บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการวิจัย

สุกรทดลองจำนวน 15 ตัว เพศผู้ อายุ 22 วัน ได้รับอนุญาตการใช้สัตว์ทดลองตามเลขที่ 55/2549 จากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วางแผนการศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่มการทดลอง (ตารางที่ 3) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีสุกรทดลองจำนวน 3 ตัวเป็นกลุ่มควบคุม โดยให้สารละลายที่ปราศจากเชื้อ (mock) ทางหลอดลมขนาด 5 มิลลิลิตรต่อตัว

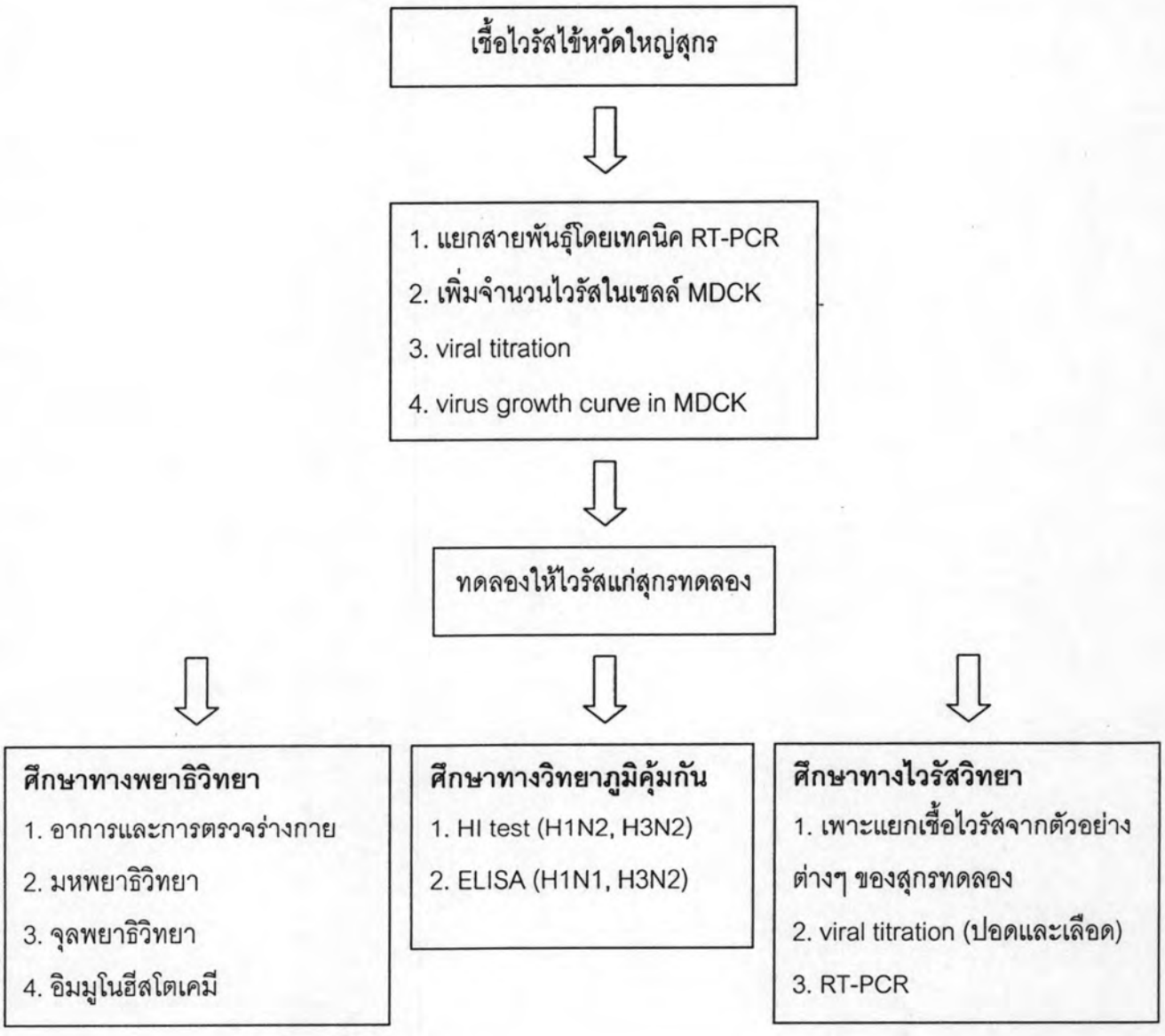
กลุ่มที่ 2 มีสุกรทดลองจำนวน 6 ตัว ศึกษาโดยการฉีดสารละลายที่มีเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ A/swine/Thailand/CB2/05 (H3N2) ทางหลอดลมในขนาด 5 มิลลิลิตรต่อตัว (10^7 $TCID_{50}$/ml)

กลุ่มที่ 3 มีสุกรทดลองจำนวน 6 ตัว ศึกษาโดยการฉีดสารละลายที่มีเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ A/swine/Thailand/CB1/05 (H1N2) ทางหลอดลมในขนาด 5 มิลลิลิตรต่อตัว (10^7 $TCID_{50}$/ml)

สุกรแต่ละกลุ่มถูกแยกเลี้ยงในห้องที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 (animal facility biosafety level 2) โดยให้อาหารที่มีโภชนาการตามอายุสุกรและน้ำสะอาดตลอดเวลา หลังจากนั้นสุ่มสุกรเพื่อชันสูตรและเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อหลังจากเริ่มทดลอง ณ วันที่ 2, 4 และ 12 โดยสุ่มสุกรจากกลุ่ม mock ครั้งละ 1 ตัว ส่วนกลุ่ม H3N2 และ H1N2 ครั้งละ 2 ตัว เพื่อศึกษารอยโรคทางมหพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยาและการกระจายตัวของแอนติเจนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสุกรทดลอง เก็บข้อมูลตลอดระยะเวลาการเลี้ยงสุกร บันทึกข้อมูลต่างๆ ดังนี้ การสังเกตอาการโดยทั่วไป การแสดงอาการทางระบบหายใจ วัดอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ทางทวารหนักทุกวัน เก็บตัวอย่างเลือดตรวจ complete blood count (CBC) เพื่อประเมินสุขภาพทั่วไปของสุกรทดลอง เก็บน้ำล้างปอดและหลอดลมเพื่อศึกษาทางเซลล์วิทยาและตรวจหาปริมาณไวรัส เก็บซีรัมเพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยวิธี ELISA, HI test และเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากช่องจมูกและเลือดร่วมกับการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 3 : แสดงแผนการใช้สุกรทดลอง

สุกรทดลอง	กลุ่มควบคุม (mock)	กลุ่ม H3N2	กลุ่ม H1N2
จำนวนสุกรเริ่มต้น (ตัว)	3	6	6
จำนวนสุกรที่ชันสูตรวันที่ 2 หลังให้เชื้อ (ตัว)	1	2	2
จำนวนสุกรที่ชันสูตรวันที่ 4 หลังให้เชื้อ (ตัว)	1	2	2
จำนวนสุกรที่ชันสูตรวันที่ 12 หลังให้เชื้อ (ตัว)	1	2	2



ภาพที่ 5 แสดงแผนภูมิการดำเนินการวิจัย

3.2 การเตรียมคอกและห้องสำหรับเลี้ยงสุกรทดลอง

สถานที่ใช้ทดลองในสุกรทดลอง ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 ของหน่วยสัตว์ทดลอง สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เตรียมความพร้อมโดยตรวจเช็คระบบการควบคุมอุณหภูมิ ความดัน ไฟฟ้า น้ำ ระบบกรองอากาศ และระบบการเก็บกักและกำจัดของเสีย ก่อนทำความสะอาดห้อง ฉีดน้ำร้อนที่พื้นและฆ่าเชื้อโดยการรมควันด้วยฟอร์มาลีนและแอมโมเนีย โดยเครื่องรมควัน เตรียมอุปกรณ์ทุกอย่างไว้ในห้องทดลอง รมควันอีกครั้งและเปิดระบบก่อนนำสุกรทดลองเข้าเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน เพื่อตรวจเช็คระบบอีกครั้ง ส่วนมาตรการในการป้องกันการติดเชื้อระหว่างผู้ปฏิบัติงานกับสุกรทดลอง โดยเปลี่ยนชุด สวมรองเท้าบูช ใส่หน้ากาก และแว่นตา จัดให้มีน้ำยาฆ่าเชื้อจุ่มเท้าทั้งก่อนเข้าห้องเปลี่ยนเสื้อผ้าและก่อนเข้าห้องเลี้ยงสุกรทดลอง และเปลี่ยนทุกวัน เมื่อปฏิบัติงานเสร็จต้องอาบน้ำและเปลี่ยนเสื้อผ้าทุกครั้ง

3.3 การคัดเลือกสุกรทดลองและการเตรียมสุกรก่อนการทดลอง

เลือกสุกรหย่านมเพศผู้ที่ตอนแล้ว อายุ 17 วัน จำนวน 15 ตัว จากฟาร์มสุกรที่ไม่เคยมีประวัติการฉีดวัคซีนไข้หวัดใหญ่สุกร สุกรทดลองต้องให้ผลลบในการตรวจไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากตัวอย่างป้ายจมูกโดยเทคนิค RT-PCR และให้ผลลบในการตรวจทางซีรัมวิทยาต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และ *M. hyopneumoniae* นำสุกรทดลองทั้ง 15 ตัว มาเลี้ยงในห้องที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 โดยแยกห้องเลี้ยงสุกรทดลองแต่ละกลุ่ม ให้อาหารที่มีโภชนาการตามอายุสุกรและน้ำสะอาดตลอดเวลา ปรับอุณหภูมิห้องที่ 26 องศาเซลเซียส อุณหภูมิใต้ไฟกกที่ 29-30 องศาเซลเซียส ความดัน -1 มิลลิเมตรน้ำ และให้สุกรปรับสภาพก่อนการทดลอง 5 วัน โดยให้เกลือแร่ผสมน้ำดื่มทุกวันเป็นเวลา 3 วัน ฉีดยาปฏิชีวนะ (Ceftriofur sodium, Excenel®, Pfizer) ติดต่อกัน 3 วัน เก็บตัวอย่างป้ายจมูกสุกรทดลองทุกตัวเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยเทคนิค RT-PCR และเก็บซีรัมตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 และ H1N2 โดย HI test และตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส และ *M. hyopneumoniae* โดยวิธี ELISA ในวันที่ 3 ก่อนเริ่มปฏิบัติการทดลองในสุกรทดลอง สุกรทดลอง ณ วันที่เริ่มทดลองมีอายุ 22 วัน

3.4 ไวรัส

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ A/swine/Thailand/CB1/05 (H1N2) และ A/swine/Thailand/CB2/05 (H3N2) ได้จากการเพาะแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากตัวอย่างป้ายจมูกสุกรป่วยที่ส่งตรวจ ณ หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเพาะแยกไวรัสในไข่ไก่ฟักอายุ 9 วัน โดยฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าถุงอแลนโตอิคขนาด 150 ไมโครลิตร สังเกตการตายของตัวอ่อนทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บน้ำจากไข่ไก่ฟักเพื่อตรวจวินิจฉัยไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยวิธี multiplex RT-PCR โดยใช้ Primers ที่ออกแบบมาจากส่วนของ M gene และสามารถตัดสายของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ได้ขนาด 700 คู่เบส (ตารางที่ 1) ในการวินิจฉัยแยกเบื้องต้นว่าเป็น influenza A virus (ดังภาพที่ 1) ต่อจากนั้นวินิจฉัยแยกสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรโดยใช้ Primers ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีน N1, N2, H1 และ H3 (Choi et al., 2002) ซึ่งจะตัดสายของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ได้ขนาด 754, 502, 1,006 และ 663 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นนำไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้จากภาคสนามมาเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักและเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Iowa State University, Ames, Iowa, USA) และไตเตรทไวรัสจนได้ปริมาณไวรัส $10^{6.5}$ - $10^{7.5}$ $TCID_{50}$ ต่อมิลลิลิตร โดยได้จากการเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟัก 4 passages และเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK 1 passage รวมทั้งศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวน (growth curve) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสายพันธุ์ H1N2 และ H3N2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK โดยการไตเตรทไวรัส ณ เวลาต่างๆ (Seo et al., 2001) ทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนสารละลายควบคุม (mock) ที่ใช้ทดลองในกลุ่มควบคุมนั้นได้จากสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ที่ปราศจากไวรัส แต่ผ่านขั้นตอนเหมือนการเพิ่มจำนวนไวรัส

3.5 การทดลองในสุกรทดลอง

ให้สารละลายไวรัสขนาด 5 มิลลิลิตร ทางหลอดลมแก่สุกรทดลองทุกตัว โดยแบ่งตามกลุ่มการทดลองดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น มีวิธีการดังนี้ ใช้ท่อสอดให้อาหาร (feeding tube) ใส่ในท่อของท่อสอดหลอดลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางท่อขนาด 5 มิลลิเมตร เพื่อลดปริมาณการคั่งค้างของสารละลาย จับบังคับสุกรทดลองอ้าปากและใช้ผ้าจับดึงลิ้นไว้ด้านข้างปาก รอจังหวะที่สุกรร้องเพื่อให้ฝาปิดกล่องเสียงเปิด จึงสอดท่อสอดหลอดลมเข้าที่ทางเปิดของฝาปิดกล่องเสียงอย่างรวดเร็ว ลึกประมาณ 2-3 เซนติเมตร แล้วดันสารละลายเข้าทางท่อสอดให้อาหารจนหมด พร้อมกับดันลมตามอีกประมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อให้แน่ใจว่าสารละลายได้เข้าไปในหลอดลมจนหมดทั้ง 5

มิลลิลิตร ปริมาณของของเหลวที่สามารถให้เข้าทางหลอดลมได้ โดยไม่ก่อให้เกิด respiratory insufficiency คือ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 1 กิโลกรัม (รุ่งโรจน์, 2547)

3.6 อาการทางคลินิก

เก็บข้อมูลโดยการเฝ้าสังเกตอาการเป็นรายกลุ่ม วัดอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ทางทวารหนักสุกรทดลองทุกตัว ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 และ 12 หลังการให้เชื้อ บันทึกข้อมูลและให้คะแนนอาการทางคลินิก (ตารางที่ 4) นำข้อมูลที่ได้ของแต่ละวันในกลุ่มต่างๆ มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 4 แสดงการบันทึกและการให้คะแนนอาการทางคลินิก

อาการทางคลินิก	คะแนน	อาการที่แสดงออก
ไข้	0	<40 องศาเซลเซียส ไม่มีไข้
	1	≥40 องศาเซลเซียส มีไข้
ไอ-จาม	0	ไม่มีไอหรือจาม
	1	มีสุกรไอหรือจาม
น้ำมูก	0	ไม่มีน้ำมูก
	1	สุกรมีน้ำมูกปริมาณเล็กน้อย
	2	สุกรมีน้ำมูกปริมาณมาก
เยื่อบุตาอักเสบ	0	ไม่มีขี้ตา
	1	สุกรมีขี้ตาเล็กน้อย
	2	เยื่อบุตาอักเสบร่วมกับมีขี้ตาปริมาณมาก
ภาวะการหายใจ	0	หายใจปกติ
	1	หายใจลำบาก

ดัดแปลงจาก Kitikoon et al. (2006)

3.7 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา

ทำการุณฆาต (euthanasia) สุกรทดลองที่ถูกสุ่มเพื่อชันสูตร ณ วันที่ 2, 4 และ 12 หลังฉีดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วย Nembutal® (Ceva Sante Animale, France) ขนาด 10 มิลลิลิตรต่อตัว ทางเส้นเลือดดำเพื่อให้สุกรทดลองสลบระดับลึก และตามด้วย magnesium sulfate ทางเส้นเลือดดำ จนกระทั่งสุกรทดลองหยุดหายใจ จากนั้นปฏิบัติการชันสูตรซากและบันทึกลักษณะรอยโรคของอวัยวะต่างๆ อย่างละเอียด ตามวิธีในคู่มือปฏิบัติการชันสูตรซากสัตว์ ของหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2547 (อัจฉริยา และคณะ 2547) และให้คะแนนรอยโรคปอดคิดคะแนนเฉลี่ยเป็นร้อยละของรอยโรคทั้งหมด โดยกลีบปอดส่วนหน้าและกลีบปอดข้างหัวใจของแต่ละข้าง และกลีบปอดส่วนกลาง จะมีคะแนนส่วนละ 10 คะแนน ส่วนกลีบปอดส่วนท้าย จะมีคะแนนข้างละ 25 คะแนน รวมทั้งสิ้น 100 คะแนน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ สมอง ทอนซิล ปอดทุกส่วน หลอดลม หัวใจ ตับ ไต ม้าม ลำไส้เล็กส่วนปลาย และต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดในบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินเข้มข้นร้อยละ 10 เพื่อตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา โดยการย้อมสี hematoxylin&eosin (H&E) ขั้นตอนดังนี้ ละลายพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ โดยแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 100, 95, 80 และ 70 ตามลำดับ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นำชิ้นเนื้อไปย้อมด้วยน้ำยา Mayer's hematoxylin 10 นาที จากนั้น differentiate ชิ้นเนื้อในน้ำยา hydrochloric acid ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 แล้วล้างด้วยน้ำประปานาน 5 นาที นำมาย้อมด้วยสี eosin นาน 4 นาที จากนั้นดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็ว โดยใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70, 80, 95 และ 100 ตามลำดับ นำสไลด์ชิ้นเนื้อมาศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของหลอดลมแบ่งเป็น 4 ระดับ โดยพิจารณาที่ secondary bronchiole (Richt et al., 2003; Vincent et al., 2006) ดังนี้

คะแนน 0: พบหลอดลมปกติ มีเซลล์เยื่อบุผิวมีรูปร่างทรงกระบอกสูงถึงปานกลาง (medium-to-tall columnar epithelial cells) มีซีเลียอยู่ที่ด้านบนเซลล์ และมีนิวเคลียสเรียงตัวอยู่ด้านฐานเซลล์ (basal pseudostratified neuclei)

คะแนน 1: พบหลอดลมส่วนใหญ่ปกติ พบมีเยื่อบุผิวหลอดลมเสียหายเล็กน้อย มีการงอกขยายของเซลล์เยื่อบุผิวเล็กน้อย พบว่าบางเซลล์ยังมีซีเลีย

คะแนน 2: พบหลอดลมเสียหายบางส่วน เยื่อบุผิวหลอดลมเสียหายปานกลาง เซลล์เยื่อบุแบนตัวลงและมีการงอกขยาย จนทำให้การเรียงตัวของเยื่อบุผิวหลอดลมเสียรูปร่าง

คะแนน 3: พ บหลอดลมเสียหายเป็นบริเวณกว้าง เยื่อบุผิวหลอดลมเสียหายปานกลาง เซลล์เยื่อบุแบนตัวลงและมีการงอกขยาย จนทำให้การเรียงตัวของเยื่อบุผิวหลอดลมเสียรูปร่าง

คะแนน 4: พบหลอดลมเสียหายรุนแรง มีการตายและการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลม ร่วมกับมีการงอกขยายของเซลล์เยื่อบุผิวจำนวนมาก

คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิของเนื้อเยื่อปอด โดยพิจารณาการหนาตัวของผนังถุงลมปอดเนื่องจากมีการแทรกเข้ามาของเซลล์อักเสบชนิดนิวเคลียสเดี่ยว ตามวิธีของ Halbur และคณะ (1995) ดังนี้

คะแนน 0: ไม่พบรอยโรค

คะแนน 1: พบปอดอักเสบชนิดมีการหนาตัวของผนังถุงลมปอดไม่รุนแรง (mild interstitial pneumonia)

คะแนน 2: พบปอดอักเสบชนิดมีการหนาตัวของผนังถุงลมปอดปานกลางและมีการกระจายหลายจุด (moderate multifocal interstitial pneumonia)

คะแนน 3: พบปอดอักเสบชนิดมีการหนาตัวของผนังถุงลมปอดปานกลางและมีการกระจายทั่วไป (moderate diffuse interstitial pneumonia)

คะแนน 4: พบปอดอักเสบชนิดมีการหนาตัวของผนังถุงลมปอดรุงแรง (severe interstitial pneumonia)

3.8 เซลล์วิทยาของน้ำล้างปอดและหลอดลม (Cytology of broncho-alveolar lavage fluid)

เก็บน้ำล้างปอดและหลอดลมจากสุกรที่สุ่มชันสูตร ณ วันที่ 2, 4 และ 12 หลังการให้เชื้อโดยใส่สารละลาย PBS 20 มิลลิลิตรทางหลอดลม พร้อมกับนวดปอดเบาๆ จากนั้นดูดเก็บสารละลาย 2 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาทางเซลล์วิทยา โดยย้อมด้วย Giemsa stain ตรวจนับจำนวนและจำแนกชนิดเซลล์ (ในจำนวนเซลล์ 100 เซลล์) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 100x (Okada et al., 2000)

3.9 การศึกษาด้วย IFA test

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดกลีบหน้าด้านซ้ายของสุกรทดลองที่ได้ทำการชันสูตร ณ วันที่ 2 4 และ 12 หลังการฉีดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร มาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อแช่แข็งให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร ตรึงสภาพชิ้นเนื้อด้วย acetone/methanol (4:1, v/v) เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาย้อมด้วยเทคนิค IFA test โดยใช้ anti-influenza A nucleoprotein monoclonal antibody (HB654404 B.V.EUROPEAN VETERINARY LABORATORY, the Netherlands) ขนาด 1:100 เป็น primary antibody บ่มในตู้บ่มความชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างด้วย

phosphate buffered saline (PBS) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาทีบนเครื่องโยกอัตโนมัติ หลังจากนั้นหยด secondary antibody ที่จับกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ไว้แล้ว ได้แก่ fluorescein isothiocyanate (FITC) – conjugated anti-mouse antiserum (Sigma) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาทีบนเครื่องโยกอัตโนมัติ และเคลือบสไลด์ด้วย glycerine pH 7 ความเข้มข้นร้อยละ 1 พร้อมกับปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงฟลูออเรสเซนต์ และบันทึกข้อมูลดังนี้ (Jung and Chae, 2006)

คะแนน 0 คือ ไม่ติดสี

คะแนน 1 คือ ติดสี 1-2 เซลล์จากเซลล์ทั้งหมดในชิ้นเนื้อ 1 ชิ้น

คะแนน 2 คือ ติดสี 1-2 เซลล์ใน 1 high power field

คะแนน 3 คือ ติดสี 3-10 เซลล์ใน 1 high power field

และ คะแนน 4 คือ ติดสีมากกว่า 10 เซลล์ใน 1 high power field

3.10 การศึกษาทางอิมมูโนฮีสโตเคมี

นำชิ้นเนื้อเยื่อต่างๆ ของสุกรทดลองที่ได้ทำการชันสูตร ณ วันที่ 2, 4 และ 12 หลังการฉีดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ที่ตรวจพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาและเนื้อเยื่อปอดทุกส่วน ได้แก่ ต่อมน้ำเหลืองที่ขั้วปอดรวมหลอดลม ปอดทุกส่วน (left and right apical, cardiac, caudal and intermediate lobes) ที่ฝังในบล๊อคพาราฟินมาย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีแบบ avidin-biotin peroxidase complex (ABC) โดยใช้ anti-influenza A nucleoprotein monoclonal antibody (HB654404 B.V.EUROPEAN VETERINARY LABORATORY, the Netherlands) เป็น primary antibody เพื่อตรวจหาแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ในเนื้อเยื่อต่างๆ ดังกล่าว (ดังภาคผนวก) โดยมีชิ้นเนื้อปอดจากสุกรป่วยรหัส 6D924L (ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer ยีน M เป็นตัวควบคุมบวก และใช้ PBS แทน primary antibody เป็นตัวควบคุมลบ นำสไลด์ชิ้นเนื้อมาศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ตรวจและประเมินการกระจายของแอนติเจนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ที่กำลังขยาย 40 เท่าและบันทึกข้อมูล (Jung and Chae, 2006) ดังนี้

คะแนน 0 คือ ไม่ติดสี

คะแนน 1 คือ ติดสี 1-2 เซลล์จากเซลล์ทั้งหมดในชิ้นเนื้อ 1 ชิ้น

คะแนน 2 คือ ติดสี 1-2 เซลล์ใน 1 high power field

คะแนน 3 คือ ติดสี 3-10 เซลล์ใน 1 high power field

และ คะแนน 4 คือ ติดสีมากกว่า 10 เซลล์ใน 1 high power field

3.11 ไวรัสวิทยา

เก็บตัวอย่างป้ายจมูก (nasal swab) จากสุกรทดลองทุกตัว ณ วันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 และ 12 หลังการฉีดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร และเก็บตัวอย่าง bronchoalveolar larvage fluid (BALF) ตัวอย่างเนื้อเยื่อปอด และตัวอย่างเลือดจากสุกรทดลองที่สุ่มชันสูตร ณ วันที่ 2 4 และ 12 หลังการฉีดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร เพื่อเพาะแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรและศึกษาการเพิ่มจำนวนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ที่มีอายุอยู่ระหว่าง 24 - 72 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน (Landolt et al., 2003) โดยเติมสารละลายทริปซิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เพิ่มจำนวนไวรัส จากนั้นตรวจหาแอนติเจนของไวรัสในเซลล์โดยการย้อมด้วยวิธี indirect immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (Clavijo et al, 2002) โดยใช้ anti-Influenza A nucleoprotein monoclonal antibody (HB654404 B.V.EUROPEAN VETERINARY LABORATORY, Netherlands) และย้อมด้วย chromogen aminoethyl carbazole substrate แล้วอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงขาว และคำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธีของ Reed และ Muench (1938)

3.12 Polymerase Chain Reaction

นำตัวอย่างป้ายจมูก (nasal swab) จากสุกรทดลองทุกตัว ณ วันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 และ 12 หลังการฉีดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร มาตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร โดยเทคนิค RT-PCR โดยแยกเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

- RNA extraction: นำเซลล์ที่ได้ไปสกัดแยก total RNA
- cDNA synthesis: นำ RNA ที่ได้มาเปลี่ยนให้เป็นสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ random hexamer primers
- PCR amplification: ทำการเพิ่มจำนวนของสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้น โดยใช้ primers ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีน M ซึ่งจะได้ PCR product ที่มีขนาด 276 คู่เบส ดังนี้ 5' TGA TCT TCT TGA AAA TTT GCA G 3' และ 5' TGT TGA CAA AAT GAC CAT CG 3' (Payungporn et al., 2004) เพื่อเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ควบคู่ไปกับเติมเบส A ในขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยา
- ตรวจสอบ PCR product โดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis

3.13 วิทยาภูมิคุ้มกัน

นำตัวอย่างซีรัมของสุกรทดลองมาตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 และ H3N2 ด้วยวิธี HI test โดยใช้ไวรัสที่ 5 HA unit/50µl ตามวิธีใน WHO manual on animal influenza diagnosis and survillance โดยแปลผลที่ระดับ HI titer $\geq$ 40 ถือว่าให้ผลบวก (Webster et al., 2002) ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ด้วยวิธี ELISA (IDEXX laboratories, Westbrook, ME, USA)

3.14 การวิเคราะห์ และประเมินผล

นำข้อมูลการสังเกตอาการโดยทั่วไป การแสดงอาการทางระบบหายใจ วัดอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ทางทวารหนักทุกวัน ค่าทางโลหิตวิทยา ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยวิธี HI test ELISA และ IFA ปริมาณเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากตัวอย่างป้ายจมูกและเลือดด้วยวิธีทางไวรัสวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ลักษณะรอยโรคทางพยาธิวิทยาและการกระจายตัวของแอนติเจนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในเนื้อเยื่อต่างๆ ที่ได้จากสุกรแต่ละกลุ่มทดลองมาเปรียบเทียบกัน โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา