บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (Swine Influenza)

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร หรือ Swine influenza virus (SIV) จัดอยู่ในแฟมิลี่ Orthomyxoviridae กลุ่ม Influenza virus A ไวรัสสายพันธุ์ที่มีรายงานพบการระบาดในสุกร มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ไวรัสสายพันธุ์ H1N1, H3N2 และ H1N2 ส่วนกลุ่ม Influenza virus B และ C สามารถตรวจพบไวรัสได้ในสุกร แต่ไม่สามารถก่อโรคได้ (Slemons, 2002; Dee, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานการเพาะแยกไวรัสไข้หวัดสัตว์ปีกสายพันธุ์ H4N6, H3N3 และ H1N1 ได้จากสุกรป่วยในประเทศแคนาดา แต่ไม่พบการระบาดไปยังบริเวณอื่น และเมื่อปี พ.ศ. 2549 มีรายงานพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N1 จากสุกรป่วยในสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีแนวโน้มวนเวียนระบาดในสุกรต่อไป (Lekcharoensuk et al., 2006) โรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีรายงานการระบาดทั่วโลก มักพบการระบาดในฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาว การติดต่อของโรคโดยการหายใจ และการสัมผัสกับสิ่งปนเปื้อนเชื้อโดยตรง โดยไวรัสจะถูกขับออกมากับสิ่งคัดหลั่งจากทางเดินหายใจของสุกรป่วย ระยะฟักตัวของโรคประมาณ 1-3 วัน หลังจากนั้นสุกรป่วยจะแสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน ได้แก่ ซึม เบื่ออาหาร นอนสุม เคลื่อนไหวลำบาก เหนื่อยง่าย เมื่อถูกต้อนหรือบังคับให้เคลื่อนไหวจะแสดงอาการหายใจหอบ อ้าปากหายใจหรือหายใจด้วยท้อง ไอ จาม มีน้ำมูก และมีไข้ (อุณหภูมิเมื่อวัดทางทวารหนัก ประมาณ 40.5 - 41.7 องศาเซลเซียส) ในแม่สุกรท้องอาจเพิ่มการแท้งได้ ระยะเวลาแสดงอาการประมาณ 3-7 วัน สุกรป่วยมักไม่เสียชีวิต แต่จะติดเชื้อโรคแทรกซ้อนได้ง่าย อัตราการป่วยของสุกรในฝูงอาจสูงถึงร้อยละ 100 แต่อัตราการตายต่ำประมาณร้อยละ 1 ของสุกรในฝูง (Easterday and Van Reeth, 1999) ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เนื่องจากอัตราการเพิ่มน้ำหนักช้าลง และต้องใช้เวลาในการขุนนานขึ้น เป็นโรคที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสุกรสูงขึ้น นอกจากนั้นไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรอาจติดต่อสู่คนที่มีความเสี่ยงได้ (Olsen et al., 2002; Taubenberger and Morenst, 2006) จากรายงานของ Myers และคณะ (2006) พบว่าพนักงานในฟาร์มสุกรที่สัมผัสใกล้ชิดสุกรป่วย จะมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสูง ดังนั้นจึงควรตรวจสอบทางซีรัมวิทยาต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรให้พนักงานในฟาร์มสุกร รวมทั้งควรแนะนำให้พนักงานในฟาร์มฉีดวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ เพื่อลดโอกาสในการแพร่เชื้อและการเกิดการรวมกันหรือการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มาจากคนและสุกร

2.2 รูปพรรณสัณฐานของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Morphology of influenza A virus)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่มีรูปร่างได้หลายแบบ ปกติจะมีรูปร่างกลม (spherical) แต่ถ้าเลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงนานๆ จะมีรูปร่างลักษณะคล้ายเป็นเส้น (filamentous) จัดเป็นไวรัสที่มีขนาดกลาง มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 80-120 นาโนเมตร (Slemons, 2002) โครงสร้างของไวรัสประกอบด้วยเปลือกหุ้ม (envelope) เป็นไขมันชั้นนอกสุด ที่ผิวนอกของเปลือกหุ้มมีไกลโคโปรตีนยื่นออกมา 2 ชนิด คือ ฮีเมกกลูตินิน (haemagglutinin; HA) มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) และนิวรามินิเดส (neuraminidase; NA) มีรูปร่างเหมือนดอกเห็ด (mushroom-shaped) ถัดเข้ามาจากเปลือกหุ้มเป็นชั้นของร่างแหโปรตีน (matrix protein; M) มี 2 ชั้นคือ ร่างแหโปรตีน 1 (M1) และร่างแหโปรตีน 2 (M2) โดยชั้นร่างแหโปรตีน 2 จะอยู่ถัดจากเปลือกหุ้ม ลักษณะเป็นโครงสร้างบางๆ ประกอบด้วยโมเลกุลของโปรตีนประมาณ 20-60 โมเลกุลต่อไวริออน ถัดไปเป็นชั้นของร่างแหโปรตีน 1 ซึ่งจะห่อหุ้มโครงสร้างเชิงซ้อนของไรโบนิวคลีโอโปรตีน (ribonucleoprotein complexes; RNP complexes) ไว้ ส่วนของ RNP complexs ประกอบด้วยกรดไรโบนิวคลิอิก (ribonucleic acid; RNA) เป็นโครงสร้างที่บรรจุจีโนมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ไว้ (ภาพที่ 3) จีโนมของไวรัสมี 8 ชิ้น (segments) แต่ละชิ้นประกอบด้วยกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid; RNA) นิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) และเอนไซม์โพลีเมอเรสเอ (acidic polymerase; PA) โพลีเมอเรสบี 1 (basic polymerase 1; PB1) และโพลีเมอเรสบี 2 (basic polymerase 2; PB2) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการคัดลอก (transcription) และเพิ่มจำนวน (replication) ของกรดไรโบนิวคลิอิก นอกจากนี้ยังพบโครงสร้างที่เรียกว่า non-structural proteins (NS) ได้แก่ NS2 พบได้ในไวรัสไข้หวัดใหญ่ทุกไวริออน ส่วน NS1 ตรวจพบได้เฉพาะในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เท่านั้น ไวรัสไข้หวัดใหญ่มีจีโนมทั้ง 8 ชิ้น (ตารางที่ 2) เป็นกรดไรโบนิวคลิอิกสายเดี่ยว ที่มีประจุเป็นลบ (single-stranded RNA) การที่มีจีโนมแยกกันเป็นชิ้นๆ หลายชิ้น ทำให้ไวรัสมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์หรือแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมในช่วงเวลาที่มีการเพิ่มจำนวนในเซลล์โฮสต์ได้ ซึ่งอาจทำให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ได้ (Heinen, 2003)

การจำแนกสายพันธุ์ (subtype) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ จำแนกตามคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของไกลโคโปรตีนฮีเมกกลูตินินและนิวรามินิเดส ปัจจุบันพบมีไกลโคโปรตีนฮีเมกกลูตินิน 16 ชนิด และไกลโคโปรตีนนิวรามินิเดส 9 ชนิด (Fouchier et al., 2005) ทุกสายพันธุ์พบได้ในนกน้ำ (water flow) นกน้ำเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญในวงจรการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Mittelholzer, 2006) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมอื่นๆ สามารถพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ได้ เช่นในมนุษย์พบสายพันธุ์ H1N1, H2N2 และ H3N2 ในม้าพบสายพันธุ์ H3N8 และ H7N7 (Collins et al., 2002; Olsen, 2002) ในสุกรพบสายพันธุ์ H1N1, H3N2 และ H1N2 ดังที่ได้กล่าว

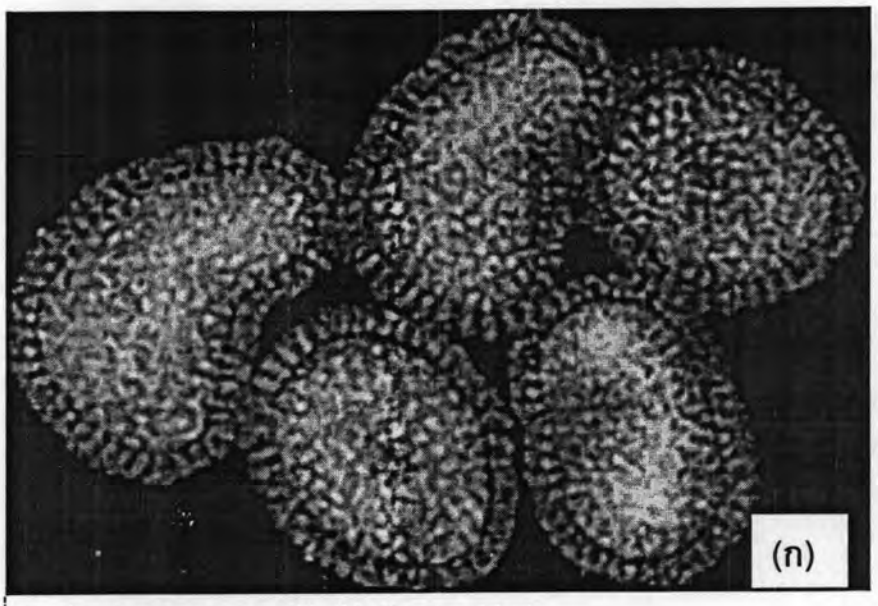
มาแล้วข้างต้น ไกลโคโปรตีนฮีเมกกลูตินินมีหน้าที่เกี่ยวกับการจับกับตัวรับบนผิวของเซลล์ และการเชื่อมรวมกันของเยื่อหุ้มเซลล์ในขั้นตอนการเข้าสู่เซลล์ ส่วนไกลโคโปรตีนนิวรามินิเดสทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ในขั้นตอนการปลดปล่อยลูกหลานของไวรัสออกจากเซลล์ (Heinen, 2003; Mittelholzer, 2006)

ตารางที่ 2 แสดงจีโนมของ Influenza A virus ทั้ง 8 ท่อน

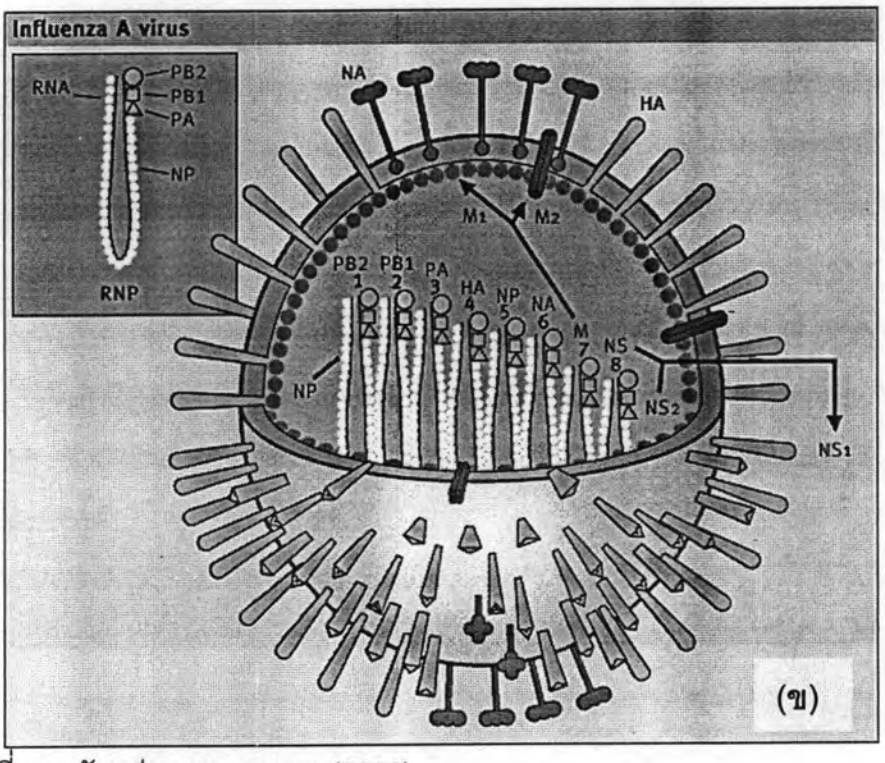
RNA segment	Nucleotides	Protein	Amino acid	Molecules/virion
1	2341	Polymerase PB2	759	30-60
2	2341	Polymerase PB1	757	30-60
3	2233	Polymerase PA	716	30-60
4	1778	Haemagglutinin HA	566	500
5	1565	Nucleoprotein NP	498	1000
6	1413	Neuraminidase NA	454	100
7	1027	Matrix protein M1	252	3000
		Matrix protein M2	97	20-60
8	890	Non-structural protein NS1	230	
		Non-structural protein NS2	121	130-200

ที่มา : ดัดแปลงจาก Heinen (2003)

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ที่มา : home.comcast.net/.../I/Influenza.html



ที่มา : ดัดแปลงจาก Heinen (2003)

ภาพที่ 3 แสดง (ก) รูปร่างของไวรัสไข้หวัดใหญ่จากภาพถ่ายอิเล็คตรอนกำลังขยาย 284,000X
(ข) ส่วนประกอบต่างๆ ของไวรัสไข้หวัดใหญ่

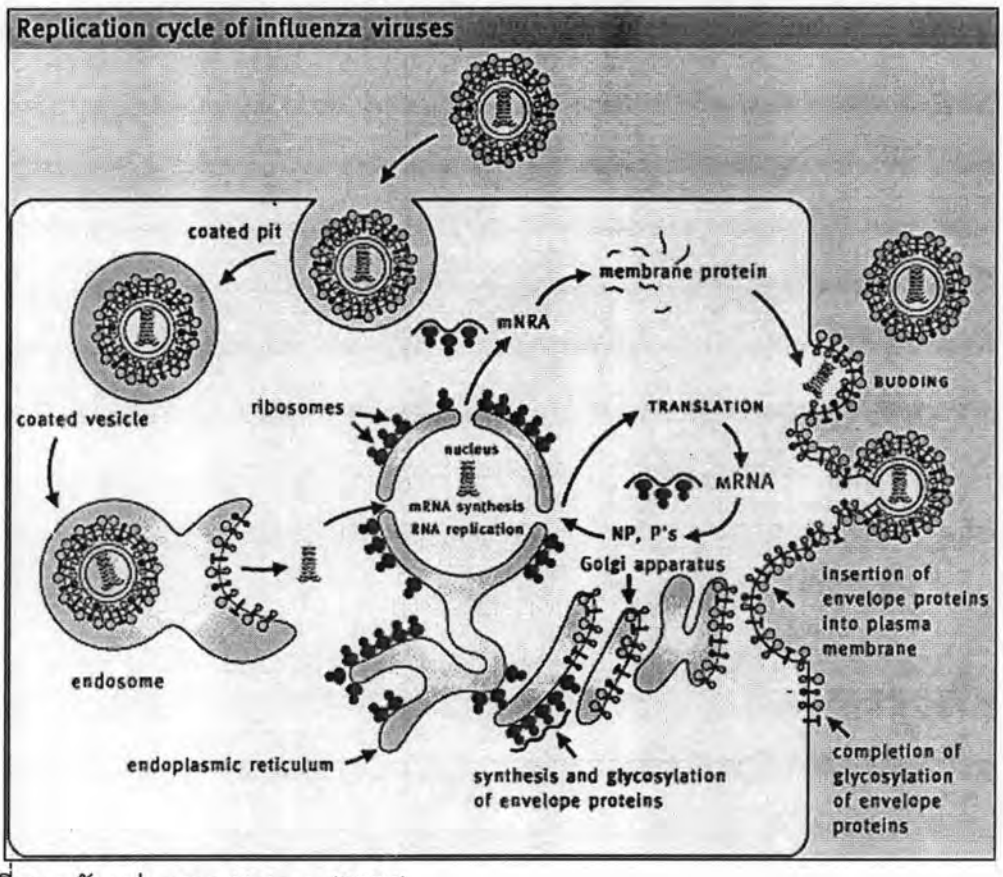
2.3 ขั้นตอนการเข้าเซลล์และเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่

ขั้นตอนการเข้าเซลล์และการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ (ภาพที่ 4) ดังนี้ (Frederick et al., 1999; Heinen, 2003)

1. ไวรัสจับกับตัวรับบนผิวเซลล์
2. การเข้าเซลล์ (endocytosis)
3. การเชื่อมกันของไวรัสกับ endosomal membrane
4. จีโนมของไวรัสเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์
5. การเพิ่มจำนวนจีโนมและการสังเคราะห์โปรตีน
6. การประกอบลูกหลานไวรัสและการออกจากเซลล์

ไวรัสไข้หวัดใหญ่จะเข้าสู่เซลล์ได้จะต้องจับกับส่วนรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์ (sialic acid-containing receptors) โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) จะทำหน้าที่ย่อยและแยกโปรตีนฮีเมกกลูตินินออกเป็น 2 ส่วน คือโปรตีน HA1 และ HA2 ส่วนของโปรตีน HA1 จะมีตำแหน่งที่ใช้จับกับส่วนรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์โฮสต์ ความจำเพาะของโปรตีน HA1 กับส่วนรับบนผิวเซลล์มีบทบาทในการกำหนดชนิดของโฮสต์ (host specificity) (Cross et al., 2001) โดยพบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจับส่วนรับบนผิวเซลล์ที่ตำแหน่ง N-acetylneuraminic acid-2,3-galactose ซึ่งพบมากที่ทางเดินอาหารของสัตว์ปีก ส่วนไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์จับส่วนรับบนผิวเซลล์ที่ตำแหน่ง N-acetylneuraminic acid-2,6-galactose ซึ่งพบมากที่ทางเดินหายใจ และบนผิวเซลล์ของสุกรมีส่วนรับทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวที่ทางเดินหายใจ (Heinen, 2003) เมื่อไวรัสไข้หวัดใหญ่จับกับตัวรับบนผิวเซลล์แล้ว จะถูกดึงเข้าเซลล์ด้วยขบวนการ endocytosis ผ่านทาง clathrin-coated pits และ vesicle (Cross et al., 2001) ต่อจากนั้นจะเกิดการเชื่อมกันของเปลือกหุ้มไวรัสกับเยื่อหุ้มเอนโดโซม (endosome) พบว่าโปรตีน M2 มีบทบาทในการควบคุมการเข้าออกของโปรตอน ซึ่งส่งผลให้พีเอชต่ำลง จึงกระตุ้นการทำงานของโปรตีน HA2 ทำให้เกิดการเชื่อมกันของเยื่อหุ้มทั้งสอง ต่อจากนั้นโปรตีน M1 จะแยกตัวออกทำให้ RNP complexes เคลื่อนออกมาสู่ไซโตพลาสมและเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสต่อไป เพื่อเพิ่มจำนวนกรดไรโบนิวคลิอิค โดยการทำหน้าที่ร่วมกันของโปรตีน PB1 PB2 PA และ NP ในการกระตุ้นขบวนการคัดลอกสายไรโบนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีจีโนมของไวรัสเป็นต้นแบบ รวมทั้งการเติมหมวก (cap) และหมู่นิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 5' และ 3' เพื่อเปลี่ยนให้ mRNA ที่สร้างขึ้นในนิวเคลียสกลายเป็น RNA ของไวรัส จึงทำให้ RNA ของไวรัสไม่ผ่านการตรวจสอบความผิดพลาด (proofreading) RNA ตามขบวนการปกติของเซลล์ ทำให้มีโอกาสเกิดความผิดพลาดของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละรอบของการเพิ่มจำนวนไวรัส อัตราการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่มีประมาณ 1.5×10^{-5} ต่อวงรอบของการติดเชื้อ (Mittelholzer, 2006)

โปรตีน NS มีบทบาทในการขนส่ง RNA ของไวรัสออกจากนิวเคลียส เพื่อไปประกอบกับโครงสร้างอื่นๆ เป็นไวรัสที่สมบูรณ์และออกจากเซลล์ต่อไป พบว่าโปรตีนนิวรามินิเดสมีบทบาทในการปลดปล่อยลูกหลานของไวรัสออกจากเซลล์ โดยทำหน้าที่ย่อยทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนโปรตีน HA2 มีบทบาทในการเชื่อมกันของเปลือกหุ้มไวรัสก่อนออกนอกเซลล์ (Mittelholzer, 2006)



ที่มา : ดัดแปลงจาก Heinen (2003)

ภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่

2.4 การกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่

การกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่มี 2 แบบ คือ

1. Antigenic drift คือการสะสมของการกลายพันธุ์ตำแหน่งเดียว (point mutation) ในยีนส่วนที่สร้างโปรตีนของไวรัส (โดยเฉพาะโปรตีนฮีเมกกลูตินิน) เพื่อหลบหลีกภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ทำให้เกิดการระบาดซ้ำของไวรัสสายพันธุ์เดิม อีกทั้งในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนไวรัสไข้หวัดใหญ่นั้น อาศัยเอนไซม์ RNA polymerase ซึ่งไม่มีการตรวจสอบความผิดพลาด การเพิ่มจำนวนไวรัสในแต่ละรอบนั้นพบมีอัตราความผิดพลาด 1/10 เบส ทำให้มีโอกาสเกิดลูกหลานของไวรัสที่ไม่เหมือนเดิมได้จำนวนมาก เพียงแต่ว่าบางอนุภาคเท่านั้นที่สามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้ พบว่าอัตรา

การกลายพันธุ์ในลักษณะนี้ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจะเกิดช้ากว่าในมนุษย์ (Slemons, 2002; Mittelholzer, 2006) อัตราการเกิดการกลายพันธุ์ในส่วนโปรตีน HA1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ classic H1N1 และไวรัสไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์สายพันธุ์ H1N1 ประมาณร้อยละ 0.4-0.48 และ 0.8 ของจำนวนกรดอะมิโนต่อปี ตามลำดับ (Olsen, 2002)

2. Antigenic shift เกิดจากการติดเชื้อข้ามชนิดโฮสต์ (interspecies transmission) หรือการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างไวรัส 2 สายพันธุ์ ทำให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่และเกิดการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่เป็นบริเวณกว้างและอาจติดต่อไปยังสัตว์ได้หลายชนิด ถ้าไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2 สายพันธุ์ ที่มีจีโนมแตกต่างกันทั้ง 8 ชิ้น เกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกัน จะมีโอกาสเกิดไวรัสจีโนไทป์ใหม่ได้ 256 จีโนไทป์ (Mittelholzer, 2006) การระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H2N2 หรือ Asian flu ที่ระบาดในมนุษย์เมื่อปี ค.ศ. 1957 เกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์และสัตว์ปีก (Heinen, 2003) ส่วนไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่ระบาดในแถบเอเชียทำให้มีผู้คนเสียชีวิตจำนวนมากนั้น เกิดจากการติดเชื้อข้ามชนิดโฮสต์ (Olsen, 2002)

2.5 ระบาดวิทยา

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีการระบาดตลอดปีและการระบาดสูงสุดในช่วงฤดูหนาวและช่วงต่อฤดู การแสดงอาการของสุกรป่วยและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่ สายพันธุ์ของไวรัส ทางที่ติดเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน เป็นต้น สุกรที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรอาจไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน เช่น ไอ จาม มีไข้ หายใจหอบ เป็นต้น การนำสุกรที่เป็นตัวอมโรคเข้ามาในฟาร์มที่ไม่เคยสัมผัสเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคในฝูง (Heinen, 2003)

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรพบมีการระบาดเป็นวงกว้างหรือระบาดเป็นครั้งคราวในประชากรสุกรทั่วโลก ในทวีปยุโรปจากการสำรวจทางซีรัมวิทยาในสุกรขุนพบอุบัติการณ์ของไวรัสสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ดังนี้ ในปี พ.ศ. 2539 ที่ประเทศเบลเยี่ยมพบร้อยละ 92 และ 57 ในปี พ.ศ. 2535 ที่ประเทศสเปนพบร้อยละ 73 และ 62 ในปี พ.ศ. 2536 ที่ประเทศเยอรมันพบร้อยละ 55 และ 51 ในปี พ.ศ. 2544 ที่ประเทศเนเธอร์แลนด์พบร้อยละ 54 และ 13 ตามลำดับ สำหรับไวรัสสายพันธุ์ H1N2 พบมีรายงานการแยกเชื้อได้ครั้งแรกในประเทศอังกฤษและเบลเยี่ยม (Heinen, 2003) ในปี พ.ศ. 2541 มีรายงานผลการสำรวจทางซีรัมวิทยาของไวรัสสายพันธุ์ H1N2 พบมีร้อยละ 85 จากฟาร์มสุกรที่ประเทศอังกฤษ (Van Reeth et al., 2001) มีรายงานพบการระบาดของไวรัสสายพันธุ์ H1N2 กระจายตามส่วนต่างๆ ทั่วโลกมากขึ้น และมีแนวโน้มว่าจะมีการระบาดแทนที่ไวรัส

สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 โดยพบการระบาดของไวรัสสายพันธุ์ H1N2 ในแถบทวีปยุโรป มากกว่าครึ่งทวีปในปี พ.ศ. 2543 และพบอุบัติการณ์การระบาดเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ในประชากรสุกรในทวีปยุโรป (Merozin et al., 2002) จากรายงานการศึกษาของ Van Reeth และคณะ (2003) พบว่าสุกรที่ติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H1N2 มีอาการหลังติดเชื้อ 24 ชั่วโมง โดยมีไข้ (อุณหภูมิเมื่อวัดทางทวารหนัก 40.6 องศาเซลเซียส) ซึม เบื่ออาหาร หายใจด้วยช่องท้อง อัตราการหายใจเพิ่มขึ้น ในทวีปอเมริกาพบมีการระบาดของไวรัสสายพันธุ์ H1N2 โดย Karasin และคณะ (2000) รายงานผลการเพาะแยกไวรัสสายพันธุ์ H1N2 ได้จากสุกรที่แสดงอาการของโรคทางเดินหายใจและแม่สุกรแท้ง เมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2542 ที่รัฐอินเดียนา และพบว่าไวรัสสายพันธุ์ H1N2 ที่ระบาดในรัฐอินเดียนานั้น เกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างไวรัสสายพันธุ์ classical H1N1 และไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ที่เคยระบาดในสหรัฐอเมริกาเมื่อปี พ.ศ. 2541 และจากการรายงานของ Webby และคณะ (2001) พบว่าที่รัฐมินนิโซต้า (Minnesota) สามารถแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ได้ร้อยละ 50 ของสุกรสาวทดแทนจำนวน 220 ตัว ในฟาร์มสุกรสาวทดแทนที่มีการระบาดของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน ซึ่งเป็นฟาร์มที่เคยมีการระบาดของไวรัสสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 มาก่อน โดยพบว่าสุกรสาวทดแทนมีอาการปอดอักเสบและพบการติดเชื้อร่วมกับ *Pasteurella multocida* และ *Streptococcus suis* ส่วนในทวีปเอเชียเริ่มมีการระบาดของไวรัสสายพันธุ์ H1N2 เช่นกัน โดย Li และคณะ (2004) รายงานผลการสำรวจที่ประเทศจีนในปี พ.ศ. 2544 พบว่าสามารถเพาะแยกไวรัสสายพันธุ์ H1N2 ได้จากช่องจมูกสุกร 2 ตัวอย่าง จากสุกรที่ให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาต่อ H1 ทั้งหมด 27 ตัวอย่าง และที่เกาหลี Jung และคณะ (2005) รายงานพบว่าไวรัสสายพันธุ์ H1N2 สามารถทำให้สุกรหย่านมแสดงอาการและมีรอยโรคของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันได้ และเมื่อปี พ.ศ. 2549 มีรายงานพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N1 เป็นครั้งแรก โดยเพาะแยกได้จากสุกรป่วยในสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีแนวโน้มพบการระบาดวนเวียนในสุกรต่อไป (Lekcharoensuk et al., 2006) จากการศึกษาของ Ma และคณะ (2006) พบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N1 ที่พบครั้งนี้ มีส่วนของยีน HA มาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ในส่วนยีน NA มาจากการกลายพันธุ์ของ classical H1N1 และส่วนยีนภายใน (internal gene) มีทั้งส่วนที่มาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์ สัตว์ปีก และสุกร และที่ประเทศเกาหลีก็มีรายงานพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N1 เมื่อต้นปี พ.ศ. 2549 เช่นกัน (Shin et al., 2006)

2.6 พยาธิกำเนิด

สุกรป่วยติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากการหายใจ หลังจากไวรัสเข้าสู่ทางเดินหายใจแล้ว จะเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวของจมูก หลอดคอและหลอดลม โดยการจับเกาะของซีเลีย ต่อจากนั้นไวรัสจะเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อบุผิวดังกล่าว ก่อนที่จะแพร่กระจายไปยังเซลล์เยื่อบุผิวอื่นๆ ของระบบทางเดินหายใจ การเพิ่มจำนวนและการออกจากเซลล์ของไวรัสทำให้เกิดการตายและการลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุผิว ร่างกายจะตอบสนองโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวขึ้นมาทดแทน เร่งการลอกหลุดของเซลล์ที่ติดไวรัสนั้นๆ การขับเมือกของทางเดินหายใจ เพื่อขับเชื้อไวรัสออกจากทางเดินหายใจ ร่วมกับปฏิกิริยาการอักเสบแบบเฉียบพลันและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ทำให้เกิดพยาธิสภาพของระบบทางเดินหายใจ และสุกรป่วยแสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน (Pensaert, 1989; Easterday and Van Reeth, 1999; Frederick et al., 1999) สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรอาจไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการอย่างเฉียบพลัน ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่ สายพันธุ์ของไวรัส ทางที่ติดเชื้อ การจัดการสภาพแวดล้อมของฟาร์มสุกร และเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน เป็นต้น (Heinen, 2003)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสามารถเพิ่มจำนวนได้ที่เซลล์เยื่อบุผิวจมูก ทอนซิล หลอดลม ต่อมน้ำเหลืองของหลอดลม และปอด โดยสามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัสด้วยเทคนิค immunofluorescent ได้หลังจากติดเชื้อ 2 ชั่วโมง ที่เซลล์เยื่อบุผิวของท่อทางเดินหายใจ (respiratory tract epithelial cells) และตรวจพบแอนติเจนที่ผนังถุงลมปอด (alveolar septae) ได้หลังจากติดเชื้อ 4 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าในช่วงแรกนั้นลักษณะการกระจายของแอนติเจนจะอยู่ในเซลล์เดี่ยวๆ และจะแพร่กระจายไปทั่วทางเดินหายใจภายใน 1-3 วัน โดยพบการกระจายของแอนติเจนเป็นบริเวณกว้างที่เซลล์เยื่อบุผิวของหลอดลม และเริ่มพบการตายของเซลล์ได้หลังจากติดเชื้อ 16 ชั่วโมง ส่วนที่หลอดลมฝอยจะพบการกระจายตัวของแอนติเจนอย่างหนาแน่นได้หลังจากติดเชื้อ 24-72 ชั่วโมง และพบแอนติเจนบางส่วนในเซลล์ที่ลอกหลุดรวมกับสิ่งขับเมือกปนนิวโทรฟิว ส่วนที่เซลล์เยื่อบุผิวของถุงลมปอดจะเริ่มพบแอนติเจนได้หลังจากติดเชื้อ 24 ชั่วโมง และพบการกระจายตัวของแอนติเจนสูงสุดที่ 72 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ หลังจากติดเชื้อ 4 วันไม่พบแอนติเจนที่หลอดลม และตรวจไม่พบแอนติเจนในทางเดินหายใจหลังจากติดเชื้อ 9 วัน (Pensaert, 1989) จากการศึกษาการกระจายตัวของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ในเนื้อเยื่อปอดโดยเทคนิค In situ hybridization โดย Jung และคณะ (2005) พบว่าในวันที่ 1 และ 3 หลังการให้เชื้อไวรัส ตรวจพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรส่วนใหญ่ที่เยื่อบุหลอดลมและหลอดลมฝอยส่วนในวันที่ 7 และ 10 หลังให้เชื้อไวรัส จะตรวจพบแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรส่วนใหญ่ที่เซลล์บุผิวถุงลมปอด (pneumocytes) และเซลล์มาโครฟาจ (macrophages) ในปอด ซึ่ง

สอดคล้องกับ Richt และคณะ (2003) ศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ในเนื้อเยื่อปอด โดยเทคนิค immunohistochemistry ในวันที่ 5 หลังการให้เชื้อไวรัส พบแอนติเจนส่วนใหญ่กระจายตัวอยู่ที่เซลล์เยื่อบุผิวของหลอดลม และพบบางส่วนในเซลล์เยื่อบุถุงลมปอด

หลังจากที่เชื้อเข้าสู่ร่างกายทางระบบทางเดินหายใจ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจะเพิ่มจำนวนที่เซลล์เยื่อบุผิวหลอดลม ภายใน 16 ชั่วโมงแรกหลังได้รับเชื้อ พบเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมเกิดการตายเป็นหย่อมๆ ถุงลมปอดแฟบเป็นบางส่วน และมีเลือดเข้ามาเลี้ยงที่ปอดมากขึ้น การตายของเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมจะขยายบริเวณกว้างมากขึ้นในเวลาต่อมา เนื่องจากการแพร่กระจายของไวรัสไปยังเซลล์ดังกล่าว หลังจากนั้นจะพบสิ่งซึมเยิ้มในหลอดลม ถุงลมปอดแฟบเป็นบริเวณกว้างขึ้น กลีบปอดส่วนหน้า (apical lobes) และกลีบปอดส่วนข้างหัวใจ (cardiac lobes) มีสีแดงคล้ำภายใน 24 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ และหลังจากติดเชื้อ 72 ชั่วโมง รอยโรคดังกล่าวจะค่อยๆ หายไปและสภาพของปอดจะกลับเป็นปกติ (Dee, 2005) การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรส่วนมากจะจำกัดบริเวณเฉพาะที่ระบบทางเดินหายใจ แต่อาจตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในกระแสโลหิตได้มักเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้จากช่องจมูกของสุกรที่ได้รับเชื้อในวันแรกเท่านั้น และจากการตรวจทางซีรัมวิทยา พบสุกรมีแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในระดับต่ำ และจากการทดลองให้เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรแก่สุกรทดลองทางหลอดลม ในขนาดสูง (10^8 EID_{50}/gram of tissue) พบว่าสามารถทำให้สุกรแสดงอาการป่วยรุนแรงได้ และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในทางเดินหายใจส่วนลึกได้ (Easterday and Van Reeth,1999) จากรายงานการศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศเกาหลี สายพันธุ์ H1N2 โดย Jung และคณะ (2005) พบว่าสุกรมีพยาธิสภาพที่ปอดรุนแรงตั้งแต่วันแรกหลังการให้เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ส่วนในวันที่ 3 และ 5 หลังการให้เชื้อ พบพยาธิสภาพที่ปอดในระดับปานกลาง และพบเพียงเล็กน้อยในวันที่ 7 และ 10 หลังการให้เชื้อไวรัส นอกจากนี้ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นเชื้อปฐมภูมิที่ทำให้สุกรเกิดโรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อน เนื่องจากมักพบการติดเชื้อร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิดได้ จากการศึกษาของ Thacker และคณะ (2001) พบว่าการติดเชื้อร่วมกันระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 (A/Sw/IA/40776/92) และ *Mycoplasma hyopneumoniae* ทำให้สุกรแสดงอาการไอและมีพยาธิสภาพที่ปอดรุนแรงกว่ากลุ่มสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการติดเชื้อร่วมกันระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 (A/Sw/Hok/2/81) และ *M. hyopneumoniae* ของ Yazawa และคณะ (2004) โดยพบว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับเชื้อทั้งสองดังกล่าวร่วมกัน จะแสดงอาการไอและมีรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่ปอดรุนแรงกว่ากลุ่มที่ให้ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทางจมูกในขนาด 10^7 EID_{50} / 0.5 มิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว

รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของโรคไข้หวัดใหญ่สุกร ได้แก่ พบลักษณะปอดสีแดงคล้ำมีขอบเขตชัดเจน มีความแน่น (firm) และมีการบวมน้ำที่ระหว่างกลีบปอดย่อย (interlobular edema) พบมีสิ่งซึมเยิ้มปนเลือดหรือไฟบรินในหลอดลมฝอย และต่อมน้ำเหลืองที่หลอดลมและขั้วปอดมีขนาดใหญ่ ลักษณะของรอยโรคที่ปอดมีขอบเขตชัดเจนและมักจำกัดบริเวณที่กลีบปอดส่วนหน้าและส่วนกลาง แต่ในรายที่ป่วยรุนแรงอาจพบลักษณะรอยโรคที่ปอดมีบริเวณกว้างมากกว่าร้อยละ 50 ของเนื้อเยื่อปอดทั้งหมด และพบเยื่อหุ้มปอดอักเสบแบบมีไฟบริน (fibrinous pleuritis) ร่วมด้วย (Easterday and Van Reeth,1999) รอยโรคที่ปอดจะชัดเจนในระยะแรกของการติดเชื้อ โดยพบลักษณะปอดอักเสบมากที่สุดประมาณร้อยละ 10.3 ของเนื้อเยื่อปอดทั้งหมด ในวันที่ 3 หลังให้เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ทางการหายใจ (aerosol dose) แก่สุกรอายุ 5 สัปดาห์ และรอยโรคจะลดลงเรื่อยๆ ในวันที่ 7, 14 และ 21 หลังการให้เชื้อ โดยพบลักษณะปอดอักเสบร้อยละ 8.8, 3.3 และร้อยละ 1.1 ของเนื้อเยื่อปอดทั้งหมด ตามลำดับ (Thacker et al., 2001) และจากการศึกษาของ Richt และคณะ (2003) พบว่าการให้ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ทางหลอดลม แก่สุกรอายุ 4 สัปดาห์ พบลักษณะปอดอักเสบเป็นบริเวณกว้างมากที่สุดในกลุ่มที่ให้ไวรัสขนาดสูง ($7x10^4$ PFU per pig) โดยพบลักษณะปอดมีสีแดงคล้ำและแน่น ลักษณะรอยโรคที่ปอดมีขอบเขตชัดเจน และพบต่อมน้ำเหลืองที่ขั้วปอดบวมแดง

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ (H1N1, H3N2 และ H1N2) ทำให้เกิดรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่คล้ายกัน เป็นลักษณะรอยโรคของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน ดังนี้ พบเยื่อบุผิวหลอดลมและหลอดลมฝอย (bronchi and bronchioli) ถูกทำลายและเกิดการตาย โดยตรวจพบลักษณะของเซลล์เยื่อบุหลอดลมฝอยหดตัวแบนลง (Jung et al., 2005) พบลักษณะหลอดลมอักเสบแบบมีสิ่งซึมเยิ้ม (exudative bronchitis) และปอดอักเสบแบบ interstitial pneumonia โดยพบสิ่งคัดหลั่งปนเซลล์ที่ลอกหลุด (desquamated cells) และการสะสมของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิลในหลอดลมและถุงลมปอดในช่วงแรก ต่อมาจะพบมีเซลล์อักเสบชนิดโมโนไซท์เข้ามาที่ปอดเป็นส่วนใหญ่ และมีเลือดเข้ามาเลี้ยงในเนื้อเยื่อปอดมากขึ้น ร่วมกับมีการขยายตัวของหลอดเลือดในปอด และระยะต่อมาจะพบเซลล์อักเสบชนิดลิมโฟซัยท์ (lymphocytes) ฮีสติโอซัยท์ (histiocytes) และพลาสมาเซลล์ (plasma cells) แพร่เข้ามาที่ผนังของถุงลมปอดมากขึ้น ตามลำดับ (Easterday and Van Reeth,1999; Thacker et al., 2001; Dee, 2005) รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของโรคไข้หวัดใหญ่ที่มีสาเหตุมาจากไวรัสต่างสายพันธุ์หรือสายพันธุ์เดียวกันแต่มีการกลายพันธุ์ของลำดับเบสพบว่ามีความรุนแรงแตกต่างกัน ดังเช่นจากการรายงานของ Vincent และคณะ (2006) พบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ที่เกิดการกลายพันธุ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 นั้นมีพยาธิสภาพที่ปอดรุนแรงกว่า classical H1N1 ที่เพาะแยกได้ในปี พ.ศ. 2473-2516 อีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้พยาธิสภาพของปอดรุนแรงคือการติดเชื้อโรคแทรกซ้อน ดังรายงานของ

Thacker และคณะ (2001) เมื่อมีการติดเชื้อร่วมกันระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรกับเชื้อ *M. hyopneumoniae* พบว่ามีลิมโฟซัยท์แทรกเข้ามาล้อมรอบหลอดลมมากขึ้นและเยื่อบุหลอดลมเสียหายมากขึ้น เมื่อเทียบกับพยาธิสภาพที่เกิดจากการให้เชื้อเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง

2.7 วิทยาภูมิคุ้มกัน

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสามารถเพิ่มจำนวนได้เฉพาะในเซลล์เท่านั้น จึงจัดเป็น intracellular parasites ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันจะรับรู้และต่อต้านอนุภาคของไวรัสได้ตั้งแต่ก่อนที่ไวรัสจะเข้าเซลล์ และหลังจากที่ลูกหลานไวรัสถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ การต่อต้านเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส ต้องอาศัยทั้งภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (nonspecific innate immune system) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific acquired immune system) (Abbas et al., 2000)

2.7.1 **ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ** การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในระยะแรกของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่นั้น ร่างกายจะตอบสนองโดยภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและตอบสนองเฉพาะที่ (local inflammatory reactions) โดย non-immune cells โดยอาศัยด่านป้องกันอันดับแรก (first line of defence) ได้แก่ สารเมือก (mucus) secretory IgA (S-IgA) และ natural killer cells (NK cells) ส่วนด่านป้องกันอันดับสอง (second line of defence) คือ สารสื่อกลางและซัยโตคัยน์ต่างๆ (Mittelholzer, 2006) ได้แก่ interferon-α (IFN-α), tumor necrosis factor-α (TNF-α) และ interleukin-1 (IL-1) ในระยะแรก (Haller et al., 2006) และตามมาด้วยการหลั่ง IL-6 IL-8 macrophage inflammatory proteins (MIPs) และ monocyte chemoattractant proteins (MCPs) เพื่อยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของไวรัส รวมทั้งสื่อเรียกและกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิลและมาโครฟาจ ซึ่งซัยโตคัยน์เหล่านี้และนิวโทรฟิลสามารถตรวจพบได้ในสิ่งคัดหลั่งจากทางเดินหายใจตั้งแต่วันแรกของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และพบมีระดับสูงประมาณ 2-3 วันหลังการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ซึ่งเป็นช่วงที่สุกรป่วยแสดงอาการ และตรวจพบได้ระดับต่ำในกระแสเลือด หลังจากนั้นพบจำนวนนิวโทรฟิลลดลง แต่พบมาโครฟาจและเศษเซลล์ตายปนในสิ่งคัดหลั่งจากทางเดินหายใจเพิ่มมากขึ้นหลังจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 3 วัน (Van Reeth, 2000) IFN-α มีบทบาทในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสและช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อ IL-12 ทำงานร่วมกับ TNF-α กระตุ้นให้ NK cells หลั่ง IFN-γ ซึ่งจะเกี่ยวกับกลไกการต่อต้านไวรัสโดยตรง กลไกการต่อต้านและทำลายเซลล์ที่ติดเชื้ออีกวิธีหนึ่งคือ ซัยโตคัยน์มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ NK cells ให้เข้ามาทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยการรับรู้ไกลโคโปรตีนฮีเมกกลูตินินผ่านทาง major histocompatibility complex (MHC) class I บนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อนั้น นอกจากนี้ซัย

โตคัยน์ยังเหนี่ยวนำการสร้าง Nitric oxide (NO) ในช่วงระยะสั้นๆ หลังติดเชื้อ ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ (Mittelholzer, 2006)

2.7.2 **ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ** การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อไวรัสโดยอาศัยภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์เป็นสื่อ (cell-mediated immunity; CMI) และภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humeral immunity) โดย IL-1β มีบทบาทสำคัญในการสื่อเชื่อมการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เซลล์ที่ทำหน้าที่หลั่ง IL-1β คือ Antigen presenting cells (APCs) มาโครฟาจ และ dendritic cells (Mittelholzer, 2006) การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำนั้น โดยอาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะ ซึ่งจะต่อต้านอนุภาคของไวรัสด้วย neutralization (โดย IgG, IgM และ IgA) agglutination (โดย IgM) และ phagocytosis (โดย antigen-antibody complex และ Fc receptor บนผิวมาโครฟาจ) ส่วนการต่อต้านและทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยอาศัยภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์เป็นสื่อ ด้วยกลไกต่างๆ ดังนี้ antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement (classical pathway) และ $CD8^+$ T cells โดยสามารถตรวจพบ $CD8^+$ T cells ในทางเดินหายใจได้ในวันที่ 5-7 หลังการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Thomas et al., 2006) การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอย่างแรกคือ neutralizing antibodies ได้แก่ IgG IgM และ IgA ซึ่งจะต่อต้านโปรตีนฮีเมกกลูตินินโดยตรง มีส่วนช่วยป้องกันการเข้าเซลล์ของไวรัส ในขณะที่ไม่พบ neutralizing antibodies ต่อโปรตีน NP และ M1 (Mittelholzer, 2006) แอนติบอดีที่ตรวจพบชนิดแรกคือ IgM สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 5-7 หลังการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และพบ HI antibody titer ได้ประมาณวันที่ 7 และมีระดับสูงสุดในวันที่ 14 หลังการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Suarez and Schultz-Cherry, 2000) พบ HI antibody titer ในระดับสูงนานหลายสัปดาห์ และหมดไปประมาณ 3-6 เดือนหลังติดเชื้อ (Collins et al., 2002) แอนติบอดีต่อโปรตีน NA ช่วยจำกัดบริเวณการติดเชื้อให้อยู่เฉพาะในระบบทางเดินหายใจ ถ้าการทำงานของแอนติบอดีต่อโปรตีน NA บกพร่องจะทำให้ไวรัสเข้าสู่กระแสโลหิตได้ การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ซ้ำหลายครั้งจะทำให้ภูมิคุ้มกันสูงขึ้น เนื่องจากการติดเชื้อครั้งเดียวระดับแอนติบอดีที่สร้างจะจำกัดเฉพาะที่ antigenic site ของโปรตีนฮีเมกกลูตินิน แต่ถ้าติดเชื้อหลายครั้งภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนอื่นๆ จะเพิ่มสูงขึ้นด้วย (broader range of specificities) (Mittelholzer, 2006)

2.8 การตรวจวินิจฉัย

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรสามารถวินิจฉัยได้โดยการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะจากซีรัม ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), hemagglutination inhibition (HI) test และ

สามารถวินิจฉัยโดยการเพาะแยกเชื้อไวรัสได้จากสิ่งคัดหลั่งจากช่องจมูก การเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรไม่ทนต่อสภาพแวดล้อมนอกร่างกาย และตรวจพบไวรัสจากทางเดินหายใจสุกรได้ในระยะแรกของการติดเชื้อเท่านั้น การตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรทำได้โดยการเพาะแยกเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟักและในเซลล์เพาะเลี้ยง Madin Darby canine kidney (MDCK) การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสจากชิ้นเนื้อที่ฝังในบล็อกพาราฟินด้วยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมี และการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR (World Organization for Animal Health, 2004)

2.8.1 **การเพาะแยกเชื้อไวรัส (Virus isolation)**

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เนื่องจากมีความไวสูง โดยการเพาะแยกเชื้อในไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยง (Webster et al., 2002) การเพาะแยกเชื้อในไข่ไก่ฟักนั้นใช้ไข่ไก่ฟักอายุประมาณ 9-11 วัน ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าถุงแอมเนียนหรือถุงอแลนโตอิค บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง สังเกตการตายของตัวอ่อนทุก 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำจากไข่ไก่ฟักเพื่อตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่นต่อไป (Clavijo et al., 2002) ส่วนการเพาะแยกเชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงนั้น เซลล์เพาะเลี้ยงที่นิยมใช้คือ MDCK ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงอื่นๆ ที่สามารถใช้ได้เช่นกัน เช่น เซลล์เพาะเลี้ยงจากไตสุกร (primary porcine kidney cell lines) เซลล์เพาะเลี้ยงจากปอดมิ้ง (mink lung) เป็นต้น (Collins et al., 2002) การเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นจะต้องเติมสารละลายทริปซิน (trypsin) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย เพื่อช่วยในการย่อยแยกโปรตีนฮีแมกกลูตินินเป็น HA1 และ HA2 ก่อนที่ HA1 จะจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ต่อไป (Herman et al., 2005) หลังจากนั้นสังเกตการเกิด cytopathogenic effect (CPE) ทุกวัน ประมาณ 5-7 วัน เก็บเซลล์รวมน้ำเลี้ยงเซลล์โดยการแช่แข็งและละลาย 3 รอบ เพื่อตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่นๆ เช่น haemagglutination, IFA, IPMA, ELISA และ PCR เป็นต้น (Mittelholzer, 2006) ตัวอย่างส่งตรวจโดยทั่วไป ได้แก่ สิ่งป้ายจมูกใน transport medium และปอด ควรเก็บตัวอย่างในช่วงที่สุกรป่วยมีไข้ในระยะแรก เนื่องจากไวรัสจะถูกขับปนออกมากับสิ่งคัดหลั่งจากจมูกประมาณ 5-7 วันหลังติดเชื้อเท่านั้น ตัวอย่างที่เก็บจากสิ่งป้ายจมูกควรเก็บใน transport medium ทันทีและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือกรณีไม่ได้ส่งตรวจทันทีควรเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อด้อยคือใช้เวลาในการวินิจฉัยนานประมาณ 2 สัปดาห์ (Collins et al., 2002; World Organization for Animal Health, 2004)

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8.2 Haemagglutination

โปรตีนฮีเมกกลูตินินบนผิวของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสามารถเข้าจับกับตัวรับที่จำเพาะบนผิวเม็ดเลือดแดงได้ ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดง (Mittelholzer, 2006) ซึ่งสามารถนำหลักการนี้มาใช้ในการตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้ โดยมักใช้ในการตรวจสอบหลังจากการเพาะแยกไวรัสเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยานี้ต้องอาศัยไวรัสจำนวนมากและอาจเกิดผลบวกเทียมได้สูง เพราะนอกจากไวรัสไข้หวัดใหญ่แล้วยังมีไวรัสและแบคทีเรียบางชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยานี้ได้เช่นกัน (Collins et al., 2002) และต้องอ่านผลภายใน 30-45 นาที เพราะถ้าตั้งไว้นานกว่า 45 นาที จะเกิดผลลบเทียมเนื่องจากการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (World Organization for Animal Health, 2004)

2.8.3 Haemagglutination inhibition

นิยมใช้ในการตรวจทางซีรัมวิทยา โดยตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมที่สามารถจับกับโปรตีนฮีเมกกลูตินินบนผิวของไวรัส เพื่อป้องกันการจับกันของไวรัสกับตัวรับบนผิวเม็ดเลือดแดง (virus-erythrocyte complexes) ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (Collins et al., 2002; Webster et al., 2002) สุกรจะสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรหลังการติดเชื้อประมาณ 5-7 วัน มีปริมาณสูงสุดหลังจากติดเชื้อ 3-6 สัปดาห์ และคงอยู่ในกระแสโลหิตนาน 3-6 เดือน ส่วนภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่นั้นจะอยู่ได้นานประมาณ 4-8 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแอนติบอดีที่ได้รับทางน้ำนมเหลือง (Collins et al., 2002) ในซีรัมปกติจะมี non-specific inhibitors ที่ทำหน้าที่ป้องกันการแข็งตัวของเลือดหรือการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด ซึ่งจะรบกวนการตรวจทำให้เกิดผลบวกเทียม (false positive) ดังนั้นจึงต้องใส่ receptor destroying enzyme เพื่อกำจัด non-specific inhibitors ก่อนทำการตรวจ (Webster et al., 2002) และควรอ่านค่าบวกที่ 1:80 ขึ้นไป เพราะถ้าอ่านที่ 1:40 อาจเป็นผลจาก nonspecific reaction (Collins et.al., 2002) แต่อย่างไรก็ตาม WHO (2004) แนะนำให้อ่านค่าบวกที่ 1:40 ขึ้นไป การตรวจด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถตรวจในขณะที่สุกรมีชีวิตและสะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือด และสามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการทั่วๆ ไป แต่ก็มีข้อเสียคือจะต้องเก็บซีรัม 2 ครั้ง ห่างกัน 2-3 สัปดาห์ (acute-convalescent phase) เพื่อดูการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดี อีกทั้งแอนติบอดีต่อโปรตีนฮีเมกกลูตินินของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรมีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ จึงสามารถใช้จำแนกชนิดของสายพันธุ์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ ดังนั้นในการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จึงต้องใช้ไวรัสทุกสายพันธุ์ในการทดสอบแต่ละครั้ง (Webster et al., 2002)

2.8.4 Fluorescent Antibody (FA) test

เป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในชิ้นเนื้อปอดสดแช่แข็ง (frozen section) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่จับกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์แล้ว วิธีนี้มีข้อดีคือตรวจและรู้ผลได้เร็ว แต่ต้องมีอุปกรณ์ซึ่งราคาสูงเช่น เครื่องตัดชิ้นเนื้อแช่แข็ง และกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นต้น และมีข้อจำกัดคือใช้ตรวจได้เฉพาะในชิ้นเนื้อที่ตัดสดไม่ควรเกิน 6 ชั่วโมง เพราะแอนติเจนของไวรัสจะสลายตัวเร็ว (Collins et al., 2002) ตำแหน่งที่ตรวจพบแอนติเจนของไวรัสขึ้นกับแอนติบอดีที่ใช้ เช่น ถ้าใช้ anti-NP influenza A antibody จะตรวจพบแอนติเจนส่วนใหญ่ในนิวเคลียส และบางส่วนในไซโตพลาสม ของเซลล์เยื่อบุผิวในระบบทางเดินหายใจและมาโครฟาจ เป็นต้น (Landolt et al., 2003)

2.8.5 Immunohistochemical (IHC) test

วิธีนี้ใช้ตรวจหาแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเช่นเดียวกับ FA test แต่ใช้สำหรับตรวจชิ้นเนื้อที่ฝังในบล็อคพาราฟิน ชิ้นเนื้อที่ตรวจด้วย IHC test สามารถเก็บไว้ได้นาน และเหมาะสำหรับการศึกษาแบบย้อนหลัง ความสามารถในการตรวจขึ้นกับแอนติบอดีที่ใช้ ถ้าใช้แอนติบอดี monoclonal anti-influenza A (neucleoprotein) จะตรวจแอนติเจนไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ทุกสายพันธุ์ ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์ควรใช้เทคนิคอื่นร่วมด้วย เช่น เทคนิค PCR เป็นต้น วิธีการนี้มีข้อเสียคือ ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาสูง และคุณภาพของชิ้นเนื้อมีผลต่อความไวในการตรวจ เนื่องจากต้องตรึงสภาพชิ้นเนื้อด้วยฟอร์มาลีน จึงอาจทำให้เกิดบดบังแอนติเจนของไวรัสในชิ้นเนื้อ ควรตัดชิ้นเนื้อหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร และแช่ 10% buffer formaline นานไม่เกิน 24-48 ชั่วโมง (Collins et al., 2002)

2.8.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เป็นชุดตรวจสอบที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เหมาะสำหรับการตรวจตัวอย่างซีรัมจำนวนมาก ต้นทุนต่ำ ข้อเสียคือมีความจำเพาะกับบางสายพันธุ์เท่านั้น และต้องเก็บตัวอย่างซีรัม 2 ร อบ คือช่วงที่สุกรป่วยแสดงอาการระยะแรกและหลังจากนั้นอีก 2-3 สัปดาห์ เพื่อพิจารณาระดับแอนติบอดีที่สูงขึ้น จึงจะสามารถตอบผลได้ว่าสุกรนั้นติดเชื้อหรือไม่ (Webster et al., 2002) ตัวอย่างชุด ELISA ที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น ELISA kit HerdChek® (IDEXX laboratories, Westbrook, ME, USA) เป็นชุดทดสอบที่ผลิตในเชิงพานิชย์ ใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 (A/swine/SD/18582/88) มีความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 99.7 และมีความไวสูงกว่าวิธี HI เมื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อสายพันธุ์นี้ แต่มีความไวน้อยมากถ้าใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสสายพันธุ์อื่น (Collins et al., 2002)

2.8.7 Antigen-Capture ELISA

ใช้ตรวจหาแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ เช่น Directigen Flu A+B rapid test (Becton Dickinson and Co., Maryland, USA) เป็นชุดทดสอบที่ผลิตในเชิงพานิชย์ ใช้ตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างจากจมูก คอ และช่องอกของมนุษย์ แต่สามารถใช้ตรวจในสัตว์อื่นๆ ได้เช่น สุกร สัตว์ปีก และม้า เป็นต้น ทราบผลรวดเร็วจึงเหมาะสำหรับใช้ตรวจเป็น screening test (Alexander et al., 2005) ถ้าใช้ตรวจตัวอย่างจากปอดและหลอดลม จะมีความไวเทียบเท่ากับการเพาะแยกเชื้อ แต่ถ้าใช้ตรวจตัวอย่างจากจมูกจะมีความไวน้อยกว่า เนื่องจากปริมาณไวรัสในตัวอย่างป้ายจมูกอาจมีน้อยกว่าปริมาณที่ชุดทดสอบสามารถตรวจได้ (Alexander et al., 2005; Smit et al., 2007) นอกจากนั้นต้องตรวจยืนยันด้วยการเพาะแยกเชื้อไวรัสหรือการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ร่วมด้วย (Collins et al., 2002)

2.8.8 RT-PCR

เทคนิค RT-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหาสารพันธุกรรม มีความจำเพาะและความไวสูงขึ้นกับ primers ที่ใช้ตรวจ (Taubenberger and Layne, 2001) เนื่องจากไวรัสไข้หวัดใหญ่มีจีโนมเป็น single-stranded RNA จึงต้องสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) เพื่อใช้เป็นสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ก่อนที่จะเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Collins et al., 2002) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอน denaturation เพื่อแยกสายคู่ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว ต่อจากนั้นเป็นขั้นตอน annealing เพื่อให้ primers เข้าไปจับกับเส้นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ตรงตำแหน่งที่เป็น complementary กัน และขั้นตอนสุดท้าย extension เป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่โดยการเติม dNTPs ที่ตำแหน่ง OH ของด้านปลาย 3' ของเส้นดีเอ็นเอสายใหม่ ถ้าใช้ primers ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีน NP จะวินิจฉัยได้ว่าเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่กลุ่มเอและบี primers ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีน M จะวินิจฉัยได้ว่าเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่กลุ่มเอ และถ้าจะจำแนกสายพันธุ์จะต้องใช้ primers ที่ออกแบบมาจากยีน HA และ NA (Webster et al., 2002)

2.9 การรักษาและควบคุม

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรไม่มีการรักษาที่จำเพาะ การให้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อน จะช่วยลดความรุนแรงของโรคได้ การป้องกันสามารถทำได้โดยการให้วัคซีนชนิดเดียวกันกับไวรัสสายพันธุ์ที่มีการระบาดในท้องถิ่น ร่วมกับการจัดการและการสุขาภิบาลฟาร์มที่ดี (Dee, 2005) เมื่อพบสุกรป่วยควรรักษาตามอาการ ปรับสภาพคอกให้แห้ง สะอาด และไม่มีฝุ่น

เพื่อให้สุกรอยู่สบายไม่เกิดภาวะเครียด รวมทั้งไม่ควรย้ายสุกรต่างคอกมารวมกัน เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของโรคในฟาร์ม ส่วนการป้องกันและควบคุมโรคไข้หวัดใหญ่สุกร ควรเน้นการจัดการและการสุขาภิบาลฟาร์มที่ดี ไม่เคลื่อนย้ายสุกรโดยไม่จำเป็น การนำสุกรเข้าทดแทนควรกักเพื่อสังเกตอาการในโรงเรือนที่แยกต่างหาก ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรนั้นไม่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งความร้อน รวมทั้งสบู่และฟอร์มาลีน ดังนั้นควรทำความสะอาด ราดน้ำยาฆ่าเชื้อและพักคอกให้แห้งก่อนนำสุกรชุดใหม่เข้ามาเลี้ยง การควบคุมสัตว์อื่นๆ ที่อาจนำเชื้อเข้าสู่ฟาร์ม เช่น นก หนู สุนัข แมว รวมทั้งคนด้วย โดยเฉพาะผู้ที่มีอาการของโรคไข้หวัดใหญ่ ไม่ควรเข้าสัมผัสสุกรในฟาร์ม เนื่องจากสุกรสามารถติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จากคนได้ (Heinen, 2003)