12/7

รายงานการวิจัย

โรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำในสัตว์สู่คน (โรคไข้หวัดใหญ่สุกร)

Emerging and Re-emerging Zoonotic Diseases (Swine Influenza)

ศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัย

โรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำในสัตว์สู่คน (โรคไข้หวัดใหญ่สุกร)

Emerging and Re-emerging Zoonotic Diseases (Swine Influenza)

ศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (CU-CLUSTER-FUND)

บทคัดย่อ

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร ทำให้สุกรป่วยด้วยอาการของโรคระบบทางเดินหายใจ และเป็นโรคติดต่อสัตว์สู่คน สามารถกลายพันธุ์และทำให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ ที่อาจทำให้เกิดโรคที่รุนแรงขึ้น หรือสามารถระบาดได้ในสัตว์หลายชนิดรวมทั้งมนุษย์ การเฝ้าระวังอย่างสม่ำเสมอทั้งด้านไวรัสวิทยา ลักษณะพันธุกรรม และด้านซีรัมวิทยามีความจำเป็นในการควบคุมและป้องกันโรคในอนาคต ในการศึกษาครั้งนี้ เก็บตัวอย่างป้ายจมูกและปอดจำนวนทั้งหมด 143 ตัวอย่าง และซีรัมสุกรจำนวนทั้งหมด 271 ตัวอย่าง ในช่วงปลายปี พ.ศ. 2552 ถึง 2553 จากบริเวณที่เลี้ยงสุกรหนาแน่น สามารถเพาะแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในไข่ไก่ฟักและ/หรือเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ได้ 7 ตัวอย่าง จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ pandemic H1N1 2009 และไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ส่วนการสำรวจทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี HI test พบให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1(06) มากที่สุด ร้อยละ 78.23 รองลงมาคือ H1N1 (09) H3N2 (07) และ H3N2 (05) ร้อยละ 33.95 9.96 และ 0 ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยครั้งนี้ พบมีความหลากหลายมากขึ้น โดยพบการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ pandemic H1N1 2009 และไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรลูกผสมสายพันธุ์ H1N2 ในสุกร ที่มีรูปแบบการผสมกันคล้ายกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ pandemic H1N1 2009 คือมีการผสมกันของยีนที่มาจากทั้งสุกร สัตว์ปีก และมนุษย์ ซึ่งยังไม่มีข้อมูลยืนยันถึงศักยภาพของการก่อโรค การระบาด หรือการติดข้ามชนิดสัตว์ของไวรัสลูกผสม H1N2 นี้

จากการสำรวจทางซีรัมวิทยา พบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 มีบทบาทในการระบาดในประเทศไทยมากกว่าสายพันธุ์ H3N2 และพบแนวโน้มการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ในฝูงสุกรในประเทศไทยเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อข้ามระหว่างวัสไข้หวัดใหญาสุกรและไวรัสไข้หวัดใหญ่ในมนุตย์ การสำรวจทางซีรัมวิทยาทำให้ทราบถึงสถานะการติดเชื้อไวรัสที่แท้จริงในฝูงสุกร แต่การตรวจทางซีรัมวิทยาโดยวิธี HI test ต้องใช้ไวรัสแอนติเจนที่ระบาดในท้องถิ่นหรือเป็นไวรัสแอนติเจนที่มีภูมิคุ้มกันข้ามกัน จึงควรมีการทวนสอบการใช้ไวรัสแอนติเจนอย่างสม่ำเสมอ หรือควรพัฒนาวิธีที่ตรวจได้รวดเร็วและง่ายกว่า HI test เพื่อการวินิจฉัยที่รวดเร็วจะช่วยในการป้องกันและควบคุมโรคได้ดี

Abstract

Swine influenza is one of major respiratory pathogens in pigs causing respiratory diseases and could be a zoonotic disease. Genetic mutation could result in a new strain possibly leading to higher severity and becoming pandemic either in animals or humans. Continuous virological surveillance in genetic and serologic study is necessary for the future disease prevention and control. In this study, samples from 143 nasal swabs and/or lung tissues and 271 pig sera were collected between late 2009 to 2010 from the intensive pig raising areas. Seven swine influenza viruses were isolated using either embryonated eggs or cell culture system. Based molecular genetic analysis, pandemic H1N1 2009 and H1N2 viruses were recovered. Serologically using HI test for H1N1(06) (78.235), H1N1 (09) (33.95%), H3N2 (07) (9.96%) and H3N2 (05) (0%) were demonstrated.

Based on molecular genetic analysis, genetic variation of the Thai swine influenza virus was evident since pandemic H1N1 2009 and a reassortment H1N2 swine influenza were demonstrated in the Thai swine farms. Similar to the triple reassorment of pandemic H1N1 2009, the novel reassortment H1N2 genes contains mixing of gene pools from swine, avian and human origins. Currently, there is no study demonstrating the pathogenesis study and potential pandemic or interspecies transmission of this novel H1N2 virus.

Serologically, H1H1 swine influenza has an impact in term of prevalence than the H3N2 virus. After the introduction of pandemic H1N1 2009 in the Thai swine population, increasing of genetic variation is unavoidable. In addition, there were evidences of interspecies transmission of swine influenza virus in humans or vice versa. Regular monitor on antigens used for HI test is essential in order to determine the true prevalence of the specific swine influenza virus due to cross reaction among strains. In addition, new diagnostic methods should be developed for a better diagnosis for prevention and control since HI test is time consuming and required laboratory skills.

สารบัญเรื่อง

(Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญตาราง	vi
สารบัญภาพ	vii
1. บทนำ	1
2. วิธีดำเนินงานวิจัย	3
3. ผลการวิจัย	4
4. วิจารณ์	18
บรรณานุกรม	19
ภาคผนวก	21

สารบัญตาราง

(List of Tables)

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนฟาร์มสุกรที่ได้ติดต่อประสานงานและเก็บตัวอย่างในจังหวัดต่างๆ	4
2	ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสและการเพาะแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างป้ายจมูกและปอด	7
3	ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ ทั้ง 8 ยีน	8
4	ผลการวิเคราะห์ความเหมือนกัน (homology) มากที่สุด เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยคำนวณเป็นค่าร้อยละที่เหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ (% Nt identity)	9
5	แสดงจำนวนตัวอย่างซีรัมและผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ด้วยวิธี Hemagglutination-inhibition (HI)	14

สารบัญภาพ

(List of Illustration)

ภาพที่		หน้า
1	แผนภูมิต้นไม้ของยีน HA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1	10
2	แผนภูมิต้นไม้ของยีน NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ N1	11
3	แผนภูมิต้นไม้ของยีน NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ N2	12
4	สายวิวัฒนาการของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่พบในการศึกษาครั้งนี้	13
5	ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ที่แยกได้ในปีต่างๆ ด้วยวิธี Hemagglutination-inhibition (HI)	15

1. บทนำ

(Introduction)

ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีจำนวนประชากรถึงร้อยละ 26 ของประชากรทั้งหมดของโลก[1-2] โดยเฉลี่ยต่อปีจะมีคนเสียชีวิตเป็นจำนวน 14 ล้านคน ซึ่งในจำนวนนี้ร้อยละ 40 (คิดเป็นร้อยละ 28 ของประชากรโลก) มีสาเหตุมาจากโรคติดเชื้อ (communicable disease) เพียงอย่างเดียว[3] เนื่องจากภูมิประเทศในแถบนี้เป็นเขตร้อนชื้นทำให้เป็นแหล่งเพาะเชื้อโรค รวมทั้งจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน ทำให้ผู้คนต้องอยู่กันอย่างแออัดมากขึ้น ความยากจนเพิ่มขึ้น สุขลักษณะของผู้คนลดลง ที่สำคัญคือประชากรในภูมิภาคนี้ ยังมีความเป็นอยู่ที่ใกล้ชิดกับสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคของโรคสัตว์สู่คนอยู่ เนื่องจากการเลี้ยงสัตว์เพื่อประกอบเป็นอาชีพก็ดี หรือเพื่อเป็นอาหารก็ดี ยังคงมีสภาพที่เป็นแบบดั้งเดิมอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งก็คือการเลี้ยงสัตว์แบบหลังบ้านที่ขาดระบบการป้องกันทางชีวภาพ (biosecurity) ที่ได้มาตรฐาน นอกจากนี้พฤติกรรมการบุกรุกป่า เพื่อเพิ่มพื้นที่เกษตรกรรมและที่อยู่อาศัยก็ยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปัจจัยทั้งหมดดังกล่าวล้วนเพิ่มโอกาสให้พื้นที่ในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย เป็นจุดเสี่ยงของการเกิดโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คนที่เป็นทั้งโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำได้ ตัวอย่างเช่น โรคไข้หวัดนก โรคไข้หวัดใหญ่สุกร และ/หรือไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์อื่นๆ โรคติดเชื้อนิปาห์ไวรัสในสุกร โรคติดเชื้อไวรัส Westnile ในนกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด โรคไข้สมองอักเสบเจอีในสุกร โรควัวบ้า โรคบรูเซลโลซิสในปศุสัตว์ โรคติดเชื้อทีบีในสัตว์ชนิดต่างๆ ซึ่งโรคเหล่านี้ มีทั้งที่สามารถติดต่อโดยตรงจากสัตว์ป่วยสู่คน เช่น โรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โรคไข้หวัดใหญ่สุกร โรคติดเชื้อนิปาห์ และโรคที่ติดต่อสู่คนโดยการผ่านยุงเป็นพาหะ เช่น โรคติดเชื้อไวรัส Westnile และโรคไข้สมองอักเสบเจอี

สำหรับการปศุสัตว์ในประเทศไทยนั้น ปัญหาของโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำชนิดที่เป็นโรคสัตว์สู่คนทั้งหมดที่ได้กล่าวมาข้างต้น มีรายงานพบได้ ยกเว้นโรคติดเชื้อไวรัส Westnile โรคติดเชื้อนิปาห์ และโรควัวบ้าที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย อย่างไรก็ตามตราบใดที่ยังมีการค้าขายสัตว์ระหว่างประเทศ การนำเข้าพ่อ-แม่พันธุ์สัตว์ การลักลอบนำเข้าและเคลื่อนย้ายสัตว์ตามบริเวณชายแดนที่ยังคงมีอยู่ต่อเนื่อง โอกาสของการเกิดโรคอุบัติใหม่ในสัตว์ก็ยังคงมีได้เช่นกัน นอกจากนี้อีกประการที่ต้องตระหนักคือเรื่องของการเดินทางระหว่างประเทศของผู้คนในปัจจุบันที่มีความสะดวกรวดเร็วขึ้นมาก ทำให้มนุษย์เองอาจเป็นพาหะนำโรคที่กำลังระบาดอยู่อีกที่หนึ่งมาสู่สัตว์ที่อยู่ในอีกซีกโลกได้ ดังเช่นกรณีของการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ pandemic

HIN1 2009 ในสุกรจากฟาร์มหนึ่งในประเทศแคนาดา ซึ่งสาเหตุของการติดเชื้อเกิดจากผู้เลี้ยงสุกรที่ติดเชื้อจากการเดินทางไปประเทศเม็กซิโกและนำโรคกลับเข้ามาแพร่ในฟาร์มสุกร

จะเห็นได้ว่า โรคติดเชื้อไวรัสอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำที่เป็นโรคสัตว์สู่คน มีทั้งชนิดที่มีอัตราการตายสูง เช่น โรคไข้หวัดนกที่มักจะติดเชื้อในคนที่สัมผัสใกล้ชิดกับไก่ป่วย และมีจำนวนไม่น้อยที่เป็นโรคที่พบในสุกร เช่น โรคไข้หวัดใหญ่สุกร โรคตับอักเสบติดต่อชนิดอี โรคติดเชื้อนิปาห์ไวรัส โรคติดเชื้อไวรัส Westnile และโรคไข้สมองอักเสบ เป็นต้น ซึ่งบางโรคถึงแม้จะไม่ทำให้คนเป็นอันตรายถึงชีวิต แต่ก็ทำให้เกิดความสูญเสียด้านการรักษาโรคแทรกซ้อน ในขณะที่บางโรคผู้ป่วยมีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดอันตรายถึงชีวิต นอกจากนี้ก็ยังมีโรคอุบัติซ้ำอื่นในสุกรที่อาจมีความเป็นไปได้ที่จะติดเชื้อข้ามสู่คน (zoonotic potential) เช่น โรคพีอีดีซึ่งเกิดจากเชื้อในกลุ่ม Coronavirus ก่อโรคท้องเสียในฝูงสุกร ถึงแม้จะไม่มีรายงานวิจัยยืนยันชัดเจนว่าเป็นโรคสัตว์สู่คน แต่จากการสำรวจในฟาร์มที่มีการระบาดของทางคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ (Unpublished data) ที่ผ่านมา ก็พบคนงานในฟาร์มป่วยด้วยอาการท้องเสียจำนวนหนึ่ง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเฝ้าระวังการติดเชื้อในฝูงสัตว์จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากและจำเป็นที่จะต้องมีการดำเนินการอย่างมีระบบและที่สำคัญต้องต่อเนื่อง โดยจะจำเพาะการสำรวจไปที่กลุ่ม Food animals ซึ่งเป็นแหล่งรังโรค เช่น สุกร โดยทางคณะผู้วิจัยเห็นว่า ระบบการสำรวจโรคดังกล่าว จะนำมาสู่การตรวจพบโรคอุบัติใหม่จากสัตว์สู่คนได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะโรคไข้หวัดใหญ่สุกร ก็จะเป็นข้อมูลที่บ่งชี้ถึงสถานภาพของโรคในสัตว์อย่างแท้จริง ซึ่งสำคัญต่อการศึกษาต่อเนื่องถึงโอกาสของการติดต่อและปัจจัยที่เอื้อต่อการแพร่ระบาดของโรคสู่คน (Potential of transmissibility and predisposing factors) ต่อไป ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ นอกจากจะนำมาใช้วางแผนเพื่อลดปัญหาของการแพร่ระบาดของโรคสัตว์สู่คนโดยเฉพาะโรคไข้หวัดใหญ่สุกรแล้ว ยังช่วยให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย มีความปลอดภัยต่อผู้เลี้ยงและประชาคมโลก และนำมาซึ่งรายได้ที่เพิ่มขึ้นของเกษตรกรไทย เนื่องจากผู้บริโภคมีความมั่นใจต่อการบริโภคเนื้อสัตว์อย่างแท้จริง

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเครือข่ายและระบบการเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์ โดยเฉพาะชนิดที่เป็นโรคสัตว์สู่คน เพื่อหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่อาจเป็นสาเหตุของโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำในสัตว์สู่คน และสำรวจทางซีรัมวิทยาเพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในคนกลุ่มเสี่ยง

2. วิธีดำเนินงานวิจัย

(Materials and Methods)

2.1 ประสานงานกับสัตวแพทย์และเครือข่ายฟาร์ม

ติดต่อกับฟาร์มสุกร และทำความเข้าใจเรื่องความสำคัญของการเฝ้าระวังโรคสัตว์สู่คนให้ถึงระดับผู้ปฏิบัติ (ผู้เลี้ยงสัตว์) จัดทำการสัมมนาสำหรับสัตวแพทย์และผู้ประกอบการ เพื่อการเสริมสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำในสัตว์ชนิดที่เป็นโรคสัตว์สู่คนโดยเฉพาะโรคไข้หวัดใหญ่สุกร รวมทั้งจัดทำเอกสารคู่มือ (Disease facts) เพื่อเสริมสร้างความรู้และเพื่อเป็นแนวทางปฏิบัติในการเฝ้าระวังโรคในฟาร์มและการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้องและปลอดภัย

2.2 ชนิดสัตว์และการเก็บตัวอย่าง

a. ทำการเก็บตัวอย่างเลือด nasal swabs และ/หรือผ่าซากเพื่อเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อปอด จากสุกรที่ป่วย ร่วมกับการสุ่มตัวอย่างจากสัตว์ปกติ เพื่อตรวจหาเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร

b. เก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อตรวจติดตามแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร

2.3 สถานที่ทำการสำรวจ

ทำการเฝ้าระวังในเขตจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น เช่น จังหวัดราชบุรี จังหวัดนครปฐม จังหวัดชลบุรีและจังหวัดฉะเชิงเทรา นอกจากนี้ก็จะตรวจติดตามไปในจังหวัดอื่นๆ กรณีที่มีโรคระบาดเกิดขึ้น

2.4 วิธีการตรวจวินิจฉัยโรค

a. เพาะแยกเชื้อไวรัสในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง ในกรณีของโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

- ทำการตรวจพิสูจน์หาเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บได้โดยตรง
- สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรค
- ตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Reverse transcriptase (RT) - Polymerase chain reaction (PCR) หรือวิธี Realtime RT-PCR

b. ตรวจตัวอย่างซีรัมเพื่อตรวจติดตามแอนติบอดีเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร

3. ผลการวิจัย

(Results)

3.1 ประสานงานกับสัตวแพทย์และเครือข่ายฟาร์ม

ได้ติดต่อประสานงานกับสัตวแพทย์ ผู้ประกอบการ และผู้ปฏิบัติงานในฟาร์มสุกร เพื่อให้ความรู้ที่เกี่ยวกับโรคไข้หวัดใหญ่สุกร เช่น ข้อมูลพื้นฐานการเกิดโรค อาการ การตรวจและการเก็บตัวอย่าง เป็นต้น รวมทั้งขอความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างซีรัมและป้ายจมูกเพื่อตรวจหาเชื้อ โดยกลุ่มเป้าหมายจะอยู่ในฟาร์มสุกรที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อโรคไข้หวัดสุกรในจังหวัดนครปฐม จังหวัดราชบุรี จังหวัดชลบุรี และจังหวัดฉะเชิงเทรา ได้ติดต่อประสานงานจำนวน 11 ฟาร์ม เก็บตัวอย่างป้ายจมูกหรือชิ้นเนื้อปอดจำนวน 4 ฟาร์ม และเก็บตัวอย่างซีรัมจำนวน 6 ฟาร์ม (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนฟาร์มสุกรที่ได้ติดต่อประสานงานและเก็บตัวอย่างในจังหวัดต่างๆ

	จำนวนฟาร์มสุกร		
จังหวัด	ติดต่อประสานงาน	เก็บตัวอย่างป้ายจมูก/ปอด	เก็บตัวอย่างซีรัม
ราชบุรี	2	1	2
นครปฐม	2	0	0
ชลบุรี	3	2	2
ฉะเชิงเทรา	4	1	2
รวม	11	4	6

3.2 การเก็บตัวอย่างและผลการตรวจ

ได้เก็บตัวอย่างป้ายจมูกหรือปอดจากสุกรจำนวน 4 ฟาร์ม เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร โดยเทคนิค RT-PCR และเพาะแยกเชื้อในไข่ไก่ฟักอายุ 9-10 วัน และ/หรือเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MDCK และเก็บตัวอย่างซีรัมจำนวน 6 ฟาร์ม เพื่อตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี HI test ดังนี้

3.2.1 ตัวอย่างป้ายจมูกหรือปอด

เก็บตัวอย่างป้ายจมูกหรือปอดจำนวนทั้งหมด 143 ตัวอย่าง มีตัวอย่างป้ายจมูกจำนวน 134 ตัวอย่าง และตัวอย่างชิ้นเนื้อปอดจำนวน 9 ตัวอย่าง เบื้องต้นทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีน M ได้แก่ 5' TGA TCT TCT TGA AAA TTT GCA G 3' และ 5' TGT TGA CAA AAT GAC CAT CG 3'[4] ตรวจพบผลบวกจำนวน 14 ตัวอย่าง หลังจากนั้นนำไปเพาะแยกในไข่ไก่ฟักและเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MDCK สามารถแยกไวรัสได้ 7 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) จากการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีน H1, H3, N1 และ N2[5] ผลการตรวจพบสายพันธุ์ H1N1 จำนวน 6 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ H1N2 จำนวน 1 ตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่างไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ที่แยกได้ทั้ง 6 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างที่ได้มาตั้งแต่ 6 มีนาคม 2553 จึงได้ทำการถอดรหัสพันธุกรรมไปแล้ว 2 ตัวอย่าง พบว่าเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic H1N1 2009 ที่มีการระบาดในคน และได้รายงานไปแล้วโดย Sreta et el., 2010ใน Emerging Infectious Disease[6] (ดังที่แนบไว้ด้านท้ายรายงาน) แต่เนื่องจากฟาร์มนี้มีการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ด้วย ผู้วิจัยจึงเก็บตัวอย่างป้ายจมูกเพิ่มเติมอีก 2 ครั้ง สามารถเพาะแยกไวรัสได้เพิ่มอีก 4 ตัวอย่าง จึงทำการจำแนกสายพันธุ์และตรวจวินิจฉัยแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic H1N1 2009 กับไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเดิมที่พบอยู่แล้วในประเทศไทยด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีน PB1 จากผลการตรวจพบไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic H1N1 2009 ส่วนตัวอย่างปอดที่เก็บจากสุกรในจังหวัดชลบุรี พบให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N2 ตัวอย่างดังกล่าวมาจากปอดของสุกรอายุประมาณ 9 สัปดาห์ป่วยด้วยอาการของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน รอยโรคที่ปอดมีสีแดงคล้ำ ขอบเขตชัดเจน ประมาณร้อยละ 20 ของพื้นที่ปอดทั้งหมด และกระจายตัวในส่วนของปอดด้านหน้าและด้านท้อง (Cranioventral part) จากผลการถอดรหัสพันธุกรรม พบไวรัสสายพันธุ์ H1N2 มาจากการผสมกันของไวรัส

ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ที่มีอยู่แล้วในประเทศไทย กับไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 จากการศึกษาในครั้งนี้ ยังไม่พบการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic H1N1 2009

ผลการถอดระหัสพันธุกรรมและการวิเคราะห์ความเหมือนกัน (homology) มากที่สุด เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank แสดงในตารางที่ 3 และ 4

ผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการด้วยแผนภูมิต้นไม้ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยครั้งนี้เปรียบเทียบกับพันธุกรรมของไวรัสที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงดังภาพที่ 1 2 และ 3 โดยสายวิวัฒนาการของยีน HA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1 มี 2 สาย ได้แก่ สายดั้งเดิม Classical swine H1 (พบระบาดในสหรัฐอเมริกา) และ สายยุโรป Eurasian swine H1 (พบระบาดในทวีปยุโรปและเอเชีย) ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยสายพันธุ์ H1 มาจากสายวิวัฒนาการ Classical swine H1 โดย RA15 และ RA75 จัดอยู่ในกลุ่ม Swine H1γ เหมือนกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ส่วน K4 จัดอยู่ในกลุ่ม Swine H1α เหมือนกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่เคยพบในประเทศไทย แต่เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของไวรัส K4 (H1N2) ทั้ง 8 ยีน (ตารางที่ 4) พบมีสายวิวัฒนาการจากการรวมกันของยีนที่มาจากทั้งสุกร สัตว์ปีก และมนุษย์ (ภาพที่ 4) ซึ่งการผสมกันของไวรัส K4 (H1N2) คล้ายกับรูปแบบการผสมกันของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 จึงควรเฝ้าระวังและสำรวจทั้งทางไวรัสวิทยา ซีรัมวิทยา และลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง เพื่อป้องกันและควบคุมการระบาดของไวรัสทั้งในสุกรและการติดเชื้อสู่มนุษย์ด้วย

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสและการเพาะแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างป้ายจมูกและชิ้นเนื้อปอด

	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ		จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก	
จังหวัด	ตัวอย่างป้ายจมูก	ตัวอย่างปอด	RT-PCR	เพาะแยกไวรัส
ราชบุรี	86	2	9	6
ชลบุรี	23	3	1	0
ฉะเชิงเทรา	25	4	4	1
รวม	134	9	14	7

ตารางที่ 3 ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ ทั้ง 8 ยีน

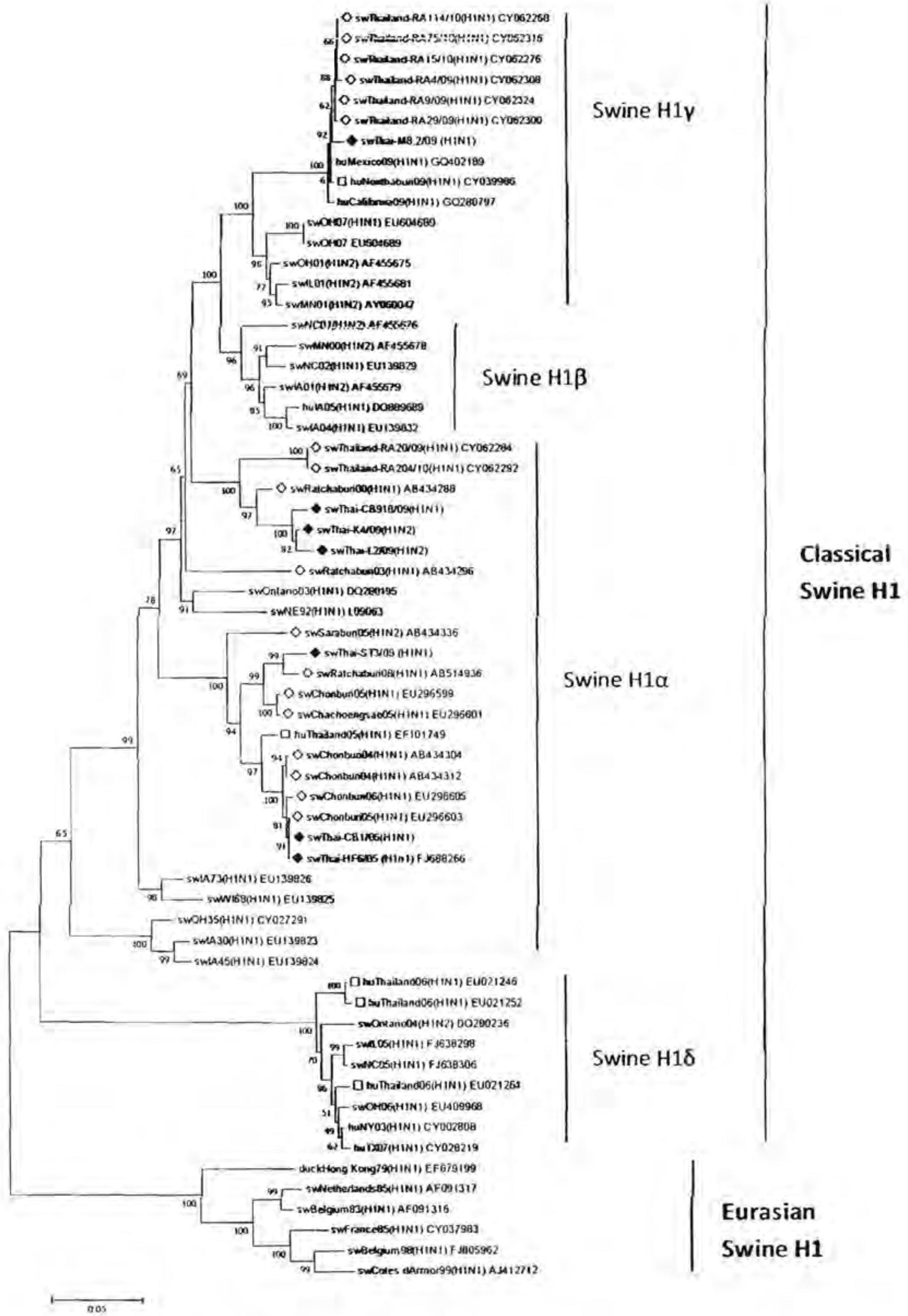
Gene	**SIV isolates**		
(length; base pair)[7] (Cheung and Poon, 2007)	**RA15* (H1N1)**	**RA75* (H1N1)**	**K4** (H1N2)**
PB2 (2341)	2,279	2,257	2,259
PB1 (2341)	2,233	2,233	2,274
PA (2233)	2,151	2,151	2,119
HA (1778)	1,674	1,691	1,700
NP (1565)	1,487	1,489	1,496
NA (1413)	1,411	1,410	1,403
M (1027)	967	981	979
NS (890)	849	822	837

* RA15 และ RA75 ตีพิมพ์ใน Emerging Infectious Disease[6] โดย Sreta et al., 2010

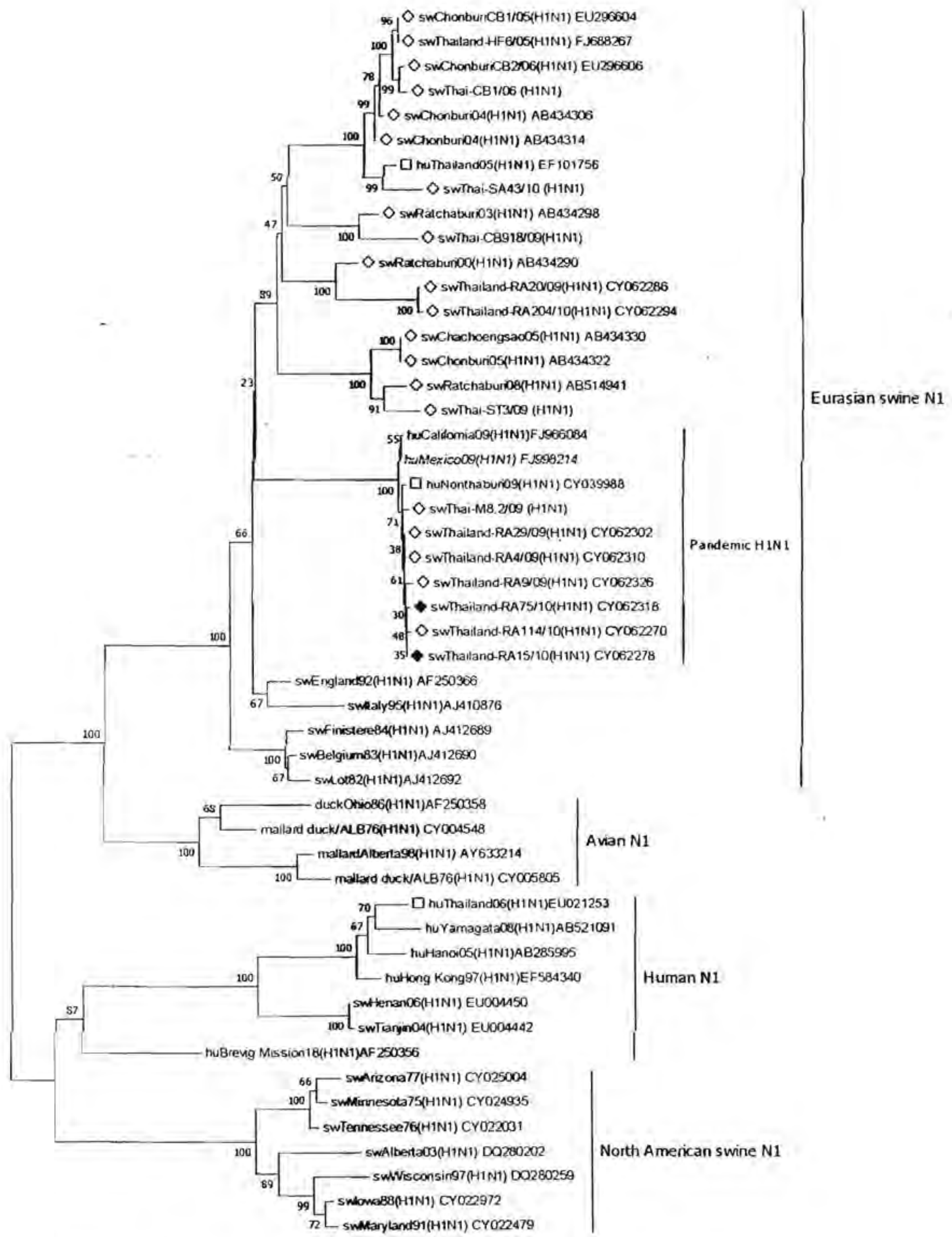
* K4 นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ที่แคนาดา ใน the 21st International Pig Veterinary Society Congress, Proceeding, 2010 July 18-21. โดย Sreta et el., 2010

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนกัน (homology) มากที่สุด เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยคำนวณเป็นค่าร้อยละที่เหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ (% Nt identity)

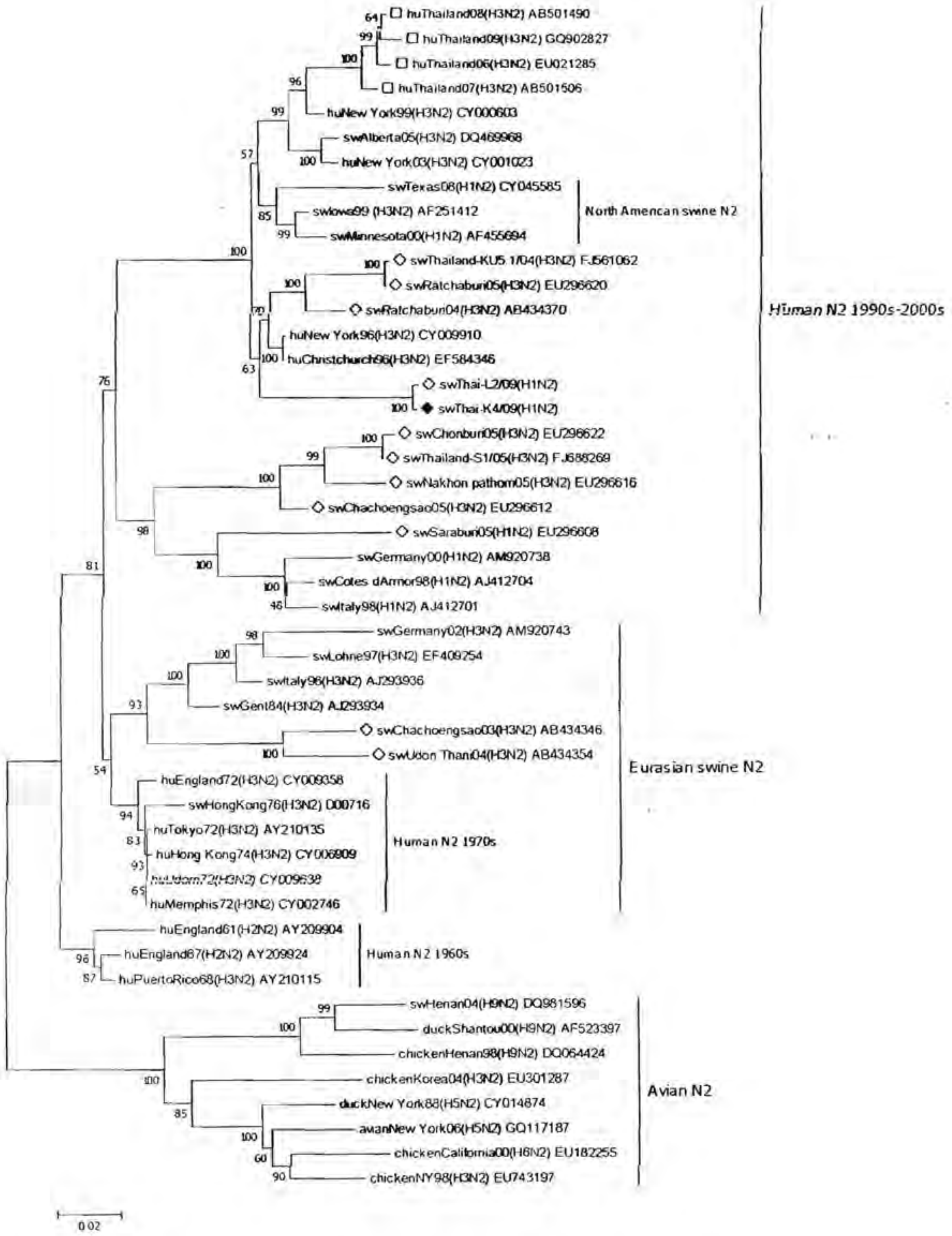
Gene	Virus	Nucleotide compared	Virus with the highest degree of Homology	Nt identity (%)
PB2	RA15	7-2286	A/swine/Thailand/CU-RA114/2010(H1N1)	99
	RA75	7-2264	A/swine/Thailand/CU-RA4/2009(H1N1)	99
	K4	22-2281	A/swine/Ratchaburi/NIAH1481/2000(H1N1)	95
PB1	RA15	34-2262	A/swine/Thailand/CU-RA9/2009(H1N1)	99
	RA75	7-2240	A/swine/Thailand/CU-RA29/2009(H1N1)	99
	K4	1-2274	A/swine/Udon Thani/NIAH464/2004(H3N2)	96
PA	RA15	1-2152	A/swine/Thailand/CU-RA114/2010(H1N1)	100
	RA75	1-2152	A/swine/Thailand/CU-RA114/2010(H1N1)	99
	K4	1-2120	A/Thailand/271/2005(H1N1)	98
HA	RA15	4-1678	A/swine Thailand/CU-RA114/2010(H1N1)	99
	RA75	7-1698	A/Thailand/THB0421/2009(H1N1)	99
	K4	35-1735	A/swine/Ratchaburi/NIAH1481/2000(H1N1)	96
NP	RA15	1-1487	A/Singapore/ON0801/2009(H1N1)	99
	RA75	1-1490	A/Singapore/ON0801/2009(H1N1)	99
	K4	35-1531	A/swine/Ratchaburi/NIAH59/2004(H3N2)	97
NA	RA15	3-1414	A/Athens/INS392/2010(H1N1)	99
	RA75	3-1413	A/Athens/INS392/2010(H1N1)	99
	K4	1-1404	A/Christchurch/1/1996(H3N2)	94
M	RA15	6-973	A/Managua/2729.02/2009(H1N1)	100
	RA75	6-987	A/Managua/2729.02/2009(H1N1)	99
	K4	1-980	A/Thailand/271/2005(H1N1)	98
NS	RA15	1-849	A/swine/Thailand/CU-RA114/2010(H1N1)	100
	RA75	1-822	A/swine/Thailand/CU-RA114/2010(H1N1)	99
	K4	1-838	A/swine/Chonburi/NIAH977/2004(H1N1)	98


swThailand-RA114/10(H1N1) CY062268
swThailand-RA75/10(H1N1) CY062316
swThailand-RA15/10(H1N1) CY062276
swThailand-RA4/09(H1N1) CY062308
swThailand-RA9/09(H1N1) CY062324
swThailand-RA29/09(H1N1) CY062300
swThai-M8.2/09 (H1N1)
huMexico09(H1N1) GQ402189
huNonthaburi09(H1N1) CY039986
huCalifornia09(H1N1) GQ280797
swOH07(H1N1) EU604689
swOH07 EU604689
swOH01(H1N2) AF455675
swIL01(H1N2) AF455681
swMN01(H1N2) AY060047
swNC01(H1N2) AF455676
swMN00(H1N2) AF455678
swNC02(H1N1) EU139829
swIA01(H1N2) AF455679
huIA05(H1N1) DQ889689
swIA04(H1N1) EU139832
swThailand-RA20/09(H1N1) CY062284
swThailand-RA204/10(H1N1) CY062292
swRatchaburi00(H1N1) AB434288
swThai-CB918/09(H1N1)
swThai-K4/09(H1N2)
swThai-L2/09(H1N2)
swRatchaburi03(H1N1) AB434296
swOntario03(H1N1) DQ280195
swNE92(H1N1) L09063
swSaraburi05(H1N2) AB434336
swThai-ST3/09 (H1N1)
swRatchaburi08(H1N1) AB514936
swChonburi05(H1N1) EU296599
swChachoengsao05(H1N1) EU296601
huThailand05(H1N1) EF101749
swChonburi04(H1N1) AB434304
swChonburi04(H1N1) AB434312
swChonburi06(H1N1) EU296605
swChonburi05(H1N1) EU296603
swThai-CB1/06(H1N1)
swThai-HF6/05 (H1n1) FJ688266
swIA73(H1N1) EU139826
swWI69(H1N1) EU139825
swOH35(H1N1) CY027291
swIA30(H1N1) EU139823
swIA45(H1N1) EU139824
huThailand06(H1N1) EU021246
huThailand06(H1N1) EU021252
swOntario04(H1N2) DQ280236
swIL05(H1N1) FJ638298
swNC05(H1N1) FJ638306
huThailand06(H1N1) EU021264
swOH06(H1N1) EU409968
huNY03(H1N1) CY002808
huTX07(H1N1) CY028219
duckHong Kong79(H1N1) EF679199
swNetherlands85(H1N1) AF091317
swBelgium83(H1N1) AF091316
swFrance85(H1N1) CY037983
swBelgium98(H1N1) FJ805962
swCotes dArmor99(H1N1) AJ412712
0.05
Swine H1γ
Swine H1β
Swine H1α
Swine H1δ
Classical
Swine H1
Eurasian
Swine H1

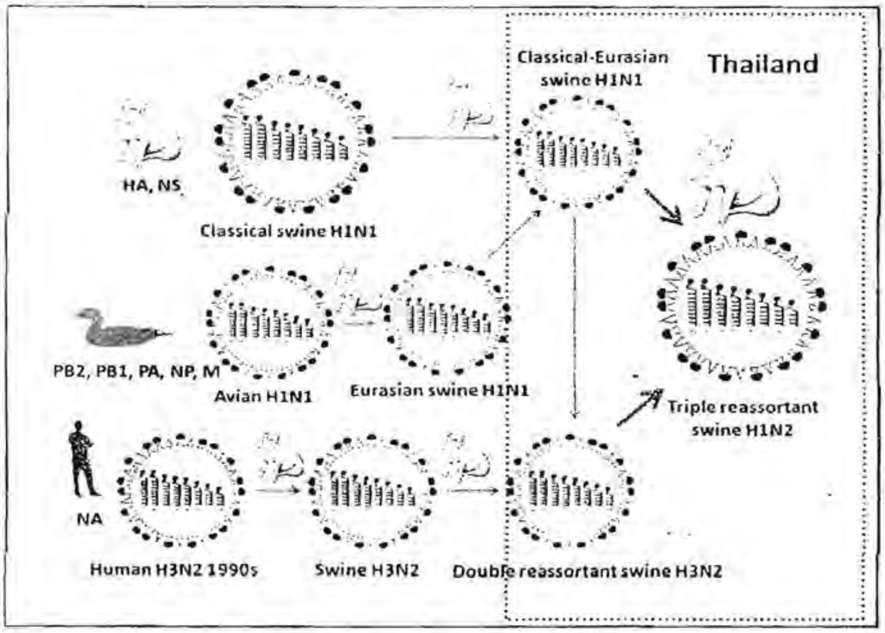
ภาพที่ 1 แผนภูมิต้นไม้ของยีน HA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1


◇ swChonburiCB1/05(H1N1) EU296604
◇ swThailand-HF6/05(H1N1) FJ688267
◇ swChonburiCB2/06(H1N1) EU296606
◇ swThai-CB1/06 (H1N1)
◇ swChonburi04(H1N1) AB434306
◇ swChonburi04(H1N1) AB434314
□ huThailand05(H1N1) EF101756
◇ swThai-SA43/10 (H1N1)
◇ swRatchaburi03(H1N1) AB434298
◇ swThai-CB918/09(H1N1)
◇ swRatchaburi00(H1N1) AB434290
◇ swThailand-RA20/09(H1N1) CY062286
◇ swThailand-RA204/10(H1N1) CY062294
◇ swChachoengsao05(H1N1) AB434330
◇ swChonburi05(H1N1) AB434322
◇ swRatchaburi08(H1N1) AB514941
◇ swThai-ST3/09 (H1N1)
huCalifomia09(H1N1)FJ966084
huMexico09(H1N1) FJ998214
□ huNonthaburi09(H1N1) CY039988
◇ swThai-M8.2/09 (H1N1)
◇ swThailand-RA29/09(H1N1) CY062302
◇ swThailand-RA4/09(H1N1) CY062310
◇ swThailand-RA9/09(H1N1) CY062326
◆ swThailand-RA75/10(H1N1) CY062318
◇ swThailand-RA114/10(H1N1) CY062270
◆ swThailand-RA15/10(H1N1) CY062278
swEngland92(H1N1) AF250366
swItaly95(H1N1)AJ410876
swFinistere84(H1N1) AJ412689
swBelgium83(H1N1)AJ412690
swLot82(H1N1)AJ412692
duckOhio86(H1N1)AF250358
mallard duck/ALB76(H1N1) CY004548
mallardAlberta98(H1N1) AY633214
mallard duck/ALB76(H1N1) CY005805
□ huThailand06(H1N1)EU021253
huYamagata08(H1N1)AB521091
huHanoi05(H1N1)AB285995
huHong Kong97(H1N1)EF584340
swHenan06(H1N1) EU004450
swTianjin04(H1N1) EU004442
huBrevig Mission18(H1N1)AF250356
swArizona77(H1N1) CY025004
swMinnesota75(H1N1) CY024935
swTennessee76(H1N1) CY022031
swAlberta03(H1N1) DQ280202
swWisconsin97(H1N1) DQ280259
swIowa88(H1N1) CY022972
swMaryland91(H1N1) CY022479
Eurasian swine N1
Pandemic H1N1
Avian N1
Human N1
North American swine N1
0.02
96
100
78
99
99
100
50
99
47
100
89
100
100
23
100
100
91
55
100
71
66
38
61
30
48
35
100
67
100
100
67
65
100
100
70
67
100
100
57
100
66
100
100
89
99
72

ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้ของยีน NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ N1


64
□ huThailand08(H3N2) AB501490
99
□ huThailand09(H3N2) GQ902827
100
□ huThailand06(H3N2) EU021285
96
□ huThailand07(H3N2) AB501506
99
huNew York99(H3N2) CY000603
swAlberta05(H3N2) DQ469968
57
100
huNew York03(H3N2) CY001023
swTexas08(H1N2) CY045585
85
swIowa99 (H3N2) AF251412
99
swMinnesota00(H1N2) AF455694
North American swine N2
100
100
◇ swThailand-KU5.1/04(H3N2) FJ561062
100
◇ swRatchaburi05(H3N2) EU296620
70
◇ swRatchaburi04(H3N2) AB434370
huNew York96(H3N2) CY009910
100
huChristchurch96(H3N2) EF584346
63
76
◇ swThai-L2/09(H1N2)
100
◆ swThai-K4/09(H1N2)
Human N2 1990s-2000s
100
◇ swChonburi05(H3N2) EU296622
99
◇ swThailand-S1/05(H3N2) FJ688269
100
◇ swNakhon pathom05(H3N2) EU296616
◇ swChachoengsao05(H3N2) EU296612
98
◇ swSaraburi05(H1N2) EU296608
swGermany00(H1N2) AM920738
81
100
100
swCotes dArmor98(H1N2) AJ412704
46
swItaly98(H1N2) AJ412701
98
swGermany02(H3N2) AM920743
100
swLohne97(H3N2) EF409254
100
swItaly96(H3N2) AJ293936
93
swGent84(H3N2) AJ293934
◇ swChachoengsao03(H3N2) AB434346
100
◇ swUdon Thani04(H3N2) AB434354
Eurasian swine N2
54
huEngland72(H3N2) CY009358
swHongKong76(H3N2) D00716
94
huTokyo72(H3N2) AY210135
83
huHong Kong74(H3N2) CY006909
93
huUdorn72(H3N2) CY009638
65
huMemphis72(H3N2) CY002746
Human N2 1970s
huEngland61(H2N2) AY209904
96
huEngland67(H2N2) AY209924
87
huPuertoRico68(H3N2) AY210115
Human N2 1960s
99
swHenan04(H9N2) DQ981596
100
duckShantou00(H9N2) AF523397
chickenHenan98(H9N2) DQ064424
100
chickenKorea04(H3N2) EU301287
85
duckNew York88(H5N2) CY014874
100
avianNew York06(H5N2) GQ117187
60
chickenCalifornia00(H6N2) EU182255
90
chickenNY98(H3N2) EU743197
Avian N2
0.02

ภาพที่ 3 แผนภูมิต้นไม้ของยีน NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ N2


Classical-Eurasian swine H1N1
Thailand
HA, NS
Classical swine H1N1
PB2, PB1, PA, NP, M
Avian H1N1
Eurasian swine H1N1
Triple reassortant swine H1N2
NA
Human H3N2 1990s
Swine H3N2
Double reassortant swine H3N2

ภาพที่ 4 สายวิวัฒนาการของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่พบในการศึกษาครั้งนี้

3.2.2 ตัวอย่างซีรัม

ตัวอย่างซีรัมมีจำนวนทั้งหมด 271 ตัวอย่าง ผลการตรวจด้วยวิธี HI พบให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N1(06) มากที่สุด รองลงมาคือ H1N1(09) H3N2(07) และ H3N2(05) (ตารางที่ 5) โดยเก็บตัวอย่างซีรัมในช่วงปลายปี พ.ศ. 2552 ถึง 2553 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ในมนุษย์เป็นวงกว้าง จากผลการตรวจพบซีรัมสุกรให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 สูงถึงร้อยละ 33.95 แสดงว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ได้ระบาดในสุกรในประเทศไทย และมีแนวโน้มที่จะพบการระบาดมากขึ้น จึงควรให้ความรู้แก่ผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับสุกร ในการปกป้องตนเองด้วยหลักสุขศาสตร์ส่วนบุคคลเพื่อป้องกันการติดเชื้อข้ามระหว่างสุกรกับมนุษย์ และควรฉีดวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่กรณีที่ต้องทำงานใกล้ชิดสุกรเพื่อลดโอกาสการติดเชื้อข้ามระหว่างสุกรกับมนุษย์ และช่วยลดโอกาสการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและทางซีรัมวิทยาของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากฟาร์มสุกรแห่งหนึ่งในจังหวัดราชบุรี พบการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 และ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทย จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงการติดเชื้อข้ามจากสุกรสู่มนุษย์ในฟาร์มแห่งนี้ ด้วยวิธี HI test พบผู้ที่ทำงานใกล้ชิดสุกรมีโอกาสติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จากสุกรมากกว่าคนที่ไม่เคยมีประวัติสัมผัสสุกรเลย ถึงร้อยละ 42.68 (ตีพิมพ์ใน Veterinary Microbiology ดังที่แนบในภาคผนวก) จึงควรให้ความรู้และมีมาตรการในการควบคุมการติดเชื้อข้ามจากสุกรสู่มนุษย์ เพื่อลดโอกาสการระบาดและการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนตัวอย่างซีรัมและผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ด้วยวิธี Hemagglutination-inhibition (HI)

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	**H1N1(06)†**		**H1N1(09)††**		**H3N2(05)‡**		**H3N2(07)‡‡**	
		ผลบวก*	%	ผลบวก	%	ผลบวก	%	ผลบวก	%
ราชบุรี	76	62/76	81.56	31/76	40.79	0/76	0	14/76	18.42
ชลบุรี	75	75/75	100	7/75	9.33	0/75	0	1/75	1.33
ฉะเชิงเทรา	120	75/120	62.5	54/120	45	0/40	0	12/120	10
รวม	271	212/271	78.23	92/271	33.95	0/271	0	27/271	9.96

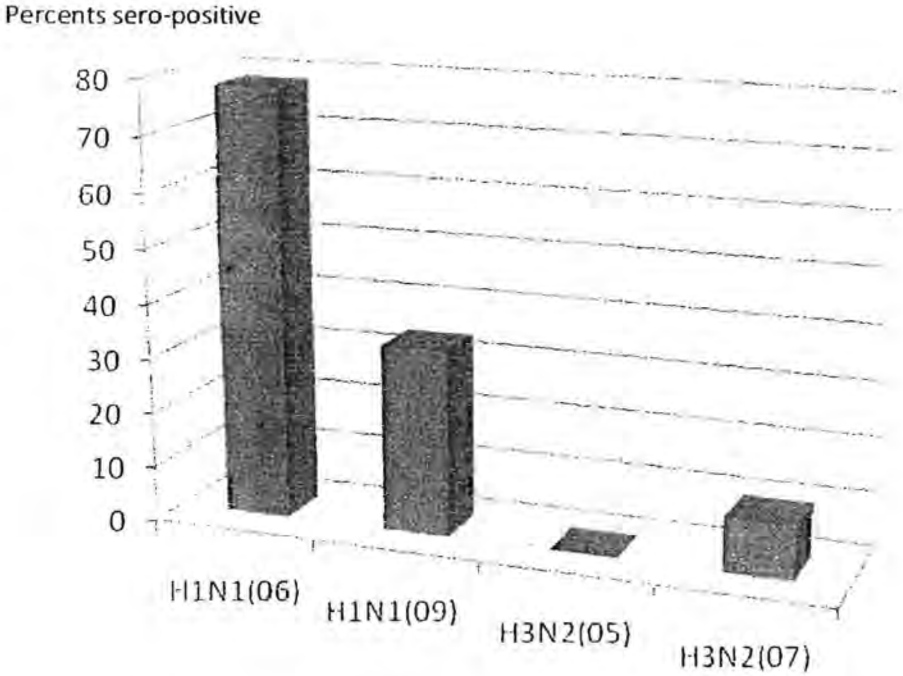
H1N1(06) † = เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์ม A จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ .2006

H1N1(09) †† = pandemic H1N1 2009 เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์ม C จังหวัดราชบุรีในปีค.ศ .2009

H3N2(05)‡ = เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์ม A จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ .2005

H3N2(07)‡‡ = เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์มA จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ .2007

ผลบวก* = HI ไตเตอร์ ≥ 40



ภาพที่ 5 ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ที่แยกได้ในปีต่างๆ ด้วยวิธี Hemagglutination-inhibition (HI) โดย

H1N1(06) = เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์ม A จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ .2006

H1N1(09) = pandemic H1N1 2009 เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์ม C จังหวัดราชบุรีในปีค.ศ .2009

H3N2(05) = เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์ม A จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ .2005

H3N2(07) = เพาะแยกได้จากสุกรในฟาร์มA จังหวัดชลบุรีในปีค.ศ .2007

3.3 สรุปผลของการวิจัย

เก็บตัวอย่างป้ายจมูกหรือปอดจากสุกรจำนวน 4 ฟาร์ม และตัวอย่างซีรัมสุกรจำนวน 6 ฟาร์ม ได้ตัวอย่างป้ายจมูกและปอดจำนวนทั้งหมด 143 ตัวอย่าง มีตัวอย่างป้ายจมูกจำนวน 134 ตัวอย่าง และตัวอย่างปอดจำนวน 9 ตัวอย่าง จากการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค RT-PCR พบให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ จำนวน 14 ตัวอย่าง และสามารถเพาะแยกไวรัสในไข่ไก่ฟักและ/หรือเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ได้ 7 ตัวอย่าง จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมพบตัวอย่างไวรัสที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรีจำนวน 6 ตัวอย่าง คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ pandemic H1N1 2009 ส่วนอีก 1 ตัวอย่างแยกได้จากจังหวัดชลบุรีพบให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 จากการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทป์ พบมาจากการผสมกันของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ที่มีอยู่แล้วในประเทศไทย กับไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมพบมีความหลากหลายมากขึ้น โดยพบการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ pandemic H1N1 2009 และไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรลูกผสมสายพันธุ์ H1N2 ในสุกร นอกเหนือจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ที่เคยระบาดอยู่แล้วในประเทศไทย ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่พบการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic H1N1 2009 แต่พบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรลูกผสมสายพันธุ์ H1N2 ที่มีรูปแบบการผสมกันคล้ายกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ pandemic H1N1 2009 คือมีการผสมกันของยีนที่มาจากทั้งสุกร สัตว์ปีก และมนุษย์ ซึ่งยังไม่มีข้อมูลยืนยันถึงศักยภาพของการก่อโรค การระบาด หรือการติดข้ามชนิดสัตว์ของไวรัสลูกผสม H1N2 นี้

การสำรวจทางซีรัมวิทยา จากตัวอย่างซีรัมสุกรจำนวนทั้งหมด 271 ตัวอย่าง ในช่วงปลายปี พ.ศ. 2552 ถึง 2553 พบให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1(06) มากที่สุด รองลงมาคือ H1N1(09) H3N2(07) และ H3N2(05) แสดงว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ที่มีบทบาทในการระบาดในประเทศไทยคือ H1N1 และมีแนวโน้มว่า ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 จะระบาดในฝูงสุกรในประเทศไทยเพิ่มขึ้น ในขณะที่ไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ที่เคยระบาดในปี พ.ศ. 2548 ตรวจไม่พบเลยในปัจจุบัน และไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2550 ซึ่งมีพันธุกรรมแตกต่างกัน พบการระบาดในระดับที่ต่ำลง (ประมาณร้อยละ 10) การสำรวจทางซีรัมวิทยาทั้งสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 จะทำให้ทราบถึงสถานะการติดเชื้อไวรัสที่แท้จริงในฝูง เนื่องจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรมีระยะในการแพร่เชื้อทางการหายใจในระยะสั้นประมาณ 3-5 วัน

เท่านั้น จึงทำให้การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจทางไวรัสวิทยาค่อนข้างลำบาก การตรวจทางซีรัมวิทยาโดยวิธี HI test ต้องใช้ไวรัสแอนติเจนที่ระบาดในท้องถิ่นหรือเป็นไวรัสแอนติเจนที่มีภูมิคุ้มกันข้ามกัน จึงควรมีการทวนสอบการใช้ไวรัสแอนติเจนอย่างสม่ำเสมอ หรือควรพัฒนาวิธีที่ตรวจได้รวดเร็วและง่ายกว่า HI test เพื่อการวินิจฉัยที่รวดเร็วจะช่วยในการป้องกันและควบคุมโรคได้ดี อีกทั้งผู้ที่ทำงานใกล้ชิดสุกรมีโอกาสติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จากสุกรมากกว่าคนที่ไม่เคยมีประวัติสัมผัสสุกรเลย ถึงร้อยละ 42.68 จึงควรให้ความรู้และมีมาตรการในการควบคุมการติดเชื้อข้ามจากสุกรสู่มนุษย์ เพื่อลดโอกาสการระบาดและการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

4. วิจารณ์

(Discussion)

จากผลการตรวจพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ pandemic H1N1 2009 จากสุกรในฟาร์มแห่งหนึ่งที่จังหวัดราชบุรี ซึ่งเคยตรวจพบมาก่อนหน้านี้แล้วเมื่อปลายเดือนพฤษจิกายน พ.ศ. 2552 แสดงว่า ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic H1N1 2009 ที่ระบาดในคนปี 2009 นั้นสามารถติดต่อวนเวียนในสุกรได้อย่างน้อยเป็นเวลา 6 เดือน โดยพบสุกรหลังหย่านมแสดงอาการเพียงตาอักเสบบวมและไอเล็กน้อยเท่านั้น ในช่วงแรกเมื่อปลายเดือนพฤษจิกายน พ.ศ. 2552 พบอัตราการป่วยสูงประมาณร้อยละ 50 ในสุกรหย่านม ต่อมาอัตราป่วยลดลงจนถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 เหลือประมาณร้อยละ 10-20 เท่านั้น ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าสุกรช่วงหลังหย่านมมีความไวรับต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ดังที่เคยมีการรายงานมาแล้ว[8,9]

จากผลการสำรวจทั้งทางไวรัสวิทยาและซีรัมวิทยาครั้งนี้ พบการกระจายของไวรัสสายพันธุ์ H1N1 สูง แต่พบไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ต่ำ นอกจากนี้ยังพบการกระจายของไวรัสสายพันธุ์ pandemic H1N1 2009 ในสุกรซึ่งมีแนวโน้มมากขึ้น ถึงแม้ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจะไม่ก่อโรครุนแรงในสุกร แต่ควรมีการเฝ้าระวังการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ในฟาร์มสุกร เพราะการกลายพันธุ์ของไวรัสและการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมสามารถเกิดขึ้นได้ในตัวสุกร เพื่อเป็นการป้องกันและควมคุมการเกิดโรคทั้งในสุกรและการติดต่อของเชื้อข้ามมาสู่คนด้วย จึงควรให้ความรู้แก่ผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับสุกร ในการปกป้องตนเองด้วยหลักสุขศาสตร์ส่วนบุคคลเพื่อป้องกันการติดเชื้อข้ามระหว่างสุกรกับมนุษย์ และควรฉีดวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่กรณีที่ต้องทำงานใกล้ชิดสุกรเพื่อลดโอกาสการติดเชื้อข้ามระหว่างสุกรกับมนุษย์ และช่วยลดโอกาสการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้

ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยมีความหลากหลายมากขึ้น ถึงแม้จากการศึกษาในครั้งนี้ ยังไม่พบการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ pandemic H1N1 2009 แต่การตรวจพบไวรัสลูกผสมสายพันธุ์ H1N2 ซึ่งบ่งชี้ถึงโอกาสการเกิดการผสมกันของไวรัสในสุกรในประเทศไทยได้ จึงควรเฝ้าระวังและสำรวจทั้งทางไวรัสวิทยา ซีรัมวิทยา และลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง เพื่อป้องกันและควบคุมการระบาดของไวรัสทั้งในสุกรและการติดเชื้อสู่มนุษย์ด้วย

บรรณานุกรม

(Bibliography)

1. Global Health Statistic. Geneva: WHO; 2008.
2. Basic Statistics. Asian Development Bank; 2008. Available from: www.adb.org/statistics/pdf/basic-statistics-2008.pdf [accessed on June 2009].
3. *Health Situation in South-East Asia Region. WHO Regional Office for South-East Asia; 1998-*2000, Annex 8; fig 26.
4. 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.
5. Choi, Y.K., Goyal, S.M., Kang, S.W., Farnham, M.W., Joo, H.S., 2002, Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. J Virol Methods 102, 53-59.
6. Sreta, D., Tantawet, S., Na Ayudhya, S.N., Thontiravong, A., Wongphatcharachai, M., Lapkuntod, J., Bunpapong, N., Tuanudom, R., Suradhat, S., Vimolket, L., Poovorawan, Y., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Kitikoon, P., 2010, Pandemic (H1N1) 2009 Virus on Commercial Swine Farm, Thailand. Emerg Infect Dis 16, 1587-1590.
7. Cheung, T.K., Poon, L.L., 2007, Biology of influenza a virus. Ann N Y Acad Sci 1102, 1-25.
8. Brookes, S.M., Nunez, A., Choudhury, B., Matrosovich, M., Essen, S.C., Clifford, D., Slomka, M.J., Kuntz-Simon, G., Garcon, F., Nash, B., Hanna, A., Heegaard, P.M., Queguiner, S., Chiapponi, C., Bublot, M., Garcia, J.M., Gardner, R., Foni, E., Loeffen, W., Larsen, L., Van Reeth, K., Banks, J., Irvine, R.M., Brown, I.H., 2010, Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non-immune pigs. PLoS One 5, e9068.

9. Sreta, D., Kedkovid, R., Tuamsang, S., Kitikoon, P., Thanawongnuwech, R., 2009, Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. Virol J 6, 34.

ภาคผนวก

(Appendix)

Poster presentation

1. Sreta D., Makhanon M., Nuntawan NA S., Charoenvisal N., Kitikoon P. and Thanawongnuwech R. 2010. Existence of reassortant H1N2 swine influenza viruses isolated in eastern part of Thailand. the 21st IPVS Congress, Proceeding, 2010 July 18-21, Canada. 564.
2. Sreta D., Kedkovid R., Jittimanee S., Musiksilp N., Tuanudom R., Thanawongnuwech R. and Kitikoon P. Serological study of H1 and H3 swine influenza viruses from pigs in the high pig population provinces in Thailand. the 21st IPVS Congress, Proceeding, 2010 July 18-21, Canada. 567.
3. Sreta D. and Thanawongnuwech R. SIV in Thailand (101-113). International Conference on Global Issues Influencing Human and Animal Health for ASEAN, One Health Concept. June 9-10, 2011. KhonKan University, KhonKan, Thailand. (Invited speaker).

Publication

1. Sreta, D., Tantawet, S., Na Ayudhya, S.N., Thontiravong, A., Wongphatcharachai, M., Lapkuntod, J., Bunpapong, N., Tuanudom, R., Suradhat, S., Vimolket, L., Poovorawan, Y., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Kitikoon, P., 2010, Pandemic (H1N1) 2009 Virus on Commercial Swine Farm, Thailand. Emerg Infect Dis 16, 1587-1590.
2. Kitikoon, P., Sreta, D., Tuanudom, R., Amonsin, A., Suradhat, S., Oraveerakul, K., Poovorawan, Y., Thanawongnuwech, R., 2010.Serological evidence of pig-to-human influenza virus transmission on Thai swine farms. Veterinary Microbiology. 148, 413-418.

ประวัตินักวิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นาย รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Roongroje Thanawongnuwech

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3 2103 00731 70 4

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** ศาสตราจารย์ A2

4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

   ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ถ. อังรีดูนังต์ เขต ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 0-2218-9620, 02-218-9621 โทรสาร 0-2252-0779

   e-mail: Roongroje.T@chula.ac.th

5. **ประวัติการศึกษา**

ปริญญา	ปีที่จบ	สถานที่
สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1 เหรียญรางวัล)	2532	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
MSc (Veterinary Pathology)	2537	Iowa State University, Ames, Iowa
PhD (Veterinary Pathology)	2541	Iowa State University, Ames, Iowa

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**

พยาธิวิทยา ไวรัสวิทยา และ วิทยาภูมิคุ้มกันโรคสุกร

7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ**

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย:

7.1.1 **R. Thanawongnuwech**: Study on genetic variation and phylogenetic relationships of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in Thailand. The Thailand Research Fund # PDF/27/2544, 2001-2003. 400,000 B.

1.1.2 R. **Thanawongnuwech,** S. Kesdangsakonwut, and I. Kramomtong. Efficacy of a subunit APP vaccine (PLEUROSTAR$^{\text{TM}}$4): A field trial in Thailand. Novartis (Thailand) 2001-2002. 412,500 B.

7.1.3 **R. Thanawongnuwech** and S. Suradhat: Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. The Rachadapiseksompoch Endowment Fund, Chulalongkorn University 2002-2003. 339,000 B.

7.1.4 **R. Thanawongnuwech,** A. Tatsanakit and P. Wongyanin. Development of ELISA test kits for detecting antibodies of swine respiratory diseases. 2004-2005. National Research Council of Thailand. 1,800,000 B.

7.1.5 **R. Thanawongnuwech,** T. Lekdumrongsak and R.Tantilertcharoen. Surveillance of important epidemic diseases in avian species in Thailand. 2004-2005. National Bureau of Agricultural and Food Standards. 1,500,000 B.

7.1.6 **R. Thanawongnuwech** and S. Chungpiwat. Study on potential vectors of PRRSV in mosquitoes from a PRRSV-positive swine farm in Nakorn Pathom Province. 2004-2005. The Rachadapiseksompoch Endowment Fund, Chulalongkorn University. 323,000 B.

7.1.7 **R. Thanawongnuwech**, S. Kesdaengsakonwut and T. Paphavasithi. Efficacy of Josamycin (ALPLUCINE premix) in decreasing the severity of porcine respiratory disease complex associated with *M. hyopneumoniae*: A field trial.2005-2006. Virbac ASIA RDL Centre, Vietnam. 792,480 B.

7.1.8 **R. Thanawongnuwech**, P. Wongyanin, T. Thaiwong and A. Tatsanakit. Development of ELISA test kits for detecting antibodies of swine respiratory diseases. 2005-2007. National Research Council of Thailand. 2,500,000 B.

7.1.9 **R. Thanawongnuwech**, K. Tienkum, and T. Paphawasithi. Efficacy of Suvaxyn PCV II vaccine (inactivated): A field trial in Thailand. 2007-2008. Fort Dodge Animal Health Thailand. 840,360 B.

7.1.10 **R. Thanawongnuwech.** Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 and H3N2 in weanling pigs in Thailand. 2007-2008. The Rachadapiseksompoch Endowment Fund, Chulalongkorn University 330,000 B.

7.1.11 **R. Thanawongnuwech**, W. Leelamanit and W. Wanasawaeng. Monoclonal antibodies production for avian influenza H5N1 diagnosis. 2007-2008. National Research Council of Thailand. 1,500,000 B.

7.1.12 **R. Thanawongnuwech** and A. Suriyasomboon. Effect of iron supplement on weaning pigs performance. 2008-2008. Zinpro Animal Nutrition (Thailand) Inc. 474,210 B.

7.1.13 International Cooperative Zoonotic Influenza Rasearch Center, **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**: Studies at the Human-Animal Interface. **University of Minnesota Center of Excellence for Influenza Research & Surveillance, Subcontract as of: 5/4/07 Contributions to the NIAID Pandemic Public Health Research Response Plan**

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ย้อนหลัง 5 ปี):

7.2.6.1 **Thanawongnuwech, R.,** Amonsin, A., Tantilertcharoen, R., Damrongwatanapokin, S., Theamboonlers, A., Payungporn, S., Nanthapornphiphat, K., Ratanamungklanon, S., Tunak, E., Songserm, T., Vivatthanavanich, V., Lekdumrongsak, T., Kesdangsakonwut, S., Tunhikorn, S., Poovorawan, Y. 2005. Probable tiger-to-tiger transmission of Avian influenza H5N1. Emerg. Infect. Dis. 11(5):699-701.

7.2.6.2 Amonsin, A., Payungporn, S., Theamboonlers, A., **Thanawongnuwech, R.**, Suradhat, S., Pariyothorn, N., Tantilertcharoen, R., Damrongwantanapokin, S., Buranathai, C., Chaisingh, A., Songserm, T., Poovorawan, Y. 2006. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. Virology 344(2):480-491.

7.2.6.3 Suradhat, S., Kesdangsakonwut, S., Sada, W., Buranapraditkun, S., Wongsawang, S., **Thanawongnuwech, R.** 2006. Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine. Vaccine 24(14): 2634-2642.

7.2.6.4 Amonsin, A., Chutinimitkul, S., Pariyothorn, N., Songserm, T., Damrongwantanapokin, S., Puranaveja, S., Jam-On, R., Sae-Heng, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Chaisingh, A., Tantilertcharoen, R., Suradhat, S., **Thanawongnuwech, R.**, Poovorawan, Y. 2006. Genetic characterization of influenza A viruses (H5N1) isolated from 3rd wave of Thailand AI outbreaks. Virus Res. 122(1-2):194-199.

7.2.6.5 Pringproa, K., Chungpivat, S., Panyathong, R., **Thanawongnuwech, R.** 2006. *Culex tritaeniorhynchus* is unlikely to be a vector for the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Thai J. Vet. Med. 36(4):21-31.

7.2.6.6 Songserm, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Chutinimitkul, S., **Thanawongnuwech, R.**, Poovorawan, Y. 2006. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. Emerg. Infect. Dis. 12(11):1744-1747.

7.2.6.7 Panyathong, R., Sada, W., Pringproa, K., Kesdaengsakonwut, S., Lacharoje, S., Suradhat, S., **Thanawongnuwech, R.** 2007. Efficacy of an attenuated PRRSV vaccine of the EU genotype in weanling pigs. Chiang Mai Vet. J. 5(1):29-49.

7.2.6.8 Somwongin, W., Tummaruk, P., Nilubon, D., Lacharoje, S., **Thanawongnuwech, R.** 2007. Efficacy of a live PRRSV vaccine of the US genotype in a PRRSV positive sow herd. Chiang Mai Vet. J. 5(1):51-70.

7.2.6.9 Suradhat, S., Damrongwatanapokin, S., **Thanawongnuwech, R.** 2007. Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas. Vet. Microbiol. 119(1):1-9.

7.2.6.10 Chutinimitkul, S., Thippamom, N., Damrongwatanapokin, S., Payungporn, S., **Thanawongnuwech, R.**, Amonsin, A., Boonsuk, P., Sreta, D., Bunpong, N., Tantilertcharoen, R., Chamnanpood, P., Parchariyanon, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2008. Genetic characterization of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza virus in Thailand. Arch. Virol. 153(6):1049-1056.

7.2.6.11 Amonsin, A., Choatrakol, C., Lapkuntod, J., Tantilertcharoen, R., **Thanawongnuwech, R.**, Suradhat, S., Suwannakarn, K., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2008. Influenza virus (H5N1) in live bird markets and food markets, Thailand. Emerg. Infect. Dis. 14(11): 1739-42.

7.2.6.12 Sreta, D., Kedkovid, R., Tuamsang, S., Kitikoon, P. and **Thanawongnuwech, R.** 2009. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. Virol. J. 6:34.

7.2.6.13 Puranaveja, S., Poolperm, P., Lertwatcharasarakul, P., Kesdaengsakonwut, S., Boonsoongnern, A., Urairong, K., Kitikoon, P., Choojai, P., Kedkovid, R., Teankum, K. and **Thanawongnuwech, R.** 2009. Chinese-like Strain of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV), Thailand. Emerg. Infect. Dis. 15(7): 1112-1115.

7.2.6.14 Amonsin, A., Kedkovid, R., Puranaveja, S., Wongyanin, P., Suradhat, S., and **Thanawongnuwech, R.** 2009. Comparative analysis of complete nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Thailand (US and EU genotypes). Virol. J. 6:143.

7.2.6.15 Wanasawaeng, W., Bunpapong, N., Leelamanit, W., and **Thanawongnuwech, R.** 2009. Growth characteristics of the H5N1 avian influenza virus in chicken embryonic eggs and MDCK cells. Thai J. Vet. Med. 39(3):281-286.

7.2.6.16 Wongyanin, P., Buranapraditkun, S., Chokeshai-usaha, , K., **Thanawonguwech, R.** and Suradhat, S. 2010. Induction of inducible $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulatory T lymphocytes by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet. Immuno. Immunopathol. 131(2-4):170-182.

7.2.6.17 Thippamom, N., Sreta, D., Kitikoon, P., **Thanawongnuwech, R.**, Poovorawan, Y., Theamboonlers, A., Suwannakarn, K., Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, S. and

Amonsin, A. 2010. Genetic variations of nucleoprotein gene of influenza A viruses isolated from swine in Thailand. Virol. J. Aug 9;7:185.

7.2.6.18 Amonsin, A., Lapkuntod, J., Suwannakarn, K., Kitikoon, P., Suradhat, S., Tantilertcharoen, R., Boonyapisitsopa, S., Bunpapong, N., Wongphatcharachai, M., Wisedchanwet, T., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., Sasipreeyajan, J. and **Thanawongnuwech, R.** 2010. Genetic characterization of 2008 reassortant influenza A virus (H5N1), Thailand. Virol. J. Sep 16;7(1):233.

7.2.6.19 **Thanawongnuwech, R.** and Suradhat, S. 2010. Taming PRRSV: Revisiting the control strategies and vaccine design. Virus Res. 154:133-140.

7.2.6.20 Sreta, D., Tantawet, S., Nuntawan Na Ayudhya, S., Thontiravong, A., Wongphatcharachai, M., Tantilertcharoen, R., Bunpapong, N., Boonyapisitsopa, S., Tuanudom, R., Amonsin, A., **Thanawongnuwech, R.**, Suradhat, S., Poovorawan, Y., and Kitikoon, P. 2010. Pandemic (H1N1) 2009 virus in a commercial swine farm in Thailand. Emerg. Infect. Dis. 16 (10):1587-90.

7.2.6.21 Olanratmanee, E., Wangnaitham, S., **Thanawongnuwech, R.**, Kunavongkrit, A. and Tummaruk, P. 2010. Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen positive uterine tissues in gilts culled due to reproductive disturbance in Thailand. Trop. Anim. Health Pro. 43 (2):451-457.

7.2.6.22 Kedkovid, R., Nuntawan Na Ayudhya, S., Amonsin, A., and **Thanawongnuwech, R.** 2010. NSP2 gene variation of the North American genotype of the Thai PRRSV in central Thailand. Virol. J. 7:340.

7.2.6.23 Kitikoon, P., Sreta, D., Tuanudom, R., Amonsin, A., Suradhat, S., Oraveerakul, K., Poovorawan, Y. and **Thanawongnuwech, R.** 2011. Serological evidence of pig-to-human influenza virus transmission on Thai swine. Vet. Microbiol. 148(2-4):413-418.

7.2.6.24 Kitikoon, P., Sreta, D., Nuntawan Na Ayudhya, S., Wongphatcharachai, M., Lapkuntod, J., Prakairungnamthip, D., Bunpapong, N., Suradhat, S., **Thanawongnuwech, R.**, and Amonsin, A. 2011. Brief report: molecular characterization of a novel reassorted pandemic H1N1 2009 in Thai pigs. Virus Genes 43(1):1-5.

7.2.6.25 Tun, H.M., Shi, M., Wong, C. LY., Nantawan Na Ayudhya, S., Amonsin, A., **Thanawonguwech, R**. and Leung, F. CC. 2011. Genetic diversity and multiple introductions of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in Thailand Virol. J., 8:164.

7.2.6.26 Duy, D. T., Toan, N.T., Puranaveja, S. and **Thanawongnuwech, R.** 2011. Genetic Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Isolates from Southern Vietnam during 2009-2010 Outbreak. Thai J. Vet. Med., 41(1):55-64.

7.2.6.27 Jittimanee, S., Nuntawan Na Ayudhya, S., Kedkovid, R., Teankum, K., **Thanawongnuwech, R.** 2011. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 in Thai pigs with porcine circovirus associated diseases (PCVAD) during 2007–2010. Thai J. Vet. Med., 41(2):163-169.

P.258

Existence of reassortant H1N2 swine influenza viruses isolated in eastern part of Thailand

Donruethai Sreta[1] Metta Makhanon[2] Suparlark Nuntawan Na Ayudhya[1]
Nataya Charoenvisal[1] Pravina Kitikoon [1] Roongroje Thanawongnuwech[1]
1. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; 2. Novartis (Thailand) Ltd, Bangkok, Thailand

Introduction

Swine influenza virus (SIV) subtypes H1N1, H1N2 and H3N2 are well established in the pig population worldwide. Since 1999, the H1N2 subtype has emerged and caused abortion storms in pregnant sows in the U.S. swine farms (1). In Thailand, H1N2 SIV was first isolated in the non-clinical swine farms in Saraburi province located in the central part in 2005 (2). It was not until 2009 that we found the H1N2 SIV associated with severe respiratory distress in two pig farms in the eastern part of Thailand. The objective of this study was to characterize the major envelope glycoprotein genes, HA and NA of the re-emerging Thai H1N2 SIV.

Materials and Methods

Two separate pig farms in Chacheongsoa province located in the eastern part of Thailand, faced with respiratory problems in the nursery to early grower pigs (4-12 wk). The morbidity rate was over 50% and mortality rate was approximately 10-20 %. Fresh 6 lung tissues were submitted to the Chulalongkorn University-Veterinary Diagnostic Laboratory. Lungs were diagnosed of PRRSV, PCV2 and SIV by PCR. SIV subtyping and characterization of HA and NA gene were performed (1).

Both SIV isolates designated as A/Swine/Thailand/CU-K4/09 (H1N2) and A/Swine/Thailand/CU-CHL2/09 (H1N2) were characterized.

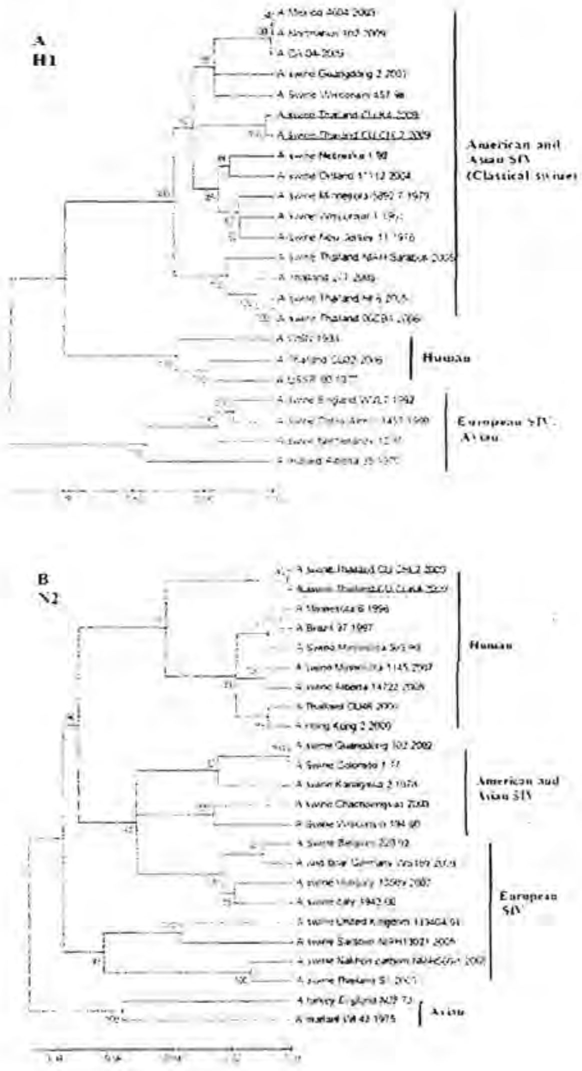
Results

The nucleotide homology of the HA and NA genes of the two current H1N2 virus compared to the first Thai swine H1N2 isolated in 2005 (H1N2/2005) are 87.5-88.2% and 82.3-82.6%, respectively. HA genes of both 2009 isolates belonged to classic swine lineage similar to the H1N2/2005 but located in different clusters. The NA gene of both 2009 H1N2 belonged to the human-like SIV similar to the H1N2/2005 but also located in different clusters.

Discussion

Previous data indicated that the Thai H1N1 and H3N2 subtypes were separated into 2 clusters (a and b) (2). The Thai H1N2 SIV reported in 2005 contained a combination of H1N1 (H1-classical swine (Cl) b) and H3N2 (N2-human (H) b). The origin of the N2 of both 2009 H1N2 viruses in this study appeared to be similar to the human-like in cluster a (Ha) closely related to the Thai human influenza viruses. Characterization of the internal genes is pending. No pathogenesis or epidemiological data was done with the 2005 H1N2 SIV.

Fig. 1: *Phylograms of HA gene (A) and NA gene (B) of SIV H1N2. Both 2009 H1N2 isolates were associated with the severe respiratory signs in pigs. This study demonstrates the presence and on-going diversity of the H1N2 SIV in the Thai swine population. The study also highlights the importance of SIV as a contributor to PRDC which remains as a major problem in the Thai pig industry*



References

1. Karasin et al. 2002. J. Clin. Microbiol. 40 (3):1073-1079.
2. Takemae et al. 2008. Influenza Other. Respi. Viruses. 2(5):181-189.

P.261

Serological study of H1 and H3 swine influenza viruses from pigs in the high pig population provinces in Thailand

Donruethai Sreta[1] Roongtham Kedkovid[1] Supatta Jittimanee[1] Nantasak Musiksilp[2]
Ranida Tuanudom[1] Roongroje Thanawongnuwech[1] Pravina Kitikoon[1]
1. Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; 2. Veterinary Research and Development Center (Western region), Ratchaburi, Thailand

Introduction and objective

Swine influenza virus (SIV) causes an acute respiratory disease in pigs that occasionally can be transmitted to human. It is one of the major viral pathogen that contributes to porcine respiratory disease complex (PRDC) (1). In Thailand H1N1, H3N2 and H1N2 SIV has been reported in the pig population. SIV-infected pigs shed virus for a short period. Therefore serological tests have been used as an indirect method to study SIV epidemiology in the Thai swine population. However the most updated SIV seroprevalence data was reported since 2005 (2). Previous genetic data characterized Thai SIV H1 subtype into classical swine lineage which is subgrouped into two clusters; classical swine cluster a (Cla) and b (Clb). Thai H1 Cla and Clb were thought to have derived from a hypothetical Classical swine H1N1 common ancestor in 1981 and 1990, respectively. The Thai SIV H3 subtype belonged to human lineage and can be subgrouped into two clusters; human cluster a (Ha) and b (Hb). Thai H3 Ha SIVs were closely related to Thai human H3N2 virus isolated in 1997 while Thai H3 Hb SIVs were closely related to human-like H3N2 virus circulating in the early 1970s (3). This study, we provide an update data

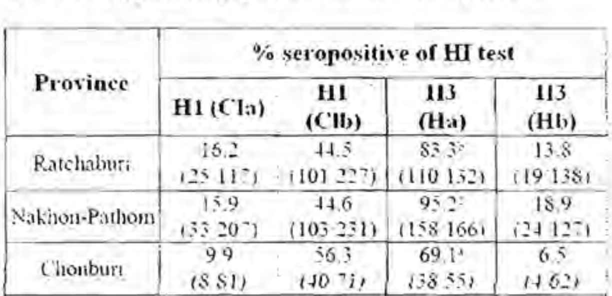
of the SIV seroprevalence based on both clusters of H1 and H3 SIV in pigs from the high pig population provinces in Thailand during June 2008 to May 2009. Materials and methodDuring June 2008 to 2009, 850 pig sera were collected from pigs of various age in the four provinces that have the highest density of pigs in Thailand. Those provinces include, Ratchaburi, Nakhon-Pathom, Chonburi and Chachoengsao. A standard hemagglutination-inhibition (HI) assay was used to evaluate the antibody titer against Thai H1 and H3 SIV. HI test was performed, according to WHO (4). All sera subjected to test with H3 virus were treated with receptor-destroying enzyme (RDE) and adsorbed with 50% chicken red blood (RBC) cells to remove non-specific inhibitors of agglutination and natural serum agglutinins. Sera subjected to test with H1 SIV were absorbed with 50% RBC without RDE treatment. Positive SI was considered when HI titer was ≥ 40. Virus antigen used for HI tests were H1N1 Cla and Clb and H3N2 Ha and Hb (3).

Results and discussion

Table 1 shows the percentage of pigs with positive antibody to H1 and H3 SIV in each province. It was demonstrated that pigs in all provinces were antibody positive to both H1 and H3 SIV. However, overall the percentage of positive pigs to H3 Ha was significantly higher than H3 Hb ($p<0.01$). There were geographical differences of seropositive pigs to different clusters of H3. Pigs that were seropositive to H3 Ha in Nakorn-Pathom was significantly higher than Chonburi and Chachoengsao ($p<0.01$). The percentage of seropositive pigs to H1N1 SIV was indifferent between each province. However, percentage of seropositive pigs to H1 Clb was significantly higher than Cla ($p<0.01$). The findings indicated that Thai SIV currently circulating in Thai pig populations are diverse antigenically. The data highlights the importance of updating SIV test antigen used in serological test for diagnostic purposes.

Table 1 *Seropositive pigs to H1 and H3 SIV by HI test*

Table 1 Seropositive pigs to H1 and H3 SIV by HI test



Province	% seropositive of HI test			
	H1 (Cla)	H1 (Clb)	H3 (Ha)	H3 (Hb)
Ratchaburi	16.2 (25/117)	44.5 (101/227)	83.3^{a} (110/132)	13.8 (19/138)
Nakhon-Pathom	15.9 (33/207)	44.6 (103/231)	95.2^{a} (158/166)	18.9 (24/127)
Chonburi	9.9 (8/81)	56.3 (40/71)	69.1^{b} (38/55)	6.5 (4/62)
Chachoengsao	21.9 (61/278)	56.9 (173/304)	79.8^{ab} (67/84)	24.1 (14/58)
Total	18.6 (127/683)	50.1 (417/833)	85.4 (373/437)	15.8 (61/385)

References

1. Easterday, B.C. and Van Reeth, K. 1999. Swine influenza. In Straw et al(eds), Diseases of Swine, 8th ed, Iowa State Press, Ames, p. 277-290.
2. Damrongwatanapokin et al. 2006. The 19th IPVS Congress. Proceeding, Copenhagen, Denmark. 2:09-16.
3. Takemae et al. 2008. Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. Influenza Other. Respi. Viruses. 2(5):181-189.
4. Webster et al, 2002. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. World Health Organization, 15-67.

Swine influenza in Thailand

Donruethai Sreta[1] and Roongroje Thanawongnuwech[2]*

[1]Faculty of Veterinary Medicine, Rajamankala University of Technology Tawan-Ok,
Chonburi 20110, Thailand.

[2]Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri-Dunant
Rd., Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand.

**Corresponding author*

General Introduction of Swine Influenza Virus (SIV)

Swine influenza virus (SIV) was first recognized in 1918 coinciding with an influenza pandemic in human worldwide known as 'Spanish flu' (Vincent et al., 2008). However, the etiology in pigs was identified as classical H1N1 SIV in 1930 (Olsen, 2002a). SIV is a member of Orthomyxoviridae group A influenza viruses and SIV subtypes based on the antigenicity of two surface glycoproteins; hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Currently, sixteen of HA (H1-H16) and nine of NA (N1-N9) have been identified (Fouchier, 2005; Slemons, 2002). Three major subtypes of SIV establish in pigs population worldwide are classical and reassortant viruses of H1N1, H3N2 and H1N2. However, other subtypes of influenza A virus such as H5N2, H2N3, H1N7, H3N3, H4N6, H3N1 and H9N2 have been reported in pigs (Cong et al., 2008; Lee et al., 2009; Lekcharoensuk et al., 2006; Ma et al., 2007; Shin et al., 2006).

SIV is a major endemic swine respiratory disease causing economic loss in the swine industry worldwide. Mostly, the prevalence is seasonally high in late fall and early winter months in the cold countries. Epidemics or pandemics of SIV may occur from many factors such as the presence of immunologically na_ve population, poor husbandry and cold weather causing stress and secondary bacterial or viral infections (Poljak et al., 2008). Moreover, SIV has a zoonotic potential occasionally reported in humans in many countries including Thailand (A/Thailand/271/2005, H1N1) as well as a pandemic H1N1 2009 virus (Komadina et al., 2007; Sreta et al., 2010). In addition, pig can act as a 'Mixing vessel' since swine tracheal epithelium contains both 2,3- and 2,6-N-acetylneuraminic acid-galactose viral receptors that can be infected with either human or avian influenza A virus (Suzuki et al., 2001). Therefore, a new pandemic virus can be generated from the swine origin through reassortment or adaptation to other hosts, especially in humans

The epidemiology of SIV occurs in two forms, epidemic or endemic. In the epidemic form, the virus quickly moves through all swine units of the immunologically naïve farm producing a pronounced clinical signs but rapid recovery rate if no complicating factors are present. In the endemic form, clinical signs may be less noticeable and not all pigs demonstrate typical clinical signs (Brown, 2000). Clinical signs of SIV are manifested as an acute respiratory disease characterized by fever, inactivity, decreased food intake, respiratory distress, coughing, sneezing, conjunctivitis and nasal discharge. SIV is transmitted by direct contact such as nose-to-nose contacting and aerosol transmission mostly by the spreading of infected droplets. The virus is excreted directly with respiratory secretion from infected pigs. Incubation period of SIV is between 1- 3 days and pigs rapidly recover within 4-7 days. In pregnant sows, SIV can cause abortion in 3-7 days of infection mostly due to high fever (Dee, 2005; Webster, 2002).

In general, antigenic variation of influenza A viruses contains two characteristics, antigenic drift and antigenic shift. Antigenic drift refers to an accumulation of point mutations inevitably produced during virus replication due to lacking of proof reading activity of the viral RNA polymerase complex (Lam et al., 2008; Laver et al., 1981; Laver et al., 1980). Antigenic shift occurs through genetic reassortment of the multiple gene segments when at lease 2 influenza A viruses infect the same host cell and exchange of RNA segments (Lam et al., 2008; Zhou et al., 1999). Based on the virus origin and genetic mutation, chronologically, SIV genetic evolution line contains two major SIV lineages, North American and Eurasian swine lineage. The evolution of SIV in the North American countries is distinct from the Eurasian lineage since genetic variation in the North American lineage is much higher (Brown, 2000). For example, the Eurasian classic H1N1 SIV was replaced by the whole avian virus jump into the pigs while the North American SIV contains mixed combinations of classic swine, human and avian virus genes (Brown, 2000; Olsen, 2002b). Similarly, European H3N2 SIV contains HA and NA genes from human 1970s like similar to the human pandemic 'Hong Kong' virus in 1968 (de Jong et al., 2007). However, other six internal genes were replaced by avian-like H1N1 genes. Interestingly in the North America, double reassortant H3N2 emerged in 1998 and subsequently triple reassortant H3N2 SIV containing human (HA, NA and PB1), swine (NP, M and NS), and avian (PB2 and PA) viruses was demonstrated. Recently, a mixed virus containing two major SIV lineages was found in many countries and some had pandemic potential such as the pandemic H1N1 2009 virus (Kingsford et al., 2009; Sreta et al., 2010; Woodland, 2009).

SIV in Thailand

In Thailand, SIV has been an endemic swine respiratory disease firstly recognized in pig serum since 1978 by serological study using human-1970s like H3N2 antigen (Kanai et al., 1981). In 1988, SIV H1N1 subtype was isolated and characterized as a classic swine H1N1 using genome mapping. It was not until 2005, retrospective genetic characterization of Thai SIVs isolated in 2000 to 2005 had been reported by Takemae et al. (2008). In addition, Sreta et al. (2009) reported a pathogenesis study of Thai SIV H1N1 and H3N2 isolated in 2005 (Sreta et al., 2009). The results showed Thai SIVs could induce flu-like symptom in infected pigs and H1N1 infected pigs showed higher lung lesion scores than those of H3N2-infected pigs. However, Thai pig farmers had no concern of SIV epidemic in their farms since the mortality was low with rapid recovery within 5-7 days post infection. Thus, the information of the true SIV status in Thailand is not clearly elucidated since genetic and antigenic information was limited. Since avian flu (H5N1) and the pandemic H1N1 2009 virus recently emerged and spread worldwide, WHO has been encouraging influenza surveillance in both humans and animals, particularly in pigs for the pandemic preparedness. In Thailand, Chulalongkorn University, Emerging and Re-emerging Infectious Disease in Animals (CU-EIDAs) has been studying nucleotide sequencing, antigenic property and serologic diagnosis for Thai SIVs. Recently, basic information of Thai SIVs including human transmission potential, economic loss in Thai swine production system, interspecies transmission and prevention and control of the disease has been investigated.

Epidemiology of SIV in Thailand

Serological data from CU-EIDAs demonstrated that SIV sero-prevalence increased during the rainy season from August to October in 2005 (unpolished data). In addition, SIVs could be isolated from September to December in 2005 to 2009 and from January to March in 2010 after the introduction of pandemic H1N1 2009 virus to the Thai swine industry. Furthermore, H1N1, H3N2 and H1N2 SIV subtypes, well established in the pig population worldwide have also been circulated in Thailand (table 1). The first SIV subtype was H3N2 isolated in 1978, relating to the contemporary human strains detected by serological study (Kanai et al., 1981). Subsequently in 1988, the first H1N1 SIV was isolated from pigs with an influenza-like symptom from Eastern Thailand (Kupradinun et al., 1991). Later, a new H1N2 subtype was isolated from pigs in Saraburi province in 2005 (Damrongwatanapokin, 2008). Currently, major SIV subtypes circulating in

CU-EIDAs. Previously, only 2.8% SIV positive pigs were found from pigs with respiratory symptom and only H3N2 subtype was found using RT-PCR (Nakharuthai et al., 2008). Moreover, the 2003 study reported about 7.9% sero-positive for H1N1 and 20.8% for H3N2 viruses, conflicting with the data in 2005 showing higher sero-positive for H1N1 over H3N2 in both grower pigs and sows (Damrongwatanapokin, 2003, 2006). Sero-surveillance in the mid 2007 to 2008 by the CU-EIDAs was positive about 50% for H1N1 and 85% for H3N2 using HI test. Subsequently, in the late 2009 to 2010, sero-positive was about 92% for H1N1, 24% for the pandemic H1N1 and 4% for H3N2 (unpolished data). It should be noted that the incidence of SIV H1N1 and H3N2 subtype become endemically in every 4 to 5 years and within two or three years the predominant subtype would dominate depending on many factors. However, it needs more epidemic information, validated tools, surveillance and specific factors of SIV outbreaks in Thailand in order to clearly elucidate SIV epidemiology and well-established prevention and control for the pandemic influenza preparedness in Thailand.

Genetic variation of SIV in Thailand

In Thailand, H1N1, H3N2 and H1N2 SIV subtypes have been circulated in the pig population. In 2000 to 2011, genetic data showed all Thai SIVs were reassortant viruses (table 2). Swine H1N1 subtype had 3 patterns of gene combinations between North American and Eurasian viruses; (1) classic swine H1 HA gene mixed with 7 genes of avian-like or swine Eurasian lineage, (2) classic swine H1 HA and NS genes mixed with 6 genes of avian-like or swine Eurasian lineage and (3) classic swine H1 HA, NP and NS genes, avian-like or swine Eurasian lineage of NA and M genes, avian PB2 and PA, and human PB1 gene. In addition, both HA and NA genes of H3N2 subtype belong to human lineage, similar to the Eurasian strain (Chutinimitkul et al., 2008; Takemae et al., 2008). Swine H3N2 subtype had three reassortment patterns; (1) Human-like HA and NA and 6 swine Eurasian internal genes, (2) Human-like HA and NA, classic swine NS gene and 5 swine Eurasian internal genes were, and (3) Human-like HA and NA, classic swine NP and NS genes, and 4 swine Eurasian internal genes. For H1N2 subtype, HA and NS genes were classic swine, NA was Human-like, and 5 internal genes were swine Eurasian. In addition, the H1N2 SIV was a reassortant from a classical swine H1N1 and a human like swine H3N2 (Takemae et al., 2008). Moreover, a novel reassortant H1N1 virus emerged in a pig farm at central part of Thailand in early 2010 (Kitikoon et al., 2011a). The novel virus contained the pandemic H1N1 2009 virus back bone replaced only NA gene from an endemic Thai swine H1N1 virus. Furthermore, genetic variation of

H1, H3, N1 and N2 genes occurred since the introduction of new influenza virus strains. For example, Thai swine H3 subtype can be divided into 2 groups, human-1970s like and human-1990s like although they share the same human origin (Lekcharoensuk et al., 2010; Sreta et al., 2009; Takemae et al., 2008). Genetic variation may cause difficulty in diagnosis and control the disease due to the phenotypic and antigenic property. SIV diagnosis in Thailand should be based on the specific information of genetic, antigenic and serology obtained in the local areas.

Table 1: History of SIVs in Thailand.

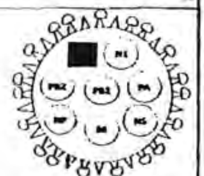
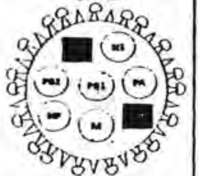
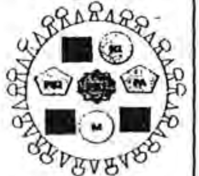
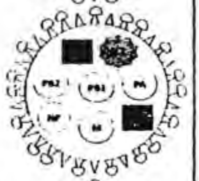
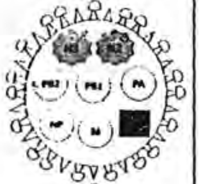
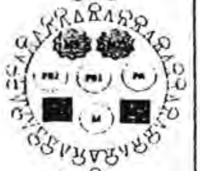
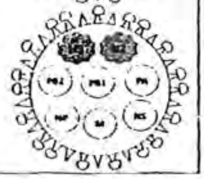
Year	Report of Thai SIVs	References
1978	First reported of swine H3N2 by serological study	Kanai et al., 1981 Nerome et al., 1981
1988	First reported of swine H1N1 isolation	Kupradinun et al., 1991
2000	Genetic characterized of swine H1N1; classic swine H1(swUS) and other 6 genes were avian origin (swEU)	Takemae et al., 2008
2003	Stable genetic H1N1 similar to 2000	Takemae et al., 2008
	Sero-surveillance 7.9% H1N1 and 20.6% H3N2 (ELISA)	Damrongwatanapokin et al., 2003
	Genetic characterized of swine H3N2; Human-1970 like HA and NA, Avian-like of internal genes	Chutinimitkul et al., 2008 Takemae et al., 2008
2004	Antigenic drift of swine H1 HA gene	Takemae et al., 2008
	Human-1990-like of swine H3 HA gene	Lekcharoensuk et al., 2010
	2 clusters of swine H1 and H3 HA gene	Takemae et al., 2008
2005	First reported of swine H1N2 isolation	Takemae et al., 2008
	Circulation of swine H1N1, H3N2 and H1N2 subtypes	Sreta et al., 2009 Takemae et al., 2008
	Sero-surveillance 55% H1N1 and 31% H3N2 in grower pigs, 91% H1N1 and 52% H3N2 in sow by HI test	Damrongwatanapokin et al., 2006
Mid 2007-2008	Sero-surveillance 50% H1N1 and 85% H3N2 by HI test	Sreta et al., 2010

Mid 2008-2009	Sero-study found pig-to-human transmission in farm workers about 50% swine H1 by HI test	Kitikoon et al., 2010
	Highest swH3N2-07 sero-positive when compared with the swH1N1-06, swH1N1-09 and swH3N2-05; 85.4, 50.1, 18.8 and 15.8%, respectively	CU-EIDAS, unpublished data
2009	Pandemic H1N1 2009 virus was isolated from pigs A new triple reassortant swine H1N2 was isolated	Sreta et al., 2010
2010	Sero-surveillance 92% swH1N1, 24% pH1N1 and 4% H3N2 by HI test	CU-EIDAs, unpublished data
	Reassortment of pandemic H1N1 and endemic swine H1N1 in a pig farm	Kitikoon et al., 2011
	Phylogenetic analysis of three H1 and two H3 subgroup	CU-EIDAs, unpublished data
2011	Genetic variation forming separate groups from the origins (swine EU and US lineage)	Takemae et al., 2008 Kitikoon et al., 2011

Interspecies transmission

Occasionally, there were several reports on SIV infection in humans (Myers et al., 2007; Myers et al., 2006). Myers et al. reviewed cases of SIV in humans from PubMed database in April 2006 and found 50 cases of apparently zoonotic SIV infection (Myers et al., 2007). Similarly in Thailand, evidence of interspecies transmission between pigs and humans demonstrated that SIV H1N1 pig-to-human transmission was found in a 4 year old boy in 2005 (Komadina et al., 2007). Soon after the human pandemic H1N1 2009 emerging in the United Stage in April 2009, the virus was found in pigs in the swine farms in many countries demonstrating the transmission from humans to pigs (Cutler et al., 2009). In Thailand, the pandemic H1N1 2009 virus was also found in both human and pig populations (Sreta et al., 2010). In addition, pig-to-human influenza transmission in the Thai swine farms was demonstrated that pig-exposure is one of the major risk factors since pig-exposed participants had significant higher percentages of SIV sero-positive number than that of non-pig-exposed group (odds ratio > 40, 95% confidence interval) (Kitikoon et al., 2011b). In Asian countries including Thailand, pig production systems mostly are an open housing system of growing to finishing pigs practicing a continuous flow system which may increase a chance of

Table 2: Genetic characterization of SIVs isolated in Thailand from GenBank database.

SIV subtype	Year Isolation	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	Virus Pattern
Swine H1N1	2000 2005	swEU	swEU	swEU	sw	swEU	swEU	swEU	swEU	
Swine H1N1	2004 2005 2006 2009 2010	swEU	swEU	swEU	sw	swEU	swEU	swEU	sw	
Pandemic H1N1	2009 2010 2011	Av	Hu	Av	sw	sw	swEU	swEU	sw	
Swine H1N2	2005	swEU	swEU	swEU	sw	swEU	Hu	swEU	sw	
Swine H3N2	2004 2005	swEU	swEU	swEU	Hu 1970s	swEU	Hu	swEU	sw	
Swine H3N2	2003 2004 2005	swEU	swEU	swEU	Hu 1990s	sw	Hu	swEU	sw	
Swine H3N2	2004 2007	swEU	swEU	swEU	Hu 1990s	swEU	Hu	swEU	swEU	

■ or sw=swine origin, ○ or swEU=swine Eurasian lineage
⬠ or Av=avian origin, ✹ or Hu=human origin

interaction of humans, pigs, farm pets and other animals. Future investigation of specific risk factors of pig-to-human influenza transmission or vice versa should be routinely performed.

Diagnosis of SIV in Thailand

In general, SIV is genetically unstable known as antigenic drift and antigenic shift. Many sub-clusters have arisen within the different H1N1 and H3N2 SIV subtypes (Ma et al., 2010). In Thailand, total 38 HA nucleotide sequences of both H1 and H3 SIVs could be divided into five clusters containing three of the H1 viruses (H1 cluster I, II and III) and two of the H3 viruses (H3 cluster I and II) (unpublished data). The genetic characters tend to evolve gradually having separate line differing from its origin. Moreover, antigenic drift and reassortment patterns in Thailand are locally specific. Thus, molecular diagnosis should be concerned particularly when subtyping using specific primers. For serologic study, using virus antigen from local SIV isolates should be utilized in the established tests due to SIV antigenic variation. Based on a study of SIV antigenic properties at CU-EIDAs using hyper-immune rabbit sera, the results showed that A/sw/Thailand/08CB1/2006 (H1N1) should be used as a reference H1 antigen for swine H1 virus antibody detection. For Thai swine H3 virus diagnosis, both A/sw/Thailand/S1/2005 (H3N2) and A/sw/Thailand /CU-PN8.4/2007 (H3N2) viruses must be included in the tests since both isolates did not have cross antibody reactivity. It should be noted that genetic characterization monitoring is necessary for HI assay evaluation since phenotypic characterization relates to the genetic and other factors. The results suggest that the SIV antigen used in the HI test should be genetically and serologically evaluated at least every two years.

Conclusion

Swine production system in Thailand is different from the systems in North America and Europe. The production size in Thailand ranges from large industrialized to backyard farms with the increasing in numbers of intensive farming. Pig housing in Thailand also consists of both closed housing (evaporation cooling system) and open housing where natural air flow ventilates the units. From the SIV epidemiology, Thai swine H1 viruses were rather stable and showed only a few nucleotide changes due to genetic drift different from what happening in the United State and European countries. It was not until late 2009, Thai SIVs have undergone increased genetic variation since the introduction of the triple reassorted internal gene (TRIG) cassette that could play a major role in interspecies transmission. It should be noted that the pandemic H1N1 2009 virus transmitted to the Thai pig population in late 2009, has been spreading and becoming endemic in many pig farms. Thus, moving the infected pig into the naïve swine population may cause the epizootic outbreak. In addition, SIV is a primary pathogen in porcine respiratory disease complex (PRDC) that leads to economic loss. Supporting information, mainly positive SIV farms showed respiratory problems concurrently with the presence of other respiratory pathogens including PRRSV and PCV2. Therefore, prevention and control of SIV in swine herds is necessary, particularly in the PRDC-affected farms.

Importantly, SIV is a public health concern since it has a zoonotic potential and influenza A virus can infect many animals including birds, horses and humans (Myers et al., 2007; Myers et al., 2006). In addition, pig-to-human influenza transmission in the Thai swine farms was demonstrated (Kitikoon et al., 2011b; Komadina et al., 2007). Also, swine-exposed populations serving as the frontline of contacting SIV, particularly in Thailand should be concerned since (1) swine influenza vaccination is not performed on Thai swine farms; (2) clinical signs in pigs are hard to identify in SIV endemic farms which renders personal protection management difficulty; and (3) most pig handlers are uneducated migrant workers from neighboring countries. Therefore, continuous monitoring for SIV infection, education on self-protection and additional research aimed at characterizing specific risk factors unique to the populations are required to help implement future influenza control programs. In addition, persons who work with swine may play an important role as a mixing host, leading to reassortment and development of novel progeny strains with pandemic potential (Ma et al., 2009). Moreover, people exposing to swine may be the first person becoming infected in the event of a novel virus and serving as a bridge for transmission of the virus to their communities. A policy of vaccinating swine workers annually with human influenza vaccine would decrease the risk of reassortment events. Persons who work with swine should be considered for sentinel influenza surveillance and may be an important group to include in pandemic planning (Myers et al., 2007; Myers et al., 2006).

However, there are no specific treatments for SIV infection, prevention and control are of importance (Dee, 2005). Treatments of clinically infected pigs include anti-inflammatory medicine to reduce the severity of affected pigs, antimicrobials to prevent secondary bacterial infections and importantly, all good management strategies. Prevention is largely depending on biosecurity and avoiding the introduction of carrier animals (Poljak et al., 2008). To introduce new animals into the herd, vaccination, quarantine and acclimation should be done. In the United

States, swine influenza vaccine is commonly used to prevent the clinical diseases but not in Thailand due to limited information. Control program commonly depends on rigorous biosecurity and limiting and avoiding the introduction of carrier animals.

References

Brown, I.H. (2000). The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*, 74: 29-48.

Chutinimitkul, S., Thippamom, N., Damrongwatanapokin, S., Payungporn, S., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Boonsuk, P., Sreta, D., Bunpong, N., Tantilertcharoen, R., Chamnanpood, P., Parchariyanon, S., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y. (2008). Genetic characterization of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza virus in Thailand. *Archives of Virology*, 153: 1049-1056.

Cong, Y.L., Wang, C.F., Yan, C.M., Peng, J.S., Jiang, Z.L., Liu, J.H. (2008). Swine infection with H9N2 influenza viruses in China in 2004. Virus Genes 36, 461-469.

Cutler, J., Schleihauf, E., Hatchette, T.F., Billard, B., Watson-Creed, G., Davidson, R., Li, Y., Bastien, N., Sarwal, S. (2009). Investigation of the first cases of human-to-human infection with the new swine-origin influenza A (H1N1) virus in Canada. *Canadian Medical Association Journal*, 181: 3-4.

Damrongwatanapokin, S., Parchariyanon, S., Pinychon, W. (2003). Serological study of swine influenza virus H1N1 infection in pigs of Thailand. In 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease (Rome), p. 281.

Damrongwatanapokin, S., Pinychon, W., Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, T. (2006). Serological study and isolation of influenza A virus infection of pigs in Thailand. In: *The 19th IPVS Congress*, Denmark

de Jong, J.C., Smith, D.J., Lapedes, A.S., Donatelli, I., Campitelli, L., Barigazzi, G., Van Reeth, K., Jones, T.C., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A. (2007). Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *Journal of Virology*, 81: 4315-4322.

Dee, S.A. (2005). *Respiratory Disease of Pigs, In: Merck Veterinary Manual.*, pp. 1228. Philadelphia, Pensylvania, USA, National Inc Publishing.

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

Kanai, C., Suwicha, K., Nadhirat, S., Nerome, K., Nakayama, M., Oya, A. (1981). Isolation and serological characterization of influenza A virus from a pig in Thailand. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, 34: 175-178.

Kingsford, C., Nagarajan, N., Salzberg, S.L. (2009). 2009 Swine-origin influenza A (H1N1) resembles previous influenza isolates. *PLoS One*, 4: e6402.

Kitikoon, P., Sreta, D., Nuntawan Na Ayudhya, S., Wongphatcharachai, M., Lapkuntod, J., Prakairungnamthip, D., Bunpapong, N., Suradhat, S., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A. (2011a). Brief report: molecular characterization of a novel reassorted pandemic H1N1 2009 in Thai pigs. *Virus Genes.*

Kitikoon, P., Sreta, D., Tuanudom, R., Amonsin, A., Suradhat, S., Oraveerakul, K., Poovorawan, Y., Thanawongnuwech, R. (2011b). Serological evidence of pig-to-human influenza virus transmission on Thai swine farms. *Veterinary Microbiology*, 148: 413-418.

Komadina, N., Roque, V., Thawatsupha, P., Rimando-Magalong, J., Waicharoen, S., Bomasang, E., Sawanpanyalert, P., Rivera, M., Iannello, P., Hurt, A., Barr, I. (2007). Genetic analysis of two influenza A (H1) swine viruses isolated from humans in Thailand and the Philippines. *Virus Genes*, 35: 161-165.

Kupradinun, S., Peanpijit, P., Bhodhikosoom, C., Yoshioka, Y., Endo, A., Nerome, K. (1991). The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. *Archives of Virology*, 118: 289-297.

Lam, T.Y., Hon, C.C., Wang, Z., Hui, R.K., Zeng, F., Leung, F.C. (2008). Evolutionary analyses of European H1N2 swine influenza A virus by placing timestamps on the multiple reassortment events. *Virus Research*, 131: 271-278.

Laver, W.G., Air, G.M., Webster, R.G. (1981). Mechanism of antigenic drift in influenza virus. Amino acid sequence changes in an antigenically active region of Hong Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin. *Journal of Molecular Biology*, 145: 339-361.

Laver, W.G., Air, G.M., Webster, R.G., Gerhard, W., Ward, C.W., Dopheide, T.A. (1980). The mechanism of antigenic drift in influenza virus: sequence changes in the haemagglutinin of variants selected with monoclonal hybridoma antibodies. *Philosophical Transactions of the* Royal *Society* B: *Biological Sciences*, 288: 313-328.

Lee, J.H., Pascua, P.N., Song, M.S., Baek, Y.H., Kim, C.J., Choi, H.W., Sung, M.H., Webby, R.J., Webster, R.G., Poo, H., Choi, Y.K. (2009). Isolation and genetic characterization of H5N2 influenza viruses from pigs in Korea. *Journal of Virology*, 83: 4205-4215.

Lekcharoensuk, P., Lager, K.M., Vemulapalli, R., Woodruff, M., Vincent, A.L., Richt, J.A. (2006). Novel swine influenza virus subtype H3N1, United States. *Emerging Infectious Disease,* 12: 787-794.

Lekcharoensuk, P., Nanakorn, J., Wajjwalku, W., Webby, R., Chumsing, W. (2010). First whole genome characterization of swine influenza virus subtype H3N2 in Thailand. *Veterinary Microbiology,* 145: 230-244.

Ma, W., Lager, K.M., Vincent, A.L., Janke, B.H., Gramer, M.R., Richt, J.A. (2009). The Role of Swine in the Generation of Novel Influenza Viruses. *Zoonoses Public Health,* 56(6-7): 326-37.

Ma, W., Vincent, A.L., Gramer, M.R., Brockwell, C.B., Lager, K.M., Janke, B.H., Gauger, P.C., Patnayak, D.P., Webby, R.J., Richt, J.A. (2007). Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 104: 20949-20954.

Ma, W., Vincent, A.L., Lager, K.M., Janke, B.H., Henry, S.C., Rowland, R.R., Hesse, R.A., Richt, J.A. (2010). Identification and characterization of a highly virulent triple reassortant H1N1 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes,* 40: 28-36.

Myers, K.P., Olsen, C.W., Gray, G.C. (2007). Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clinical Infectious Diseases,* 44: 1084-1088.

Myers, K.P., Olsen, C.W., Setterquist, S.F., Capuano, A.W., Donham, K.J., Thacker, E.L., Merchant, J.A., Gray, G.C. (2006). Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus? *Clinical Infectious Diseases,* 42: 14-20.

Nakharuthai, C., Boonsoongnern, A., Poolperm, P., Wajjwalku, W., Urairong, K., Chumsing, W., Lertwitcharasarakul, P., Lekcharoensuk, P. (2008). Occurrence of swine influenza virus infection in swine with porcine respiratory disease complex. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health,* 39: 1045-1053.

Olsen, C.W. (2002). The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Research,* 85: 199-210.

Poljak, Z., Dewey, C.E., Martin, S.W., Christensen, J., Carman, S., Friendship, R.M. (2008). Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003. *Canadian Journal of Veterinary Research,* 72: 7-17.

Shin, J.Y., Song, M.S., Lee, E.H., Lee, Y.M., Kim, S.Y., Kim, H.K., Choi, J.K., Kim, C.J., Webby, R.J., Choi, Y.K. (2006). Isolation and characterization of novel H3N1 swine influenza viruses from pigs with respiratory diseases in Korea. *Journal of Clinical Microbiology,* 44: 3923-3927.

Slemons, R.D. (2002). History, Structure and Function of Swine Influenza Virus. In Scientific Symposium on Swine Influenza.Proceeding (Iowa), pp. 1-4.

Sreta, D., Kedkovid, R., Tuamsang, S., Kitikoon, P., Thanawongnuwech, R. (2009). Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. *Virology Journal*, 6: 34.

Sreta, D., Tantawet, S., Ayudhya, S.N.N., Thontiravong, A., Wongphatcharachai, M., Lapkuntod, J., Bunpapong, N., Tuanudom, R., Suradhat, S., Vimolket, L., Poovorawan, Y., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Kitikoon, P. (2010). Pandemic (H1N1) 2009 Virus on Commercial Swine Farm, Thailand. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 1587-1590.

Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Miyamoto, D., Hidari, K.I.P.J., Guo, C.-T., Kida, H., Webster, R.G., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. (2001). Sialyl sugar chains as receptors and determinants of host range of influenza A viruses. *International Congress Series*, 1219: 521-525.

Takemae, N., Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, S., Uchida, Y., Ruttanapumma, R., Watanabe, C., Yamaguchi, S., Saito, T. (2008). Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2: 181-189.

Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Janke, B.H., Richt, J.A., 2008, Swine influenza viruses a North American perspective. Advance Virus Research, 72: 127-154.

Webster, R., Cox, N. and Stohr, K. (2002). *WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance (World Health Organization)*, pp. 15-67.

Woodland, D.L. (2009) . Swine influenza virus has caused considerable concern around the world. *Viral Immunology*, 22: 233,

Zhou, N.N., Senne, D.A., Landgraf, J.S., Swenson, S.L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K., Krauss, S., Webster, R.G.(1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *Journal of Virology*, 73: 8851-8856.

Pandemic (H1N1) 2009 Virus on Commercial Swine Farm, Thailand

Donruethai Sreta, Siriporn Tantawet,
Suparlark N. Na Ayudhya,
Aunyaratana Thontiravong,
Manoosak Wongphatcharachai,
Jiradej Lapkuntod, Napawan Bunpapong,
Ranida Tuanudom, Sanipa Suradhat,
Linda Vimolket, Yong Poovorawan, Roongroje
Thanawongnuwech, Alongkorn Amonsin,
and Pravina Kitikoon

A swine influenza outbreak occurred on a commercial pig farm in Thailand. Outbreak investigation indicated that pigs were co-infected with pandemic (H1N1) 2009 virus and seasonal influenza (H1N1) viruses. No evidence of gene reassortment or pig-to-human transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus was found during the outbreak.

In April 2009, a novel swine origin influenza A (H1N1) virus, now referred to as pandemic (H1N1) 2009 virus, emerged in humans in Mexico and the United States and spread worldwide (*1*). In May 2009, pandemic (H1N1) 2009 was confirmed in 2 patients in Thailand who had a history of travel to Mexico. Shortly after emergence of this virus, reports of transmission from humans to pigs on pig farms were documented (*2,3*). Human-to-pig transmission of this virus was reported in Thailand on December 17, 2009 (www.dld.go.th/dcontrol/Alert/Ah1n1/H1N1%20update22_12_2009.pdf). Pigs showed mild respiratory signs; only 1 pandemic (H1N1) 2009 virus was isolated from 80 nasal swab specimens.

Swine influenza virus (SIV) was reported in Thailand in 1981 (*4*). All 3 subtypes (H1N1, H3N2, and H1N2) of this virus are circulating in Thailand (*5*). A recent pathogenesis study demonstrated that subtype H1N1 induces typical SIV-like illness and slightly more severe gross lesions than illness induced by subtype H3N2 (*6*). Genetic data indicate that SIV (H1N1) in Thailand differs from pandemic (H1N1) 2009 virus. SIV (H1N1) in Thailand contains surface proteins of influenza viruses from North America and Eurasia, which are also found in pandemic (H1N1) 2009 virus; SIV (H1N1) in Thailand contains internal proteins of viruses from Eurasia; and pandemic (H1N1) 2009 viruses contain swine, human, and avian virus gene segments (*5,7*).

We report an outbreak of infection with pandemic (H1N1) 2009 virus during November 2009–March 2010 on a commercial pig farm in Thailand. The outbreak presumably resulted from human-to-pig transmission because 1 of the workers on this farm had influenza-like clinical signs at the beginning of the outbreak. Infection in this worker was not confirmed because he quit his job on the farm after the start of the outbreak and could not be located.

The Study

In early November 2009, a small commercial pig farm in central Thailand reported respiratory problems in pigs (morbidity rate 50%, mortality rate 10%) in nursery pigs. The farm contained 3,235 pigs (700 sows, 35 boars, 1,000 piglets, 1,000 nursery pigs, and 500 finishing pigs). It has a conventional open-house production system in which both sides of the unit have natural air flow ventilation. The farm also has continuous nursery herd flow in which new pigs are continuously added when they are old enough. This process results in pigs of different ages being in the same unit. Sick pigs had clinical signs (fever, cough, nasal discharge, edematous eyelids, and conjunctivitis) of infection.

Nasal swabs from 20 nursery pigs (4–9 weeks of age) were submitted to Chulalongkorn University Veterinary Diagnostic Laboratory. All samples were positive for porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (these viruses are major causes of swine respiratory disease), and 2 samples were positive for influenza A virus by reverse transcription–PCR (RT-PCR) with primers for each specific pathogen (*8–10*).

Because respiratory problems in nursery pigs continued, nasal swabs specimens from 20 nursery pigs and finishing pigs, gilts (young females), and sows (10 per group) with clinical signs were submitted to the diagnostic laboratory by the end of December 2009. Two samples from nursery pigs were positive for influenza virus A (H1N1) by multiplex RT-PCR (*11*). Both samples were subjected to virus isolation in MDCK cells (*12*) and designated RA20 and RA29 (Table 1). Genome characterization identified RA20 as SIV and RA29 as pandemic (H1N1) 2009 virus (Table 2; Figure). SIV-positive nasal swabs obtained in November were then characterized. Results showed that isolates RA4 and RA9 were pandemic (H1N1) 2009 virus, which indicated that pigs on the farm were infected with this virus.

Author affiliations: Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (D. Sreta, S.N. Na Ayudhya, A. Thontiravong, M. Wongphatcharachai, J. Lapkuntod, N. Bunpapong, R. Tuanudom, S. Suradhat, L. Vimolket, Y. Poovorawan, R. Thanawongnuwech, A. Amonsin, P. Kitikoon); and Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand (S. Tantawet)

DOI: 10.3201/eid1610.100665

Table 1. Influenza (H1N1) viruses studied, Thailand[*]

Influenza (H1N1) virus isolate	Collection date	Identification	Study designation	GenBank accession no. (gene segment 1–8)
A/sw/Thailand/CU-RA4/2009	2009 Nov 6	Pandemic (H1N1)2009	RA4	CY062305–CY062312
A/sw/Thailand/CU-RA9/2009	2009 Nov 6	Pandemic (H1N1) 2009	RA9	CY062321–CY062328
A/sw/Thailand/CU-RA20/2009	2009 Dec 28	Thai SIV	RA20	CY062281–CY062288
A/sw/Thailand/CU-RA29/2009	2009 Dec 28	Pandemic (H1N1)2009	RA29	CY062297–CY062304
A/sw/Thailand/CU-RA114/2010	2010 Jan 17	Pandemic (H1N1)2009	RA114	CY062265–CY062272
A/sw/Thailand/CU-RA204/2010	2010 Jan 17	Thai SIV	RA204	CY062289–CY062296
A/sw/Thailand/CU-RA15/2010	2010 Jan 30	Pandemic (H1N1) 2009	RA15	CY062273–CY062280
A/sw/Thailand/CU-RA75/2010	2010 Jan 30	Pandemic (H1N1) 2009	RA75	CY062313–CY062320

[*] SIV, swine influenza virus.

Pandemic (H1N1) 2009 investigations on the farm included clinical surveillance and sample collection from sick and contact pigs and close monitoring of swine workers and farm pets for influenza-like illness. Nasal swab specimens were obtained from pigs on January 17, 2010, January 30, 2010, and March 9, 2010. Because initial laboratory findings indicated that the outbreak involved the nursery herd, weaned pigs were moved to a separate site on the farm to control disease in the nursery pigs. Following Food and Agriculture Organization (www.fao.org) sample collection recommendations, we obtained 20 nasal swabs from pigs with SIV-like illness. In addition, nasal swab specimens (n = 10 per group) were collected from gilts, sows, and finishing pigs to test for pandemic (H1N1) 2009 virus, although no clinical signs were observed in any pigs from these age groups. All SIV-positive samples were subjected to virus isolation (*12*), virus subtyping by multiplex RT-PCR (*11*), and whole genome sequencing of subtype H1N1 viruses (*13*). Of 175 samples obtained during December 26, 2009–March 9, 2010, fifteen swab specimens from nursery pigs with clinical signs were positive for influenza (H1N1) 2009 virus; 8 viruses were characterized. No other SIV subtypes were found. On March 9, ≈1 month after implementing the change in handling of pigs, no pigs showed respiratory signs and 34 nasal swab specimens were negative for influenza virus.

Gene sequences were compared for corresponding genes of other influenza virus strains obtained from GenBank by using the MegAlign program (DNASTAR, Madison, WI, USA). Phylogenetic trees were constructed by using MEGA4 (www.megasoftware.net/) and the neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates. Whole genome analysis showed that contemporary SIV (H1N1) and pandemic (H1N1) 2009 virus were concurrently circulating in the nursery herd (Table 2; Figure). On the basis of virus hemagglutinin 1 gene grouping (*14*), our findings show that newly isolated SIV (H1N1) from Thailand are grouped in the classical swine cluster with other SIV (H1N1) isolates (online Appendix Figure, www.cdc.gov/EID/content/16/10/1587-appF.htm). There was no evidence of gene reassortment between SIV (H1N1) and pandemic (H1N1)2009 virus during the investigation (Table 2).

To test for evidence of pandemic (H1N1) 2009 virus interspecies transmission, we obtained serum samples on January 17, 2010, from 40 pigs in 8 age groups (5/group),

Table 2. Gene origin and percent homology of SIV RNA segments compared with pandemic (H1N1) 2009 virus, Thailand[*]

Influenza (H1N1) virus	PB2 (1–2229)†	PA (1–2153)†	NA (1–1347)†	M (1–982)†	HA (1–1698)†	NS (1–778)†	NP (1–1443)†	PB1 (1–2153)†
Pandemic (H1N1) 2009‡	Avian TRIG		Eurasian swine		Classical swine			Human TRIG
SIV from Thailand§	Eurasian swine				Classical swine		Eurasian swine	
RA4	Avian TRIG		Eurasian swine		Classical swine			Human TRIG
RA9	Avian TRIG		Eurasian swine		Classical swine			Human TRIG
RA20¶	Eurasian swine				Classical swine		Eurasian swine	
	83.1%	85.1%	89.5%	94.2%	86.4%	90.8%	82.4%	85.1%
RA29	Avian TRIG		Eurasian swine		Classical swine			Human TRIG
RA114	Avian TRIG		Eurasian swine		Classical swine			Human TRIG
RA204¶	Eurasian swine				Classical swine		Eurasian swine	
	83.2%	85.2%	89.5%	94.2%	86.8%	90.8%	82.3%	85.1%
RA15	Avian TRIG		Eurasian swine		Classical swine			Human TRIG
RA75	Avian TRIG		Eurasian swine		Classical swine			Human TRIG

[*] All swine influenza virus (SIV) isolates except RA20 and RA204 have >99% homology with corresponding genes of A/Nonthaburi/102/2009. PB, polymerase B; PA, polymerase A; NA, neuraminidase; M, matrix; HA, hemagglutinin; NS, nonstructural; NP, nucleoprotein; TRIG, triple reassorted internal gene.

†Nucleotide positions compared.

‡A/Nonthaburi/102/2009 (H1N1) virus.

§A/sw/Ratchaburi/NIAH1481/2000 (H1N1) virus.

¶Percent homology of compared sequences with those of corresponding genes of A/Nonthaburi/102/2009.

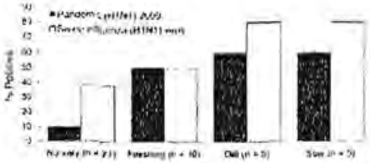


Figure. Percentage of pigs with antibodies against pandemic (H1N1) 2009 virus and swine influenza virus (H1N1) detected by hemagglutination-inhibition test, by pig type, Thailand. Serum samples were obtained from pigs of different ages in January 2010 Samples were positive when titer was ≥40.

15 workers, and 4 farm pets (3 dogs and 1 cat). Samples were subjected to hemagglutination-inhibition (HI) testing with SIV (H1N1) and pandemic (H1N1) 2009 virus antigens (*12*).

Control rabbit antibodies against SIV (H1N1) viruses did not cross-react with pandemic (H1N1) 2009 virus. Serologic results showed that only 2 (9.5%) of 21 test samples from the nursery group had positive HI titers for pandemic (H1N1) 2009 virus and 8 (38%) of 21 had positive HI titers for SIV (H1N1) virus. For pigs in other age groups, 11 (55%) of 20 had antibodies against pandemic (H1N1) 2009 virus and 14 (70%) of 20 had antibodies against SIV (H1N1) by HI test. No human cases of co-infection were observed. We found no evidence of pandemic (H1N1) 2009 virus interspecies transmission from pigs to humans or to farm pets.

Conclusions

Consistent with findings of previous reports (*2,3*), our findings demonstrate that young pigs are susceptible to infection with pandemic (H1N1) 2009 virus. Infection in pigs substantiates the hypothesis that the clinical outcome caused by infection with pandemic (H1N1) 2009 virus differs from that of infection with SIV (H1N1), which currently circulates in pigs in Thailand. Serologic results demonstrated that uninfected populations are susceptible to infection with pandemic (H1N1) 2009 virus. Results of genome analysis did not show gene reassortment between the 2 different influenza (H1N1) viruses. However, a previous report showed that reassortment of influenza virus genes occurs in pigs (*15*). Continued monitoring, characterization of SIVs, and serologic surveillance of pigs are necessary for future influenza pandemic preparedness.

Acknowledgments

We thank Suphattra Jittimanee, Roongtham Kedkovid, and Na Taya Churoenvisal for assisting with sample collection, and the Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project for supporting facilities of the Emerging and Reemerging Infectious Diseases in Animals Research Unit. This study was conducted at the Faculty of Veterinary Science and Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

This study was supported by grants from National Research Council of Thailand, Emerging Health Risk Cluster, Rachadapiseksompoch Endowment Fund, and a subcontract to Chulalongkorn University from the University of Minnesota under the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (prime contract no. HHSN266200700007c).

Dr Sreta is a member of the Faculty of Veterinary Medicine at Rajamangala University of Technology Tawannok and a PhD candidate in the Veterinary Pathobiology Program, Faculty of Veterinary Science, at Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Her research interests are swine influenza virus surveillance and genetic characterization.

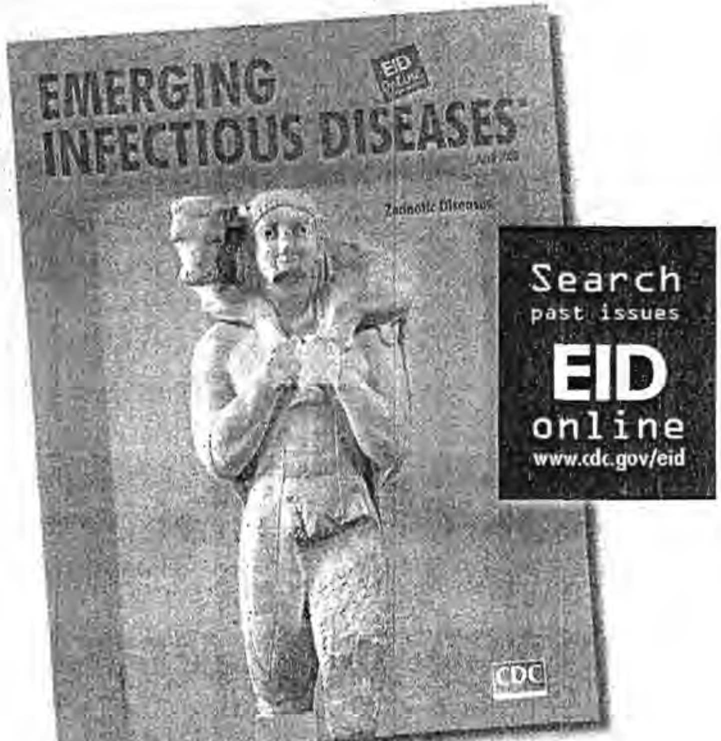
References

1. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1)Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N Engl J Med. 2009;360:2605–15. DOI: 10.1056/NEJMoa0903810
2. Pereda A, Cappuccio J, Quiroga MA, Baumeister E, Insarralde L, Ibar M, et al. Pandemic (H1N1) 2009 outbreak on pig farm, Argentina. Emerg Infect Dis. 2010;16:304–7.
3. Pasma T, Joseph T. Pandemic (H1N1) 2009 infection in swine herds, Manitoba, Canada. Emerg Infect Dis. 2010;16:706–8.
4. Kanai C, Suwicha K, Nadhirat S, Nerome K, Nakayama M, Oya A. Isolation and serological characterization of influenza A virus from a pig in Thailand. Jpn J Med Sci Biol. 1981;34:175–8.
5. Takemae N, Parchariyanon S, Damrongwatanapokin S, Uchida Y, Ruttanapumma R, Watanabe C, et al. Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. Influenza Other Respi Viruses. 2008;2:181–9. DOI: 10.1111/j.1750-2659.2008.00062.x
6. Sreta D, Kedkovid R, Tuamsang S, Kitikoon P, Thanawongnuwech R. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. Virol J. 2009;6:34. DOI: 10.1186/1743-422X-6-34
7. Kingsford C, Nagarajan N, Salzberg SL. 2009 Swine-origin influenza A (H1N1) resembles previous influenza isolates. PLoS One. 2009;4:e6402. DOI: 10.1371/journal.pone.0006402
8. Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, Theamboonlers A, Keawcharoen J, Oraveerakul K, et al. Single-step multiplex reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. Viral Immunol. 2004;17:588–93. DOI: 10.1089/vim.2004.17.588
9. Kim J, Chae C. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfected pigs. J Vet Diagn Invest. 2004;16:45–50.
10. Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tatsanakit A, Damrongwatanapokin S. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet Microbiol. 2004;101:9–21. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.03.005

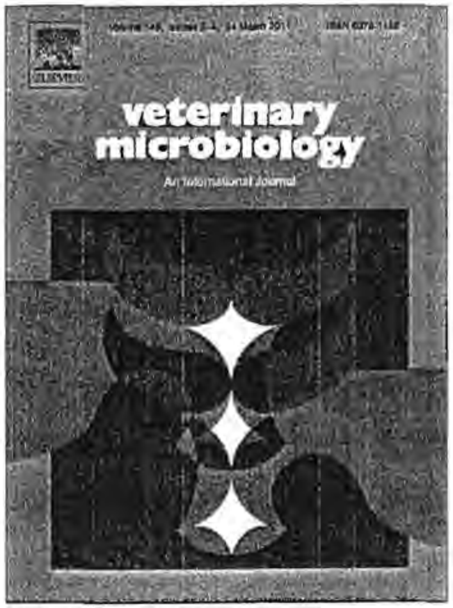
---

11. Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW, Joo HS. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. J Virol Methods. 2002;102:53–9. DOI: 10.1016/S0166-0934(01)00442-6
12. Kitikoon P, Nilubol D, Erickson BJ, Janke BH, Hoover TC, Sornsen SA, et al. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. Vet Immunol Immunopathol. 2006;112:117–28. DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.02.008
13. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch Virol. 2001;146:2275–89. DOI: 10.1007/s007050170002
14. Vincent AL, Ma W, Lager KM, Gramer MR, Richt JA, Janke BH. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. Virus Genes. 2009, Jul 14. [Epub ahead of print].
15. Castrucci MR, Donatelli I, Sidoli L, Barigazzi G, Kawaoka Y, Webster RG. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. Virology. 1993;193:503–6. DOI: 10.1006/viro.1993.1155

Address for correspondence: Pravina Kitikoon, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand; email: prwina21@gmail.com



Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Veterinary Microbiology 148 (2011) 413–418

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Short communication

Serological evidence of pig-to-human influenza virus transmission on Thai swine farms

Pravina Kitikoon[a,c], Donruethai Sreta[a,c], Ranida Tuanudom[a,c], Alongkorn Amonsin[a,c], Sanipa Suradhat[a,c], Kanisak Oraveerakul[a], Yong Poovorawan[b], Roongroje Thanawongnuwech[a,c,*]

[a] *Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd., Bangkok 10330, Thailand*
[b] *Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd., Bangkok 10330, Thailand*
[c] *Emerging and Re-emerging Infectious Disease in Animals, Research Unit (CUEIDAs), Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd., Bangkok 10330, Thailand*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 June 2010
Received in revised form 15 September 2010
Accepted 21 September 2010

Keywords:
Influenza
Interspecies transmission
Hemagglutination inhibition
Antibody

ABSTRACT

We investigated influenza interspecies transmission in two commercial swine farms in Thailand. Sera from swine-exposed workers ($n = 78$), age-matched non-swine-exposed healthy people ($n = 60$) and swine populations in both farms ($n = 85$) were studied. Hemagglutination-inhibition (HI) assay was performed on Thai swine H1 viruses (swH1N1 and swH1N2) isolated from both farms. Thai human H1N1 (huH1N1) and pandemic H1N1 2009 (pH1N1) were also used as test antigens. The hemagglutinin (HA) 1 genes of swH1N1 and swH1N2 viruses were sequenced and shown to be genetically distinct from the Thai huH1N1 and pH1N1 viruses. Evidence of pig-to-human influenza virus transmission was found in farm workers with increased odds of elevated antibody titers to both swH1N1 (OR 42.63, 95% CI, 14.65–124) and swH1N2 (OR 58, 95% CI, 13.12–256.3) viruses. No evidence of human-to-pig influenza virus transmission was detected in this study.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Occasionally, swine influenza virus (SIV) transmission to humans, and vice versa, has been documented (Karasin et al., 2006; Katsuda et al., 1995). Previously documented SIV-infected human cases were nonfatal and human-to-human transmission was rare (Myers et al., 2007). In addition, a large number of cases involved swine farmers, people who lived on swine farms or were in close contact with pigs. At present, three SIV subtypes, H1N1, H1N2 and H3N2 are commonly found in swine throughout the world (Easterday and Van Reeth, 1999). The first subtype isolated was named "classical-swine" influenza virus as all eight gene segments were of swine origin. Classical swine H1N1 (cH1N1) was known as the dominant virus in North American swine populations for over 60 years (Easterday and Van Reeth, 1999). Recent data indicated that the HA1 genes of classical-swine subtypes could now be grouped into three separate clusters, swine H1-alpha (swH1α), swine H1-beta (swH1β) and swine H1-gamma (swH1γ) (Vincent et al., 2009). The HA1 gene of swH1γ is known as the progenitor of the pandemic H1N1 2009 (pH1N1) viruses (Kingsford et al., 2009). In contrast, H1N1 virus originally introduced into the European pig population is often referred to as "avian-like" virus since it contains entire avian genes that are genetically distinct from the cH1N1 viruses. Currently, European H1N1 isolates contain an HA1 segment from both human and avian lineages while the remaining gene segments are still of avian origin (Zell et al., 2008). Thai H1N1 SIV contains surface HA1 and NA1 antigens from the North American (classical swine)- and Eurasian (avian-like)- swine lineages, respectively (Sreta

---

[*] Corresponding author at: Faculty of Veterinary Science and Emerging and Re-emerging Infectious Disease in Animals, Research Unit (CUEIDAs), Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd., Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand. Tel.: +66 0 2218 9615; fax: +66 0 2252 0779.
E-mail address: roongroje.t@chula.ac.th (R. Thanawongnuwech).

0378-1135/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vetmic.2010.09.019

et al., 2009; Takemae et al., 2008). Notably, this feature is uniquely shared among the pH1N1 viruses that emerged in early 2009 (Kingsford et al., 2009).

Swine production system in Thailand is different from the systems in North America and Europe. The production size in Thailand ranges from large industrialized farms (>1000 pigs) to backyard farms (<50 pigs). Pig housing in Thailand also consists of both closed housing or evaporation cooling system and open housing where natural air flow ventilates the units. Normally, Thai swine farm owners and farm workers including their spouses and children live on the farm. Such an environment provides an excellent human-animal interface for influenza virus cross-species transmission. The aim of this study was to investigate the serological evidence of influenza virus interspecies transmission among Thai swine workers and pigs on the farm. Tests for hemagglutination-inhibition (HI) antibodies against the Thai swine H1N1 viruses (swH1N1 and swH1N2) isolated from both farms and the representative Thai human H1N1 (huH1N1) and pH1N1 were performed on both human and swine populations. To evaluate the genetic diversity of the viruses utilized as HI test antigen, the HA1 genes of swH1N1 and swH1N2 viruses were sequenced followed by phylogenetic analysis adding huH1N1, pH1N1 and other reference H1 influenza viruses from GenBank.

2. Materials and methods

2.1. *Study population*

2.1.1. *Human population*

From 2008 to early 2009, sera from 78 swine-exposed participants were collected from two large scale commercial farms in the central-eastern region of Thailand. Subjects were farm owners ($n = 2$), pig handlers ($n = 52$), veterinarians ($n = 8$), farm cleaners ($n = 8$) and people working in the farm office ($n = 8$) with their age ranging from 18 to 59 years (50% males and 50% females). Sixty negative control subjects with no history of swine exposure (verified by personal interview) were voluntarily recruited from the Blood centre and hospital in the central-eastern region of Thailand. The non-swine-exposed control sera were obtained from 50% males and 50% females with their age ranging from 19 to 60 years. During the time of investigation all subjects were healthy with no influenza-like illness. The study had been approved by the institutional review board (137/2007record#400/49).

2.1.2. *Swine population*

Eighty-five pig serum samples were collected from farms A and B, 46 and 39 samples, respectively. Both farms maintained an open housing system. Swine serum was randomly sampled cross-sectionally from different age groups including gilts, sows, weaning and growing pigs.

2.2. *Influenza viruses for hemagglutination-inhibition (HI) test*

Influenza viruses used as HI test antigens included two swine and human influenza viruses each. The swine viruses, H1N1 (A/Swine/Thailand/CU-CB1/06; swH1N1) and H1N2 (A/Swine/Thailand/CU-CHK4/09; swH1N2) were isolated from the lungs of pigs during an outbreak of widespread illness among nursery pigs from farm A and B, respectively. Both isolates were propagated in MDCK cells as described previously (Kitikoon et al., 2006). The human viruses, Thai seasonal H1N1 (A/Thailand/CU41/06; huH1N1) and pandemic H1N1 2009 (A/Nonthaburi/102/09; pH1N1), accession numbers EU021246 and GQ150342, respectively were kindly provided by Professor Y. Poovorawan (Chulalongkorn University, Thailand).

2.3. *Hemagglutination-inhibition (HI) test*

Swine and human serum samples were pretreated with 20% kaolin and receptor-destroying enzyme (Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan) and influenza-specific antibody detection was performed with a standard HI assay (Yoon et al., 2004). Serum-only controls along with positive and negative serum controls (from influenza A seronegative rabbits hyperimmunized with swH1N1, swH1N2 and pH1N1 HI test antigens) were included with each set of samples tested. HI assays on swH1N1, swH1N2 and huH1N1 viruses were performed using 0.5% chicken RBC in phosphate buffered saline (PBS). Assays on pH1N1 virus were performed with 0.5% turkey RBC in PBS. Samples with HI titers ≥ 40 were considered positive evidence to previous exposure (Olsen et al., 2002).

2.4. *HA1 gene analysis of the Thai swine H1 viruses*

Viral RNA was extracted from swH1N1 and swH1N2 using the NucleoSpin Extract Viral RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and cDNAs were synthesized using universal primer (Uni12 primer 5′-AGCAAAAGCAGG-3′) and Omniscript RT kit (Qiagen, USA) followed by hemagglutinin (HA) gene amplification as described previously (Hoffmann et al., 2001). Complete HA gene sequencing was carried out by 1st BASE Company and analyzed by Bioedit Sequence Alignment Editor V.7.0.5.3. Sequences were submitted to Genbank [accession numbers, GU454848 (swH1N1) and GU454849 (swH1N2)]. The phylogenetic tree was constructed using MEGA4 with neighbor-joining method and 1000 bootstrap replicates (Saitou and Nei, 1987).

2.5. *Statistical analysis*

The differences between each group's HI geometric mean titers were measured using Wilcoxon/Kruskal–Wallis test or Rank sum test (JMP 5.1 Software, SAS Institute, Cary, NC). HI test results were also evaluated as dichotomous outcomes with HI titers ≥ 40 considered to be previously exposed to virus antigen. The association of occupational risks was then examined for statistical significance by Chi-square or two-sided Fisher's exact analyses. Analysis was performed using Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Version 2.3 (Dean et al., 2009).

3. Results

3.1. *Influenza virus antibodies in human population*

Fifty and 92% of swine-exposed workers from farm A and B, respectively had developed antibodies against the SIV isolate circulating on the corresponding farm (Table 1). The SIV antibody positive participants included 2 farm owners (2/2, 100%), 46 pig handlers (46/52, 88.5%), 4 veterinarians (4/8, 50%), 5 farm cleaners (5/8, 62.5%) and 2 people working in the farm office (2/8, 25%). The participants from farms A and B seropositive to Thai huH1N1 amounted to 14.3 and 42%, respectively. However, none were seropositive to pH1N1. The difference in numbers of antibody positive samples between the farm workers and non-exposed controls was statistically significant ($p < 0.001$). When compared to the non-exposed control subjects, swine-exposed participants had increased odds of elevated antibody levels to SIV [swH1N1 odds ratio (OR) 42.63, 95% confidence interval (CI), 14.65–124 and swH1N2 OR 58, 95% CI 13.12–256.3].

3.2. *Influenza virus antibodies in swine population*

Overall, pigs from all age groups from both farms were found seropositive to both swH1N1 and swH1N2 viruses except for gilts on farm B proving seronegative to swH1N1 virus (data not shown). No huH1N1- or pH1N1-specific HI antibodies were detected in the studied pig population.

3.3. *HA1 sequence analysis of Thai swine H1 viruses*

Phylogenetic analysis based on the HA genes of swine H1 viruses revealed that the viruses grouped in the classical swine lineage cluster swH1α as two separate clades (classical swine a (Cla) and Clb) (Table 2 and Fig. 1). Data indicated that swH1N1 and swH1N2 differed by less than 3.2% and 4.2% from the representative strain of Clb and Cla, respectively (Table 2). Genetic analysis has shown that the HA1 genes of all Thai H1N1 human influenza viruses isolated prior to 2009 (with the exception of A/Thailand/271/05 (H1N1)) have HA genes of human origin and are distinct from the Thai swine H1 viruses (less than 80% similarity). The HA gene of huH1N1 differed by less than 3.3% at the nucleotide level when compared to other Thai human H1N1 (isolated during 2006–2008) and human H1N1 strains incorporated into the human influenza vaccines during 2007–2009 (Table 2). These Thai seasonal human H1N1 isolates shared 98.9% amino acid homology of the HA protein indicating antigen similarity between seasonal human H1N1 viruses isolated in Thailand during 2006–2008 (data not shown).

Table 1
Hemagglutination-inhibition titers and percentage of seropositive serum samples from farm and control humans against the Thai swine and human influenza viruses and pandemic H1N1 2009 virus.

Test antigens	Farm A ($n = 28$)		Farm B ($n = 50$)		Control participants ($n = 60$)	
	HI titer	% (n)	HI titer	% (n)	HI titer	% (n)
swH1N1	40^{b}	50 (14)	160^{c}	96 (48)	10^{a}	5 (3)
swH1N2	20^{b}	21.4 (6)	80^{c}	92 (46)	10^{a}	3.3 (2)
huH1N1	10	14.3 (4)	20	42 (21)	5	1.7 (1)
pH1N1	10	0 (0)	10	0 (0)	5	0 (0)

Mean titers with different exponential letters within a row are statistically significant ($p > 0.0001$). HI titer ≥ 40 are considered seropositive and indicate previous infection. swH1N1 = A/Sw/Thailand/CU-CB1/06 (H1N1) isolated from pigs in farm A. swH1N2 = A/Sw/Thailand/CU-CHK4/09 (H1N2) isolated from pigs in farm B. huH1N1 = A/Thailand/CU41/06 (H1N1). pH1N1 = A/Nonthaburi/102/09 (H1N1).

Table 2
Percent homology of the HA genes of swH1N2, swH1N1, huH1N1 and pH1N1 compared to reference swine and human H1 viruses available at the GenBank database.

Species of origin (cluster)	Strain	Designation	% nucleotide homology		
			swH1N2	swH1N1	huH1N1
Swine (swH1α)	A/Sw/Thailand/CU-CHK4/09(H1N2)	swH1N2	100.0	85.8	71.1
	A/Sw/Thailand/CU-CB1/06 (H1N1)	swH1N1	85.8	100.0	72.5
	A/Sw/Ratchaburi/NIAH1481/00(H1N1)	swRat00^{a}	96.8	86.2	72.0
	A/Sw/Chonburi/NIAH589/05(H1N1)	swChon^{b}	80.5	95.8	72.2
Swine (swH1γ)	A/Sw/Indiana/P12439/00(H1N2)	swIN00	87.9	86.1	69.7
	A/Nonthaburi/102/09(H1N1)	pH1N1	85.5	83.4	69.6
	A/Thailand/CU-B5/09(H1N1)	pH1N1	85.6	83.4	69.3
Thai	A/Thailand/CU41/06(H1N1)	huH1N1	71.1	72.5	100.0
Human	A/Thailand/500/07(H1N1)	huH1N1/07	79.2	77.7	96.7
Seasonal	A/Thailand/669/08(H1N1)	huH1N1/08	76.4	77.7	97.3
Human	A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Vaccine 2007	73.3	74.1	97.5
H1N1	A/Solomon Islands/3/06(H1N1)	Vaccine 2008	69.6	71.4	99.1
Vaccine	A/Brisbane/59/07(H1N1)	Vaccine 2009	72.8	73.2	97.9

[a] Representative strain of Thai swine H1 classical swine a (Cla) (Takemae et al., 2008).

[b] Representative strain of Thai swine H1 classical swine b (Clb) (Takemae et al., 2008).

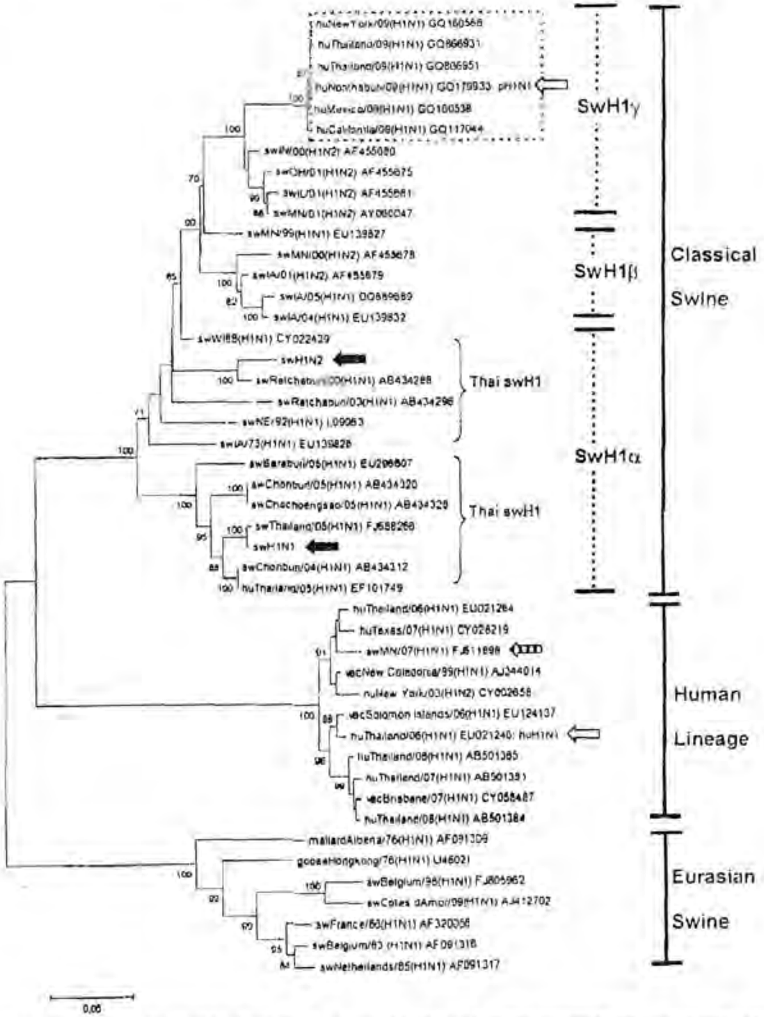

huNewYork/09(H1N1) GQ160566
huThailand/09(H1N1) GQ866931
huThailand/09(H1N1) GQ866951
huNonthaburi/09(H1N1) GQ179933: pH1N1
huMexico/09(H1N1) GQ100538
huCalifornia/09(H1N1) GQ117044
swIN/00(H1N2) AF455680
swOH/01(H1N2) AF455675
swIL/01(H1N2) AF455681
swMN/01(H1N2) AY060047
swMN/99(H1N1) EU139827
swMN/00(H1N2) AF455678
swIA/01(H1N2) AF455679
swIA/05(H1N1) DQ889689
swIA/04(H1N1) EU139832
swWI/88(H1N1) CY022429
swH1N2
swRatchaburi/00(H1N1) AB434288
swRatchaburi/03(H1N1) AB434296
swNE/92(H1N1) L09063
swIA/73(H1N1) EU139828
swSaraburi/05(H1N1) EU296807
swChonburi/05(H1N1) AB434320
swChachoengsao/05(H1N1) AB434328
swThailand/05(H1N1) FJ688268
swH1N1
swChonburi/04(H1N1) AB434312
huThailand/05(H1N1) EF101749
huThailand/06(H1N1) EU021264
huTexas/07(H1N1) CY026219
swMN/07(H1N1) FJ611898
vacNew Caledonia/99(H1N1) AJ344014
huNew York/03(H1N2) CY002658
vacSolomon Islands/06(H1N1) EU124137
huThailand/06(H1N1) EU021240: huH1N1
huThailand/08(H1N1) AB501385
huThailand/07(H1N1) AB501391
vacBrisbane/07(H1N1) CY058487
huThailand/08(H1N1) AB501384
mallardAlberta/76(H1N1) AF091309
gooseHongkong/76(H1N1) U46021
swBelgium/98(H1N1) FJ805962
swCotes dArmor/99(H1N1) AJ412702
swFrance/80(H1N1) AF320056
swBelgium/83 (H1N1) AF091316
swNetherlands/85(H1N1) AF091317
100
87
100
70
90
99
88
85
100
82
100
100
71
100
100
100
95
100
88
100
91
100
88
96
99
100
92
100
99
95
84
SwH1γ
SwH1β
SwH1α
Thai swH1
Thai swH1
Classical
Swine
Human
Lineage
Eurasian
Swine
0.05

Fig. 1. Phylogenetic tree for the HA1 segment based on nucleotide sequence of the Thai swine (swH1N1 and swH1N2) and human (huH1N1 and pH1N1) influenza viruses and other sequences available at GenBank. Three clusters of related classical swine H1 viruses, swH1α (classical swine H1N1), swH1β (reassorted H1N1-like) and swH1γ (H1N2-like) are shown (Vincent et al., 2009). The black arrow indicates the Thai swine H1 isolates sequenced and analyzed in this study. The open arrow indicates human viruses used as hemagglutination-inhibition (HI) test antigen. The striped arrow indicates the representative human-like virus isolated in 2007 from pigs in North America that grouped with swH1δ (human-like H1). Isolates in the dotted square box are the pandemic H1N1 2009 viruses. The reference influenza viruses used for the analysis are host abbreviated (sw swine; hu human; vac human influenza vaccine) followed by place and year of origin, subtype and GenBank accession number. The length of the horizontal lines is proportional to the minimum number of nucleotide differences required to join nodes.

4. Discussion

Previous genetic analysis of Thai swine H1 viruses (subtypes, H1N1 and H1N2) has demonstrated that Thai HA1 genes isolated in the course of 2000–2005 were derived from the North American classical-swine lineage and are separated into 2 subclusters (Cla and Clb) (Takemae et al., 2008). The HA1 genes of the Thai swine H1 viruses isolated in 2006 and 2009 were largely homologous to the previous Thai swine H1 viruses. In addition, recent isolates, swH1N2 and swH1N1 were placed into 2 separate subclusters Cla and Clb, respectively, similar to older isolates from the same provinces (Takemae et al., 2008). Phylogenetically, both old and new Thai swine H1 viruses were genetically distinct from the Thai seasonal human H1N1 (huH1N1) viruses (2006–2008), human H1N1 vaccine strains (vacH1N1) included into the 2007–2009 human influenza vaccines and pH1N1 viruses. The Thai huH1N1 viruses, however, grouped with A/Swine/Minnesota/07002083/07 virus which was isolated from pigs in North America and previously grouped with a new cluster, swH1δ consisting of HA1 genes of human origin (Vincent et al., 2009).

The lack of control antibodies against the huH1N1 HI test antigens has been a limitation to our study. However, recent research has reported minimal cross-reactivity between HI antibodies raised against swH1α virus and antibodies raised against swH1δ and pH1N1 viruses and vice versa (Vincent et al., 2009). HI antibodies against swH1N1 and swH1N2 viruses from pigs on both farms indicated the endemic nature of both viruses. The studied pigs were seronegative to huH1N1 and pH1N1 indicating no human-to-swine influenza virus transmission during the investigation period. Importantly, swine workers infected with seasonal huH1N1 viruses should neither work nor have contact with pigs in order to lower the potential of human-to-pig viral transmission. The timing of this investigation (2008 to early 2009) was prior to the emergence of pH1N1 in the human population (April 2009) confirming the absence of pH1N1 virus at least on these pig farms.

In contrast, serological analysis of human sera clearly indicated swine-to-human influenza virus transmission having occurred on both farms. Almost all swine-exposed participants (except for one) in this study had no history of human influenza virus vaccination, therefore, confounding cross-reactive human vaccine H1-antisera to Thai swine H1 viruses are limited. Based on phylogenetic analysis, confounding cross-reactive human sera with Thai huH1N1- antibodies to the Thai swine H1 viruses are also less likely. Former studies in the U.S. have listed swine exposure as an important risk factor for humans to contract SIV infection and increased odds of elevated SIV-antibody titers in such human populations were detected (Gray et al., 2007; Olsen et al., 2002). The increased odds of elevated SIV-specific antibodies detected among the Thai swine-exposed workers (swH1N1 OR 42.6 and swH1N2 OR 58) were close to the findings described by another study (OR 54.9) conducted on North American swine workers (Gray et al., 2007). The distinctive cluster among the HA1 genes of contemporary Thai swine H1 viruses and Thai huH1N1 and vacH1N1 viruses suggests that Thai swine-exposed workers might not have been protected against the Thai swine H1 viruses even if they had been vaccinated with the previously available human influenza vaccines. To date, the pH1N1 strain has been included into the 2010 human influenza vaccines. However, cross-protection provided by the vaccine to the contemporary Thai swine H1 viruses requires further investigation. Swine-exposed populations as the frontline of contracting SIV, particularly in Thailand should be concerned since (1) swine influenza vaccination is not performed on Thai swine farms; (2) clinical signs in pigs are hard to identify on endemic farms which renders personal protection management difficult; and (3) most pig handlers are uneducated migrant workers from neighboring countries. Therefore, continuous monitoring for SIV infection, education on self-protection and additional research aimed at characterizing specific risk factors unique to the populations are required to help implement future influenza control programs.

Acknowledgements

The authors would like to thank Drs. M. Mekhanon, C. Boonyongmaneerat, S. Prapatsornpinyo, N. Bunpapong and S. Kesdangsakonwut for their help in sample collection. We also would like to thank Dr. S. Payungporn for preparation of the Thai human H1N1 virus and Ms. Linda Vimolket for human serum sample collection. We appreciate the assistance of Ms D. Prakairungnamthip and S. Wattanodorn in sample preparation and Ms. P. Hirsch in manuscript editing. We are grateful to Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project for supporting facilities. This study was supported by a grant from the National Research Council of Thailand and partially funded by Emerging Health Risk Cluster, The Rachadapiseksompoch Endowment Fund, Chulalongkorn University.

References

Dean, A.G., Sullivan, K.M., Soe, M.M., 2009. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Georgia Emory University, Atlanta.

Easterday, B.C., Van Reeth, K., 1999. Swine influenza. In: Straw, B.E., D'Allaire, S.D., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 277–290.

Gray, G.C., McCarthy, T., Capuano, A.W., Setterquist, S.F., Olsen, C.W., Alavanja, M.C., 2007. Swine workers and swine influenza virus infections. Emerg. Infect. Dis. 13, 1871–1878.

Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R., 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch. Virol. 146, 2275–2289.

Karasin, A.I., Carman, S., Olsen, C.W., 2006. Identification of human H1N2 and human-swine reassortant H1N2 and H1N1 influenza A viruses among pigs in Ontario Canada (2003 to 2005). J. Clin. Microbiol. 44, 1123–1126.

Katsuda, K., Sato, S., Shirahata, T., Lindstrom, S., Nerome, R., Ishida, M., Nerome, K., Goto, H., 1995. Antigenic and genetic characteristics of H1N1 human influenza virus isolated from pigs in Japan. J. Gen. Virol. 76 (Pt. 5), 1247–1249.

Kingsford, C., Nagarajan, N., Salzberg, S.L., 2009. 2009 Swine-origin influenza A (H1N1) resembles previous influenza isolates. PLoS One 4, e6402.

Kitikoon, P., Nilubol, D., Erickson, B.J., Janke, B.H., Hoover, T.C., Sornsen, S.A., Thacker, E.L., 2006. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. Vet. Immunol. Immunopathol. 112, 117–128.

Myers, K.P., Olsen, C.W., Gray, G.C., 2007. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. Clin. Infect. Dis. 44, 1084–1088.

Olsen, C.W., Brammer, L., Easterday, B.C., Arden, N., Belay, E., Baker, I., Cox, N.J., 2002. Serologic evidence of H1 swine influenza virus infection in swine farm residents and employees. Emerg. Infect. Dis. 8, 814–819.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.

Sreta, D., Kedkovid, R., Tuamsang, S., Kitikoon, P., Thanawongnuwech, R., 2009. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. Virol. J. 6, 34.

Takemae, N., Parchariyanon, S., Damrongwatanapokin, S., Uchida, Y., Ruttanapumma, R., Watanabe, C., Yamaguchi, S., Saito, T., 2008. Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. Influenza Other Respi. Viruses 2, 181–189.

Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Gramer, M.R., Richt, J.A., Janke, B.H., 2009. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. Virus Genes.

Yoon, K.J., Janke, B.H., Swalla, R.W., Erickson, G., 2004. Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses. J. Vet. Diagn. Invest. 16, 197–201.

Zell, R., Bergmann, S., Krumbholz, A., Wutzler, P., Durrwald, R., 2008. Ongoing evolution of swine influenza viruses: a novel reassortant. Arch. Virol. 153, 2085–2092.