

การสำรวจและเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนกในนกอพยพระหว่างปี 2548-2553

ดวงทอง ปัจฉิมศิริ^{1*} ดวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง² ศรายุทธ แก้วกาหลง¹ บัณฑิต นวลศรีฉาย¹

¹ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

² สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช

* ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทร. 0-2579-8908 ถึง 14 โทรสาร 0-2579-8918 ถึง 19 อีเมล: tuangthongp@dld.go.th

บทคัดย่อ

ตรวจหาเชื้อไข้หวัดนกจากนกในธรรมชาติ 3 กลุ่ม คือ นกอพยพ นกประจำถิ่น และนกอพยพและนกประจำถิ่น ระหว่างปี 2548 – 2553 จากตัวอย่าง cloacal swab จำนวน 2,144 ตัวอย่าง และซากนกจำนวน 605 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่เคยพบการระบาดของโรคไข้หวัดนก ในพื้นที่ที่มีประชากรนกอยู่อย่างหนาแน่น บริเวณที่มีการทำรังวางไข่ของนก และบริเวณที่อยู่ใกล้เคียงกับแหล่งชุมชน นำตัวอย่างทั้งหมดมาตรวจด้วยวิธีทางไวรัสวิทยา และอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อสำรวจและเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนกที่อาจแพร่โดยนกในธรรมชาติ พบว่าตัวอย่างที่ส่งตรวจทั้งหมดไม่พบเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จากการศึกษาครั้งนี้อาจสรุปได้ว่านกในธรรมชาติไม่มีความเสี่ยงในการนำโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย

คำสำคัญ : เชื้อไวรัสไข้หวัดนก สำรวจและเฝ้าระวัง วิธีทางไวรัสวิทยา อิมมูโนฮิสโตเคมี

บทนำ

การระบาดของโรคไข้หวัดนกครั้งแรกในประเทศไทย เกิดขึ้นในช่วงต้นปี พ.ศ. 2547 จากนั้นเกิดการระบาดทุกปี ครึ่งสุดท้ายเกิดการระบาดเล็กน้อยในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2551 (ชุดิพนธ์ และ พรพิรุณ, 2552) อย่างไรก็ตามโรคไข้หวัดนกกยังคงเป็นโรคที่มีความสำคัญในลำดับต้นที่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องต้องทำการเฝ้าระวังโดยเฉพาะในเชิงรุก โดยกรมปศุสัตว์เฝ้าระวังในสัตว์ปีกที่เป็นอาหาร และกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืชเฝ้าระวังในนกธรรมชาติ ซึ่งหน่วยราชการทั้งสองนี้ได้ร่วมกันทำงานอย่างจริงจังและต่อเนื่องตลอดมา เนื่องจากในช่วงการระบาดไม่เพียงแต่พบเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ปีกที่เป็นอาหารแต่ยังพบในนกในธรรมชาติได้แก่ นกฟิราบ นกกระจอกบ้าน นกปากห่าง นกเอี้ยงสาธิต นกเอี้ยงต่าง นกกาเหว่า นกแซงแซว นกเอี้ยงหงอน นกกระต๊อ นกขมิ้น นกกระจอกตาสี เป็นต้น (Siengsan et al., 2009) นกน้ำในวงศ์ Anatidae ได้แก่ เป็ด ห่านและหงส์ เป็นตัวนำโรคไข้หวัดนกในธรรมชาติ (Webster et al. 1992) มีบทบาทสำคัญในการแพร่โรคดังกล่าวจากทวีปเอเชียไปยังทวีปยุโรปและแอฟริกา (Kilpatrick et al., 2006; Olsen et al., 2006) อย่างไรก็ตามบทบาทในการแพร่โรคระหว่างการอพยพของนกในธรรมชาติและการเคลื่อนย้ายของสัตว์ปีกที่เป็นอาหารยังเป็นที่ถกเถียง (Feare and Yasue, 2006; Gauthier-clerc et al., 2007) ในประเทศไทยจากการเก็บตัวอย่างมูลและ tracheal swab ของนกปากห่างในบริเวณสร้างรังวางไข่ 10 แห่งในจังหวัดนครสวรรค์ สุพรรณบุรี นครปฐม อ่างทอง ปทุมธานีและกรุงเทพมหานคร จำนวน 270 ตัว ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547 โดยเจ้าหน้าที่ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช และนำมาวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ได้ตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 ในโคโลนีนกปากห่างที่จังหวัดนครสวรรค์ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร อ. สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี และ อ. บางเลน จ. นครปฐม (บุษบง และดวงรัตน์, 2547) นกในธรรมชาติ จึงเป็นสัตว์ที่สามารถติดโรคไข้หวัดนกและอาจเป็นตัวแพร่โรคได้ การสำรวจโรคไข้หวัดนกในนกธรรมชาติจึงเป็นการเฝ้าระวังเตือนภัยต่อประชาชน เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องที่ได้อีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อสำรวจและเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนก ที่อาจแพร่โดยนกในธรรมชาติ ในระยะเวลา 5 ปี (ตุลาคม 2548 – กันยายน 2553) โดยการบูรณาการงานระหว่างกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืชและกรมปศุสัตว์ ในกรณีที่ตรวจพบสามารถเตือนภัยไปยังประชาชนและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อที่จะได้จัดการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังสามารถเฝ้าระวังในระดับชีวโมเลกุล ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ในกรณีที่ตรวจไม่พบจะเป็นการช่วยลดความตื่นตระหนกและหวาดระแวงที่มนุษย์ มีต่อนกในธรรมชาติ

อุปกรณ์และวิธีการ

นำตัวอย่าง cloacal swab และซากนก มาตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธีทางไวรัสวิทยา เมื่อพบเชื้อจะศึกษาหาลำดับเบส (sequencing) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ส่วนซากนกนอกจากนำมาตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีแล้ว ยังสามารถตรวจด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา แบคทีเรียวิทยา และปรสิตวิทยา เพื่อหาเชื้อชนิดอื่นได้

ตัวอย่าง

เจ้าหน้าที่ของสำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืชเก็บตัวอย่าง cloacal swab จำนวน 2,144 ตัวอย่าง และเจ้าหน้าที่ของกรมปศุสัตว์เก็บตัวอย่างซากนก จำนวน 605 ตัวอย่าง จากนกอพยพ นกประจำถิ่น และนกอพยพและนกประจำถิ่น (นกอพยพและนกประจำถิ่น หมายถึงนกที่บางกลุ่มประชากรจะมีการอพยพ แต่บางกลุ่มประชากรไม่อพยพ ยังคงอยู่ในประเทศไทยตลอดทั้งปี เช่น นกปากห่าง นกแซงแซวหางปลา เป็ดแดง เป็นต้น) ทั่วประเทศ เป็นระยะเวลา 5 ปี โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่พบการระบาดของโรคไข้หวัดนก ในพื้นที่ที่มีประชากรนกอยู่อย่างหนาแน่น บริเวณที่มีการทำรังวางไข่ของนก และบริเวณที่อยู่ใกล้เคียงกับแหล่งชุมชน แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติและศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาค 7 แห่ง

การเก็บตัวอย่าง cloacal swab จากนกในธรรมชาติ

เก็บตัวอย่าง cloacal swab ลงในหลอดที่บรรจุ virus transport media ในกรณีเป็นนกชนิดเดียวกัน และเก็บเวลาและสถานที่เดียวกันจะรวม 3 ตัว ใน 1 หลอดตัวอย่าง แต่บางครั้งอาจน้อยกว่าหรือมากกว่าขึ้นอยู่กับจำนวนนกที่จับได้แต่ละเวลาและสถานที่ จากนั้นนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมง โดยแช่เย็นตลอดการขนส่ง พร้อมข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่าง ได้แก่ ชนิดนก วัน เวลา สถานที่ รวมทั้งสภาพแวดล้อม และสุขภาพนก เพื่อวิเคราะห์ผล

การตรวจทางไวรัสวิทยา

การเตรียมตัวอย่าง

นำหลอดตัวอย่าง cloacal swab มาเขย่าหลอดอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าสารเพื่อให้อุจจาระหลุดจากไม้ปั่นสำลี เทสารละลายลงในหลอดปั่นขนาด 1.5 ml ปั่นที่ความเร็ว 1,000 g นาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสในหลอดที่บรรจุยาปฏิชีวนะ gentamicin ปริมาณ 50 µg/ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จึงทำการแยกเชื้อไวรัส ส่วนซากนกนำอวัยวะมาบดรวมกัน แล้วเติมสาร PBS เตรียมเป็นร้อยละ 10 ของสารละลาย แล้วเทสารละลายลงในหลอดปั่นเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่าง cloacal swab

การแยกเชื้อไวรัส

ใช้วิธีฉีดไข่ไก่ฟักตามวิธีที่กำหนด (OIE, 2008) กล่าวโดยย่อดังนี้ ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้ทาง allantoic cavity ในปริมาณ 0.2-0.3 ml/ฟอง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 4 วัน ตรวจดูการมีชีวิตของตัวอ่อนทุกวัน จนครบ 7 วัน ตัวอ่อนที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง หลังฉีดจะถูกคัดทิ้งเนื่องจากอาจตายเพราะเทคนิคการฉีด กรณีที่ตัวอ่อนตายหลัง 24 ชั่วโมงจะดูน้ำไข่เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี hemagglutination (HA) ในกรณีที่ฉีดครบ 7 วัน แล้วตัวอ่อนไม่ตาย จะแช่เย็นไข่ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอ่อนตาย แล้วจึงดูน้ำไข่เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส หากให้ผล HA เป็นลบ จะฉีดไข่ไก่ฟัก passage ที่ 2 โดยมีวิธีการเช่นเดียวกับ passage แรก ตัวอย่างที่ให้ผล HA เป็นลบจากการฉีดไข่ 2 passage จะตัดสินว่าเป็นลบ หาก HA ให้ผลบวกทำการทดสอบต่อด้วยวิธี hemagglutination inhibition (HI) เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อไวรัส avian influenza หรือ Newcastle

การตรวจหา Hemagglutinin (HA) และ Neuraminidase (NA) subtype

ใช้วิธี HA-HI และ NA-NI ตามวิธีมาตรฐาน (Alexander and Spackman, 1981) โดยใช้ reference serum H1-H15 และ N1-N9 จาก Veterinary Laboratory Agency, Department for Environment, Food and Rural Affairs, Weybridge ประเทศอังกฤษ ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงโรค avian influenza

Reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR)

สกัด RNA จากน้ำไข่ด้วยชุดสกัด Qiagen RNA viral kit (Qiagen, Germany) ตามขั้นตอนที่กำหนดในขั้นตอนสุดท้ายใช้ DEPC-treated water ละลายตัวอย่าง RNA จากนั้นนำตัวอย่าง RNA มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ primer สำหรับทำ full genome ทั้ง 8 ท่อน (Hoffman *et al.*, 2001) โดยปฏิกิริยา RT-PCR โดยย่อ ดังนี้ ปฏิกิริยาทั้งหมด 50 µl ของ RT-PCR ประกอบด้วย 25 µl ของ 2x buffer (Invitrogen), 1 µl (10 µM) ของ primer forward และ reverse, 1 µl ของส่วนผสมของเอนไซม์ Super Script III /Patinum Taq High Fidelity และสุดท้ายเติม DEPC-treated water ไป 17 µl ให้ครบ 50 µl จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิสำหรับทำปฏิกิริยา reverse transcriptase บ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 30 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที 50°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 3 นาที จำนวน 40 รอบ ต่อด้วยอุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที ในขั้นตอนสุดท้าย จากนั้นนำ PCR product มาตรวจโดยวิธี electrophoresis โดยใช้ 1.2% agarose gel และย้อมด้วยสาร ethidium bromide และส่องดูด้วยเครื่อง Ultraviolet transilluminator

การศึกษาลำดับเบส (sequencing) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกรณีตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

หลังจากเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยวิธี RT-PCR นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA.) นำไปเชื่อมต่อกับ pGem_T vector system (Promega, USA) แล้วจึงใส่ลงในเชื้อ E.coli DH5 α โดยใช้ Gene Pulser XcellTM (BioRad, USA) ตรวจสอบ clone ด้วย gene specific primer (Hoffmann *et al.*, 2001) และ Bigdye Terminator version 3.1 chemistry (Applied Biosystems, USA) แล้วจึงทำปฏิกิริยาในเครื่อง 3100 DNA analyzer (Applied Biosystems, USA) การหาลำดับเบสดำเนินไปทั้ง 2 ทิศทางของ universal M13 primer (pGEM-T vector) หลังขั้นตอน sequencing ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปโดยใช้ Bioedit software version 7.0.4.1 (Thompson *et al.*, 1994) จากนั้นจึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA, version 4) (Tamura *et al.*, 2007)

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

เก็บตัวอย่างสมองและอวัยวะภายในแช่ในน้ำยา 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลินนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาเข้ากระบวนการทำสไลด์เนื้อเยื่อและย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin ตามวิธีมาตรฐานทางพยาธิวิทยา (Luna, 1968) แล้วนำมาตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

การตรวจโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

นำตัวอย่างที่เป็นพาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อ จากกระบวนการทำสไลด์เนื้อเยื่อเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ตัดด้วยไมโครทอมหนาประมาณ 3-4 ไมครอน วางบน positive charge slide จากนั้นนำสไลด์เนื้อเยื่อตัวอย่าง และสไลด์ควบคุมบวกและลบ มาเข้ากระบวนการวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry/IHC) โดยนำสไลด์เนื้อเยื่อผ่านกระบวนการดิงพาราฟินและทำให้ชุ่มน้ำอีกครั้ง กำจัด endogenous peroxidase ภายในเนื้อเยื่อด้วย 3% hydrogen peroxide ในเมทานอล เปิด epitope ด้วย proteinase K ready-to-use (DakoTM) เป็นเวลา 15 นาที ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะด้วย 5% skim milk ในน้ำยา PBS เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผ่านกระบวนการย้อมสีด้วยวิธี IHC โดยใช้ mouse-derived monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ nucleoprotein of type-A influenza virus (clone EVS 238 HB65 like) ความเข้มข้น 1:1,000 โดยเจือจางใน 1% bovine serum albumin ปลอ่ยให้ทำปฏิกิริยาค้างคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาย้อมต่อ ด้วย detection kit En-vision (DakoTM:K4001) ทำให้เห็นสีด้วย 3-amine 9-ethyl carbozole (AEC) จากนั้น ตรวจดูรูปแบบการติดสีเฉพาะของ type-A influenza virus แอนติเจน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างอวัยวะภายในที่สำคัญเช่น สมอง หัวใจ ปอด ตับ ไต และ ม้าม ทำการเพาะแยกเชื้อดังนี้ สำหรับเชื้อทั่วไปจะเพาะแยกเชื้อจากอวัยวะในแต่ละชนิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar และ MacConkey agar ถ้าต้องการเพาะเชื้อชนิดอื่นเช่น *Mycoplasma* spp. *Ureaplasma* spp. *Campylobacter* spp. *Salmonella* spp. และ *Brachyspira* spp. จะเพาะแยกเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษที่จำเพาะต่อเชื้อชนิดนั้น (selective media) เมื่อเพาะแยกเชื้อเสร็จนำไปป้อนในตู้บ่มเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อชนิดนั้น ตามระยะเวลาที่กำหนดสำหรับเชื้อแต่ละชนิด แล้วนำมาพิสูจน์เชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ หรือใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล เมื่อพิสูจน์เชื้อแล้ว นำเชื้อที่สามารถทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพได้ด้วยวิธี Disk diffusion test มาทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพเพื่อเลือกหายาต้านจุลชีพที่เหมาะสมสำหรับการรักษา

การตรวจทางปรสิตวิทยา

ตรวจหาปรสิตในระบบทางเดินอาหาร โดยวิธีลอยตัว (Flotation technique) ตามวิธีของสุวรรณณี (2540) และตรวจปรสิตในระบบหมุนเวียนโลหิต ตามวิธีของกลุ่มงานปรสิตวิทยา (2536)

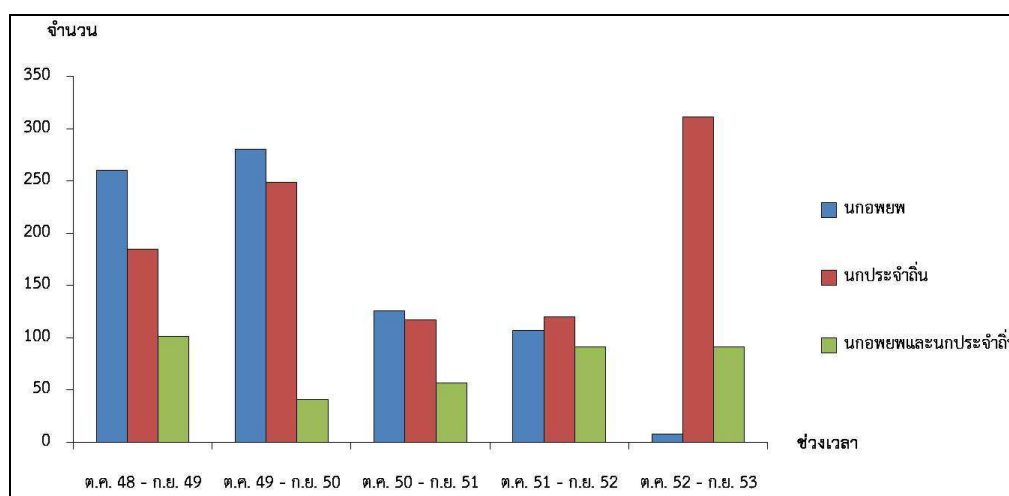
ผล

จากการตรวจ cloacal swab จำนวน 2,144 ตัวอย่าง เพื่อหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธีทางไวรัสวิทยา พบว่าให้ผลลบทั้งหมด รายละเอียดของ cloacal swab แสดงในตารางที่ 1 ในรูปที่ 1 และรูปที่ 2

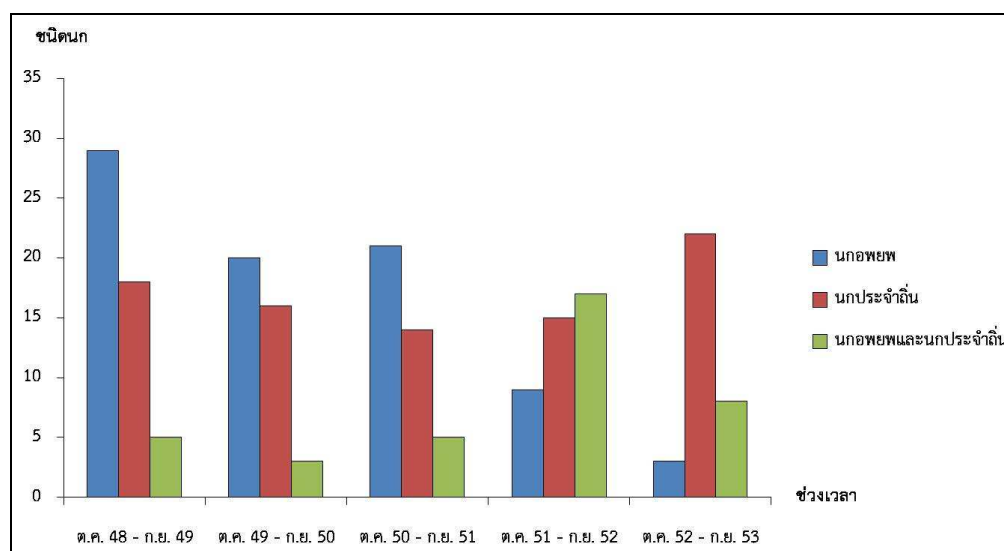
ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจหาเชื้อไข้หวัดนก ตั้งแต่ ตุลาคม 2548 – กันยายน 2553

ช่วงเวลา	นกอพยพ			นกประจำถิ่น			นกอพยพและนกประจำถิ่น			รวม			
	cloacal	จังหวัด	ชนิด	cloacal	จังหวัด	ชนิด	cloacal	จังหวัด	ชนิด	cloacal	ผลการตรวจ ทางไวรัส วิทยา	* จังหวัด ที่เก็บ	ชนิด
	swab	ที่เก็บ	นก	swab	ที่เก็บ	นก	swab	ที่เก็บ	นก	swab			
ต.ค. 48–ก.ย. 49	260	11	29	185	11	18	101	6	5	546	-	20	52
ต.ค. 49–ก.ย. 50	280	22	20	249	21	16	41	11	3	570	-	35	39
ต.ค. 50–ก.ย. 51	126	23	21	117	27	14	57	7	5	300	-	31	40
ต.ค. 51–ก.ย. 52	107	21	9	120	32	15	91	17	17	318	-	45	41
ต.ค. 52–ก.ย. 53	8	3	3	311	32	22	91	14	8	410	-	34	33

* หมายเหตุ เนื่องจากบางตัวอย่างจากนกทั้ง 3 กลุ่มมาจากจังหวัดเดียวกัน ดังนั้นจำนวนจังหวัดรวมจึงเท่ากับค่าที่แสดงในตาราง



รูปที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่าง cloacal swab ของนกอพยพ นกประจำถิ่นและนกอพยพและนกประจำถิ่น



รูปที่ 2 แสดงจำนวนชนิดของนกอพยพ นกประจำถิ่น และนกอพยพและนกประจำถิ่น

ส่วนการตรวจซากนกโดยวิธีทางไวรัสวิทยา และอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่าไม่พบเชื้อไข้หวัดนกจากตัวอย่างทั้งหมด ส่วนผลการชันสูตรโรคมียังนี้ ต.ค. 48 - ก.ย. 49 ตรวจตัวอย่างซากนก จำนวน 206 ซากจาก 25 จังหวัด พบ Colibacillosis 14 ตัวอย่าง Intestinal parasite infestation 10 ตัวอย่าง Streptococcosis 2 ตัวอย่าง Salmonellosis 2 ตัวอย่าง Aspergillosis 1 ตัวอย่าง ต.ค. 49 - ก.ย. 50 ตรวจตัวอย่างซากนก จำนวน 226 ซากจาก 13 จังหวัด พบ Intestinal parasitic infestation 14 ตัวอย่าง Colibacillosis 1 ตัวอย่าง Coccidiosis 2 ตัวอย่าง และ Staphylococcosis 2 ตัวอย่าง ต.ค. 50 - ก.ย. 51 ตรวจตัวอย่างซากนกทาง จำนวน 90 ซากจาก 34 จังหวัด พบ Intestinal parasitic infestation 7 ตัวอย่าง Coccidiosis 6 ตัวอย่าง Pasteurellosis 1 ตัวอย่าง ต.ค. 51 - ก.ย. 52 ตรวจตัวอย่างซากนก จำนวน 50 ซาก จาก 16 จังหวัด พบ Intestinal parasitic infestation 10 ตัวอย่าง Coccidiosis 6 ตัวอย่าง ต.ค. 52 - ก.ย. 53 ตรวจตัวอย่างซากนก จำนวน 33 ซาก จาก 8 จังหวัด พบ Intestinal parasitic infestation 7 ตัวอย่าง Coccidiosis 3 ตัวอย่าง Haemoproteus infection 2 ตัวอย่าง Histomoniasis 6 ตัวอย่าง Colibacillosis 2 ตัวอย่าง Salmonellosis 1 ตัวอย่าง Fowl pox 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงโรคที่พบจากซากนกในธรรมชาติ

โรคที่พบ	ช่วงเวลา				
	ต.ค. 48 - ก.ย. 49	ต.ค. 49 - ก.ย. 50	ต.ค. 50 - ก.ย. 51	ต.ค. 51 - ก.ย. 52	ต.ค. 52 - ก.ย. 53
Colibacillosis	14	1	-	-	2
Streptococcosis	2	-	-	-	-
Salmonellosis	2	-	-	-	1
Staphylococcosis	-	2	-	-	-
Pasteurellosis	-	-	1	-	-
Aspergillosis	1	-	-	-	-
Intestinal parasite infestation	10	14	7	10	7
Coccidiosis	-	2	6	6	3
Histomoniasis	-	-	-	-	6
Haemoproteus	-	-	-	-	2
Fowl pox	-	-	-	-	1

วิจารณ์

จากการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกทั้งเชิงรุก (การตรวจตัวอย่าง cloacal swab) และเชิงรับ (การตรวจตัวอย่างซากนกในธรรมชาติ) เป็นระยะเวลา 5 ปี จากตัวอย่างจำนวนมาก และในพื้นที่กว้างขวางทั่วประเทศ พบว่าไม่พบเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในตัวอย่างดังกล่าว อาจเนื่องจากการสำรวจในช่วงที่มีการระบาดของโรคน้อยลง ซึ่งจากข้อมูลการรายงานโรคในสัตว์ปีกที่เป็นอาหารของกรมปศุสัตว์ต่อองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) พบการระบาดลดความรุนแรงลงเป็นลำดับ โดยในช่วงปี พ.ศ. 2547 เกิดโรคถึง 1,740 outbreaks ใน 60 จังหวัด ปี พ.ศ. 2548 เกิดโรค 194 ครั้งใน 21 จังหวัด ปี พ.ศ. 2549 เกิดโรค 2 ครั้งใน 2 จังหวัด ปี พ.ศ. 2550 เกิดโรค 4 ครั้งใน 4 จังหวัด และปี พ.ศ. 2551 เกิดโรค 4 ครั้งใน 4 จังหวัด (ชุดิพนธ์ และ พรพิรุณ, 2552.) ซึ่งสอดคล้องกับผลการสำรวจโรคไข้หวัดนกในนกในธรรมชาติของ Siengsan et al. (2009) ในช่วงปี พ.ศ. 2547 ถึง 2550 ซึ่งตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดนกน้อยลงตามลำดับ และน้อยลงมากที่สุดในปี พ.ศ. 2550 ซึ่งในปี พ.ศ. 2547 การสำรวจและเฝ้าระวังในประเทศอื่นๆ ก็พบไม่มากหรือไม่พบเลย ดังเช่นฮ่องกง ตรวจตัวอย่างโรคไข้หวัดนกจากนกธรรมชาติถึง 2,200 ตัวอย่าง ผลไม่พบเลย (Sabirovic et al., 2005) และในปี พ.ศ. 2548 สถานการณ์ทั่วโลกก็พบว่าการรายงานโรคไข้หวัดนกในนกธรรมชาติลดลง (Chen et al., 2006) ในเกาหลีได้มีการเกิดโรคในนกธรรมชาติเป็นครั้งแรก เช่นพบในนกสาลิกา (*Magpie Pica pica*) เพียง 3 ตัว ตายอยู่ใกล้ฟาร์มไก่ที่มีการติดเชื้อโรคไข้หวัดนก (Kwon et al., 2005)

จากการที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการสำรวจและเฝ้าระวังในครั้งนี้ทำให้ไม่สามารถเฝ้าระวังในระดับชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของเชื้อได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันจากข้อมูลการเรียงลำดับเบสของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ตรวจพบในประเทศไทย ระหว่างปี 2547 ถึง 2551 จัดอยู่ใน clade 1 เป็นส่วนใหญ่ของประเทศ และ clade 2.3.4 พบทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือในช่วงปี 2546 ถึง 2550 ซึ่งถือว่ายังไม่มีเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อต้นแบบของแต่ละ clade (Bandit et al., 2008)

สำหรับผลการชันสูตรโรคจากซากนกในธรรมชาติ พบว่าสรุปผลการชันสูตรได้ไม่มากอาจเกิดจากสภาพตัวอย่างไม่เหมาะสมในการตรวจพิสูจน์สาเหตุ เนื่องจากสัตว์ตายอยู่ในธรรมชาติ ไม่สามารถเก็บตัวอย่างตรวจได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามโรคที่พบเป็นโรคที่ไม่ทำอันตรายในวงกว้าง เนื่องจากไม่ใช่โรคระบาดที่ร้ายแรง

จากการสำรวจและเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนกในนกในธรรมชาติในครั้งนี้ อาจกล่าวได้ว่า นกในธรรมชาติในประเทศไทย ไม่มีความเสี่ยงในการนำโรคไข้หวัดนก อย่างไรก็ตามหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจำเป็นต้องทำการเฝ้าระวังต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลในการเตรียมการวางแผนยุทธศาสตร์โรคไข้หวัดนกของประเทศ เพื่อประโยชน์ทางการสาธารณสุข การเลี้ยงสัตว์ทั้งภาคครัวเรือนและภาคอุตสาหกรรม การค้าระหว่างประเทศ และระบบเฝ้าระวังโรคขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) โดยควรทำการสำรวจในเชิงรุกเฉพาะในพื้นที่ที่มีความเสี่ยงโดยทำพร้อมกันในพื้นที่เดียวกัน ทั้งในนกธรรมชาติและสัตว์ปีกที่เป็นอาหาร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มไวรัสวิทยา แบคทีเรียวิทยา ปรสิตวิทยา ระบาดวิทยาทางห้องปฏิบัติการและกลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติและศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาค 7 แห่ง ของกรมปศุสัตว์ที่ได้ตรวจวินิจฉัยหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค และเจ้าหน้าที่ของสำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช ที่ได้เก็บตัวอย่าง cloacal swab และซากนกส่งห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มงานปาสติวิทยา. 2536. การตรวจและวินิจฉัยโรคทางปาสติวิทยาในปศุสัตว์. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์. 41 หน้า.
- ชุดิพนธ์ ศิริมงคลรัตน์ และพรพิรุณ ชินสอน. 2552. การแก้ไขปัญหาโรคไข้หวัดนกในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2547-2551. ศูนย์ควบคุมโรคไข้หวัดนก สำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ หน้า 1-4.
- บุษบง กาญจนสาขา และ ดวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง. 2547. รายงานการศึกษาเชื้อไข้หวัดนกในนกปากห่างในประเทศไทย เอกสารวิชาการกลุ่มวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช.
- สุวรรณี นิธิอุทัย. 2540. การตรวจวินิจฉัยปรีตในอุจจาระ. เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคปริตทางสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 3-7.
- Alexander, D.J. and Spackman, D. 1981. Characterization of influenza A viruses isolated from turkeys during March – May 1979. *Avian Pathol.* 10: 281-293.
- Nuansrichay, B., Vitoonpong, R., Parchariyanon, S., Chaishing, A. 2008. Phylogenetic characterization of avian influenza H5N1 subtype viruses isolated in Thailand during 2006-2008. *Thai-NIAH eJournal: ISSN 1905-5048, <http://www.dld.go.th/niah>, V3 N2 (September – December 2008) pp. 205–217.*
- Chen, H., Smith, G.J.D., Li, K.S., Wang, J., Fan, X.H., Rayner, J.M., Vijaykrishna, D., Zhang, J.X., Zhang, L.J., Guo, C.T., Cheung, C.L., Xu, K.M., Duan, L., Huang, K., Qin, K., Leung, Y.H.C., Wu, W.L., Lu, H.R., Chen, Y., Xia, N.S., Naipospos, T.S.P., Yuen, K.Y., Hassan, S.S., Bahri, S., Nguyen, T.D., Webster, R.G., Peiris, J.S.M. & Guan, Y. 2006. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 2845–2850.
- Feare, C.J. & Yasue, M. 2006. Asymptomatic infection with highly pathogenic avian influenza H5N1 In wild birds: how sound is the evidence? *Virol. J.* 3: 96.
- Gauthier-Clerc, M., Lebarbenchon, C. & Thomas, F. 2007. Recent expansion of highly pathogenic avian influenza H5N1: a critical review. *Ibis* 149: 202–214.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster R.G. and Perez, D.R., 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virology.* 146: 2275–2289.
- Kilpatrick, A.M., Chmura, A.A., Gibbons, D.W., Fleischer, R.C., Marra, P.P. & Daszak, P. 2006. Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 19368–19373.
- Kwon, Y.-K., Joh, S.-J., Kim, M.-C., Lee, Y.-J., Choi, J.-G., Lee, E.-K., Wee, S.-H., Sung, H.-W., Kwon, J.-H., Kang, M.-I. & Kim, J.-H. 2005. Highly pathogenic avian influenza in Magpies (*Pica pica sericea*) in South Korea. *J. Wildlife Dis.* 41: 618–623.
- Luna, L.G. 1968. Manual of histologic staining method of the Arm Forces Institute of Pathology. 3rd ed. McGraw-Hill Book company, New York. USA. p. 207–235.
- Office International des Epizooties. 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: 465-481.
- Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A. & Fouchier, R.A.M. 2006. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 312: 384–388.
- Sabirovic, M., Raw, L., Hall, S. & Coulson, N. 2005. International disease monitoring, October to December 2004. *Vet Record* 156: 193–196.
- Siengsanon, J., Chaichoune, K., Phonaknguen, R., Sariya, L., Prompiram, P., Kocharin, W., Tangsudjai, S., Suwanpukdee, S., Wiriyarat, W., Pattanarangsang, R., Robertson, I., Blacksell, S.D. and Ratanakorn, P. 2009. Comparison of outbreaks of H5N1 highly pathogenic avian influenza in wild birds and poultry in Thailand. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(3), 2009, pp. 740-747.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007 MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position – specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673–4680.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M. & Kawaoka, Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56: 152–179.

Surveillance and monitoring of avian influenza in natural birds in Thailand during 2005 – 2010

Tuangthong Patchimasiri^{1*} Duangrat Pothieng² Sarayuth Kaewkalong¹ Bandit Nuansrichay¹

¹ National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Pahonyothin road, Kasetklang, Chatuchak, Bangkok 10900

² Wildlife Conservation Office, National Park, Wildlife and Plant Conservation Department

* Corresponding person: Tel. +662-579-8908 to 14 Fax. +662-579-8918 to 19 E-mail: tuangthongp@dld.go.th

Abstract

Surveillance and monitoring of highly pathogenic avian influenza (HPAI) in migratory birds, residential birds, and migratory and residential birds were virologically and immunohistochemically performed to detect HPAI virus and HPAI virus antigen during 2005 – 2010 in a total number of 2,144 cloacal swabs and 605 natural bird carcasses. The cloacal swabs were collected from the risky area such as the outbreak area, the area of high density of natural bird, migratory bird colony area, and the community nearby area around the country. The results show no HPAI virus and HPAI virus antigen detection from cloacal swabs and natural bird carcasses respectively. Our results indicated that natural birds could not serve as vectors for the introduction of HPAI in Thailand.

Key words: HPAI virus, Surveillance and monitoring, Virology, Immunohistochemistry technique