บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ชนิดรุนแรง (Highly Pathogenic Avian Influenza, HPAI) ของสัตว์ปีกในพื้นที่ประเทศไทยในปี พ.ศ. 2547 เป็นสาเหตุให้มีการทำลาย สัตว์ปีกชนิดต่างๆ มากกว่า 60 ล้านตัว และก่อให้เกิดความสูญเสียชีวิตของประชากรไทยถึง 17 คน จากผู้ป่วยที่ยืนยันการติดเชื้อ 25 คน โรคดังกล่าวมีสาเหตุจากไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิด A กลุ่มย่อย H5N1 เป็นไวรัสชนิดอาร์เอนเอ (RNA virus) ในตระกูล Orthomyxoviridae ซึ่งสามารถจำแนกกลุ่มย่อย (subtype) ของไวรัส จากการเข้าคู่กันของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin) และนิวรามินิเดส (neuraminidase) ที่ปรากฏบนเปลือกหุ้ม ปัจจุบันสามารถจำแนกออกได้ 16 ชนิด (H1-16) และ 9 ชนิด (N1-9) ตามลำดับ (Fouchier et al., 2005) ความรุนแรงในการก่อโรคขึ้นกับชนิดของสัตว์ สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสและปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุ การติดเชื้อแทรกซ้อน ระดับภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่ติดเชื้อ ทางที่สัตว์ได้รับเชื้อ ปริมาณของเชื้อและระยะเวลาที่สัตว์สัมผัสเชื้อ รวมทั้งปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลให้เกิดความเครียด การเกิดโรคชนิดรุนแรงในสัตว์ปีกพบว่ามีอัตราการตายที่อาจสูงถึง 100% องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศหรือ Office International des Epizooties (OIE) ได้จัดให้โรคติดเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ชนิดรุนแรง อยู่ในกลุ่มโรคที่ต้องรายงาน (notifiable diseases) เนื่องจากเป็นโรคอันตรายร้ายแรงและมีความสามารถในการแพร่กระจายไวรัสไปสู่สัตว์ชนิดอื่น นอกจากนี้พบว่าไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา สามารถติดต่อเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์และก่อให้เกิดอาการป่วยที่รุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ โรคนี้จึงจัดว่าเป็นภัยคุกคามที่สำคัญต่อสุขภาพอนามัยของประชากรภายในประเทศไทยและภูมิภาคต่างๆทั่วโลก โดยเฉพาะภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก เชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา นอกจากก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสุขภาพสัตว์และมนุษย์แล้วนั้น การระบาดของโรคยังส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกและการส่งออกผลิตภัณฑ์ของสัตว์ปีก ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกไก่สดแช่แข็งมากถึง 4 หมื่นล้านบาท ในปี พ.ศ. 2545 แต่ภายหลังการระบาดของโรคในพื้นที่ประเทศไทยตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2546 ปัจจุบันพบว่ามูลค่าการส่งออกไก่สดแช่แข็งลดลงกว่า 90%

มาตรการการควบคุมโรคที่ยอมรับในระดับสากล คือ การทำลายฝูงสัตว์ที่ติดเชื้อและประกาศเป็นเขตการระบาดของโรค การควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์และเฝ้าระวังโรคในพื้นที่ควบคุม รวมทั้งมีมาตรการประกอบอย่างอื่น เช่น การกำหนดเขตทำวัคซีนเพื่อลดการแพร่กระจาย

ของไวรัสในพื้นที่ โดยพบว่าข้อดีของการให้วัคซีน คือ สามารถลดการปล่อยไวรัสออกสู่สิ่งแวดล้อม มีการทดลองยืนยันการใช้วัคซีนในสัตว์ปีก สามารถลดการเพิ่มจำนวนและปริมาณการแพร่กระจายของไวรัสได้ (Ruben, 1987) อย่างไรก็ตาม รายงานการทดลองใช้วัคซีนที่ผลิตจากไวรัสสายพันธุ์แตกต่างกัน แม้จะสามารถตรวจพบระดับของแอนติบอดี แต่แอนติบอดีดังกล่าวไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสในท้องถิ่นได้ (Trevor et al., 2000) และพบว่าไวรัสที่นำมาผลิตเป็นวัคซีนจะต้องมีความเหมือนกันของลำดับสารพันธุกรรมมากกว่า 90% จึงสามารถกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไวรัส รวมทั้งสามารถลดการปลดปล่อยไวรัสได้ (Swayne et al., 2000) ดังนั้นการให้วัคซีนที่เหมาะสมกับการระบาดของโรคในท้องถิ่นต่างๆ ควรต้องมีการตรวจสอบลำดับสารพันธุกรรมเป็นประจำ เพื่อพัฒนาวัคซีนให้เหมาะสมกับไวรัสที่ระบาดในขณะนั้น การประกาศเป็นเขตปลอดโรคในพื้นที่เป้าหมายที่กำหนด ควรต้องมีการตรวจแยกระหว่างสัตว์ปีกที่เคยได้รับวัคซีนและสัตว์ปีกที่ติดเชื้อในธรรมชาติ ซึ่งทำได้โดยการแยกชนิดของแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในร่างกาย การใช้วัคซีนชนิดเชื้อตายในสื่อน้ำมันเตรียมจากไวรัสทั้งโมเลกุล หรือการใช้วัคซีนที่เตรียมได้จากการนำส่วนประกอบต่างๆของไวรัส เช่น ฮีแมกกลูตินิน, นิวรามินิเดส, โปรตีน M และนิวคลิโอโปรตีน (nucleoproteins) รวมทั้งการแยกเอาเฉพาะส่วนของยีน (genes) หรือดีเอ็นเอ (DNA) ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้างโปรตีนดังกล่าว โดยนำไปประกอบเข้าตัวกลางอื่นๆ เช่น วัคซีนที่เตรียมจากการตัดต่อยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนฮีแมกกลูตินินเข้ากับยีนของไวรัสฝีดาษสัตว์ปีก (fowl pox virus) (Webster et al., 1991) หรือ baculovirus-expressed HA proteins (Swayne et al., 2000) แต่การใช้วัคซีนดังกล่าวข้างต้น อาจจะก่อให้เกิดปัญหาในการวินิจฉัยแยกชนิดของแอนติบอดีที่เกิดจากไวรัสที่ก่อโรคในธรรมชาติและไวรัสที่มีอยู่ในวัคซีน

ไวโรโซม (virosomes) เป็นอนุภาคที่เกิดจากการจัดเรียงโมเลกุลของโปรตีนและไขมันที่เป็นองค์ประกอบบนเปลือกหุ้มไวรัส (viral envelopes) โครงสร้างใหม่ที่เกิดขึ้นมีลักษณะรูปร่างและส่วนประกอบของโปรตีนใกล้เคียงกับไวรัสต้นแบบ แต่จะไม่ปรากฏส่วนประกอบของนิวคลิโอโปรตีนและสารพันธุกรรมอยู่ในโครงสร้างของไวโรโซม ส่งผลให้ไวโรโซมไม่มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในเซลล์โฮสต์ (Huckrieda et al., 2003) แต่ยังคงความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Gluck and Metcalfe, 2003) ซึ่งคาดว่าจะเป็นทางเลือกที่อาจนำมาใช้เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมวัคซีนป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาในสัตว์ปีก และเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มขีดความสามารถของจำแนกความแตกต่างระหว่างแหล่งที่มาและชนิดของแอนติบอดีต่อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ที่เกิดขึ้น (Differential Infected from vaccinated animals ; DIVA)

1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.1.1 เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมไวโรโซมจากไวรัสเอเวียนอินฟลูเอ็นซา

1.1.2 เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติพื้นฐานทางชีววิทยาของไวโรโซมที่เตรียมจากไวรัสเอเวียนอินฟลูเอ็นซา

1.2 สมมติฐานงานวิจัย

1.2.1 ไวโรโซมซึ่งเตรียมจากไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา ควรมีคุณลักษณะทางกายภาพและโปรตีนองค์ประกอบแตกต่างจากไวรัสดั้งเดิม โดยอนุภาคของไวโรโซมไม่ควรมีนิวคลิโอแคปซิดโปรตีนบรรจุอยู่ภายใน ยกเว้นไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1.3.1 ทราบถึงโครงสร้างและองค์ประกอบของไวโรโซม รวมทั้งคุณสมบัติพื้นฐานของอนุภาคไวโรโซมที่เตรียมได้จากไวรัสเอเวียนอินฟลูเอ็นซา

1.3.2 เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนารูปแบบและวิธีการในการเตรียมวัคซีนป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอ็นซาในสัตว์ปีก

1.4 กรอบแนวคิดงานวิจัย

การทดลองทางห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมและทดสอบคุณลักษณะทางด้านกายภาพและชีววิทยาของไวโรโซมที่เตรียมจากเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ชนิด เอช5เอ็น1 โดยแบ่งออก เป็น 3 ส่วนดังนี้

1.4.1 <u>ศึกษาวิธีการเตรียมไวโรโซมจากไวรัสที่ผ่านการลดฤทธิ์ (inactivated virus)</u>

1.4.2 <u>ศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติทางกายภาพของไวโรโซมเปรียบเทียบกับไวรัสต้นแบบ</u>

1.4.2.1 การศึกษารูปร่างของไวโรโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

1.4.2.2 การศึกษาโปรตีนองค์ประกอบของไวรัส ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

1.4.2.3 การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค Western immunoblotting

1.4.3 <u>ศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติทางชีวภาพของไวโรโซมเปรียบเทียบกับไวรัสต้นแบบ</u>

1.4.3.1 การทดสอบด้วยวิธีการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination, HA activity)