

โรคไวรัสระบบทางเดินหายใจในสุกร ที่สำคัญทางเศรษฐกิจ และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ



ISBN: 978-974-682-363-0

สุจิรา ปาจริยานนท์

โรคไวรัสระบบทางเดินหายใจในสุกรที่สำคัญทางเศรษฐกิจ
และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ
Respiratory Viral Diseases of Economic Importance
in Swine and Laboratory Diagnosis

สุจิตรา ปาจริยานนท์
วท.บ., สพ.บ., Ph.D.

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

คำนำ

สุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่เลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย ตั้งแต่การเลี้ยงไว้บริโภคในครัวเรือนไปจนถึงการเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมรายย่อย และอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการบริโภคภายในประเทศและส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศ ปัญหาและอุปสรรคในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรที่สำคัญได้แก่ การเกิดโรคระบาดซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาลและมีผลกระทบต่อ การส่งออก กรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการ ป้องกัน ควบคุมและกำจัดโรคระบาดสัตว์ที่ก่อให้เกิดความเสียหาย โดยกำหนดแผนงาน มาตรการ และจัดระบบการดำเนินการป้องกันและควบคุมโรคที่ชัดเจน และเป็นแนวทางเดียวกันทั้งประเทศเพื่อให้สุกรมีสุขภาพแข็งแรง ปลอดภัยจากโรคต่างๆ มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค ประชาชนได้บริโภคเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ที่สะอาด ถูกสุขอนามัย ปลอดภัยจากการปนเปื้อนจากสารเร่งเนื้อแดง ยาตกค้าง ตลอดจนจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย มีคุณภาพเท่าเทียมมาตรฐานสากล และสามารถส่งออกไปแข่งขันในตลาดโลกได้

โรคไวรัสระบบทางเดินหายใจของสุกร พบเป็นสาเหตุซึ่งทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงสุกร การป้องกัน ควบคุม และกำจัดโรคจะประสบความสำเร็จอย่างเป็นรูปธรรม สามารถจัดระบบการป้องกันและควบคุมโรคได้ชัดเจน และเกิดประโยชน์สูงสุด จำเป็นอย่างยิ่งที่เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ สัตวบาล เกษตรกร และผู้ที่เกี่ยวข้องต้องมีความเข้าใจเรื่องโรค สาเหตุของโรค การแพร่ระบาด อาการ รอยโรค การป้องกันและควบคุมโรค รวมทั้งการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ได้ผลถูกต้องและรวดเร็ว ผู้เขียนได้รวบรวมข้อมูลทางวิชาการดังกล่าวทั้งในประเทศ และต่างประเทศที่เป็นปัจจุบัน เพื่อเป็นข้อมูลให้เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ ปศุสัตว์ นักวิชาการ นักศึกษา เกษตรกร และผู้สนใจ นำไปใช้ประโยชน์อ้างอิง และเป็นแนวทางในการป้องกันและควบคุมโรค

ผู้เขียนขอขอบคุณ สพ.ญ. วาสนา ภิญโญชนม์ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในการเขียนหนังสือเล่มนี้ขอขอบคุณสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มไวรัสวิทยา และเจ้าหน้าที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ช่วยเหลืองานวิจัย รวมทั้งนักวิจัยที่ปรากฏในหนังสือเล่มนี้จนทำให้หนังสือเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 ความสำคัญของโรคไวรัสระบบทางเดินหายใจในสุกร และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ	1
บทที่ 2 โรคพาร์อาร์เอส	
ระบาดวิทยาของโรค	5
สาเหตุของโรค	5
การติดต่อของโรค	7
พยาธิกำเนิด	8
อาการ	8
รอยโรค	10
การวินิจฉัยโรค	11
การป้องกันและการควบคุมโรค	12
บรรณานุกรม	15
บทที่ 3 โรคไข้หวัดใหญ่สุกร	
ระบาดวิทยาของโรค	17
สาเหตุของโรค	18
การติดต่อของโรค	21
พยาธิกำเนิด	23
อาการ	23
รอยโรค	24
การวินิจฉัยโรค	25
การป้องกันและควบคุมโรค	25
บรรณานุกรม	26
บทที่ 4 โรคไข้มองอักเสบนีปาห์	
ระบาดวิทยาของโรค	29
สาเหตุของโรค	30
การติดต่อและพยาธิกำเนิด	31
อาการ	31
รอยโรค	33
การวินิจฉัยโรค	35

	หน้า
การควบคุมและป้องกันโรค	36
บรรณานุกรม	36
บทที่ 5 การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสระบบทางเดินหายใจในสุกรทางห้องปฏิบัติการ	
การตรวจวินิจฉัยโรคพาร์อาร์เอส	40
การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่สุกร	57
การตรวจวินิจฉัยโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์	69
บรรณานุกรม	78

ความสำคัญของโรคไวรัสระบบทางเดินหายใจในสุกร และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

โรคระบบทางเดินหายใจในสุกรที่เกิดจากเชื้อไวรัส เป็นโรคที่มีผลกระทบ และเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกร โรคที่สำคัญและทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ได้แก่ โรคพอร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza) และโรคใช้สมองอักเสบนิปาห์ (Nipah virus infection) เป็นต้น

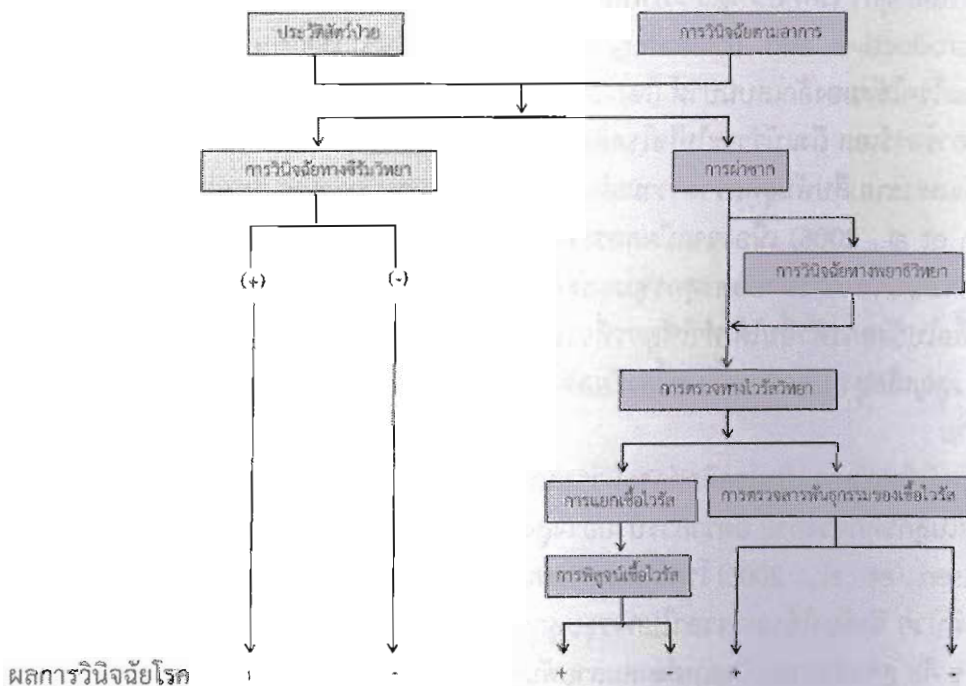
โรคพอร์อาร์เอส ถึงแม้ว่าจะไม่ใช่โรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน แต่เป็นโรคที่มีผลกระทบต่อระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ที่สร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก (Zimmerman et al., 2006) เนื่องจากมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิตสุกรโดยตรง เช่น การตายของลูกสุกรอนุบาล การตายของสุกรขุนและการแท้งของแม่สุกร สุกรที่หายจากอาการป่วยสามารถแพร่เชื้อไปยังสุกรตัวอื่นได้ ทำให้สุกรที่จะเข้ามาร่วมฝูงใหม่ที่ไม่ภูมิคุ้มกันสามารถติดเชื้อและมีอัตราการสูญเสียสูง นอกจากนี้โรคนี้ยังมีผลต่อการกักตุนภูมิคุ้มกัน ทำให้สัตว์อ่อนแอติดเชื้ออื่นๆ แทรกซ้อนได้ง่าย

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน ทำให้เกิดอาการระบบทางเดินหายใจชนิดเฉียบพลันในสุกรทุกช่วงอายุ อัตราการป่วยอาจสูงถึง 100% มักไม่พบการตายถ้าไม่มีการติดเชื้อแทรกซ้อน (Olsen et al., 2006) โรคนี้มีผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ เนื่องจากทำให้สุกรสูญเสียน้ำหนักในช่วงที่ป่วย จึงต้องใช้ระยะเวลาในการขุนสุกรนานขึ้น และประการสำคัญโรคนี้มีผลกระทบด้านสาธารณสุข คือ สุกรสามารถเป็นแหล่งผสมสายพันธุ์เชื้อไวรัสได้ เนื่องจากมีตัวรับเชื้อไวรัสทั้งจากคนและสัตว์ปีก ทำให้เชื้อไข้หวัดใหญ่มีโอกาสแลกเปลี่ยนยีน ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ ทำให้เกิดการระบาดใหญ่ในคนได้

โรคใช้สมองอักเสบนิปาห์ เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่ร้ายแรง มีผลกระทบต่อระบบทางเดินหายใจและระบบประสาท (Kirkland and Stephano, 2006) หากเกิดการระบาดในสุกรจะทำให้เกิดการสูญเสียอย่างมากทั้งในอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรและด้านสาธารณสุข

โรคทั้งสามยังไม่มียารักษาโดยเฉพาะ ดังนั้นจึงควรเตรียมมาตรการในการป้องกันโรค โดยมีการจัดการด้านสุขาภิบาลที่ดี การให้ความเข้มงวดในมาตรการความปลอดภัยทางชีวภาพ และการตรวจวินิจฉัยโรคให้ได้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมป้องกันโรค และลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงสุกร

การวินิจฉัยโรคเป็นกระบวนการค้นหาสาเหตุของการทำให้เกิดโรค ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากหลายๆ ด้าน เช่น ประวัติการเกิดโรค อาการของโรค การตรวจชันสูตรซากและการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ (รูปที่ 1.1) การวินิจฉัยโรคเบื้องต้น สามารถตรวจดูอาการของสัตว์ป่วย เช่น เบื่ออาหาร หงอย ซึม นอนสุม ขนลุก เดินโซเซ ผิวหนังมีผื่นแดง เป็นจุด หรือ เป็นจ้ำ มีไอ จามหรือมีน้ำมูกร่วมกับข้อมูลอัตราการป่วย หรืออัตราการตาย สามารถเป็นเครื่องบ่งชี้หรือชี้แนะเบื้องต้น แต่การวินิจฉัยด้วยตาเปล่าอาจไม่เพียงพอในการหาสาเหตุที่แท้จริง จำเป็นต้องตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ เพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง นำไปสู่การกำหนดมาตรการที่เหมาะสม ได้แก่ การรักษา ควบคุม ป้องกัน หรือเฝ้าระวังโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น



รูปที่ 1.1 การวินิจฉัยโรคทางไวรัสวิทยา

บรรณานุกรม

Olsen CW, Brown IH, Easterday BC and Van Reeth K. 2006. Swine influenza. In Diseases of Swine (9th edition). BE Straw, JJ Zimmerman, SD Allaire and DJ Taylor, eds. Black well Publishing. p. 469-482.

- Kirkland PD and Stephano A. 2006. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle and Nipha Virus Infection. In Diseases of Swine (9th edition). BE Straw, JJ Zimmerman, SD Allaire and DJ Taylor, eds. Blackwell Publishing. p. 455-468.
- Zimmerman J, Benfield DA, Murtauah MP, Osorio F, Stevenson GW and Torremorell M. 2006. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). In Diseases of Swine (9th edition). BE Straw, JJ Zimmerman, SD Allaire and DJ Taylor, eds. Blackwell Publishing. p. 387-418.

โรคพือาร์อาร์เอส

โรคพือาร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) เป็นโรคติดต่อในสุกรมีสาเหตุจากเชื้อไวรัส PRRS ลักษณะของโรคที่สำคัญได้แก่ ระบบสืบพันธุ์ล้มเหลวในแม่สุกร และปัญหาทางระบบหายใจในลูกสุกร พบมีการระบาดและก่อความสูญเสียในอุตสาหกรรมผลิตสุกรทั่วโลก แม่สุกรที่ติดเชื้อมักจะพบปัญหาผสมไม่ติด คลอดลูกกรอกในระยะท้ายของการตั้งท้อง แท้งลูก ลูกตายแรกคลอด ลูกที่รอดชีวิตจะอ่อนแอ และส่วนใหญ่จะตายเนื่องจากมีปัญหาทางระบบหายใจและติดเชื้อแทรกซ้อน

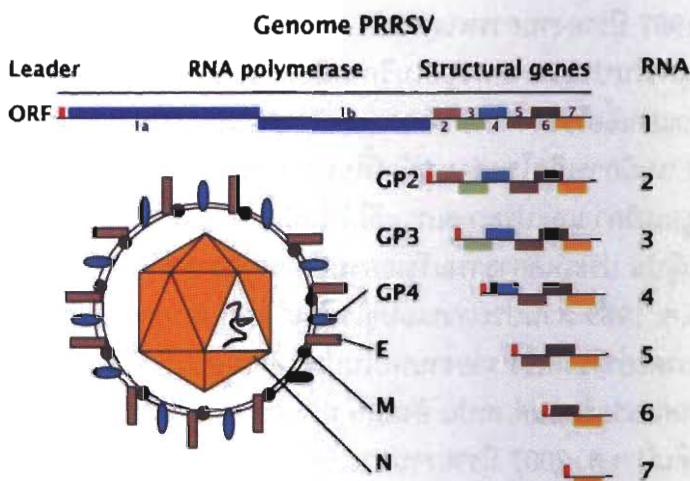
ระบาดวิทยาของโรค

ในปี ค.ศ. 1987 มีรายงานการพบสุกรป่วยด้วยอาการของโรคทางระบบสืบพันธุ์ และระบบทางเดินหายใจในสุกรในประเทศสหรัฐอเมริกา ต่อมาในปี ค.ศ. 1991 นักวิจัยจากประเทศเนเธอร์แลนด์สามารถแยกเชื้อไวรัส PRRS ได้ จากการศึกษาย้อนหลังโดยตรวจจากอาการของโรคและตรวจทางซีรัมวิทยา พบมีการเกิดโรคก่อนหน้านี้ในประเทศต่างๆ เช่น ประเทศแคนาดา ในปี ค.ศ. 1979 ประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศเกาหลีใต้ ในปี ค.ศ. 1985 ประเทศสหภาพโซเวียต ในปี ค.ศ. 1986 ประเทศญี่ปุ่น ประเทศสาธารณรัฐเยอรมนี และประเทศฟิลิปปินส์ ในปี ค.ศ. 1987 และประเทศไทย ในปี ค.ศ. 1989 ส่วนประเทศแถบยุโรปตะวันตก พบสุกรมีกลุ่มอาการแท้งและอาการทางระบบหายใจระบาดอย่างรวดเร็ว รายงานพบในประเทศเยอรมนี ปี ค.ศ. 1990 รวมทั้งมีรายงานการระบาดในประเทศเนเธอร์แลนด์ สเปน อังกฤษ ฝรั่งเศส เบลเยียม และเดนมาร์ก ในช่วงปี ค.ศ. 1991-1992 ในช่วงต้นปี ค.ศ. 2007 มีรายงานการเกิดโรค PRRS ชนิดรุนแรงในประเทศจีน มีสุกรป่วยและตายจำนวนมาก โดยสุกรมีอาการไข้สูงร่วมด้วยจึงเรียกชื่อกลุ่มอาการของโรคที่ระบาดในประเทศจีนว่า swine high fever syndrome และต่อมามีรายงานการระบาดของกลุ่มอาการของโรคดังกล่าวในประเทศเวียดนาม จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ PRRS ที่ระบาดในประเทศจีนและเวียดนาม พบว่าเป็นเชื้อชนิด atypical PRRS ซึ่งมีรหัสพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อชนิด typical PRRS ที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้

สาเหตุของโรค

โรค PRRS มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส ใน Family Arteriviridae Genus Arterivirus สามารถเจริญได้ในเซลล์ macrophage จากปอดสุกร เป็นเชื้อไวรัสชนิด RNA มีเปลือกหุ้ม มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 50-70 nm RNA ของเชื้อ PRRS มีความยาว 15 kb และถูก code ด้วย open reading

frame (ORF) จำนวน 8 ORFs (รูปที่ 2.1) ประกอบด้วย non structural protein-NSP (ORF1 a และ ORF1 b) และ structural protein ประกอบด้วย minor membrane glycoprotein-GP2 (ORF2), membrane glycoprotein-GP3 (ORF3), membrane glycoprotein-GP4 (ORF4), major membrane glycoprotein (envelope glycoprotein)-GP5 (ORF5), membrane associated protein (ORF6) และ nucleocapsid protein (ORF7) สเตรนของเชื้อ PRRS แบ่งทางพันธุกรรมเป็น 2 genotypes ได้แก่ European (EU) genotype หรือ Type I พบในประเทศแถบยุโรป และ North America (NA) genotype หรือ Type II ซึ่งพบในประเทศแถบอเมริกาเหนือ ส่วนประเทศในแถบอเมริกาใต้และเอเชีย พบทั้ง 2 genotypes รวมทั้งประเทศไทย (Thanawongnuwech et al., 2002) เชื้อ atypical PRRS ที่รายงานในประเทศจีนในปี ค.ศ. 2007 มีรหัสพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อ typical PRRS คือ ยีนส่วน NSP2 มี amino acid หายไป 30 ตัว โดยมีการหายไป 1 ตัว บริเวณ conserved lysine ตำแหน่งที่ 482 และ amino acid จำนวน 29 ตัว หายไปที่ตำแหน่ง 534-562 (Tian et al., 2007)



รูปที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

(www.porcilis-prrs.com/microbiology-prrsv-structure.asp.)

เชื้อไวรัสจะถูกขับออกจากสุกรทางน้ำลาย น้ำมูก ปัสสาวะ น้ำนม น้ำเชื้อและมูลสุกร สุกรเป็นสัตว์ที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติ การติดเชื้อในสุกร ครั้งแรกอาจติดมาจากสัตว์ป่า ส่วนสัตว์อื่นๆ ที่เคยมีรายงานการพบเชื้อ PRRS คือ หนู หนูตะเภา รวมทั้ง สุนัข แมว นกกระจอก และเป็ด

การติดตัวของโรค

สุกรติดเชื้อได้หลายทาง เช่น จากการหายใจ การกิน ทางระบบสืบพันธุ์ และการฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อ สุกรจะมีความไวรับต่อเชื้อต่างกันตามช่องทางของการรับเชื้อ เช่น การติดเชื้อโดยการกินและการสูดดม ต้องใช้เชื้อไวรัสถึง $10^{5.3}$ TCID₅₀ (Benfield et al., 2000a) ส่วนการติดเชื้อโดยน้ำเชื้อจะต้องใช้เชื้อ PRRS $10^{4.5}$ TCID₅₀ แต่การฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อใช้เชื้อจำนวนเพียง 20 particles หรือน้อยกว่าก็สามารถทำให้สุกรเป็นโรคได้ (Yoon et al., 1999) โดยรวมแล้วการได้รับเชื้อโดยการฉีดจะมีความไวต่อการเป็นโรคมากกว่าการติดเชื้อโดยวิธีอื่น นอกจากนี้อาจมีการติดเชื้อทางอ้อม เช่น วัตถุสิ่งของเครื่องใช้ เสื้อผ้า รองเท้า น้ำ อาหาร พาหะต่างๆ มีความเป็นไปได้ที่มีการติดเชื้อทางอากาศซึ่งอาจไปได้ไกล 15-30 เมตร

การติดต่อจากแม่สู่ลูก

เชื้อ PRRS สามารถติดต่อจากแม่ที่มีเชื้อในกระแสเลือดผ่านทางสายรกสู่ลูก ทำให้ลูกตายในท้อง หรือลูกรอดชีวิตแต่มีเชื้อในกระแสเลือด ลูกสุกรอาจอ่อนแอ หรือมีอาการผิดปกติ เชื้อไวรัสสามารถติดต่อไปยังลูกขณะตั้งท้องได้ 14 วัน หรือมากกว่า แต่โดยปกติเชื้อจะผ่านจากแม่สู่ลูกได้ดีในระยะท้ายของการตั้งท้อง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ PRRS ทั้งชนิดรุนแรงสูง และรุนแรงต่ำสามารถผ่านรกได้ในระยะตั้งท้อง 90 วัน (Park et al., 1996)

การติดเชื้อแบบแฝง

เชื้อไวรัส PRRS อาจทำให้เกิดโรคแบบเรื้อรัง และแฝงตัวอยู่ในสุกร เชื้อจะเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่ไวรับต่อเชื้อ โดยสุกรไม่แสดงอาการของโรคแต่จะเป็นพาหะของโรคนานหลายเดือน จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้โรคแพร่ระบาด มีรายงานการศึกษาการคงอยู่ของเชื้อในสุกรโดยการฉีดเชื้อ PRRS เข้ามดลูกขณะตั้งท้อง 90 วันพบว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสจากต่อมน้ำเหลืองและต่อมทอนซิลได้นาน 132 วัน หลังคลอด (Benfield et al., 2000b) สุกรทุกอายุสามารถติดเชื้อชนิดแฝงได้ โดยมีรายงานพบในลูกสุกรขณะอยู่ในท้อง หรือสุกรอายุน้อยหรือโตเต็มที่

ความคงทนของเชื้อไวรัส

เชื้อ PRRS จะถูกขับออกมากับน้ำลาย ปัสสาวะและมูลสุกร ทำให้เชื้อปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและติดต่อผ่านสิ่งของเครื่องใช้ในฟาร์ม เชื้อ PRRS มีความเปราะบาง ถูกทำลายด้วยความร้อนและแห้ง สามารถมีชีวิตที่อุณหภูมิ -20°C และ -70°C นานเป็นเดือนหรือเป็นปี ในของเหลวที่อุณหภูมิ $20-21^{\circ}\text{C}$ นาน 1-6 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3-24 ชั่วโมง ที่ 56°C นาน 6-20 นาที เชื้อ PRRS คงทนได้ดีที่ pH 6.5-7.5 แต่จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วที่ pH ต่ำกว่า 6.0 และสูงกว่า 7.5 สารละลายไขมัน เช่น คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ และผงซักฟอกที่เจือจางสามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ โดยทำให้เปลือกหุ้มเชื้อไวรัสแตกออก นอกจากนี้เชื้อยังไม่ทนต่อความแห้ง เชื้อ PRRS จะถูกทำลายได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ 0.03% chlorine นาน 10 นาที 0.0075% iodine 1 นาที และ 0.0063% quarternary ammonium compound 1 นาที

พยาธิกำเนิด

หลังสุกรได้รับเชื้อ PRRS เชื้อจะแบ่งตัวในเซลล์ macrophage ที่อยู่บริเวณใกล้เคียง แล้วแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองอย่างรวดเร็วไปสู่ปอดและเนื้อเยื่ออื่นๆ เชื้อ PRRS ชนิดรุนแรงจะเข้าสู่กระแสเลือดภายในเวลา 12-24 ชั่วโมง และพบเชื้อปริมาณสูงสุดในวันที่ 7-14 หลังได้รับเชื้อ โดยจะพบไวรัสสูงถึง 10^2 - 10^5 TCID₅₀ ต่อซีรัม 1 มล. หรือต่อเนื้อเยื่อ 1 กรัม และพบเชื้อจำนวนมากที่สุดในปอด (Duan et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบเชื้อไวรัสใน macrophage ที่อยู่ในเส้นเลือด หรือนอกเส้นเลือดบริเวณหัวใจและไต บางครั้งพบที่เยื่อหุ้มถุงลม หลอดลม รวมทั้ง endothelium fibroblast และ spermatocyte เมื่อเชื้อเพิ่มจำนวนสูงสุดในซีรัมแล้วปริมาณไวรัสจะลดลงอย่างรวดเร็ว สุกรส่วนใหญ่จะตรวจไม่พบเชื้อในเลือดในวันที่ 28 หลังได้รับเชื้อ แต่มีรายงานการตรวจโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) พบเชื้อได้นาน 251 วัน หลังได้รับเชื้อ อาจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดได้นานในลูกสุกรที่ได้รับเชื้อขณะอยู่ในท้อง ซึ่งพบได้นานถึง 48 วัน หลังคลอด และการตรวจด้วยวิธี PCR พบได้นานถึง 228 วัน ไม่ว่าจะติดเชื้อขณะอยู่ในท้องหรือติดเชื้อหลังคลอด เชื้อไวรัสจะคงอยู่ระยะหนึ่งในต่อมทอนซิล และต่อมน้ำเหลือง โดยเฉพาะ inguinal และ sternal lymphnodes (Xiao et al., 2004) ซึ่งสามารถตรวจพบได้โดยการแยกเชื้อนาน 132-157 วันหลังได้รับเชื้อ

อาการ

สุกรที่ติดเชื้อ PRRS มีอาการไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสเตรนของเชื้อ ภูมิคุ้มกันของสุกร ความไวต่อการรับเชื้อของสุกร การเคยสัมผัสเชื้อมาก่อน รวมทั้งปัจจัยการจัดการดูแล อาการที่พบในขั้นต้นได้แก่ การพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดในสุกรบางตัว และการติดเชื้อผ่านสายรกทำให้ระบบสืบพันธุ์ล้มเหลวในแม่สุกร (Terpstra et al., 1991) สุกรที่ไม่มีภูมิคุ้มโรค จะติดเชื้อและเป็นโรคทุกอายุ โดยเฉพาะในสุกรอนุบาล และสุกรรุ่นที่ภูมิคุ้มกันจากแม่หมดลง หรือในสุกรทดแทน

ในระยะแรกของการระบาดของโรคจะพบสุกรทุกอายุแสดงอาการเบื่ออาหารและไม่มีแรง มีภาวะการติดเชื้อไวรัสในเลือดแบบเฉียบพลัน ระยะนี้จะใช้เวลานาน 2-3 สัปดาห์ ระยะที่สองจะพบปัญหาในระบบสืบพันธุ์ล้มเหลวในแม่สุกร ซึ่งจะพบในแม่สาวเป็นอันดับแรก โดยจะพบเชื้อในกระแสเลือดในระยะไตรมาสที่สามของการตั้งท้อง พบอัตราการตายของสุกรก่อนหย่านมสูง ระยะต่อมาพบปัญหาทางระบบสืบพันธุ์และการตายของลูกสุกรก่อนหย่านมลดลง ซึ่งระยะดังกล่าวเชื้อไวรัสได้แพร่กระจายไปทั่วฟาร์มแล้ว

สุกรแม่พันธุ์

แม่สุกรที่ตั้งท้องในระยะแรกที่ 21-109 วัน จะสูญเสียลูก 1-3% มีอัตราการแท้งลูกสูง หรือพบการกลับสัดและไม่ตั้งท้อง อาจพบอัตราการตาย 1-4% ในแม่สุกรที่ป่วยเฉียบพลัน บางครั้งพบอาการปอดบวม กระเพาะปัสสาวะและไตอักเสบ บางรายที่เป็นโรครุนแรงเฉียบพลัน ทำให้เกิดการ

แท้งลูก 10-50% และอัตราการตายอาจถึง 10% โดยแม่สุกรแสดงอาการทางประสาท เช่น เดินเซ เดินเป็นวงกลม หรือขาหลังเป็นอัมพาต การติดเชื้อในช่วงท้องระยะท้ายที่ 100-118 วัน จะทำให้เกิดการแท้ง ลูกที่คลอดออกมาจะมีลักษณะต่างๆ บางตัวอาจปกติ บางตัวอ่อนแอ และมีขนาดต่างๆ กัน และอาจพบลูกตายแรกคลอด หรือลูกกรอก

สุกรพ่อพันธุ์

สุกรพ่อพันธุ์ในระยะป่วยเฉียบพลันจะมีอาการเบื่ออาหาร เชื่องซึม มีอาการทางระบบหายใจ และคุณภาพอสุจิลดลง หลังได้รับเชื้อ PRRS 2-10 สัปดาห์จะมีการเปลี่ยนแปลงของอสุจิโดยพบการเคลื่อนไหวลดลง โคโรโมโซมผิดปกติ เชื้อไวรัสสามารถขับออกทางอสุจิทำให้เกิดการติดเชื้อโดยการผสมพันธุ์

สุกรระยะคนม

ลูกสุกรที่เกิดจากแม่สุกรติดเชื้อ PRRS จะพบอัตราการตายสูงในช่วงก่อนหย่านม ลูกสุกรที่คลอดตามกำหนด หรือคลอดก่อนกำหนดจะพบแสดงอาการกระวนกระวาย ผอม แคระแกร็น ขาถ่าง หายใจหอบและหายใจขัด (รูปที่ 2.2) แต่ไม่ค่อยพบอาการสั่น หรือตะกุกตะกาย



รูปที่ 2.2 ลูกสุกรติดเชื้อพาร์อาร์เอส แสดงอาการหายใจหอบ

สุกรหย่านมและสุกรรุ่น

สุกรหย่านมและสุกรรุ่นที่เป็นโรคแบบเฉียบพลัน จะมีอาการเบื่ออาหาร เชื่องซึม ผิวหนังแดง หายใจระแวก แต่ไม่มีอาการไอ ขนหยาบ น้ำหนักที่เพิ่มต่อวันลดลง และพบแบคทีเรียแทรกซ้อนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งได้แก่ *Streptococci suis* ที่ทำให้เกิดสมองอักเสบ โลหิตเป็นพิษจากเชื้อ *Salmonella* และโรค Glasser's disease จากเชื้อแบคทีเรีย *Haemophilus parasuis* ทำให้ปอดและหลอดลมอักเสบ

รอยโรค

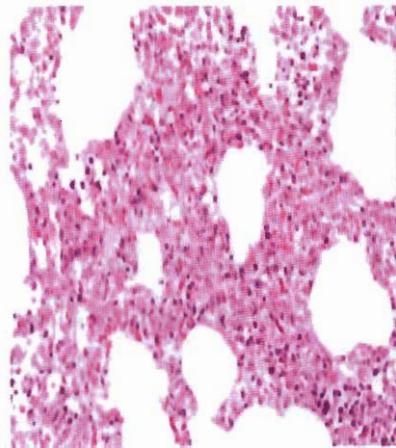
รอยโรคภายนอก

รอยโรคที่พบได้แก่ interstitial pneumonia (รูปที่ 2.3) ต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ ซึ่งจะพบในสุกรทุกอายุ อย่างไรก็ตามโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส หรือเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ อาจทำให้เกิดรอยโรคที่คล้ายกัน จึงต้องยืนยันผลการตรวจพบเชื้อไวรัส ส่วนความรุนแรงและการกระจายของรอยโรคขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสเตรนของเชื้อไวรัส

รอยโรคในลูกสุกรที่ได้รับเชื้อขณะอยู่ในท้อง ในกรณีที่คลอดเมื่อท้องประมาณ 100 วัน แต่คลอดก่อนกำหนด จะพบลักษณะต่างๆ กัน เช่น ลักษณะปกติ ลูกขนาดเล็กกว่าปกติ หรือขนาดปกติ แต่อ่อนแอ ส่วนลูกที่ตายอาจพบลักษณะการดูดซึมกลับ หรือเป็นลูกกรอก รอยโรคของลูกอ่อนและลูกตายแรกคลอดไม่สามารถบ่งชี้ลักษณะจำเพาะของโรค แต่ในกรณีลูกที่คลอดออกมาและยังมีชีวิต แต่ตายหลังคลอด 2-3 วัน เมื่อทำการผ่าซากจะพบรอยโรค การบวมน้ำของเนื้อเยื่อ การบวมของเยื่อพังผืดของม้าม การบวมบริเวณลำไส้ ท้องมาน มีน้ำในช่องอก น้ำในช่องท้อง (Lager and Halbur, 1996)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา จะพบลักษณะดังนี้

ปอด	- interstitial pneumomia
ต่อมธัยมัส ม้าม และ ลำไส้ (Peyer's patch)	- lymphoid depletion, necrosis และ hyperplasia
หัวใจ	- perivascular myocarditis
สมอง	- encephalitis
ไต	- periglomerular และ peritubular lymphohistocyte aggregation
มดลูก	- myometrium และ endometrium มีลักษณะบวม และมี lymphohistiocytic perivascular cuffs
อัณฑะ	- seminiferous tubule ฝ่อ



รูปที่ 2.3 ปอดสุกรติดเชื้อพาร์อาร์เอส พบรอยโรค interstitial pneumonia

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยโรคต้องอาศัยข้อมูลทางด้านประวัติ อาการ รอยโรคทั้งรอยโรคที่ดูด้วยตาเปล่า และทางจุลพยาธิวิทยา รวมทั้งข้อมูลด้านการผลิตสุกรของฟาร์ม ข้อมูลการตรวจทางซีรัมและการตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งอาจเป็นข้อมูลสำหรับการวินิจฉัยเบื้องต้น เช่นในกรณีที่พบปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ในสุกรทุกอายุ มีอัตราการแท้งมากขึ้น คลอดก่อนกำหนด มีสุกรตายแรกคลอด และพบอัตราตายสูงในลูกสุกรหย่านม อาการดังกล่าว อาจคล้ายคลึงกับโรคที่ทำให้พบการแท้งลูก หรือระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว เช่น โรค porcine parvovirus, Aujeszky's disease, haemagglutination encephalomyelitis virus, porcine circovirus type II, swine influenza, classical swine fever, porcine cytomegalovirus และ leptospirosis ในกรณีที่มีโรคแทรกซ้อนร่วมด้วยจะทำให้การวินิจฉัยโรคทำได้ยากขึ้น ดังนั้นควรมีการวินิจฉัยยืนยันการตรวจหาเชื้อไวรัส และแอนติบอดีทางห้องปฏิบัติการ

ประเทศไทยมีรายงานการสำรวจสถานะของโรค PRRS ทางซีรัมวิทยา (Oraveerakul et al., 1995; Damrongwatanapokin et al., 1996) และสามารถแยกเชื้อไวรัสได้ในครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1996 (Damrongwatanapokin et al., 1996) โดยแยกเชื้อได้จาก ซีรัมและตัวอย่างอวัยวะลูกสุกรป่วยที่มีอาการหายใจลำบาก ผลการศึกษาคุณลักษณะของเชื้อไวรัสทางพันธุกรรม พบว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์อเมริกา (North American, NA) หลังจากนั้นได้มีรายงานการระบาดของโรคประปรายเรื่อยมา จากการศึกษาย้อนหลังโดยตรวจแอนติบอดีจากซีรัมสุกรนำเข้า และซีรัมสุกรที่ส่งตรวจห้องปฏิบัติการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างปี ค.ศ. 1988-1996 พบซีรัมที่ให้ผลบวก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1989 และพบซีรัมที่ให้ผลบวกในปี 1991 เป็นสุกรนำเข้าจากประเทศเบลเยียม และประเทศอังกฤษ

การพิจารณาการใช้วิธีวินิจฉัยโรคในระบบการเฝ้าระวังโรค

การเฝ้าระวังโรคระดับฟาร์มโดยปกติใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีคัดกรองและใช้วิธี PCR, immunofluorescent antibody technique (IFA) หรือ blocking ELISA ในการพิสูจน์ยืนยันในกรณีที่ให้ผลสงสัย

การป้องกันและควบคุมโรค

การจัดโปรแกรมการควบคุมโรคจะช่วยป้องกันเชื้อจากภายนอก หรือเชื้อสเตรนใหม่เข้าสู่ฟาร์ม มีความเชื่อว่าการแพร่ระบาดเริ่มแรกของเชื้อ PRRS เกิดจากการใช้น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัส แต่จากการวิเคราะห์ข้อมูลการระบาดของโรคในฟาร์มสุกรที่เลี้ยงแบบอุตสาหกรรมในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าการระบาดของโรคเกิดจากการแพร่เชื้อจากฟาร์มข้างเคียง การเคลื่อนย้ายสุกรที่มีการติดเชื้อมา การติดต่อจากแม่ลงที่เป็นพาหะตลอดจนการจัดการความปลอดภัยทางชีวภาพไม่ดีพอ

การป้องกันและควบคุมโรคที่ได้ผลดีควรมีมาตรการดังนี้

- ที่ตั้งฟาร์มควรอยู่ในบริเวณที่แยก ห่างไกลจากฟาร์มอื่น
- มีการควบคุมการเคลื่อนย้ายสุกรและสิ่งของเครื่องใช้ผ่านเข้าออกฟาร์ม
- สิ่งของเครื่องใช้ควรทำความสะอาดฆ่าเชื้อและทำให้แห้ง เนื่องจากเชื้อ PRRS เจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ชุ่มชื้นและเย็น
- มีการป้องกันสัตว์เลี้ยง นก หนู และแมลงไม่ให้เข้ามาในโรงเรือน
- สุกรทดแทนควรมาจากฝูงที่ไม่มีการระบาดของโรคซึ่งได้รับการตรวจรับรองมาแล้ว มีการกักกันก่อนนำเข้ารวมฝูงอย่างน้อย 30 วัน และมีการทดสอบอีกครั้งก่อนนำเข้ารวมฝูง
- น้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียมต้องมาจากพ่อพันธุ์ที่ปลอดโรค แนะนำให้ตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR ในสุกรพ่อพันธุ์ก่อนนำน้ำเชื้อไปใช้ซึ่งสามารถตรวจการติดเชื้อในระยะเริ่มแรกได้

กรณีฟาร์มปลอดโรค สุกรที่จะนำมารวมฝูงควรมาจากฟาร์มสุกรที่ปลอดโรค PRRS ส่วนในฟาร์มที่มีโรคนี้อยู่แล้วก็ไม่ควรนำเชื้อสายพันธุ์ใหม่เข้าสู่ฟาร์ม ควรลดการกระจายของโรคในระยะต่างๆ จนกระทั่งสามารถกำจัดโรคออกจากฝูง ฝูงสุกรที่มีโรคอยู่ในฟาร์มจะตรวจพบเชื้อไวรัสและแอนติบอดีในสุกรที่ระยะต่างๆ ของการผลิสุกร ควรนำสุกรทดแทนที่เคยได้รับเชื้อและสร้างแอนติบอดีจากสายพันธุ์ที่มีในฝูงมาเข้ารวมฝูง เพื่อให้สุกรระยะหย่านมปลอดจากโรค การนำสุกรสาวทดแทนที่ไม่มีแอนติบอดีต่อโรคเข้ามารวมฝูงจะมีความเสี่ยงในระยะอู้มท้อง และต่อลูกระยะหย่านม ควรนำสุกรสาวที่จะมาทดแทนมาเลี้ยงร่วมกับแม่สุกรที่เป็นโรคเพื่อให้สุกรทดแทนติดเชื้อขณะอายุ 2-4 เดือน เนื่องจากระยะการได้รับเชื้อ และการสร้างแอนติบอดีเป็นระยะที่เหมาะสมก่อนนำเข้ารวมฝูงที่มีการระบาดของโรค นอกจากนั้นยังมีการแนะนำให้สุกรสาวฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็นหรือเชื้อตาย การฉีดวัคซีนเชื้อเป็นทำให้สุกรสร้าง active immunity ซึ่งเป็นวิธีที่มั่นใจได้ว่าสุกรจะสร้างแอนติบอดีได้ ข้อจำกัดของวัคซีน ได้แก่ ข้อจำกัดในการสร้างภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ ซึ่งขึ้นอยู่กับสเตรนของเชื้อ

ไวรัสที่ใช้ทำวัคซีนและสเตรนของเชื้อที่ระบาด สุกรที่อยู่ในโรงเรือนเดียวกันควรมีการฉีดวัคซีนเชื้อเป็นในครั้งเดียวกัน ส่วนวัคซีนเชื้อตายอาจใช้เสริมให้กับสุกรสาวทดแทนที่นำมาเลี้ยงรวมกับสุกรป่วยหรือแม่สุกรสาวที่ฉีดวัคซีนเชื้อเป็นแล้ว การกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโดยใช้ซีรัมสุกรที่ติดเชื้อในฟาร์มจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคโดยตรง หากใช้วัคซีนที่จำหน่ายในท้องตลาด เชื้อไวรัสวัคซีนที่ใช้ผลิตวัคซีนอาจมี antigenicity ที่แตกต่างจากเชื้อไวรัสที่มีการระบาดอยู่ในฟาร์มและอาจทำให้การสร้างแอนติบอดีไม่เพียงพอที่จะป้องกันเชื้อสายพันธุ์ที่ระบาดได้ แต่การสร้างภูมิคุ้มกันโดยใช้ซีรัมสุกรในฟาร์มเป็นวิธีที่มีความเสี่ยง ต้องมีการพิจารณาให้รอบคอบเนื่องจากอาจมีเชื้ออื่นปนเปื้อน รวมทั้งต้องมีการควบคุมโรคที่ได้มาตรฐานและมีระบบการจัดการความปลอดภัยทางชีวภาพที่ดี

การควบคุมโรค PRRS ที่เป็นแบบเรื้อรังในสุกรหย่านมเป็นงานที่ทำหายของสัตวแพทย์ที่ดูแลฟาร์ม การระบาดของโรคในสุกรอนุบาลและสุกรขุน เกิดจากการระบาดของสุกรหย่านมที่ได้รับเชื้อจากสุกรที่โตกว่าหรือติดเชื้อจากสุกรเป็นโรค การคัดทิ้งสุกรบางส่วน (partial depopulation) เป็นวิธีควบคุมโรคที่ต้องพิจารณาปรับเปลี่ยนตามสภาวะของโรคในการเลี้ยงสุกรแบบต่อเนื่อง (continuous flow) และเป็นการป้องกันการแพร่เชื้อสู่ฝูงที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ผลการควบคุมโรคโดยวิธีนี้พบว่า สุกรอนุบาลจะมีการเจริญเติบโตต่อวันสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และอัตราการตายลดลง แต่ก็มีข้อจำกัด เช่น การขนย้ายสุกรอนุบาลจำนวนมากซึ่งอาจต้องทำเป็นระยะๆ วิธีควบคุมโรคโดยการฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็นในสุกรขุนและสุกรที่มาจากแหล่งอื่น นำมาใช้กับฟาร์มขนาดใหญ่ที่เลี้ยงแบบอุตสาหกรรมที่ไม่สามารถคัดทิ้งสุกรได้ในครั้งเดียว การควบคุมโรค PRRS ในฝูงสุกรหย่านมควรควบคุมโรคที่เกิดร่วมกับ PRRS ด้วย เช่น *Haemophilus parasuis* และ *Streptococcus suis* เป็นต้น การใช้วัคซีนและการรักษาที่เหมาะสม ควรนำมาพิจารณาใช้ในการระบาดแต่ละครั้ง

ในกรณีเกิดโรคแบบเฉียบพลันในฝูงสุกรดูดนม ต้องมีมาตรการในการจัดการเป็นลำดับ เช่น การจำกัดการเคลื่อนย้ายลูกสุกรอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ทำลายสุกรระยะดูดนมจนถึงหย่านมที่เป็นโรคแบบเรื้อรัง และมีมาตรการแบบจัดเลี้ยงสุกรเป็นชุด เข้าเลี้ยงพร้อมกันและออกพร้อมกัน (all-in/all-out)

การกำจัดโรค

การกำจัดเชื้อไวรัส PRRS ออกจากฝูงเป็นวิธีกำจัดโรควิธีหนึ่ง การคัดทิ้งสุกรทั้งหมด และนำมาเลี้ยงใหม่ (depopulation/repopulation) การคัดทิ้งสุกรบางส่วน การแยกสุกรหย่านมเร็วขึ้น การตรวจโรคและคัดทิ้งสุกรที่เป็นโรค รวมทั้งการปิดฟาร์ม การกำจัดเชื้อจากฟาร์มโดยการปิดฟาร์ม ระยะเวลาที่ใช้ในการปิดฟาร์มจะนานประมาณ 6 เดือน การกำจัดเชื้อโดยการคัดทิ้งตัวที่ให้ผลบวกจากการตรวจหาเชื้อไวรัส และแอนติบอดี เป็นวิธีที่ให้ผลดี ฝูงสุกรที่จะใช้วิธีนี้ต้องเป็นฝูงสุกรที่มีการผลิตแบบคัดแยก และไม่พบอาการของโรคในระยะ 12 เดือน ที่ผ่านมา และควรเป็นฝูงที่มีความชุกของโรคไม่

เกิน 25% การกำจัดเชื้อ PRRS จากฝูงสุกรพันธุ์จะประสบผลสำเร็จได้ต้องนำสุกรทดแทนที่ปลอดเชื้อ PRRS เข้ามาในฟาร์มในขณะที่ฟาร์มไม่มีเชื้อไวรัสหลงเหลืออยู่ โดยมีการพิสูจน์ว่าไม่มีเชื้อหมุนเวียนอยู่ในฝูงสุกรพันธุ์ หรือในฝูงสุกรที่มีการติดเชื้อแฝงอยู่ แผนการกำจัดเชื้อที่ได้ผลดี ต้องมีระบบการจัดการด้านความปลอดภัยทางชีวภาพที่ดีเพื่อป้องกันการอุบัติใหม่ของโรคในฟาร์ม

การคัดทิ้งสุกรทั้งฝูงและนำมาเลี้ยงใหม่ เป็นวิธีการที่ประสบความสำเร็จสูงแต่เป็นวิธีที่แพงและอาจนำมาใช้ในกรณีที่มิโรคอื่นร่วมด้วย วิธีนี้อาจเป็นวิธีเลือกใช้เฉพาะในฟาร์มที่มีการเลี้ยงสุกรตั้งแต่เกิดจนกระทั่งขายที่มีการติดเชื้อในฝูงสุกรขุนและไม่สามารถกำจัดเชื้อจากฝูงได้โดยวิธีอื่น วิธีนี้เหมาะสำหรับฟาร์มสุกรขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามถ้านำไปใช้ในฟาร์มขนาดใหญ่ (>500 แม่) ต้องใช้วิธีอื่นเสริม เช่น การปิดฟาร์ม การตรวจ และคัดทิ้งตัวที่ให้ผลบวก เพื่อกำจัดเชื้อออกจากฝูงสุกรพันธุ์ ก่อนที่จะมีการกำจัดโรคในสุกรที่เลี้ยงหมุนเวียนในฟาร์ม นอกจากนี้ยังใช้วิธีคัดแยกสุกรที่หย่านมให้เร็วเพื่อสร้างสุกรปลอดเชื้อ PRRS ที่ปลอดจากแม่สุกรติดเชื้อ ลูกสุกรแต่ละรุ่นจากแม่เหล่านี้ อาจให้ผลการปลอดโรคที่ไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาของเชื้อไวรัสในฝูงสุกร การใช้เทคนิค all-in/all-out ในการคัดแยกสุกรหย่านมแต่ละรุ่น เป็นเทคนิคที่ใช้ได้ผลดี

วัคซีน

มีการผลิตวัคซีนทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายสำหรับป้องกันโรค ซึ่งขึ้นอยู่กับภูมิภาคของประเทศที่เกิดโรค วัคซีนเชื้อเป็นสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ดีกว่าวัคซีนชนิดเชื้อตาย ถึงแม้ว่าวัคซีนชนิดเชื้อเป็นอาจไม่ปลอดภัย วัคซีนชนิดเชื้อตายโดยทั่วไปจะมีประสิทธิภาพต่ำเมื่อใช้ในสุกรปลอดโรคที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน แต่เมื่อใช้ร่วมกับสุกรในฟาร์มที่เคยเกิดโรค หรือสุกรที่ฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็นมาแล้วจะทำให้สุกรสร้าง neutralizing antibody ได้สูงกว่าการใช้วัคซีนเชื้อตายอย่างเดียว การฉีดวัคซีนในท้องที่อาจให้ประสิทธิผลที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีนที่มีจำหน่ายในภูมินาณั้นๆ และวิธีการใช้วัคซีน เช่น เชื้อไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน มีความแตกต่างจากเชื้อไวรัสที่มีอยู่ในท้องที่ ทำให้วัคซีนไม่สามารถกระตุ้นให้สุกรสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสในท้องที่ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อไวรัสวัคซีนที่ทำให้อ่อนกำลังลง (attenuate) เมื่อนำไปฉีดให้สุกรอาจกลายพันธุ์ทำให้เกิดความรุนแรงได้ (Nielsen et al., 2001) ซึ่งทำให้มีการแพร่ระบาดของเชื้อ เกิดการติดเชื้อแบบแฝง มีการติดเชื้อผ่านสายรก การติดเชื้อขณะท้อง การขับเชื้อออกทางน้ำเชื้อ รวมทั้งระยะ เวลาตั้งแต่ฉีดวัคซีนจนกระทั่งให้ความคุ้มโรคกินเวลานาน ดังนั้นในการผลิตวัคซีนต้องมีการวิจัยเกี่ยวกับความปลอดภัย และประสิทธิภาพของวัคซีน เพื่อทำให้ผู้ใช้เกิดความมั่นใจที่จะนำวัคซีนไปใช้ในการควบคุมโรค

บรรณานุกรม

- Benfield DA, Nelson C, Steffen M, Rowland RR. 2000a. Transmission of PRRSV by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV. Proc Annual Meeting Am Assoc Swine Pract. p. 405-408.
- Benfield D, Nelson J, Rossow K, Nelson C, Steffen M, Rowland R. 2000b. Diagnosis of persistent or prolonged porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections. Vet Res, 31: 71.
- Damrongwatanapokin S, Arsayuth K, Kongkrong C, Parchariyanon S, Pinyochon W and Tantaswasdi U. 1996. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. Thai Vet Med Assoc, 47(2): 19-31.
- Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. 1997. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissue of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet Microbiol, 56: 9-19.
- Lager KM, Halbur PG. 1996. Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Vet Diagn Invest, 81: 1327-1334.
- Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Forsberg R, Stadejek T, Botmer A, Storgaard T. 2001. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutation. J Gen Virol, 82: 1263-1272.
- Oraveerakul K, Punarriwatana D, Luengyosluechakul S, Tuntasuparak W, Kunavongkrit A. 1995. Seroprevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus among swine breeding farms in the central and northeastern part of Thailand. Thai J Vet Med, 25: 233-240.
- Park BK, Yoon IJ, Joo HS. 1996. Pathogenesis of plaque variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant sows. Am J Vet Res, 57: 320-323.
- Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang X, Sun M, Jin P, Wang S, Kitamura Y, Yan J, Gao DF.

2007. Emergence of fetal PRRS variants: Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. PLOS ONE 2 (b): e526. doi: 101371/ Journal. Pone. 0000526.
- Terpstra C, Wensvoort G, Pol JMA. 1991. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. Vet Q, 13: 131-136.
- Thanawongnuwech R, Tatsanakit A, Damrongwatanapokin S, and Thacker E. 2002. Typing of PRRSV isolates in Thailand by a nested multiplex PCR. The 17th Congress of the International Pig Veterinary Society, Ames, Iowa, USA. p. 410.
- Xiao Z, Batista L, Dee S, Halbur P, Murtaugh MP. 2004. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of the virus load. J Virol, 78: 5923-5933.
- Yoon KJ, Zimmerman JJ, Chang CC, Cancel-Tirado S, Harmon KM, McGinley MJ. 1999. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. Vet Res, 30: 629-638.

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza) มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส influenza type A ลักษณะที่สำคัญของโรคคือทำให้เกิดโรคแบบเฉียบพลัน สุกรมีไช่ระยะสั้น เบื่ออาหาร ซึม มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ โดยมีอาการไอ หายใจขัด มีน้ำมูกและปอดบวม อาการดังกล่าวอาจพบอยู่นานหลายสัปดาห์ถ้ามีการระบาดของโรคจากสุกรตัวหนึ่งไปยังตัวอื่นภายในฝูงอย่างต่อเนื่อง และหากมีเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสชนิดอื่นร่วมด้วยจะทำให้เกิดโรคทางระบบทางเดินหายใจซับซ้อนในสุกร ความรุนแรงและระยะเวลาในการเป็นโรคนั้นขึ้นอยู่กับอายุ สุขภาพรวมถึงภูมิคุ้มกันของสุกร สเตรนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคและการติดเชื้อแทรกซ้อน

ระบาดวิทยาของโรค

ในปี ค.ศ. 1918 มีรายงานโรคระบาดในสุกรที่มีอาการและพยาธิสภาพคล้ายกับโรคไข้หวัดใหญ่ในคน ที่ทำให้คนตายประมาณ 20-50 ล้านคน การที่สุกรป่วย และมีการระบาดของโรค ที่คล้ายกับพบโรคไข้หวัดใหญ่ในคนจึงเรียกโรคนี้ว่า flu หรือ Hog flu ต่อมาได้มีการรายงานยืนยันว่าทั้งโรคไข้หวัดใหญ่สุกรและไข้หวัดใหญ่ในคนเกิดจากเชื้อไวรัส ในปี ค.ศ. 1957 มีการระบาดใหญ่ของไข้หวัดใหญ่ในคน และระบาดไปยังประเทศแถบเอเชีย จึงได้มีการสำรวจโรคไข้หวัดใหญ่สุกร และไข้หวัดใหญ่ในคนทางชีววิทยา พบว่า คนที่มีอาชีพที่สัมผัสกับสุกรสามารถติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้ (Olsen et al., 2006) ต่อมา มีรายงานการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้จากสุกรและผู้เลี้ยงสุกร ซึ่งเป็นการยืนยันว่าคนติดเชื้อไวรัสจากสุกร และจากการวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพบว่าเชื้อไวรัสจากคน และสัตว์มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (Taubenberger et al., 2001)

ในเดือนเมษายน ปี ค.ศ. 2009 องค์การอนามัยโลกรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ในคนในประเทศเม็กซิโก หลังจากนั้น มีรายงานการระบาดในสหรัฐอเมริกา และแคนาดาแล้วแพร่กระจายไปสู่ภูมิภาคอื่นๆ ทั่วโลกอย่างรวดเร็ว ซึ่งในรายงานครั้งแรกเรียกโรคไข้หวัดหมู ต่อมาศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคประเทศสหรัฐอเมริกาได้รายงานลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ A (H1N1) 2009 ซึ่งมีสารพันธุกรรมที่มาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ 3 สายพันธุ์ด้วยกัน ได้แก่ เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน เชื้อไข้หวัดนกที่พบในทวีปอเมริกาเหนือ และเชื้อไข้หวัดสุกรที่พบบ่อยในทวีปยุโรปและเอเชีย สาเหตุที่เรียกชื่อโรคว่าโรคไข้หวัดหมู เนื่องจากมีสารพันธุกรรมมาจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร

ในเดือนกรกฎาคม 2009 ประเทศแคนาดารายงานการตายของสุกรและตรวจพบว่าสุกรมีการติดเชื้อไวรัส A (H1N1) 2009 ซึ่งเป็นเชื้อชนิดเดียวกับไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ที่พบระบาดในคน จึงอาจเป็นไปได้ที่สุกรจะติดจากผู้ดูแลฟาร์ม ต่อมามียารายงานการพบเชื้อไวรัส A (H1N1) 2009 ในสุกรในประเทศสหราชอาณาจักร อเมริกา ญี่ปุ่น ไช่แลนด์ จีนและฟินแลนด์ นอกจากการรายงานในสุกรยังมีรายงานในสัตว์อื่นๆ เช่น สัตว์ปีก ferret และแมว ประเทศไทยมียารายงานการพบเชื้อไวรัส A(H1N1)2009 ครั้งแรกในฟาร์มสุกร จังหวัดสระบุรีในเดือนธันวาคม 2553

สาเหตุของโรค

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด RNA ใน Family *Orthomyxoviridae* มีขนาด 80-120 nm มีไขมันเป็นเปลือกหุ้มจึงไม่ทนต่อสารกำจัดคราบสกปรกและน้ำยาฆ่าเชื้อ เชื้อไวรัสประกอบด้วยโปรตีน 11 ชนิด และแบ่งเป็น 8 segments ประกอบด้วย haemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), polymerase B2 (PB2), polymerase B1 (PB1), polymerase A (PA), matrix (M), nucleoprotein (NP) และ nonstructural protein (NS) โครงสร้างที่มีลักษณะเป็น segment ทำให้เชื้อไวรัสมีโอกาสแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่างสายพันธุ์ได้

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ แบ่งเป็น type ตามความแตกต่างของ matrix และ nucleoprotein เช่น type A, B และ C เชื้อไวรัส type A มีความสำคัญที่ทำให้สุกรเป็นโรค ส่วน subtype จะแบ่งตาม hemagglutinin (HA หรือ H) และ neuraminidase (NA หรือ N) ซึ่งเป็น glycoprotein ที่ยื่นออกจากเปลือกหุ้ม (รูปที่ 3.1) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะมี HA และ NA แตกต่างกัน โดย HA แบ่งออกเป็น H1-H16 และ NA แบ่งเป็น N1-N9 ทำให้เชื้อไวรัสมีความแตกต่างด้าน antigenic และ genetic เช่น subtype H1N1, H3N2 เป็นต้น

การจำแนก genotype ทำได้โดยการหาลำดับเบสของแต่ละ segment ของ RNA และนำไปวิเคราะห์ทาง phylogenetic การศึกษาด้าน subtype และ genotype ของเชื้อไวรัสจะทำให้ทราบระบาดวิทยาและวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส แหล่งกำเนิด รวมทั้งทำให้ทราบการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในทวีปต่างๆ

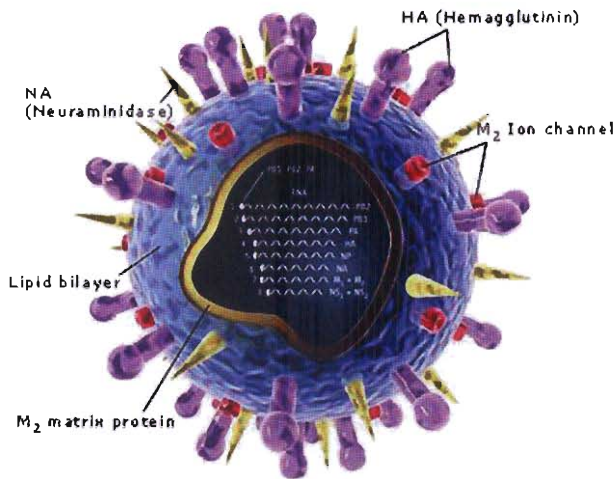


Illustration: Chris Bickel/Science. Reprinted with permission from Science Vol. 312, page 380 (21 April 2006) © 2006 by AAAS

รูปที่ 3.1 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

จากการวิเคราะห์สาเหตุของการระบาดของโรค พบว่าการเคลื่อนย้ายสุกรเป็นสาเหตุหลักของการระบาดของโรค สุกรอาจติดเชื้อโดยการหายใจและการกิน ทำให้มีการแพร่โรคจากตัวป่วยไปยังสุกรปกติได้และจะพบเชื้อไวรัสสูงสุดในวันที่ 2-5 หลังจากที่ได้รับเชื้อ อาจพบไวรัสในน้ำมูกสูงถึง $10^{7.0}$ infected particle/ml (Landolt et al., 2003) เมื่อเชื้อไวรัสแพร่สู่สุกรแล้ว เชื้อไวรัสจะวนเวียนอยู่ในฝูงที่ยังมีสุกรที่ไวต่อการติดเชื้ออยู่ภายในฝูง

การศึกษาทางระบาดวิทยา และวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จำเป็นต้องทราบแหล่งของเชื้อ และระบาดวิทยาของเชื้อในสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น สัตว์น้ำที่เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก คน ม้า และสุกร เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยทำให้สัตว์ป่วยและเป็นโรค ส่วนนกน้ำและนกที่หากินตามชายฝั่ง เชื้อไวรัสจะปรับตัวในสัตว์เหล่านี้และมักไม่ทำให้เกิดโรคและมีอัตราการวิวัฒนาการต่ำ (Wright and Webster, 2001) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ทั้ง 16 HA และ 9 NA subtypes เคยแยกได้จากนกน้ำ โดยเชื้อถูกขับออกมาจากมูลของนก ทำให้เชื้อปนเปื้อนน้ำในทะเลสาบ นกน้ำเหล่านี้จะเป็นตัวนำโรคทำหน้าที่เป็นพาหะและแพร่เชื้อ subtype ชนิดต่างๆ ไปยังพื้นที่ต่างๆ ที่นกสามารถบินไปถึงมีผลทำให้เชื้อมีวิวัฒนาการในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในสุกรมีรายงานพบมากเฉพาะ subtype H1, H3, N1 และ N2 เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร subtype H1N1 พบเป็นสาเหตุหลักของการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรสามารถแยกเชื้อได้ทั้งในสหรัฐอเมริกา ยุโรป และเอเชีย นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อในสุกรป่าและไก่อว

ในประเทศไทยมีรายงานการแยกเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร subtype H1N1 ครั้งแรก โดย Kupradinan et al. (1991) และ Damrongwatanapokin et al. (2006) ได้รายงานสภาวะโรคไข้หวัดใหญ่สุกรระหว่างปี ค.ศ. 2004-2005 โดยพบว่าสุกรส่วนใหญ่ให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาต่อทั้ง subtype H1N1 และ H3N2 และจากตัวอย่างสัตว์ป่วยส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติในปี 2004 และ 2005 พบเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร subtype H1N1, H3N2 และ H1N2 จำนวน 5 ตัวอย่างจาก 24 ตัวอย่าง และ 14 ตัวอย่างจาก 31 ตัวอย่าง ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรจำนวน 12 ตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทยในระหว่างปี ค.ศ. 2000-2005 พบว่าเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้ง 3 subtypes มียีน PB2, PB1, PA และ M มาจากไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก (avian like, AL) (ตารางที่ 3.1) ซึ่ง subtype H1N1 มียีนส่วนใหญ่มาจากไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก H1N1 ยกเว้น ยีน HA และ NS มียีนที่มาจากไข้หวัดใหญ่สุกร (classical swine, CL) เกือบทั้งหมด ส่วน subtype H3N2 มีการแลกเปลี่ยนยีนทั้งระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน (human origin, H) สัตว์ปีกและสุกร โดยยีน HA และ NA มาจาก human origin (H) ยีน PB2, PB1, PA และ M มาจาก ไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก ส่วนยีน NP และ NS มาจากไข้หวัดใหญ่สุกร (Takemae et al., 2008)

ตารางที่ 3.1 RNA ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยระหว่างปี ค.ศ. 2000-2005

Strain	subtype	HA	NA	PB2	PB1	PA	M	NP	NS
Sw/Ratchaburi/NIAH1481/00	H1N1	Cla	ALa	ALa	ALa	ALa	ALa	ALa	ALa
Sw/ Ratchaburi/NIAH550/03									
Sw/Chonburi/NIAH9469/04	H1N1	Clb	-	-	-	ALb	ALb	-	Clb
Sw/Chonburi/NIAH977/04									
Sw/Chonburi/NIAH589/05	H1N1	Clb	-	-	-	ALb	ALb	-	-
Sw/Chachoengsao/NIAH587/05									
Sw/Saraburi/NIAH13021/05	H1N2	Clb	Hb	-	-	-	-	-	Clb
Sw/ Chachoengsao/03	H3N2	Hb	Hb	-	-	-	-	Cla	Cla
Sw/Udon Thani/NIAH464/04	H3N2	Hb	Hb	-	-	-	-	-	-
Sw/Nakhon Pathom/NIAH586-1/05	H3N2	Hb	Hb	-	-	ALb	-	Cla	-
Sw/Ratchaburi/NIAH59/04	H3N2	Ha	Ha	-	-	-	-	-	Cla
Sw/Ratchaburi/NIAH874/05	H3N2	Ha	Ha	-	-	-	-	Cla	Cla

หมายเหตุ: Cl = Classical swine (Cla, Clb), AL = Avian like (ALa, ALb),

H = Human origin (Ha, Hb)

จากลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยโดยเฉพาะ subtype H3N2 Parchariyanon et al. (2008) ได้ศึกษาสภาวะโรคทางซีรัมวิทยาโดยวิธี haemagglutination inhibition (HI) โดยใช้แอนติเจน H1N1 1 ตัวอย่าง (A/Sw/Ratchaburi/

NIAH550/03) และ H3N2 2 ตัวอย่าง (A/Sw/Chachoengsao/03 และ A/Sw/Ratchaburi/NIAH59/04) พบว่า ตัวอย่างซีรัมสุกรจำนวน 1,215 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2550 จาก 10 จังหวัดในเขต 2 และ เขต 7 ให้ผลบวกต่อ subtype H1N1 7.74% และต่อ subtype H3N2 (A/Sw/Chachoengsao/03) 36.5% และ H3N2 (A/Sw/Ratchaburi/NIAH59/04) 84.5% จะเห็นได้ว่าผลบวกต่อ subtype H3N2 มีความแตกต่างกันแสดงถึงความหลากหลายทาง antigenic ของ subtype H3N2

การติดต่อของโรค

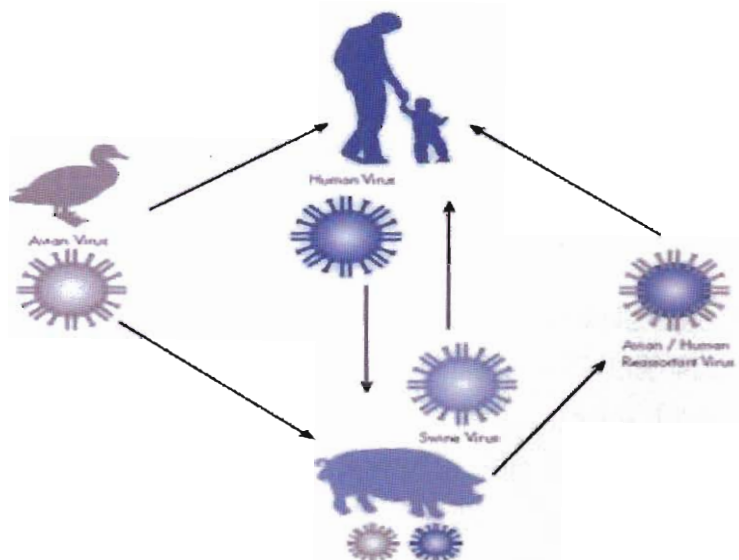
การติดต่อของเชื้อไข้หวัดใหญ่ระหว่าง คน สุกร และสัตว์ปีก

สุกรสามารถติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 ตามธรรมชาติจากคนได้ แต่มีหลักฐานข้อมูลพบไม่มาก ส่วนเชื้อ H3N2 ในคน (human H3N2) สามารถแยกได้บ่อยในสุกรแถบเอเชีย และยุโรป เชื้อ H3N2 ที่พบระบาดวนเวียนอยู่ในฝูงสุกรในยุโรป พบมีการเปลี่ยนแปลงทาง antigenic และ genetic เล็กน้อย เมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ H3N2 ในคน เชื้อ human H3N2 ในประเทศอเมริกาเหนือ พบไม่บ่อยในสุกร (Bikour et al., 1995) แต่ถ้าสุกรมีการติดเชื้อ human H3N2 อาจเป็นจุดวิกฤตที่ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนยีนของเชื้อไวรัสในสุกร ซึ่งปัจจุบันมีรายงานพบมากขึ้นในสุกรในสหรัฐอเมริกา

สุกรสามารถติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก (AIV) ได้ และมีรายงานการติดเชื้อ AIV ตามธรรมชาติในสุกรในหลายภูมิภาคของโลก โดยเฉพาะเชื้อ AIV-H1N1 มีรายงานการแยกเชื้อ AIV-H1N1, AIV-H3N2 และ AIV-H9N2 จากสุกรในประเทศแถบเอเชีย

การที่คนหรือสัตว์ได้รับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2 ชนิด เข้าไปในร่างกาย จะทำให้มีโอกาสนในการแลกเปลี่ยน segment ของ RNA ของเชื้อไวรัสขณะที่เชื้อไวรัสมีการแบ่งตัว สุกรมีความไวต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้งของคนและสัตว์ปีก (รูปที่ 3.2) เนื่องจากเซลล์ในทางเดินหายใจของสุกรมี receptor ซึ่งสามารถจับกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้งของคน และของสัตว์ปีก (Ito, 2000)

มีการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด reassortant ซึ่งมีการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและไข้หวัดใหญ่ในสุกร ได้จากสุกรในประเทศแถบเอเชียและอเมริกา เชื้อไวรัส H3N2 ที่แยกได้จากสุกรในเอเชีย พบว่ามี HA และ NA ยีนมาจากเชื้อไวรัสของคน ส่วน internal protein ยีนมาจากเชื้อไวรัสจากสัตว์ปีก (Peiris et al., 2001) และมีรายงานพบเชื่อดังกล่าวมากในสุกรในยุโรป เชื้อ H3N2 ที่แยกได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีลักษณะโดดเด่น คือ มี triple reassortant สามารถแยกเชื้อได้บ่อยในสุกรตั้งแต่ปี ค.ศ. 1998 เชื้อไวรัสเหล่านี้ประกอบด้วยยีน HA, NA และ PB1 จากไวรัสในคน ยีน NP, M และ NS จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และ ยีน PB2 และ PA จาก ไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก (AIV) (Webby et. al., 2000) การติดเชื้อไวรัสเหล่านี้ นอกจากจะทำให้เกิดอาการทางระบบทางเดินหายใจแล้ว อาจพบการแท้งลูกในแม่สุกร หรือทำให้สุกรที่โตเต็มที่ตายได้ ซึ่งปกติแล้วการติดเชื้อไวรัส H1N1 หรือ H3N2 ในสุกรจะไม่ทำให้สุกรตาย



รูปที่ 3.2 การติดต่อของเชื้อไข้หวัดใหญ่ระหว่างคน สุกร และสัตว์ปีก
(<http://news.bbc.co.uk/2/health/science/979523.stm>)

ผลกระทบทางด้านสาธารณสุข

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรมีความสำคัญด้านสาธารณสุข 2 ประเด็น ได้แก่ เชื้อไวรัสเป็นเชื้อที่ติดต่อระหว่างสัตว์และคนและสุกรสามารถรับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้งของคน และสัตว์ปีก ดังนั้นทำให้เชื้อไวรัสมีโอกาสแลกเปลี่ยนยีนในสุกร และอาจทำให้เกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดครั้งใหญ่ในมนุษย์ได้

ในประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศในเอเชีย และยุโรป มีรายงานการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในคน ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส H1N1 ที่ยังไม่มี การแลกเปลี่ยนยีน (classical H1N1) อย่างไรก็ตามมีรายงานการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกชนิด reassortant H1N1 ที่แยกได้จากสุกรในยุโรป การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด reassortant H3N2 ที่แยกได้จากสุกรในยุโรปและฮ่องกง รวมทั้งการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิด reassortant H1N1 ที่แยกได้จากสุกรในประเทศสหรัฐอเมริกา (Alexander and Brown, 2000)

การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในคนมักเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับสุกร แต่ก็มีรายงานการติดเชื้อในคนที่ไม่มีประวัติสัมผัสกับสัตว์มาก่อน กรณีดังกล่าวอาจเป็นไปได้ที่คนติดเชื้อจากสุกร จากนั้นก็มีการติดเชื้อจากคนสู่คน จากการศึกษาสารพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรบ่งชี้ว่า เชื้อไข้หวัดใหญ่ H3N2 ของคนที่พบในสุกรเป็นเชื้อที่เคยมีการระบาดในคนมาแล้ว และเชื่อดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะกลับมาในคนโดยเฉพาะในเด็กเล็กที่ยังไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคโดยมีโอกาสดติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อม จาก

การที่สุกรมีความไวต่อการรับเชื้อไข้หวัดใหญ่ของคนและสัตว์ปีก สุกรจึงเป็นถังผสม (mixing vessel) ที่ให้เชื้อไวรัสมีโอกาสในการแลกเปลี่ยนยีน ทำให้เกิดเชื้อไวรัสตัวใหม่ และอาจทำให้มีการระบาดครั้งใหญ่ในคนได้

พยาธิกำเนิด

หลังจากที่สุกรได้รับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร เชื้อจะแบ่งตัวในเยื่อจมูก ทอนซิล หลอดลม ปอด ต่อม้ำเหลืองบริเวณหลอดลม โดยตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดในปริมาณต่ำๆ และพบในระยะสั้น การเกิดโรคจะเป็นแบบเฉียบพลันและเชื้อไวรัสจะถูกกำจัดไปอย่างรวดเร็ว สุกรจะขับเชื้อออกทางน้ำมูกในวันที่ 1-7 หลังได้รับเชื้อ และเชื้อไวรัสจะหมดภายใน 7 วัน และไม่สามารถแยกเชื้อจากปอดและเนื้อเยื่อของทางเดินหายใจหลังได้รับเชื้อ 7 วันไปแล้ว (Brown et al., 1993) ปอดเป็นอวัยวะที่ตรวจพบเชื้อไวรัสในปริมาณสูง โดยจะพบเชื้อที่เยื่อหลอดลมและหลอดลมฝอย รวมทั้งในเซลล์เยื่อถุงลม เสมหะและเซลล์ที่หลุดลอกและเซลล์ชนิด neutrophil ในหลอดลม หลังจากได้รับเชื้อ 2-3 วัน ปริมาณเชื้อไวรัสในเซลล์จะลดจำนวนลง เชื้อไวรัสจะทำลายเซลล์โดยตรงจากขบวนการ apoptosis ของโปรตีน NA และหรือโปรตีน PB1 นอกจากนี้ cytokines ที่ผลิตก่อนเกิดการอักเสบระหว่างการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน มีความสำคัญที่ทำให้โรคพัฒนาต่อไป สุกรที่ติดเชื้อจะสร้าง interferon- α (IFN- α), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) และ interleukin-6 (IL-6) ซึ่ง cytokines เหล่านี้จะทำให้ปอดไม่ทำงานและเกิดการอักเสบ สุกรมีไข้ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร และทำให้มีผลกระทบอย่างอื่นตามมา

อาการ

การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรแพร่ระบาดและทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งฝูง เนื่องจากเชื้อไวรัสระบาด ได้รวดเร็ว สุกรที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1, H1N2 และ H3N2 จะแสดงอาการคล้ายๆ กัน โดยมีอาการทางระบบหายใจชนิดเฉียบพลัน มีระยะฟักตัว 1-2 วัน สุกรส่วนใหญ่ในฝูงที่ติดเชื้อจะแสดงอาการของโรค และพบในสุกรทุกอายุ อาการแรกที่พบได้แก่ มีไข้ เบื่ออาหาร ไม่ค่อยมีปฏิกิริยาตอบสนอง ล้มลงนอน นอนซึม ไม่อยากลุกขึ้น เยื่อตาและโพรงจมูกอักเสบ มีน้ำมูก จาม ไอ น้ำหนักลด อัตราการป่วยสูง (100%) แต่อัตราการตายต่ำ (น้อยกว่า 1%) ยกเว้นมีโรคอื่นร่วมด้วยหรือสุกรอายุน้อย สุกรจะหายป่วยภายใน 5-7 วันหลังแสดงอาการ

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรมักเกิดกับฝูงสุกรที่ไม่ภูมิคุ้มกันโรค ฝูงสุกรพันธุ์ที่เคยติดเชื้อมาก่อนจะมีภูมิคุ้มกันต่อโรค ลูกที่คลอดจากแม่เหล่านี้จะมีภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่ เมื่อมีการติดเชื้อครั้งใหม่จะไม่ทำให้สุกรแสดงอาการหรือแสดงอาการอย่างอ่อน อย่างไรก็ตามอาจมีปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น อายุสุกร ความเครียดจากการติดเชื้อ การติดเชื้อแทรกซ้อน สภาพของอากาศ สภาพโรงเรือน ซึ่งมีผลต่ออาการป่วยของสุกร เช่นการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสแทรกซ้อน มีผลทำให้ความ

รุนแรงและระยะเวลาป่วยนานขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสมรรถนะทางระบบสืบพันธุ์ในแม่สุกรลดลงหลังจากมีการระบาดของโรคในฝูงสุกรพันธุ์ โดยพบอัตราการผสมติดลดลง แท้งลูก จำนวนลูกต่อครอกน้อยและอ่อนแอ รวมทั้งสุกรตายแรกคลอด

รอยโรค

รอยโรคที่ดูด้วยตาเปล่า

รอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสในสุกรอย่างเดียวย ส่วนใหญ่จะพบปอดบวม ปอดมีลักษณะแน่นแข็งโดยเฉพาะ apical lobe และ cardial lobe พบได้บ่อย โดยจะพบประมาณ 50% ของปอดหลังจากมีการติดเชื้อ 4-5 วัน มีขอบเขตของรอยโรคแยกชัดเจนระหว่างปอดส่วนดีและส่วนแน่นแข็งสีม่วง บางครั้งจะพบการบวมน้ำในปอด พบเสมหะในทางเดินอากาศภายในปอด หรือลิ่มเลือด ต่อม น้ำเหลืองบริเวณหลอดลมและล้นปี้บวม

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

รอยโรคที่เด่นชัดได้แก่ เนื้อตายที่เยื่อหุ้มปอด เซลล์เยื่อปอดหลอดลมลอกหลุด ภายใน 24 ชั่วโมง หลังทดลองหยอดเชื้อเข้าทางหลอดลม พบว่าทางเดินอากาศ ถูกอุดตันด้วยเยื่อที่อักเสบและตาย และส่วนใหญ่จะพบเซลล์ neutrophil มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ neutrophil นอกจากอุดตันทางเดินอากาศในปอดแล้วยังปล่อยเอนไซม์ออกมาทำลายปอดด้วย ในเวลา 2-3 วันต่อมาจะมีเซลล์ lymphocyte อยู่รอบๆ หลอดลมและหลอดเลือด

ภูมิคุ้มกันโรค

สุกรที่ติดเชื้อจะสร้างภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อการติดเชื้อทั้งสองชนิด ได้แก่ การสร้างแอนติบอดีในเลือดและการสร้างภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ แอนติบอดีต่อโปรตีนของเชื้อไวรัส เช่น แอนติบอดีต่อโปรตีน HA, NA, M และ NP แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน HA เท่านั้นที่สามารถ neutralize เชื้อไวรัสได้ และสามารถตรวจหาได้โดยวิธี virus neutralization (VN) หรือวิธี HI แอนติบอดีต่อโปรตีน NA, M และ NP ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อเริ่มแรกได้ แต่สามารถช่วยในการฆ่าเซลล์ที่ติดเชื้อได้ด้วยขบวนการอย่างอื่น เช่น cytotoxic T lymphocytes ที่สามารถขจัดเชื้อไวรัสออกจากปอด สุกรสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ มีผลทำให้เชื้อไวรัสถูกกำจัดได้หมดภายใน 1 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ การตอบสนองของ T cell สามารถตรวจได้หลังรับเชื้อแล้ว 7 วัน การตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี HI สามารถตรวจพบหลังได้รับเชื้อ 7-10 วัน และระดับ HI ไตเตอร์ จะขึ้นสูงสุด 1:160-1:320 หลังได้รับเชื่อนาน 2-3 สัปดาห์ แอนติบอดีจะคงระดับสูงนานหลายสัปดาห์ก่อนจะเริ่มลดลงใน 8-10 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ การตรวจด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่มีความไวจำเพาะสูง สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมได้ภายใน 3 วัน และจากสารคัดหลั่งจากจมูกใน 4 วันหลังติดเชื้อ

หลังการติดเชื้อ สุกรจะสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสสเตรนเดิมหรือสเตรนที่คล้ายกัน จากการทดลองฉีดเชื้อ H1N1 และ H3N2 ในสุกรพบว่า สุกรสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสชนิดเดิม ในปอดและทางเดินหายใจได้อย่างสมบูรณ์ โดยการฉีดพิษทับด้วยเชื้อไวรัสชนิดเดิม หลังได้รับเชื้อครั้งแรกที่ 6 และ 9 สัปดาห์ สุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีนจะสร้าง neutralizing antibody ในระดับสูง ซึ่งสามารถแพร่กระจายไปสู่ปอดได้มากพอที่จะลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อในปอดและสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ แต่ป้องกันการขับเชื้อทางจมูกได้น้อย ซึ่งอาจเนื่องจากเนื้อเยื่อในจมูกไม่สร้าง Specific IgA ต่อเชื้อไวรัส

แอนติบอดีที่ถ่ายทอดจากแม่สุกร สามารถป้องกันการติดเชื้อในลูกสุกรได้ แต่แอนติบอดีที่ถ่ายทอดจากแม่ จะมีผลรบกวนการสร้างแอนติบอดีจากการฉีดวัคซีน ระดับแอนติบอดีที่ถ่ายทอดมายังลูกขึ้นอยู่กับระดับแอนติบอดีในแม่ ระดับแอนติบอดีที่ถ่ายทอดจะลดลงตามระยะเวลาประมาณ 4-14 สัปดาห์ ได้มีการทดลองฉีดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร ให้สุกรที่มีแอนติบอดีถ่ายทอดจากแม่ พบว่าไม่สามารถป้องกันการขับเชื้อไวรัสจากทางจมูกได้ แต่สามารถป้องกันการติดเชื้อในปอดได้อย่างสมบูรณ์ ในสุกรบางตัว

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยโรคโดยสังเกตจากอาการป่วยเป็นการวินิจฉัยเบื้องต้น โรคไขหวัดใหญ่สุกรไม่มีอาการจำเพาะที่เด่นชัดและอาจมีอาการคล้ายคลึงกับโรคทางระบบหายใจอื่นๆ ในสุกร ดังนั้นการวินิจฉัยโรคต้องอาศัยผลทางห้องปฏิบัติการ ในการวินิจฉัยโรคไขหวัดใหญ่สุกรโดยเฉพาะในลูกสุกรหรือสุกรหย่านมที่เกิดจากแม่ที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากเคยพบว่าสุกรหย่านมที่มีแอนติบอดีถ่ายทอดจากแม่อาจติดเชื้อและขับเชื้อออกมาได้ อัตราการแยกเชื้อไวรัสและความรุนแรงของโรคมักมีความผันแปรตรงข้ามกับระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอดจากแม่

การป้องกันและควบคุมโรค

การฉีดวัคซีน และการจัดการด้านความปลอดภัยทางชีวภาพเป็นวิธีการที่ใช้ในการป้องกันโรค วัคซีนที่ใช้เป็นชนิดเชื้อตายมีส่วนประกอบของ adjuvant ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 2 ครั้ง ห่างกัน 2-4 สัปดาห์ ในแม่สุกรแนะนำให้ฉีดปีละ 2 ครั้ง เชื้อไขหวัดใหญ่สุกรที่ใช้สำหรับเตรียมวัคซีนจะมีความแตกต่างกันตามภูมิภาคของโลก เนื่องจากความแตกต่างทางด้าน antigenic และ genetic วัคซีนที่ใช้ในยุโรป เริ่มผลิตในกลางศตวรรษ 1980 เชื้อไวรัสที่ใช้มีทั้ง H1N1 และ H3N2 ซึ่งส่วนใหญ่ยังคงประกอบด้วยเชื้อไวรัสสเตรน New Jersey/76 (H1N1) จากคนและสเตรน Port Chalmers/73 (H3N2) ในประเทศสหรัฐอเมริกาเริ่มใช้วัคซีนในปี ค.ศ. 1993 ซึ่งเป็นวัคซีนชนิด monovalent H1N1 ต่อมาเมื่อมีการระบาดของไขหวัดใหญ่สุกร H3N2 ในสุกรในประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1998 จึงได้มีการใช้วัคซีนชนิด monovalent และ bivalent (H1N1/H3N2) วัคซีนของประเทศสหรัฐอเมริกาเริ่มแรกประกอบด้วยเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร classical H1N1 และ triple reassortant H3N2 นอกจากนี้ยังมี

การผลิตวัคซีนชนิด trivalent ซึ่งมีส่วนประกอบของไขหวัดใหญ่สุกร reassortant H1N1 หรือมีการใช้ autogenous vaccine โดยใช้เชื้อไขหวัดใหญ่สุกรจากการระบาดของโรค

มีการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนจากการทดสอบในสุกร ประสิทธิภาพของวัคซีนนอกจากจะขึ้นอยู่กับสเตรนของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรที่ใช้ทำวัคซีนและเชื้อพิษที่ใช้ฉีดพิษทับ (challenge strain) แล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณแอนติเจน/โอดีส สารที่ใช้เป็น adjuvant สุขภาพของสุกรขณะฉีดวัคซีน วิธีและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำวัคซีน วัคซีนที่มีปริมาณแอนติเจน/โอดีส มากกว่าจะมีประสิทธิภาพดีกว่า และการใช้ adjuvant ที่สามารถกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ดีกว่าก็มีผลส่งเสริมประสิทธิภาพของวัคซีน โดยปกติการฉีดวัคซีน 2 ครั้งในสุกรที่ไม่มีแอนติบอดีต่อไขหวัดใหญ่สุกรจะให้ HI titer ระหว่าง 1:20-1:640 ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีน แอนติบอดีที่เกิดจากการฉีดวัคซีนจะมีระยะเวลานั้น โดยมีรายงานว่าระดับแอนติบอดีจะลดลงภายใน 10 สัปดาห์ จากการทดลองให้เชื้อพิษในสุกรที่ฉีดวัคซีน พบว่าสุกรที่มี HI ไตเตอร์ มากกว่า 1:160 สามารถป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อในปอดและสามารถป้องกันโรคได้ (Van Reeth et al., 2001)

ในแม่สุกรแนะนำให้ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง และพบว่าแม่สุกรที่มี HI ไตเตอร์ระหว่าง 1:160-1:640 หรือมากกว่า ลูกสุกรจะได้รับแอนติบอดีถ่ายทอดจากแม่ในระดับสูงและอยู่ได้นาน ดังนั้นการฉีดวัคซีนในแม่สุกร จึงมีความสำคัญในการป้องกันโรคในลูกสุกรตุนจนถึงระยะอนุบาล ไม่นิยมทำวัคซีนในสุกรขุน นอกจากจะมีปัญหาของโรคนี้ในสุกรรุ่นและสุกรขุนในระยะท้าย มีการผลิตวัคซีนชนิดใหม่ เช่น DNA วัคซีนที่มีเยื่อ HA หรือ NP ซึ่งการทดลองในสุกรทดลองให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจนัก เนื่องจากพบว่าวัคซีนสามารถลดปริมาณและระยะในการขับเชื้อไวรัส แต่ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรค

ในการควบคุมและป้องกันโรคที่ดี ควรหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงทั้งภายใน และภายนอก ปัจจัยเสี่ยงภายใน เช่น การเลี้ยงสุกรหนาแน่น คุณภาพอาหารและน้ำที่มีการปนเปื้อนเชื้อโรคหรือสารพิษ ไม่มีการเข้มงวดเรื่องการเข้า-ออกฟาร์ม รวมทั้งระบบการจัดการด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ส่วนปัจจัยเสี่ยงภายนอก เช่น การนำเข้าโรคเข้าฟาร์ม ฟาร์มตั้งอยู่ในเขตการเลี้ยงสุกรหนาแน่น แหล่งสุกรพันธุ์ทดแทนไม่ปลอดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร เป็นต้น

บรรณานุกรม

- Alexander DJ and Brown IH. 2000. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 19:197-225.
- Bikour MH, Forst EH, Deslandes S, Talbot B, Weber JM and Elazthary Y. 1995. Recent H3N2 swine influenza virus with haemagglutinin and nucleoprotein genes similar to 1975 human strains. J Gen Virol, 76:697-703.

- Brown IH, Done SH, Spencer YI, Cooley WA, Harris PA and Alexander DJ. 1993.
Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. *Vet Rec*, 132:598-602.
- Damrongwatanapokin S, Pinyochon W, Parchariyanon S and Damrongwatanapokin T. 2006 Serological study and isolation of influenza A virus infection of pigs in Thailand. *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress*. Copenhagen, Denmark, Narayana press, 2: 136.
- Ito T. 2000. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses. *Microbiol Immunol*, 44: 423-430.
- Kupradinan S, Peanpijit P, Bhodhikosoom C, Yoshiko Y, Endo A and Nerome K. 1991. The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. *Arch Virol*, 118: 289-297.
- Landolt GA, Karasin AI, Phillips L and Olsen CW. 2003. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs. *J Clin Microbiol*, 41: 1936-1941.
- Olsen CW, Brown I. H, Easterday B. C and Van Reeth K. 2006. Swine Influenza. In *Diseases of Swine* (9th edition). BE Straw, JJ Zimmerman, SD Allaire and DJ Taylor, eds. Blackwell Publishing. p. 469-482.
- Peiris JSM, Guan Y, Ghose P, Markwell D, Krauss S, Webster RG and Shortridge KF. 2001. Co-circulation of avian H9N2 and human H3N2 viruses in pigs in southern China. In *Potions for the Control of Influenza IV*. Excerpta Medica International Congress Series 1219. A Osterhaus, N Cox, A Hampson, eds. Amsterdam: Excerpta Medica. p. 195-200.
- Parchariyanon S, Rattanapumma R, Molee L and Pinyachon W. 2008. Seroepidemiological study of swine influenza virus H1N1 and H3N2 in Thailand. *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress*. Durban, South Africa. p 27.
- Taubenberger JK, Reid AH, Janczewski TA and Fanning TG. 2001. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos Trans R Soc Lond [Biol]*, 356: 1829-1839.

การผลิตวัคซีนชนิด trivalent ซึ่งมีส่วนประกอบของไขหวัดใหญ่สุกร reassortant H1N1 หรือมีการใช้ autogenous vaccine โดยใช้เชื้อไขหวัดใหญ่สุกรจากการระบาดของโรค

มีการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนจากการทดสอบในสุกร ประสิทธิภาพของวัคซีนนอกจากจะขึ้นอยู่กับสเตรนของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรที่ใช้ทำวัคซีนและเชื้อพิษที่ใช้ฉีดพิษทับ (challenge strain) แล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณแอนติเจน/โอดีส สารที่ใช้เป็น adjuvant สุขภาพของสุกรขณะฉีดวัคซีน วิธีและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำวัคซีน วัคซีนที่มีปริมาณแอนติเจน/โอดีส มากกว่าจะมีประสิทธิภาพดีกว่า และการใช้ adjuvant ที่สามารถกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ดีกว่าก็มีผลส่งเสริมประสิทธิภาพของวัคซีน โดยปกติการฉีดวัคซีน 2 ครั้งในสุกรที่ไม่มีแอนติบอดีต่อไขหวัดใหญ่สุกรจะให้ HI titer ระหว่าง 1:20-1:640 ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของวัคซีน แอนติบอดีที่เกิดจากการฉีดวัคซีนจะมีระยะเวลานาน โดยมีรายงานว่าระดับแอนติบอดีจะลดลงภายใน 10 สัปดาห์ จากการทดลองให้เชื้อพิษในสุกรที่ฉีดวัคซีน พบว่าสุกรที่มี HI ไตเตอร์ มากกว่า 1:160 สามารถป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อในปอดและสามารถป้องกันโรคได้ (Van Reeth et al., 2001)

ในแม่สุกรแนะนำให้ฉีดวัคซีน 2 ครั้ง และพบว่าแม่สุกรที่มี HI ไตเตอร์ระหว่าง 1:160-1:640 หรือมากกว่า ลูกสุกรจะได้รับแอนติบอดีถ่ายทอดจากแม่ในระดับสูงและอยู่ได้นาน ดังนั้นการฉีดวัคซีนในแม่สุกร จึงมีความสำคัญในการป้องกันโรคในลูกสุกรตอนจนถึงระยะอนุบาล ไม่นิยมทำวัคซีนในสุกรขุน นอกจากจะมีปัญหาของโรคนี้ในสุกรรุ่นและสุกรขุนในระยะท้าย มีการผลิตวัคซีนชนิดใหม่ เช่น DNA วัคซีนที่มีเยื่อ HA หรือ NP ซึ่งการทดลองในสุกรทดลองให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจนัก เนื่องจากพบว่าวัคซีนสามารถลดปริมาณและระยะในการขับเชื้อไวรัส แต่ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรค

ในการควบคุมและป้องกันโรคที่ดี ควรหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงทั้งภายใน และภายนอก ปัจจัยเสี่ยงภายใน เช่น การเลี้ยงสุกรหนาแน่น คุณภาพอาหารและน้ำที่มีการปนเปื้อนเชื้อโรคหรือสารพิษ ไม่มีการเข้มงวดเรื่องการเข้า-ออกฟาร์ม รวมทั้งระบบการจัดการด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ส่วนปัจจัยเสี่ยงภายนอก เช่น การนำเชื้อโรคเข้าฟาร์ม ฟาร์มตั้งอยู่ในเขตการเลี้ยงสุกรหนาแน่น แหล่งสุกรพันธุ์ทดแทนไม่ปลอดเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร เป็นต้น

บรรณานุกรม

- Alexander DJ and Brown IH. 2000. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 19:197-225.
- Bikour MH, Forst EH, Deslandes S, Talbot B, Weber JM and Elazthary Y. 1995. Recent H3N2 swine influenza virus with haemagglutinin and nucleoprotein genes similar to 1975 human strains. J Gen Virol, 76:697-703.

- Brown IH, Done SH, Spencer YI, Cooley WA, Harris PA and Alexander DJ. 1993.
Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. *Vet Rec*, 132:598-602.
- Damrongwatanapokin S, Pinyochon W, Parchariyanon S and Damrongwatanapokin T. 2006 Serological study and isolation of influenza A virus infection of pigs in Thailand. *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress*. Copenhagen, Denmark, Narayana press, 2: 136.
- Ito T. 2000. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses. *Microbiol Immunol*, 44: 423-430.
- Kupradinan S, Peanpijit P, Bhodhikosoom C, Yoshiko Y, Endo A and Nerome K. 1991. The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. *Arch Virol*, 118: 289-297.
- Landolt GA, Karasin AI, Phillips L and Olsen CW. 2003. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs. *J Clin Microbiol*, 41: 1936-1941.
- Olsen CW, Brown I. H, Easterday B. C and Van Reeth K. 2006. Swine Influenza. In *Diseases of Swine (9th edition)*. BE Straw, JJ Zimmerman, SD Allaire and DJ Taylor, eds. Blackwell Publishing. p. 469-482.
- Peiris JSM, Guan Y, Ghose P, Markwell D, Krauss S, Webster RG and Shortridge KF. 2001. Co-circulation of avian H9N2 and human H3N2 viruses in pigs in southern China. In *Potions for the Control of Influenza IV*. Excerpta Medica International Congress Series 1219. A Osterhaus, N Cox, A Hampson, eds. Amsterdam: Excerpta Medica. p. 195-200.
- Parchariyanon S, Rattanapumma R, Molee L and Pinyachon W. 2008. Seroepidemiological study of swine influenza virus H1N1 and H3N2 in Thailand. *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress*. Durban, South Africa. p 27.
- Taubenberger JK, Reid AH, Janczewski TA and Fanning TG. 2001. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos Trans R Soc Lond [Biol]*, 356: 1829-1839.

- Takemae N, Parchariyanon S, Damrongwatanapokin S, Uchida Y, Ruttanapumma R, Watanabe C, Yamaguchi S and Saito T. 2008. Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. *Inf Oth Resp Vir*, 2: 181-189.
- Van Reeth K, Labarque G, De Clereq S and Pensart M. 2001. Efficacy of vaccination of pigs with different H1N1 swine influenza viruses using a recent challenge strain and different parameters of protection. *Vaccine*, 19: 4479-4486.
- Webby RJ, Swenson S, Krauss SL, Gerrish PJ, Goyal SM and Webster RG. 2000. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol*, 74: 8243-8251.
- Wright PF and Webster RG. 2001. Orthomyxoviruses. In *Field's Virology* (4th edition). PM Howley, DE Griffin, RA Lamb, MA Martin, B Roizman, SE Straus, eds. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1533-1579.

โรคไข้สมองอักเสบนิปาห์

โรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ (Nipah virus infection) เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในประเทศมาเลเซียโดย Dr. Chau Kaw Bing นักวิทยาศาสตร์ผู้เชี่ยวชาญทางไวรัสวิทยา สุนัขติดเชื้อไข้สมองอักเสบนิปาห์จะแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจและระบบประสาท

ระบาดวิทยาของโรค

มีรายงานการระบาดครั้งแรกในประเทศมาเลเซียในปี ค.ศ. 1998 มีอัตราการตายสูงในผู้ป่วย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผู้เลี้ยงสุกร ต่อมาโรคได้ระบาดไปทางตอนใต้ของเมือง Tambun ทำให้มีผู้ป่วยอย่างน้อย 85 คนในรัฐ Selamban จากการที่มีอุบัติการณ์ของโรคในคนและสัตว์ควบคู่กัน จึงสันนิษฐานว่าโรคที่เกิดในคนมีสาเหตุจากการติดเชื้อจากสุกร (Chua et al., 1999, 2000) เป็นผลให้มีการทำลายสุกรเกือบ 1 ล้านตัวเพื่อควบคุมโรค (รูปที่ 4.1) ต่อมาในปี 1999 มีการระบาดของโรคที่ Sugai Balow ซึ่งอยู่ทางใต้ของรัฐ Selamban มีการแยกเชื้อไวรัสนิปาห์ได้จากผู้เสียชีวิตที่แสดงอาการทางประสาทเป็นการยืนยันว่าการป่วยตายเกิดจากเชื้อไวรัสนิปาห์ จากการระบาดของโรคในประเทศมาเลเซียระหว่างปี ค.ศ 1998-1999 ทำให้มียอดผู้ติดเชื้อสูงถึง 256 ราย และเสียชีวิต 105 ราย (CDC, 1999)

การระบาดในประเทศสิงคโปร์ทำให้มีผู้ป่วย 11 ราย และเสียชีวิต 1 ราย ซึ่งเป็นคนงานในโรงฆ่าสัตว์ที่มีการฆ่าสุกรที่นำเข้าจากบริเวณที่มีการแพร่ระบาดของโรคในประเทศมาเลเซีย (Paton et al., 1999) ส่วนประเทศบังคลาเทศมีการระบาดของโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ในคนในปี 2001, 2003, 2004 และ 2011 โดยเชื่อว่าการแพร่ระบาดของโรคเกิดจากการสัมผัสใกล้ชิดกับผู้ป่วยหรือสัมผัสกับแหล่งของโรคและมีความเป็นไปได้ที่มีการติดเชื้อจากคนสู่คน การเกิดโรคในปี 2004 มีผู้ป่วย 263 ราย เสียชีวิต 35 ราย จากการศึกษาการเกิดโรคในปี 2004 (Luby et al., 2006) พบผู้ป่วยติดเชื้อไข้สมองอักเสบนิปาห์จากค้างคาวที่มากินผลไม้ และในปี 2011 Wahed et al. (2011) รายงานการเสียชีวิตของคนติดเชื้อไข้สมองอักเสบนิปาห์อย่างน้อย 15 คน ทางภาคเหนือของประเทศบังคลาเทศ และสรุปผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อไข้สมองอักเสบนิปาห์ในประเทศทั้งหมดตั้งแต่ ปี 2001-2011 รวม 113 คน

ประเทศอินเดียมีรายงานการระบาดของโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ในคนในปี 2001 มีการสันนิษฐานสาเหตุการระบาดอาจเกิดจากการติดเชื้อจากค้างคาวกินผลไม้ ซึ่งในบริเวณนั้นมีค้างคาวกินผลไม้และมีต้นไม้ที่ออกผลจำนวนมาก แต่ไม่มีการยืนยันสาเหตุที่แน่นอนเนื่องจากไม่มีการสำรวจโรคในค้างคาวและสัตว์อื่นๆ การระบาดครั้งนี้มีผู้ป่วย 66 ราย และเสียชีวิต 45 ราย จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าการแพร่ระบาดของโรคเป็นการแพร่จากคนสู่คน มีการติดต่อระหว่างผู้ป่วยกับพยาบาล และผู้ที่มาเยี่ยมโดยมีหลักฐานการตรวจซีรัมของผู้ป่วย 4 ราย และผู้ที่สัมผัสกับผู้ป่วย 2 ราย ในปี 2007 มีรายงานผู้ป่วย 5 ราย และเสียชีวิตทั้ง 5 ราย และจากข้อมูลพบว่าการแพร่ระบาดจากคนสู่คน และพบว่าสายพันธุ์ ที่พบในประเทศอินเดียและประเทศบังกลาเทศมีความใกล้เคียงกันมากกว่าสายพันธุ์จากประเทศมาเลเซีย

ประเทศไทยไม่พบการระบาดของเชื้อไข้สมองอักเสบนิปาห์ในคนและในสุกร แต่มีความเสี่ยงสูงที่อาจเกิดการระบาด เนื่องจากมีพรมแดนติดต่อกับประเทศมาเลเซีย และมีลักษณะภูมิประเทศที่คล้ายคลึง ทำให้มีค้างคาวชนิดที่เป็นพาหะของโรค ดังนั้นกรมปศุสัตว์จึงมีการเฝ้าระวังโรคทางห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจทางซีรัมวิทยาโดยวิธี ELISA ในพื้นที่ที่มีความเสี่ยงสูงและที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ถึงปี พ.ศ. 2554 ผลการตรวจไม่พบผลบวกในตัวอย่างซีรัมสุกร



รูปที่ 4.1 การทำลายสุกรเพื่อควบคุมโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์
(http://mentorz.blogspot.com/2009_04_01_archive.html)

สาเหตุของโรค

โรคไข้สมองอักเสบนิปาห์มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสนิปาห์อยู่ใน family *Paramyxoviridae*, genus *Henipavirus* เป็นเชื้อไวรัสชนิดที่มีเปลือกหุ้มและเป็นเชื้อไวรัส RNA สายเดี่ยว มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Hendra virus* ซึ่งอยู่ใน genus เดียวกัน ไวรัสนี้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200-300 nm การระบาดของโรคในคนที่ประเทศมาเลเซียเกิดจากการติดเชื้อจากสุกรป่วย และสันนิษฐานว่าสุกร

ได้รับเชื้อไวรัสจากค่างคาวกินผลไม้ จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสัปปาห์ที่แยกได้จากคนและจากสุกร พบว่าเป็นเชื้อที่มีสารพันธุกรรมเหมือนกันซึ่งบ่งชี้ว่าคนติดเชื้อจากสุกร นอกจากนี้ยังพบหลักฐานการติดเชื้อในสัตว์อื่นๆ เช่น สุนัข แมว และม้า ในประเทศไทยมีการสำรวจโรคนี้ในค่างคาว 12 ชนิดใน 9 จังหวัด ได้แก่ สิงห์บุรี อโยธยา กรุงเทพฯ ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี ราชบุรี และสุราษฎร์ธานี โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อใช้สมองอักเสบนิปาห์ โดยวิธี ELISA จากตัวอย่างเลือดค่างคาว 1,054 ตัวอย่าง พบผลบวก 82 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.8% การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างน้ำลายค่างคาว จำนวน 1,286 ตัวอย่าง และตัวอย่างเยื่อค่างคาว จำนวน 1,282 ตัวอย่าง โดยวิธีการรวมกลุ่มตัวอย่าง 10 ต่อ 1 จากตัวอย่างชนิดเดียวกันพบสารพันธุกรรมของเชื้อใช้สมองอักเสบนิปาห์ใน 2 กลุ่มตัวอย่างน้ำลาย และ 6 กลุ่มตัวอย่างเยื่อค่างคาว และพบว่าบางตัวอย่างมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ในประเทศมาเลเซียและบังคลาเทศ (Wacharapluesadee et al., 2005)

การติดต่อและพยาธิกำเนิด

การติดเชื้อไวรัสสัปปาห์ในสุกรคาดว่าสุกรได้รับเชื้อจากค่างคาว โดยเฉพาะค่างคาวกินผลไม้ซึ่งเป็นแหล่งรังโรค เมื่อเกิดโรคระบาดในสุกร สัตว์จะติดเชื้ออย่างรวดเร็วจากการสัมผัสโดยตรงจากสิ่งคัดหลั่งหรือจากสิ่งของเครื่องใช้ในฟาร์มที่ปนเปื้อนเชื้อ การแพร่เชื้อในฟาร์มคาดว่าเกิดจากการเคลื่อนย้ายสุกรป่วยในฟาร์มที่มีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพที่ไม่ดี นอกจากนี้สุกรที่อยู่อย่างแออัดและใกล้ชิดกันมีโอกาสติดเชื้อได้มากถึงแม้ว่าจะมีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพที่เข้มงวดก็ตาม จากการศึกษาการแพร่เชื้อในสุกรที่ห้องปฏิบัติการด้านสุขภาพสัตว์ ประเทศออสเตรเลีย (Australian Animal Health Laboratory, CSIRO) พบว่าสุกรสามารถติดเชื้อได้โดยการกิน และการฉีดเชื้อ เชื้อไวรัสสามารถแพร่ได้รวดเร็ว และตรวจพบ neutralizing antibody ในซีรัมสุกรได้ที่ 10-14 วัน หลังได้รับเชื้อ พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อไวรัสสัปปาห์ในสัตว์ทุกชนิดเริ่มต้นจากเส้นเลือดในเยื่อภายใน

อาการ

สุกรทุกอายุสามารถติดเชื้อไวรัสสัปปาห์ได้ สุกรที่ป่วยเป็นโรคใช้สมองอักเสบนิปาห์มีอาการที่ไม่เฉพาะเจาะจงจึงควรมีการวินิจฉัยแยกจากโรคอื่นที่มีอาการคล้ายกัน ซึ่งได้แก่ โรคคหิวคอตสุกร โรคพอร์อาร์เอส โรคอเอสกี โรคปอดบวมที่เกิดจากการติดเชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae* (swine enzootic pneumonia), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (porcine pleuropneumoniae), *Pasteurella multocida* (Pasteurellosis) สุกรที่ป่วยด้วยโรคดังกล่าวข้างต้น มักไม่ตาย แต่ถ้าติดเชื้อใช้สมองอักเสบนิปาห์จะมีอาการทางระบบหายใจ ระบบประสาทและมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น ให้สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการติดเชื้อใช้สมองอักเสบนิปาห์

ได้รับเชื้อไวรัสจากคางคากินผลไม้ จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสัปปะที่แยกได้จากคนและจากสุกร พบว่าเป็นเชื้อที่มีสารพันธุกรรมเหมือนกันซึ่งบ่งชี้ว่าคนติดเชื้อจากสุกร นอกจากนี้ยังพบหลักฐานการติดเชื้อในสัตว์อื่นๆ เช่น สุนัข แมว และม้า ในประเทศไทยมีการสำรวจโรคนี้ในคางคาก 12 ชนิดใน 9 จังหวัด ได้แก่ สิงห์บุรี อโยธยา กรุงเทพฯ ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี ราชบุรี และสุราษฎร์ธานี โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อใช้สมองอักเสบนิปาห์ โดยวิธี ELISA จากตัวอย่างเลือดคางคาก 1,054 ตัวอย่าง พบผลบวก 82 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.8% การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างน้ำลายคางคาก จำนวน 1,286 ตัวอย่าง และตัวอย่างเยื่อคางคาก จำนวน 1,282 ตัวอย่าง โดยวิธีการรวมกลุ่มตัวอย่าง 10 ต่อ 1 จากตัวอย่างชนิดเดียวกันพบสารพันธุกรรมของเชื้อใช้สมองอักเสบนิปาห์ใน 2 กลุ่มตัวอย่างน้ำลาย และ 6 กลุ่มตัวอย่างเยื่อคางคาก และพบว่าบางตัวอย่างมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ในประเทศมาเลเซียและบังคลาเทศ (Wacharapluesadee et al., 2005)

การติดต่อและพยาธิกำเนิด

การติดเชื้อไวรัสสัปปะในสุกรคาดว่าสุกรได้รับเชื้อจากคางคาก โดยเฉพาะคางคากินผลไม้ซึ่งเป็นแหล่งรังโรค เมื่อเกิดโรคระบาดในสุกร สัตว์จะติดเชื้ออย่างรวดเร็วจากการสัมผัสโดยตรงจากสิ่งคัดหลั่งหรือจากสิ่งของเครื่องใช้ในฟาร์มที่ปนเปื้อนเชื้อ การแพร่เชื้อในฟาร์มคาดว่าเกิดจากการเคลื่อนย้ายสุกรป่วยในฟาร์มที่มีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพที่ไม่ดี นอกจากนี้สุกรที่อยู่อย่างแออัดและใกล้ชิดกันมีโอกาสติดเชื้อได้มากถึงแม้ว่าจะมีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพที่เข้มงวดก็ตาม จากการศึกษาการแพร่เชื้อในสุกรที่ห้องปฏิบัติการด้านสุขภาพสัตว์ ประเทศออสเตรเลีย (Australian Animal Health Laboratory, CSIRO) พบว่าสุกรสามารถติดเชื้อได้โดยการกิน และการฉีดเชื้อ เชื้อไวรัสสามารถแพร่ได้รวดเร็ว และตรวจพบ neutralizing antibody ในซีรัมสุกรได้ที่ 10-14 วัน หลังได้รับเชื้อ พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อไวรัสสัปปะในสัตว์ทุกชนิดเริ่มต้นจากเส้นเลือดในเยื่อภายใน

อาการ

สุกรทุกอายุสามารถติดเชื้อไวรัสสัปปะได้ สุกรที่ป่วยเป็นโรคใช้สมองอักเสบนิปาห์มีอาการที่ไม่เฉพาะเจาะจงจึงควรมีการวินิจฉัยแยกจากโรคอื่นที่มีอาการคล้ายกัน ซึ่งได้แก่ โรคคหิวคัสด์สุกร โรคพอร์อาร์เอส โรคอูเอสกี โรคปอดบวมที่เกิดจากการติดเชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae* (swine enzootic pneumonia), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (porcine pleuropneumoniae), *Pasteurella multocida* (Pasteurellosis) สุกรที่ป่วยด้วยโรคดังกล่าวข้างต้น มักไม่ตาย แต่ถ้าติดเชื้อใช้สมองอักเสบนิปาห์จะมีอาการทางระบบหายใจ ระบบประสาทและมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น ให้สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการติดเชื้อใช้สมองอักเสบนิปาห์

สุกรหย่านมและสุกรขุน

สุกรหย่านมและสุกรขุนจะพบป่วยกะทันหัน มีไข้และอาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่น หายใจเร็ว หอบ และไอแห้ง ในรายที่เป็นรุนแรงจะมีเลือดออกทางจมูก รายที่รุนแรงน้อยจะพบอาการอ้าปากหายใจ และอาจพบอาการทางประสาท อาการสั่น ลำตัวบิด กล้ามเนื้อเกร็ง ขาหลังไม่มีแรง ขาเจ็บ หรือเป็นอัมพาต เกร็ง

สุกรพ่อ-แม่พันธุ์

สุกรพ่อ-แม่พันธุ์ที่เป็นโรคจะตายกะทันหันชั่วข้ามคืน หรือป่วยมีไข้เฉียบพลัน หายใจลำบาก น้ำลายไหล น้ำมูกมีลักษณะใส หรือเป็นหนองปนเลือดออกจากช่องจมูก (รูปที่ 4.2) สุกรป่วยจะมีอาการทางระบบประสาท เช่น เดินเซ หัวตก อาการเกร็งแบบ tetanus กัดฟัน เคี้ยวปาก และกล้ามเนื้อเกี่ยวกับการกลืนเป็นอัมพาต สุกรที่ตั้งท้องจะพบการแท้งลูก ในแม่สุกรที่ซึ่มให้ผลบวกแต่มีสุขภาพแข็งแรง พบว่ายังสามารถเลี้ยงลูกให้มีสุขภาพแข็งแรงได้



รูปที่ 4.2 สุกรพ่อ-แม่พันธุ์ป่วยด้วยโรคไซ้สมองอักเสบนิปาร์ จะพบการตายกะทันหัน มีน้ำมูกใสหรือเป็นหนองปนเลือดจากช่องจมูก (CSIRO, AAHL)

สุกรดูดนม

พบอัตราการตายในสุกรดูดนมสูงถึง 40% ผลการติดเชื้อในลูกสุกรดูดนม และแม่สุกรต่อการเลี้ยงลูกไม่ทราบแน่ชัด ลูกสุกรส่วนใหญ่จะมีอาการอ้าปากหายใจ ขาไม่มีแรง กล้ามเนื้อสั่นและลำตัวบิด ซึ่งเป็นอาการทางประสาท

สัตว์ชนิดอื่นที่สามารถติดเชื้อไวรัสสปีนปาร์

สุนัขและแมว

ขณะที่มีการระบาดของโรคไข้มองอึกเสบนิปาร์ในสุกรในประเทศมาเลเซีย พบมีสุนัขตาย ซึ่งขณะป่วยสุนัขมีอาการคล้ายโรค distemper สามารถแยกเชื้อไวรัสสปีนปาร์ได้จากสุนัข 1 ตัว และตรวจพบเชื้อในเนื้อเยื่อจากอวัยวะสุนัขสองตัวด้วย วิธี immunoperoxidase staining (Chua et al., 2000) จากการสำรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสสปีนปาร์ โดยวิธี ELISA ในสุนัขที่มีสุขภาพปกติ ซึ่งเลี้ยงอยู่ในบริเวณที่เกิดโรคพบว่าสุนัข 50% มีแอนติบอดีต่อโรคไข้มองอึกเสบนิปาร์ บางฟาร์มรายงานว่าไม่มีแมวป่วย และได้มีการยืนยันโดยการฉีดเชื้อเข้าแมวทดลอง พบว่าแมวสามารถติดเชื้อไวรัสสปีนปาร์ได้ (Middleton et al., 2001)

ม้า

ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสสปีนปาร์ในซีรัมม้า จำนวน 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างซีรัมม้าส่งตรวจ จำนวน 3,000 ตัว ด้วยวิธี serum neutralization และในม้า 1 ตัว ที่มีอาการทางประสาท เมื่อตรวจเนื้อเยื่อที่ถูกตรึง (fix) ด้วยฟอร์มาลีน โดยเทคนิค immunohistochemistry (IHC) พบให้ผลบวกต่อการติดเชื้อไวรัสสปีนปาร์ ม้าเหล่านี้ เป็นม้าที่เลี้ยงท่ามกลางฟาร์มสุกรที่เกิดโรค

นกและหนู

ไม่พบการติดเชื้อไวรัสสปีนปาร์

รอยโรค

การตรวจหารอยโรคในสุกร ต้องทำการผ่าซากสุกรที่เพิ่งตายหรือสุกรที่มีอาการแบบเฉียบพลัน การคัดเลือกสุกร เพื่อทำการผ่าซากต้องเลือกสุกรที่เป็นตัวแทนของสุกรทุกอายุ และทุกกลุ่ม และจำนวนที่เหมาะสม

รอยโรคจากการผ่าซากในสุกรที่เป็นโรคไข้มองอึกเสบนิปาร์มีลักษณะไม่จำเพาะ อวัยวะที่สำคัญได้แก่ ปอด และเยื่อหุ้มสมอง ในสุกรส่วนใหญ่จะพบปอดมีลักษณะแน่น มีฟองอากาศ และจุดเลือดออกขนาดเล็ก รวมทั้งมีก้อนลิ่มเลือดในทางเดินอากาศในปอด เมื่อเปิดผ่าปอดจะพบเยื่อเกี่ยวพันระหว่างปอดขยายตัว เยื่อหุ้มปอดมีเลือดคั่ง ไม่พบรอยโรคที่อวัยวะภายในอื่นๆ

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

ในการผ่าซากเก็บตัวอย่างสุกรที่สงสัยป่วยด้วยโรคไข้มองอึกเสบนิปาร์ ควรมีการเตรียมความพร้อมในด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ (รูปที่ 4.3) เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากการผ่าซาก เนื่องจากเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน การติดเชื้อในสุกรจะเกี่ยวข้องกับเยื่อทางเดินหายใจ การเกิด syncytia เป็นรอยโรคหนึ่งทางจุลพยาธิวิทยาของการติดเชื้อไวรัสสปีนปาร์ (รูปที่ 4.4) แต่อาจตรวจไม่พบในทุกระยะของการติดเชื้อ การตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา สามารถใช้เป็นวิธีการหนึ่งในการวินิจฉัยโรค แต่ในกรณีที่มีการติดเชื้ออื่นที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ปอด และสมองร่วม

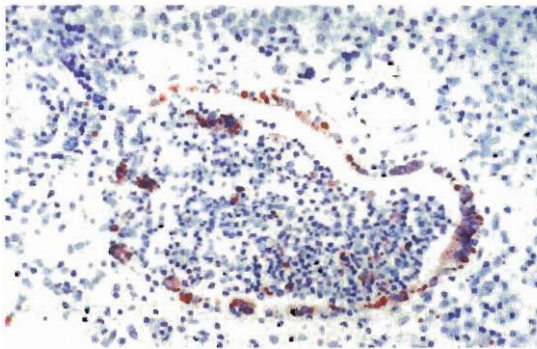
ด้วย เช่น โรคอหิวาต์สุกร หรือ enzootic pneumonia ไม่ว่าจะเกิดก่อนหรือหลังจากการติดเชื้อไวรัสสปีท์ จะทำให้ไม่สามารถใช้วินิจฉัยแยกจากโรคเหล่านี้ได้ สุกรที่ติดเชื้อไวรัสสปีท์ส่วนใหญ่จะพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ดังนี้

- | | |
|------------------------|--|
| ปอด | - พบเส้นเลือดอักเสบ ร่วมกับการถูกทำลายของไฟบริน มีเลือดออก และการรวมกลุ่มของเซลล์ mononuclear ซึ่งอาจทำให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือด พบ interstitial pneumonia ระดับรุนแรงมาก และรุนแรงปานกลางร่วมกับ hemorrhage ทั่วๆ ไปที่ interlobular septa และพบเซลล์ลักษณะ syncytial ของ endothelial cells ของเส้นเลือด |
| หลอดลม | - มีการขยายตัวของ columnar epithelium การรวมตัวของเซลล์ น้ำเหลืองรอบๆ และภายในหลอดลม ทำให้มีเสมหะซึ่งอาจมีส่วนประกอบของเซลล์ที่ยังมีชีวิต หรือเซลล์ที่ตายแล้ว หรือเศษเซลล์ รวมทั้งมีการตายของเซลล์ columnar แบบเซลล์เดี่ยวๆ และพบ neutrophil จำนวนมาก |
| ถุงลม | - พบ neutrophil จำนวนมากและพบเซลล์ลักษณะ syncytial ของ endothelial cells ของเส้นเลือด |
| สมอง | - พบเยื่อหุ้มสมองอักเสบ มีลักษณะบวม และมีการรวมตัวของเซลล์ น้ำเหลือง เซลล์พลาสมาและเซลล์ macrophage นอกจากนี้ยังพบ เส้นเลือดอักเสบมีลักษณะผนังเส้นเลือดบวม และพบเซลล์ macrophage ปะปนอยู่บ้าง |
| ไต และ lymphoid tissue | - พบเส้นเลือดอักเสบ ร่วมกับการถูกทำลายของไฟบริน เลือดออก และการรวมกลุ่มของเซลล์ mononuclear ซึ่งอาจทำให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือด |

จากการตรวจโดยวิธี immunohistology พบเชื้อไวรัสจำนวนมากใน endothelial cell ของเส้นเลือด โดยเฉพาะเส้นเลือดในปอด นอกจากนี้ยังพบเชื้อไวรัสในเศษเซลล์ที่ตายแล้วในช่องทางเดินหายใจ (Hooper et al., 2001)



รูปที่ 4.3 การผ่าซากสุกรที่สงสัยป่วยด้วยโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์
ควรมีการเตรียมความพร้อมในด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ
(CSIRO, AAHL)



รูปที่ 4.4 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ลักษณะ syncytia ของสุกรติดเชื้อไวรัสนิปาห์
(CSIRO, AAHL)

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ประกอบด้วยการวินิจฉัยเบื้องต้น โดยสังเกตจากอาการสัตว์ป่วย แต่เนื่องจากอาการจะคล้ายกับโรคที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ และระบบประสาท ดังนั้นจำเป็นต้องส่งวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ เช่น การตรวจทางซีรัมวิทยา จุลพยาธิวิทยา immunohistochemistry การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) และการแยกเชื้อไวรัส

การรักษา

ในระหว่างที่มีการระบาดของโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ในประเทศมาเลเซียไม่มีการรักษาในสุกร ในคนที่ติดเชื้อต้องมีการดูแลที่เข้มงวด โดยการให้อยู่ในที่ที่มีอากาศถ่ายเทได้ดีเพื่อบรรเทาอาการทาง

ระบบประสาท ไม่มีการรักษาที่จำเพาะ มีรายงานการรักษาคนที่ติดเชื้อไซ้สมองอักเสบนิปาห์ โดยการให้ยา Ribavirin ในผู้ป่วยพบว่ายาดังกล่าวอาจลดอัตราการตายในคน แต่การรักษาในสัตว์ทดลองไม่ได้ผล

การควบคุมและป้องกันโรค

มีการเข้มงวดกักกันสัตว์และทำลายสุกรทุกตัวที่ติดเชื้อหรือสัมผัสเชื้อ การสำรวจโรคเชิงรุกและการทำลายสัตว์ติดเชื้อเป็นวิธีการกำจัดเชื้อและทำให้สุกรปลอดจากโรค การตรวจหาเชื้อไวรัสในสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค เช่น ค้างคาว รวมทั้งการสร้างระบบความปลอดภัยทางชีวภาพในฟาร์มจะทำให้ทราบสาเหตุได้ล่วงหน้า และสามารถควบคุมไม่ให้โรคแพร่กระจายได้ ในขณะนี้ยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันโรค ดังนั้นจึงควรมีการเตรียมความพร้อมและการเฝ้าระวังโรคที่เข้มงวดเพื่อป้องกันการสูญเสียทางเศรษฐกิจ

บรรณานุกรม

- CDC 1999. Outbreak of Hendra-like virus - Malaysia and Singapore, 1998-1999. Morbidity & Mortality Weekly Report, 48: 265-269.
- Chua K, Bellini W, Rota P, Harcourt B, Tamin A, Lam S, Ksiazek T, Rollin P, Zaki S, Shieh W. J, Goldsmith C, Gubler D. Roehrig J, Eaton B, Gould A, Olson J, Field H, Daniels P, Ling A, Peters C, Anderson L and Mahy B. 2000. Nipah virus: A recently emergent deadly paramyxovirus. Science, 288: 1432-1435.
- Chua KB, Goh K. J, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PSK, Ksiazek TG, Zaki SR, Paul G, Lam SK and Tan CT. 1999. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig farmers in Malaysia. The Lancet, 354: 1256-59.
- Hooper P, Zaki S, Daniels P. and Middleton D. 2001. Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. Microbes and Infection: 3: 315-322.
- Hyatt A, Zaki S, Goldsmith C, Wise T and Hengstberger, S. 2001. Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cell culture and host animals. Microbes and Infection, 3: 279-306.
- Luby SP, Rahman M, Hossain MJ, Blum LS, Husain MM, Gurley E, Khan R, Ahmed BN, Rahman S, Nahar N, Kenah E, Comer JA and Ksiazek TG. 2006. Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. Emerg Infect Dis, 12: 1888-1894.

- Middleton D, Westbury H, Morrissy C, Van der Heide B, Russell G, Braun M. and Hyatt, A. 2001. Experimental Nipah virus infection in pigs and cats. *Compar Pathol*, 124-136.
- Paton N, Leo Y, Zaki S, Auchus A, Lee K, Ling A, Chew S, Ang B, Rollin P, Umapathi T, Sng I, Lee C, Lim E and Ksiazek T. 1999. Outbreak of Nipah virus infection among abattoir workers in Singapore. *The Lancet*, 354: 1253-56.
- Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Boongird K, Wanghongsa S, Chanhom L, Rollin P, Stockton P, Rupprecht CE, Ksiazek TE and Hemachudha T. 2005. Bat Nipah Virus, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 11(12): 1949-1951.
- Wahed F, Kader SA, Akhtarunnessa and Mahamud MM. 2011. Nipah Virus: An emergent deadly paramyxovirus infection in Bangladesh. *J Bangladesh Soc Physiol*, 6(2): 134-139.

การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสระบบทางเดินหายใจในสุกร ทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสระบบทางเดินหายใจในสุกรทางห้องปฏิบัติการมีแนวทางการวินิจฉัยโรคดังนี้ การแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค การตรวจหาไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจ และการตรวจทางซีรัมวิทยา นอกจากนั้นการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วย และการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมจะช่วยให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้อง

การแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค

เป็นวิธีมาตรฐานของการวินิจฉัยโรคทางไวรัสวิทยา การแยกเชื้อไวรัสสามารถเพาะแยกเชื้อในสิ่งมีชีวิต เช่น เซลล์เพาะเลี้ยง ไข่ฟัก และสัตว์ทดลอง หลังการเพาะแยกเชื้อไวรัสได้แล้ว เชื้อไวรัสบางชนิดอาจก่อหรือไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect; CPE) จึงต้องนำไปพิสูจน์ชนิดของเชื้อโดยพิจารณาเลือกใช้วิธีเช่นเดียวกับการตรวจหาไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจหรือการตรวจทางซีรัมวิทยา

การตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจ

สามารถตรวจโดยวิธีดังนี้ immunofluorescent antibody (FA) technique, immunoperoxidase (IP) staining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), electron microscopy (EM), immunoelectron microscopy (IEM) และ molecular technique

การตรวจทางซีรัมวิทยา

สามารถตรวจได้โดย enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), virus neutralization (VN) test, complement fixation (CF) test, immunodiffusion (ID) test และ hemagglutination inhibition (HI) test

นอกจากนั้นการเก็บตัวอย่างสัตว์ป่วยเพื่อส่งตรวจห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาก็มีความจำเป็นเพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำ มีข้อควรปฏิบัติดังนี้ เก็บตัวอย่างเป้าหมายที่เหมาะสมในแต่ละโรค เก็บตัวอย่างในสารที่เหมาะสม เช่น viral transport media (VTM) สำหรับตัวอย่างปัสสาวะ เป็นต้น และเก็บตัวอย่างในภาชนะที่สะอาดและรักษาความเย็นได้

สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อส่งตรวจห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ควรเก็บตัวอย่างให้ปลอดภัย ปั่นเป็นชิ้นๆ เก็บเลือดแล้วรีบนำส่งห้องปฏิบัติการโดยไม่ต้องแช่เย็น และห้ามแช่เลือดที่ยังไม่ได้แยกเม็ดเลือดแดงออกในช่องแช่แข็ง ส่วนซีรัมที่แยกเม็ดเลือดแดงออกแล้วสามารถแช่แข็งได้

การตรวจวินิจฉัยโรคพาร์อาร์เอส

การแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

การแยกเชื้อพาร์อาร์เอส (PRRS) สามารถทำได้โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์ที่ใช้แยกเชื้อไวรัส ได้แก่ เซลล์ macrophage จากปอดสุกร (porcine alveolar macrophage, PAM) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความไวในการแยกเชื้อมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ CL-2621 หรือเซลล์ MARC-145 เซลล์ MARC-145 เป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากเซลล์ MA-104 ซึ่งเป็นเซลล์ไตลิง สามารถใช้แยกเชื้อ PRRS บางสเตรนได้ ตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการแยกเชื้อไวรัส ได้แก่ ซีรัม ปอด และต่อมน้ำเหลือง ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้ดีหลังจากสุกรได้รับเชื้อ 4-28 วัน ในระยะที่เชื้อแฝงตัว ตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ ทอนซิล ต่อมน้ำเหลืองหรือการขูดจากคอหอยหลังช่องปาก (oropharynx) ซึ่งดีกว่าการใช้ตัวอย่างจากซีรัมหรือปอด

การเตรียมเซลล์ macrophage จากปอดสุกร

สุกรที่จะนำมาเตรียมทำเซลล์ macrophage ควรมีอายุไม่เกิน 4 สัปดาห์ มีสุขภาพดี ปราศจากการติดเชื้อ PRRS ทำการผ่าซากนำปอดออกมา ล้างเซลล์ macrophage ภายในปอดด้วย phosphate buffer saline (PBS) 3-4 ครั้ง รวม 200 มล. นำมาปั่นที่ 1,000 g นาน 10 นาที ได้ตะกอนเซลล์ นำมาล้างด้วย PBS อีก 2 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายนำเซลล์มาละลายใน PBS 50 มล. นับจำนวนเซลล์ คำนวณให้ได้เซลล์ 4×10^7 เซลล์/มล. เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หากเตรียมเซลล์ macrophage จากสุกรหลายตัวควรแยกเก็บแต่ละตัวไม่ควรนำมารวมกัน

การทดสอบความไวของเซลล์ macrophage ต่อเชื้อ PRRS

ก่อนนำ macrophage ไปใช้ควรมีการทดสอบความไวของเซลล์ต่อเชื้อไวรัส PRRS ที่ทราบไโดเตอร์แล้ว โดยนำเชื้อไวรัสมาไตเตรทในเซลล์ macrophage รวมทั้งนำไปทดสอบด้วยวิธี serum neutralization กับซีรัมควบคุมบวกและควบคุมลบโดยย้อมเซลล์ด้วยวิธี immunoperoxidase เซลล์ macrophage ที่จะนำไปใช้ได้อีกก็ต่อเมื่อสามารถใช้ทดสอบหาไโดเตอร์ของเชื้อไวรัส และไโดเตอร์ของซีรัมตามที่ได้เคยทดสอบไว้ นอกจากนี้ซีรัมวัวที่จะนำมาใช้เป็นส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ต้องปลอดจากเชื้อ pestivirus ด้วย

การแยกเชื้อไวรัส PRRS โดยใช้เซลล์ macrophage มีขั้นตอนดังนี้

1. การเพาะเซลล์ในไมโครเพลท

นำเซลล์ macrophage ออกจากถังไนโตรเจนเหลว 1 หลอดซึ่งมีเซลล์ 4×10^7 เซลล์/มล. ล้างเซลล์ด้วย PBS 50 มล. ปั่นที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 300 g นาน 10 นาที นำเซลล์มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ (อาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย MEM ที่มีส่วนประกอบของ 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, penicillin 100 IU และ streptomycin 100 ไมโครกรัม)

ซึ่งมีส่วนผสมของซีรัมวัว 5% แยกเซลล์ในไมโครเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีเซลล์ 1×10^5 เซลล์/หลุม บ่มไมโครเพลทที่ 37°C นาน 1-2 วัน เซลล์จำนวน 1 หลอด จะเพาะเซลล์ในไมโครเพลทได้ 4 เพลท

2. การเตรียมตัวอย่างในไมโครเพลทสำหรับเชื้อจางตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ ซีรัมหรือตัวอย่างของทอนซิล ปอด ต่อม้ำน้ำเหลือง และม้ามบด ที่ทำให้มีความเข้มข้น 10% น้ำหนัก/ปริมาตร โดยใช้ PBS แยกอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในไมโครเพลทสำหรับเชื้อจางตัวอย่าง หลุมละ 90 ไมโครลิตร ทุกหลุมยกเว้นคอลัมน์ 12E-12H (รูปที่ 5.1) เติมตัวอย่างจำนวน 10 ไมโครลิตร ในแถว A และ E โดย 1 ตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ ยกเว้นคอลัมน์ 11E-11H และคอลัมน์ 12E-12H โดยเติมตัวอย่างควบคุมบวกลงในหลุม 11E-11H ส่วนหลุม 12E-12H เป็นหลุมเซลล์ควบคุม เชื้อจางตัวอย่างโดยดูดตัวอย่างจากแถว A และ E (ตัวอย่างเชื้อจาง 1:10) ไปยังแถว B และ F (เชื้อจาง 1:100) ผสมตัวอย่างให้เข้ากันดูดตัวอย่างจากแถว B และ F ไปยังแถว C และ G (เชื้อจาง 1:1,000) ผสมตัวอย่างและดูดตัวอย่างจากแถว C และ G ไปยังแถว D และ H (เชื้อจาง 1:10,000) ไมโครเพลท 1 เพลทใช้ตรวจได้ 11 ตัวอย่าง ดูดตัวอย่างที่เชื้อจางแล้วในแต่ละความเข้มข้นจากไมโครเพลทเชื้อจางตัวอย่าง หลุมละ 50 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลทที่มีเซลล์ macrophage ที่เตรียมไว้โดยเรียงลำดับตัวอย่างตามไมโครเพลทเชื้อจางตัวอย่าง นำไมโครเพลทไปบ่มที่ 37°C

3. การอ่านผล

ตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัส PRRS จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ภายใน 2-4 วัน หากไม่พบการเกิด CPE ต้องนำไปผ่านเซลล์เป็น passage ที่ 2 หลังจากเพาะเชื้อ passage แรก 2-4 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (CPE) ทุกวันเป็นเวลา 2-4 วัน โดยในวันที่ 2 ของการผ่านเซลล์ passage 1 ในน้ำเซลล์จากถังไนโตรเจนเหลวมาเพาะเลี้ยงในไมโครเพลท แล้วดูดตัวอย่างจาก passage 1 ลงในเซลล์ macrophage ที่เพาะเลี้ยงใหม่เป็น passage ที่ 2 สังเกตการเกิด CPE ทุกวัน

4. การแปลผล

4.1 หลุมที่เกิด CPE ใน passage แรกอย่างเดียว การแปลผล - ผลบวกสูง
(อาจเนื่องจากตัวอย่างมีผลต่อเซลล์)

4.2 เกิด CPE 2 passage การแปลผล ให้ผลสงสัย

ยืนยันผลโดยการนำไมโครเพลทไปย้อมเซลล์ด้วยวิธี immunoperoxidase โดยใช้ซีรัมบวกต่อ PRRS หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ PRRS หลุมที่ให้ผลบวกเซลล์จะติดสีแดงเข้ม ส่วนหลุมที่ให้ผลลบ เซลล์จะไม่ติดสีโดยดูเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมบวกและหลุมเซลล์ควบคุม

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
10	A	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	
100	B													
1,000	C													
10,000	D													
10	E	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	+	C	
100	F												C	
1,000	G												C	
10,000	H												C	

1-11 = หมายเลขตัวอย่าง
+ = ตัวอย่างควบคุมบวก
C = เซลล์ควบคุม

รูปที่ 5.1 การแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

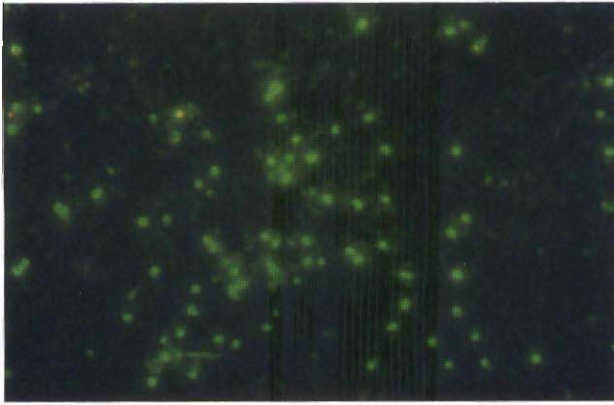
การตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจ

วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับความพร้อมของแต่ละห้องปฏิบัติการ

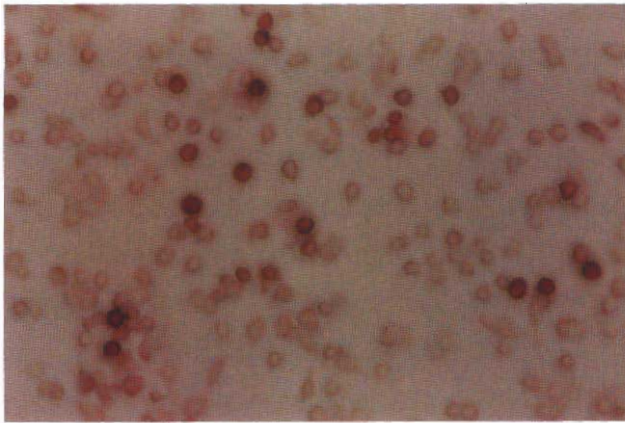
1. วิธี fluorescent antibody technique (FAT) สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (รูปที่ 5.2) และเนื้อเยื่อแช่แข็ง อวัยวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจโดยวิธีนี้ ได้แก่ ปอดและต่อมน้ำเหลือง เซลล์ที่มีเชื้อไวรัส PRRS จะพบการเรืองแสงสีเขียว

2. วิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) สามารถใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสในตัวอย่างที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงและย้อมเซลล์ด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay เซลล์ที่มีเชื้อไวรัส PRRS จะติดสีแดงเข้ม (รูปที่ 5.3)

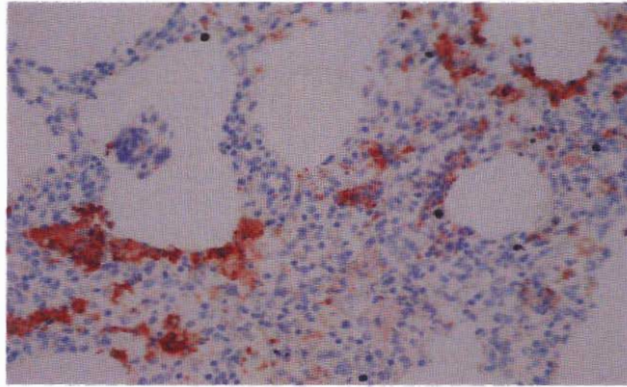
3. วิธี immunohistochemistry (IHC) ใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสในตัวอย่างอวัยวะที่ตรึงด้วยฟอร์มาลีน เช่น ปอด หัวใจ ไต ม้าม ต่อมน้ำเหลือง ต่อมทอนซิลและต่อมธัยมัส เซลล์ที่มีเชื้อไวรัส PRRS จะติดสีแดงเข้ม (รูปที่ 5.4) การตรวจโดยวิธี IHC มีความไวต่อการพบเชื้อมากกว่าวิธี FAT แต่การตรวจด้วยวิธี FAT ให้ผลรวดเร็ว และประหยัด ข้อจำกัดของ วิธี FAT คือต้องใช้เนื้อเยื่อสด และต้องอาศัยความชำนาญ ถึงแม้ว่าผลการตรวจโดยวิธี FAT และ IHC จะให้ผลบวกจำเป็นต้องมีการตรวจโดยการแยกเชื้อไวรัส หรือวิธี polymerase chain reaction (PCR) เพื่อยืนยันผลการตรวจ



รูปที่ 5.2 เซลล์ porcine alveolar macrophage ที่ติดเชื้อพาร์อาร์เอส
พบการเรืองแสงสีเขียวด้วยวิธี fluorescent antibody technique
(NIAH, Thailand)



รูปที่ 5.3 เชื้อพาร์อาร์เอส ในเซลล์เพาะเลี้ยง porcine alveolar macrophage
ติดสีแดงเข้มด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay
(NIAH, Thailand)



รูปที่ 5.4 เนื้อเยื่อปอดสุกรติดเชื้อพอร์คิอาร์อาร์เอส พบเซลล์ติดสีแดงเข้ม
ตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry

4. การตรวจสอบพันธุกรรมของเชื้อไวรัส

การตรวจสอบพันธุกรรมมีวิธีการตรวจหลายวิธี ได้แก่ วิธี polymerase chain reaction (PCR), nested PCR, real-time PCR และ sequencing ตัวอย่างที่ใช้สามารถใช้ซีรัม หรือตัวอย่างอวัยวะระบบทางเดินหายใจ และระบบต่อมน้ำเหลือง ข้อดีของวิธี PCR เป็นวิธีที่ให้ผลภายใน 1-2 วัน มีความไว และความจำเพาะสูง นอกจากนี้ยังใช้ตรวจในกรณีตัวอย่างไม่เหมาะสมสำหรับการแยกเชื้อไวรัส เช่น น้ำเชื้อ หรือเนื้อเยื่อที่ย่อยสลาย เน่า หรือถูกความร้อนระหว่างขนส่ง ข้อเสีย คือ มีค่าใช้จ่ายสูง และปัญหาเรื่องผลบวกปลอม ในการปฏิบัติงานการตรวจสอบพันธุกรรม มีข้อควรระวังในเรื่องการปนเปื้อนของ amplified PCR product ภายในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นควรมีตัวอย่างควบคุมลบในขั้นตอนต่างๆ ของการทำ PCR และผู้ปฏิบัติงานควรมีความชำนาญ และมีขบวนการประกันคุณภาพ การทดสอบในทุกห้องปฏิบัติการ วิธีการตรวจสอบพันธุกรรม มีดังนี้

4.1 วิธี PCR เป็นวิธีตรวจหา nucleic acid ของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อปอด ซีรัม น้ำเชื้อ เนื้อเยื่อในช่องปาก หรือน้ำล้างปอด วิธี PCR มีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีแยกเชื้อไวรัส วิธี IHC หรือวิธี FAT เช่น มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจหา RNA ได้ในสุกรที่เป็นโรคทั้งแบบเฉียบพลัน และแบบแฝง สามารถตรวจหา RNA ในตัวอย่างที่แยกเชื้อได้ยาก เช่น ตัวอย่างของสุกรที่ย่อยสลายแล้ว น้ำเชื้อและมูลสัตว์ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ได้ผลรวดเร็วภายใน 1-2 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นซึ่งอาจใช้เวลาเป็นสัปดาห์ และ PCR product สามารถนำไปศึกษาพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยศึกษาการเรียงลำดับเบสของยีนซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพด้านการวินิจฉัยโรค ในระยะที่เชื้อแฝงตัว (persistent) การตรวจเนื้อเยื่อที่ขูดจากบริเวณคอหอยหลังช่องปาก โดยวิธี PCR ให้ความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัส PRRS การใช้วิธี PCR สามารถตรวจพบ nucleic acid ของเชื้อไวรัสในต่อมน้ำเหลืองได้นาน 86 วัน หลังได้รับเชื้อ ในน้ำเชื่อนาน 92 วัน ในเนื้อเยื่อ

คอหอยหลังช่องปากนาน 105 วัน และในซีรัมและต่อมทอนซิลบดนาน 251 วัน (Will et al., 2003) ห้องปฏิบัติการสามารถใช้วิธี nested PCR เพื่อให้ได้ผลผลิต PCR ที่มากขึ้น โดยอาศัย PCR 2 ขั้นตอนด้วย primers 2 คู่ วิธี PCR มีขั้นตอนดังนี้

การสกัด RNA จากตัวอย่างส่งตรวจ หรือตัวอย่างที่ต้องการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ เชื้อ ในบางห้องปฏิบัติการอาจสกัดด้วย acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform ปัจจุบันนิยมใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปซึ่งสามารถเลือกใช้ตามชนิดของตัวอย่างส่งตรวจ การสกัด RNA ให้ได้ปริมาณมาก และสมบูรณ์ต้องอาศัยความชำนาญในระดับหนึ่ง เนื่องจาก RNA จะสลายตัวได้ง่าย รวดเร็ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด RNA ควรปลอดจาก RNase ควรใส่ถุงมือทุกครั้งที่ต้องจับ อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด RNA เนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อน RNase จากผิวหนังของผู้ปฏิบัติงานได้

การเปลี่ยนสาย RNA genome ให้เป็น complementary DNA (cDNA) ในปฏิกิริยา reverse transcription

การเพิ่มจำนวนสาย DNA โดยการจำลอง DNA สายใหม่จากสาย DNA ต้นแบบด้วย DNA polymerase โดยใช้ DNA ตั้งต้นหรือ primer 1 คู่ ทำให้สังเคราะห์ DNA ได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน (denaturation, annealing และ extension) และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน และเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณ DNA ได้จำนวนมาก

การวิเคราะห์ DNA ด้วย agarose gel electrophoresis เป็นการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น โดยระยะทางที่ DNA เคลื่อนที่ไปได้ขึ้นกับขนาดของ DNA และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ DNA ที่แยกได้โดยวิธีนี้มองเห็นได้ เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ เช่น ethidium bromide (ETBr) ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

Primer สำหรับการตรวจเชื้อ PRRS forward 5'3' reverse 5'3'

1010F: ATG GCC AGC CAG TCA ATC A

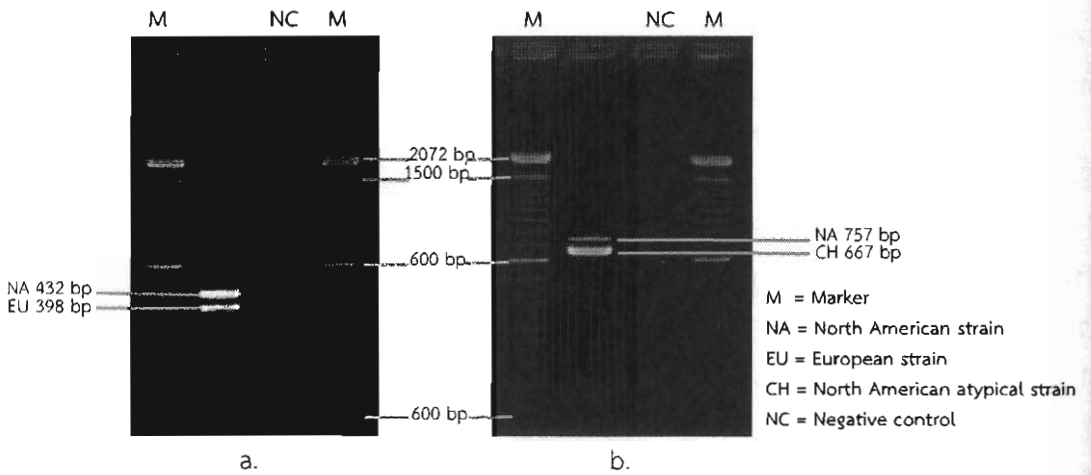
1011R: TCG CCC TAA TTG AAT AGG TG

(EU strain 398 bp, NA strain 432 bp, Mardassi et al., 1994) (รูปที่ 5.5 a)

NSP2F: AAA GAC CAG ATG GAG GAG GA

NSP2R: GAG CTG AGT ATT TTG GGC GTG

(NA atypical strain 667 bp, NA typical strain 757 bp, Xiao et al., 2008) (รูปที่ 5.5 b)



รูปที่ 5.5 ผลการตรวจสอบพันธุกรรมเชื้อฟลูอาร์อาร์เอส โดยวิธี polymerase chain reaction (a ตามวิธี Mardassi et al., 1994, b ตามวิธี Xiao et al., 2008)

4.2 วิธี real-time PCR

เนื่องจากวิธี PCR ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้แม้ว่าจะมีการพัฒนา quantitative PCR ในรูปแบบต่างๆแล้วก็ตาม วิธี PCR มีขบวนการหลายขั้นตอน ในทางปฏิบัติไม่เหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากๆ การอ่านผลอาศัยการทำ agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง ด้วยข้อจำกัดของวิธี PCR จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค real-time PCR โดยพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ การพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหา PCR product ในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporter) ต่างๆ การพัฒนาเครื่อง thermocycler โดยการเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR product และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR product ในหลอดปฏิกิริยา ดังนั้นการทำ real-time PCR จึงเป็นการเพิ่มขยายปริมาณ DNA โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณ PCR product ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ

การตรวจวัด PCR product จากการเกิดสัญญาณการเรืองแสง มี 2 วิธี

1. การใช้ non specific detection เช่น SYBRTM Green I, SYBRTM Gold, YOYOTM-1 และ AmpliflorTM เป็นต้น
2. การใช้ specific detection เช่น hybridization probe, hydrolysis probe (TaqManTM), molecular beacons และ scorpion เป็นต้น

การจะเลือกใช้วิธีใดขึ้นกับความชำนาญของผู้ปฏิบัติ รวมทั้งข้อดีและข้อด้อยของแต่ละวิธี เช่น วิธีที่ 1 SYBR green ไม่ specific ต้องเสียเวลา optimize และต้องทำ melting point curve amplicon นาน ทำให้ signal มากขึ้น แต่ข้อดีคือจะมีราคาถูกกว่าวิธีที่ 2

Primers และ probes สำหรับการตรวจเชื้อ PRRS

Primers NA strain ORF7 forward 5'3' reverse 5'3'

17F1: ATG ATG RGC TGG CAT TCT

17F2: GTR ATG RGC TGG CAT TCC

17R: ACA CGG TCG CCC TAA TTG

Probe 17P: FAM-TGT GGT GAA TGG CAC TGA TTG ACA-TAMRA

(Kleiboeker et al., 2005) (รูปที่ 5.6)

Primers EU strain ORF7 forward 5'3' reverse 5'3'

18F: GCA CCA CCT CAC CCA GAC

18R: CAG TTC CTG CGC CTT GAT

Probe 18P: HEX-CCT CTG CTT GCA ATC GAT CCA GAC-TAMRA

(Kleiboeker et al., 2005) (รูปที่ 5.6)

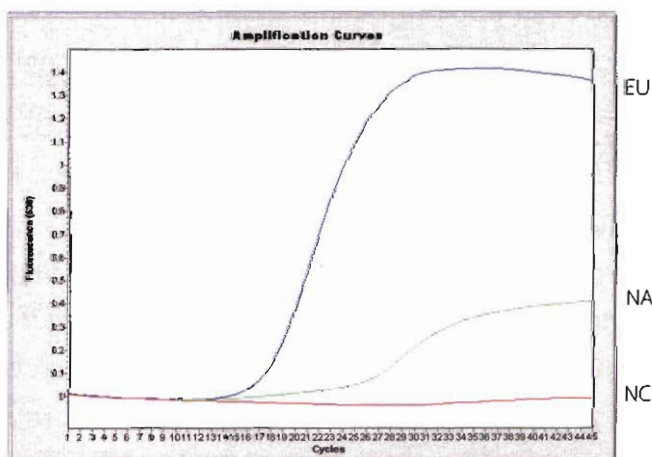
Primers NA atypical strain NSP2 forward 5'3' reverse 5'3'

52F: CCC AAG CTG ATG ACA CCT TTG

52R: AAT CCA GAG GCT CAT CCT GGT

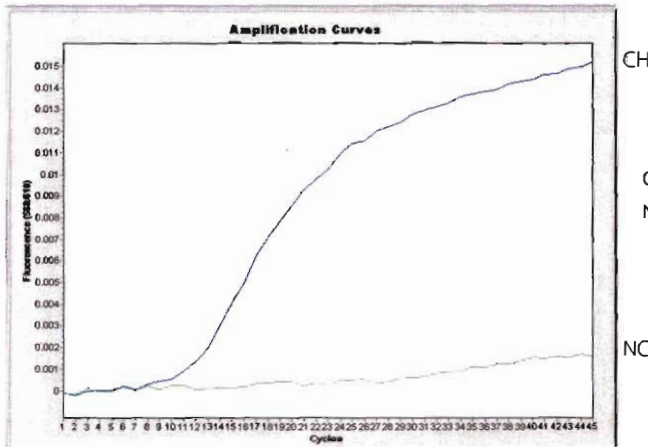
Probe 52P: FAM-CGC GTA GAA CTG TGA CAA CAA CGC TGA-TAMRA

(Xiao et al., 2008) (รูปที่ 5.7)



EU = European strain
NA = North American strain
NC = Negative control

รูปที่ 5.6 การตรวจสอบสารพันธุกรรมเชื้อพาร์อาร์เอส โดยวิธี real-time PCR
(Kleiboeker et al., 2005)



รูปที่ 5.7 ผลการตรวจสอบพันธุกรรมเชื้อพาร์อาร์เอส โดยวิธี real-time PCR (Xiao et al., 2008)

4.3 วิธี sequencing

วิธี sequencing เป็นการหาลำดับ nucleotide ของ DNA ซึ่งมี 3 วิธี

1. การหาลำดับ nucleotide โดยวิธีทางเคมี (chemical sequencing) โดยการตัดโมเลกุลของ DNA โดยใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์เฉพาะต่อนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว และติดตาม DNA โดยติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น ^{32}P และแยกขนาดของชิ้น DNA โดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis และอ่านค่าลำดับเบสจากแถบที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์

2. การหาลำดับ nucleotide โดยการใช้เอนไซม์ (enzymatic sequencing) วิธีนี้เป็นวิธีของ Sanger เรียก Sanger sequencing หรือ dideoxy sequencing โดยการใช้ enzyme มาต่อสาย DNA จาก primer ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

Sequence primers forward 5'3' reverse 5'3'

1010F: ATG GCC AGC CAG TCA ATC A

1011R: TCG CCC TAA TTG AAT AGG TG

(EU strain 398 bp, NA strain 430 bp, Mardassi et al., 1994)

NSP2F: AAA GAC CAG ATG GAG GAG GA

NSP2R: GAG CTG AGT ATT TTG GGC GTG

(NA atypical strain 666 bp, NA typical strain 756 bp, Xiao et al., 2008)

3. การหาลำดับ nucleotide โดยวิธี pyrosequencing

เป็นวิธีการหาลำดับ nucleotide ของเชื้อโรคแต่ละชนิดโดยไม่ต้องรู้ลำดับ nucleotide ของ primers และสามารถทำ whole genome sequencing ของเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และโปรโตซัวได้ หลายชนิดและหลายโรคในตัวอย่างเดียวกันได้ในระยะเวลาสั้นภายใน 1 สัปดาห์ เนื่องจากภายในเครื่องมี software สามารถทำการวิเคราะห์ whole genome ของเชื้อโรคได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่เครื่องหาลำดับ nucleotide แบบ Sanger ต้องใช้ software แยกต่างหาก

การตรวจทางซีรัมวิทยา

การตรวจทางซีรัมวิทยาคือเป็นที่ยอมรับในผู้ควบคุมดูแลฟาร์ม เนื่องจากซีรัมเป็นตัวอย่างที่เก็บได้ง่าย มีปริมาณเพียงพอที่จะนำไปทดสอบซ้ำได้หลายครั้งและสามารถเก็บเป็นซีรัมอ้างอิงสำหรับอนาคตได้ การตรวจทางซีรัมวิทยาเพื่อใช้วินิจฉัยว่าสุกรติดเชื้อหรือไม่ ต้องใช้ซีรัมที่เจาะขณะเกิดโรค และหลังเกิดโรค ซึ่งหากสุกรมีการติดเชื้อจะพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงทางซีรัมจากผลลบเป็นผลบวก อย่างไรก็ตามวิธีทางซีรัมวิทยาไม่สามารถใช้วินิจฉัยแยกระหว่างแอนติบอดีที่เกิดจากการติดเชื้อตามธรรมชาติหรือจากการฉีดวัคซีน ดังนั้นการใช้ซีรัมที่เจาะครั้งเดียวในการวินิจฉัยโรคจึงมีข้อจำกัด โดยเฉพาะในฟาร์มที่มีอัตราการพบผลบวกสูง นอกจากนี้การตรวจพบแอนติบอดีในสุกรอนุบาลอาจเนื่องจากได้รับ passive immunity จากแม่ซึ่งอาจตรวจพบภูมิคุ้มกันถ่ายทอดในลูกสุกรได้นาน 3-5 สัปดาห์ วิธีการตรวจทางซีรัมวิทยามีดังนี้

1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ได้มีการผลิตชุดทดสอบ ELISA ทางการค้าเพื่อใช้ตรวจแอนติบอดีต่อ PRRS เช่น Herd Check 2X PRRS ELISA IDEXX Laboratories ซึ่งใช้กันแพร่หลายมีความไว ความจำเพาะผ่านมาตรฐานและตรวจได้รวดเร็ว เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อ nucleocapsid ของเชื้อทั้งสายพันธุ์ NA และ EU สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้รวดเร็ว โดยตรวจพบหลังได้รับเชื้อ 9 วัน และระดับแอนติบอดีจะสูงสุดระหว่างวันที่ 30-50 หลังได้รับเชื้อ ต่อจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงและหมดภายใน 4-12 เดือน การแปลผลการตรวจโดยคำนวณจากค่า S/P ratio ค่า S/P เท่ากับหรือมากกว่า 0.4 แปลผลเป็นบวก ค่า S/P น้อยกว่า 0.4 แปลผลเป็นลบ การตรวจซีรัมที่เจาะครั้งเดียวจะแปลผลได้ยาก ซีรัมที่ตรวจให้ผลลบอาจเนื่องมาจากหลายกรณี เช่น สุกรไม่ได้รับเชื้อ สุกรได้รับเชื้อแล้วแต่ยังไม่ทันสร้างแอนติบอดี สุกรติดเชื้อแบบแฝง สุกรเคยติดเชื้อและสามารถกำจัดเชื้อได้หมดแล้ว หรือให้ผลลบเนื่องจากความไวของ ELISA ต่ำ

กรณีสุกรที่มีการติดเชื้อแบบแฝงและตรวจซีรัมที่ให้ผลลบโดยวิธี ELISA สามารถตรวจพบเชื้อหรือตรวจหา RNA ของเชื้อได้จากเนื้อเยื่อทอนซิลหรือจากเนื้อเยื่อชุดจากลำคอและคอกอหยอ การตรวจโดยวิธี ELISA พบให้ผลบวกलग 0.5-2.0% ในกรณีที่พบว่า ELISA ให้ผลบวกलग ต้องยืนยันด้วยวิธี IFA และ blocking ELISA การตรวจโดยวิธีนี้ไม่สามารถบอกถึงสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคได้

หรือบอกสถานะจากการติดเชื้อมีทั้งการตรวจหาไวรัสหรือจากการทำวัคซีน ข้อดีของการใช้วิธี ELISA คือ สามารถตรวจตัวอย่างซีรัมได้จำนวนมากและทราบผลเร็ว

2. Virus neutralization (VN)

เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง แต่สุกรจะสร้างนิวทรัลไลซิงแอนติบอดีหลังได้รับเชื้อมาแล้ว 1-2 เดือน ดังนั้นการตรวจโดยวิธีนี้จะให้ความไวต่ำกว่าวิธี IFA และวิธี ELISA (Benfield et al., 1992) โดยทั่วไปจะพบระดับแอนติบอดีสูงสุดที่ 60-90 วันหลังได้รับเชื้อ และตรวจพบนานถึง 1 ปี ในการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี VN หากใช้ไวรัสสายพันธุ์ที่สุกรได้รับจะทำให้ผลการตรวจแม่นยำมากขึ้นเช่นเดียวกับวิธี IFA โดยทั่วไปนิยมใช้ในงานวิจัยมากกว่างานด้านวินิจฉัยโรค

3. Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

การตรวจซีรัมโดยใช้วิธี IPMA โดยนำเซลล์ macrophage มาเพาะเลี้ยงในไมโครเพลท เมื่อเซลล์เกาะพื้นผิวแล้วเติมเชื้อ PRRS ลงในเซลล์ ให้เซลล์มีเชื้อไวรัส ประมาณ 30-50% ทำการตรึงเซลล์ด้วยสารตรึงเซลล์พร้อมที่จะนำไปใช้ทางซีรัมวิทยา หรืออาจใช้เซลล์ MARC-145 แทนเซลล์ macrophage นำซีรัมมาเจือจางแล้วใส่ในเซลล์ที่ทำให้ติดเชื้อ PRRS ซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PRRS แอนติบอดีจะจับกับเชื้อ PRRS ซึ่งอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ macrophage หรือเซลล์ MARC-145

วิธีทำ

1. การเพาะเซลล์ MARC-145 ในไมโครเพลท 96 หลุม และการเพาะเชื้อ PRRS
 - 1.1 เตรียมเซลล์ MARC-145 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมวัว 5% ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม และเติมเซลล์ลงในไมโครเพลท 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม
 - 1.2 นำไปบ่มในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% ที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง
 - 1.3 เติมเชื้อ PRRS ซึ่งได้ปรับตัวให้เจริญในเซลล์แล้วโดยมีปริมาณไวรัส $10^5 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$. หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยเว้นไว้ 2 แถวเป็นแถวควบคุม
 - 1.4 นำไปบ่มในตู้ CO_2 5% ที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง
2. การตรึงเซลล์
 - 2.1 เท media ออก แล้วล้างด้วย PBS 1 ครั้ง
 - 2.2 ทำการตรึงเซลล์ด้วยการเติม 4% formaldehyde ใน 1% PBS tween 20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที อาจใช้ absolute ethanol เป็นสารตรึงเซลล์ โดยบ่มที่ 5°C นาน 45 นาที หรือใช้ 80% acetone ที่แช่เย็น นำไปตรึงเซลล์นาน 45 นาที
 - 2.3 เทสารตรึงเซลล์ทิ้ง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS 1 ครั้ง
 - 2.4 ซับให้แห้งโดยเคาะเพลทเบาๆ เปิดฝาเพลท แล้วนำเพลทไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37°C นาน 45 นาที

- 2.5 นำไมโครเพลทไปแช่ที่ -20°C นาน 45 นาที โดยเปิดฝาไมโครเพลท ในกรณีที่ยังไม่ใช้ให้เก็บไมโครเพลท โดยปิดฝาไมโครเพลท และเก็บที่ -20°C
3. การเตรียมซีรัมในไมโครเพลทสำหรับเจือจางซีรัม
 - 3.1 เติมน้ำ PBS ในไมโครเพลทสำหรับเจือจางซีรัม หลุมละ 180 ไมโครลิตร ในแถว A และ E (รูปที่ 5.8)
 - 3.2 เติมน้ำ PBS 120 ไมโครลิตร ทุกหลุมที่เหลือ
 - 3.3 เติมน้ำซีรัมที่ต้องการตรวจ 20 ไมโครลิตร ลงในแถว A และ E โดยทดสอบตัวอย่างละ 2 ข้ำ ยกเว้น E11 และ E12 เติมน้ำซีรัมควบคุมบวกและซีรัมควบคุมลบ หลุมละ 20 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ซีรัม เจือจาง 1:10 ในแถว A และ E (ไมโครเพลท 1 เพลท ตรวจซีรัมได้ 11 ตัวอย่าง)
 - 3.4 เจือจางซีรัมแบบ 4 fold โดยดูดถ่ายจากแถว A และ E จำนวน 40 ไมโครลิตรไปยังแถว B และ F ไปเรื่อยๆ เพื่อเจือจางซีรัมเป็น 1:40, 1:160 และ 1:640
4. การบ่มซีรัมกับเซลล์ ที่ได้ตรงด้วยสารตรึงเซลล์
 - 4.1 ดูดซีรัมที่เจือจางแล้วจากไมโครเพลทสำหรับเจือจางซีรัม หลุมละ 50 ไมโครลิตร ไปยังไมโครเพลทที่มีเซลล์ MARC-145 ที่ตรึงแล้วโดยการเรียงตามลำดับในไมโครเพลทสำหรับเจือจางซีรัม จากนั้นปิดฝาไมโครเพลท แล้วนำไปบ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง
 - 4.2 เติมน้ำซีรัมในไมโครเพลททั้ง ล้างไมโครเพลท 3 ครั้ง ด้วย PBS ที่มี 0.5% tween 20
5. การบ่มกับคอนจูเกต
 - 5.1 เจือจางคอนจูเกต rabbit anti - swine horseradish peroxidase (HRPO) กับ 0.5% PBS tween 20 ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วเติมลงในไมโครเพลท หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดฝาไมโครเพลท นำไปบ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง
 - 5.2 ล้างไมโครเพลท 3 ครั้ง ด้วย 0.5% PBS tween 20
6. วิธีย้อมเซลล์
 - 6.1 เติมน้ำ 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, chromogen / substrate) ลงในไมโครเพลททุกหลุม ละ 50 ไมโครลิตร
 - 6.2 วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
 - 6.3 ล้างไมโครเพลท ด้วยน้ำ 2 ครั้ง
7. การอ่านและแปลผล

ถ้าซีรัมมีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส จะพบว่า 30-50% ของเซลล์มีการติดสีแดงเข้มใน cytoplasm ส่วนซีรัมที่ไม่มีแอนติบอดี เซลล์จะไม่ติดสี ซีรัมที่มี non-specific reaction เซลล์จะติด

สีทุกเซลล์ โดยดูเปรียบเทียบกับซีรัมควบคุมบวก การอ่านค่าไตเตอร์จะอ่านที่ส่วนกลับของค่าการเจือจาง (dilution) สูงสุดของซีรัมที่พบว่า 50% หรือมากกว่าของจำนวนหลุมของเซลล์ที่ติดสีแดงเข้ม
การแปลผล

ซีรัมไตเตอร์ < 1:10 ให้ผลลบ

ซีรัมไตเตอร์ระหว่าง 1:10 - 1:40 = ให้ผลบวกอย่างอ่อน

ซีรัมไตเตอร์ $\geq$ 1:160 = ให้ผลบวก

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
10	A	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	
40	B													
160	C													
640	D													
10	E	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	+	-	
40	F													
160	G													
640	H													

1-11 = หมายเลขตัวอย่าง
+ = ซีรัมควบคุมบวก
- = ซีรัมควบคุมลบ

รูปที่ 5.8 การตรวจฟิอาร์อาร์เอส แอนติบอดีโดยวิธี immunoperoxidase monolayer assay

4. Immunofluorescent assay (IFA) สำหรับการตรวจแอนติบอดี

การตรวจซีรัมโดยวิธี IFA สามารถเลือกใช้ไมโครเพลท หรือสไลด์ 8 หลุม โดยการเพาะเซลล์ MARC-145 และใช้เชื้อไวรัส PRRS ซึ่งได้ปรับตัวให้เจริญในเซลล์แล้ว อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมวัว 5% หลังจากเพาะเชื้อลงในเซลล์ และอบในระยะเวลาที่เหมาะสม นำเซลล์มาล้าง และตรึงเพื่อนำไปใช้ตรวจทางซีรัมวิทยาต่อไป ในการทดสอบซีรัม นำซีรัมมาเจือจาง 1:20 ซึ่งเป็นการทดสอบว่า ซีรัมมีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส PRRS หรือไม่ ถ้าซีรัมมีแอนติบอดี เมื่อทำการย้อมเซลล์ในหลุมโดยใช้ anti-porcine IgG ที่ติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) จะพบการเรืองแสงในเซลล์เมื่อดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนส์

วิธีทำ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145 ในไมโครเพลทและเพาะเชื้อไวรัส

- 1.1 ใช้ที่ดูดปล่อยสารละลายชนิดหลายช่องทางดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมวัว 5% ใส่ลงในไมโครเพลทคอลัมน์ที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 หลุมละ 50 ไมโครลิตร (รูปที่ 5.9)

- 1.2 ย่อยเซลล์ MARC-145 ที่เจริญเต็มที่แล้วในขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมวัว 5% โดยปรับให้มีเซลล์ 1×10^5 - 1.25×10^5 เซลล์/มล.
- 1.3 ใช้ที่ดูดปล่อยสารละลายชนิดหลายช่องทางดูดเซลล์ 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลททุกหลุม
- 1.4 เจือจางเชื้อไวรัส PRRS ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมวัว 5% ให้ได้ $10^{2.2}$ TCID₅₀/50 ไมโครลิตร แจกลงในไมโครเพลทคอลัมน์ที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 หลุมละ 50 ไมโครลิตร
- 1.5 นำไมโครเพลทไปบ่มที่ 37°C ในตู้ CO₂ 5% นาน 48-72 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ติดเชื้อไวรัส 40-50%
2. การตรึงเซลล์
 - 2.1 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS 1 ครั้ง
 - 2.2 เติม 80% acetone ที่แช่เย็น ใส่ในหลุมๆ ละ 150 ไมโครลิตร บ่มที่ 4°C นาน 30 นาที
 - 2.3 เท acetone ทิ้ง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS 1 ครั้ง ปล่อยให้แห้งในอุณหภูมิห้อง
 - 2.4 เก็บในกล่องพลาสติกปิดให้สนิท เก็บไว้ที่ -70°C จนกว่าจะนำมาใช้
3. การเจือจางซีรัมในไมโครเพลทสำหรับเจือจางซีรัม
 - 3.1 เจือจางซีรัมเป็น 1:20 ด้วย PBS (0.01 M pH 7.2) ในไมโครเพลทสำหรับเจือจางซีรัม (ซีรัม 10 ไมโครลิตร + PBS 190 ไมโครลิตร)
 - 3.2 เจือจางตัวอย่างซีรัมควบคุมบวกและควบคุมลบเช่นเดียวกัน
4. การบ่มซีรัมกับเซลล์ MARC-145 ที่ตรึงแล้ว
 - 4.1 นำไมโครเพลทออกจาก freezer -70°C วางที่อุณหภูมิห้องแล้วทำให้เซลล์เปียกด้วย PBS หลุมละ 150 ไมโครลิตร ประมาณ 2-3 นาที เท PBS ทิ้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ
 - 4.2 ดูดซีรัมที่เจือจางแล้วใส่ในหลุมเซลล์ที่มีเชื้อไวรัส และไม่มีเชื้อไวรัส อย่างละ 2 หลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร (1 ไมโครเพลทตรวจได้ 23 ตัวอย่าง)
 - 4.3 เติมซีรัมควบคุมบวก และซีรัมควบคุมลบ ในหลุม G11, G12 และ H11, H12 ตามลำดับ หลุมละ 50 ไมโครลิตร
 - 4.4 ปิดฝาไมโครเพลทนำไปบ่มที่ 37°C ในตู้บ่มที่มีความชื้น นาน 30 นาที
 - 4.5 เทซีรัมทิ้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ นำไปล้างด้วย PBS 3 ครั้ง
5. การบ่มกับคอนจูเกต
 - 5.1 เจือจาง FITC คอนจูเกต (rabbit or goat anti serum IgG heavy and light chain) ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ใส่คอนจูเกต หลุมละ 50 ไมโครลิตร

5.2 ปิดฝา นำไปบ่มที่ 37°C นาน 30 นาที ในตู้ที่มีความชื้น

5.3 เทคอนจูเกตออกจากไมโครเพลทซับให้แห้ง นำไปล้างด้วย PBS 4 ครั้ง

5.4 นำไมโครเพลทไปส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

6. การอ่านและแปลผล

ซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อ PRRS จะพบว่าเซลล์ที่มีเชื้อ PRRS จะเรืองแสงใน cytoplasm ขณะที่เซลล์ที่ไม่มีเชื้อ PRRS จะไม่มีการเรืองแสง

ซีรัมที่ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PRRS จะไม่พบการเรืองแสงใน cytoplasm ของเซลล์ ทั้งในเซลล์ที่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ PRRS ในกรณีที่พบว่าไม่มีการเรืองแสงใน cytoplasm ของเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสโดยใช้ซีรัมควบคุมบวก หรือพบมีการเรืองแสงของเซลล์ที่ไม่มีเชื้อ โดยใช้ซีรัมควบคุมลบ จะต้องทำการทดสอบใหม่ ถ้าผลยังไม่ชัดเจนต้องเจาะเลือดมาทดสอบใหม่

	V	N	V	N	V	N	V	N	V	N	V	N
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
B	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
C	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
D	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
E	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18
F	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18
G	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	+	+
H	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	-	-

V = มีเชื้อ PRRS

N = ไม่มีเชื้อ PRRS

1-23 = หมายเลขตัวอย่าง

+ = ซีรัมควบคุมบวก

- = ซีรัมควบคุมลบ

รูปที่ 5.9 การตรวจพีอาร์อาร์เอส แอนติบอดีโดยวิธี immunofluorescence

5. Immunofluorescent assay (IFA) สำหรับการตรวจหาระดับแอนติบอดี

ใช้เซลล์ MARC-145 ซึ่งทำให้ติดเชื้อ PRRS แล้วในไมโครเพลท 96 หลุม โดย 1 ไมโครเพลทสามารถตรวจซีรัมได้ 16 ตัวอย่าง

1. ย่อยเซลล์ MARC-145 และเพาะเลี้ยงลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้ CO_2 5% ที่ปรับสภาพความชื้น จนได้เซลล์เต็มพื้นผิว
2. เติมเชื้อ PRRS ลงในไมโครเพลทที่มีเซลล์เต็มพื้นผิว ยกเว้นเซลล์คอลัมน์ที่ 1, 6 และ 11 แล้วบ่มที่ 37°C ในตู้ CO_2 5% นาน 48-72 ชั่วโมง (รูปที่ 5.10)

3. เทาอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง ล้างเพลทด้วย PBS 1 ครั้ง ตรึงเซลล์ด้วย 80% acetone ที่แช่เย็น ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เท acetone ที่ ปล่อยให้แห้ง ปิดฝาเพลทเก็บไว้ที่ -20°C ในกรณีที่ต้องเก็บไว้นานควรเก็บที่ -70°C
4. เจือจางซีรัมที่จะทดสอบ ซีรัมควบคุมบวก และซีรัมควบคุมลบแบบ serial 4-fold ในไมโครเพลทสำหรับเจือจางตัวอย่างซีรัม โดยเริ่มจาก 1:16 หรือ 1:20 (ซึ่งจะได้ซีรัมที่เจือจาง 1:16, 1:64, 1:256 และ 1:1024 หรือ 1:20, 1:80, 1:320 และ 1:1280) จากนั้นเติมซีรัมที่เจือจางแล้วลงในไมโครเพลทที่มีเซลล์และเชื้อ PRRS ที่เตรียมไว้ หลุมละ 50 ไมโครลิตร ในคอลัมน์ที่ 2, 3, 4, 5 หรือ 7, 8, 9, 10 แล้วนำซีรัมที่เจือจาง 1:16 หรือ 1:20 ของทุกตัวอย่างลงในหลุมควบคุม คอลัมน์ที่ 1 และ

6

	N	V	V	V	V	N	V	V	V	V	N	V	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1	1	1	1	1	9	9	9	9	9	+	+	16
B	2	2	2	2	2	10	10	10	10	10			64
C	3	3	3	3	3	11	11	11	11	11			256
D	4	4	4	4	4	12	12	12	12	12			1024
E	5	5	5	5	5	13	13	13	13	13	-	-	16
F	6	6	6	6	6	14	14	14	14	14			64
G	7	7	7	7	7	15	15	15	15	15			256
H	8	8	8	8	8	16	16	16	16	16			1024
	16	16	64	256	1024	16	16	64	256	1024			

V = มีเชื้อ PRRS

N = ไม่มีเชื้อ PRRS

1-16 = หมายเลขตัวอย่าง

+ = ซีรัมควบคุมบวก

- = ซีรัมควบคุมลบ

รูปที่ 5.10 การตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อพีอาร์อาร์เอส โดยวิธี IFA

5. นำไปบ่มในตู้ที่มีความชื้นอุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที เทซีรัมทิ้ง และล้างไมโครเพลทด้วย PBS 3 ครั้ง
6. เติมคอนจูเกต FITC anti swine IgG ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม นำไปบ่มในตู้ที่มีความชื้นโดยอบที่ 37°C 30 นาที เทคอนจูเกตทิ้ง ล้างไมโครเพลทหลายๆครั้งด้วยน้ำก๊อกและซับให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

7. การอ่านและแปลผล

อ่านค่าไตเตอร์ที่ส่วนกลับของความเจือจางสูงสุดที่พบการเรืองแสงสีเขียวใน cytoplasm ของเซลล์ที่มีเชื้อไวรัส ส่วนเซลล์ควบคุมที่ไม่มีเชื้อไวรัสจะไม่พบเซลล์เรืองแสงใน cytoplasm ไม่ว่าจะใส่ซีรัมควบคุมบวก หรือซีรัมควบคุมลบ หรือซีรัมที่ต้องการตรวจ ซีรัมควบคุมลบเมื่อทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสไม่ควรเกิดการเรืองแสงใน cytoplasm ของเซลล์ ส่วนซีรัมควบคุมบวก เมื่อทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสจะพบการเรืองแสงใน cytoplasm ของเซลล์ ความเจือจางสูงสุดที่พบการเรืองแสงอาจแตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ผลการตรวจอาจขึ้นอยู่กับสเตรนของ **เชื้อไวรัส PRRS** ที่นำมาใช้ การตรวจระดับแอนติบอดีสามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคโดยการตรวจซีรัมคู่ (paired serum) ซีรัมที่ให้ผลบวก ได้แก่ ซีรัมที่มีไตเตอร์สูงกว่าเดิม 4 เท่า (4-fold) หลังจากเจาะครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรก 2 สัปดาห์ ซึ่งแสดงว่าสุกรมีการติดเชื้อไวรัส

วิธี IFA สามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ได้หลังจากสุกรได้รับเชื้อ 5 วัน และสามารถตรวจพบได้นาน 21-28 วัน หลังได้รับเชื้อ ขณะที่ตรวจพบ IgG หลังจากได้รับเชื้อที่ 9-14 วัน พบ IgG สูงสุดหลังได้รับเชื้อ 30-50 วัน และคงอยู่นาน 3-5 เดือนหลังได้รับเชื้อ (Zhou et al., 2002) ความไวของวิธีตรวจขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้ตรวจ และสเตรนของเชื้อไวรัส PRRS ที่ใช้ในการทดสอบ วิธี IFA ไม่ให้ผล cross reaction ระหว่างสายพันธุ์ NA และสายพันธุ์ EU หรือมีผลน้อย จึงใช้วิธี IFA สำหรับตรวจยืนยันการติดเชื้อ PRRS ในกรณีผลการตรวจโดยวิธี ELISA ให้ผลสงสัย

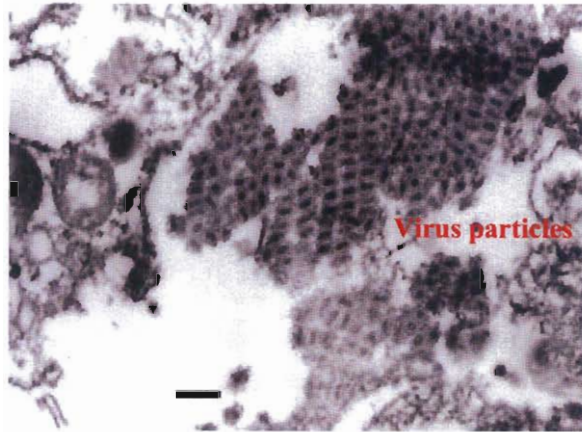
การตรวจวินิจฉัยโรคไขหวัดใหญ่สุกร

เชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สุกรสามารถติดต่อกันระหว่างสัตว์และคน การปฏิบัติงานเกี่ยวกับเนื้อเยื่อ สวอป ไซฟัก และเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสควรปฏิบัติในตู้ปลอดเชื้อที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความระมัดระวัง โดยใช้เครื่องป้องกันการติดเชื้อ เช่น สวมใส่เครื่องป้องกันเชื้อเข้าทางระบบหายใจ เช่น การสวมใส่หน้ากาก และถุงมือระหว่างปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

การแยกและพิสูจน์เชื้อไขหวัดใหญ่สุกร

ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ใช้ในการเพาะแยกเชื้อ ได้แก่ ปอด เยื่อบุจมูก หรือเซลล์จากหลอดลมและถุงลม นำตัวอย่างดังกล่าวมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บดในโกร่ง หรือใช้เครื่องบด stomacher หรือ homogenizer ผสมกับน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ ให้ได้ความเข้มข้น 10-20% น้ำหนัก/ปริมาตร สำหรับตัวอย่าง สวอปที่เก็บจากการป้ายจมูกหรือป้ายคอควรเก็บในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของยาปฏิชีวนะ และ albumin จากซีรัมวัว (5 มก./มล.) ควรส่งถึงห้องปฏิบัติการในสภาพแช่เย็น เนื่องจากเชื้อไวรัสไม่คงทน แต่ไม่ควรแช่แข็งตัวอย่างเพราะการ freeze-thaw มีผลทำให้ปริมาณไวรัสลดลง เมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างป้ายจมูกหรือป้ายคอเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเย็น 4°C ความเร็ว 1500-1900 g นาน 15-30 นาที ส่วนตัวอย่าง เนื้อเยื่อที่บดแล้วนำเข้าเครื่องปั่นเช่นเดียวกัน เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมากับตัวอย่าง เก็บส่วนใสใส่ยาปฏิชีวนะ ก่อนนำไปเพาะแยกเชื้อ ยาปฏิชีวนะที่ใช้ ได้แก่ gentamycin 10 ไมโครกรัม/มล., penicillin 10,000 หน่วย/มล. หรือ streptomycin 10,000 หน่วย/มล. และ 2% fungizone (250 มก./มล.) หลังเติมยาปฏิชีวนะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30-60 นาที สำหรับตัวอย่างป้ายจมูกหรือป้ายคือนำไปเพาะแยกเชื้อโดยไม่ต้องเจือจาง ส่วนตัวอย่างปอดอาจนำมาเจือจาง 1:3 หรือไม่ต้องเจือจางก็ได้ ในกรณีที่ยังไม่ทำการเพาะแยกเชื้อในวันเดียวกันควรเก็บส่วนใสของตัวอย่างไว้ที่ -70°C

การแยกเชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง สามารถใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจากสัตว์ได้หลายชนิด เช่น เซลล์เพาะเลี้ยงจากไตสุกร ไตโค ไตสุนัข เซลล์ปอดและ epithelial cell จากหลอดลมสุกร เซลล์ human diploid รวมทั้งเซลล์ Vero, swine testis, mink lung และ MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงและสามารถตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (รูปที่ 5.11) จะพบอนุภาคไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง การติดไขหวัดกับการแยกเชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหรือการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดอาจช่วยให้การแยกเชื้อได้ผลดีขึ้น พบว่าการแยกเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร โดยใช้การเพาะเซลล์ร่วมกัน (co-culture) เช่น เซลล์ MDCK ร่วมกับเซลล์ mink lung สามารถช่วยให้การแยกเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรได้ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 5.11 อนุภาคไวรัสในเซลล์ MDCK จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

1. เซลล์ที่ใช้แยกเชื้ออาจใช้เซลล์ไลน์หรือเซลล์ชนิดปฐมภูมิที่มีความไวต่อเชื้อไวรัส เซลล์ไลน์ที่นิยมใช้แยกเชื้อ ได้แก่ เซลล์ MDCK
2. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เต็มพื้นผิวภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งจะเต็มภายใน 48-72 ชั่วโมง
3. ล้างเซลล์ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ L- (tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl ketone (TPCK) trypsin 1 ไมโครกรัม/มล. 2-3 ครั้ง
4. เติมห่วงอย่างบดหรือสวอปลงในเซลล์เพาะเลี้ยงในไมโครเพลทชนิด 24 หลุม เติมห่วงอย่าง 100-200 ไมโครลิตร/หลุม ส่วนขวดเพาะเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เติมห่วงอย่าง 1-2 มล./ขวด
5. นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C นาน 1-2 ชั่วโมง ในกรณีที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในไมโครเพลทชนิดอากาศผ่านเข้าออกได้ ควรบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% และปรับความชื้นได้
6. เติมห่วงอย่างทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ TPCK-trypsin 1-2 ครั้ง
7. เติมห่วงอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนประกอบของ TPCK-trypsin และไมไสซีรีมวู นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3-5 วัน โดยตรวจดูการเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) เป็นระยะ
8. ตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสจากอาหารเลี้ยงเซลล์โดยดูการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยวิธี haemagglutination (HA) หากวิธี HA ให้ผลลบ หรือไม่พบ CPE ควรนำเซลล์มาแช่แข็งที่ -70°C แล้วนำมาละลาย (freeze-thaw) เพื่อให้เซลล์แตก แล้วนำไปผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงใน passage ต่อไป โดยเริ่มปฏิบัติจากข้อ 4-8 ถ้าพบ CPE หรือวิธี HA ให้ผลบวก นำไปตรวจหา subtype โดยวิธี hemagglutination inhibition (HI) วิธี neuraminidase inhibition (NI) วิธี PCR หรือวิธี real-time PCR

การแยกเชื้อไวรัสโดยการฉีดเข้าไขไก่อฟัก

1. ใช้ไขไก่อฟักอายุ 10-11 วัน
 2. ใช้ตัวอย่าง 0.1-0.3 มล. ฉีดเข้า allantoic cavity และ amniotic sac ตัวอย่างละ 3-4 ฟอง
 3. นำเข้าตู้บอดูอุณหภูมิ 35-37°C นาน 3-4 วัน ส่องไข่เพื่อตรวจดูการตายของไขวันละครั้ง ไข่ฟักที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง คัดทิ้ง
 4. ไข่ฟักที่ตายหลัง 24 ชั่วโมงให้นำไปแช่เย็น เก็บน้ำไขของไข่ฟักที่ตายและที่ไม่ตายนำไปปั่นในเครื่องปั่นเย็น 4°C ด้วยความเร็ว 1500-1900 g นาน 10-20 นาที
 5. เก็บส่วนใสนำไปตรวจหาเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรโดยวิธีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง
 6. ในกรณีที่ให้ผลลบ นำไปฉีดไข่ หรือผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงเป็น passage ต่อไป
- จากผลงานวิจัยพบว่า การผ่านเชื้อไขหวัดใหญ่สุกรในไขไก่อฟักมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid receptor binding site (Takemae et al., 2010) ดังนั้นจึงนิยมใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการแยกเชื้อไวรัส แต่เนื่องจากเชื้อบางตัวไม่สามารถเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ไม่ดีจึงอาจต้องทำการแยกเชื้อโดยใช้ไขไก่อฟัก

วิธีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง [haemagglutination (HA) test]

1. เตรียม 0.5% เม็ดเลือดแดงไก่ ไก่หวง หรือหนูตะเภา โดยการเจาะเลือดไก่ 10-20 มล. ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 50 มล. เติมน้ำ PBS ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงแล้วนำไปปั่นและล้างด้วย PBS 2-3 ครั้ง และทำเป็น 0.5% ด้วย PBS สามารถเก็บไว้ที่ 4°C ได้นาน 1 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งเม็ดเลือดแดงสลาย (hemolysis)
2. ใช้ไมโครเพลทชนิด 96 หลุม (V หรือ U shape) แจก PBS 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม (รูปที่ 5.12)
3. เติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจลงในหลุมแรกของแต่ละแถว และตัวอย่างควบคุมบวกลงในหลุม H1 จำนวน 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
4. เจือจางตัวอย่างจากหลุมแรกไปจนถึงหลุมที่ 11 ของแต่ละแถว (เจือจาง 1:2-1:2048) คอลัมน์ที่ 12 เป็นเม็ดเลือดแดงควบคุม
5. เติมน้ำเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 0.5% ทุกหลุมละ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. ปิดเพลท นำไปไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30-60 นาที ซึ่งจะเห็นเม็ดเลือดแดงในหลุมเม็ดเลือดแดงควบคุมรวมตัวกันที่ก้นหลุมมีลักษณะเป็นเม็ดกระดุม
7. หลุมที่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ (HA ให้ผลบวก) หมายถึง มีเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร จะพบเม็ดเลือดแดงกระจายทั่วหลุม หลุมที่ให้ผลลบจะพบเม็ดเลือดแดงรวมตัวกันที่ก้นหลุมลักษณะคล้ายเม็ดกระดุม ส่วนหลุมที่จับกลุ่มไม่สมบูรณ์จะพบลักษณะคล้ายกระดุมมีส่วนของเม็ดเลือดแดงกระจายรอบๆ มีลักษณะคล้ายโดนัท สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหลุมที่ให้ผลลบ

และหลุมที่จับกลุ่มแบบไม่สมบูรณ์ โดยการเอียงเพลาทำมุม 45°C นาน 20-30 วินาที สังเกตดูการไหลของเม็ดเลือดแดง ถ้ามีการไหลของเม็ดเลือดแดงเหมือนหยดน้ำตา และบริเวณรอบๆ มีลักษณะใส แสดงว่าให้ผลลบ หลุมที่ให้ผลไม่สมบูรณ์ (partial inhibition) จะไม่พบลักษณะเม็ดเลือดที่คล้ายหยดน้ำตา

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1											C
B	2											C
C	3											C
D	4											C
E	5											C
F	6											C
G	7											C
H	+											C

1-7 = หมายเลขตัวอย่าง
 + = ตัวอย่างควบคุมบวก
 C = เม็ดเลือดแดงควบคุม

รูปที่ 5.12 วิธี haemagglutination

การจำแนก type หรือ subtype ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร

1. การจำแนกโดยวิธี haemagglutination inhibition (HI)
 - 1.1 เจือจางแอนติเจนของเชื้อไวรัสควบคุม (H1, H3...) ด้วย 0.01 M PBS pH 7.2-7.4 ให้ได้ 8 HA unit (HAU)/50 ไมโครลิตร หรือ 4 HAU/25 ไมโครลิตร
 - 1.2 เตรียมตัวอย่างที่ต้องการตรวจให้ได้ 8 HAU/50 ไมโครลิตร
 - 1.3 นำตัวอย่างที่ต้องการตรวจรวมทั้งแอนติเจนของเชื้อไวรัสควบคุมที่เจือจาง 8 HAU แล้วมาไตเตรทย้อนกลับ (back titration) เพื่อความมั่นใจว่าเชื้อไวรัสมีความเข้มข้น 8 HAU ซึ่งมีวิธีการเช่นเดียวกับการตรวจด้วยวิธี hemagglutination
 - 1.4 ทำการลด non-specific reaction โดยใช้ receptor-destroying enzyme (RDE lyophilize: Denka, 1 ขวดผสมด้วยน้ำเกลือ 20 มล.) ในซีรัมควบคุมแต่ละ HA subtype (H1, H3) โดยการเติมซีรัม 100 ไมโครลิตร ลงใน RDE 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37°C ค้างคืน (นาน 12-18 ชั่วโมง) แล้วนำไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 60 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำเกลือ 600 มล. (ซีรัมเจือจาง 1:10)

- 1.5 ทำการกำจัด natural hemagglutinin จากตัวอย่างซีรัมที่กำจัด nonspecific reaction แล้วด้วยเม็ดเลือดแดงที่ล้างและปั่นตกตะกอนแล้วโดยเติม 100% เม็ดเลือดแดง 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที โดยการเขย่าเป็นระยะๆ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 800g นาน 10 นาทีเก็บส่วนใส
- 1.6 เติม PBS 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลททุกหลุม (รูปที่ 5.13) ยกเว้นหลุมเม็ดเลือดแดงควบคุมเติม 50 ไมโครลิตร (H7-H12)
- 1.7 เติมซีรัมควบคุมบวกของแต่ละ subtype (H1 และ H3) 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรกที่ต้องการจำแนก H subtype แล้วทำการเจือจางซีรัมๆละ 3 หลุมต่อแต่ละ subtype (1:2-1:8)
- 1.8 เติมตัวอย่างที่เตรียมไว้ (ตัวอย่างที่ต้องการตรวจเพื่อจำแนก subtype และแอนติเจนควบคุมบวกของแต่ละ subtype เช่น H1, H3) 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม (V หรือ U shape) ตัวอย่างละ 3 หลุม ต่อซีรัมควบคุมแต่ละ subtype (subtype H1 และ H3)
- 1.9 ปิดเพลทและนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10-30 นาที
- 1.10 เติมเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 0.5% จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าเพลทในขณะที่แยกเม็ดเลือดแดงให้เขย่าเม็ดเลือดแดงให้กระจายให้ทั่วกัน
- 1.11 ปิดเพลท บ่มในอุณหภูมิห้องจนกระทั่งสังเกตเห็นเม็ดเลือดแดงตกลงก้นหลุมคล้ายเม็ดกระดุมในหลุมเม็ดเลือดแดงควบคุม (ปกติใช้เวลา 30-60 นาที) ตรวจผลการเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) หลังทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เนื่องจากมีเชื้อบางตัวเมื่อจับกับเม็ดเลือดแดงแล้วจะหลุดจากเม็ดเลือดแดงใน 30 นาที
- 1.12 อ่านผล ซึ่งได้อธิบายไว้ในขั้นตอนการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของเชื้อไวรัส ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อแอนติเจน subtype ที่ใช้ จะพบมีการยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง การทดสอบจะใช้ได้ต่อเมื่อตัวอย่างส่งตรวจ และแอนติเจนควบคุมบวกมีความเข้มข้น 8 HAU
- 1.13 ในกรณีที่เม็ดเลือดแดงในหลุมควบคุมไม่รวมกันที่ก้นหลุมในลักษณะเป็นเม็ดกระดุม อาจเนื่องจากสาเหตุดังนี้ สารละลาย PBS มีส่วนประกอบที่ไม่ถูกต้อง น้ำในไมโครเพลทระเหยมากเกินไป เม็ดเลือดแดงเก่า หรือความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงไม่ถูกต้อง

	H1			H3			H1			H3		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1			1			9			9		
B	2			2			10			10		
C	3			3			11			11		
D	4			4			12			12		
E	5			5			13			13		
F	6			6			14			14		
G	7			7			+1			+3		
H	8			8			C	C	C	C	C	C

2	4	8	2	4	8	2	4	8	2	4	8

1-14 = หมายเลขตัวอย่าง
H1 = ซีรัมควบคุมบวก H1
H3 = ซีรัมควบคุมบวก H3
+1 = แอนติเจนควบคุมบวก H1
+3 = แอนติเจนควบคุมบวก H3
C = เม็ดเลือดแดงควบคุม

รูปที่ 5.13 การจำแนก subtype ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยวิธี haemagglutination inhibition

2. การตรวจโดยวิธี neuraminidase inhibition (NI)

การจำแนก subtype โดยวิธี NI ยังไม่มีการตรวจในห้องปฏิบัติการหลายๆ แห่ง แนะนำส่งตรวจยังห้องปฏิบัติการอ้างอิง

การตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจ

การตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจ สามารถตรวจได้หลายวิธี

1. Immunofluorescent technique โดยใช้เนื้อเยื่อปอด เยื่อบุจมูกหรือเซลล์จากหลอดลม และถุงลม
2. Immunohistochemistry (IHC) ตรวจหาเชื้อจากเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงด้วยสารตรึงเนื้อเยื่อ
3. Antigen-capture enzyme link immunosorbent assay (ELISA) ชุดทดสอบสำเร็จรูปตรวจเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร type A จากตัวอย่างปอด และสวอปจมูก
4. Enzyme immunoassay membrane test เช่น Directigen FLU-A ซึ่งเป็นชุดตรวจหาเชื้อไวรัส influenza type A จากตัวอย่างของสัตว์ป่วย ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว
5. การตรวจสารพันธุกรรม

การตรวจโดยวิธี immunofluorescence

- 1.1 เทคนิคการตรวจโดยวิธีนี้ใช้ตรวจแผ่นเนื้อเยื่อบนแผ่นกระจก (cover slip) หรือไมโครเพลทชนิด 96 หลุมที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัส และต้องมีตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบด้วยทุกครั้ง
- 1.2 หลังจากบ่มเชื้อบนเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อให้เซลล์ติดเชื้อ 10-20% บนแผ่นกระจก ล้างแผ่นกระจกด้วย PBS 1 ครั้ง นำไปแช่ใน 100% acetone หรือถ้าเป็นไมโครเพลทใช้ 80% acetone นาน 5-10 นาที แล้วปล่อยให้แห้ง
- 1.3 ในกรณีตัวอย่างเป็นอวัยวะให้ตัดเป็นแผ่นเนื้อเยื่อชิ้นบางๆ วางบนสไลด์แก้วตรึงด้วย acetone 5-10 นาที ทำให้แห้ง
- 1.4 หยดคอนจูเกตแล้วบ่มในภาชนะควบคุมความชื้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที
- 1.5 ล้างด้วย PBS pH 7.2 และแช่ใน PBS 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและทำให้แห้ง
- 1.6 หยด mounting fluid ลงบนสไลด์แก้ว คว่ำแผ่นกระจก ที่มีเซลล์ลงบนสไลด์แก้ว สำหรับแผ่นเนื้อเยื่อให้หยด mounting fluid ลงบนเนื้อเยื่อ แล้วปิดด้วยแผ่นกระจก ส่วนเซลล์ในไมโครเพลท 96 หลุม ไม่จำเป็นต้องปิดด้วย cover-slip
- 1.7 นำไปส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ในห้องมืด เซลล์ที่ติดเชื้อจะมีการเรืองแสงสีเขียว สว่าง (apple green fluorescence) ผู้ตรวจต้องมีประสบการณ์ และได้รับการฝึกอบรมในการตรวจมาก่อน

การตรวจสารพันธุกรรม

ในปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจนิยมใช้การตรวจสารพันธุกรรม ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลเร็วภายใน 1-2 วัน มีความไว และความจำเพาะสูง แต่มีข้อควรระมัดระวังในเรื่องของการควบคุมการปนเปื้อน และการประกันคุณภาพการทดสอบในทุกห้องปฏิบัติการ การตรวจสารพันธุกรรมสามารถตรวจได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจโดยวิธี PCR มีวิธีดังนี้

- 1.1 การสกัด RNA จากตัวอย่างส่งตรวจ หรือตัวอย่างที่ต้องการจำแนก type หรือ subtype การตรวจจำแนก type สามารถตรวจหาชิ้น matrix (M) หรือ nucleoprotein (NP) ส่วน subtype ให้ตรวจหา hemagglutinin (HA หรือ H) และ neuraminidase (NA หรือ N) การสกัดใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปโดยเลือกใช้ตามชนิดของตัวอย่างส่งตรวจ และวิธีสกัดตามเอกสารในชุดทดสอบของแต่ละผู้ผลิต
- 1.2 การเปลี่ยนสาย RNA genome ให้เป็น cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription
- 1.3 การเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR

1.4 การวิเคราะห์ DNA ด้วย agarose gel electrophoresis เป็นการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น โดยระยะทางที่ DNA เคลื่อนที่ได้ขึ้นกับขนาดของ DNA และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ DNA ที่แยกได้โดยวิธีนี้มองเห็นได้ เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

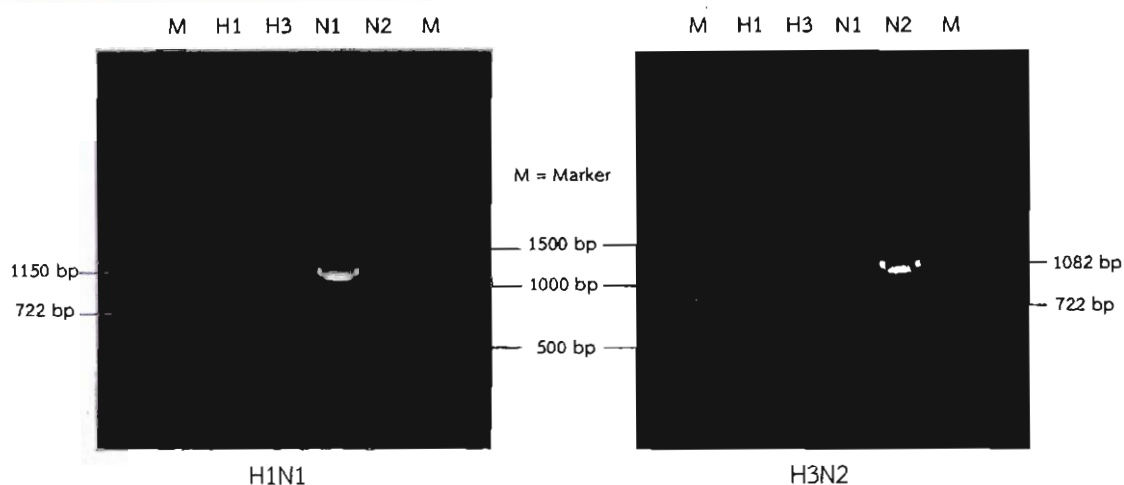
เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสามารถจำแนก subtype ตามชนิดของโปรตีน HA และ NA โดยวิธีทางชีวโมเลกุล เช่น วิธี PCR (รูปที่ 5.14)

PCR primers forward 5'3' reverse 5'3'

Type A (Matrix) M1F2A: ATG AGY CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG
M242R3A: TGG ACA AAG CGY CTA CGC TGC AG
(Type A 242 bp, WHO, 2009)

Subtype HA H1-6F: AAG CAG GGG AAA ATA AAA GC
H1-707R: GCT ATT TCT GGC TTG AAY TTC
H3-949F: AAT GAC AAR CCH TTY CAA AA
H3-END: AGT AGA AAC AAG GGT G
(H1 and H3 722 bp, Takemae et al., 2008)

Subtype NA N1-1F: AGC AAA AGC AGG AGA TTA AA
N1-1131R: GGA TCC CAA ATC ATC TCA AA
N2-19F: AGC AAA AGC AGG AGT GAA G
N2-1053R: CAA AGG CCC AGC CTT TCA CT
(N1 1150 bp, N2 1082 bp, Takemae et al., 2008)



รูปที่ 5.14 ผลการจำแนก subtype เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (Takemae et al., 2008)

2 การตรวจโดยวิธี real-time PCR

จากการระบาดของเชื้อ H1N1 อย่างกว้างขวางในปี 2009 ทำให้มีการปรับปรุงวิธีการตรวจสอบพันธุกรรม โดยการตรวจหาชิ้น matrix (M) ของเชื้อโดยวิธี real-time PCR ห้องปฏิบัติการอ้างอิงแต่ละแห่งอาจมีการนำวิธีการไปดัดแปลงปรับปรุงใช้แตกต่างกันเพื่อให้ใช้ในการตรวจได้อย่างเหมาะสม

ศูนย์ควบคุมโรค (CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกาให้ข้อมูล การแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อ H1N1 ที่เคยระบาดและ H1N1 2009 ที่ระบาดใหม่ โดยวิธี real-time ซึ่ง PCR primers และ probes สำหรับการทำ real-time PCR เชื้อไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 (Modified Speckman) (รูปที่ 5.15) forward 5'3' reverse 5'3' มีดังนี้

Type A: TCA ggC CCC CTC AAA gCC gA

InfA Forward: GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C

InfA Reverse: AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA

InfA Probe ¹: TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG

SW InfA Forward: GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG

SW InfA Reverse: GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC

SW InfA Probe ²: CYA CTG CAA GCC CA "T" ACA CAC AAG CAG GCA

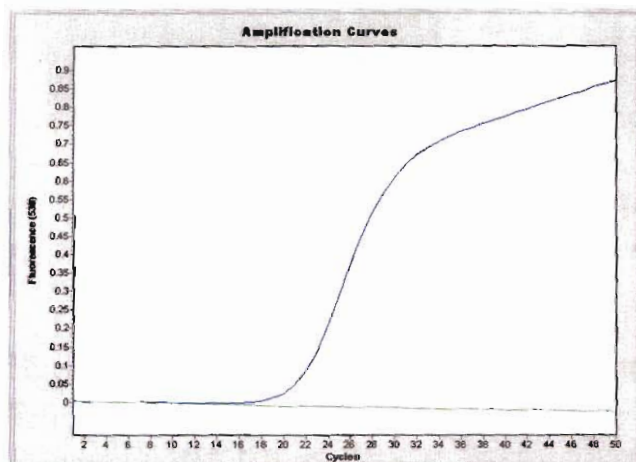
SW H1 Forward: GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA

SW H1 Reverse: CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC

SW H1 Probe ²: CA GAA TAT ACA "T" CC RGT CAC AAT TGG ARA A

¹ TaqMan® probes are labeled at the 5'-end with the reporter molecule 6-carboxyfluorescein (FAM) and with the quencher, TRAMRA at the 3'-end.

² Taqman® probes are labeled at the 5'-end with the report er molecule 6-carboxyfluorescein (FAM) and quenched internally at a modified "T" residue with TRAMRA, with a modified 3'-end to prevent probe extension by Taq polymerase.



Type A

Type A = Swine Influenza Type A

NC = Negative Control

NC

รูปที่ 5.15 ผลการตรวจสอบพันธุกรรมเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร type A โดยวิธี real-time PCR

3 การตรวจโดยวิธี sequencing

การหาลำดับ nucleotide ของ DNA สามารถใช้ยืนยันการตรวจหา subtype ของเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามควรมีการประกันคุณภาพของวิธีการตรวจในแต่ละห้องปฏิบัติการเพื่อให้ผลการตรวจมีความถูกต้อง องค์การอนามัยโลก (WHO) ด้านโรคไข้หวัดใหญ่ที่ศูนย์ควบคุมโรค (CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ให้ข้อมูลการทำ sequence เชื้อไข้หวัดใหญ่ H1N1 2009 ในหัวข้อ sequencing primers and protocol 12 May 2009 (http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/sequencing_primers/en/index.html)

การตรวจทางซีรัมวิทยา

การตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร โดยใช้วิธี haemagglutination inhibition (HI) สามารถใช้ช่วยในการวินิจฉัยโรคได้โดยการตรวจซีรัม 2 ครั้ง เจาะห่างกัน 10-21 วัน ถ้าผลการตรวจพบไตเตอร์ของซีรัมครั้งที่สองสูงขึ้นเป็น 4 เท่า หรือมากกว่า แสดงว่าสุกรเคยได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรมาก่อน นอกจากนี้ยังมีการตรวจทางซีรัมโดยวิธีอื่นๆ เช่น virus neutralization (VN), agar gel immunodiffusion (AGID), indirect fluorescent antibody และชุดทดสอบสำเร็จรูป enzyme

link immunoabsorbent assay (ELISA) มีการผลิตเพื่อการค้า ซึ่งมีเทคนิคการทดสอบ แตกต่างกันในแต่ละชุดทดสอบแต่วิธี HI ยังเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึง nonspecific inhibitor และ nonspecific hemagglutinin ในซีรัมสุกร ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัด nonspecific ดังกล่าว นอกจากนี้เชื้อไขหวัดใหญ่สุกรที่ใช้เป็นแอนติเจนควรเตรียมจากเชื้อที่แยกได้จากท้องที่นั้นๆ หรือเป็นเชื้อที่มีความใกล้เคียงกัน ห้องปฏิบัติการบางแห่งใช้วิธี VN หรือวิธี AGID ซึ่งไม่ต้องกำจัด nonspecific ดังกล่าวในซีรัมก่อน

การตรวจโดยวิธี haemagglutination inhibition (HI)

- 1.1 เจือจางแอนติเจนอ้างอิง (H1, H3...) ให้ได้ความเข้มข้น 4-8 HAU/25 ไมโครลิตร ใน 0.01 M PBS pH 7.2
- 1.2 เตรียมตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจ ซีรัมควบคุมบวก และซีรัมควบคุมลบ โดยใช้ RDE เช่นเดียวกับการตรวจด้วยวิธี HI สำหรับการจำแนก subtype ของเชื้อไขหวัดใหญ่สุกร
- 1.3 เติมน้ำ PBS 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลททุกหลุมยกเว้นแถว A ส่วนหลุมเม็ดเลือดแดงควบคุม (H11 และ H12) เติมน้ำ PBS 50 ไมโครลิตร (รูปที่ 5.16)
- 1.4 เติมตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจจากข้อ 1.2 จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุมชนิดกัน V หรือ U จำนวน 2 หลุม/ตัวอย่าง (A1-A10) และซีรัมควบคุมลบ และควบคุมบวกจำนวน 50 ไมโครลิตร อย่างละ 1 หลุม (A11 และ A12) แล้วเติมน้ำตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจจำนวน 25 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลุม/ตัวอย่าง เพื่อเป็นซีรัมควบคุม (H1-H10)
- 1.5 เจือจางตัวอย่างซีรัมโดยดูดจากแถว A จำนวน 25 ไมโครลิตร ลงในแถว B และทำซ้ำจนถึงแถว G และดูดทิ้ง 25 ไมโครลิตร จากแถว G (จะได้ความเข้มข้นของซีรัมเป็น 1:1, 1:2 จนถึง 1:64)
- 1.6 เติมน้ำแอนติเจน 25 ไมโครลิตร ลงทุกหลุม ยกเว้นหลุมซีรัมควบคุม (H1-H10) และหลุมเม็ดเลือดแดงควบคุม (H11-H12)
- 1.7 ปิดเพลท วางไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 30-60 นาที
- 1.8 เติมน้ำเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 0.5% จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม เขย่าแล้วทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 20-30 นาที จนกระทั่งพบที่กันหลุมของหลุมเม็ดเลือดแดงควบคุมมีเม็ดเลือดแดงรวมตัวคล้ายกระดุม ในขณะที่แยกเม็ดเลือดแดงควรเขย่าให้เม็ดเลือดแดงกระจายทั่วกัน
- 1.9 เพื่อทดสอบว่าแอนติเจนที่ใช้ทดสอบมีความเข้มข้นได้ตามกำหนด ควรมีการหาความเข้มข้นของแอนติเจนก่อนนำมาใช้ และขณะที่ใช้ทดสอบหาแอนติบอดีโดยวิธี HI

1.10 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ โดยการตรวจดูว่าตัวอย่างให้ผลบวก หมายถึง ซีรัมมีไคเตอร์ต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร ต้องเป็นหลุมที่ไม่เกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง หลุมซีรัมควบคุมลบ ไม่มีการยับยั้งการเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ซีรัมควบคุมบวก ต้องมี HI ไคเตอร์ และการตรวจย้อนกลับความเข้มข้นของแอนติเจน ต้องได้ 4-8 HAU/25 ไมโครลิตร

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	A	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	-	+
2	B												
4	C												
8	D												
16	E												
32	F												
64	G												
	H	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5	C	C

1-5 = หมายเลขตัวอย่าง
 + = ซีรัมควบคุมบวก
 - = ซีรัมควบคุมลบ
 S1-S5 = ซีรัมควบคุม
 C = เม็ดเลือดแดงควบคุม

รูปที่ 5.16 วิธี haemagglutination inhibition

การตรวจวินิจฉัยโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์

เนื่องจากโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์เป็นโรคระบาดที่รุนแรงในสุกร และเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน ดังนั้นในการปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการควรคำนึงถึงความปลอดภัยทางชีวภาพเป็นลำดับแรก การตรวจวินิจฉัยโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ประกอบด้วย

การแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อไวรัส

การยืนยันการระบาดของโรคที่เกิดครั้งแรกควรใช้วิธีแยกเชื้อไวรัส เนื่องจากเชื้อไวรัสนิปาห์เป็นเชื้ออันตรายต้องทำในห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 4 (รูปที่ 5.17) เชื้อไวรัสนิปาห์เจริญได้ดีใน Vero cell ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่มีลักษณะ syncytium โดยพบนิวเคลียสของเซลล์เรียงตัวรอบๆขอบของเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียส ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความแตกต่างจาก syncytium ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เกิดจากเชื้อไวรัส Hendra ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อไวรัสนิปาห์ (Hyatt et al., 2001) ตัวอย่างที่ใช้เพาะแยกเชื้อได้แก่ สมอ ปอด ไต และม้าม โดยจะพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ซึ่งปกติจะเกิดภายใน 3 วัน หลังเพาะแยกเชื้อ และแนะนำให้เพาะแยกเชื้อในเซลล์ 2 ครั้ง (2 passages) ในกรณี ไม่พบ CPE ใน passage แรก (Daniel et al., 2001) และทำการยืนยันเชื้อไวรัสที่พบในเซลล์โดยการตรึง และย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสนิปาห์หรือใช้วิธีนิวทรัลไลซ์กับซีรัมจำเพาะ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาเชื้อไวรัสจากน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยใช้เทคนิค PCR หรือใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และควรส่งเชื้อที่สงสัยไปยังห้องปฏิบัติการอ้างอิงนานาชาติเพื่อแยกลักษณะของเชื้อทางชีวโมเลกุล การปฏิบัติการเกี่ยวกับโรคอุบัติใหม่เช่นโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ ควรทำงานเป็นทีมร่วมกับนักวิชาการระดับนานาชาติ ตัวอย่างส่งตรวจแยกเชื้อไวรัสไข้วัยะสด เช่น ปอด ม้าม ไต ทอนซิล อวัยวะในระบบประสาทส่วนกลาง บรรจุภาชนะตามคำแนะนำและระเบียบปฏิบัติในการส่งตัวอย่างของสมาคมการขนส่งทางอากาศระหว่างประเทศ (International Air Transport Association, IATA)



รูปที่ 5.17 ห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 4 (CSIRO, AAHL)

การตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจ

เทคนิค immunohistochemistry หรือ IHC เป็นวิธีที่แนะนำให้ใช้และมีความปลอดภัยในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสสุกร เป็นวิธีตรวจเนื้อเยื่อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลีน เชื้อไวรัสสุกรจะทำให้เกิดพยาธิสภาพเริ่มแรกที่เยื่อเมือกภายในของเส้นเลือด สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ในเนื้อเยื่อเหล่านี้ นอกจากนั้นยังพบเชื้อไวรัสที่เยื่อหุ้มสมอง ปอด หลอดลม และไตของสุกร ในสัตว์ตั้งท้องสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสที่มดลูก สายรก และเนื้อเยื่อลูกอ่อนของสุกร (Daniel, 2001) การตรวจการติดเชื้อไวรัสสุกรโดยวิธีนี้อาจมีความไวและความจำเพาะไม่สมบูรณ์ ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างจึงควรเก็บจำนวนสัตว์ให้เพียงพอในการเป็นตัวแทนของสัตว์ในฟาร์ม และควรเก็บอวัยวะหลายชนิดจากสัตว์ตัวเดียวกัน ห้องปฏิบัติการที่ใช้วิธี IHC ตรวจโรคใช้สมองอักเสบนิปาห์ต้องมีการทดสอบวิธีตรวจบันทึกการตรวจซึ่งในบางครั้งแปลผลได้ยาก ถ้าผู้วินิจฉัยมีความคุ้นเคยกับขบวนการตรวจมีการปฏิบัติบ่อยจะมีความชำนาญ อาจมีการแลกเปลี่ยนตัวอย่างระหว่างห้องปฏิบัติการหรือระหว่างประเทศที่มีการตรวจโดยวิธีนี้ ซึ่งเป็นการพัฒนาการตรวจและเป็นการประกันคุณภาพการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างส่งตรวจโดยวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี IHC ใช้ตัวอย่างปอด และอวัยวะในระบบทางเดินหายใจที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลีน การส่งตัวอย่างควรบรรจุในภาชนะตามข้อแนะนำ และระเบียบปฏิบัติของ IATA

การตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ negative contrast และใช้วิธีย้อมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสด้วยแอนติบอดีและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของเชื้อ และ antigenic activity ของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (Hyatt et al., 2001)

การตรวจหาสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR เป็นวิธีวินิจฉัยโรคใช้สมองอักเสบนิปาห์ที่ใช้เป็นปกติในห้องปฏิบัติการด้านสุขภาพสัตว์ของประเทศออสเตรเลีย เป็นการหาชิ้น M และ N ของเชื้อไวรัส ขณะที่ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคประเทศสหรัฐอเมริกา (CDC) ตรวจหาเฉพาะชิ้น N การวินิจฉัยโรคโดยวิธี PCR มีความสำคัญ ดังนั้นจึงควรมีการควบคุมคุณภาพภายในของห้องปฏิบัติการ (Daniels et al., 2001)

การตรวจทางซีรัมวิทยา

ในการเตรียมแผนสุ่มตัวอย่างตรวจทางซีรัมวิทยาต้องทราบว่า โรคนี้เป็นโรคระบาดที่รุนแรงในสุกร เมื่อสงสัยว่าฟาร์มสุกรมีการติดเชื้อ เป็นที่คาดการณ์ได้ว่าจะต้องมีสุกรบางส่วนที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส แนวทางในการปฏิบัติ คือ ถ้าคาดว่าสุกรจำนวน 20% มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส ดังนั้นการเก็บตัวอย่างซีรัม ควรเก็บซีรัมจำนวน 15 ตัวอย่าง ต่อกลุ่มสุกร (สุกรที่โตเต็มที่แล้ว สุกรขุน และสุกรหย่านม) ซึ่งจะให้ความเชื่อมั่น 95% ต่อการตรวจพบสุกรที่ให้ผลบวก (Daniels, 2000) การเก็บซีรัมต้องเก็บหลังจากเลือดแข็งตัวภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันเม็ดเลือดแตก การส่งซีรัมทางเครื่องบินเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการอ้างอิง ผู้ส่งจะต้องผ่านการฝึกอบรมการบรรจุหีบห่อตัวอย่าง

จาก IATA ประเทศที่จะส่งซีรัมต้องมีการติดต่อกับห้องปฏิบัติการการอ้างอิงล่วงหน้าและต้องมีใบอนุญาตนำเข้าตัวอย่าง

วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เป็นวิธีที่ได้ผลเร็วและปลอดภัย ไม่จำเป็นต้องใช้ห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 4 (BSL4) เป็นการวินิจฉัยที่มีประโยชน์ที่สุด การจัดห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจโดยวิธี ELISA มีการแนะนำให้มีการทดสอบมาตรฐานของวิธี โดยใช้ positive และ negative control serum และทดสอบความใช้ได้ (validation) กับซีรัมอ้างอิงซึ่งได้ทำการทดสอบโดยวิธี serum neutralization แล้ว ซึ่งสามารถทราบความจำเพาะของวิธี ELISA ต่อมาห้องปฏิบัติการด้านสุขภาพสัตว์ของประเทศออสเตรเลีย (Australian Animal Health Laboratory, CSIRO) ได้พัฒนาวิธี ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไซโม่งอักษะนิปาห์โดยใช้ blocking antigen ที่เตรียมจาก Vero cell lysate เพื่อลด non-specific reaction และ ใช้แอนติเจนที่เตรียมจากโปรตีน G และ โปรตีน M ของเชื้อไวรัสที่ได้จากการใช้ baculovirus expression system (Daniels et al., 2001) การใช้วิธี ELISA เพื่อการสำรวจสถานะของโรคต้องมีการจัดโปรแกรมอย่างระมัดระวัง เนื่องจากความจำเพาะโดยวิธี ELISA ไม่ได้ผล 100% ซึ่งอาจมีผลบวกหลง (reactor) ดังนั้นการจัดโปรแกรมสำรวจสถานะโรคต้องคำนึงถึงข้อมูลทางระบาดวิทยา สัตวแพทย์ผู้ตรวจและเจ้าหน้าที่สาธารณสุขที่เกี่ยวข้องต้องมีแผนปฏิบัติการล่วงหน้าในกรณีที่เกิดผลการตรวจเป็น reactor ต้องส่งตัวอย่างไปที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงเพื่อยืนยันผลการตรวจ ดังนั้นการเก็บตัวอย่างต้องทำอย่างรอบคอบโดยคำนึงถึงหลักการด้านระบาดวิทยา (Daniels, 2000)

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติได้รับการสนับสนุนจาก Australian Animal Health Laboratory (AAHL) ประเทศออสเตรเลีย ในการนำวิธี indirect และ modify ELISA สำหรับการตรวจทางซีรัมวิทยาทางห้องปฏิบัติการโดยได้รับการสนับสนุน Nipah antigen, Vero antigen, absorbing Vero, negative และ positive Nipah serum และปีงบประมาณ 2553 ได้ดำเนินการจัดซื้อจากประเทศออสเตรเลียเป็นต้นมา

1. การเตรียมซีรัมเพื่อทดสอบโดยวิธี ELISA (วิธีการตาม AAHL ประเทศออสเตรเลีย)

- 1.1 เติมนativated solution หลุมละ 80 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทสำหรับเจาะจางตัวอย่าง (sample plate) ชนิด 96 หลุม ยกเว้นหลุม E, F, G และ H ในแถวที่ 6 และแถวที่ 12 (รูปที่ 5.18)
- 1.2 เติมซีรัมตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ใน inactivated solution จะได้ความเข้มข้นของซีรัม 1:5 (88 ตัวอย่าง/ไมโครเพลท)
- 1.3 ปิดไมโครเพลทด้วยแผ่นปิดไมโครเพลทให้แน่น และนำไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที หลังจากนั้นสามารถแช่แข็งที่ -20°C หากยังไม่ได้ทดสอบต่อ

- 1.4 เตรียมหลอด bullet ลงใน rack ยกเว้นหลุม E, F, G และ H ในแถวที่ 6 และแถวที่ 12
- 1.5 เติม absorbing Vero ลงในหลอด bullet หลอดละ 25 ไมโครลิตร
- 1.6 เติมซีรัมที่ inactivate แล้วลงในหลอด bullet หลอดละ 25 ไมโครลิตร
- 1.7 วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
- 1.8 เติม blocking solution ลงในหลอด bullet หลอดละ 450 ไมโครลิตร(ซีรัมเจือจาง 1:100)
- 1.9 เตรียมซีรัม high positive (H+) (เจือจาง 1:100)
 - นำซีรัม high positive ที่ผ่านการ inactivate เช่นเดียวกับซีรัมปกติ 250 ไมโครลิตรผสมกับ absorbing Vero 250 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 15 มล.
 - เติม blocking solution 4.5 มล.
 - วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
- 1.10 เตรียมซีรัม low positive (L+) (เจือจาง 1:800)
 - นำซีรัม high positive ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมกับ blocking solution 4.2 มล. ในหลอดขนาด 15 มล.
- 1.11 เตรียมซีรัม negative (N-)
 - นำซีรัม negative ที่ผ่านการ inactivate เช่นเดียวกับซีรัมปกติ 250 ไมโครลิตร ผสมกับ absorbing vero 250 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 15 มล.
 - เติม blocking solution 4.5 มล.
 - วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	45	53	61	69	77	85
B	2	10	18	26	34	42	46	54	62	70	78	86
C	3	11	19	27	35	43	47	55	63	71	79	87
D	4	12	20	28	36	44	48	56	64	72	80	88
E	5	13	21	29	37		49	57	65	73	81	
F	6	14	22	30	38		50	58	66	74	82	
G	7	15	23	31	39		51	59	67	75	83	
H	8	16	24	32	40		52	60	68	76	84	

รูปที่ 5.18 Sample plate

2. วิธีการทดสอบ

- 2.1 เติมนipah antigen ลงในไมโครเพลททดสอบ (ELISA plate) แถวที่ 1 3 5 7 9 และ 11 เติมนipah antigen แถวที่ 2 4 6 8 10 และ 12 หลุมละ 50 ไมโครลิตรทุกหลุม A-H (รูปที่ 5.19)
- 2.2 ปิดไมโครเพลทด้วยแผ่นปิดไมโครเพลทและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าไมโครเพลท
- 2.3 ล้างด้วย 0.5% PBS-T 4 ครั้งแต่ละครั้งให้เคาะไมโครเพลทเพื่อให้สะอาดน้ำ
- 2.4 เติมนblocking solution 100 ไมโครลิตรต่อหลุมทุกหลุม
- 2.5 ปิดไมโครเพลทด้วยแผ่นปิดไมโครเพลทอันเดิม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที บนเครื่องเขย่าไมโครเพลท
- 2.6 ล้างด้วย 0.5% PBS-T 4 ครั้ง แต่ละครั้งให้เคาะแรงๆ เพื่อให้สะอาดน้ำ
- 2.7 ถ่ายซีรัมที่เจือจาง 1:100 จาก sample plate (ผสมขึ้นลง 3 ครั้ง) ลงใน ELISA plate โดยถ่ายแถวที่ 1 จาก sample plate มาเติมในแถวที่ 1 และ 2 ของ ELISA plate ดังนั้น sample plate 1 แผ่น จะใช้ ELISA plate 2 แผ่น
- 2.8 เติมนซีรัม high positive (H+) ที่เตรียมไว้ลงในหลุม E11 และ E12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร
- 2.9 เติมนซีรัม low positive (L+) ที่เตรียมไว้ลงในหลุม F11 และ F12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร
- 2.10 เติมนซีรัม negative (N-) ที่เตรียมไว้ ลงในหลุม G11 และ G12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร
- 2.11 เติมนinactivate solution ลงในหลุม H11 และ H12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร
- 2.12 ปิดไมโครเพลทด้วยแผ่นปิดไมโครเพลทและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยไม่ต้องเขย่าไมโครเพลท
- 2.13 ล้างด้วย 0.5% PBS-T 4 ครั้ง แต่ละครั้งให้เคาะ plate แรงๆ เพื่อให้สะอาดน้ำ
- 2.14 เติมนprotein A peroxidase ที่เจือจาง (1:8,000) ด้วย conjugate diluent ทุกหลุม (ยกเว้นหลุม H12) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนหลุม H12 (TMB control) เติมนconjugate diluent 100 ไมโครลิตร
- 2.15 ปิดไมโครเพลทด้วยแผ่นปิดไมโครเพลทและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยไม่ต้องเขย่าไมโครเพลท
- 2.16 ล้างด้วย 0.5% PBS-T 4 ครั้ง แต่ละครั้งให้เคาะไมโครเพลทแรงๆ เพื่อให้สะอาดน้ำ
- 2.17 เติมนTMB substrate ทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร
- 2.18 ปิดไมโครเพลทด้วยแผ่นปิดไมโครเพลทและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-20 นาที ในที่มืด
- 2.19 เติมนstop solution ทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร
- 2.20 อ่านผลด้วยเครื่อง ELISA ที่ 450 nm

	Ni	Ve	Ni	Ve	Ni	Ve	Ni	Ve	Ni	Ve	Ni	Ve
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41
B	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42
C	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43
D	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44
E	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37	H+	H+
F	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38	L+	L+
G	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39	N-	N-
H	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40	C	TMB

Ni = Nipah antigen

Ve = Vero antigen

H+ = High positive serum

L+ = Low positive serum

N- = Negative serum

C = Conjugate control

TMB = Substrate control

รูปที่ 5.19 ELISA plate

3. การคำนวณและการแปลผล

$$S/N = \frac{\text{OD sample with Nipah antigen}}{\text{OD sample with Vero antigen}}$$

S/N ratio ≥ 2.0 is Positive

S/N ratio < 2.0 is Negative

หมายเหตุ:

- OD high positive serum (H+) $\approx >0.8 - 1.1$
- OD low positive serum (L+) $\approx >0.2 - 0.4$
- OD negative serum (N-) $\approx <0.2$

4. การเตรียมสารละลาย

สารละลายอื่นๆ นอกจาก Nipah antigen, Vero antigen, absorbing Vero, negative และ positive Nipah serum เตรียมที่ห้องปฏิบัติการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ดังนี้

4.1 Washing solution

1.1 PBS 13 ลิตร

- PBS 1,300 มล. (1.3 ลิตร)
- DW1 11,700 มล. (11.7 ลิตร)

1.2 0.5% PBS-T

- PBS 12,935 มล. (12.935 ลิตร)
- Tween (20) 65 มล.

4.2 Inactivated solution

- PBS 99 มล.
- Tween (20) 0.5 มล.
- Triton X-100 0.5 มล.

4.3 Blocking solution (5% skim milk* + 5% chicken serum in PBS)

- PBS 617.5 มล.
- Skim milk 32.5 กรัม
- Chicken serum 32.5 มล.

* ละลาย skim milk ใน PBS ก่อนแล้วเติม serum

4.4 Conjugate diluent (1% skin milk in PBST)

- 0.5% PBST 210 มล.
- Skim milk 2.1 กรัม

4.5 TMB solution แบ่งใส่ในขวดแก้วสีชาวดละ 1 มล. หรือห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

- TMB 0.101 กรัม
- DMSO 10 มล.

TMB substrate

- H₂O 180 มล.
- TMB solution 2 มล.
- Acetate-Citric buffer 20 มล.
- 3H₂O₂ (30 µl 30% H₂O₂ + 270 µl H₂O) 250 ไมโครลิตร

4.6 Acetate - Citric acid buffer

- 1 M Na acetate 100 มล.
- 1 M Citric acid 1.5 มล.

Adjust ด้วย Citric Acid ให้ได้ pH 5.9

4.7 Stop solution

(1 N H₂SO₄ 700 มล.)

- DW2 680 มล.
- H₂SO₄ (conc.) 20 มล.

4.8 Nipah antigen

- PBS 50 มล.
- Nipah antigen 50 ไมโครลิตร

4.9 Vero antigen

- PBS 50 มล.
- Vero antigen 50 ไมโครลิตร

4.10 absorbing Vero*

- PBS 29.7 มล.
- Absorbing Vero 300 ไมโครลิตร

* การเตรียม absorbing Vero สามารถใช้ Vero antigen แทน absorbing Vero ได้

วิธี serum neutralization

เป็นวิธีที่ใช้ยืนยันผลการตรวจในการตรวจโดยวิธี EILSA ให้ผลสงสัย และเนื่องจากวิธีนี้ต้องใช้เชื้อไวรัสในปริมาณการตรวจซึ่งเป็นเชื้ออันตรายสูง จึงจำเป็นต้องปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 4

ประเทศไทยมีความเสี่ยงสูงที่อาจเกิดการระบาดของโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ เนื่องจากมีพรมแดนติดต่อกับประเทศมาเลเซีย กรมปศุสัตว์ได้ทำการเฝ้าระวังโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ในประชากรสุกร โดยสำนักควบคุมป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ร่วมกับสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ดำเนินการเฝ้าระวังโรคในพื้นที่เสี่ยงสูง หรือมีการเลี้ยงสุกรหนาแน่น คือในพื้นที่ของสำนักสัตวศาสตร์ สัตว์ และสุขอนามัยที่ 2, 7, 8 และ 9 ระหว่างปี พ.ศ. 2542 ถึง 2554 โดยตรวจคัดกรองทางซีรัมวิทยาโดยวิธี ELISA และตรวจหาไวรัสแอนติเจนด้วยวิธี immunohistochemistry (IHC) จากเนื้อเยื่อสุกรป่วยที่แช่ในฟอร์มาลิน ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมเนื่องจากสามารถใช้ห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติได้รับการสนับสนุนจาก Australian Animal Health Laboratory (AAHL) ประเทศออสเตรเลียโดยได้นำวิธี Indirect ELISA ในการตรวจตัวอย่างซีรัมในปีพ.ศ. 2542 ต่อมาในปี 2544 ผู้เชี่ยวชาญจากประเทศออสเตรเลีย ได้จัดฝึกอบรมความรู้ด้าน IHC และ Modified ELISA และในปี 2545 ได้รับการสนับสนุนแอนติเจนสำหรับการตรวจซีรัมสุกรด้วยวิธี Modified ELISA จากการตรวจหาไวรัสแอนติเจน ในตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดสุกรที่มีรอยโรคปอดอักเสบชนิด interstitial pneumonia ด้วยวิธี IHC ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 ถึง 2547 จำนวน 671 ตัวอย่าง ผลการตรวจให้ผลลบทุกตัวอย่าง (ข้อมูลจากกลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ตารางที่ 5.1)

ผลการตรวจทางซีรัมวิทยา โดยตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสสปีนาร์ต โดยวิธี ELISA ระหว่างปี พ.ศ. 2542-2554 จำนวน 49,967 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5.2) ตัวอย่างส่งตรวจให้ผลลบทั้งหมดโดยมีบางตัวอย่างให้ผลบวก (reactor) เนื่องจากความจำเพาะวิธีนี้ไม่ได้ผล 100% ซึ่งอาจมีผลบวก (reactor) ทางสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ได้ส่งตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกระหว่างปี พ.ศ. 2542-2547 ตรวจยืนยันด้วยวิธี serum neutralization ณ ห้องปฏิบัติการ AAHL ประเทศออสเตรเลีย ทุกตัวอย่างส่งตรวจให้ผลลบ

ตารางที่ 5.1 ผลการตรวจหาไวรัสแอนติเจนจากตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดสุกรที่มีรอยโรคปอดอักเสบชนิด interstitial pneumonia ด้วยวิธี immunohistochemistry

พ.ศ.	จำนวนตัวอย่าง	ผล
2541	58	-
2542	169	-
2543	112	-
2544	55	-
2545	41	-
2546	82	-
2547	154	-
รวมทั้งสิ้น	671	ให้ผลลบทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 5.2 จำนวนตัวอย่างซีรัมสุกรตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสสปีนาร์ต ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay ระหว่างปี พ.ศ. 2542-2554

พ.ศ.	วิธีตรวจ	จำนวนตัวอย่าง
2542	Indirect ELISA	560
2544	Modified ELISA	1,299
2545	Modified ELISA	1,298
2546	Modified ELISA	14,737
2547	Modified ELISA	3,594
2548	Modified ELISA	4,762
2549	Modified ELISA	4,202
2550	Modified ELISA	4,566
2551	Modified ELISA	3,666
2552	Modified ELISA	4,900
2553	Modified ELISA	3,031
2554	Modified ELISA	3,352
รวมทั้งสิ้น		49,967

บรรณานุกรม

- Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robinson D, Christianson WT, Morrison RB, Goryca D and Chladek D. 1992. Characterization of swine infertilization of swine infertility and respiratory syndrome syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR. 2332). J Vet Diagn Invest, 4: 127-133.
- CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A (H1N1) 6 October 2009. http://www.who.int/sr/resources/publications/swineflu/sequencing_primers/en/index.html.
- CDC sequence primers and protocol for influenza A (H1N1) 12 May 2009. http://www.who.int/sr/resources/publications/swineflu/sequencing_primers/en/index.html.
- Daniels P. 2000. The Nipah virus outbreak in Malaysia: Overview of the outbreak investigation and the issues that remain. In: 16th International Pig Veterinary Society Congress (ed. Cargill CaMO, S.) Ocean Grove. p. 553-554.
- Daniels P, Ksiazek T and Eaton B. 2001. Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra virus infections. Microbes and Infection, 3: 289-295
- Hyatt A, Zaki S, Goldsmith C, Wise T and Hengstberger, S. 2001. Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cell culture and host animals. Microbes and Infection. 3: 279-306.
- Kleiboeker SB, Schommer SK, Lee SM, Watkins S, Chiitick W and Polson D. 2005. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase - PCR. J Vet Diagn Invest. 17(2): 165-170.
- Mardassi H, Louise W, Samir M and Serg D. 1994. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. J Clin Microbiol, 12(9): 2197-2203.
- Takemae N, Parchariyanon S, Damrongwatanapokin S, Uchida Y, Ruttanapumma R, Watanabe C, Yamaguchi S and Saito T. 2008. Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. Influenza and Other Respiratory Viruses, 2: 181-189.

- Takemae N, Ruttanapumma R, Parchariyanon S, Yoneyama S, Hayashi T, Hiramatsu H, Sriwilaijaroen N, Uchida Y, Kondo S, Yagi H, Kato K, Suzuki Y and Saito T. 2010. Alterations in receptor-binding properties of swine influenza viruses of the H1 subtype after isolation in embryonated chicken eggs. *Journal of General Virology*, 91: 938-948.
- Will R, Doster A, Galeota J, Sur J and Osorio E. 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol*, 41: 58-62.
- WHO information for Laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009. Virus in humans-revised, 23 November 2009. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_Recommendations_H1N1_20090521.Pdf.
- Xiao X, Wu H, Yu Y, Cheng B, Yang X, Chen G, Liu D and Li X. 2008. Rapid detection of a highly virulent Chinese-type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by real-time reverse transcriptase PCR. *J Virol Meth*, 149: 49-55.
- Zhou EM, Zimmerman JJ, Zhou KX, Jiang Z and Platt KB. 2002. IgM capture ELISA as a sero diagnostic test for detection of primary infection of PRRSV in pigs. *Proc Annual Meeting Am Assoc Swine Vet*, p. 295-298.