



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจหาการปรากฏและการกระจายตัวของตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อ
ไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในระบบทางเดินหายใจสูกร

โดย ประวีณา กิตติคุณและคณะ

พฤษภาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจหาการปรากฏและการกระจายตัวของตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อ
ไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในระบบทางเดินหายใจสุกร

คณะผู้วิจัย

1. อ.สพ.ญ.ดร. ประวีณา กิตติคุณ
2. ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ

สังกัด

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชื่อโครงการ การตรวจหาการปรากฏและการกระจายตัวของตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ใน
ระบบทางเดินหายใจสุกร

Characterization of the presence and distribution of avian influenza A virus H5N1 receptor in the
swine respiratory tract

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี ตั้งแต่วันที่ 15 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2551 ถึงวันที่ 14 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2553

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : อาจารย์ สพ.ญ.ดร. ประวีณา กิตติคุณ

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ นพ. ยง ภู่วรวรรณ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 15 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2552 **ถึงวันที่** 14 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2553

1. การดำเนินงาน

- ☒ ได้ดำเนินงานตามแผนที่วางไว้
- ☐ ได้ดำเนินงานล่าช้ากว่าแผนที่วางไว้
- ☐ ได้เปลี่ยนแผนที่วางไว้

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีกเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและการสาธารณสุขเป็นอย่างมากในปัจจุบัน การที่ต้องทำลายสัตว์ปีกที่ติดเชื้อนั้นคิดเป็นจำนวนเงินได้ประมาณมากกว่า 10,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐ นอกจากนี้ยังก่อความวิตกกังวลถึงโอกาสของการเกิดโรคระบาดใหญ่ในคนให้มีมากยิ่งขึ้น การศึกษาในหลายๆ ด้านเพื่อพัฒนาความเข้าใจทางด้านชีวภาพของเชื้อ รวมถึงการพัฒนาความเข้าใจในกลไกการติดเชื้อและการเกิดพยาธิสภาพในสัตว์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

จากหลักฐานทางระบาดวิทยาที่ผ่านมาในอดีตพบว่า การติดเชื้อในธรรมชาติข้ามไปมาระหว่างสัตว์ชนิดต่างๆ ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอพบได้น้อย ยกเว้นกรณีของการติดเชื้อข้ามระหว่างสุกรกับคนค่อนข้างจะพบเห็นได้เป็นปกติ อย่างไรก็ตาม เหตุการณ์การติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในคนเมื่อปีค.ศ. 1997 และช่วงปีค.ศ. 2004 จนถึงปัจจุบันในหลายประเทศทั่วโลกนั้น พิสูจน์ให้เห็นว่าการติดเชื้อไข้หวัดนกจากสัตว์ปีกไปสู่คนโดยตรงนั้นเกิดขึ้นได้ แต่การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากคนสู่คนนั้นยังไม่มีรายงานซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสสายพันธุ์นี้ยังไม่มีการปรับตัวหรือกลายพันธุ์เมื่อมีการติดเชื้อในคน เป็นที่น่าสังเกตว่าคนที่ติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 มักมีอาการป่วยที่รุนแรง และมีอัตราการตายสูงถึง 50% เช่นเดียวกับการติดเชื้อนี้ในไก่ หรือการให้เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อใน ferret ทดลองกับอาการป่วยที่รุนแรงและถึงตายเช่นกัน ในขณะที่การให้เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 สเตรนเดียวกันนี้ในสุกรทดลองพบว่า สุกรสามารถติดเชื้อไวรัสแต่ไม่แสดงอาการของโรครุนแรงเช่นในคน หรือในไก่และ ferret อีกทั้งการติดเชื้อไม่ทำให้สุกรป่วยรุนแรงถึงตาย

พบว่าชนิดของตัวรับบน (receptor) ผิวเซลล์ของเยื่อบุทางเดินหายใจเป็นตัวกำหนดเบื้องต้นถึงความสามารถในการติดเชื้อและก่อโรคของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสัตว์ชนิดต่างๆ สำหรับในคนทางเดินหายใจส่วนบนซึ่งรวมเยื่อบุบริเวณโพรงจมูก เซลล์เยื่อบุบริเวณ paranasal sinuses pharynx และหลอดลมจะปรากฏตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน และไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นส่วนมาก ในขณะที่ตัวรับชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดนกจะพบอยู่ในทางเดินหายใจส่วนล่าง และพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 นั้น จะเกาะ (attach) กับเซลล์ชนิด pneumocyte type II, alveolar macrophage, nonciliated cuboidal epithelial cells ในปอด แต่ในทางตรงกันข้ามเชื้อจะเกาะเซลล์เยื่อบุบริเวณหลอดลมเป็นจำนวนน้อยมากในคน สำหรับการกระจายตัวของตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสุกรนั้น มีการสำรวจเพียงในบริเวณหลอดลม ซึ่งพบตัวรับที่จำเพาะต่อทั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ไข้หวัดใหญ่ในคนและไข้หวัดนก ส่วนข้อมูลการกระจายตัวของตัวรับในทางเดินหายใจส่วนอื่น รวมถึงชนิดของเซลล์ที่มีการติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 นั้น ยังไม่มีรายงาน ดังนั้น โครงการวิจัยในส่วนนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการปรากฏและการกระจายตัวของตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์

H5N1 ในทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและล่างของสุกร เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาต่อ เพื่อหาสาเหตุหรือปัจจัยที่ส่งผลให้มีความแตกต่างทางด้านความรุนแรงในการก่อโรครดงเช่นที่พบในคนและสุกรต่อไป

2. วัตถุประสงค์

8.1 เพื่อตรวจหาการปรากฏและการกระจายตัวของตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่างของสุกร

8.2 เพื่อตรวจวัดการติดเชื้อและการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่างของสุกร

3. ระเบียบวิธีวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัยเพื่อบรรลุวัตถุประสงค์ทั้ง 2 ข้อ มีดังต่อไปนี้

วัตถุประสงค์ข้อที่ 1 เพื่อตรวจหาการปรากฏและการกระจายตัวของตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่างของสุกร

ทำการตรวจหาตัวรับที่มี α -2,3 linkage และ α -2,6 linkage บนตัวอย่างชิ้นเนื้อจากระบบทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่างของสุกร โดยใช้ DIG glycan differentiation kit ซึ่งเป็น alkaline phosphatase system โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่องจากไตสุนัข Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells ซึ่งมีตัวรับที่มีทั้ง α -2,3 linkage และ α -2,6 linkage บนเยื่อผิวเป็น positive control และเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง C6/36 (มาจากยุง *Aedes albopictus*) ซึ่งไม่มีทั้ง α -2,3 linkage และ α -2,6 linkage เป็น negative control

ผลการทดลองจะสามารถบอกได้ถึงปริมาณและการกระจายตัวของตัวรับที่มี α -2,3 linkage (จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนก) และ α -2,6 linkage (จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนและสุกร) บนเยื่อทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่างของสุกรได้ ซึ่งจะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นว่า เนื้อเยื่อที่มาจากทางเดินหายใจในส่วนใดมีโอกาสในการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1

วัตถุประสงค์ข้อที่ 2 เพื่อตรวจวัดการติดและเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่างของ

สถานที่ทำการทดลอง

การทดลองที่มีการใช้เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ทั้งหมดได้ทำในห้องปฏิบัติการวิจัยไข้หวัดนก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 14 ตึก 60 ปี ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการชนิดปลอดเชื้อแบบ Bio-safety level 2+ ขนาด 30 ตารางเมตร ที่มีตู้ปลอดเชื้อระดับ Bio-safety level 2 มีตู้ควบคุมอุณหภูมิและก๊าซ CO₂ เพื่อบ่มเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับการวิจัยในสัตว์ทดลองโดยเฉพาะ (animal isolator แบบปลอดเชื้อระดับ Bio-safety level 3) จำนวน 2 เครื่อง และมีเครื่อง

autoclave ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งห้องปฏิบัติการดังกล่าวนี้ได้ผ่านการรับรองจาก CDC ให้สามารถใช้ในการทดลองวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ได้

เชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 คือ A/Chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/CU-K2/04 (CU-K2) ได้ใช้เชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร A/Swine/Thailand/CB1/06 (H1N1) ควบคุมไปด้วยกันกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 เพื่อเป็น positive control

ไวรัสถูกเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักชนิดไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดย Allantoic fluid จากไข่ฟักจะถูกเก็บ และตรวจยืนยันการพบไวรัสด้วยวิธี hemagglutination (HA) test และ real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (rRT-PCR) และทำการหาปริมาณของเชื้อไวรัสเป็น EID₅₀ การตรวจ HA ใช้วิธีมาตรฐานของ OIE (OIE, 2004)

สุกรทดลองและการเก็บเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนของการเก็บเนื้อเยื่อจะทำการการุณฆาต (euthanasia) สุกรทดลองอายุ 3 สัปดาห์ ที่ปลอดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร โดยการฉีด Nembutal® (Ceva Sante Animale, France) ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อตัว เข้าทางหลอดเลือดดำเพื่อให้สุกรสลบ และตามด้วยการให้ magnesium sulfate ทางหลอดเลือดดำจนกระทั่งสุกรหยุดหายใจ จากนั้นจึงปฏิบัติการชันสูตรซากและเก็บตัวอย่างตามวิธีในคู่มือปฏิบัติการชันสูตรซากสัตว์ ของหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2547

ตรวจการเกาะติดของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อ

ศึกษาการติดเชื้อของไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในเนื้อเยื่อของ nasal turbinate, tonsil, trachea, และเนื้อเยื่อปอดของสุกร โดยการให้เชื้อไวรัสบนชิ้นเนื้อตัวอย่างที่เก็บสดและเพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ภายในเวลาไม่เกิน 3 ชม. หลังการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ ทำการติดเชื้อไวรัสที่มีความเข้มข้น 10^5 TCID₅₀/ml ในชิ้นเนื้อและบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงล้างไวรัสที่ไม่เกาะติดตัวรับออก แล้วบ่มชิ้นเนื้อที่ติดเชื้อเป็นเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงเก็บน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์แช่ไว้ที่ -70°C เพื่อทำการวัดปริมาณไวรัสที่เพิ่มขึ้นต่อไป ส่วนตัวอย่างชิ้นเนื้อนำไปผ่านการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อตรวจจับการติดเชื้อของไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (monoclonal anti-Influenza A NP antibody) ³ และย้อมตัวรับบนผิวเซลล์ด้วย digoxigenin (DIG) glycan differentiation kit (Roche, Germany) (ภาคผนวก) จากนั้นจึง counterstain ด้วย hematoxylin ผลการทดลองจะสามารถระบุถึงตำแหน่งของระบบทางเดินหายใจที่มีความไวต่อการติดเชื้อ

ตรวจการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้จากการเพาะเลี้ยงและให้เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้จะนำมาสกัด total RNA ด้วยน้ำยาสกัด Trizol LS จากนั้นจึง quantify total RNA ก่อน จึงนำตัวอย่าง RNA ในปริมาณที่เท่ากัน มาทำการตรวจวัดการเพิ่มจำนวนของไวรัส โดยใช้ single step real time reverse transcriptase polymerase

chain reaction² ที่มี in vitro-generated matrix-specific negative sense RNA molecules เป็น standard ผลที่ได้จะบ่งชี้ถึงบริเวณของระบบทางเดินหายใจสุกร ที่รองรับการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ได้ดี

4. รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

4.1 กิจกรรมที่ทำได้จริง

4.1.1 วัตถุประสงค์ข้อที่ 1 เพื่อตรวจหาการปรากฏและการกระจายตัวของตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่างของสุกร

ได้ดำเนินการสำเร็จตามวัตถุประสงค์แล้ว กล่าวคือได้ทำการตรวจหาการปรากฏและการกระจายตัวของตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่างของสุกร นอกจากนี้ยังได้นำเทคนิคการย้อมตัวรับไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาการปรากฏของตัวรับบนระบบทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่างของนกกระทาวัวและควายในประเทศไทย โดยทำการตรวจย้อมหาการปรากฏของตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ทั้งที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 และที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและสุกร เนื่องจากผู้วิจัยเห็นว่ายังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในวัวและโดยเฉพาะอย่างยิ่งในควายมาก่อน ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่ามีความสำคัญโดยเฉพาะในประเทศที่ยังคงการเลี้ยงวัวและควายเพื่อการเกษตรดังเช่นประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งการเลี้ยงสัตว์ดังกล่าวต้องมีการคลุกคลีอย่างใกล้ชิดกับเจ้าของ รวมทั้งอาจมีการเลี้ยงปะปนกันกับสัตว์ปศุสัตว์ชนิดอื่นเช่น สุกร ไก่และเป็ด จึงทำให้มีโอกาสในการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ข้ามระหว่างชนิดสัตว์ได้

จากผลการศึกษาในวัตถุประสงค์ข้อที่ 1 ดังกล่าวข้างต้นผู้วิจัยได้พบว่าหลอดลมและปอดของนกกระทาและหลอดลมของสุกรมีตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคนและไข้หวัดนกในหลอดลม ส่วน nasal turbinate และ tonsil ของสุกรมีเฉพาะตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน ในขณะที่ปอดของสุกร ควายและวัวมีเฉพาะตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน ส่วนหลอดลมของควายแตกต่างกับหลอดลมของวัวตรงที่หลอดลมควายมีตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดนก (ตารางที่ 1) ผู้วิจัยได้ส่ง manuscript ในลักษณะที่เป็น short communication ไปที่ Journal of Comparative Pathology (ภาคผนวก) ซึ่งทาง reviewer ได้ให้คำแนะนำในด้านต่างๆ เช่น ควรที่จะเพิ่มจำนวน N ของสัตว์แต่ละชนิดให้มากขึ้นเพื่อลด species variation การใช้ staining test ของอีกบริษัทซึ่งมีรายงานว่าตรวจจับตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดนกได้ทุกชนิด และควรได้มีการแสดงการจับของเชื้อ (virus attachment to receptor) ร่วมด้วย

ตารางที่ 1 แสดงผลการย้อมตัวรับของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอบนผิวเซลล์ของเนื้อเยื่อสุกร

Animal	Organ	α 2,3-galactose	α 2,6-galactose
Quail	Trachea	+	+
	Lung	+	+
Pig	Trachea	+	+
	Lung	-	+
Buffalo	Trachea	+	-
	Lung	-	+
Cow	Trachea	-	-
	Lung	-	+

หมายเหตุ ผลการย้อม nasal turbinate และ tonsil ของสุกร พบเฉพาะตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน

4.1.2 วัตถุประสงค์ข้อที่ 2 เพื่อตรวจวัดการติดเชื้อและการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่างของสุกร

1. ภายหลังจากที่ได้เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสุกร (tonsil, turbinate, trachea และ เนื้อเยื่อปอด) จากการผ่าซากแล้ว ได้นำชิ้นเนื้อจากการผ่าซากไปห้องปฏิบัติการ โดยแช่ใน transport media (50% RPMI+ 50% DMEM supplement with 10 ug/ml gentamicin, 1000 U/ml penicillin-streptomycin (P/S), 2% FBS และ NaHCO_3 ที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะสูงกว่าปกติถึง 10 เท่า

2. ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับการ inoculate เชื้อ (tissue culture media) โดยเบื้องต้นได้กำหนดการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย tissue culture media จำนวน 3 ชนิด (A, B และ C) แต่เนื่องจากมีเหตุขัดข้องเรื่องการจัดซื้อ tissue culture media C [Airway Epithelial Cell Growth Medium Ready-to-use (Promocell, Germany)] ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเฉพาะ tissue culture media ชนิด A และ B ซึ่งมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

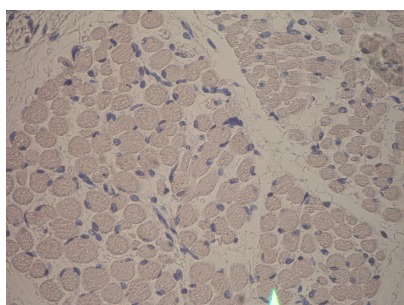
Tissue culture media A 50%RPMI+ 50% DMEM supplement with 0.3 mg/ml L-glutamine + 1 ug/ml gentamicin + 100 U/ml penicillin-streptomycin (P/S) + 10% FBS + NaHCO_3

Tissue culture media B DMEM + F12 supplement with 0.3 mg/ml L-glutamine + 1 ug/ml gentamicin + 100 U/ml penicillin-streptomycin (P/S) + 10% FBS + NaHCO_3

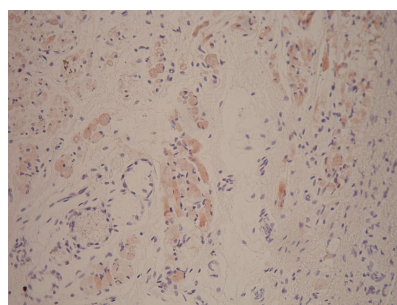
ได้ทดลองอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสุกรทั้งสองชนิดในขั้นตอนการติดเชื้อ ex vivo ด้วยเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 ตาม Protocol for tissue inoculation and sample collection (ภาคผนวก) แล้วจึงเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อไปทำการย้อมหาเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร โดยทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เวลาต่างๆ ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ว่า Tissue culture media A ช่วยรองรับการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1 และ H3N2 ของเนื้อเยื่อได้ดีกว่า Tissue culture media B เนื่องจากผลการย้อมชิ้นเนื้อให้ผลบวกดังแสดงในภาพที่ 1

3. ทดลองการติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 และดำเนินการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ระยะเวลาต่างๆ เพื่อนำไปตรวจหาปริมาณ viral copy number rRT-PCR เพื่อบ่งชี้ถึงการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อสุกร ภายหลังการติดเชื้อแบบ ex vivo ภายหลังการให้เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ได้ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ nasal turbinate, tonsil, trachea และ เนื้อเยื่อปอด ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, และ 48 ชั่วโมงจากสุกร 3 ตัว เพื่อนำไปตรวจหา Influenza viral copy numbers ด้วยวิธี rRT-PCR ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดลองไม่พบการเพิ่มจำนวนอย่างมีนัยสำคัญของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในเนื้อเยื่อใดๆ ของสุกรทั้ง 3 ตัว อย่างไรก็ตามจะเห็นแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในบริเวณหลอดลมสุกร (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับผลการย้อมตัวรับที่ผิวเซลล์บนเนื้อเยื่อที่พบว่า สุกรมีตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดนกที่บริเวณหลอดลม ทั้งนี้ควรได้ทดลองซ้ำโดยการทดลองปรับปริมาณการติดเชื้อรวมทั้งทดลองกับเนื้อเยื่อสุกรจำนวนเพิ่มขึ้น

(A)



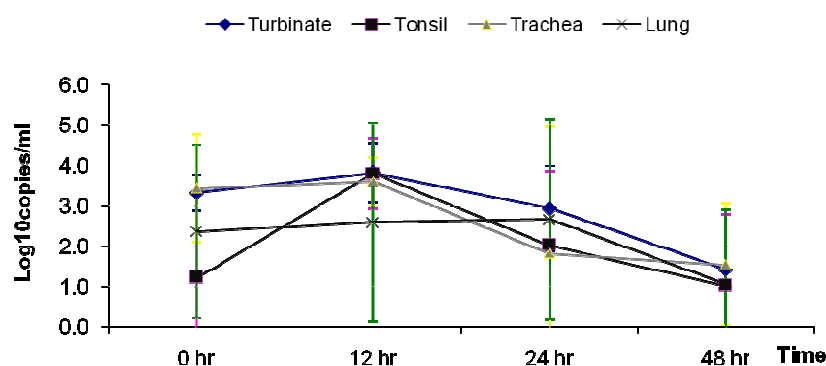
(B)



ภาพที่ 1 แสดงผลการย้อม tonsil ของสุกร (A) negative control tissue (B) swine influenza virus infected tissue ที่เพาะเลี้ยงในลักษณะ ex vivo โดยสีน้ำตาลแดงแสดงถึงโปรตีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร H1N1

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณเฉลี่ย viral copy number ($\log_{10}$ copies per ml $\pm$ SD) ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในเนื้อเยื่อสุกรที่ระยะเวลาต่างๆ ภายหลังจากการให้เชื้อแบบ ex vivo

Organ	Hours (hr) post ex vivo inoculation			
	0 hr	12 hr	24 hr	48 hr
Nasal turbinate	3.3 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 1.5
Tonsil	1.3 $\pm$ 2.1	3.8 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 1.8	1.0 $\pm$ 1.8
Trachea	3.4 $\pm$ 1.3	3.6 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 3.2	1.6 $\pm$ 1.5
Lung	2.4 $\pm$ 2.1	2.4 $\pm$ 2.5	2.7 $\pm$ 2.5	1.0 $\pm$ 1.8



ภาพที่ 2 แสดง copy numbers per ml ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่ชั่วโมงต่างๆ ภายหลังจากการติดเชื้อแบบ ex vivo

5. สรุปผลการดำเนินงานของโครงการโดยย่อ

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาดั้วรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในระบบทางเดินหายใจสุกรทั้งส่วนบน (nasal turbinate tonsil และหลอดลม) และส่วนล่าง (เนื้อเยื่อปอด) ซึ่งพบว่าสุกรมีตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่หลอดลมมากเฉพาะที่บริเวณหลอดลม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการติดและเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในเนื้อเยื่อระบบทางเดินหายใจของสุกร ที่พบแนวโน้มการเพิ่มจำนวนของเชื้อเฉพาะที่บริเวณหลอดลมของสุกร ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่า สามารถนำหลอดลมสุกรมาใช้เป็น model ในการศึกษาด้านอื่นๆ ของการติดเชื้อไข้หวัดนก โดยเฉพาะไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์รุนแรงเช่น สายพันธุ์ H5N1 ได้ นอกจากนี้ผลการทดลองนี้ยังสามารถนำไปใช้อธิบายผลการให้เชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสุกรทดลอง (in vivo) ที่พบว่าเชื้อไม่ก่อพยาธิสภาพหรือโรคที่รุนแรงดังเช่นที่พบในการติดเชื้อในไก่¹ ผู้วิจัยได้ส่ง manuscript ในลักษณะที่เป็น short communication ไปที่ Journal of Comparative Pathology (ภาคผนวก)

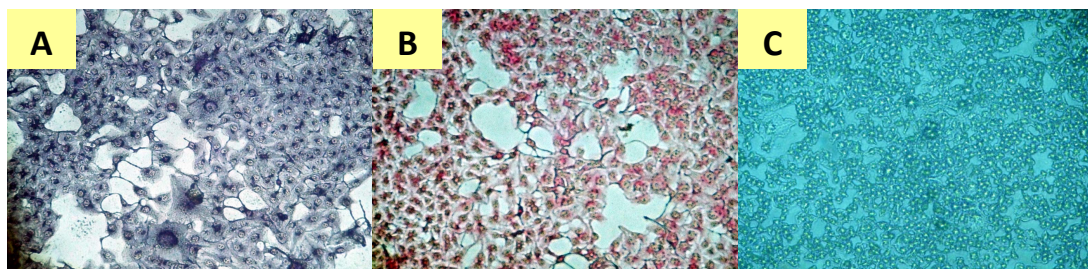
References

- 1 Lipatov AS, Kwon YK, Sarmiento LV, et al.: 2008, Domestic pigs have low susceptibility to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *PLoS Pathog* 4:e1000102.
- 2 Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, et al.: 2004, Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. *Viral Immunol* 17:588-593.
- 3 Vincent LL, Janke BH, Paul PS, Halbur PG: 1997, A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest* 9:191-195.

ภาคผนวก

Protocols for staining influenza receptors with digoxigenin (DIG) glycan differentiation kit

1. slides were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in tris-buffered saline (TBS) for 1 hour
2. To detect the SA α 2,3-gal specific receptor the slides were incubated with digoxigenin (DIG)-labeled *Maackia amurensis* lectin (MAA; Roche, Germany) 5 μ g/ml in buffer I (TBS with Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ and 1%BSA) for 1 hour
3. To detect the SA α 2,6-gal specific receptor the slides were incubated with *Sambucus nigra* lectin (SNA; Roche, Germany) 5 μ g/ml in buffer I for 1 hour
4. Wash samples 3 times with TBS and incubated with anti-DIG-alkaline phosphatase (AP) with 1% BSA for 1 hour
5. After washing the slides were developed in either a NBT-BCIP blue color substrate (for SA α 2,6-gal) or Vector® Red color substrate (Vector Laboratories, USA) (for SA α 2,3-gal)
6. Slides were then mounted and screened for positive signal under a light microscope (Carl Zeiss/Microimaging GMBH, Germany). Picture 1 indicates positive staining for SA α 2,3-gal and SA α 2,6-gal in tissue culture cells known to be SA α 2,3-gal and SA α 2,6-gal positive



ภาพที่ 1 แสดงการย้อมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้เป็น positive control ได้แก่ (A) SA α 2,3 ซึ่งเป็นตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 บน MDCK cells ติดสีน้ำเงินเข้ม และ (B) SA α 2,6 ซึ่งเป็นตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน

และสุกร ติดสีแดง และการย้อมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้เป็น negative control (C) C6/36 cells ที่ผ่านการย้อมด้วย SA α 2,3 ไม่ติดสี (การย้อมด้วย SA α 2,6 ไม่ได้แสดง)

Protocol for tissue inoculation and sample collection

1. Following necropsy, immediately place tissue in Transport media
2. Carefully cut tissue to size 3-4 mm
3. Place tissue into 12-well plate containing different growth media
4. infected tissues with
 - a. H3N2 virus (titer 10^5 TCID₅₀/ml) dilute 1:10 (infectious titer 10^4 TCID₅₀/ml) and add 100 ul inoculum to 1.5 ml culture media
 - b. H1N1 virus (titer 10^5 TCID₅₀/ml) dilute 1:10 (infectious titer 10^4 TCID₅₀/ml) and add 100 ul inoculum to 1.5 ml culture media
5. Incubate tissues at 37°C with 5% CO₂ for 2 hr for virus absorption
6. Remove supernatant
7. Add culture media 2 cc/well and wash twice to discard unattached virus
8. Add culture media 1.5 cc/well and collect 250 ul supernatant to add in Trizol keep at -70°C (0 hr post infection)
9. Continue to incubate at 37°C with 5% CO₂
10. Collect tissues at 24, 48 hr post infection) according to timeline above and store one piece of tissue at -80°C and keep supernatant (in Trizol LS solution) at -20°C
11. The other tissue were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hr and transferred to 70% alcohol ready for staining with influenza-specific antibody

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Comparative Pathology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Influenza A virus receptor identification in the respiratory tract of quail, pig, cow and swamp buffalo

Article Type: Short Communication

Keywords: Influenza A virus; quail; pig; buffalo; cow; receptor

Corresponding Author: Dr. Pravina Kitikoon, Ph.D., DVM

Corresponding Author's Institution: Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

First Author: Pravina Kitikoon, Ph.D., DVM

Order of Authors: Pravina Kitikoon, Ph.D., DVM; Tiladit Rung-ruangkijkrai, Ph.D., DVM;
Aunyaratana Thontiravong, M.S.; Yong Poovorawan, MD

Dear editor,

I would like to submit the attached manuscript entitled, “Influenza A virus receptor identification in the respiratory tract of quail, pig, cow and swamp buffalo” (file: Receptor_identification_Final.doc) for consideration for possible publication in Journal of Comparative Pathology.

This work is an original article and has not been simultaneously submitted for publication in any other journal.

Sincerely,
Pravina Kitikoon

SHORT PAPER

Influenza A virus receptor identification in the respiratory tract of quail, pig, cow and swamp buffalo

P. Kitikoon¹, T. Rung-ruangkijkrai², A. Thontiravong¹, and Y. Poovorawan³

¹Department of Pathology and ²Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Science,

³Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Correspondence to: P. Kitikoon (e-mail: pravina.k@chula.ac.th)

Summary

Virus infection requires the interaction of a virus protein with the host-cell receptor. The Influenza A virus receptor consists of sialic acid linked to the galactose unit in a α 2,3 or α 2,6 conformation. The various types of these receptors are expressed differently on the epithelial lining of various animal species. Here we characterized the types of receptors that are expressed in the upper and lower respiratory tracts of cow, buffalo, pig and quail.

Keywords: Influenza A virus; quail; pig; buffalo; cow; receptor

Introduction

Influenza A viruses can infect avian species, land based birds such as chickens and ducks and also humans and other mammalian species such as horses, pigs, minks, seals, and whales (Krug, 1989). Evidence places the origin of Influenza A viruses to waterfowl as all 16 hemagglutinin (HA) and 9 neuraminidase (NA) subtypes persist in these avian reservoirs (Fouchier *et al.*, 2005). Although the virus can be isolated from a wide range of hosts, it is clear that influenza A viruses do not replicate indiscriminately across these animal species but rather show a host-range restriction pattern. For example, experimental infection studies demonstrated that human influenza virus can replicate and cause clinical signs but avian influenza viruses replicate poorly and do not induce clinical signs in non-human primate species (Beare and Webster, 1991). The same is true for studies on avian species such as Japanese quail that showed no clinical symptoms and shed low amounts of virus when experimentally infected with human and swine influenza viruses (Makarova *et al.*, 2003). However, pigs, humans and birds demonstrate partial host restriction facilitating occasional virus-transmission from one species to another. For example human-to-pig virus transmission and vice versa, has been frequently documented (Karasin *et al.*, 2000; Kundin, 1970; Myers *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Cross-species transmission of influenza A viruses can lead to an event known as ‘genetic reassortment’ since the virus genome comprises 8 RNA segments. This happens when a host cell is infected simultaneously with two different viruses. During viral replication, the exchange of RNA segments from the different parental strains can result in a novel virus with a new combination of genes. If this virus harbors an HA and/or NA protein that is new to the host it can evade the host immune response and cause an outbreak in that population and other species as well.

Influenza A virus infections in humans and animals are initiated by interactions between the viral HA and sialic acid (SA)-containing molecules on the target epithelial cells (Krug, 1989). Viruses from different host species have specific binding preference to either the *N*-acetylneuraminic acid α 2,3-galactose (SA α 2,3-gal) or the *N*-acetylneuraminic acid α 2,6-galactose (SA α 2,6-gal) linkage (Ito, 2000). Previous research has indicated that the receptor specificity of influenza virus correlates with receptor molecules at the replication site in the hosts' tissue. It has been shown that human influenza viruses (subtypes, H1, H2 and H3) recognize the SA α 2,6-gal linked receptor found predominantly in the humans' upper and lower respiratory tract (Shinya *et al.*, 2006). Avian influenza viruses recognize the SA α 2,3-gal linked receptor which aligns both the respiratory and digestive tract of bird species. Seal and whale lung epithelial cells express the SA α 2,3-gal linked receptor and influenza A virus isolated from these species recognizes the corresponding linkage type (Ito, 2000). This indicates that avian influenza virus can be directly transmitted to sea mammals. The pig trachea has been shown to express both SA α 2,6- and SA α 2,3-gal linked receptors and thus, both human and avian influenza viruses are able to infect pigs (Ito *et al.*, 1998). Recent data have shown that not all avian species display identical types of influenza virus receptors. The type of linkage expressed on the receptor varies depending on the location of epithelial cells in the host and the species of animal. Therefore, the initial step to identify hosts for influenza A viruses as well as potential intermediate hosts for re-assorted viruses is to identify the type of receptor expressed in the upper and lower respiratory tract of the different animal species. This is the first study investigating the distribution of the SA α 2,3-

gal and SA α 2,6-gal linked receptors in the upper and lower respiratory tract of cows and water buffalos.

Materials and Methods

Animal and tissue preparation

Trachea and lung samples were collected from the following species (two healthy animals each): five-week-old quails obtained from the Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Thailand; three-week-old pigs purchased from Charoen Pokphand Group (Bangkok, Thailand); cows and water buffalos of unknown age obtained from a slaughterhouse (Bangkok, Thailand).

Animals were humanely sacrificed. Trachea and lung tissues were freshly collected and immersed in phosphate buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde for 48 hours. Tissue samples were then dehydrated by successive immersion in various alcohols and embedded in paraffin wax. These paraffin-embedded tissues were cut into 5- μ m sections with a microtome, mounted on 3-aminopropyltrethoxy-saline (APS)-coated slides, deparaffinized in xylene and rehydrated by alcohol. At least 4 sections per tissue sample were subjected to immunohistochemistry staining to facilitate detection of each specific type of influenza virus receptor.

Immunohistochemistry

Detection of SA α 2,3-gal and SA α 2,6-gal linked receptors on tissue samples was performed with the digoxigenin (DIG) glycan differentiation kit (Roche, Germany) following the manufacturer's instructions. In brief, the slides were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in tris-buffered saline (TBS) for 1 hour. To detect the SA α 2,3-gal specific receptor the slides were incubated with digoxigenin (DIG)-labeled *Maackia amurensis* lectin

(MAA; Roche, Germany) 5µg/ml in buffer I (TBS with Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} and 1%BSA) for 1 hour. To detect the SAα2,6-gal specific receptor the slides were incubated with *Sambucus nigra* lectin (SNA; Roche, Germany) 5µg/ml in buffer I for 1 hour. The samples were then washed 3 times with TBS and incubated with anti-DIG-alkaline phosphatase (AP) with 1% BSA for 1 hour. After washing 3 times with TBS the slides were developed in either a NBT-BCIP blue color substrate (for SAα2,6-gal) or Vector® Red color substrate (Vector Laboratories, USA) (for SAα2,3-gal). Slides were then mounted and screened for positive signal under a light microscope (Carl Zeiss/Microimaging GMBH, Germany). Quail and pig trachea have been shown to contain both SAα2,3-gal and SAα2,6-gal linked receptors and were thus used to serve as positive controls. Slides stained with buffer I containing neither MAA nor SNA served as negative controls.

Results

SAα2,6-gal linked receptor detection

The results of the SNA lectin-based staining specific for the SAα2,6-gal linked receptor are shown in Fig. 1 and table 1. Quail and pig trachea epithelial lining showed a strong reaction with SNA lectin indicating that both species have receptors for human influenza virus in the trachea. Neither cow nor buffalo trachea showed any reaction to SNA indicating absence of receptors for human influenza viruses. Lungs from all animals included in this study showed reaction to SNA lectin specific for SAα2,6-gal linked receptors indicating expression of the receptor for human influenza viruses (table 1, picture not shown). Pig lung in particular, demonstrated a strong reaction to SNA lectin on the epithelial lining of the big airways such as the bronchi.

SA α 2,3-gal linked receptor detection

The results of the MAA lectin-based staining specific for the SA α 2,3-gal linked receptor are shown in Fig. 2 and table 1. In line with the results of SA α 2,6-gal detection, quail and pig trachea demonstrated intensive reaction to MAA lectin. This indicates that both quail and pig have receptors for avian influenza viruses in their trachea. The epithelial lining of cow trachea showed no reaction to MAA indicating the absence of SA α 2,3-gal linked receptors. In contrast, the epithelial lining of buffalo trachea displayed a strong reaction to MAA. This suggests that buffalo trachea selectively expresses SA α 2,3-gal linked receptors that are specific to avian influenza viruses. The MAA lectin reacted strongly to quail lung tissue while no reaction was detected in the lungs from pig, cow and buffalo. This suggests that out of the four species studied only quail expresses the receptor for avian influenza virus in the lung.

Discussion

Many rural populations in Asian countries keep cows and water buffalos as livestock. In Thailand, water buffalos are raised mainly on small farms in rural areas. Water buffaloes are closely associated with rice paddy cultivation and are considered a part of the Thai farmer's life. They are usually tended by the young or elder members of the family and are allowed to graze freely on the rice field and grass land. Dairy and beef production in Thailand have become more industrialized. However, in rural areas cows/cattle farming are still spotted as in the old days where animals are not confined but are allowed to graze freely during the day and are herded back to the village in the evening. Possibly influenza A virus cross-species transmission can happen to both cows and water buffalo. In Thailand both animal species are in daily contact with all the influenza A virus natural hosts and viral

reservoirs (wild birds). Thai water buffalos in particular are often seen with starlings and mynahs on their backs in the rice fields and mud puddles. Those two bird species are known to be susceptible to the highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus (Boon *et al.*, 2007).

Published data on influenza A virus infection in cattle are scarce. Research reported from Japan in 1978 studied sera from 728 cattle during 1975-1977 and detected 1.5% and 1% of hemagglutination-inhibition (HI) antibody response to human H1 and H3 influenza A virus, respectively (Onta *et al.*, 1978). Another article reviewed the reports on serological findings and virus isolation from cattle in many countries (Lopez and Woods, 1984) indicating that 20% of more than 600 cattle sera in the USA had HI antibodies to swine H1N1, equine H7N7 and also human influenza B viruses. In addition, the article provided data on virus isolation showing that H1N1 and H3N2 virus have been isolated from cattle in Hungary and the USSR respectively. A more recent study (Jones-Lang *et al.*, 1998) in Minnesota used an ELISA based test to detect H1 subtype-specific antibodies in 2,345 bovine sera. The group detected 27% positive along with 31% weak-positive samples that appeared to peak during the months of seasonal influenza epidemics found in the swine population. These previous data indicate that bovine species are susceptible to influenza A virus infection, in particular human and swine influenza. The most recent influenza A virus study conducted in bovine species comprised an experimental infection with the HPAI H5N1 virus (Kalthoff *et al.*, 2008). Four Holstein-Friesian calves were experimentally infected with a high dose of HPAI H5N1 virus and were monitored for 7 days post infection (dpi). It was concluded in the study that the infection rate of cattle with HPAI H5N1 in disease-endemic regions should be low since no animals showed any clinical signs. Although seroconversion

was detected in all animals at 14 (dpi) very low amounts of virus were shed by two of the animals for only 2 dpi. These findings provide an explanation for the data from previous reports. It is well known that the initial step for virus infection is the successful attachment of the viral protein to the specific receptor on the target cells (Knipe *et al.*, 2001). This study demonstrated that the SA α 2,3-gal linked receptors which are the receptors for avian influenza viruses (including the HPAI H5N1 virus) are absent from the upper and lower respiratory tract of cows. Only the SA α 2,6-gal linked receptors which are the receptors for human and swine influenza viruses are present in the lower respiratory tract. Therefore, human and swine influenza viruses can replicate in cows more efficiently than avian influenza viruses. It should be noted however that influenza virus infection in cows may not be as prevalent as in the swine population because the SA α 2,6-gal linked receptors were detected only in the cow's lung but not the trachea. Therefore, it is possible that a higher viral load is required for both human and swine influenza virus to infect and establish influenza A virus-associated respiratory disease in cows compared to the human and swine population. No studies have been conducted to assess influenza A virus infection in water buffalos. The findings of the study indicate that the types of influenza virus receptor expressed in water buffalos are not consistent in the upper and lower respiratory tract. Water buffalos express SA α 2,3-gal linked receptors which are the receptors for avian influenza viruses in the trachea while SA α 2,6-gal linked receptors which are the receptors for human and swine influenza viruses are expressed in the lungs. Since water buffalo expresses both types of receptors in the respiratory tract, it would be interesting to conduct experimental infection studies to further evaluate the possibilities of buffalo as an influenza virus intermediate host. However, such studies require high level biosecurity laboratories and thus, seroprevalence studies to

assess the HI antibody levels against influenza A viruses particularly to HPAI H5N1 may be more practical as the results can also imply virus transmission from birds to buffalo.

Acknowledgement

The authors would like to thank Sinchai Pienchob and Supradit Wangnaitham for their guidance in tissue preparation, Dr. Wijit Banlunara for invaluable comments and Ms. P. Hirsch for editing the manuscript. This study was funded by the Thailand Research Fund (TRF) # MRG5180057.

References

- Beare, A. S. and Webster, R. G. (1991). Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol*, **119**, 37-42.
- Boon, A. C., Sandbulte, M. R., Seiler, P., Webby, R. J., Songserm, T., Guan, Y. and Webster, R. G. (2007). Role of terrestrial wild birds in ecology of influenza A virus (H5N1). *Emerg Infect Dis*, **13**, 1720-1724.
- Fouchier, R. A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G. F., Olsen, B. and Osterhaus, A. D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, **79**, 2814-2822.
- Ito, T. (2000). Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses. *Microbiol Immunol*, **44**, 423-430.
- Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G. and Kawaoka, Y. (1998). Molecular basis for

- 202 the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*, **72**,
 203 7367-7373.
- 204 Jones-Lang, K., Ernst-Larson, M., Lee, B., Goyal, S. M. and Bey, R. (1998). Prevalence of
 205 influenza A virus (H1N1) antibodies in bovine sera. *New Microbiol*, **21**, 153-160.
- 206 Kalthoff, D., Hoffmann, B., Harder, T., Durban, M. and Beer, M. (2008). Experimental
 207 infection of cattle with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect*
 208 *Dis*, **14**, 1132-1134.
- 209 Karasin, A. I., Schutten, M. M., Cooper, L. A., Smith, C. B., Subbarao, K., Anderson, G. A.,
 210 Carman, S. and Olsen, C. W. (2000). Genetic characterization of H3N2 influenza
 211 viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human
 212 and reassortant virus genotypes. *Virus Res*, **68**, 71-85.
- 213 Knipe, D. M., Howley, P. M. and Griffin, D. E. (2001). *Fundamental virology*. Lippincott
 214 Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. xi, 1395.
- 215 Krug, R. M. (1989). *The Influenza viruses*. Plenum Press, New York, pp. xv, 434.
- 216 Kundin, W. D. (1970). Hong Kong A-2 influenza virus infection among swine during a
 217 human epidemic in Taiwan. *Nature*, **228**, 857.
- 218 Lopez, J. W. and Woods, G. T. (1984). Influenza virus in ruminants: a review. *Res Commun*
 219 *Chem Pathol Pharmacol*, **45**, 445-462.
- 220 Makarova, N. V., Ozaki, H., Kida, H., Webster, R. G. and Perez, D. R. (2003). Replication
 221 and transmission of influenza viruses in Japanese quail. *Virology*, **310**, 8-15.
- 222 Myers, K. P., Olsen, C. W. and Gray, G. C. (2007). Cases of swine influenza in humans: a
 223 review of the literature. *Clin Infect Dis*, **44**, 1084-1088.

- 224 Onta, T., Kida, H., Kawano, J., Matsuoka, Y. and Yanagawa, R. (1978). Distribution of
225 antibodies against various influenza A viruses in animals. *Nippon Juigaku Zasshi*, **40**,
226 451-454.
- 227 Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N. and Kawaoka, Y. (2006). Avian flu:
228 influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, **440**, 435-436.
- 229 Yu, H., Zhang, G. H., Hua, R. H., Zhang, Q., Liu, T. Q., Liao, M. and Tong, G. Z. (2007).
230 Isolation and genetic analysis of human origin H1N1 and H3N2 influenza viruses
231 from pigs in China. *Biochem Biophys Res Commun*, **356**, 91-96.
- 232
- 233
- 234
- 235
- 236
- 237
- 238
- 239
- 240
- 241
- 242
- 243
- 244
- 245
- 246

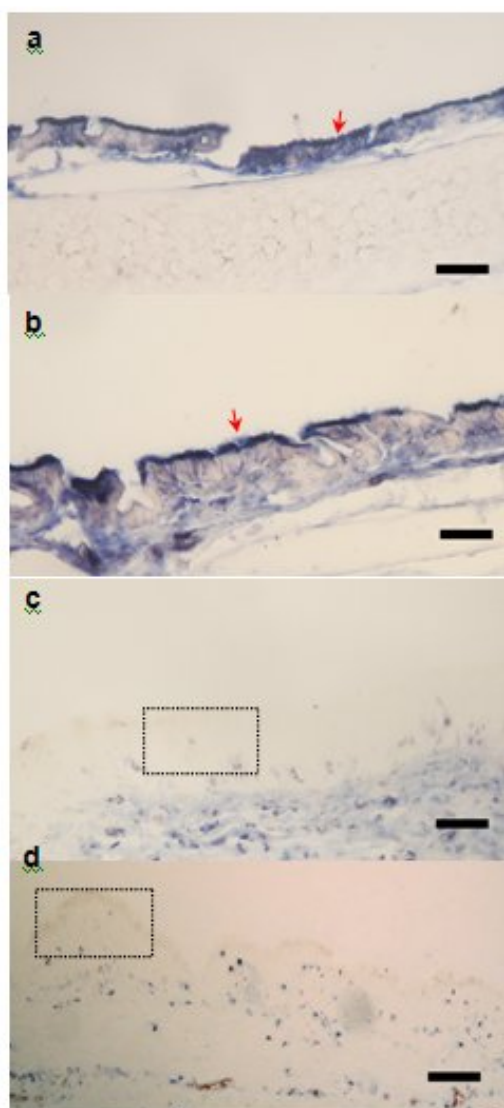


Fig. 1 Sialic acid (SA) α 2,6-galactose (gal) linked receptor detection. Trachea sections from (a) Quail, (b) Pig, (c) Buffalo and (d) Cow. Red arrows indicate epithelial cells with positive staining. Dotted box indicate area of epithelial cells with negative staining. IHC. Bar, 50 μ m.

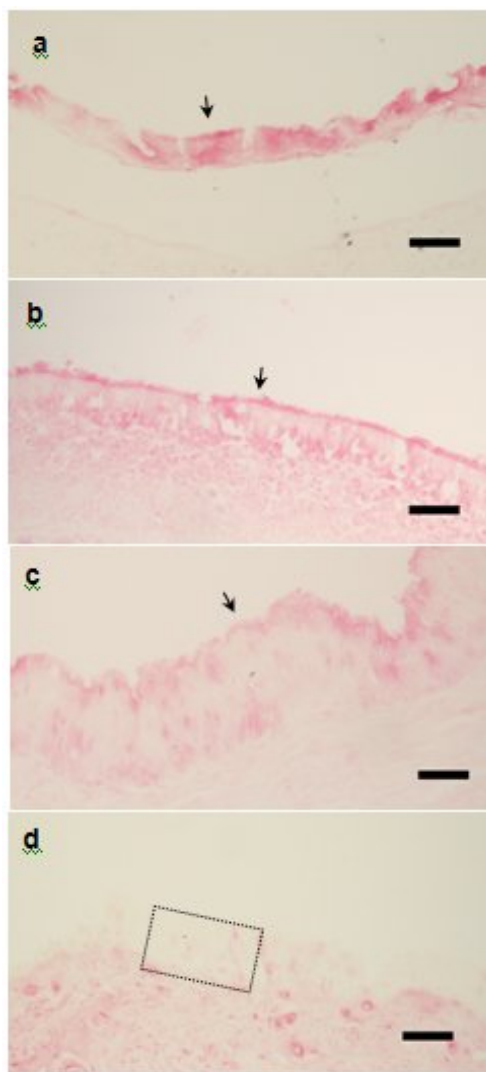


Fig. 2 Sialic acid (SA) α 2,3-galactose (gal) linked receptor detection. Trachea sections from (a) Quail, (b) Pig, (c) Buffalo and (d) Cow. Black arrows indicate epithelial cells with positive staining. Dotted box indicate area of epithelial cells with negative staining. IHC. Bar, 50 μ m.

Table 1

Summary of Sialic acid (SA) α 2,3-galactose and SA α 2,6-galactose linked receptor expression in the respiratory tract of quail, pig, buffalo and cow

Animal	Organ	α 2,3-galactose	α 2,6-galactose
Quail	Trachea	+	+
	Lung	+	+
Pig	Trachea	+	+
	Lung	-	+
Buffalo	Trachea	+	-
	Lung	-	+
Cow	Trachea	-	-
	Lung	-	+

1

Table 1

2

Summary of Sialic acid (SA) α 2,3-galactose and SA α 2,6-galactose linked receptor

3

expression in the respiratory tract of quail, pig, buffalo and cow

Animal	Organ	α 2,3-galactose	α 2,6-galactose
Quail	Trachea	+	+
	Lung	+	+
Pig	Trachea	+	+
	Lung	-	+
Buffalo	Trachea	+	-
	Lung	-	+
Cow	Trachea	-	-
	Lung	-	+

4

Figure 1a
[Click here to download high resolution image](#)

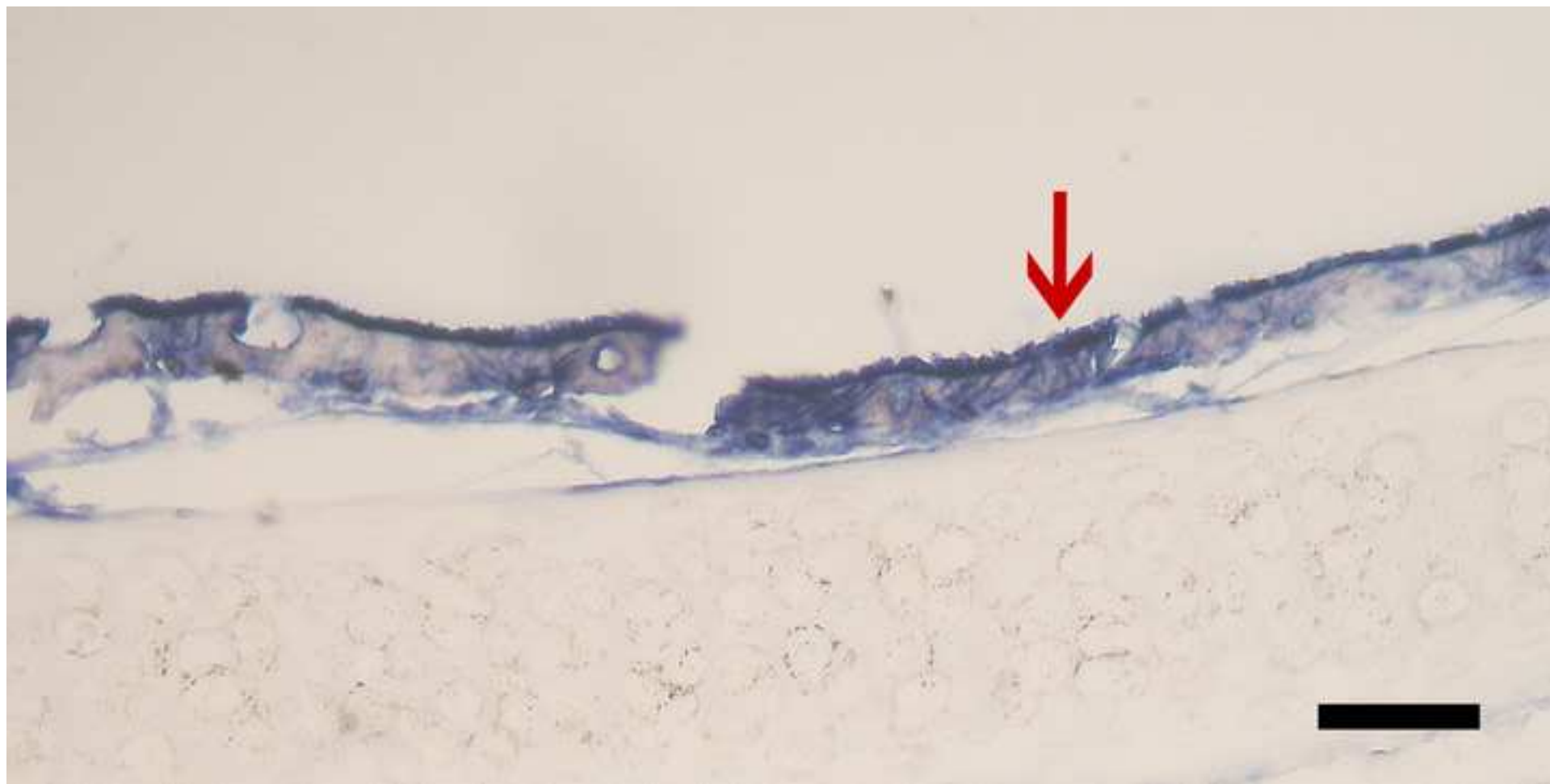


Figure 1b
[Click here to download high resolution image](#)

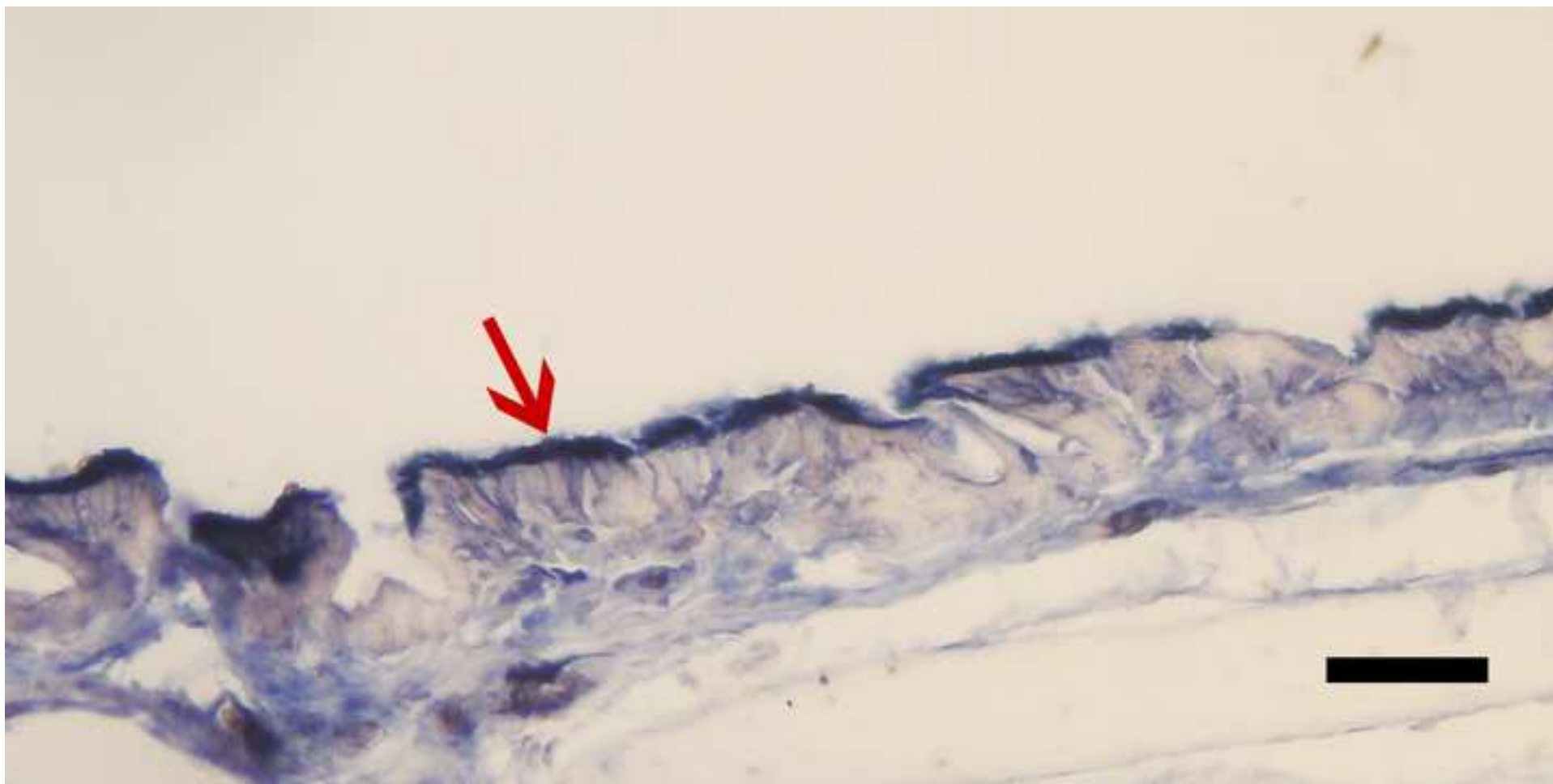


Figure 1c
[Click here to download high resolution image](#)



Figure 1d
[Click here to download high resolution image](#)

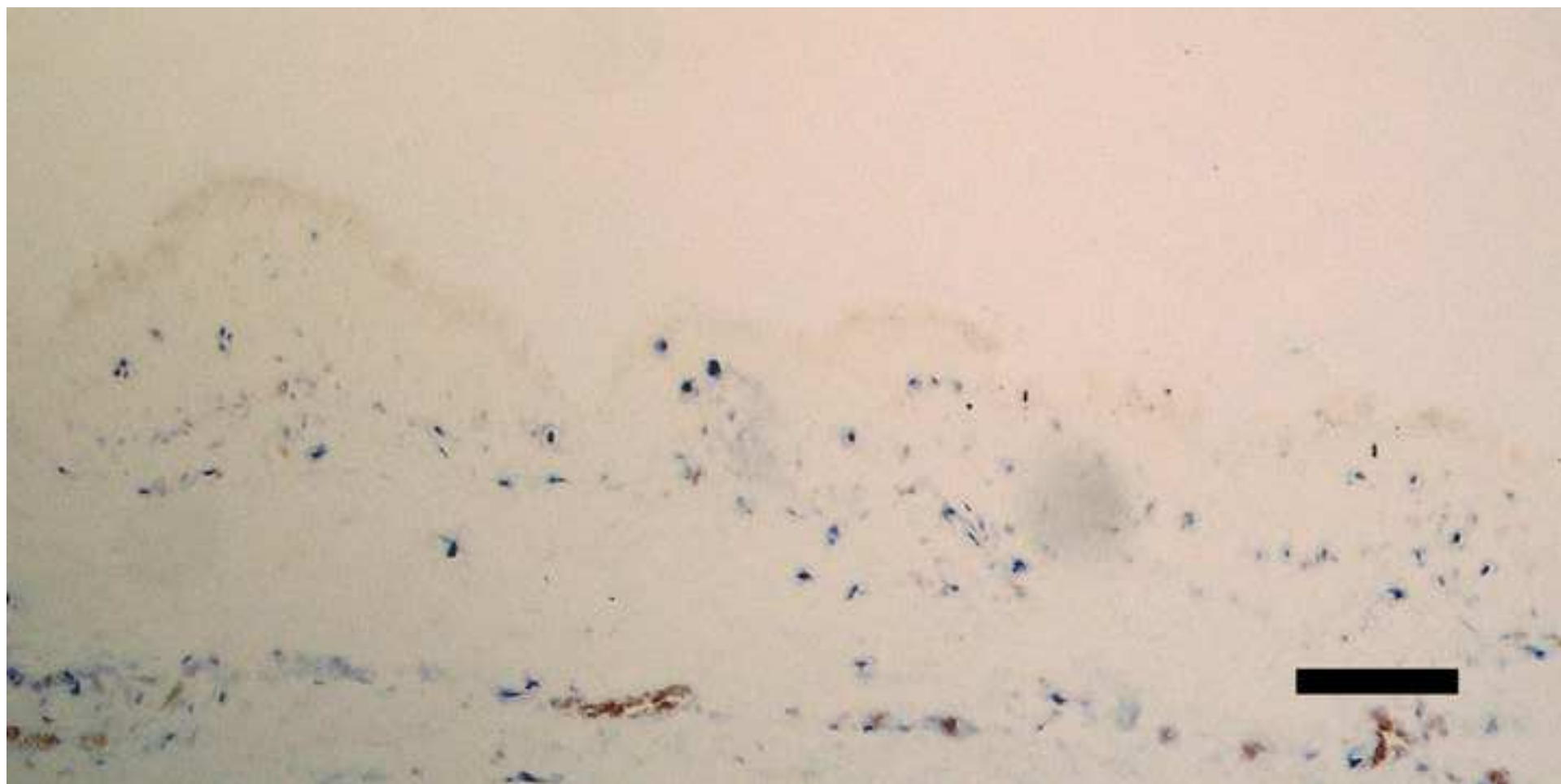


Figure 2a
[Click here to download high resolution image](#)

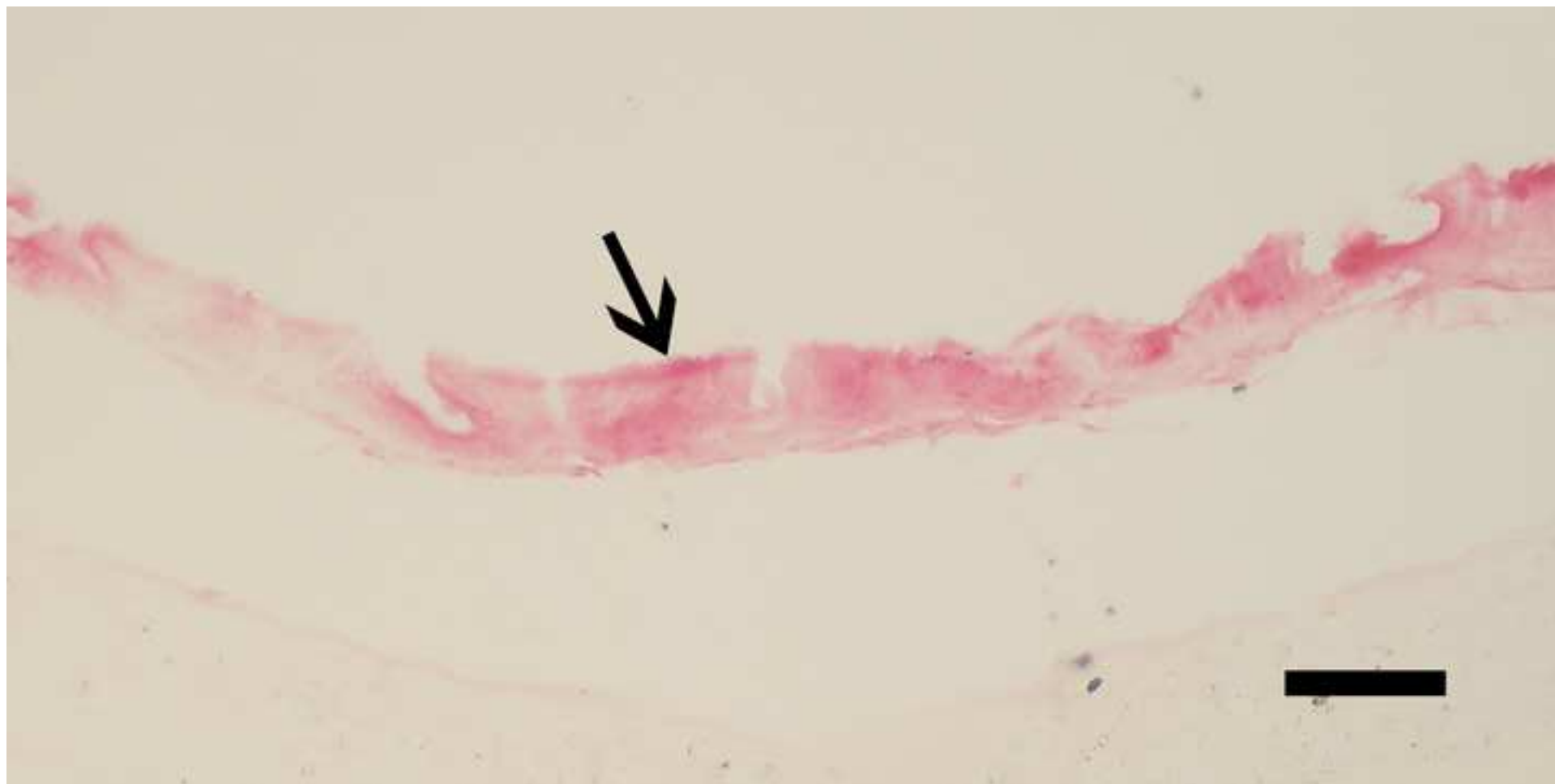


Figure 2b
[Click here to download high resolution image](#)

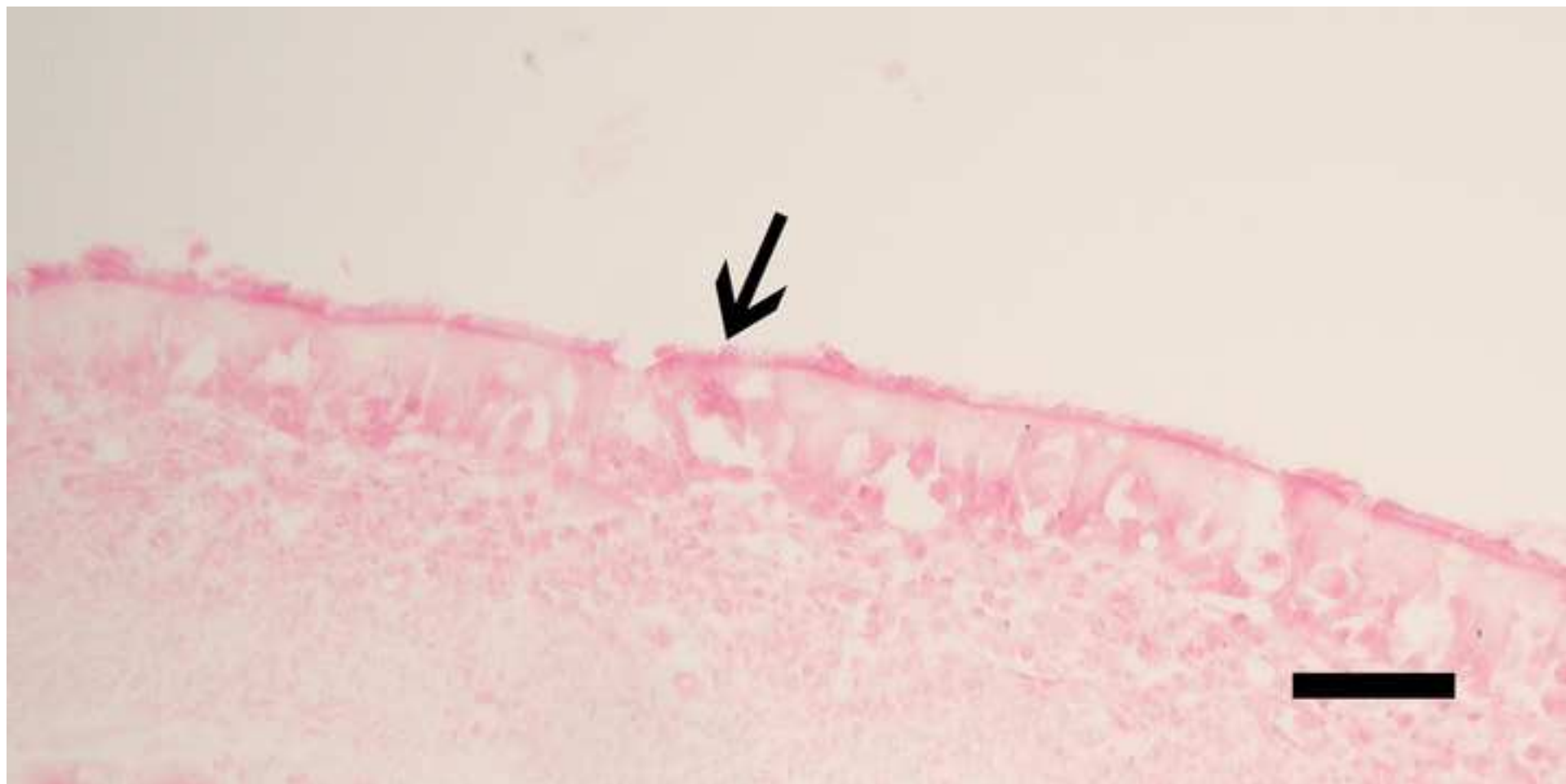


Figure 2c
[Click here to download high resolution image](#)

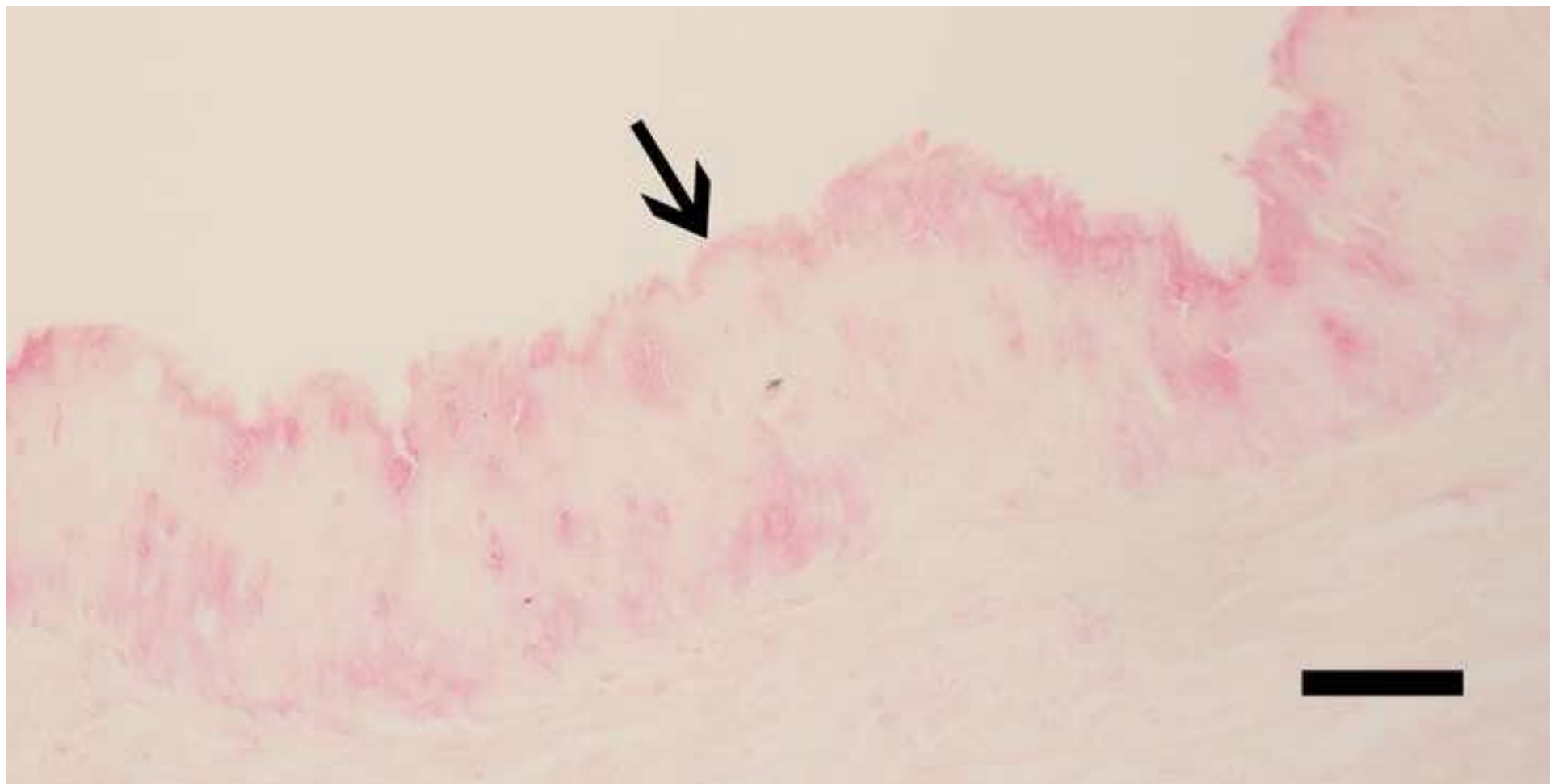


Figure 2d
[Click here to download high resolution image](#)

