บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การจำแนกชนิด และลักษณะโครงสร้างของไวรัส

ไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เป็นไวรัส อาร์ เอน เอ สายเดี่ยว (negative sense, single-strand RNA) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 80-120 นาโนเมตร (Murphy et al., 1999) มีรูปร่างคล้ายวงกลม (spherical) และเปลือกหุ้ม (envelope) อยู่ในตระกูล *Orthomyxoviridae* สามารถจำแนกออกเป็น 3 ชนิด ตามลักษณะความแตกต่างของแอนติเจน (antigenic type) ได้แก่ ชนิด A B และ C โดยไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ชนิด A (type A) สามารถพบได้ในคน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและสัตว์ปีก ไวรัสชนิด B พบได้เฉพาะในคนเท่านั้น ในขณะที่ไวรัสชนิด C สามารถพบได้ในคนและสุกร

ลักษณะและรูปร่างโดยทั่วไปของไวรัส บริเวณเปลือกหุ้มจะประกอบด้วยไกลโคโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิด คือ ไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin) มีลักษณะรูปทรงแท่ง (rod shaped trimer) และไกลโคโปรตีนนิวรามินิเดส (neuraminidase) ลักษณะรูปร่างคล้ายเห็ด (mushroom shaped trimer) เชื้อไวรัสจะใช้ส่วนไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินในการจับกับกรดซัยอะลิค (sialic acid) บนรีเซฟเตอร์ของเซลล์ผู้ถูกอาศัย แล้วเกิดขบวนการเอนโดไซโตซิส (endocytosis) เข้าสู่เซลล์และมีคุณสมบัติในการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง ไกลโคโปรตีนนิวรามินิเดสเป็นโปรตีนที่มีเอนไซม์ซัยอะลิเดส (sialidase enzyme) เพื่อทำหน้าที่ในการย่อยสารเมือกที่ปกคลุมอยู่บนเยื่อบุทางเดินหายใจและช่วยในการยึดเกาะและการย่อยสลายเยื่อหุ้มของเซลล์ผู้ถูกอาศัยในกระบวนการปลดปล่อยเชื้อไวรัสออกสู่ภายนอกเซล์ผู้ถูกอาศัย ภายในอนุภาคของไวรัสประกอบด้วยแกนกลางเป็นไรโบนิวคลิโอโปรตีน (ribonucleoproteins, RNPs) จำนวน 8 ท่อน (segments) สำหรับใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน 10 ชนิดดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยภายในแต่ละท่อนจะประกอบด้วยรหัสพันธุกรรม ของไวรัส 1 ชิ้น นอกจากนั้นภายในอนุภาคของไวรัสยังประกอบด้วยอาร์เอ็นเอ โพลิเมอร์เรส คอมเพลกซ์ (RNA polymerase complex) และนิวคลิโอโปรตีน (nucleoprotein, NP) โดยพบว่า อาร์เอ็นเอ โพลิเมอร์เรส คอมเพลกซ์ เป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด คือ พีเอ โพลีเมอร์เรส (PA polymerase, PA), พีบี 1 โพลีเมอร์เรส (PB1 polymerase, PB1) และ พีบี 2 โพลีเมอร์เรส (PB2 polymerase, PB2) อนุภาคของไวรัส 1 โมเลกุลจะประกอบด้วย อาร์เอ็นเอ โพลิเมอร์เรส คอมเพลกซ์ ประมาณ 30-60 ชุด และไรโบนิวคลิโอโปรตีนทั้งหมดจะบรรจุอยู่ภายในชั้นของเมทริกซ์โปรตีน (matrix, M) ล้อมรอบด้วยโครงสร้างที่เป็นเปลือกหุ้ม (envelopes) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยชั้นไขมันฟอสโฟลิปิด และไกลโคโปรตีน (Portela and Digard, 2002)

ไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด A สามารถจำแนกเป็นกลุ่มย่อย (subtype) โดยอาศัยความแตกต่างและการเข้าคู่กันของไกลโคโปรตีนนิวรามินิเดสและนิวรามินิเดสที่ปรากฏบนเปลือกหุ้มไวรัส ปัจจุบันสามารถจำแนกไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส ได้ทั้งหมด 16 (H1-16) และ 9 (N1-9) กลุ่มย่อยตามลำดับ (Fouchier et al., 2005)

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบและคุณสมบัติของ Influenza A virus genome RNA segments (Lamb and Krug, 2001)

segment	Encoded polypeptide	น้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ	หน้าที่
1	PB1	86,500	ส่วนประกอบของ RNA transcriptase และ replication complex
2	PB2	85,700	ส่วนประกอบของ RNA transcriptase complex
3	PA	84,200	ส่วนประกอบของ RNA transcriptase และ replication complex
4	HA	61,468	เป็นไกลโคโปรตีนหลักบนผิวของไวรัส ทำหน้าที่ในการจับและแทรกเข้าสู่เซลล์โฮสต์ เป็นแอนติเจนที่สำคัญ
5	NP	56,101	เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน mRNA เป็น template RNA ในกระบวนการสังเคราะห์ RNA
6	NA	50,087	เป็นไกลโคโปรตีนบนผิวของไวรัส ทำหน้าที่เกี่ยวกับการปลดปล่อยเชื้อไวรัสออกจากเซลล์โฮสต์ และเป็นแอนติเจนที่สำคัญ
7	M1	27,801	ทำหน้าที่ร่วมกับ RNPs and NS2
	M2	11,010	เกี่ยวกับการแลกเปลี่ยนอิออน
8	NS1	26,815	ลดการตอบสนองของ interferon
	NS2	14,216	เกี่ยวข้องกับการส่ง RNPs ออกจากนิวเคลียส

2.2 การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัส

การผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) เป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสภายในรหัสพันธุกรรม ส่งผลทำให้แอนติเจนอันเป็นผลผลิตจากการแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมี 2 แบบ คือ

แอนติจีนิก ดริฟ (Antigenic drift) เป็นการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนเพียงเล็กน้อย สามารถพบได้ในไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ทุกชนิด แต่ไม่เพียงพอที่จะเกิดไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดสกลุ่มย่อยใหม่ แอนติจีนิก ดริฟ อาจทำให้เกิดการระบาดของไวรัสได้ในวงจำกัด กลไกการเกิดแอนติจีนิก ดริฟ เชื่อว่าเกิดจากขบวนการผ่าเหล่าเฉพาะตำแหน่ง (point mutation) ได้แก่ การแทนที่ของกรดอะมิโนบางตัว (substitution) การขาดหายไปของกรดอะมิโน (deletion) และการแทรกเพิ่มเติมด้วยกรดอะมิโนตัวใหม่ (insertion) ภายในจีโนมของไวรัส (Wright and Webster, 2001) เนื่องจากไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา มีเอนไซม์ อาร์ เอ็น เอ โพลิเมอร์เรส (RNA polymerase) ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบความผิดพลาดของการจำลองรหัสพันธุกรรม (proof-reading activity) ความผิดพลาดดังกล่าวสามารถพบได้ในอัตรา $1/10^4$ เบส (bases) ในแต่ละวงรอบของกระบวนการจำลองรหัสพันธุกรรม (replication cycle) จากอัตราความผิดพลาดนี้สามารถก่อให้เกิดไวรัสชนิดใหม่เกิดขึ้นมากมาย แต่จะมีไวรัสบางอนุภาคเท่านั้นที่จะสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนต่อไปได้ (Easterday et al., 1997)

แอนติจีนิก ชิฟ (Antigenic shift) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงของไวรัสส่งผลให้มีความสามารถในการก่อโรคที่มีความรุนแรงมากขึ้น รวมทั้งการพัฒนาความสามารถในการแพร่กระจายและการก่อโรคของไวรัสไปสู่สัตว์ชนิดอื่นๆ กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ร่วมกันตั้งแต่ 2 สายพันธุ์ (strains) ขึ้นไปในสัตว์ตัวเดียวกัน ส่งผลให้ไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ชนิดใหม่มีความสามารถในก่อโรคและการติดเชื้อเข้าสู่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่นๆ ได้ง่ายขึ้น โดย เฉพาะการติดเชื้อและก่อโรคในมนุษย์ (Brown, 2001)

2.3 คุณสมบัติทางกายภาพของไวรัส

โดยทั่วไปไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เป็นเชื้อโรคที่สามารถถูกทำลายได้โดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และปัจจัยทางกายภาพต่างๆ เช่น ความร้อน ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความแห้ง แต่ทั้งนี้ไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา สามารถมีชีวิตอยู่ในสภาวะอากาศเย็นและชื้นได้นานถึง 105 วัน เชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนในอุจจาระ สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 30-35 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เชื้อไวรัสมีชีวิตอยู่ได้นาน 7 วัน (Swayne and Halvorson, 2002) ในกรณีที่มีการปนเปื้อนของไวรัสในน้ำที่มีอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส พบว่าไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 4 วัน และอาจนานกว่า 30 วัน เมื่ออยู่ในน้ำอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ความเค็มและความเป็นกรด-ด่าง มีผลต่อการเจริญของไวรัส เนื่องจากไวรัสมีเปลือกหุ้มที่ประกอบด้วยชั้น

ฟอสโฟลิปิด (Stallknecht et al., 1990) สารละลายอินทรีย์และสารซักฟอก เช่น โซเดียม ดีออกซีคลอเรต (sodium deoxycholate) จึงสามารถทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ได้ การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มต่างๆ ได้แก่ ฟีนอลิค (phenolics) แอมโมเนียมไอออน (ammonium ions) สารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) กรด (dilute acids) และไฮดรอกซีลามาย (hydroxylamine) สามารถทำลายไวรัสได้เช่นเดียวกัน (Swayne and Halvorson, 2002) Suarez และคณะ (2003) พบว่าภายหลังจากการฆ่าเชื้อไวรัสด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มฟีนอล และสารประกอบควอเทอร์นารี แอมโมเนียม (quaternary ammonium compound) ยังคงสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสโดยวิธีเรียลไทม์ อาร์ที พีซีอาร์ (realtime RT-PCR) แต่ไม่สามารถเพาะแยกไวรัสและไม่พบการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในตัวอย่างที่ได้รับไวรัสที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีดังกล่าว นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้สารเคมีต่างๆ เช่น อัลดีไฮด์ (aldehyde) เบตาโปรปริโอแลคโตน (beta-propriolactone) (Davison et al., 1999 และ Lu et al., 2003) และไบนารี เอทธีลินีมีน (binary ethylenimine) (King, 1991) สามารถใช้ในการลดฤทธิ์ของไวรัสได้ โดยไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส ยังคงมีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนได้เป็นเวลานาน ในขณะที่ไวรัสไม่มีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดติดเชื้อในสิ่งมีชีวิต

2.4 การติดต่อและแพร่กระจายของไวรัส

การติดต่อของเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ระหว่างสัตว์ปีกชนิดต่างๆ สามารถเกิดขึ้นได้โดยการสัมผัสกับสัตว์ปีกที่ป่วยหรือมีเชื้อไวรัสอยู่ในร่างกายโดยตรง หรือการสัมผัสกับอากาศ น้ำดื่มและอาหาร รวมทั้งวัสดุอุปกรณ์การเลี้ยงที่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสหรืออุจจาระของสัตว์ป่วย (Webster et al., 1992) การติดต่อของเชื้อไวรัสระหว่างสัตว์ปีกกับสัตว์ปีกโดยตรง พบว่ามีความสัมพันธ์กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อไวรัส ชนิดและสายพันธุ์ของสัตว์ปีก รวมทั้งอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม (Alexander et al., 1986) นอกจากการติดต่อระหว่างสัตว์ปีกด้วยกันแล้ว ยังมีรายงานการตรวจพบไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 ในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น หนู (mouse) แฮมสเตอร์ (hamsters) เฟอร์เรต (ferrets) สุนัข หมู แมว เสือโคร่งและเสือดาว (Choi et al., 2005; Gavorkova et al., 2005; Keawcharoen et al., 2004; Songserm et al., 2006) การติดเชื้อไวรัสในสัตว์ดังกล่าว อาจเกิดจากการติดต่อโดยตรงระหว่างสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยกันเองหรือการติดต่อทางอ้อมกับสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักมีสาเหตุจากการกินสัตว์ปีก เช่น ไก่หรือนกพิราบที่ติดเชื้อไวรัส (Keawcharoen et al., 2004; Songserm et al., 2006) ในบางครั้งอาจพบว่าสามารถเกิดการติดต่อทางอ้อมจากการสัมผัสกับน้ำดื่ม อาหาร และวัสดุอุปกรณ์การเลี้ยงที่ปนเปื้อนไวรัสจากสิ่งคัดหลั่ง น้ำลาย หรือสิ่งขับถ่าย โดยโอกาสในการติดเชื้อจากสิ่งดังกล่าวขึ้นกับปริมาณของไวรัสที่ปนเปื้อนมากับสิ่งดังกล่าว (Thanawongnuwech et al., 2005)

นอกจากนั้นยังมีรายงานว่านกป่า หรือนกในธรรมชาติหลายชนิด โดยเฉพาะนกน้ำในกลุ่มเป็ด ห่าน และนกนางนวล มีความสามารถในการเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ เนื่องจากสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิด เอ ได้ทุกกลุ่มย่อย (H1-16 และ N1-9) โดยสัตว์ดังกล่าวที่ติดเชื้อไวรัสอาจไม่แสดงอาการป่วยหรือการเกิดโรคปรากฏให้เห็น แต่เชื้อไวรัสยังสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและขับออกมาทางสิ่งขับถ่าย ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการติดต่อและแพร่กระจายสู่สัตว์ปีกชนิดอื่นๆในธรรมชาติ หรือสัตว์ที่หากินและใช้แหล่งที่อยู่อาศัยร่วมกับสัตว์ปีกกลุ่มดังกล่าว (Fouchier et al., 2003; Stephenson et al., 2004)

2.5 การก่อโรคของไวรัส

การก่อโรคของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา มีความสัมพันธ์กับชนิดของฮีแมกกลูตินิน เชื้อไวรัสที่มีความสามารถในการก่อโรคชนิดรุนแรงมักปรากฏอยู่ในกลุ่มย่อยเอช 5 (H5) และเอช 7 (H7) (Easterday et al., 1997) แต่ในการเกิดโรคในธรรมชาติมักพบว่าไวรัสชนิดที่ไม่ก่อโรครุนแรงสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมให้มีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มสูงขึ้นได้ (Ito et al., 2001) โดยความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงในส่วนของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินิน เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วย ตำแหน่งสำหรับจับกับตัวรับบนเซลล์โฮสต์ ตำแหน่งของแอนติเจนต่างๆ และตำแหน่งโปรติโอไลติก คลิเวจ ไซต์ (proteolytic cleavage sites) ซึ่งโดยทั่วไปจะปรากฏกรดอะมิโนอาร์จีนิน (arginine) และไลซีน (lysine) (Suarez et al., 2004) ความรุนแรงในการก่อโรคที่เปลี่ยนไปเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงของการจับกันระหว่างไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับตัวรับที่มีความจำเพาะของเซลล์โฮสต์บนตำแหน่งไกลโคซิเลชัน (glycosylation site) หรือมีสาเหตุเกิดจากการแทรกตัวของกรดอะมิโนบางตัว (insertion of basic amino acid) เช่น พิวรีน (purine) ลงไปบนโปรติโอลัยติก คลีเวจ ไซต์ ส่งผลต่อความสามารถในการแบ่งตัวของไวรัสเพิ่มขึ้นและทำให้ระดับความรุนแรงในการก่อโรคสูงขึ้น เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์โฮสต์ (endogenous proteases) เช่น ฟิวรีน (furin) และ พีซี6 (PC6) บนตำแหน่งดังกล่าวมีอัตราเพิ่มสูงขึ้น (Perdue and Suarez, 2000) นอกจากนั้นไวรัสที่ก่อโรครุนแรงมักมีกรดอะมิโนอาร์จีนินและไลซีนบนโปรติโอลัยติก คลีเวจ ไซต์ จำนวนมาก ทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์โฮสต์สามารถทำปฏิกิริยาในตำแหน่งดังกล่าวได้มากขึ้นและส่งผลให้สัตว์ปีกที่ติดเชื้อเกิดอาการป่วยรุนแรง ในขณะที่ไวรัสชนิดไม่รุนแรงจะมีจำนวนของกรดอะมิโนบนตำแหน่งโปรติโอ-ลัยติก คลีเวจ ไซต์ น้อยกว่าไวรัสที่ก่อโรครุนแรง และไวรัสชนิดไม่รุนแรงจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่มีลักษณะคล้ายทริปซิน (trypsin-like protease) เพื่อจับกับกรดอะมิโนบนตำแหน่งโปรติโอลัยติก คลีเวจ ไซต์ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวพบได้เฉพาะภายในเซลล์ของท่อระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร ส่งผลให้การก่อโรคจำกัดอยู่เฉพาะอวัยวะภายในระบบดังกล่าวเท่านั้น (Steinhauer, 1999)

การแสดงอาการป่วยของโรคติดเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ในสัตว์ปีก พบว่ามีความสัมพันธ์กับชนิดและสายพันธุ์ของสัตว์ปีก ความรุนแรงของเชื้อไวรัส และปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุของสัตว์ปีก การติดเชื้อแทรกซ้อน ระดับภูมิคุ้มของสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ ทางที่สัตว์ได้รับเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกาย ปริมาณของเชื้อและระยะเวลาที่ได้รับเชื้อ รวมทั้งปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น อุณหภูมิและสิ่งแวดล้อมที่ทำให้เกิดความเครียด การเกิดโรคในสัตว์ปีกได้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามความรุนแรงหลังจากติดเชื้อ (OIE, 2006) ได้แก่

1. ชนิดอ่อนหรือไม่รุนแรง (apathogenic or mildly pathogenicity avian influenza, MPAI หรือ low pathogenicity avian influenza , LPAI) ส่วนใหญ่มักพบในนกอพยพตระกูลเป็ด โดยสัตว์ปีกที่ได้รับไวรัสมักไม่แสดงอาการป่วยใดๆ แต่ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนและขับไวรัสปนเปื้อนออกมากับอุจจาระของสัตว์ปีกและสามารถแพร่กระจายไวรัสไปสู่สัตว์ชนิดอื่น รวมทั้งมีการตกค้างของไวรัสในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในแหล่งน้ำ ไก่หรือไก่งวงที่ได้รับเชื้อ อาจแสดงอาการผิดปกติในระบบทางเดินหายใจอย่างอ่อน เช่น ซึม กินอาหารลดลง มีสิ่งคัดหลั่งในช่องจมูก จาม และผลผลิตไข่ลดลง (Swayne and Halvorson, 2003)

2. ชนิดรุนแรงมาก (Highly Pathogenic Avian Influenza, HPAI) การติดเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง โดยทั่วไปจะมีระยะฟักตัวของโรคประมาณ 1-3 วัน และอาจมีอัตราการตายสูงถึง 100 % สัตว์ปีกที่ตายมักพบอาการหน้าบวม หงอนและเหนียงมีสีม่วงคล้ำ มีจุดเลือดออกบริเวณผิวของหน้าแข้ง น้ำตาไหล ไซนัสบวม หายใจลำบาก และอาจพบอาการของระบบประสาทและท้องเสียร่วมด้วย รอยโรคที่ปรากฏในสัตว์ตายขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการเกิดโรค โดยทั่วไปจะพบว่าซากมีลักษณะผอมแห้ง มีการบวมน้ำใต้ผิวหนังที่ส่วนหัวและคอ เยื่อบุตาอักเสบบวมแดง หลอดลมและถุงลมอักเสบ ไตบวมแดง ลำไส้อักเสบ อาจพบจุดเนื้อตายที่ตับ ม้ามและไต รวมทั้งพบจุดเลือดออกทั่วไป รังไข่อักเสบและไข่แดงแตกในช่องท้อง การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาส่วนใหญ่มักพบในไก่งวงและไก่ โดยมีรายงานพบว่าไก่งวงมีความไวในการแสดงอาการและมีอัตราการตายที่สูงกว่าไก่ (Easterday et al., 1997; Swayne and Halvorson, 2003) ในขณะที่อัตราการติดเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ในเป็ด ซึ่งพบว่ามีอัตราที่สูงกว่าในไก่งวงและไก่ แต่เป็ดมักไม่แสดงอาการป่วยที่ชัดเจนหรือแสดงอาการแบบอ่อนๆ (Chen et al., 2004) แม้ว่าได้รับไวรัสชนิดที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง เมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงในการเกิดโรคในสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ เช่น ห่าน นกอีมู และนกพิราบ Perkins และ Swayne (2002) พบว่านกอีมูและห่านมีความไวในการเกิดโรค รวมทั้งสามารถแสดงอาการของโรคได้รุนแรงกว่าการติดเชื้อในเป็ดและนกพิราบ

ในปัจจุบันสามารถจำแนกไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ชนิดที่มีความสามารถในการก่อโรครุนแรง (HPAI) ตามหลักของ Office of International des epizooties (OIE) (2000) ได้ดังนี้

1) ไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ที่สามารถทำให้ไก่ทดลองอายุ 4-6 สัปดาห์ จำนวน 8 ตัว ที่ได้รับเชื้อ (infective allantoic fluid ที่เจือจาง 1/10 จำนวน 0.2 มล) โดยการฉีดเข้าเส้นเลือดดำ ก่อให้เกิดการตายอย่างน้อย 6 ตัว ภายใน 10 วัน (มีค่า intravenous pathogenicity index (IVPI) มากกว่า 1.2 หรือมีอัตราการตายอย่างน้อย 75%)

2) ไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ชนิด เอช 5 (H5) และเอช 7 (H7) ที่มีค่า IVPI ต่ำกว่า 1.2 หรือมีอัตราการตายต่ำกว่า 75% แต่มีการจัดเรียงตัวของ multiple basic amino acid (arginine หรือ lysine) บนตำแหน่ง hemagglutinin cleavage แสดงว่าเป็นไวรัสชนิดรุนแรง

2.6 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายสัตว์ปีกต่อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา

การกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา จากการติดเชื้อไวรัสในธรรมชาติหรือการได้รับวัคซีนชนิดต่าง ๆ เช่น วัคซีนเชื้อตายในสื่อน้ำมัน (inactivated oil-base whole virus) วัคซีนที่ใช้ตัวกลางในการนำส่งไวรัส (vectored virus) วัคซีนที่ผลิตจากโปรตีนจำเพาะ (subunit proteins) วัคซีนที่เตรียมจากดีเอ็นเอของไวรัส (DNA vaccine) และวัคซีนที่เตรียมจากไวรัสที่ผ่านการดัดแปลงทางพันธุกรรม (reverse genetic vaccines) (Tian et al., 2005) ก่อให้เกิดการทำงานร่วมกันของระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ คือ ระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity, CMI) และระบบภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (humoral immunity, HMI) โดยภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำจะทำหน้าที่ในการจับแอนติเจนที่มีความจำเพาะบนไวรัส ซึ่งช่วยลดปริมาณไวรัสในกระแสเลือด ลดการแพร่กระจายของไวรัสภายในร่างกายและช่วยขับไวรัสออกจากร่างกายผ่านทางสิ่งคัดหลั่งหรืออุจจาระ ซึ่งแอนติบอดีที่สำคัญดังกล่าว ได้แก่ IgG IgM และ IgA (Abbas et al., 2000; Janeway and Trevors, 1994) ขณะที่การทำงานของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ ทำหน้าที่ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและยับยั้งการเจริญของไวรัสผ่านการทำงานของ Cytotoxic T-lymphocyte ($CD8^+$) (Hilleman, 2002)

การสร้างนิวทรัลไลซิง แอนติบอดี (neutralizing antibody) สำหรับป้องกันการติดเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ในสัตว์ปีก มีความสัมพันธ์กับชนิดของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของไวรัส โดยเฉพาะโปรตีนที่อยู่บนเปลือกหุ้มของไวรัส (surface proteins) ซึ่งประกอบด้วยไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส (Swayne and Halvorson, 2003) แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนดังกล่าวมีหน้าที่หลักในการต่อต้านการติดเชื้อไวรัสและป้องกันไม่ให้ไวรัสก่อโรคในร่างกายสัตว์ (Swayne et al., 1998) โดยความสามารถดังกล่าวมีความความจำเพาะอย่างสูงระหว่างชนิดของแอนติบอดีและกลุ่มย่อยของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไวรัส (Kodihalli et al., 1997) Smirnov และคณะ (2001) พบว่าการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีด้วยไวรัสสายพันธุ์อเมริกัน (American lineage) และได้รับการให้เชื้อพิษ (challenge) ด้วยสายพันธุ์เดียวกันสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ในระดับ 94.4 – 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อได้รับเชื้อพิษต่างสายพันธุ์กัน

(Eurasian lineage) จะสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ในระดับ 50.0 - 55.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าไวรัส แม้อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน (H5) แต่เมื่อมีความแตกต่างในการแสดงออกของพันธุกรรม (different phylogenetic lineage) ก็ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีที่สามารถป้องกันการเกิดโรคข้ามสายพันธุ์ (cross-protection) ได้อย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากลักษณะความแตกต่างของกรดอะมิโนที่ปรากฏอยู่บนโครงสร้างของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (Hoffmann et al., 2005)

นิวคลิโอโปรตีน และ M1 protein เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลของไวรัสทุกกลุ่มย่อยและสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในการสร้างแอนติบอดีได้ เช่นเดียวกับไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวอยู่ภายในโมเลกุลของไวรัสจึงส่งผลให้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนทั้งสองชนิดไม่สามารถต่อต้านและทำลายไวรัสที่แพร่กระจายอยู่ภายในร่างกายได้โดยตรง (Suarez and Schultz-Cherry, 2000; Tollis and Trani, 2002) แต่โปรตีนดังกล่าวยังคงสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) ได้ โดยสามารถเหนี่ยวนำให้ cytotoxic-T lymphocytes เกิดการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสและมีส่วนร่วมในการขจัดไวรัสออกจากร่างกาย และ cytotoxic-T lymphocytes ที่ได้รับการกระตุ้นการทำงานจากไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ต่างกลุ่มย่อย สามารถชักนำให้ cytotoxic-T lymphocytes เกิดการตอบสนองต่อไวรัสต่างกลุ่มย่อยอื่นๆและส่งผลให้ความรุนแรงในการเกิดโรคลดลง และป้องกันไม่ให้เกิดการตายในไก่ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการปล่อยเชื้อไวรัสออกจากร่างกาย (Seo and Webster, 2001) การตอบสนองของ cytotoxic-T lymphocytes นี้ นอกจากจะเกิดจากการกระตุ้นของนิวคลิโอโปรตีน และโปรตีน M1 แล้ว อาจเกิดจากโปรตีนชนิดอื่นๆ เช่น พีเอ โพลีเมอร์เรส (PA) พีบี 1 โพลีเมอร์เรส (PB1) และ พีบี 2 โพลีเมอร์เรส (PB2) ได้เช่นกัน (Jameson et al., 1998)

2.7 วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ในสัตว์ปีก

การควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ชนิดที่มีความสามารถในการก่อโรคแบบรุนแรง (HPAI) โดยทั่วไปจะต้องใช้มาตรการกำจัดและทำลายฝูงสัตว์ที่เกิดโรคระบาด (Halvorson, 2002) แต่ในบางพื้นที่อาจมีความจำเป็นต้องใช้มาตรการเกี่ยวกับการให้วัคซีนในสัตว์ปีกร่วมด้วย ซึ่งโดยทั่วไปการใช้วัคซีน สามารถป้องกันการเกิดโรค ลดอัตราการตาย ลดการปล่อยเชื้อไวรัสและเพิ่มความทนทานต่อการติดเชื้อไวรัส (Capua et al., 2004) อย่างไรก็ตาม การใช้วัคซีนในการป้องกันโรคอาจไม่ประสบผลสำเร็จในการกำจัดโรคออกไปจากพื้นที่ระบาด เนื่องจากพบว่าเชื้อไวรัสยังคงมีสามารถในการเจริญและเพิ่มจำนวนในสัตว์ปีกที่ได้รับวัคซีน และปล่อยเชื้อไวรัสออกมาสู่ธรรมชาติได้ (Capua and Marangon, 2004; Swayne et al., 2006)

ในปัจจุบันวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา แบ่งเป็น 3 กลุ่ม (Capua and Marangon, 2003) ได้แก่

1. inactivated homologous vaccines คือ วัคซีนที่เตรียมจากไวรัสที่มีคุณลักษณะเหมือนกับไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ (autogenous vaccine) ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคได้เป็นอย่างดี แต่อาจก่อให้เกิดปัญหาในการวินิจฉัยความแตกต่างระหว่างไวรัสที่ก่อโรคและไวรัสที่อยู่ในวัคซีน (Halvorson, 2002; Suarez and Schultz-Cherry, 2000)

2. inactivated heterologous vaccines เป็นวัคซีนที่เตรียมขึ้นมาจากไวรัสที่มีไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินอยู่ในกลุ่มย่อย (subtype) เดียวกันกับไวรัสในพื้นที่ แต่มีความแตกต่างของไกลโคโปรตีนนิวรามินิเดส (heterologous neuraminidase) การใช้วัคซีนที่เตรียมจากไวรัสที่มีไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสพิษ สามารถป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ปีกที่ได้รับวัคซีนดังกล่าว โดยสัตว์ไม่แสดงอาการป่วยและไม่พบการตายเกิดขึ้น ในขณะที่สัตว์ที่ได้รับวัคซีนซึ่งเตรียมจากไวรัสที่มีไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินต่างชนิดกันจะปรากฏอาการป่วยให้เห็นถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการตาย 90 เปอร์เซ็นต์ (Lee et al., 2004; ; Middleton et al, 2007; Swayne et al., 2000 ; Swaye et al., 2006)

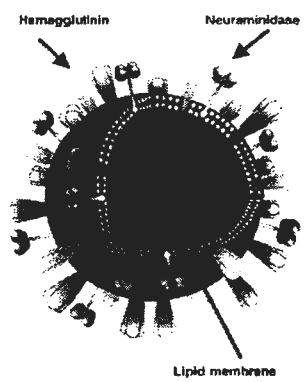
3. recombinant หรือ genetic vaccines นอกจากวัคซีนที่เตรียมจากไวรัสโดยตรงแล้ว ปัจจุบันมีการพัฒนาวัคซีนด้วยเทคนิคทางด้านพันธุกรรม ได้แก่ baculovirus-derived hemag glutinin protein vaccine (Gao et al., 2006; Swayne et al., 2000) recombinant fowl-poxvirus vaccine (Qiao et al., 2003; Swayne et al., 2000) infectious laryngotracheitis virus recombinant (Kodihalli et al., 1997; Luschow et al., 2001) ซึ่งพบว่าวัคซีนยังคงความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อและการเกิดโรคในสัตว์ปีกได้เช่นเดียวกับไวรัสทั่วไป (Webster et al., 1991) ความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคนอกจากเกี่ยวข้องกับกลุ่มย่อยของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินแล้ว ยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับลำดับของกรดอะมิโนบนโปรตีนเอชเอ 1 (HA 1) (Swayne et al., 2000; Swayne et al., 2006) และปริมาณของแอนติเจนที่บรรจุอยู่ในวัคซีนด้วย (Swayne at al., 1999)

2.8 อินฟลูเอ็นซาไวโรโซม (Influenza virosomes)

Influenza virosomes เป็นอนุภาคที่เกิดจากการจัดเรียงโปรตีนที่อยู่บนโครงสร้างของเปลือกหุ้มไวรัส (viral envelopes) เกิดเป็นโครงสร้างใหม่ของไวรัสที่มีรูปร่างและส่วนประกอบใกล้เคียงกับไวรัสต้นแบบ (Almeida et al., 1975) ยกเว้นส่วนประกอบของนิวคลิโอโปรตีนและสารพันธุกรรม (Huckrieda et al., 2003) โดยทั่วไปไวโรโซมมีรูปร่างกลมมน (unilamellar vesicles) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางสูงสุดไม่เกิน 150 นาโนเมตร และปรากฏส่วนที่ยื่นออกมาจากผิวของเปลือกหุ้ม ซึ่งประกอบด้วยไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส (Gluck and Metcalfe, 2003) เป็นผลให้อนุภาคดังกล่าวยังคงมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

การหลอมรวม และการเข้าสู่ภายในไซโตพลาสมของเซลล์ (cell fusion) แต่ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในเซลล์โฮสต์ (Gluck and Metcalfe, 2002)

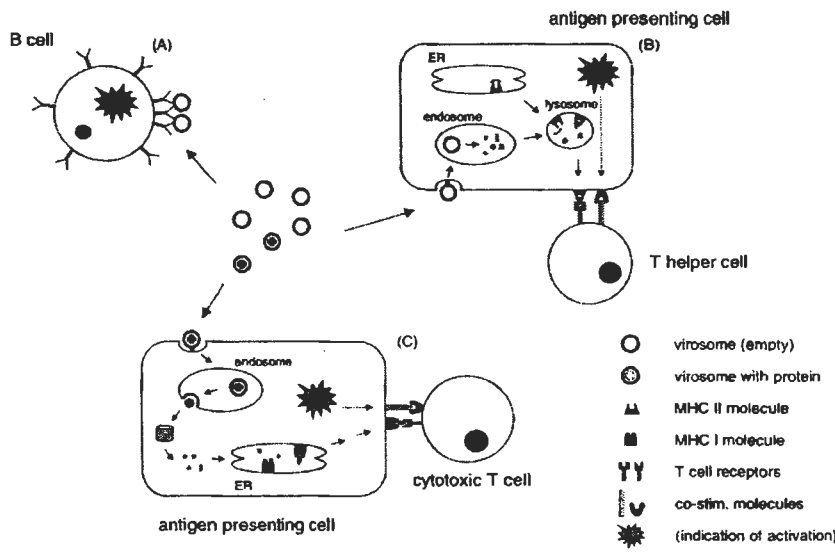
กระบวนการเตรียมไวโรโซมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น 1.) การละลายไขมันที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไวรัสด้วยการใช้พลังงาน เช่น การเขย่าด้วยความเร็วสูง หรือการใช้คลื่นความถี่สูงในการทำให้เซลล์แตก (sonicate) 2.) การละลายชั้นไขมันบริเวณเยื่อหุ้มโดยใช้สารละลายที่ไม่มีขั้วร่วมกับการใช้ตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม หรือ 3.) การเตรียมโดยการใช้สารซักฟอก (detergents) ในการละลายเยื่อหุ้มไวรัส (Kersten and Crommelin, 1995) สารซักฟอกที่ใช้มีหลายชนิด ได้แก่ octaethyleneglycol mono-(n-dodecyl) ether หรือ octyl glycoside (Stegmann et al., 1987) โดยสารดังกล่าวจะทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการแยกโครงสร้างของเยื่อหุ้มไวรัสในส่วนที่เป็นน้ำมันและส่วนที่เป็น viral capsid ซึ่งมีสารพันธุกรรมออกจากกัน หลังจากนั้นจึงแยก viral capsid ออกมาจากสารผสมด้วยวิธีการปั่นด้วยแรงเหวี่ยงและกำจัดสารซักฟอกออกด้วยตัวดูดซับ เช่น BioBead SM2 (Bron et al., 1993) ในระหว่างที่มีการแยกสารซักฟอกออกจากสารผสมจะเกิดการจัดเรียงตัวของโปรตีนและโครงสร้างของเยื่อหุ้มของไวรัสเป็นอนุภาคของไวโรโซม นอกจากนั้นยังสามารถใช้สาร Triton X-100 ในการเตรียมไวโรโซมได้เช่นเดียวกัน (Homhuan et al., 2004)



รูปที่ 1. รูปภาพแสดงลักษณะโครงสร้างของไวโรโซม. ที่มา: Th. Wyler, Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland. (Zurbriggen, 2003)

2.9 ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไวโรโซม

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายมีความสัมพันธ์กับปริมาณของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (HA) ที่แทรกอยู่ระหว่างชั้นของเยื่อหุ้มไวรัส โดยหน่วยย่อย HA_1 และ HA_2 ของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน เป็นส่วนที่ตอบสนองต่อการหลอมรวมกับเยื่อหุ้มของเซลล์โฮสต์ และการจับกับตัวรับบน antigen presenting cells เช่น macrophages หรือ lymphocytes ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Zurbriggen, 2003) โดยแอนติเจนที่ติดอยู่บนผิวของไวโรโซมจะกระตุ้นการทำงานของตัวรับในกลุ่ม MHC class II (ภาพที่ 2) ในขณะที่แอนติเจนที่แทรกอยู่ภายในอนุภาคของไวโรโซมจะมีผลต่อการทำงานของตัวรับในกลุ่ม MHC class I เป็นผลให้ไวโรโซมสามารถกระตุ้นการทำงาน cytotoxic-T lymphocytes (Bungener et al., 2002) ร่วมกับการกระตุ้นการทำงานของ helper-T lymphocytes (Schumacher et al., 2004)



รูปที่ 2. แผนภาพแสดงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการได้รับไวโรโซม ประกอบด้วย ความสามารถในการจับกับ Ig receptor บนผิวของ B cell (A) การกระตุ้นการทำงานของ antigen presenting cell ผ่านทาง MHC class II (B) และการกระตุ้นการทำงานของ antigen presenting cell ผ่าน MHC class I (C) ซึ่งการทำงานดังกล่าวสามารถกระตุ้นการทำงานของ T helper cells and CTLs. (Huckrieda et al., 2003)

2.10 การพัฒนาวัคซีนไวโรโซมเพื่อป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ปีก

Kapczynski และ Tumpey (2003) พัฒนาวัคซีนไวโรโซมที่เตรียมจากไวรัสนิวคาสเซิลที่มีคุณลักษณะคล้ายคลึงกับไวรัสต้นแบบ โดยยังคงส่วนประกอบของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส รวมทั้งโปรตีนสำหรับการหลอมรวม (fusion protein) เมื่อทดลองให้วัคซีนไวโรโซมผ่านทางจมูกและทางหลอดลม พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีและป้องกันการตายภายหลังจากการป้อนเชื้อพิษได้เช่นเดียวกับวัคซีนเชื้อเป็น ส่วนการให้วัคซีนไวโรโซมนิวคาสเซิลโดยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous immunization) พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีและป้องกันไม่ให้ไก่ที่ได้รับการป้อนเชื้อพิษแสดงอาการป่วยด้วยโรคนิวคาสเซิลได้เช่นเดียวกัน และความสามารถในการป้องกันโรคจะแปรผันตรงกับปริมาณแอนติเจนที่อยู่ภายในวัคซีนไวโรโซม (Homhuan et al., 2004)

Kapczynski (2004) ได้เตรียมวัคซีนไวโรโซมจากเมตานิวโมไวรัส (metapneumovirus) สำหรับป้องกันการติดเชื้อในไก่งวง พบว่าการให้วัคซีนไวโรโซมโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและการหยอดจมูก สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี และลดการแสดงอาการป่วยของไก่งวงได้ การให้วัคซีนไวโรโซมโดยการหยอดจมูกสามารถลดการแสดงอาการป่วยได้ดีกว่าการให้ด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ