บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

การระบาดของเชื้อไข้หวัดนก ในสัตว์ปีกเกิดขึ้นเมื่อกลางเดือนธันวาคม ปี 2003 ถึงต้นเดือนกุมภาพันธุ์ ปี 2004 โดยมีสาเหตุมาจาก HPAI ของเชื้อไข้หวัดนก H5N1 virus ซึ่งมีรายงานการเกิดโรคที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศเกาหลี, เวียดนาม, ญี่ปุ่น, ไทย, ปากีสถาน, กัมพูชา, ลาว, อินโดนีเซีย, และจีน [1] มีการฆ่าสัตว์ไปกว่า 150 ล้านตัว สูญเสียรายได้ไปมากกว่า 250 ล้านดอลลาร์ มีผู้ติดเชื้อ 32 คนและเสียชีวิต 23 คน ในประเทศเวียดนาม และมีผู้ติดเชื้อ 19 คนและเสียชีวิต 12 คน ต่อมาในเดือนเมษายน 2005 เกิดการระบาดอีกครั้งในประเทศอินโดนีเซีย, เวียดนาม, จีน, ไทย มีผู้ป่วยติดเชื้อ 77 คน และเสียชีวิต 34 คน [2] ซึ่งปัจจุบันยังคงมีการระบาดของโรคไข้หวัดนกทั้งในสัตว์และคน และยังมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคนี้อยู่ ปัจจุบัน OIE มีการพิจารณาให้มีการใช้วัคซีนในการควบคุมไวรัสไข้หวัดนก แต่การใช้วัคซีนอาจมีผลกระทบต่อนโยบายการค้าที่มีนโยบายไม่ให้ใช้วัคซีน [3] เนื่องจากยังไม่สามารถแยกความแตกต่างในการใช้วัคซีนได้จากสัตว์ที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติได้ [4] ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีที่สามารถแยกความแตกต่างของสัตว์ที่ติดเชื้อจากธรรมชาติกับสัตว์ที่ได้รับวัคซีน (Differentiation Infected from Vaccinated Animal : DIVA) ซึ่งสามารถตรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกได้ด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา ปัจจุบันมีวิธีการร่วมกับการใช้วัคซีนที่เป็น DIVA อยู่ 4 แนวทาง คือ 1. Sentined เป็นวิธีที่ให้สัตว์ที่ได้รับฉีดวัคซีนอยู่รวมกับสัตว์ที่ไม่ได้รับวัคซีน เฝ้าดูการเกิดโรคและเมื่อเกิดโรคทำการวินิจฉัยด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา 2. Subunit vaccines ใช้โปรตีนจาก heamagglutinin และ neuraminidase ผลิตเป็นวัคซีน ฉีดให้แก่สัตว์ซึ่งสามารถวินิจฉัยโรคด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา, AGID, ELISA 3. Heterologous neuraminidaseใช้โปรตีน neuraminidase ที่ไม่ได้เกิดโรคในพื้นที่นั้น ทำเป็นวัคซีนและฉีดให้แก่สัตว์ ซึ่งสามารถวินิจฉัยด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา (Heamagglutination inhibition : HI test, neuraminidase inhibition : NI test) [5, 6] และ 4. NS1 DIVA เป็นทางเลือกในปัจจุบัน ซึ่งดูจากความแตกต่างของระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อโปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนก ซึ่งโปรตีน NS1 ถูกสร้างขึ้นมาระหว่างที่เซลล์มีการติดเชื้อแต่ไม่รวมเป็น viral particle โดยที่วัคซีนที่ใช้เป็นวัคซีนเชื้อตายซึ่งจะถูกแยกส่วนของ NS1 ออกไปในกระบวนการเตรียมวัคซีน ฉะนั้นวัคซีนที่ฉีดเข้าตัวสัตว์มีแอนติบอดีต่อ NS1 ในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งในปัจจุบันวัคซีนที่จำหน่ายเป็นวัคซีนที่ได้มาจากการฉีดไข่ไก่ฟัก แล้วนำเอา allantoic fluid มาใช้ผลิตวัคซีนทำให้วัคซีนมีโปรตีน NS1 ผสมอยู่ แต่สัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อ

จากธรรมชาติมีแอนติบอดีต่อ NS1 ที่มากกว่า [5, 6] และเมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์โฮสต์ โปรตีน NS1 เป็นโปรตีนชนิดแรกที่ถูกสังเคราะห์ออกมาเมื่อมีการติดเชื้อ [6-8] และสะสมอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ ยังพบในส่วนของ polysomal cell และใน cellular RNA ในรูปของ paracrystalline inclusion body ภายใน cytoplasm ของเซลล์ที่ติดเชื้อ [8] จากคุณสมบัตินี้จึงนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีในสัตว์ที่ติดเชื้อจากธรรมชาติกับสัตว์ที่ได้รับวัคซีนป้องกัน avian influenza virus A ได้ และเมื่อพิจารณาในด้านความผันแปรของโปรตีน NS1 ที่มีในประเทศไทย มีการศึกษาว่าความผันแปรของโปรตีน NS1 อยู่ในระดับต่ำ และลักษณะพันธุกรรมยังคงอยู่ในกลุ่มของไวรัสไข้หวัดนกที่ระบาดในประเทศไทย [9,10] จึงสามารถใช้ตัวอย่างที่ได้จากข้างต้นมาทำการศึกษากระบวนการผลิตโปรตีนได้ ซึ่งอาจนำโปรตีนที่ได้มาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อประเทศไทย

การศึกษาครั้งนี้ได้นำโปรตีน NS1 เชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากตัวอย่างที่มีการศึกษาการระบาดในประเทศไทยมาเพิ่มปริมาณดีเอนเอ, นำมาเพิ่มจำนวนใน *E.coli*, กระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ และตรวจยืนยันด้วยวิธี western blot เพื่อนำโปรตีน NS1 ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

เพื่อศึกษากระบวนการผลิต Nonstructural 1 Protein (NS1) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่พบในประเทศไทย

ความสำคัญของการวิจัย

ทำให้มีเทคโนโลยีการผลิต Nonstructural 1 Protein (NS1) ในประเทศไทย ซึ่งโปรตีนที่ได้อาจจะนำใช้แยกความแตกต่างของสัตว์ที่ติดเชื้อจากธรรมชาติกับสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคฯ ด้วยชุดทดสอบที่จะมีขึ้นในอนาคต

ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ใช้ไวรัส A/little grebe/Thailand/Phichit-01/2004(H5N1) ซึ่งนำมาใช้ผลิตโปรตีน Nonstructural 1 Protein (NS1) ในระบบ *Escherichia coli* ในระดับห้องปฏิบัติการ

สมมติฐานของการวิจัย

มีความสามารถในการผลิตโปรตีน Nonstructural 1 Protein (NS1) ของไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่พบในประเทศไทยใน *E.coli* ในระดับห้องปฏิบัติการ