บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Influenza A viruses

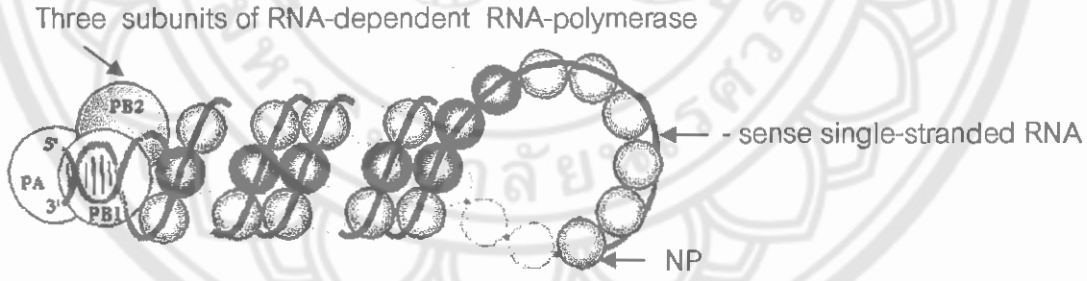
Avian influenza viruses หรือไวรัสไข้หวัดนก จัดอยู่ใน Family *Orthomyxoviridae* ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 5 genus คือ Influenza A, Influenza B, Influenza C, Thogotovirus และ Isavirus [11, 12] avian influenza viruses อยู่ genus เดียวกับ influenza A viruses ไวรัสนี้หุ้มด้วยซองไขมัน (envelope) ภายในมี genome ทั้งหมด 8 ท่อน ที่เป็น Negative single stranded RNA

influenza viruses สามารถแบ่งออกเป็น 3 genus ได้โดยใช้ความแตกต่างของ nucleoprotien (NP) และ matrix (M1) protein ซึ่งใน genus B และ genus C เป็นไวรัสที่ติดเชื้อในมนุษย์เท่านั้น แต่ genus A จะติดเชื้อได้ทั้งในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก [11, 12] Influenza A viruses สามารถแบ่งกลุ่มโดยใช้ antigenic nature หรือ glycoprotein ที่อยู่บนผิวไวรัส คือ Haemagglutinin (H or HA) และ Neuraminidase (N or NA) โดย Haemagglutinin สามารถแบ่งออกเป็น 16 กลุ่ม (H1 - H16) และ Neuraminidase สามารถแบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม (N1 - N9) ซึ่งทุกกลุ่มสัตว์ปีกสามารถติดเชื้อได้ทั้งหมด [2, 11] และสำหรับ avian influenza viruses สามารถแบ่งตามลักษณะความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรค ออกเป็น 2 ชนิด คือ Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) [13] และ Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI) [14] ไวรัสที่เป็นHPAL ได้แก่ H5 และ H7 ซึ่งทำให้เกิดอาการรุนแรงและมีอัตราการตายของสัตว์ปีกสูง [6] HPAI ในสัตว์ปีก เมื่อเกิดอาการของโรคสัตว์ป่วยในระยะเวลาสั้นและตายอย่างรวดเร็วเกือบ 100 % [2] ทำให้สูญเสียรายได้ทางอุตสาหกรรมสัตว์ปีกเป็นจำนวนเงินมากกว่า 250 ล้านดอลลาร์ [1]

ลักษณะโครงสร้างของ Influenza A viruses

อนุภาคของไวรัสไข้หวัดนกมีขนาด 80 – 120 nm. มีลักษณะเป็น Pleomorphic เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน ลักษณะนี้เกิดจากส่วนของ spikes ที่ไม่แข็งแรง [15] spikes เป็น glycoprotein มี 2 ชนิดคือ glycoprotein type 1 ที่มี N-terminal ectodomain และ C-terminal anchor มีลักษณะเป็น Rod-shaped spikes (trimer) ของโปรตีน HA ซึ่ง HA spikes สามารถจับกับ sialyloligosaccharides ที่เป็น receptor บนผิวของเซลล์โฮสต์ เพื่อให้อนุภาคไวรัสเข้าสู่ภายใน

เซลล์โฮสต์ได้ และ glycoprotein type 2 ที่มี N-proximal anchor และ C-terminal ectodomain มีลักษณะเป็น Mushroom - shaped spikes (tetramer) ของโปรตีน NA ซึ่ง NA spikes ทำหน้าที่ให้อนุภาคไวรัสที่มีการแบ่งตัวจากเซลล์ที่ติดเชื้อหลุดออกมาจาก host cell ได้ โดย HA และ NA ต้องมี activity ที่สมดุลกัน เพื่อให้ NA ทำงานได้ดีและออกมาจากเซลล์ได้ เมื่อ spikes 2 ชนิด รวมกันมีจำนวนประมาณ 500 ก้าน จำนวนของ H:N มีอัตราส่วนประมาณ 4.5 : 1 [8] ในส่วนล่างของ spikes ที่ยึดติด lipid bilayer ได้มาจาก plasma membrane ของ host cell ซึ่งบริเวณนี้เป็นส่วนของ envelop ส่วนโปรตีนอีกชนิดที่ยื่นออกมาจาก envelop คือ M2 เป็น ion channel protein ถัดเข้าไปด้านในของ envelop เป็นชั้นของ M1 (membrane protien) และภายใน M1 มี ribonucleoprotiens core (RNPs) [11] ที่ประกอบด้วย trimeric polymerase complex หรือ three subunits of RNA-dependent RNA-polymerase ที่จับกันด้วย non covalent ซึ่งอยู่ด้านบนสุดของเส้น RNP, โปรตีน NP เป็นแกนกลาง และสุดท้ายคือ RNA ที่มีลักษณะเป็นเส้นซึ่งจับอยู่กับโมเลกุลของ NP ดังภาพ 1 [16, 17] RNPs จำนวน 8 ท่อนซึ่งแต่ละเส้นจะมี RNA ที่กำหนดลักษณะโปรตีนต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 และในตารางมีรหัส (code) สำหรับการสังเคราะห์ viral protein จำนวน 11 ชนิด (PB2, PB1, PB1-F2, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, NEP/NS2) [11]

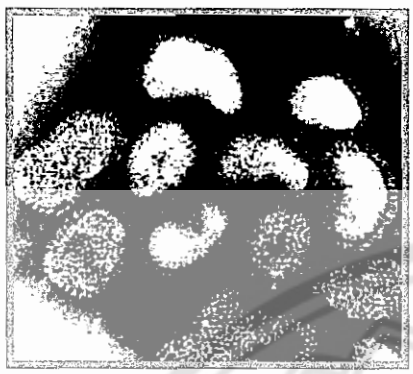


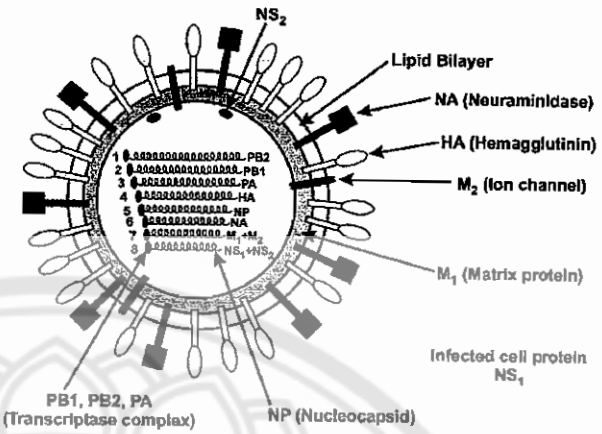
ภาพ 1 แสดงส่วนประกอบ ribonucleoprotiens core (RNPs)

ที่มา: [17]

ตาราง 1 แสดงตัวเลขของ genome ของ Influenza A viruses (A/Puerto Rico/8/34)

segments	Length (nucleotides)	Encodeed polypeptide	Encodeed polypeptide length	Molecular Wieght (Dalton)
1	2,341	PB2	759	85,700
2	2,341	PB1	757	86,500
		PB1-F2	87	
3	2,233	PA	716	84,200
4	1,778	HA	566	61,468
5	1,565	NP	498	56,101
6	1,413	NA	454	50,087
7	1,027	M1	252	24,801
		M2	97	11,010
8	890	NS1	230	26,815
		NS2	121	14,216





ก. ข.

ภาพ 2 ก แสดงรูปร่างของเชื้อ influenza A virus ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน
ข แสดงโครงสร้างของเชื้อ influenza A virus

ที่มา: [18,19]

โปรตีนของอนุภาคไวรัสทั้ง 11 ชนิด มีรายละเอียดดังนี้

PB2, PB1 และ PA เมื่อรวมตัวกันอย่างสมบูรณ์ภายใน cytoplasm และย้ายเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ เรียกว่า Polymerase complex ซึ่งในแต่ละตัวมีรายละเอียดดังนี้

Polymerase basic protein (PB2) ได้จาก RNA ท่อน 1 มีหน้าที่ในช่วง initiation ของขบวนการ transcription ของไวรัส โดยเป็นโปรตีนที่จดจำและจับกับ 5' cap ของ mRNA ของเซลล์โฮสต์เพื่อนำส่วน 5' cap มาทำเป็น primer ในขบวนการ transcription ของ mRNA ของไวรัส

Polymerase basic protein (PB1) มาจาก RNA ท่อน 2 มีหน้าที่ในช่วง elongation ของ primer ในการผลิต mRNA ของไวรัส ส่วนโปรตีนมีหน้าที่ในช่วง elongation ในการสังเคราะห์ template RNA และ vRNA [6, 11] นอกจากนี้ยังพบว่า ภายใน PB1 ยังมีโปรตีน PB1-F2 ที่ถูกแปลรหัสจากส่วน alternative open reading frame (ORE) ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการ apoptosis ใน cell-specific manner [6, 11]

Polymerase acidic protein (PA) มาจาก RNA ท่อน 3 อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อและเป็นส่วนผิวของ RNA-dependent RNA polymerase complex ของ PB2 และ PB1 [6, 11]

Heamagglutinin (HA) เป็นโปรตีน integral membrane และเป็น surface antigen ที่สำคัญของ influenza virus ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้จับกับ receptor ของเซลล์โฮสต์และรวมเป็น fusion ระหว่าง envelop ของไวรัสกับโฮสต์ โปรตีน HA มาจาก RNA ท่อน 4 [6, 11] และโปรตีน HA เป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนายาและวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนก [20] HA สังเคราะห์ที่ membrame bound ribosome และย้ายเข้าสู่ lumen endoplasmic reticulum (ER) ของเซลล์ที่ติดเชื้อ และออกมาอยู่ที่ผนังหุ้มเซลล์ HA ที่ยังไม่สามารถทำงานได้หรือเรียกว่า precursor protein (HA0) [11] เมื่อมีการเติม Palmitic acid ที่ตำแหน่ง Cysteine ใกล้ carboxy terminus [6, 11] และท้ายสุดเป็นการตัดด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะที่อยู่ในโฮสต์เช่น tryptase หรือ furin จากนั้นสามารถแบ่ง HA0 ที่ถูกตัดได้เป็น 2 ส่วน คือ HA1 และ HA2 [20] แต่ยังคงมี disulphide bond เป็นพันธะเชื่อมกันอยู่ [11] บริเวณที่ถูกเอมไซน์ของ host cell ตัดเรียกว่า cleavage site ซึ่งเป็นตำแหน่งของ Arg หรือ Lyr ถ้าบริเวณนี้มี Arg หรือ Lyr อยู่หนึ่งตัว เอมไซน์จากเซลล์โฮสต์ไม่สามารถตัดได้ ทำให้เชื้อไวรัสไม่สามารถแพร่ไปยังส่วนต่างๆของร่างกายได้ สัตว์จึงไม่ก่อโรคชนิดรุนแรง จึงเรียกการเกิดโรคนี้ว่า LPAI แต่ถ้า cleavage site มี Arg หรือ Lyr เรียงซ้ำกันหลายตัว เอมไซน์จากเซลล์โฮสต์ สามารถตัดได้ทำให้เชื้อไวรัสมีความสามารถแพร่ไปยังส่วนต่างๆของร่างกายได้ และทำให้สัตว์ก่อโรคชนิดรุนแรง จึงเรียกการเกิดโรคนี้ว่า HPAI ซึ่งพบในสายพันธุ์ H5 และ H7 [21]

Nucleoprotein (NP) มาจาก RNA ท่อน 5 โปรตีน NP ที่สังเคราะห์แล้ว ได้ถูกทิ้งไว้ในเซลล์ที่ติดเชื้อและใน virion โปรตีน NP เป็นเป้าหมายสำคัญของ cytotoxic T-cell immune response ของเซลล์โฮสต์ [6, 11]

Neuraminidase (NA) มาจาก RNA ท่อน 6 เป็น integral membrane glycoprotein และเป็น surface antigen ที่สำคัญเป็นอันดับ 2 ของไวรัสไข้หวัดนก NA ทำหน้าที่เป็นเอมไซน์ที่ตัด α-ketosidic ที่เชื่อมระหว่าง sialic acid ที่อยู่ด้าน terminal และตำแหน่ง adjacent sugar ทำให้ไวรัสลูกเป็นอิสระ และเข้าสู่เซลล์โฮสต์ตัวใหม่ [6, 11]

M1 protein มาจาก RNA ท่อน 7 ส่วนของ M1 เป็น collinear เมื่อไวรัสสังเคราะห์ได้เป็นโปรตีนและทิ้งไว้ใน virion โปรตีน M1 เป็นส่วนเปลือกหุ้ม virion หรือ nucleocapsids ในเซลล์ที่ติดเชื้อจะพบทั้งในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส และมีความสำคัญในช่วงนำ RNPs ออกจากนิวเคลียส [6, 11]

M2 protein มาจาก RNA ท่อน 7 ส่วนของ M1 เป็นส่วนที่ถูก transcription จาก RNA ท่อน 7 ซึ่งเกิดการ splicing M2 เป็น integral membrane พบบนผิวเซลล์ที่มีการติดเชื้อ และพบ

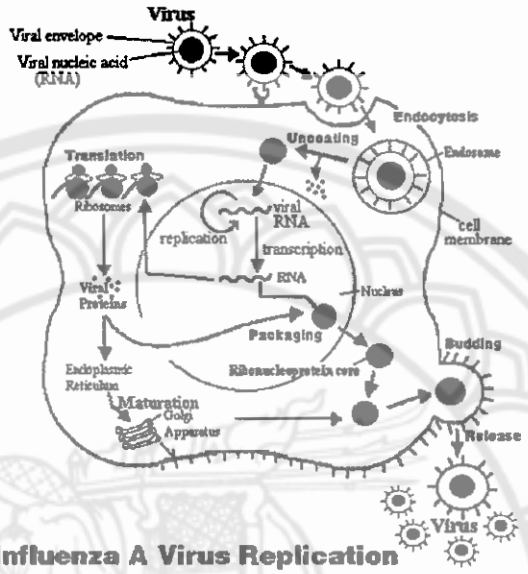
เล็กน้อยใน virion มีหน้าที่เป็นเหมือน proton channel เมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์โฮสต์ M2 protein ทำการเพิ่มอิออนภายในถุงเอนโดโซม ทำให้ภายในถุงมีความเป็นกรดมากขึ้น pH ประมาณ 5 - 6 มีผลทำให้ถุงเอนโดโซมเปิด RNPs ของไวรัสจึงสามารถออกมาจากถุงเข้าสู่ cytoplasm และนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ในลำดับต่อไป เพื่อเริ่มกระบวนการสังเคราะห์ RNA ของไวรัส [6, 11]

Nonstructural 1 protein มาจาก RNA ท่อน 8 โดยโปรตีน NS1 เป็น collinear ขณะที่โปรตีน NS2 เป็นส่วนที่ได้จากการ splicing โปรตีน NS1 ถูกทิ้งในเซลล์ที่ติดเชื้อเป็นตัวแรกในนิวเคลียสที่มีการสังเคราะห์เป็นโปรตีนออกมา ส่วนโปรตีน NS2 เป็นตัวแรกที่เข้าไปอยู่ในcytoplasm และอยู่ใน virion แต่โปรตีน NS1 ไม่เข้าไปรวมกับ virion โปรตีนทั้งสองมีหน้าที่เกี่ยวกับการ replication [6, 11]

วงชีวิตของ Influenza A viruses

Influenza A viruses จับกับเซลล์โฮสต์โดยใช้ส่วนหัวที่เป็น Rod-shaped ของ HA จับกับ sialic acid ที่เป็น receptor บนผิวเซลล์โฮสต์จากนั้นไวรัสเริ่มกระบวนการเข้าสู่เซลล์โดยวิธี receptormediate endocytosis เมื่อ pH ในถุงเอนโดโซมลดลงมีผลไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตอนทำให้เกิดการแยกกันของ membrane fusion ระหว่าง envelope ของไวรัสกับ endosome membrane ของเซลล์โฮสต์ ส่วนภายในถุง endosome M2 ทำหน้าที่เปิดช่องให้ M1 ทำให้ RNPs สามารถออกจากถุง endosome และนำ RNPs ทั้งหมดออกมา เพื่อเข้าสู่cytoplasm ของเซลล์โฮสต์และเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์โฮสต์โดยผ่านทาง nuclear pore โดยไวรัสจะมี RNA polymerase เข้ามากับอนุภาคเพื่อสร้างสาย RNA สายบวก ใช้ในการสร้าง genomic RNA ของไวรัส และไวรัสใช้ polymerase complex ตัด 5' cap ของ mRNA ของเซลล์โฮสต์และตัดเป็นสายสั้นๆ นำมาทำเป็น primer ของไวรัส จากนั้นไวรัสจึงสร้าง mRNA ของไวรัส โดย mRNA 6 สาย ที่เกิด transcription ได้เป็นโปรตีน HA, NA, NP, PB1, PB2 และ PA ส่วน mRNA ของไวรัส 2 สาย คือ M และ NS ต้องมีกระบวนการ splice จึงได้โปรตีนออกมา 4 ชนิดคือ M1, M2, NS1 และ NS2 โปรตีนทั้ง 11 ชนิดมีหน้าที่ต่างกัน ซึ่งได้อธิบายในหัวข้อ ลักษณะโครงสร้างของ Influenza A viruses ในครั้งแรกที่เกิดกระบวนการ transcription และ translation ของไวรัส ไวรัสจะสร้างโปรตีน NP และ NS1 ก่อน เพื่อยับยั้งกระบวนการ transcription ของเซลล์โฮสต์ ในส่วนการสร้างสายพันธุกรรม RNA สายลบ จะสร้างโดยอาศัยสาย RNA สายบวกที่เกิดขึ้นจากการ transcrition เป็น template ได้ RNPs ขึ้นภายในนิวเคลียส และ RNPs ทั้งหมดของไวรัสออกจากนิวเคลียสเข้าสู่ cytoplasm โดยอาศัยการทำงานของโปรตีน M1 และ NS2 และ RNPs ที่ออกมาแล้วจะประกอบเป็นไวรัสตัวใหม่ เกิดกระบวนการ assembly โดยโปรตีน M1 ทำการห่อหุ้ม RNPs

ให้อนุภาคอยู่ในถุง จากนั้นจึงไปรวมกับ HA และ NA ที่แทรกอยู่บริเวณผิวเซลล์ [12, 15, 16] และ budding ผ่านผนัง cytoplasm ออกมาได้ไวรัสลูกตัวใหม่ ดังภาพ 3

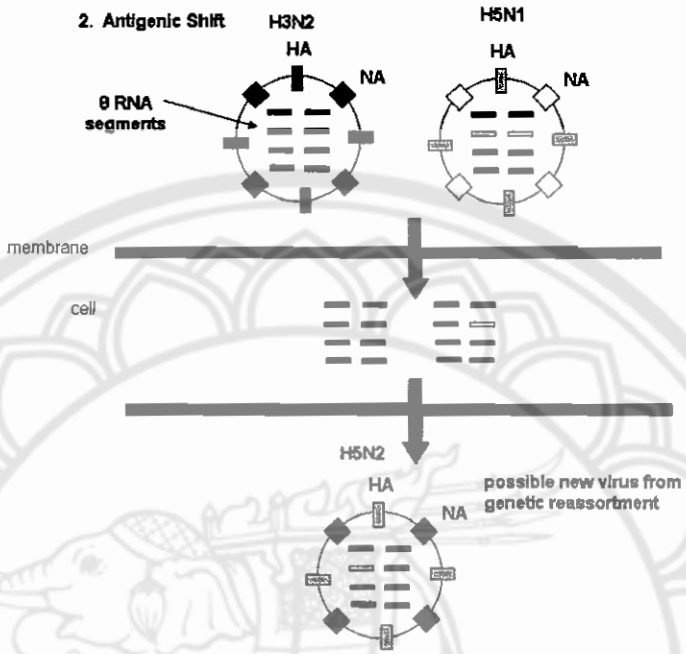


ภาพ 3 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

ที่มา: [22]

เมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์โฮสต์มีการเพิ่มจำนวนทำให้ได้ไวรัสตัวใหม่ ไวรัสที่เข้าสู่เซลล์โฮสต์จะไม่มีเอมไซม์ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบความผิดพลาดระหว่างที่ทำการเพิ่มจำนวน ฉะนั้นไวรัสตัวใหม่แต่ละตัวจะมี RNA ที่ต่างจากพ่อแม่มากกว่า 1 นิวคลีโอไทด์ หรืออาจเกิด point mutation มีผลทำให้เกิด antigenic drift ได้ ส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน HA และ NA ที่ทำหน้าที่เป็น surface antigen แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน HA และ NA ส่วนการเกิด antigenic shift เป็นการเกิด reassortment คือ ในช่วงเวลาเดียวกัน มีไวรัสต่างสายพันธุ์ 2 อนุภาค เข้าไปอยู่ในเซลล์โฮสต์เดียวกัน และเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกัน เมื่อประกอบกันทำให้ได้อนุภาคไวรัสใหม่ที่มี RNPs ของ HA และ NA ที่ต่างกับไวรัส 2 อนุภาคเดิม และการเปลี่ยนแปลงของ HA และ NA มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน HA และ NA ที่ทำหน้าที่เป็น surface antigen ด้วย ซึ่งอาจทำให้ไวรัสนี้ก่อให้เกิดการโรคระบาดที่รุนแรงยิ่งขึ้นหรืออาจไม่ก่อโรค เช่น influenza virus และ avain influenza virus เข้าไปในเซลล์ของหมูซึ่งเป็นเซลล์เดียวกัน ไวรัสทั้งสองชนิดเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกัน ซึ่งมีผลทำให้ได้ไวรัสตัวใหม่ขึ้นมาที่สามารถระบาด

ได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ปีก ดังภาพ 4 ซึ่งมีผลทำให้เกิดความสูญเสียชีวิตและเศรษฐกิจอย่างมาก เป็นต้น [12, 16]



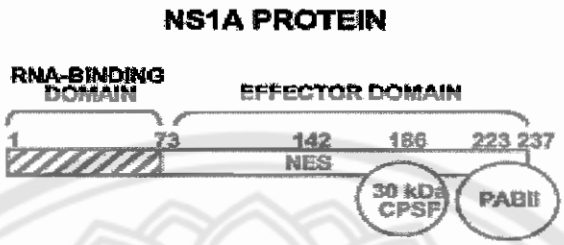
ภาพ 4 แสดงการเกิด antigenic shift

ที่มา: [23]

โปรตีน NS1 หรือ Nonstructural 1 Protein

โปรตีนของไวรัสไข้หวัดนกที่สามารถบอกได้ว่าสัตว์ปีกชนิดนั้นติดเชื้อหรือไม่ คือ โปรตีน Nonstructural 1 (NS1) ซึ่งถูกพบครั้งแรกในปี 1971 เมื่อไวรัสเข้าสู่นิวเคลียสมีกระบวนการผลิตโปรตีน โปรตีน NS1 เป็นโปรตีนชนิดแรกที่ไวรัสผลิตออกมาในระดับสูงและทิ้งโปรตีน NS1 ไว้ในเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งไม่พบภายใน progeny virions หรืออนุภาคไวรัสตัวใหม่ จึงเรียก nonstructural 1 protein [6, 11, 15, 21] และพบโปรตีน NS1 หลังจากมีไวรัส replication 3 ชั่วโมง เมื่อมีการทดลองนำไวรัส A/PR/8/34 หรือ A/Bel/42 เลี้ยงใน MDCK [24] NS1 อยู่ในกลุ่ม NS ซึ่งมี 2 ส่วน คือ NS1 และ NS2 ซึ่ง NS2 พบได้ใน purified virions ทั้ง NS1 และ NS2 จะใช้นิวคลีโอไทด์ 9 ตัวที่ N – terminal amino acid และใช้นิวคลีโอไทด์ 56 นิวคลีโอไทด์ ร่วมกันโดยสังเคราะห์โปรตีนที่ AUG เหมือนกัน [11, 19] จากการวิเคราะห์ Phylogenetic ของลำดับกรดอะมิโน NS1 ทำให้สามารถแยกโปรตีน NS1 ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ allele A และ B ซึ่ง allele A เป็นโปรตีน NS1

จากไวรัสไข้หวัดนก ที่ทำให้ติดเชื้อในมนุษย์ หมูและม้า ในขณะที่ allele B ติดเชื้อเฉพาะสัตว์ปีก [21, 24]

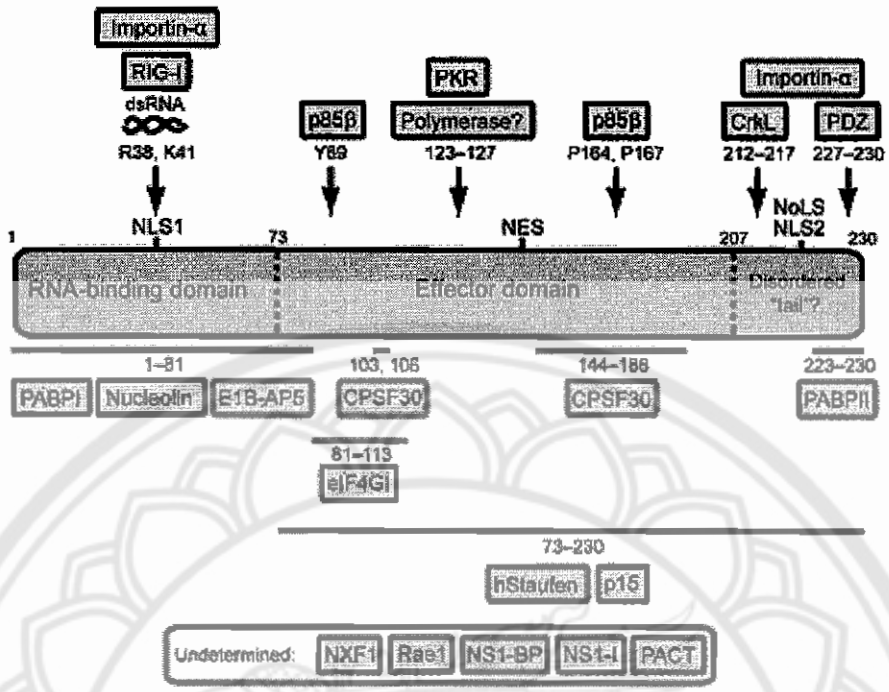


ภาพ 5 ส่วนประกอบต่างๆของโปรตีน NS1

ที่มา: [12]

โปรตีน NS1 มีความยาวของกรดอะมิโน 230 ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ

1. ส่วนใกล้ N - terminus amino acid ตำแหน่งที่ 1 – 73 (NS1 1-73) ดังภาพ 5,6 มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันไวรัสจากระบบการป้องกันไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านโดย IFN-α/β [25] แสดงในภาพ 8 ก ส่วนนี้เป็นส่วนที่เรียกว่า RNA – binding domain (RBD) ในตำแหน่งอาร์จีนีน 38 และ ไลซีน 41 ซึ่งจับกับ dsRNA เป้าหมาย เพื่อยับยั้งการทำงานของ Protein Kinase R (PKR) ของสิ่งมีชีวิต ซึ่ง PKR ที่ทำงานอยู่เป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเมื่อมี viral replication ดังภาพ 7 [21] ซึ่งมีผู้นำ NS1 1-73 จาก Influenza virus ชื่อ A/Udorn/72 มาทำการศึกษาด้วย NMR และ X-ray crystallography พบว่า NS1 1-73 เป็น symmetric homodimer ซึ่งมีลักษณะเป็น six-helix chain fold เป็นโครงสร้างที่ต่างจาก predominant class ของ dsRNA-binding domains หรือเรียกว่า dsRBD ซึ่งมีมากในโปรตีนของ eukaryotic และ prokaryotic เมื่อส่วน NS1 1-73 จับกับ dsRNA ที่มีความยาว 16 ลำดับเบส ในอัตราส่วน 1:1ทำให้ทั้งสองส่วนจับกันได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อนำข้อมูลที่ได้จาก มาทำการวิเคราะห์พบว่าเมื่อ NS1 1-73 จับกับ dsRNA เป็นการจับกันแบบง่ายและไม่มีการเปลี่ยนโครงสร้าง และยังพบว่า dsRNA-binding epitope ของ NS1 1-73 อยู่ที่ helic 2 และ 2' และยังพบว่า NS1 1-73 จับกับ dsRNA ที่อยู่ในรูป A form เท่านั้น ดังแสดงในภาพ 8 ข ซึ่งจากงานวิจัยนี้ทำให้เห็นโครงสร้างจำลอง (3D) ของ NS1 1-73 [26]



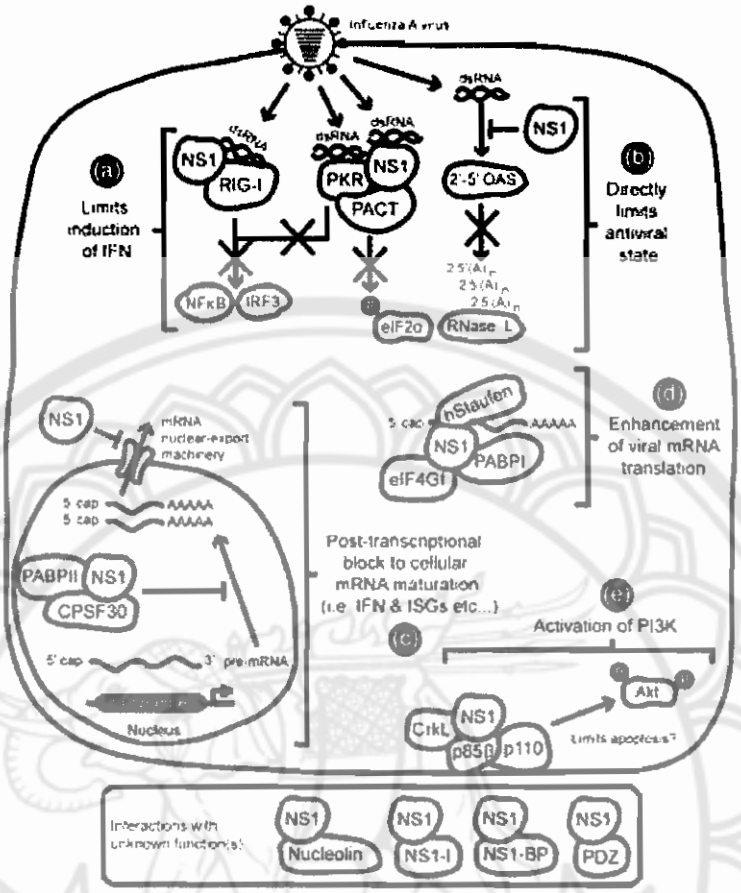
ภาพ 6 การแสดงหน้าที่ต่างๆตามส่วนประกอบของโปรตีน NS1

ที่มา: [21]

2. ส่วน C-terminal half เริ่มจาก amino acid ตำแหน่งที่ 74 – 237 มีตำแหน่งที่สำคัญๆ หลายตำแหน่งดังภาพ 5 และ 6 ซึ่งแบ่งได้ดังนี้

2.1 amino acid ตำแหน่งที่ 186 เป็นตำแหน่งที่จับกับ 30 kDA ของ cleavage และ polyadenylation specificity factor (CPSF) ของสิ่งมีชีวิตที่ติดเชื้อ [25]

2.2 amino acid ตำแหน่งที่ 223 – 237 เป็นตำแหน่งที่จับกับ poly(A) - binding protein II (PABII) ของสิ่งมีชีวิตที่ติดเชื้อ [25]

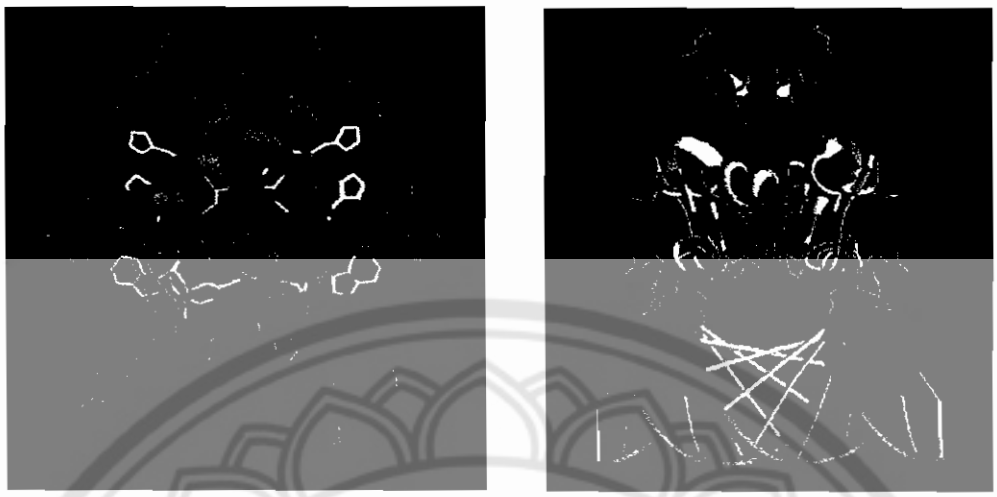


ภาพ 7 การทำงานในหน้าที่ต่าง ๆของ NS1 ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ

ที่มา: [21]

โดยตำแหน่งต่างๆของโปรตีน NS1 มีหน้าที่ยับยั้งกระบวนการ posttranscriptional ของเซลล์สิ่งมีชีวิต ก่อนจะได้ mRNA ที่จะไปผลิตยีนต้านไวรัส [25]

3. amino acid ตำแหน่งที่ 137 – 146 เป็นตำแหน่งของ nuclear export signal (NES) NS1-binding site กับ 30 kDA CPSF ถูกควบคุมระหว่างที่มีการติดเชื้อมีผลทำให้ NES ทำงาน ซึ่งหน้าที่ของ NES อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้โปรตีน NS1 ออกจากนิวเคลียสเป็นลำดับแรกเมื่อมีการติดเชื้อ ซึ่งบางทีการรวมอยู่ใน cytoplasm ของโปรตีน NS1 จำเป็นสำหรับการยับยั้งการทำงานของ PKR ได้ [25]



ก ข

ภาพ 8 ก แสดงโครงสร้างของ NS1 1-73
ข แสดงการจับกันของโปรตีน NS1 กับ dsRNA

ที่มา: [26]

โปรตีน NS1 เป็นโปรตีนชนิดแรกที่ถูกสังเคราะห์ออกมาเมื่อมีการติดเชื้อ [7] จึงนำโปรตีน NS1 มาใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดโรค เช่น โรคไข้เหลือง, โรคไข้เลือดออก, โรคไวรัสตับอักเสบ และโรคปากและเท้าเปื่อย [6, 27] เมื่อมีการระบาดของโรคไข้หวัดนก จึงได้มีผู้ทดลองนำโปรตีนนี้มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ไข้หวัดนกขึ้น ด้วยชุดทดสอบ ELISA ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของสัตว์ที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติกับสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน [6]

การระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

การระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกของ H5 และ H7 พบได้ทั่วโลก ซึ่งสามารถแยกการระบาดตามทวีป ดังนี้

ทวีปยุโรป ในประเทศ Italy เมื่อปี 1878 พบ avian influenza viruses **ประเภท HPAI ครั้งแรกในไก่เนื้อ เรียกการระบาดในครั้งนี้ว่า** Fowl plague **ซึ่งประเทศ Italy เป็นประเทศที่พบการระบาดของ** avian influenza viruses **หลายครั้ง ได้แก่**

ปี 1997 ระหว่างเดือนตุลาคม ถึงเดือน มกราคม 1998 พบการระบาดของ avian influenza viruses สายพันธุ์ H5N2 ประเภท HPAI ในเมือง Veneto และ Friuli-Venezia Giulia ได้ทำลายไก่เป็นจำนวน 7,741 ตัว [15]

ปี 1998 ตรวจพบ avian influenza viruses สายพันธุ์ H5N9 ประเภท LPAI ที่ Emilia Romagna ทำลายไก่เป็นจำนวน 2,000 ตัว ในปี 1998 พบการระบาดของ avian influenza viruses สายพันธุ์ H5N2 ประเภท LPAI ที่ประเทศ Belgium ทำให้ไก่เกิดอาการทางระบบทางเดินหายใจ มีการควบคุมโรคด้วยนโยบาย stamped out หรือ การทำลายสัตว์ป่วย [15]

จากนั้นในเดือน มีนาคม ถึงธันวาคม ปี 1999 ตรวจพบ avian influenza viruses สายพันธุ์ H7N1 ประเภท LPAI จากสัตว์ปีก มี 199 ฟาร์ม ที่ติดเชื้อไวรัสและเชื้อไวรัสมีลักษณะไม่เหมือนเชื้อที่พบในกลุ่มประเทศ EU ซึ่งการใช้วิธี stamped out เพียงอย่างเดียว ไม่น่าเพียงพอสำหรับการควบคุมโรค และในระหว่างนั้นวันที่ 17 ธันวาคม 1999 มีการตรวจพบ avian influenza viruses สายพันธุ์ H7N1 ประเภท HPAI ในไก่งวงพันธุ์เนื้อ พบการเกิดโรค 413 จุด มีสัตว์ปีกตายทั้งหมด 13,000,000 ตัว (ในส่วนนี้รวมถึงการใช้วิธี stamped out) การระบาดครั้งนี้ใช้วิธี stamped out และฆ่าเชื้อในบริเวณที่เกิดโรคเป็นบริเวณกว้าง 5.5 กิโลเมตร [15]

เกิดการระบาดอีกครั้งในเดือน สิงหาคม 2000 จาก avian influenza viruses สายพันธุ์ H5N2 ประเภท LPAI ในไก่งวง มีการกำจัดด้วยวิธี stamped out [15]

การระบาดซ้ำหลายครั้งของ avian influenza viruses ทำให้ประเทศ Italy มีนโยบายใช้วัคซีนต่อต้าน avian influenza viruses เพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นในฟาร์มและในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก โดยประเทศ Italy เริ่มใช้นโยบายการใช้วัคซีนในวันที่ 15 พฤศจิกายน 2000 จนถึง พฤษภาคม 2002 ซึ่งวัคซีนที่ใช้เป็นวัคซีนที่ใช้ avian influenza viruses สายพันธุ์ H7N1 ที่มีการระบาดอยู่ในพื้นที่ แต่ใช้ avian influenza viruses สายพันธุ์ H7N3 (A/ck/Pakistan/95/H7N3) ที่ผ่านกระบวนการ inactivate ในการเตรียมวัคซีน ซึ่ง H7N3 เป็นเหมือน marker vaccine หรือเป็นวัคซีนที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสัตว์ที่ติดเชื้อในพื้นที่กับสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนได้ หรือเรียกวัคซีนชนิดนี้ว่า DIVA vaccine (Differentiating infected from vaccinated animals) [15]

หลังจากนโยบายการใช้วัคซีนหมดลง ประเทศ Italy มีการสำรวจซีรั่มสัตว์ปีกด้วยวิธี haemagglutinin inhibition tests ในไก่งวงเนื้อ และตรวจพบ avian influenza viruses สายพันธุ์ H7N3 ประเภท LPAI ในเดือน ตุลาคม 2002 ที่จังหวัด Brescia ซึ่งเป็นเชื้อตัวใหม่ที่สามารถแยกได้

ในประเทศ Italy มีการใช้วัคซีนควบคู่การทำลายสัตว์ จำนวน 6 ล้านตัว และมีรายงานการระบาดของ avian influenza viruses ครั้งสุดท้ายเมื่อวันที่ 30 กันยายน 2003 [15]

เดือนกุมภาพันธ์ 2003 ตรวจพบ avian influenza viruses สายพันธุ์ H7N7 ประเภท HPAI ในฟาร์มของจังหวัด Gelder Valley ประเทศ Netherlands เป็นเหตุให้มีสัตว์ปีกตายจำนวน 30 ล้านตัว และในช่วงกลางเดือนเมษายน 2003 เชื้อระบาดไปสู่ประเทศ Belgium เกิดการระบาด 8 จุด สัตว์ตายจำนวน 2.3 ล้านตัว และระบาดที่ประเทศ Germany มีสัตว์ตายจำนวน 419,000 ตัว ทั้งสามประเทศใช้วิธี stamped out ในการควบคุมการเกิดโรค [15]

ทวีปอเมริกา

ในปี 1994 ที่ประเทศ Mexico พบการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N2 ประเภท HPAI ที่เกิดการ mutation ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกประเภท LPAI ทำให้มีการระบาดถึงปี 1997 และในปีนี้ประเทศ Mexico นำวัคซีน H5N2 ที่เป็นเชื้อตายและวัคซีน recombinant Pox-H5 มาใช้ในการควบคุมโรค จากการระบาดในประเทศ Mexico ทำให้มีการแพร่กระจายเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสู่ประเทศในกลุ่มอเมริกากลาง [15]

ในปี 2000 ที่ประเทศ Guatemala และประเทศ El Salvador ในปี 2001 ซึ่งเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่พบเป็นสายพันธุ์ H5N2 และทั้งสองประเทศควบคุมโดยใช้วัคซีนเหมือนประเทศ Mexico ในช่วงที่ทั้งสามประเทศมีการระบาดของโรคเกิดขึ้น [15]

ประเทศสหรัฐอเมริกา มีการระบาดที่รัฐ Pennsylvania ระหว่างเดือน ธันวาคม ปี 1996 ถึงเดือน เมษายน 1997 มีสัตว์ปีกติดเชื้อประมาณ 2.5 ล้านตัว โดยตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H7N2 ประเภท LPAI มีสัตว์ปีกที่แสดงอาการ 25% ประเทศสหรัฐอเมริกามีการควบคุมโดย Biosecurity และลดประชากรสัตว์ที่ติดเชื้อลง [15]

ในปี 2000 ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H7N1 ประเภท LPAI ในไก่งวงที่ Ontario ในประเทศ Canada สัตว์มีอาการของโรคและมีการผลิตไข่ลดลง มีการควบคุมโรคด้วยวิธี stamped out [15]

จากนั้นในปี 2002 ตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H7N2 ประเภท LPAI อีกครั้งที่รัฐ Virginia ประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งควบคุมโรคด้วยวิธี stamped out มีสัตว์ปีกถูกทำลายเป็นจำนวน 5 ล้านตัว สูญเสียงบประมาณเป็นจำนวน 149 ล้านดอลลาร์ อีกหนึ่งปีถัดมาตรวจพบการเกิดโรคไข้หวัดนก สายพันธุ์ H7N2 ประเภท LPAI ที่รัฐ Delaware ในเดือนกุมภาพันธุ์ 2004 จำนวน 2 ฟาร์ม มีสัตว์ติดเชื้อ 11,000 ตัว [15]

ต่อมาในเดือน มีนาคม 2004 พบฝูงไก่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H7N2 ประเภท LPAI ซึ่งเป็นผลมาจากการระบาดในรัฐ Delaware ทำให้มีสัตว์ติดเชื้อในฟาร์มประมาณ 118,000 ตัว และต้องปิดฟาร์มเพื่อควบคุมและลดการเกิดโรค ในระหว่างเดือนกุมภาพันธุ์ 2004 ตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N2 ประเภท HPAI ในรัฐ Texas ในไก่ จำนวน 6,608 ตัว ซึ่งการติดเชื้อครั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการระบาดในประเทศ Mexico จากนั้นในเดือนมีนาคม 2004ประเทศ Canada พบเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H7N3 ประเภท LPAI ที่ British Columbia มีสัตว์ปีกสูญเสีย 16,000 ตัว และห่างไปอีก 3 กิโลเมตร ตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์H7N3 ประเภท HPAI เป็นครั้งแรก ได้มีการควบคุมโรคด้วยวิธี stamped out [15]

ทวีปเอเชีย

ในปี 1995 พบการระบาดของ avian influenza viruses สายพันธุ์ H7N3 ประเภท HPAI ในทางตอนเหนือของประเทศปากีสถาน ซึ่งมีสัตว์ตายจำนวน 3.2 ล้านตัว และในปี 2001 สามารถแยกเชื้อได้จากไก่ ทางตอนใต้ของเมือง Islamabad เป็นเชื้อ avian influenza viruses สายพันธุ์ H9N2 และ H7N3 ซึ่ง H7N3 มีทั้งประเภท HPAI และ LPAI มีการใช้วัคซีนที่มี H7 ร่วมกับ H9 oil - based inactivated vaccine และควบคุมการเกิดโรคโดย Biosecurity การระบาดครั้งนี้สูญเสียสัตว์ปีกมากกว่า 7.8 ล้านตัว [15]

ในปี 1996 พบ avian influenza viruses สายพันธุ์ H5N1 ประเภท HPAI เป็นครั้งแรกในภูมิภาคเอเชีย ที่ประเทศ China ในเมือง Guangdong เกิดการระบาดในไก่และติดต่อไปที่เขตเศรษฐกิจ Hong Kong [28] ในปี 1997 เดือน มีนาคม ถึง พฤษภาคม และเกิดการระบาดซ้ำในเดือนพฤศจิกายน และธันวาคม 1999 ควบคุมโรคโดยทำลายสัตว์ปีกและนำสัตว์ปีกบางส่วนมาประกอบอาหาร [15]

จากนั้นมีการระบาดอีกครั้งในปี 2001 ซึ่งมีผลทำให้ประเทศ Korea มีสัตว์ติดเชื้อ avian influenza viruses สายพันธุ์ H5N1 ประเภท HPAI และปี 2002 เป็นผลให้ 22 ฟาร์มติดเชื้อระหว่างเดือนมกราคม ถึงมีนาคม 2002 ต้องทำลายสัตว์เป็นจำนวน 950,000 ตัว และในเดือนเมษายน 2002 เขตเศรษฐกิจ Hong Kong ประกาศให้มีการใช้วัคซีนที่เตรียมจาก avian influenza viruses สายพันธุ์ H5N2 [15]

การระบาดในระหว่างวันที่ 12 ธันวาคม 2003 ถึง 27 มกราคม 2004 พบ 9 ประเทศในแถบเอเชียมีการระบาดของ avian influenza viruses สายพันธุ์ H5N1 ประเภท HPAI ในสัตว์ปีก ได้แก่ ประเทศเกาหลี, เวียดนาม, ญี่ปุ่น, ไทย, ปากีสถาน, กัมพูชา, ลาว, อินโดนีเซีย,และจีน [15] มีการทำลายสัตว์ปีกไปกว่า 150 ล้านตัว มีผู้ติดเชื้อและเสียชีวิตในประเทศ เวียดนาม และ ไทย

ต่อมาในเดือนเมษายน 2005 เกิดการระบาดอีกครั้งในประเทศอินโดนีเซีย, เวียดนาม, จีน, ไทย [2] ตั้งแต่มีการระบาดของโรคจนถึงวันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2009 มียอดผู้ติดเชื้อทั้งสิ้น 403 คน และยอดผู้เสียชีวิตทั้งสิ้น 256 คน ปัจจุบันประเทศจีนและเวียดนาม ซึ่งเป็นเพื่อนบ้านยังคงมีผู้ติดเชื้อและผู้เสียชีวิตด้วยโรคไข้หวัดนกอยู่ [29]

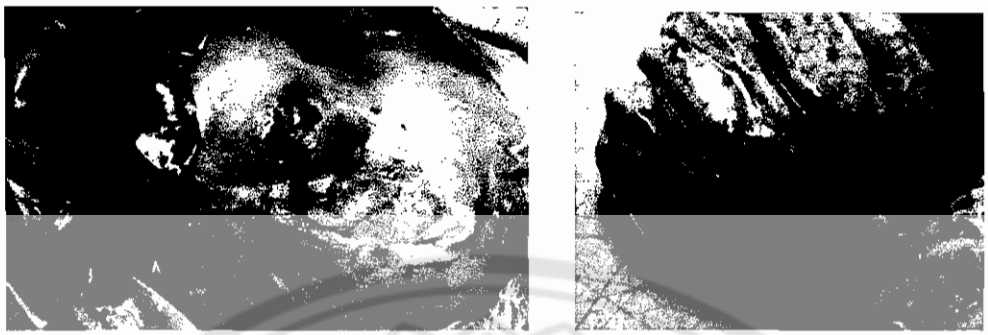
ระยะฟักตัว

Avian influenza viruses เมื่อสัตว์ติดเชื้อ avian influenza viruses ประเภท HPAI ระยะฟักตัวในสัตว์ มีตั้งแต่ไม่กี่ชั่วโมง ถึง 3 วัน [2] ในกรณีที่เลี้ยงในโรงเลี้ยงแบบปิด และในกรณีที่เลี้ยงทั่วไปหรือเป็นฝูง มีระยะฟักตัวนานถึง 14 วัน จึงมีอาการของโรค ซึ่งการฟักตัวของเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ วิธีการรับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย จำนวนเชื้อและชนิดสัตว์ ในรายที่เชื้อฟักตัวระยะสั้น สัตว์ตายทันทีทำให้ไม่พบวิการใดๆ แต่ในรายที่เชื้อค่อยๆ ฟักตัว สัตว์มีอาการซูบผอม ซึม ไม่กินอาหาร ขนยุ่ง ปริมาณไข่ลดลง น้ำตาไหลมาก หน้าบวม หงอนมีสีคล้ำ ดังภาพ 9 เมื่อสัตว์ตาย มีวิการดังนี้ ที่หลอดลมอักเสบรุนแรง มีเมือกมาก มีจุดเลือดออกที่กระเพาะแท้ โดยเฉพาะตรงรอยต่อกับกิ๋น ไตบวมแดง เป็นต้น ดังภาพ 10 [30] ในสัตว์บางชนิดเช่นนก หรือเป็ด อาจไม่แสดงอาการป่วยแต่เป็นตัวแพร่เชื้อ

ก. ข.

ภาพ 9 แสดงอาการของสัตว์ป่วย
ก ไก่ที่ป่วยจนหน้าบวมและหงอนมีสีคล้ำและตาย
ข เป็ดป่วยมีอาการกระจกตาอักเสบเป็นฝ้าหรือขุ่น (ตัวบน)

ที่มา: [30]



ก. ข.

ภาพ 10 แสดงอวัยวะของสัตว์ที่ตาย
ก จุดเลือดออกของเยื่อหุ้มต่างๆ ในสัตว์ที่ตาย
ข ปอดอักเสบและบวมน้ำ

ที่มา: [30]

การควบคุมและป้องกันโรค

การระบาดของโรคไข้หวัดนกที่เกิดขึ้นทั่วโลก ทำให้ OIE มีเกณฑ์ในการป้องกันและควบคุมโรคไข้หวัดนกขึ้น เพื่อให้ประเทศที่มีการระบาดของโรคนี้สามารถนำไปปฏิบัติตามหรือเป็นนโยบายของประเทศนั้นๆได้ ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่นำเอาเกณฑ์นี้มาใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคไข้หวัดนก

การป้องกันและการควบคุมโรคไข้หวัดนกของ OIE มีดังนี้

1. Contingency Planning การวางแผนรับมือการเกิดโรคระบาด โดยมีการเตรียมความพร้อมในด้านต่างๆ ก่อนที่จะเกิดโรคจริง [31]

2. Zoning and Compartmentalization การแบ่งโซนการเกิดโรคระบาดเพื่อกำจัด, ควบคุมและป้องกันการเกิดโรคซ้ำ [31]

3. Culling เป็นการทำลายสัตว์ที่ติดเชื้อโรคไข้หวัดนก [31]

4. Strategic Vaccination ในกรณีที่มีการระบาดอย่างรุนแรง ทำให้สัตว์ตายเป็นจำนวนมาก อาจมีการใช้วัคซีนซึ่งวัคซีนจะช่วยลดการแพร่เชื้อไวรัสไข้หวัดนก แต่วัคซีนที่สามารถใช้ได้ต้องเป็นวัคซีนที่สามารถแยกความแตกต่างของแอนติบอดีจากสัตว์ที่ติดเชื้อกับสัตว์ที่ได้รับวัคซีนได้หรือ

ที่เรียกว่า Differentiation of Infected from Vaccinated Animals (DIVA) ซึ่งใช้ได้ผลในประเทศอิตาลี [31]

5. Decontamination and Disposal เป็นการลดการติดเชื้อโรคระหว่างที่มีการระบาดของโรค และการจัดการกับซากสัตว์ที่ติดเชื้อ รวมถึงอุปกรณ์, สิ่งแวดล้อมบริเวณที่เกิดโรค [31]

6. Wildlife เป็นการป้องกันสัตว์ปีกที่เลี้ยงแบบหลังบ้านจากโรคไข้หวัดนกโดยต้องเข้าใจพฤติกรรมของไวรัสในสัตว์ป่า ซึ่งเป็นพาหะของโรคนี้ และบางประเทศมีรายงานการเกิดโรคไข้หวัดนกในสัตว์ป่า ซึ่งสัตว์ปีกที่เลี้ยงแบบหลังบ้านต้องมีหลักการเลี้ยงที่มีมาตรฐานและถูกสุขอนามัยจึงสามารถปลอดจากโรคนี้ได้ [31]

7. Food Safety เป็นการจัดการการเลี้ยงสัตว์ปีกให้ได้มาตรฐานและถูกสุขอนามัย เพื่อลดการเกิดโรคไข้หวัดนกและโรคระบาดอื่นที่สามารถเกิดกับสัตว์ปีกได้ [31]

8. Import/Export Considerations พิจารณาถึงการนำเข้าและส่งออกของสัตว์ปีกในเชิงพาณิชย์ [31]

9. Compensation เมื่อมีการทำลายสัตว์ควรมีการชดเชยค่าเสียหายให้แก่เกษตรกรหรือเลี้ยงสัตว์ปีก [31]

ซึ่งทั้งหมดนี้กรมปศุสัตว์ได้นำมาใช้เป็นนโยบายของกรมฯ โดยเริ่มจากมีประกาศเรื่องนิยามของโรคไข้หวัดนกในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ (Case Definition for Notifiable Avian Influenza) ในวันที่ 1 กรกฎาคม 2548 โดยมีการกำหนดนิยามของโรคไข้หวัดนกกรณีสงสัยว่าป่วยหมายความว่า

1. สัตว์ปีกที่ถูกเลี้ยงในระบบฟาร์ม มีอัตราการตายอย่างน้อยร้อยละ 1 ใน 2 วันหรือมีอัตราการกินอาหารและน้ำลดลงร้อยละ 20 ใน 1 วัน หรือ

2. สัตว์ปีกที่ถูกเลี้ยงแบบหลังบ้าน มีอัตราการตายอย่างน้อยร้อยละ 5 ใน 2 วัน

3. สัตว์ปีกตามข้อ 1 และ 2 แสดงอาการอื่นร่วมด้วยดังนี้

3.1 ตายกะทันหัน

3.2 อาการระบบทางเดินหายใจ เช่น หายใจลำบาก หน้าบวม น้ำตาไหล

3.3 อาการทางระบบประสาท เช่น ชัก คอบิด

3.4 ท้องเสีย หรือขนยุ่ง ซึม ไม่กินอาหาร ไข่ลด ไข่รูปร่างปกติ หงอนเหนียงสีคล้ำหรือหน้าแข้งมีจุดเลือดออก [32,33]

จากนิยามนี้จะทำให้การดำเนินการควบคุมและป้องกันโรคไข้หวัดนกเกิดประสิทธิภาพและเป็นไปในทางเดียวกัน ทำให้หน่วยงานต่างๆภายในกรมปศุสัตว์สามารถปฏิบัติการควบคุมและ

ป้องกันโรคได้อย่างถูกต้องตรงกันตามนโยบาย ซึ่งตามนโยบายได้แบ่งภาวะการเกิดโรคระบาดออกเป็น 2 ส่วน คือ ภาวะปกติ และภาวะของการเกิดโรคระบาด [32,33]

ภาวะปกติ เจ้าหน้าที่จะมีการเตรียมความพร้อมในด้านต่างๆ ดังนี้

1. การเตรียมความพร้อมในด้านบุคลากร มีการตั้งหน่วยควบคุมโรคเฉพาะกิจเตรียมไว้ตามกิจกรรมต่างๆ ได้แก่

1.1 เฝ้าระวังโรค

1.2 สอบสวนโรค

1.3 ควบคุมเคลื่อนย้ายและกักกัน

1.4 ทำลายสัตว์

1.5 ทำลายเชื้อโรค

1.6 ประชาสัมพันธ์และประสานงานกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

2. การเตรียมความพร้อมในด้านข้อมูลและรายงานผลการปฏิบัติงาน

3. เตรียมความพร้อมด้านวัสดุ อุปกรณ์และยานพาหนะ

4. เฝ้าระวังโรค

5. ควบคุมเคลื่อนย้ายและกักกัน

6. พัฒนาบุคลากรและซักซ้อมความเข้าใจ

7. เตรียมงบประมาณ

8. ซ้อมปฏิบัติจริงตามเหตุการณ์สมมุติ

ภาวะเกิดโรคระบาด เมื่อศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ทั้ง 7 แห่ง ตรวจพบโรคไข้หวัดนกหรือสงสัยหรือทางหน่วยงานของกรมปศุสัตว์ได้รับแจ้งมีการตายตามนิยามโรคไข้หวัดนก เจ้าหน้าที่ที่รับผิดชอบในพื้นที่นั้นๆ จะมีการดำเนินงานตามนโยบายของกรมปศุสัตว์ที่กำหนดไว้ โดยมีการสอบสวนโรคในพื้นที่เบื้องต้น ถ้าสงสัยจะมีการเก็บตัวอย่างส่งศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ที่อยู่ในพื้นที่ เมื่อผลการตรวจวินิจฉัยว่าไม่พบโรคไข้หวัดนกในตัวอย่างส่งตรวจ ต้องดำเนินการตรวจสอบหาสาเหตุอื่นๆ ทั้งทางห้องปฏิบัติการและให้เจ้าหน้าที่ในพื้นที่นั้นลงพื้นที่เพื่อหาสาเหตุโรคด้วย เมื่อทราบว่าตัวอย่างที่ส่งตรวจเป็นโรคใดจะมีการประชาสัมพันธ์ให้ประชาชนในพื้นที่ทราบ และกรณีที่ผลการตรวจวินิจฉัยว่าพบโรคไข้หวัดนกในตัวอย่างส่งตรวจ ให้เจ้าหน้าที่ในพื้นที่นั้นลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างส่งตรวจยืนยันกับทางศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ สำหรับผลการวินิจฉัยในครั้งแรกให้มีการรายงานเบื้องต้นไปยังส่วนงานที่รับผิดชอบภายในกรมปศุสัตว์ซึ่งเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ในพื้นที่เกิดโรคต้องลงพื้นที่สอบสวนโรคโดยละเอียด, มีการประกาศให้พื้นที่

นั้นเป็นพื้นที่เขตโรคระบาดและระดมกำลังหน่วยควบคุมโรคเฉพาะกิจลงพื้นที่เพื่อทำลายสัตว์และทำลายเชื้อโรคและรายงานไปยังสาธารณสุขจังหวัดทันทีเพื่อลงพื้นที่ติดตามประชาชนที่อาจติดโรคไข้หวัดนก และร่วมมือกับหน่วยงานอื่นเช่น กระทรวงกลาโหม, กระทรวงมหาดไทย, กระทรวงสาธารณสุข หรือกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เพื่อควบคุมการระบาดของโรคดังนี้

1. **ควบคุมเคลื่อนย้ายและกักกัน โดยการห้ามเคลื่อนย้ายสัตว์ปีกและซากในพื้นที่รัศมี** 10 กิโลเมตร รอบจุดเกิดโรคเป็นเวลาอย่างน้อย 30 วัน [32,33]

2. ทำลายสัตว์ สัตว์ปีกจะถูกทำลายทันที ถ้าได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคไข้หวัดนก ซึ่งการทำลายรวมถึงสัตว์ปีกที่อยู่ในพื้นที่ในรัศมีที่กำหนด และในการระบาดรอบสองให้มีการทำลายสัตว์ปีกที่สงสัยว่าเป็นโรคไข้หวัดนกทันทีโดยไม่ต้องรอผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ การทำลายสัตว์มีการควบคุมการทำลายสัตว์ปีกโดยเลือกวิธีที่เหมาะสมภายใต้หลักการสวัสดิภาพสัตว์ (Animal Welfare) ที่ไม่ทำให้สัตว์ได้รับความทุกข์ทรมาน โดยการใช้ก๊าซรมควัน ซึ่งใช้ก๊าซคาร์บอนโมนอกไซด์หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในเต็นท์รมก๊าซ สำหรับการทำลายซากและผลิตภัณฑ์สามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการเผาในเตาเผาซาก และวิธีการฝังใต้ระดับดินไม่น้อยกว่า 50 เซนติเมตร และต้องอยู่ห่างจากแหล่งน้ำแล้วราดทับด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น คลอรีน หรือปูนขาว บนซากสัตว์ปีกและบริเวณหลุมแล้วฝังกลบทับให้แน่นโดยให้ดินพูนสูงกว่าระดับผิวดินไม่น้อยกว่า 50 เซนติเมตร แล้วทำการพ่นน้ำยาฆ่าเชื้อให้ทั่วบริเวณที่ฝัง หลังจากทำลายสัตว์แล้ว จึงมีการจ่ายค่าทำลายสัตว์แก่เกษตรกรตามราคาที่รัฐบาลกำหนด โดยผู้ว่าราชการจังหวัดเป็นจ่ายให้ [32,33]

3. ทำลายเชื้อโรค มีทำลายเชื้อโรคในที่เกิดโรคหรือควบคุมให้เกษตรกรดำเนินการทำลายเชื้อโรค ดังนี้

3.1 ยานพาหนะ ใช้เครื่องพ่นยาฆ่าเชื้อฉีดพ่นยานพาหนะที่บรรทุกสัตว์ปีก พ่นบนรถและล้อรถให้ทั่วทุกซอกทุกมุมด้วยน้ำยากลุ่มฟอร์มาลดีไฮด์ กลุ่มกลูตารัลดีไฮด์ กลุ่มควอเตอร์นารีแอมโมเนีย กลุ่มฟีนอล หรือสารประกอบคลอรีน [32,33]

3.2 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ในโรงเรือน ให้แช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ ทำการล้างและขัดวัสดุอุปกรณ์ในน้ำผงซักฟอก เพื่อขจัดคราบไขมันและสิ่งสกปรกต่างๆ [32,33]

3.3 โรงเรือน ล้างและขัดโดยใช้ผงซักฟอกจากนั้นฉีดพ่นให้ทั่วโรงเรือนด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อทุกวันเช้า-เย็น [32,33]

3.4 ถาดไข่ แช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อหรือผงซักฟอกเป็นระยะเวลา 30 นาที หรือรมควัน **ถาดไข่ในห้องปิดโดยใช้ฟอร์มาลิน 25 ml ต่อด่างทับทิม 12.5 g ในพื้นที่ 1 ลูกบาศก์เมตร เป็นระยะเวลา20 นาที, ไข่ ให้จุ่มไข่ในน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มไฮโปคลอไรด์หรือสารประกอบฟีนอลหรือ**

รมควันเช่นเดียวกับถาดไข่ และน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ควรใช้น้ำยาคลอรีนผสมลงในน้ำทิ้งต่างๆ เพื่อฆ่าเชื้อโรค [32,33]

ก่อนที่จะสัมผัสสัตว์ป่วยหรือซากสัตว์หรือจะทำลายสัตว์ ควรป้องกันตนเองโดยการสวมผ้าพลาสติกกันเปื้อน ผ้าปิดปากและจมูก ถุงมือ หมวก ทุกครั้ง หลังเสร็จจากงานควรนำเสื้อผ้าที่ใช้แล้ว ผ้าพลาสติกกันเปื้อน ผ้าปิดปากและจมูก ถุงมือ หมวก แช่ด้วยผงซักฟอกก่อนจึงซักล้าง ส่วน ผ้าพลาสติกกันเปื้อน ผ้าปิดปากและจมูก ถุงมือ หมวก ที่เป็นชนิดใช้แล้วทิ้งให้นำไปฝังหรือเผาและรีบอาบน้ำฟอกสบู่ให้สะอาดและสวมเสื้อผ้าชุดใหม่ [32,33]

1. การประชาสัมพันธ์และประสานงานกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง โดยเมื่อสัตว์ปีกสงสัยว่าเป็นโรคไข้หวัดนกให้แจ้งผู้ว่าราชการจังหวัดและสาธารสุขจังหวัดเพื่อเฝ้าระวังโรคในคนทันที, มีการแลกเปลี่ยนข้อมูลการเกิดโรคในนกกับกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เพื่อควบคุมโรคให้ได้ผลดี และมีการประชาสัมพันธ์ให้เกษตรกรทราบการระบาดของโรคไข้หวัดนก การป้องกันโรค, การทำลายสัตว์และการทำลายเชื้อโรค [32,33]

2. การเฝ้าระวังโรค มีการดำเนินการเฝ้าระวังโรคในพื้นที่รัศมี 10 กิโลเมตร รอบจุดเกิดโรคดังนี้ 2.1 เฝ้าระวังอาการทางคลินิก [32,33]

2.2 สุ่มเก็บตัวอย่างอุจจาระส่งห้องปฏิบัติการที่ความเชื่อมั่น 99% คือ ฟาร์มทุกฟาร์มเก็บอุจจาระส่งโรงเรือนละ 60 ตัว และสัตว์ปีกปล่อยเลี้ยงเก็บหมู่บ้านละ 20 ตัว [32,33]

สำหรับการควบคุมและป้องกันโรคไข้หวัดนกที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดและมีราคาถูกเป็นการป้องกันโรคในฟาร์มซึ่งใช้ระบบความปลอดภัยทางชีวภาพหรือเรียกว่า Farm biosecurity ซึ่งเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยสำหรับผู้เลี้ยงสัตว์ปีก การป้องกันแบบนี้เป็นระบบการป้องกันหรือลดโอกาสในการนำเชื้อโรคเข้าสู่หรือออกจากฟาร์มหรือโรงเรือน สถานที่เลี้ยงสัตว์ โรงฆ่าสัตว์ โรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์จากสัตว์ รวมไปถึงรถขนส่งภาชนะอุปกรณ์ การจัดการขยะ ซากสัตว์ และน้ำทิ้ง สิ่งที่สำคัญของระบบนี้คือ ต้องมีการแยกส่วนระหว่างบริเวณที่ปลอดเชื้อโรคออกจากกัน [32,33]

การระบาดของโรคที่เกิดขึ้นเกิดจากเชื้อโรคที่เข้ามาในฟาร์ม ซึ่งมาได้ 3 ทาง คือ ทางบก ทางน้ำ และทางอากาศ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม [32,33] ได้ดังต่อไปนี้

1. **เข้ามากับแหล่งของวัตถุดิบที่เข้าสู่ฟาร์ม เช่น น้ำที่ใช้ในฟาร์ม วัสดุรองพื้น แกลบ อุปกรณ์นำมาใช้ในโรงเรือน ลูกไก่ที่นำมาเลี้ยงใหม่ การนำสัตว์ปีกที่ติดเชื้อโรคหรือเป็นพาหะนำเชื้อโรคเข้าสู่ฟาร์ม**
2. **เข้ามากับยานพาหนะ ที่เข้ามาในฟาร์มหรือโรงเรือน เช่น รถขนส่งไก่หรือรถขนขี้ไก่**
3. **เข้ามากับคน เช่น คนงานประจำภายในฟาร์ม คนงานที่เข้าไปจับไก่หรือผู้เข้ามา**

เยี่ยมชม

4. เข้ามากับสัตว์พาหะ เช่น นกประจำถิ่นที่เข้ามากินหรือพักอาศัยในบริเวณนั้น สัตว์ที่อาศัยอยู่บริเวณนั้นเช่น หนู สุนัข แมว แมลงต่างๆ เช่น แมลงวัน, แมลงปีกแข็ง

5. เข้ามากับฝุ่น ละออง หรืออากาศที่พัดเข้า – ออก เป็นเหตุให้เมื่อมีสภาวะเกิดโรคระบาดต้องกำจัดไก่ในพื้นที่รอบๆ ภายในรัศมีตามกำหนด

จากทั้ง 5 ข้อ จะเห็นว่าทางที่เชื้อโรคสามารถเข้ามาได้นั้นมีหลายทาง ซึ่งจะต้องมีการป้องกันโรคที่จะเกิดในฟาร์ม มีข้อปฏิบัติ 3 ข้อ [32,33] คือ

1. การควบคุมการเข้า-ออกจากฟาร์ม และภายในฟาร์ม เป็นการควบคุมทั้งคน สัตว์ และยานพาหนะ, มีการทำความสะอาดวัสดุอุปกรณ์ รวมถึงยานพาหนะด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ และไม่ใช้น้ำจากแหล่งน้ำสาธารณะ เมื่อเข้าสู่ฟาร์ม ต้องมีห้องสำหรับเปลี่ยนเสื้อผ้าและห้องทำความสะอาดร่างกาย มีการฆ่าเชื้อที่รองเท้าก่อนเข้าฟาร์มโดยต้องเปลี่ยนรองเท้าที่ห้องเปลี่ยนเสื้อผ้า และเมื่อออกจากฟาร์มทำเช่นเดียวกับตอนเข้าฟาร์ม

2. การกำจัดให้สัตว์อยู่ในบริเวณสภาพแวดล้อมที่มีการควบคุม ฟาร์มควรมีรั้วกั้นให้เป็นสัดส่วน นอกจากนี้เลี้ยงสัตว์แยกตามกลุ่มอายุ

3. การทำความสะอาดและทำลายเชื้อโรค มีการทำความสะอาดอุปกรณ์ต่างๆก่อนและหลังเข้า-ออกจากฟาร์ม รวมทั้งยานพาหนะ คนที่เข้า-ออกจากฟาร์ม มีการรักษาความสะอาดในโรงเรือน โรงเรือนควรมีตาข่ายปิดเพื่อป้องกันไม่ให้สัตว์อื่นๆเช่น นก หนู เข้ามาในโรงเรือน หากมีสัตว์ปีกป่วยหรือตายอย่างผิดปกติ ให้รีบแจ้งเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ในพื้นที่ทันที และไม่นำสัตว์ปีกที่ป่วยตายทิ้งลงในแหล่งน้ำ ควรทำลายสัตว์ปีกตามวิธีที่กล่าวแล้ว ขยะทั้งหมดในฟาร์มควรทำลายโดยวิธีฝังหรือเผา

ปัจจุบันกรมปศุสัตว์มีหลักเกณฑ์ในการนำสัตว์ปีกเข้าเลี้ยงใหม่และมีการกำหนดเกณฑ์ของฟาร์มสัตว์ปีกมาตรฐาน ซึ่งเป็นการช่วยให้ฟาร์มที่ผ่านการตรวจรับรองจากกรมปศุสัตว์ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคระบาดของสัตว์ปีกไม่เฉพาะแต่โรคไข้หวัดนกเพียงอย่างเดียวยังรวมถึงโรคของสัตว์ปีกชนิดอื่นๆด้วย ทำให้ระบบ Farm biosecurity มีประสิทธิภาพมากตามที่ OIE แนะนำ

วัคซีนสำหรับป้องกันโรคไข้หวัดนก

การควบคุมโรคไข้หวัดนกสามารถทำให้สำเร็จได้ นอกจากการใช้วัคซีน ยังต้องอาศัย strict surveillance และใช้ biosecurity ควบคู่กันไป [34] การใช้วัคซีนเป็นเครื่องมือเบื้องต้นที่ช่วยทำให้สัตว์มีความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกได้มากขึ้นคือ การฉีดวัคซีนช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์ การทำโปรแกรมการฉีดวัคซีนที่ดีจะช่วยเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันในฝูง

ป
SF
995.6
.V55
ป6720
2552
1.45679973
สำนักหอสมุด
17 ก.ค. 2552

สัตว์ที่ได้รับวัคซีน อีกทั้งช่วยเพิ่มความทนทานต่อการติดเชื้อ ซึ่งถ้ามีการติดเชื้อ การแสดงอาการจะลดลงและปริมาณเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ออกมาพร้อมกับสารคัดหลั่งสู่สิ่งแวดล้อมจะมีปริมาณที่น้อยลงเช่นกัน [5, 34-37] ซึ่งทั้งหมดเป็นข้อดีในการใช้วัคซีน แต่การใช้วัคซีนไม่ได้ช่วยป้องกันการติดเชื้อไข้หวัดนกสู่สิ่งแวดล้อม ถ้าสัตว์ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเป็นปริมาณที่สูงมาก สัตว์ที่ได้รับวัคซีนเมื่อได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะไม่แสดงอาการของสัตว์ที่ได้รับเชื้อและไวรัสจะถูกปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม [34] ถ้าไม่มีการจัดการฟาร์มที่มีประสิทธิภาพ และไม่มีการเฝ้าระวังหลังฉีดวัคซีนเข้าสู่สัตว์ อาจมีการกระจายของเชื้อไข้หวัดนกออกสู่สิ่งแวดล้อมทำให้เกิดการระบาดอีกครั้งอย่างประเทศปากีสถานและแม็กซิโก [34,35] และการใช้วัคซีนเป็นการรบกวนการดำเนินการเฝ้าระวังทางซีรั่ม มีผลทำให้การควบคุมและกำจัดโรคไข้หวัดนกไม่มีประสิทธิภาพ [14,35]

ในกลุ่มยุโรปมีการใช้วัคซีนในช่วงที่มีการระบาด แต่มีข้อกำจัดเนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างของวัคซีนที่ฉีดให้กับสัตว์ได้คือแยกไม่ได้ว่าสัตว์ได้รับเชื้อจากวัคซีนหรือสัตว์ได้รับการติดเชื้อจากธรรมชาติ [4] การฉีดวัคซีนเป็นการใช้เพื่อควบคุมการระบาดของไวรัสไข้หวัดนกที่ทราบสายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตาม อาจมีผลกระทบต่อการค้าที่มีนโยบายไม่ให้ใช้วัคซีน [3]

ในปัจจุบันมีการใช้วัคซีนหลายประเภท ได้แก่

Inactivated homologous vaccines : เป็นการเตรียมวัคซีนโดยวิธีดั้งเดิม ซึ่งใช้ยีนทั้งหมดของไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ที่ใช้ทำวัคซีนเป็นสายพันธุ์ที่เกิดโรคในพื้นที่นั้น มีใช้ในแม็กซิโกและปากีสถาน ข้อเสียของระบบนี้คือไม่สามารถแยกความแตกต่างในการใช้วัคซีนได้ [4] วิธีการผลิตวัคซีนไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ใช้ inactivated whole virus vaccine เป็นวัคซีนที่มีราคาไม่แพง วัคซีนนี้ถูกผลิตจาก allantoic fluid emulsified ที่ไม่มีการทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำมาผสมลงใน adjuvant ที่เป็นน้ำมัน แม้ว่าวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนกสามารถใช้ได้ดีแต่ในส่วนของการควบคุมและกำจัดไวรัสที่เป็น LPAI หรือ HPAI ยังทำไม่ได้ [6] และยังไม่สามารถแยกความแตกต่างในการใช้วัคซีนได้จากสัตว์ที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติได้ [4] โดยวิธีทางซีโรโลยี [3]

Inactivated heterologous vaccines : การผลิตวัคซีนทำได้ง่ายเหมือนวิธี Inactivated homologous vaccines แต่ต่างกันที่สายพันธุ์ที่ใช้ผลิตวัคซีน วิธีนี้ใช้ Heamagglutinin ที่เกิดโรคในขณะนั้นและใช้ Neuraminidase ที่ต่างจากการเกิดโรคในขณะนั้น การติดตามในพื้นที่ เกี่ยวกับการป้องกันโรคและการเพิ่มขึ้นของสารคัดหลั่งโดยระบบภูมิคุ้มกันที่เพิ่มมากขึ้นโดยกลุ่ม Heamagglutinin, ในขณะที่ใช้ Neuraminidase เป็นตัวชักนำให้แอนติบอดีต่อต้าน และสามารถใช้ Neuraminidase เป็นตัวบ่งชี้ว่าพื้นที่นั้นเกิดการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก [36] และวิธีการนี้เป็นวิธีพื้นฐานที่มีการพัฒนาเป็น DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) ซึ่งใช้

Neuraminidase เป็นตัวแยกความแตกต่างระหว่างสัตว์ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกกับสัตว์ที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนก ในประเทศอิตาลี [13]

Recombinant vaccines : recombinant fowlpox virus ที่ใช้ H5 เป็นแอนติเจนมีการใช้ Recombinant ไวรัสในการควบคุมโรคไข้หวัดนกที่เกิดขึ้นในประเทศแม็กซิโก [37] เพื่อต่อต้านไวรัส LPAI H5N2 และวัคซีนนี้ไม่มีการใช้ในกลุ่มประเทศ EU [4]

การห้ามมิให้นำเข้าสินค้าประเภทสัตว์ปีกหรือผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกจากประเทศที่มีการใช้วัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนก และสัตว์ปีกเศรษฐกิจที่ติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5 และ H7 ทำให้มีการสูญเสียทางเศรษฐกิจของประเทศนั้นเป็นอย่างมากทำให้ไม่มีการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5 และ H7 [4] ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้ DIVA vaccine ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างจากสัตว์ที่ใช้วัคซีนได้อย่างถูกต้อง และมีจุดประสงค์เพื่อเป็นระบบเตือนที่สามารถสืบค้นการใช้วัคซีนในพื้นที่ได้หลังจากมีการให้วัคซีนและการติดเชื้อในฝูงสัตว์อาจเกี่ยวกับการจัดการฟาร์มที่ไม่มีประสิทธิภาพ

การแยกแตกต่างของสัตว์ที่ติดเชื้อจากสัตว์ที่ถูกฉีดวัคซีน (Differentiating Infected from Vaccinated Animals : DIVA)

ปัจจุบันการใช้วัคซีนถูกนำมาพิจารณาอีกครั้ง ซึ่งการใช้วัคซีนเป็นทางเลือกอีกทางที่ใช้กำจัดโรคไข้หวัดนก เพราะเป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพ และวัคซีนยังเป็นเหมือนเครื่องเตือนให้ทราบถึงการเกิดโรคไข้หวัดนก และสามารถทำ serologic surveillance ได้ โดยการตรวจ HI หลังจากฉีดวัคซีน นอกจากนี้ต้องมีการสุ่มตัวอย่างมา 10 - 20 ตัวต่อฝูง นำมาตรวจซีรั่มและไม่มีผลต่อทางการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งวัคซีนสามารถแยกความแตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยธรรมชาติกับการได้รับวัคซีนและสามารถแยกสัตว์ที่ได้รับวัคซีนกับสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยธรรมชาติได้ มีการใช้ DIVA อยู่ 2 ชนิด คือ Heterologous Neuraminidase และ Nonstructural 1 protein (NS1) [5]

ทางเลือกของการใช้ DIVA ปัจจุบันมองเห็นถึงการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มที่มีต่อไวรัสไข้หวัดนกจึงใช้ Nonstructural 1 protein (NS1) ซึ่งถูกผลิตเป็นโปรตีนออกมาเมื่อเซลล์ของสัตว์ติดเชื้อ ดังนั้น สัตว์ที่ถูกฉีดวัคซีนที่ทำจากเชื้อไวรัสที่นำมาทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งจะไม่มีโปรตีน NS1 ปนอยู่นั้น อาจจะทำให้สัตว์ที่ถูกฉีดวัคซีนไม่สร้างแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อโปรตีน NS1 แต่ในการติดเชื้อโดยธรรมชาติแอนติบอดีต่อโปรตีน NS1 อาจพัฒนาตัวมันเอง ซึ่งสามารถตรวจได้โดยวิธี ELISA [5] การตรวจใช้พื้นฐานของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน ซึ่งโปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนกเป็นตัวเหมาะสมที่สุด ที่จะใช้เป็นแอนติเจน อย่างไรก็ตามวัคซีนที่มีจำหน่ายทั่วไปผลิต

มาจากน้ำไข่ที่ได้มาจากการฉีดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกลงในไข่ไก่ฟัก และนำมาทำให้บริสุทธิ์ ฉะนั้นในวัคซีนยังคงพบชิ้นส่วนของโปรตีน NS1 ที่ปนเปื้อนจากการแตกของเซลล์ในน้ำไข่ และวัคซีนนี้จะตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีน NS1 และแอนติบอดีต่อโปรตีน NS1 ได้นำมาใช้สำหรับ NS1 DIVA ในสัตว์ที่ติดเชื้อโรคไข้หวัดนกในธรรมชาติระดับของแอนติบอดีสูงกว่าระดับแอนติบอดีของสัตว์ที่ได้รับวัคซีน โดยการลดความเข้มข้นของซีรั่มก่อนการทดสอบจะพบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างการใช้วัคซีนกับสัตว์ติดเชื้อได้ โดยวิธี ELISA [6] หรือวิธีทางอิมมูนโลยีอื่น

แม้ว่าวัคซีน DIVA สามารถควบคุมโรคไข้หวัดนกได้ แต่ยังคงมีข้อกำจัดซึ่งในประเทศอิตาลี ได้มีการใช้วัคซีน DIVA ควบคุมโรคไข้หวัดนกแต่ยังคงพบเชื้อไวรัสอยู่ในพื้นที่ที่มีการฉีดวัคซีน จึงได้มีการทำลายสัตว์ปีกทั้งหมด แม้ว่าจะสามารถใช้วัคซีนควบคุมโรคได้ แต่ท้ายที่สุดต้องมีการทำลายสัตว์เช่นกัน สำหรับการใช้วัคซีนในเป็ดนั้นมีความเสี่ยงสูง เนื่องจากเป็ดเป็นพาหะนำเชื้อโรคที่ดีโดยไม่แสดงอาการ จึงต้องมีการติดตามผลซีรั่มหลังจากฉีดวัคซีน DIVA อย่างใกล้ชิด และวัคซีน DIVA เป็นวัคซีนที่มี Neuraminidase ต่างจาก Neuraminidase ในพื้นที่ แต่ถ้ากรณีที่มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกที่มี Neuraminidase ตัวใหม่ วัคซีน DIVA ที่ฉีดเข้าสู่สัตว์แล้วจะไม่สามารถแยกความแตกต่างของแอนติบอดีระหว่างสัตว์ที่ติดเชื้อไข้หวัดนกที่มี Neuraminidase ตัวใหม่ กับสัตว์ที่ติดเชื้อโดยการฉีดวัคซีนได้ [38] ฉะนั้นการตรวจแอนติบอดีต่อโปรตีน Neuraminidase อย่างเดียวไม่น่าเพียงพอ จึงน่าจะมีการตรวจแอนติบอดีต่อโปรตีน NS1 ด้วยเพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจหาความแตกต่างของแอนติบอดีระหว่างสัตว์ที่ติดเชื้อไข้หวัดนกที่มี Neuraminidase ตัวใหม่ กับสัตว์ที่ติดเชื้อโดยการฉีดวัคซีน และไม่เป็นการสูญเสียงบประมาณในการผลิตวัคซีน DIVA อีกทั้งวัคซีนยังสามารถใช้ได้ต่อไป

การตรวจวินิจฉัยโรค

การพัฒนาวัคซีนมีขึ้นอยู่อย่างต่อเนื่อง โดยมีการใช้วัคซีนที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างการใช้วัคซีนกับสัตว์ติดเชื้อได้ ซึ่งต้องมีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคให้สอดคล้องและควบคู่ เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างการใช้วัคซีนกับสัตว์ติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ การพัฒนาวิธีตรวจใหม่ต้องมีความรวดเร็วและใช้เวลาในการตรวจสั้น การตรวจวินิจฉัยโรคในปัจจุบันมีข้อจำกัดมาก จำเป็นต้องมีการพัฒนาในหัวข้อดังนี้

1. พัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพและราคาไม่สูงเพื่อใช้ในการ screen สัตว์ที่อาจเกิดโรคได้

2. พัฒนาให้ชุดทดสอบมีความรวดเร็วและมีความไวและความจำเพาะต่อโรคสูง [39]

ปัจจุบัน OIE ได้มีคู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกดังนี้

1. Identification of the agent virus isolation **เป็นการแยกเชื้อไวรัสโดยวิธีใช้ไข่ไก่ฟัก เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันทั่วโลก วิธีนี้ใช้แยกไวรัสไข้หวัดนกได้ดี [40] ทำได้โดยฉีดเชื้อที่สงสัยเข้าไปในไข่ไก่ฟักที่มีอายุประมาณ 9 - 11 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 – 7 วัน** ส่องดูไข่ไก่ฟักทุกวัน ถ้ามีไข่ตายให้นำ allantoic fluid มาตรวจโดยวิธี HI [41,43] หรือนำ chorioallantoic membrane มาดูการเกิด pock [43] วิธีฉีดไข่นี้เป็นวิธีที่ดีแต่มีข้อเสียว่าการตรวจจะใช้เวลานานประมาณ 2 – 10 วัน ใช้บุคลากรที่มีความชำนาญเป็นจำนวนมาก และยังไม่มีความเฉพาะเจาะจงตัวเชื้อมากนัก ซึ่งจะไม่ทันกับการระบาดของโรคไข้หวัดนกที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและรุนแรง เมื่อเทียบกับการใช้ ELISA ที่สามารถตรวจได้อย่างรวดเร็วและผลมีความจำเฉพาะ [40]

2. Agar gel immunodiffusion (AGID) มีใช้ในห้องปฏิบัติการ เป็นการตรวจแอนติบอดีที่จำเฉพาะในไก่และไก่งวง เพื่อบ่งชี้ว่าสัตว์เหล่านั้นได้รับการติดเชื้อ โดยใช้โปรตีน matrix หรือ nucleocapsid เป็นแอนติเจน [41] วิธีทดสอบจะนี้สามารถสังเกตได้จากการเกิดตะกอนเป็นเส้นระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีด้วยการแพร่เข้าหากัน [42] สามารถอ่านผลได้หลังจาก 24 – 48 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดี [41] วิธีการนี้บอกผลว่าสัตว์ตัวนั้นเป็นไข้หวัดนกหรือไม่เท่านั้น ซึ่งเป็นการบอกทางคุณภาพ แต่ไม่อาจบอกถึงความแตกต่างระหว่างสัตว์ติดเชื้อไข้หวัดนกกับสัตว์ที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนก มีความเฉพาะน้อยกว่าวิธี ELISA และวิธี HI [42] วิธีนี้มีข้อคือ วิธีการปฏิบัติไม่ยุ่งยาก, ไม่สิ้นเปลืองแอนติบอดีและแอนติเจน อีกทั้งไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน สามารถนำมาใช้ตรวจสอบแอนติเจนเพื่อใช้ในงานวิจัยได้ [43,44]

3. Haemagglutination (HA) and Haemagglutination inhibition tests (HI) ใช้ตรวจในงานประจำของห้องปฏิบัติงาน วิธี Haemagglutination เป็นวิธีที่เฉพาะต่อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้น การตรวจ HA, HI ในซีรั่มไก่ไม่ค่อยมีปัญหาทำให้เกิดผลบวกปลอมต่อการทดสอบ แต่ซีรั่มจากสัตว์ชนิดอื่น อาจมีผลทำให้เกิดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงไก่ ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียมเม็ดเลือดแดงของไก่ก่อนนำไปทดสอบ [41]

4. Haemagglutination (HA) and Haemagglutination inhibition tests (HI) และ Neuraminidase inhibition test **ทั้งสองวิธีเป็นวิธีการทางอิมมูโนโลยี แต่จะนิยมใช้** Haemgglutination inhibition test **มากกว่าเนื่องจากวิธีการไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาประมาณ 1 วัน วิธีนี้เป็นการวัดปริมาณของอนุภาคไวรัสโดยใช้คุณสมบัติของไวรัสที่มีฮีแมกกลูตินินที่อยู่บนผิวนอกของไวรัสซึ่งเป็นตัวทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (agglutinate) ปริมาณของฮีแมกกลูตินินจะสัมพันธ์กับปริมาณของอนุภาคไวรัสที่มีอยู่ในสารละลาย จึงสามารถใช้วัดปริมาณของอนุภาคไวรัสได้ แต่จะ**

บอกไม่ได้ว่าไวรัสนั้นสามารถติดเชื้อในเซลล์ได้หรือไม่ เนื่องจากไวรัสนั้นอาจอยู่ในสภาพ non-infectious แต่ยังคงมีฮีแมกกลูตินิน ซึ่งฮีแมกกลูตินินก็ยังคงแสดงการเกิด Haemgglutination ได้ [43,44] วิธีนี้ไม่สามารถแยกสัตว์ที่ติดเชื้อกับสัตว์ได้รับวัคซีน [42]

5. Antigen detection เป็นชุดทดสอบที่ใช้ monoclonal antibody ต่อ nucleoprotein ดังนั้นจึงสามารถใช้ตรวจเชื้อ Influenza A ได้ แม้พัฒนาชุดทดสอบใน mammalian cell แต่สามารถประยุกต์ใช้ตรวจไวรัสในสัตว์ปีกและนกชนิดอื่นๆได้ ข้อดีของวิธีนี้คือ ทราบผลภายใน 15 นาที ข้อเสียคือขาดความไวต่อไวรัสสายพันธุ์อื่น และราคาค่อนข้างแพง [41]

6. Direct RNA detection เป็นเทคนิคที่ใช้วินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยเทคนิค RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะกับสายพันธุ์ที่มีการระบาดในช่วงนั้น อ่านผลเร็ว มีความไวและความเฉพาะต่อไวรัสที่แยกมาทำการทดสอบ แต่มีราคาค่อนข้างสูง [41]

7. Enzyme - Linked Immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีการทางอิมมูโนโลยีเช่นเดียวกับ Haemgglutination inhibition test และ Agar gel precipitation test เป็นการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะโดยใช้แอนติบอดีตัวที่สองซึ่งปิดสลากด้วยเอนไซน์ วิธี ELISA เป็นวิธีที่มีความไวสูงมาก [44] ใช้ในการตรวจโรคไข้หวัดนกได้อย่างจำเฉพาะเจาะจง [40] และเป็นการตรวจเชิงปริมาณ ความจำเฉพาะเจาะจงของวิธีการนี้ทำให้สามารถแยกสัตว์ที่นำมาตรวจโรคไข้หวัดนกเป็นสัตว์ติดเชื้อหรือเป็นสัตว์ที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนก และวิธีนี้ตรวจได้เร็วกว่า immunoblotting และ virus isolation [27]

การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกมีหลายวิธี ซึ่งขึ้นอยู่กับห้องปฏิบัติการแต่ละที่ ที่จะใช้ในการตรวจ ในประเทศไทยมีการใช้วิธี แยกเชื้อไวรัสโดยวิธีไข่ไก่ฟัก, วิธี Haemagglutination (HA) and Haemagglutination inhibition tests (HI), วิธี PCR และวิธี ELISA ซึ่งข้อเสียแต่ละวิธีกล่าวไว้ข้างต้นแล้ว และการแยกความแตกต่างของสัตว์ติดเชื้อโดยธรรมชาติกับสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนต้องอาศัยวิธีการตรวจด้วย ELISA หรือวิธีทางซีโรโลยีอื่น ฉะนั้นจึงมีความจำเป็นต้องผลิตโปรตีนขึ้นมา เพื่อใช้เป็นแอนติเจนที่ใช้สำหรับชุดทดสอบ ELISA หรือวิธีทางซีโรโลยีอื่นที่จะมีขึ้นในอนาคต