



มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10300-2551

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10300-2008

การชันสูตรโรคไข้หวัดนก

DIAGNOSIS OF AVIAN INFLUENZA

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ICS 11.220

ISBN XXX-XXX-XXX-X



มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10300-2551

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10300-2008

การชันสูตรโรคไข้หวัดนก

DIAGNOSIS OF AVIAN INFLUENZA

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

50 ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ 0 2561 2277 โทรสาร 0 2561 3357

www.acfs.go.th

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 125 ตอนพิเศษ 139 ง
วันที่ 18 สิงหาคม พุทธศักราช 2551

คณะกรรมการเฉพาะกิจพิจารณามาตรฐานและข้อกำหนดสุขอนามัยสัตว์บก
เรื่อง การขึ้นสูตรโรคใช้หวัดนก

- | | |
|---|------------------|
| 1. อธิบดีกรมปศุสัตว์
(นายธนิศย์ เอนกวิทย์
แทนอธิบดีกรมปศุสัตว์) | ประธานอนุกรรมการ |
| 2. ผู้แทนกรมปศุสัตว์
(นางสาวอรพินทร์ ภาสวรกุล) | อนุกรรมการ |
| 3. ผู้แทนสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นางอรทัย ศิลปนาพร
นางสาวยุพา เหล่าจินดาพันธ์) | อนุกรรมการ |
| 4. ผู้แทนสำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์
(นายประสิทธิ์ ชัยทวีทรัพย์
นางฉันทนี บุรณะไทย) | อนุกรรมการ |
| 5. ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธวัช เล็กดำรงศักดิ์) | อนุกรรมการ |
| 6. ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ทวีศักดิ์ ส่งเสริม) | อนุกรรมการ |
| 7. ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
(นางพัชรภรณ์ อนันต์เกียรติกุล) | อนุกรรมการ |
| 8. ผู้แทนคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(รองศาสตราจารย์สุภาพร อีสริโยดม) | อนุกรรมการ |
| 9. ผู้แทนสัตวแพทยสภา
(ศาสตราจารย์จิโรจ ศศิปรียจันทร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมศักดิ์ ภัคภิบุญ) | อนุกรรมการ |
| 10. ผู้แทนสภาหอการค้าแห่งประเทศไทย
(นางสาวพรศรี เหล่ารุจิสวัสดิ์) | อนุกรรมการ |

- | | |
|---|---|
| 11. ผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้แทนเกษตรกร หรือ ผู้แทนภาคเอกชน (เฉพาะคราวประชุม) | อนุกรรมการ |
| (นางอรุณี ชัยสิงห์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีระพล ศิริณฤมิตร
นางอุทุมพร ศรีสถิตยน์รากูร | ผู้ทรงคุณวุฒิด้านการขนส่งโรคไข้หวัดนก
ผู้ทรงคุณวุฒิด้านการขนส่งโรคไข้หวัดนก
ผู้แทนภาคเอกชน) |
| 12. ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ | อนุกรรมการและเลขานุการ |
| สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นางสาวศศราญมณี กระจำวงษ์) | |
| 13. ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ | อนุกรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ |
| สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นางสาวมินตรา ลักขณา) | |

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การขนส่งโรคไข้หวัดนกนี้ กำหนดวิธีการขนส่งเพื่อใช้รับรองการปลอดโรคไข้หวัดนก และใช้เป็นคู่มือการขนส่งโรคไข้หวัดนกในห้องปฏิบัติการให้เป็นไปอย่างถูกต้อง แม่นยำ ซึ่งประกอบด้วย วิธีการเก็บตัวอย่าง และการขนส่งทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีทางไวรัสวิทยา วิทยาภูมิคุ้มกัน และชีววิทยาโมเลกุล เพื่อส่งเสริมระบบการผลิตสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัย และมีคุณภาพเหมาะสมต่อการบริโภคทั้งภายในประเทศและระหว่างประเทศ และเป็นประโยชน์ในการประกาศ (notify) สถานะการระบาดของโรคไข้หวัดนกประเทศและต่อองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้กำหนดขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากผลการศึกษาโครงการศึกษาสภาวะโรคระบาดที่สำคัญในสัตว์ปีกในประเทศไทยของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติซึ่งได้รับความร่วมมือการดำเนินงานจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้กำหนดขึ้นโดยใช้เอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

World Organisation for Animal Health (OIE). 2005. Chapter 2.7.12. Avian Influenza. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris, France.



ประกาศคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ :

การชั้นสูตรโรโซ้หัวदनก

พ.ศ. 2551

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ในการประชุมครั้งที่ 1/2551 เมื่อวันที่ 11 สิงหาคม พ.ศ. 2551 มีมติเห็นชอบให้กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชั้นสูตรโรโซ้หัวदनก เพื่อประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพและตรวจสอบคุณภาพ การอำนวยความสะดวก สะดวกทางการค้า และการคุ้มครองผู้บริโภค

ดังนั้น อาศัยอำนาจของคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ซึ่งแต่งตั้งโดยมติคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 5 สิงหาคม พ.ศ. 2551 จึงออกประกาศกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชั้นสูตรโรโซ้หัวदनก ไว้ใช้เป็นมาตรฐานสมัครใจ ดังมีรายละเอียดแนบท้ายประกาศนี้

ประกาศ ณ วันที่ 14 สิงหาคม พ.ศ. 2551

(นายสมศักดิ์ ปริศนานันทกุล)

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ประธานคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

การชันสูตรโรคไข้หวัดนก

1 ขอบข่าย

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ กำหนดรายละเอียดการชันสูตรโรคไข้หวัดนก (avian influenza) ที่มีสาเหตุจากไวรัสอินฟลูเอนซา (influenza virus) ชนิด A (type A) ชนิดย่อย H5 และ H7 (subtype H5 and H7)

2 นิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 โรคไข้หวัดนก (avian influenza) หมายถึง โรคระบาดร้ายแรงในสัตว์ปีก ที่มีสาเหตุจากไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิด A ชนิดย่อย H5 และ H7

2.2 สัตว์ปีก (avian) หมายถึง สัตว์ปีกทั้งหลายซึ่งได้แก่ นก ไก่ เป็ด ห่าน

2.3 การชันสูตรโรค (diagnosis) หมายถึง การตรวจโรคสัตว์ปีกที่ป่วย หรือตาย หรือที่สงสัยว่าติดไวรัสอินฟลูเอนซา โดยใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการร่วมกับการซักประวัติจากผู้ที่เกี่ยวข้อง และสังเกตอาการของสัตว์ปีกนั้น

2.4 ห้องปฏิบัติการชีวনিরภัย (laboratory biosafety) หมายถึง ห้องปฏิบัติการที่มีระบบโครงสร้าง การดำเนินงานและการตรวจสอบที่ชัดเจน ขั้นตอนปฏิบัติการที่ปลอดภัย มีการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ องค์ความรู้ และเทคโนโลยีเพื่อป้องกันบุคลากร ห้องปฏิบัติการ และสิ่งแวดล้อม จากชีววัตถุอันตรายต่างๆ เช่น เชื้อโรค เลือด เนื้อเยื่อ สารพันธุกรรม สารพิษ ทำให้สามารถปฏิบัติงานเกี่ยวกับชีววัตถุอันตรายต่างๆ ได้อย่างปลอดภัย

3 การชันสูตรโรค

การชันสูตรโรคไข้หวัดนกโดยวิธีทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ วิธีทางไวรัสวิทยา วิทยาภูมิคุ้มกัน และชีววิทยาโมเลกุล ซึ่งเป็นวิธีที่ระบุอยู่ในคู่มือการชันสูตรโรคและการใช้วัคซีนในสัตว์บก (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ

โรคไข้หวัดนกเป็นโรคที่มีอันตรายร้ายแรงที่กำหนดในกฎหมายว่าด้วยโรคระบาดสัตว์ (ภาคผนวก ก) และมีความเสี่ยงสูงในการแพร่กระจายของเชื้อภายในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นเพื่อเป็นการลดความเสี่ยงต่อไวรัสอินฟลูเอนซา ห้องปฏิบัติการต้องมีระบบชีวনিরภัย (laboratory biosafety) ครอบคลุมทั้งด้านสถานที่ เครื่องมือเครื่องใช้ วัสดุอุปกรณ์ และระบบการปฏิบัติงาน รวมทั้งบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญเกี่ยวกับ การปฏิบัติงานที่ดีในห้องปฏิบัติการ (good laboratory practice) ความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเสี่ยง (risk group of microorganisms) วิธีการจัดการกับตัวอย่างหรือสิ่งติดเชื้อ และการควบคุมการแพร่เชื้อ โดยมีการตรวจประเมินประสิทธิภาพของระบบชีวনিরภัยในห้องปฏิบัติการดังกล่าว

3.1 การเก็บ และนำส่งตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างต้องเหมาะสม ถูกวิธี และนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุดมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อความถูกต้องแม่นยำของการชันสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างที่ใช้ในการชันสูตรโรคไข้หวัดนกสามารถเก็บจากสัตว์มีชีวิตที่ป่วยหรือสงสัยว่าติดเชื้อ หรือซากสัตว์ที่ตายใหม่ๆ เพื่อไม่ให้เกิดการเสื่อมสลายตัวเองหลังตาย (post mortem autolysis)

3.1.1 การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ปักษีมีชีวิต

(1) สัตว์ที่ตายจากระบบหายใจ โดยใช้สำลีหรือใยสังเคราะห์ (polyester) พันไม้ซึ่งปลอดเชื้อ ป้าย (swab) สัตว์ที่ตายจากเยื่อเมือกของช่องปาก (choanal slit) หลอดลม (trachea) หลังจากนั้นให้จุ่มลงในน้ำยาเก็บรักษาไวรัส (viral transport media) เช่น น้ำยา PBS (phosphate buffer saline: PBS) หรือน้ำยาเก็บรักษาไวรัสอื่นๆ ที่ผสมยาปฏิชีวนะตามภาคผนวก ข

การเก็บสำลีพันไม้ที่ป้ายตัวอย่าง อาจเก็บรวมกันในน้ำยาเก็บรักษาไวรัสได้ไม่เกิน 5 ตัวอย่างต่อหลอด

(2) สัตว์ที่ตายจากทวารร่วม (cloaca) โดยใช้สำลีหรือใยสังเคราะห์พันไม้ซึ่งปลอดเชื้อป้ายผนังทวารร่วมหรือเก็บมูลสด ไม่น้อยกว่า 1 g การเก็บสำลีพันไม้ที่ป้ายตัวอย่าง อาจเก็บรวมกันในน้ำยาเก็บรักษาไวรัสได้ไม่เกิน 5 ตัวอย่างต่อหลอด

3.1.2 การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ปีกตาย ให้ส่งซากสัตว์ปีกทั้งตัว หรือเก็บอวัยวะ ได้แก่ หลอดลม ปอด ตับอ่อน ตับ ม้าม ลำไส้ ไต หัวใจ และสมอง เป็นต้น แยกบรรจุในภาชนะตามความเหมาะสม

3.1.3 ให้นำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการทันทีหรือภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างในภาชนะที่ปิดสนิท ป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ และควบคุมอุณหภูมิประมาณ 4 °C (2 °C ถึง 8 °C) ไม่ควรแช่แข็งตัวอย่างที่ส่งตรวจ

3.2 การชันสูตรโรคไข้หวัดนก

การชันสูตรโรคไข้หวัดนก ชนิดย่อย H5 และ H7 ตามวิธีมาตรฐาน มี 2 ขั้นตอน ตามภาคผนวก ค ดังนี้

(1) การเพาะแยกไวรัส (virus isolation) โดยการฉีดตัวอย่างเข้าไขไก่ฟัก และวิธี HA (haemagglutination test: HA test) เพื่อตรวจหาคุณสมบัติการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ขั้นตอนนี้แสดงว่าเป็นไวรัสอินฟลูเอนซา

ชนิด A หรือเชื้อชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ หากผลการทดสอบ HA เป็นบวกให้ดำเนินการตามข้อ (2) ต่อไป

(2) การระบุชนิดไวรัส (virus identification) ขั้นตอนนี้ครอบคลุมการทดสอบไวรัสใช้หัวตนกชนิด A และการทดสอบชนิดย่อย ด้วยวิธี AGID (Agar Gel Immunodiffusion: AGID) ซึ่งเป็นการตกตะกอนในวุ้น หรือใช้วิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) หรือใช้วิธีอื่นที่องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศระบุเพื่อยืนยันว่าเป็นไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด A หากได้ผลเป็นบวก ให้พิสูจน์ไวรัสชนิดย่อยโดยใช้วิธีจำเพาะสำหรับ H5 หรือ H7 ด้วยวิธี HI (haemagglutination inhibition test: HI test) เพื่อตรวจหาการยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

อาจใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุลตามภาคผนวก ข เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรม ซึ่งได้แก่ วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สผกผัน หรืออาร์ทีพีซีอาร์ (reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR) และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สผกผัน แบบเวลาจริง หรือเรียลไทม์อาร์ทีพีซีอาร์ (real-time RT-PCR)

3.2.1 การเพาะแยกและเพิ่มจำนวนไวรัส โดยฉีดตัวอย่างตามข้อ 3.1 เข้าในไข่ไก่ฟัก และให้ทดสอบด้วยวิธี HA ต่อไป

ขั้นตอนนี้ต้องดำเนินการในห้องปฏิบัติการที่มีระบบชีวনিরภัย

(1) ตัวอย่างเป็นอวัยวะภายในให้นำมาบดละเอียดผสมกับน้ำยา PBS ให้มีความเข้มข้นสัดส่วนโดยมวลต่อปริมาตรเป็น 10% ถึง 20% แต่ถ้าเป็นตัวอย่างที่เก็บด้วยสำลี (พันไม้) ที่อยู่ในน้ำยาเก็บรักษาไวรัสตามภาคผนวก ขให้นำมาเขย่าแรงๆด้วยเครื่องผสมวอร์เท็กซ์ (vortex mixer) แล้วแยกเอาสำลีพันไม้ ออก

(2) นำตัวอย่างที่ได้ มาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 1,000 g นาน 10 นาที

(3) นำส่วนใส (supernatant) ใส่เพนนิซิลิน (penicillin) 2,000 units/ml, สเตربتอมิซิน (streptomycin) 2 mg/ml, เจนตามิซิน (gentamycin) 50 µg/ml และมิโคสตาติน (mycostatin) 1,000 units/ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมงเพื่อกำจัดแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อน หรือกำจัดแบคทีเรียด้วยวิธีอื่น เช่น กรองเอาแบคทีเรียออกด้วยเยื่อแผ่นกรอง (membrane filter) ขนาด 0.22 µm

(4) นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ (3) ปริมาตรอย่างน้อย 200 µl ฉีดเข้าในถุงหุ้มตัวอ่อน (allantoic sac) ของไข่ไก่ฟักที่ปลอดเชื้อหรือที่ปลอดภูมิคุ้มกันต่อไวรัสอินฟลูเอนซาที่อายุ 9 วัน ถึง 11 วัน จำนวน 5 ฟอง ต่อ 1 ตัวอย่าง

(5) นำไข่ฟักที่ฉีดไวรัสแล้วเข้าตู้ฟักที่อุณหภูมิ 35 °C ถึง 37 °C เป็นเวลา 4 วัน ถึง 7 วัน

(6) ตรวจสอบการมีชีวิตของตัวอ่อนในไข่ฟักทุกวัน ตั้งแต่วันที่ 4 ถึงวันที่ 7

(7) นำไข่ฟักที่ตัวอ่อนตาย หรือเมื่อครบกำหนดภายหลังการฉีดไวรัส แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง

(8) เก็บน้ำในถุงหุ้มตัวอ่อน (allantoic fluid) นำไปทดสอบคุณสมบัติการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี HA ตามภาคผนวก ง.2

(9) หากผลที่ได้เป็นลบ ให้นำน้ำจากถุงหุ้มตัวอ่อน ไปทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง (2nd passage) ในขั้นตอนที่ (4) ถึงขั้นตอนที่ (8)

3.2.2 การพิสูจน์ไวรัสอินฟลูเอนซา

เนื่องจากวิธี HA ที่ให้ผลบวก โดยพบการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (ภาพที่ จ.1 และภาพที่ จ.2) แสดงว่าน้ำในถุงหุ้มตัวอ่อนจากไข่ไก่ฟัก อาจมีไวรัสอินฟลูเอนซา หรือไวรัสนิวคาสเซิล (Newcastle disease virus: NDV) หรือเชื้อชนิดอื่น ดังนั้นต้องทำการยืนยันว่าเป็นไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิด A ด้วยวิธี AGID กับแอนติซีรัมอินฟลูเอนซา ชนิด A (known influenza type A antisera) หรืออาจใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุลเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมชนิด A ตามภาคผนวก ข

อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ คือ วิธี ELISA ที่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ซึ่งมีความจำเพาะกับไวรัสอินฟลูเอนซา สามารถนำมาวินิจฉัยโรคไขหวัดนกได้อย่างรวดเร็ว

จากนั้นจึงนำไปทดสอบชนิดย่อย H5 และ H7 ด้วยวิธี HI โดยตรวจหาการยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกับแอนติซีรัม (antiserum) ต่อชนิดย่อย H5 และ H7 หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อชนิดย่อย H5 และ H7 ตามภาคผนวก ง.3 หรืออาจใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุลเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมชนิดย่อย H5 และ H7 ตามภาคผนวก ข

4 การตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา

การตรวจพบแอนติบอดีทางซีรัมวิทยา สามารถใช้ประโยชน์ในการระบุถึงการติดไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดย่อย H5 และ H7 ได้ในกรณีที่ไม่มี การใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคไขหวัดนกในสัตว์ปีก วิธีทางซีรัมวิทยาที่ใช้เป็นมาตรฐาน คือ วิธี HI

การแปลผล ถ้าได้ระดับ HI titre เท่ากับหรือมากกว่า $\log_2 4$ หรือ 2^4 หรือ 1:16 เมื่อใช้แอนติเจนเท่ากับ 4 HAU (haemagglutinating unit: HAU) แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดย่อยนั้น ๆ

ภาคผนวก ก

วิทยาการระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคไข้หวัดนก

(ข้อ 3)

ก.1 วิทยาการระบาด (epidemiology)

โรคไข้หวัดนกหรือโรคไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก เป็นโรคระบาดร้ายแรงในสัตว์ปีกและอาจติดต่อถึงคนได้ ในบางกรณีทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในอัตราสูง โรคนี้มีสาเหตุจากไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิด A ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) ไวรัส จัดอยู่ในวงศ์ (family) Orthomyxoviridae สกุล (genus) Influenzavirus แยกเป็นชนิดย่อย (subtype) ตามความแตกต่างของแอนติเจนที่เปลือกหุ้ม 2 ชนิด คือ ฮีมาแอกกลูตินิน (haemagglutinin: HA) และ นิวรามินิเดส (neuraminidase: NA) โดยโรคไข้หวัดนกที่อยู่ในบัญชีโรค (listed diseases) ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organisation for Animal Health: OIE) หมายถึง โรคที่มีสาเหตุจากไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดย่อย H5 และ H7 (notifiable avian influenza: NAI) เท่านั้น และเนื่องจากโรคนี้มีความสำคัญต่อการผลิตสัตว์ปีกและการค้าระหว่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดย่อย H5N1 ที่มีรายงานการเกิดโรคและทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตเป็นครั้งแรกในฮ่องกงเมื่อ พ.ศ. 2540 ก่อนที่จะแพร่ระบาดไปทั่วโลก และรุนแรงในหลายประเทศในทวีปเอเชีย ประเทศไทยจึงกำหนดให้โรคไข้หวัดนกเป็นโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติมเมื่อ พ.ศ. 2547 ตามกฎหมายว่าด้วยโรคระบาดสัตว์

ก.2 คุณลักษณะของไวรัส (viral characteristics)

ไวรัสอินฟลูเอนซาเป็นไวรัสอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ชนิดมีเปลือกหุ้ม (envelope) โดยเปลือกชั้นนอกเป็นชั้นไขมัน (lipid membrane) ที่ได้จากโฮสต์เซลล์ ประกอบด้วยไกลโคโปรตีน (glycoproteins) 3 ชนิด แต่ที่สำคัญมีสองชนิด คือ ฮีมาแอกกลูตินิน และนิวรามินิเดส ซึ่งมีลักษณะเป็นปุ่มยื่นออกมา (spikes) ไกลโคโปรตีนอีกชนิดหนึ่งมีจำนวนน้อยกว่า ได้แก่ แมทริกซ์ โปรตีน 2 (matrix protein 2: M2) ซึ่งเปลือกชั้นในจะเป็นแมทริกซ์ โปรตีน 1 (matrix protein: M1) ทำให้เชื้อคงรูปร่างและห่อหุ้มส่วนประกอบไรโบนิวคลีโอโปรตีน (ribonucleoprotein: RNP) ที่อยู่ภายในจำนวน 8 ท่อน (segments) และเป็นรหัส (code) สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัส (viral proteins) 10 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงโปรตีนที่ไวรัสสร้าง
(ข้อ ก.2)

ท่อน (segment)	ขนาด (nucleotides)	โพลีเปปไทด์	หน้าที่
1	2,341	polymerase PB2	Subunit of polymerase: Host cap binding and endonuclease
2	2,341	polymerase PB1	Catalytic subunit of polymerase
3	2,233	polymerase PA	Subunit of polymerase, active in vRNA synthesis
4	1,778	haemagglutinin HA	Haemagglutinin
5	1,565	nucleoprotein NP	Nucleoprotein: Part of transcriptase complex
6	1,413	neuraminidase NA	Neuraminidase: release of virus
7	1,027	matrix protein M1	Matrix protein: Major component of virion
		matrix protein M2	Integral membrane protein: Ion channel
8	890	protein NS1 & non structural	Anti-interferon protein. Effects on cellular RNA transport
		protein NS2	RNP nuclear export

ก.3 พยาธิกำเนิด (pathogenesis)

หลังจากสัตว์ปีกได้รับไวรัสอินฟลูเอนซา ไวรัสจะเพิ่มจำนวนในระบบหายใจโดยเฉพาะในโพรงจมูก หรือระบบทางเดินอาหารแล้วแพร่เชื้อออกมา ไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดรุนแรงจะเข้าสู่ชั้นใต้เยื่อเมือก (submucosa) และเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อ (endothelial cells) ของหลอดเลือดฝอย จากนั้นเมื่อไวรัสออกจากเซลล์จะแพร่กระจายไปตามระบบเลือดและระบบน้ำเหลืองสู่อวัยวะต่างๆ เช่น สมอง ผิวหนัง อาการที่ปรากฏและการตายของสัตว์ที่ติดเชื้อเกิดจากความล้มเหลวของอวัยวะต่างๆในร่างกาย ไวรัสอินฟลูเอนซาสามารถคงอยู่ในเนื้อเยื่อ สิ่งคัดหลั่งและมูลของสัตว์ติดเชื้อ รวมทั้งในน้ำและสิ่งแวดล้อม แต่สามารถทำให้ลดฤทธิ์ได้ (inactivation) เช่น ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 3 ชั่วโมง หรืออุณหภูมิ 60 °C นาน 30 นาที หรือในสภาวะที่เป็นกรด หรือด้วยสารเคมีบางชนิด ได้แก่ ออกซิไดส์ซิง เอเจนท์ (oxidizing agents) โซเดียม โดดีซิล ซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate) ลิพิด โซลเวนท์ (lipid solvents) เบตาโพรพิโอแลคโตน (β -propiolactone) ฟอรัมาลิน และสารประกอบไฮโอติน

ก.4 อาการ (clinical signs)

การแบ่งชนิดของโรคไข้หวัดนก แบ่งตามความรุนแรงของการก่อโรค (ภาคผนวก ฉ) เป็น 2 ชนิด คือ โรคไข้หวัดนกชนิดรุนแรง (highly pathogenic avian influenza: HPAI) และโรคไข้หวัดนกชนิดไม่รุนแรง (low pathogenic avian influenza: LPAI) โดยโรคไข้หวัดนกชนิดรุนแรงนับเป็นโรคระบาดที่สำคัญใน

สัตว์ปีกโดยเฉพาะไก่ นอกจากนี้อาการของโรคที่พบยังขึ้นอยู่กับชนิด (species) ของสัตว์ปีก ความรุนแรงของเชื้อ และปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุ การติดเชื้อแทรกซ้อน ระดับภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่ติดเชื้อ ทางที่สัตว์ได้รับเชื้อ ปริมาณของเชื้อ และระยะเวลาที่ได้รับเชื้อ เป็นต้น ตลอดจนปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น สิ่งแวดล้อม ความเครียด อุณหภูมิ โดยทั่วไปอาการที่พบมีดังนี้

- (1) ไก่และไก่วง มีระยะฟักตัวของโรคประมาณ 3 วัน ถึง 5 วัน ไก่แสดงอาการซึม ไม่กินอาหาร ไข่ลดอย่างรวดเร็ว ใบหน้า หงอน และเหนียงบวมคล้ำ ขาดน้ำ มีสิ่งคัดหลั่งในช่องจมูกและปาก ตาแดงหรือมีเลือดคั่ง อาจพบอาการทางระบบประสาทร่วมด้วย อัตราการตายอาจสูงถึง 100% อย่างไรก็ตามก็อาจไม่พบอาการใดๆ ถ้าสัตว์ตายจากโรคนี้เฉียบพลัน
- (2) นก ส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการป่วย หรืออาจตายเฉียบพลัน
- (3) เป็ดและห่าน อาจไม่แสดงอาการป่วย

ก.5 พยาธิวิทยา (pathology)

รอยโรคที่พบในสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ คือ พบปื้นเลือดที่หน้าแข้ง มีคราบน้ำมูกและน้ำตา เยื่อตามีการคั่งเลือดอย่างรุนแรง บวมน้ำใต้ผิวหนังบริเวณหัวและคอ กล้ามเนื้อมีการคั่งเลือด ท่อลมมีเลือดออก และมีเมือกมากผิดปกติ พบจุดเลือดออกที่ด้านในของกระดูกอก หัวใจ เยื่อช่องท้อง ไขมันในช่องท้อง รังไข่ ตับอ่อน เยื่อบุกระเพาะแท้ และกระเพาะบด เนื้อเยื่อน้ำเหลืองในลำไส้ เลือดคั่งอย่างรุนแรงที่ไต รอยโรคของระบบหายใจอาจพบตั้งแต่แบบไม่รุนแรงจนถึงแบบรุนแรง ในรายที่ตายแบบเฉียบพลันอาจไม่พบรอยโรคใดๆ

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่พบในสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ คือ พบเนื้อตายและการอักเสบในอวัยวะต่างๆ โดยมักพบที่สมอง หัวใจ ปอด ตับอ่อน อวัยวะน้ำเหลือง (primary และ secondary lymphoid organs)

อย่างไรก็ตามอาการและพยาธิสภาพดังกล่าวไม่ใช่ลักษณะที่บ่งชี้ของโรคนี้เท่านั้น แต่อาจต้องวินิจฉัยแยกโรคจากโรคระบบหายใจอื่น เช่น โรคนิวคาสเซิล, โรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อ (infectious laryngotracheitis), โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ (infectious bronchitis) และโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น อหิวาต์สัตว์ปีกชนิดเฉียบพลัน (acute fowl cholera) จึงจำเป็นต้องใช้วิธีชันสูตรทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย โดยเฉพาะวิธีการแยกและระบุชนิดไวรัส

ก.6 การแพร่เชื้อ (transmission)

สัตว์ปีกติดเชื้อจากการสัมผัสโดยตรงกับสิ่งคัดหลั่งจากสัตว์ปีกที่เป็นโรค โดยเฉพาะมูลและสิ่งคัดหลั่งจากระบบหายใจ หรือติดต่อจากอาหาร น้ำ อุปกรณ์การเลี้ยง เครื่องใช้ในฟาร์ม ยานพาหนะ รองเท้าและเสื้อผ้าที่ปนเปื้อนเชื้อ แหล่งรังโรค (reservoir) ที่สำคัญในการแพร่เชื้อ คือ สัตว์ปีก ประเภท เป็ด นกน้ำ และนกป่า อาจติดเชื้อโดยไม่แสดงอาการแต่สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อและแพร่เชื้อไปสู่สัตว์ปีกอื่นได้

ภาคผนวก ข

น้ำยาเก็บรักษาไวรัสอินฟลูเอนซา

(ข้อ 3.1 และ ข้อ 3.2)

ข.1 น้ำยาเก็บรักษาไวรัส (viral transport media: VTM) ได้แก่ น้ำยา PBS (phosphate buffered saline: PBS), เบรน ฮาร์ท อินฟิวชัน บรอต (brain heart infusion broth), ทริปโตส นูเทรียน บรอต (tryptose nutrient broth), เปปโตส บรอต (peptose broth), เอ็มอีเอ็ม (minimal essential media: MEM) และเอ็ม199 (M199) เป็นต้น กรณีที่ตัวอย่างเป็นสิ่งคัดหลั่งจากระบบหายใจจะผสมยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลิน (penicillin) 2,000 units/ml, สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 2 mg/ml, เจนตามัยซิน (gentamycin) 50 µg/ml, และมิโคสตาทิน (mycostatin) 1,000 units/ml หากเป็นตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากทวารร่วมหรือมูลสด ให้ใช้ยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นเป็น 5 เท่า

ข.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยา PBS สำหรับใช้เป็น stock solution (10X)

NaCl	80	g
KCl	2	g
Na ₂ HPO ₄	11.5	g
KH ₂ PO ₄	2	g
Distilled water (D.W.)	1,000	ml

(1) ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่นให้ละลายเข้ากัน ปรับให้ได้ความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.0 ถึง 7.4 จะได้ stock solution (10X)

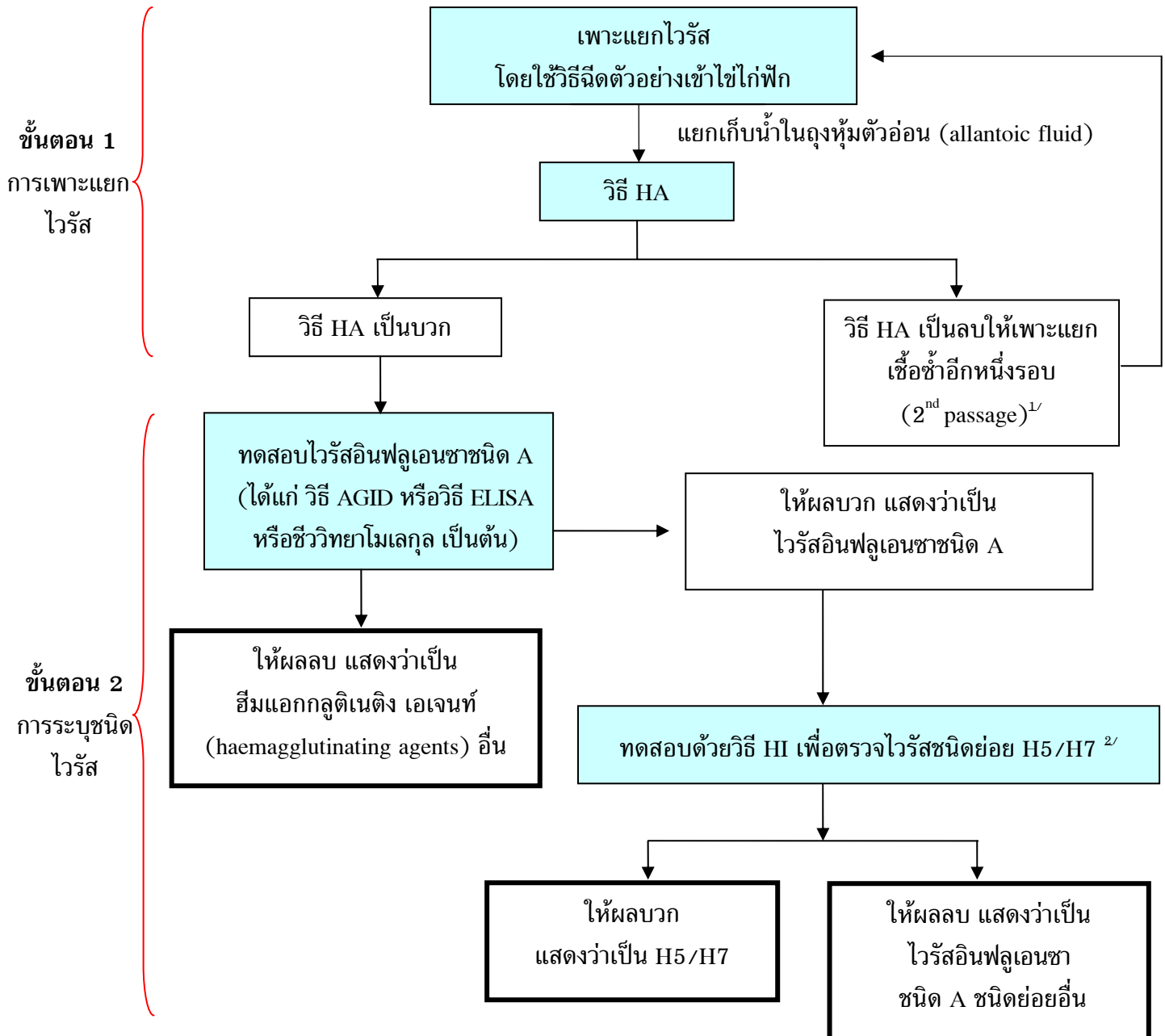
(2) ึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที

(3) นำ stock solution ปริมาตร 100 ml มาเจือจาง โดยผสมกับน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 ml จะได้ working solution แล้วนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน

ภาคผนวก ค

ขั้นตอนการชันสูตรโรคไข้หวัดนก

(ข้อ 3.2)



^{1/} เมื่อทำซ้ำรอบที่สองแล้ว ยังคงให้ผลเป็นลบแสดงว่าไม่พบไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด A

^{2/} การตรวจไวรัสชนิดย่อย H5/H7 อาจใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุล เช่น วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ผสมผผัน หรืออาร์ทีพีซีอาร์ และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ผสมผผัน แบบเวลาจริง หรือเรียลไทม์อาร์ทีพีซีอาร์ ที่ใช้ไพรเมอร์/ไพรอบ (primer/probe) ที่มีความจำเพาะต่อชนิดย่อย H5/H7 ชนิดนั้นๆ

ภาคผนวก ง

การชันสูตรโรคใช้หัตถ์นกด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

(ข้อ 3.2.1 ข้อ 3.2.2 และข้อ 4)

ง.1 การเตรียมเม็ดเลือดแดงไก่

- (1) เจาะเลือดไก่ที่โตเต็มวัยอย่างน้อย 3 ตัว ใส่ในสารละลายอัลซีเวอร์ (Alsever's solution) ในอัตราส่วน 1:1
- (2) ล้างเม็ดเลือดแดง 3 ครั้งด้วยน้ำยา PBS โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 800 g นาน 5 นาที
- (3) ปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงให้มีความเข้มข้น 1% ในน้ำยา PBS

ง.2 การทดสอบคุณสมบัติการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยวิธี HA (haemagglutination test: HA test)

- (1) เติมน้ำยา PBS ปริมาตร 25 μ l ลงในไมโครเพลท (ชนิด 96 หลุม) ที่มีก้นหลุมเป็นรูปตัววีลงในทุกหลุม
- (2) เติมน้ำแอนติเจน เช่น H5 ปริมาตร 25 μ l ลงในไมโครเพลทหลุมที่ 1 ของแต่ละแถว
- (3) ทำการเจือจางแอนติเจน 1:2 ตามลำดับ (serial twofold dilution)
- (4) เติมน้ำยา PBS ปริมาตร 25 μ l ลงในทุกหลุม
- (5) เติม 1% เม็ดเลือดแดงปริมาตร 25 μ l ลงในทุกหลุม เขย่าให้เม็ดเลือดแดงกระจายทั่วกัน
- (6) ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 40 นาที หรือที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 60 นาที หรือเมื่อเม็ดเลือดแดงในหลุมควบคุมรวมกลุ่มเป็นเม็ดกระดุม
- (7) อ่านผลทันที หลุมที่ให้ผล HA เป็นบวก (ภาพที่ จ.2) มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ที่ก้นหลุม ให้ค่าหลุมที่มีความเจือจางของแอนติเจนสูงสุดที่ให้ผลบวกมีค่าเป็น 1 HAU (HA unit)
- (8) เตรียมแอนติเจนให้มีความเข้มข้น 4 HAU ดังนี้

ตัวอย่าง ถ้าหลุมที่มีค่า 1 HAU มีค่าความเจือจางของแอนติเจนเท่ากับ 1:1,024

หาค่าการเจือจางแอนติเจนได้ เท่ากับ $1,024/4 = 256$

ดังนั้นต้องเจือจางแอนติเจนด้วยน้ำยา PBS ในอัตราส่วน 1:256

ข้อควรปฏิบัติ

ทุกครั้งต้องทำ back titration เพื่อตรวจยืนยันความเข้มข้นของแอนติเจน โดย

- (1) เติมน้ำยา PBS ปริมาตร 25 μ l ลงในหลุม หลุมที่ 1 ถึง 4 ของแต่ละแถว
- (2) เติมน้ำยาแอนติเจนที่เตรียมไว้ปริมาตร 25 μ l ลงในหลุมที่ 1 ของแต่ละแถว แล้วเจือจางแอนติเจนลงไปตามลำดับ
- (3) เติมน้ำยา PBS ปริมาตร 25 μ l ลงในทุกหลุม
- (4) เติมน้ำยา 1% เม็ดเลือดแดงปริมาตร 25 μ l ลงในทุกหลุม เขย่าให้เม็ดเลือดแดงกระจายทั่วกันตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 40 นาที
- (5) อ่านยืนยันผล 4 HAU โดยหลุมที่ 1 และ 2 ให้ผลบวก หลุมที่ 3 และ 4 ให้ผลลบ

ง.3 การทดสอบคุณสมบัติยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยวิธี HI (haemagglutination inhibition test: HI test)

- (1) เติมน้ำยา PBS ปริมาตร 25 μ l ลงในทุกหลุมของไมโครเพลท (ชนิด 96 หลุม) ที่มีก้นหลุมเป็นรูปตัววี
- (2) เติมน้ำตัวอย่างซีรัมแต่ละตัวอย่างปริมาตร 25 μ l ในหลุมที่ 1 ของแต่ละแถว
- (3) ทำการเจือจางซีรัม 1:2 ตามลำดับ
- (4) เติมน้ำยาแอนติเจน 4 HAU ที่เตรียมไว้ปริมาตร 25 μ l ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากัน
- (5) ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หรือที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C นาน 60 นาที
- (6) เติมน้ำยา 1% เม็ดเลือดแดง ปริมาตร 25 μ l ลงในทุกหลุม เขย่าให้เข้ากัน
- (7) ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนานประมาณ 40 นาที หรือเมื่อเม็ดเลือดแดงในหลุมควบคุม (ที่ไม่มีแอนติเจน) รวมกลุ่มเป็นเม็ดกระดุม หรือที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C นาน 60 นาที
- (8) การอ่านผล หลุมที่ให้ผล HI เป็นบวกแสดงว่ามีการยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยจะเห็นลักษณะของเม็ดเลือดแดงตกตะกอนรวมกันที่ก้นหลุม หรือมีลักษณะคล้ายกระดุม (ภาพที่ จ.4) หรือเมื่อเอียงเพลทแล้วพบว่าไม่มีอัตราการไหลของเม็ดเลือดแดงเท่ากับในหลุมควบคุม (ภาพที่ จ.5)
- (9) การแปลผล ถ้าได้ระดับ HI titre เท่ากับหรือมากกว่า $\log_2 4$ หรือ 2^4 หรือ 1:16 เมื่อใช้แอนติเจนเท่ากับ 4 HAU แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อไวรัสฮิสทีโอพลาสมาชนิดย่อยนั้นๆ

(10) เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดสอบ จะต้องทดสอบซีรัมควบคุมบวก (positive control) และซีรัมควบคุมลบ (negative control) ด้วยทุกครั้ง

ซีรัมควบคุมบวก หมายถึง ซีรัมที่ทราบค่าระดับ HI titre (known titre) เมื่อทดสอบแล้วควรได้ค่าเท่าเดิม หรือ ต่างกันไม่เกิน 1 dilution

ซีรัมควบคุมลบ หมายถึง ซีรัมที่มีค่าไตเตอร์ไม่มากกว่า $\log_2 2$ หรือ 2^2 หรือ 1:4

หมายเหตุ

ตัวอย่างซีรัมไก่โดยทั่วไปจะไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่ม แต่ซีรัมไก่พื้นเมือง เป็ด ห่าน หรือสัตว์ปีกอื่นๆ มักพบว่าการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงแบบ non-specific haemagglutination จำเป็นต้องกำจัดการในซีรัมที่ทำให้เกิดการจับกลุ่มดังกล่าวออก โดย

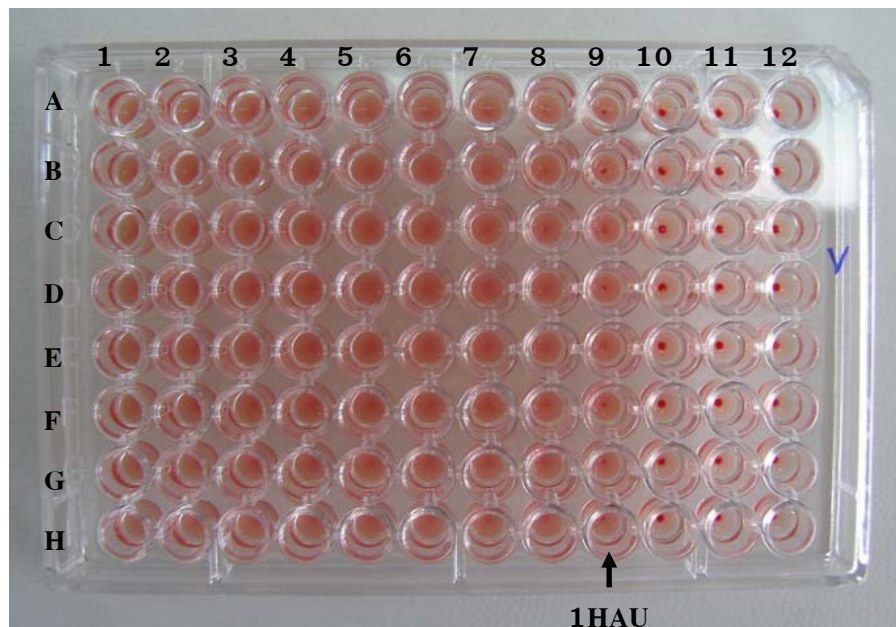
(1) บ่มซีรัมที่ 56°C นาน 30 นาที หรือ

(2) ผสมซีรัมกับเม็ดเลือดแดงไก่เข้มข้น (packed red blood cell: packed RBC) ในปริมาตรเท่าๆกันที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ 800 g นาน 2 นาที ถึง 5 นาที และดูดแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดแดงไก่อ่อนนำไปตรวจด้วยวิธี HI

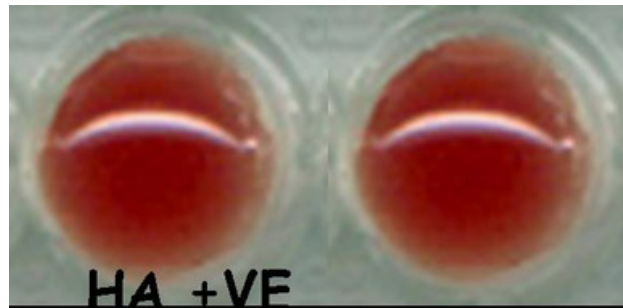
ภาคผนวก จ

ภาพประกอบการชั้นสูตรโรคใช้หวัดนก

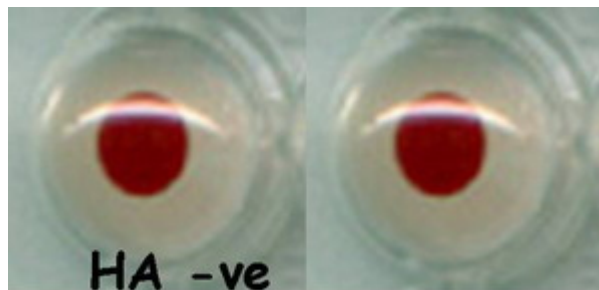
(ข้อ 3.2.2)



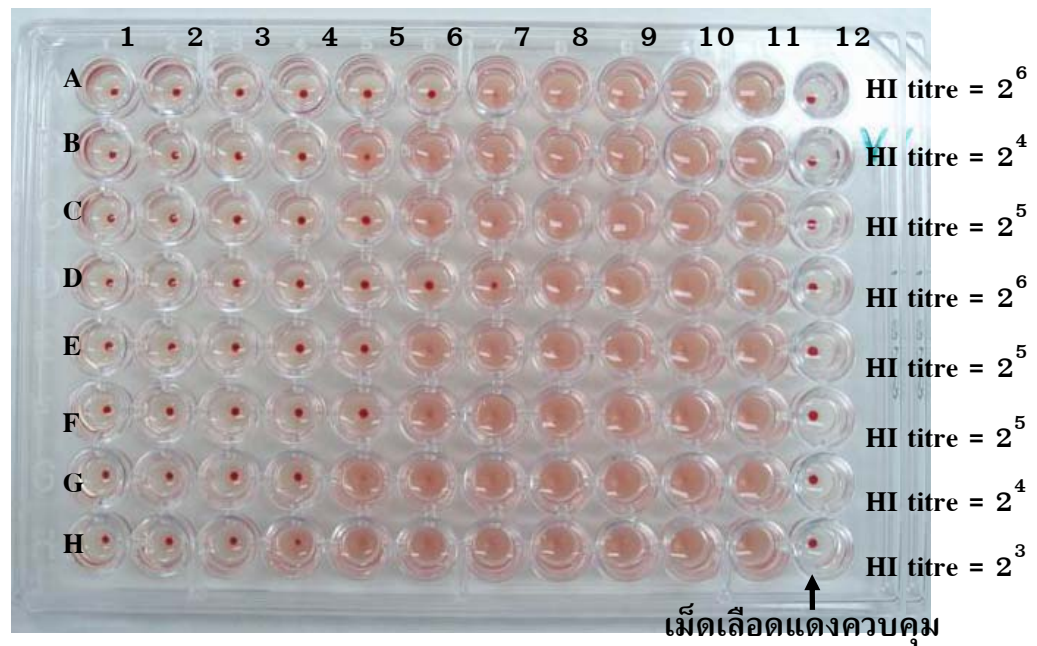
ภาพที่ จ.1 แสดงผลการพิสูจน์ไวรัสด้วยวิธี HA



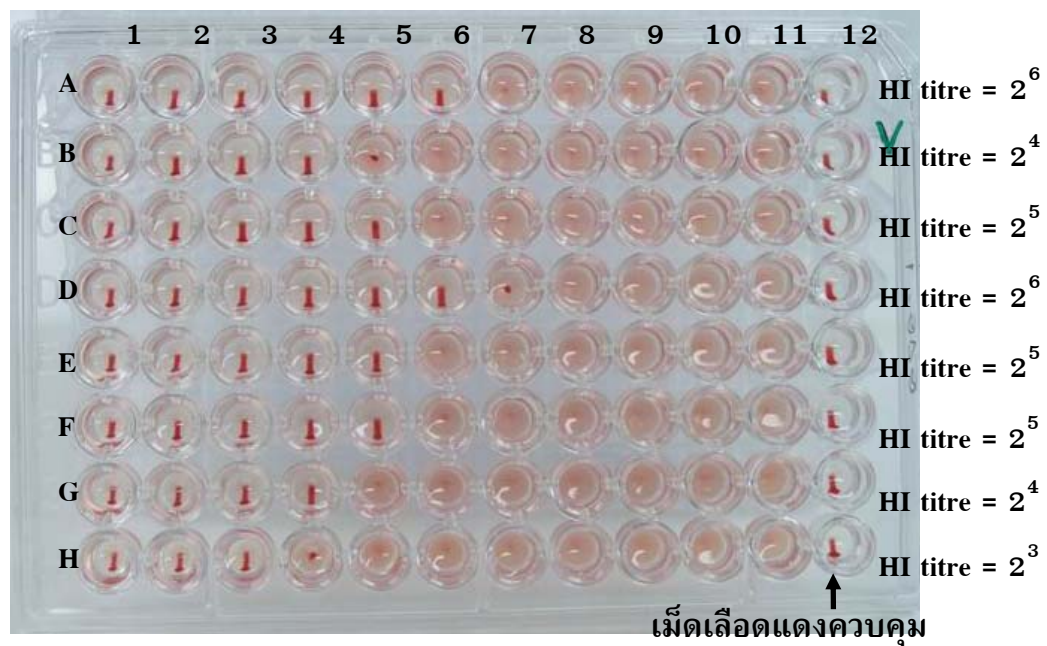
ภาพที่ จ.2 แสดงวิธี HA ที่ให้ผลบวก
จะเห็นการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ในลักษณะกระจายเป็นร่างแหเต็มพื้นที่



ภาพที่ จ.3 แสดงวิธี HA ที่ให้ผลลบ
จะเห็นลักษณะของเม็ดเลือดแดงตกตะกอนรวมกันที่ก้นหลุม หรือมีลักษณะคล้ายกระดุม



ภาพที่ จ.4 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี HI



ภาพที่ จ.5 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี HI
เมื่อเอียงเพลทแล้วพบว่าหลุมที่ให้ผลบวกมีอัตราการไหลของเม็ดเลือดแดงเท่ากับในหลุมควบคุม

หมายเหตุ รูปภาพที่ จ.1 ถึงรูปภาพที่ จ.5 ได้รับความอนุเคราะห์จากสัตวแพทย์หญิงอุทุมพร ศรีสถิตยัณรากร

ภาคผนวก จ

การทดสอบความรุนแรงของไวรัสอินฟลูเอนซา สำหรับโรคไข้หวัดนก

(ภาคผนวก ก.4)

การทดสอบความรุนแรงของไวรัสอินฟลูเอนซา มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกชนิดไวรัสอินฟลูเอนซาที่พบว่าเป็นไวรัสชนิดรุนแรงหรือไม่รุนแรง ซึ่งในการพิจารณาว่าเชื้อที่พบเป็นไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดรุนแรง นั้น มีหลักเกณฑ์ ดังนี้

จ.1 การทดสอบความรุนแรงของไวรัสอินฟลูเอนซาด้วยวิธีการฉีดเชื้อเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous pathogenicity test: IVPT) ตามวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนี้

(1) กรณีที่ฉีดไวรัสอินฟลูเอนซาโดยใช้น้ำในถุงหุ้มตัวอ่อนที่ติดเชื้อ (infected allantoic fluid) ที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 0.2 ml เข้าหลอดเลือดดำไก่ทดลองที่อายุ 4 สัปดาห์ ถึง 8 สัปดาห์ และพบว่าทำให้ไก่ตายอย่างน้อย 6 ตัว จากจำนวนแปดตัว ภายใน 10 วัน

หรือ

(2) กรณีที่มีค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อจากการฉีดเชื้อเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous pathogenicity index: IVPI) มากกว่า 1.2 จากการฉีดไวรัสอินฟลูเอนซาโดยใช้น้ำในถุงหุ้มตัวอ่อนที่ติดเชื้อ ที่มี HA titre มากกว่า 1:16 หรือ $\log_2 4$ หรือ 2^4 เจือจางด้วยไอโซโทนิคซาลิน (isotonic saline) ปลอดเชื้อ ในอัตราส่วน 1:10 เข้าหลอดเลือดดำไก่ที่ปลอดจากเชื้อหรือไม่มีภูมิคุ้มต่อไวรัสอินฟลูเอนซาที่อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 10 ตัว ตัวละ 0.1 ml ตรวจดูอาการไก่ทุกวันในเวลาเดียวกับที่ฉีดเชื้อ เป็นเวลา 10 วัน บันทึกผลเป็นรายวัน โดยให้คะแนน ดังนี้

คะแนน 0 หมายถึง ไก่ปกติ

คะแนน 1 หมายถึง ไก่มีอาการป่วย เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง

คะแนน 2 หมายถึง ไก่มีอาการป่วยรุนแรง ซึ่งพบว่าการแสดงอาการป่วยหลายอย่างร่วมกัน เช่น อาการทางระบบหายใจ ระบบประสาท ซึม ท้องเสีย ผิวหนังหนาหรือหงอนบวมคล้ำ

คะแนน 3 หมายถึง ไก่ตาย รวมถึงไก่ที่มีอาการป่วยมากจนไม่สามารถกินน้ำหรืออาหารได้ ซึ่งต้องทำการการุณฆาต

การแปลผล ค่าความรุนแรงของเชื้อจากการฉีดเชื้อเข้าหลอดเลือดดำ จะได้จากคะแนนอาการป่วยต่อไก่หนึ่งตัว ในการตรวจดูอาการในแต่ละครั้ง เป็นเวลา 10 วัน โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.00 ซึ่งหมายถึง

พบไก่ตายทุกตัวภายใน 24 ชั่วโมง และมีค่าต่ำสุด 0.00 ซึ่งหมายถึง ไม่พบว่าไก่แสดงอาการป่วยใดๆ ภายในระยะเวลา 10 วันหลังเกิดอาการ

อย่างไรก็ตาม ไวรัสอินฟลูเอนซาทั้งชนิดย่อย H5 และ H7 ที่ไม่รุนแรงจากการทดสอบข้างต้น ต้องตรวจการเรียงตัวของกรดอะมิโน (amino acid sequencing) ที่ตำแหน่งของฮีมแอกกลูตินิน หากพบลำดับเบสของสารพันธุกรรม ใกล้เคียงกับของไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดรุนแรง จะถูกจัดให้เป็นไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดรุนแรง

ฉ.2 การจำแนกชนิดของไวรัสอินฟลูเอนซาขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ แบ่งเป็น 3 ประเภท ดังนี้

(1) ไวรัสอินฟลูเอนซาทุกชนิดที่มีคุณสมบัติตามหลักเกณฑ์ในภาคผนวก ฉ.1 จะจัดเป็นไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดรุนแรง (highly pathogenic notifiable avian influenza: HPNAI) ที่ต้องรายงานต่อองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ

(2) ไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดย่อย H5 และ H7 ที่ไม่มีความรุนแรงต่อไก่ และไม่พบการเรียงตัวของกรดอะมิโนตรงตำแหน่งฮีมแอกกลูตินิน คลิเวจ (haemagglutinin cleavage) ที่ใกล้เคียงกับของไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดรุนแรง จะจัดเป็นไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดไม่รุนแรง (low pathogenic notifiable avian influenza: LPNAI) ที่ต้องรายงานต่อองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ

(3) ไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่ชนิดย่อย H5 และ H7 ที่ไม่มีความรุนแรงต่อไก่จะจัดเป็นไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดไม่รุนแรง (low pathogenic avian influenza: LPAI)

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างการชันสูตรโรคไข้หวัดนกด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

(ข้อ 3.2.3)

การชันสูตรโรคด้วยวิธีนี้ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

(1) การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานทั่วไป หรือใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป ที่พิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพและความจำเพาะใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน

(2) การตรวจพิสูจน์ไวรัสอินฟลูเอนซาชนิดย่อย H5N1 ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสผกผัน และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสผกผัน แบบเวลาจริง หรือเรียลไทม์อาร์ทีพีซีอาร์

ข.1 การชันสูตรโรคไข้หวัดนกด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสผกผัน หรืออาร์ทีพีซีอาร์

วิธีการ

(1) เตรียม master mix ตามความเหมาะสมของบริษัทผู้ผลิตจำหน่าย (manufacturer instruction)

หมายเหตุ สูตรนี้สำหรับ 1 ตัวอย่าง โดยทำในน้ำแข็งตลอดเวลา

ตารางที่ ข.1 ตัวอย่างไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบโรคไข้หวัดนกชนิดย่อย H5N1 (พ.ศ.2550-2551)

ทิศทาง (direction)	ลำดับเบส (sequence)	ขนาดดีเอ็นเอที่ได้ จากพีซีอาร์ (PCR-product size) (base pair: bp)	ระดับ ความจำเพาะ (specificity level)
forward reverse	5'-TGATCTTCTTGAAAATTTGCAG-3' 5'-TGTTGACAAAATGACCATCG-3'	276 bp	M gene (Influenza A)
forward reverse	5'-GACTCAAATGTCAAGAACCTTTA-3' 5'-CCACTTATTTCCCTCTCTGTTTAG-3'	189 bp	H5 gene
forward reverse	5'-GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC-3' 5'-TGATAGTGTCTGTTATTATGCC-3'	131 bp	N1 gene

(2) โปรแกรมวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามตัวอย่างโปรแกรมในตารางที่ ข.1 ดังนี้

reverse transcription	48 °C	45 min	
initial denaturation	95 °C	2 min	
denaturation	94 °C	15 s	} 40 รอบ
annealing	55 °C	30 s	
extension	72 °C	30 s	
final extension	72 °C	10 min	

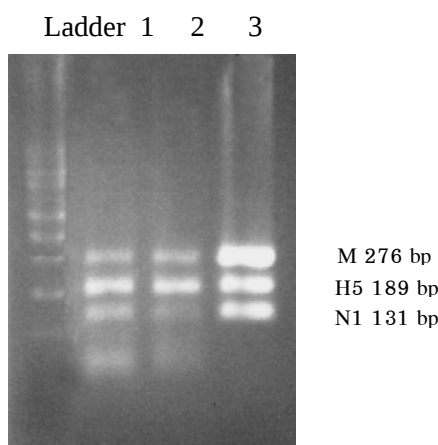
(3) ระหว่างที่เครื่องพีซีอาร์กำลังทำงาน ให้เตรียม 1.5% อะกาโรสเจลใน TBE buffer อุณหภูมิร้อนจนเจลละลายหมดจึงเทใส่ถาดพิมพ์ แล้วรอให้เจลเย็นและแข็งดีจึงนำไปวางบนเครื่อง electrophoresis chamber ที่มี TBE buffer อยู่ในระดับที่ท่วมแผ่นเจล

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

(5) นำไปแยกขนาดของ PCR product ด้วยเครื่อง gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide 2 µg/ml ในน้ำกลั่น นาน 15 min

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

(7) การแปลผล ถ้าเชื้อที่ทดสอบเป็นไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิด A ชนิดย่อย H5N1 โดยจะเห็นแถบเรืองแสงของดีเอ็นเอ (ภาพที่ ข.1) ตามขนาดไพรเมอร์ที่ใช้ในตารางที่ ข.1



ภาพที่ ข.1 ผลการตรวจวินิจฉัยไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด A ชนิดย่อย H5N1 ด้วยวิธี multiplex PCR ที่ให้ผลบวกต่อไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิด A ชนิดย่อย H5N1 โดยปรากฏเป็น PCR product ของ H5N1 และ M gene ขนาด 189 bp 131 bp และ 276 bp ตามลำดับ กรณีที่ไม่มีไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิด A (negative) จะไม่ปรากฏแถบเรืองแสงของ M gene

ที่มา : รองศาสตราจารย์รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช

ช.2 การชันสูตรโรคใช้หัวตันกด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสผกผัน แบบเวลาจริง หรือเรียลไทม์อาร์ทีพีซีอาร์

(1) อุปกรณ์และสารเคมีที่ต้องใช้

primer คือ Inf A TH₅ F 5' ATGCCCCAAATATGTGAAATCA 3'
 Inf A TH₅ A 5' TTGTCTGCAGGGTACCCACTC 3'
 probes คือ Inf A TH 5 fl 5' GCAGGTTTTAGAGGGAGGATGGC 3'
 Inf A TH 5 lc 5' GGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACC 3'
 RNA extraction : Magna Pure LC (Roche, Germany)
 RT – PCR : Reagents from Roche, Germany in Light Cycler

(2) PCR master mix (15µl/ reaction)

2.7 x Light Cycler RNA Master hybridization probes	7.5 µl
Distilled water	2.9 µl
Mn (Oac) ₂	1.6 µl (2 mM)
forward primer	1.0 µl (0.5 µM)
reverse primer	1.0 µl (0.5 µM)
probes TH5 fl	0.5 µl (0.4 µM)
TH5 lc	0.5 µl (0.4 µM)
Master Mix	15 µl
RNA template	5 µl
Total	20 µl /sample

(3) Condition

reverse transcription	61 °C, 20 min
Hot start	95 °C, 2 min
DNA amplification	95 °C, 5 s (denaturation)
	53 °C, 15 s (annealing)
	72 °C, 8 s (extension)
	} 65 รอบ
melting curve	45 °C, 60 s
cooling step	40 °C, 30 s

(4) Primer

forward (H5) : 5'-ACTCCAATGGGGGCGATAAAC-3'
 reverse (H5) : 5'-CAACGGCCTCAAACCTGAGTGT-3'
 forward (N1) : 5'-AAGGGTTTTTCATTTAAATACGGC-3'
 reverse (N1) : 5'-CCAGTCCACCCATTTGGATCC-3'

(5) PCR product ของ H5 เท่ากับ 352 bp (Poddar, 2002)^{1/} และ N1 เท่ากับ 106 bp (Payungporn et al., 2004)^{2/}

Condition

reverse transcription	50 °C 30 min 1 รอบ
pre-denaturation	95 °C 15 min 1 รอบ
denaturation	94 °C 15 s
annealing	55 °C 15 s
extension	72 °C 30 s
final-extension	72 °C 10 min 1 รอบ

Reaction

Distilled water	4 µl
5X buffer	5 µl
5X Q solution	5 µl
dNTP	1 µl
enzyme	1 µl
primer H5 (N1) forward	2 µl
H5 (N1) reverse	2 µl
RNA	5 µl
total	25 µl /reaction

Extract viral RNA : QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat. No. 52904)

Enzyme : One Step RT-PCR System (Qiagen)

^{1/} Poddar S.K 2002. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex Reverse Transcription-PCR and agarose gel electrophoresis. Journal of Virological Methods. 99: 63-70

^{2/} Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, Theamboonlers A, Keawcharoen J, Oraveerakul K, Amonsin A, Poovorawan Y. 2004. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. Viral Immunol. 17:588-593

ภาคผนวก ช

หน่วย

หน่วยและสัญลักษณ์ที่ใช้ในมาตรฐานนี้ และหน่วย SI (International System of Units หรือ *Le Système International d' Unités*) ที่ยอมรับให้ใช้ได้ มีดังนี้

รายการ	ชื่อหน่วย	สัญลักษณ์หน่วย SI
มวล	กรัม (gram)	g
	มิลลิกรัม (milligram)	mg
ปริมาตร	มิลลิลิตร (milliliter)	ml
	ไมโครลิตร (microliter)	µl
ความยาว	เซนติเมตร (centimeter)	cm
	มิลลิเมตร (millimeter)	mm
	ไมโครเมตร (micrometer)	µm
เวลา	วินาที (second)	s
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส (degree Celsius)	°C
ความเข้มข้นของสาร	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (milligram per milliliter)	mg/ml
	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (microgram per milliliter)	µg/ml
	ยูนิต/มิลลิลิตร (unit per milliliter)	units/ml
ค่าแรงเหวี่ยง	แกรวิตี (gravity)	<i>g</i>