

Monitoring and Surveillance of Highly Pathogenic Avian influenza H5N1 in captive and wild birds at zoo, Suphan Buri province, Thailand, 2009-2010

Plern Yongyuttawichai*, Tanasak Changbunjong, Sarin Suwanpakdee, Anuwat Wiratsudakul, Nareerat Sangkachai, Thekhawet Weluwanarak, Poonyapat Sedwisai, Tatiyanuch Chamsai, Parntep Ratanakorn

The Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Diseases in Wildlife and Exotic animals,
Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Nakorn Pathom, 73170

*Corresponding author, E-mail address: vspyt@mahidol.ac.th

Abstract

The monitoring and surveillance of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus in captive and wild birds at zoo in Suphan Buri province, Thailand was carried out under the disease surveillance program of the Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Diseases in Wildlife and Exotic animals from January 2009 to October 2010 by collecting tracheal swabs, cloacal swabs and serum. All 325 samples were found negative in viral detection with molecular technique, cell culture and serological methods. Although this study found no evidence of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 in the area, the monitoring and surveillance for avian influenza should be continuously conducted.

Keywords: captive birds, wild birds, H5N1, highly pathogenic avian influenza virus, disease monitoring and surveillance

การเฝ้าระวังและสำรวจโรคไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 ในนกเลี้ยงและนกธรรมชาติ ณ สวนสัตว์ จ. สุพรรณบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2552-2553

เพลิน ยงยุทธวิชัย* ธนศักดิ์ ช่างบรรจง ศรีรินทร์ สุวรรณภักดี อนุวัฒน์ วิรัชสุดากุล
นริรัตน์ สังข์ไชย ทิฆมเวท เวฬุวนารักษ์ ปุณณพัฒน์ เศษวิสัย ตติยนุช แซ่มัส ปานเทพ รัตนากร

ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่น และสัตว์อพยพ
คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170
*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: vspyt@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

ศูนย์เฝ้าระวังฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้เฝ้าระวังและติดตามการเกิดโรคระบาดที่เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 (HPAI H5N1) ในนกเลี้ยงและนกธรรมชาติ ณ สวนสัตว์ จ.สุพรรณบุรี ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 โดยทำการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีป้ายจากหลอดลม ช่องทวารร่วม และซีรัม จำนวนทั้งสิ้น 325 ตัวอย่าง ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสดังกล่าว ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา การเพาะเลี้ยงเซลล์ และซีรัมวิทยา ไม่พบผลบวกทางห้องปฏิบัติการ แม้ว่าการศึกษารังนี้จะไม่พบการระบาดของโรคไข้หวัดนกในพื้นที่ การเฝ้าระวังและสำรวจโรคไข้หวัดนกควรจะมีการกระทำต่อไปอย่างต่อเนื่อง

คำสำคัญ: นกเลี้ยง นกธรรมชาติ เชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 การเฝ้าระวังและสำรวจโรค

บทนำ

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เป็นต้นมา ประเทศไทยมีรายงานการเกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 (highly pathogenic avian influenza) อย่างต่อเนื่องในหลายพื้นที่รวมทั้งจังหวัดสุพรรณบุรี โดยในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2546 มีรายงานการตายของเสื่อไคร้ง 2 ตัว และเสือดาว 2 ตัวในสวนสัตว์แห่งหนึ่งในจังหวัดสุพรรณบุรี โดยเสื่อทั้งหมดแสดงอาการไข้สูงและหายใจลำบาก ซึ่งเมื่อเก็บตัวอย่างไปตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่าเสื่อเสียชีวิตเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 จากการกินซากไก่ดิบที่ให้เป็นอาหาร ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวมีการป่วยตายอย่างผิดปกติในสัตว์ปีกในพื้นที่ดังกล่าวซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 (Keawcharoen และคณะ 2004) ซึ่งรายงานนี้เป็นรายงานการป่วยตายซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 ในสัตว์ตระกูลแมวเป็นครั้งแรกในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบการตายของสุนัขจากจังหวัดสุพรรณบุรี เนื่องจากติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 จากการกินซากเป็ดที่ตายจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2547 อีกด้วย (Songserm และคณะ 2006) หลังจากเกิดการระบาดของโรคในช่วงเวลาดังกล่าวทำให้เกิดการตื่นตัวในการเฝ้าระวังและติดตามการเกิดโรคไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 ทั้งในปศุสัตว์และสัตว์ป่ารวมทั้งนกธรรมชาติเรื่อยมา ทั้งนี้มีการเปรียบเทียบการระบาดของโรคไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 ระหว่างสัตว์ปีกในธรรมชาติและสัตว์ปีกในฟาร์ม โดยพบว่าการระบาดมักจะเกิดขึ้นในช่วงฤดูหนาวและมักพบการติดเชื้อในนกธรรมชาติในพื้นที่ที่เคยเกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 ในปศุสัตว์มาก่อน นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเชื้อได้ในนกธรรมชาติที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาดเก่า หลังจากการทำลายปศุสัตว์ไปแล้วถึง 3 ปี (Siengsan และคณะ 2009)

ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่น และสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ทำการเฝ้าระวังและติดตามโรคไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 ณ สวนสัตว์แห่งนี้ทุกๆ 2 เดือน ระหว่างเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2552 ถึงเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 โดยเก็บตัวอย่างจากการป้ายเชื้อจากหลอดลม (tracheal swab)

ช่องทวารร่วม (cloacal swab) และซีรัมจากทั้งนกเลี้ยงและนกธรรมชาติที่อาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกันกับสัตว์ในสวนสัตว์นั้น เนื่องจากเคยมีรายงานของจากกรมปศุสัตว์ในปี พ.ศ. 2547 จนถึงปี พ.ศ. 2550 (Siengsan และคณะ 2009)

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกจัดอยู่ในเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส (RNA virus) อยู่ในวงศ์ Orthomyxoviridae เป็นเชื้อไวรัสที่ประกอบด้วยสายพันธุกรรม สายเดี่ยว 8 ชิ้น เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถแบ่งออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ A สายพันธุ์ B และสายพันธุ์ C เชื้อไข้หวัดนก (Avian influenza virus A virus) จัดอยู่ในกลุ่มไข้หวัดใหญ่ชนิด A แบ่งเป็นชนิดย่อยตาม HA 16 (H1-H16) ชนิดย่อย (subtype) และ NA 9 (N1-N9) ชนิดย่อย เป็น เชื้อไข้หวัดนกจัดอยู่กลุ่มสายพันธุ์ A สามารถแบ่งชนิดย่อยได้ตามสารโปรตีนเคลือบผิว Hemagglutinin (H) และ Neuraminidase (N) ได้อีก 16 และ 9 ชนิดตามลำดับ สามารถแยกเชื้อดังกล่าวได้จากสัตว์หลายชนิดรวมทั้งนก (Fouchier และคณะ 2005) โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสามารถแยกเชื้อได้จากนกหลายชนิด โดย HA ทั้ง 16 ชนิดย่อยสามารถพบได้ในเป็ด นกนางนวล และกลุ่มนกชายเลนซึ่งเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อไวรัสดังกล่าวตามธรรมชาติ (Spackman 2008) ซึ่งเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่พบในสัตว์ปีกมีทั้งชนิดที่ก่อโรครุนแรงและไม่รุนแรง (ปรางกวันและคณะ 2549; Spackman 2008) เชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 สามารถแยกเชื้อได้จากสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น สัตว์ตระกูลแมว (Keawcharoen และคณะ 2004) สุนัข (Songserm และคณะ 2006) ม้า สุกร แร้คคูน รวมทั้งมนุษย์ (AHC 2011)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างจะเป็นส่วนพื้นที่ของสวนสัตว์แห่งหนึ่งในจังหวัดสุพรรณบุรี ประกอบไปด้วยบริเวณกรงนกเลี้ยงขนาดใหญ่ กรงนกที่จัดแสดงโชว์ กรงนกกักกัน และกรงนกทดแทน นกทั้งหมดที่อยู่ภายในกรงจะถูกจับโดยใช้ตาข่ายพราง (mist net) และสวิง (hand net) ส่วนนกธรรมชาติที่อาศัยอยู่บริเวณภายนอกกรงจะถูกเก็บตัวอย่างโดยใช้ตาข่ายพราง โดยกางตาข่ายไว้บริเวณด้านนอกกรงเลี้ยงสัตว์ สำหรับการเฝ้าระวังและสำรวจโรคไข้หวัดนกในสวนสัตว์จะทำการเก็บตัวอย่างจากนกที่มีชีวิต ทุกๆ 2 เดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม 2552 จนถึงเดือนตุลาคม 2553 โดยทำการเก็บตัวอย่างจาก

หลอดลม และบริเวณทวารร่วมด้วยวิธีการป้าย เมื่อได้ตัวอย่างแล้วจะใส่หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 10 มิลลิลิตรที่อยู่ในบรรจุ viral transport medium (VTM) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งส่วนประกอบของ VTM จะประกอบด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) bovine plasma albumin, เพนิซิลินจี (23106 ยูนิท/ลิตร), สเตรปโตมัยซิน (200 มิลลิกรัม/ลิตร), เจนต้ามัยซิน (250 มิลลิกรัม/ลิตร), นิสเตติน (0.53106 ยูนิท/ลิตร), โพลีมิกซินบี (23106 ยูนิท/ลิตร), โอฟลอกซาซิน (60 มิลลิกรัม/ลิตร) และซัลฟาเมทอกซาโซล (0.2 กรัม/ลิตร) การเก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำที่บริเวณปีก (wing vein) เก็บในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ปราศจากสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด รวมทั้งทำการบันทึกชนิดของนกเพศ ช่วงอายุ สภาพของสัตว์และหมายเลขห่วงขาของนกที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นเก็บตัวอย่างในถังเก็บความเย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์และห้องปฏิบัติการชีววิทยาของศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่น และสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ภายใน 48 ชั่วโมงเพื่อทำการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 ต่อไป

การแยกเชื้อและการเพาะเลี้ยงไวรัสไข้หวัดนก

นำตัวอย่างที่ป้ายจากหลอดลมและทวารร่วมที่เก็บใน VTM 3 มิลลิลิตร กรองผ่าน Millipore membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนที่กรองได้ไปใช้ในการแยกเชื้อหรือนำส่วนน้ำใสมาปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีและนำส่วนใส (supernatant) ไปใช้ในการแยกเชื้อ เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสคือ MDCK (Madin-Darby canine kidney) โดยหยอดตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตรลงในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อหลุมของ 24-well tissue culture plate ทำซ้ำสองหลุมต่อตัวอย่าง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจะดูดส่วนใสทิ้ง 150 ไมโครลิตร เติมน้ำเลี้ยง (TPCK-MEM) ลงไป 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วันและสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect: CPE) ทุกวัน หากพบเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเกิด CPE แสดงว่าเซลล์อาจมีการติดเชื้อไวรัส จะทำการพิสูจน์เชื่อว่าเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัด

นกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 หรือไม่ โดยใช้วิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล RT-PCR

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 โดยวิธี Multiplex RT-PCR

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรงสายพันธุ์ย่อย H5N1 ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR จะใช้เป็นการยืนยัน สายพันธุ์ย่อยของเชื้อไวรัส โดยนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ มาสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Germany) primer ที่ใช้ในการตรวจชุดที่ 1 คือ Primer ที่จำเพาะต่อยีน M Forward: 5'AAA AGC AGG TAG ATA TTG AAG C 3'Reverse: 5'GTC CCA ATT GTC CTC ATT GC 3'Primer ที่จำเพาะต่อยีน H5 (Poddar, 2002) Forward: 5'ACT CCA ATG GGG GCG ATA AAC 3'Reverse: 5'CAA CGG CCT CAA ACT GAG GTG T 3' และ Primer ที่จำเพาะต่อยีน N1 Forward: 5'AAG GGT TTT CAT TTA AAT ACG GGC 3' Reverse: 5'CCA GTC CAC CCA TTT GGA TCC 3' โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์การทำ Multiplex RT-PCR สำหรับ primer ชุดที่ 1 ดังนี้ Reverse Transcription 50 องศาเซลเซียส 30 นาที First Denature 95 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้น Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที Annealing 60 องศาเซลเซียส 45 วินาทีและ Extension 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย Final Extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ในกรณีที่ Primer ชุดที่ 1 ให้ผลบวกไม่ครบทุกยีนใช้ primer ชุดที่ 2 ในการตรวจเพิ่มเติม โดยมี Primer ดังนี้ primer ที่จำเพาะต่อยีน M (Poddar 2002) Forward: 5'CCG AGA TCG CAC AGA GAC TTG AAG AT 3'Reverse: 5'GGC AAG TGC ACC AGC AGA ATA ACT 3' Primer ที่จำเพาะต่อยีน H5 (Lee และคณะ 2001) Forward: 5'ACA CAT GCY CAR GAC ATA CT 3' Reverse: 5'CTY TGR TTY AGT GTT GAT GT 3' และ Primer ที่จำเพาะต่อยีน N1 Forward: 5' ATG GTA ATG GTG TTT GGA TAG GAA G 3' Reverse: 5'AAT GCT GCT CCC ACT AGT CCA G 3' โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์การทำ Multiplex RT-PCR สำหรับ primer ชุดที่ 2 เช่นเดียวกับชุดที่ 1 แต่ใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส ตัวควบคุมบวก (positive control) ใช้สายพันธุ์อ้างอิงของเชื้อไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง

สายพันธุ์ย่อย H5N1 (A/chicken/Thailand/vsmu-3-CBI/2005) ในการตรวจวินิจฉัย

การตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันทางซีรัมวิทยา (WHO 2002)

Hemagglutination inhibition (HI) test

นำซีรัมตัวอย่างที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง ทำปฏิกิริยากับ Receptor-Destroying Enzyme (RDE) (Denka Seiken, Japan) ที่ระดับความเจือจางสุดท้ายเป็น 1:4 บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนนำมากำจัด RDE ส่วนที่ยังเหลือในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และเติม 50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงห่านพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดเก็บส่วนน้ำใสเพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป ในการทดสอบด้วย HI ซีรัมตัวอย่างที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ RDE จะทำการปรับระดับความเจือจางเป็น 1:20 ก่อนนำมาหยอดลงในไมโครเพลท ปริมาณ 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการเจือจางลง 2 เท่าเป็นลำดับ แล้วนำมาเติมไวรัสที่มีความเข้มข้น 4 HAU ปริมาณ 25 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนนำมาเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงห่าน ปริมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตรวจสอบระดับแอนติบอดีไคเตอร์ของปฏิกิริยาโดยพิจารณาจากหลุมสุดท้ายของซีรัมตัวอย่างทดสอบที่เกิดการยับยั้งการเกาะกลุ่มอย่างสมบูรณ์

Microneutralization (Micro NT) test

นำซีรัมตัวอย่างที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ RDE ที่ปรับระดับความเจือจางเป็น 1:20 หยอดลงในไมโครเพลท ปริมาณ 60 ไมโครลิตร ทำการเจือจางลง 2 เท่าเป็นลำดับ ก่อนนำมาเติมไวรัสที่มีความเข้มข้น 100 TCID₅₀/0.1 มิลลิตร แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

ส่วนผสมที่มีซีรัมตัวอย่างกับไวรัสจะย้ายไปลงในไมโครเพลท ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MDCK อยู่ จากนั้นบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสที่มี 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์นาน 18 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ (CPE) ก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธี ELISA เพื่อตรวจสอบส่วนนิวคลีโอโปรตีนของไวรัสโดยใช้ mouse specific monoclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA.) เป็น primary antibody และ goat anti-mouse Igs (Dakocytomation, Glostrup, Denmark) เป็น secondary antibody เมื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วนำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 450/630 พิจารณาซีรัมตัวอย่างบวกเมื่อมีระดับภูมิคุ้มกันมากกว่าหรือเท่ากับ 40 พิจารณาซีรัมตัวอย่างลบเมื่อมีระดับภูมิคุ้มกันน้อยกว่า 40

ผลการวิจัย

จากการดำเนินงานเฝ้าระวังและสำรวจโรคไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 ในนกเลี้ยงและนกธรรมชาติ ณ สวนสัตว์จังหวัดสุพรรณบุรี ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2552 จนถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 เก็บตัวอย่างจากนกได้ทั้งหมดจำนวน 325 ตัวอย่าง ประกอบด้วยนกจำนวน 31 ชนิดจาก 12 วงศ์ โดยชนิดที่เก็บตัวอย่างได้มากที่สุดได้แก่ ไก่ฟ้าสีทอง นกเอี้ยงหงอน ไก่ฟ้ารีฟ นกกาบบัว นกยูงอินเดีย และชนิดอื่นๆ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่าไม่พบเชื้อและสารพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 จากการตรวจด้วยวิธีการแยกเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงไวรัสและวิธี Multiplex RT-PCR นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบระดับของภูมิคุ้มกันของนกต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 จากการตรวจด้วยทั้งวิธี Hemagglutination inhibition (HI) และ Microneutralization (Micro NT)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดและจำนวนของนกที่ใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 ระหว่างปี พ.ศ. 2552 ถึง 2553

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวน (ตัว)
ไก่แจ้	<i>Gallus domesticus</i>	9
ไก่ต๊อก	<i>Numida meleagris</i>	2
ไก่ป่า	<i>Gallus gallus</i>	4
ไก่ฟ้าพญาลอ	<i>Lophura diardi</i>	13
ไก่ฟ้ารีฟ	<i>Symaticus reevesi</i>	28
ไก่ฟ้าเลดีแอมเฮิร์สต์	<i>Chrysolophus amherstiae</i>	8
ไก่ฟ้าสีทอง	<i>Chrysolophus pictus</i>	98
ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มดำ	<i>Lophura leucomelana lineata</i>	5
ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง	<i>Lophura leucomelanos crawfordii</i>	4
นกกระทุง	<i>Pelecanus rufescens</i>	1
นกกาบบัว	<i>Ibis leucocephalus</i>	20
นกกุลา	<i>Threskiornis melanocephalus</i>	7
นกแก้วโม่ง	<i>Psittacula eupatria</i>	4
นกขุนทอง	<i>Gracula religiosa</i>	3
นกขุนแผน	<i>Urocissa erythrorhyncha</i>	7
นกเขาใหญ่	<i>Streptopelia chinensis</i>	4
นกค้อกคาเทล	<i>Nymphicus hollandicus</i>	3
นกขาปีไหน	<i>Caloenas nicobarica</i>	2
นกตะกรุม	<i>Leptoptilos javanicus</i>	8
นกปากห่าง	<i>Anastomus oscitans</i>	3
นกพิราบป่า	<i>Columba livia</i>	3
นกยูงไทย	<i>Pavo muticus</i>	1
นกยูงอินเดีย	<i>Pavo cristatus</i>	17
นกหลุมพูขาว	<i>Ducula bicolor</i>	1
นกเลิฟเบิร์ด	<i>Agapornis roseicollis</i>	3
นกอีโก้	<i>Porphyrio porphyrio</i>	12
นกเอี้ยงสาริกา	<i>Acridotheres tristis</i>	2
นกเอี้ยงหงอน	<i>Acridotheres javanicus</i>	43
เป็ดคับแค	<i>Nettapus coromandelianus</i>	3
เป็ดมาลลาร์ด	<i>Anas platyrhynchos</i>	3
รวม		325

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 จากตัวอย่างการป่ายจากหลอดลม ช่องทวารร่วม และซีรัมจากนกในกรงเลี้ยงและนกธรรมชาติ ซึ่งอาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์ในกรงเลี้ยงชนิดอื่นๆ โดยใช้วิธีการวางตาข่ายพรางและใช้สวิงจับ ณ สวนสัตว์แห่งหนึ่งในจังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 325 ตัวอย่าง ไม่พบผลบวกทางห้องปฏิบัติการ อาจเนื่องมาจากการที่นกในกรงเลี้ยงและนกธรรมชาติที่ทำการศึกษา ยังไม่เคยได้รับการสัมผัสกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 นอกจากนี้ภายหลังจากการตายของเสื่อจำนวนหลายตัว ในสถานที่แห่งนี้จากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 ทางศูนย์เฝ้าระวังฯ จึงร่วมกับเจ้าหน้าที่ของสวนสัตว์ได้เพิ่มระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity system) ซึ่งเป็นวิธีการป้องกันโรคไข้หวัดนกแบบก่อโรครุนแรง สายพันธุ์ย่อย H5N1 ที่มีการแนะนำให้ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก (FAO 2004) โดยการให้ผู้เข้าชมสวนสัตว์และเจ้าหน้าที่สวนสัตว์จุ่มเท้าก่อนเข้าสู่เขตที่มีการเลี้ยงสัตว์ มีการปรับปรุงสิ่งแวดล้อมภายในกรงเลี้ยง มีการพ่นยาฆ่าเชื้อในจุดอับของกรงเลี้ยงทุกสัปดาห์ การป้องกันการเข้าออกของสัตว์อื่นสู่บริเวณที่มีการเลี้ยงสัตว์ รวมทั้งการให้ความรู้แก่เจ้าหน้าที่ของสวนสัตว์ในเรื่องโรคไข้หวัดนก และการป้องกันตนเองจากโรคดังกล่าว

Siengsanon และคณะ (2009) ได้รายงานถึงการระบาดของโรคไข้หวัดนกในนกธรรมชาติในประเทศไทย มักเกิดขึ้นตามมาจากการระบาดของโรคในปศุสัตว์ และอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมิแนวโน้มไปในทางเดียวกัน เนื่องจากการระบาดของโรคไข้หวัดนกในประเทศไทยที่มีรายงานในปศุสัตว์ ครั้งสุดท้ายในปี พ.ศ. 2551 (กรมปศุสัตว์ 2554) และ การศึกษานี้ดำเนินการหลังจากช่วงเวลาดังกล่าว ซึ่งการระบาดในปศุสัตว์ได้สงบลงแล้ว จึงอาจเป็นเหตุผลที่ไม่พบการระบาดในนกทั้งในกรงเลี้ยงและนกธรรมชาติในช่วงเวลาของการศึกษาในครั้งนี้

ปัจจุบันแม้ว่าจะไม่มีรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย แต่ความเสี่ยงในการเกิดการระบาดซ้ำก็ยังมีอยู่ เนื่องจากยังพบการระบาดในประเทศเพื่อนบ้านของประเทศไทยหลายประเทศ เช่น เวียดนาม กัมพูชา และ อินโดนีเซีย เป็นต้น (OIE 2011) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังและติดตามโรคนี้ต่อไปอย่างต่อเนื่อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.ทิพาพรหม ปานลักษณ์ เจ้าหน้าที่จากกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ อนุชีววิทยา และซีรัมวิทยา ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่น และสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

- ปรางกวิณ แยังขจร ภาวิน ผดุงทศ นัทธินิ กิตติธรรม นิภา จารุปาลี และวีรวรรณ วิละพงษ์เพชร (2549). โรคไข้หวัดนก. เชียงใหม่: สัตวแพทยสาร. 4(2): 137-147.
- สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ (2554). รายงานสถานการณ์ประจำวันวันที่ 4 มกราคม 2554 ณ เวลา 16.00 น. [Online available]: http://www.dld.go.th/dcontrol/th/images/stories/document/AI_2010/January/4-1-54.pdf. Accessed on 7 September 2011.
- Academic health center University of Minnesota (AHC). (2011). Avian Influenza (Bird Flu): Agricultural and Wildlife Considerations. [Online available]: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/influenza/avianflu/biofacts/avflu.html>
- FAO. (2004). Recommendations on the Prevention, Control and Eradication of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) in Asia (proposed with the support of the OIE) September 2004. [Online available]: http://web.oie.int/eng/AVIAN_INFLUENZA/FAO%20recommendations%20on%20HPAI.pdf. Accessed on 7 September 2011.
- Fouchier R.A.M., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., and Osterhaus A.D. M. E. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol, 79: 2814-2822.
- Keawcharoen J., Oraveerakul K., Kuiken T., Fouchier R.A.M., Amonsin A., Payungporn S., Noppornpanth S., Wattanodorn S., Theamboonlers A., Tantilertcharoen R., Pattanarangsarn R., Arya N.,

- Ratanakorn P., Osterhaus A.D.M.E., and Poovorawan Y. (2004). Avian influenza H5N1 in Tigers and Leopards. *Emerg Infect Dis*, 10(12): 2189-2191.
- 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 Methods*, 97(1-2): 13-22.
- OIE. (2011). Update on highly pathogenic avian influenza in animals (Type H5 and H7). [Online available]: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2011/>. Accessed on 7 September 2011.
- Poddar S.K. (2002). Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J Virol Methods*, 99: 63-70.
- Siengsanon J., Chaichoune K., Phonakngune R., Sariya L., Prompiram P., Kocharin W., Tungsudjai S., Suwanpakdee S., Wiriyarat W., Pattanarangsarn R., Robertson I., Blacksell S.D. and Ratanakorn P. (2009). Comparison of outbreaks of H5N1 highly pathogenic avian influenza in wildbirds and poultry in Thailand. *J wildl Dis*, 45(3): 740-747.
- Songserm T., Amonsin A., Jam-on R., Sae-Heng N., Pariyothorn N., Payungporn S., Theamboonlers A., Chutinimitkul S., Thanawongnuwech R. and Poovorawan Y. (2006). Fatal avian influenza H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis*, 12(11): 1744-1777.
- Spackman E. (2008). A brief introduction to the avian influenza virus. *Methods Mol Bio*, 436: 1-6.
- WHO. (2002). WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. [Online available]: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf>. Accessed on 7 September 2011.