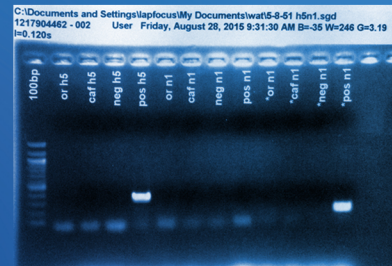




คู่มือทางห้องปฏิบัติการ ในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนก และนิวคาสเซิลทางไวรัสวิทยา



สัตวแพทย์หญิงรินฤดี บุญยะไพตร
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

คู่มือทางห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนก และนิวคาสเซิลทางไวรัสวิทยา

รหัสมาตรฐานสากลประจำหนังสือ :

ISBN 978-616-406-181-1

ชื่อหนังสือ : คู่มือทางห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนก
และนิวคาสเซิลทางไวรัสวิทยา

ชื่อผู้แต่ง : สัตวแพทย์หญิงรื่นฤดี บุญยะโทตระ
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ครั้งที่พิมพ์ : ครั้งที่ 1 จำนวน 100 เล่ม

ปีที่พิมพ์ : พ.ศ. 2558

พิมพ์ที่ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย

คำนำ

โรคไข้หวัดนกและโรคนิวคาสเซิลจัดเป็นโรคที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในสัตว์ปีก การระบาดของโรคไข้หวัดนกส่งผลกระทบต่อทั้งทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสาธารณสุข ตลอดจนระบบการผลิตและอุตสาหกรรมส่งออกสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกของประเทศไทยสร้างความเสียหายต่อระบบการผลิตและการส่งออก เป็นผลให้เสียโอกาสทางการค้า ขะลอการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศ ในขณะที่โรคนิวคาสเซิลก็สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในลักษณะเดียวกัน ปัจจุบันกรมปศุสัตว์โดยความร่วมมือของหลายฝ่ายที่เกี่ยวข้องสามารถควบคุมการเกิดโรคได้ตลอดระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา แม้กระนั้นก็ตาม การวางมาตรการเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่องนับเป็นสิ่งสำคัญและมีความจำเป็นเพื่อให้ผู้บริโภครภายในประเทศ ตลอดจนประเทศคู่ค้ามีความมั่นใจในความปลอดภัยของผลผลิตสัตว์ปีก มาตรการเฝ้าระวังโรคที่สำคัญยิ่งประการหนึ่ง คือการมีห้องปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคที่เชื่อถือได้และมีมาตรฐานสากล ตลอดจนมีเครือข่ายทางห้องปฏิบัติการที่กระจายอยู่ในแต่ละภูมิภาคทั่วประเทศ ที่มีระบบการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการเป็นไปในแนวทางเดียวกัน อันจะนำไปสู่การเป็นมาตรฐานเดียวกันทั่วประเทศ ทั้งนี้การจัดทำคู่มือทางห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกและนิวคาสเซิลทางไวรัสวิทยาเล่มนี้ ใช้เทคนิคที่เป็นมาตรฐานสากลตามข้อกำหนดขององค์การสุขภาพสัตว์โลก ซึ่งเป็นที่เชื่อถือและเป็นหลักในการปฏิบัติงานทั่วโลก

ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิชาการและผู้ที่เกี่ยวข้องใน อันที่จะเพิ่มพูนความรู้และเป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานสมดังเจตนารมณ์ของผู้เขียนสืบไป

รื่นฤดี บุณยะโหดระ
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
ตุลาคม 2558

สารบัญ

	หน้า
ตอนที่ 1 : โรคไข้หวัดนก	1
ตอนที่ 2 : การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา	14
ตอนที่ 3 : โรคนิวคาสเซิล	42
ตอนที่ 4 : การตรวจวินิจฉัยโรคนิวคาสเซิลทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา	49
ตอนที่ 5 : วิธีการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงและสารเคมี	66
ตอนที่ 6 : เครื่องมือห้องปฏิบัติการ และการทำ interlaboratory testing	79

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายงานการพบเชื้อ H5, H7-HPAI ในกลุ่มประเทศในทวีปเอเชีย ปีค.ศ. 2011-2015	11
ตารางที่ 2 รายงานการพบเชื้อ H5, H7-HPAI ในกลุ่มประเทศในทวีปอาฟริกา ปีค.ศ. 2011-2015	12
ตารางที่ 3 รายงานการพบเชื้อ H5, H7-HPAI ในกลุ่มประเทศในทวีปยุโรป ปีค.ศ. 2011-2015	13
ตารางที่ 4 รายงานการพบเชื้อ H5, H7-HPAI ในกลุ่มประเทศในทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้และออสเตรเลีย ปีค.ศ. 2011-2015	13

สารบัญภาพ

หน้า

Fig. 1	Egg inoculation into allantoic cavity	18
Fig. 2	Hacmorrhage of the embryo 24 hrs. after egg inoculation with H5N1 virus isolated in 2004	18
Fig. 3	normal chicken embryo fibroblast (CEF) cell	19
Fig. 4	Cytopathic effect (CPE) 80% after inoculation of H5N1 virus into CEF cell for 48 hrs.	19
Fig. 5	Detection of HA activity from infected allantoic fluid using HA test	21
Fig. 6	Identification of Influenza A virus from infected allantoic fluid using HI test	22
Fig. 7	Amplified product of H5 and N1 fragments using One-step RT-PCR	31
Fig. 8	Amplification curve of NDV and Influenza A virus using multiplex rRT-PCR	35
Fig. 9	Cytopathic effect (50%) after CEF inoculation of NDV for 48 hrs.	51
Fig. 10	Cytopathic effect (80%) after CEF inoculation of NDV for 72 hrs.	51
Fig. 11	Amplified NDV gene fragment was shown after running of Nested PCR.	56

ตอนที่ 1

โรคไข้หวัดนก (Avian Influenza, AI)

โรคไข้หวัดใหญ่ชนิด A (Influenza A) มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสใน family *Orthomyxoviridae*, genus *Influenzavirus A* (Cox, 2000) เชื้อไข้หวัดใหญ่แบ่งเป็น 3 genera คือ A, B และ C เฉพาะเชื้อไวรัส Influenza A ที่ติดเชื้อมนสัตว์ปีก (poultry) และนก (bird) ปัจจุบันองค์การสุขภาพสัตว์โลก (World Organization of Animal Health, OIE) ให้คำจำกัดความของโรคไข้หวัดนก (avian influenza) และกำหนดให้รายงานโรคในกรณีที่เป็นการติดเชื้อในสัตว์ปีกที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส Influenza A ชนิดก่อโรครุนแรงสูง (high pathogenicity) การติดเชื้อที่มีสาเหตุจาก H5 และ H7 subtype ชนิดก่อโรครุนแรงต่ำ (low pathogenicity) และ ไวรัส Influenza A ชนิดก่อโรครุนแรงสูงในนกและนกป่า ส่วนไวรัส Influenza A ที่เป็น non-H5 และ non-H7 ได้แก่ H1-4, H6 และ H8-16 ไม่อยู่ในคำจำกัดความของโรคไข้หวัดนกและไม่ต้องรายงานต่อ OIE (OIE, 2015) ดังนั้นคำสำคัญที่กล่าวถึงในบริบทของโรคไข้หวัดนก คือ highly pathogenic avian influenza (HPAI), H5/H7 Low pathogenic avian influenza (LPAI) และ Influenza A โดยคำหลังหมายถึง influenza virus ในนก (bird) ที่เป็น H1-H16

สาเหตุของโรค

เชื้อไวรัส Influenza A มีลักษณะ spherical ถึง pleomorphic เป็น envelope single stranded RNA มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-120 μm ประกอบด้วย glycoprotein 2 ชนิดคือ H และ N ซึ่งมีความสำคัญในการจำแนกเชื้อและควบคุมการเกิดโรค โดย H มีผลต่อความสามารถของไวรัสในการจับกลุ่ม (agglutination) เม็ดเลือดแดงกับการเกาะติดและแทรกตัวเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ส่วน N เกี่ยวข้องในการปล่อย virus particle ที่สร้างขึ้นใหม่ออกจากเซลล์เจ้าบ้าน เชื้อไวรัสประกอบด้วยโปรตีน 8 ชนิดได้แก่ HA NA NP M1 M2 PB1 PB2 และ HA และ non-structural protein ได้แก่ NS1 และ NS2 ปัจจุบันมีรายงานพบ H 16 subtype (H1-H16) และ N 9 subtype (N1-N9) ในนกป่าและสัตว์ปีกทั่วโลก (Spielman et al., 2004) โดย H5 H7 และ H9 สามารถก่อโรครุนแรง (Webster and Hulse, 2004) เฉพาะ H5 และ H7 จัดเป็น

subtype ที่ก่อโรครุนแรงในสัตว์ปีก (Easterday et al., 1997) อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัส H5 และ H7 ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากนกมักมีความรุนแรงต่ำในสัตว์ปีก แต่เนื่องจากทั้ง 2 subtype สามารถปรับเปลี่ยนความรุนแรงในการก่อโรคเป็น HPAI ได้ หากมีการหมุนเวียนของเชื้อในฝูงสัตว์ปีก ระยะเวลาหนึ่ง (Suarez et al., 2003a; Swayne and Halvorson, 2008) ดังนั้น H5/H7 LPAI virus ทั้งหมดจากสัตว์ปีกจึงต้องรายงานต่อ OIE

การกระจายของโรค

โรคนี้เดิมมีชื่อเรียกว่า Fowl plaque มีรายงานการเกิดโรคครั้งแรกในปีค.ศ.1878 และ 1901 สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1955 จึงสามารถตรวจพบเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค ในปีค.ศ.1970 มีการศึกษาเฝ้าระวัง และตรวจพบเชื้อ ไวรัสในนกน้ำ (waterfowl) และมีการสันนิษฐาน ถึงความเสี่ยงที่นกดังกล่าว อาจนำโรคไปสู่สัตว์ปีก จากนั้นหลายปีต่อมาเกิดการระบาดของโรคในไก่กระทงในประเทศ สหรัฐอเมริกาในปีค.ศ.1983 และประเทศเม็กซิโกในปีค.ศ.1990 จนกระทั่งเกิดการระบาดของ H5N1-HPAI ในฮ่องกงเมื่อปีค.ศ.1997 ต่อเนื่องจนถึงต้นปีค.ศ.2005 ในหลายประเทศในแถบ เอเชีย เป็นผลให้ต้องทำลายสัตว์ปีกเป็นจำนวนถึง 150 ล้านตัวเพื่อหยุดยั้งการแพร่ระบาดของโรค แม้กระนั้นก็ตามเชื้อไวรัสยังแพร่ไปยังประเทศรัสเซียราวกลางปีค.ศ.2005 โดยมีรายงานการแพร่เชื้อไปยังสุกรและเสือด และพบว่ำนับตั้งแต่ปีค.ศ.1997 เป็นต้นมา เชื้อไวรัสมีการสลับลำดับ nucleotide เป็นจำนวนถึง 17 reassortment ในคนในทวีปเอเชีย อีกทั้งมีอุบัติการณ์ของ H7N7-HPAI ในประเทศเนเธอร์แลนด์ในปี ค.ศ.2003 โดยมีผู้เสียชีวิต 1 คน และมีการทำลายไก่นับล้านตัวเพื่อหยุดยั้งการแพร่ระบาดของโรค

ระบาดวิทยา

มีข้อสันนิษฐานว่า นกน้ำ (aquatic birds) อาจเป็นต้นกำเนิดของเชื้อไวรัส Influenza A และเป็ดอพยพอาจเป็นตัวกระจายเชื้อโดยไม่เกิดโรค รวมทั้งนกสวยงามและนกน้ำเลี้ยงจาก ตลาดค้าสัตว์ปีกที่อาจเป็นตัวแพร่เชื้อ (Sims et al., 2005) มีผู้ให้ข้อสังเกตว่า Influenza A อาจปรับเปลี่ยนจาก LPAI ซึ่งพบทั่วไปในนกป่าเป็น HPAI ได้ จึงมีการศึกษาเฝ้าระวังเชื้อ Influenza A ในนกป่าอย่างกว้างขวาง โดยคาดหวังว่าผลจากการเฝ้าระวังน่าจะเป็นสัญญาณเตือนการระบาดของ HPAI

ปัจจุบันมีรายงานการแยกเชื้อ Influenza A ในภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก ทั้ง แอฟริกา เอเชีย ออสเตรเลีย ยุโรป อเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ เกี่ยวกับชนิดของสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ มีรายงานการ

แยกเชื้อไวรัส ได้จากสัตว์ปีกใน order Anseriformis (เป็ดและห่าน) และ Charadriiformes (นกทะเล นกนางนวล นกน้ำ) ซึ่งคาดว่ากลุ่มหลังน่าจะเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อไวรัสโดยไม่ก่อโรค (Stallknecht et al., 2007)

ความคงทนของไวรัส

โดยทั่วไปเชื้อไวรัส Influenza A ไม่คงทนต่อสิ่งแวดล้อม ความร้อน ความเป็นกรด-ด่าง และความแห้งสามารถทำลายเชื้อได้ เชื้อไวรัสมี lipid envelope ซึ่งถูกทำให้หมดฤทธิ์ (inactivate) ได้ด้วย organic solvent และน้ำยาฆ่าเชื้อ (detergent) ในกรณีเชื้อไวรัสอยู่ในอินทรีย์วัตถุ (organic matter) เช่น อุจจาระ น้ำมูก สามารถทำลายเชื้อได้โดยใช้สารเคมี เช่น กลุ่ม aldehyde (formaldehyde หรือ glutaraldehyde) และ beta-propiolactone แต่กรณีที่สามารถชะล้างอินทรีย์วัตถุออกไปได้ สามารถทำลายไวรัสได้โดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น quaternary ammonium compound, phenolic, sodium hypochlorite กรดเจือจาง เป็นต้น

การทำลายเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ มักใช้ 70% ethanol, phenol, quaternary ammonium compound และ sodium hypochlorite การที่ไวรัสมีอินทรีย์วัตถุห่อหุ้มอยู่ทำให้เชื้อคงทนต่อสารเคมีและทางฟิสิกส์มากขึ้น อีกทั้งในสภาวะดังกล่าว ความชื้นและความเย็นจะช่วยให้เชื้อไวรัสอยู่ได้นานขึ้น มีรายงานว่าเชื้อไวรัส สามารถคงชีพในสภาวะที่มีของเหลวได้นานถึง 105 วันในอุณหภูมิต่ำ และหากมีอุจจาระห่อหุ้มจะคงชีพได้นานถึง 30-35 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C และนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 10°C ดังนั้นการทำลายเชื้อในพื้นที่จึงแนะนำให้ดำเนินการเป็นขั้นตอนโดยในขั้นแรกใช้ความร้อน ล้างคอกหรือสิ่งปลูกสร้างโดยใช้อุณหภูมิ 90°C นาน 1 สัปดาห์ จากนั้นเคลื่อนย้ายอุปกรณ์เพื่อล้างและใช้น้ำยาฆ่าเชื้อแล้วทิ้งวางไว้นาน 2-3 สัปดาห์ น้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ได้ดี คือ 5.25% sodium hypochlorite, 2% sodium hydroxide, phenol, 4% sodium carbonate/0.1% sodium silicate (Committee on Foreign Animal Diseases, 1998) ทั้งนี้หากสามารถชะล้างอินทรีย์วัตถุก่อนจะทำให้ น้ำยาฆ่าเชื้อสามารถทำลายไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Vegad, 2008) นอกจากนี้ความร้อนอุณหภูมิ 50°C อย่างน้อย 60 นาที หรือ pH ต่ำๆ (pH 2) ก็สามารถทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ได้

กรณีของ LPAI virus มีรายงานว่าเชื้อ H7N2-LPAI สามารถคงชีพได้นานกว่า 32 วัน ที่อุณหภูมิ 20°C และอย่างน้อย 20 วัน ที่ 28-30°C ในขณะที่ H5 และ H7-HPAI คงชีพในน้ำได้นานกว่า 100 วัน ที่อุณหภูมิ 17°C และอยู่ได้นาน 26-30 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C ในสภาวะแช่แข็งไวรัส สามารถคงชีพอยู่ได้นานไม่จำกัด สำหรับ H5N1 มีรายงานว่าในสภาวะที่อยู่มูลไก่ ไวรัสคงชีพได้นานถึง 4 วัน ที่อุณหภูมิ 25-32°C ในที่ร่ม

ในกรณีที่ต้องการเก็บรักษาเชื้อ ไวรัสจะอยู่ได้นานในสารละลายที่มีโปรตีน และอยู่ได้นานขึ้นหากเก็บที่ -70°C หรือทำให้แห้ง (lyophilization) เชื้อไวรัสในน้ำไขสามารถคงทนได้นานหลายสัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4°C โดยไม่สูญเสียความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) และแม้ว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ทั่วไปสามารถทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ได้ แต่ยังคงตรวจพบ RNA โดยวิธีการทางชีวโมเลกุล แต่จะไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้ (Suarez et al., 2003b)

การจำแนกเชื้อไวรัส

ไวรัส Influenza A จำแนกเป็น subtype ตามปฏิกิริยาทางซีรัมวิทยาของ HA และ NA glycoprotein โดยแบ่งเป็น 16 HA subtype และ 9 NA subtype ทั้งนี้การตรวจหา HA และ NA subtype ทำได้โดยวิธีการทางซีรัมวิทยาโดยวิธี Haemagglutination – haemagglutination inhibition (HA-HI) และ Neuraminidase – neuraminidase inhibition (NA-NI) (Fouchier et al., 2005; Swayne et al., 2008) ล่าสุดมีรายงานการแยกเชื้อ H17, H18 จากค้างคาวในกัวเตมาลา (Tong et al., 2012; 2013; Swayne et al., 2013) ในส่วนของ H5N1 ยังมีการจำแนกเป็น clade ต่างๆ เพื่อแสดงถึงความหลากหลายทางโมเลกุลและ gene evolution

เชื้อไวรัส Influenza A ในสัตว์ปีกสามารถจำแนกตามความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity) ได้เป็น 2 pathotype ดังได้กล่าวมาแล้ว ทั้งนี้ OIE (2015) ได้กำหนดเกณฑ์ในการตัดสินความรุนแรงของเชื้อไวรัสดังนี้

a) วิธีการข้อใดข้อหนึ่งในการตัดสินความรุนแรงของเชื้อไวรัสในไก่ high pathogenicity influenza A ได้แก่

i) เชื้อไวรัส Influenza A ที่เมื่อฉีดน้ำไขติดเชื้อมีระดับความเจือจาง 1/10 dilution ปริมาณ 0.2 mL เข้าเส้นเลือดไก่อายุ 4-8 สัปดาห์ จำนวน 8 ตัว ทำให้ไก่จำนวน 6, 7 หรือ 8 ตัวตายภายใน 10 วันหลังฉีดเชื้อ

ii) เชื้อไวรัส Influenza A ที่มีค่า intravenous pathogenicity index (IVPI) มากกว่า 1.2 ดังจะกล่าวถึงวิธีการหาค่า IVPI ในบทต่อไป

b) เชื้อไวรัส H5 และ H7 ทั้งหมดที่เป็น low pathogenicity ในไก่ ให้ศึกษาการเรียงลำดับ amino acid ที่ cleavage site ของ HA protein หากมี multiple basic amino acid ให้พิจารณาจัดเป็น HPAI

ทั้งนี้ OIE (2015) วางข้อกำหนดในการจำแนกเชื้อไวรัส Influenza A ที่ต้องรายงานโรคและวางมาตรการควบคุมดังนี้

a) Influenza isolate ทั้งหมดจากไก่ที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์ที่กำหนด ให้จัดเป็น HPAI

b) H5 และ H7 isolate จากไก่ที่ไม่เป็น highly pathogenic ในไก่ และไม่มีลำดับ amino

acid ที่ H0 cleavage site ที่คล้ายคลึงกับ HPAI virus อื่นๆ ให้จัดเป็น H5/H7 LPAI

c) ตามวัตถุประสงค์ของ Terrestrial Code HPAI และ H5/H7 LPAI ในไก่ เข้าหลักเกณฑ์ของคำว่า “avian influenza”

d) เชื้อไวรัส Influenza A ที่เป็น high pathogenicity ในนกชนิดอื่น นอกเหนือจากไก่ รวมทั้งนกป่า

วิธีการในการศึกษาการเรียงลำดับ nucleotide อาจทำโดยสกัด RNA จากตัวอย่างและศึกษาการเรียงลำดับของ nucleotide ของ haemagglutinin cleavage site โดยตรงหรืออาจใช้วิธี cloning ส่วนของ haemagglutinin แล้วจึงศึกษาการเรียงลำดับ nucleotide จาก cDNA ก็ได้

อย่างไรก็ตาม กรณีที่ผลการศึกษาการเรียงลำดับ nucleotide ไม่พบลักษณะที่คล้ายคลึงกับ HPAI virus ต้องตรวจริบยืนยันโดยวิธีฉีดเข้าไก่ เนื่องจากมีความเป็นไปได้ที่ตัวอย่างจะมีเชื้อไวรัสทั้ง high และ low pathogenicity รวมกัน แม้ว่าจากการศึกษาที่ผ่านมา HPAI virus จะเป็น H5 H7 แต่มีรายงานพบ H10N4 และ H10N5 ที่จัดเป็น HPAI (Wood et al., 1996) จากการฉีดเชื้อเข้าไก่พบว่าเชื้อไวรัส H10N4 และ H10N5 ทำให้ไก่ตายถึง 7/10 และ 8/10 ตัวตามลำดับ โดยมีค่า IVPI มากกว่า 1.2 แต่จากการศึกษาการเรียงลำดับ amino acid ที่ haemagglutinin cleavage site ไม่พบลักษณะที่คล้ายคลึงกับ HPAI อื่นๆ ในทางกลับกันมีรายงานพบเชื้อไวรัส 4 ตัวที่พบ multiple amino acid ที่ haemagglutinin cleavage site แต่มีค่า IVPI ต่ำกว่า 1.2 (Londt et al., 2007)

การติดต่อ

เนื่องจากเชื้อไวรัส Influenza A มีการเพิ่มจำนวนที่ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร ไต และระบบสืบพันธุ์ ดังนั้นจึงพบว่าเชื้อจะถูกขับจากจมูก ปาก conjunctiva และ cloaca ของสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ จากการทดลองให้ไก่ติดเชื้อ HPAI virus ทาง intranasal route สามารถพบเชื้อไวรัสปริมาณสูงที่ oropharynx มากกว่าจาก cloaca ทั้งนี้อาจขึ้นกับแต่ละ isolate (เชื้อไวรัสที่แยกได้) จากรายงานของ Nakatani และคณะ (2005) พบว่าเชื้อ H5N1-HPAI ที่แยกได้จากไก่ในประเทศญี่ปุ่น น่าจะมีการขับเชื้อไวรัสจากทางเดินอาหารมากกว่าจากทางเดินหายใจ ในขณะที่หากเป็น LPAI ปริมาณไวรัสที่ถูกขับออกมาจะต่ำกว่ามาก การติดต่อที่สำคัญ คือการติดต่อโดยตรง (direct contact) กับสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ และการติดต่อโดยอ้อม (indirect contact) จากการสัมผัสสิ่งคัดหลั่งหรือสิ่งปนเปื้อนเชื้อไวรัส คนเป็นตัวแพร่เชื้อที่สำคัญจากแหล่งต้นกำเนิดของเชื้อไปยังจุดอื่น เช่น จากฟาร์มที่เกิดโรครวมทั้งเครื่องมือเครื่องใช้ในฟาร์ม (mechanical transmission) ซึ่งเป็นการติดต่อที่สำคัญที่สุดในการแพร่ระบาดของโรค สำหรับการติดต่อจากแม่สู่ลูก (vertical transmission) ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน มีรายงานการพบเชื้อไวรัสที่เปลือกไข่และ internal

content ในไข่ไก่ จากแม่ไก่ที่ติดเชื้อ HPAI (Cappuci et al., 1985; Kilany et al., 2010) อย่างไรก็ตามไวรัส Influenza A เป็น embryo lethal คือ ทำให้ตัวอ่อนในไข่ตาย นอกจากนี้การติดเชื้อทั้ง HPAI และ LPAI ในไข่ไก่มีผลให้อัตราการให้ไข่น้อยลง

ตลาดค้าสัตว์ปีกและฟาร์มสุกรเป็นแหล่งรังโรคอีกแห่งหนึ่งในการแพร่เชื้อไวรัส Influenza A ตลาดค้าสัตว์ปีกเป็นจุดรวมสัตว์ปีกหลายชนิดทั้ง ไก่ เป็ดและนกหลายชนิด ซึ่งทำให้เชื้อไวรัสมีโอกาสเพิ่มจำนวนและเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อก่อนแพร่กระจายไปสู่ผู้เลี้ยงสัตว์ปีกที่ไวต่อการติดเชื้อสำหรับสุกร นอกจากเชื้อไวรัส swine flu (H1N1) แล้ว ยังพบ H3N2 subtype ที่แพร่ระบาดในกลุ่มสุกรและมีรายงานการติดต่อของเชื้อ Influenza จากสุกรไปยังไก่วง ดังนั้นจึงควรดำเนินการเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้นกที่นำเข้าจากต่างประเทศก็อาจเป็นตัวแพร่โรคได้จึงควรเฝ้าระวังเช่นกัน

อาการ

Pathotype ของเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออาการของโรค นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ได้แก่ ชนิดของสัตว์ อายุ การติดเชื้อร่วม (co-infection) ภูมิคุ้มกันและสิ่งแวดล้อม การติดเชื้อ Influenza A บางชนิดอาจทำให้เกิดอัตราการตายสูงในสัตว์ปีก species หนึ่ง แต่อาจไม่มีความผิดปกติใดๆ ในสัตว์ปีก species อื่น ดังรายงานการพบเชื้อ H7N3 จากเหยี่ยวที่สุขภาพปกติ แต่ทำให้เกิดอาการรุนแรงในไก่อายุ 6 สัปดาห์ (Samoor, 2008)

กรณี LPAI virus การติดเชื้อในนกป่ามักเป็นแบบไม่แสดงอาการ ส่วนในสัตว์ปีกเลี้ยง (domestic poultry) เช่น ไก่ และไก่วง มักมีอาการทางระบบหายใจ ทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ อาการที่พบ ได้แก่ จาม ไอ มีน้ำตา ขนยุ่ง การเคลื่อนไหวลดลง (decrease activity) กินอาหารและน้ำน้อยลง การติดเชื้อในไข่ไก่ทำให้ไข่ผิดปกติ และอาจมีอาการท้องเสียร่วมด้วย

การติดเชื้อ HPAI virus ในนกป่าและนกน้ำเลี้ยง (domestic waterfowl) มักมีอาการเพียงเล็กน้อย ยกเว้นกรณีที่ติดเชื้อ H5N1-HPAI ที่ทำให้มีอาการซึม เบื่ออาหารและตายแบบเฉียบพลัน (Tumpey et al., 2002; Lee et al., 2005) รวมทั้งมีรายงานอุบัติการณ์ของโรคที่เกิดจาก H5N3-HPAI ในนกทะเลในแอฟริกาใต้เมื่อปี 1961 เป็นผลให้มีการตายแบบเฉียบพลันโดยไม่แสดงอาการใดๆ

การติดเชื้อ HPAI ในไก่ ไก่วง และ galliformes อื่น มีผลต่ออวัยวะภายในหลายระบบทำให้เกิดอาการต่างกันขึ้นกับเชื้อไวรัสมีผลทำลายเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใด ในไก่และไก่วงมักมีอัตราการตายสูงก่อนที่จะสังเกตพบอาการใดๆ อาการที่อาจพบในไก่ได้แก่ มีน้ำมูก น้ำตา ไอ จาม หายใจลำบาก sinus และ/หรือ หัวบวม ยืนไม่ติดที่ กินอาหารและน้ำลดลง ผิวหนังบริเวณที่ไม่มีขน

หงอน เหนียงเกิดปื้นม่วง (cyanosis) เติบโตช้า อาการทางประสาท และท้องเสีย การติดเชื้อในนกมักมีอาการทางประสาท เช่น คอบิด กล้ามเนื้อคอและหัวสั้น ไม่สามารถยืนได้ ไม่มีแรงจากการไม่กินอาหารและน้ำ การติดเชื้อในนกกระจอกเทศมักมีอาการไม่มีแรง ขนยุ่ง อ้าปากหายใจ ถ่ายมีเลือดปน จามและนั่งผิดปกติ ทั้งนี้อาการของโรคขึ้นกับความรุนแรงของเชื้อไวรัสเป็นสำคัญ

การติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีรายงานการติดเชื้อ H5N1 ในสุนัข แมว เสือ (tiger และ leopard) จากการกินเนื้อไก่ดิบ และมีรายงานการติดเชื้อในสุกรและโคจากการทดลอง

การติดเชื้อในคน

โรคไข้หวัดนกเป็นโรคสัตว์สู่คนที่ทั่วโลกให้ความสำคัญเป็นอันดับต้นๆ ระยะฟักตัวในคน ตั้งแต่ 2-8 วัน และอาจนานถึง 17 วัน ปัจจุบันองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) กำหนดให้ใช้ระยะฟักตัวที่ 7 วัน เพื่อประโยชน์ในการตรวจติดตามอาการหลังสงสัยว่ามีการสัมผัสเชื้อ

การติดเชื้อ HPAI virus ในคนมีอาการรุนแรงกว่า LPAI virus เช่นเดียวกับในสัตว์ปีก อาการที่พบในคนคือ มีไข้สูง มีอาการทางระบบทางเดินหายใจตอนบน เจ็บหน้าอก อาจมีเลือดออกจากจมูกและเหงือก หรืออาจมีอาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องเสีย อาเจียนและปวดท้อง มีรายงานการติดเชื้อ H5N1 ในคนทำให้มีอาการสมองอักเสบ (encephalitis) โดยไม่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ และในระยะท้ายของการติดเชื้อการทำงานของอวัยวะภายในหลายระบบล้มเหลว อีกทั้งมีรายงานการติดเชื้อ avian H5N1 ในคนจากการกินเลือดเป็ดที่ไม่ปรุงสุกและสามารถตรวจพบ avian H5N1 virus จากอุจจาระของเด็กที่มีอาการท้องเสีย นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบแอนติเจนและ nucleic acid ของเชื้อไวรัสจาก fetus ของผู้หญิง ตั้งครรภ์ 1 รายที่ตายจากการติดเชื้อ H5N1 virus บ่งชี้ว่าการติดต่อผ่านรกอาจพบได้ในบาง species (CFSPH, 2014) นอกจากนี้ H5N1 แล้วยังมีรายงานการติดเชื้อ H7N7-HPAI ในคนเป็นผลให้มีผู้เสียชีวิต 1 ราย และพบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากผู้เสียชีวิตมีการเปลี่ยนแปลงตัวในระดับโมเลกุล แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวในคนที่ติดเชื้อไวรัส subtype เดียวกัน แต่มีอาการดีขึ้นจนหายเป็นปกติ สำหรับ LPAI virus มีรายงานการติดเชื้อ H7N2 และ H9N2 ในคนโดยไม่มีผู้เสียชีวิต

การวินิจฉัยแยกโรค

สำหรับ HPAI virus อาการของโรคคล้ายคลึงกับ

- velogenic Newcastle disease (ND)
- โรคคอหิวด์ไก่ (fowl cholera)

ส่วน LPAI virus อาการที่พบในสัตว์ปีกจะคล้ายคลึงกัน

- lentogenic ND
- โรคกล่องเสียงอักเสบ (infectious laryngotracheitis)
- โรคหลอดลมอักเสบ (infectious bronchitis)
- โรคติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิด
- ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการในการวินิจฉัยและแยกโรค

การควบคุมโรค

แนวทางปฏิบัติเพื่อควบคุมป้องกันโรคไข้หวัดนกจำเป็นต้องมีการดำเนินการหลายด้านในเวลาเดียวกัน ทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น virus subtype สภาพเศรษฐกิจของแต่ละประเทศและความเสี่ยงทางด้านสาธารณสุข เป็นต้น การควบคุมโรคให้ได้ผลต้องให้ความรู้แก่ผู้เลี้ยงสัตว์ปีก มาตรการด้านความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพ (biosafety and biosecurity) เช่น การเข้า-ออกของคน เครื่องมือเครื่องใช้รวมทั้งยานพาหนะก่อนและหลังเข้าฟาร์มสัตว์ปีก การทำความสะอาดเครื่องมือเครื่องใช้ การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่เหมาะสม มีการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน และการดำเนินการเฝ้าระวังโรคในพื้นที่อย่างต่อเนื่อง มาตรการดำเนินการอย่างเป็นระบบในกรณีที่เกิดอุบัติการณ์ของโรค วิธีดำเนินการเพื่อควบคุมป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ การกำจัดสัตว์ปีกที่เป็นโรค และมาตรการจำกัดบริเวณเชื้อไวรัสให้อยู่ในวงจำกัดเพื่อประโยชน์ในการทำลายเชื้อไวรัสรวมทั้งพื้นที่โดยรอบ รวมถึงการเฝ้าระวังโรคในจุดที่มีความเสี่ยง เช่น ตลาดค้าสัตว์ปีกภายในประเทศ การวางมาตรการควบคุมป้องกันในการนำเข้าและส่งออกสัตว์ปีก มาตรการเฝ้าระวังโรคที่ตลาดค้าสัตว์ปีกตามแนวชายแดน เป็นต้น

การวินิจฉัยโรคที่ให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ และเชื่อถือได้เป็นปัจจัยสำคัญเพื่อประโยชน์ในการควบคุมกำจัดโรคและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อได้ทันเหตุการณ์ในกรณีเกิดโรค การดำเนินการทางห้องปฏิบัติการยังมีความจำเป็นต่อการเฝ้าระวังโรคทั้ง active surveillance โดยเก็บตัวอย่างจากสัตว์ปีกในพื้นที่เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส หรือแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส และ passive surveillance เช่น ตรวจหา LPAI virus ในกรณีพบอัตราการให้ไขลดลงในไก่ไข่ หรือสัตว์ปีกมีอาการทางระบบทางเดินหายใจ แต่ไม่มีอัตราการตายหรืออัตราการตายต่ำ รวมทั้งตรวจหาเชื้อ Influenza A ทุกครั้งที่รับตัวอย่างซากไก่

ในกรณีที่พบการระบาดของโรคในสัตว์ปีก ไม่ควรให้สัตว์ชนิดอื่น เช่น สุนัข แมว เสือ กินเนื้อสัตว์ปีกหรือนก และไม่ควรถ่ายอุจจาระหรือมูลสัตว์ปีกเพื่อป้องกันการติดเชื้อจากการกินและสัมผัสเชื้อโดยตรง

การควบคุมโรคโดยการทำวัคซีน

ปัจจุบันมีการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัส Influenza A ในบางประเทศ งานวิจัยทดลองระบุว่าวัคซีนสามารถกระตุ้นให้สัตว์ปีกสร้างแอนติบอดี และเกิดความคุ้มโรค (Wood et al., 1985; Webster et al., 1986; Stone, 1987; 1988) วัคซีนที่ใช้มีหลายชนิด เช่น H5 AI vaccine, H7 AI vaccine, HA – based vaccine เป็นต้น ทั้งนี้ การทำโปรแกรมวัคซีนมักกำหนดเป้าหมายเฉพาะฝูงสัตว์ปีกที่มีความเสี่ยงสูงและมีการทบทวนถึงความจำเป็นในการทำวัคซีน เนื่องจากผลจากการทำวัคซีนทำให้สัตว์ปีกมีการขับเชื้อไวรัสโดยไม่ปรากฏอาการผิดปกติใดๆ ดังนั้นต้องใช้กลยุทธ์การทำวัคซีนที่แยกความคุ้มโรคที่เกิดจากการติดเชื้อและฉีดวัคซีน (Differentiate Infected from Vaccinated Animals, DIVA) เพื่อให้มีการเฝ้าระวังและตรวจสอบสัตว์ปีกที่อาจติดเชื้อในฝูง และควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ปีก ความเป็นไปได้ของหนึ่งที่สามารถพบภายหลังการทำวัคซีนคือการปรับเปลี่ยนของเชื้อไวรัสที่ทนต่อวัคซีน (vaccine resistant virus) การพิจารณาเรื่องการทำวัคซีนจึงต้องรอบคอบและคิดรอบด้านโดยพิจารณาถึงความจำเป็น ชนิดของวัคซีนที่ใช้ กลุ่มเป้าหมาย ผลกระทบที่อาจตามมา วิธีดำเนินการ รวมทั้งมาตรการที่ต้องดำเนินการหลังการใช้วัคซีน

สำหรับประเทศไทยซึ่งการส่งออกสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์เป็นสินค้าหลักอย่างหนึ่งของประเทศ รัฐบาลมีนโยบายชัดเจนไม่ให้ใช้วัคซีนโรคใช้หัวดนกในสัตว์ปีกทุกชนิด (สำนักนายกรัฐมนตรี, 2547) ประกอบกับข้อกำหนดของประเทศคู่ค้าหลักห้ามใช้วัคซีนในสัตว์ปีก จึงใช้นโยบายกำจัดสัตว์ปีกที่เป็นโรคเพื่อควบคุมการแพร่ระบาดโดยจ่ายค่าชดเชยให้แก่เกษตรกร และแม้ว่าประเทศไทยจะปลอดโรคตามมาตรฐานของ OIE ตั้งแต่เดือน มีนาคม พ.ศ. 2552 (อรพันธ์, 2556) แต่ยังคงดำเนินมาตรการเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่องทั้งในพื้นที่และทางห้องปฏิบัติการ ทั้งการเฝ้าระวังเชิงรับโดยรับตัวอย่างเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคจากสัตว์ปีกที่มีประวัติป่วยด้วยอาการทางระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหารหรือระบบประสาท และเฝ้าระวังเชิงรุกโดยวางแผนสุ่มเก็บตัวอย่างในพื้นที่เพื่อตรวจวินิจฉัยโรค มีการตรวจวินิจฉัยยืนยันโรคที่รวดเร็วจากห้องปฏิบัติการ มีการประสานงานข้อมูลโรคใช้หัวดนกของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งในและระหว่างประเทศ ให้ความรู้แก่เกษตรกรและประชาชนทั่วไปตลอดจนศึกษาวิจัยโรคใช้หัวดนกโดยเฉพาะทางชีวโมเลกุลเพื่อวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาและทราบถึงแหล่งที่มาของโรค

การรักษา

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่ได้ผล ทำได้เพียงการรักษาแบบประคับประคองและป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อนโดยใช้ยาปฏิชีวนะ แต่ไม่แนะนำให้รักษาเนื่องจากเป็นโรคที่ติดต่อสู่คน

สถานการณ์การพบเชื้อไวรัส H5/H7 HPAI ปี ค.ศ.2011-2015

นับตั้งแต่เกิดอุบัติการณ์ของ H5N1-HPAI ครั้งแรกในฮ่องกงโดยพบในตลาดค้าสัตว์ปีก เมื่อปีค.ศ.1997 (Li et al., 2004) จากรายงานขององค์การสุขภาพสัตว์โลก พบว่ามีรายงานการเกิดโรคไข้หวัดนกอย่างต่อเนื่อง โดยในปีค.ศ.2004 การพบเชื้อส่วนใหญ่เป็น H5N1 มีพบ H5N2 subtype ที่ไทเป และยังมีการระบาดของ H5N1 virus อย่างต่อเนื่องจนถึงปีค.ศ.2010 โดยมีรายงานการพบเชื้อในหลายประเทศ ได้แก่ เมียนมาร์ เนปาล โรมาเนีย รัสเซีย เวียดนาม บังคลาเทศ ภูฏาน บัลแกเรีย กัมพูชา สาธารณรัฐประชาชนจีน ฮ่องกง อินเดีย อิสราเอล ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้ ในขณะที่พบ H7N7 ในสเปน และเกาหลีเหนือกับ H5 ในมองโกเลีย ช่วงปีค.ศ.2011-2015 แนวโน้มการแพร่ระบาดของเชื้อ H5N1 subtype มากขึ้นโดยมีรายงานพบเชื้อในหลายประเทศทั่วโลกทั้ง เอเชีย ยุโรป แอฟริกา อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ และออสเตรเลีย สำหรับประเทศในแถบเอเชีย นอกจาก H5N1 virus ที่พบในหลายประเทศแล้วยังพบเชื้อ H5N2 H5N3 H5N6 และ H5N8 (ตารางที่ 1) เช่นเดียวกับในแอฟริกาที่มีรายงานพบ H5N1 ในหลายประเทศ และพบ H5N2 ในประเทศแอฟริกาใต้ (ตารางที่ 2) สำหรับกลุ่มประเทศในยุโรป subtype ที่พบในหลายประเทศคือ H5N8 และพบ H5N1 ในประเทศบัลแกเรียและรัสเซียในขณะที่ อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ และออสเตรเลียพบ H5N1 ในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดาในปีค.ศ.2015 (ตารางที่ 4) จากข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าโรคไข้หวัดนก โดยเฉพาะ H5N1 subtype ยังคงเป็นภัยคุกคามต่อการเลี้ยงไก่รวมทั้งภาคการผลิตในหลายประเทศ และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องวางมาตรการควบคุมป้องกันโรคอย่างเข้มงวด โดยเฉพาะมาตรการเฝ้าระวังการเคลื่อนย้ายสัตว์ปีกตามแนวชายแดน ตลาดค้าสัตว์ปีก การนำเข้าสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก รวมทั้งนกนำเข้า ตลอดจนการเฝ้าระวังโรคในนกอพยพ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชน ตลอดจนระบบการผลิตและการส่งออกของประเทศ

ตารางที่ 1 รายงานการพบเชื้อ H5/H7 HPAI ในกลุ่มประเทศทวีปเอเชียปีค.ศ. 2011-2015

ประเทศ	subtype	ปี (ค.ศ.)					รายงานล่าสุด (วัน/เดือน)
		2011	2012	2013	2014	2015	
อินเดีย	H5N1	✓	✓	✓	✓	✓	31/7
อิสราเอล	H5N1	✓	✓			✓	17/8
ญี่ปุ่น	H5N8		✓		✓	✓	24/4
	H5N1	✓					
คาซัคสถาน	H5N1					✓	17/6
เมียนมาร์	H5N1	✓	✓			✓	15/5
ตุรกี	H5N1					✓	15/6
เวียดนาม	H5N1	✓	✓	✓	✓	✓	1/9, 22/9
	H5N6				✓	✓	31/8, 30/9
ลาว	H5N6				✓		
กัมพูชา	H5N1	✓	✓	✓	✓		
สาธารณรัฐประชาชนจีน (People's Rep. of China)	H5N1	✓	✓	✓	✓	✓	22/7
	H5N2				✓	✓	14/8
	H5N6				✓	✓	14/8
	H5N8				✓		
สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) (Chinese Taipei)	H5N2		✓	✓	✓	✓	4/9
	H5N8					✓	4/9
	H5N3					✓	26/2
	H5N1		✓				
ภูฏาน	H5N1		✓	✓		✓	16/4
เนปาล	H5N1	✓	✓	✓	✓		
บังคลาเทศ	H5N1	✓	✓	✓			
ฮ่องกง	H5N6			✓		✓	5/5
	H5N1	✓	✓				

ตารางที่ 1 รายงานการพบเชื้อ H5/H7 HPAI ในกลุ่มประเทศทวีปเอเชียปีค.ศ. 2011-2015 (ต่อ)

ประเทศ	subtype	ปี (ค.ศ.)					รายงานล่าสุด (วัน/เดือน)
		2011	2012	2013	2014	2015	
Palestinian Auton	H5N1	✓				✓	14/5
Territories	H5					✓	14/8
อิหร่าน	H5N1					✓	24/6, 29/7
อินโดนีเซีย	H5N1	✓					
มองโกเลีย	H5N1	✓					
เกาหลีเหนือ (Dem. People's Rep.)	H5N1			✓	✓		
เกาหลีใต้ (Rep. of)	H5N1	✓					
	H5N8				✓	✓	28/7

✓ = มีรายงานการพบเชื้อ

ตารางที่ 2 รายงานการพบเชื้อ H5/H7 HPAI ในกลุ่มประเทศทวีปแอฟริกา ปีค.ศ. 2011-2015

ประเทศ	subtype	ปี (ค.ศ.)					รายงานล่าสุด (วัน/เดือน)
		2011	2012	2013	2014	2015	
ลิเบีย	H5N1					✓	16/2
ไนเจอร์	H5N1					✓	21/4, 28/9
ไนจีเรีย	H5N1					✓	3/9
Burkina Faso	H5N1					✓	9/5
Côte d' Ivoire	H5N1					✓	1/9
กาน่า	H5N1					✓	14/8
แอฟริกาใต้	H5N2	✓	✓	✓			

ตารางที่ 3 รายงานการพบเชื้อ H5/H7 HPAI ในกลุ่มประเทศทวีปยุโรป ปีค.ศ. 2011-2015

ประเทศ	subtype	ปี (ค.ศ.)					รายงานล่าสุด (วัน/เดือน)
		2011	2012	2013	2014	2015	
อิตาลี	H5N8			✓	✓	✓	20/1
เนเธอร์แลนด์	H5N8				✓	✓	29/4
โรมาเนีย	H5N1					✓	28/4
รัสเซีย	H5N8				✓	✓	20/3
	H5N1				✓	✓	21/8
สวีเดน	H5N8					✓	20/3
สหราชอาณาจักร UK	H5N8				✓	✓	17/2
	H7N7					✓	27/8
บัลแกเรีย	H5N1					✓	13/7
เยอรมนี	H5N8				✓	✓	27/4
	H7N7					✓	27/7, 7/9
ฮังการี	H5N8					✓	8/4

ตารางที่ 4 รายงานการพบเชื้อ H5/H7 HPAI ในกลุ่มประเทศทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้และออสเตรเลีย ปีค.ศ. 2011-2015

ประเทศ	subtype	ปี (ค.ศ.)					รายงานล่าสุด (วัน/เดือน)
		2011	2012	2013	2014	2015	
เม็กซิโก	H7N3		✓	✓	✓	✓	8/5
สหรัฐอเมริกา	H5N8				✓	✓	17/8
	H5N2				✓	✓	1/9, 21/9
	H5N1					✓	16/6
แคนาดา	H5N1					✓	21/4
	H5N2				✓	✓	7/8
	H5N8					✓	1/5
ออสเตรเลีย	H7N2			✓	✓		
	H7N7		✓	✓			

ที่มาของข้อมูล : World Organization for Animal Health update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7)
Available from [http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2015/\(cites 2015 Sept 30\)](http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2015/(cites%2015%20Sept%2030))

ตอนที่ 2

การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเป็นเครื่องมือสำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมกำจัดโรคไข้หวัดนก เนื่องจากไม่มีอาการเฉพาะของโรค การตายของสัตว์ปีกจำนวนมากภายในระยะเวลารวดเร็วโดยไม่แสดงอาการของโรคชัดเจนอาจเป็นข้อสงสัยในเบื้องต้น แต่การนำไปสู่ข้อสรุปว่ามีสาเหตุการตายจากการติดเชื้อไวรัส Influenza A ชนิดของ subtype และความรุนแรงของเชื้อไวรัส จำเป็นต้องใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการในการตัดสินการเป็นโรค นอกจากนี้การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการยังมีความสำคัญในการเฝ้าระวังโรค การตรวจโรคเพื่อสนับสนุนการส่งออก รวมทั้งเพื่อรับรองสถานภาพปลอดโรคไข้หวัดนกของประเทศ

ห้องปฏิบัติการตรวจโรคไข้หวัดนกจำเป็นต้องมีระบบความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพ (biosafety and biosecurity) เพื่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน บุคลากรอื่นในหน่วยงาน และป้องกันเชื้อไวรัสสู่ภายนอกห้องปฏิบัติงาน การปฏิบัติงานจึงจำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 3 (biosafety level-3, BSL-3) หรือระดับ 2 (BSL-2) เป็นอย่างน้อย และต้องทำการทดสอบเชื้อไวรัสในตู้ชีวนิรภัยระดับ 2 (biosafety cabinet class II)

การเตรียมตัวของผู้ปฏิบัติงาน

- เนื่องจากไวรัส Influenza A โดยเฉพาะ HPAI virus สามารถติดต่อถึงคนได้ ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานต้องเตรียมตัวอย่างอย่างระมัดระวัง ใช้อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล ได้แก่ หมวกคลุมผม เสื้อคลุมแขนยาว ถุงมือ และผ้าปิดปาก-จมูก ทุกครั้งที่ปฏิบัติงาน

- ปฏิบัติงานในตู้ชีวนิรภัยระดับ 2 (biocabinet) เช็ดทำความสะอาดภายในตู้ทั้งก่อนและหลังปฏิบัติงานโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่เหมาะสม ปัจจุบันห้องปฏิบัติงานกลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ใช้น้ำยาฆ่าเชื้อชนิด 1% sodium hypochlorite และ 70% alcohol

- ถอดเสื้อคลุม ถุงมือ และล้างมืออย่างถูกสุขลักษณะก่อนออกจากห้องปฏิบัติการ
- อุปกรณ์หลังปฏิบัติงานให้วางแยกในภาชนะที่จัดเตรียมไว้เพื่อฆ่าเชื้อตามระบบที่จัดเตรียมไว้

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย

ในกรณีที่เป็นสัตว์ปีกมีชีวิต ชนิดตัวอย่างที่ควรส่งตรวจ ได้แก่ cloacal swab และ oropharyngeal swab โดยแช่ swab ในสารละลาย virus transport media (VTM) เพื่อเป็นการรักษาเชื้อไวรัส ในกรณีที่เป็นนกโดยเฉพาะนกตัวเล็ก การเก็บตัวอย่าง cloacal swab อาจเป็นอันตรายต่อชีวิตสัตว์ การเก็บตัวอย่างมูลที่เพิ่งถ่ายใหม่ๆ เป็นทางเลือกที่ดีเพื่อความปลอดภัยของสัตว์

ในกรณีที่เป็นซาก ตัวอย่างที่ควรส่งตรวจได้แก่ หลอดลม ปอด ลำไส้ รวมทั้ง content ม้าม ไต สมอง ตับและหัวใจ cloacal swab และ oropharyngeal swab ตัวอย่างลำไส้ และ content ควรแยกจากอวัยวะอื่นเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรียในลำไส้ การปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียมีผลต่อการแยกเชื้อไวรัส หลังเก็บตัวอย่างควรแช่เย็นและนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว

การเก็บตัวอย่าง oropharyngeal swab สามารถทำได้ทั้งสัตว์ปีกมีชีวิตและตาย ในกรณีมีชีวิตควรทำให้ swab ชุ่มด้วย VTM ก่อนเก็บตัวอย่าง จากนั้นค่อยๆ ใส่ swab เข้าไปใน pharynx แล้วถูเยื่อเมือกเบาๆ โดยใช้ swab 1 อันต่อสัตว์ปีก 1 ตัว แล้วใส่ก้าน swab ลงในหลอด VTM สามารถรวม swab จากสัตว์ปีกหลายตัวในหลอด VTM เดียวกันโดยจำนวนที่เหมาะสมควรเป็น 3 swab ต่อ VTM 1 หลอด กรณีที่เก็บ swab จากสัตว์ปีกที่ตาย สามารถใช้ swab ที่แห้งโดยวิธีเดียวกัน ส่วนการเก็บตัวอย่าง cloacal swab ใช้ชนิดของ swab เช่นเดียวกันทั้งในสัตว์มีชีวิตและตาย วิธีการเก็บตัวอย่าง cloacal swab ให้ใส่ swab เข้าไปใน cloaca จากนั้นหมุน swab 2-3 รอบเพื่อเก็บตัวอย่างอุจจาระขนาดใหญ่แล้วจึงใส่ cloacal swab ในหลอด VTM เช่นเดียวกัน

ในกรณีที่จัดส่งตัวอย่างที่สงสัยโรคไข้หวัดนกพร้อมกับตัวอย่างที่ส่งตรวจโรคอื่นควรแยกตัวอย่างโดยใช้ภาชนะ เช่น กระติกน้ำแข็งแยกออกจากกัน หากใช้กล่องโฟมควรปิดฝากล่องให้แน่นหนาโดยใช้เทป พร้อมเขียนกำกับที่ฝากล่องโดยระบุชนิดของตัวอย่าง พร้อมแนบใบนำส่งซึ่งมีประวัติของสัตว์โดยละเอียดเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธีและวิธีที่เป็น gold standard และเป็นวิธีที่ระบุสำหรับการค้าระหว่างประเทศ คือ การแยกเชื้อไวรัส (OIE, 2015) ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธี คือการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้ไข่ไก่ฟัก และใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เนื่องจากเชื้อไวรัส Influenza A โดยเฉพาะ HPAI สามารถเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวนได้ดีในตัวของไข่ไก่ฟัก และโดยเหตุที่

ทั้งเชื้อไวรัส Influenza A และ Newcastle disease virus (NDV) มีคุณสมบัติจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงไก่ (haemagglutination) และคุณสมบัติดังกล่าวจะถูกยับยั้ง (inhibit) ด้วยซีรัมจำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดเดียวกัน จึงทำการตรวจหาและพิสูจน์ชนิดของเชื้อไวรัสโดยวิธี HA และ HI โดยใช้ซีรัมจำเพาะต่อ Influenza A virus และซีรัมจำเพาะต่อ NDV

การเตรียมตัวอย่าง

ผู้ปฏิบัติงานใช้อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลที่ดังกล่าวมาแล้ว และปฏิบัติงานในตู้ชีวนิรภัยที่ปลอดเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อและระมัดระวังการปนเปื้อน

กรณีที่เป็นตัวอย่าง swab เช่น cloacal swab, nasal swab ให้นำหลอดตัวอย่างไปเขย่าแรงๆ โดยใช้ vortex mixer นานประมาณ 3-5 นาที แล้วแยกก้านสำล่ออก จากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนต่อไป

กรณีเป็นตัวอย่างอวัยวะภายในให้ตัดชิ้นส่วนของอวัยวะภายในแต่ละชนิด นำมารวมกันประมาณ 1 g แล้วบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่งบดและทรายละเอียด ทำเป็น 10% suspension โดยใช้ PBS จากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนต่อไป

- นำตัวอย่างที่ได้จากที่กล่าวเบื้องต้นปั่นด้วยความเร็ว 2,500 g นาน 5 min
- นำส่วนใส (supernatant) มาเติม penicillin 2,000 units/mL, streptomycin 2 mg/mL และ gentamicin 50 µg/mL ตั้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อน
- ดำเนินการทดสอบต่อไป ในกรณีที่ยังไม่ดำเนินการทันทีให้เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

1. การแยกเชื้อไวรัส

1.1 การแยกเชื้อโดยใช้ไข่ไก่ฟัก

วิธีฉีดเข้าไข่ไก่ฟักจะได้ผลดีกว่าเซลล์เพาะเลี้ยง เนื่องจากเชื้อ HPAI เพิ่มจำนวนได้ดีในตัวอ่อน (chicken embryo) ในไข่ไก่ฟัก ในกรณีของไวรัส LPAI จะเพิ่มจำนวนได้ดีในไข่ไก่ฟัก การแยกเชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมักไม่ได้ผล ทั้งนี้การเพิ่มจำนวนของไวรัส จะเป็นไปอย่างช้าๆ ดังนั้น virus titer จะค่อนข้างต่ำ โดยทั่วไปใช้ไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน โดยใช้ไข่ไก่ฟักจากพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อเฉพาะ (specific pathogen free, SPF) ซึ่งได้รับการรับรองว่าปลอดเชื้อชนิดใดจากการตรวจด้วยวิธีใด หรืออาจใช้ไข่ไก่ฟักจากฝูงไก่ที่ปลอดเชื้อและไม่มีแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ NDV และไวรัส Influenza A subtype H5, H7 (specific antibody negative, SAN)

หลังจากฉีดตัวอย่างเข้าไข่ไก่ฟักทาง allantoic cavity ได้ 4 วัน จะ chill ไข่เพื่อเก็บน้ำไข่ (allantoic fluid) เพื่อตรวจ haemagglutination (HA) activity ของเชื้อไวรัส โดยวิธี HA ในกรณีที่ให้ผลบวกจะดำเนินการพิสูจน์เชื้อต่อไปด้วยวิธี HI โดยใช้ซีรัมจำเพาะต่อเชื้อไวรัส

Influenza A และซีรัมจำเพาะต่อ NDV กรณีผลการทดสอบเป็นบวกต่อซีรัมจำเพาะต่อไวรัส Influenza A และเป็นลบต่อซีรัมจำเพาะต่อ NDV จึงดำเนินการตรวจหา subtype ต่อไปด้วยวิธี HA-HI และ Neuraminidase, Neuraminidase Inhibition (NA-NI) โดยใช้ monospecific antisera H1-H16 และ N1-N9 (จาก Veterinary Diagnostic Laboratory , VDL, UK ซึ่งเป็น Reference lab ของโรคไข้หวัดนก) หลังจากทราบ subtype แล้ว ในกรณีเป็น H5 หรือ H7 ต้องดำเนินการวิเคราะห์การเรียงลำดับเบส (nucleotide sequence analysis) เพื่อศึกษาความรุนแรงของเชื้อไวรัส

กรณีผลการทดสอบโดยวิธี HA ให้ผลลบ จะดำเนินการฉีดไขฟักต่อไปอีก 1 passage หากให้ผลลบจาก 2 passage จึงตัดสินใจว่าตัวอย่างนั้นไม่พบเชื้อไวรัสทั้ง Influenza A และ ND

สำหรับการตรวจ HA activity นอกจาก HA test แล้ว ยังสามารถใช้วิธีอื่น ได้แก่ Influenza A type specific test เช่น agar gel immunodiffusion (AGID) หรือตรวจหา Influenza A specific nucleic acid เช่น real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR)

วิธีการ

- ตรวจไข่ไก่ฟัก โดยดูความมีชีวิตและความแข็งแรงของตัวอ่อน เห็นเส้นเลือดชัดเจน วางไข่ใบบนถาด โดยวางด้านป้านของไข่ขึ้น label วงกลมแสดงบริเวณที่เป็นอากาศของไข่ไก่ฟัก
- ส่องไข่เพื่อกำหนดตำแหน่งที่ฉีดไข่โดยใช้ดินสอกาตำแหน่งที่เป็นบริเวณอากาศของไข่ไก่ฟักที่เมื่อแทงเข็มจาก tuberculin syringe เพื่อฉีดตัวอย่างเข้าไข่ไก่ฟัก ส่วนปลายของเข็มจะฉีดเข้าน้ำไข่ โดยหลีกเลี่ยงไม่ให้ถูกตัวอ่อน (embryo) และเส้นเลือด
- ทำความสะอาดบริเวณเหนือตำแหน่งที่ label รวมทั้งบริเวณโดยรอบด้วย 70% ethanol
- ไข่เข็มปลอดเชื้อเจาะเปลือกไข่ตรงตำแหน่งที่กำหนดไว้
- ฉีดตัวอย่างโดยใช้ tuberculin syringe ในปริมาณ 0.2 mL ต่อฟอง โดยฉีดไข่ 3 ฟองต่อตัวอย่าง
- ปิดรูไข่ตรงตำแหน่งที่ฉีดเชื้อโดยใช้พาราฟินเหลว
- วางถาดไข่ฉีดเชื้อใน incubator 37°C
- หลังฉีดไข่ ตรวจดูความมีชีวิตของตัวอ่อนทุกวัน ตัวอ่อนที่ตายภายใน 24 ชั่วโมงให้ทิ้ง เนื่องจากอาจตายด้วยเหตุผลทางเทคนิค กรณีที่ตัวอ่อนตายภายหลัง 24 ชั่วโมง ใช้ syringe ดูดน้ำไข่ (allantoic fluid) ตรวจ HA activity ของเชื้อไวรัสด้วยวิธี HA

- หลังฉีดไข่ 4 วันหากตัวอ่อนยังไม่ตาย ให้ chill ไข่โดยวางที่อุณหภูมิ 4°C นานประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บน้ำไข่ตรวจ HA activity
- กรณีผลการตรวจด้วยวิธี HA เป็นลบ ฉีดไข่ไก่ฟักชุดใหม่จากน้ำไข่ของไข่ชุดแรกอีก 1 passage หากผล HA เป็นลบ ถือว่าตัวอย่างนั้นไม่พบเชื้อไวรัส Influenza A และ NDV
- กรณีให้ผล HA เป็นบวก ต้องทำการทดสอบเพื่อพิสูจน์ต่อไปด้วยวิธี HI โดยใช้ซีรัมจำเพาะต่อไวรัส Influenza A และซีรัมจำเพาะต่อ NDV
- กรณีผลการทดสอบโดยวิธี HI ให้ผลบวกต่อ Influenza A และให้ผลลบต่อ NDV ต้องทำการทดสอบต่อไปโดยวิธี HA-HI เพื่อพิสูจน์ว่าเป็น H5 หรือ H7 หรือไม่ โดยใช้ซีรัมจำเพาะต่อ H5 และซีรัมจำเพาะต่อ H7



Fig. 1 Viral inoculation into allantoic cavity of embryonated egg.
(NIAH)



Fig. 2 Hemorrhage of chicken embryo found in 24 hrs. after egg inoculation of 2004-isolated H5N1 virus for 48 hrs.
(left = normal, right = inoculated embryo)
(NIAH)

1.2 การแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

นอกจากไข่ไก่ฟักแล้ว HPAI virus ยังสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดที่เตรียมจากสัตว์ปีก ที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ primary cell ชนิด chicken embryo fibroblast (CEF) และ chicken embryo kidney (CEK) cell การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงทำให้เกิด syncytia ซึ่งเป็นผลจากการรวมตัว (fusion) ของเซลล์หลายเซลล์เกิดเป็น multinucleated cell การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเฉพาะอันเป็นผลจากการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งเรียกว่า cytopathic effect (CPE)

วิธีการ

- เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง บ่มที่ CO₂ incubator อุณหภูมิ 37°C จนเซลล์เจริญเติบโตเป็น monolayer
 - ใช้ไปเปิดดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง
 - ล้างเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย PBS 1 ครั้ง โดย rinse ให้ PBS กระจายทั่วทั้งขวดด้านที่เซลล์เกาะ
 - ลงตัวอย่างปริมาณ 0.5-1 mL absorb นาน 1 ชั่วโมง ใน CO₂ incubator
 - เติมน้ำเลี้ยงเชื้อชนิด 2% maintenance medium ปริมาณ 5-10 mL แล้ว
- แต่ขนาดของขวดเพาะเซลล์
- บ่มเพาะใน CO₂ incubator 37°C ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (CPE) ทุกวัน นาน 5-7 วัน
 - กรณีเกิด CPE ให้เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ หลังพบ CPE 70-80% จากนั้นตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี HA
 - กรณีผลการทดสอบโดยวิธี HA ให้ผลบวก ดำเนินการพิสูจน์เชื้อไวรัสตามขั้นตอนเดียวกับการแยกเชื้อโดยใช้ไข่ไก่ฟัก
 - กรณีผลการทดสอบโดยวิธี HA ให้ผลลบ ใช้น้ำจากเซลล์เพาะเลี้ยงมา passage ลงเซลล์เพาะเลี้ยงชุดใหม่อีก 1 passage หาก HA test จาก passage 2 ให้ผลลบ ถือว่าตัวอย่างนั้นไม่พบเชื้อไวรัส Influenza A และ ND



Fig. 3 Normal chicken embryo fibroblast (CEF) cell (40x) (NIAH)

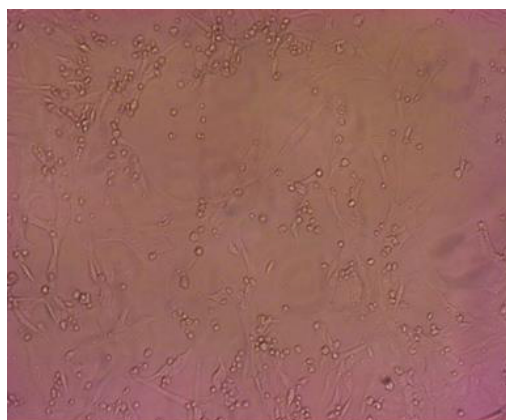


Fig. 4 Cytopathic effect (80%) observed after CEF inoculation of 2004-isolated H5N1 virus for 48 hrs. (40x) (NIAH)

2. การทดสอบทางซีรัมวิทยา

2.1 เทคนิค HA-HI

ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาและพิสูจน์เชื้อไวรัส Influenza A โดยวิธี HA ใช้ตรวจหาเชื้อไวรัส ส่วนวิธี HI ใช้ได้ทั้งพิสูจน์เชื้อ Influenza A และตรวจหา H subtype โดยใช้ monospecific antiserum H1-H16 ส่วนการตรวจหา N subtype ใช้วิธี NA-NI โดยใช้ monospecific antiserum N1-N9 ซึ่งวิธีการทดสอบตามที่กล่าวถึงโดย Capua และคณะ (2003)

นอกจากนี้ยังใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส Influenza A เช่น การตรวจหาแอนติบอดีต่อ H5/H7 subtype ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการเฝ้าระวังโรคในพื้นที่ รวมทั้งใช้ตรวจหาแอนติบอดีไต่เตอร์หลังวัคซีนในประเทศที่มีการทำวัคซีนโรคไข้หวัดนก เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพ ของวัคซีน

สำหรับสัตว์ปีกบางชนิด เช่น เป็ด ซีรัมอาจมีผลการจับกลุ่ม (agglutinate) กับเม็ดเลือดแดงไก่ จึงต้องมีขั้นตอนการทำลาย non-specific ดังกล่าวโดยการ adsorb ซีรัมด้วย packed cell ของเม็ดเลือดแดงไก่

Haemagglutination (HA) test

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

- microtiter plate ชนิด V-shape หรือ U-shape
- phosphate buffered saline (PBS)
- 1% chicken red blood cell (cRBC)
- shaker
- Incubator 37°C
- micropipette ขนาด 0-50 μ L
- tip

วิธีการ

- เติมน้ำ PBS ปริมาณ 25 μ L ทุกแถว
- เติมน้ำไขหรือน้ำจากเซลล์เพาะเลี้ยงปริมาณ 25 μ L เฉพาะหลุมแรก (การทดสอบแต่ละครั้ง ควรทำ 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง)
- ทำ serial dilution ตั้งแต่หลุม 1 ถึงรองสุดท้าย ส่วนหลุมสุดท้ายเป็นตัวควบคุม (ไม่มีไวรัส)
- เติมน้ำ PBS 25 μ L ทุกหลุม

- เติม 1% cRBC ปริมาณ 25 μ L
- วางที่อุณหภูมิห้อง นาน 40 นาที
- อ่านผลการทดสอบ

การอ่านผล

กรณี cRBC แขนงลอย ไม่ตกตะกอนเป็นเม็ดกลมสีแดง (red botton) อ่านผลเป็นผลบวก (positive) (Fig. 5)

กรณี cRBC ตกตะกอนเป็นเม็ดกลมสีแดง (red botton) อ่านผลเป็นลบ (negative)

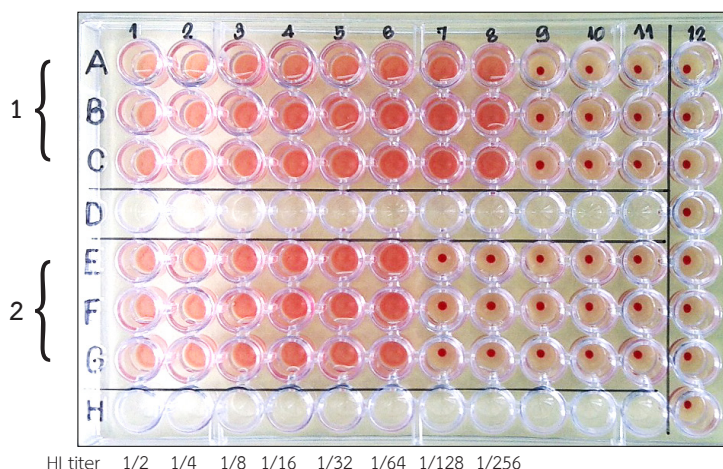


Fig. 5 Detection of HA activity from H5N1 infected allantoic fluid using HA test showed positive reaction.

Sample 1 (A-C): HA titer = 1/256 (1 HA unit, HAU = 1/256)

Sample 2 (E-G): HA titer = 1/64 (1 HAU = 1/64)

(NIAH)

Haemagglutination inhibition (HI) test

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

เช่นเดียวกับ HA test โดยเพิ่มซีรัมอ้างอิง (reference serum) ต่อเชื้อที่ต้องการทดสอบ

วิธีการ

- เติม PBS 25 μ L ทุกหลุม
- เติม reference serum (เจือจาง 1/10) 25 μ L ในหลุม A
- ทำ serial dilution ตั้งแต่หลุมแรกจนถึงหลุมรองสุดท้าย หลุมสุดท้ายเป็นตัวควบคุม
- เติมแอนติเจน 4 HA unit (HAU) ที่เตรียมใหม่ๆ ปริมาณ 25 μ L ทุกหลุม ยกเว้นหลุมสุดท้าย ยกตัวอย่างจาก รูปที่ 1, ตัวอย่างที่ 1 ให้ผล 1 HAU = 1/256 ดังนั้น 4 HAU = 1/64

- เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
- เติม 1% cRBC ปริมาณ 25 μ L ทุกหลุม
- เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 40 นาที
- อ่านผลการทดสอบ

การอ่านผล

- ในกรณีที่เกิด red botton อ่านผลเป็นบวก (positive)
- ในกรณีที่ cRBCแขวนลอย ไม่เกิด red botton อ่านผลเป็นลบ (negative)

การแปลผล

กรณีตรวจหาการติดเชื้อ HI titer มากกว่าหรือเท่ากับ 1/16 ถือว่าตัวอย่างนั้นให้ผลเป็นบวก

กรณีตรวจหาแอนติบอดีไต่อะเอนกหลังฉีดวัคซีน หรือตรวจสถานะการติดเชื้อ ในการเฝ้าระวังโรค อ่านผล HI titer ที่หลุมสุดท้ายที่อ่านผลเป็นบวก

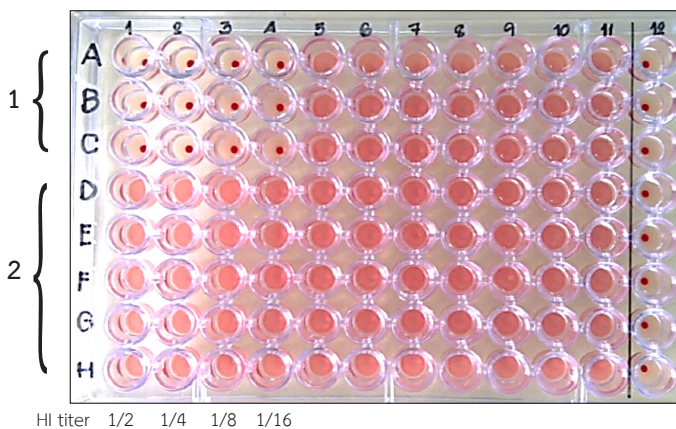


Fig. 6 Identification of Influenza A virus from infected allantoic fluid using HI test.

Sample 1 (A-C): HI titer against specific influenza A antiserum = 1/16

Sample 2 (D-H): HI titer against specific ND antiserum was negative.

(NIAH)

วิธีการ adsorb ซีรัม

เป็นวิธีทำลาย non-specific ในซีรัมสัตว์ปีกบางชนิด เช่น เป็ด ก่อนการทดสอบโดยวิธี

HA-HI

- เตรียม 25% suspension ของ cRBC โดยใช้ PBS หลังจากล้าง cRBC 3 ครั้ง ด้วย PBS
- ผสมซีรัม 40 μ L กับ 25% suspension cRBC ปริมาณ 50 μ L
- ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
- ปั่นที่ 3000 rpm นาน 5 นาที

- ดูดส่วนใส วางใน water-bath อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที
- นำซีรัมที่ได้ทดสอบโดยวิธี HI

2.2 เทคนิค Agar gel immunodiffusion test (AGID)

เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส Influenza A เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อในฝูงไก่ และไก่วง เนื่องจาก Influenza A ทั้งหมดมีคุณสมบัติทางแอนติเจนของ nucleocapsid และ matrix ที่คล้ายคลึงกัน จึงอาศัยคุณสมบัติดังกล่าวตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนดังกล่าว การเตรียมแอนติเจนทำจาก chorioallantoic membrane ของไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อ บดเป็นเนื้อเดียวกัน freeze-thaw 3 ครั้ง ปั่นที่ 1,000Xg จากนั้นทำลายคุณสมบัติการติดเชื้อด้วย 0.1% formalin หรือ 1% betapropiolactone ปั่นอีกครั้งแล้วจึงใช้ส่วนใสเป็นแอนติเจน gel ที่ใช้ คือ 1% (w/v) agarose หรือ purified agar และ 8% (w/v) NaCl ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 อ่านผล precipitin line หลัง 48 ชั่วโมง (OIE, 2008)

เทคนิค AGID อาจใช้ไม่ได้กับสัตว์ปีกทุกชนิด เนื่องจากสัตว์ปีกบางชนิดไม่สร้าง precipitating antibody เช่น เป็ด และกรณีที่ใช้ AGID ให้ผลบวกต้องทดสอบยืนยันด้วยวิธี HI โดยใช้แอนติเจนจำเพาะต่อ H5 และแอนติเจนจำเพาะต่อ H7

3. การตรวจหาความรุนแรงของเชื้อไวรัส (pathogenicity)

ความรุนแรงของโรคในไก่ขึ้นกับ highly pathogenic strain ของเชื้อไวรัส โดยทำให้เกิดอาการ ได้แก่ มีน้ำมูก น้ำตา ไอ จาม หายใจลำบาก sinus และ/หรือ หัวบวม ยืนไม่ติดที่กินอาหารและน้ำลดลง ผิวหนังบริเวณที่ไม่มีขน หงอน เหนียงเกิดปื้นม่วง (cyanosis) เดินโซเซ อาการทางประสาทและท้องเสีย ในไก่ไข่อัตราการให้ไข่ลดลงและไข่มีคุณภาพต่ำ อัตราการเกิดโรคสูง อัตราตายสูงและรวดเร็ว หากเป็น low pathogenicity influenza A virus มักทำให้เกิดอาการอย่างอ่อนหรือไม่มีอาการทางคลินิกหรืออาจมีอาการรุนแรงหากมีปัจจัยอื่น เช่น มีการติดเชื้อร่วม เป็นต้น

วิธีการหาค่า Intravenous pathogenicity index (IVPI)

- เตรียมไข่ที่ฉีดเชื้อที่ใหม่ ปลอดเชื้อแบคทีเรีย และมี HA titer มากกว่า 1/16 เจือจางเป็น 1/10 โดยใช้ sterile isotonic saline
- ฉีดน้ำไข่เจือจางปริมาณ 0.1 mL เข้าเส้นเลือดไก่ SPF หรือ SAN อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 10 ตัว การฉีดเข้าเส้นเลือดไก่มักฉีดเข้าเส้นเลือดที่ปีก (wing vein)
- สังเกตอาการไก่ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน ในการสังเกตอาการแต่ละวันมีเกณฑ์การให้คะแนนไก่แต่ละตัวดังนี้

ไก่ปกติ	=	0
ป่วย	=	1
ป่วยรุนแรง	=	2
ตาย	=	3

อาการที่สังเกตได้แก่ มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ ซึม ท้องเสีย มีปื้นสีม่วง (cyanosis) ที่ผิวหนังหรือหงอน หัวและ/หรือหน้าบวม มีอาการทางประสาท

ถ้าไก่มีอาการอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียวอ่านเป็น ป่วย

ถ้าไก่มีอาการมากกว่า 1 อย่าง อ่านเป็น ป่วยรุนแรง

ในกรณีที่ไก่ป่วยจนกินอาหารและน้ำไม่ได้ ให้ทำเมตตาฆาต และให้คะแนนเท่ากับ 3 ในวันถัดไป

การตัดสินผลโดยคำนวณ IVPI ซึ่งเป็นคะแนนเฉลี่ยของแต่ละตัวต่อการสังเกตอาการแต่ละครั้งตลอดระยะเวลา 10 วัน

ค่า IVPI เป็น 3.00 หมายถึง ไก่ทั้งหมดตายภายใน 24 ชั่วโมง

ค่า IVPI เป็น 0.00 หมายถึง ไก่ทั้งหมดไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ ในช่วง 10 วันที่สังเกตอาการ

เชื้อไวรัส Influenza A ที่มีค่า IVPI มากกว่า 1.2 จัดเป็น high pathogenicity (OIE, 2008; 2015)

4. การตรวจหาแอนติเจนและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

วิธีทดสอบที่เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยโรคไข้หวัดนก คือการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้ไข่ไก่ฟัก และพิสูจน์เชื้อโดยวิธีการทางชีววิทยา ซึ่งต้องใช้เวลาหลายวัน ในบางกรณีจำเป็นต้องทราบผลการทดสอบที่รวดเร็วเพื่อประโยชน์ในการควบคุมกำจัดโรคได้อย่างทันเวลาที่ก่อนที่โรคจะแพร่ระบาดเป็นวงกว้าง จึงมีการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลขึ้นเพื่อให้ทราบผลการทดสอบที่รวดเร็ว เทคนิคดังกล่าวมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพในการทดสอบทั้งในด้านความรวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ

4.1 การตรวจหาแอนติเจน

การตรวจหาแอนติเจนจากตัวอย่างโดยตรงใช้เป็นวิธีการคัดกรอง (screening test) ใน ภาคสนามเนื่องจากทดสอบได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก และทราบผลในเวลารวดเร็ว ปัจจุบันมีชุดทดสอบสำเร็จรูปหลายชนิดทั้งที่ผลิตในประเทศ และต่างประเทศซึ่งมีความแตกต่างกันในแง่ของความไว (sensitivity) ของการทดสอบ ชุดทดสอบดังกล่าวจัดเป็น antigen capture immuno assay ซึ่งมีความไวต่ำกว่าวิธีแยกเชื้อไวรัส ประมาณ 3-4 log (Woolcock

and Cardona, 2005) อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวเป็นเพียงการตรวจคัดกรอง จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างตรวจยืนยันโดยวิธีแยกเชื้อไวรัสด้วย

4.2 เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เทคนิค RT-PCR ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจหา viral protein, nucleic acid หรือ virus particle ที่มีปริมาณน้อย โดยใช้หลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจาก DNA ต้นแบบ (template) โดยใช้ primer จำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดนั้นๆ และมีส่วนประกอบอื่นได้แก่ nucleotide และเอนไซม์ที่จำเป็นต่อปฏิกิริยาดังกล่าว แล้วจึงตรวจหาผลที่เกิดขึ้น (PCR product) โดยวิธี agarose gel electrophoresis การอ่านผลโดยเทียบขนาดของ PCR product กับ marker ที่เหมาะสม

เทคนิค RT-PCR ใช้ตรวจหา viral RNA ทั้งจากตัวอย่างโดยตรงและน้ำไขติดเชื้อ พิสูจน์ H5/H7 subtype และตรวจหาลำดับ nucleotide จาก cDNA product (Suarez et al., 2007)

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาใช้เทคนิคดังกล่าวในการจำแนก H และ N subtype เนื่องจากเป็นวิธีการที่ให้ผลรวดเร็วแม่นยำและให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับวิธีมาตรฐานคือ HA-HI และ NA-NI สำหรับ primer ที่ใช้ตรวจหา H1-H16 และ N1-N9 ใช้วิธีของ Lee และคณะ (2001), Fereidouni และคณะ (2009)

เทคนิค RT-PCR ในการ identify H และ N subtype

1. ขั้นตอนการสกัด RNA

ตัวอย่างที่มาจาก swab นำมาเทใส่หลอด microcentrifuge tube ปั่นที่ 10,000 rpm 10 นาที จากนั้นเทใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม 4% gentamicin 60 μ L ตั้งทิ้งไว้ที่ 30-40 นาที จากนั้นนำไปสกัด RNA

ตัวอย่างที่ได้จากน้ำไขติดเชื้อ ต้องทำการ inactivate 0.1% formalin ก่อนนำมาสกัด RNA ส่วนตัวอย่างอวัยวะภายในนำมาบดเตรียมเป็น 10% suspension โดยใช้ PBS จากนั้นจึงนำไปสกัด RNA

ขั้นตอนการสกัด ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการของชุดสกัด E.Z.N.A.[®] Viral RNA Kit (Omega, USA)

- เติมน้ำยา QVL lysis buffer 500 μ L (ที่เติม carrier RNA 5.6 μ L แล้ว) ใส่ในหลอด microcentrifuge tube

- เติมตัวอย่าง 150 μ L mix 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที

- เติม ethanol (96-100%) 350 μ L, mix 15 วินาที, spin down เพื่อให้ RNA

ตกตะกอน

- ดูดตัวอย่างใส่ในหลอด Hibin® RNA column ที่มี collection tube ขนาด 2 mL
- นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge 10,000 rpm 15 วินาที
- เปลี่ยน collection tube ใหม่ ทำซ้ำโดยดูดตัวอย่างใส่ในหลอด Hibin® RNA column แล้วปั่นจากนั้นเปลี่ยน collection tube หลอดใหม่
- เติม VHB buffer 500 µL จากนั้นปั่น 10,000 rpm 15 วินาที
- เท supernatant ทั้ง จากนั้นนำไปปั่นให้ 13,000 rpm 2 นาที
- นำ Hibin® RNA column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่
- เติม DEPC-treated water 20-50 µL ตรงกลาง membrane ของ Hibin® RNA column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที
- ปั่นที่ 13,000 rpm 1 นาที จะได้ RNA ในหลอด microcentrifuge
- เก็บที่ 4°C เพื่อดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

2. ขั้นตอน One-step RT-PCR

ลำดับ	Master mix	ปริมาณ (µL)
1	distilled water DNase, RNase free	5 µL
2	2x reaction mix	12.5 µL
3	MgSO ₄ (5 mM)	0.5 µL
4	primer 1 (20 pmol)	0.5 µL
5	primer 2 (20 pmol)	0.5 µL
6	Superscript	1 µL
	Master mix total volume	20 µL
7	RNA ตัวอย่าง	5 µL
	Total reaction volume	25 µL

ขั้นตอน	stage	No. of cycle	Temp. (°C)	Time
cDNA synthesis	1	1	50	30 min
Denaturation	2	1	94	2 min
			94	15 sec
PCR amplification	3	40	50	30 sec
			68	1 min
Final extention	4	1	68	5 min

Primer ที่ใช้

	Name	Sequence(5'-3')	primer	product size (bp)
H1	H1-550f	5' – AAC AAY AAR GRG AAA GAA GT - 3'	Primer Forward	467
	H1-1016r	5' – GGG ACD TTY CTT ART CCT GT - 3'	Primer Reverse	
H2	H2-422f	5' – GAG AAA RTW AAG ATT CTG CC - 3'	Primer Forward	662
	H2-1083r	5' – CCA AAC AAY CCY CTT GAY TC - 3'	Primer Reverse	
H3	H3-175f	5' – CAR ATT GAR GTG ACH AAT GC - 3'	Primer Forward	722
	H3-896r	5' – GGT GCA TCT GAY CTC ATT A - 3'	Primer Reverse	
H4	H4-8f	5' – GCA GGG GAA ACA ATG CTA TC A - 3'	Primer Forward	770
	H4-777r	5' – CCW GGY TCT ACA ATW GTC C - 3'	Primer Reverse	
H5	H5-155f	5' – ACA CAT GCY CAR GAC ATA CT - 3'	Primer Forward	545
	H5-699r	5' – CTY TGR TTY AGT GTT GAT GT - 3'	Primer Reverse	
H6	H6-661f	5' – AGC ATG AAT TTT GCC AAG AG - 3'	Primer Forward	302
	H6-962r	5' – GGR CAT TCT CCT ATC CAC AG - 3'	Primer Reverse	
H7	H7-12f	5' – GGG ATA CAA AAT GAA YAC TC - 3'	Primer Forward	634
	H7-645r	5' – CCA TAB ARY YTR GTC TGY TC - 3'	Primer Reverse	
H8	H8-166f	5' – GTG GAA ACA GAG AAA CAT - 3'	Primer Forward	432
	H8-597r	5' – CCA TAA GAA RAT GAT GTC T - 3'	Primer Reverse	
H9	H9-151f	5' – CTY CAC ACA GAR CAC AAT GG - 3'	Primer Forward	488
	H9-638r	5' – GTC ACA CTT GTT GTT GTR TC - 3'	Primer Reverse	
H10	H10-521f	5' – GGA CAA AAY TTC CCT CAG AC - 3'	Primer Forward	412
	H10-932r	5' – GRA AAG GGA GCT TTG TAT TT - 3'	Primer Reverse	
H11	H11-240f	5' – TGY TCM TTT GCT GGR TGG AT - 3'	Primer Forward	450
	H11-689r	5' – CTC TGA ACC CAC TGC TAC AT - 3'	Primer Reverse	
H12	H12-11f	5' – AGG GGT CAC AAT GGA AAA A - 3'	Primer Forward	421
	H12-431r	5' – GGT GAA ATC AAA CAT CTT CA - 3'	Primer Reverse	
H13	H13-203f	5' – CCA CAC AGG AAC ATA YTG TTC - 3'	Primer Forward	231
	H13-433r	5' – CTA CTG A AW GAY CTG ATT CC - 3'	Primer Reverse	
H14	H14-444f	5' – TCA TCG CCG AAC AAT TCA CC - 3'	Primer Forward	543
	H14-986r	5' – GCA GTT TCC TAT AGC AAT CC - 3'	Primer Reverse	
H15	H15-455f	5' – GTG CGT GTA AGA GAA CAG TG - 3'	Primer Forward	383
	H15-837r	5' – ATT AGA GCG GAG AAA GGT GG - 3'	Primer Reverse	

ที่มาของข้อมูล : Lee et al. (2001)

Primer ที่ใช้ (ต่อ)

	Name	Sequence(5'-3')	primer	product size (bp)
N1	N1-53f	5' – AAT CTG TAT GGY AAT AGG AAT A - 3'	Primer Forward	236
	N1-289r	5' – AGA GAK GAA TTG CCC GCT ART GTY AC - 3'	Primer Reverse	
N2	N2-39f	5' – TCT CTC TAA CCA TTR CAA CAG TAT G - 3'	Primer Forward	244
	N2-283r	5' – TAA TTT GAC ATT GYG GCT TTG ACC A - 3'	Primer Reverse	
N3	N3-55f	5' – GTG AAY ACY AYT CTR TCA ACA ATA GC - 3'	Primer Forward	241
	N3-296r	5' – ACT ATD ACR TCY TTG TTY TC - 3'	Primer Reverse	
N4	N4-91f	5' – TCA ATA TGG TTY AGY CAT TA - 3'	Primer Forward	236
	N4-327r	5' – GGA TCC AAT TCT RAT YCC ATT GTC - 3'	Primer Reverse	
N5	N5-76f	5' – TWT TCA ACA TWC TKC TTC AT - 3'	Primer Forward	203
	N5-279r	5' – GAT ACA TYR CAG AGA GGT TC - 3'	Primer Reverse	
N6	N6-44f	5' – AGG AAT GAC ACT ATC SGT AGT AAG - 3'	Primer Forward	242
	N6-286r	5' – ACY TCR CAY ARR GGY TTD GW - 3'	Primer Reverse	
N7	N7-52f	5' – ATC YGG ART RGC AAT AGY RC T - 3'	Primer Forward	247
	N7-299r	5' – GCT ATY ACR ACC CAY CCY TCA AC - 3'	Primer Reverse	
N8	N8-40f	5' – TCM YTR GGR HTD STW RTM YT - 3'	Primer Forward	232
	N8-272r	5' – TCA CAY ADT GSY TCK GTR TT - 3'	Primer Reverse	
N9	N9-65f	5' – GTA ATA GGC ACR ATT GCA GTA CT - 3'	Primer Forward	226
	N9-291r	5' – CCT TTG GTC ARG TTA TTG AA - 3'	Primer Reverse	

ที่มาของข้อมูล : Tsukamoto K. (In House), National Institute of Animal Health, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, Japan

	Name	Sequence(5'-3')	primer	product size (bp)
H1	H1-883F	5' – YDT CGA TGC TCC RGT YCA Y - 3'	Primer Forward	391
	H1-1273R	5' – TGY TCY TTR CCY ACY GCW GTG - 3'	Primer Reverse	
H2	H2-892F	5' – AAM MCT TGA AAA YTG YGA - 3'	Primer Forward	343
	H2-1234R	5' – TTC AAT CAC AGA CTT YAC YTT G - 3'	Primer Reverse	
H3	H3-919F	5' – GYA TYA CTC CWA ATG GAA GC - 3'	Primer Forward	376
	H3-1294R	5' – ATT CTY CCT TCY ACT TCD GA - 3'	Primer Reverse	
H4	H4-758F	5' – TGG ACW ATT GTR GAD CCW GGA - 3'	Primer Forward	421
	H4-1179R	5' – GCT GCC TGR GTV GAY TTG AG - 3'	Primer Reverse	
H5	H5-918F	5' – CCA RTR GKG GCK ATA AAY TC - 3'	Primer Forward	249
	H5-1166R	5' – KGT CTG CWG CRT AYC CRC TY - 3'	Primer Reverse	
H6	H6-870F	5' – TCA RAY YTD CCA ATH GAG AA - 3'	Primer Forward	387
	H6-1256R	5' – YTC RTG VTC KAC WGC YTC RA - 3'	Primer Reverse	

	Name	Sequence(5'-3')	primer	product size (bp)
H7	H7-937F	5' – ATY AAY MSY AGR RCW GTR GG - 3'	Primer Forward	241
	H7-1177R	5' – GAT CWA TTG CHG AYT GRG TG - 3'	Primer Reverse	
H8	H8-854F	5' – GGC AGA ATA ATY CAA AAT GA - 3'	Primer Forward	376
	H8-1229R	5' – TCA TYT TGT CAA CTA TAT TGT TGA C - 3'	Primer Reverse	
H9	H9-943F	5' – CAC AAT GTM AGY AAR TAT GC - 3'	Primer Forward	554
	H9-1496R	5' – TCC ATG CAY TGR TYR TCA CA - 3'	Primer Reverse	
H10	H10-935F	5' – AAY YTD TCM CCD AGR ACD GT - 3'	Primer Forward	311
	H10-1245R	5' – TCA GAY TCT ATK GAY YCR AAC - 3'	Primer Reverse	
H11	H11-858F	5' – GGA AAT GGG AAA YTG TTC AG - 3'	Primer Forward	410
	H11-1267R	5' – AAT TCR TGT TGH AYA GAC TC - 3'	Primer Reverse	
H12	H12-776F	5' – CAR ACW GTV AAR ATA CAR AC - 3'	Primer Forward	368
	H12-1143R	5' – CCY GTY CCY TCH GMR TTY TG - 3'	Primer Reverse	
H13	H13-856F	5' – ATT GAR GAR TAT GGA AAA GG - 3'	Primer Forward	337
	H13-1192R	5' – GTY GAY TCT TTR TCT GCA GC - 3'	Primer Reverse	
H14	H14-863F	5' – GAG CAC AGT GCT TAA AAG TG - 3'	Primer Forward	282
	H14-1144R	5' – GCA TTT TGR TGC CTR AAT CCA TAC C - 3'	Primer Reverse	
H15	H15-828F	5' – CCG CTC TAA TGC CCC WTC RG - 3'	Primer Forward	273
	H15-1100R	5' – TCG ATG AAT CCT GCA ATT GC - 3'	Primer Reverse	

ที่มาของข้อมูล : Tsukamoto, et al. (2008)

	Name	Sequence(5'-3')	primer	product size (bp)
N1	N1-F	5' – AGR ^a CCT TGY TTC TGG GTT GA - 3'	Primer Forward	126
	N1-R	5' – ACC GTC TGG CCA AGA CCA - 3'	Primer Reverse	
N2	N2-F	5' – GCA TGG TCC AGY TCA AGY TG - 3'	Primer Forward	362
	N2-R	5' – CCY TTC CAG TTG TCT CTG CA - 3'	Primer Reverse	
N3	N3-F	5' – AGA TCR GGC TTT GAA RTC ATC AAA GT - 3'	Primer Forward	247
	N3-R	5' – CAT TGT CTA RTC CAC AGA AAG TAA CTA TAC - 3'	Primer Reverse	
N4	N4-F	5' – TGG ATA AGA TTC AAC AGT GA - 3'	Primer Forward	456
	N4-R	5' – GGT ATC AGA ATT AAC ACC ACA - 3'	Primer Reverse	
N5	N5-F	5' – GTT ATT GGG TAA TGA CRG AYG GTC - 3'	Primer Forward	193
	N5-R	5' – GGT CTA TTC ATT CCA TTC CAA - 3'	Primer Reverse	

	Name	Sequence(5'-3')	primer	product size (bp)
N6	N6-F	5' – GCI ACA GGA ATG ACA CTA TC - 3'	Primer Forward	265
	N6-R	5' – GRA TGT GCC ATG ART TTA C - 3'	Primer Reverse	
N7	N7-F	5' – GTY GAC AAY AAC AAT TGG TCA GG - 3'	Primer Forward	183
	N7-R	5' – CCC AAC TGR GAI TGG GCT - 3'	Primer Reverse	
N8	N8-F	5' – GGT CAG GAT AYA GYG GTT CYT TCA C - 3'	Primer Forward	145
	N8-R	5' – CCA CAC ATC ACA ATG GAG CT - 3'	Primer Reverse	
N9	N9-F	5' – AAC ACI GAC TGG AGT GGY TAC - 3'	Primer Forward	166
	N9-R	5' – GGA ATT CTG TRC TGG AAC AC - 3'	Primer Reverse	

^a Codes for ambiguous bases position and NTP analogues: R=A/G, Y=C/T, I=inosine. ที่มาของข้อมูล : Fereidouni et al. (2009)

3. ขั้นตอนการตรวจหา Amplified product โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

การตรวจวิเคราะห์ผล PCR product โดยวิธี agarose gel electrophoresis อาศัยหลักการพื้นฐานของ DNA ที่มีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบซึ่งมีประจุเป็นลบเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะถูกผลักไปสู่ขั้วบวก โดยผ่านตัวกลาง ทำให้สามารถแยกขนาดของ DNA ได้

วิธีทดสอบ

3.1 เตรียม 1.5% agarose gel

3.2 นำแผ่น agarose gel วางลงใน chamber ของเครื่อง electrophoresis ที่มี 1X TAE buffer อยู่ โดยวางแผ่น gel ด้านที่มีช่องสำหรับเติมตัวอย่างไว้ที่ขั้วลบของ electrophoresis chamber เสมอ จากนั้นเติม 1X TAE buffer ให้ท่วมแผ่น gel

3.3 ใส่ตัวอย่างลงในแผ่น gel โดยหลุมที่ 1 ใส่ DNA Ladder Marker 100 bp 2 μ L เพื่อเป็น standard base pair

3.4 ใส่ตัวอย่างจากขั้นตอนที่ได้ จากขั้นตอนที่ 2 ลงในหลุมที่ 2 โดยก่อนใส่ให้ผสมกับ 6X loading dye และ distilled water (DW) บนแผ่น parafilm ในอัตราส่วนตัวอย่าง loading dye และ DW เป็น 4:1:1 แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette ก่อนใส่ตัวอย่างลงในช่องที่ 2 ของแผ่น gel และหลุมต่อไปตามจำนวนตัวอย่างโดยมีการใส่ตัวอย่าง positive control และ negative control

3.5 ปิดฝา chamber ให้สนิทและตรวจสอบความเรียบร้อยก่อนจะผ่านกระแสไฟฟ้า จากนั้นเปิดเครื่อง electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลา 25 นาที

3.6 เมื่อครบเวลาปิดเครื่อง electrophoresis และถอดปลั๊กออกนำแผ่น agarose gel ออกจาก chamber เพื่อนำไปย้อมสี Ethidium bromide (EtBr) โดยแช่ลงในสารละลาย EtBr ความเข้มข้น 0.5 μ g/mL 15 นาที จากนั้นล้าง EtBr ส่วนเกินโดยแช่ใน deionized water 5 นาที

3.7 ตรวจ PCR band โดยใช้เครื่อง UV Transilluminator โดยนำแผ่น agarose gel วางบนเครื่อง UV Transilluminator ซึ่งใช้แสง UV ตรวจการเรืองแสงของ PCR band ที่ถูกย้อมด้วยสีของ EtBr

3.8 ถ่ายภาพ PCR band ด้วยชุดถ่ายภาพ

3.9 อ่าน product length โดยเปรียบเทียบกับ positive control และ DNA ladder marker 100 bp

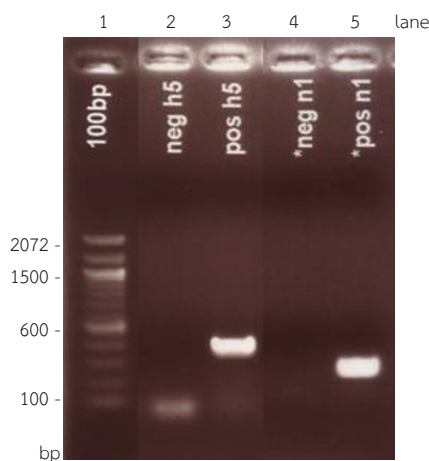


Fig. 7 Amplified product of H5 and N1 fragments using One-step RT-PCR.

lane 1 = 100 bp marker

lane 2 = negative control (H5), lane 3 = positive H5 with 545 bp

lane 4 = negative control (N1), lane 5 = positive N1 with 126 bp (NIAH)

4.3 เทคนิค Real-time RT-PCR (rRT-PCR)

เทคนิค rRT-PCR เป็นการตรวจหาเชิงปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ข้อดีของเทคนิคนี้คือให้ผลการทดสอบรวดเร็วภายในระยะเวลาเพียง 3 ชั่วโมง ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน เนื่องจากไม่มีขั้นตอนที่ใช้สาร EtBr ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง มีความไวและจำเพาะเทียบได้กับวิธีการแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่าง tracheal swab และ oropharyngeal swab ของไก่และไก่วง แต่สำหรับตัวอย่าง cloacal swab และเนื้อเยื่อของนกบางชนิดอาจเกิดผลลบเทียม (false negative) อันเป็นผลจาก PCR inhibiting substance (Das et al., 2006) ปัจจุบันห้องปฏิบัติการหลายแห่งใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวินิจฉัยและเฝ้าระวังโรคโดยตรวจได้ทั้งจากตัวอย่างโดยตรงและน้ำไข้ติดเชื้อ การตรวจหาเชื้อไวรัส Influenza A ส่วนใหญ่ target ที่ matrix (M) gene ซึ่ง Influenza A ทั้งหมดจะมีส่วนที่มีลำดับ nucleotide ตรงกัน จากนั้นจึงพิสูจน์ subtype ในขั้นตอนต่อไป

โดยใช้ primer ของ Tagman rRT-PCR ที่จำเพาะต่อส่วน HA2 region ซึ่งสามารถพิสูจน์ H5 และ H7 ได้ มีรายงานว่า primer ที่จำเพาะต่อ H5 ที่เสนอโดย Spackman (2002) สามารถตรวจหา H5N1-HPAI ได้หลาย isolate ทั้ง Asian, North American และ European lineage (Slomka et al., 2007) กรณีผลการทดสอบโดย rRT-PCR เป็นบวกต้องทำการวิเคราะห์การเรียงลำดับ nucleotide เพื่อศึกษาความรุนแรงของเชื้อไวรัส

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติใช้เทคนิค rRT-PCR ตรวจหาเชื้อไวรัส Influenza A หรือ NDV จากตัวอย่างโดยตรงและน้ำไขติดยึดเชื้อควบคู่กับการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้ไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยง กรณีที่พบเชื้อ Influenza A จึงตรวจ H5/H7 subtype โดยใช้ specific rRT-PCR ทั้งนี้ตัวอย่างดังกล่าวต้องดำเนินการแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อโดยวิธีมาตรฐานไปพร้อมกัน

การศึกษาความใช้ได้ของเทคนิค (validation) รวมทั้งวิธีการทดสอบ (protocol) เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง โดยเล็งเห็นถึงความสำคัญดังกล่าวประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป (European Union) จึงร่วมมือกันระหว่างห้องปฏิบัติการอ้างอิงของแต่ละประเทศกำหนดวิธีการทดสอบ และตรวจสอบความใช้ได้เพื่อสร้างมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการของโรคไข้หวัดนก (Monne, 2008)

เทคนิค Real-time ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Influenza A, H5/H7 วิธีการ

1. ขั้นตอนการสกัด RNA

ตัวอย่างที่นำมาสกัดอาจเป็นตัวอย่าง swab อวัยวะภายในบดเป็น 10% suspension น้ำไขติดยึดหรือน้ำเซลล์เพาะเลี้ยง ขั้นตอนการสกัดดำเนินการเช่นเดียวกับเทคนิค RT-PCR ซึ่งได้กล่าวมาแล้ว

2. ขั้นตอนการเตรียม Master Mix

2.1 การเตรียม Master Mix สำหรับการวิเคราะห์เชื้อไวรัส Influenza A

ลำดับ	Master mix	ปริมาณ (μL)
1	distilled water DNase, RNase free	3 μL
2	2x RT-PCR buffer	12.5 μL
3	25X RT-PCR Enzyme mix	1 μL
4	Influenza A Primer Probe Mix	3.5 μL
	Master mix total volume	20 μL
5	RNA ตัวอย่าง	5 μL
	Total reaction volume	25 μL

Primer ที่ใช้ / Probe Type A

Name	Sequence(5'-3')	Type	Primer No.
IVA D161M	5' AGA TGA GYC TTC TAA CCG AGG TCG 3'	Primer Forward	2848
IVA D162M1	5' TGC AAA AAC ATC YTC AAG TCT CTG 3'	Primer Reverse	2849
IVA D162M2	5' TGC AAA CAC ATC YTC AAG TCT CTG 3'		2850
IVA D162M3	5' TGC AAA GAC ATC YTC AAG TCT CTG 3'		2851
IVA D162M4	5' TGC AAA TAC TAC YTC AAG TCT CTG 3'		2852
IVA Ma	(FAM) TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA(TAM)	Probe	2853

ที่มาของข้อมูล : Australian Animal Health Laboratory (AAHL)

2.2 การเตรียม Master Mix สำหรับการวิเคราะห์เชื้อไวรัส Influenza H5 subtype

ลำดับ	Master mix	ปริมาณ (μL)
1	distilled water DNase, RNase free	0.124 μL
2	2x RT-PCR buffer	12.5 μL
3	25X RT-PCR Enzyme mix	1 μL
4	Duplex H5 Primer Probe Mix	6.376 μL
	Master mix total volume	20 μL
5	RNA ตัวอย่าง	5 μL
	Total reaction volume	25 μL

Primer ที่ใช้ / H5 Duplex

Name	Sequence(5'-3')	Type	Primer No.
IVA D148H5	5' AAA CAG AGA GGA AAT AAG TGG AGT AAA ATT 3'	Primer	2854
IVA D204F	5' ATG GCT CCT CGG RAA CCC 3'		2855
IVA D149H5	5' AAA GAT AGA CCA GCT ACC ATG ATT GC 3'		2856
IVA D205R	5' TTY TCC ACT ATG TAA GAC CAT TCC G 3'		2857
IVA H5a	(6FAM) TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA (TAMRA)	Probe	2858
IVA D215P	(6FAM) ATG TGT GAC GAA TTC MTM G (BNFQ)		2859

ที่มาของข้อมูล : Australian Animal Health Laboratory

2.3 การเตรียม Master Mix สำหรับการวิเคราะห์เชื้อไวรัส Influenza H7 subtype

ลำดับ	Master mix	ปริมาณ (μL)
1	distilled water DNase, RNase free	2.25 μL
2	2x RT-PCR buffer	12.5 μL
3	25X RT-PCR Enzyme mix	1 μL
4	Forward Primer (10μM)	2 μL
5	Reward Primer (10μM)	2 μL
6	Probe (10μM)	0.25 μL
7	RNA ตัวอย่าง	5 μL
Total reaction volume		25 μL

Primer ที่ใช้ / H7

Name	Sequence(5'-3')	Type H7	Primer No.
FLI-H7F	5' AYA GAA TAC AGA TWG ACC CAG T 3'	Forward Primer	2860
FLI-H7R	5' TGA TGC ACY GCA TGT TTC CA 3'	Reward Primer	2861
FLI-H7P	5' (FAM) TGG TTT AGC TTC GGG GCA TCA TG (BHQ)1 3'	Probe	2862

ที่มาของข้อมูล : Australian Animal Health Laboratory

3. ขั้นตอน Thermal Cycle Program

สำหรับ Ag Path-ID One-step RT-PCR kit (Ambion-ABI P/N 1005) ใช้ Amplification condition ดังนี้ (ทั้ง AAHL Influenza virus A และ H5 Duplex เทคนิค)

1X 45°C 10 min, 95°C 10 min

1X 95°C 15 sec, 60°C 45 sec

4. ผลการวิเคราะห์

4.1 Real-time TagMan Analysis

การวิเคราะห์ที่จะกล่าวถึงการใช้ ABI 7500 Fast ThermalCycle ใน mode “standard”

ให้ set threshold ที่ 0.05 สำหรับ Influenza A หรือ 0.2 สำหรับ H5 Duplex การตัดสินเมื่อ เทคนิค ปรากฏผลดังนี้

1. Positive control

1.1 แสดง amplification curve และ Ct value บน Reporter dye layer ทั้ง strong และ weak positive control รวมทั้ง extraction control

- 1.2 Ct value ต้องอยู่ใน range ที่ยอมรับได้สำหรับ positive control ทั้งหมด
 2. No template control (NTC) และ Negative control extraction (NCE)
 - 2.1 กรณีที่ไม่ปรากฏ amplification curve บน Reporter dye layer จึงตัดสินได้ว่าไม่มี contamination
 3. ตัวอย่างทดสอบ
 - 3.1 กรณีที่ปรากฏ amplification curve จึงตัดสินได้ว่าทำการสกัดตัวอย่างได้อย่างเหมาะสม
- ในกรณีที่ผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดเบื้องต้น และการทดสอบใช้ได้ (valid) จึงทำการวิเคราะห์ผล หากพบว่าการทดสอบไม่ได้ผล (invalid) ให้ทดสอบซ้ำโดยปรึกษากับ Lab Manager

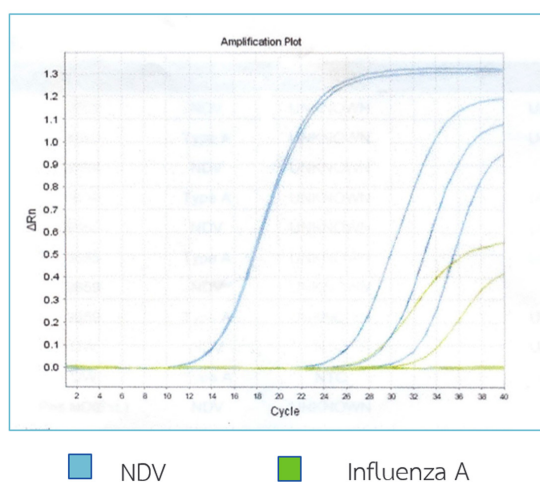


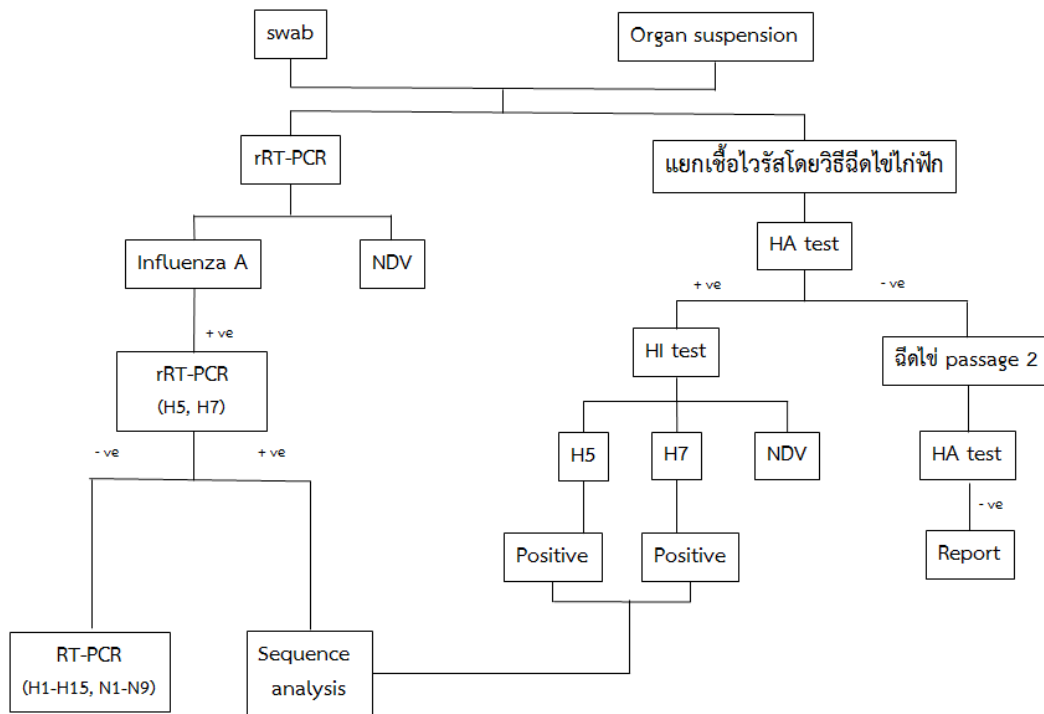
Fig.8 Amplification curve of NDV and Influenza A virus using multiplex rRT-PCR. Influenza A virus was isolated in 2004. (NIAH)

4.4 การตรวจติดตามทางระบาดวิทยา (Epidemiological assessment)

นอกเหนือจากการตรวจวินิจฉัยโรคแล้ว เทคนิคทางชีวโมเลกุลยังใช้ตรวจติดตามทางด้านระบาดวิทยาเพื่อวิเคราะห์ถึงต้นกำเนิดและการแพร่ของเชื้อไวรัสโดยศึกษาการเรียงลำดับ nucleotide และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) เทียบกับข้อมูลของเชื้อไวรัสใน GenBank จากรายงานของ Nuansrichay และคณะ (2008) พบว่าเชื้อ H5N1 ที่แยกได้ในประเทศไทยระหว่างปี 2006-2008 จำนวน 3 isolate จากจังหวัดพิจิตร อ่างทอง และนครสวรรค์ จัดอยู่ใน Clade 1 โดยเป็นกลุ่มเดียวกับที่พบในประเทศกัมพูชา มาเลเซีย ลาว และเวียดนามในปี 2003-2004 และอีก 3 isolate ที่แยกได้ในช่วงเวลาเดียวกัน

จากจังหวัดนครพนม หนองคายและมุกดาหาร จัดอยู่ใน Clade 2.3.4 ใน cluster เดียวกับ Fujian-like virus ซึ่งแยกได้จากประเทศจีนในปี 2005 และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับบาง isolate ที่พบในประเทศเวียดนาม มาเลเซีย และลาวในปี 2006-2007

แผนภูมิแสดงขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ



เอกสารอ้างอิง

- สำนักนายกรัฐมนตรี, 2547-ก คำสั่งสำนักนายกรัฐมนตรี ที่ 185/2547 เรื่องแต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาแก้ไขสถานการณ์โรคไข้หวัดนก ลงวันที่ 23 กรกฎาคม 2547
- สำนักนายกรัฐมนตรี, 2547-ข หนังสือสำนักนายกรัฐมนตรี ที่ นร 0411/365 ลงวันที่ 17 กันยายน 2547 เรื่องผลการพิจารณาการใช้วัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนก
- อรพันธ์ ภาสวรกุล. 2556. การควบคุมป้องกันและกำจัดโรคไข้หวัดนกชนิดรุนแรง (เอช 5 เอ็น 1) จากประสบการณ์ของประเทศไทย สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ หน้า 1-32.
- Cappuci D.T., Johnson Jr. D.C., Brugh M., Smith T.M., Jackson C.F., Pearson J.E. and Senne D.A. 1985. Isolation of avian influenza virus (subtype H5N2) from chicken eggs during a natural outbreak. *Avian Dis.* 29: 1195-1200.
- Capua I., Terregino C., Cattoli G., Mutinelli F. and Rodriguez J.F. 2003. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.* 32(1): 47-55.
- Committee on Foreign Animal Diseases. 1998. Appendix 3: Cleaning and disinfection. In: *Foreign Animal Diseases*. Anonymous. U.S. Animal Health Association, Richmond, Virginia. pp. 445-448.
- Cox N.J., Fuller F., Kaverin N., Klenk H.D., Lamb R.A., Mahy B.W., McCauley J.W., Nakamura K., Palese P. and Webster R.G. 2000. Orthomyxoviridae. In: *Virus Taxonomy*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel M.H., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.N., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., and Wichner R.B. (eds.). Academic Press, San Diego. pp. 585-597.
- Das A., Spackman E., Senne D., Pedersen J. and Suarez D.L. 2006. Development of a internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. *J. Clin. Microbiol.* 44(9): 3065-3073.
- Easterday B.C., Hinshaw V.S. and Halvorson D.A. 1997. Influenza. In: *Disease of Poultry*. Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. and Saif Y.M. (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 583-605.
- Fouchier Ron A.M., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B. and Osterhaus Albert D.M.E. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* 79: 2814-2822.
- Kilany W.H., Arafa A., Erfan A.M., Ahmed M.S., Nawar A.A., Selim A.A., Knoulosy S.G., Hassan M.K., Aly M.M., Hafez H.M. and Abdelwhab E.M. 2010. Isolation of highly pathogenic avian influenza H5N1 from table eggs after vaccine break in commercial layer flock. *Avian Dis.* 54: 1115-1119.

- Lee C.W., Suarez P.L., Tumpey T.M., Sung H.W., Kwon Y.K., Lee Y.J., Choi J.G., Joh S.J., Kim M.C., Lee E.K., Park J.M., Lu X., Katz J.M., Spackman E., Swayne D.E. and Kim J.H. 2005. Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. *J. Virol.* 79: 3692-3702.
- Lee M.S., Chang P.C., Shien J.H., Cheng M.C., and Shieh H.K. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Meth.* 97: 13–22.
- Li K.S., Guan Y., Wang J., Smith G.J., Xu K.M., Duan L., Rahardjo A.P., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T.D., Estoepangestie A.T., Chaisingh A., Auewarakul P., Long H.T., Hanh N.T., Webby R.J., Poon L.L., Chen H., Shortridge K.F., Yuen K.Y., Webster R.G. and Peiris J.S. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature.* 430: 209-213.
- Londt B.Z., Banks J. and Alexander D.J. 2007. Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in vivo tests. *Avian Pathol.* 36: 347-350.
- Monne I., Ormelli S., Salviato A., De Battisti C., Bettini F., Salomoni A., Drago A., Zecchin B., Capua I., and Cattoli G. 2008. Development and Validation of a One-Step Real-Time PCR เทคนิค for Simultaneous Detection of Subtype H5, H7, and H9 Avian Influenza Viruses. *J. Clin. Microbiol.* 46: 1769–1773.
- Nakatani H., Nakamura M., Yamamoto Y., Yamada M. and Yamamoto Y. 2005. Epidemiology, pathology, and the immunochemistry of layer hens naturally affected with H5N1 highly pathogenic avian influenza in Japan. *Avian Dis.* 49 Issue 3: 436-441.
- Nuansrichay B., Vitoonpong R., Parchariyanon S. and Chaishing A. 2008. Phylogenetic characterization of avian influenza H5N1 subtype viruses isolated in Thailand during 2006-2008. *Thai-NIAH e-Journal*, V3N2 (Sept-Dec 2008) p. 205-217 [Online]. Available from: <http://www.dld.go.th/niah>. cites 2015 Sept 6.
- Samour J. 2008. *Avian Medicine* 2nd ed. Elsevier, Toronto. pp. 358-363.
- Sims L.D., Domenech J., Benigno C. Kahn S., Kamata A., Lubroth J., Martin V. and Roeder P. 2005. Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. *Vet. Rec.* 157: 159-164.
- Skeeles J.K., Morressey R.L., Nagy A., Helm F., Bunn T.O., Langford M.J., Long R.E. and Apple R.O. 1984. The use of fluorescent antibody (FA) techniques for rapid diagnosis of avian influenza (H5N2) associated with the Pennsylvania outbreak of 1983-84. In: *Proceedings of the 35th North Central Avian Disease Conference*. Anonymous. 32.
- Slemons R.D. and Swayne D.E. 1990. Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Dis.* 34: 277-284.

- Slomka M.J., Pavlidis T., Banks J., Shell W., McNally A., Essen S. and Brown I.H. 2007. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian Dis.* 51: 373-377.
- Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T. and Suarez D.L. 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR เทคนิค for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40(9): 3256-3260.
- Spielman D., Mauroo N., Kinoshita R. Leung C. and Webster R. 2004. Wild bird species and the ecology of virulent avian influenza. *Proceedings of the American Association of zoo Veterinarians, American Association of Wildlife Veterinarians and Wildlife Disease Association, San Diego, CA.* pp. 40-45.
- Stallknecht D.E., Nagy E., Hunter D.B. and Slemons R.D. 2007. Avian influenza. In: *Infectious Diseases of Wild Birds.* Thomas N.J., Hunter D.B. and Atkinson C.T. (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa. pp. 108-130.
- Stone H.D. 1987. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chicken of various ages. *Avian Dis.* 31: 483-490.
- Stone H.D. 1988. Optimization of hydrophile-lipophile balance for improved efficacy of Newcastle disease and avian influenza oil-emulsion vaccines. *Avian Dis.* 32: 68-73.
- Suarez D.L., Spackman E. and Senne D.A. 2003a. Update on molecular epidemiology of H1, H5 and H7 influenza virus infections in poultry in North America. *Avian Dis.* 47: 888-897.
- Suarez D.L., Spackman E., Senne D.A., Bulaga L., Welsch A.C. and Froberg K. 2003b. The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT-PCR. *Avian Dis.* 47: 1091-1095.
- Suarez D.L., Das A. and Ellis E. 2007. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis.* 51: 201-208.
- Suarez D.L., Das A. and Ellis E. 2007. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian. Dis.* 51: 201-208.
- Swayne D.E. and Halvorson D.A. 2008 Influenza. In: *Diseases of Poultry.* 12th ed. Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., and Swayne D.E. (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa. pp. 153-184.
- Swayne D.E., Senne D.A. and Suarez D.L. 2008. Avian influenza. In: *Isolation and Identification of Avian Pathogens.* Dufour-Zavala L., Swayne D.E., Glisson J.R., Pearson J.E., Reed W.M., Jackwood M.W. and Woolcook P.R. (eds.). American Association of Avian Pathologist, Jacksonville, Florida. pp.128-134.

- Swayne D.E., Suarez D.L. and Sims L.D. 2013. Influenza. In : Diseases of Poultry. 13th ed. Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nair V., Nolan L.K. and Suarez D.L. (eds.). Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. pp. 181-218.
- The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). 2014. Avian Influenza (online). Iowa State University, Ames, Iowa. pp. 1-33. Available from http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/highly_pathogenic_avian_influenza-citations.pdf. cited 2015 Sept 6.
- Tong S., Li Y., Rivallier P., Conrardy C., Castillo D.A., Chen L.M., Recuenco S., Ellison J.A., Davis C.T., York I.A., Turmelle A.S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M.R., Tang K., Rowe L.A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K.A., Cox N.J., Anderson L.J., Rupprecht C.E. and Donis R.O. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 4269-4274.
- Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L.M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P.J., Gilbert A.T., Chang J., Guo Z., Davis C.T., Paulson J.C., Stevens J., Rupprecht C.E., Holmes E.C., Wilson I.A. and Donis R.O. 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9: e 1003657.
- Tsukamoto K., Ashizawa H., Nakanishi K., Kaji N., Suzuki K., Okamatsu M., Yamaguchi S. and Mase M. 2008. Subtyping of Avian Influenza Viruses H1 to H15 on the Basis of Hemagglutinin Genes by PCR Assay and Molecular Determination of Pathogenic Potential. *J. Clin. Microbiol.* 46 Issue 9: 3048-3055.
- Tumpey T.M., Suarez D.L., Perkins L.E.L., Senne D.A., Lee J.G., Lee Y.J., Mo I.P., Sung H.W. and Swayne D.E. 2002. Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. *J. Virol.* 76: 6344-6355.
- Van Campen H., Easterday B.C. and Hinshaw V.S. 1989. Virulent avian influenza A viruses: Their effect on avian lymphocytes and macrophages in vivo and in vitro. *J. Gen. Virol.* 70: 2887-2895.
- Vegad J.L. 2008. Poultry Diseases: A guide for Farmers and Poultry Professionals. Second revised and enlarged ed. pp. 12-21.
- Webster R.G., Kawaoka Y. and Bean W.J. 1986. Vaccination as a strategy to reduce the emergence of amantadine- and rimantadine- resistance strains of a chick/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus. *J. Antimicrob. Chemo.* 18: 157-164.
- Webster R.G. and Hulse D.J. 2004. Microbial adaptation and change: avian influenza. *Rev. sci. tech. off. Int. Epiz.* 23(2): 453-465.

- Wood J.M., Kawaoka Y., Newberry L.A., Bordwell E. and Webster R.G. 1985. Standardization of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal A/chicken/Pennsylvania/1370/83 infection. *Avian Dis.* 29: 867-872.
- Wood G.W., Banks J., Strong I., Parsons G. and Alexander D.J. 1996. An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens but lacks multiple amino acids at the haeagglutinin cleavage site. *Avian. Pathol.* 25: 799-806.
- Woolcock P.R. and Cardona C.J. 2005. Commercial immunoเทคนิค kits for the detection of influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. *Avian Dis.* 49: 477-481.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2008 Avian Influenza. In: Manual of Diagnostic test vaccines for terrestrial animals. 6th ed. Office international des Epizootics, Paris. pp. 465-481.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2015. Avian Influenza. Available from <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online>. cites 2015 Oct 2.

ตอนที่ 3

โรคนิวคาสเซิล (Newcastle Disease, ND)

โรคนิวคาสเซิล (ND) เป็นโรคทางไวรัสในสัตว์ปีกที่มีสาเหตุจาก Newcastle disease virus (NDV) หรือ avian paramyxovirus serotype-1 (APMV-1) (Alexander and Senne, 2008a) ซึ่งจัดอยู่ใน genus *Avulavirus*, subfamily *Paramyxovirus*, family *Paramyxoviridae* ชื่ออื่นๆ ที่เรียกได้แก่ Ranikhet disease, Pseudo fowl pest, Pseudo poultry plaque, Avian pest, Avian distemper, Avian pneumoencephalitis และ Korean fowl plaque โรคนิวคาสเซิลเป็นโรคติดต่อที่สำคัญในสัตว์ปีกที่สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากต่ออุตสาหกรรมสัตว์ปีกรวมทั้งไก่พื้นเมืองและนก ปัจจุบันยังมีรายงานการพบโรคในหลายประเทศ แม้ประเทศที่ไม่พบการระบาดของโรคก็คงให้ความสำคัญในการควบคุมเฝ้าระวังอย่างเข้มงวด สำหรับประเทศไทยโรคนี้จัดเป็นโรคระบาดร้ายแรงในสัตว์ปีกที่อยู่ในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 และต้องรายงานต่อองค์การสุขภาพสัตว์โลก (OIE) เฉพาะชนิดที่มีความรุนแรงสูง (velogenic strain)

ประวัติและความเป็นมา

โรคนิวคาสเซิลพบครั้งแรกในประเทศอินโดนีเซีย เมื่อปี ค.ศ. 1926 (Kraneveld, 1926) หลังจากนั้นในปีต่อมาพบโรคนี้ที่เมือง Newcastle ประเทศอังกฤษ (Doyle, 1927) อันเป็นที่มาของชื่อโรคและมีชื่อพ้อง (synonym) คือ avian paramyxovirus type-1 (APMV-1) มีรายงานการระบาดของโรคนี้ในหลายประเทศทั่วโลก โดยสัตว์ปีกกว่า 250 ชนิด (species) สามารถติดเชื้อไวรัสดังกล่าวได้ (Alexander, 1997) แต่ทำให้เกิดโรครุนแรงในไก่ แม้จะมีการป้องกันโรคโดยการทำวัคซีนมากกว่า 60 ปีแล้วแต่ ND ก็ยังเป็นปัญหาต่ออุตสาหกรรมสัตว์ปีก (Czeglédi et al., 2006) ปัจจุบัน OIE (2015) กำหนดให้ ND เป็นโรคติดเชื้อไวรัส APMV-1 โดยมีเกณฑ์ตัดสินความรุนแรงของโรคข้อใดข้อหนึ่งดังนี้

1. เชื้อไวรัสมีค่า intracerebral pathogenicity index (ICPI) ในลูกไก่อายุ 1 วัน (*Gallus gallus*) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.7 ดังจะกล่าวถึงวิธีทดสอบในบทต่อไป

2. มี multiple basic amino acid คือ arginine หรือ lysine อย่างน้อย 3 ตัวที่ C-terminus ของ F2 protein ที่ตำแหน่ง 113-116 และมี phenylalanine ที่ตำแหน่ง 117 ซึ่งเป็น N-terminus ของ F1 protein ในกรณีที่ไม่สามารถหาลักษณะ ของ amino acid ตามที่กำหนด ให้ใช้วิธีหาค่า ICPI

สาเหตุของโรค

Newcastle disease virus (NDV) เป็น enveloped virus ที่ประกอบด้วย linear, non-segmented single-stranded RNA (Lamb et al., 2005) มีน้ำหนักประมาณ 20-25% weight for weight (w/w) และคาร์โบไฮเดรต 6% w/w NDV genome ประกอบด้วย 6 structural protein ได้แก่ nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), matrix (M), fusion (F), hemagglutinin-neuraminidase (HN) และ RNA-dependent RNA polymerase (RNAP) ซึ่งเรียกว่า large polymerase (L) (Lamb and Parks, 2007)

สำหรับคุณสมบัติทางชีววิทยา NDV มีคุณสมบัติจับกลุ่ม (agglutination) กับเม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิดซึ่งเป็นผลการจับรวม (bind) ของ HN protein กับ sialic acid receptor ที่ผนังเม็ดเลือดแดง (Bang and Libert, 1952) และคุณสมบัติดังกล่าวจะถูกยับยั้ง (inhibit) ด้วยซีรัมจำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดเดียวกัน (Burnet, 1943) ข้อค้นพบดังกล่าวเป็นประโยชน์ต่อการตรวจหาเชื้อ NDV โดยใช้เม็ดเลือดแดงไก่เป็นตัวทดสอบ นอกจากเม็ดเลือดแดงไก่แล้ว NDV ยังสามารถจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดอื่นด้วย (Ito et al., 1999) โดยความสามารถในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง จะผันแปรตาม strain ของเชื้อไวรัส ชนิดสัตว์ที่แยกเชื้อไวรัส และชนิดสัตว์ที่ใช้เม็ดเลือดแดง

ความคงทนของเชื้อไวรัส

ความคงทนของเชื้อ NDV วัดได้จากการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) การจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงไก่และการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มโรค (immunogenicity) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวถูกทำลายได้ทั้งทางฟิสิกส์และเคมี เช่น ความร้อน แสง รังสี U-V รังสี X-ray pH และสารเคมี ทั้งนี้เชื้อไวรัสต่าง strain มีความคงทนแตกต่างกัน เชื้อ NDV ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 100°C ภายใน 1 นาที ส่วนที่อุณหภูมิ 56°C เชื้อไวรัสจะถูกทำลายความสามารถในการติดเชื้อ คุณสมบัติการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงไก่และความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มโรคต่อเชื้อภายใน 5 นาที ถึง 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 8°C และ 20°C เชื้อไวรัสยังคงคุณสมบัติของเชื้อได้นานนับเดือนหรือเป็นปี (Beard and Hanson, 1984)

สำหรับความคงทนของ NDV ต่อสารเคมี formalin, beta-propiolactone และ phenol สามารถทำลายความสามารถในการติดเชื้อโดยไม่ส่งผลต่อ immunogenicity น้ำยาฆ่าเชื้อส่วน

ใหญ่สามารถทำลาย NDV ได้อย่างรวดเร็ว Quaternary ammonium compound, 1-2% lysol, 0.1% cresol, 2% formalin และ 1% phenol / quaternary ammonium mixture ก็สามารถทำลาย NDV ได้ (Fenner et al., 1987; Kassai et al., 2007; Cobb, 2011) หากเชื้อไวรัสไม่ได้อยู่ในอินทรีย์สาร (organic matter) เช่น เนื้อเยื่อ อุจจาระ น้ำยา formalin สามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ดีที่อุณหภูมิและความเข้มข้นที่แตกต่างกันโดย formalin 0.1% ทำลายเชื้อได้ภายใน 6 ชั่วโมงและที่ความเข้มข้น 1/5000 สามารถทำลายเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ได้ภายใน 1 ชั่วโมง

ความคงทนของ NDV ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติขึ้นกับไวรัสที่อยู่ใน medium ชนิดใด เช่น ชากสัตว์ อุจจาระ ความแห้งหรือน้ำเมือก โดยอินทรีย์วัตถุไม่เพียงแต่ปกป้องเชื้อไวรัสแต่ยังมีผลลดประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อ (Walker et al., 1973) ดังนั้นก่อนการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ ควรล้างอินทรีย์วัตถุออกเสียก่อนหากเป็นไปได้ มูลสัตว์ปึกเป็น medium ที่ดี ในการคงชีพของ NDV โดยเชื้อจะคงความสามารถในการติดเชื้อได้นานกว่า 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 37°C ในกรณีที่เชื้อไวรัสอยู่ในชากสัตว์จะสามารถคงชีพได้นานหลายสัปดาห์ในอุณหภูมิที่เย็นและอยู่ได้หลายปีหากเก็บชากที่อุณหภูมิแช่แข็ง (Vegad, 2008) ความร้อนและแสงแดดช่วยทำลายเชื้อไวรัสได้ มีรายงานว่า NDV จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 55°C นาน 45 นาที หรือถูกแสงแดดโดยตรงนาน 30 นาที แต่จะยังคงความสามารถในการติดเชื้อได้นาน 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C และนานหลายสัปดาห์ที่อุณหภูมิ -20°C และที่อุณหภูมิ -70°C นานนับเดือนหรือเป็นปี เชื้อ NDV เป็นไวรัสที่ทนทานและสามารถคงชีพในธรรมชาติได้โดยปัจจัยสำคัญที่มีผลให้เชื้อคงชีพนอกตัวสัตว์ปีก คือ อุณหภูมิ ความชื้น ความแห้ง การสัมผัสกับแสงแดด และอินทรีย์วัตถุที่มีเชื้อไวรัสปนเปื้อนอยู่ ดังมีรายงานพบเชื้อ NDV ในคอกไก่ ถาดไข่ เปลือกไข่ ขนไก่และอื่นๆ หลังนำไก่ทั้งหมดออกจากเล้า (depopulation) แล้วนานถึง 2-8 สัปดาห์ หลังเกิดการระบาดของโรค นอกจากนี้เชื้อไวรัสยังสามารถคงชีพในไข่สดได้นานหลายเดือนและในชากสัตว์ปึกแช่แข็งนานกว่า 2 ปี มีรายงานว่าในชากไก่ที่ไม่ได้ออนชนและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เชื้อไวรัสจะคงชีพอยู่ที่ผิวหนังและในไขกระดูกได้นานถึง 4-6 เดือน (Buxton and Fraser, 1977) โดยทั่วไปการแช่เย็นหรือแช่แข็งจะช่วยในการคงชีพของเชื้อไวรัส

ความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity)

ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ NDV ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น strain ของเชื้อไวรัส ปริมาณของเชื้อ ทางของการติดเชื้อ (route) อายุของสัตว์ปีกและสภาพแวดล้อม สัตว์ปีกอายุน้อยมักจะแสดงอาการรุนแรง ส่วนพันธุ์สัตว์หรือพันธุ์กรรมมีผลน้อย route ของการติดเชื้อมีผลต่อกระบวนการเกิดโรค หากเป็นการติดเชื้อโดยธรรมชาติ เช่นทางการหายใจ การกินและ

ทางตาจากฝุ่นละอองที่มีเชื้อไวรัส สัตว์ปีกมักแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจ หากเป็นการติดเชื้อโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เข้าเส้นเลือดหรือเข้าสมองมักแสดงอาการทางระบบประสาท

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test)

เชื้อ NDV ที่แยกได้แต่ละ isolate มีความรุนแรงแตกต่างกัน ประกอบกับปัจจุบันมีการใช้วัคซีนเชื้อเป็นของโรคนี้ในไก่ ดังนั้นการตรวจหาเชื้อไวรัสจากสัตว์ปีกที่แสดงอาการของโรคเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอในการวินิจฉัยโรค จำเป็นต้องตรวจสอบความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้ด้วย แต่เดิมการทดสอบความรุนแรงของเชื้อมีหลายวิธี เช่น การหาค่า mean death time (MDT) ในไข่ไก่ฟัก โดยวิธีฉีดเชื้อที่แยกได้เข้าไข่ไก่ฟักทาง allantoic sac จากนั้นหาค่า MDT จากระยะเวลาที่ตัวอ่อนในไข่ไก่ฟักตายหลังฉีดเชื้อ โดยค่า MRT ต่ำกว่า 60, 60 – 90 และมากกว่า 90 ชั่วโมง จัดเป็น velogenic, mesogenic และ lentogenic ตามลำดับ (Hanson and Brandly, 1955) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบความรุนแรงของไวรัส โดยหาค่า Intravenous pathogenicity index (IVPI) ในไก่อายุ 6 สัปดาห์ (Hanson, 1980) แต่ปัจจุบันมีข้อตกลงร่วมกันของนานาชาติให้ใช้วิธีการทางห้องปฏิบัติการในการทดสอบความรุนแรงของ NDV โดยการทดสอบในตัวสัตว์ (in vivo test) และวิธีการทางชีวโมเลกุล การทดสอบในตัวสัตว์ทำได้โดยฉีดเชื้อไวรัสที่แยกได้เข้าสมองลูกไก่อายุ 1 วัน (SPF chicks) จากนั้นสังเกตอาการเพื่อหาค่า intracerebral pathogenicity index (ICPI) ส่วนวิธีการทางชีวโมเลกุล โดยวิเคราะห์การเรียงตัวของ amino acid ที่ Fo cleavage site ของ fusion glycoprotein (F protein) ซึ่งใช้เป็นตัวตัดสิน pathotype ของเชื้อ NDV (Fuller et al, 2009) ทั้งนี้ Terregino and Capua (2009) ให้ความเห็นว่า ICPI เป็นการทดสอบในตัวสัตว์ที่มีความไวมากที่สุด

การติดต่อ

การติดเชื้อ NDV โดยการหายใจและการกิน (Alexander, 1988) การกินอาจเกิดจากการกินเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนในอาหารและน้ำ จากน้ำมูกหรือมูลของสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ (Alexander et al., 1985) สัตว์ปีกที่แสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจจะแพร่เชื้อโดยการจาม เป็นผลให้เชื้อกระจายในอากาศ (Li et al., 2009) และติดต่อไปยังตัวอื่นในฝูง โดยลักษณะของการแพร่โรคเช่นนี้เองจึงมีการประยุกต์ใช้เป็นวิธีการในการทำวัคซีนในฝูงไก่โดยวิธีสเปรย์และ aerosol generator (Meulemans, 1988) หากคอกมีสัตว์ปีกแออัดมาก โรคก็ยังแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว แต่หากเป็นการเลี้ยงแบบแยกกรง การแพร่ระบาดจะเกิดได้ช้ากว่า สำหรับการติดเชื้อแบบ vertical คือจากแม่สู่ลูกยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามมีรายงานการติดเชื้อในตัวอ่อนในไข่ไก่ฟัก จากไข่ไก่ที่ติดเชื้อ virulent strain แต่ตัวอ่อนมักตายก่อนฟักตัว (Lancaster and Alexander,

1975) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Pospisil และคณะ (1991) ที่พบ lentogenic virus ในตัวอ่อนของไข่ไก่ฟัก และลูกไก่อายุ 1 วัน ที่ฟักจากแม่ที่ทำวัคซีนโรคนี้ ในขณะที่ Capua และคณะ (1993) สามารถแยกเชื้อ virulent NDV จากตัวอ่อนของไข่ไก่ฟัก และจาก cloacal swab ของแม่ไก่ทั้งที่มีแอนติบอดีต่อ NDV ในระดับที่สูง อีกทั้งมีการทดลองฉีดเชื้อ virulent NDV เข้าไข่ไก่ฟัก SPF พบว่าตัวอ่อน ไม่ตายทั้งหมด และยังสามารถแยกเชื้อไวรัสจากลูกไก่ที่ฟักจากไข่ติดเชื้อ (Chen and Wang, 2002) นอกจากนี้โดยเหตุที่ NDV มีความคงทน แม้อยู่นอกตัว host ดังนั้นแมลง สัตว์ทะเล รวมทั้งคนอาจเป็นพาหะ (mechanical vector) ในการแพร่เชื้อได้

อาการ

โรคนิวคาสเซิลมีระยะฟักตัวนาน 2-15 วัน เฉลี่ย 5-6 วัน สัตว์ปีกบางชนิดอาจนานกว่า 20 วัน อาการในสัตว์ปีกแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น virus strain หรือ pathotype ชนิดและอายุของสัตว์ที่ติดเชื้อ การติดเชื้อร่วม (co-infection) สภาพแวดล้อม สภาพของฝูง สัตว์ปีก เช่น ความเครียด ทางของการติดเชื้อ (route) และปริมาณของเชื้อไวรัส

อาการในไก่

เชื้อ NDV ถูกจัดกลุ่มกว้างๆ เป็น pathotype ตามอาการที่พบในสัตว์ปีก สำหรับ virulent virus มักทำให้เกิดโรคแบบเฉียบพลัน อาจมีอัตราการตายสูงโดยไม่ปรากฏอาการ การเกิดโรคในไก่ที่มีสาเหตุจาก viscerotropic velogenic ND (VVND) pathotype จะมีอาการไม่กระวนกระวาย (listlessness) หายใจถี่ อ่อนเพลีย หมดแรงและตาย อาจมีอาการหัวและตาบวม ถ่ายเหลวสีเขียว กล้ามเนื้อสั่น ขาและปีกเป็นอัมพาตและคอบิดไปด้านหลังของลำตัว อัตราการตายสูงถึง 100% มีรายงานการเกิดโรค ND โดยไวรัสชนิดนี้ในประเทศอังกฤษ เมื่อปี 1970-1973 (Allan et al., 1978) และไอร์แลนด์เหนือ (McFerran and McCracken, 1988) โดยทั่วไปเชื้อ VVND ทำให้เกิดอาการรุนแรง มีอัตราการตายสูงและพบลักษณะเลือดออกที่ทางเดินอาหาร

เชื้อไวรัส neurotropic velogenic ND (NVND) ทำให้เกิดอาการทางระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันในไก่ หลังแสดงอาการ 1-2 วัน จะมีอาการทางระบบประสาท ในไก่ไข่เชื้อไวรัสมีผลทำให้ไข่ลด อัตราการตายสูงถึง 100% มีรายงาน pathotype นี้ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Alexander and Senne, 2008b) มีข้อสังเกตว่า เชื้อ NVND ทำให้เกิดอาการรุนแรง อัตราการตายสูงและไม่ทำให้เกิดเลือดออกที่ทางเดินอาหาร (Ritchie and Carter, 1995)

เชื้อไวรัส mesogenic strain ทำให้เกิดอาการทางระบบทางเดินหายใจ ในไก่ไข่การติดเชื้อมีผลให้ไข่ลดนานหลายสัปดาห์ อัตราการตายต่ำยกเว้นไก่อายุน้อย ไก่ที่ไวต่อการติดเชื้ออาจมีอาการรุนแรงหากมีการติดเชื้ออื่นร่วม (Alexander and Senne, 2008a)

เชื้อไวรัส lentogenic strain อาจไม่ทำให้เกิดอาการในไก่โตเต็มวัย แต่จะมีอาการทางระบบหายใจในไก่อายุน้อยและสำหรับไก่ที่ไวต่อการติดเชื้ออาจตายได้ การติดเชื้อในไก่กระทงอาจมีผลให้น้ำหนักลด (Vegad, 2008)

แม้มีการจัดกลุ่ม NDV ตามกลุ่มอาการของโรคก็ตาม strain ที่ก่อโรครุนแรงในสัตว์ปีกชนิดหนึ่ง อาจทำให้เกิดการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ (subclinical) ในสัตว์ปีกอีกชนิดหนึ่ง (Alexander, 1991) นอกจากนี้ในการเกิดโรคในพื้นที่ สัตว์ปีกอาจแสดงอาการแบบทับซ้อน (overlap) กันระหว่าง pathotype ทำให้ไม่สามารถจำแนกกลุ่มอาการได้อย่างชัดเจน มีรายงานว่า การติดเชื้อ NDV ในสัตว์ปีกที่ทำวัคซีนชนิด virulent strain อาจมีการเพิ่มจำนวนไวรัสในตัวสัตว์ แต่อาการทางคลินิกจะค่อยๆ ลดลงโดยสัมพันธ์กับระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น (Alexander, 1995)

อาการในสัตว์ปีกชนิดอื่น

การติดเชื้อ ND velogenic strain พบได้ในสัตว์ปีกหลายชนิด โดยความรุนแรงจะแตกต่างกันในสัตว์ปีกต่างชนิดกันและพบว่า การติดเชื้อ strain ดังกล่าวในเป็ดมักไม่แสดงอาการ (Alexander, 2009) ไก่วงจะไวต่อการติดเชื้อ NDV เช่นเดียวกับไก่ แต่แสดงอาการรุนแรงน้อยกว่า (Box et al., 1970; Alexander et al., 1999) และแม้จะเป็นที่เข้าใจว่าเป็ดและห่านทนต่อการติดเชื้อ NDV strain ที่ทำให้เกิดอาการรุนแรงในไก่ แต่ยังมีรายงานการเกิดโรครุนแรงในเป็ดที่ติดเชื้อนี้ (Higgins, 1971) รวมทั้ง game bird หลายชนิด (Lancaster, 1966) โดยมีลักษณะของโรคคล้ายคลึงกับที่พบในไก่ (Beer, 1978) สำหรับการติดเชื้อในนก นกพิราบ นกคุ้มและไก่ฟ้ามักแสดงท้องเสียและมีอาการทางระบบประสาท (Wernery and Manvell, 2003) เช่นเดียวกับในนกเหยี่ยว มักแสดงอาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น เบื่ออาหาร อาเจียน ลำไส้ส่วนท้ายเป็นอัมพาต (paralytic ileus) และมีอาการทางประสาท เช่น อ่อนแรง หัวตก กล้ามเนื้อสั่น คอบิด ขาและปีกเป็นอัมพาต (Wernery et al., 1995) สำหรับนกกระจอกเทศ มีรายงานว่า การติดเชื้อ NDV ที่ทำให้เกิดอาการรุนแรงในไก่ไม่ทำให้เกิดโรค (pathogenic disease) ในนกกระจอกเทศ แต่กลุ่มอายุน้อยอาจซึมและแสดงอาการทางประสาท ส่วนตัวโตเต็มวัยจะไม่แสดงอาการ (Alexander, 2000)

โดยเหตุที่ ND พบได้ในสัตว์ปีกหลายชนิดรวมทั้งนกน้ำและนกป่า ในบางครั้งสามารถตรวจพบ virulent NDV จากนกป่าซึ่งอาศัยอยู่บริเวณใกล้เคียงกับสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ จึงเป็นที่มาของข้อสันนิษฐานที่ว่านกป่าอาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในสัตว์ปีก ดังกรณีที่พบการระบาดของ ND ในประเทศในเครือจักรภพอังกฤษ เมื่อปี 1997 โดยสรุปว่านกป่าอพยพ เป็นตัวนำโรค (Alexander et al., 1999) เช่นเดียวกับรายงานการเกิด ND ในนกกาน้ำ (cormorant) ในประเทศแคนาดาเมื่อปี 1990 (Wobeser et al., 1993) และในปี 1992 เกิดโรคอีกครั้งในสัตว์

ชนิดเดียวกันในประเทศแคนาดาและสหรัฐอเมริกา โดยเกิดโรคในไก่วงด้วย (Mixson and Pearson, 1992; Heckert, 1993) อันเป็นเหตุให้เกิดข้อสันนิษฐานว่านกกาน้ำอาจเป็นตัวแพร่เชื้อมายังไก่วง หลังจากนั้นก็เกิดโรคในนกกาน้ำในประเทศแคนาดาอีกครั้งในปี 1995 และสหรัฐอเมริกาในปี 1997 ซึ่งทั้ง 2 ครั้ง สามารถแยกเชื้อ NDV ได้จากนกที่ตาย (Kuiken et al., 1998) อย่างไรก็ตามข้อสันนิษฐานดังกล่าวก็ยังไม่มีการสรุปที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังมีรายงานการแยกเชื้อ NDV จากนกแก้ว นกฟิราบ นกกาน นกฮูกและนกน้ำ ในเวลาเดียวกันโดยให้ความเห็นว่าการดังกล่าวไม่มีบทบาทสำคัญในการแพร่โรค ND (Charlton et al., 2006)

อาการในคน

การติดเชื้อ NDV ในคนทำให้มีไข้และเยื่อตาอักเสบซึ่งสามารถหายได้เอง โดยมีรายงานในผู้ที่ทำงานในฟาร์มสัตว์ปีก (Ritchie and Carter, 1995) แต่ไม่พบรายงานการติดต่อจากคนสู่คน จากการศึกษาของ Pedersen และ คณะ (1990) พบว่าผู้ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสัตว์ปีกมีแอนติบอดีไคเตอร์ต่อ NDV ในระดับที่สูง อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัส Mumps อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับ NDV เป็นผลให้เกิดผลบวกเทียม (false positive) ได้ (Chang, 1981) โดยทั่วไปการติดเชื้อในคนมักเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับเชื้อไวรัสจากสัตว์ปีกที่ติดเชื้อหรือซากสัตว์ปีกที่เป็นโรคนี้อาจได้รับเชื้อโดยบังเอิญขณะทำวัคซีนในไก่

การวินิจฉัยแยกโรค

อาการของโรค ND มีหลายรูปแบบ แบบรุนแรงอาจมีอาการคล้ายกับโรคในสัตว์ปีกอื่นๆ ได้แก่

- Highly pathogenic avian influenza (HPAI)
- โรคอหิวาต์ไก่ (fowl cholera)
- โรคหลอดลมอักเสบ (infectious bronchitis)
- โรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อในไก่ (infectious laryngotracheitis)
- โรคกัมโบโร (infectious bursal disease, Gumboro disease)

ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมป้องกันและกำจัดโรคต่อไป

ตอนที่ 4

การตรวจวินิจฉัยโรคนิวคาสเซิลทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา

โรคนิวคาสเซิล (ND) เป็นโรคที่หลายประเทศทั่วโลกให้ความสำคัญ และมีการเตรียมพร้อมทางห้องปฏิบัติการ ในการตรวจวินิจฉัยโรค และเนื่องจากเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลมีความเสี่ยงสูงในการแพร่กระจายจากห้องปฏิบัติการสู่ภายนอก ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องมีระบบความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพ (biosafety and biosecurity) โดยต้องเป็นห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 3 (biosafety level-3, BSL-3) หรือระดับ 2 (BSL-2) เป็นอย่างน้อย

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย

กรณีสัตว์ปีกมีชีวิตควรเก็บตัวอย่าง tracheal swab, cloacal swab น้ำตา หรือเก็บมูลที่เพิ่งถ่ายใหม่ๆ ซึ่งจะมีเชื้อไวรัสปริมาณสูง โดยเฉพาะช่วงที่เกิดการระบาด (Alexander, 1995; Roy et al., 1995; 2001; OIE, 2009/2010) มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างในการตรวจวินิจฉัย ND โดย Parede and Young (1990) แนะนำให้เก็บตัวอย่าง bursa เพื่อแยกเชื้อไวรัสสำหรับปลูกทำวัคซีน และในช่วงที่เกิดการระบาดควรเก็บตัวอย่าง intestinal content ซึ่งจะพบเชื้อไวรัสได้มาก นอกจากนี้มีรายงานว่าในสัตว์ปีกที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ virulent virus ยังสามารถเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหาร (Alexander, 1988) กรณีสัตว์ตายให้เก็บตัวอย่าง oro- nasal swab ปอด ไต ลำไส้รวมทั้ง content ในลำไส้ ม้าม สมอง ตับและหัวใจจากสัตว์ปีกที่ตาย ตัวอย่างลำไส้ที่มีอุจจาระควรแยกจากตัวอย่างอื่น (OIE, 2009)

ในกรณีจัดส่งตัวอย่างที่สงสัยโรคนิวคาสเซิล (ND) พร้อมกับตัวอย่างที่ส่งตรวจโรคอื่น ควรแยกตัวอย่างโดยใช้ภาชนะ เช่น กระติกน้ำแข็ง แยกออกจากกันถ้าเป็นไปได้ หากใช้กล่องโฟมควรปิดฝากล่องให้แน่นหนาโดยใช้เทป พร้อมเขียนกำกับที่ฝากล่องโดยระบุชนิดของตัวอย่าง พร้อมแนบใบนำส่งซึ่งมีประวัติของสัตว์โดยละเอียดเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค จำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจควรพิจารณาความเหมาะสม กรณีที่มีอุปกรณ์ในฝูงสัตว์ปีกและต้องการตรวจ ND ควรเก็บตัวอย่าง cloacal swab และ oropharyngeal swab อย่างละไม่ต่ำกว่า 20 ตัว หากเป็นไปได้ควรเก็บตัวอย่างจากสัตว์ปีกที่กำลังแสดงอาการของโรค ถ้าเป็นตัวอย่างเลือดควรเจาะเลือดสัตว์ป่วยหรือตัวที่เพิ่งฟื้นจากป่วยเพื่อตรวจหาแอนติบอดีจากตัวอย่างซีรัม การเจาะ

เลือดควรเจาะจาก wing vein โดยใช้เข็มเจาะเลือดขนาดที่เหมาะสมกับสัตว์ปีก เช่น เข็มเบอร์ 23 สำหรับไก่หรือไก่วง เบอร์ 25 สำหรับนก

หลังเจาะเลือดวางหลอดเก็บเลือดในแนวเอียงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากเลือดแข็งตัว และสามารถแยกซีรัมได้แล้ว จึงนำหลอดเลือดห่อด้วยถุงพลาสติกแล้วแช่ในน้ำแข็งในกรณีที่ไม่มี rack หรือแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ในกรณีที่ไม่สามารถส่งตัวอย่างภายใน 24 ชั่วโมง ควรแยกซีรัมใส่หลอดเก็บตัวอย่างหลอดใหม่ และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C หากไม่สามารถนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 2-3 วัน ควรพิจารณาเก็บตัวอย่างซีรัมโดยการแช่แข็ง แต่ต้องแน่ใจว่าซีรัมไม่มีเม็ดเลือดแดงปน มิฉะนั้นการแช่แข็งจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกทำให้ตัวอย่างไม่มีคุณภาพอาจทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อนได้พึงระลึกไว้เสมอว่าประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการเริ่มจากการส่งตัวอย่างที่เหมาะสม และมีคุณภาพ

2. การแยกเชื้อไวรัส

การแยกเชื้อไวรัสสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การแยกเชื้อโดยใช้ไข่ไก่ฟักและใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

2.1 การแยกเชื้อโดยใช้ไข่ไก่ฟัก เป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากเชื้อ NDV เจริญเติบโตได้ดีในตัวอย่างของไข่ไก่ฟัก และเชื้อไวรัสจะเพิ่มขึ้นตามจำนวน passage ที่เพิ่มขึ้น (Roy, 1995) ไข่ไก่ที่ใช้เป็นไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน จากพ่อแม่พันธุ์ SPF ซึ่งได้รับการรับรองว่าปลอดเชื้อชนิดใด จากการตรวจด้วยวิธีใด หรืออาจใช้ไข่ไก่ฟักจากฝูงไก่ที่ปลอดเชื้อและไม่มีแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ NDV และ ไวรัส Influenza A subtype H5, H7 (SAN)

ขั้นตอนการฉีดไข่ใช้วิธีเดียวกับการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดนก หลังจากฉีดไข่ไก่ฟักได้ 4 วัน หรือเร็วกว่านั้นหากตัวอย่างตายจึงดูดน้ำไข่ (allantoic fluid) ตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี HA ในกรณีที่ HA ให้ผลบวกจึงพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยวิธี HI ต่อไป แต่หาก HA ให้ผลลบต้องใช้น้ำไข่ฉีดเข้าไข่ไก่ฟักชุดใหม่ (passage 2) แล้วดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนแรก หากผลการตรวจน้ำไข่จากทั้ง 2 passage ให้ผล HA เป็นลบ จึงตัดสินใจว่าตัวอย่างนั้นไม่พบเชื้อ NDV

2.2 การแยกเชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้โดยทั่วไปคือ primary cell ชนิด chicken embryo fibroblast (CEF) และ chicken embryo kidney (CEK) cell หลังจากใส่ตัวอย่างที่ต้องการหาเชื้อ NDV ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ 4 วัน หรืออาจเร็วกว่านั้นหากเกิดลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (CPE) 70-80% จึงตรวจหาเชื้อ NDV จากน้ำเลี้ยงเซลล์โดยวิธี HA แล้วดำเนินการตามขั้นตอนต่อไป กรณีที่ HA ให้ผลลบ นำน้ำเลี้ยงเซลล์จาก passage แรกลงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเดียวกันชุดใหม่เป็น passage 2 แล้วดำเนินการเช่นเดียวกับใน passage แรก หากผลการตรวจน้ำเลี้ยงเซลล์จาก 2 passage ให้ผลการทดสอบโดยวิธี HA เป็นลบ จึงตัดสินใจว่าตัวอย่างนั้นไม่พบเชื้อ NDV นอกจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด CEF และ CEK cell แล้ว

มีรายงานว่าสามารถใช้ MDBK cell line ในการเลือก (select) pathogenic isolate และกำจัด lentogenic isolate ได้ภายใน 2-3 passage (King, 1993; Roy et al., 1997)

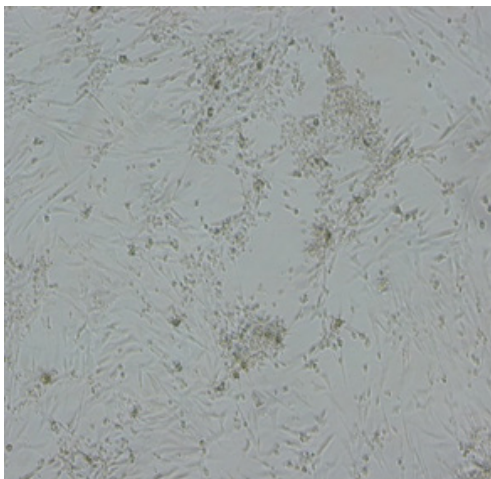


Fig. 9 Cytopathic effect (50%) observed after CEF inoculation of NDV for 48 hrs. (40x) NDV is the seed virus for vaccine production. (NIAH)

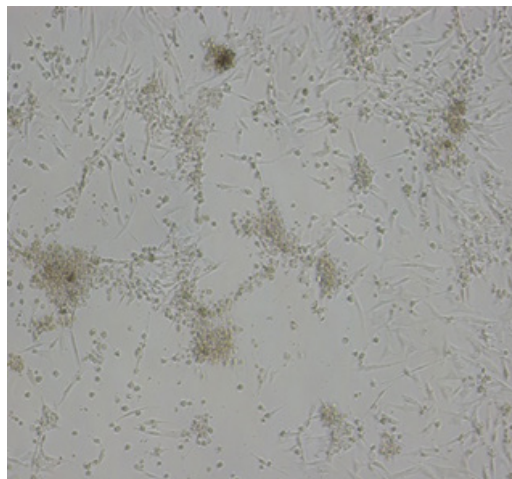


Fig. 10 Cytopathic effect (80%) observed after CEF inoculation of NDV for 72 hrs. (40x) (NIAH)

3. การทดสอบทางซีรัมวิทยา

โดยเหตุที่เชื้อ NDV มีคุณสมบัติจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงไก่ และคุณสมบัติดังกล่าวสามารถถูกยับยั้ง ด้วยซีรัมจำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดเดียวกัน เช่นเดียวกับไวรัส Influenza A จึงอาศัยหลักการดังกล่าวในการตรวจหาและพิสูจน์เชื้อ NDV โดยวิธี HA-HI

หลังจากฉีดตัวอย่างที่มีเชื้อ NDV เข้าในไข่ไก่ฟัก หรือเซลล์เพาะเลี้ยงบางชนิด เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนมากขึ้น เป็นผลให้ตัวอ่อนในไข่ไก่ฟักตาย กรณีฉีดเข้าในไข่ไก่ฟัก หรือเกิด CPE กรณีใช้เซลล์เพาะเลี้ยง จากนั้นจึงตรวจหาเชื้อโดยวิธี HA หาก HA ให้ผลบวกจึงพิสูจน์เชื้อไวรัสด้วยวิธี HI โดยใช้ซีรัมจำเพาะต่อ NDV และเนื่องจากเชื้อไวรัส Influenza A ก็มีคุณสมบัติจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงไก่เช่นเดียวกัน ดังนั้นในขั้นตอน HI จึงต้องทดสอบกับซีรัมจำเพาะของไวรัส Influenza A ด้วยพร้อมกัน ในกรณีตัวอย่างมีเชื้อ NDV ก็จะทำให้ผลการทดสอบโดยวิธี HI ต่อซีรัมจำเพาะของ NDV เป็นบวก (positive) และให้ผลลบ (negative) ต่อซีรัมจำเพาะต่อไวรัส Influenza A จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างมีเชื้อไวรัส NDV และต้องตรวจหาความรุนแรงของเชื้อไวรัสที่แยกได้โดยการวิเคราะห์การเรียงลำดับ nucleotide (nucleotide sequencing analysis) หรือหาค่า ICPI โดยการฉีดเชื้อเข้าสู่ลูกไก่

เทคนิค HA-HI นอกจากใช้ตรวจหาและพิสูจน์เชื้อ NDV แล้วยังใช้เป็นวิธีตรวจหาแอนติบอดีไต่อะตอร์ของเชื้อ NDV ทั้งจากการติดเชื้อโดยธรรมชาติ หรือจากการทำวัคซีน กรณีของวัคซีนสามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัม และ local secretion ประมาณ 6-10 วันหลังฉีดวัคซีนเชื้อเป็น และจะคงอยู่ช่วงเวลาหนึ่ง (Gough and Alexander, 1973; Allan and Gough, 1976) ซึ่งแอนติบอดีที่เกิดขึ้นวัดได้จากการตรวจหา HI titer (Edison and Kleven, 1980) โดย OIE (2008) ยอมรับให้ใช้ HI test ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ NDV และมีการศึกษาพบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่าง HI test กับการฉีดเชื้อพิษทัต (Allan et al., 1978) มีกรณีน้อยมากที่จะเกิดภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัสโดยไม่ปรากฏ HI antibody หรือพบในระดับต่ำ กรณีดังกล่าวสัตว์จะสร้าง cell-mediated immunity (CMI) ซึ่งสามารถตรวจได้เพียง 2 วัน หลังวัคซีน (Ghumman and Bankowski, 1976)

4. การตรวจหาความสามารถในการทำให้เกิดโรค

4.1 Intracerebral pathogenicity test (ICPI)

วิธีทดสอบ

- นำน้ำไขติดยัดเชื้อที่สดและปลอดเชื้อแบคทีเรีย มี HA titer มากกว่า 1:16 เจือจางเป็น 1/10 ด้วย sterile isotonic saline

- ฉีดเชื้อเข้าลูกไก่อายุเกิน 24 ชั่วโมง และไม่เกิน 40 ชั่วโมงซึ่งฟักจากไข่ SPF โดยฉีดเข้าสมอง (intracerebral) ในขนาด 0.05 mL/ตัว จำนวน 10 ตัว/ตัวอย่าง

- ตรวจลูกไก่ทุกวันเป็นเวลา 8 วัน

- ในการตรวจดูอาการลูกไก่แต่ละวัน ให้คะแนนลูกไก่แต่ละตัวดังนี้

0 = ปกติ

1 = แสดงอาการป่วย

2 = ตาย

กรณีที่ลูกไก่ไม่กินอาหารและน้ำควรทำเมตตาฆาต และให้คะแนน = ตายในวันถัดไป

- ค่า ICPI เป็นค่าเฉลี่ยของคะแนนลูกไก่แต่ละตัวต่อการสังเกตอาการแต่ละครั้ง ตลอดระยะเวลา 8 วัน

การตัดสินผล

virulent strain จะมีค่าใกล้เคียงกับ maximum score คือ 2.0

lentogenic strain จะมีค่าใกล้เคียงกับ 0

เชื้อไวรัสที่มีค่า ICPI มากกว่าหรือเท่ากับ 0.7 จัดเป็น virulent strain (OIE, 2008; 2015)

4.2 การตรวจหาความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยวิธีการทางชีวโมเลกุล

นอกจากการหาค่า ICPI แล้ว การวิเคราะห์การเรียงลำดับ nucleotide เป็นอีกวิธีหนึ่งในการตรวจหา pathogenicity ของ NDV โดย velogenic และ mesogenic strain ของ NDV จะมี basic amino acid อย่างน้อย 3 ตัว คือ arginine (R) หรือ lysine (K) ที่ตำแหน่ง 113-116 และ phenylalanine (F) ที่ตำแหน่ง 117 ส่วน lentogenic strain จะมี basic amino acid ต่ำกว่า 3 ตัวที่ตำแหน่ง 113-116 และ leucine (L) ที่ตำแหน่ง 117 ของ N-terminus ของ F1 protein (Collins and Bashiruddin, 1993) ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ amino acid ไม่พบลักษณะที่กล่าวมา ควรหาค่า ICPI เพราะเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถยืนยันว่าพบ virulent virus หรือไม่ เนื่องจากอาจเกิดการผิดพลาดทางเทคนิคได้ เช่น การจับของ primer ผิดตำแหน่ง (primer mismatch) หรืออาจมีการติดเชื่อมร่วมกันทั้ง virulent และ avirulent virus ดังนั้นการวินิจฉัยโรคควรให้ความสำคัญกับวิธีการแยกเชื้อไวรัสและตรวจหาความรุนแรงของเชื้อ (OIE, 2008)

5. เทคนิคทางชีวโมเลกุล

ชนิดของตัวอย่างเป็นปัจจัยสำคัญในการตรวจหาเชื้อ NDV โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ให้ได้ผล ในกรณีต้องการตรวจจากตัวอย่างโดยตรงควรใช้ตัวอย่าง oropharyngeal swab หรือ tracheal swab การตรวจจากตัวอย่างที่มีอุจจาระเจือปนอาจทำให้เกิดผลลบเทียม (false negative) อันเป็นผลจาก PCR inhibiting substance (Wilde et al., 1990)

5.1 เทคนิค RT-PCR

เทคนิคดังกล่าวมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง เพื่อให้มีความไวและจำเพาะสูงขึ้น อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่าเทคนิค RT-PCR มีความไวในการตรวจหา RNA ของเชื้อ NDV จากน้ำไขติดย่น้อยกว่าวิธีการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้ไข่ไก่ฟัก จากการทดลองนำน้ำไขมาเจือจางเป็นระดับต่างๆ แล้วนำมาทดสอบเปรียบเทียบกัน (Gohm et al., 2010) นอกจากการตรวจหา RNA จากตัวอย่างอวัยวะบดน้ำไขและน้ำจากเซลล์เพาะเลี้ยงแล้วยังสามารถตรวจจากตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยตรง (Kant et al., 1997) ในกรณีที่ตรวจจากเนื้อเยื่อโดยตรงควรตรวจตัวอย่างจากอวัยวะหลายชนิด เนื่องจากเชื้อ NDV ต่าง strain มี organ tropism ต่างกัน การตรวจจากหลายอวัยวะจึงมีโอกาสตรวจพบได้มากกว่า นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคนี้ตรวจหา vaccine virus จากเนื้อเยื่อทางเดินหายใจจากการทดลองฉีดวัคซีนซินสเตรน Lasota และ Hitchner B1

ในบางกรณีเทคนิค RT-PCR อาจมีความไวมากกว่าการแยกเชื้อไวรัส เช่นกรณีสัตว์ปีกสร้างแอนติบอดีหลังติดเชื้อ เชื้อไวรัสจะถูก neutralized โดยแอนติบอดี ดังนั้นกรณีดังกล่าว

RT-PCR น่าจะสามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้ในระยะเวลาสั้นกว่าเมื่อเทียบกับการแยกเชื้อไวรัส อาจกล่าวได้ว่าขณะที่แอนติบอดีไคเตอร์ต่อเชื้อ NDV เพิ่มขึ้น โอกาสแยกเชื้อไวรัสจะน้อยลง (Westbury et al., 1984)

ปัจจุบันสามารถใช้เทคนิค RT-PCR ตรวจหา RNA ของเชื้อ NDV ทั้งจากตัวอย่างโดยตรง น้ำไขและน้ำจากเซลล์เพาะเลี้ยง และเพื่อให้การตรวจหาความรุนแรงของเชื้อทำได้รวดเร็วขึ้น จึงมีการออกแบบ primer ให้ครอบคลุม F gene cleavage site ซึ่งใช้เป็นตัวตัดสิน pathotype ของเชื้อ NDV (Fuller et al., 2009) ดังนั้นหลังจากเพิ่มปริมาณ cDNA ในขั้นตอน PCR แล้วจึงสามารถวิเคราะห์การเรียงลำดับ amino acid จาก PCR product

การพัฒนาเทคนิค RT-PCR เป็นไปอย่างต่อเนื่องเพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะของการทดสอบ Nested PCR เป็นผลจากการพัฒนาที่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็น 2 ขั้นตอน โดยมี primer 2 คู่ คือ external primer และ internal primer จาก external primer ทำให้ได้ปริมาณสารพันธุกรรมจำนวนหนึ่ง จากนั้นมีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมต่อเนื่องจาก internal primer โดยทั่วไป PCR product ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 จะมี nucleotide fragment สั้นกว่า PCR product จากขั้นตอนแรก

วิธีการตรวจหา genome ของ NDV โดยวิธี Nested PCR

1. ขั้นตอนการสกัด RNA

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและขั้นตอนการสกัดเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในโรคไข้หวัดนก

ขั้นตอน Nested PCR

ใช้ชุด Kit Invitrogen® superscription III One-step RT-PCR with Platinum Taq

ลำดับ	Master Mix	ปริมาณ (μL)
1	Distilled water DNase, RNase free	3.5 μL
2	2x reaction mix	6.5 μL
3	MgSO ₄ (5mM)	0.25 μL
4	Primer 1 (20 pmol)	0.25 μL
5	Primer 2 (20 pmol)	0.25 μL
6	superscript	0.25 μL
	Master mix total volume	11 μL
7	RNA ตัวอย่าง	1.5 μL
	Total reaction volume	12.5 μL

ขั้นตอน	stage	No. of cycle	Temp. (°C)	Time
cDNA synthesis	1	1	50	30 min
Denaturation	2	1	94	2 min
PCR amplification	3	40	94	30 sec
			50	30 sec
			72	1.5 min
Final extension	4	1	72	10 min
			4	α

Primer ที่ใช้

Name	Sequence(5->3)	Target gene	Position	Expected size (bp)	Remark
NDV_M1	TTC TCT AGC AGT GGG ACA GC	M protein	914-933	921	external primer
NDV_F1	CAT CTT CCC AAC TGC CAC TG	F protein	592-573		external primer
NDV_M2	TGG AGC CAA ACC CGC ACC TGC GG	M protein	980-1003	766	internal primer
NDV_F2	GGA GGA TGT TGG CAG CAT T	F protein	503-485		internal primer

ที่มาของข้อมูล : Mase et al. (2002); Nuansrichay and Chaishing (2008)

*การทดสอบต้องมี positive และ negative control ทุกครั้ง

3. ขั้นตอนการตรวจหา Amplified product ของ NDV โดยวิธี Agarose gel electrophoresis ดังได้กล่าวไว้ในโรคไข้หวัดนก

4. การแปลผล

หากพบแถบ DNA ที่ตำแหน่ง 766 bp ให้อ่านผลเป็นบวก เมื่อเทียบกับ positive control หากไม่พบแถบ DNA ที่ตำแหน่ง 766 bp ให้อ่านผลเป็นลบ

ทั้งนี้การสรุปผลการตรวจวินิจฉัยต้องดูผลแยกเชื้อโดยการฉีดไข่ไก่ฟักด้วย ในกรณีที่ผลการทดสอบโดยวิธี RT-PCR ให้ผลบวกสอดคล้องกับผลการแยกเชื้อและตรวจหาและพิสูจน์เชื้อ NDV โดยวิธี HA-HI ให้ผลบวก ต้องหาความรุนแรงของเชื้อ โดยหาค่า Intracerebral pathogenicity index (ICPI) หรือวิเคราะห์การเรียงลำดับ nucleotide ต่อไป

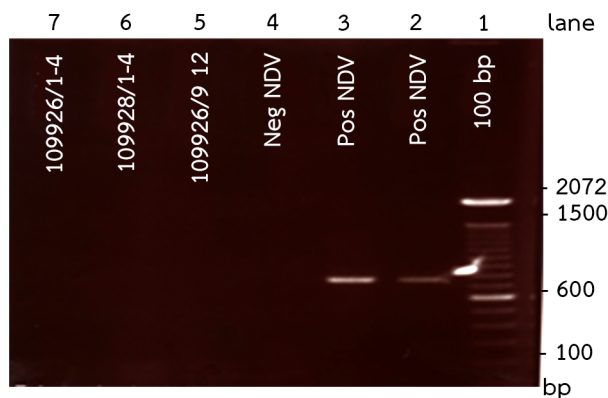


Fig. 11 Amplified NDV gene fragment was shown after running of Nested PCR .
Lane 1 is 100 bp marker, lane 2-3 are NDV (766 bp),
lane 4 is negative control.
lane 5-7 are allantoic fluid samples from 3 cases,
all samples give negative results.
NDV is the seed virus for vaccine production.
(NIAH)

5.2 เทคนิค Real-time RT-PCR (rRT-PCR)

rRT-PCR ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้การตรวจวินิจฉัยโรค มีความไวความจำเพาะ ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว (Higushi et al., 1992) และใช้จำแนก pathotype ของ NDV ได้ (Steyer et al., 2010) เทคนิคดังกล่าว target ที่ conserved region ของ matrix gene และให้ผลสอดคล้องกับวิธีการแยกเชื้อไวรัส (Wise et al., 2004) อีกทั้งมีเทคนิค ที่ target ที่ fusion gene (Pham et al., 2005) หรือ matrix และ fusion gene (Steyer et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้ rRT-PCR ในการจำแนกระหว่าง avirulent และ virulent strain ของเชื้อ NDV (Nidzworki et al., 2011) ปัจจุบันมีการใช้ เทคนิค นี้อย่างแพร่หลายในอเมริกาเหนือ และยุโรปโดยใช้ตรวจหา และจำแนก pathotype ของเชื้อไวรัสที่แยกได้ (Farcas et al., 2009)

ปัจจุบันเทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลาย รวมทั้ง USDA-validated rRT-PCR ซึ่งใช้ในอเมริกาเหนือและยุโรป โดยเทคนิคดังกล่าว target ที่ conserved region ของ matrix gene อย่างไรก็ตามในปี 2009 มีรายงานการทดสอบตัวอย่างจำนวน 34 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บจากนกเลี้ยง นกเขา และนกพิราบ ผลการทดสอบโดย validated rRT-PCR ให้ผลลบเทียม (false negative) ในขณะที่ผลการแยกเชื้อไวรัสพบเชื้อ NDV จากทุกตัวอย่าง และจากการวิเคราะห์การเรียงลำดับ nucleotide จากหลายส่วนของ fusion gene (Aldous et al., 2003) พบว่าทุก isolate เป็น virulent virus จากการศึกษาลึกลับสาเหตุของการเกิดผลลบเทียม

พบว่าเป็นผลจาก nucleotide ใน primer และ probe จับตัวกันเอง (Cattoli et al., 2009) จากกรณีดังกล่าวคณะผู้รายงานจึงมีข้อเสนอแนะให้ใช้การแยกเชื้อไวรัสเป็นวิธีวินิจฉัยโรคที่สำคัญ และสนับสนุนการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจน (antigenic variation) และความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic variation) ของเชื้อไวรัส

นอกจากกรณีดังกล่าวแล้วยังมีรายงานการวิเคราะห์การเรียงลำดับ nucleotide ของ Fo cleavage site ซึ่ง OIE (2009/2010) ยอมรับให้เป็นวิธีพิสูจน์ virulent NDV แต่มีรายงานที่พบว่า NDV จาก 3 case ที่พบในประเทศจีนมีผลการวิเคราะห์โดยวิธีดังกล่าวบ่งชี้ว่าเป็น lentogenic strain ในขณะที่เชื้อไวรัสดังกล่าวมีค่า intracerebral pathogenicity index (ICPI) และ intravenous pathogenicity index (IVPI) บ่งชี้ว่าเป็น virulent strain (ICPI มากกว่า 1.75, IVPI มากกว่า 2.25) (Tan et al., 2008) กล่าวคือผลการวิเคราะห์การเรียงลำดับ nucleotide ไม่สอดคล้องกับค่า ICPI และ IVPI จากกรณีดังกล่าว OIE จึงไม่แนะนำให้ตัดสินใจการเป็น lentogenic virus จากการวิเคราะห์การเรียงลำดับ nucleotide เพียงอย่างเดียว

รายงานดังกล่าวย้ำถึงความจำเป็นในการใช้การแยกเชื้อไวรัสเป็นวิธีหลักในการวินิจฉัยโรคนิวคาสเซิล ส่วนเทคนิคทางชีวโมเลกุลอาจใช้เป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้นในกรณีที่ต้องการผลการทดสอบอย่างรวดเร็ว รวมทั้งใช้วิเคราะห์การเรียงลำดับ nucleotide ศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจน และความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่ขณะเดียวกันควรดำเนินการแยกเชื้อไวรัสด้วยประการสำคัญการแยกเชื้อไวรัสถือเป็น gold standard ที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล ทำให้ระบบการวินิจฉัย และเฝ้าระวังโรคทางห้องปฏิบัติการของประเทศได้รับความเชื่อถือ สร้างความเชื่อมั่นแก่ประเทศคู่ค้าอันเป็นผลดีต่อภาคการผลิตและการส่งออกของประเทศ

เทคนิคทางชีวโมเลกุลนอกจากใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแล้ว การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) จากส่วนของ fusion (F) gene ก็มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในการตรวจติดตามทางระบาดวิทยา (epidemiological assessment) เพื่อวิเคราะห์ถึงต้นกำเนิดและการแพร่ของเชื้อไวรัสเมื่อเกิดอุบัติการณ์ของโรค (Kim, 2007) จาก phylogenetic analysis ของลำดับ nucleotide ของ F gene ร่วมกับ genome length สามารถแบ่ง NDV เป็น 2 class คือ class I และ class II โดย class I ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่แยกได้จากนกป่า นกน้ำ และนกทะเล (Czeplédi, 2006; Kim et al., 2007; Miller et al., 2010) และมักเป็น avirulent ในไก่ ส่วน class II รวมถึง lentogenic, mesogenic และ velogenic strain หากจำแนกตามความสามารถในการก่อโรคในไก่ (Dortmans et al., 2011; Kim et al., 2012a;b) แต่ละ class ยังแบ่งเป็น genotype หรือ lineage ต่างๆ (Diel et al., 2012; Snoeck et al., 2013) ซึ่งมีรายงานการพบเชื้อ NDV ต่าง genotype ในแต่ละภูมิภาค เช่น เชื้อ NDV ที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกาเป็น genotype V (Pedersen et al., 2004) ส่วนเชื้อไวรัสที่พบในแอฟริกา เอเชีย และยุโรป

ส่วนใหญ่เป็น genotype VI (pigeon paramyxovirus type 1) และ VII (Yu et al., 2001; Lien et al., 2007; Liu et al., 2007; Abolnik et al., 2008; Irvine et al. 2009)

การตรวจหาสารพันธุกรรมของ NDV

1. ขั้นตอนการสกัด RNA เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในโรคไข้หวัดนก
2. ขั้นตอนการเตรียม Master mix

ลำดับ	Master mix	ปริมาณ (μL)
1	distilled water DNase, RNase free	2.75 μL
2	2x RT-PCR buffer	12.5 μL
3	25X RT-PCR Enzyme mix	1 μL
4	Forward primer (18 μM)	1.25 μL
5	Reward primer (18 μM)	1.25 μL
6	Probe	1.25 μL
7	RNA ตัวอย่าง	5 μL
Total volume		25 μL

Primer probe

Name	Sequence(5'-3')	Type H7
NDV-OzF-D043	5' gTC AAT CAT AAT CAA gTT ACT CCC AAA T 3'	Forward primer
NDV-OzR-D044	5' gTA gTC AAT gTC CTg TTg TAT gCC TC 3'	Reward primer
NDV-F-All AUS	5' (FAM) TTT TGC ACA CGC CT (MGBNFQ)1 3'	Probe

Real-time PCR condition

ขั้นตอน	stage	No. of cycle	Temp. (°C)	Time
Reverse transcription	1	1	48	30 min
Hot start	2	1	95	10 min
Amplification	3	40	95	15 min
			60	1 min

Threshold : 0.05

เอกสารอ้างอิง

- Abolnik C., Gerdes G.H. Kitching, J., Swanepoel S., Romito, M. and Bisschop S.P. 2008. Characterization of pigeon paramyxoviruses 1 (Newcastle disease virus) isolated in South Africa from 2001 to 2006. Onderstepoort J. Vet. 75: 147–152.
- Aldous E.W., Mynn J.K., Banks J. and Alexander D.J. 2003. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. Avian Pathol. 32: 239-256.
- Alexander D.J. 1988. Newcastle disease: Method of spread. In: Newcastle disease. Alexander D.J. (ed.). Kluwer Academic, Boston, MA. pp. 256-272.
- Alexander D.J. 1991. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: Disease of Poultry. 9th ed. Calnex B.W. Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M and Yoder Jr. H.W. (eds.). Iowa State University Press, Ames. pp. 496-519.
- Alexander D.J. 1995. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. J. Comp. Pathol. 112: 105-126.
- Alexander D.J. 1997. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: Diseases of Poultry. 10th ed. Calnex B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. and Saif Y.M. (eds.). Iowa State University Press, Ames. pp. 496-519.
- Alexander D.J. 2000. Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*) – A review. Avian Pathol. 29: 95-100.
- Alexander D.J. 2009. Ecology and epidemiology of Newcastle disease. In: Avian Influenza and Newcastle Disease, a Field and Laboratory Manual. Capua I. and Alexander D.J. (eds.). Springer-Verlag, Milan. pp. 19-26.
- Alexander D.J., Wilson G.W.C., Russel P.H., Lister S.A. and Parsons G. 1985. Newcastle disease outbreaks in fowl in Great Britain during 1984. Vet. Rec. 117: 429-434.
- Alexander D.J., Manvell R.J., Banks R.J., Collins M.S., Parsons G., Cox B., Forst K.M., Special E.C., Ashman S. and Aldous E.W. 1999. Experimental assessment of the pathogenicity of the Newcastle disease from outbreaks in Great Britain in 1997, for chickens and turkeys and the protection afforded by vaccination. Avian Pathol. 28: 501-512.
- Alexander D.J. and Senne D.A. 2008a. Newcastle disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. In: Disease of Poultry. 12th ed. Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Noland L.K. and Swayne D.E. (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 75-116.
- Alexander D.J. and Senne D.A. 2008b. Newcastle disease and Other Avian Paramyxoviruses. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens. 4th ed. Dufour-Zavala L. (Editor in Chief), Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M. and Woolcock P.R. American Association of Avian Pathologists, Athens, GA. pp. 135-141.

- Allan W.H. and Gough R.E. 1976. A comparison between the hemagglutination inhibition and complement fixation tests for Newcastle disease. *Research in Veterinary Science*. 20: 101-103.
- Allan W.H., Lancaster J.E. and Toth B. 1978. Newcastle disease vaccines – Their production and use. *FAO Animal production and Health Series No. 10*. FAO, Rome, Italy.
- Bang F.B. and Libert R. 1952. The effect of Newcastle disease virus on chicken red blood cells: II. A study of the adsorption, sensitization, and elution process. *Am. J. Epidemiol.* 55: 373-385.
- Beard C.W. and Hanson R.P. 1984. Newcastle disease. In: *Diseases of Poultry*. 8th ed. Hofstad M.S., Barwes H.J., Calnek B.W., Reid W.M. and Yoder H.W. (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 452-470.
- Beer J.V. 1978. Newcastle disease in the pheasant, *Phasianus colchicus*, in Britain. In: *Wildlife Diseases*. Page L.A. (ed.). Plenum Press, NY. pp. 423-430.
- Box P.G., Helliwell B.I. and Halliwell P.H. 1970. Newcastle disease in turkeys. *Vet. Rec.* 86: 524-527.
- Burnet F.M. 1943. Human infection with the virus of Newcastle disease of fowls. *Med. J. Australia*. 2: 313-314.
- Buxton A. and Fraser G. 1977. Rickettsias and Viruses. In: *Animal Microbiology*. Vol. 2. Blackwell Scientific Publications, Melbourne. pp. 517-527.
- Capua I., Scacchia M.T. and Caporale V. 1993. Unexpected isolation of virulent Newcastle disease virus from commercial embryonated fowls' eggs. *Zentralbl Veterinarmed B.* 40(9-10): 609-612.
- Cattoli G., De Battisti C., Marciano S., Ormetti S., Monne I., Terregio C. and Capua I. 2009. False-negative results of a validated real-time PCR protocol for diagnosis of Newcastle disease due to genetically variability of matrix gene. *J. Clin. Microbiol.* 47(11): 3791-3792.
- Chang P.N. 1981. Viral zoonoses. In: *Series in Zoonoses*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 261-274.
- Charlton B.R., Bermudez A.J., Buulianne M., Halvorson D.A., Schrader J.S., Sander J.E. and Wakenell P.S. 2006. *Avian Disease Manual*. 6th ed. American Association of Avian Pathologists, Jacksonville. pp. 55-59.
- Chen J.P. and Wang C.H. 2002. Clinical epidemiological and experimental evidence for the transmission of Newcastle disease virus through eggs. *Avian Dis.* 46: 461-465.
- Cobb S.P. 2011. The spread of pathogens through trade in poultry meat: Overview and recent developments. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 30: 149-164.
- Collins M.S. and Bashiruddin J.B. 1993. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch. Virol.* 128: 363-370.

- Czeplédi A., Ujvári D., Sumogyi E., Wehmann E., Werner O. and Lomniczi B. 2006. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res.* 120 (1-2): 36-48.
- Diel D.G., da Silva L.H., Liu H., Wang Z., Miller P.J. and Afonso C.L. 2012. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect. Genet. Evol.* 12: 1770-1779.
- Dortmans J.C., Koch G., Rottier P.J. and Peeters B.P. 2011. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet. Res.* 42: 122.
- Doyle T.M. 1927. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *J. Comp. Pathol. Therapeut.* 40: 144-169.
- Edison C.S. and Kleven S.H. 1980. Vaccination of chickens with a clone-selected Lasota strain of Newcastle disease virus. *Poult. Sci.* 59: 976-984.
- Farkas T., Szakely E., Beluk S. and Kiss I. 2009. Real-time PCR-based pathotyping of Newcastle disease virus by use TagMan minor groove binder probes. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2114-2123.
- Fenner F., Bachmann P.A., Gibbs E.P.J. Murphy F.A., Studdert N.J. and White D.o. 1987. *Vet. Virol.* Academic Press, New York. pp. 493-496.
- Fuller C.M., Collins M.S. and Alexander D.J. 2009. Development of a real-time reverse-transcription PCR for the detection and simultaneous pathotyping of Newcastle disease virus isolates using a novel probe. *Arch. Virol.* 154(6): 929-937.
- Ghumman J.S. and Bankowski R.A. 1976. In vitro DNA synthesis in lymphocytes from turkeys vaccinated with Lasota, TC, and inactivated Newcastle disease vaccines. *Avian Dis.* 20: 18-31.
- Gohm D.S., Thur B. and Hofmann M.A. 2010. Detection of Newcastle disease virus in organs and feces of experimentally infected chicken using RT-PCR. *Avian Pathol.* 29: 143-152.
- Gough R.E. and Alexander D.J. 1973. The speed of resistance to challenge induced in chickens vaccinated by different routes with B1 strain of live NDV. *Vet. Rec.* 92: 563-564.
- Hanson R.P. 1980. Newcastle disease. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens. Hitchner S.B., Domermuth C.H., Purchase H.G. and Williams J.E. (eds.). American Association Avian Pathologists, College Station, TX. pp. 63-66.
- Hanson R.P. and Brandly C.A. 1955. Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. *Science.* 122: 156-157.
- Heckert R.A. 1993. Newcastle disease in cormorants. *Can. Vet. J.* 34: 184.
- Higgins D.A. 1971. Nine disease outbreaks associated with myxoviruses among ducks in Hong Kong. *Trop. Animal Health Prod.* 3: 232-240.
- Higushi R., Dollinger G., Walsh P.S. and Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequence. *Nat. Biotechnol.* 10: 413-417.

- Irvine R.M., Aldous E.W., Manvell R.J., Cox W.J., Ceeraz V., Fuller C.M., Wood A.M., Milne J.C., Wilson M., Hepple R.G., Hurst A., Sharpe C.E., Alexander D.J. and Brown I.H., 2009. Outbreak of Newcastle disease due to pigeon paramyxovirus type 1 in grey partridges (*Perdix perdix*) in Scotland in October 2006. *Vet. Rec.* 165: 531–535.
- Ito T., Kawaoka Y., Kameda C., Yasuda J., Kida H. and Otsuki K. 1999. Differences in receptor specificity between Newcastle disease viruses originating from chickens and waterfowl. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 951-953.
- Kant A., Koch G., Van Roozooelaar D.J., Balk F. and Ter Huurne A. 1997. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 26: 837-49.
- Kassaify Z.G., El Hakim R.G., Rayya E.G., Shaib H.A. and Barbour E.K. 2007. Preliminary study on the efficacy and safety of eight individual and blended disinfectants against poultry and dairy indicator organisms. *Veter. Ital.* 43: 821-830.
- Kim L.M., King D.J., Suarez D.L., Wong C.W. and Afonso C.L. 2007. Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1310-1314.
- Kim B.Y., Lee D.H., Kim M.S., Jang J.H., Lee Y.N., Park J.K., Yuk S.S., Lee J.B., Park S.Y., Choi I.S. and Song C.S. 2012a. Exchange of Newcastle disease viruses in Korea: the relatedness of isolates between wild birds, live bird markets, poultry farms and neighboring countries. *Infect. Genet. Evol.* 12: 478–482.
- Kim S.H., Nayak S., Paldurai A., Nayak B., Samuel A., Aplogan G.L., Awoume K.A., Webby R.J., Ducatez M.F., Collins P.L. and Samal S.K. 2012b. Complete genome sequence of a novel Newcastle disease virus strain isolated from a chicken in West Africa. *J. Virol.* 86: 11394–11395.
- King D.J. 1993. Newcastle disease virus passage in MDBK cells as an aid in detection of a virulent subpopulation. *Avian Dis.* 37: 961-969.
- Kraneveld F.C. 1926. A poultry disease in the Dutch East Indies. *Nederlands-Indische Bladen voor Diergeneeskunde.* 38: 448-450.
- Kuiken T., Heckert R.A., Riva J., Leighton F.A. and Wobeser G. 1998. Excretion of Pathogenic Newcastle disease virus by double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) in absence of mortality or clinical signs of disease. *Avian Pathol.* 27: 541-546.
- Lamb R.A., Collins P.L., Kolakofsky D., Melero J.A., Nagai Y., Oldstone M.B.A., Pringle C.R. and Rima B.K. 2005. Family paramyxoviridae. In: *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. and Ball L.A. (eds.). Elsevier Academic Press, San Diego. pp. 655-668.

- Lamb R. and Parks G.D. 2007. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology. Vol. 1. Fields B., Knipe D.M. and Howley P.M. (eds.). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp. 1449-1496.
- Lancaster J.E. 1966. Newcastle disease: a review 1926-1964. Monograph No.3 Canadian Department of Agriculture, Ottawa.
- Lancaster J.E. and Alexander D.J. 1975. Newcastle disease virus and spread, a review of some of the literature. Monograph No. 11. Canadian Department of Agriculture, Ottawa.
- Li X., Chai T., Wang Z., Song C., Cao H., Liu J., Zhang X., Wang W., Yao M. and Miao Z. 2009. Occurrence and transmission of Newcastle disease. Vet. Microbiol. 136: 226-232.
- Lien Y.Y., Lee L.W., Su H.Y., Tsai H.J., Tsai M.C., Hsieh C.Y. and Tsai S.S. 2007. Phylogenetic characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan during 2003-2006. Vet. Microb. 123: 194-202.
- Liu H., Wang Z., Wu Y., Zheng D., Sun C., Bi D., Zuo Y. and Xu T. 2007. Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005. J. Virol. Methods. 140: 206-211.
- Mase M., Imai K., Sanada Y., Sanada N., Yuasa N., Imada T., Tsukamoto K. and Yamaguchi S. 2002. Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan. J. Clin. Microbiol. 40: 3826-3830.
- McFerran J.B. and McCracken R.M. 1988. Newcastle disease. In: Newcastle disease. Alexander D.J. (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Boston, MA. 161-183.
- Meulemans G. 1988. Control by vaccination. In: Newcastle Disease. Alexander D.J. (Ed.). Kluwer Academic Publisher, Boston, MA. 318-332.
- Miller P.J., Decanini E.L. and Afonso C.L. 2010. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. Infect. Genet. Evol. 10: 26-35.
- Mixson M.A. and Pearson J.E. 1992. Newcastle disease. Report of the Committee on Transmissible Disease of Poultry and other Avian Species. Proc. 96th Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc. pp. 357-360.
- Nidzworcki D., Rabalski L. and Gromadzka B. 2011. Detection and differentiation of virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus by real-time PCR. Short communication. J. of Virological Method. 173: 144-149.
- Parede L. and Young P.L. 1990. The pathogenesis of velogenic Newcastle disease virus infection of chickens of different ages and different level of immunity. Avian Diseases. 34: 803-808.
- Pedersen K.A., Sadasiv E.C., Chang P.W. and Yates V.J. 1990. Detection of antibody to avian viruses in human populations. Epidemiol. Infect. 104:519-525.

- Pedersen J.C., Senne D.A., Woolcock P.R., Kinde H., King D.J., Wise M.G., Panigrahy B. and Seal B.S. 2004. Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002–2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2329–2334.
- Pham H.M., Konnai S., Usui T., Chang K.S., Murata S., Mase M., Ohashi K. and Onuma M. 2005. Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus by real-time PCR with melting-curve analysis. *Arch. Virol.* 150: 2429-2438.
- Pospisil Z.D., Zendulkova D. and Smid B. 1991. Unexpected emergence of Newcastle disease virus in very young chicks. *Acta. Vet. Brno.* 60: 263-270.
- Ritchie B.W. and Carter K. 1995. *Avian Viruses: Function and Control*. Wingers Publishing Inc., Lake Worth, Florida. pp. 253-283.
- Roy P. 1995. Studies on Newcastle disease virus variation in the field. Ph.D. thesis submitted to the TamilNadu Veterinary and Animal University, Chennai, India.
- Roy P., Dhinakar Raj G., Koteeswaran A., Nochimuthu K. and Venugopalan A.T. 1995. Suitable samples from remote areas for Newcastle disease diagnosis. *Tropical Animal Health and Production.* 27: 171-174.
- Roy P., Venugopalan A. T. and Kumanan K. 1997. Primary isolation of Newcastle disease virus in MDBK cell line. *Journal of Veterinary and Animal Sciences.* 28: 61-63.
- Roy P., Parida S., Koteeswaran A., Venugopalan A. T. and Muralimanohar B. 2001. Tears: A source for Newcastle disease virus in diagnosis of the disease in chicken. *Journal of Veterinary and Animal Sciences.* 32: 69-71.
- Snoeck C.J., Owoade A.A., Couacy-Hymann E., Alkali B.R., Okwen M.P., Adeyanju A.T., Komoyo G.F., Nakoune E., Le Faou A. and Muller C.P. 2013. High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. *J. Clin. Microbiol.* 51: 2250–2260.
- Steyer A.F., Rojs O.Z., Krapez U., Slavec B. and Barlic-Maganja D. 2010. A diagnostic method based on MGB probes for rapid detection and simultaneous differentiation between virulent and vaccine strains of avian paramyxovirus type 1. *J. Virol. Meth.* 166: 28-36.
- Tan L.T., Xu H.Y., Wang Y.L., Qin Z.M., Sun L., Liu W.J. and Cui Z.Z. 2008. Molecular characterization of three new virulent Newcastle disease virus variants isolated in China. *J. Clin. Microbiol.* 46: 750-753.
- Terrigino C. and Capua I. 2009. Conventional diagnosis of Newcastle disease virus infection. In: *Avian Influenza and Newcastle disease, a Field and Laboratory Manual*. Capua I. and Alexander D.J. (eds.). Springer-Verlag, Italy. pp. 123-126.

- Vegad J.L. 2008. Poultry Diseases: A guide for Farmers and Poultry. Professionals (Second Revised and Enlarged Edition). Salasar Imaging Systems, Delhi. pp. 12-21.
- Walker J.W., Heron B.R. and Mixson M.A. 1973. Exotic Newcastle disease eradication program in the United States. Avian Diseases. 17: 486-503.
- Wernery U., Alexander D.J., Neumann U. Kaaden O.R. and Nothelfer H.B. 1995. Newcastle disease in captive falcon. Middle East Falcon Research Group Specialist Workshop, Abu Dhabi. pp. 24-39.
- Wernery U. and Manvell R. 2003. Avian viral diseases in the United Arab Emirates (UAE). Proceedings of the European Association of Avian Veterinarians, Tenerife. pp. 72-77.
- Westbury H.A., Parsons G. and Allan W.H. 1984. Duration of excretion of virulent Newcastle disease virus following challenge of chickens with different titers of serum antibody to the virus. Aust. Vet. J. 61: 44-46.
- Wilde J., Eiden J. and Yolken R. 1990. Removal of inhibitory substances from human faecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and PCR. J. Clin. Microbiol. 28: 1300-1307.
- Wise M.G., Suarez D.L., Seal B.S., Pedersen J.C., Senne D.A., King D.J., Kapczynski D.R. and Spackman E. 2004. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 42(1): 329-338.
- Wobeser G., Leighton F.A., Norman R. Myers D.J., Onderka D., Pybus M.J. , Neufeld J. L. , Fox G.A., and Alexander D .J. . 1993. Newcastle disease in wild water birds in western Canada. Can. Vet. J. 34(6): 353-359.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2008 Newcastle Disease. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th ed. Office International des Epizootics, Paris. pp. 576-589.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2009/2010 Newcastle disease. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties, Paris. pp. 576-589.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2015. Newcastle Disease. Available from: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online>. cites 2015 Oct 2.
- Yu L., Wang Z., Jiang Y., Chang L. and Kwang J., 2001. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. J. Clin. Microbiol. 39: 3512-3519.

ตอนที่ 5

วิธีการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง และสารเคมี

I การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้แยกเชื้อ AIV มีหลายชนิด แต่จะกล่าวเฉพาะชนิดที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ primary cell ชนิด chicken embryo fibroblast (CEF) และ chicken embryo kidney (CEK) cell

1. การเตรียม chicken embryo fibroblast (CEF)

เครื่องมือที่ใช้

- suction pump
- magnetic stirrer
- refrigerated centrifuge
- Inverted microscope
- CO₂ incubator
- ตู้ชีวนิรภัย

วัสดุอุปกรณ์

- ไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน เป็นไข่จากฝูงไก่ที่ปลอดเชื้อ (SPF) หรือจากฝูงไก่ที่ไม่มีแอนติบอดีจำเพาะ (SAN)

- อุปกรณ์ที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ได้แก่ กรรไกร ปากคีบ กรวยกรองละเอียด magnetic bar หลอด centrifuge

- เครื่องแก้วที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ได้แก่ flash, beaker, pipette, petri-dish
- tissue culture plate ซึ่งมีหลายแบบให้เลือกใช้ เช่น 6-well plate, 24-well plate

สารเคมี

- phosphate buffered saline (PBS)
- fetal calf serum

- 0.25% trypsin
- น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (เช่น HAM's F12 + 0.3% TPB + 5% fetal calf serum, 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL gentamicin)
- 70% alcohol
- PSG (ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin + streptomycin + gentamicin)

วิธีการเตรียม

- 1.1 ส่องดูความมีชีวิตของไข่ไก่ฟัก ใช้ไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน ที่ตัวอ่อนมีชีวิตและแข็งแรง
- 1.2 วางไข่บนถาดโดยให้ด้านป้านของไข่อยู่ด้านบน ทำการฆ่าเชื้อที่เปลือกไข่ไก่ฟักโดยเช็ดด้วย 70% alcohol
- 1.3 ใช้กรรไกรและปากคีบเปิดไข่ทางด้านป้าน โดยเปิดเป็นวงกลม
- 1.4 แยก chorioallantoic membrane ออกโดยใช้กรรไกรหรือปากคีบชุดใหม่
- 1.5 นำตัวอ่อนมาวางใน petri-dish ล้างด้วย PBS + 1% PSG
- 1.6 แยกส่วนหัว ปีก ขาและอวัยวะภายในออกจากตัวอ่อน จากนั้นใช้กรรไกรตัดตัวอ่อนให้ละเอียด และทำให้ละเอียดยิ่งขึ้นโดยดันผ่านไซริงค์ลงใน flask
- 1.7 ล้างตัวอ่อนที่ละเอียดแล้ว 2 ครั้ง โดยใช้ PBS + 1% PSG จากนั้นล้างด้วย 0.25% trypsin 1 ครั้ง
- 1.8 ย่อยตัวอ่อน 1-2 ครั้งโดยใช้ 0.25% trypsin นาน 20-30 นาที/ครั้ง
- 1.9 กรองเซลล์ที่ย่อยได้ผ่านกรวยกรองละเอียดลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 mL
- 1.10 centrifuge ที่ 230Xg นาน 5 นาที
- 1.11 ใช้ pipette หรือ suction pump ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนเซลล์โดยเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์แล้วนำไป centrifuge ที่ 230Xg นาน 5 นาที
- 1.12 ล้างตะกอนเซลล์ซ้ำอีก 2 ครั้ง
- 1.13 เติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ และนับเซลล์
- 1.14 เตรียม CEF 5×10^5 หรือ 1×10^6 cell/mL ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์
- 1.15 ใส่ CEF ลงใน tissue culture plate ในปริมาณที่เหมาะสมสำหรับแต่ละชนิด plate ที่เลือกใช้ เขียน lot no. และ วัน/เดือน ที่เตรียมบน plate
- 1.16 incubate ใน 5% CO₂ incubator อุณหภูมิ 37°C นาน 1-2 วัน ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ทุกวัน จนกระทั่งได้เต็มที่เป็น monolayer ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน จึงนำไปใช้งานได้

2. การเตรียม chicken embryo kidney (CEK) cell

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีเช่นเดียวกับข้อที่ 1 ยกเว้นไข่ไก่อายุ 18 วัน และน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้ MEM + 0.3% TPB + 0.03% L-glutamine + 5% fetal calf serum + 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL gentamicin

วิธีการเตรียม

- 2.1 ใช้ไข่ไก่ฟักอายุประมาณ 18 วัน ที่ตัวอ่อนมีชีวิตและแข็งแรง
- 2.2 วางไข่บนถาดไข่โดยให้ด้านข้างของไข่ (ด้านที่เป็นช่องอากาศ) อยู่ด้านบน ทำการฆ่าเชื้อที่เปลือกไข่ไก่ฟักโดยเช็ดด้วย 70% alcohol
- 2.3 ใช้กรรไกรและปากคีบเปิดเปลือกไข่ทางด้านข้าง โดยเปิดเป็นวงกลม
- 2.4 ล้างตัวอ่อนด้วย PBS + 1% PSG
- 2.5 วางตัวอ่อนใน petri-dish เปิดช่องท้อง แยกอวัยวะทางเดินอาหารออกเพื่อให้เห็นไตซึ่งฝังอยู่ใกล้กระดูกสันหลัง
- 2.6 ใช้กรรไกรและปากคีบเลาะไตออก วางใน petri-dish อีกใบที่มี PBS + 1% PSG
- 2.7 ล้างไต 2 ครั้งด้วย 0.25% trypsin
- 2.8 ย่อยไตด้วย 0.25% trypsin นาน 10 นาที/ครั้ง จนย่อยหมด
- 2.9 เก็บเซลล์ที่ย่อยได้ผ่านกรวยกรองละเอียดใส่หลอด centrifuge ขนาด 50 mL
- 2.10ปั่นที่ 250Xg นาน 5 นาที
- 2.11 เทส่วนใสทิ้ง หรือใช้ suction pump แล้วล้างตะกอนเซลล์โดยเติมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ ใช้ pipette ดูดเป่าเพียงให้ตะกอนเซลล์กระจายอย่างช้าๆ จากนั้นปั่นที่ 250Xg นาน 5 นาที
- 2.12 ล้างตะกอนเซลล์ซ้ำอีก 2 ครั้ง
- 2.13 เตรียมเซลล์ 0.25% - 3% โดยใช้ น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์
- 2.14 แยกเซลล์ที่เตรียมไว้ลงใน tissue culture plate ในปริมาณที่เหมาะสมกับชนิดของ plate เช่น 1 mL/หลุม ใน 24 well tissue culture plate
- 2.15 เขียน lot no., วัน-เดือนที่เตรียมที่ plate
- 2.16 บ่มเซลล์ใน 5% CO₂ incubator อุณหภูมิ 37°C นาน 2 วัน
- 2.17 เปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 3 เซลล์จะโตเต็มที่เป็น monolayer ใน 2 วัน ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วย Inverted microscope

II การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม trypsin

Trypsin เป็น proteolytic enzyme ที่ห้องปฏิบัติการใช้ทำให้เซลล์แยกออกจากกันในการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้ในปริมาณที่เหมาะสมเพราะหากใช้เปอร์เซ็นต์สูงเกินไป เซลล์ก็อาจถูกทำลายได้ ประสิทธิภาพของ trypsin จะถูกยับยั้งโดยซีรัม

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้

เครื่องมือ

- เครื่องชั่ง
- pH meter
- magnetic stirrer
- suction pump
- ตู้อุ่นแช่แข็ง

อุปกรณ์

- หัวกรอง (membrane filter) ขนาด 0.22 μm
- beaker ขนาด 1,000 mL
- กระบอกตวง ขนาด 1,000 และ 2,000 mL
- แท่งแม่เหล็กกวน (magnetic bar)
- Automatic syringe
- หลอดแก้วขนาด 16x125 mm

สารเคมี

- trypsin 1:250 (ใช้ tissue culture grade เช่น Difco[®], Amersco[®])
- PBS (1x)

การเตรียม 2.5% trypsin (stock solution)

- 1.1 ชั่ง trypsin 50 g ใส่ปิกรเกอร์ 2,000 mL
- 1.2 เติมน้ำ PBS (1x) 500 mL ใส่ magnetic bar วางบน magnetic stirrer กวนให้เข้ากัน
- 1.3 เทใส่กระบอกตวง 2,000 mL
- 1.4 ปรับค่าความเป็น กรด-ด่าง ให้ได้ pH 7.4-7.6 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl
- 1.5 กรองผ่านหัวกรอง (membrane filter) ขนาด 0.22 μm โดยใช้ suction pump
- 1.6 แยกใส่หลอดแก้วที่เตรียมไว้หลอดละ 10 mL โดยใช้ Automatic syringe
- 1.7 ติดฉลาก ชื่อสารเคมี lot no. วันเดือนที่เตรียม ผู้เตรียมที่หลอดแก้ว

1.8 เก็บที่ $-25\pm 5^{\circ}\text{C}$ หรือ $-35\pm 5^{\circ}\text{C}$

การเตรียม 0.25% trypsin (working solution)

1.1 นำ 2.5% trypsin จำนวนเท่าที่จะใช้ในแต่ละครั้งออกจากตู้แช่แข็ง

1.2 เจือจาง 2.5% trypsin ในอัตราส่วน 1/10 โดยใช้ PBS (1X) เพื่อใช้เป็น working solution ในการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

2. การเตรียม phosphate buffered saline (PBS) solution

PBS เป็นสารละลายที่ใช้เป็นหลักในห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา เช่น ใช้เตรียมสารละลายชนิดอื่น เช่น viral transport medium ใช้ล้างเม็ดเลือดแดง ใช้เป็นสารละลายในการตรวจทางซีรัมวิทยาโดยวิธี HA-HI เป็นต้น

สารเคมี

- sodium chloride (NaCl) AR grade
- potassium chloride (KCl) AR grade
- potassium dihydrogen phosphate (K_2HPO_4) AR grade
- disodium hydrogen phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- น้ำกลั่น 3 ครั้ง (Tri-distilled water, DW3)
- 1N NaOH และ 1N HCl

วิธีเตรียม

วิธีเตรียม PBS (stock solution)

- ชั่ง NaCl 400 g, KCl 10 g, KH_2PO_4 10 g และ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 72 g ใส่ในขวดแก้วขนาด 5,000 mL

- เติม DW3 ให้ได้ปริมาตร 5,000 mL

- ผสมสารเคมีให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer

- ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ pH 7.2 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl โดยใช้ pH meter ได้เป็น PBS stock solution (10x)

- ตวง PBS stock solution (10x) 500 mL ใส่ขวดแก้ว 1,000 mL

- ติดฉลากชื่อสารเคมี lot no. วันเดือนที่เตรียม วันหมดอายุ และชื่อผู้เตรียมที่ขวดแก้ว

- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที ก่อนนำไปนึ่งให้คลายฟองเกลียวขวดสารเคมีก่อนเพื่อให้ความร้อนคลายตัว

- ปิดฝาขวดให้แน่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง
- อายุการใช้งาน 1 ปี

วิธีเตรียม PBS (working solution)

- นำ PBS stock solution (10x) ปริมาณ 500 mL เทใส่ขวดแล้ว
- เติมน้ำ DW 4,500 mL เพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 5,000 mL
- ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ pH 7.2 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl
- ตวงสารละลายในปริมาตร 400 mL โดยใส่ขวดแก้วขนาด 500 mL
- ติดฉลากชื่อสารเคมี วันเดือนที่เตรียม วันหมดอายุ และชื่อผู้เตรียม
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที
- ทดสอบ PBS ก่อนนำไปใช้งาน โดยนำไปทดสอบกับซีรัมอ้างอิงบวกและลบต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนก subtype H5 โดยวิธี HA-HI ตามวิธีที่กำหนด
- หากผลการทดสอบไม่ถูกต้อง ต้องเตรียมใหม่และทดสอบก่อนนำไปใช้งานทุกครั้ง
- ปิดฝาให้แน่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง
- อายุการใช้งาน 6 เดือน

3. การเตรียม viral transport medium (VTM)

VTM เป็นสารเคมีที่ใช้ในการถนอมรักษาเชื้อไวรัสจากตัวอย่าง ได้แก่ cloacal swab และ tracheal swab หรือ oropharyngeal swab โดยเฉพาะ cloacal swab จะมีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อน จากเชื้อแบคทีเรียในอุจจาระ จึงต้องมีวิธีการในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการส่งตัวอย่างจากพื้นที่ไปยังห้องปฏิบัติการ มิฉะนั้นเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนขึ้นอาจส่งผลการทดสอบได้ วิธีการดังกล่าวคือการใช้ VTM เป็น medium ในการเก็บรักษาตัวอย่าง และควบคุมอุณหภูมิ เช่น การแช่เย็น VTM มีส่วนประกอบของยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ได้แก่ penicillin G sodium, streptomycin sulfate และ gentamicin sulfate ในปริมาณที่เหมาะสม โดยทั่วไปการเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจแยกเชื้อไวรัสไข้ penicillin 2,000 units/mL, streptomycin 2 mg/mL และ gentamicin 50 µg/mL แต่ในกรณีที่ตัวอย่างมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในปริมาณมาก เช่น cloacal swab อาจเพิ่มปริมาณยาต้านเชื้อจุลชีพขึ้นอีก 5-10 เท่า ทั้งนี้การเตรียม VTM จะทำในตู้ปลอดเชื้อ biosafety cabinet class II

การเตรียม VTM ปริมาตร 10 ลิตร โดยมี penicillin 10,000 unit/mL, streptomycin 10 mg/mL และ gentamicin 250 µg/mL

- ชั่ง penicillin 60 g ใส่ปิกรเกอร์ขนาด 1,000 mL
- เติมน้ำ DW 400 mL ละลายให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- เทใส่กระบอกตวงขนาด 500 mL เติมน้ำ DW ให้ได้ปริมาตรรวม 500 mL
- ชั่ง streptomycin 100 g และ gentamicin 2.5 g ใส่ในปิกรเกอร์ขนาด 1,000 mL

- เติมน้ำ DW 400 mL ละลายให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- เติมน้ำ streptomycin และ gentamicin ที่ละลายแล้วลงในกระบอกตวงขนาด 500 mL ปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรรวม 500 mL ด้วยน้ำ DW
- ผสมสารละลาย penicillin กับสารละลาย streptomycin และ gentamicin ละลายให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- แบ่งสารละลายเป็นส่วนเท่าๆ กัน (500 mL) เทใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 5,000 mL จากนั้นเติมน้ำ DW 4 ลิตร/ขวด
- เติมน้ำ PBS stock solution (10x) 500 mL/ขวด ผสมให้เข้ากัน
- ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ pH 7.2 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl
- กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 μm โดยใช้ suction pump โดยปฏิบัติงานใน biosafety cabinet
- แยกใส่หลอดพลาสติกชนิดมีฝาเกลียวขนาด 15 mL หลอดละ 5 mL โดยใช้ Automatic syringe
- ติดฉลากชนิดสารเคมี วันเดือนที่เตรียม และผู้เตรียมที่ข้างขวด เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ -20°C
- อายุการใช้งาน 6 เดือน
- การเตรียม VTM ปริมาตร 10 ลิตร โดยมีความเข้มข้น penicillin 2,000 unit/mL, streptomycin 2 mg/mL และ gentamicin 50 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 μm
- ชั่ง penicillin 6 g, streptomycin 10 g และ gentamicin 0.25 g ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 mL
- เทสารทั้งหมดลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 mL จากนั้นเติมน้ำ PBS stock (10x) 500 mL ละลายให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- ปริมาตรความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ pH 7.2 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl
- แยกใส่หลอดพลาสติกมีฝาเกลียวขนาด 15 mL หลอดละ 5 mL โดยใช้ Automatic syringe (ปฏิบัติงานใน BSC Class II)
- ติดฉลากชื่อสารเคมี lot no. วันเดือนที่เตรียม วันหมดอายุ และชื่อผู้เตรียมที่ข้างหลอด
- เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ -20°C
- อายุการใช้งาน 6 เดือน

4. การเตรียม PSG

- ชั่ง penicillin (10,000 unit/mL) 6 g, streptomycin 10 g และ gentamicin 0.25 g ใส่ปิกรเกอร์ขนาด 1,000 mL
- เติม PBS working solution (1x) ให้ได้ปริมาตรรวม 1,000 mL
- ละลายให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ pH 6.6 ด้วย 1N NaOH และ 1N HCl
- กรองผ่านหัวกรอง (membrane filter) ขนาด 0.22 μ m โดยใช้ suction pump
- แจกใส่หลอดแก้วฝาแก้วเกลียวขนาด 10x100 mm หลอดละ 5 mL โดยใช้ Automatic syringe
- ติดฉลากชื่อสารเคมี lot no. วันเดือนที่เตรียม และชื่อผู้เตรียมไว้ที่ข้างหลอด
- เก็บที่อุณหภูมิ $-25\pm 5^{\circ}\text{C}$ หรือ $-35\pm 5^{\circ}\text{C}$

5. การเตรียมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (culture media)

น้ำยาเลี้ยงเซลล์มีวิธีเตรียมได้หลายแบบ ขึ้นกับชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เลือกใช้ ในที่นี้จะกล่าวถึงน้ำยาเลี้ยงเซลล์ชนิดที่เตรียมจาก HAM'S F12 ซึ่งห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเลือกใช้อยู่ในปัจจุบัน HAM'S F12 เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดสังเคราะห์ มีส่วนประกอบของกรดอะมิโน เกลือแร่ และวิตามินชนิดต่างๆ ผู้พัฒนาสูตรคือ Richard G. HAM ตั้งแต่ปี 1965 นอกจาก HAM'S F12 แล้วยังมีน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญคือ tryptose phosphate broth (TPB) และซีรัม TPB เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ส่วนซีรัมมีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทั่วไปนิยมใช้ calf หรือ bovine serum ที่ผ่านการกรองด้วย membrane filter ก่อนนำมาใช้ต้องทดสอบว่าไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดต่างๆ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

วิธีการเตรียม

- ชั่ง HAM'S F12 และ NaHCO_3 ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด เช่น ยี่ห้อ Nissui ชั่ง HAM'S F12 53 g, NaHCO_3 6 g ยี่ห้อ Biochrome ชั่ง HAM'S F12 53.5 g, NaHCO_3 3 g จากนั้น ชั่ง penicillin G Sodium 0.6 g และ Streptomycin sulphate 1 g ใส่ปิกรเกอร์ขนาด 1,000 mL
- เติม DW3 400 mL ละลายให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- เทส่วนผสมลงในขวดแก้วเกลียวขนาด 5,000 mL จากนั้นเติม DW3 ให้ได้ ปริมาตรรวม 5 lit
- ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ pH 7.4 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH

- กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 μm โดยใช้ suction pump ใส่ในขวดแก้วขนาด 1,000 mL ปิดฝาขวดให้แน่น

- ปิดฉลากระบุชื่อสารเคมี วันเดือนปีที่เตรียม วันหมดอายุ และชื่อผู้เตรียม
- เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C
- อายุการใช้งาน 1 เดือน

การเตรียมน้ำยาเลี้ยงเซลล์

- ผสมน้ำยาเลี้ยงเซลล์โดยใช้ HAM'S F12 เป็นน้ำยาหลัก เติม TPB 10%, PSG 1%
- ในกรณีที่เตรียม Growth medium สำหรับเพิ่มจำนวนเซลล์โดยทั่วไปจะใช้ซีรัม 5%
- กรณีที่เตรียม maintenance medium สำหรับเซลล์ที่โตเต็มที่แล้ว ไม่ต้องใช้ซีรัม

6. การเตรียม Tryptose phosphate broth (TPB)

- ชั่ง TPB 29.5 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 mL
- เติม DW3 ให้ได้ปริมาตร 1,000 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer
- แยกใส่ขวดแก้วขนาด 50 หรือ 100 mL นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ที่ 121°C นาน 15 นาที

- ปิดป้ายระบุชื่อสารเคมี วันเดือนปีที่เตรียม
- เก็บที่ 2-8°C
- อายุการใช้งาน 2 เดือน

7. ซีรัม (Calf หรือ Bovine serum)

- ละลาย calf หรือ bovine serum ผสมให้เข้ากัน
- แยกใส่หลอดแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณ 5 mL/หลอด
- ปิดป้ายระบุชื่อสารเคมี ควรมีการบันทึกว่าแต่ละ lot ที่แบ่งมาจากซีรัม lot no. ได้เพื่อตรวจสอบย้อนกลับได้
- เก็บแช่แข็งที่ -25°C หรือ -35°C

8. การเตรียม Alsever's solution

- สำหรับ Alsever's solution ปริมาณ 1,000 mL ชั่ง glucose 20.50 g, trisodium citrate 8.00 g, citric acid 0.55 g และ sodium chloride 4.20 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 2,000 mL
- เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6.1 โดยใช้ 1N NaOH หรือ 1N HCl

- ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้วิธีกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.22 μm แบ่งสารละลายใส่ขวดแก้วขนาด 100 mL
- ปิดป้ายชื่อสารเคมี วันเดือนที่เตรียม
- เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8°C
- อายุการใช้งาน 6 เดือน

9. การเตรียมเม็ดเลือดแดงไก่ (chicken red blood cell, cRBC)

- ไก่ที่ใช้เป็นไก่โตเต็มวัย และไม่ได้ทำวัคซีนใดๆ
- เจาะเลือดไก่อย่างน้อย 3 ตัว ใส่ใน Alsever's solution ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันเพื่อไม่ให้เลือดแข็งตัว
- เทใส่ centrifuge tube นำไปปั่นที่ 800Xg นาน 5 นาที
- เติม PBS ปริมาตรที่แน่นอน เช่น 10 mL ลงใน cRBC ผสมให้เข้ากัน
- วัดความเข้มข้นของ cRBC โดยปั่นอัดแน่นเม็ดเลือดแดง (hematocrit) ด้วยเครื่อง microhematocrit centrifuge
- ปรับความเข้มข้นของ cRBC ให้เป็น 5% ใน PBS หรือ 1% ใน PBS
- แบ่งสารละลายใส่ขวดแก้ว ปิดป้ายบ่งชี้สถานะ วันเดือนที่เตรียม
- เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8°C
- อายุการใช้งาน 7 วัน

9.1 วิธีการปั่นอัดแน่นเม็ดเลือดแดง (hematocrit)

อุปกรณ์ที่ใช้

- capillary hematocrit tube
- ดินน้ำมันสำหรับอุดปลายด้านหนึ่งของ capillary hematocrit tube
- micro-hematocrit centrifuge
- hematocrit reader
- cRBC

วิธีการ

- ใช้ capillary hematocrit tube ตะปลายข้างหนึ่งที่ cRBC เเยิงหลอดเล็กน้อยเพื่อให้เลือดเข้าไปในหลอดในปริมาณอย่างน้อย 2 ใน 3 ของหลอดโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นอุดปลายข้างหนึ่งด้วยดินน้ำมัน
- นำไปปั่นโดยใส่หลอด capillary ลงใน micro-hematocrit centrifuge โดยให้ปลายด้านที่อุดดินน้ำมันอยู่ด้านนอก ปิดฝาให้แน่น จากนั้นปั่นนาน 5 นาที

- หลังปั่นเสร็จนำไปอ่านด้วยเครื่อง hematocrit reader ทันที โดยกำหนดให้ปลายด้านล่างสุดของ column เป็น 100 ชั้นบนสุดของ column cRBC เป็นจุดอ่าน บันทึกค่า% hematocrit ที่อ่านได้

- ปรับความเข้มข้นของ cRBC ให้เป็น 1% ใน PBS โดยคำนวณตามสูตร $C_1 V_1 = C_2 V_2$ ตัวอย่างเช่น มี cRBC ใน PBS มีปริมาตร 10 mL และวัดค่า hematocrit ได้ 50% ต้องการเตรียม 1% cRBC

$$\begin{aligned} C_1 &= 50\% & V_1 &= 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 1\% & V_2 &= ? \\ C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 50 \times 10 &= 1 \times V_2 \\ V_2 &= 50 \times 10 = 500 \text{ mL} \\ \therefore \text{จะต้องเติม PBS} &= 500 - 10 = 490 \text{ mL} \\ \text{จะได้ 1\% cRBC ปริมาตร 500 mL} \end{aligned}$$

10. การเตรียม TAE buffer

10.1 การเตรียมสารละลาย 0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 1,000 mL

- ชั่ง disodium ethylene diamine tetraacetate (Na_2EDTA) ปริมาตร 186.12 g ใส่ในขวดแก้วฟลาเกลียวขนาด 1,000 mL

- เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 mL ลงในขวด

- ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ magnetic stirrer

- ชั่ง sodium hydroxide (NaOH) ชนิดเม็ด ปริมาตร 20 g

- ค่อยๆ เติม NaOH ลงในขวดสารละลายทีละน้อยจนครบ 20 g เพื่อปรับ pH ของสารละลาย 0.5 M Na_2EDTA ให้เท่ากับ 8.0

- เมื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายด้วยน้ำกลั่น จนปริมาตรเป็น 1,000 mL

- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

- ติดป้ายบอกชนิดของสารเคมี วัน/เดือน/ปี ที่เตรียม

10.2 การเตรียมสารละลาย 50x Tris-acetate EDTA buffer (50x TAE buffer)

- ชั่ง Trizma® base ปริมาตร 242 g ใส่ลงในขวดแก้วฟลาเกลียวขนาด 1,000 mL

- เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 mL

- ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ magnetic stirrer
- เติม 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 100 mL
- เติม acetic acid (glacial) 100% ปริมาตร 57.1 mL ผสมให้เข้ากัน
- ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น จนปริมาตรเป็น 1,000 mL
- ติดป้ายบอกชนิดของสารเคมี วันเดือนปีที่เตรียม

10.3 การเตรียมสารละลาย 1x Tris-acetate EDTA buffer (1xTAE buffer)

- ตวงสารละลาย 50x TAE buffer ปริมาตร 20 mL ใส่ลงในขวดแก้วฟาเกลียวขนาด 1,000 mL
- เติมน้ำกลั่นปริมาตร 980 mL
- ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ magnetic stirrer
- ติดป้ายบ่งบอกชื่อสารเคมี วันเดือนปีที่เตรียม

11. การเตรียม 1.5% Agarose gel

- ชั่ง agarose ปริมาณ 1.5 g เทลงในขวดแก้วฟาเกลียวขนาด 250 mL
- เติมสารละลาย 1x TAE buffer ปริมาตร 100 mL โดยใช้กระบอกตวงขนาดความจุ 200 mL เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นละลาย agarose โดยใช้ microwave
- เขย่าขวดเบาๆ เพื่อให้ agarose ละลายจนหมด หากยังมีส่วนที่ไม่ละลาย ให้นำเข้า microwave อีกครั้งจนได้สารละลาย 1.5% agarose gel ที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- นำขวดบรรจุสารละลาย 1.5% agarose gel ออกจาก microwave ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที
- เทสารละลาย 1.5% agarose gel ลงบน gel box ช้าๆ ให้มีความหนาประมาณ 5-7 mm โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศบนแผ่นเจล
- ทำช่องสำหรับหยอดตัวอย่างโดยใช้หวี (comb) วางลงบนสารละลายในตำแหน่งของ gel box ที่จัดไว้แล้ว โดยใช้เลือกหวีขนาดที่เหมาะสมกับจำนวนตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ
- ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ให้สารละลาย 1.5% agarose gel เย็นลงและแข็งตัว
- เมื่อสารละลาย 1.5% agarose gel แข็งตัวดีแล้วให้ดึงหวีออกช้าๆ เพื่อไม่ให้แผ่นเจลแตกหรือมีรอยร้าว
- เมื่อต้องการใช้งาน ให้นำภาชนะที่มี 1.5% agarose gel วางในช่องของเครื่อง Electrophoresis จากนั้นเติมน้ำกลั่น 1x TAE buffer จนท่วมแผ่นเจล

12. การเตรียม 100 bp DNA ladder Marker

- นำสารทุกตัวออกมาวางบน microtube rack เพื่อให้ละลาย
- อัตราส่วนในการเตรียม 100 bp DNA Ladder : DW : 6x Loading dye = 1:4:1 โดยเติม DW 200 μ L ลงในหลอด 100 bp DNA Ladder ปริมาณ 50 μ L และเติม 6x Loading dye 50 μ L
- ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer
- ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ microcentrifuge ประมาณ 5-10 วินาที เพื่อให้สารไม่ติดฝาหลอด
- ติดป้ายบ่งชี้สถานะสารมาตรฐาน

13. การเตรียม 1kb DNA Ladder Marker

- นำสารทุกตัวออกมาวางบน microtube rack เพื่อให้ละลาย
- อัตราส่วนในการเตรียม 1 kb DNA Ladder : DW : 6x Loading dye = 1:4:1 โดยจุด 1kb DNA Ladder ปริมาณ 10 μ L ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 mL เติม DW ปริมาตร 40 mL และ 6x Loading dye ปริมาตร 10 μ L
- ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer
- ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ microcentrifuge ประมาณ 5-10 วินาที เพื่อให้สารไม่ติดฝาหลอด
- ติดป้ายบ่งชี้สถานะสารมาตรฐาน

14. การเตรียม Ethidium bromide (EtBr)

- ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 500 mL ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 1,000 mL ที่หุ้มด้วย aluminium foil
- เติมสารละลาย EtBr ความเข้มข้น 10 mg/mL ปริมาตร 25 μ L
- เขย่าขวดให้สารละลายเข้ากัน
- ติดป้ายบ่งชี้สถานะสารมาตรฐาน

ตอนที่ 6

เครือข่ายห้องปฏิบัติการ และการทำ Interlaboratory testing

ด้วยตระหนักถึงความสำคัญของมาตรฐานห้องปฏิบัติการของโรคไข้หวัดนกและเพื่อให้การตรวจวินิจฉัยเป็นมาตรฐานเดียวกัน สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติและห้องปฏิบัติการเครือข่ายได้แก่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาคต่างๆ ทั้ง 7 แห่งทั่วประเทศร่วมกันจัดทำโครงการสอบเทียบตัวอย่างของโรคไข้หวัดนก โดยครอบคลุมเทคนิคการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5 โดยวิธีฉีดไข่ไก่ฟักและเซลล์เพาะเลี้ยง รวมทั้งการเปรียบเทียบฝีมือภายใน การตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5 โดยวิธี HI ทั้งนี้สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติได้รับการรับรองระบบมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 ในขอบข่ายการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5 ตั้งแต่ปี 2551 และได้รับการรับรองขอบข่ายการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและนิวคาสเซิลจากสัตว์ปีกโดยวิธีการแยกเชื้อในไข่ไก่ฟักและพิสูจน์เชื้อโดยวิธี HA-HI ตั้งแต่ปี 2554 ได้รับการรักษาระบบและต่ออายุจนถึงปัจจุบัน

ในด้านความร่วมมือกับห้องปฏิบัติการต่างประเทศ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติร่วมมือกับหน่วยงาน Australian Animal Health Laboratory (AAHL) ประเทศออสเตรเลีย ดำเนินการสอบเทียบโรคไข้หวัดนกโดย AAHL ได้จัดส่งตัวอย่างเพื่อทดสอบความชำนาญ (proficiency test) โดยเริ่มดำเนินการตั้งแต่ปี 2552 สำหรับโรคไข้หวัดนกทำการทดสอบความชำนาญในส่วนของ HI test ของ H5 และ rRT-PCR ของ Influenza type A (H5/H7) ส่วนโรคนิวคาสเซิล ทดสอบความชำนาญในส่วนของ HI test และ rRT-PCR ผลการทดสอบในปี 2557 พบว่าให้ผลตรงกับ AAHL ทุกตัวอย่างและทุกวิธีการทดสอบ (100%) นอกจากนี้ยังได้ปรับปรุงห้องปฏิบัติการเป็นห้องปฏิบัติการชีวนิเวศระดับ 3 (Biosafety level-3, BSL-3) การดำเนินการดังกล่าวเป็นผลดีต่อระบบการวินิจฉัยและเฝ้าระวังโรคของประเทศไทยให้เป็นที่เชื่อถือในระดับสากล สร้างความเชื่อมั่นต่อประเทศคู่ค้า และป้องกันระบบการผลิตอุตสาหกรรมสัตว์ปีก เป็นผลให้การขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศเป็นไปอย่างมั่นคงและต่อเนื่อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณท่านอธิบดี อยุทธ หรินทรานนท์ รองอธิบดีวิมลพร ธิติศักดิ์ นายสัตวแพทย์ปรีชา วงษ์วิจารณ์ ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ผู้เชี่ยวชาญ ลัดดา ตรงวงศา และสัตวแพทย์หญิงมนยา เอกทัตร์ ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนและให้คำแนะนำในการจัดทำคู่มือเล่มนี้ ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์บัณฑิต นวลศรีฉาย สัตวแพทย์หญิงไกล่รุ่ง ทัศนระน้อย นายสัตวแพทย์รัฐปณัฐ สงคสุภา คุณวัชรโรบล ทองอ่วม คุณไพรัตน์ กัมมานุสร และคุณนฤมล เพ็งจันทร์ ที่เอื้อเฟื้อและสืบทอดข้อมูล ขอขอบคุณ คุณวิไล แสงปาก คุณธีรศักดิ์ อินธิยะ คุณสุภาวดี จิตต์สมนึก และคุณชนกพร บุญศาสตร์ ที่จัดพิมพ์ข้อมูลจนเป็นรูปเล่มสมบูรณ์

Special thanks to Dr Tsukamoto Kenji, National Institute of Animal Health, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, Japan for providing the data of N1-N9 primers.

