หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

โรคไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza) เกิดจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร (swine influenza virus) เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน (acute respiratory disease) ในสุกรทุกช่วงอายุ และส่งผลกระทบต่อการสูญเสียด้านเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรโดยเฉพาะในสุกรหลังหย่านม ทำให้สุกรสูญเสียน้ำหนักในช่วงที่แสดงอาการ และทำให้ระยะเวลาในการขุนสุกรนานขึ้น ในสุกรตั้งท้องอาจทำให้แท้งได้ นอกจากนี้ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรยังเป็นเชื้อปฐมภูมิ (primary pathogen) ที่ทำให้สุกรสามารถติดเชื้อโรคแทรกซ้อนได้ง่าย ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุของโรคระบบทางเดินหายใจซับซ้อนหรือโรคพี อาร์ ดี ซี (porcine respiratory disease complex; PRDC) (Dee, 2005) โรคนี้เป็นปัญหาสำคัญต่อผู้เลี้ยงสุกรทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย

ปัจจุบันไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่มีรายงานพบการระบาดทั่วโลกมี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ไวรัสสายพันธุ์ H1N1 H3N2 และ H1N2 (Slemons, 2002; Dee, 2005) ทั้งนี้มีรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2461 ที่สหรัฐอเมริกา โดยพบสุกรจำนวนมากแสดงอาการคล้ายโรคไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์ ประกอบกับในช่วงเวลาดังกล่าวมีการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์อย่างรุนแรง และสามารถวินิจฉัยแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 (classical H1N1) ได้ในปี พ.ศ. 2473 (Webby et al., 2001; Richt et al., 2003) ต่อมามีรายงานการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นครั้งคราวและกระจายตามประเทศต่างๆ ทั่วโลก ทั้งไวรัสสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 จนกระทั่งเมื่อปี พ.ศ. 2518 จนถึงปัจจุบัน พบมีความถี่ในการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรมากขึ้นและกระจายไปตามพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก รวมทั้งในแถบทวีปเอเชีย และสามารถแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมได้มากขึ้น ซึ่งพบว่าเกิดจากการกลายพันธุ์และการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ทั้งสายพันธุ์ที่มาจากมนุษย์ สัตว์ปีก และสุกร (Slemons, 2002) โดยพบว่าสุกรมีส่วนรับ (receptor site) บนผิวเซลล์ที่เหมือนกับส่วนรับในมนุษย์และสัตว์ปีก ทำให้ไวรัสไข้หวัดใหญ่ของมนุษย์และสัตว์ปีกสามารถเข้าเซลล์ของสุกรได้ จึงมีโอกาสเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในเซลล์สุกรได้สูง โดยพบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีกจับส่วนรับบนผิวเซลล์ที่ตำแหน่ง N-acetylneuraminic acid-2,3-galactose ส่วนไวรัสไข้หวัดใหญ่มนุษย์จับส่วนรับบนผิวเซลล์ที่ตำแหน่ง N-

acetylneuraminic acid-2,6-galactose และบนผิวเซลล์ของสุกรมีส่วนรับทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าว (Heinen, 2003)

การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่มีความสำคัญต่อการอุบัติใหม่ของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในแต่ละครั้ง เนื่องจากสุกรไม่เคยสัมผัสกับไวรัสสายพันธุ์ที่อุบัติขึ้นใหม่ จึงไม่มีภูมิต้านทานที่จำเพาะต่อไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้ ทำให้เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่กระจายเป็นบริเวณกว้าง (pandemic) และอาจติดต่อไปยังสัตว์อื่นๆ ได้ สำหรับการอุบัติซ้ำของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรในท้องถิ่นต่างๆ มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์เดิมนั้น โดยเฉพาะการกลายพันธุ์ในส่วนของยีนฮีเมกกลูตินิน (haemagglutinin gene) ทำให้ไวรัสมีความแตกต่างจากเดิม (variation) ไวรัสจึงสามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของสุกรและสามารถจับกับส่วนรับบนผิวเซลล์เพื่อเข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลล์ของสุกรได้ (Heinen, 2003) ดังนั้นการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม รวมถึงการศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในท้องถิ่นต่างๆ จึงมีความสำคัญมาก เพื่อควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งในท้องถิ่นและพื้นที่อื่นๆ ทั่วโลก ในอดีตการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีสาเหตุจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ส่วนไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 พบเริ่มมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากมีรายงานพบการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 กระจายตามส่วนต่างๆ ทั่วโลกมากขึ้น และมีแนวโน้มว่าจะมีการระบาดแทนที่ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 (Marozin et al., 2002) พบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้จากสุกรในแถบทวีปอเมริกา มาจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างไวรัสสายพันธุ์ classical H1N1 และไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ที่เคยระบาดในสหรัฐอเมริกาเมื่อปี พ.ศ. 2541 (ไวรัสสายพันธุ์ H3N2 มาจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสสายพันธุ์ H3N2 จากมนุษย์ ไวรัสสายพันธุ์ H1N1 จากสุกร และไวรัสสายพันธุ์ H1N1 จากสัตว์ปีก) (Karasin et al., 2002; Richt et al., 2003) ซึ่งแตกต่างจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้ในแถบทวีปยุโรปและทวีปเอเชีย โดยพบว่ามาจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสสายพันธุ์ human H1N1 และไวรัสสายพันธุ์ human-like H3N2 (Spickler, 2004) การอุบัติใหม่ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ทั้งในแถบทวีปอเมริกา ทวีปยุโรป และทวีปเอเชีย ทำให้เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สุกรกระจายในประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยสุกรป่วยจะแสดงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันและแม่สุกรแท้งลูก ดังมีรายงานต่างๆ ดังนี้ จากรายงานการศึกษาของ Van Reeth และคณะ (2003) พบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้จากประเทศอังกฤษ ทำให้สุกรทดลองแสดงอาการหลังติดเชื้อ 24 ชั่วโมง โดยมีไข้ (อุณหภูมิเมื่อวัดทางทวารหนัก 40.6 องศาเซลเซียส) ซึม เบื่ออาหาร หายใจด้วยท้อง อัตราการหายใจเพิ่มขึ้น ส่วนที่สหรัฐอเมริกา Karasin และคณะ (2000) รายงานผลการเพาะแยกไวรัสสายพันธุ์ H1N2 ได้จาก

ฟาร์มที่มีการระบาดของโรคทางเดินหายใจในสุกรป่วยช่วงอายุ 6 สัปดาห์ขึ้นไป และจากฟาร์มสุกรแห่งหนึ่งที่มีแม่สุกรแท้งจำนวน 600 ตัว เมื่อเดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2542 ที่รัฐอินเดียนา และพบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้ในรัฐอินเดียนา รัฐอิลลินอยส์ รัฐมินนิโซต้า รัฐโอไฮโอ รัฐไอโอวา และรัฐคาโรไลนา ระหว่างปี พ.ศ. 2543-2544 มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนกับไวรัสสายพันธุ์ H1N2 ที่ระบาดในรัฐอินเดียนาเมื่อปลายปี พ.ศ. 2542 (Karasin et al., 2002) ส่วนในแถบทวีปเอเชีย Li และคณะ (2004) รายงานผลการสำรวจที่ประเทศจีนในปี พ.ศ. 2544 พบว่าสามารถเพาะแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ได้จากตัวอย่างป้ายจมูกสุกร 2 ตัวอย่าง จากสุกรที่ให้ผลบวกในการทดสอบทางซีรัมวิทยาต่อ H1 จำนวน 27 ตัวอย่าง จากสุกรทั้งหมด 951 ตัว และที่ประเทศเกาหลี Jung และคณะ (2005) รายงานการศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ที่แยกได้ในประเทศเกาหลีเมื่อปี พ.ศ. 2546 จากสุกรแม่พันธุ์ 200 ตัว ที่แสดงอาการคล้ายโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดรุนแรง พบว่าสามารถทำให้สุกรทดลองแสดงอาการและมีรอยโรคของโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันได้

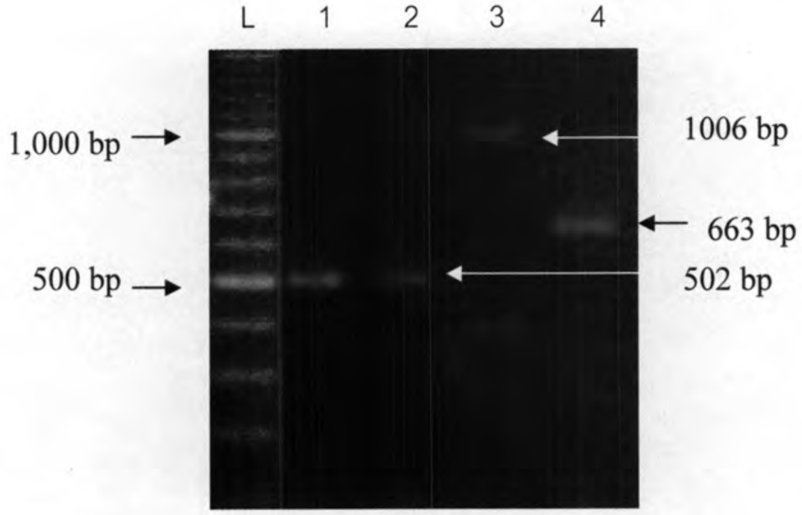
ในประเทศไทยมีรายงานพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร ดังนี้ Kupradinun และคณะ (1990) รายงานการเพาะแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ได้เป็นครั้งแรกจากสุกรป่วยที่แสดงอาการคล้ายโรคไข้หวัดใหญ่ในเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2531 และจากการรายงานผลการสำรวจทางซีรัมวิทยาต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 จากสุกรใน 15 จังหวัดของประเทศไทย โดย Damrongwatanapokin และคณะ (2003) พบอุบัติการณ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N1 ร้อยละ 39 จากตัวอย่างซีรัมสุกรทั้งหมด 1,610 ตัวอย่าง ส่วน Parchariyanon และคณะ (2006) รายงานการสำรวจทางซีรัมวิทยาของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากสุกรใน 5 จังหวัด ได้แก่ ฉะเชิงเทรา กาญจนบุรี ขอนแก่น สุโขทัย และสุพรรณบุรี ในปี พ.ศ. 2547 พบตัวอย่างซีรัมสุกรให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ร้อยละ 7.9 และให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ร้อยละ 20.6 จากตัวอย่างซีรัมสุกรทั้งหมด 533 ตัวอย่าง และ Damrongwatanapokin และคณะ (2006) รายงานการสำรวจทางซีรัมวิทยาและไวรัสวิทยาของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2547 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2548 ใน 35 จังหวัดของประเทศไทย พบตัวอย่างซีรัมสุกรขุนให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ร้อยละ 55 และให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ร้อยละ 31 จากตัวอย่างซีรัมสุกรขุน 751 ตัวอย่าง และพบตัวอย่างซีรัมแม่สุกรให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ร้อยละ 91 และให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 ร้อยละ 52 จากตัวอย่างซีรัมแม่สุกร 2,494 ตัวอย่าง ส่วนผลการแยกเชื้อและการจำแนกสายพันธุ์ไวรัสจากตัวอย่างป้ายจมูกสุกรในปี พ.ศ. 2548 พบไวรัสสายพันธุ์ H1N1, H3N2 และ H1N2 จำนวน 9, 4 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ จากตัวอย่างป้ายจมูกสุกรทั้งหมด 31 ตัวอย่าง จากรายงานดังกล่าวข้างต้น เป็นที่น่าสังเกตว่าไวรัส

ไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 นั้นสามารถแยกได้ในประเทศไทยเป็นครั้งแรกเมื่อต้นปี พ.ศ. 2548 ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาพยาธิกำเนิดและวิทยาภูมิคุ้มกันของไวรัสสายพันธุ์นี้

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทยเบื้องต้น โดยสุ่มตัวอย่างป้ายจมูกสุกรป่วยในฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี multiplex RT-PCR ณ หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้ Primers ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีน M และสามารถตัดสายของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ได้ขนาด 700 คู่เบส (bp) (ตารางที่ 1) ในการวินิจฉัยแยกเบื้องต้นว่าเป็นไวรัส Influenza A (ดังภาพที่ 1) ต่อจากนั้นวินิจฉัยแยกสายพันธุ์ของไวรัสโดยใช้ Primers ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีน N1 N2 H1 และ H3 (Choi et al., 2002) ซึ่งจะตัดสายของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ได้ขนาด 754, 502, 1006 และ 663 คู่เบส ตามลำดับ (ตารางที่ 1) พบว่าสามารถแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ได้จากตัวอย่างป้ายจมูกสุกรอนุบาล (ดังภาพที่ 2) และไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 ได้จากตัวอย่างป้ายจมูกสุกรป่วยอายุ 6 สัปดาห์ (ดังภาพที่ 2) ในปี พ.ศ. 2548 เช่นกันกับ Damrongwatanapokin และคณะ (2006) ซึ่งมีรายงานการพบไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 เป็นครั้งแรกในประเทศไทย อีกทั้งการรายงานข้อมูลด้านพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยมีน้อย จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้ศึกษาถึงพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H1N2 เปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ H3N2 ที่แยกได้ในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2548 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านระบาดวิทยาและพยาธิวิทยา ในการวางแผนการจัดการเพื่อควบคุม ป้องกัน และกำจัดโรคของระบบทางเดินหายใจที่มีสาเหตุมาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรจากฟาร์มสุกรในประเทศไทย

ภาพที่ 1 แสดงแถบของ PCR products ที่ได้จาก Primers ของยีน M บน agarose gel electrophoresis: โดย L คือ 100-bp DNA ladder; 1-10 เป็นตัวอย่างป้ายจมูกสุกรป่วย; 11 คือ negative control; 12 คือ positive control 700 bp; จากภาพตัวอย่างที่ 1 8 และ 9 ได้ PCR products เท่ากับ 700 bp; 1 คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากสุกรอนุบาล; 8 และ 9 คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากสุกรหย่านมอายุ 6 สัปดาห์

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แสดงแถบของ PCR products บน agarose gel electrophoresis: L คือ 100-bp DNA ladder; 1 และ 2 ใช้ Primers ของยีน N1 (754 bp) และ N2 (502 bp); ส่วน 3 และ 4 ใช้ Primers ของยีน H1 (1006 bp) และ H3 (663 bp); 1 และ 3 คือตัวอย่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากสุกรหย่านมอายุ 6 สัปดาห์ (H1N2); ส่วน 2 และ 4 คือตัวอย่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากสุกรอนุบาล (H3N2)

ตารางที่ 1 แสดง Primers ที่ใช้ในเทคนิค RT-PCR

Primers	ลำดับเบส	PCR Products	SIV subtypes
MF	GCA AAA GCA GGT AGA TAT TGA A	700 bp	-
MR	GTC CCA ATT GTC CTC ATT GC		
H1F*	GGG ACA TGT TAC CCA GGA GAT	1006 bp	H1
H1R*	GCA TTG TAT GTC CAA ATA TCC A		
H3F*	TAT GCC TGG TTT TCG CTC AA	663 bp	H3
H3R*	TTC GGG ATT ACA GTT TGT TG		
N1F*	GGT TCC AAA GGA GAC ATT TTT G	754 bp	N1
N1R*	CTA TCC AAA CAC CAT TGC CAT A		
N2F*	TGC GAT CCT GAC AAG TGT TAT C	502 bp	N2
N2R*	CAG ACA CAT CTG ACA CCA GGA T		

* ที่มา : ดัดแปลงจาก Choi et al. (2002)

1.2 สมมุติฐานการวิจัย

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ A/Swine/Thailand/CB2/05 (H3N2) และ A/Swine/Thailand/CB1/05 (H1N2) ที่แยกได้จากภาคสนามในประเทศไทย สามารถก่อโรคในสุกรทดลองได้

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ A/Swine/Thailand/CB2/05 (H3N2) และ A/Swine/Thailand/CB1/05 (H1N2) ที่แยกได้จากภาคสนามในประเทศไทย โดยศึกษาการแสดงอาการของสุกรทดลอง ลักษณะรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา ลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา การกระจายของแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในเนื้อเยื่อปอดและอวัยวะที่พบรอยโรค การตอบสนองทางวิทยาภูมิคุ้มกันและปริมาณไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรในเลือดและในทางเดินหายใจสุกรทดลอง

1.4 คำถามสำหรับการวิจัย

1. ไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยสายพันธุ์ A/Swine/Thailand/CB2/05 (H3N2) และ A/Swine/Thailand/CB1/05 (H1N2) สามารถก่อโรคในสุกรทดลองได้หรือไม่
2. ถ้าไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยสายพันธุ์ A/Swine/Thailand/CB2/05 (H3N2) และ A/Swine/Thailand/CB1/05 (H1N2) สามารถก่อโรคในสุกรทดลองได้ จะมีพยาธิกำเนิดอย่างไร และพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยสายพันธุ์ A/Swine/Thailand/CB1/05 (H1N2) และสายพันธุ์ A/Swine/Thailand/CB2/05 (H3N2) เหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทราบถึงพยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ A/Swine/Thailand/CB2/05 (H3N2) และสายพันธุ์ A/Swine/Thailand/CB1/05 (H1N2) ที่แยกได้จากภาคสนามในประเทศไทย ในสุกรหย่านม