบ subtype H1N1 ในประชากรสุกรก่อน H3N2 เมื่อศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อ H1N1 ก็จะพบว่าต้นกำเนิดและลักษณะการวิวัฒนาการของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่พบในฝูงสุกรแถบทวีปยุโรปเมื่อเทียบกับทวีปอเมริกาเหนือมีความแตกต่างกัน กล่าวคือต้นกำเนิดสายพันธุ์ (genetic lineage) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในทวีปยุโรปมาจากการติดเชื้อข้ามจากเป็ดสู่สุกร (avian-to-swine cross-species transmission) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อปีค.ศ. 1979 (Zell et al., 2008) เมื่อวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของท่อนพันธุกรรมทั้ง 8 ของเชื้อ จะพบว่าลักษณะเหมือนกับที่พบในเชื้อไข้หวัดนกทุกประการ ดังนั้นสายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัด

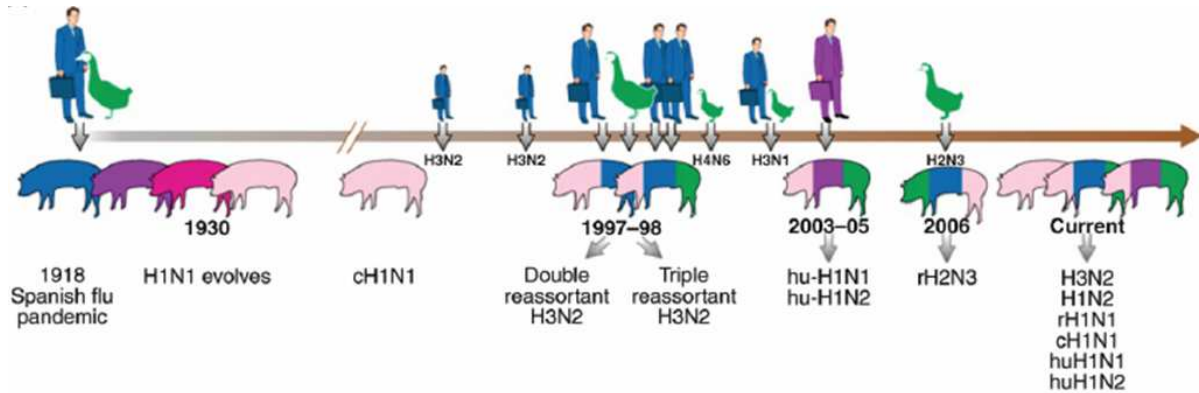
ใหญ่สุกร H1N1 ในทวีปยุโรปซึ่งถูกเรียกว่าเป็น Eurasian lineage ก็มักที่จะเรียกว่าเป็น Avian-like swine (ภาพที่ 14) ซึ่งเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่มีลักษณะ Avian-like นี้ก็ได้แพร่ระบาดในประชากรสุกรของทวีปยุโรปจนเป็นลักษณะ endemic disease ซึ่งต่อมาเมื่อประมาณปีค.ศ. 2001 ก็ปรากฏลักษณะของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ในประเทศฝรั่งเศสที่มีลักษณะของท่อน HA ที่มีต้นกำเนิดมาจากมนุษย์ในขณะที่ท่อนพันธุกรรมอื่นๆ ทั้งหมดยังคงลักษณะของ Avian-like swine ซึ่งเป็น Eurasian lineage เหมือนเดิม ดังนั้นโดยรวมแล้วเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่พบในทวีปยุโรปจะมีสองลักษณะคือ ทุกท่อนพันธุกรรมเป็น Avian-like swine กับที่ท่อน HA1 ยีนเป็น human lineage ส่วนท่อนที่เหลือทั้งหมดเป็น Avian-like swine (Zell et al., 2008) ในขณะที่เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในสุกรแถบอเมริกาเหนือจะมีความหลากหลายมากกว่าทางทวีปยุโรปอย่างมาก โดยหากย้อนอดีตไปกว่า 70 ปี จะพบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 เป็น classical swine คือมีต้นกำเนิดสายพันธุ์ของเชื้อ ที่เป็นของสุกรทั้งหมด เนื่องจากมีหลักฐานระบุไว้ว่าในช่วงของการระบาดใหญ่ (pandemic) ของ Spanish flu (H1N1) เมื่อปี ค.ศ. 1918 ในขณะที่มีคนป่วยและตายเป็นจำนวนมากทั่วโลกจากการติดเชื้อไวรัส Spanish flu H1N1 ก็มีรายงานระบุถึงสุกรจำนวนมากที่มีลักษณะการป่วยด้วยอาการทางระบบทางเดินหายใจที่คล้ายคลึงกับที่พบในคนป่วยในขณะนั้น ดังนั้นจึงเชื่อว่าสุกรในแถบทวีปอเมริกาเหนือได้ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดนี้ตั้งแต่ตอนนั้น และเมื่อเชื้อได้เข้าสู่และแพร่กระจายในฝูงสุกรแล้ว เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด H1N1 ก็ได้มีวิวัฒนาการในสุกรอย่างต่อเนื่อง ทำให้ได้เชื้อที่มีลักษณะที่เป็น swine lineage จวบจนกระทั่งเมื่อปีค.ศ. 1930 จึงสามารถเพาะแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 จากสุกรในรัฐ Iowa ได้ครั้งแรก (ภาพที่ 15 และ 16) ซึ่งเป็น classical-swine lineage ซึ่งแตกต่างกันกับที่พบในสุกรทวีปยุโรป ซึ่งเป็น avian-like swine อย่างสิ้นเชิง ต่อมาเมื่อมีการกระโดดข้ามชนิดสัตว์จากคนสู่สุกรของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนชนิด H3N2 เข้าสู่ฝูงสุกรเมื่อปีค.ศ. 1997 ตามด้วยการดึงเอาท่อนพันธุกรรมบางส่วนจากสัตว์ปีกเข้ามาเป็น triple reassorted H3N2 ซึ่งรวมท่อนพันธุกรรมของคน สุกรและนกไว้ด้วยกันในปีค.ศ. 1998 ต่อมาไม่นานหลังจากนั้นก็เกิดการกลายพันธุ์ชนิด genetic reassortment ขึ้นอีกครั้งระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด classical-swine lineage H1N1 (cH1N1) กับ H3N2 ได้เป็น H1N2 และ reassorted H1N1 (rH1N1) ซึ่งไวรัสใหม่ทั้งสองชนิดนี้มีท่อนพันธุกรรมที่รวมระหว่างคน สุกรและสัตว์ปีกเข้าด้วยกัน ต่อมาเมื่อประมาณปีค.ศ. 2003-2005 ก็พบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่ท่อนพันธุกรรม HA1 มาจากเชื้อ H1N1 ของคนส่วนท่อน NA และท่อนอื่นๆ ที่เหลือทั้งหมดเหมือน rH1N1 ซึ่งไวรัสที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบนี้ไม่ได้ถูกจัดว่าเป็น classical-swine lineage (Vincent et al., 2008) ดังนั้นโดยรวมในปัจจุบันเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ในทวีปอเมริกาเหนือมีความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมอย่างมาก โดยเฉพาะในช่วงระยะเวลาเพียง 10 ปีที่ผ่านมา เมื่อนำเฉพาะท่อน HA



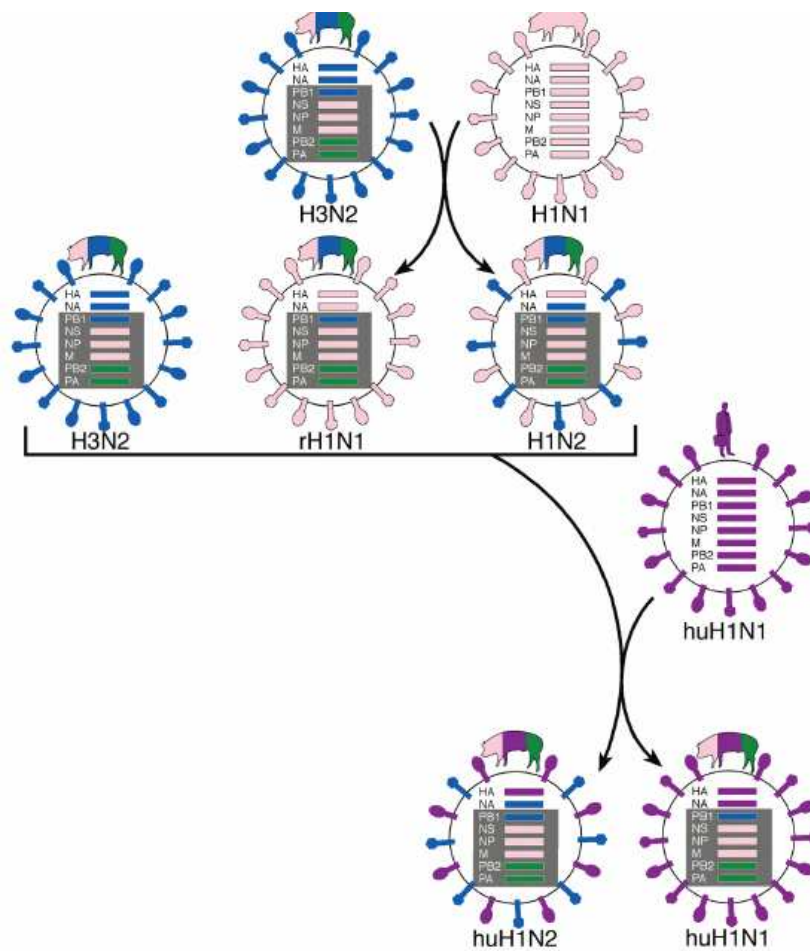
ภาพที่ 14 แสดงลำดับการเกิดและลักษณะของท่อนพันธุ์กรรมที่พบในเชื้อไขหัดใหญ่สูตรทั้ง 3 subtype ที่พบในทวีปยุโรป (Zell et al., 2008)

ยีนมาศึกษาในรายละเอียดจะสามารถจัดเป็นกลุ่มย่อยๆ (Vincent et al., 2009) ดังแสดงในภาพที่ 17 ซึ่งได้มี
 การศึกษาเพิ่มเติมถึงความเกี่ยวเนื่องของการเปลี่ยนทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 กับ
 การก่อโรคและความคุ้มข้ามของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อระหว่างเชื้อชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อ H1N1 ที่พบในฝูง
 สุกรในประเทศสหรัฐอเมริกามีความแตกต่างของความรุนแรงของการก่อโรคและภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อ
 H1N1 ในอดีตมักไม่ให้ผลคุ้มข้ามการติดเชื้อ H1N1 ในปัจจุบัน (Vincent et al., 2006)

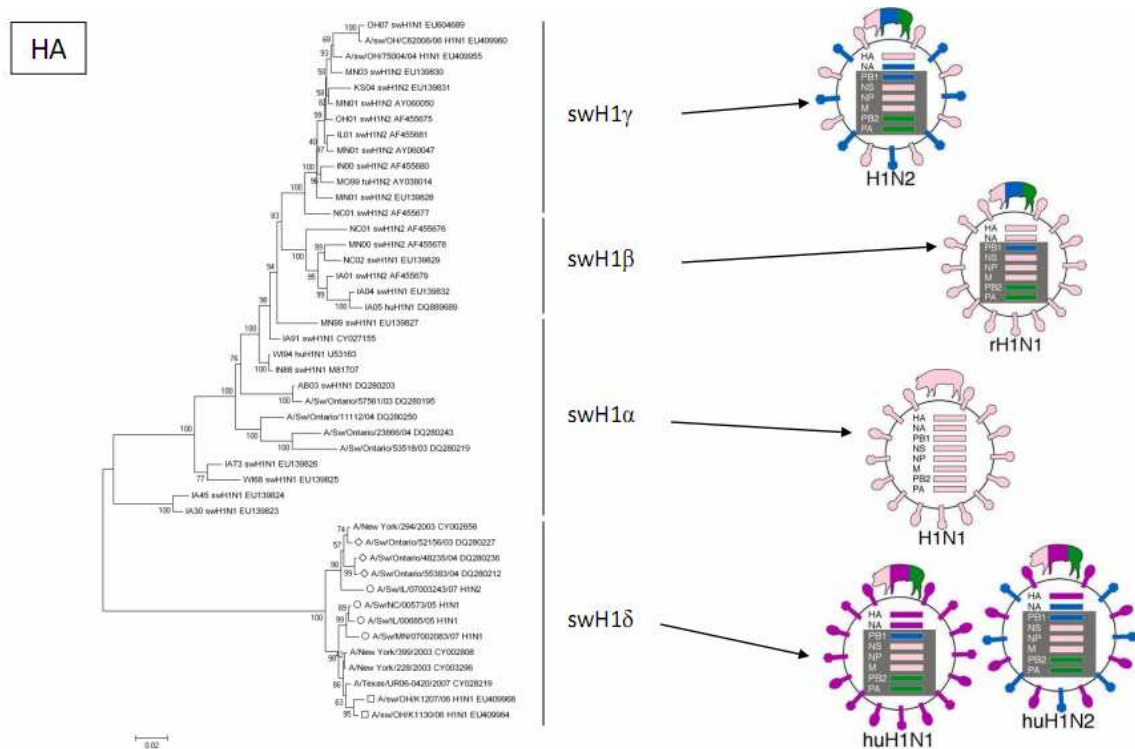
สำหรับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในประเทศไทยนั้น มีรายงานการพบเชื้อ H3N2 และ H1N1 ในสุกร ปีค.ศ. 1988 และ 1991 ตามลำดับ (Kanai et al., 1981; Kupradinun et al., 1991) ซึ่งต่อมาในปีค.ศ. 2003 ได้มี รายงานการพบเชื้อ H1N2 ส่วนข้อมูลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในบ้านเรานั้น มีจำนวนน้อยมาก ที่ผ่านมามีเพียงหนึ่งรายงานที่ทำการศึกษาพ่นพันธุกรรมทั้งแปดพ่อนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ สุกรทั้งสามชนิด (Takemae et al., 2008)



ภาพที่ 15 แสดงลำดับของการเกิดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในทวีปอเมริกาเหนือ (Vincent et al., 2008)



ภาพที่ 16 แสดงการเกิด genetic reassortment และลักษณะของท่อนพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในทวีปอเมริกาเหนือ (Vincent et al., 2008)



ภาพที่ 17 แสดงการแบ่งกลุ่มย่อย (clade) ของท่อน hemagglutinin (HA) ยีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1 ในทวีปอเมริกาเหนือ (Vincent et al., 2009)

โดยได้ทำการศึกษาเชื้อทั้งหมด 12 isolates ที่ได้จากสุกรในจังหวัดชลบุรี ราชบุรี สระบุรี ฉะเชิงเทรา อุดรธานีและนครปฐม ในระหว่างปีค.ศ. 2000-2005 จากการศึกษาท่อนพันธุกรรมทั้งหมดของเชื้อ H1N1 พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งหมดที่ศึกษามีลักษณะต้นกำเนิดสายพันธุ์ที่ปนกันระหว่าง classical swine กับ Eurasian swine และแบ่งได้เป็นสองกลุ่มย่อย (clade a และ b) โดยเชื้อทั้งสองกลุ่ม มีท่อน HA ยีนเป็น classical swine แต่ clade a จะประกอบไปด้วยเชื้อ H1N1 ที่เพาะแยกได้จากสุกรในจังหวัดราชบุรีจะมีท่อน พันธุกรรมที่เหลือทั้งหมดเป็น Eurasian swine ส่วน clade b มีท่อน NS ยีนเป็น classical swine เหมือน HA ยีน และท่อนที่เหลือทั้งหมดเป็น Eurasian swine (ตารางที่ 15) รายงานนั้นสนับสนุนว่า แต่เดิมเชื้อไข้หวัดใหญ่ สุกรที่วนเวียนในประชากรสุกรในประเทศไทย น่าที่จะเหมือนกับที่พบทางทวีปอเมริกาเหนือคือเป็น classical swine ซึ่งมีต้นกำเนิดของทุกท่อนพันธุกรรมเป็นของสุกร จนกระทั่งประมาณปีค.ศ. 1990 ที่มีการติดเชื้อ H1N1 ที่เป็น Eurasian swine (avian-like swine) เข้ามาในฝูงสุกรในบ้านเราทำให้มีการแลกเปลี่ยนทดแทน ท่อนยีนส่วนใหญ่ซึ่งกล่าวมาข้างต้นจาก classical swine ไปเป็น Eurasian swine

ตารางที่ 15 แสดงลักษณะของต้นกำเนิดพันธุกรรมของทุกท่อนยีนและการแบ่งกลุ่มย่อยของทุกท่อนยีน (phylogenetic origin and cluster of each RNA segment) ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในประเทศไทยระหว่างปีค.ศ. 2000-2005 (Takemae et al., 2008)

strain	subtype	HA	NA	PB2	PB1	PA	M	NP	NS
Sw/Ratchaburi/NAH1481/00 Sw/Ratchaburi/NAH550/03	H1N1	Cla	ALa	ALa	ALa	ALa	ALa	ALa	ALa
Sw/Chonburi/NAH9469/04 Sw/Chonburi/NAH977/04	H1N1	C1b	-	-	-	ALb	ALb	-	C1b
Sw/Chonburi/NAH589/05 Sw/Chachoengsao/NAH587/05	H1N1	C1b	-	-	-	ALb	ALb	-	-
Sw/Saraburi/NAH13021/05 Sw/Chachoengsao/03	H1N2	C1b	Hb	-	-	-	-	-	C1b
Sw/Udon Thani/NAH464/04	H3N2	Hb	Hb	-	-	-	-	Cla	Cla
Sw/Nakhon Pathom/NAH586-1/05	H3N2	Hb	Hb	-	-	-	-	-	-
Sw/Ratchaburi/NAH59/04	H3N2	Ha	Ha	-	-**	ALb	-	Cla	-
Sw/Ratchaburi/NAH874/05	H3N2	Ha	Ha	-	-	-	-	Cla	Cla

*Phylogenetic origins that differ from A/Sw/Ratchaburi/NAH1481/00 are shown. The small characters a and b after the origins represent the clusters designated in this study. CI, AL and H stand for classical swine, avian-like swine and human origins respectively.
**It was not clear whether another introduction had occurred or not.

สำหรับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H3N2 ที่พบในช่วง ระหว่างปีค.ศ. 2000-2005 มีส่วนผสมของท่อน พันธุกรรมที่หลากหลายกว่าชนิด H1N1 โดยมีท่อน HA และ NA ยีนมาจากมนุษย์ ส่วนของท่อน RNA polymerase (PB2, PB1 และ PA) matrix (M) ยีนมาจากนก และท่อน nucleoprotein (NP) และ nonstructural protein (NS) ยีนมาจากสุกร (classical swine) ซึ่งแตกต่างกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H3N2 ที่พบในทวีป ยุโรป ซึ่งมีท่อน HA และ NA มาจากคนแต่ส่วนทุกท่อนที่เหลือนำมาจากนก เชื้อ H3N2 ในไทยยังต่างจากที่พบ ในทวีปอเมริกาเหนือหนึ่งจุดตรงที่ท่อน PB1 ก็มาจากคนเช่นเดียวกันกับท่อน HA และ NA นับจากรายงานที่ แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยที่ปรากฏในช่วงปีค.ศ. 2000-2005 ก็ไม่ ปรากฏการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในช่วงปีปัจจุบันเลย

ในช่วงปีค.ศ. 2005 คณะผู้วิจัยได้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 จำนวน 2 isolates และชนิด H3N2 จำนวน 1 isolates ในปีค.ศ. 2006 พบเฉพาะชนิด H1N1 ในขณะที่ช่วงปีค.ศ. 2007 พบเฉพาะชนิด H3N2 ส่วน เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่พบในระหว่างการค้าเนื้อสัตว์โครงการวิจัยฯ พบเฉพาะชนิดที่เป็น H1 คณะผู้วิจัย ได้นำเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่พบในสุกรจังหวัดชลบุรีในปีค.ศ. 2005, 2006 และ 2009 และเชื้อ ไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H3N2 ที่พบในสุกรจังหวัดชลบุรีในปีค.ศ. 2005 และ 2007 มาศึกษาลักษณะทาง พันธุกรรมเชิงลึก เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H3N2 ในขณะนี้อยู่รอดรหัสพันธุกรรมไม่ครบทั้งแปดท่อน แต่ จากการวิเคราะห์ข้อมูลเท่าที่พบจะเห็นว่าเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากโดย H3N2 ปีค.ศ. 2005 คล้ายคลึงกับ

H3N2 ที่มีรายงานในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทราในปีค.ศ. 2005 ส่วนเชื้อ H3N2 ปีค.ศ. 2007 ก็ยังคงไม่เปลี่ยนแปลงมากนักคือ ยังคงเหมือนกันกับเชื้อ H3N2 ที่เพาะแยกได้จากสุกรในจังหวัดราชบุรีในปีค.ศ. 2004

สำหรับการศึกษาเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 คณะผู้วิจัยพบว่า โดยรวมแล้วเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมไม่มากนัก โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบกับความเปลี่ยนแปลงที่พบในเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ในต่างประเทศ โดยเชื้อ H1N1 ทั้ง 3 isolates (เพาะแยกได้ในปีค.ศ. 2005, 2006 และ 2009) ที่ทำการศึกษา ยังคงไม่พบการเกิด genetic reassortment ข้ามชนิดสัตว์จนได้ท่อนพันธุกรรมที่หลากหลาย โดยเฉพาะชนิดที่เป็น triple reassort ระหว่างคน นกและสุกร เชื้อ H1N1 ในบ้านเรา ยังคงมีลักษณะที่มีต้นกำเนิดผสมระหว่างสุกรในทวีปอเมริกาเหนือและสุกรทวีปยุโรป คือมีท่อน HA และ NA ยีนเป็น classical swine ในขณะที่ท่อนอื่นที่เหลืออีก 8 ท่อนเป็น Eurasian swine (avian-like swine) อย่างไรก็ตามเมื่อคุณลักษณะของการ drift ของเชื้อทั้งสามโดยรวมจะพบว่าท่อน HA NA และ RNA polymerases ของไวรัสที่เพาะแยกในปัจจุบันจะมีเริ่มออกห่างจากที่พบเมื่อ 4 ปีที่แล้ว ซึ่งการกลายพันธุ์ในลักษณะนี้เป็นสิ่งที่พบได้เป็นปกติเนื่องจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นเชื้อไวรัส RNA ส่วนท่อนอื่นที่เหลือ (M NP และ NS) ซึ่งประกอบไปด้วยท่อนที่มีความคงที่สูงในเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (highly conserved) โดยเฉพาะท่อน M และ NP ของเชื้อทั้งสามมีความใกล้เคียงกัน

เมื่อศึกษาเรื่องการดื้อยาของเชื้อไวรัส จะสามารถวิเคราะห์ได้จากท่อน M และ NA ยีน จะพบว่าเชื้อทั้งสามคือดื้อยา Amantadine ซึ่งโดยรวมแล้วพบลักษณะนี้เป็นปกติอยู่แล้ว ส่วนการดื้อยา Oseltamivir จะพบว่าเชื้อ H1N1 ปีค.ศ. 2005 และ 2006 ไม่ดื้อดื้อยา ในขณะที่เชื้อ H1N1 2009 พบว่าดื้อดื้อยา ที่ผ่านมายา Amantadine ได้เริ่มถูกนำมาใช้เพื่อการควบคุมและการรักษาการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนก่อนยา Oseltamivir และการดื้อดื้อยา Amantadine ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอซึ่งรวมคนไข้ที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและไข้หวัดนกนั้นพบมากเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยา Oseltamivir (Bright et al., 2005) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงเพียงหนึ่งลำดับเบสก็ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่หลายตำแหน่งเช่น 26, 27, 30, 31 หรือ 34 ซึ่งล้วนส่งผลต่อการทำให้เชื้อดื้อยา Amantadine ได้ ส่วนการใช้ยา Oseltamivir เพิ่งจะเริ่มใช้กันอย่างแพร่หลายเมื่อประมาณปีค.ศ. 1999-2002 ซึ่งขณะนั้นพบการดื้อยาน้อยมาก ต่อมาเมื่อมีการใช้ยาในกลุ่มนี้ในคนไข้ที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่มากขึ้นก็พบสายพันธุ์ที่ดื้อดื้อยามากขึ้นตามลำดับ แต่ก็ยังไม่มากเท่าการใช้ยา Amantadine สาเหตุหลักอันหนึ่งที่เชื้อไวรัสมีการพัฒนาการดื้อดื้อยา น่าจะสืบเนื่องมาจากการให้ยาแบบ suboptimal dosing นอกจากนี้ระยะเวลาและความต่อเนื่องของการให้ยาก็มีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นให้เชื้อเกิดการดื้อดื้อยาเช่นเดียวกับการเกิดการดื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่พบในเชื้อแบคทีเรีย

พบว่าโปรตีน HA ที่ encode โดย HA ยีนมีอัตราการเปลี่ยนของกรดอะมิโนประมาณ $4-5 \times 10^{-3}$ / ตำแหน่ง/ปี ซึ่งสูงกว่ายีนท่อนอื่นๆ ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Wilson and Cox, 1990) การเปลี่ยนแปลงของท่อน HA ยีนส่วนใหญ่แล้วจะเกิดขึ้นที่บริเวณของ globular head ของโปรตีน ซึ่งเป็นบริเวณรอบๆ

receptor binding site ของเชื้อ (Schweiger et al., 2002) การกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน HA มีสาเหตุหลักมาจากการที่เชื้อใช้ RNA polymerase ที่ไม่มี proof reading ซึ่งส่งผลให้ขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนของยีนมีความผิดพลาดของลำดับเบส การกลายพันธุ์ในลักษณะนี้มีความสำคัญอย่างมากในการวางแผนควบคุมโรคโดยการใช้วัคซีน เนื่องจากหากเกิด antigenic drift ของ HA โปรตีนขึ้นแล้ว จะทำให้ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการทำวัคซีนด้วยเชื้อ strain เดิมไม่ให้ผลคุ้มข้ามต่อเชื้อ strain ใหม่ที่ drift หรือกลายพันธุ์ไปแล้ว จะเห็นได้ว่าการผลิตวัคซีนป้องกันเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนจะต้องมีการพิจารณา strain ของเชื้อไวรัสที่จะถูกนำไปผลิตเป็นวัคซีนทุกๆ ปี ซึ่งยังแบ่งเป็น strain สำหรับทำวัคซีนใช้ในซีกโลกเหนือกับ strain สำหรับทำวัคซีนสำหรับซีกโลกใต้ เมื่อมาพิจารณาการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศต่างๆ จะพบว่าประเทศสหรัฐอเมริกา มีการใช้วัคซีนในปริมาณมากและต่อเนื่อง เมื่อเทียบกับทางทวีปยุโรป ส่วนประเทศไทยไม่มีการใช้วัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในฝูงสุกรบ้านเราเลย ข้อมูลการศึกษาพบว่า การทำใช้วัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่มีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นให้เชื้อมีการกลายพันธุ์มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะการกลายพันธุ์ในส่วนของโปรตีน HA (Boni, 2008) ซึ่งน่าที่จะอธิบายลักษณะของความหลากหลายของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ที่พบในทวีปอเมริกาเหนือ ซึ่งมีความหลากหลายสูงมากแตกต่างกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ในบ้านเราที่ยังคงมีความหลากหลายของเชื่อน้อยกว่า

การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการเพาะแยกและพิสูจน์เชื้อมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ สัตว์ที่ติดเชื้อจะปลดปล่อยเชื้อไวรัสออกมาทางระบบทางเดินหายใจภายหลังการติดเชื้อในระยะเวลาที่สั้นมาก (ประมาณแค่ 1-3 วันหลังติดเชื้อ) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยการตรวจติดตามเชื้อไวรัสหรือโปรตีนของเชื้อไวรัสเพียงอย่างเดียวจึงอาจทำให้ได้ผลปลอม ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคจึงมักอาศัยการตรวจทางซีรัมวิทยาเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก เก็บตัวอย่างส่งตรวจได้ง่าย การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อจะทำเพื่อบ่งชี้ถึงการติดเชื้อไวรัส ซึ่งต้องอาศัยการทำ paired serum และนอกจากนี้การตรวจทางซีรัมวิทยาก็ยังใช้ในการดูการตอบสนองของภูมิคุ้มกันสุกรต่อการทำวัคซีนเพื่อประเมินความคุ้มโรคได้ อีกทั้งยังสามารถใช้ในการตรวจติดตามการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอข้ามชนิดสัตว์ได้ โดยวิธีที่เป็นมาตรฐานสำหรับการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอได้แก่ การตรวจด้วยวิธี hemagglutination-inhibition (HI) test ซึ่งใช้หลักการตรวจวัดระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (HA) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ใช้ในการทดสอบ โดยการจับกันของแอนติบอดีในเลือดกับเชื้อไวรัสจะสามารถยับยั้งการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงเนื่องจากการจับของเชื้อไวรัส (inhibit hemagglutination) อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดอันหนึ่งสืบเนื่องมาจากการที่ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอมีการกลายพันธุ์ที่ HA โปรตีนค่อนข้างสูง ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ด้วยวิธี HI จึงต้องมีการประเมินเป็นระยะๆ ถึงไวรัสที่จะนำไปใช้ในการทดสอบเพื่อให้คงความจำเพาะของวิธีตรวจ (de Jong et al., 2003) การศึกษาทางซีรัมวิทยาต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในบ้านเราสามารถนำมาใช้ในการประเมินอุบัติการณ์ของเชื้อในฟาร์มได้ เนื่องจากไม่มีการใช้วัคซีน

ป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในประชากรสุกรในประเทศไทย จึงทำให้การแปลผลทางซีรัมวิทยาทำได้ง่าย และไม่มีควมสับสน อย่างไรก็ตามผลการศึกษาทางซีรัมวิทยาต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่ผ่านมามีจำนวนไม่มาก แต่ก็สามารถยืนยันอุบัติการณ์ของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ทั้งในแม่สุกรและสุกรขุนได้ในหลายจังหวัดของประเทศ (Damrongwatanapokin et al., 2003; Pachariyanon et al., 2006) สำหรับผลการศึกษาทางซีรัมวิทยาของโครงการวิจัยฯ นี้ ก็ยังพบว่าสุกรในทั้งสี่จังหวัดที่ทำการสำรวจคือ ราชบุรี นครปฐม ชลบุรีและฉะเชิงเทรายังคงมีการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งชนิด H1N1 และ H3N2 อยู่และสามารถพบได้ตลอดทั้งปี แต่จะพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมากที่สุดในช่วงฤดูฝนต่อหนาว โดยจะพบว่าอุบัติการณ์ต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H3N2 จะสูงกว่าชนิด H1N1 และจะพบว่าแม่สุกรจะมีอุบัติการณ์ต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 สูงมากกว่ากลุ่มสุกรหย่านมและสุกรขุนอย่างมีนัยสำคัญ การติดตามผลทางซีรัมวิทยาต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมีประโยชน์อย่างยิ่งในการติดตามเฝ้าระวังโรคในฝูงสุกร เนื่องจากจะทำให้ทราบว่าสุกรในฟาร์มมีระดับภูมิคุ้มต่อการติดเชื้อมากน้อยเพียงใด และยังใช้ในการประเมินกลุ่มอายุสุกรที่มักจะพบการติดเชื้อ เนื่องจากสามารถดูการ seroconvert ของสุกรต่อเชื้อได้ จึงทำให้สามารถเข้าทำการเก็บตัวอย่างในกลุ่มอายุสุกรได้ถูกต้องโดยเฉพาะกรณีที่เชื้อวนเวียนในฟาร์มอย่างต่อเนื่องจนสุกรที่ติดเชื้อไม่มีอาการแสดงทางคลินิกที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อที่ชัดเจน (subclinical presentation) ข้อมูลทางซีรัมวิทยาที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี HI ยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาแอนติบอดีชนิดที่ cross-react กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดที่เป็น subtype เดียวกันแต่เป็นคนละ isolate และ/หรือ strain ที่แตกต่างได้เพื่อนำมาวิเคราะห์ดูการเกิด antigenic drift ของเชื้อไวรัสได้ ดังที่ได้มีการศึกษาในสุกร โดยได้นำซีรัมสุกรที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ในอดีต มาจับกับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้ในปัจจุบัน และในทางกลับกันก็นำซีรัมสุกรที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในปัจจุบัน มาจับกับเชื้อที่เพาะแยกได้ในอดีต แล้วพบว่าความสามารถในการจับกันของทั้งสองคู่ลดลง แสดงถึงการเกิด antigenic drift ของเชื้อในปัจจุบันออกจากเชื้อในอดีต (Vincent et al., 2006) ผลการศึกษาของโครงการฯ ไม่สามารถบอกถึงการเกิด antigenic drift ของเชื้อด้วยการศึกษาทางซีรัมวิทยาได้เนื่องจากตัวอย่างซีรัมที่ศึกษาเป็นซีรัมสุกรในฟาร์มที่ติดเชื้อตามธรรมชาติเพราะฉะนั้นสุกรอาจที่จะติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรหลายชนิดและหลาย strain อย่างไรก็ตามผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ H1N1(06) และ H1N1(09) ซึ่งเพาะแยกได้จากสุกรในจังหวัดชลบุรีทั้งคู่ ในฟาร์มหนึ่งพบว่าสุกรที่มีแอนติบอดีต่อ H1N1(06) ไม่ว่าจะอยู่ในระดับที่สูงกลางหรือต่ำเมื่อนำซีรัมจากสุกรเหล่านั้นไปจับกับเชื้อ H1N1(09) ก็ให้ผลลบทั้งหมด ซึ่งบ่งชี้ว่าแอนติบอดีต่อ H1N1(06) ไม่น่าที่จะ cross-react กับเชื้อ H1N1(09) ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าเชื้อ H1N1(09) มีการ drift จากเชื้อ H1N1(06) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลทางพันธุกรรมของท่อน HA ยีนที่พบว่าเชื้อ H1N1(09) มีเปอร์เซ็นต์ homology ต่อเชื้อ H1N1(06) ต่ำกว่า เปอร์เซ็นต์ homology ระหว่างเชื้อ H1N1(06) กับเชื้อ H1N1(05) ประโยชน์อีกประการของการศึกษาทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี HI คือสามารถนำผลการทดสอบไปแปลผลการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสที่เพาะแยกได้ ดังผลการสำรวจของโครงการฯ ที่พบว่า

เชื้อ H1N1(09) ยังแพร่กระจายในประชากรสุกรทั้งสี่จังหวัดน้อยกว่าเชื้อ H1N1(06) เนื่องจากเปอร์เซ็นต์สุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H1N1(09) น้อยกว่าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H1N1(06) เกินครึ่ง ซึ่งอธิบายได้เนื่องจากเชื้อ H1N1(09) เพิ่งจะเพาะแยกได้จากสุกรในจังหวัดชลบุรีที่ป่วยด้วยโรคทางระบบทางเดินหายใจเมื่อเดือนมกราคมของปีนี้ อย่างไรก็ตามควรได้มีการติดตามทางชีววิทยาโดยศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อและจำนวนสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ H1N1(09) เพื่อประเมินว่าควรมีการเปลี่ยนแปลงไวรัสที่จะใช้ในการตรวจด้วยวิธี HI เพื่อป้องกันหรือลดเชื้อ H1N1 ในบ้านเราหรือไม่

ตั้งแต่ปีค.ศ .1958-2005 มีหลักฐานการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในคนอยู่จำนวนไม่น้อย (รวมรวมโดย (Myers et al., 2007)) ส่วนใหญ่เป็นรายงานจากประเทศยุโรปและอเมริกาเหนือ สำหรับในเอเชียมีรายงานการพบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H3N2 ในทารกอายุ 10 เดือนในฮ่องกงปีค.ศ .1999 (Nerome et al., 1981) การพบเชื้อ ‘swine-like’ H1N2 จากชายอายุ 25 ปีประเทศฟิลิปปินส์ในปี ค.ศ .2004 และการพบ ‘swine-like’ H1N1 จากเด็กชายอายุ 4 ปีในประเทศไทยเมื่อปีค.ศ. 2005 (Komadina et al., 2007) ส่วนรายงานในต่างประเทศของกลุ่มคนที่ทำงานในลักษณะที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร เช่น คนทำงานฟาร์ม คนทำงานในโรงฆ่าสัตว์ และสัตว์แพทย์ที่เข้าออกฟาร์ม พบว่ากลุ่มคนที่ทำงานดังกล่าวมีอัตราความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสูงกว่าคนทำงานอาชีพอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสสุกร (Myers et al., 2006) ซึ่งลักษณะของอาการแสดงทางคลินิกในคนที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร ไม่มีความแตกต่างกับการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ของคน ดังนั้นจำนวนรายงานการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในคนจึงอาจน้อยกว่าที่เป็นจริงเนื่องจากผลการตรวจวินิจฉัย อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าหลักฐานของการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอข้ามระหว่างคนและสุกรนั้นมีอยู่จริง โดย Centers for Disease Control (CDC) ได้รายงานว่าในประเทศสหรัฐอเมริกาจะพบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในคน 1 รายในทุกๆ 1-2 ปี (http://www.cdc.gov/flu/swineflu/key_facts.htm)

เนื่องจากที่ผ่านมาไม่พบข้อมูลการสำรวจการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสู่คนในประเทศไทยเลย ทางคณะผู้วิจัยฯ จึงได้ตั้งวัตถุประสงค์ในการสำรวจศึกษาหาอุบัติการณ์ดังกล่าว โดยได้มุ่งเน้นที่กลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยงสูงซึ่งได้แก่ กลุ่มคนที่ทำงานสัมผัสกับสุกร หรือมีความเกี่ยวข้องกับฟาร์มสุกร ไม่ว่าจะเป็นอยู่อาศัยหรือเป็นสัตว์แพทย์ผู้เข้า-ออกฟาร์ม หรือทำงานในธุรกิจของฟาร์ม โดยจะทำการสำรวจเฉพาะฟาร์มที่สามารถเพาะแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการสำรวจประชากรคนที่ทำงานในฟาร์มสุกรสองแห่งด้วยกัน โดยฟาร์ม A สามารถเพาะแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N1 ได้และได้เก็บตัวอย่างซีรัมคนในฟาร์ม A จำนวน 28 คน ส่วนฟาร์ม B เพาะแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด H1N2 ได้เก็บตัวอย่างซีรัมคนในฟาร์มจำนวน 50 คน นอกจากนี้ก็ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากคนที่ไม่มีประวัติการสัมผัสสุกรจำนวน 30 คนที่มีอายุใกล้เคียงกับบุคคลสองกลุ่มแรกเพื่อเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ จากการสอบถามประวัติของผู้เข้าร่วมพบว่า มีสองคนที่มีประวัติการทำวัคซีนไข้หวัดใหญ่ในคนจากทุกคนที่เข้าร่วม โดยรวมแล้วทุกคนมีสุขภาพภายนอกแข็งแรงดี มีเพียง 6 คนในกลุ่มผู้สัมผัสสุกรที่เพิ่งหายจากหวัดหรือมีอาการแพ้อากาศ เมื่อ

นำตัวอย่างซีรัมที่ได้มาตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไข้วัดใหญ่สุกรที่เพาะแยกได้จากแต่ละฟาร์ม ผลที่ได้สอดคล้องกันทั้งสองฟาร์มและบ่งชี้ว่า คนที่ทำงานสัมผัสสุกรหรือที่อาศัยอยู่ในฟาร์มสุกรมีโอกาสของการสัมผัสเชื้อไข้วัดใหญ่สุกรมากกว่าคนที่ไม่ได้สัมผัสสุกรถึงกว่า 24-29 เท่า โดยกลุ่มคนที่มีลักษณะงานที่สัมผัสกับสุกรโดยตรงเช่นคนเลี้ยงสุกร คนทำความสะอาดในฟาร์มในคอกสุกร หรือสัตวแพทย์ มีเปอร์เซ็นต์ที่ทำให้ผลบวกต่อเชื้อไข้วัดใหญ่สุกรในฟาร์มมากกว่าคนที่ทำงานในธุรกิจฟาร์มหรือเป็นผู้ผสมอาหาร ผลการสำรวจดังกล่าวเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์อย่างยิ่งที่ชี้ให้เห็นถึงการติดเชื้อข้ามของเชื้อไข้วัดใหญ่สุกรสู่คนในประเทศไทย เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อไข้วัดใหญ่ในคนก็สามารถติดเชื้อสู่สุกรได้ด้วยเช่นกัน ดังนั้นควรได้มีการติดตามต่อเนื่องในฝูงสุกรเพื่อหาหลักฐานดังกล่าว เนื่องจากข้อมูลที่ได้จะช่วยในการวางแผนเพื่อลดโอกาสการเกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะของ genetic reassortment ซึ่งเกิดขึ้นได้ในสุกรต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการสำรวจการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในฝูงสุกรที่อยู่ในพื้นที่จังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่นเป็นระยะเวลา 1 ปี โดยได้มีการติดตามเก็บตัวอย่างทั้ง nasal swabs ชี้นเนื้อปอด และชีรุ่มจากสุกรทุกกลุ่มอายุทั้งที่แสดงอาการป่วยด้วยโรคทางระบบทางเดินหายใจและที่ไม่มีอาการแสดงของโรค นอกจากนี้ยังได้มีการสำรวจหาอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสุคน ในกลุ่มคนที่มีโอกาสสัมผัสสุกร เช่น คนที่ทำงานในฟาร์มสุกรหรืออาศัยในฟาร์มสุกรที่พบว่ามีการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประชากรสุกรของฟาร์ม ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยของโครงการนี้สรุปได้ดังนี้

1. ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย สามารถตรวจพบเชื้อไข้หวัดใหญ่ได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ H1N1 H3N2 และ H1N2 และจากการศึกษาทางชีรุ่มวิทยา พบอุบัติการณ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสูงในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่น ทั้งสายพันธุ์ H1N1 (50%) และ H3N2 (85%) ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมโรคระบบทางเดินหายใจในฟาร์มสุกร และควรมีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อประเมินความเสียหายและการวางแผนป้องกันโรคในฟาร์มสุกรต่อไป
2. จากการสำรวจทั้งทางไวรัสวิทยาและชีรุ่มวิทยาในประเทศไทยในครั้งนี้ ยังไม่พบเชื้อ novel H1N1 2009 ในสุกร ซึ่งควรมีการสำรวจต่อเนื่องและขยายวงกว้างไปยังพื้นที่อื่นๆ เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการให้ความรู้แก่ประชาชน โดยเฉพาะผู้บริโภคนสุกรและผู้ปฏิบัติงานใกล้ชิดสุกร
3. จากข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ที่แยกได้จากสุกรในปีค.ศ. 2005, 2006 และ 2009 สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยไม่ใช่เชื้อ novel H1N1 2009 ที่ระบาดในคน และไม่มีความสัมพันธ์กัน เมื่อนำมาเทียบกับเชื้อ novel H1N1 2009 ที่ระบาดในคน พบว่ามีความแตกต่างกัน จากการจัดแผนภูมิต้นไม้ พบว่าจัดอยู่ในคนละกลุ่ม
4. การสำรวจหาอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสุคนในกลุ่มคนทำงานฟาร์มสุกรสองแห่งพบว่ากลุ่มคนที่มีความเสี่ยงคือ คนที่สัมผัสสุกร หรืออาศัยในฟาร์มสุกร ทำงานในฟาร์มสุกรหรือเข้า-ออกฟาร์มสุกร จะมีโอกาสที่จะสัมผัสเชื้อ หรือติดเชื้อ (ไข้หวัดใหญ่สุกรมากกว่ากลุ่มคนที่ไม่มีความเสี่ยงถึงกว่า 24 เท่า ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการป้องกันการติดต่อระหว่างคนและสุกร เพื่อหลีกเลี่ยงการผสมกันของไวรัสจากคนและสุกร และควรให้ความรู้และข้อเสนอแนะแก่ผู้ปฏิบัติงานดังกล่าว

5. จากการสำรวจครั้งนี้ สามารถแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ได้ 4 ตัวอย่าง ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาทางพยาธิวิทยา อีกทั้งจากข้อมูลเบื้องต้นทางพันธุกรรมพบว่าแตกต่างจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้ในปี 2548 จึงควรศึกษาในเชิงลึกถึงลักษณะทางพันธุกรรมทั้ง 8 ท่อน เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัส ซึ่งอาจส่งผลในการระบาดต่อไปในอนาคตทั้งในคนและสุกร

เนื่องจากธรรมชาติของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอจะเกิดกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง จึงทำให้เชื้อไวรัสสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อชนิดเดิม ส่งผลให้มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนทุกๆ ปี (Seasonal influenza) ซึ่งสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ด้วยการทำวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ เป็นที่ทราบกันดีว่ายิ่งไวรัสในวัคซีนมีความคล้ายคลึงกับไวรัสที่ระบาดอยู่เท่าใดก็ยิ่งจะทำให้วัคซีนที่ได้รับให้ผลคุ้มโรคได้ดีขึ้น ในการเฝ้าระวังการอนามัยโลก (WHO) จึงต้องมีเครือข่ายห้องปฏิบัติการทั่วโลก รวมทั้งต้องมีการให้ทุนสนับสนุนการเฝ้าระวังโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประชากรมนุษย์อย่างต่อเนื่อง ซึ่งส่งผลให้ได้ isolate ของเชื้อไวรัสที่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรค สำหรับการป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่สุกรนั้น มีข้อจำกัดทั้งทางด้านเครือข่ายห้องปฏิบัติการ รวมทั้งเงินทุนสนับสนุนการเฝ้าระวังโรค จึงทำให้การผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรไม่สามารถถูกปรับปรุงให้ทันสมัยได้เช่นเดียวกันกับที่ใช้ในคน นอกจากนี้ยังพบว่าที่ผ่านมาเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมีความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมและวิวัฒนาการในสุกรแต่ละทวีป อย่างชัดเจน จึงทำให้ไม่สามารถผลิตวัคซีนที่มีไวรัสวัคซีนแบบเดียวเพื่อใช้กับสุกรได้ทั่วโลก

อย่างไรก็ตามเหตุการณ์การระบาดใหญ่ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 เมื่อต้นปีที่ผ่านมา พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่พบระบาดในคนมีลักษณะของพันธุกรรมเป็นของสุกร และเคยได้พบก่อนพันธุกรรมที่มีการรวมกันระหว่างคน นกและสุกรในลักษณะนี้มานานแล้ว แต่เนื่องจากข้อมูลจากการสำรวจลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรไม่ต่อเนื่อง จึงทำให้ไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าต้นกำเนิดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 เกิดขึ้นที่ใดและเมื่อไหร่ จากเหตุการณ์นี้ทำให้ตระหนักว่า การติดตามเฝ้าระวังลักษณะวิวัฒนาการของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่รวมถึงไข้หวัดใหญ่ในคนและไข้หวัดใหญ่สุกรมีความสำคัญอย่างยิ่ง และควรได้มีการติดตามอย่างต่อเนื่อง เพราะว่าข้อมูลที่ได้รับนอกจากจะสามารถบอกถึงลักษณะของเชื้อว่าเหมือนหรือแตกต่างกับที่พบในที่อื่นๆ ทั่วโลกอย่างไร ข้อมูลวิวัฒนาการของเชื้อยังสามารถบ่งชี้ถึงการเกิด genetic reassortment ซึ่งสื่อถึงการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์ ส่วนผลการติดตามทางชีวโมเลกุลก็มีประโยชน์ในการเฝ้าระวังการติดเชื้อโดยทางอ้อม โดยเฉพาะในประเทศไทยซึ่งสุกรฟาร์มไม่มีการทำวัคซีน ดังนั้นการพบแอนติบอดีต่อเชื้อจึงมักจะสื่อถึงการติดเชื้อตามธรรมชาติ และการประยุกต์ใช้การตรวจ

ทางซีรุ่มวิทยายังสามารถบ่งชี้ถึงอุบัติการณ์และความถี่ของการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์เช่น การติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรสู่คน หรือในทางกลับกันการติดเชื้อไขหวัดใหญ่ในคนสู่สุกรได้

ข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษาความชุก ลักษณะทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์ถึงการติดเชื้อจากสัตว์สู่คนของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรในจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นในประเทศไทยนี้ ทำให้ทราบว่ามีการติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรในประชากรสุกรที่สำรวจอย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปี รวมทั้งยังพบอุบัติการณ์การติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรสู่คนที่ทำงานในฟาร์มสุกรอีกด้วย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของการเฝ้าระวังเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรอย่างยิ่ง และมีข้อเสนอแนะว่า **ควรได้มีการติดตามเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรอย่างต่อเนื่องทั้งในประชากรสุกรและในคนรวมทั้งสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น สัตว์ปีกที่อยู่ใกล้ชิดฟาร์มสุกร โดยการสำรวจในอนาคตควรที่จะขยายขอบเขตไปสู่พื้นที่อื่นๆ ที่มีการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสุกรที่มีระบบ biosecurity ที่ไม่ได้มาตรฐานและมีการเลี้ยงสุกรปะปนกับสัตว์ชนิดอื่นๆ** เนื่องจากเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรมีการกลายพันธุ์ตลอดเวลา อีกทั้งสุกรยังมีความสามารถในการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อไขหวัดใหญ่ชนิดอื่นๆ เช่น ไขหวัดใหญ่ในคนและไขหวัดนก ซึ่งเพิ่มโอกาสของการเกิดเชื้อไวรัสชนิดใหม่ที่มีโอกาสก่อให้เกิดการระบาดใหญ่ทั้งในประชากรสุกรและประชากรมนุษย์ได้ นอกจากนี้ควรได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อข้ามชนิดสัตว์ที่สามารถใช้เพื่อตรวจสัตว์ได้หลายชนิด เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการเฝ้าระวังการติดเชื้อในระดับประชากร องค์ความรู้พื้นฐานจากการตรวจติดตามเชื้อ จะทำให้การวางแผนการเฝ้าระวังโรคในฟาร์มสุกรเพื่อลดความเสียหายโดยตรงที่เกิดจากการติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรรวมทั้งความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้ออื่นๆ รวมทั้งก่อโรกระบบทางเดินหายใจในสุกรให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังเกิดประโยชน์ในการวางแผนการจัดการด้านต่างๆ และการวางแผนทางการปฏิบัติตนของบุคลากรในฟาร์ม รวมทั้งคนที่ต้องเข้าออกฟาร์มสุกร หรือเกี่ยวข้องกับฟาร์มสุกร เพื่อลดโอกาสของการติดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรข้ามสู่คนให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

บรรณานุกรม

- Boni, M.F., 2008, Vaccination and antigenic drift in influenza. *Vaccine* 26 Suppl 3, C8-14.
- Bright, R.A., Medina, M.J., Xu, X., Perez-Oronoz, G., Wallis, T.R., Davis, X.M., Povinelli, L., Cox, N.J., Klimov, A.I., 2005, Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 366, 1175-1181.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S., 2003, Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J* 44, 735-737.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Kang, S.W., Farnham, M.W., Joo, H.S., 2002, Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J Virol Methods* 102, 53-59.
- Damrongwatanapokin, S., Pachariyanon, S., Pinyochon, W., 2003. Serological study of swine influenza virus H1N1 infection in pigs of Thailand. In: 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig diseases, Rome, p. 261.
- Damrongwatanapokin, S., Pinyochon, W., Pachariyanon, S., Damrongwatanapokin, T., 2006. Serological study and isolation of influenza A virus infection of pigs in Thailand. In: Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, pp. 09-16.
- de Jong, J.C., Palache, A.M., Beyer, W.E., Rimmelzwaan, G.F., Boon, A.C., Osterhaus, A.D., 2003, Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Dev Biol (Basel)* 115, 63-73.
- de Jong, J.C., Smith, D.J., Lapedes, A.S., Donatelli, I., Campitelli, L., Barigazzi, G., Van Reeth, K., Jones, T.C., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., 2007, Antigenic and Genetic Evolution of Swine Influenza A (H3N2) Viruses in Europe. *J Virol* 81, 4315-4322.
- Dean, A.G., Sullivan, K.M., Soe, M.M. 2009. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health (Atlanta, Georgia Emory University).
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D., 2005, Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79, 2814-2822.
- Gramer, M., 2005. Swine influenza virus antigenic drift-impacts on control strategies. In: Swine disease conference for swine practitioners, Ames, Iowa, pp. 58-59.

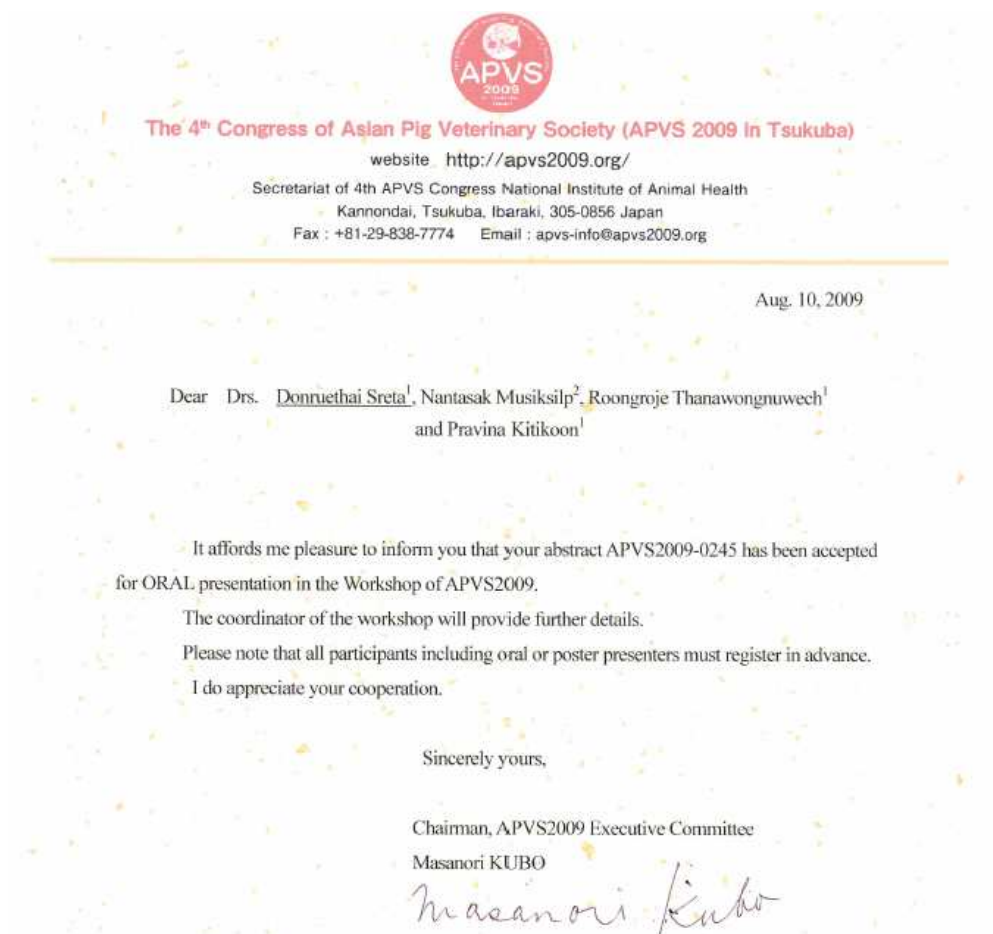
- Haesebrouck, F., Pensaert, M.B., 1986, Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunised with an inactivated influenza H1N1 vaccine. *Vet Microbiol* 11, 239-249.
- Kanai, C., Suwicha, K., Nadhirat, S., Nerome, K., Nakayama, M., Oya, A., 1981, Isolation and serological characterization of influenza A virus from a pig in Thailand. *Jpn J Med Sci Biol* 34, 175-178.
- Karasin, A.I., Carman, S., Olsen, C.W., 2006, Identification of human H1N2 and human-swine reassortant H1N2 and H1N1 influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada (2003 to 2005). *J Clin Microbiol* 44, 1123-1126.
- Karasin, A.I., Schutten, M.M., Cooper, L.A., Smith, C.B., Subbarao, K., Anderson, G.A., Carman, S., Olsen, C.W., 2000, Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res* 68, 71-85.
- Kitikoon, P., Nilubol, D., Erickson, B.J., Janke, B.H., Hoover, T.C., Sornsen, S.A., Thacker, E.L., 2006, The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 112, 117-128.
- Komadina, N., Roque, V., Thawatsupha, P., Rimando-Magalong, J., Waicharoen, S., Bomasang, E., Sawanpanyalert, P., Rivera, M., Iannello, P., Hurt, A.C., Barr, I.G., 2007, Genetic analysis of two influenza A (H1) swine viruses isolated from humans in Thailand and the Philippines. *Virus Genes* 35, 161-165.
- Kupradinun, S., Peanpijit, P., Bhodhikosoom, C., Yoshioka, Y., Endo, A., Nerome, K., 1991, The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. *Arch Virol* 118, 289-297.
- Lambkin, R., McLain, L., Jones, S.E., Aldridge, S.L., Dimmock, N.J., 1994, Neutralization escape mutants of type A influenza virus are readily selected by antisera from mice immunized with whole virus: a possible mechanism for antigenic drift. *J Gen Virol* 75 (Pt 12), 3493-3502.
- Loeffen, W.L., Heinen, P.P., Bianchi, A.T., Hunneman, W.A., Verheijden, J.H., 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.
- McMinn, P., Carrello, A., Cole, C., Baker, D., Hampson, A., 1999, Antigenic drift of influenza A(H3N2) virus in a persistently infected immunocompromised host is similar to that occurring in the community. *Clinical infectious diseases* 29, 456-458.

- Murphy, B.R., Webster, R.G., 1996, Orthomyxoviruses, In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.) *Fields virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1397-1445.
- Myers, K.P., Olsen, C.W., Gray, G.C., 2007, Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis* 44, 1084-1088.
- Myers, K.P., Olsen, C.W., Setterquist, S.F., Capuano, A.W., Donham, K.J., Thacker, E.L., Merchant, J.A., Gray, G.C., 2006, Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus? *Clin Infect Dis* 42, 14-20.
- Nerome, K., Ishida, M., Nakayama, M., Oya, A., Kanai, C., Suwicha, K., 1981, Antigenic and genetic analysis of A/Hong Kong (H3N2) influenza viruses isolated from swine and man. *J Gen Virol* 56, 441-445.
- Olsen, C.W., 2002, The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* 85, 199-210.
- Olsen, C.W., Brammer, L., Easterday, B.C., Arden, N., Belay, E., Baker, I., Cox, N.J., 2002, Serologic evidence of H1 swine Influenza virus infection in swine farm residents and employees. *Emerg Infect Dis* 8, 814-819.
- Olsen, C.W., Brown, I.H., Easterday, B.C., Van Reeth, K., 2006, Swine Influenza, In: D'Allaire, S.D., Allaire, S.D., Taylor, D.J., Zimmerman, J., Straw, B.E. (Eds.) *Diseases of Swine*. Blackwell Pub., Ames, Iowa, pp. 469-482.
- Oxford, J.S., Haaheim, L.R., Slepushkin, A., Werner, J., Kuwert, E., Schild, G.C., 1981, Strain specificity of serum antibody to the haemagglutinin of influenza A (H3N2) viruses in children following immunization or natural infection. *J Hyg (Lond)* 86, 17-26.
- Pachariyanon, S., Damrongwatanapokin, S., Pinyochon, W., Chuxnum, T., Soawapak, H., Choomkasien, P., 2006. Investigation of influenza A virus infection in pigs from 5 reported AIV outbreak provinces in 2004. In: *Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark*, pp. 09-17.
- Provisions, C. 2003. House Report 107-623 (Agriculture, Rural Development, Food and Drug Administration, and Related Agencies Appropriations Bill).
- Schweiger, B., Zadow, I., Heckler, R., 2002, Antigenic drift and variability of influenza viruses. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 191, 133-138.

- Skibbe, D., Zhou, E.M., Janke, B.H., 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.
- Takemae, N., Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, S., Uchida, Y., Ruttanapumma, R., Watanabe, C., Yamaguchi, S., Saito, T., 2008, Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. *Influenza Other Respi Viruses* 2, 181-189.
- Tamura, S., Tanimoto, T., Kurata, T., 2005, Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Jpn J Infect Dis* 58, 195-207.
- Taubenberger, J.K., Layne, S.P., 2001, Diagnosis of influenza virus: coming to grips with the molecular era. *Mol Diagn* 6, 291-305.
- Vincent, A.L., Lager, K.M., Janke, B.H., Gramer, M.R., Richt, J.A., 2007, Failure of protection and enhanced pneumonia with a US H1N2 swine influenza virus in pigs vaccinated with an inactivated classical swine H1N1 vaccine. *Vet Microbiol*.
- Vincent, A.L., Lager, K.M., Ma, W., Lekcharoensuk, P., Gramer, M.R., Loiacono, C., Richt, J.A., 2006, Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States. *Vet Microbiol* 118, 212-222.
- Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Gramer, M.R., Richt, J.A., Janke, B.H., 2009, Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes*.
- Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Janke, B.H., Richt, J.A., 2008, Swine influenza viruses a North American perspective. *Adv Virus Res* 72, 127-154.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y., 1992, Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56, 152-179.
- Wilson, I.A., Cox, N.J., 1990, Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu Rev Immunol* 8, 737-771.
- Zell, R., Bergmann, S., Krumbholz, A., Wutzler, P., Durrwald, R., 2008, Ongoing evolution of swine influenza viruses: a novel reassortant. *Arch Virol* 153, 2085-2092.
- Zou, S., 1997, A practical approach to genetic screening for influenza virus variants. *J Clin Microbiol* 35, 2623-2627.

ภาคผนวก

1. การนำเสนอผลงานวิจัยของโครงการในการประชุม The 4th Congress of Asian Pig Veterinary Society (APVS 2009 in Tsukuba) วันที่ 26-28 ตุลาคม 2009



Serological study of H1N1 and H3N2 swine influenza viruses from pigs in the high pig population provinces in Thailand

Donmethai Sreai¹, Nantasak Musiksulp², Roongroj Thanawongmuwch¹ and Pravina Kirikoon¹

¹Dept. of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

²Veterinary Research and Development Center (Western region), Ratchaburi, Thailand

Introduction

Influenza A virus is a cause of epidemic respiratory disease in many species including birds, humans and pigs. Therefore, monitoring the virus and immunological response to the virus will help gain important data for controlling the disease. Swine influenza virus (SIV) causes an acute respiratory disease in pigs that occasionally can be transmitted to human. Moreover, SIV is one of the major viral pathogen in addition to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) that contributes to the porcine respiratory disease complex (PRDC) (1). In Thailand, pig industry also faces the PRDC problem and thus seroprevalence studies of SIV in Thailand have been conducted since 2003. However, the only current serological data is available in 2005 (2) and update data is needed. In this study, we provide an update of the seroprevalence of SIV in pigs from the high pig population provinces in Thailand during June 2008 to Mar 2009.

Materials and method

Six hundred and fifty serum samples collected from June 2008 to Mar 2009 from pigs in the top four provinces that have the highest pig density in Thailand including Ratchaburi, Nakhon-Pathom, Chonburi and Chachoengsao respectively. Hemagglutination inhibition (HI) assay was used to evaluate the antibody titer against H1N1 and H3N2 SIV. HI test was performed, according to WHO (3). All sera subjected to test with H3N2 virus were treated with receptor-destroying enzyme (RDE) and adsorbed with 50% chicken red blood (RBC) cells to remove non-specific inhibitors of agglutination and natural serum agglutinins. Sera subjected to test with H1N1 SIV were adsorbed with 50% RBC without RDE treatment. Positive SI was considered when HI titer was ≥ 20 .

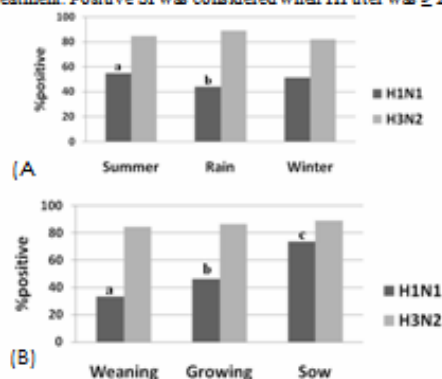


Figure 1. Percentage of seropositive pigs to H1N1 and H3N2 SIV in each season (A) and each pig group (B). ^{abc} were statistically different ($p < 0.05$).

Province	% SI positive	
	H1N1	H3N2
Ratchaburi	44.49 (101/227)	83.33 (110/132) ^{ab}
Nakhon-Pathom	44.59 (103/231)	95.18 (158/166) ^b
Chonburi	56.34 (40/71)	69.69 (38/55) ^a
Chachoengsao	53.06 (52/98)	79.76 (67/84) ^a
Total	47.20 (296/627)	85.35 (373/437)

Table 1. Percentage of seropositive pigs to H1N1 and H3N2 SIV in each province. ^{ab} were statistically different ($p < 0.05$).

Result

Table 1 shows the percentage of pigs with positive antibody to SIV in each province. It was demonstrated that pigs in all provinces were positive to both H1N1 and H3N2 SIV. However, the percentage of pigs positive to H3N2 was significantly higher than H1N1 SIV ($p < 0.01$). Figure 1 shows percentage of seropositive pigs against SIV in (A) each season and (B) each pig group. Data shows that SIV positive antibodies were found in pigs throughout the year and in all age groups that was surveyed. In addition, the results from all samples showed that pigs had significantly higher levels of mean HI score to H3N2 (HI titer to = 74.6 ± 23.0) than H1N1 (HI titer = 16.2 ± 16.3) ($p < 0.05$). Percentage of antibodies to H3N2 showed that the amount of seropositive pigs in Nakhon-Pathom was significantly higher than Chonburi ($p < 0.01$) and Chachoengsao ($p < 0.01$). However, the percentage of seropositive pigs to H3N2 was indifferent in each season and age group ($p > 0.05$). On the other hand, the percentage of seropositive pigs to H1N1 was no different when compared between provinces, but sows had significantly highest percent seropositive than all other age groups.

Discussion and Conclusion

This study indicates that SI can be found in all seasons in the four provinces with the highest pig population in Thailand. Results from June 2008 to Mar 2009 demonstrated that pigs were exposed to both H1N1 and H3N2 SIV. However, H3N2 seroprevalence was dominant over H1N1, in contrast to a previous report conducted in 2005 (2). Our findings indicated that H3N2 continuously circulate among pigs in all age groups as the percent seropositive was over 65% in all analyzed data. Although the number of seropositive pigs to H1N1 was significantly lower than H3N2, the presence of antibodies in all age groups particularly in sows indicate that this subtype is still present in the swine population of Thailand. In summary, SIV continues to circulate among pigs in the highest pig density area of Thailand. Therefore, it is essential to continue this type of surveillance and to further characterize the genetic makeup of the virus as the information will contribute to the control PRDC and prevent pig-to-human SIV transmission.

References

- Easton, B.C. and Van Reeth, K. 1999. Swine influenza. In: Straw et al. (eds), *Diseases of Swine*, 8th edition, Iowa State Press, Ames, p. 277-290.
- Dumrongwatanapokin et al. 2006. The 19th IPVS Congress, Proceedings, Copenhagen, Denmark, 2009-16.
- Webster et al. 2002. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. World Health Organization, 15-67.

2. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลที่ได้จากวัตถุประสงค์ข้อที่ 3 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรจากตัวอย่างซีรัมสุกร

The SAS System

11:45 Thursday, July 1, 2009 41

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
strain	1273	1.5098193	0.5001000	1.0000000	2.0000000
province	1273	3.0054988	1.0011634	1.0000000	4.0000000
farm	1273	5.2482325	2.5870928	1.0000000	9.0000000
mon	1273	2.9033778	1.6051008	1.0000000	5.0000000
group	1104	1.8079710	0.6861470	1.0000000	3.0000000
age	1273	18.9748625	11.7877987	4.0000000	40.0000000
HI	999	107.5575576	192.5585574	0	640.0000000
score	1004	2.6195219	2.2368832	0	7.0000000
percent	1004	0.6195219	0.4857464	0	1.0000000
season	1273	2.1523959	0.6120098	1.0000000	3.0000000

The SAS System

11:45 Thursday, July 1, 2009 42

----- strain=1 -----

The FREQ Procedure

Table of province by percent

province	percent		
Frequency			
Percent			
Row Pct			
Col Pct	0	1	Total
1	31	40	71
	5.21	6.72	11.93
	43.66	56.34	
	9.57	14.76	
2	39	27	66
	6.55	4.54	11.09
	59.09	40.91	
	12.04	9.96	
3	128	103	231
	21.51	17.31	38.82
	55.41	44.59	
	39.51	38.01	
4	126	101	227
	21.18	16.97	38.15
	55.51	44.49	
	38.89	37.27	
Total	324	271	595
	54.45	45.55	100.00

Frequency Missing = 29

Statistics for Table of province by percent

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	3	4.0931	0.2516
Likelihood Ratio Chi-Square	3	4.0805	0.2529
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	1.4996	0.2207
Phi Coefficient		0.0829	
Contingency Coefficient		0.0827	
Cramer's V		0.0829	

Effective Sample Size = 595

Frequency Missing = 29

The SAS System

11:45 Thursday, July 1, 2009 43

----- strain=2 -----

The FREQ Procedure

Table of province by percent

province percent

Frequency Percent Row Pct Col Pct	0	1	Total
1	17 4.16 30.91 29.31	38 9.29 69.09 10.83	55 13.45
2	11 2.69 19.64 18.97	45 11.00 80.36 12.82	56 13.69
3	8 1.96 4.82 13.79	158 38.63 95.18 45.01	166 40.59
4	22 5.38 16.67 37.93	110 26.89 83.33 31.34	132 32.27
Total	58 14.18	351 85.82	409 100.00

Frequency Missing = 240

Statistics for Table of province by percent

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	3	26.6438	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Square	3	27.3518	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	6.6853	0.0097
Phi Coefficient		0.2552	
Contingency Coefficient		0.2473	
Cramer's V		0.2552	

Effective Sample Size = 409

Frequency Missing = 240

WARNING: 37% of the data are missing.
The SAS System

11:45 Thursday, July 1, 2009 44

----- strain=1 -----

The FREQ Procedure

Table of season by percent

season		percent		
Frequency	Percent	Row Pct	Col Pct	Total
		0	1	
1	38	26		64
	6.39	4.37		10.76
	59.38	40.63		
	11.73	9.59		
2	205	160		365
	34.45	26.89		61.34
	56.16	43.84		
	63.27	59.04		
3	81	85		166
	13.61	14.29		27.90
	48.80	51.20		
	25.00	31.37		
Total	324	271		595
	54.45	45.55		100.00

Frequency Missing = 29

Statistics for Table of season by percent

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	2	3.1987	0.2020
Likelihood Ratio Chi-Square	2	3.1946	0.2024
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	2.9798	0.0843
Phi Coefficient		0.0733	
Contingency Coefficient		0.0731	
Cramer's V		0.0733	

Effective Sample Size = 595

Frequency Missing = 29

The SAS System

11:45 Thursday, July 1, 2009 45

----- strain=2 -----

The FREQ Procedure

Table of season by percent

season percent

Frequency
Percent
Row Pct

Col Pct	0	1	Total
1	4	51	55
	0.98	12.47	13.45
	7.27	92.73	
	6.90	14.53	
2	31	196	227
	7.58	47.92	55.50
	13.66	86.34	
	53.45	55.84	
3	23	104	127
	5.62	25.43	31.05
	18.11	81.89	
	39.66	29.63	
Total	58	351	409
	14.18	85.82	100.00

Frequency Missing = 240

Statistics for Table of season by percent

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	2	3.8193	0.1481
Likelihood Ratio Chi-Square	2	4.1090	0.1282
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	3.7401	0.0531
Phi Coefficient		0.0966	
Contingency Coefficient		0.0962	
Cramer's V		0.0966	

Effective Sample Size = 409

Frequency Missing = 240

WARNING: 37% of the data are missing.

The SAS System

11:45 Thursday, July 1, 2009 46

----- strain=1 -----

The FREQ Procedure

Table of group by percent

group	percent		
Frequency			
Percent			
Row Pct			
Col Pct	0	1	Total
1	124	53	177
	23.80	10.17	33.97
	70.06	29.94	
	42.18	23.35	
2	147	115	262
	28.21	22.07	50.29
	56.11	43.89	
	50.00	50.66	
3	23	59	82
	4.41	11.32	15.74
	28.05	71.95	
	7.82	25.99	
Total	294	227	521
	56.43	43.57	100.00

Frequency Missing = 103

Statistics for Table of group by percent

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	2	40.2429	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Square	2	40.9323	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	37.7254	<.0001
Phi Coefficient		0.2779	
Contingency Coefficient		0.2678	
Cramer's V		0.2779	

Effective Sample Size = 521

Frequency Missing = 103

WARNING: 17% of the data are missing.

The SAS System

11:45 Thursday, July 1, 2009 47

----- strain=2 -----

The FREQ Procedure

Table of group by percent

group	percent		
Frequency			
Percent			
Row Pct			
Col Pct	0	1	Total
1	27	161	188
	7.16	42.71	49.87
	14.36	85.64	
	49.09	50.00	
2	24	133	157
	6.37	35.28	41.64
	15.29	84.71	
	43.64	41.30	
3	4	28	32
	1.06	7.43	8.49
	12.50	87.50	
	7.27	8.70	
Total	55	322	377
	14.59	85.41	100.00

Frequency Missing = 272

Statistics for Table of group by percent

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	2	0.1812	0.9134
Likelihood Ratio Chi-Square	2	0.1852	0.9115
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.0030	0.9563
Phi Coefficient		0.0219	
Contingency Coefficient		0.0219	
Cramer's V		0.0219	

Effective Sample Size = 377

Frequency Missing = 272

WARNING: 42% of the data are missing.

The SAS System

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK._DS
Dependent Variable	_z
Weight Variable	_w
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Dimensions

Covariance Parameters	1
Columns in X	11
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs Per Subject	624
Observations Used	521
Observations Not Used	103
Total Observations	624

Parameter Search

CovP1	Variance	Res Log Like	-2 Res Log Like
1.0224	1.0224	-1139.9032	2279.8064

Covariance Parameter
Estimates

Cov Parm	Estimate
Residual	1.0224

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	2279.8
AIC (smaller is better)	2281.8
AICC (smaller is better)	2281.8
BIC (smaller is better)	2286.0

Solution for Fixed Effects

Effect	province	season	group	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept				1.1946	0.3241	513	3.69	0.0003
province	1			0.9645	0.3749	513	2.57	0.0104
province	2			0.3139	0.3733	513	0.84	0.4007
province	3			0.1005	0.2158	513	0.47	0.6415
province	4			0	.	.	.	.
season		1		-0.9970	0.4087	513	-2.44	0.0151
season		2		-0.4833	0.2272	513	-2.13	0.0339

The SAS System

The Mixed Procedure

Solution for Fixed Effects

Effect	province	season	group	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
season		3		0	.	.	.	.
group			1	-1.8747	0.3047	513	-6.15	<.0001
group			2	-1.2161	0.2821	513	-4.31	<.0001
group			3	0	.	.	.	.

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
province	3	513	2.25	0.0816
season	2	513	4.08	0.0174
group	2	513	18.99	<.0001

Least Squares Means

Effect	province	season	group	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
province	1			0.6354	0.2947	513	2.16	0.0316
province	2			-0.01517	0.2916	513	-0.05	0.9585
province	3			-0.2286	0.2127	513	-1.07	0.2831
province	4			-0.3291	0.2138	513	-1.54	0.1243
season		1		-0.4880	0.3252	513	-1.50	0.1342
season		2		0.02578	0.1781	513	0.14	0.8850
season		3		0.5091	0.2078	513	2.45	0.0146
group			1	-0.8288	0.1790	513	-4.63	<.0001
group			2	-0.1702	0.1503	513	-1.13	0.2581
group			3	1.0459	0.2657	513	3.94	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	province	season	group	_province	_season	_group	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
province	1		2				0.6505	0.4090	513	1.59	0.1124
province	1		3				0.8639	0.3710	513	2.33	0.0203
province	1		4				0.9645	0.3749	513	2.57	0.0104
province	2		3				0.2134	0.3727	513	0.57	0.5672

Differences of Least Squares Means

Effect	province	season	group	_province	_season	_group	Adjustment	Adj P
province	1		2				Tukey-Kramer	0.3850
province	1		3				Tukey-Kramer	0.0930
province	1		4				Tukey-Kramer	0.0507
province	2		3				Tukey-Kramer	0.9403

The SAS System

The Mixed Procedure

Differences of Least Squares Means

Effect	province	season	group	_province	_season	_group	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
province	2			4			0.3139	0.3733	513	0.84	0.4007
province	3			4			0.1005	0.2158	513	0.47	0.6415
season		1			2		-0.5137	0.4065	513	-1.26	0.2069
season		1			3		-0.9970	0.4087	513	-2.44	0.0151
season		2			3		-0.4833	0.2272	513	-2.13	0.0339
group			1			2	-0.6586	0.2125	513	-3.10	0.0020
group			1			3	-1.8747	0.3047	513	-6.15	<.0001
group			2			3	-1.2161	0.2821	513	-4.31	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	province	season	group	_province	_season	_group	Adjustment	Adj P
province	2			4			Tukey-Kramer	0.8348
province	3			4			Tukey-Kramer	0.9665
season		1			2		Tukey-Kramer	0.4164
season		1			3		Tukey-Kramer	0.0399
season		2			3		Tukey-Kramer	0.0855
group			1			2	Tukey-Kramer	0.0058
group			1			3	Tukey-Kramer	<.0001
group			2			3	Tukey-Kramer	<.0001

GLIMMIX Model Statistics

Description	Value
Deviance	660.8677
Scaled Deviance	646.3759
Pearson Chi-Square	524.5015
Scaled Pearson Chi-Square	513.0000
Extra-Dispersion Scale	1.0224

The SAS System

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK._DS
Dependent Variable	_z
Weight Variable	_w
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Dimensions

Covariance Parameters	1
Columns in X	11
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs Per Subject	649
Observations Used	377
Observations Not Used	272

Parameter Search

CovP1	Variance	Res Log Like	-2 Res Log Like
1.1641	1.1641	-1023.5817	2047.1634

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm Estimate

Residual 1.1641

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	2047.2
AIC (smaller is better)	2049.2
AICC (smaller is better)	2049.2
BIC (smaller is better)	2053.1

Solution for Fixed Effects

Effect	province	season	group	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept				1.4360	0.6702	369	2.14	0.0328
province	1			-1.8624	0.5141	369	-3.62	0.0003
province	2			-0.4173	0.5421	369	-0.77	0.4419
province	3			1.4559	0.4769	369	3.05	0.0024
province	4			0	.	.	.	.
season		1		2.6785	0.7403	369	3.62	0.0003
season		2		0.5348	0.4304	369	1.24	0.2149

The SAS System

The Mixed Procedure

Solution for Fixed Effects

Effect	province	season	group	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
season		3		0	.	.	.	.
group			1	-0.1276	0.6575	369	-0.19	0.8462
group			2	-0.5059	0.6647	369	-0.76	0.4471
group			3	0	.	.	.	.

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
province	3	369	10.47	<.0001
season	2	369	6.60	0.0015
group	2	369	0.66	0.5159

Least Squares Means

Effect	province	season	group	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
province	1			0.4335	0.4289	369	1.01	0.3128
province	2			1.8786	0.5080	369	3.70	0.0003
province	3			3.7518	0.4865	369	7.71	<.0001
province	4			2.2959	0.3795	369	6.05	<.0001
season		1		3.6974	0.6531	369	5.66	<.0001
season		2		1.5536	0.3281	369	4.74	<.0001
season		3		1.0189	0.3351	369	3.04	0.0025
group			1	2.1735	0.3004	369	7.24	<.0001
group			2	1.7952	0.3005	369	5.97	<.0001
group			3	2.3011	0.6338	369	3.63	0.0003

Differences of Least Squares Means

Effect	province	season	group	_province	_season	_group	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
province	1			2			-1.4451	0.6675	369	-2.16	0.0310
province	1			3			-3.3183	0.6032	369	-5.50	<.0001
province	1			4			-1.8624	0.5141	369	-3.62	0.0003
province	2			3			-1.8732	0.6130	369	-3.06	0.0024

Differences of Least Squares Means

Effect	province	season	group	_province	_season	_group	Adjustment	Adj P
province	1			2			Tukey-Kramer	0.1351
province	1			3			Tukey-Kramer	<.0001
province	1			4			Tukey-Kramer	0.0019
province	2			3			Tukey-Kramer	0.0128

The SAS System

The Mixed Procedure

Differences of Least Squares Means

Effect	province	season	group	_province	_season	_group	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
province	2			4			-0.4173	0.5421	369	-0.77	0.4419
province	3			4			1.4559	0.4769	369	3.05	0.0024
season		1			2		2.1438	0.6807	369	3.15	0.0018
season		1			3		2.6785	0.7403	369	3.62	0.0003
season		2			3		0.5348	0.4304	369	1.24	0.2149
group			1			2	0.3783	0.3608	369	1.05	0.2951
group			1			3	-0.1276	0.6575	369	-0.19	0.8462
group			2			3	-0.5059	0.6647	369	-0.76	0.4471

Differences of Least Squares Means

Effect	province	season	group	_province	_season	_group	Adjustment	Adj P
province	2			4			Tukey-Kramer	0.8680
province	3			4			Tukey-Kramer	0.0129
season		1			2		Tukey-Kramer	0.0050
season		1			3		Tukey-Kramer	0.0010
season		2			3		Tukey-Kramer	0.4290
group			1			2	Tukey-Kramer	0.5468
group			1			3	Tukey-Kramer	0.9794
group			2			3	Tukey-Kramer	0.7271

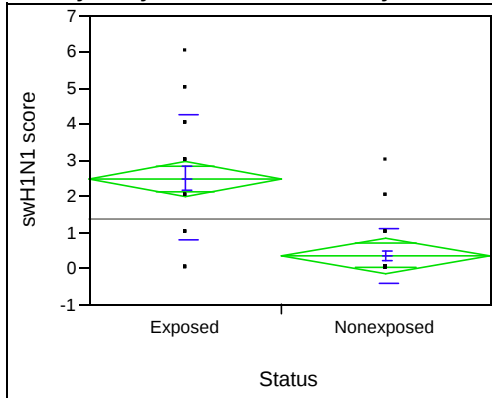
GLIMMIX Model Statistics

Description	Value
Deviance	266.3489
Scaled Deviance	228.8044
Pearson Chi-Square	429.5492
Scaled Pearson Chi-Square	369.0000
Extra-Dispersion Scale	1.1641

3. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลที่ได้จากวัตถุประสงค์ข้อที่ 4 ซึ่งเป็นการศึกษาหาอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้วัดใหญ่สุกรสู่คนในฟาร์มสุกร A และ ฟาร์มสุกร B

Two sample T test analysis: HI score exposed VS non-exposed participants from farm A

Oneway Analysis of swH1N1 score By Status



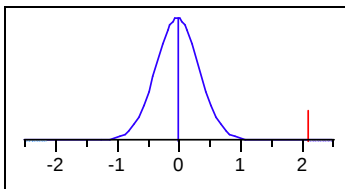
Oneway Anova Summary of Fit

Rsquare	0.407172
Adj Rsquare	0.396585
Root Mean Square Error	1.30908
Mean of Response	1.396552
Observations (or Sum Wgts)	58

t Test

Exposed-Nonexposed
Assuming equal variances

Difference	2.13333	t Ratio	6.201806
Std Err Dif	0.34399	DF	56
Upper CL Dif	2.82242	Prob > t	<.0001
Lower CL Dif	1.44425	Prob > t	<.0001
Confidence	0.95	Prob < t	1.0000



Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Status	1	65.91264	65.9126	38.4624	<.0001
Error	56	95.96667	1.7137		
C. Total	57	161.87931			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
Exposed	28	2.50000	0.24739	2.004	2.9956
Nonexposed	30	0.36667	0.23900	-0.112	0.8454

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Means and Std Deviations

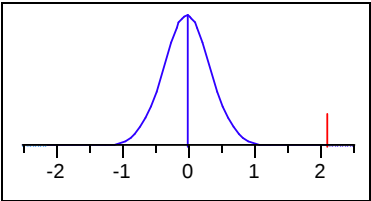
Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
Exposed	28	2.50000	1.71053	0.32326	1.8367	3.1633
Nonexposed	30	0.36667	0.76489	0.13965	0.0811	0.6523

t Test

Exposed-Nonexposed

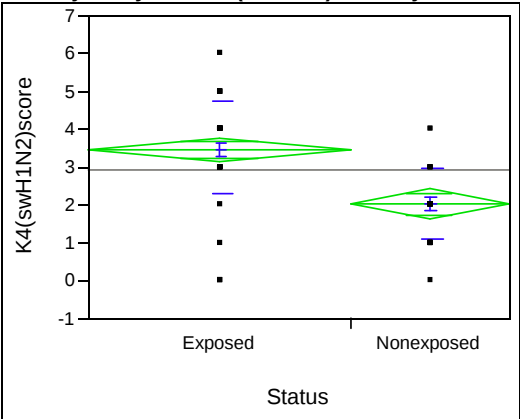
Assuming unequal variances

Difference	2.13333	t Ratio	6.058277
Std Err Dif	0.35214	DF	36.82409
Upper CL Dif	2.84694	Prob > t	<.0001
Lower CL Dif	1.41972	Prob > t	<.0001
Confidence	0.95	Prob < t	1.0000



Two sample T test analysis: HI score exposed VS non-exposed participants from farm B

Oneway Analysis of K4(swH1N2)score By Status



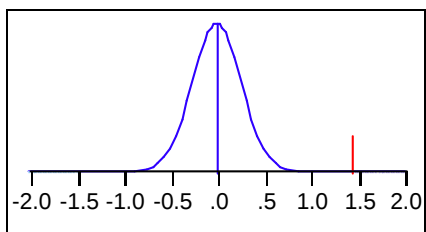
Oneway Anova
Summary of Fit

Rsquare	0.282944
Adj Rsquare	0.273751
Root Mean Square Error	1.12914
Mean of Response	2.9375
Observations (or Sum Wgts)	80

t Test

Exposed-Nonexposed
Assuming equal variances

Difference	1.44667	t Ratio	5.547806
Std Err Dif	0.26076	DF	78
Upper CL Dif	1.96581	Prob > t	<.0001
Lower CL Dif	0.92753	Prob > t	<.0001
Confidence	0.95	Prob < t	1.0000



Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Status	1	39.24083	39.2408	30.7782	<.0001
Error	78	99.44667	1.2750		
C. Total	79	138.68750			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
Exposed	50	3.48000	0.15968	3.1621	3.7979
Nonexposed	30	2.03333	0.20615	1.6229	2.4438

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Means and Std Deviations

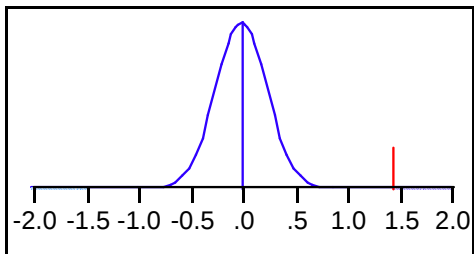
Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
Exposed	50	3.48000	1.23288	0.17436	3.1296	3.8304
Nonexposed	30	2.03333	0.92786	0.16940	1.6869	2.3798

t Test

Exposed-Nonexposed

Assuming unequal variances

Difference	1.44667	t Ratio	5.950927
Std Err Dif	0.24310	DF	73.90237
Upper CL Dif	1.93106	Prob > t	<.0001
Lower CL Dif	0.96227	Prob > t	<.0001
Confidence	0.95	Prob < t	1.0000



Odds Ratio with 95% CI : Farm A human serum samples

2 x 2 Table Statistics

Single Table Analysis				
Exposure	Disease			
	(+)	(-)		
	(+)	14	14	28
	(-)	1	29	30
		15	43	58

Chi Square and Exact Measures of Association

Test	Value	p-value(1-tail)	p-value(2-tail)
Uncorrected chi square	16.45	0.00002498	0.00004995
Yates corrected chi square	14.11	0.00008640	0.0001728
Mantel-Haenszel chi square	16.17	0.00002901	0.00005802
Fisher exact		0.00004171	0.00008342
Mid-P exact		0.00002148	0.00004297

All expected values (row total*column total/grand total) are >=5
OK to use chi square.

Risk-Based* Estimates and 95% Confidence Intervals (Not valid for Case-Control studies)

Point Estimates		Confidence Limits	
Type	Value	Lower, Upper	Type
Risk in Exposed	50%	32.63, 67.37	Taylor series
Risk in Unexposed	3.333%	0.0, 18.09	Taylor series
Overall Risk	25.86%	16.25, 38.47	Taylor series
Risk Ratio	15	2.108, 106.7 ¹	Taylor series
Risk Difference	46.67%	27.07, 66.27 ^o	Taylor series
Etiologic fraction in pop.(EFp)	87.11%	63.32, 100	
Etiologic fraction in exposed(EFe)	93.33%	52.57, 99.06	

Odds-Based Estimates and Confidence Limits

Point Estimates		Confidence Limits	
Type	Value	Lower, Upper	Type
CMLE Odds Ratio*	27.38	4.221, 637.6 ¹	Mid-P Exact
		3.528, 1267 ¹	Fisher Exact
Odds Ratio	29	3.458, 243.2 ¹	Taylor series
Etiologic fraction in pop.(EFp OR)	90.11%	71.29, 100	
Etiologic fraction in exposed(EFe OR)	96.55%	71.08, 99.59	

*Conditional maximum likelihood estimate of Odds Ratio

(P)indicates a one-tail P-value for Protective or negative association; otherwise one-tailed exact P-values are for a positive association.

Martin,D; Austin,H (1991) An efficient program for computing conditional maximum likelihood estimates and exact confidence limits for a common odds ratio. Epidemiology 2, 359-362.

^o 1 95% confidence limits testing exclusion of 0 or 1, as indicated

P-values < 0.05 and confidence limits excluding null values (0,1, or [n]) are highlighted.

LookFirst items: Editor's choice of items to examine first.

Odds Ratio with 95% CI : Farm B human serum samples

2 x 2 Table Statistics

Single Table Analysis				
		Disease		
		(+)	(-)	
Exposure	(+)	45	5	50
	(-)	8	22	30
		53	27	80

Chi Square and Exact Measures of Association

Test	Value	p-value(1-tail)	p-value(2-tail)
Uncorrected chi square	33.64	<0.0000001	<0.0000001
Yates corrected chi square	30.86	<0.0000001	<0.0000001
Mantel-Haenszel chi square	33.22	<0.0000001	<0.0000001
Fisher exact		<0.0000001	<0.0000001
Mid-P exact		<0.0000001	<0.0000001

All expected values (row total*column total/grand total) are >=5
OK to use chi square.

Risk-Based* Estimates and 95% Confidence Intervals (Not valid for Case-Control studies)

Point Estimates		Confidence Limits	
Type	Value	Lower, Upper	Type
Risk in Exposed	90%	78.21, 96.09	Taylor series
Risk in Unexposed	26.67%	13.98, 44.65	Taylor series
Overall Risk	66.25%	55.33, 75.68	Taylor series
Risk Ratio	3.375	1.851, 6.153 ¹	Taylor series
Risk Difference	63.33%	45.46, 81.21 ^o	Taylor series
Etiologic fraction in pop.(EFp)	59.75%	38.82, 80.67	
Etiologic fraction in exposed(EFe)	70.37%	45.98, 83.75	

Odds-Based Estimates and Confidence Limits

Point Estimates		Confidence Limits	
Type	Value	Lower, Upper	Type
CMLE Odds Ratio*	23.28	7.142, 87.95 ¹	Mid-P Exact
		6.381, 104 ¹	Fisher Exact
Odds Ratio	24.75	7.248, 84.52 ¹	Taylor series
Etiologic fraction in pop.(EFp OR)	81.48%	69.19, 93.76	
Etiologic fraction in exposed(EFe OR)	95.96%	86.2, 98.82	

*Conditional maximum likelihood estimate of Odds Ratio

(P)indicates a one-tail P-value for Protective or negative association; otherwise one-tailed exact P-values are for a positive association.

Martin,D; Austin,H (1991) An efficient program for computing conditional maximum likelihood estimates and exact confidence limits for a common odds ratio. Epidemiology 2, 359-362.

^o : 95% confidence limits testing exclusion of 0 or 1, as indicated

¹ P-values < 0.05 and confidence limits excluding null values (0,1, or [n]) are highlighted.

LookFirst items: Editor's choice of items to examine first.