การอภิปรายผล

โรคไข้หวัดใหญ่ (influenza) เกิดจากเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด RNA จัดอยู่ในตระกูล *Orthomyxoviridae* สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 4 วงศ์ (genus) ได้แก่ A, B, C และ thogotovirus ไวรัสไข้หวัดใหญ่ ทั้ง 4 วงศ์สามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้ แต่มีเพียงไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอเท่านั้น ที่มีรายงานการศึกษาในวงกว้างว่า สามารถติดต่อและก่อโรคในคนและสัตว์ได้หลายชนิด เช่น สุกร ม้า เสือ สุนัข และ แมว (Amonsin et al., 2006; Amonsin et al., 2007; Songserm et al., 2006a; Songserm et al., 2006b; Thanawongnuwech et al., 2005) และเป็นเพียงวงศ์เดียวที่มีรายงานการติดต่อและก่อโรคในสัตว์ปีก (Taubenberger and Morens, 2010; Webster et al., 1992) เนื่องจากลักษณะของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่เป็นท่อน ทำให้ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอต่างสายพันธุ์กันมีโอกาสเกิดการแลกเปลี่ยนท่อนสารพันธุกรรม (genetic reassortment) เกิดขึ้น และทำให้ลักษณะของเชื้อไวรัสเปลี่ยนแปลงไปจนเกิดเป็นเชื้อไวรัสตัวใหม่ ที่อาจมีความรุนแรงและสามารถผ่านแนวป้องกันทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ของโรคไข้หวัดใหญ่ (pandemic influenza) อยู่เป็นระยะๆ

เนื่องจากมีรายงานการศึกษาว่านกกระทามีตัวรับที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2 ชนิด กล่าวคือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกและไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน (Wan and Perez, 2006) โดยตัวรับทั้ง 2 ชนิดจะพบได้ที่หลอดลม (trachea) และลำไส้ (intestine) ของนกกระทา ดังนั้นนกกระทาจึงสามารถทำหน้าที่เป็น mixing vessel ที่รับไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้งจากสัตว์ปีกและสัตว์ชนิดอื่น ดังนั้นหากนกกระทาติดไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่างสายพันธุ์พร้อมกัน อาจทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนท่อนสารพันธุกรรม (genetic reassortment) ทำให้ได้เชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ หรือเรียกว่า " Antigenic shift" (Webster et al., 1982) และอาจทำให้ได้เชื้อไวรัสชนิดใหม่ๆ และอาจทำให้เกิดการระบาดของเชื้อไวรัสครั้งใหญ่

การศึกษาครั้งนี้ได้เพาะแยกและตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ จากฟาร์มนกกระทา อีกทั้งยังได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งได้วิเคราะห์เปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในจุดที่มีความสำคัญในแต่ละยีนของเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นรายงานแรกที่ทำให้ทราบถึงความชุกและอุบัติการณ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในฟาร์มนกกระทาในประเทศไทย และยังเป็นการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงและการกลายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในประเทศไทย

การศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกฟาร์มนกกระทาในจังหวัดอยุธยาและจังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งเป็นจังหวัดและพื้นที่ที่เคยมีรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 มาก่อน โดยเก็บตัวอย่างนกกระทาจากแต่ละฟาร์มเป็นระยะเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2553 รวมจำนวนนกกระทาทั้งสิ้น 1,020 ตัว (OPS =1,020 ตัวอย่าง และ CS =1,020 ตัวอย่าง) ผลการเพาะแยกและตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ พบตัวอย่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ (ให้ผลบวกต่อ real time RT-PCR หรือ M gene positive) จำนวน 24 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.18% (24/2040) ในจำนวนนี้สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส 3 ตัวอย่างเป็นสายพันธุ์ H7N1 ตัวอย่างดังกล่าวเป็นตัวอย่างนกกระทาจากฟาร์มในจังหวัดอยุธยา และเป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ พบมากในฟาร์มจังหวัดอยุธยามากกว่าฟาร์มในจังหวัดสุพรรณบุรี (1.54% และ 0.75% ตามลำดับ) จากการสอบย้อนหลังข้อแตกต่างที่เด่นชัดของทั้งสองฟาร์มคือ การจัดการในเรื่องความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) ซึ่งฟาร์มในจังหวัดอยุธยาเป็นฟาร์มที่เลี้ยงแบบระบบเปิด นกกระทาภายในฟาร์มมีโอกาสสัมผัสกับสัตว์พาหะของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้โดยตรง ในขณะที่ฟาร์มในจังหวัดสุพรรณบุรี เป็นฟาร์มที่เลี้ยงในระบบปิด (evaporative cooling system) และได้มาตรฐานการจัดการฟาร์มจากกรมปศุสัตว์ ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนยืนยันผลของการจัดการฟาร์มต่ออัตราความชุกของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในฟาร์ม

ผลการเพาะแยกและตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ยังพบว่าตัวอย่างที่เก็บจาก OPS จะให้ผลบวกมากกว่าตัวอย่างจาก CS (1.47% และ 0.88% ตามลำดับ) ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนในตัวอย่างที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดอยุธยา ที่มีจำนวนตัวอย่าง OPS ที่ให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ คิดเป็น 2.18% เมื่อเทียบกับตัวอย่างจาก CS ที่ให้ผลบวก 0.91% สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในต่างประเทศ ที่พบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่จะแบ่งตัว (replication) และปลดปล่อยไวรัส (shedding) ที่บริเวณทางเดินหายใจ (respiratory tract) เป็นหลัก (Makarova et al., 2003; Perez et al., 2003)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส โดยการเปรียบเทียบโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของยีน HA พบว่าโครงสร้างความสัมพันธ์ ที่ได้จากการเปรียบเทียบเฉพาะไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 เชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศมองโกเลียและญี่ปุ่น หรือ Eurasain lineage อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ของยีน HA จากการเปรียบเทียบไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7 ที่ระบาดทั่วโลก (ไม่เฉพาะสายพันธุ์ H7N1 เท่านั้น) พบว่าโครงสร้างความสัมพันธ์แสดงให้เห็นว่า เชื้อไวรัส CU-J2882 อยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H7N7 ที่ระบาดอยู่ในประเทศเกาหลีมากกว่าที่จะอยู่ในกลุ่ม H7N1 (ภาพที่ 3 และ ภาพที่ 4)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส โดยการเปรียบเทียบโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของยีน NA เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่ระบาดในประเทศต่างๆ แล้ว พบว่าเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 ในนกกระทาจะแตกต่างกับ N1 ของเชื้อไวรัสในกลุ่มสายพันธุ์ H7N1 (ภาพที่ 5) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ที่เป็น HxN1 เช่น H1N1, H2N1, H3N1, H5N1 เป็นต้น แล้วพบว่ายีน NA (N1) ของเชื้อไวรัส CU-J2882 อยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 ที่ระบาดในประเทศไทย (ภาพที่ 6) จากข้อมูลโครงสร้างความสัมพันธ์ของยีน HA และ NA ดังกล่าวจึงเป็นไปได้ว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 ที่แยกได้ในนกกระทาครั้งนี้ เป็นเชื้อไวรัสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่มาจากเชื้อไวรัสกลุ่มยุโรปและเอเชีย (Eurasain lineage) โดยเฉพาะยีน NA ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่พบไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 ในนกกระทาแต่อย่างใด

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน HA และ NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในจุดที่มีความสำคัญในแต่ละยีนของเชื้อไวรัส พบว่าเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 ในนกกระทา มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง HA cleavage site ที่แสดงถึงคุณลักษณะของไวรัสที่ไม่ก่อโรครุนแรง (Low pathogenicity avian influenza, LPAI) ซึ่งจากรายงานในต่างประเทศพบว่า หากมีการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนที่ HA cleavage site ของยีน HA จะมีผลทำให้ไวรัสเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก LPAI เป็น HPAI (Banks et al., 2001) นอกจากนี้เชื้อไวรัส CU-J2882 ในนกกระทามีตำแหน่ง N-link glycosylation เป็น Asparagine (N) ในตำแหน่งที่ 123 และ 149 และมี receptor-binding site (RBS) ทั้งในส่วนของ right edge และ left edge of receptor-binding pockets เหมือนกับเชื้อไวรัสจากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งจากรายงานในต่างประเทศพบว่า การมี N-link oligosaccharide เพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง 123 และ 149 ของ HA1 domain ของยีน HA จะมีผลทำให้ไวรัสสามารถติดเชื้อในโฮสต์ได้ง่าย (Banks et al., 2001) โดยการพบกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 123 และ 149 มีผลต่อการเจริญของเชื้อไวรัสใน MDCK cell และผลของการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 149 จะส่งผลชัดเจนกว่าตำแหน่ง 123 (Wagner et al., 2000) การเจริญหรือการแบ่งตัว (replication) ของเชื้อไวรัสภายในเซลล์โฮสต์ นอกจากจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของโปรตีน HA แล้ว ยังขึ้นอยู่กับโปรตีน NA ด้วย โดยโปรตีน HA จะทำหน้าที่ในการเกาะกับตัวรับ (receptor) ของเซลล์โฮสต์ทำให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้วเกิดกระบวนการ replication ขึ้น ในขณะที่โปรตีน NA ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ตัดย่อย sialic acid ออกจากผนังของเซลล์โฮสต์ในขั้นตอนปลดปล่อยไวรัส (release) ออกจากเซลล์ทำให้ได้เชื้อไวรัสตัวใหม่ ซึ่งทั้งโปรตีน HA และ NA ของเชื้อไวรัสจะต้องสัมพันธ์กันเพื่อให้เกิดความสมดุล พบว่าหากยีน HA มีการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่ง N-link glycosylation ทำให้ความสามารถในการเข้า

เซลล์ได้ลดลง ยีน NA ของเชื้อไวรัสก็จะทำงานทดแทน ดังรายงานการทดลองการสร้าง reassortant virus ในห้องปฏิบัติการ โดยพบว่าเชื้อไวรัสที่มียีน HA ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่ง 123 และ 149 กับยีน NA (N1) จะทำให้ความสามารถในการเจริญของเชื้อบน MDCK cell ลดลงถึง 20 เท่า แต่หากเป็นยีน N2 ผลกระทบนี้จะลดลง (Wagner et al., 2000)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 พบว่าเชื้อไวรัส A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 จากนกกระทามีกรดอะมิโนของโปรตีน NA บริเวณ stalk region มีการลดจำนวนของกรดอะมิโน 20 ตัว (20 amino acid deletion) เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 จากห่านในประเทศจีน A/Goose/Guangdong/1/1996 (H5N1) และ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 จากไก่ในประเทศเยอรมัน A/Chicken/ Rostock/8/1934(H7N1) การที่ยีน NA (N1) ของเชื้อไวรัสมีการลดจำนวนลง (deletion) ของกรดอะมิโนที่บริเวณ stalk region เป็นการปรับตัวหรือวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสที่ติดเชื้อในนกป่าให้สามารถติดเชื้อวนเวียน (circulating) อยู่ในสัตว์ปีกที่เลี้ยงไว้ตามบ้าน (domestic poultry) ได้ (Banks et al., 2001)

โดยสรุปการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจพิสูจน์และแยกไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ จากนกกระทาในฟาร์มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2553 และได้พิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่จำนวน 24 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส (subtype) ได้ 3 ตัวอย่าง โดยเป็นสายพันธุ์ H7N1 และได้ถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N1 จำนวน 1 ตัวอย่างคือ A/Quail/AY/Thailand/CU-J2882/09 และได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของยีน HA และ NA ของเชื้อไวรัส และนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้ไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank ต่อไป การศึกษาวัจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่จะทำให้ทราบถึงความชุกของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในฟาร์มนกกระทา และสามารถตรวจพบไวรัสสายพันธุ์ H7N1 เป็นรายงานแรกในประเทศไทย