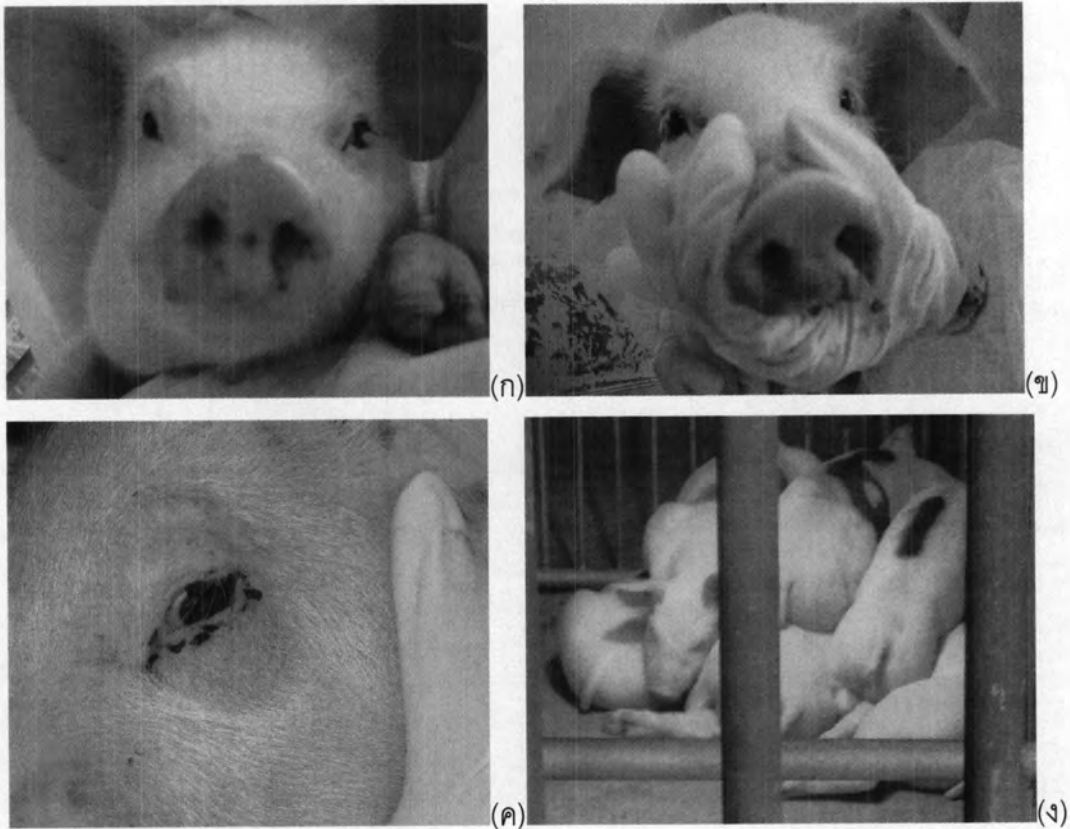


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 อาการทางคลินิก

หลังจากฉีดไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (วันที่ 0 ของการทดลอง) ให้แก่สุกรกลุ่ม H3N2 และกลุ่ม H1N2 ทางหลอดลม พบว่าสุกรแสดงอาการของโรกระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันที่บ่งบอกถึงการเกิดโรคไข้หวัดใหญ่สุกร ได้แก่ มีน้ำมูกใส ไอจาม เยื่อตาอักเสบ หายใจเหนื่อยหอบและนอนซึม (ภาพที่ 6) โดยพบว่าสุกรในกลุ่ม H3N2 เริ่มแสดงอาการตั้งแต่วันที่ 1 หลังการให้เชื้อ โดยพบสุกรมีน้ำมูกใสในวันที่ 1-5 หลังการให้เชื้อ มีไข้ต่ำเล็กน้อยในวันที่ 1-2 หลังการให้เชื้อ และพบการไอหรือจามในวันที่ 2-7 หลังการให้เชื้อ ส่วนสุกรในกลุ่ม H1N2 เริ่มพบมีน้ำมูกใสตั้งแต่วันที่ 1-4 หลังการให้เชื้อ และพบมีน้ำมูกปริมาณมากในวันที่ 4 หลังการให้เชื้อ พบสุกรมีไข้ต่ำเล็กน้อยในวันที่ 1-2 หลังการให้เชื้อ และพบการไอหรือจามในวันที่ 2-4 หลังการให้เชื้อ และพบพฤติกรรมนอนซึมได้ทั้งในกลุ่ม H3N2 และ H1N2 ในวันที่ 1-4 หลังการให้เชื้อ เมื่อนำค่าคะแนนอาการทางคลินิกของแต่ละกลุ่มมาเปรียบเทียบกัน พบว่ากลุ่ม H1N2 มีคะแนนสูงกว่ากลุ่ม H3N2 ในวันที่ 1-4 หลังการให้เชื้อ แต่ในวันที่ 5 หลังการให้เชื้อ พบว่ากลุ่ม H3N2 มีคะแนนสูงกว่า เนื่องจากมีสุกรทดลองเพียงกลุ่มละ 2 ตัวและสุกรหนึ่งตัวในกลุ่ม H3N2 ยังพบน้ำมูกใสเล็กน้อย แต่ในวันที่ 5 หลังให้เชื้อไม่พบอาการทางคลินิกในกลุ่ม H1N2 และสังเกตพบเยื่อตาอักเสบในวันที่ 7 หลังการให้เชื้อ ทั้งกลุ่ม H3N2 และ H1N2 ส่วนสุกรในกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ที่ปราศจากเชื้อ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอาการทางคลินิก (ภาพที่ 7) และผลการวัดอุณหภูมิทางทวารหนัก (ภาพที่ 8) พบว่าสุกรในทั้ง 3 กลุ่มไม่มีไข้ (< 40 องศาเซลเซียส) พบอุณหภูมิสูงสุด 39.9 องศาเซลเซียส จากสุกรในกลุ่ม H1N2 ในวันที่ 1 หลังการให้เชื้อ

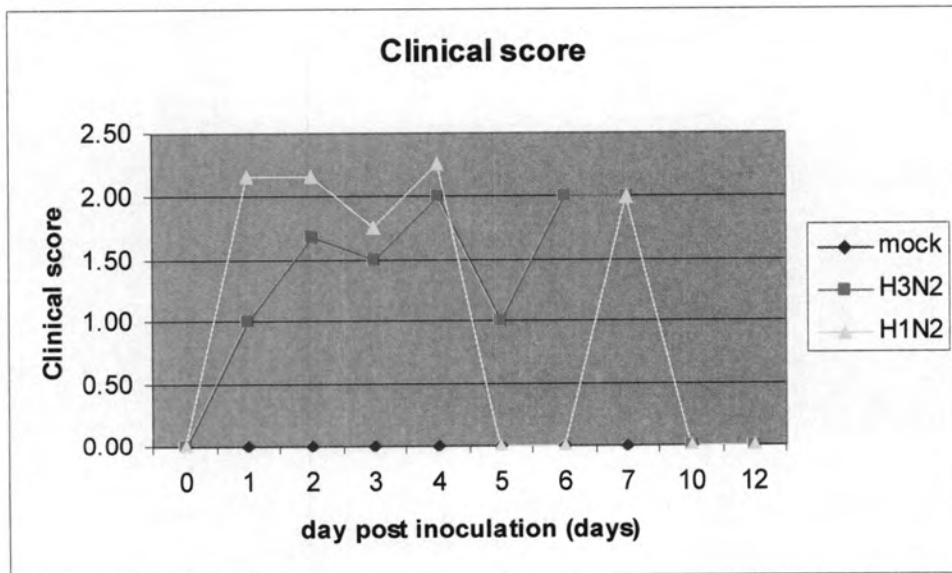


ภาพที่ 6 แสดงอาการทางคลินิกของโรคระบบหายใจเฉียบพลัน ณ วันที่ 1 หลังการให้เชื้อ

(ก) น้ำมูกใสของสุกรกลุ่ม H3N2 ณ วันที่ 1 หลังการให้เชื้อ

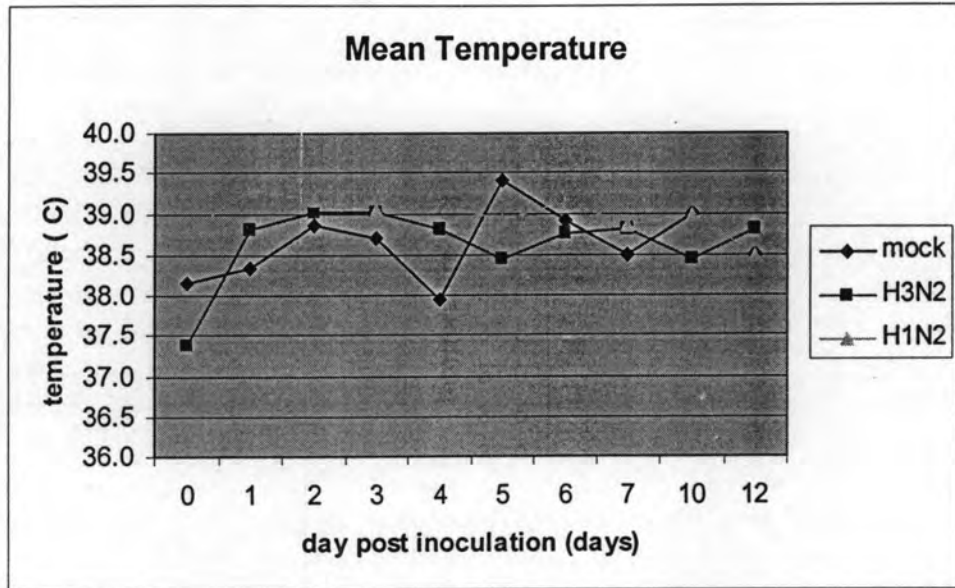
(ข) น้ำมูกใสของสุกรกลุ่ม H1N2 ณ วันที่ 1 หลังการให้เชื้อ

(ค) เยื่อตาอักเสบ และ (ง) นอนซึม ในกลุ่ม H3N2 ณ วันที่ 1 หลังการให้เชื้อ



ภาพที่ 7 แสดงระดับคะแนนอาการทางคลินิกของสุกรทดลองในแต่ละกลุ่ม





ภาพที่ 8 แสดงผลการวัดอุณหภูมิทางทวารของสุกรทดลองทั้ง 3 กลุ่ม

4.2 การตรวจทางโลหิตวิทยา

ค่าทางโลหิตวิทยาตลอดการทดลอง พบว่าสุกรหนึ่งตัวในกลุ่ม H3N2 มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำ (ต่ำกว่าร้อยละ 32) ค่าฮีโมโกลบินต่ำ (ต่ำกว่า 10 กรัมต่อเดซิลิตร) และมีจำนวนเม็ดเลือดแดงต่ำ (ต่ำกว่า 5 ล้านเซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) ในวันที่ 4 หลังการให้เชื้อ ส่วนสุกรตัวอื่นทั้งในกลุ่ม mock, H3N2 และ H1N2 มีค่าทางโลหิตวิทยาในระดับปกติ (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก) ส่วนปริมาณเม็ดเลือดขาวเฉลี่ย ณ วันเริ่มต้นการทดลอง พบว่าสุกรทุกกลุ่มมีค่าเม็ดเลือดขาวอยู่ในภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (เม็ดเลือดขาวต่ำกว่า 9,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) หลังจากนั้นพบว่าเม็ดเลือดขาวอยู่ในระดับปกติจนสิ้นสุดการทดลอง และค่าเม็ดเลือดขาวในทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ และพบว่าสุกรในกลุ่ม H1N2 มีค่าเม็ดเลือดขาวอยู่ในภาวะเม็ดเลือดขาวสูง (เม็ดเลือดขาวมากกว่า 20,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) ในวันที่ 12 หลังการให้เชื้อ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาว (mean \pm SD, เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) ณ วันที่ทำการทดลอง

วันที่ทำการทดลอง	mock	H3N2	H1N2
0	6,767 \pm 617 (3)*	8,267 \pm 2,824 (6)	7,979 \pm 2,427 (6)
2	15,000 \pm 3617 (3)	14,220 \pm 3,134 (6)	14,730 \pm 5,437 (6)
4	14,350 \pm 565 (2)	10,740 \pm 3,213 (4)	15,100 \pm 4,148 (4)
12	17,150 (1)	15,250 \pm 3,041 (2)	20,230 \pm 9,086 (2)

* จำนวนตัวอย่าง

4.3 เซลล์วิทยาของน้ำล้างปอดและหลอดลม

ผลการนับแยกชนิดเซลล์ในตัวอย่างน้ำล้างปอดและหลอดลม แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละจากการนับแยกชนิดเซลล์ในจำนวนเซลล์ทั้งหมด 100 เซลล์ พบว่าในตัวอย่างน้ำล้างปอดและหลอดลม ประกอบด้วย มาโครฟาจ ลิมโฟไซต์ และนิวโทรฟิล (ดังตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ในตัวอย่างน้ำล้างปอดและหลอดลม

วันที่ทดลอง	ชนิดเซลล์	mock	H3N2	H1N2
2	macrophage	84.00	84.00	85.33
	neutrophil	1.25	3.00	6.50
	lymphocyte	14.57	11.13	8.125
4	macrophage	88.50	81.63	86.00
	neutrophil	4.00	5.60	0.50
	lymphocyte	8.75	12.75	13.50
12	macrophage	89.00	87.50	78.50
	neutrophil	1.75	1.38	4.50
	lymphocyte	9.25	11.13	17.00

4.4 รอยโรคทางพยาธิวิทยา

4.4.1 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา

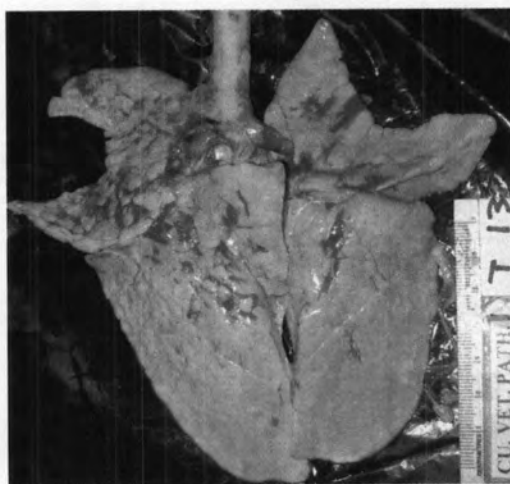
พบลักษณะรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของปอดที่บ่งถึงการอักเสบของปอด ในกลุ่ม H3N2 และ H1N2 ได้ตั้งแต่วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ โดยพบบริเวณปอดอักเสบสีแดงคล้ำ มีขอบเขตชัดเจน มีความแน่น และบวม น้ำที่ระหว่างกลีบปอดค่อย และต่อมน้ำเหลืองที่หลอดลมและขั้วปอดมีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ 2-3 เท่า (ภาพที่ 9) พบรอยโรครุนแรงในวันที่ 2 หลังการให้เชื้อ และลดลงตามลำดับในวันที่ 4 และ 12 หลังการให้เชื้อ โดยพบว่าบริเวณปอดอักเสบอยู่ที่กลีบปอดส่วนหน้า กลีบปอดส่วนกลาง กลีบปอดข้างหัวใจ รวมทั้งกลีบปอดส่วนล่างบางส่วนด้วย เมื่อประเมินค่าเป็นร้อยละของพื้นที่ปอดอักเสบพบว่ากลุ่ม H1N2 มีค่าร้อยละของปอดอักเสบมากกว่ากลุ่ม H3N2 และพบว่ากลุ่ม H1N2 มีรอยโรคที่ปอดนานถึงวันที่ 12 หลังการให้เชื้อ ในขณะที่กลุ่ม H3N2 ไม่พบรอยโรคที่ปอดในวันที่ 12 หลังการให้เชื้อ (ตารางที่ 7) พบต่อมน้ำเหลืองที่บริเวณปอดและหลอดลมมีขนาดใหญ่ขึ้น 2-3 เท่า ในสุกรทดลองกลุ่ม H3N2 และ H1N2 ณ วันที่ 2 และ 4 หลังการให้เชื้อ ส่วนสุกรในกลุ่ม mock ไม่พบรอยโรคที่ปอดและต่อมน้ำเหลือง (ภาพที่ 9) ที่ทอนซิลและกระดุกเทอร์ไบเนตพบจุดเลือดออกขนาดเท่าเข็มหมุดกระจาย ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อในกลุ่ม H3N2 และ H1N2 นอกจากนี้ยังพบจุดเลือดออกขนาดเท่าเข็มหมุดที่ไต 3-4 จุด (3-4 red pin point foci) ในสุกรกลุ่ม H3N2 ณ วันที่ 2 และ 4 หลังการให้เชื้อ ส่วนในกลุ่ม H1N2 พบจุดเลือดออกที่ไตขนาดเท่าเข็มหมุดกระจายทั่วผิวไตในวันที่ 12 หลังการให้เชื้อ พบถุงน้ำที่ไตจำนวน 1-3 จุดในสุกรทดลองทั้ง 3 กลุ่ม และไม่พบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่อวัยวะอื่นๆ ของร่างกาย เช่น ตับ ม้าม ตับอ่อน ลำไส้ หัวใจ เป็นต้น

ตารางที่ 7 แสดงร้อยละของปอดอักเสบทางมหพยาธิวิทยา

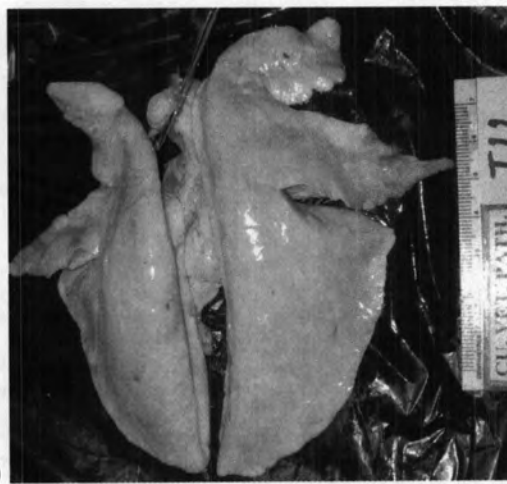
วันที่ทดลอง	mock*	H3N2**		H1N2**	
	ตัวที่ 1 (%)	ตัวที่ 1 (%)	ตัวที่ 2 (%)	ตัวที่ 1 (%)	ตัวที่ 2 (%)
2	0.0	20.0	2.0	36.0	33.0
4	0.0	2.0	1.0	5.0	3.0
12	0.0	0.0	0.0	6.0	0.5

*mock ชั้นสุตรวันละ 1 ตัว

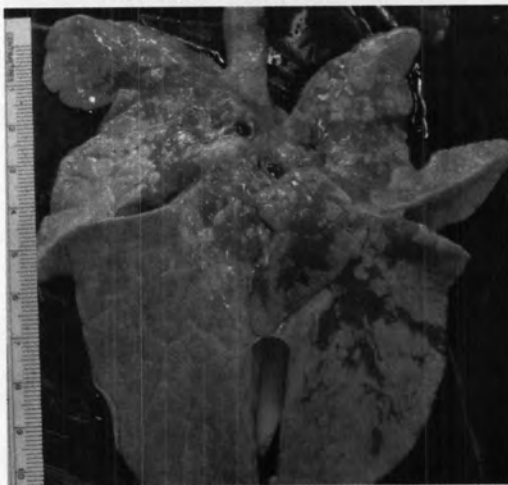
**H3N2 และ H1N2 ชั้นสุตรวันละ 2 ตัว



(ก)



(ข)



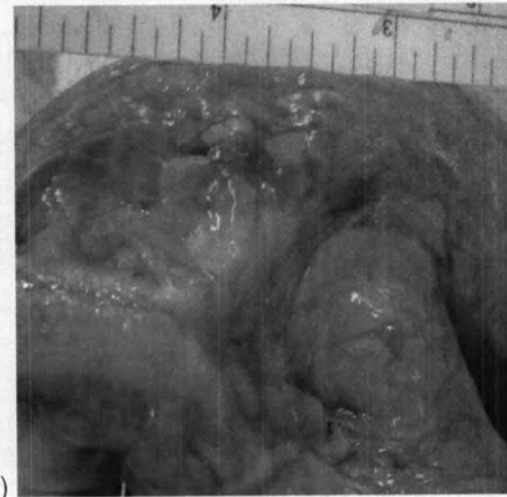
(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะปอดทางมพยาธิวิทยา

- (ก) และ (ข) ปอดอักเสบกลุ่ม H3N2 ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ
 (ค) และ (ง) ปอดอักเสบกลุ่ม H1N2 ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ
 (จ) ปอดปกติในกลุ่มควบคุม (mock) ณ วันที่ 2 หลังการทดลอง
 (ฉ) ปอดอักเสบในกลุ่ม H1N2 ณ วันที่ 12 หลังการให้เชื้อ

4.4.2 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

พบลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ป่องถึงหลอดลมและปอดอักเสบ เยื่อปิวหลอดลม ถูกทำลายเสียหาย โดยตรวจพบลักษณะของเซลล์เยื่อปิวหลอดลมหดตัวแบนลง ซีเลียหายไป เกิดการตาย และมีการงอกขยายเพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์เยื่อปิวหลอดลมเรียงตัวหลายชั้นมากขึ้นและเสียรูปทรง พบลักษณะหลอดลมอักเสบแบบมีสิ่งซึมเยิ้ม (exudative bronchitis) โดยพบสิ่งคัดหลั่งปนเศษเซลล์ตาย เซลล์อักเสบชนิดมาโครฟาจและนิวโทรฟิลสะสมในท่อหลอดลม พบว่ามีลิมโฟไซต์และอีสตีโอไซต์แทรกเข้ามาล้อมรอบหลอดลมมากขึ้น และพบลักษณะปอดอักเสบแบบ interstitial pneumonia โดยพบเซลล์ปิวถุงลมปอดชนิด 2 (pneumocyte type 2) เพิ่มมากขึ้น ร่วมกับมีอีสตีโอไซต์และลิมโฟไซต์เข้ามาแทรกระหว่างถุงลมปอด ทำให้ผนังถุงลมปอดหนาตัว (ภาพที่ 10) เมื่อนำค่าเฉลี่ยคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาจากปอดทุกส่วนของสุกรทดลองในแต่ละกลุ่มมาเปรียบเทียบกัน (ตารางที่ 8 และ 9) พบหลอดลมอักเสบรุนแรงในวันที่ 2 หลังการให้เชื้อ และหลอดลมอักเสบน้อยในวันที่ 4 และ 12 หลังการให้เชื้อ ยกเว้นในกลุ่ม H1N2 พบหลอดลมอักเสบปานกลางในวันที่ 12 หลังการให้เชื้อ ส่วนค่าเฉลี่ยคะแนน interstitial pneumonia นั้น พบมีความรุนแรงปานกลางในวันที่ 2 หลังการให้เชื้อ และพบว่ามีค่าความรุนแรงต่ำในวันที่ 4 และ 12 หลังการให้เชื้อ แต่ในกลุ่ม mock ไม่พบรอยโรคของหลอดลมอักเสบและ interstitial pneumonia เลย นอกจากนี้ยังพบรอยโรคที่ทอนซิล มีการอักเสบของ crypt โดยพบการสะสมของเศษเซลล์ตาย นิวโทรฟิล และอีโอซิโนฟิลในช่องว่างของ crypt พบการงอกขยายของเซลล์ปิว crypt ซึ่งตรวจพบได้ในสุกรทดลองทุกตัว ที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณปอดและหลอดลมพบการบวมน้ำที่เยื่อหุ้มผิว การหายไป (mild depletion) และการงอกขยาย (mild proliferation) ของเซลล์ลิมโฟยด์กระจายเป็นหย่อมๆ ทั้งกลุ่ม H3N2 และ H1N2 ณ วันที่ 2 และ 4 หลังการให้เชื้อ ส่วนอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ หัวใจ ตับ ไต ม้าม ตับอ่อน ลำไส้ ไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยคะแนนรอยโรคหลอดลมอักเสบทางจุลพยาธิวิทยา จากชิ้นเนื้อปอด 4 ส่วน ได้แก่ กลีบปอดส่วนหน้า กลีบปอดข้างหัวใจ กลีบปอดส่วนล่าง และกลีบปอดส่วนกลาง

วันที่ทดลอง	mock*	H3N2**		H1N2**	
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2
2	0.0	3.75	2.00	3.75	3.75
4	0.0	1.00	0.75	1.00	0.75
12	0.0	0.75	0.5	2.00	0.75

*mock ขึ้นสูตรวันละ 1 ตัว

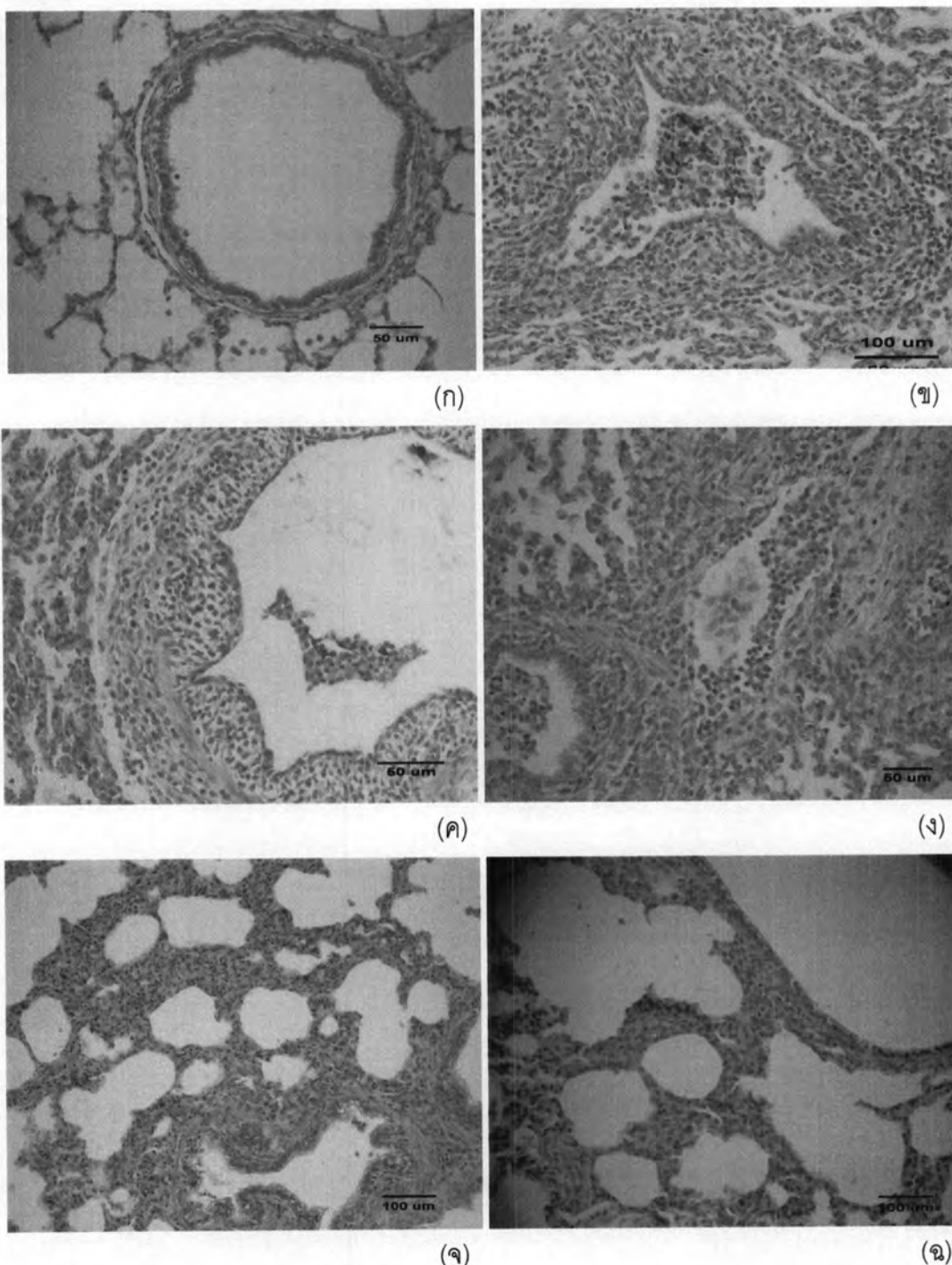
**H3N2 และ H1N2 ขึ้นสูตรวันละ 2 ตัว

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยคะแนนรอยโรค interstitial pneumonia จากชิ้นเนื้อปอด 4 ส่วน ได้แก่ กลีบปอดส่วนหน้า กลีบปอดข้างหัวใจ กลีบปอดส่วนล่าง และกลีบปอดส่วนกลาง

วันที่ทดลอง	mock*	H3N2**		H1N2**	
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2
2	0.0	1.75	1.00	1.75	2.00
4	0.0	0.50	0.25	0.50	0.25
12	0.0	0.50	0.50	1.25	0.50

*mock ขึ้นสูตรวันละ 1 ตัว

**H3N2 และ H1N2 ขึ้นสูตรวันละ 2 ตัว



ภาพที่ 10 แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของปอดจาก H&E staining

- (ก) ปอดและหลอดลมปกติในกลุ่ม mock ณ วันที่ 2 หลังการทดลอง
- (ข) หลอดลมอักเสบในกลุ่ม H3N2 ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ
- (ค) เยื่อปิวหลอดลมแบนตัวและซีเลียวหายไป ในกลุ่ม H1N2 ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ
- (ง) หลอดลมอักเสบร่วมกับการแทรกของอีสติโอไซต์และลิมโฟไซต์รอบหลอดลมในกลุ่ม H3N2 ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ
- (จ) ปอดอักเสบชนิดผนังถุงลมปอดหนาตัว ในกลุ่ม H1N2 ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ
- (ฉ) ปอดอักเสบชนิดผนังถุงลมปอดหนาตัว ในกลุ่ม H3N2 ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ

4.5 การกระจายตัวของแอนติเจน

4.5.1 การกระจายตัวของแอนติเจนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรโดยวิธี IFA

การกระจายตัวของแอนติเจนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรโดยวิธี IFA อ่านผลบวกโดยพบการเรืองแสงสีเขียว (positive apple-green) ที่นิวเคลียสและไซโตพลาสซึม ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกลีบปอดส่วนหน้าข้างขวา พบมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 หลังการให้เชื้อ (ตารางที่ 10) โดยพบว่ากลุ่ม H3N2 และ H1N2 มีค่าใกล้เคียงกัน โดยพบแอนติเจนในเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมเป็นส่วนใหญ่ เซลล์เยื่อบุถุงลมปอดและมาโครฟาจเป็นส่วนน้อย และในวันที่ 4 หลังการให้เชื้อ พบการเรืองแสงสีเขียวในเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมลดลง แต่ยังพบการเรืองแสงในเซลล์เยื่อบุถุงลมปอดและมาโครฟาจได้ในปริมาณใกล้เคียงกับในวันที่ 2 หลังการให้เชื้อ ณ วันที่ 12 หลังการให้เชื้อในกลุ่ม H3N2 และ H1N2 พบการเรืองแสงสีเขียวได้ในมาโครฟาจ 1-2 เซลล์ใน 1 แผ่นสไลด์ ส่วนกลุ่ม mock พบการเรืองแสงสีเขียวได้ในมาโครฟาจ 1-2 เซลล์ใน 1 แผ่นสไลด์ ณ วันที่ 2, 4 และ 12 หลังการให้เชื้อ

ตารางที่ 10 แสดงคะแนนการกระจายตัวของแอนติเจนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในเนื้อเยื่อปอดโดยวิธี IFA จากชิ้นเนื้อกลีบปอดส่วนหน้า

วันที่ทดลอง	mock*	H3N2**		H1N2**	
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2
2	1	4	3	4	4
4	1	2	2	2	2
12	1	1	1	1	1

*mock ชั้นสุตรวันละ 1 ตัว

**H3N2 และ H1N2 ชั้นสุตรวันละ 2 ตัว

4.5.2 การกระจายตัวของแอนติเจนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรโดยวิธี IHC

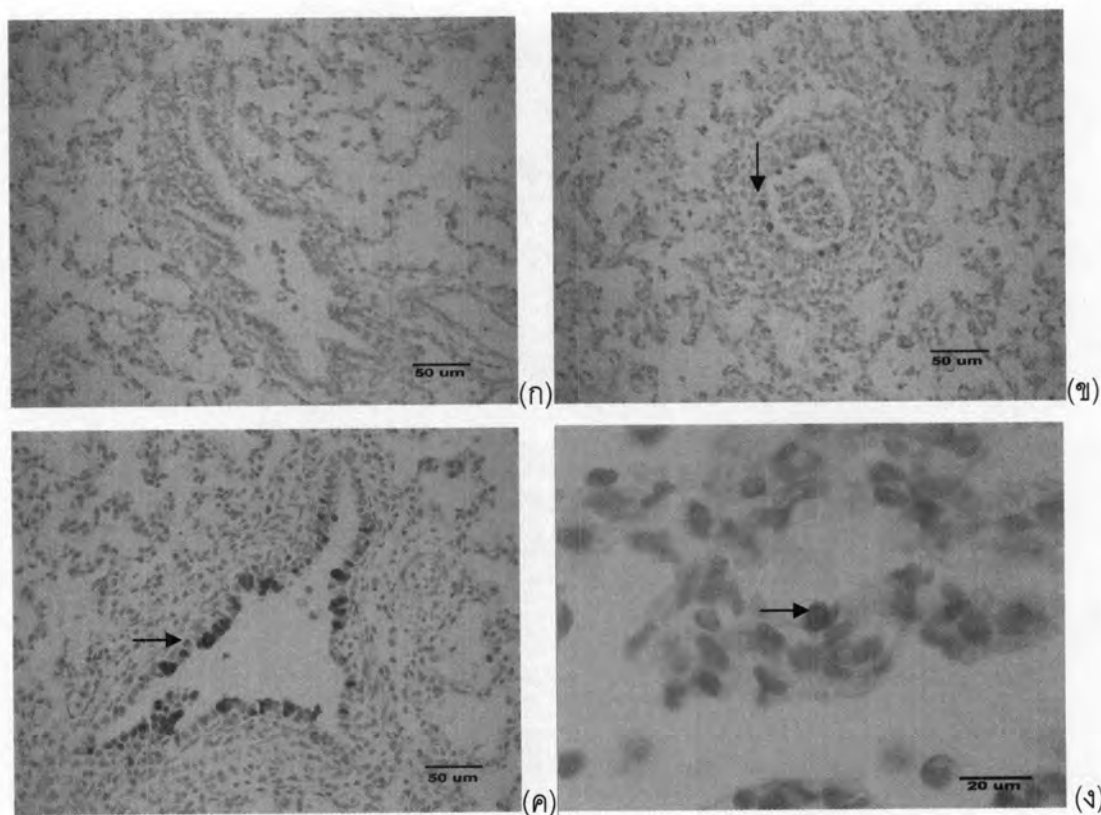
การกระจายตัวของแอนติเจนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรโดยวิธี IHC พบการติดสีน้ำตาลดำ (positive black brown reaction) ในนิวเคลียสและบางส่วนของไซโตพลาสซึมในเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมเป็นส่วนใหญ่ เซลล์เยื่อบุถุงลมปอดและมาโครฟาจเป็นส่วนน้อย โดยพบสูงสุดในวันที่ 2 หลังการให้เชื้อ ลดลงตามลำดับในวันที่ 4 และ 12 หลังการให้เชื้อทั้งในกลุ่ม H3N2 และ H1N2 ส่วนในวันที่ 12 หลังการให้เชื้อ ในกลุ่ม H3N2 ไม่พบแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร แต่ในกลุ่ม H1N2 ยังตรวจพบแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้ (ดังตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงคะแนนเฉลี่ยของการกระจายแอนติเจนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรโดยวิธี IHC จากชิ้นเนื้อปอด 4 ส่วน ได้แก่ กลีบปอดส่วนหน้า กลีบปอดข้างหัวใจ กลีบปอดส่วนล่าง และกลีบปอดส่วนกลาง

วันที่ทดลอง	mock*		H3N2**		H1N2**	
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2
2	0	4.00	0.75	4.00	2.00	
4	0	1.00	0	1.00	0.5	
12	0	0	0	0.25	0	

*mock วัคซีนตัววันละ 1 ตัว

**H3N2 และ H1N2 วัคซีนตัววันละ 2 ตัว



ภาพที่ 11 แสดงลักษณะการกระจายของแอนติเจน NP ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยเทคนิค IHC

(ก) negative control ไม่พบการติดสีน้ำตาลดำของแอนติเจน

(ข) positive control (หัวลูกศร) แอนติเจนติดสีน้ำตาลดำในนิวเคลียสของเซลล์บุผิวหลอดลม

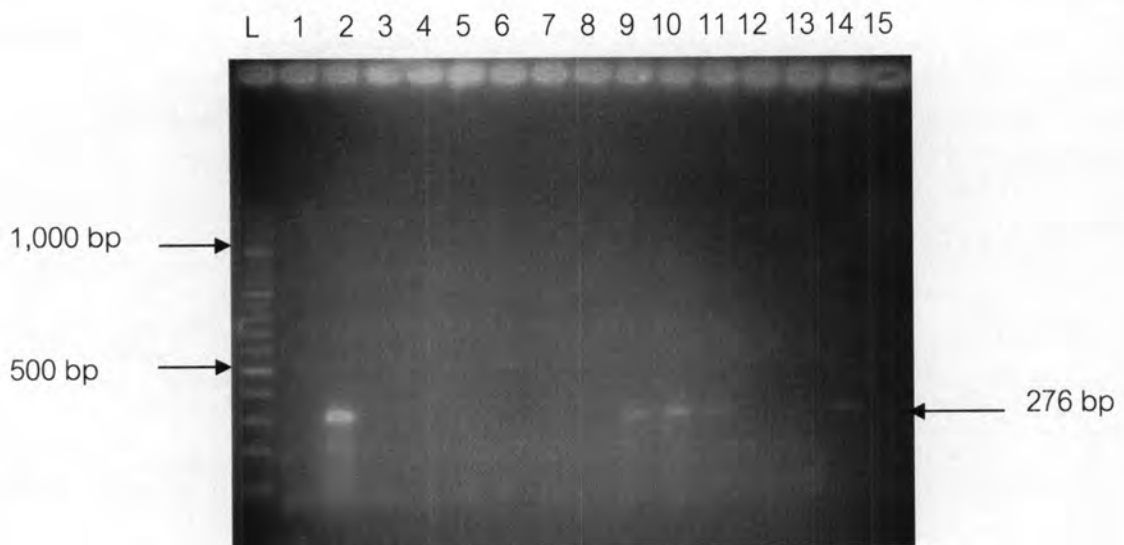
(ค) พบแอนติเจนติดสีน้ำตาลดำที่เซลล์บุผิวหลอดลม (หัวลูกศร) ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ

(ง) พบแอนติเจนติดสีน้ำตาลดำที่เซลล์บุผิวถุงลมปอด (หัวลูกศร) ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ

4.6 การศึกษาทางไวรัสวิทยา

จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยเทคนิค RT-PCR จากตัวอย่างป้ายจมูก สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในกลุ่มทดลองให้เชื้อได้ในวันที่ 2-4 หลังการให้เชื้อ โดยพบ 1 ตัวอย่างจากกลุ่ม H3N2 ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อ และในกลุ่ม H1N2 พบ 1 ตัวอย่าง ณ วันที่ 2 หลังการให้เชื้อและ 2 ตัวอย่าง ณ วันที่ 4 หลังการให้เชื้อ (ภาพที่ 12) ส่วนตัวอย่างป้ายจมูกจากกลุ่ม mock และตัวอย่างซีรัมจากทั้ง 3 กลุ่มไม่พบสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการไตเตรทปริมาณไวรัสร่วมกับเทคนิค IPMA ในกลุ่ม H3N2 พบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรมีปริมาณ $10^2 - 10^3$ TCID₅₀/ml จากน้ำล้างปอดและหลอดลม และปริมาณ 10^4 TCID₅₀/gm จากเนื้อเยื่อปอด ในวันที่ 2 หลังการให้เชื้อ และในวันที่ 4 และ 12 หลังการให้เชื้อ ไม่พบไวรัสจากการไตเตรท ส่วนในกลุ่ม H1N2 นั้นไม่สามารถบอกค่าได้ เนื่องจากมีการปนเปื้อนแบคทีเรียในช่วงการทดลองในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างน้ำล้างปอดและหลอดลมและเนื้อเยื่อปอดจากกลุ่ม mock ไม่พบไวรัสจากการไตเตรท



ภาพที่ 12 แสดงแถบของ PCR products ที่ได้จาก Primers ของยีน M บน agarose gel electrophoresis จากตัวอย่างป้ายจมูก: โดย L คือ 100-bp DNA ladder; 1-2 กลุ่ม H3N2 (2 dpi); 3-4 กลุ่ม H3N2 (4 dpi); 5-6 กลุ่ม H3N2 (12 dpi); 7-9 กลุ่ม H1N2 (2 dpi); 10-11 กลุ่ม H1N2 (4 dpi); 12-13 กลุ่ม H1N2 (12 dpi); 14 คือ positive control 276 bp; 15 คือ negative control; จากภาพตัวอย่างที่ 2 9 10 และ 11 ได้ PCR products เท่ากับ 276 bp

4.7 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

ณ วันเริ่มต้นการทดลอง พบว่าสุกรทุกกลุ่มให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสทีอาร์ อาร์ เอส และเชื้อ *M. hyopneumoniae* ด้วยวิธี ELISA (S/P ratio \geq 0.4 ถือว่าให้ผลบวก) และพบว่าสุกรทุกกลุ่มให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 และ H1N2 ด้วยวิธี HI test (HI titer \geq 40 ถือว่าให้ผลบวก) จากการทดลองพบว่าผลของระดับ HI titer ต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ของสุกรกลุ่ม H3N2 มีระดับถึง 1:40 ในวันที่ 4 หลังการให้เชื้อและพบสุกรเพียงหนึ่งตัวที่ยังคงมีระดับ HI titer ต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ถึง 1:40 จนถึงวันที่ 12 หลังการให้เชื้อ ในขณะที่สุกรในกลุ่ม mock และ H1N2 ให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ด้วยวิธี HI test ส่วนระดับ HI titer ต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ด้วยวิธี HI test พบว่าในวันที่ 12 หลังการให้เชื้อ ในกลุ่ม H1N2 มีระดับสูงถึง 1:160 ในขณะที่สุกรในกลุ่ม mock และ H3N2 ให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ด้วยวิธี HI test (ตารางที่ 12)

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 โดยวิธี ELISA นั้น สุกรทดลองทุกตัวไม่พบผลบวก (S/P ratio \geq 0.4) ต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2

ตารางที่ 12 แสดง HI titer ต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 และ H3N2

	Pig #	HI titer (H3N2)*				HI titer (H1N2)*			
		0 dpi	2 dpi	4 dpi	12 dpi	0 dpi	2 dpi	4 dpi	12 dpi
mock	1	< 10	< 10	ND	ND	20	10	ND	ND
	2	< 10	10	20	ND	20	10	10	ND
	3	< 10	< 10	< 10	10	10	10	10	10
H3N2	4	10	10	ND	ND	10	10	ND	ND
	5	10	20	40**	ND	10	10	< 10	ND
	6	10	10	ND	ND	10	10	ND	ND
	7	10	< 10	40**	10	10	10	10	10
	8	10	20	40**	ND	10	10	10	ND
	9	10	20	40**	40**	10	10	10	10
H1N2	10	< 10	< 10	10	< 10	< 10	< 10	< 10	160**
	11	< 10	10	10	ND	< 10	< 10	< 10	ND
	12	< 10	10	10	ND	< 10	< 10	10	ND
	13	< 10	< 10	ND	ND	< 10	10	ND	ND
	14	< 10	< 10	ND	ND	< 10	10	ND	ND
	15	< 10	< 10	10	< 10	< 10	10	10	160**

ND ไม่สามารถบอกค่าได้ เนื่องจากการอุณหภูมิต่ำกว่าวันที่เก็บตัวอย่างซีรัม

* ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่ใช้ในการตรวจ HI test

** HI titer \geq 40 ถือว่าให้ผลบวก

