มาตรฐานสินค้าเกษตร

มกษ. 10050-2556

THAI AGRICULTURAL STANDARD

TAS 10050-2013

การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร

DIAGNOSIS OF SWINE INFLUENZA

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ICS 11.220 ISBN

มาตรฐานสินค้าเกษตร

มกษ. 10050-2556

THAI AGRICULTURAL STANDARD

TAS 10050-2013

การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร

DIAGNOSIS OF SWINE INFLUENZA

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
50 ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 0 2561 2277 โทรสาร 0 2561 3357
www.acfs.go.th

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 130 ตอนพิเศษ 76 ง
วันที่ 25 มิถุนายน พุทธศักราช 2556

คณะกรรมการวิชาการพิจารณามาตรฐานสินค้าเกษตร
เรื่อง การชันสูตรโรคระบบทางเดินหายใจในสุกร

1. นายนิรันดร เอื้องตระกูลสุข ประธานกรรมการ
   กรมปศุสัตว์
2. นายพลายยงค์ สการะเศรณี กรรมการ
   กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
3. นายชัยศิริ มหันตชัยสกุล กรรมการ
   สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
4. นางสาวณัฐวดี ภมรานนท์ กรรมการ
   สำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์
5. นางสุจิรา ปาจริยานนท์ กรรมการ
   สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
6. ผู้ช่วยศาสตราจารย์คมกฤช เทียนคำ กรรมการ
   คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7. รองศาสตราจารย์กิจจา อุไรรงค์ กรรมการ
   คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
8. นายกฤษฎากรณ์ พริ้งเพราะ กรรมการ
   คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
9. นายจำลอง มิตรชาวไทย กรรมการ
   คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
10. นายวิทวัช วิริยะรัตน์ กรรมการ
    คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
11. นายเกียรติภูมิ พฤกษะวัน กรรมการ
    สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ
12. นายรชฎ ตันติเลิศเจริญ กรรมการ
    สมาคมเวชศาสตร์ชันสูตรทางสัตวแพทย์ไทย
13. นายวิลาส วิบูลย์ศิริกุล กรรมการ
    สมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย

14. ศาสตราจารย์รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช กรรมการ
ผู้ทรงคุณวุฒิด้านการชันสูตรโรคในสุกร

15. นางสาวสคราญมณี กระจ่างวงษ์ กรรมการและเลขานุการ
สำนักกำหนดมาตรฐาน
สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza) เป็นโรคระบบทางเดินหายใจในสุกรที่มีสาเหตุจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ซึ่งมีความเสี่ยงของการแพร่กระจายโรคมาสู่มนุษย์ ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และเป็นปัญหาด้านสาธารณสุข นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสเกิดเป็นสายพันธุ์ย่อยของไวรัสส่งผลต่อความถูกต้องและแม่นยำในการวินิจฉัยโรค ดังนั้นคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรจึงเห็นควรจัดทำมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร เพื่อใช้เป็นแนวทางปฏิบัติสำหรับห้องปฏิบัติการเพื่อการชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร และเป็นคู่มือเพื่อประกอบการรับรองมาตรฐานฟาร์มสุกรต่อไป

มาตรฐานสินค้าเกษตรนี้ กำหนดขึ้นโดยใช้เอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

ข้อมูลจากผลการศึกษาโครงการการศึกษาวิธีการชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร ของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

World Organisation for Animal Health (OIE). 2010. Chapter 2.8.8. Swine Influenza. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris, France.

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร
ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตร ได้มีมติในการประชุมครั้งที่ ๑/๒๕๕๖ เมื่อวันที่ ๖ มีนาคม ๒๕๕๖ เห็นสมควรกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร เป็นมาตรฐานทั่วไป ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑ เพื่อส่งเสริมสินค้าเกษตรให้ได้คุณภาพ มาตรฐาน และปลอดภัย

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๕ มาตรา ๑๕ และมาตรา ๑๖ แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงออกประกาศ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร มาตรฐานเลขที่ มกษ. 10050-2556 ไว้เป็นมาตรฐานทั่วไป ดังมีรายละเอียดแนบท้ายประกาศนี้

ประกาศ ณ วันที่ ๒๐ เมษายน พ.ศ. ๒๕๕๖

ยุคล ลิ้มแหลมทอง

(นายยุคล ลิ้มแหลมทอง)
รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

มาตรฐานสินค้าเกษตร

การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร

1. ขอบข่าย

มาตรฐานสินค้าเกษตรนี้ กำหนดรายละเอียดที่สำคัญเกี่ยวกับการชันสูตรทางห้องปฏิบัติการ เพื่อชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza) ที่มีสาเหตุจากไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิดเอ ชนิดย่อยเอช 1 และเอช 3 (influenza virus type A, subtype H1 and H3)

2. นิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 การชันสูตรโรค (diagnosis) หมายถึง การตรวจสอบหาหลักฐาน สาเหตุ หรือข้อเท็จจริง เพื่อประกอบการวินิจฉัยโรค

2.2 โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza) หมายถึง โรคติดต่อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจในสุกรที่มีสาเหตุจากไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิดเอ ชนิดย่อยเอช 1 และ เอช 3 หรือในมาตรฐานนี้เรียกว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร

2.3 สุกร (swine) หมายถึง สัตว์ในวงศ์ Suidae เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม มีกีบคู่ ทั้งที่เป็นสัตว์เลี้ยงและที่เป็นสัตว์ป่า

2.4 ชุดควบคุมผลบวก (positive control set) หมายถึง ชุดทดสอบที่มีเชื้อมาตรฐาน เพื่อใช้ดูผลเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ต้องการตรวจ

2.5 ชุดควบคุมผลลบ (negative control set) หมายถึง ชุดทดสอบที่ไม่มีเชื้อมาตรฐาน เพื่อใช้ดูผลเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ต้องการตรวจ

2.6 ห้องปฏิบัติการชีวนิรภัย หรือห้องปฏิบัติการปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety laboratory) หมายถึง ห้องปฏิบัติการที่สามารถป้องกันอันตรายจากการสัมผัสกับวัตถุชีวภาพ เช่น เชื้อโรค เลือด เนื้อเยื่อ สารพันธุกรรม

สารพิษ ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในห้องปฏิบัติการนั้น ๆ โดยต้องมีขั้นตอนปฏิบัติการที่ปลอดภัย เพื่อลดความเสี่ยงต่อการสัมผัสและป้องกันการแพร่กระจายของวัตถุชีวภาพดังกล่าว

3. การชันสูตรโรค

การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกรโดยใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ พยาธิวิทยา วิทยาภูมิคุ้มกัน วิทยาไวรัส และชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งเป็นวิธีที่ระบุอยู่ในคู่มือการชันสูตรโรคและการใช้วัคซีนในสัตว์บก (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (The World Organisation for Animal Health; OIE) หรือวิธีที่มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าหรือดีกว่า และได้รับการเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ โดยมีการปรับวิธีการชันสูตรโรคให้เหมาะสมกับไวรัสที่พบในประเทศไทย

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่ส่งผลกระทบต่อระบบการผลิตสุกร และอาจก่ออันตรายต่อสุขภาพมนุษย์ (ภาคผนวก ก) และเป็นไวรัสที่มีความเสี่ยงสูงในการแพร่กระจายของเชื้อภายในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร ควรดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัย ซึ่งมีความพร้อมทั้งสถานที่ เครื่องมือเครื่องใช้ วัสดุอุปกรณ์ และระบบการปฏิบัติงาน รวมทั้งบุคลากรมีความรู้ความชำนาญเกี่ยวกับการปฏิบัติงานที่ดีในห้องปฏิบัติการ (good laboratory practices)

3.1 การชักตัวอย่าง

ให้เป็นไปตามภาคผนวก ข

3.2 การเก็บและนำส่งตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างต้องมีวิธีและปริมาณที่เหมาะสม และนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด การเก็บและนำส่งตัวอย่างที่ถูกวิธีจะมีผลทำให้การชันสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการมีความถูกต้องขึ้น ตัวอย่างที่ใช้ในการชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกรสามารถเก็บจากสุกรมีชีวิตที่ป่วยหรือสงสัยว่าติดเชื้อโดยการป้ายกวาดโพรงจมูก (nasal swab) หรือเก็บตัวอย่างเลือด ส่วนสุกรหลังตายให้เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปอด

3.2.1 การเก็บตัวอย่างจากสุกรมีชีวิต

3.2.1.1 สิ่งคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ สำหรับนำไปตรวจหาไวรัส (virus identification) โดยใช้ไม้ป้าย (swab) ป้ายกวาดสิ่งคัดหลั่งจากเยื่อเมือกในโพรงจมูกของสุกรที่แสดงอาการป่วย ภายใน 24 - 48 ชั่วโมง

(ภาคผนวก ค) หลังจากนั้นให้จุ่มลงในน้ำยาเก็บรักษาไวรัส (viral transport media) หรือน้ำยาเก็บรักษาไวรัสอื่น ๆ ที่ผสมยาปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ง ข้อ ง.2)

การเก็บไม้ป้ายที่ป้ายกวาดตัวอย่าง อาจเก็บรวมกันในน้ำยาเก็บรักษาไวรัสได้จำนวน 5 ตัวอย่างต่อหลอด ให้นำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการทันทีหรือภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างในภาชนะที่ปิดสนิทป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (°C) (หรือ 2 - 8°C) ไม่ควรแช่แข็งตัวอย่างที่ส่งตรวจ

3.2.1.2 ซีรัม สำหรับการตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกัน โดยเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) 3 - 5 มิลลิลิตร (ml) และเก็บตัวอย่างซีรัมคู่ (paired sera) ห่างกัน 10 - 21 วัน เพื่อดูผลการเพิ่มขึ้นของระดับภูมิคุ้มกัน

3.2.2 การเก็บตัวอย่างจากสุกรหลังตาย

3.2.2.1 ให้เก็บเนื้อเยื่อปอดโดยเฉพาะที่มีหลอดลมฝอยที่ไม่เกิดการเสื่อมสลายตัวเองหลังตาย (post mortem autolysis) โดยเลือกเก็บทั้งบริเวณรอยต่อที่ปกติและที่มีรอยโรค ประมาณชิ้นละ 3 - 4 กรัม (g) ใส่ถุงเก็บตัวอย่าง 2 ชั้น ติดฉลากและระบุข้อมูลให้ชัดเจน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 - 4 °C นำส่งตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว ภายใน 24 ชั่วโมง ต้องไม่นำเนื้อเยื่อปอดที่เก็บจากสุกรแต่ละตัวมารวมกันในถุงเก็บตัวอย่างเดียวกัน

3.3 การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร

การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร ต้องดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัย โดยแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

(1) การตรวจหาไวรัส (virus identification) โดยเพาะแยกเชื้อในไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยง และตรวจหาแอนติเจนหรือสารพันธุกรรมของไวรัส ต้องตรวจหาคุณสมบัติการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย haemagglutination test (HA test) เพื่อยืนยันว่าเป็นไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิดเอ หรือเชื้อชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกัน ก่อนทำการเพาะแยกเชื้อไวรัส ทั้งนี้หากผลการตรวจ HA test เป็นบวกให้ดำเนินการตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น haemagglutination inhibition test (HI test) เพื่อตรวจหาการยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ภาคผนวก จ) หรือตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้แก่ วิธี reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) (ภาคผนวก ฉ) หรือ real-time RT-PCR เป็นต้น

อาจตรวจหาแอนติเจนในชิ้นเนื้อหรือตัวอย่างที่ส่งตรวจ โดยวิธี fluorescent antibody test หรือ immunohistochemistry (ภาคผนวก ช) หรือใช้วิธีอื่นที่องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศรับรอง

(2) การตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เพื่อวัดระดับแอนติบอดี (antibody) ต่อโปรตีน haemagglutinin ซึ่งมีความจำเพาะต่อไวรัสชนิดย่อยที่ใช้ในการทดสอบ เช่น HI test เพื่อดูระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้อาจใช้วิธี agar gel immunodiffusion test, indirect fluorescent antibody test, virus neutralization test หรือ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ตามที่องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศรับรอง

3.3.1 วิธีการตรวจหาไวรัส

3.3.1.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการเพาะแยกไวรัส

(1) นำตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ (ข้อ 3.2.1.1) มาเขย่าในหลอดปั่นเหวี่ยงอย่างแรง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 - 1,900 *g* (acceleration due to gravity) นาน 15 -30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

(2) ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อปอด (ข้อ 3.2.2) ให้เลือกตัดชิ้นเนื้อปอดที่มีรอยโรคบริเวณที่ติดหลอดลมฝอย ประมาณ 1 g ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปบดในโกร่งบดโดยใช้ทรายละเอียดช่วยในการบด ใส่ PBS 5 - 10 ml คนให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 -1,900 *g* นาน 15 - 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

(3) นำส่วนใส (supernatant) ใส่ยาปฏิชีวนะ เช่น เจนทาไมซิน (gentamycin) 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (μg/ml) หรือ เพนนิซิลลิน (penicillin) (10,000 ยูนิต/มิลลิลิตร (units/ml): สเตรปโทไมซิน (streptomycin) 10,000 units/ml และฟังจิโซน (2% fungizone) 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร(mg/ml) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อน หรือกำจัดแบคทีเรียในส่วนใสดังกล่าวด้วยวิธีอื่น เช่น กรองเอาแบคทีเรียออกด้วยเยื่อแผ่นกรอง (membrane filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (μm) (อาจมีผลทำให้จำนวนไวรัสน้อยลง)

(4) ดูดส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำไปใช้ในการเพาะแยกไวรัสในไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยง หรือหากต้องการเก็บตัวอย่างนานกว่า 24 ชั่วโมง ให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C

3.3.1.2 การเพาะแยกและเพิ่มจำนวนไวรัส ในไข่ไก่ฟัก

(1) ใช้ไข่ไก่ฟักอายุ 10 -11 วัน จำนวน 3 - 4 ฟอง ต่อ 1 ตัวอย่าง ในการเพาะแยกไวรัส

(2) ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าถุงแอมเนียน (amniotic sac) และถุงแอลแลนทอย (allantoic sac) (ภาพที่ ฎ.5) ขนาด 0.1 - 0.2 ml

(3) บ่มที่อุณหภูมิ 35 - 37°C นาน 3 - 4 วัน ตรวจการตายของตัวอ่อนในไข่ไก่ฟักทุก 24 ชั่วโมง ไข่ฟักที่ตัวอ่อนตายภายใน 24 ชั่วโมงแรกให้คัดออก

(4) นำไข่ไก่ฟักที่ตัวอ่อนตาย หรือเมื่อครบกำหนดการบ่มภายหลังการฉีดไวรัส แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 12 ชั่วโมง หรือแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 1 ชั่วโมง

(5) เก็บของเหลวจากไข่ไก่ฟัก ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 - 1,900 *g* นาน 10 - 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำไปทดสอบคุณสมบัติการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย HA test (ภาคผนวก จ ข้อ จ.2)

(6) หาก HA test ให้ผลบวกให้ตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่นต่อไป เช่น RT- PCR (ภาคผนวก ฉ)

(7) หาก HA test ให้ผลลบ ให้นำของเหลวจากไข่ไก่ฟัก ไปทำซ้ำ (second passage) ในขั้นตอนที่ (1) - (6) อีกครั้งหนึ่ง

3.3.1.3 การเพาะแยกและเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่องที่นิยมใช้คือ Madin Darby Canine Kidney (MDCK) ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงอื่นที่สามารถใช้ได้ เช่น เซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่องจากปอดมิ้ง (mink lung cell line) เซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิจากไตสุกร (primary porcine kidney cells) การเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นจะต้องเติมสารละลาย trypsin ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย เพื่อช่วยในการย่อยแยกโปรตีน haemagglutinin เป็น HA1 และ HA2 ก่อนที่ HA1 จะจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ต่อไป

(1) การเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ ให้นำ MDCK มาเพาะเลี้ยงในจานอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม โดยให้มีปริมาณเซลล์ไม่น้อยกว่า 10^6 cell/ml ในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ (minimal essential medium; MEM) ที่มี 5% Fetal Bovine Serum (FBS) (ภาคผนวก ง. ข้อ ง.4) ใส่หลุมละ 1 ml

(2) นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นานประมาณ 48 ชั่วโมง จนเซลล์โตเต็มที่ มีลักษณะแผ่ขยายเป็นชั้นเดียว (confluent monolayer) จนเต็มพื้นที่หลุม หรือประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่หลุม

(3) นำ confluent monolayer มาล้างด้วย PBS หรือ MEM 3 ครั้ง ครั้งละ 0.5 ml และดูดน้ำล้างออกให้หมด

(4) เติมสารละลายไวรัส 0.2 - 0.3 ml โดยเจือจางสารละลายด้วย PBS เป็น 1:1, 1:2 และ 1:3 ควรทำซ้ำอย่างน้อย 2 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 45 - 60 นาที

(5) ดูดสารละลายบน confluent monolayer ทิ้ง

(6) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนผสมของ MEM, และ trypsin 1 μg/ml หลุมละ 1 ml นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2

(7) สังเกตการเกิด cytopathic effect (CPE) ทุกวัน เป็นเวลา 5-7 วัน

(8) หากไม่พบ CPE ให้เก็บเซลล์พร้อมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C จนแข็งตัวและนำออกมาละลายที่อุณหภูมิ 0 - 4°C ทำซ้ำ 2 - 3 รอบ แล้วนำไปทำซ้ำ (second passage) โดยผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงในขั้นตอนที่ (4) - (7) อีกครั้งหนึ่ง เพื่อยืนยันการพบไวรัสและนำไปตรวจด้วยวิธีอื่นต่อไป เช่น HA test หรือ RT- PCR

หากต้องการทราบปริมาณไวรัส อาจใช้การตรวจปริมาณไวรัสโดยการไทเทรต (ภาคผนวก ซ) และย้อมด้วยเทคนิค immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (ภาคผนวก ฌ)

(9) การแปลผล ให้พิจารณาจากการเกิด CPE ของเซลล์เพาะเลี้ยง ร่วมกับการตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่น

3.3.2 การตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

การตรวจหาภูมิคุ้มกันหรือระดับแอนติบอดีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นการวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน haemagglutinin ซึ่งมีความจำเพาะต่อไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิดเอ ชนิดย่อยต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ สามารถใช้ประโยชน์ในการระบุถึงการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรชนิดย่อยเอช1 และ เอช 3 ได้ ในกรณีที่ไม่มีการใช้วัคซีนไข้หวัดใหญ่สุกร วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันที่ใช้เป็นมาตรฐาน คือ HI test โดยเก็บตัวอย่างซีรัมคู่ห่างกัน 10 - 21 วัน เพื่อดูระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น หากระดับแอนติบอดีจากการตรวจซีรัมครั้งที่ 2 สูงกว่าครั้งแรก 4 เท่า แสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ชนิดย่อยนั้น ๆ

ภาคผนวก ก

วิทยาการระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคไข้หวัดใหญ่สุกร

(ข้อ 3)

ก.1 วิทยาการระบาด

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza) เกิดจากการติดไวรัสอินฟลูเอนซา (influenza virus) จัดอยู่ในวงศ์ Orthomyxoviridae กลุ่มไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิดเอ ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว (single-stranded RNA) ปกติมีรูปร่างกลม แต่ถ้าเลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงนาน ๆ จะมีรูปร่างเป็นเส้น มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 80 - 120 นาโนเมตร (nm) โครงสร้างของไวรัสประกอบด้วยเปลือกหุ้มชั้นนอกสุด (envelope) เป็นไขมันที่ผิวนอกของเปลือกหุ้มมีไกลโคโปรตีนยื่นออกมา 2 ชนิด คือ ฮีแมกกลูตินิน (haemagglutinin) มีรูปร่างเป็นแท่ง และนิวรามินิเดส (neuraminidase) มีรูปร่างเหมือนดอกเห็ด ถัดเข้ามาจากเปลือกหุ้มเป็นชั้นของร่างแหโปรตีน (matrix protein; M) มี 2 ชั้น คือ M1 และ M2 โดยชั้น M2 อยู่ถัดจากเปลือกหุ้ม ลักษณะเป็นโครงสร้างบาง ๆ ประกอบด้วยโมเลกุลของโปรตีนประมาณ 20-60 โมเลกุลต่อไวริออน (virion) ถัดไปเป็นชั้นของ M1 ซึ่งห่อหุ้มโครงสร้างเชิงซ้อนของไรโบนิวคลีโอโปรตีน (ribonucleoprotein complexes; RNP complexes) ไว้ RNP complexes ประกอบด้วยกรดไรโบนิวคลิอิก (ribonucleic acid; RNA) เป็นโครงสร้างที่บรรจุจีโนมของไวรัสอินฟลูเอนซาไว้ จีโนมของไวรัสมี 8 ท่อน (segments) แต่ละท่อนประกอบด้วย ribonucleic acid, nucleoprotein และ acidic polymerase (PA) มีจีโนมทำหน้าที่ในการถอดรหัส และเพิ่มจำนวน ของ ribonucleic acid คือ basic polymerase 1 (PB1) และ basic polymerase 2 (PB2) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่เรียกว่า non-structural proteins (NS) ได้แก่ NS2 พบได้ในไวรัสอินฟลูเอนซาทุกไวริออน ส่วน NS1 ตรวจพบได้เฉพาะในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาเท่านั้น ไวรัสไข้หวัดใหญ่มีจีโนมทั้ง 8 ท่อน เป็นกรดไรโบนิวคลิอิกสายเดี่ยว ที่มีประจุเป็นลบ (negative single-stranded RNA) การที่มีจีโนมแยกกันเป็นท่อน ๆ หลายท่อนทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมในช่วงเวลาที่มีการเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ได้ ซึ่งอาจทำให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ได้

การจำแนกสายพันธุ์ชนิดย่อย (subtype) ของไวรัสอินฟลูเอนซา จำแนกตามคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส (glycoproteins of haemagglutinin and neuraminidase) ปัจจุบันพบว่ามี haemagglutinin glycoproteins ไม่น้อยกว่า 17 ชนิด[1/] และ neuraminidase glycoproteins 9 ชนิด

[1/] Tong S, Li Y, Rivailler P, et al. 2012. *A distinct lineage of influenza A virus from bats*. available at: < www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1116200109> [Accessed 20 April 2012].

ทุกสายพันธุ์ชนิดย่อยพบได้ในนกน้ำ (waterfowl) ซึ่งนกน้ำเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญในวงจรการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมอื่น ที่สามารถพบไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดย่อยต่าง ๆ ได้ เช่น พบชนิดย่อยH1N1, H2N2 และ H3N2 ในมนุษย์ ชนิดย่อย H3N8 และ H7N7 ในม้าส่วนในสุกรพบมีรายงานการระบาดของชนิดย่อย H1N1, H3N2 และ H1N2 ทั้งนี้มีรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2461 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยพบสุกรจำนวนมากแสดงอาการคล้ายโรคไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์ ประกอบกับในช่วงเวลาดังกล่าวมีการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์อย่างรุนแรง และสามารถวินิจฉัยแยกไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดย่อย H1N1 (classical H1N1) ได้ในปี พ.ศ. 2473 ต่อมามีรายงานการระบาดของไวรัสอินฟลูเอนซาในสุกรเป็นครั้งคราวและกระจายตามประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ทั้งไวรัสชนิดย่อย H1N1 และ H3N2 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2518 จนถึงปัจจุบัน พบว่าการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีความถี่มากขึ้นและกระจายไปตามพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วโลก รวมทั้งทวีปเอเชีย

ในประเทศไทยพบการระบาดของไวรัสอินฟลูเอนซาในสุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ชนิดย่อย ได้แก่ ชนิดย่อย H1N1 H1N2 และ H3N2 โดยตรวจพบชนิดย่อย H3N2 ได้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2521 จากนั้นสามารถแยกไวรัสชนิดย่อย H1N1 ได้ในปี พ.ศ. 2531 ส่วนไวรัสชนิดย่อย H1N2 นั้นเพาะแยกได้ในปี พ.ศ. 2548 จากการศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสชนิดย่อย H1N1 และ H3N2 ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2548 พบว่าไวรัสสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพเฉพาะที่ระบบทางเดินหายใจ โดยสุกรแสดงอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์ เช่น ไอ จาม มีไข้ เบื่ออาหาร นอกจากนี้ยังพบว่าสุกรป่วยสามารถขับเชื้อได้เพียง 1 - 3 วัน หลังได้รับเชื้อเท่านั้น เมื่อวิเคราะห์สายพันธุกรรมของจีโนมทั้ง 8 จีโนมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่ระบาดในประเทศไทย พบว่ามีการผสมระหว่างสายพันธุ์จากอเมริกาและสายพันธุ์จากยุโรป ทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุกรรมของไวรัสอินฟลูเอนซาในสุกรในประเทศไทย

ในต้นปี พ.ศ. 2552 ได้มีการระบาดของไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิดเอ human pandemic H1N1 2009 (pH1N1) ในมนุษย์ทั่วโลก โดยพบว่าสารพันธุกรรมของไวรัสมาจากการแลกเปลี่ยนพันธุกรรม ของไวรัสที่มีต้นกำเนิดมาจากสุกร สัตว์ปีก และมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายไปยังสุกรในหลายประเทศรวมทั้งในประเทศไทย โดยพบรายงานการเพาะแยกเชื้อได้จากสุกรทั้งในฟาร์มและในงานแสดงสุกรในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการพบการคงอยู่ของไวรัส pH1N1 และ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ในฟาร์มสุกรแห่งหนึ่งในภาคตะวันตกของประเทศไทย เป็นเวลานานถึง 4 เดือน และยังพบการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ pH1N1 กับไวรัสสายพันธุ์ประจำถิ่นในสุกรของไทยด้วย แต่ยังไม่พบการระบาดไปยังพื้นที่อื่น ๆ และพบว่าไวรัสลูกผสมครั้งนี้ทำให้สุกรแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจเพียงเล็กน้อย และไม่ทำให้สุกรป่วยถึงตาย อย่างไรก็ตามจากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่าในประเทศไทยเองก็มีการระบาดของโรคและมีความเสี่ยงต่อการเกิดไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งไม่อาจทราบได้ว่าในอนาคตจะเกิดการระบาดเป็นวงกว้าง ดังเช่นไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ pH1N1 หรือไม่ จึงควรตระหนักว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่นั้น มีโอกาสกลายพันธุ์ได้ ดังนั้นการสำรวจ การวินิจฉัย และการเฝ้าระวังโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ซึ่งสอดคล้องกับข้อแนะนำขององค์การอนามัยโลกที่ให้ความสำคัญในการสำรวจโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ทั้งในมนุษย์และสัตว์อื่น ๆ โดยเฉพาะในสุกร เพื่อเป็นการควบคุมโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำที่อาจแพร่กระจายมายังมนุษย์ ดังเช่นการระบาดของไวรัส pH1N1

ก.2 พยาธิกำเนิด

สุกรป่วยติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเริ่มจากระบบทางเดินหายใจ เข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวด้านในของจมูก ท่อลม และหลอดลม โดยไวรัสเกาะบนซีเลีย ต่อจากนั้นไวรัสจะเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อบุผิวดังกล่าว ภายใน 16 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อ ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมตายเป็นหย่อม ๆ พบถุงลมปอดบางส่วนแฟบ และมีเลือดเข้ามาเลี้ยงที่ปอดมากขึ้น การตายของเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมจะขยายบริเวณกว้างจากการแพร่กระจายของไวรัสไปยังเซลล์ดังกล่าว หลังจากนั้นจะพบสิ่งซึมเยิ้มข้น (exudate) ภายในหลอดลม ถุงลมปอดแฟบเป็นบริเวณกว้างขึ้น ปอดส่วนหน้า (apical lobes) และปอดส่วนข้างหัวใจ (cardiac lobes) มีสีแดงคล้ำ ภายใน 24 ชั่วโมง และหลังจากติดเชื้อ 72 ชั่วโมง รอยโรคดังกล่าวจะค่อย ๆ หายไปและสภาพของปอดจะกลับเป็นปกติ การติดเชื้อไวรัสในสุกรส่วนมากจะเกิดเฉพาะที่บริเวณระบบทางเดินหายใจ แต่อาจตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ และมักเพาะแยกเชื้อได้จากเยื่อบุผิวโพรงจมูกของสุกรที่ได้รับเชื้อในวันแรก สุกรที่ได้รับเชื้ออาจไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการอย่างรุนแรงมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ช่องทางการติดเชื้อ (route of infection) ภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่ สายพันธุ์ชนิดย่อยของไวรัส การจัดการ สภาพแวดล้อมของฟาร์มสุกร และเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ชนิดย่อย (H1N1, H3N2 และ H1N2) ทำให้เกิดรอยโรคทาง จุลพยาธิวิทยาที่คล้ายกัน หรือพบการอักเสบติดเชื้อของโรคระบบทางเดินหายใจ ดังนี้ พบเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมและหลอดลมฝอย (bronchi and bronchioli) ถูกทำลายและเกิดการตาย โดยตรวจพบลักษณะของเซลล์เยื่อบุหลอดลมฝอยแบนลง (Jung et al., 2005) ภายในหลอดลมที่อักเสบมีสิ่งซึมเยิ้มข้น (exudative bronchitis) และปอดอักเสบแบบ interstitial pneumonia พบสิ่งคัดหลั่งปนเซลล์ที่ลอกหลุด (desquamated cells) และพบการเพิ่มจำนานของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล (neutrophills) ในหลอดลมและถุงลมปอดในช่วงแรก ต่อมาจะพบมีเซลล์อักเสบชนิดโมโนไซต์ (monocytes) เข้ามาแทนที่ในเนื้อเยื่อปอดเป็นส่วนใหญ่ และมีเลือดเข้ามาเลี้ยงในเนื้อเยื่อปอด ร่วมกับมีการขยายตัวของหลอดเลือดในปอด และระยะต่อมาจะพบเซลล์อักเสบชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ฮีสติโอไซต์ (histiocytes) และพลาสมาเซลล์ (plasma cells) เข้ามาแทรกที่ผนังของถุงลมปอดมากขึ้น ตามลำดับ

ก. 3 อาการ

การสังเกตอาการของสุกรป่วยร่วมกับการพิจารณารูปแบบของการระบาดของโรคในฟาร์มมักพบว่าสุกรป่วยแสดงอาการของโรคระบบหายใจแบบเฉียบพลันหรือแสดงอาการคล้ายโรคไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์ ลักษณะ

การระบาดของโรคในฝูงสุกรจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยพบอัตราการป่วยสูงถึง 100% ในขณะที่อัตราการตายต่ำ (1- 4%)

<u>อาการ</u> มีไข้ ตาอักเสบ บวม มีขี้ตา ไอ จาม มีน้ำมูกใส ซึม (ภาพที่ ฎ.1) เบื่ออาหาร ทำให้อัตราการเพิ่มน้ำหนักลดลง บางครั้งอาจพบสุกรท้องเสียร่วมด้วย ลูกสุกรหลังหย่านมมักนอนสุมกัน ส่วนแม่สุกรท้องอาจแท้งได้เนื่องจากมีไข้สูง

<u>ระยะฟักตัวของโรค</u> 1 - 3 วัน

<u>ระยะเวลาแสดงอาการ</u> 3 - 7 วัน ส่วนใหญ่ไม่เกิน 5 วัน ถ้าไม่มีเชื้ออื่นแทรกซ้อนสุกรจะค่อย ๆ หายเป็นปกติ ในต่างประเทศมีรายงานสุกรอาจแสดงอาการป่วยนานถึง 15 วัน เนื่องจากสภาพอากาศและสิ่งแวดล้อม

<u>ระยะเวลาการกระจายตัวของโรคในฟาร์ม</u> โรคนี้แพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วทั่วโรงเรือนภายใน 7 - 14 วัน

<u>ระยะเวลาการขับเชื้อ</u> สุกรป่วยจะขับเชื้อปนมากับสิ่งคัดหลั่งจากทางเดินหายใจ เช่น น้ำมูกและเสมหะ จากการทดลองในประเทศไทย พบสุกรขับเชื้อได้นานถึง 4 วัน แต่ในต่างประเทศอาจนานถึง 15 วัน

ภาคผนวก ข

การชักตัวอย่าง

(ข้อ 3.1)

ข.1 การชักตัวอย่างหรือเก็บตัวอย่างโดยวิธีป้ายกวาดโพรงจมูก (nasal swab)

การชักตัวอย่างจะพิจารณาจากสถานภาพสัตว์ในฟาร์ม ดังนี้

- หากสุกรในฟาร์มเริ่มแสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจ ให้ชักตัวอย่างจากสุกรที่แสดงอาการป่วยอย่างน้อย 20 ตัว
- ฟาร์มที่เคยพบการระบาดของโรคภายในเวลา 30 วัน แต่ไม่พบสุกรแสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจในวันที่เข้าไปเก็บตัวอย่าง ให้ชักตัวอย่างจากสุกรที่สงสัยอย่างน้อย 20 ตัว
- หากต้องการสำรวจโรคเพื่อยืนยันว่าไม่มีการระบาดของโรคภายในฟาร์มซึ่งมีประวัติพบการระบาดมากกว่า 30 วัน และในวันที่เข้าไปเก็บตัวอย่างไม่พบสุกรแสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจ ให้ชักตัวอย่างตามตารางที่ ข.1

ตารางที่ ข.1 การชักตัวอย่างโดยวิธีป้ายกวาดโพรงจมูกเพื่อยืนยันว่าไม่มีการระบาดของโรคภายในฟาร์ม

จำนวนสุกรในฟาร์ม (ตัว)	จำนวนตัวอย่างที่ต้องชักเมื่อคาดว่ามีการแพร่กระจายของโรคในระดับต่าง ๆ (ตัว)			
	Detection 1% of shedding		Detection 5% of shedding	
	(99% confidence)	(95% confidence)	(99% confidence)	(95% confidence)
> 10,000	459	299	90	59
5,000	429	283	90	59
3,000	399	272	90	59
2,000	374	261	90	59
1,000	315	231	83	56
500	240	188	77	53
400	214	172	74	52
300	182	150	70	50
200	140	120	63	46
100	83	75	48	38
50	50	50	33	25
25	25	25	20	18

ที่มา: ดัดแปลงจาก FAO Guideline for surveillance of pandermic H1N1/2009 and other influenza viruses in swine population.

ภาคผนวก ค
วิธีเก็บตัวอย่างป้ายกวาดโพรงจมูก

(ข้อ 3.2.1)

ค.1 อุปกรณ์และวิธีการเก็บตัวอย่าง

ค 1.1 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างป้ายกวาดโพรงจมูก

- หลอดทดลอง พร้อมฝาเกลียว ขนาด 3 - 5 ml
- ไม้ป้ายกวาดโพรงจมูกควรเป็น Dacron หรือ rayon หรือ polyester swab ที่ปราศจากเชื้อ ในกรณีจำเป็นอาจใช้ cotton swab ชนิดที่ไม่มีสารเรืองแสงและสารฟอกขาว โดยมีก้านยาวขนาด 15 เซนติเมตร (cm) และควรแยกก้านไม้ออกทันที เนื่องจากจะทำให้รบกวนการวินิจฉัยโรคได้

ค 1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง

ค.1.2.1 จับสุกรให้อยู่ในท่าเงยหน้าและยกจมูกสูง ถ้าเป็นลูกสุกรหย่านมอาจจับสุกรให้ยืนด้วย 2 ขาหลัง โดยหันหน้าออกจากผู้จับ อาจใช้บ่วงรัดจมูก (snare) ช่วยบังคับ (ภาพที่ ฎ.2)

ค.1.2.2 เช็ดจมูกด้านนอกให้สะอาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

ค.1.2.3 สอดก้านไม้ป้ายกวาดโพรงจมูกด้านที่มีสำลีเข้าโพรงจมูกสุกรโดยเงยก้านไม้ป้ายกวาดโพรงจมูกขึ้นพร้อมเอียงเข้าสู่ส่วนกลางของโพรงจมูก (dorsal-medial direction) จากนั้นจึงค่อย ๆ ป้ายกวาดรอบ ๆ เยื่อเมือกโพรงจมูก จะได้สิ่งคัดหลั่งและเซลล์เยื่อบุโพรงจมูกมากที่สุด ควรใช้ไม้ป้ายกวาดหนึ่งอันเก็บตัวอย่างจากโพรงจมูกสุกร ทั้งสองข้าง ความลึกของการสอดก้านไม้จะแตกต่างตามอายุสุกร

- ลูกสุกรอายุ 0 - 4 สัปดาห์ สอดก้านไม้ป้ายกวาดลึก 1 cm
- สุกรหย่านมอายุ 4 - 7 สัปดาห์ สอดก้านไม้ป้ายกวาดลึก 2 cm
- สุกรขุนที่อายุกว่า 7 สัปดาห์ สอดก้านไม้ป้ายกวาดลึก 3 - 4 cm
- พ่อแม่พันธุ์สุกร สอดก้านไม้ป้ายกวาดลึกมากกว่า 4 cm ตามความเหมาะสม

ค.1.2.4 จุ่มไม้ด้านที่ใช้ป้ายใน transport medium ทันที และแยกหรือหักก้านไม้ ให้ต่ำกว่าปากหลอดทดลอง เพื่อให้สามารถปิดฝาหลอดทดลองได้ และปิดฝาให้สนิท

ค.1.2.5 ติดฉลาก และเขียนระบุรายละเอียดตัวอย่างที่หลอดให้ชัดเจน เช่น รหัสสุกร อายุสุกร อาการ วันที่เก็บตัวอย่าง ที่ตั้งฟาร์ม จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2 – 8°C ทันที และ รักษาอุณหภูมิตลอดระยะเวลาจนถึงห้องปฏิบัติการ และควรส่งถึงห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมง หลังเก็บตัวอย่าง

ภาคผนวก ง

การเตรียมอุปกรณ์และสารเคมี

(ข้อ 3.2.1, ข้อ 3.3.1.3)

ง.1 การเตรียม PBS ใช้สำหรับ transport medium

NaCl	8	g
KCl	0.2	g
Na_2HPO_4	1.15	g
KH_2PO_4	0.2	g

(1) เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1 ลิตร (L)

(2) นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave

ง.2 การเตรียม transport medium

(1) PBS, pH 7.4 หรือ Eagle's minimal essential medium (MEM)

(2) bovine serum albumin (BSA) 1%

(3) ยาปฏิชีวนะ เช่น penicillin G (2x106 U/l), streptomycin (200 mg/l), gentamicin (250 mg/l)

(4) แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 - 2 ml ต่อไม้ป้ายหนึ่งตัวอย่าง

ง.3 อุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นในการเพาะแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง

- biological safety cabinet class II
- T-75 หรือ T-25 tissue culture flasks
- 24 well tissue culture plates
- Eagle's minimal essential medium (MEM)
- bovine serum albumin fraction V, 7.5% solution

- fetal bovine serum (FBS)
- trypsin-EDTA
- trypsin, tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK) treated (type XIII from bovine pancreas)
- gentamicin reagent solution
- penicillin-streptomycin

ง.4 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ MDCK

(1) เตรียมจาก working MEM 500 ml (การเตรียม working MEM ขึ้นอยู่กับคำแนะนำของแต่ละผู้ผลิต)

(2) เติม FBS 25 ml (จะได้ 5% FBS in MEM)

(3) เติม penicillin-streptomycin 5 ml

ง.5 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะแยกไวรัส

(1) เตรียม working MEM 500 ml (วิธีเตรียม working MEM ขึ้นอยู่กับคำแนะนำของแต่ละผู้ผลิต)

(2) เติม BSA 25 - 50 ml (จะได้ 5% ถึง 10% BSA in MEM)

(3) เติม penicillin-streptomycin 5 ml

(4) เติม TPCK-trypsin stock 0.5 ml (จะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 μg/ml)

ง.6 การเตรียม TCPK-trypsin stock 2 μg/ml

(1) ละลาย TPCK-trypsin 20 mg ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ 10 ml (ขึ้นอยู่กับคำแนะนำของผู้ผลิต)

(2) กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 μm

(3) แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

ง.7 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการตรวจด้วย HI test

- centrifuge and centrifuge tubes

- incubator
- V-bottom microtitration plates
- deep well microtitration plates
- water bath 56°C
- single channel and multichannel pipette
- pipette tips
- biological safety cabinet
- reagent reservoirs

ง.8 การเตรียม 10X PBS, pH 7.4 สำหรับการตรวจ HA และ HI test

Na_2HPO_4	12.30 g
NaH_2PO_4	1.80 g
NaCl	85.00 g

(1) ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่น (sterile deionized water) ปริมาตร 1000 ml ให้ละลายเข้ากัน

(2) ก่อนนำไปใช้ ให้ผสม ในสัดส่วน 10 X PBS กับ sterile deionized water ในอัตราส่วน 1 : 9

(3) ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ± 0.1

ภาคผนวก จ

การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

(ข้อ 3.3, ข้อ 3.3.1.2, ข้อ 3.3.2)

จ.1 การเตรียมเม็ดเลือดแดงไก่ 0.5%

(1) เจาะเลือดไก่ที่โตเต็มวัยอย่างน้อย 3 ml ใส่ในสารละลายอัลซีเวอร์ (Alsever's solution) อัตราส่วน 1:1 กลับหลอดขึ้นและลงเบา ๆ ให้เข้ากัน เพื่อไม่ให้เลือดแข็งตัว

(2) ปั่นเหวี่ยงที่ 800 *g* นาน 10 นาที ค่อย ๆ ดูดส่วนใสทิ้ง

(3) ล้างเม็ดเลือดแดง 3 ครั้งด้วย PBS ปริมาตร 10 เท่าของเม็ดเลือดแดง กลับหลอดขึ้น-ลงเบา ๆ ให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 800 *g* นาน 10 นาที

(4) ดูดส่วนใสทิ้ง

(5) เติม PBS ปริมาตร 10 เท่าของเม็ดเลือดแดง กลับหลอดขึ้น-ลงเบา ๆ เพื่อให้สารละลายผสมกัน

(6) ทำซ้ำข้อ (3) ถึง (5) อีก 2 รอบ

(7) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 *g* นาน 10 นาที

(8) ดูดส่วนใสทิ้ง จะได้เม็ดเลือดแดงที่เป็น packed red blood cells สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 สัปดาห์

(9) เมื่อจะนำไปใช้ให้เตรียมเม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 0.5% โดยผสมเม็ดเลือดแดงจากข้อ (8) 500 µl กับ PBS ปริมาตร 10 ml เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ไม่เกิน 1 สัปดาห์ หากพบว่าเม็ดเลือดแดงแตกให้เตรียมใหม่ และผสมเม็ดเลือดแดงให้เข้ากันทุกครั้งก่อนนำไปใช้งาน

จ.2 Haemagglutination test (HA test) เพื่อทดสอบคุณสมบัติการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

โปรตีนฮีแมกกลูตินินบนผิวของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสามารถเข้าจับกับตัวรับที่จำเพาะบนผิวเม็ดเลือดแดงได้ ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ซึ่งสามารถนำหลักการนี้มาใช้ในการตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้ โดยมักใช้ในการตรวจสอบหลังจากการเพาะแยกไวรัส เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยานี้ต้องอาศัยไวรัสจำนวนมากและอาจเกิดผลบวกเทียมได้สูง เพราะนอกจากไวรัสไข้หวัดใหญ่แล้วยังมีไวรัสและ

แบคทีเรียบางชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยานี้ได้เช่นกัน และต้องอ่านผลภายใน 30 - 45 นาที เพราะถ้าตั้งไว้นานกว่า 45 นาที จะเกิดผลลบเทียมเนื่องจากการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง วิธี HA มีรายละเอียด ดังนี้

(1) ใส่ PBS ใน plate ชนิด 96 well ทุกหลุม หลุมละ 50 µl โดยใช้ไมโครไปเปต

(2) เติมสารละลายจากของเหลวจากไข่ฟักหรือไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง ในแถวแรก หลุมละ 50 µl ตัวอย่างละ 2 - 4 หลุม ดูดสารละลายขึ้น-ลงเพื่อให้ผสมกันดี

(3) ทำสารละลายเจือจาง 2 เท่า (2 fold dilution) โดยดูดสารละลายจากแถวแรก 50 µl ใส่ในแถวที่ 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดไปใส่ในแถวถัดไปเรื่อย ๆ จนถึงแถวรองสุดท้ายให้ดูดสารละลายทิ้ง (แถวสุดท้ายเป็นชุดควบคุมผลลบ (negative control))

(4) เติมเม็ดเลือดแดงไก่ 0.5% ที่เตรียมไว้ (ข้อ จ.1) ทุกหลุม หลุมละ 50 µl

(5) เคาะเบา ๆ เพื่อให้สารละลายผสมกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 45 นาที

(6) อ่านผลทันที หลุมที่ให้ผล HA บวกจะพบมีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ที่ก้นหลุม (ภาพที่ ฎ.6)

วินิจฉัยให้หลุมที่มีความเจือจางของแอนติเจนสูงสุดที่ให้ผลบวกมีค่าเป็น 1 เอชเอ ยูนิต (HA unit, HAU)

จ.3 Haemagglutination inhibition test (HI test) เพื่อทดสอบคุณสมบัติยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

เป็นวิธีตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมที่ถูกป้องกันไม่ให้สามารถจับกับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (haemagglutinin) บนผิวของไวรัส กับตัวรับบนผิวเม็ดเลือดแดง (virus-erythrocyte complexes) ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง สุกรจะสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรหลังการติดเชื้อ 5 - 7 วัน โดยมีปริมาณสูงสุดหลังจากติดเชื้อ 3 - 6 สัปดาห์ และคงอยู่ในกระแสเลือดนาน 3 - 6 เดือน ส่วนแอนติบอดีที่ได้รับจากแม่จะอยู่ได้นาน 4 - 8 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแอนติบอดีที่ได้รับทางนมน้ำเหลือง (colostrum) การตรวจด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถตรวจในขณะที่สุกรมีชีวิตและสะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือด และสามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่จะต้องเก็บซีรัมคู่ ห่างกัน 10 - 21 วัน เพื่อดูการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดี อีกทั้งแอนติบอดีต่อโปรตีนฮีแมกกลูตินิน ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรมีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ จึงสามารถใช้จำแนกชนิดของสายพันธุ์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดย่อยได้ ดังนั้นในการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จึงต้องใช้ไวรัสทุกสายพันธุ์ในการทดสอบ HI test แต่ละครั้ง มีรายละเอียด ดังนี้

(1) เจือจางไวรัสแอนติเจนให้มีความเข้มข้น 4 HAU/25 µl หรือ 8 HAU/25 µl โดยใช้ PBS (0.01 M, pH 7.2 ถึง pH 7.4) ต้องทำ back titration เพื่อตรวจยืนยันความเข้มข้นของแอนติเจน

(2) เติม PBS ปริมาตร 25 μl ลงในทุกหลุมของไมโครเพลท (ชนิด 96 หลุม) ที่มีก้นหลุมเป็นรูปตัววีหรือตัวยู

(3) เติมตัวอย่างซีรัมแต่ละตัวอย่างปริมาตร 25 μl ในหลุมที่ 1 ของแต่ละแถว ทำซ้ำสามชุดต่อหนึ่งตัวอย่าง

(4) ทำสารละลายเจือจาง 2 เท่า (2 fold dilution)

(5) เติมไวรัสแอนติเจนมาตรฐานจากข้อ (1) (แอนติเจนชุดควบคุมผลบวก) ปริมาตร 25μl ทุกหลุม

(6) สำหรับหลุมที่ไม่ได้ใช้ทดสอบให้เติม PBS ปริมาตร 50 μl เพื่อทดสอบการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง

(7) ปิดไมโครเพลท และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 - 30 นาที

(8) เติม 0.5% เม็ดเลือดแดง ปริมาตร 50 μl ลงในทุกหลุม เขย่าให้เข้ากัน

(9) ปิดไมโครเพลท และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 - 60 นาที หรือเมื่อเม็ดเลือดแดงในหลุมควบคุมผลบวกรวมกลุ่มกันเป็นเม็ดกระดุม

(10) การอ่านผล หลุมที่ให้ผล HI เป็นบวก แสดงว่ามีการยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยจะพบว่าเม็ดเลือดแดงจับกลุ่มคล้ายเม็ดกระดุม หรือเมื่อเอียงเพลทแล้วพบว่ามีอัตราการไหลของเม็ดเลือดแดงเท่ากับการไหลของเม็ดเลือดแดงในหลุมควบคุมผลบวก

(11) การแปลผล ถ้าได้ระดับ HI titre เท่ากับหรือมากกว่า 1:40 เมื่อใช้แอนติเจนเท่ากับ 4 HAU/ 25 μl หรือ 8 HAU/ 25 μl แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ชนิดย่อยนั้น ๆ

หรือกรณีเก็บซีรัมเพื่อยืนยันการติดเชื้อควรทำซีรัมคู่ 2 ครั้ง ห่างกัน 10 - 21 วัน จะมีค่า HI titer เพิ่มขึ้นมากกว่า 4 เท่า หาก HI titer ต่ำกว่า 1:40 แสดงว่าสุกรไม่ได้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่สุกร

หมายเหตุ:

1. เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดสอบ จะต้องมีซีรัมชุดควบคุมผลบวก และซีรัมชุดควบคุมผลลบด้วยทุกครั้ง

2. ในซีรัมปกติจะมี non-specific inhibitors ที่ทำหน้าที่ป้องกันการแข็งตัวของเลือดหรือการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด ซึ่งจะรบกวนการตรวจทำให้เกิดผลบวกเทียม (false positive) ดังนั้นจึงต้องใส่ receptor destroying enzyme เพื่อกำจัด non-specific inhibitors ก่อนทำการตรวจ ทั้งนี้ WHO แนะนำให้อ่านค่าบวกที่ 1:40 ขึ้นไป จำเป็นต้องกำจัด non-specific haemagglutination ก่อน โดย

(1) เตรียม receptor-destroyed enzyme (RDE) ให้ได้ความเข้มข้น 100 units/ml ด้วยการเจือจาง RDE 1 ส่วน ในสารละลาย calcium saline 10 ส่วน (1/10 dilution) หรือขึ้นอยู่กับคำแนะนำของผู้ผลิต

(2) ผสมซีรัมที่ใช้อ้างอิง (reference serum สำหรับ H1N1, H1N2 และ H3N2 isolates) 50 µl กับ RDE 200 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12 - 18 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

(3) เติมสารละลาย 2.5% sodium citrate ปริมาตร 150 µl บ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที

(4) นำซีรัมจากข้อ (2) ปริมาตร 200 µl ผสมกับ PBS 25 µl

(5) เติมเม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 50% ปริมาตร 50 µl เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หรือบ่มที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน

(6) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 *g* ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที

ภาคผนวก ฉ

การชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

(ข้อ 3.3, ข้อ 3.3.1.2, ข้อ 3.3.1.3)

การชันสูตรโรคด้วยวิธีชีววิทยาระดับโมเลกุลนี้ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

(1) การสกัด RNA ด้วยวิธีมาตรฐานทั่วไป หรือใช้ชุดสกัด RNA สำเร็จรูป ที่พิสูจน์แล้วว่ามีความไว และความจำเพาะใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน

(2) การตรวจพิสูจน์พันธุกรรมไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยวิธี RT-PCR ประกอบด้วยการสร้าง cDNA และการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมาย สามารถใช้ชุดปฏิกิริยาในขั้นตอนเดียว (one step RT-PCR) หรือแยกทำการสร้าง cDNA ก่อน (ภาคผนวก ญ) แล้วนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR

ฉ.1 การสกัด RNA มีวิธีการดังนี้

(1) นำตัวอย่างป้ายจมูกหรือปอดที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 3.3.1.1 แบ่งตัวอย่างมา 250 µl แล้วเติม Trizol LS 750 µl ใช้ไปเปตดูดขึ้น-ลง เพื่อให้สารละลายรวมกัน

(2) นำตัวอย่างข้อ (1) มาบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

(3) เติมคลอโรฟอร์ม 200 µl ในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าเป็นเวลา 15 - 20 วินาที

(4) บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

(5) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที

(6) เติม isopropanol 500 µl ผสมให้เข้ากัน

(7) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นานอย่างน้อย 10 นาที

(8) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง

(9) ล้างตะกอนด้วย ethanol 75% ในสัดส่วน 1 µl ต่อ 500 µl

(10) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง

(11) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 20 นาที หรือจนกว่าตะกอนแห้ง

(12) ละลายตะกอนใน diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water ปริมาตร 40 µl นำไปใช้ในขั้นตอนสร้าง cDNA ทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำไปตรวจวินิจฉัยต่อไป

หมายเหตุ: อาจใช้ชุดสกัด RNA สำเร็จรูป ตามวิธีของผู้ผลิตจำหน่าย (manufacturer instruction)

ฉ.2 การสร้าง cDNA และการเพิ่มจำนวน DNA ในขั้นตอนเดียว

ใช้ชุดปฏิกิริยา one strep RT-PCR ของ Access Quick™ RT-PCR Kit (Promega, USA) โดยมีลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในปฏิกิริยาจาก 5′ – 3′ ดังนี้

(1) เตรียมสารละลาย master mix ลงในหลอดขนาด 0.5 ml หลอดละ 22 µl ดังตารางที่ ฉ.1

ตารางที่ ฉ.1 ส่วนประกอบสารละลาย PCR Master mix

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร
RNAse free water		8.0 µl
Master mix 2X		12.5 µl
Primer MF	25 pmol/µl	0.5 µl
Primer MR	25 pmol/µl	0.5 µl
AMV Reverse Transcriptase		0.5 µl
Total (µl)		22.0 µl

ตารางที่ ฉ.2 ตัวอย่าง primers ที่ใช้ในการทดสอบโรคไข้หวัดใหญ่สุกร

ทิศทาง (direction)	ลำดับเบส (base sequence)	ขนาด DNA ที่ได้จากพีซีอาร์ (PCR-product size) (base pair:bp)	ระดับความจำเพาะ (specificity level)
Forward (MF)[2/] Reverse (MR)[2/]	5′-TGATCTTCTTGAAAATTTGCAG-3′ 5′-TGTTGACAAAATGACCATCG-3′	276 bp	M gene (Influenza A)

หมายเหตุ: primers ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีน M ใช้ตรวจยืนยันว่าเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ หากต้องการจำแนกสายพันธุ์ชนิดย่อยต้องใช้ primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน HA และ NA

(2) เติม viral RNA จากขั้นตอนการสกัดตัวอย่างละ 3 μl ปิดฝาหลอด PCR แล้ว

(3) นำหลอดเข้าเครื่อง thermocycler โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

ขั้นที่ 1	Reverse transcription	48 °C	45	นาที	
ขั้นที่ 2	Initial PCR activation	94°C	3	นาที	
ขั้นที่ 3	Denaturation	94 °C	20	วินาที	35 รอบ
ขั้นที่ 4	Annealing	55 °C	20	วินาที	
ขั้นที่ 5	Extension	72 °C	30	วินาที	
ขั้นที่ 6	Final extension	72 °C	10	นาที	

[2/]Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, et. al. 2004.*Single-Step Multiplex Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Influenza A Virus Subtype H5N1 Detection*.Viral Immunology; Vol. 17. No. 4: 588-593.

(4) ระหว่างที่เครื่องพีซีอาร์กำลังทำงานให้เตรียม 1.5% agarose gel ใน TBE buffer ละลายให้เข้ากันด้วยใช้ไมโครเวฟที่ความร้อนระดับกลางหรือ 300 - 600 วัตต์ นานประมาณ 3-5 นาที จากนั้นนำไปเทใส่ถาดพิมพ์ที่มีจำนวนหลุมเพียงพอกับจำนวนตัวอย่างที่จะตรวจสอบ รอให้เจลเย็นและแข็งดีแล้วจึงนำไปวางบนเครื่อง electrophoresis chamber ที่มี TBE buffer อยู่ในระดับที่ท่วมแผ่นเจล

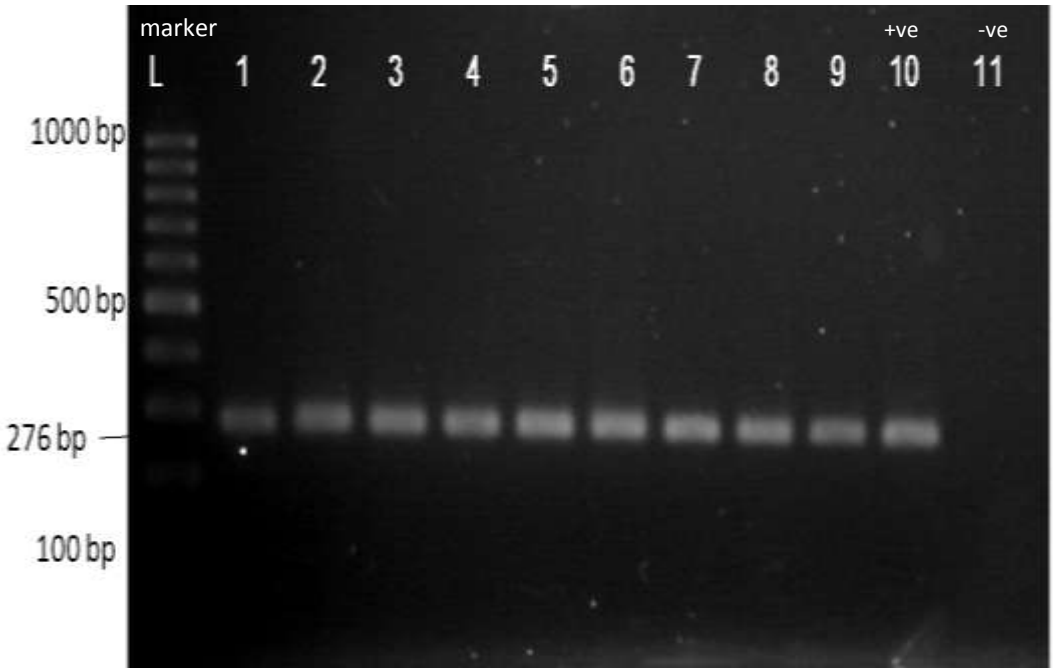
(5) นำ PCR product 10 µl ที่ผสมกับ 6X loading dye 2 µl มาหยอดในเจลที่เตรียมไว้ โดยใช้แถวแรกของเจลเป็น DNA marker (100 bp)

(6) นำไปแยกขนาดของ PCR product ด้วยเครื่อง gel electrophoresis 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 - 60 นาที

(7) ย้อมแผ่น agarose gel ด้วย ethidium bromide 2 µg/ml ในน้ำกลั่น นาน 15 นาที หรืออาจใช้สารเรืองแสงสำหรับย้อม DNA (florescence dye)

(8) อ่านด้วยเครื่อง visible-UV gel transmission เพื่อตรวจหาขนาดของ PCR product

(9) การแปลผล ถ้าเชื้อที่ทดสอบเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ชนิดเอ โดยจะเห็นแถบเรืองแสงของ DNA (ภาพที่ ฉ.1) ตามขนาด primers ที่ใช้ตามตารางที่ ฉ.2



ภาพที่ ฉ.1 ภาพแสดงผลการชันสูตรเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีน M ให้ผลบวกโดยได้ PCR product 276 bp

ภาคผนวก ช

Immunohistochemistry (IHC)

(ข้อ 3.3)

ช.1 หลักการ

วิธีนี้ใช้ตรวจหาแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากชิ้นเนื้อที่ฝังในบล็อคพาราฟิน เหมาะสำหรับการศึกษาแบบย้อนหลัง เนื่องจากสามารถเก็บบล็อกพาราฟินได้เป็นระยะเวลานาน แต่มีข้อจำกัด คือ ความสามารถในการตรวจขึ้นกับแอนติบอดีที่ใช้ ถ้าใช้แอนติบอดี monoclonal anti-influenza A (neucleoprotein) จะตรวจแอนติเจนไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิดเอ ได้ทุกสายพันธุ์ชนิดย่อย ส่วนการจำแนกสายพันธุ์ไวรัสชนิดย่อยต้องใช้เทคนิคอื่นร่วมด้วย เช่น เทคนิค PCR เป็นต้น ทั้งนี้คุณภาพของชิ้นเนื้อมีผลต่อความไวในการตรวจ เนื่องจากต้องคงสภาพชิ้นเนื้อด้วยฟอร์มาลีน จึงอาจทำให้เกิดบดบังแอนติเจนของไวรัสในชิ้นเนื้อ

ช.2 วิธีการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยเทคนิค immunohistochemistry

(1) การเก็บชิ้นเนื้อ ต้องตัดชิ้นเนื้อหนา 0.5 – 1 cm และแช่ 10% buffered formalin นานไม่เกิน 24 ชั่วโมง นำไปฝังบล็อกพาราฟิน

(2) ใช้ความร้อนละลายพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ ที่ตัด (tissue section) หนาไม่เกิน 4 µm โดยแช่ในไซลีนและจุ่มในแอลกอฮอล์ 100%, 95%, 80% และ 70% ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่น

(3) ทำให้แอนติเจนออกมา (antigen retrieval) ด้วยเอนไซม์ proteinase K 0.1% ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที

(4) ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ต่อจากนั้น block non-specific endogenous peroxidase ด้วย 3% H_2O_2 ใน absolute methanol นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(5) ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

(6) block non-specific binding ด้วย bovine serum albumin 1% ใน PBS ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที

(7) ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

(8) ทำปฏิกิริยากับ monoclonal anti-NP influenza A antibody ตามความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสม

(9) ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

(10) นำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ biotinylate rabbit anti- mouse IgG ความเข้มข้น 1:400 ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที

(11) ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

(12) นำไปทำปฏิกิริยากับ envision polymer (Envision Polymer DAKO, Denmark) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที

(13) ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

(14) ทำให้เกิดสีด้วย DAB 0.05% (3,3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride 0.01 M Tris-HCL, pH 7.6) (Sigma, USA) 30 - 60 วินาที

(15) ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 นาที

(16) ย้อมทับด้วยสี Mayer's hematoxylin นาน 45 วินาที

(17) ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที

(18) ดึงน้ำ (dehydrate) ออกจากชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็วโดยจุ่มในแอลกอฮอลล์ 70%, 80%, 95% และ 100% ตามลำดับ แล้วปิดทับด้วยแผ่นสไลด์

(19) การอ่านผล เมื่อพบนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อมีสีน้ำตาลเข้มแสดงว่าให้ผลบวก หากภายในนิวเคลียสไม่ติดสีดังกล่าวแสดงว่าให้ผลลบ

(20) การแปลผล พบแอนติเจนของไข้หวัดใหญ่สุกรย้อมติดสีน้ำตาลแดง บ่งบอกถึงการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในชิ้นเนื้อดังกล่าว

ข้อควรปฏิบัติ

ต้องทำให้ชิ้นเนื้อมีความชุ่มชื้นตลอดเวลาใน moist chamber

ภาคผนวก ซ

วิธีการตรวจหาปริมาณไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรโดยการไตเตรท

(ข้อ 3.3.1.3)

(1) นำเซลล์ MDCK มาเพาะเลี้ยงในจานอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม โดยให้มีปริมาณเซลล์ไม่น้อยกว่า 10^6 cell/ml ในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ (minimal essential medium; MEM) ที่มี 5% fetal bovine serum (FBS) ใส่หลุมละ 200 µl

(2) นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นานประมาณ 48 ชั่วโมง จนเซลล์แบ่งตัวและแผ่ขยายออกเป็นเซลล์ชั้นเดียวจนเต็มพื้นที่หลุม หรือประมาณ 80% ของพื้นที่หลุม (confluent monolayer)

(3) เตรียมสารละลายตัวอย่างไวรัส ที่มีความเข้มข้น 1:10, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$ จนถึงความเข้มข้นที่ต้องการ ด้วย MEM และ trypsin 1 µg/ml ในหลอดทดลอง เก็บที่อุณหภูมิ 4°C หรือตั้งบนน้ำแข็งระหว่างรอเตรียมล้างเซลล์เพาะเลี้ยง

(4) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในข้อ (1) ทิ้ง และล้างเซลล์ด้วย PBS หรือ MEM 3 ครั้ง ๆ ละ100 µl ต่อหลุม

(5) เติมสารละลายไวรัสในข้อ (3) ลงบนเซลล์ confluent monolayer หลุมละ 100 µl โดยแต่ละความเข้มข้นควรทำซ้ำ 3 หลุม ถึง 4 หลุม (หลุมที่ไม่ได้เติมสารละลายไวรัส ให้เติม MEM และ trypsin 1 µg/ml เพื่อเป็นชุดควบคุมผลลบ)

(6) นำเข้าตู้บ่ม 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C สังเกตการเกิด CPE ทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน

(7) นำไปตรวจสอบด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) และคำนวณค่าไวรัสไตเตอร์โดยวิธี Reed and Muench, 1938

(8) อาจนำสารละลายไวรัสไปตรวจสอบด้วยวิธี HA test หรือ real time RT- PCR ต่อไป

ภาคผนวก ฌ

วิธีการย้อม immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

(ข้อ 3.3.1.3)

(1) นำเพลทเลี้ยงเซลล์ที่ได้ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสตามข้อ 3.3.1.3 รินอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และคงสภาพเซลล์ด้วย 4% ฟอร์มาลินที่เจือจางด้วย 0.5% Phosphate Buffered Saline Tween-20 (PBST) หลุมละ 100 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

(2) รินฟอร์มาลินทิ้ง แล้วล้างด้วย 0.5% PBST หลุมละ 100 µl ถึง 200 µl ล้าง 3 ครั้ง ครั้งที่ 3 ให้แช่ทิ้งไว้ 5 นาที

(3) เติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (anti-influenza A nucleoprotein monoclonal antibody) อัตราส่วน 1:2000 เจือจางด้วย 0.5% PBS ที่มี 1% BSA (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ใส่หลุมละ 50 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที

(4) รินสารละลายทิ้ง แล้วล้างด้วย 0.5% PBST ทำเหมือนข้อ (2)

(5) เติม anti-mouse IgG conjugate ในอัตราส่วนที่เหมาะสมตามคำแนะนำของผู้ผลิต เจือจางด้วย 0.5% PBST ที่มี 1% BSA (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ใส่หลุมละ 50 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที

(6) รินสารละลายทิ้ง แล้วล้างด้วย 0.5% PBST ทำเหมือนข้อ (2)

(7) เติม substrate หลุมละ 100 µl มีส่วนประกอบดังนี้

AEC: acetate buffer: 30% H_2O_2 ในอัตราส่วน 1 µl : 19 µl : 20 µl (ปริมาตรนี้ใช้กับตัวอย่างทั้งหมด 2 เพลท) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที

(8) อ่านผลเป็นบวกเมื่อพบว่าภายในนิวเคลียสติดสีน้ำตาลแดง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลบวก หากไม่ติดสีภายในนิวเคลียสแสดงว่าให้ผลลบ

(9) การแปลผล มีการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรภายในเซลล์เพาะเลี้ยงเมื่อพบนิวเคลียสติดสีน้ำตาลแดง

ภาคผนวก ญ

การสร้าง cDNA

(ภาคผนวก ฉ)

การสังเคราะห์ cDNA (reverse transcription) มีวิธีการดังนี้

(1) ใช้ RNA 1 ไมโครกรัม (μg) เป็น RNA ต้นแบบ

(2) สังเคราะห์ cDNA สายแรก (first strand cDNA) โดยสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยาต้องการ ส่วนผสมปริมาตร 20 μl ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ ญ.1 ส่วนประกอบสารละลาย RT Master mix

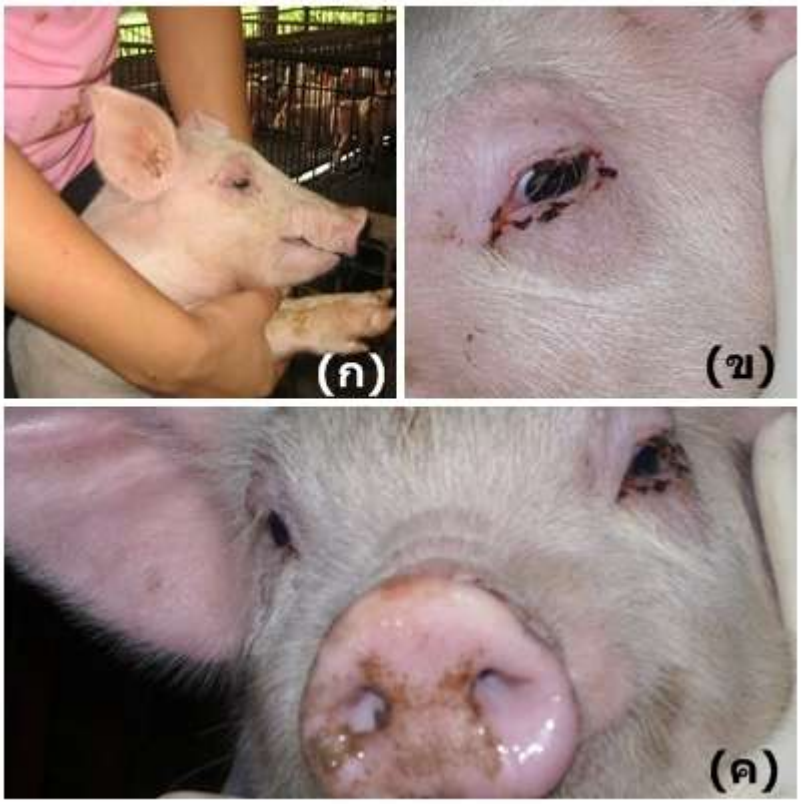
สารเคมี	ความเข้มข้น	
Hexamer primer 144R	0.75	ไมโครโมลาร์ (μM)
dNTPs	1	มิลลิโมลาร์ (mM)
M-MLV (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)	2.5	Unit
$MgCl_2$	5	mM
PCR buffer (10 mM Tris/HCl. pH 8.3, 50 mM KCl)		
Total volume	20	μl

(3) นำตัวอย่างเข้าเครื่อง thermocycler ในขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิ

(4) ตั้งอุณหภูมิที่ 42°C นาน 15 นาที ให้เกิดปฏิกิริยา reverse transcription ของ RNA ต้นแบบ ให้เป็น cDNA สายแรก จากนั้นให้เพิ่มอุณหภูมิเป็น 100°C นาน 5 นาที เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ reverse transcriptase และปรับอุณหภูมิของสารละลายลงมาที่ 5°C ก่อนนำไปเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR ต่อไป

ภาคผนวก ฎ

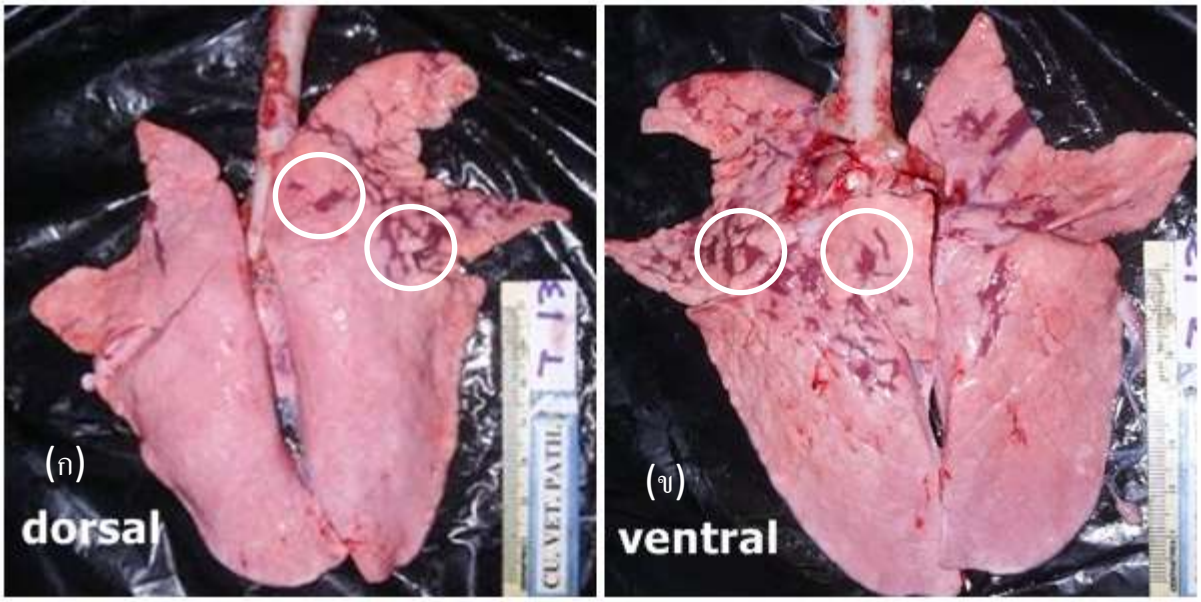
ภาพประกอบการชันสูตรโรคไข้หวัดใหญ่สุกร



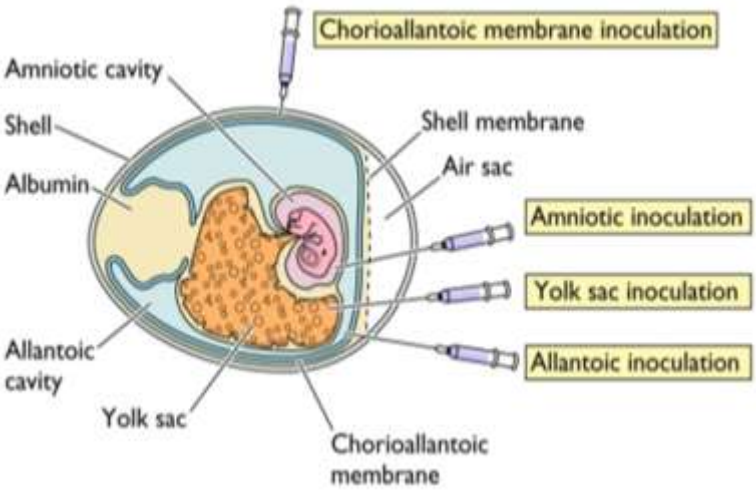
ภาพที่ ฎ.1 (ก) แสดงสุกรป่วยด้วยโรคระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน
(ข) ภาพการอักเสบที่ตา (ค) ภาพน้ำมูกใสที่จมูก

ภาพที่ ฎ.2 ภาพแสดงการเก็บตัวอย่างไข้หวัดใหญ่สุกรจากสิ่งคัดหลั่งภายในโพรงจมูกด้วยวิธีป้ายกวาดโพรงจมูก (nasal swab)

ภาพที่ ฎ.3 ภาพแสดงการเก็บตัวอย่างเลือดจากลูกสุกร

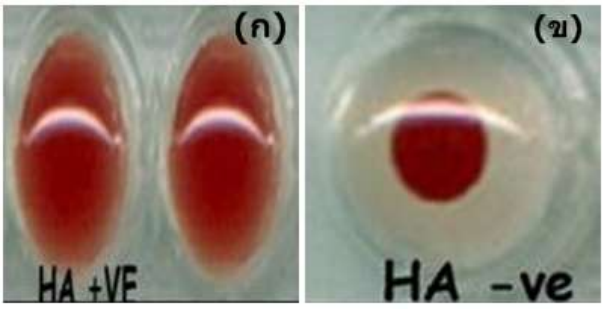


ภาพที่ ฎ.4 (ก) และ (ข) ภาพแสดงบริเวณที่ควรเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปอด (วงกลม)

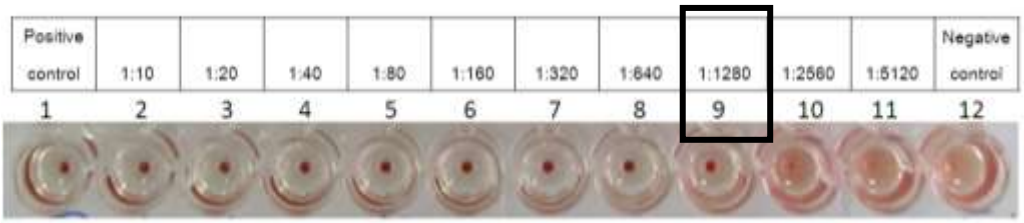


ภาพที่ ฎ.5 ภาพแสดงตำแหน่งที่ใช้เพาะแยกและเพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟัก

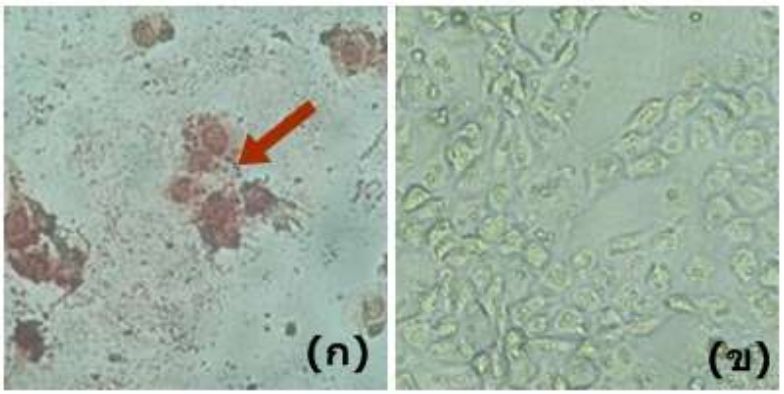
ที่มา: http://wenliang.myweb.uga.edu



ภาพที่ ฎ.6 (ก) ภาพแสดงลักษณะการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ให้ผลบวกและ (ข) ลักษณะของเม็ดเลือดแดงรวมกันคล้ายเม็ดกระดุมที่ให้ผลลบใน HA test



ภาพที่ ฎ.7 ภาพแสดงแสดงค่า HI titer ที่ 1: 1280 ซึ่งพบเม็ดเลือดแดงที่รวมกันคล้ายเม็ดกระดุม (ช่องสี่เหลี่ยมที่ 9)



ภาพที่ ฎ.8 ภาพแสดงการย้อมด้วยเทคนิค immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)
(ก) พบเซลล์ย้อมติดสีน้ำตาลแดงในนิวเคลียส แสดงว่ามีการติดไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร
(ข) ไม่พบเซลล์ย้อมติดสีน้ำตาลแดงที่นิวเคลียสแสดงว่าเป็นเซลล์ปกติ