บทที่ 4

บทวิจารณ์

4.1 การจำแนกชนิดและชนิดย่อยของไวรัสไข้หวัดใหญ่

ทราบกันดีแล้วว่า เชื้อไข้หวัดใหญ่ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดในทวีปอเมริกาและบางส่วนของยุโรป และในประเทศญี่ปุ่นคือ เชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (48) ซึ่งพบได้ว่ามีการแพร่กระจาย อยู่ในระดับต่ำในประเทศไทย จากรายงานเชื้อที่แยกได้ร่วมกับประเทศเพื่อนบ้านคือ จีน ฮ่องกง อินเดีย เกาหลี และประเทศอื่นในทวีปเอเชีย ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมานั้น พบว่า เป็นการกลับมาระบาดอีกครั้งของเชื้อที่เงียบหายไปในช่วง 3-4 ปี หรือมิฉะนั้นก็เป็นการระบาดต่อเนื่องกันมา ส่วนไข้หวัดใหญ่ชนิดบี แม้ความรุนแรงของโรคจะไม่มาก และมีอัตราการตายไม่สูงเท่ากับชนิดเอ (ภาคผนวก ก.7) แต่ก็พบรายงานการแยกเชื้อได้บ่อยกว่าและสม่ำเสมอ ซึ่งฤดูกาลระบาดของโรคจะเพิ่มสูงในฤดูฝนต่อเนื่องถึงฤดูหนาว เชื้อที่แยกได้ในประเทศไทย จึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับสถานการณ์การระบาดของโรคนี้ในประเทศอื่น ทั้งในเอเชียและกลุ่มประเทศตะวันตก ซึ่งมีฤดูการระบาดของโรคล่าช้ากว่าเพื่อเป็นการเตรียมวัคซีนขึ้นใช้ป้องกันในกลุ่มเสี่ยงอันได้แก่ กลุ่มเด็กก่อนในวัยเรียน คนชรา และทหาร ซึ่งพบว่ามีอัตราป่วย และการกระจายของโรคสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ (49)

ในปี 2532-2533 ได้แยกเชื้อไวรัสจากน้ำกลั้วคอ และการป้ายเชื้อจากคอได้ทั้งชนิดเอ และบี สำหรับบี นั้นในประเทศไทยเคยจำแนกได้ประปรายได้แก่ ในปี 2524 และ 2527 เป็นชนิดบี สายพันธุ์สิงคโปร์ หลังจากนั้นไม่เคยแยก พบชนิด บี อีกจนกระทั่งปี 2531 แยกได้ชนิดบี สายพันธุ์ยามากาตะ (11) ซึ่งคาดว่าอาจมีการระบาดต่อเนื่องกันมา จนถึงปี 2533 ที่ทำการวิจัย เพราะชนิดบี ที่พบในครั้งนี้ เป็นชนิดบี สายพันธ์ยามากาตะ และจากผลการแยก และ

พิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่แยกในปี พ.ศ.2532 พบว่าเป็นชนิดย่อยทั้งสองแบบคือ A/H1N1 คล้าย A/Taiwan/1/86 (H1N1) และชนิดย่อย A/H3N2 คล้าย A/Hokkaido/20/89 (H3N2) ซึ่งชนิดหลังมีการระบาดต่อเนื่องมาจนถึงปี พ.ศ.2533 แต่ก็มีบางช่วง (พ.ค.-ส.ค.) ที่แยกได้ชนิดย่อย A/H3N2 ที่มีความคล้ายคลึงกับ A/Sichuan/2/89 (H3N2) ซึ่งการระบาดที่เกิดขึ้นนี้ อาจสันนิษฐานในเบื้องต้นได้ว่า เป็นการติดต่อจากนักท่องเที่ยวต่างชาติที่เข้ามาในประเทศไทย หรืออาจมาจากมูลสัตว์ จำพวกนกที่อพยพมาผสมพันธุ์จากประเทศจีนตอนบน (50) และชนิดย่อย A/H3N2 ตัวสุดท้ายที่แยกได้ อาจมีสาเหตุมาจากการเกิดรีคอมบิเนชันของ Mix infection ระหว่าง A/H1N1 กับ A/H3N2 ที่ระบาดในปี 2532 ทำให้ชนิดของแอนติเจนิค ดีเทอร์มีแนนท์ เปลี่ยนแปลงไปได้ในขณะที่ไวรัสมีการประกอบตัวเป็นอนุภาค (assembly) (51)

4.2 การสกัดแยกอาร์เอนเอ และการย่อยตัดด้วยเอนไซม์ RNase T1

จากผลการทดลองครั้งนี้ อาร์เอนเอที่สกัดได้ มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง ดังจะเห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260:280 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.8 และจากการใช้เอนไซม์ Rnase T1 ย่อยตัดอาร์เอนเอเพื่อดู RNase T1 pattern ในรูปที่ 3 และ 4 จะแสดงความคล้ายกันของกลุ่มไวรัสตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่างคือ A/Bangkok/1/89 (H1N1), A/Bangkok/2/89 (H1N1), A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) ซึ่งเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอทั้งหมด จะเห็นว่ารูปแบบของแถบที่ปรากฏ เมื่อทำบน 10% โพลิอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟริซิส ในสารละลายบัฟเฟอร์ยูเรีย 6M ผ่านไป 8 ชั่วโมง พบว่าในไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่มีความแตกต่างของชนิดย่อยเป็น A/H3N2 และชนิดย่อย A/H1N1 นั้นให้รูปแบบของแถบโพลิเปปไตด์ที่คล้ายคลึงกันมาก พบว่าเป็น discrete band ชัดเจน จำนวน 8 ท่อน จากผลการที่ได้นี้แสดงถึงลำดับเบสอาร์เอนเอนั้นมีบริเวณที่เป็น recognition sequence อยู่หลายชุด ซึ่งเอนไซม์ RNase T1 จะเข้าตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของนิวคลีโอไทด์ที่จุดตัด หลังไนโตจีนัสเบสชนิดกวานีน (26) การทำงาน

ของเอนไซม์จะเกิดขึ้นมากน้อยเพียงใดนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับจำนวนจุดตัดแล้ว ความบริสุทธิ์ของอาร์เอนเอและโครงรูปอาร์เอนเอ ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ควรนำมาพิจารณาด้วย ในการทดลองครั้งนี้พบว่า ปัญหาสำคัญมักมีการปนเปื้อนของเอนไซม์นิวคลีเอส จากสิ่งแวดล้อมได้ตลอดเวลา ในขั้นตอนการสกัดและหลังการสกัดแยกอาร์เอนเอ ทำให้อาร์เอนเอถูกย่อยไปบางส่วนด้วยเอนไซม์ดังกล่าว จำนวนแถบที่เกิดขึ้นในการรันเจลอิเลคโตรโฟรีซิส จึงอาจมีมากกว่าที่ควรเป็น การทดลองนี้เก็บอาร์เอนเอไว้ที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส เพราะนอกจากจะช่วยลดการระเหยของน้ำ เพื่อให้ความเข้มข้นของอาร์เอนเอไม่ผิดพลาดไปแล้ว ยังช่วยลดการปนเปื้อนของนิวคลีเอสได้

รูปแบบของแถบโพลิเปปไตด์ ที่เกิดจากการย่อยตัดด้วยเอนไซม์ RNase T1 ของตัวอย่างเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดย่อย A/H3N2 คือ A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) ในรูปที่ 4 จะเห็นว่ามีบางส่วนของตำแหน่งและความเข้มของแถบที่แสดงแอนติเจนจำเพาะต่อชนิดไปคล้าย A/Hokkaido/20/89 (H3N2) และบางส่วนคล้าย A/Sichuan/2/89 (H3N2) จึงคาดว่า อาจมีการเกิดการผันแปรขึ้นในสายพันธุ์ตัวอย่างที่แยกได้ของสองสายพันธุ์ดังกล่าว ซึ่งสามารถตรวจสอบอย่างละเอียด โดยการทำแบบพิมพ์ลายนิ้วมือ (fingerprinting) เพื่อหาเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงของเบสองค์ประกอบพบมากในเบสไซโตซีน อะดีนีน และยูราซิล เป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียง 1 ตัว ในขณะมีการสังเคราะห์อาร์เอนเอ ที่เรียกว่าพอยท์มิวเตชัน (point mutation) และส่วนใหญ่เป็นการทรานสิชัน (transition) จากไซโตซีน เป็นยูราซิล โดยปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีอะมิเนชัน (oxidative deamination) เปลี่ยนกลุ่มอะมีโนเป็นกลุ่มคีโต หรือการเกิดอัลคิลเลชัน (alkylation) มีการโมดิฟายด์ (modify) เบสกวานีน และไทมีน โดยการเติมกลุ่มอัลคีลให้กับออกซิเจนที่สร้างพันธะไฮโดรเจนเป็นผลให้การจับคู่ผิดพลาด โดยกวานีนจะจับกับไทมีน และอะดินินจะจับกับไซโตซีน นอกจากนี้ความบกพร่องที่เกิดขึ้น ในขณะมีการสังเคราะห์อาร์เอนเอ ได้แก่การเกิดทอโทเมอริก ชิฟท์ (tautomeric shift) ของไฮโดรเจน จากกลุ่มอะมีโนตำแหน่งที่ 6 ย้ายไปตำแหน่งที่ 1 ในเบสอะดีนีนซึ่งกลุ่มอิมิโนที่เกิดขึ้นนี้สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน

กับเบสไซโตซีน และผลสุดท้ายของการมิวเตตชนิดทรานเวอร์ชัน (transvertion) ทั้งสองแบบหลัง จะทำให้ลำดับเบสที่ได้จากการจำลองแบบมีการเปลี่ยนแปลงจากไซโตซีนเป็นอะดีนีน (21) ซึ่งการมีชนิด และจำนวนของเบสองค์ประกอบที่แตกต่างกันนี้เองที่ส่งผลให้การรันในโพลิอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซิสทิศทางแรกเปลี่ยนไปการใช้เบอร์เซนต์เจลต่ำจะช่วยลดข้อได้เปรียบ ในการเคลื่อนที่ของรอลิโกนิวคลีโอไทม์ขนาดเล็กต่อขนาดใหญ่ ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่จึงแปรผันตามค่าประจุสุทธิของเบสที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสายรอลิโกนิวคลีโอไทด์ และที่พีเอช 3.5 จะช่วยให้เกิดความแตกต่างของประจุสูงสุดในระหว่างเบส จนกระทั่งประจุสุทธิเป็นลบจากน้อยไปมากดังนี้ ไซโตซีน อะดีนีน กวานีน และยูราซีล และเนื่องจากเป็นการรันจากขั้วลบไปขั้วบวก ดังนั้นรอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสยูราซีลเป็นองค์ประกอบในปริมาณมากที่สุด ก็จะวิ่งไปได้เร็วและไกลกว่ารอลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่มีเบสองค์ประกอบชนิดไซโตซีน (26) ทำให้จำนวนและความเข้มของแถบ (band) ที่แทนด้วยชิ้นส่วนของรอลิโกนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว ในฟิงเกอร์พรินติงทิศทางแรกแตกต่างกันไป

4.3 การโพลิอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซิสสองทิศทาง

ในการทดลองครั้งนี้ควรเป็นการเปรียบเทียบแผนที่รอลิโกนิวคลีโอไทด์ซึ่งเกิดจากการทำฟิงเกอร์พรินติง ระหว่างอาร์เอนเอของตัวอย่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้ กับสายพันธุ์ที่ใช้อ้างอิงชนิดเดียวกับที่ใช้ในการตรวจสอบทางน้ำเหลืองวิทยาว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดหรือแตกต่างไปมากน้อยเพียงใด แต่เนื่องจากไม่มีอาร์เอนเอชนิดดังกล่าว จึงเป็นการเปรียบเทียบกันเองระหว่างสายพันธุ์ของตัวอย่างที่แยกได้ทั้ง 4 ชนิดคือ A/Bangkok/1/89 (H1N1), A/Bangkok/2/89 (H1N1), A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bang1kok/4/90 (H3N2) จากผลการทดลองรูปที่ 3 และ 4 พบว่าตำแหน่งของรอลิโกนิวคลีโอไทด์ แอนติเจนฮีมแอคกลูตินิน มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น มากกว่าในส่วนอื่น ๆ ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีของการเกิดการผันแปร นอกจากจะมีความแตกต่างในจำนวนแถบแล้วตำแหน่งของแถบ (53) ซึ่งเป็นผลจากการ

เคลื่อนที่ของเบสองค์ประกอบในเชื้อไข้หวัดใหญ่แต่ละสายพันธุ์ก็แตกต่างกันด้วย อธิบายไวด้ว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสอาร์เอนเอ ซึ่งเป็นไปได้หลายลักษณะ แม้เพียงตำแหน่งเดียว แต่ถ้าหากไปตรงกับรหัสหยุด (stop codon) ก็จะทำให้ชิ้นส่วนรอลิรกนิวคลีรอไทด์นั้นมีขนาดสั้นลงไปได้ หรือในกรณีที่การเปลี่ยนแปลงของเบสเพียง 1 ตำแหน่งนั้น มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดอะมิรนหรือไม่ก็ตาม (nonsense, silent และ missense mutation) ซึ่งผลดังกล่าวนี้ เกิดขึ้นที่ยีนในส่วนของฮีมแอคกลูติเนชัน ที่เรียกว่าแอนติเจนิค ดริฟท์ แต่ยังไม่ถึงขั้นการเปลี่ยนของชนิดย่อย (subtype) ที่เรียกว่า แอนติเจนิค ชิฟท์ (21) ซึ่งนอกจากจะอธิบายด้วยเหตุผลในด้านมิวเตชันแล้ว การที่มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่พร้อม ๆ กันมากกว่าหนึ่งชนิดคือสายพันธุ์ A/H1N1 และสายพันธุ์ A/H3N2 ในปี 2532 อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีรีคอมบิแนนท์ของสารพันธุกรรมจากเชื้อทั้งสองชนิด กลายเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ระบาดในปี 2533 ก็เป็นได้ จากผลการทดลองในรพลิอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรรพรีซิสทิศทางที่สอง ซึ่งเป็นการรันในเปอร์เซนต์เจลสูง ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ขึ้นกับขนาดหรือความยาวของรอลิรกนิวคลีรอไทด์จึงสามารถใช้ตรวจสอบจุดเล็กจุดน้อย ที่วิ่งไปได้ช้าในทิศทางแรก ซึ่งทราบว่ามีเบสองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไซโตซีน ซึ่งคาดว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดนั้น (26) จากผลการทดลอง (รูปที่ 5-10) พบว่ารูปแบบของจุดที่เกิดขึ้นในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 มีความแตกต่างอย่างสังเกตเห็นได้ชัดเจน สายพันธุ์ A/H1N1 ในตัวอย่าง A/Bangkok/1/89 (H1N1) และ A/Bangkok/2/89 (H1N1) ที่ระบาดในปี 2532 มีความแตกต่างของเบสเพียง 1.5 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ A/H3N2 ในตัวอย่าง A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) ที่ระบาดในปี พ.ศ.2533 พบว่ามีความแตกต่างของเบสถึง 12.5 เปอร์เซนต์ ซึ่งอาจหมายความว่า A/Bangkok /4/90 (H3N2) เป็นรีคอมบิแนนท์ของ A/H1N1 (A/Bangkok/1/89 หรือ A/Bangkok/2/89) กับ A/H3N2 (A/Bangkok/3/90 (H3N2)) ที่ระบาดในปี 2532 และไวรัสตัวนี้อาจเป็นสายพันธุ์ตั้นกลาง (intermidiate strain) ก่อนที่จะมีการเปลี่ยนแปลงทางแอนติเจน (antigenic shift) ไปเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรงของโรคมากกว่าเดิม และสามารถก่อให้เกิดการระบาด

ในอนาคต (49) ส่วนการที่ไม่พบว่ามีการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดย่อย A/H1 ในปี พ.ศ.2533 ขณะที่ทำการวิจัยนั้น เข้าใจว่าไวรัสชนิดดังกล่าวที่ตรวจแยกเชื้อว่ามีการระบาดในกลางปี พ.ศ.2532 (เดือนมิถุนายน - กรกฎาคม) ได้มีการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิต้านทานชนิดจำเพาะต่อชนิดย่อย A/H1 และสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ในเวลาต่อมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย