หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ไข้หวัดใหญ่ คำจำกัดความ

ไข้หวัดใหญ่ เป็นโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจ เกิดจากเชื้อไวรัส Myxovirus influenzae มีลักษณะโรคคือ ไข้ ปวดศีรษะรุนแรง ปวดกล้ามเนื้อ อ่อนเพลียอย่างฉับพลัน (1)

1.1.1 ประวัติโรคไข้หวัดใหญ่

ไข้หวัดใหญ่มีการระบาดทั่วโลก (Pandemics) มีการระบาดครั้งใหญ่ๆ (Epidemics) มาในช่วงเวลาไม่น้อยกว่า 400 ปี การศึกษาระบาดวิทยาเริ่มในปี พ.ศ.2432-2435 โดย Pfeiffer ในปี พ.ศ.2434 แยกได้เชื้อแบคทีเรียจากผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ ให้ชื่อว่า Pfeiffer's bacillus (Hemophilus influenzae)(2) ซึ่งเข้าใจผิดว่าเป็นสาเหตุของไข้หวัดใหญ่ ในปี พ.ศ.2476 สมิธและพวกจึงได้แยกไวรัสที่เป็นต้นเหตุของโรคได้ เรียกว่าอินฟลูเอนซา เอ ในปีต่อ ๆ มามีผู้แยกไวรัสอื่น ๆ อีก คือ อินฟลูเอนซา บี อินฟลูเอนซา ซี และพบว่าอินฟลูเอนซา เอ เป็นต้นเหตุของการระบาดทั่วโลกในปี พ.ศ.2500 มีอัตราการป่วยถึงร้อยละ 20-40 และอัตราการตายสูงมาก การระบาดเริ่มในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน จึงนิยมเรียกเชื้อนี้ว่าอินฟลูเอนซาอาเซีย

สำหรับในประเทศไทย (3) มีบันทึกการระบาดไว้ตั้งแต่ พ.ศ.2461 (รัชกาลที่ 6) และมีการระบาดอีกหลายครั้ง เช่น มีการระบาดครั้งใหญ่ใน พ.ศ.2500 และ 2511 เกิดจากเชื้ออินฟลูเอนซาสายพันธุ์ฮ่องกง และใน

พ.ศ.2515 มีการระบาดอีกโดยสายพันธุ์ A/England/42/72 ซึ่งผู้ป่วยมีอาการไม่ค่อยรุนแรงและไม่มีตาย

1.1.2 สาเหตุการเป็นโรคไข้หวัดใหญ่

เป็น RNA Virus ในกลุ่ม Orthomyxovirus (4) ซึ่งประกอบด้วย Influenza virus ชนิด เอ บี และซี (Type A, B, C) (5) สำหรับชนิด เอ ยังแบ่งชนิดย่อยออกไปอีก เชื้อเป็นไวรัสที่มีโครงรูป หลายลักษณะ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100-150 นาโนเมตร ส่วนประกอบที่สำคัญของเชื้อนี้ คือ แอนติเจนที่อยู่ที่สิ่งห่อหุ้ม (envelope) ซึ่งมี 2 ชนิดคือ ฮีมแอคกลูตินิน หรือเอช (H) และนิวรามินิเดส หรือเอน (N) ซึ่งเป็นแอนติเจนจำเพาะต่อสายพันธุ์ (strain specific antigen) และกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีชนิดคุ้มกันได้ (protective antibodies) และการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนทั้ง 2 ชนิดนี้ทั้งแบบสมบูรณ์ (complete) เรียกว่า แอนติเจนิคชิฟท์ (antigenic shift) และบางส่วน (partial) เรียกว่า แอนติเจนิค ดริฟท์ (antigenic drift) นี้เองที่เป็นสาเหตุของการระบาดทั่วโลก (Pandemics) และการระบาดใหญ่ (Epidemics) ตามลำดับ

การเรียกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ อาศัยเกณฑ์ดังนี้

1. ชนิด (type) ของไวรัส เอ, บี หรือ ซี
2. สปีชีส์ของสัตว์ที่ติดเชื้อ ยกเว้นคน
3. สถานที่ที่พบ (geographic origin)
4. ลำดับสายพันธุ์ (strain) ที่แยกเชื้อได้
5. ปี ค.ศ.ที่แยกเชื้อได้
6. สำหรับอินฟลูเอนซา เอ ให้บอกชนิดย่อย (subtype) ของเอช และเอน แอนติเจนด้วย

ตัวอย่าง Influenza virus A/ Hong Kong/ 1 / 68 (H3N2), A / Bangkok / 136 / 89 (H3N2), A / Swine / Taiwan / 7251 / 79 (H3N2), B / Yamagata / 16 / 88

1.1.3 ระบาดวิทยา

ไข้หวัดใหญ่เป็นได้กับคนทุกอายุและทุกเพศ อย่างไรก็ตาม กลุ่มผู้เสี่ยงต่อการติดเชื้อมักเป็นกลุ่มเด็กอายุ 0-15 ปี และกลุ่มผู้สูงอายุ เนื่องจากมีภูมิคุ้มกันต่อโรคต่ำกว่าในวัยอื่น ๆ นอกจากนี้ปัจจัยที่ส่งเสริมให้โรคไข้หวัดใหญ่ มีการระบาดได้ทุกปีนอกเหนือไปจากความไม่มีภูมิต้านทานต่อโรคแล้ว สภาพภูมิอากาศความแออัดยัดเยียด ความรุนแรงของเชื้อ และการเกิด การแปรผันของแอนติเจน (antigenic variation) ของไวรัสตามธรรมชาติ เป็นสาเหตุที่ควรนำมาพิจารณาร่วมด้วย

การระบาดมีได้ทั้งการระบาดทั่วโลก การระบาดใหญ่ การระบาดย่อย (Outbreaks) และการมีเป็นประจำ (Endemics) การระบาดทั่วโลกมักเกิดจากอินฟลูเอนซา เอ และมักระบาดทุก 10-12 ปี (6) เกิดจากเชื้อมีแอนติเจนิค ชิฟท์ หรือเชื้อมีการรวมตัวเข้าด้วยกัน (recombination) (7) การระบาดใหญ่มักเกิดจากอินฟลูเอนซา เอ เช่นกันและมักจะเกิดทุก 2-4 ปี (6) เกิดจากเชื้อมีแอนติเจนิค ดริฟท์ สำหรับการระบาดย่อยมักเกิดจากอินฟลูเอนซา บี และมักเกิดทุก 4-6 ปี (6) ส่วนการเกิดโรคประจำนั้น จะมีอยู่ตลอดปีโดยไม่มีการแยกเชื้อจากผู้ป่วย ผู้ป่วยที่เป็นโรคจะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสโดยไม่มีการข้ามพวก (8) และภูมิคุ้มกันนี้จะค่อย ๆ ลดลงในเวลาหลายสัปดาห์ และมักจะหายไปในเวลาหนึ่งปี (9, 10)

สำหรับสถานการณ์ของโรคไวรัสไข้หวัดใหญ่ ในประเทศไทยในระยะที่ผ่านมา พบว่าอุบัติการสูงขึ้นในฤดูฝน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม และมักต่อเนื่องมาจนถึงฤดูหนาว เชื้อไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้ในประเทศไทย ส่วนใหญ่ใช้เป็นข้อมูลในการนำไปผลิตเป็นวัคซีนในประเทศต่าง ๆ ที่อยู่ในเขตอบอุ่น จากรายงานเฝ้าระวังโรค การตรวจแยกเชื้อพบไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีชนิดย่อยแตกต่างกันไปทุกปี ส่วนใหญ่เป็นชนิดย่อย เอช 3 เอน 2 (H3N2) และ เอช 1 เอน 1 (H1N1) ในบางปีจะมีมากกว่า 1 ชนิดย่อย (ตารางที่ 2 สรุปเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่ระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2522 -2531) ตารางที่ 1 สำหรับไข้หวัดใหญ่ชนิดบีนั้น มีรายงานประปรายในปี 2527 ส่วนในปี 2531 นั้น ระยะต้นปีรายงานการพบเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ชนิดย่อย เอช 2

ตารางที่ 1 สรุปเชื้อไข้หวัดใหญ่ Type A ระหว่างปี พ.ศ.2522-2531 ประเทศไทย

summary of influenza Type A by year 1978-1988 Thailand (47)

พ.ศ.	เชื้อไข้หวัดใหญ่ที่ระบาด (Isolated Types)	
	A/H1N1	A/H3N2
2522		1. A/Bangkok/1/79
		2. A/Bangkok/2/79
2523		1. A/Bangkok/1/79
		2. คล้าย A/Bangkok/1/79 และ A/Texas/1/77
2524	1. A/USSR/80/77	1. คล้าย A/Bangkok/1/79 และ A/Texas/1/77
	2. คล้าย A/USSR/80/77 และ A/Brazil/11/79	2. A/Bangkok/1/79
2525	1. A/USSR/90/77	1. A/Bangkok/1/79
	2. คล้าย A/USSR/90/77 และ A/Brazil/11/79	2. คล้าย A/Bangkok/1/79 และ A/Texas/1/77
2526	1. A/Hong Kong/2/82	
	2. A/Chile/1/83	
2527		1. A/Philippines/2/82
		2. A/Bangkok/2/82
2528		1. A/Philippines/2/82
		2. A/Bangkok/2/82
		3. A/Oregon/4/80
		4. A/Caen/1/84
2529	1. A/Taiwan/1/86	
	2. A/Singapore/6/89	
2530	1. A/Hong Kong/2/82	
	2. A/Singapore/6/86	
2531		A/Hong Kong/1/88

จาก สถาบันวิจัยไวรัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สรุปเชื้อไวรัสไหญ่ Type A ระหว่างปี 2522-2528 ประเทศไทย

รายงานเฝ้าระวังโรค, June 3, 1988, pp.254

กองระบาดวิทยา สำนักปลัดกระทรวงสาธารณสุข สถานการณ์ไข้หวัดใหญ่ในประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ.2526-2531 May 22,1990,pp.258-270

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอน 3 (H2N3) เรื่อยมา จนในระยะปลายปีจนถึงเดือนมกราคม พ.ศ.2532 มีรายงานการพบเชื้อไวรัส ชนิดบีในเด็กวัยเรียนที่มีอาการของโรคไข้หวัดใหญ่ที่เข้ารับการรักษาที่ศูนย์ประชานิเวศน์ จ.กรุงเทพ 6 ราย แต่จากการสอบสวนเป็นลักษณะซึ่งเกิดขึ้นเป็นครั้งคราว (sporadic case) ไม่พบลักษณะการระบาดของโรค (11)การตรวจพบการระบาดครั้งนี้ นับว่าเป็นเชื้อกลุ่มที่ไม่พบมานานหลายปี เป็นที่น่าสนใจสำหรับสถานการณ์การระบาดของโรคนี้ในประเทศอื่นในเอเชียและประเทศทางตะวันตก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ซึ่งพบผู้ป่วยจากการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดบี ประปรายในปีพ.ศ.2531 และพบสูงมากขึ้นในช่วงระยะเวลาเดียวกับการระบาดในประเทศไทยครั้งนั้น ซึ่งจากรายงานการระบาดในสหรัฐอเมริกาประมาณร้อยละ 84 ของการแยกเชื้อพบเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดบี ร้อยละ 15 เป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ชนิดย่อย เอช 1 เอน 1 (H1N1) และร้อยละ 4 เป็น เอช 3 เอน 2 (H3N2)

1.1.4 <u>พยาธิกำเนิดและพยาธิวิทยา</u>

อินฟลูเอนซาไวรัส เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคติดต่อโดยระบบหายใจโดยตรง ถ่ายทอดจากคนหนึ่งไปยังอีกคนหนึ่งโดยวิธีหายใจเอาละอองเสมหะผู้ที่เป็นโรคจากการไอหรือจามเข้าไป เชื้อจะทำให้มีการเสื่อมโทรมลง (degeneration) (12) และการตายของเนื้อเยื่อหรือกลุ่มของเซลล์ (necrosis)และเลือดออกในชั้นผิวๆ ของเอปิธีเลียมของหลอดคอ (trachea) หลอดลม(bronchi) และอาจลุกลามกระจายไปถึงหลอดลมฝอย (brochiole) และถุงลมปอด (alveolar duct) แต่เซลล์ชั้นต่ำสุด (basal cell layer) มักไม่มีการเปลี่ยนแปลง เอปิธีเลียมจะฟื้นตัว (regeneration) ได้ในประมาณ 4 - 6 วันต่อมา โดยกลายเป็นอันดิฟเฟอเรนชิเอท เอปิธีเลียม (undifferentiated epithelium) ในชั้นสับมิวโคซา มีภาวะโลหิตคั่ง (hyperemia) มาก และมีเซลล์พลาสมา (plasma), ลิมโฟซัยท์ (lymphocyte) และโลหิตมีจำนวนฮิสทิโอไซท์มากเกินไป (histiocyte infiltration) ในทุกๆ ชั้นของระบบหลอดลม ในปอดอาจมีพยาธิสภาพเป็นถุงลมที่บวมน้ำ (primary edematous) หรือมีลักษณะการอักเสบมีจุดเลือดที่ถุง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลม (hemorrhagic alveolitis) และมีการหนาตัว (thickening) ของผนังกั้นถุงลม(alveolar septa) จากการขยายตัวของหลอดเลือด และมีการอักเสบ (inflammatory infiltration) ด้วยโมโนนิวเคลียร์เซลล์เพียงชนิดเดียว ต่อมน้ำเหลืองที่ขั้วปอดและที่ bifurcation ของหลอดลมใหญ่จะโตและมีเลือดคั่งและเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงของบลาสโตไซท์ (blastic transformation) ในรายที่ถึงตายจะพบพยาธิสภาพที่กล้ามเนื้อหัวใจ มีตั้งแต่การเสื่อมถึงการตายของกล้ามเนื้อหัวใจและมีการอักเสบด้วยเซลล์อื่น ๆ นอกเหนือไปจากโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ส่วนภาวะโลหิตมีเชื้อไวรัส (viremia) จะมีอยู่ชั่วคราว และไม่พบในทุกราย และการเจริญอย่างผิดปกติของทารกในครรภ์ที่พบเกิดจากผลของเชื้อไวรัสที่เข้าสู่กระแสโลหิต(3, 12)

1.1.5 <u>ลักษณะทางคลินิค (3)</u>

1.1.5.1 ไข้หวัดใหญ่ที่ไม่มีภาวะแทรกซ้อน

ระยะฟักตัว 24-72 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการอ่อนเพลียมากอย่างฉับพลันมีเบื่ออาหาร คลื่นไส้ ปวดศีรษะอย่างรุนแรง ปวดตามแขนขา ไข้จะขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก 38.5 ถึง 40°ซ. ภายใน 2-3 ชั่วโมง มีไอแห้ง ๆ อาจมีอาการเจ็บคอ และคอแดงได้ แต่ไม่พบอาการน้ำมูกไหล อาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น อาเจียน ท้องเดินไม่ใช่ลักษณะของไข้หวัดใหญ่ ผู้ป่วยอาจมีหน้าแดง มีการติดเชื้อได้บ่อย ๆ ตาจะแดง อาจพบเสียงหายใจที่ผิดปกติ (rale) จากการตรวจฟังที่ส่วนล่างของปอด ไข้มักเป็นอยู่ 2-4 วัน แล้วค่อย ๆ ลดลง อาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหารจะหายไปใน 1-4 สัปดาห์

1.1.5.2 การชักนำให้เกิดโรคระบบการทำงานของร่ายกาย

1.1.5.2.1 ระบบไหลเวียน พบอาการเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (pericarditis) ภาวะหัวใจวายและมีเลือดคั่ง (congestive heart failure)

1.1.5.2.2 ระบบประสาทกลาง พบเยื่อหุ้มสมองอักเสบ สมองอักเสบในไข้หวัดใหญ่ที่เกิดจากเชื้ออินฟลูเอนซา เอ

1.1.5.2.3 ระบบหายใจ

1.1.5.2.3.1 หลอดลมอักเสบเฉียบพลัน (Acute bronchitis) ผู้ป่วยมีอาการไอ มีเสมหะ เป็นฟอง มีไข้ ฟังปอดพบเสียงจากหลอดลม (bronchophony) ภาพถ่ายรังสีปอดอาจพบการดั่งของเลือดกระจายทั้งสองข้าง และจุดมัวในบริเวณแนวกั้นระหว่างปอดและกระบังลม ภาวะนี้เป็นอยู่ 2-3 วัน จนถึงหลายสัปดาห์

1.1.5.2.3.2 ไวรัสนิวมอเนียปฐมภูมิ(Primary influenza viral pneunomia) เกิดหลังเป็นโรคประมาณ 1 สัปดาห์ อาการเริ่มอย่างฉับพลัน ผู้ป่วยมีอาการหอบอย่างรุนแรง มีอาการเขียว ไอแห้ง ๆ เสมหะมักน้อยมากและมีเลือดปน การตรวจร่างกายไม่ค่อยพบอะไรในระบบการหายใจ ภาพถ่ายรังสีทรวงอกอาจพบจุดมัวรอบขั้วปอดที่เกิดจากการสะสมน้ำ หรือมีการอักเสบจากการติดเชื้อกระจายทั่วไปที่เนื้อปอด จำนวนเม็ดเลือดขาวจะต่ำ โรคมีระยะสั้นมาก ผู้ป่วยมักตายจากภาวะเฉียบพลันจากภาวะการหายใจวาย

1.2 แอนติเจนิค ดีเทอมิแนนท์กับการแพร่ระบาดของโรค

1.2.1 ไวรัสอินฟลูเอนซา เอ และบี

อนุภาคของไวรัสซึ่งเป็นหลายรูปแบบ (pleomorphic) ถูกห่อหุ้มด้วยลิปิด เอนเวลอป (lipid envelope) หรือลิปิด เมมเบรน (lipid membrane) นั้นเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน โดยเทคนิคเนกาทีฟสเตนนิง (negative-staining) จะแสดงโครงรูปที่ซับซ้อนในหลายลักษณะตั้งแต่ทรงกลมรี (globular form), รูปยาว (filamentous form) และทรงกลม (sphaerical shape) (ภาคผนวก ก) อย่างไรก็ตามไวรัสที่ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ที่ติดเชื้อจะพบเพียงรูปทรงกลมเท่านั้น ภายในลิปิด เอนเวลอป ประกอบด้วย โปรตีน แมทริกซ์ (matrix protein) หรือเปลือกหุ้มแมทริกซ์ (matrix shell) ทำหน้าที่เป็นโครงร่าง ซึ่งจะเกี่ยวข้อง (associate) กับชั้นผิวด้านในของลิปิด เอนเวลอป และภายในแมทริกซ์ เชลล์ จะประกอบ

ด้วยอาร์เอนเอจีโนมสายเดี่ยวจำนวน 8 ท่อน (segment) (ภาคผนวก ก.6) ที่จะถอดรหัสเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนที่แตกต่างกัน โดยอาร์เอนเอจีโนม ท่อนที่ 1-3 รับผิดชอบการจำลองแบบและการสังเคราะห์อาร์เอนเอ มีผลิตภัณฑ์โปรตีนเป็น เอนไซม์โพลิเมอเรส 3 ชนิด ส่วนที่เหลือจะเป็นโปรตีนที่แสดงคุณสมบัติการเป็นแอนติเจน ซึ่งได้แก่ ฮีมแอคกลูตินิน นิวคลีโอโปรตีน นิวรามินิเดส โปรตีนเมทริกซ์ และโปรตีนนอนสตรัคเจอรอล รับผิดชอบโดยอาร์เอนเอจีโนม ท่อนที่ 4, 5, 6, 7, และ 8 ตามลำดับ (13)

ส่วนที่เป็นลิปิด เอนเวลอปนั้นเข้าใจว่าเป็นส่วนที่ไวรัสได้มาจากพลาสมา เมมเบรนของเซลล์ที่ไวรัสเข้าไปเจริญอยู่ (14) พบแอนติเจน (antigen:Ag) ที่โผล่พ้นผิว 2 ชนิด คือฮีมแอคกลูตินิน หรือเอชเอ (HA) และนิวรามินิเดส หรือเอนเอ (NA) เป็นอัตราส่วนที่ 3/5 และ 2/5 ตามลำดับ เป็นสารประกอบพวกไกลโคโปรตีน ซึ่งส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ไซด์ เชน (Carbohydrate side chain) จะแสดงการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนิค แอคทิวิตีในระหว่างสายพันธุ์ของไวรัส ดังนี้

1.2.1.1 ฮีมแอคกลูตินิน (Hemagglutinin)

มีหน้าที่ในการเข้าจับกับเซลล์และกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยานิวทรัลไลเซชัน (neutralization) กับแอนติบอดี เมื่ออนุภาคของไวรัสเข้าจับกับเซลล์พบว่าโมเลกุลของฮีมแอคกลูตินินโมโนเมอร์ ซึ่งเป็นสายเดี่ยวของโพลีเปปไตด์จะถูกตัด โดยแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติโอไลติคจากเซลล์ทำให้ปลายด้านอะมิโน (n-terminal signal siquence) ถูกกำจัดออกไป และตามด้วยการตัดอีกครั้งจะได้โมโนเมอร์ 2 ส่วนที่มีขนาดต่างกันคือ เอชเอ 1 (HA1) และเอชเอ 2 (HA2) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 36,000 และ 27,000 ตามลำดับ โมโนเมอร์ทั้งสองเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide linked chain) ซึ่งการตัดนี้จะขึ้นกับชนิดของเซลล์ผู้ถูกอาศัยและสายพันธุ์ของไวรัส ตลอดจนสภาวะที่ไวรัสมีการเจริญอยู่ ซึ่งในเซลล์ผู้ถูกอาศัยบางชนิดในโมเลกุลของฮีมแอคกลูตินินนั้น จึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยในเบื้องต้น เพื่อตรวจสอบการปรากฏของไวรัสไข้หวัดใหญ่ เนื่องจากตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว ด้วยวิธีการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination) และการตรวจฮีมแอดซอพชัน

(Hemadsorption assay) และจากการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ที่ผ่านมา พบว่าเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนิคของไกลโคโปรตีนตัวนี้ ซึ่งการเกิดการผันแปรของยีน (variation) ในโมเลกุลของฮีมแอคกลูตินิน เกิดได้ 2 ลักษณะ สำหรับการเกิดการเปลี่ยนแปลงบางส่วน (partial change) ที่เรียกว่า แอนติเจนิค ดริฟท์ (Antigenic drift) นั้นเป็นผลจากการเกิดพอยท์มิวเตชัน (point mutation) ของไนโตรจีนัสเบส ทำให้รหัสและชนิดของกรดอะมิโนในลำดับของสาย ณ บริเวณที่ถาวรเป็นคอนเสิฟรีเจียน (conserve region) ของโมเลกุลเอชเอ 1 โมโนเมอร์เกิดการเปลี่ยนแปลง ส่วนการเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยสมบูรณ์ (Complete change) ที่เรียกว่าแอนติเจนิค ชิฟท์ (Antigenic shift) นั้น เป็นผลจากการแทนที่ของยีนที่จะถอดรหัสเป็นฮีมแอคกลูตินิน และมักเกิดควบคู่ไปพร้อมกับการแทนที่ของยีนที่จะถอดรหัสเป็นนิวรามินิเดส ทำให้ชนิดย่อย (subtype) เปลี่ยนไปจากชนิดเดิมที่เคยมีการแพร่ระบาด และสามารถตรวจสอบได้จากการทำปฏิกริยาฮีมแอคกลูตินินอินฮิบิชัน (14)

1.2.1.2 นิวรามินิเดส (Neuraminidase)

เป็นโปรตีนที่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ในการเข้าทำลายรีเซพเตอร์ (receptor) บนผิวของเซลล์ผู้ถูกอาศัยที่ถูกจับด้วยฮีมแอคกลูตินินของไวรัสโดยเอนไซม์นิวรามินิเดส จะเข้าทำปฏิกริยาตัดพันธะแอลฟา คีโตไซดิค (∝-ketosidic linkage) ที่เชื่อมปลายของกรดซิเอลิค และปลายของน้ำตาล (sugar residue) ที่อยู่ใกล้กันในซิเอโลไกลโคโปรตีนและไกลโคไลปิด (15, 16,17) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในชั้นเมมเบรนของเซลล์ผู้ถูกอาศัย เป็นการช่วยให้ไวรัสสามารถผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ และเป็นการทำลายฮีมแอคกลูตินินรีเซพเตอร์ไปพร้อมกัน(18) นิวรามินิเดสโมเลกุลถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นโพลีเปปไตด์สายเดี่ยว ถอดและแปลรหัสจากอาร์เอนเอท่อนที่หก มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 ดาลตัน(19) ประกอบด้วยโพลิเปปไตด์ที่มีโครงสร้างเหมือนกัน 4 สาย มีน้ำหนักโมเลกุลสายละ 50,000 ดาลตัน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์(20) การเกิดแอนติเจนิคดริฟท์ ในโมเลกุลของนิวรามินิเดส เป็นผลจากการเกิด การแทนที่ (substitution) ของกรดอะมิโนบนยีนตำแหน่งที่ 344 และ 368 เป็นส่วนใหญ่ (ภาคผนวก ก.4.2) และแอนติเจนิคชิฟท์ เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิด

และจำนวนของกรดอะมิโน ซึ่งเกิดการการแทนที่ (replacement) และการลดลง (deletion) ตั้งแต่ 11-18 ชนิด ตรงส่วนที่เป็นคอนเซิฟรีเจียน ที่บริเวณก้าน (stalk) กับซีเควนซ์ บริเวณที่ต่อกับเมมเบรนของอนุภาคไวรัส (ภาคผนวก ก.4) นอกจากนี้ชนิดของคาร์โบไฮเดรตในไกลโคโปรตีน ซึ่งมีความหลากหลาย ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งในการเกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่างสายพันธุ์ของไวรัสด้วย (4,21)

จากการทดสอบด้วยวิธีดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิส์วชัน (Double immunodiffusion) เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของแอนติเจนิคในฮีมแอคกลูตินิน และนิวรามินิเดส แอนติเจน สามารถจำแนกชนิดย่อย (sub-typing) ในไกลโคโปรตีนดังกล่าวออกได้ถึง 13 และ 9 ชนิดตามลำดับ (ภาคผนวก ก.5) (4) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของแต่ละชนิดย่อยในไวรัส จะตรวจสอบด้วยการทำปฏิกิริยาฮีมแอคกลูตินินอินฮิบิชันและนิวรามินิเดสอินฮิบิชัน พบว่าส่วนใหญ่ไข้หวัดใหญ่ที่แพร่ระบาดในคนซึ่งเกิดจากไวรัสชนิดเอ นั้นมักเป็นชนิดย่อยที่คุ้นเคย ได้แก่ เอช1, เอช2, เอช3 และ เอน1, เอน2 ที่พบเป็น เอช1เอน1, เอช2เอน2, เอช3เอน2 ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดผลแอนติเจนิค ดริฟท์ และแอนติเจนิค ชิฟท์ สำหรับไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบีก็สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนิค ดริฟท์ ด้วยการทำฮีมแอคกลูตินิน อินฮิบิชัน เทสต์ เช่นเดียวกัน

1.2.1.3 กรดไรโบนิวคลีอิคจีโนม (Ribonucleie acid genome)

ผลจากการทำ เจลอิเลคโตรโฟรีซีสในไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งชนิดเอ และบี แสดงให้เห็นว่าอนุภาคของไวรัสประกอบด้วยอาร์เอนเอชนิดสายเดี่ยว (single strand RNA) จำนวน 8 ท่อน และเป็นเนกาทีฟ สแตรนด์ ไวรัส (negative strand virus) ซึ่งหมายถึงอาร์เอนเอของไวรัสที่ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นอาร์เอนเอถอดรหัส (m-RNA) ในการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสได้ ในอาร์เอนเอท่อนที่แตกต่างกันนี้จัดเข้ากลุ่มตามขนาดได้ 3 กลุ่มใหญ่ ตั้งแต่กลุ่มที่มีขนาดใหญ่มาก ประกอบด้วยอาร์เอนเอจำนวน 3 ท่อน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90,000-100,000 ดาลตัน เกี่ยวข้องกับอาร์เอนเอโพลิเมอเรส แอคทิวิตี I, II และ III ในขบวนการถ่ายทอดรหัส

(transcription) กลุ่มที่มีขนาดปานกลาง จำนวน 3 ท่อน มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 50,000 ดาลตัน เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการเป็นแอนติเจน ได้แก่ นิวคลิโอโปรตีน (type-specfic antigen) และไกลโคโปรตีน 2 ชนิด คือ ฮีมแอคกลูตินิน และนิวรามินิเดส (subtype-specific antigen) และกลุ่มที่มีขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 ดาลตัน จำนวน 2 ท่อน เกี่ยวข้องกับแมทริกซ์ โปรตีน และนอนสตรัคเจอรัล โปรตีน (ตาราง 1) (4)

1.2.1.4 นิวคลิโอโปรตีน (Nucleoptotein) (22,24) มีความสำคัญในการจัดแบ่งชนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ออกเป็นเอ, บี และซี อาศัยคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนจำเพาะชนิด (type specific antigen) จากปฏิกริยาการเกิด ครอสรีแอคชัน (cross reaction) ในการตรวจสอบทางอิมมูนวิทยา ได้แก่ ปฏิกริยาการตรึงคอมพลีเมนต์ (complement fixation), ปฏิกริยาดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวส์ชัน (double immunodiffusion) มีน้ำหนักโมเลกุล 56, 106 ดาลตัน เป็นองค์ประกอบในแกนหลัก ของส่วนในสุดของอนุภาคไวรัส โดยนิวคลีโอโปรตีนเข้าฟอร์มเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน (complex structure) กับอาร์เอนเอ เซกเมนต์ และโพลิเมอเรสโปรตีน จากการศึกษา อาร์เอนเอ: อาร์เอนเอ ไฮบริไดซิเซชัน (RNA: RNA hybridization) พบว่า ชนิดของนิวคลีโอโปรตีนยีน ในสัตว์ต่างชนิดที่มีการติดเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา เอ ซึ่งมีความยาว 1,565 นิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสให้กรดอะมิโนถึง 498 ชนิดนั้นสามารถเกิดการผันแปรได้ เนื่องจากพบว่า มีความแตกต่างกันถึง 5 กลุ่ม แบ่งเป็น 2 กลุ่มในหมู่สัตว์ปีก 2 กลุ่มในม้า และ 1 กลุ่มในคนและสุกร จัดเป็นแอนติเจนจำเพาะสายพันธุ์ (23, 25) นอกจากนี้ยังพบว่าในโมเลกุลของนิวคลีโอโปรตีน ที่บริเวณคอนเสิฟโดเมน (conserved domain) มีความเกี่ยวข้องกับการถอดแบบอาร์เอนเอ

1.2.1.5 เมทริกซ์ โปรตีน (Matrix protein) (24) เป็นผลิตภัณฑ์จากอาร์เอนเอ ท่อนที่ 7 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการช่วยรักษาสภาวะความเสถียรของอนุภาคไวรัส และแสดงแอนติเจนผิว จัดเป็นแอนติเจนจำเพาะชนิดสามารถใช้จำแนกชนิดของไวรัสได้ (4)

ตารางที่ 2 ยีนและผลิตภัณฑ์จากยีนในไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

Virion RNA segment	Known gene product	Length (nucleotides)	Encoded polypeptide	Nascent polypeptide length (aa)	Nature polypeptide	Approx.no. of molecules per virion	Remarks
1.	RNA polymer ase I	2,341	PB2	759		30-60	Host cell RNA cap binding; component of RNAtranscriptase
2.	RNA polymer ase II	2,341	PB1	757		30-60	Initiation of transcription; component of RNA transcriptase
3.	RNA polymer ase III	2,233	PA	716		30-60	Component of RNA transcriptase
4.	Hemagglutinin	1,778	HA	566	HA1 326 HA2 222	500	Surface glycoprotein, receptor-binding and fusion activity; trimer; major antigenic
5.	Nucleoprotein	1,565	NP	498	1000		Associated with RNA segments to/ from ribonucleoprotein; structural component of RNA transcriptase; type specific antigen

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Virion RNA segment	Known gene product	Length (nucleotides)	Encoded polypeptide	Nascent polypeptide length (aa)	Nature polypeptide	Approx.no. of molecules per virion	Remarks
6.	Neuraminidase	1,413	NA	454	454	100	Surface glycoprotein;neuraninidase activity;tetramer; surface antigen
7.	Matrix protein	1,027	M	252	252	3000	Major protein component of virus; underties lipid bilayer; type-specific antigen
			M2	96			Spliced mRNA, peptide predicted by nucleotide sequence only
8.	Non-structure protein 1	890	NS1	230			Non structural protein; function unknown
	Non-structure		NS2	121			Spliced RNA, nonstructural protein; function unknown

จาก Air, G.M. and Laver, W.G., "The Molecular basis of antigenic variation in Influenza Virus". Advancesin virus research.31. (New York: Acadamic Press, 1986),p.56

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.1.6 นอนสตรัคเจอรัล โปรตีน (Nonstructural protein)

ยีนที่ถ่ายทอดรหัส สำหรับโพลิเปปไทด์ นอนสตรัค-เจอรัล โปรตีน หรือ NS อยู่ในเซกเมนต์เดียวกัน แต่เขตลำดับการอ่าน (reading frame) ที่ต่างกัน เป็นผลให้เกิดโปรตีนต่างกัน 2 ชนิด NS1 และ NS2 ไม่ค่อยมีความสำคัญในแง่การเป็นแอนติเจน เนื่องจากโปรตีนสองชนิดนี้ถูกทำลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์และแอนติบอดีจากเซลล์ติดเชื้อ สำหรับหน้าที่ยังไม่ทราบแน่นอน พบว่า NS1 จะสร้างมากในนิวเคลียสขณะที่มีการติดเชื้อ ส่วน NS2 จะสร้างในช่วงปลายของการติดเชื้อ และพบในไซโตพลาสซึม (24)

1.2.1.7 โพลิเมอเรส โปรตีน (Polymerase protein)

เป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับโปรตีนชนิดที่พบในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ ถ่ายทอดรหัสโดยอาร์เอนเอท่อนที่ 1, 2 และ 3 ผลิตภัณฑ์ของยีนเป็น PB1, PB2, และ PA ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 96,000, 87,000 และ 85,000 ตามลำดับ โพลิเมอเรสโปรตีนเป็นเอนไซม์ที่พบในอนุภาคไวรัสจะเกี่ยวข้องอยู่กับอาร์เอนเอ และนิวคลีโอโปรตีน มีบทบาทสำคัญในขบวนการถอดแบบ (transcription) ของเชื้อ แต่เนื่องจากถูกสังเคราะห์ขึ้นในปริมาณค่อนข้างน้อย ทำให้การศึกษาถึงโครงสร้างและคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนยังไม่กว้างขวางนัก (4)

1.2.2 <u>ไวรัสอินฟลูเอนซา ซี</u>

มีความแตกต่างจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สองชนิดแรกคือ เอ และ บี ตรงที่ไม่พบนิวรามินิเดส จึงไม่แสดงปฏิกริยากับเม็ดเลือดแดงที่ใช้ในการทดสอบเบื้องต้นถึงการปรากฏของไวรัส อย่างไรก็ตามในไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบีก็มีเอนไซม์ชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติใช้ทำลายรีเซพเตอร์ของเซลล์ผู้ถูกอาศัยเช่นกัน และพบว่าชนิดของรีเซพเตอร์ที่มีความจำเพาะกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบีนั้นมีความแตกต่างไปจากชนิดเอ และบี สำหรับการเปลี่ยนแปลงในไวรัสชนิดนี้ยังศึกษากันน้อยมากเนื่องจากไม่ใช่สาเหตุในการระบาดเหมือนสองชนิดแรก (21)

1.3 เทคนิคในการตรวจสอบการมี การผันแปรของแอนติเจน (Antigenic variation) ของเชื้อ (26)

การตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยของนิวเตชันในไวรัสไข้หวัดใหญ่ จากการวิเคราะห์ด้านรมเลกุล (molecular) และน้ำเหลืองวิทยา (serology) โดยวิธีต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีฟิงเกอร์พรินติง พบว่า ความไว (sensitivity) ยังต่ำอยู่มาก (27) เช่น คอมเพททิชัน นิวคลีอิด แอซิด ไฮบริไดซ์เซชัน สามารถตรวจสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ได้เพียง 25% โฮรมโลจีส์ของลำดับเบสทั้งหมดบนซีเควนส์ หรือแม้การทำเรสตริชัน เอนโดนิวคลีเอส ก็ตรวจสอบได้ไม่เกิน 30% โฮรมโลจีส์ ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ทางน้ำเหลืองวิทยา เช่น การใช้โพลีโคลนนอล แอนติบอดี ยังมีขีดจำกัดอยู่ที่ คอนเสิฟ โฮรมโลจี การทำรอลิโกนิวคลีโอไทด์ฟิงเกอร์พรินติง ใช้ทำนายความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดทางพันธุกรรม (ภาคผนวก ก.11) ระหว่างพวกไวรัสในกลุ่มเดียวกัน และใช้ชี้บ่งถึงธรรมชาติของการแพร่กระจายและการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไวรัส ลักษณะเฉพาะของเทคนิคนี้คือจะปรากฏเป็นรูปแบบการเรียงตัวของจุด (spot.pattern) แบบพิมพ์ลายนิ้วมือ แต่ละจุดจะมีการเคลื่อนที่เป็นอิสระไม่ขึ้นแก่กัน จึงจำเป็นต้องมีตัวเทียบที่จะใช้เป็นแม่แบบอ้างอิง (reference pattern) จากการพิจารณาระยะทางการเคลื่อนที่ไปได้เท่า ๆ กันของแต่ละจุดที่คล้ายคลึงกัน การมีตำแหน่งและขนาดของจุดเล็กจุดน้อยร่วมกันของอาร์เอนเอไวรัสสองตัวอย่างจะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์อันใกล้ชิดทางพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองนั้นได้ ซึ่งความไวของวิธีนี้ จะขึ้นกับกลไกในการย่อยอาร์เอนเอออกเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดต่าง ๆ การเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงหนึ่งตัว ซึ่งส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับไซโตซีน (cytosine) อะดีนีน (adenine) หรือยูริดีน (uredine) จะส่งผลให้การเคลื่อนที่ในเจลอิเลคโตรโฟริซิสทิศทางแรกเปลี่ยนไป และจุดที่ปรากฏก็จะ shift ไปได้ในอาร์เอนเอที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง และส่วนใหญ่การเคลื่อนที่ที่เปลี่ยนไปนั้น มันถูกคาดหวังว่าเป็นการ ทรานสิชัน (transision) ของเบสไซโตซีน เป็นเบสยูริดีนส่วน

018774

น้อยเท่านั้นที่เปลี่ยนแบบ ทรานสเวอร์ชัน (transversion) จากเบสไซโตซีน เป็นอะดีนีน การเปลี่ยนที่เกี่ยวข้องกับเบสกวานีน (guanine) มักเกิดจากการตัดของเอนไซม์อาร์เอนเอสทีวัน (RNase T1) ที่จุดตัดเฉพาะ แต่โดยทั่วไปพบน้อยกว่ากรณีข้างต้นมาก

หลักการของวิธีฟิงเกอร์พรินติง เป็นการทำเจลอิเลคโตรโฟริซิสในสองทิศทางชนิดตัวกลาง (medium) เป็นโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) โดยใช้ความต่างศักย์สูงในทิศทางแรก (First dimension) ทำให้อาร์เอนเอแยกจากกันด้วยประจุสุทธิ (net charge) และติดตามด้วยทิศทางที่สอง (Second dimension) ซึ่งใช้เปอร์เซนต์เจลสูง ทำให้อาร์เอนเอแยกจากกันด้วยความแตกต่างของขนาดและความยาวของสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ โดยในทิศทางแรกใช้ความต่างศักย์สูงถึง 400 โวลต์ เพื่อช่วยให้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดใหญ่ เคลื่อนที่ได้ดีเท่ากับขนาดเล็ก ลดปัญหาการเกิดหาง (tailing) และใช้พีเอชต่ำ 3.5 ทำให้เกิดความแตกต่างของประจุในระหว่างเบสสูงที่สุด มีผลทำให้ประจุสุทธิเป็นลบ ความสามารถในการเคลื่อนที่ของนิวคลีโอไซด์โมโนฟอสเฟต (nucleoside monophosphate) จะเพิ่มจากเบสไซโตซีน อะดีนีน กวานีน และยูริดีน ตามลำดับ ถ้าไม่คิดแรงเสียดทาน การเคลื่อนที่ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์จะขึ้นอยู่กับประจุรวม (total charge) ของเบสทั้งหมด และการใช้เปอร์เซนต์โพลีอะคริลาไมด์ต่ำ (10%) เพื่อให้การเคลื่อนที่ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไม่ว่าขนาดจะใหญ่หรือเล็กเป็นไปได้โดยเท่าเทียมกัน และโอลิโกนิวคลีโอไทด์จะวิ่งไปได้ไกลเพียงใด ก็ขึ้นกับองค์ประกอบของเบสภายในสายว่าประกอบด้วยเบสอะไร อาร์เอนเอที่สกัดจากไวรัสที่ผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์แล้ว ควรมีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ก่อนผ่านเข้าสู่ขั้นตอนการย่อยตัดด้วยเอนไซม์อาร์เอนเอสทีวัน (RNase T1) และติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพนกมมาฟอสเฟตสามสิบสอง อาร์เอนเอ (γ -32p RNA) โดยมีเอนไซม์โพลีนิวคลีโอไทด์ไคเนส (Polynucleotide Kinase) ย้ายหมู่ฟอสเฟตติดฉลากจาก (γ -32P) RNA ไปยังปลายไฮดรอกซิลกรุปอิสระ (free-OH group) ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัด ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพราะอาจเกิดการปนเปื้อนของนิวคลีเอสจากสิ่งแวดล้อมได้ และการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ในทิศทางแรกจะสิ้นสุดลงเมื่อ dye

marker ที่หยอด (load) ไปพร้อมกับอาร์เอนเอ ตัวอย่างเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นมาได้ 20 เซนติเมตร ตัดเจลตามแนวการเคลื่อนที่ของแถบ (band) รอลิรกนิวคลีรอไทด์กว้างประมาณ 2 เซนติเมตร เตรียมเชื่อมกับเจลของระบบอิเลคโตรโฟรีซีสทิศทางที่สอง สภาวะการทำที่อุณหภูมิห้องควบคุมให้มีปริมาณกระแสไฟฟ้าต่อเพลทเป็น 10 มิลลิแอมแปร์ การทำจะสิ้นสุดลงเมื่อสีติดตาม (dye marker) เคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นลงมา 16 เซนติเมตร หรือประมาณ 16 ชั่วโมง จึงถอดกระจกออกข้างหนึ่ง ใช้แผ่นโพลิเอทธิลีน (wrak) ห่อผิวเจลข้างที่เปิดออก จากนั้นวางแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ซึ่งอยู่ในถุงดำลงประกบทับ จัดให้ขอบของแผ่นเจลและแผ่นฟิลม์พอดีกัน ปิดทับด้วยกระจกอีกครั้งหนึ่ง และนำไปวางในห้องเย็นค้างคืน การตาก (expose) นี้อาจใช้เวลาตั้งแต่ 1 ถึง 3 วัน เพื่อให้ความคมชัดของจุดที่ต้องการเป็นไปได้ดีขึ้น แผ่นฟิล์มที่ปรากฏของแบบลายนิ้วมือที่เป็นจุดสีดำเมื่อเปรียบเทียบกับลายพิมพ์นิ้วมือสายพันธุ์อ้างอิง โดยคำนวณจากสูตรการหาเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงของเบส สามารถใช้แปลผลแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีการแพร่ระบาดนั้นได้ว่ามีการติดเชื้อต่อเนื่องมาจากเชื้อที่เคยระบาดในปีก่อน ๆ หรือเป็นเชื้อตัวใหม่ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น เพราะตามทฤษฎีแล้วชนิดของไข้หวัดใหญ่ที่มีความสัมพันธ์ อย่างใกล้ชิดมาก ๆ นั้น มีความเป็นไปได้อย่างสูงที่พบว่าเคยเป็นชนิดเดียวกันมาก่อน โดยที่มีการแอบแฝงของสายพันธุ์เป็นระยะเวลานาน อาจถึง 10 ปี โดยไม่เคยมีการปรากฏของเชื้อ ในช่วงระยะเวลาดังกล่าวแต่อย่างใด ต่อมามีการตรวจสอบพบเชื้อชนิดนี้อีก และพบว่าจีโนติคดีเทอร์มิแนนท์ยังคงเหมือนเดิมทุกอย่าง (28) หรือเกิดเนื่องจากมิวแตนท์ของสายพันธุ์จากที่เคยติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ม้า สุกร มาเป็นสายพันธุ์จากที่ก่อโรคในคน สาเหตุมาจากยีนมิวเตชัน (29,30) หรือมีการระบาดของไวรัสสองสายพันธุ์ในเวลาใกล้เคียงกัน ทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำซ้อน (mixed infection) ขึ้นในคนและในขณะที่เกิดการเข้าประกอบ (reassembly) เพื่อเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์นั้นมีการจับเอาแอนติจินิค ดีเทอร์มิแนนท์ของไวรัสอีกชนิดหนึ่งเข้ามาแทน ทำให้เกิดเป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดใหม่ที่เป็นลูกผสม (recombinant) ขึ้น (31) และสาเหตุที่เป็นผลมาจากการเกิดแอนติจินิค แวริเอชัน ภายในโมเลกุลของแอนติเจนฮีมแอคกลูตินิน

บนอนุภาคไวรัส ชนิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่ 1 ตำแหน่ง (single substitution in HA molecules) (32) ที่พบบ่อยว่ามีการเปลี่ยนแปลงรหัสของคู่เบสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน ที่บริเวณไตรเมอร์ของโมเลกุล (ภาคผนวก ก.3.2) ซึ่งทำหน้าที่รับผิดชอบต่อการเข้าจับที่เมมเบรนของเซลล์ผู้ถูกอาศัยในขณะที่มีการติดเชื้อของไวรัส เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในปฏิกริยาการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนแปลงไปตามความรุนแรงของเชื้อ (4)

1.4 การป้องกัน

1.4.1 วัคซีน

วัคซีนไข้หวัดใหญ่จะมีประโยชน์ในการป้องกันโรคหรือทำให้ความรุนแรงของโรคลดลง ถ้าโรคนั้นเกิดจากเชื้อที่เป็นโฮโมโลกัส หรือมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดทางสายพันธุ์ย่อย แต่โดยทั่วไปแล้วการฉีดวัคซีนไม่ได้ผลดีเสมอไป เพราะมีการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนของเชื้อเสมอ แม้วัคซีนยังไม่ใช่สิ่งจำเป็นสำหรับประเทศไทย เนื่องจากฤดูกาลระบาดของโรคจะเกิดขึ้นก่อนและหมดไปอย่างรวดเร็ว ประกอบกับไม่พบว่ามีความรุนแรงของโรคหรือการติดเชื้อแทรกซ้อน และหมดไปอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของอิลิกนิวคลีโอไทด์สามารถใช้คาดคะเนการระบาดของเชื้อไวรัส จึงเป็นข้อมูลสำคัญในการผลิตวัคซีน ที่จำเป็นต้องให้ในกลุ่มเสี่ยงซึ่งได้แก่ ผู้ป่วยที่เป็นโรครูมาติคของลิ้นหัวใจ (rheumatic valvular heart disease) และโรคหัวใจอื่น ๆ โรคเรื้อรังของหลอดลมและปอด โรคเบาหวาน โรคแอดดิสัน หญิงมีครรภ์ และผู้ที่มีอายุ 65 ปีขึ้นไป (3) องค์ประกอบของวัคซีนในแต่ละปีจะถูกกำหนดขึ้นโดยองค์การอนามัยโลก ในเดือนมกราคมหรือเดือนกุมภาพันธ์ หรืออาจเปลี่ยนแปลงกำหนดวันได้บ้างหากมีการตรวจพบการปรากฏการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่ ในส่วนต่าง ๆ ของโลก เมื่อศูนย์ข้อมูลได้รับตัวอย่างชนิดของไวรัสแล้วจะใช้เวลาหนึ่งถึงสองสัปดาห์ในการเลี้ยงไวรัสให้มีชีวิต และทำการเพิ่มปริมาณในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคโนโลยีสมัยใหม่ จนมากพอที่จะนำมาผลิตวัคซีนจากเชื้อไวรัสที่ถูกทำให้อ่อนฤทธิ์ด้วยวิธีที่ต่างกัน โดยเริ่มจากเชื้อไข้หวัดใหญ่จาก

หลายสายพันธุ์ที่ถูกส่งมานั้นจะนำมาเพาะเลี้ยงในถุงอัลแลนโตอิคในไข่ไก่ฟัก ราว 5 ถึง 10 พาสเซส เพื่อรักษาคุณสมบัติการติดเชื้อ และศึกษาพยาธิสภาพโดยเพาะลงเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปอดจากคน 5 ถึง 8 พาสเซส จากนั้นนำฟลูอิดที่ได้นี้วิเคราะห์หาคุณสมบัติของแอนติเจนว่ามีความแตกต่างหรือไม่ ในระหว่างเชื้อที่แยกได้ในขณะนั้นกับเชื้อที่เคยมีการระบาดมาก่อน โดยการตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสและชนิดย่อยของแอนติเจนด้วยการทดสอบปฏิกริยาฮีมแอคกลูตินินอินฮิบิชัน และนิวรามินิเดส อินฮิบิชัน และตรวจสอบความใกล้ชิดของสายพันธุ์จากปฏิกริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติเจนของเชื้อตัวอย่างกับแอนติซีรัมที่เตรียมไว้ด้วยวิธีดับเบิลอิมมูโน ดิฟฟิวชัน และหาเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงของเบสในรอลิกนิวคลีโอไทด์ จากการทำแผนที่อาร์เอนเอ ขณะเดียวกับมีการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากซีรัมกลุ่มประชากร เพื่อหาว่าในซีรัมดังกล่าวมีแอนติบอดีไตเตอร์ต่อแอนติเจนของเชื้อที่กำลังมีการระบาดอยู่หรือไม่ วัคซีนจากไวรัสสายพันธุ์ที่ผ่านขั้นตอนการตรวจสอบและมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้ร่างกายผลิตแอนติบอดีขึ้นป้องกันการติดเชื้อที่ดีนั้น มักเป็นชนิดโพลิวาเลนซ์ ซึ่งประกอบด้วยสองถึงสามสายพันธุ์ของไวรัสทั้งชนิดเอ ที่มีความแตกต่างของแอนติเจนฮีมแอคกลูตินิน และนิวรามินิเดสชนิดย่อยแบบต่าง ๆ และไวรัสชนิดบีร่วมกัน เพื่อให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยแอนติบอดีเป็นไปได้กว้างขึ้น (3,54) ตัวอย่างวัคซีนที่ผลิตขึ้นโดยวิธีของ Zhdanoo และ Fadeyeva ใน พ.ศ.2495 เป็นไตรวาเลนซ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่จากอัลแลนโตอิค ฟลูอิดที่ถูกฆ่าแล้วตัวอย่างละ 0.1 มล. ในปริมาณของวัคซีน 0.3 มล. และสามารถเตรียมในรูปของวัคซีนแห้ง โดยไม่สูญเสียความรุนแรงของไวรัส ด้วยการทำให้เยือกแข็ง โดยมีแป้งทำหน้าที่เป็นอินเนิท เบส ผ่านเครื่องทำให้เป็นผงที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน ไวรัสจะยังคงมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 21 เดือน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการให้วัคซีนปีละสองครั้ง โดยเว้นระยะห่างกัน 9 เดือน ในเดือนกันยายนและเดือนมกราคม เนื่องจากวัคซีนสามารถป้องกันการติดเชื้อและกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันอยู่ได้นาน 10 เดือน (2) ปัจจุบันวัคซีนที่ใช้ เตรียมจาก infected, extraembryonic fluid of chick embryo มีส่วนผสมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ เอช3 เอน2 700 ซี.ซี.เอยูนิต และไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี 500 ซี.ซี.เอยูนิต เป็น

วัคซีนจากเชื้อไวรัสที่ถูกทำให้อ่อนกำลังด้วยการใส่ฟอร์มาลดีไฮด์ [inactivated (formalinized) vaccine] วิธีการให้วัคซีน ครั้งแรกในระยะสองถึงสามเดือนก่อนจะมีการระบาด ให้ 1 มล. เข้าใต้ผิวหนังสองครั้ง ห่างกันหลาย ๆ สัปดาห์ หรือสองถึงสามเดือน แล้วให้เสริมอีกครั้ง (booster) ด้วย 1 มล. เข้าใต้ผิวหนังอีกปีละครั้ง ในประมาณช่วงเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน ผลข้างเคียงจากวัคซีนส่วนใหญ่ไม่ค่อยพบ แต่อาจพบการแพ้ที่ผิวหนัง เช่น เป็นผื่นนูนหรือลมพิษจากโปรตีนแปลกปลอม หรือจ้ำเขียว ภาวะเลือดคั่งเป็นจุดตามผิวหนังได้ในผู้ที่แพ้โปรตีนจากไข่ และอาจมีไข้ได้ในบางราย (3)

1.4.2 สารเคมีหรือยา

อะแมนตาดีน ไฮโดรคลอไรด์ เป็นสารประกอบพวกซิมเมทริกอามีน พบว่า มีผลป้องกันการติดเชื้อตามธรรมชาติ จากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอได้ โดยขนาด 200 มก.ต่อวัน เริ่มให้เร็วที่สุดหลัง exposure และให้ต่อไปอย่างน้อย 10 ถึง 30 วัน (ภาคผนวก ก.10)

1.5 สมมติฐานและวัตถุประสงค์ของการวิจัย

ดังกล่าวแล้วข้างต้นว่าไข้หวัดใหญ่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข ซึ่งจะมีประจำทุกๆ ปี และความรุนแรงมากน้อยแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อไวรัส สำหรับไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ พบว่ามีอาการรุนแรงและเกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคในทุกกลุ่มอายุมากกว่าชนิดบี และซี ซึ่งพบว่าระบาดเฉพาะในเด็ก และการระบาดครั้งใหญ่ๆ แต่ละครั้งล้วนมาจากการผันแปรทางแอนติเจนของชนิดเอทั้งสิ้น ในอดีตที่ผ่านมาไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดนั้นพบว่าการระบาดเริ่มต้นในเขตเอเชียและแปซิฟิค สำหรับประเทศไทย อัตราการป่วยของประชากรยังอยู่ในระดับสูง รายงานการเสียชีวิตจากไข้หวัดใหญ่ร้อยละ 0.02-0.04 (11) จึงได้มีการแยกเชื้อและแจ้งการระบาดตลอดเวลา โดยร่วมกับสถาบันวิจัยไวรัสและกองระบาดวิทยา ดังนั้นการดำเนินการเฝ้าระวังโรคโดยใกล้ชิด และการศึกษาทางห้อง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิบัติการ จึงมีบทบาทสำคัญ ที่ทำให้การควบคุมโรคดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อลดการแพร่กระจายของโรคภายในชุมชน

วัตถุประสงค์

1. จำแนกชนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีการแพร่ระบาด และรายงานผลในทางระบาดวิทยา

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรอลิรกนิวคลีรอไทด์ รดยการทำแผนที่รอลิรกนิวคลีรอไทด์ ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมการระบาดซึ่งอาจจะนำไปสู่การผลิตวัคซีนในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย