จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 ที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทย ด้วยสารเคมีและวิธีทางกายภาพ

โดย
สมศักดิ์ ภัคภิญโญ
จิโรจ ศศิปรียจันทร์
รชฎ ตันติเลิศเจริญ

ธันวาคม 2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 ที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทยด้วยสารเคมีและวิธีทางกายภาพ

โดย

สมศักดิ์ ภัคภิญโญ

จิโรจ ศศิปรียจันทร์

รชฎ ตันติเลิศเจริญ

ธันวาคม 2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2548 (ครั้งที่ 7) สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ สพ.ญ.สุวรักษ์ วรรณรัตน์ ทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัยของโครงการวิจัยนี้ ห้องปฏิบัติการรัสวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อการใช้ห้องปฏิบัติการ และหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อและอนุญาตการใช้ห้องปฏิบัติการโรคไข้หวัดนก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 ที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทยด้วยสารเคมีและวิธีทางกายภาพ

ชื่อผู้วิจัย สมศักดิ์ ภัคภิญโญ จิโรจ ศศิปรียจันทร์ รชฎ ตันติเลิศเจริญ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ธันวาคม 2549

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช 5 เอ็น1 ที่แยกไก่จากไก่ในเขตจังหวัดภาคกลาง และภาคตะวันออกของประเทศไทย ระหว่างเดือน มกราคม ถึง กุมภาพันธ์ 2547 ซึ่งเป็นการระบาดครั้งแรก และ เดือนตุลาคม 2547 ซึ่งเป็นการระบาดครั้งที่ 2 ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ วิธีทางกายภาพและความเป็นกรด-ด่าง ด้วยการเก็บตัวอย่างอวัยวะ ปอด ลำไส้ ท่อลม และตับ จากไก่ป่วยที่สงสัย มาทำการแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 ด้วยวิธีการฉีดในไข่ไก่ฟักอายุ 11 วัน วิธีการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง วิธีการยับยั้งจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง และวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส หลังจากนั้นทำการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสด้วยการฉีดในไข่ไก่ฟัก และตรวจหาปริมาณไวรัสในน้ำไข่ไก่ฟัก เก็บน้ำไข่ไก่ฟักนี้ที่ -80 องศาเซลเซียส ($^{\circ}$ ซ) นำน้ำไข่ไก่ฟักที่มีเชื้อไวรัสมาสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) เพื่อนำไปส่งตรวจการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin; HA) และนิวรามินิเดส (neuraminidase; NA) นำมาวิเคราะห์การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit version 7.0.5.3 ทำการคัดเลือกเชื้อไวรัสจำนวน 3 เชื้อ มาทดสอบการคงอยู่ของเชื้อไวรัสปริมาณ 1.0 x 10^{8} ELD_{50}/ml ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ กลูตารัลดีไฮด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ควอเตอร์นารีแอมโมเนียม กลูตารัลดีไฮด์ผสมกับกลุ่มควอเตอร์นารีแอมโมเนียม ไอโอดีน คลอรีน ฟอร์มาลิน และฟีนอล ด้วยอัตราส่วนความเข้มข้นที่แนะนำ ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 $^{\circ}$ ซ ณ วันที่ 0, 5, 7 และ 14 ซึ่งมีระยะเวลาสัมผัสของเชื้อไวรัสและน้ำยาฆ่าเชื้อนาน 10 นาที วิธีทางกายภาพด้วยอุณหภูมิ 55, 60, 65, 70 และ 75 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลานาน 10, 15, 30, 45 และ 60 นาที และความเป็นกรด-ด่าง 3, 5, 7, 9 และ 12 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ผสมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งมีระยะเวลาสัมผัสของเชื้อไวรัสและสารละลายที่ปรับความเป็นกรด-ด่างนาน 5 และ 10 นาที หลังจากนั้นนำมาฉีดไข่ไก่ฟักอย่างละ 6 ฟอง นำเข้าตู้ฟักไข่ สังเกตและบันทึกการตายของไข่ไก่ฟักเป็นระยะเวลานาน 7 วัน หากพบว่าไข่ไก่ฟักตายทำการเก็บน้ำไข่ไก่ฟักเพื่อแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัสดังวิธีการข้างต้น ผลพบว่า สามารถแยกเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 จากการระบาดครั้งแรกได้จำนวน 8 เชื้อ และครั้งที่ 2 ได้จำนวน 1 เชื้อ ทั้ง 9 เชื้อ มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ และความเหมือนของการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีน HA และ NA คือ 1638 – 1670 และ 1306 – 1321 และระหว่างร้อยละ 99.32 –

99.88 และ 99.16 – 100 ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อไวรัสจำนวน 3 เชื้อคือ 2004.1, CUK-2/04 และ 2004.2 มาทำการศึกษาพบว่า มีความคงทนต่ำหรือไม่มีความคงทนเลยต่อน้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์ผสมกับกลุ่มควอเตอนารีแอมโมเนียม คลอรีน และฟีนอล ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 °ซ อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 60 นาที และ/หรืออุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที และพบว่าเชื้อไวรัสคงทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ในช่วงที่ทำการศึกษา จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า CUK-2/04 ค่อนข้างคงทนต่อน้ำยาฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างมากที่สุด

คำสำคัญ: ไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 ประเทศไทย การทำลายเชื้อ น้ำยาฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title	The inactivation of avian influenza virus subtype H5N1 isolated from chickens in Thailand by chemical and physical methods
Name of the Investigators	Somsak Pakpinyo Jiroj Sasipreeyajan Rachod Tantilertcharoen
Year	December 2006

Abstract

This study was to determine the persistence of isolated avian influenza subtype H5N1 from the central and eastern parts of Thailand between January and February 2004 (the 1st outbreak) and October 2004 (the 2nd outbreak) against various conditions including disinfectants, temperature and pH. Lungs, intestines, tracheas and livers of suspected chickens were isolated and identified as avian influenza virus (AIV) H5N1 by inoculation of 11 days old of chicken embryonated eggs (CEE) hemagglutination test, hemagglutination inhibition test and polymerase chain reaction. The AIV H5N1 propagation and virus titration were done by inoculation of CEE. The allantoic fluid (AF) of CEE containing AIV H5N1 was stored at -80° C until used. The AF containing AIV H5N1 was extracted for RNA, which was submitted for nucleotide sequencing of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes followed by sequencing analysis by BioEdit software version 7.0.5.3. Three AIV H5N1 isolates, each containing 1.0×10^8 ELD_{50}/ml, were determined the persistence of virus with recommended concentration of disinfectants including glutaraldehyde (Glu), hydrogenperoxide, quaternary compounds (QAC), Glu+QAC, iodine, chlorine, formalin and phenol at 25 and 37° C, stored for 0, 5, 7, and 14 days. The exposure time of treated AIV H5N1 with disinfectants was 10 min. The physical methods including various temperatures at 55, 60, 65, 70 and 75° C for 10, 15, 30, 45 and 60 min and the pH at 3, 5, 7, 9 and 12 were determined. The treated AIV H5N1 were inoculated into six 11 days old of CEE. The inoculated CEE were incubated, observed and recorded for 7 days. The death of inoculated CEE was harvested for the AF, which was isolated and identified as AIV H5N1 as previously described. Results revealed that the 1st and 2nd outbreak found AIV H5N1 for 8 and 1 isolates, respectively.

Numbers of nucleotides and the homology of nucleotide sequences of H5 and N1 genes of all 9 isolates were 1638 – 1670 and 1306 – 1321, and 99.32% – 99.88% and 99.16% – 100%, respectively. Three AIV H5N1 isolates, 2004.1, CUK-2/04 and 2004.2, showed the low or no persistence against Glu, Glu+QAC, chlorine and phenol at 25 and 37 ^{o} C. The temperatures at 65 ^{o} C for 60 min and/or at least 70 ^{o} C for at least 10 min could inactivate, where as all ranges of pH could not inactivate all 3 isolates. In this study, CUK-2/04 was more persistent against disinfectants, temperatures, and pH compared to other isolates.

Keywords: avian influenza subtype H5N1, Thailand, inactivation, disinfectants, temperatures, pH

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
หน้าหัวเรื่อง	i
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	v
สารบัญ	vii
รายการตารางประกอบ	viii
รายการภาพประกอบ	ix
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีการวิจัย	10
ผลการวิจัย	18
การอภิปรายผล	27
ข้อสรุป	32
เอกสารอ้างอิง	33

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบ ความเข้มข้น และอัตราส่วนที่ใช้ของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อเชื้อเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1

ตารางที่ 2 แสดงความเหมือนของนิวคลิโอไทด์เบสของสายยีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 จำนวน 9 เชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2547

ตารางที่ 3 แสดงความเหมือนของนิวคลิโอไทด์เบสของสายยีนนิวรามินีเดสของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 จำนวน 9 เชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2547

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนไข่ไก่ฟักที่ตายภายหลังจากที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัส H5N1 จำนวน 3 เชื้อที่ทดลองด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ โดยที่น้ำยาฆ่าเชื้อถูกผสมให้มีอัตราส่วนที่ทำการทดลองแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง (25° ซ.) เป็นเวลา 0, 5, 7 และ 14 วัน (n = 6)

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนไข่ไก่ฟักที่ตายภายหลังจากที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัส H5N1 จำนวน 3 เชื้อที่ทดลองด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ โดยที่น้ำยาฆ่าเชื้อถูกผสมให้มีอัตราส่วนที่ทำการทดลองแล้วเก็บที่อุณหภูมิ (37° ซ.) เป็นเวลา 0, 5, 7 และ 14 วัน (n = 6)

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนไข่ไก่ฟักที่ตายภายหลังจากที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัส H5N1 จำนวน 3 เชื้อที่ทดลองที่อุณหภูมิต่าง ๆ 55°, 60°, 65°, 70° และ 75° ซ เป็นเวลา 10, 15, 30, 45 และ 60 นาที (n = 6)

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนไข่ไก่ฟักที่ตาย ภายหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ pH 3 5 7 9 และ 12 โดยระยะเวลาสัมผัสระหว่างเชื้อไวรัส H5N1 และความเป็นกรด-ด่าง นาน 5 และ 10 นาที (n=6)

รายการภาพประกอบ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ

ภาพที่ 2 Multiplex RT-PCR for the identification of avian influenza (H5N1) of 9 isolates. Lane 1: ladder 100 bp, Lane 2: negative control, Lane 3: CU-K2/04 (positive control), Lane 3 – 12: samples.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โรคไข้หวัดนก หรือโรคเอเวียนอินฟลูเอนซา (avian influenza) เป็นโรคระบาดที่ก่อให้เกิดความผิดปกติส่วนใหญ่ของระบบทางเดินหายใจในสัตว์ปีกหลายชนิด โรคนี้พบการรายงานครั้งแรกในปีค.ศ. 1878 ที่ประเทศอิตาลีและเรียกชื่อว่ากาฬโรคสัตว์ปีก (fowl plague) (Swayne and Halvorson, 2003) ต่อมาในปีค.ศ. 1901 พบว่าเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส จนกระทั่งในปีค.ศ. 1955 จึงได้จัดเชื้อโรคนี้อยู่ในกลุ่มอินฟลูเอนซาไวรัส การระบาดของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาเริ่มขึ้นในปีค.ศ. 1959 ที่สกอตแลนด์ ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 และได้มีการระบาดของเชื้อไวรัสแพร่กระจายไปทั่วโลก โดยในปีค.ศ. 1983 ที่เพนซิลวาเนียเป็นสายพันธุ์ เอช5 เอ็น2 และในช่วงระหว่างปีค.ศ. 1990 ที่ประเทศออสเตรเลียเป็นสายพันธุ์ เอช7 ในปีค.ศ. 1994 ได้มีการระบาดที่ปากีสถานสายพันธุ์ เอช7 เอ็น3 และที่เม็กซิโก สายพันธุ์ เอช5 เอ็น2 ในปีค.ศ. 1997-1998 ที่ประเทศอิตาลีสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 (Alexander, 2000) ส่วนการระบาดที่ฮ่องกงในปีค.ศ. 1997-1998 เป็นสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 โดยในการระบาดครั้งนี้ได้มีการทำลายไก่เป็นจำนวนมากกว่า 950,000 ตัว (Sim et al., 2003) ซึ่งรายงานการระบาดในช่วงแรกตั้งแต่ปีค.ศ. 1959 -1997 ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา ชนิดรุนแรง พบว่ามีรายงานการระบาดทั้งหมด 17 ครั้ง โดยพบการระบาดในไก่งวง 5 ครั้ง และในไก่ 12 ครั้ง ซึ่ง 9 ครั้งเกิดจากเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช7 และ 8 ครั้งจากเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 (Alexander, 2000) และในช่วงปลายปี ค.ศ. 2003 ถึงต้นปี ค.ศ. 2004 ได้มีการระบาดของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา ชนิดรุนแรงในประเทศแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเริ่มพบรายงานการระบาดที่ประเทศเกาหลีใต้ เวียดนาม ญี่ปุ่น ไทย กัมพูชา ลาว อินโดนีเซีย จีน และไต้หวัน ส่วนในประเทศไทยนั้นได้รายงานการระบาดครั้งแรกเมื่อวันที่ 23 มกราคม 2004 มีรายงานการระบาดทั้งหมด 61 ครั้ง ใน 76 อำเภอ (Capua and Alexander, 2004) โดยได้มีการทำลายไก่มากกว่า 26 ล้านตัว นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกว่า 250 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ซึ่งเชื้อไวรัสที่ระบาดที่ประเทศไทยนี้เป็นไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนสายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 (Viseshakul et al., 2004)

คุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซานั้น พบว่าไม่คงทนต่อสภาพอากาศแห้ง ในสภาพอากาศแห้งที่อุณหภูมิห้องนั้นเชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตรอดได้นาน 2 สัปดาห์ (Sutherland, 2002) แต่ในสภาพอากาศเย็นและชื้น เชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 105 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าในมูลไก่ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 30-35 วัน และที่อุณหภูมิ 20 °ซ เชื้อไวรัสมีชีวิตอยู่ได้ 7 วัน (Swayne and Halvorson, 2003)

ในปัจจุบันเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาชนิด เอช5 เอ็น1 เกิดการระบาดอย่างมากในสัตว์ปีกในประเทศไทย ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเศรษฐกิจและยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขด้วยกล่าวคือ มีการติดเชื้อในคนทำให้คนแสดงอาการป่วยและตาย การติดเชื้อเกิดจากการสัมผัสสิ่งคัดหลั่งของสัตว์ป่วยโดยตรง ปัจจุบันในสัตว์ปีกยังไม่มีวิธีการรักษาที่ได้ผล การป้องกันโดยการใช้วัคซีนยังคงเป็นข้อถกเถียงกันอยู่ถึงผลดี ผลเสีย และผลที่ตามมาภายหลังจากการใช้วัคซีน (Stephenson et al., 2004) ดังนั้นวิธีการที่ดีที่สุดคือการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส ซึ่งวิธีหนึ่งที่ทำได้ด้วยการกำจัดหรือลดปริมาณของเชื้อไวรัส เช่น การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อโรค การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน และการใช้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง สำหรับวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาดูลักษณะความทนทานของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาชนิด เอช5 เอ็น1 ภายใต้สภาวะแวดล้อมต่างๆได้แก่ ที่อุณหภูมิต่างๆ และสภาวะความเป็นกรด-ด่าง และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาชนิด เอช5 เอ็น1 โดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิด และระยะเวลาการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อภายหลังผสม

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทำให้ปลอดเชื้อ (Sterilization)

คือขบวนการทำลายเชื้อจุลชีพทุกชนิดที่ทำให้เกิดโรคและไม่ทำให้เกิดโรค รวมทั้งสปอร์ของแบคทีเรียให้หมดไป วิธีการทำให้ปลอดเชื้อหรือทำลายเชื้อจุลชีพแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ (physical methods) และวิธีทางเคมี (chemical methods) (Nester, 2004)

วิธีทางกายภาพ (Physical methods)

การลดปริมาณหรือการทำลายเชื้อโดยวิธีทางกายภาพสามารถทำได้หลายวิธีคือ

1. **การทำลายเชื้อโดยใช้ความร้อน** (Heat related methods)

การใช้ความร้อนเพื่อการควบคุมปริมาณเชื้อจุลชีพเป็นวิธีเก่าแก่วิธีหนึ่ง ทำได้โดยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีน (protein denature) และรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มซัยโตพลาสึม (cytoplasmic membrane) และ ผนังเซลล์ (cell wall) นอกจากนี้ยังขัดขวางการทำงานของกรดนิวคลิอิก (nucleic acids) ซึ่งเชื้อจุลชีพแต่ละชนิดสามารถทนต่อความร้อนได้แตกต่างกัน จากการศึกษาของ Cleeland และคณะ (1972) ได้ศึกษาความคงทนของเชื้ออินฟลูเอนซาไวรัส สายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์ 7 สายพันธุ์ พบว่าที่อุณหภูมิ 60 °ซ ระยะเวลา

1-5 ชั่วโมง สามารถทำลายเชื้ออินฟลูเอนซาไวรัส สายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์ได้ 6 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 7 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่ทนความร้อนคือ A_0/PR8/34 ซึ่งสามารถทำลายได้เมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 24 ชั่วโมง หรือจากการศึกษาของ King (1991) พบว่าที่อุณหภูมิ 60 °ซ ระยะเวลา 30 นาที สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N2 H5N9 และ H9N2 ได้ โดยทั่วไปความร้อนที่นิยมใช้ในการทำลายเชื้อมีอยู่ 2 แบบ คือ ความร้อนชื้น (moist heat) และความร้อนแห้ง (dry heat) (Robert, 2004)

1.1 ความร้อนชื้น

เป็นวิธีการทำลายเชื้อจุลชีพโดยทำให้เอนไซม์ และโปรตีนในเซลล์เกิดการแข็งตัว (coaglulation) ความร้อนชื้นสามารถทำลายเชื้อจุลชีพโดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาที่สั้นกว่าความร้อนแห้ง เนื่องจากความร้อนจากไอน้ำสามารถแทรกซึมเข้าสู่ซัยโตพลาสซึมของเซลล์สิ่งมีชีวิตได้มากกว่า ช่วยให้โปรตีนภายในเซลล์ตกตะกอนได้ดีขึ้น การทำลายเชื้อโดยความร้อนชื้นมี 3 วิธี คือ การต้มเดือด โดยใช้อุณหภูมิ 100 °ซ ระยะเวลา 5-10 นาที การนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อความดัน (autoclave) วิธีการนี้จะใช้ไอน้ำเดือดความดันสูง โดยปกติจะใช้อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15-30 นาที โดยจากการศึกษาของ Elhafi และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาโดยใช้เครื่อง autoclave ต่อการทำลายเชื้ออินฟลูเอนซาไวรัสในมนุษย์ พบว่าระยะเวลาต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้ออินฟลูเอนซาได้เมื่อใช้เครื่อง autoclave คือ 5 วินาที

และการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) คือ การทำลายเชื้อจุลชีพในอาหารที่เป็นของเหลว โดยใช้ความร้อนไม่สูงมากแล้วทำให้เย็นตัวลงอย่างรวดเร็ว เช่น การฆ่าเชื้อโรคในน้ำนมจะใช้ความร้อนประมาณ 62.9 °ซ ระยะเวลา 30 นาที หรือที่อุณหภูมิ 71.6 °ซ 15 นาที (Jacquelyn, 2005)

1.2 ความร้อนแห้ง

เป็นวิธีการทำลายเชื้อจุลชีพโดยทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ เดสตรัคชั่น (oxidative destruction) ต่อซัยโตพลาสซึมของเซลล์โดยใช้ความร้อน 160-180 °ซ นาน 1-3 ชั่วโมงซึ่งวิธีนี้ใช้ความร้อนสูงและนานกว่าวิธีความร้อนชื้น (Robert, 2004)

2. การกรอง

การกรองต่างจากวิธีการทำให้ปราศจากเชื้อวิธีอื่น ๆ เนื่องจากการกรองไม่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ แต่เป็นวิธีการแยกเชื้อจุลชีพออกจากของเหลวที่ไม่สามารถทำให้ปราศจากเชื้อโดยการใช้ความร้อนหรือสารเคมีได้ (Nester, 2004)

3. การใช้รังสี

รังสีที่นิยมใช้ได้แก่ รังสียูวี (UV) รังสีแกมมา (gamma) เป็นต้น โดยรังสียูวีมีความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร โดยเมื่อเชื้อจุลชีพดูดกลืนแสงเข้าไป แสงอุลตร้าไวโอเลตจะไปรบกวนพันธะโควาเลน (covalent bond) ทำให้โครงสร้างของสารพันธุกรรมเสียไป นอกจากนี้ยังขัดขวางการจับคู่กันระหว่างเบสของโครงสร้างสายพันธุกรรม (Jacquelyn, 2005)

วิธีทางเคมี (Chemical methods)

เป็นการใช้สารเคมีในการทำลายเชื้อจุลชีพ ซึ่งสารเคมีสามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้โดยออกฤทธิ์ทำลายส่วนประกอบของเซลล์ถึงแม้ว่าสารเคมีแต่ละชนิดจะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีได้เป็น 3 ประเภท คือ ออกฤทธิ์ต่อโปรตีนภายในเซลล์ ออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ และ ออกฤทธิ์ต่อส่วนประกอบอื่น ๆ ของเซลล์ (ภาพที่ 1) (Jacquelyn, 2005)

การออกฤทธิ์ต่อโปรตีนภายในเซลล์

โปรตีนเป็นโมเลกุลอินทรีย์ที่มีมากที่สุดในเซลล์ของเชื้อจุลชีพ และเป็นส่วนสำคัญต่อลักษณะโครงร่างและหน้าที่ของเซลล์ ในสภาพปกติโปรตีนแต่ละชนิดจะมีรูปร่างเฉพาะซึ่งจำเป็นสำหรับการทำหน้าที่นั้น ๆ ดังนั้นสารเคมีที่ออกฤทธิ์ต่อโปรตีนจะเข้าไปรบกวนทำให้โครงร่างของโปรตีนภายในเซลล์เกิดการเสื่อมสภาพหรือเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนทำให้โปรตีนเสียสภาพไม่สามารถทำหน้าที่ได้ (Burton and Engelkirk, 2000)

การออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์

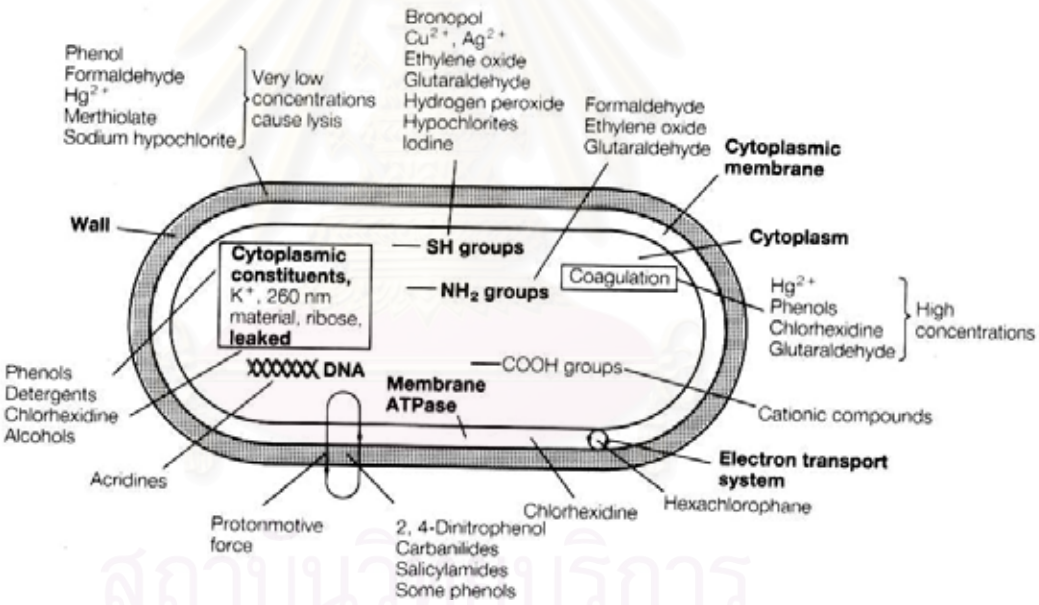
การออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์โดยสารเคมีจะเข้าไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพไป โดยเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการเข้าออกของสารต่าง ๆ เป็นผลทำให้มีการปลดปล่อยไอออนอินทรีย์ที่สำคัญ โคเอนไซม์ (coenzyme) และกรดอะมิโนออกจากเซลล์ นอกจากนี้ยังรบกวนต่อการขนส่งแบบใช้พลังงาน (active transport) และขบวนการเมทาบอลิสึม (metabolism) เป็นผลให้เชื้อจุลชีพตายหรือไม่สามารถเจริญเติบโต (Widmer and Frei 2004)

การออกฤทธิ์ต่อส่วนประกอบอื่น ๆ ของเซลล์

โดยส่วนใหญ่สารเคมีต่าง ๆ จะไปออกฤทธิ์ที่กรดนิวคลีอิคหรือขบวนการสร้างพลังงานของเซลล์ (Jacquelyn, 2005)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสารเคมีได้แก่ ความเข้มข้นของสารเคมี ระยะเวลา อุณหภูมิ และสภาพแวดล้อม เป็นต้น โดยทั่วไปสารเคมีที่นิยมใช้ในการควบคุมเชื้อจุลชีพได้แก่ น้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectants) น้ำยาระงับเชื้อ (antiseptic) และ สารละลายกรด-ด่าง (pH) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ได้ตามคุณสมบัติทางเคมี และการออกฤทธิ์ทำลายเชื้อได้ดังนี้ (Burton and Engelkirk, 2000)

ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ (คัดลอกจาก Russell et al., 1992)



1. **กลุ่มฟีนอล** (Phenol) **และอนุพันธ์ของฟีนอล** (Phenol derivatives)

ฟีนอลหรือ carbolic acid มีสูตรทางเคมีคือ C_6H_5OH ไม่ค่อยนิยมใช้ในสภาพบริสุทธิ์ เพราะราคาแพงและเป็นพิษ แต่นิยมใช้ในรูปอนุพันธ์ของฟีนอล กลไกการออกฤทธิ์ทำลายเชื้อของฟีนอลคือจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้โปรตีนภายในเซลล์ตกตะกอนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ ทำให้กรดอะมิโนรั่วไหลออกจากเซลล์ (Widmer and Frei 2004) ในปี 2003 Suarez และ คณะ (2003) ได้ทำการศึกษาโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อฟีนอล 2 ชนิด สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ และสารประกอบเปอร์ออกซิเจน (peroxygen

compound) ต่อการทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N9 และ H7N3 โดยใช้การรอดชีวิตของไข่ไก่ฟักเป็นตัวแปรผล จากผลการศึกษาพบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 5 ชนิดที่นำมาทดสอบสามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาได้เมื่อผสมตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต นอกจากเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาแล้ว Butcher and Ulaeto (2005) ยังพบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อฟีนอลสามารถทำลายเชื้อออร์โธพ็อกไวรัสได้ (orthopox virus)

2. **กลุ่มฮาโลเจน** (Halogen)

ตัวอย่างของน้ำยาฆ่าเชื้อที่อยู่ในกลุ่มนี้เช่น ไอโอดีน และคลอรีน

ไอโอดีน (Iodine)

ไอโอดีนโดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของทิงเจอร์ไอโอดีนซึ่งประกอบไปด้วยไอโอดีน 2% และโซเดียมไอโอไดน์ (sodium iodine) 2% ละลายในแอลกอฮอลล์ที่เจือจาง ไอโอดีนจะออกฤทธิ์ได้ดีที่สภาวะเป็นกรด โดยจะอยู่ในรูปของ ไดอะโตมิคไอโอดีน (diatomic iodine หรือ I_2) แต่ประสิทธิภาพจะลดลงเมื่ออยู่ที่สภาวะเป็นด่าง โดยจะอยู่ในรูปไอโอไดด์ (iodide หรือ I^-) และไตรไอโอไดด์ (tri-iodide หรือ I^-_3) ผลของไอโอดีนในการทำลายเชื้อจุลชีพคือจะทำหน้าที่เป็นสารออกซิไดซ์ และไปจับกับกรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl) ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสียสภาพเป็นผลให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติ และเซลล์ถูกทำลายต่อมา (Linton et al., 1987)

3. **สารประกอบโลหะหนัก** (Heavy metals and their compounds)

โลหะหนักที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อจุลชีพ เช่น สารหนู สังกะสี ปรอท เงิน และทองแดง เป็นต้น กลไกการออกฤทธิ์เกิดจากสารประกอบโลหะหนักจะเข้าไปรวมตัวกับโปรตีนและเอนไซม์ภายในเซลล์ ทำให้การทำงานของโปรตีนและเอนไซม์ภายในเซลล์ผิดปกติไป นอกจากนี้สารประกอบโลหะหนักที่มีความเข้มข้นสูง สามารถทำให้โปรตีนภายในเซลล์ตกตะกอนได้ (Robert, 2004)

4. **กลุ่มสารลดแรงตึงผิว** (Surfactant group)

กลุ่มสารลดแรงตึงผิวเป็นสารประกอบที่มีหมู่เคมีที่ดึงดูดน้ำ (hydrophilic) และหมู่เคมีที่ผลักน้ำ (hydrophobic) โดยส่วนที่เป็น hydrophobic จะเป็นคาร์บอนโมเลกุลสายยาว (long chain hydrocarbon) ซึ่งละลายในไขมัน ขณะที่ส่วน hydrophilic อาจจะแตกตัวหรือไม่แตกตัว ซึ่งมีทั้งประจุบวก ประจุลบ และเป็นกลาง (Russell et al., 1992) โดยสารลดแรงตึงผิวที่สำคัญที่สุดคือชนิดที่มีประจุบวก ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่ สารประกอบควอเตอนารี

แอมโมเนียม (quaternary ammonium compounds หรือ QAC) กลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบควอเตอนารีแอมโมเนียมจะไปออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยประจุบวกจะเข้าไปรวมตัวกับหมู่ฟอสเฟตของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane phospholipids) ขณะที่ส่วน hydrophobic จะแทรกเข้าไปยังชั้นในของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (permeability) ทำให้หน้าที่การควบคุมการเข้า-ออกสูญเสียไป (Linton et al., 1987) จากการศึกษาของ Armstrong and Froelich ในปี 1964 พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อในกลุ่มสารประกอบควอเตอนารีแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้นของ 0.025 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ระยะเวลา 10 นาที สามารถทำลายเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาได้ หรือจากการศึกษาของ Davison และคณะ (1999) พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อในกลุ่มสารประกอบควอเตอนารีแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้น 0.39% สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H7N2 ได้

5. **อัลดีไฮด์** (Aldehyde)

สารในกลุ่มนี้มีสูตรทางเคมีคือ C_nH_{2n+1} ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่ ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)

ฟอร์มาลดีไฮด์ มีสถานะเป็นก๊าซ ส่วนที่อยู่ในรูปของเหลวจะเรียกว่าฟอร์มาลีน (formalin) ซึ่งมีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบอยู่ 37% มีสูตรทางเคมีคือ HCHO การออกฤทธิ์โดยจะทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) ไฮดรอกซิล (hydroxyl) และซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl) ของโปรตีนทำให้โปรตีนเสียสภาพไป (Russell et al., 1992)

ในปี 2005 Sauerbrei และคณะ ได้ทำการศึกษาโดยใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0.7% พบว่ามีประสิทธิภาพสามารถทำลายเชื้อในกลุ่มแอดีโนไวรัส (adenovirus) หรือจากการศึกษาของ Habib และคณะ (2006) พบว่าที่ความเข้มข้นของฟอร์มาลีน 0.1 และ 0.2% ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สามารถทำลายเชื้อไวรัสเบอร์ซาอักเสบได้

กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารประกอบประเภทไดอัลดีไฮด์ (dialdehyde) มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลชีพสูง แต่ระคายเคืองและเป็นพิษน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟอร์มาลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์มีสูตรทางเคมีคือ $C_5H_8O_2$ ออกฤทธิ์ได้ดีในสภาพที่เป็นด่างมากกว่ากรด มีความคงตัวอยู่ประมาณ 7-14 วัน กลไกการออกฤทธิ์โดยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพของโปรตีน (Robert, 2004) กลูตารัลดีไฮด์เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถทำรายเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ และบีได้ (McDonnell and Russell, 1999) และที่ความเข้มข้นเท่ากัน กลูตารัลดีไฮด์จะให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลชีพสูงกว่าฟอร์มาลดีไฮด์ (Bovallius and Anas, 1977)

6. **แอลกอฮอล์** (Alcohol)

กลไกการออกฤทธิ์ของแอลกอฮอล์คือ ทำให้เอนไซม์และโปรตีนเสียสภาพ นอกจากนี้แอลกอฮอล์ยังมีคุณสมบัติในการละลายไขมัน ดังนั้นจึงสามารถละลายไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ออก ทำให้โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย แอลกอฮอล์ที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิดคือ เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) และไอโซโพรพิวแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol) (Linton et al., 1987)

7. **กลุ่มสารออกซิไดซ์ซิง** (Oxidizing agent)

สารในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ที่พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ของเอนไซม์และโปรตีน ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide หรือ H_2O_2) และโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนส หรือด่างทับทิม ($KMnO_4$) เป็นต้น (Linton et al., 1987)

8. **ก๊าซ** (Gases)

การทำลายเชื้อจุลชีพโดยใช้ก๊าซนั้นนิยมใช้กับภาชนะหรือเครื่องมือที่ไม่ทนความร้อน รวมไปถึงอุปกรณ์ไฟฟ้า ก๊าซที่นิยมใช้ในการทำลายเชื้อได้แก่ เอทธิลรีนออกไซด์ (ethylene oxide) โพรไพลีนออกไซด์ (propylene oxide) และเบต้าโพรไพโอแลคโตน (beta-propiolactone) กลไกการออกฤทธิ์โดยก๊าซจะไปรวมตัวกับโปรตีน กรดนิวคลีอิค หรือเอนไซม์ ทำให้การทำงานของเซลล์เสียสภาพไป (Robert, 2004)

9. **กรดและด่าง** (Acids and alkaline)

กรดและด่างแก่จะทำลายสารอินทรีย์ทุกชนิด นอกจากนี้สามารถทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลชีพ โดยเชื้อจุลชีพแต่ละชนิดจะทนต่อสภาพกรดและด่างได้แตกต่างกัน กรดอนินทรีย์มีความสามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้ดีกว่ากรดอินทรีย์ เนื่องจากแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออน (H^+) ได้มากกว่า คุณสมบัติของการฆ่าเชื้อจุลชีพของกรดจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้น แต่ไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาตร ส่วนด่างมีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อจุลชีพได้เนื่องจากความเข้มข้นของไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) (Russell et al., 1992) จากการศึกษาของ Carson and Frisch (1953) ได้ทำการศึกษาโดยใช้กรดแทนนิค (tannic acid) ต่อการทำลายเชื้ออินฟลูเอนซาไวรัส พบว่ากรดแทนนิคปริมาณ 1 มิลลิกรัม ระยะเวลา 6 ชั่วโมง สามารถทำลายเชื้ออินฟลูเอนซาไวรัส สายพันุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์ได้ หรือจากการศึกษาของ Scholtissek (1985) พบว่าที่ pH 5.2 สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H7N2 ได้

วิธีการวิจัย

วิธีการวิจัย

แบ่งออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1: การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 แบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1.1 การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา

1.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา

1.3 การตรวจพิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสที่เตรียม

1.4 เชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาเอช 5 เอ็น1ที่แยกได้นี้จะนำไปส่งตรวจวิเคราะห์การเรียงตัวของยีน (sequence analysis)

1.5 จดบันทึกผลการทดลอง และรายงานผลการทดลอง

ส่วนที่ 2: การทดสอบความคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 แบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อในการทำลายเชื้อไวรัส และระยะเวลาการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อภายหลังผสม

2.2 การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่ออุณหภูมิต่างๆ

2.3 การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ

2.4 จดบันทึกผลการทดลอง วิเคราะห์และรายงานผลการทดลอง

ส่วนที่1: การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1

1.1 การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา

โดยเตรียมเชื้อไวรัสจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ ซึ่งเก็บมาจากแหล่งที่พบการระบาดครั้งแรกในประเทศไทย ช่วงเดือนมกราคม 2547 จำนวน 8 ตัวอย่าง และการระบาดครั้งที่ 2 ประมาณเดือนตุลาคม 2547 จำนวน 1 เชื้อ โดยมีวิธีการเตรียมเชื้อไวรัสซึ่งดัดแปลงมาจาก Swayne และคณะ 1998 มีขั้นตอนอย่างย่อ ๆ ดังนี้

1.1.1 เตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาจากชิ้นเนื้อตัวอย่างไก่ได้แก่ ปอด ลำไส้ ท่อลม และตับที่ติดเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา โดยนำชิ้นเนื้อตัวอย่างมารวมกันให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม แล้วนำมาใส่ในโกร่งบด เติมทรายลงไปเพื่อบดให้เซลล์ของผู้ถูกอาศัยแตก จากนั้นเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไล (phosphate buffer

saline หรือ PBS) ที่มี pH 7.0 ลงไปประมาณ 9 มิลลิลิตร คนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

1.1.2 เทใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 1000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.1.3 เก็บส่วนใส (supernatant) และลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพโดยนำมากรองด้วยกระดาษกรอง ที่ขนาด 0.45 ไมครอน เติมยาปฏิชีวนะลงไป ได้แก่ เจนตามัยซิน (gentamicin) 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

1.1.4 เก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสก่อนนำไปฉีดไข่ฟัก

1.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา

การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสโดยใช้วิธีการฉีดเชื้อไวรัสเข้าสู่ไข่ไก่ฟัก ดัดแปลงมาจาก Swayne และคณะ 1998 มีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 นำเชื้อไวรัสที่เก็บและรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสมาละลายด้วยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และทำให้เจือจางลงเป็น 10 เท่า (ten fold dilution) (10^{-1} – 10^{-3})

1.2.2 ฉีดเชื้อไวรัสที่เตรียมไว้ ประมาณ 0.2-0.3 มิลลิลิตร โดยใช้ไข่ไก่ฟักที่อายุ 9-11 วัน เข้าทาง allantoic cavity จำนวน 6 ฟอง/1 ความเข้มข้น และ ฉีด PBS แทนเชื้อไวรัส เข้าไข่ไก่ฟักที่อายุเดียวกัน จำนวน 6 ฟอง เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม

1.2.3 นำไข่ไก่ฟักที่ผ่านการฉีดเชื้อไวรัสย้ายเข้าสู่ตู้ฟักไข่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ ส่องตรวจไข่ไก่ฟักทุกวัน อย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง เพื่อดูว่ามีชีวิตหรือไม่ เป็นเวลา 7วัน

1.2.4 เมื่อครบกำหนด หรือพบว่ามีไข่ไก่ฟักตายในช่วงเวลาที่กำหนด โดยสังเกตระยะเวลาการตายเพื่อคำนวณหาปริมาณและความรุนแรงของเชื้อไวรัส (50% of embryo lethal dose/ml; ELD_{50}/ml) ตามวิธีการของ Reed และ Muench (1938)

1.2.5 เก็บ allantoic fluid ที่มีเชื้อไวรัสที่ –80 องศาเซลเซียส และคัดเลือก allantoic fluid ที่มีเชื้อไวรัสที่ให้ไตเตอร์สูงสุดเพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 การตรวจพิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้น

เพื่อเป็นการตรวจพิสูจน์ว่าเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้น ซึ่งได้มาจากการเก็บตัวอย่าง จำนวน 8 ตัวอย่าง จากแหล่งที่เกิดการระบาดในประเทศไทย ช่วงเดือน มกราคม 2547 ว่าเป็นเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา ชนิด เอช5 เอ็น1

1.3.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาด้วยวิธีการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination หรือ HA)

วิธีการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงเป็นการทดสอบคุณสมบัติการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงของเชื้อไวรัส (Office International des Epizooties, 2000) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.3.1.1 เติมสารละลาย PBS ลงในถาดหลุม (microtiter plate) จำนวน 25 ไมโครลิตร ทุกหลุม (หลุมที่ 1 – 12)

1.3.1.2 เติม allantoic fluid ที่มีเชื้อไวรัสลงในหลุมแรกปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดของเหลวจากหลุมแรกปริมาตร 25 ไมโครลิตรสู่หลุมที่ 2 และดำเนินการต่อจนถึงหลุมที่ 10 เป็นการทำเจือจาง 2 เท่า (serial 2 fold dilution) (หลุมที่ 11 และ 12 เป็นหลุมควบคุมลบ)

1.3.1.3 เติมสารละลาย PBS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทุกหลุมเพื่อให้สารละลายในแต่ละหลุมมีปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.3.1.4 เติมเม็ดเลือดแดงไก่เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมและเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 40 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงที่ก้นหลุม

1.3.2 การทดสอบเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาด้วยวิธียับยั้งการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination inhibition test หรือ HI)

เป็นวิธีการทดสอบเพื่อดูการยับยั้งการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอช 5 (Office International des Epizooties, 2000) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.3.2.1 เติมสารละลาย PBS ลงในถาดหลุม จำนวน 25 ไมโครลิตร หลุมที่ 1 – 3 (หลุมที่ 1 เป็นหลุมทดสอบตัวอย่าง หลุมที่ 2 และ 3 เป็นหลุมควบคุมลบ เฉพาะซีรั่ม (serum) ที่มีแอนติบอดีต่อเอช 5กับ PBS และ เฉพาะเม็ดเลือดแดงไก่กับ PBS ตามลำดับ)

1.3.2.2 เติม allantoic fluid ที่มีเชื้อไวรัสลงในหลุมแรกปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.3.2.3 เติมสารละลาย PBS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในหลุมที่ 2 และ 3 เพื่อให้สารละลายในแต่ละหลุมมีปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.3.2.4 เติมซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเอช5 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในถาดหลุมที่ 1 และ 2 เขย่าให้เข้ากัน ส่วนหลุมที่ 3 เติมสารละลาย PBS ลงปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที

1.3.2.5 เติมเม็ดเลือดแดงไก่เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทุกหลุมและเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 40 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ก้นหลุม

1.3.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (multiplex RT-PCR)

1.3.3.1 ขั้นตอนสกัด RNA

ทำการแยกสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกออกจาก allantoic fluid โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAamp® viral Mini kit (QIAGEN, USA) ตามคำแนะนำของบริษัท

1.3.3.2 ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (multiplex RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี one step multiplex RT-PCR โดยใช้ ACCessQuick™ RT-PCR system (Promega, USA) และใช้ตัวตั้งต้น (primer set) และขั้นตอนโดยอ้างอิงมาจาก Poddar (2002) มีขั้นตอนดังนี้

Primer name	Primer sequence	Amplicon size (bp)
H5 sense	5'-ACTCCAATGGGGGCGATAAA-3'	351 bp
H5 antisense	5'-CAACGGCCTCAAACTGAGTGT-3'	
N1 sense	5'-AAGGGGTTTTCATACAGGTAT-3'	106 bp
N1 antisense	5'-TCTGTCCATCCATTAGGATCC-3'	

- Reverse transcription 50 องศาเซลเซียส 30 นาที 1 รอบ
- Initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 นาที 1 รอบ
- Denaturation 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที
- Annealing 55 องศาเซลเซียส 15 วินาที
- Extension 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที

} ทั้งหมด 40 รอบ

1.3.3.3 นำผลผลิตที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตรมาแยกวิเคราะห์ด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ย้อมด้วยเอทธีเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 15 นาที และดูผลโดยใช้เครื่องมองภาพผ่านแสงยูวี และบันทึกภาพ

1.4 เชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาเอช 5 เอ็น1จากตัวอย่างที่แยกได้นี้จะนำไปส่งตรวจวิเคราะห์การเรียงตัวของยีน (sequence analysis)

1.5 จดบันทึกผลการทดลอง และรายงานผลการทดลอง

ส่วนที่ 2: การทดสอบความคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อในการทำลายเชื้อไวรัส และระยะเวลาการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อภายหลังผสม

ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อการคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา โดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อในการทดสอบทั้งหมด 8 ชนิดซึ่งได้รับการขึ้นทะเบียนจากกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ คือ น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มกลูตารัลอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) (Ucarsan®) น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) (Aqua clean®) น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มควอเตอนารีแอมโมเนียม (quaternary ammonium compound; QAC) (Bioclean®) น้ำยาฆ่าเชื้ออื่นที่มีส่วนผสมของกลุ่ม-กลูตารัลอัลดีไฮด์ผสมกับกลุ่มควอเตอนารีแอมโมเนียม (Firstop®) น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มไอโอดีน (Iodox®) น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) (Chorex-HC®) น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มฟอร์มาลีน (formalin) (Merck® KGaA, Germany) ความเข้มข้น 1% (Favero, 1985) และน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มฟีนอล (phenol) ซึ่งแสดงส่วนประกอบ ความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อ และอัตราส่วนที่ใช้ (ตารางที่ 1) โดยทำการดัดแปลงวิธีการทดสอบมาจาก Suarez และคณะ 2003 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบ ความเข้มข้น และอัตราส่วนที่ใช้ของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1

กลุ่ม	ส่วนประกอบของน้ำยาฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อ	อัตราส่วนใช้จริง
Glutaraldehyde	Glutaraldehyde	20% W/W	1:200
(Glu)	Etoxylated alcohol (9 EO)	3% W/W	
Peroxide (HP)	Hydrogen peroxide	50% W/W	1:2000
QAC	Benzalkonium chloride	10%	1:500
Glu + QAC	Glutaraldehyde	10% W/W	1:200
	Octyl decyl dimethyl ammonium chloride	3% W/W	
	Dioctyl dimethyl ammonium chloride	1.2% W/V	
	Didecyl dimethyl benzyl ammonium chloride	1.8% W/V	
	Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride	4% W/V	
Iodine	Nonylphenoxypolyethoxyethanol iodine complex	3% W/V	1:500
Chlorine	Sodium hypochlorite	1% W/W	1:20
Formaldehyde	Formalin	37%	1:100
Phenol	High boiling Tar acid	20% W/W	1:250
	Chlorinated xylenol	20% W/W	
	Dodecyl benzene sulfonic acid	35% W/W	

2.1.1 เตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นตามที่กำหนด

2.1.2 แบ่งน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิดลงในหลอดทดลองอย่างละ 1 มิลลิลิตร

2.1.3 นำของเหลวจากไข่ฟัก (allantoic fluid) ที่เตรียมไว้ซึ่งเก็บและรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสมาละลายด้วยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเจือจางให้มีเชื้อไวรัสไข้หวัดนกประมาณ 10^8 ELD_{50}/mL ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยาฆ่าเชื้ออยู่ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

2.1.4 เมื่อครบ 10 นาที แบ่งสารละลายฉีดลงในไข่ไก่ฟักฟองละ 0.1 มิลลิลิตร อย่างละ 6 ฟอง ต่อหนึ่งชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อ พร้อมทั้งทำการฉีดเฉพาะน้ำยาฆ่าเชื้อลงในไข่ไก่ฟักฟองละ 0.1 มิลลิลิตรจำนวน 3 ฟอง ส่องตรวจไข่ไก่ฟักเป็นเวลา 7 วัน หากพบว่าไข่ไก่ฟักตายให้เก็บ allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักที่ตายไปตรวจด้วยวิธี HA และ HI ต่อไป

2.1.5 ทำการทดลองซ้ำหลังจากเก็บน้ำยาฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 5, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันดังนี้คือ เก็บรักษาในภาชนะที่มีฝาปิดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส

2.2 การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่ออุณหภูมิต่าง ๆ

ขั้นตอนการทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาโดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Swayne และ Beck 2004 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 ตั้งอุณหภูมิอ่างต้มน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันดังนี้ 55, 60, 65, 70 และ 75 องศาเซลเซียสตามลำดับ

2.2.2 นำ allantoic fluid ที่เตรียมไว้ซึ่งมีเชื้อไวรัสไข้หวัดนกอยู่ 10^8 ELD_{50}/mL แบ่งลงในหลอดทดลอง 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองด้วยพาราฟิลม์ (parafilm)

2.2.3 นำหลอดทดลองที่มีเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและหลอดทดลองที่มีเฉพาะสารละลาย PBS วางลงใน water bath ที่แต่ละอุณหภูมิเป็นเวลา 10, 15, 30, 45 และ 60 นาทีตามลำดับ

2.2.4 แบ่งฉีดลงในไข่ไก่ฟักจำนวน 6 ฟองต่อหนึ่งอุณหภูมิ ฟองละ 0.1 มิลลิลิตร พร้อมทั้งทำการฉีดเฉพาะสารละลาย PBS ที่ปรับอุณหภูมิแล้วตามที่ต้องการลงในไข่ไก่ฟักฟองละ 0.1 มิลลิลิตรจำนวน 3 ฟอง ส่องตรวจไข่ไก่ฟักเป็นเวลา 7 วัน

2.2.5 หากพบว่าไข่ไก่ฟักตายให้เก็บ allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักที่ตายไปตรวจด้วยวิธี HA และ HI ต่อไป

2.3 การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ

วิธีการทดสอบผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา ได้ดัดแปลงวิธีการมาจาก Stallknecht และคณะ (1990) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 นำ allantoic fluid ที่เตรียมไว้ซึ่งมีเชื้อไวรัสไข้หวัดนกอยู่ 10^8 ELD_{50}/mL แบ่งลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.3.2 จากนั้นเตรียมสารละลาย PBS ให้ได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ต้องการ ดังนี้ 3, 5, 7, 9 และ 12 ตามลำดับ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เพื่อปรับ pH

2.3.3 นำสารละลาย PBS ที่ผ่านการปรับ pH แบ่งลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 และ 10 นาที ตามลำดับ

2.3.4 เมื่อครบระยะเวลาเวลาแล้ว แบ่งสารละลายฉีดลงในไข่ไก่ฟักจำนวน 6 ฟอง ต่อหนึ่งความเป็นกรด-ด่าง ฟองละ 0.1 มิลลิลิตร พร้อมทั้งทำการฉีดเฉพาะสารละลาย PBS ที่ปรับ pH แล้วตามที่ต้องการลงในไข่ไก่ฟัก ฟองละ 0.1 มิลลิลิตรจำนวน 3 ฟอง ส่องตรวจไข่ไก่ฟักเป็นเวลา 7 วัน

2.3.5 หากพบว่าไข่ไก่ฟักตายให้เก็บ allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักที่ตายไปตรวจด้วยวิธี HA และ HI ต่อไป

2.4 จดบันทึกผลการทดลอง วิเคราะห์และรายงานผลการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

ส่วนที่ 1: การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1

1.1 การเตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา

ทำการเตรียมเชื้อไวรัสจากตัวอย่างชิ้นเนื้อของปอด ลำไส้ ท่อลม และ ตับ มารวมกัน ซึ่งเก็บมาจากแหล่งที่พบการระบาดจากจังหวัด ฉะเชิงเทรา ชลบุรี นครปฐม นครสวรรค์ และสุพรรณบุรี ซึ่งเป็นการระบาดครั้งแรก ช่วงเดือนมกราคม – กุมภาพันธ์ 2547 จำนวน 8 เชื้อ (เชื้อที่ 1 – 8) และการระบาดครั้งที่ 2 ประมาณเดือนตุลาคม 2547 จำนวน 1 เชื้อ (เชื้อที่ 9) หลังจากนั้นเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

1.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา และคำนวณหาปริมาณและความรุนแรงของเชื้อไวรัส (50% of embryo lethal dose/ml; ELD_{50}/ml)

นำเชื้อไวรัสที่เตรียมได้ซึ่งเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส จำนวน 9 เชื้อ มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ละลายหลังจากนั้นนำมาฉีดไข่ไก่ฟักอายุ 9 วัน เข้าสู่ allantoic sac ด้วยการเจือจางลงเป็น 10 เท่า (ten fold dilution) (10^{-1} – 10^{-8}) ความเข้มข้นละ 6 ฟอง ผลพบว่า ทั้ง 9 เชื้อเมื่อคำนวณตามวิธีการของ Reed และ Muench (1938) มีความรุนแรงระหว่าง $10^{8.0}$ – $10^{9.5}$ ELD_{50}/ml (ข้อมูลความรุนแรงของแต่ละเชื้อไม่ได้แสดงไว้)

1.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาด้วยวิธีการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination หรือ HA) และ ด้วยวิธียับยั้งการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination inhibition test หรือ HI) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอช 5

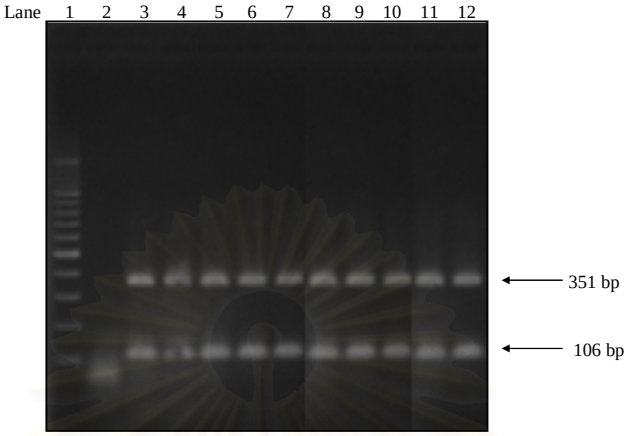
ผล HA ของไวรัสทั้ง 9 เชื้อ อยู่ระหว่าง 2^6 – 2^8

ผล HI ของไวรัสทั้ง 9 เชื้อ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอช 5 พบว่าเกิดปฏิกริยาระหว่างเชื้อไวรัสและแอนติบอดี แสดงว่าไวรัสทั้ง 9 เชื้อ เป็นสายพันธุ์เอช 5 ทั้งหมด

1.4 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (multiplex RT-PCR)

จากการตรวจยืนยันของเชื้อไวรัสพบผลิตภัณฑ์ 351 bp และ 106 bp ซึ่งแสดงเป็นส่วนของยีน hemagglutinin และ neuraminidase ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 Multiplex RT-PCR for the identification of avian influenza (H5N1) of 9 isolates. Lane 1: ladder 100 bp, Lane 2: negative control, Lane 3: CU-K2/04 (positive control), Lane 3 – 12: samples.



1.4 เชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา เอช 5 เอ็น1 จากตัวอย่างที่แยกได้นี้นำไปส่งตรวจวิเคราะห์การเรียงตัวของยีน (sequence analysis) และรายงานในฐานข้อมูลธนาคารยีน (GeneBank database)

จากการตรวจวิเคราะห์การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีน hemagglutinin และ neuraminidase หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 9 isolates ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit version 7.0.5.3

การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีน hemagglutinin ทั้ง 9 เชื้อ การระบาดครั้งแรก (เชื้อที่ 1 – 8) และการระบาดครั้งที่ 2 (เชื้อที่ 9) ซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 1638 – 1670 พบความเหมือนของการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง ร้อยละ 99.32 – 99.88 (ตารางที่ 2)

การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีน neuraminidase ทั้ง 9 เชื้อ การระบาดครั้งแรก (เชื้อที่ 1 – 8) และการระบาดครั้งที่ 2 (เชื้อที่ 9) ซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 1306 – 1321 พบความเหมือนของการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง ร้อยละ 99.16 – 100 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงความเหมือนของนิวคลิโอไทด์เบสของสายยีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 จำนวน 9 เชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2547**

เชื้อที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-								
2	99.64*	-							
3	99.64	99.64	-						
4	99.82	99.7	99.7	-					
5	99.64	99.64	99.64	99.7	-				
6	99.7	99.69	99.7	99.76	99.82	-			
7	99.57	99.57	99.57	99.63	99.69	99.75	-		
8	99.76	99.76	99.76	99.82	99.88	99.82	99.69	-	
9	99.4	99.39	99.4	99.46	99.4	99.45	99.32	99.51	-

*ร้อยละของความเหมือนของนิวคลิโอไทด์เบสของสายยีนฮีแมกกลูตินินระหว่างเชื้อไวรัส

**การระบาดครั้งแรก (เชื้อที่ 1 – 8) และการระบาดครั้งที่ 2 (เชื้อที่ 9)

ตารางที่ 3 แสดงความเหมือนของนิวคลิโอไทด์เบสของสายยีนนิวรามินีเดสของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1 จำนวน 9 เชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2547**

เชื้อที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-								
2	99.69*	-							
3	99.85	99.7	-						
4	99.69	99.7	99.7	-					
5	99.85	99.85	99.85	99.85	-				
6	99.85	99.85	99.85	99.85	100	-			
7	99.85	99.85	99.85	99.85	100	100	-		
8	99.69	99.7	99.7	99.7	99.85	99.85	99.85	-	
9	99.31	99.16	99.31	99.16	99.31	99.32	99.31	99.16	-

*ร้อยละของความเหมือนของนิวคลิโอไทด์เบสของสายยีนนิวรามินีเดสระหว่างเชื้อไวรัส

**การระบาดครั้งแรก (เชื้อที่ 1 – 8) และการระบาดครั้งที่ 2 (เชื้อที่ 9)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนที่ 2: การทดสอบความคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ เอช5 เอ็น1

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อในการทำลายเชื้อไวรัส และระยะเวลาการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อภายหลังผสม

จากการตรวจวิเคราะห์การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีน hemagglutinin และ neuraminidase ทั้ง 9 isolates พบว่ามีความเหมือนของการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ มากกว่าร้อยละ 99.16 ซึ่งแสดงว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ทางคณะผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกเป็นตัวแทนของมา 1 isolate ซึ่งเป็นเชื้อที่ระบาดที่จังหวัดชลบุรี (ตัวอย่าง 2004.1) และเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่พบการระบาดและมีการรายงานครั้งแรกในประเทศไทย CUK-2/04 ซึ่งเป็นเชื้อที่ระบาดที่จังหวัดนครปฐม (Viseshakul et al., 2004) (ตัวอย่าง CUK-2) และเชื้อที่พบการระบาดครั้งที่ 2 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2547 ซึ่งเป็นเชื้อที่ระบาดที่จังหวัดราชบุรี (ตัวอย่าง 2004.2) ว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร ในด้านความคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ เอช5เอ็น1

จากการทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสจำนวน 3 เชื้อ ดังนี้ 2004.1, CUK-2 และ 2004.2 ต่อน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ ดังนี้ กลูตารัลอัลดีไฮด์ (Glu) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (HP) ควอเตอนารีแอมโมเนียม (QAC) กลูตารัลอัลดีไฮด์ผสมกับกลุ่มควอเตอนารีแอมโมเนียม (Glu+QAC) ไอโอดีน (Iodine) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (SHPC) ฟอร์มาลีน (Formalin) ฟีนอล (Phenol) ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ณ วันที่ 0, 5, 7 และ 14 ผลพบว่า เชื้อไวรัสจำนวน 3 เชื้อต่อน้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์ผสมกับกลุ่มควอเตอนารีแอมโมเนียม โซเดียมไฮโปคลอไรต์ และฟีนอล มีความคงทนต่ำหรือไม่มีความคงทนเลย ที่อุณหภูมิ 25 และ 37° ซ. เชื้อไวรัสมีความคงทนปานกลางต่อน้ำยาฆ่าเชื้อควอเตอนารีแอมโมเนียม และฟอร์มาลีนที่อุณหภูมิ 37° ซ. แต่มีความคงทนมากขึ้นที่อุณหภูมิ 25° ซ และเชื้อไวรัสมีความคงทนอย่างมากต่อน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไอโอดีน ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 ° ซ (ตารางที่ 4 และ 5) อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้มีกลุ่มควบคุมบวก (เชื้อไวรัส) ซึ่งสามารถฆ่าไข่ไก่ฟักได้ 100%และกลุ่มควบคุมลบ (น้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ) ซึ่งไม่สามารถฆ่าไข่ไก่ฟัก ร่วมการศึกษาด้วย นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้เก็บน้ำไข่ฟักจากไข่ไก่ฟักที่รอดชีวิตและตายเนื่องจากเชื้อไวรัสที่สัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ มาฉีดสู่ไข่ไก่ฟักใหม่เพื่อพิสูจน์ว่าไวรัสยังคงมีชีวิตอยู่หรือไม่ ซึ่งผลที่ได้เหมือนกับผลการศึกษาครั้งแรกคือ ไข่ไก่ฟักที่รอดชีวิตในครั้งแรก ไข่ไก่ฟักยังคงรอดชีวิตในครั้งที่สอง ส่วนไข่ไก่ฟักตายในครั้งแรก ไข่ไก่ฟักยังคงตายในครั้งที่สอง

2.2 การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่ออุณหภูมิต่าง ๆ

จากการทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่ออุณหภูมิต่าง ๆ 55 °ซ 60 °ซ 65 °ซ 70 °ซ และ 75 °ซ เป็นเวลา 10, 15, 30, 45 และ 60 นาที พบว่า แนวโน้มทั้ง 3 เชื้อ (2004.1, CUK-2 และ 2004.2) มีความคงทนต่ออุณหภูมิต่ำกว่า 70 °ซ กล่าวคือที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที หรืออุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 60 นาที เชื้อไวรัส H5N1 มีแนวโน้มที่จะตายหรือเชื้อไวรัส H5N1ไม่สามารถที่จะทำให้ไข่ไก่ฟักตาย นอกจากนี้เชื้อไวรัส H5N1 เชื้อ CUK-2 ค่อนข้างคงทนเมื่อเปรียบเทียบกับ เชื้อ 2004.1 และ 2004.2 (ตารางที่ 6)

2.3 การทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ

จากการทดสอบความคงทนของเชื้อไวรัสต่อความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ที่ 3, 5, 7, 9 และ 12 โดยให้เวลาสัมผัสระหว่างเชื้อไวรัส H5N1 และความเป็นกรด-ด่าง นาน 5 และ 10 นาที พบว่าไวรัสมีความคงทนต่อความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ในการศึกษา คือสามารถฆ่าไข่ไก่ฟักตายได้ ระหว่าง 2 – 6 ฟองหรือ ร้อยละ 33.34 - 100 (ตารางที่ 7) โดยที่กลุ่มควบคุมบวก (เชื้อไวรัส) สามารถฆ่าไข่ไก่ฟักได้ 100%และกลุ่มควบคุมลบ (สารละลาย PBS ที่ปรับความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ) ไม่สามารถฆ่าไข่ไก่ฟัก นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้เก็บน้ำไข่ฟักจากไข่ไก่ฟักที่ตายเนื่องจากเชื้อไวรัสที่สัมผัสความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ มาฉีดสู่ไข่ไก่ฟักใหม่เพื่อพิสูจน์ว่าไวรัสยังคงมีชีวิตอยู่ ผลพบว่าไข่ไก่ฟักตายแสดงว่าเชื้อไวรัสคงทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ในช่วงที่ทำการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนไข่ไก่ฟักที่ตายภายหลังจากที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัส H5N1 จำนวน 3 เชื้อที่ทดลองด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ โดยที่น้ำยาฆ่าเชื้อ ถูกผสมให้มีอัตราส่วนที่ทำการทดลอง แล้ว แล้วเก็บที่อุณหภูมิ (25° ซ.) เป็นเวลา 0, 5, 7 และ 14 วัน (n = 6)

กลุ่ม	วันที่ 0			วันที่ 5			วันที่ 7			วันที่ 14		
	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2
Glu	1	2	2	3	0	0	0	0	1	1	0	1
HP	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
QAC	2	1	1	3	2	1	3	1	3	3	3	1
Glu+QAC	1	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0
Iodine	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
SHPC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Formalin	0	3	1	2	1	2	1	1	0	0	2	4
Phenol	0	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0

*กลุ่มควบคุมลบ (เฉพาะน้ำยาฆ่าเชื้อ ทั้ง 8 ชนิด ๆ ละ 3 ฟอง) ไม่พบการตายของไข่ไก่ฟัก

**กลุ่มควบคุมบวก (เฉพาะไวรัส ทั้ง 3 เชื้อ ๆ ละ 6 ฟอง) พบการตายของไข่ไก่ฟักทั้ง 6 ฟอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนไข่ไก่ฟักที่ตายภายหลังจากที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัส H5N1 จำนวน 3 เชื้อที่ทดลองด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ โดยที่น้ำยาฆ่าเชื้อถูกผสมให้มีอัตราส่วนที่ทำการทดลอง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ (37° ซ.) เป็นเวลา 0, 5, 7 และ 14 วัน (n = 6)

กลุ่ม	วันที่ 0			วันที่ 5			วันที่ 7			วันที่ 14		
	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2
Glu	1	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0
HP	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
QAC	2	1	1	3	2	3	3	0	0	6	3	0
Glu+QAC	1	0	0	0	2	1	3	1	0	3	0	0
Iodine	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
SHPC	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Formalin	0	3	1	2	5	3	0	0	0	1	1	0
Phenol	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1

*กลุ่มควบคุมลบ (เฉพาะน้ำยาฆ่าเชื้อ ทั้ง 8 ชนิด ๆ ละ 3 ฟอง) ไม่พบการตายของไข่ไก่ฟัก

**กลุ่มควบคุมบวก (เฉพาะไวรัส ทั้ง 3 เชื้อ ๆ ละ 6 ฟอง) พบการตายของไข่ไก่ฟักทั้ง 6 ฟอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนไข่ไก่ฟักที่ตายภายหลังจากที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัส H5N1 จำนวน 3 เชื้อที่ทดลองที่อุณหภูมิต่าง ๆ 55°, 60°, 65°, 70° และ 75° ซ. เป็นเวลา 10, 15, 30, 45 และ 60 นาที (n = 6)

เวลา	55° ซ.			60° ซ.			65° ซ.			70° ซ.			75° ซ.		
(นาที)	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2
10	6	6	6	6	6	4	0	6	0	0	1	0	0	0	0
15	6	6	6	6	6	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0
30	6	6	3	6	6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
45	6	6	1	6	2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
60	2	6	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

*กลุ่มควบคุมลบ (เฉพาะ PBS ที่เวลาต่าง ๆ เวลาละ 3 ฟอง) ไม่พบการตายของไข่ไก่ฟัก

**กลุ่มควบคุมบวก (เฉพาะไวรัสที่ไม่ผ่านความร้อน ทั้ง 3 เชื้อ ๆ ละ 6 ฟอง) พบการตายของไข่ไก่ฟักทั้ง 6 ฟอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนไข่ไก่ฟักที่ตาย ภายหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ผสมกับสารละลาย PBS ที่ปรับ pH 3 5 7 9 และ 12 โดยระยะเวลาสัมผัสระหว่างเชื้อไวรัส H5N1 และความเป็นกรด-ด่าง นาน 5 และ10 นาที (n=6)

กรด-ด่าง	ระยะเวลาสัมผัสเชื้อ 5 นาที			ระยะเวลาสัมผัสเชื้อ 10 นาที		
	2004.1	CUK-2	2004.2	2004.1	CUK-2	2004.2
3	2	6	2	3	5	3
5	6	6	6	6	6	4
7	6	6	6	6	6	6
9	6	6	6	6	6	6
12	4	6	5	4	6	5

*กลุ่มควบคุมลบ (เฉพาะ PBS ที่ปรับความเป็นกรด-ด่าง ๆ ละ 3 ฟอง) ไม่พบการตายของไข่ไก่ฟัก

**กลุ่มควบคุมบวก (เฉพาะไวรัสทั้ง 3 เชื้อ ๆ ละ 6 ฟอง) พบการตายของไข่ไก่ฟักทั้ง 6 ฟอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล

การศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาในครั้งนี้ผู้วิจัยได้เตรียมเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาจากตัวอย่าง ปอด ลำไส้ และตับ ซึ่งเก็บมาจากแหล่งที่พบการระบาดในประเทศไทย ช่วงเดือนมกราคม 2547 จำนวน 8 ตัวอย่าง และได้นำมาเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟัก อายุ 11 วัน โดยวิธีการที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส เป็นวิธีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับให้ใช้ในการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสดังกล่าวกันอย่างแพร่หลาย (Swayne et al., 1998) หลังจากเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสได้ในปริมาณที่ต้องการ เลือกตัวอย่างเชื้อไวรัสมา 3 ตัวอย่าง โดยมีเกณฑ์ว่าตัวอย่างเชื้อไวรัสมีความเหมือนกันของการเรียงตัวนิวคลิโอไทด์ของยีน hemagglutinin และ neuraminidase มากกว่าร้อยละ 97 ซึ่งปรากฏว่าไวรัสทั้ง 9 เชื้อมีความเหมือนกันร้อยละ 99 ขึ้นไป ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อไวรัสที่มีการรายงานพบครั้งแรก (CUK-2/04) และ เชื้อไวรัสที่มีความสามารถในการติดเชื้อสูงสุดคือ 10^9 ELD_{50}/1ml (2004.1) ซึ่งเป็นการระบาดครั้งแรก และคัดเลือกเชื้อไวรัสที่พบการระบาดครั้งที่ 2 (2004.2)

การคำนวณหาความความสามารถในการติดเชื้อของเชื้อไวรัสโดยใช้ไข่ไก่ฟักอายุ 11 วัน ซึ่งวิธีการคำนวณได้อ้างอิงมาจาก Reed และ Munch (1938) โดยความสามารถในการติดเชื้อต่ำสุดที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในการศึกษาวิจัย คือ10^3–10^4 EID_{50}/ มิลลิลิตร (OIE, 2000) แต่จากการศึกษาของ Swayne และ Halvorson (2003) พบว่าปริมาณของเชื้อไวรัสที่สามารถขับออกมาจากระบบทางเดินหายใจของไก่ที่ติดเชื้อคือ $10^{4.2}$-$10^{7.7}$ EID_{50} /1ml และที่ขับออกมาพร้อมกับอุจจาระคือ $10^{2.5}$-$10^{4.5}$ EID_{50}/1gram feces และจากการศึกษาของ Webster และคณะ (1978) พบว่าเป็ดสามารถขับเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H7N2 ออกมาพร้อมกับอุจจาระได้ในปริมาณสูงถึง $10^{8.7}$ EID_{50}/gram feces ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงใช้เชื้อไวรัสปริมาณ $10^{8.0}$ ELD_{50}/1ml ซึ่งค่อนข้างมีความสามารถในการติดเชื้อสูง

เนื่องจากที่บริเวณเปลือกของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซามีโปรตีน HA ซึ่งมีคุณสมบัติจับกับเม็ดเลือดแดงทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ดังนั้นจึงได้นำเชื้อไวรัสที่มีความสามารถในการติดเชื้อสูงที่สุดคือ 10^9 ELD_{50}/1ml มาทดสอบการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงเพื่อเป็นการทดสอบเบื้องต้นว่าเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้นมานั้นเป็นเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา โดยผลการทดสอบพบว่าเชื้อไวรัสมี HA titers เท่ากับ 256/25 µl จากนั้นได้ทำการตรวจพิสูจน์ยืนยันชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้นจากตัวอย่างทั้งหมด 8 ตัวอย่างอีกครั้งด้วยวิธี multiplex RT-PCR ซึ่งผลการตรวจพิสูจน์ยืนยันเชื้อไวรัสด้วยวิธี multiplex RT-PCR พบว่าเชื้อไวรัสที่เตรียมขึ้นจากตัวอย่างทั้ง 8 ตัวอย่าง เป็นเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 โดยวิธี multiplex RT-PCR เป็นวิธีทำให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน การใช้ primer

มากกว่า 1 คู่วิธี multiplex RT-PCR นั้นมีข้อดีกว่าวิธี RT-PCR คือประหยัดเวลาและเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า ในกรณีเพื่อการตรวจวินิจฉัย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR รวมถึงลดโอกาสการปนเปื้อนที่เกิดจากการทำ PCR หลายขั้นตอน (Spackman et al, 2003) และผลจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อไวรัสที่แยกได้จากตัวอย่างทั้ง 8 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อไวรัสที่มีความเหมือนกันเฉลี่ยอยู่ที่ 99.695 แสดงว่าทั้ง 8 ตัวอย่างนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันและจัดว่าเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อสรุปของ Nobusawa และคณะ (1991) ที่กล่าวว่าเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา ที่มีร้อยละของความเหมือนกัน (% identity) ของยีนฮีแมกกลูตินินเท่ากับ 80-90% จัดเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H5N1 โดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิด และระยะเวลาการใช้งานของน้ำยาฆ่าเชื้อภายหลังผสม นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะความทนทานของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 ภายใต้สภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้แก่ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ และสภาวะความเป็นกรด-ด่าง โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่ให้ผลดีในการศึกษาครั้งนี้คือ น้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์ผสมกับกลุ่มควอเตอนารีแอมโมเนียม โซเดียมไฮโปคลอไรต์ และฟีนอล จากการทดสอบความทนทานของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที เป็นอุณหภูมิต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัสมีความคงทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 3 ถึง 12 ที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที

เชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาเป็นเชื้อไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ง่าย ดังเช่น การใช้สารเคมีต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติในการละลายไขมันสามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ โดยในปี 1940 นั้น Stock และ Francis ได้ทำการศึกษาการทำลายเชื้อต่อเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาโดยใช้สบู่ซึ่งเตรียมมาจากกรดอินทรีย์และกรดไขมันเช่น กรดโอลีอิค (oleic acid) กรดไลโนลิค (linolic acid) เป็นต้น โดยผลการทดลองพบว่าสบู่ที่เตรียมขึ้นสามารถทำลายเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาได้ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกต่อน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 8 ชนิด พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อทุกชนิดเมื่อเจือจางสัดส่วนตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตทันทีและนำมาฆ่าเชื้อ สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ทวีศักดิ์ และคณะ (2546) ที่ทำการทดลองโดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ 15 ชนิด พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อในกลุ่มกลูตารัลดีไฮด์ ฟีนอล กรดเปอร์อะซิติก กลุ่มแอมโมเนียมคลอไรด์ และกลุ่มแอซิดไฮเปอร์คลอไรต์สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาได้ นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม (ppm) โซเดียมไฮโปครอไรด์ 1,000 ppm ของเบนซัลโคเนียม คลอไรด์ 0.02% ของกลูตารัลดีไฮด์สามารถทำลายเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาได้ (Prince and Prince 2001) และจากการศึกษาของ

Armstrong และ Froelich (1964) พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อเบนซาโคเนียมคลอไรด์สามารถทำลายเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาได้เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 0.025 mg/ml ที่อุณหภูมิ 30 °ซ หรือจากการศึกษาของ Davison และคณะ (1999) ที่ทดสอบน้ำยาฆ่าเชื้อ 4 ชนิด คือ ฟีนอล สารประกอบควอเตอนารีแอมโมเนียม และ สารประกอบควอเตอนารีแอมโมเนียมรวมกับฟอร์มัลดีไฮด์ พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่ทดสอบทั้ง 4 ชนิดนั้นสามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H7N2 ได้เมื่อใช้ความเข้มข้นตามคำแนะนำของบริษัท หรือจากการศึกษาของ Mbithi และคณะ (1990) พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อที่นิยมใช้โดยทั่วไปได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์ โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ไอโอดีน สารประกอบควอเตอนารีแอมโมเนียม และฟีนอล เมื่อผสมตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตสามารถทำลายเชื้อไวรัสตับอักเสบ ชนิดเอได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์ผสมกับกลุ่มควอเตอนารีแอมโมเนียม โซเดียมไฮโปคลอไรต์ และฟีนอล ให้ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดอื่น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเก็บรักษาน้ำยาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ ทำให้ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 8 ชนิดสูงกว่าการเก็บรักษาน้ำยาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yilmaz และ Kaleta (2003) ที่ทำการทดลองโดยใช้กรดมด (formic acid) และน้ำยาฆ่าเชื้ออีก 3 ชนิด ได้แก่ Lysovet PA® ซึ่งมีฟอร์มัลดีไฮด์ และกลูตารัลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ น้ำยาฆ่าเชื้อ TAD CID® ซึ่งมีฟอร์มัลดีไฮด์ และกลูตารัลดีไฮด์ เป็นส่วนประกอบ และน้ำยาฆ่าเชื้อ Wofasteril E® ร่วมกับน้ำยาฆ่าเชื้อ Alcapur® ในการทำลายเชื้อ bovine enterovirus type 1 (ECBO virus) mammalian orthoreovirus type 1 และ bovine adenovirus type 1 (BAV 1) ที่อุณหภูมิ 10 และ 20 °ซ โดยผลการทดลองพบว่ากรดมดและน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดสอบนี้สามารถทำลายเชื้อไวรัสที่ใช้ในการทดสอบได้ทุกชนิด โดยที่อุณหภูมิ 20 °ซ จะให้ผลในการทำลายเชื้อได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 10 °ซ อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Thomas และ Russell (1974) พบว่าการเก็บรักษาน้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาฆ่าเชื้อเปลี่ยนไป โดยที่อุณหภูมิสูงทำให้น้ำยาฆ่าเชื้อมีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อ ทำให้ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ลดลง ซึ่งเป็นเรื่องที่ควรจะทำการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากในการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ทำการบันทึกค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาฆ่าเชื้อ

เชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานมากกว่า 30 วัน ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 4 วัน ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 4 °ซ (Hayden and Palese, 1997) และจากการศึกษาของ Stallknecht และคณะ (1990) พบว่าเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรงสามารถมีชีวิตได้นาน 126-207 วัน ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 17 °ซ และสามารถมีชีวิตได้นาน 30-102 วัน ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28 °ซ ในขณะที่เชื้อไวรัสสามารถมีชีวิต

ได้นานถึง 30-35 วัน ในมูลไก่ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และเชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตได้นานถึง 7 วัน ในมูลไก่ที่มีอุณหภูมิ 20 °ซ (Swayne and Halvorson, 2003) โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสต่ออุณหภูมิที่ต่างกันได้แก่ อุณหภูมิ 55 60 65 70 และ 75 °ซ ตามลำดับ การเลือกใช้ช่วงอุณหภูมิดังกล่าวเนื่องมาจากที่อุณหภูมิ 56 °ซ ระยะเวลา 30 นาที เป็นอุณหภูมิต่ำที่สุดที่สามารถทำให้โปรตีนในซีรัมเสื่อมสภาพ (Schlesinger et al., 1990) และที่ช่วงอุณหภูมิ 60-65 °ซ เป็นช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurization) ซึ่งโดยมากนิยมใช้ที่อุณหภูมิ 62 °ซ ระยะเวลา 30 นาที (Zinsser, 1992) ส่วนอุณหภูมิ 70-75 °ซ ตรงบริเวณจุดศูนย์กลาง (core temperature) ที่ระยะเวลา 1 วินาที เป็นช่วงอุณหภูมิที่ได้มีการแนะนำว่าสามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูซาในผลิตภัณฑ์ไก่ปรุงสุกได้ (OIE, 2006) โดยผลการศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H5N1 ได้คือ อุณหภูมิ 60 °ซ ระยะเวลา 60 นาที โดยตรวจไม่พบการจับกลุ่มตกตะกอนเม็ดเลือดแดง ในขณะที่อุณหภูมิ 55 °ซ ไม่สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 ได้ ซึ่งต่างจากการศึกษาของ King (1991) พบว่าที่อุณหภูมิ 56 °ซ ระยะเวลา 30 นาที สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N2 ได้ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสยังสามารถจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงได้ และที่อุณหภูมิ 60 °ซ ระยะเวลา 30 นาที สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H5N2 ได้โดยตรวจไม่พบการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง และจากการศึกษาของ Lu และคณะ (2003) พบว่าที่อุณหภูมิ 56 °ซ ระยะเวลา 40 และ 60 นาที ไม่สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H7N2 ได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ ที่ทำการศึกษาช่วงอุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 60 นาที แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Lu และคณะ (2003) พบว่าที่อุณหภูมิ 60 °ซ ระยะเวลา 10 นาที สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H7N2 ได้ ในขณะที่การศึกษาของ Swayne และ Beck (2004) พบว่าที่อุณหภูมิ 55, 57, 59, 61 และ 63 °ซ ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 12 นาที สามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงและก่อโรคไม่รุนแรงที่อยู่ในไข่แดงได้

จากการศึกษาลักษณะความทนทานของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างในช่วง pH 3 ถึง 12 โดยการเลือกใช้ช่วง pH ดังกล่าวเนื่องมาจากพบว่าที่ระดับ pH 3 เป็นระดับ pH ที่ยังไม่ได้มีการศึกษาวิจัยมาก่อน และที่ระดับ pH 5 พบว่าเป็นระดับ pH ที่ใช้ในขบวนการรวมตัว (fusion) ของ host cell กับส่วนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัส (Huang et al., 1981) และที่ระดับ pH 12 พบว่าเป็นระดับ pH ของปูนขาวภายหลังจากละลายน้ำ (Westernlime, 2006) ซึ่งปูนขาวนิยมใช้ในการฆ่าเชื้อโรคภายในฟาร์ม โดยผลจากการศึกษาลักษณะความคงทนของเชื้อไวรัสต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างในครั้งนี้พบว่าเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H5N1 มี

ความคงทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างในช่วง pH 3 ถึง pH 12 ซึ่งมีระยะเวลาสัมผัสเชื้อนาน 5 และ 10 นาที อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่า pH ที่ต่ำกว่า 3 หรือ สูงกว่า 12 น่าจะทำลายเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในการศึกษาครั้งนี้ โดยเฉพาะในสภาพ pH ที่ต่ำกว่า 3 หรือสภาพที่เป็นกรด มีโอกาสทำลายเชื้อได้มากกว่า ดังนั้นการใช้ปูนขาวละลายน้ำอาจไม่สามารถทำลายเชื้อได้อย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องใช้วิธีการอื่น ๆ ร่วมด้วยในการทำลายเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สำหรับระยะเวลาสัมผัส 5 และ 10 นาทีนั้น ไม่พบความแตกต่างในการทำลายเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยระยะเวลาสัมผัสนาน 5 นาที ก็สามารถทำลายเชื้อได้ ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Lu และ คณะ (2003) ที่ได้ทำการศึกษาถึงผลของ pH ที่ระดับต่าง ๆ ได้แก่ pH 2 5 7 10 และ 12 ต่อเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H7N2 จากการศึกษาพบว่าที่ระดับ pH 2 ระยะเวลา 5 นาที เท่านั้นที่สามารถทำลายเชื้อไวรัสดังกล่าวได้ ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Scholtissek (1985) ที่ได้ทำการศึกษาความคงทนของเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง ได้แก่ H5 และ H7 และสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรงได้แก่ H1 H3 และ H11 ต่อสภาพความเป็นกรดที่ระดับ pH 5.2 พบว่าที่ระดับ pH ดังกล่าวสามารถทำลายเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์รุนแรงได้ ในขณะที่เชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงมีความคงทนต่อสภาพความเป็นกรดที่ระดับ pH 5.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุป

1. การเตรียมเชื้อไวรัสได้ 9 เชื้อ และผ่านการยืนยันว่าเป็นไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ด้วยการทดสอบฮีแมกกลูติเนชั่น และ RT-PCR

2. เชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ทั้ง 9 เชื้อได้นำไปส่งตรวจวิเคราะห์การเรียงตัวของยีนซึ่งมีความเหมือนกันของการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีน hemagglutinin ร้อยละ 99.32 – 99.88 และความเหมือนของการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีน neuraminidase ระหว่าง ร้อยละ 99.16 – 100 แสดงว่าเป็นเชื้อไข้หวัดนกเชื้อเดียวกัน

3. เชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ เชื้อ 2004.1, CUK-2 และ 2004.2 มีความคงทนต่อน้ำยาฆ่าเชื้อเมื่อเจือจางในระดับความเข้มข้นที่จะนำไปใช้ (working dilution) ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 °ซ. ณ วันที่ 0, 5, 7 และ 14 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไอโอดีน มีความคงทนปานกลางต่อน้ำยาฆ่าเชื้อควอเตอนารีแอมโมเนียม และฟอร์มาลีนที่อุณหภูมิ 25° ซ. แต่มีความคงทนมากขึ้นที่อุณหภูมิ 37 °ซ. มีความคงทนต่ำหรือไม่มีความคงทนต่อน้ำยาฆ่าเชื้อ-กลูตารัลอัลดีไฮด์ กลูตารัลอัลดีไฮด์ผสมกับกลุ่มควอเตอนารีแอมโมเนียม โซเดียมไฮโปคลอไรต์ และฟีนอล

4. เชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ เชื้อ 2004.1, CUK-2 และ 2004.2 ไม่มีความคงทนต่ออุณหภูมิ 70 °ซ.หรือสูงกว่า เป็นเวลา 10 นาที โดยพบว่าเชื้อ CUK-2 ค่อนข้างคงทนเมื่อเปรียบเทียบกับ เชื้อ 2004.1 และ 2004.2

5. เชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ เชื้อ 2004.1, CUK-2 และ 2004.2 มีความคงทนต่อความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงที่ทำการศึกษา

6. การศึกษาครั้งนี้อาจชี้ให้เห็นว่า เชื้อไข้หวัดนกทั้ง 3 เชื้อ โดยพบการระบาดครั้งแรก คือ 2004.1 ซึ่งมาจากการระบาดที่จังหวัดชลบุรีและ CUK-2 ซึ่งมาจากการระบาดที่จังหวัดนครปฐม และ 2004.2 ซึ่งพบการระบาดครั้งที่สองซึ่งมาจากการระบาดที่จังหวัดราชบุรี ซึ่งมีความเหมือนกันของยีน hemagglutinin และ neuraminidase มากกว่าร้อยละ 99.16 ชี้ให้เห็นว่าเชื้อไวรัสทั้ง 3 เชื้อเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน แต่จากการศึกษาถึงความคงทนต่อสภาพต่าง ๆ พบว่าเชื้อ CUK-2 มีความคงทนมากกว่าเชื้อ 2004.1 และ 2004.2

เอกสารอ้างอิง

ทวีศักดิ์ ส่งเสริม. 2546. การศึกษาความคงอยู่ ความคงทนของเชื้อไข้หวัดนกในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ และความไวต่อยาฆ่าเชื้อโรค. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 1-15.

Alexander, D.J. 2000. A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol. 74 (1-2): 3-13.

Armstrong, J.A. and Froelich, E.J. 1964. Inactivation of viruses by benzalkonium chloride. Appl Microbiol. 12 (2): 132-137.

Bovallius, A. and Anas, P. 1977. Surface-decontaminating action of glutaraldehyde in the gas-aerosol phase. Appl Environ Microbiol. 34 (2): 129-134.

Burton, G.R.W. and Engelkirk, P.G. 2000. Sterilization and disinfection. In: Microbiology for the health sciences. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 109-201.

Butcher, W. and Ulaeto, D. 2005. Contact inactivation of orthopoxviruses by household disinfectants. Appl Microbiol. 99 (2): 279-284.

Capua, I. and Alexander, D.J. 2004. Human health implications of avian influenza viruses and paramyxoviruses. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 23 (1): 1-6.

Carson, R.S. and Frisch, A.W. 1953. The inactivation of influenza viruses by tannic acid and related compounds. J Bacteriol. 66 (5): 572-575.

Cleeland, R., Grunberg, E. and Prince, H.N. 1972. Inactivation of the hemagglutinins of type A influenza viruses by physical and chemical means: an aid to classification. Infect Immun. 5 (3): 324-331.

Davison, S., Benson, C.E., Ziegler, A.F., Eckroade, R.J. 1999. Evaluation of disinfectants with the addition of antifreezing compounds against nonpathogenic H7N2 avian influenza virus. Avian Dis. 43 (3): 533-537.

Elhafi, G.C., Naylor, J.E., Savage, E. and Jones, R.C. 2004. Microwave or autoclave treatments destroy the infectivity of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus but allow detection by reverse transcriotase-polymerase chain reaction. Avian Pathol. 33 (3): 303-306.

Favero, M.S. 1985. Sterilization, disinfection, and antisepsis in the hospital. In: Manual of clinical microbiology. 4th ed. Lennette, E.H. (ed.). Washington, D.C: American Society for Microbiology. 129-137.

Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F, Olsen, B. and Osterhaus A.D. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol. 79 (5): 2814-2822.

Habib, M., Hussain, I., Fang, W.H., Rajput, Z.I., Yang, Z.Z. and Irshad, H. 2006. Inactivation of infectious bursal disease virus by binary ethylenimine and formalin. J Zhejiang Univ Sci B. 7 (4): 320-323.

Hayden, F.G. and Palese, P. 1997. Influenza Virus. In: Clinical Virology, New York: Churchill Livingstone. 911-942.

Huang, R.T., Rott, R. and Klenk, H.D. 1981. Influenza viruses cause hemolysis and fusion of cells. Virology. 15 (1): 243-247.

Jacquelyn, B. 2005. Sterilization and disinfection. In: Microbiology principle and explorations. 5th ed, USA: Wiley. 328-348.

King, D.J. 1991. Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. Avian Dis. 35 (3): 505-514.

Linton, W., Hugo, B. and Russell, A.D., 1987. Chemical disinfectants. In: Disinfection in veterinary and farm animal practice. London : Blackwell Scientific. 12-42.

Lu, H., Castro, A.E., Pennick, K., Liu, J., Yang, Q., Dunn, P., Weinstock, D. and Henzler, D. 2003. Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. Avian Dis. 47 (Suppl. 3): 1015-1021.

Mbithi, J.N., Springthorpe, V.S. and Sattar, S.A. 1990. Chemical disinfection of hepatitis A virus on environmental surfaces. Appl Environ Microbiol. 56 (11):3601-3604.

McDonnell, G. and Russell, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev. 12 (1):147-179.

Nester, E.W., 2004. Control of microbial growth. In: Microbiology a human perspective. 4th ed, Boston: McGraw-Hill. 110-130.

Nobusawa, E., Aoyama, T., Kato, H., Suzuki, Y., Tateno, Y. and Nakajima, K. 1991. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A virus. Virology. 182 (2): 475-485.

Office International des Epizooties. 2000. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4th ed. Paris: OIE. 212-219.

Office International des Epizooties (OIE), 2006. Guidelines for the inactivation of the avian influenza virus, available from http://www.oie.int/downld/Prep_conf Avian inf/Terres_trial%20Code/TAHC_Guidelines%20for%20AI%20inactivation.pdf

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 (1-2): 63-70.

Prince, H.N. and Prince, D.L. 2001. Principles of viral control and transmission. In: Disinfection, sterilization, and preservation. 5th. Block, S.S. (ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 542-574.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

Robert, W.B. 2004. Controlling microbiology in the environment In: Microbiology. New York: Pearson Benjamin. 262-284.

Russell, A.D., Hugo, W.B. and Ayliffe G.A.J. 1992. Types of antimicrobial agents. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 2nd ed. London: Blackwell Scientific Pub. 7-75.

Sauerbrei, A., Sehr, K., Eichhorn, U., Reimer, K. and Wutzler, P. 2005. Inactivation of human adenovirus genome by different groups of disinfectants. J Hosp Infect. 57 (1): 67-72.

Scholtissek, C. 1985. Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. Vaccine. 1985 Sep: 3 (3 Suppl): 215-218.

Schlesinger, M., Nave, Z., Levy, Y., Slater, P.E. and Fishelson, Z. 1990. Prevalence of hereditary properdin, C7 and C8 deficiencies in patients with meningococcal infections. Clin Exp Immunol. 81 (3):423-7.

Sims, L.D., Guan, Y., Ellis, T. M., Liu, K. K., Dyrting, K., Wong, H.,Kung, N. Y. H., Shortridge, K. F. and Peiris, M. 2003. Avian Influenza in Hong Kong 1997-2002. Avian Dis. 47 (Suppl. 3): 832-838.

Spackman, E., Senne, D.A., Bulaga, L.L., Trock, S. and Suarez, D.L. 2003. Development of multiplex real-time RT-PCR as a diagnostic tool for avian influenza. Avian Dis. 47 (3 Suppl): 1087-1090.

Stallknecht, D.E., Kearney, M.T., Shane, S.M. and Zwank, P.J. 1990. Effect of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. Avian Dis. 34 (2): 412-418.

Stephenson, I., Nicholson, K.G., Wood, J.M., Zambon, M.C. and Katz, J.M. 2004. Confronting the avian influenza threat: vaccine development for a potential pandemic. Lancet Infect Dis. 4 (8): 499-509.

Stock, C.C. and Francis, Jr. 1940. The inactivation of the virus of epidemic influenza by soaps. J. Exp. Med. 71: 661–681.

Suarez, D.L., Spackman, E., Senne, D.A., Bulaga, L., Welsch, A.C. and Froberg, K. 2003. The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT-PCR. Avian Dis. 47 (Suppl. 3): 1091-1095.

Sutherland, S. 2002. Orthomyxoviruses. In: Medical microbiology. 16th ed, London: Churchill Livingstone. 468-474.

Swayne, D.E., Senne, D.A. and Beard, C.W. 1998. Avian influenza. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4thed. Kennett Square: University of Pennsylvania. 150-154.

Swayne, D.E. and Halvorson, D.A. 2003. Influenza. In: Diseases of poultry. 11thed. Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M. and McDougald, L.R. (ed.). Iowa: Iowa State University Press. 135-153.

Swayne, D.E., and Beck, J.R. 2004. Heat inactivation of avian influenza and Newcastle disease viruses in egg products. Avian Pathol. 33 (5): 512-518.

Thomas, S. and Russell, A.D. 1974. Temperature-induced changes in the sporicidal activity and chemical properties of glutaraldehyde. Appl Microbiol. 28 (3): 331-335.

Viseshakul, N., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Suradhat, S., Payungporn, S., Keawchareon, J., Oraveerakul, K., Wongyanin, P., Plitkul, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2004. The genome sequence analysis of H5N1 avian influenza A virus isolated from the outbreak among poultry populations in Thailand. Virology. 328 (2): 169-176.

Webster, R.G., Yakhno, M., Hinshaw, V.S., Bean, W.J. and Murti, K.G. 1978. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. Virology. 84 (2):268-278.

Westernlime. 2006. Material Safety Data sheet Pure Cal High Calcium Hydrated Lime (Calcium Hydroxide), available from http://www.westernlime.com/pdfs/MSDS PureCal.pdf

Widmer, A.E. and Frei, R. 2004. Antimicrobial activity of glucoprotamin: a clinical study of a new disinfectant for instruments. Infect Control Hosp Epidemiol. 24 (10): 762-764.

Yilmaz, A. and Kaleta, E.F. 2003. Evaluation of virucidal activity of three commercial disinfectants and formic acid using bovine enterovirus type 1 (ECBO virus), mammalian orthoreovirus type 1 and bovine adenovirus type 1. Vet J. 166 (1): 67-78.

Zinsser H. 1992. Sterilization and disinfection. In: Zinsser microbiology. New Jersey: Prentice-Hall International. 188-199.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย