

# ไวรัสไข้หวัดนก H5N1

พิไลพันธ์ พุชวัฒน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700

E-mail: siput@mahidol.ac.th

## โรคไข้หวัดนก

โรคไข้หวัดนก (avian influenza หรือเรียกสั้นๆ ว่า bird flu) คือโรคไข้หวัดใหญ่ที่เกิดขึ้นในสัตว์ปีก ส่วนโรคไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์จะเรียกว่า human influenza ทั้งโรคไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกมีสาเหตุจาก influenza viruses ซึ่งเป็นไวรัสใน Family Orthomyxoviridae (พิไลพันธ์, 2005; Wright and Webster, 2001)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ แบ่งออกเป็น 3 immunological types: A, B, C ตามความแตกต่างของแอนติเจนของ nucleoprotein (NP) และโปรตีน matrix (M) ไวรัสที่พบก่อโรคในคน คือ type A และ B โดย type A พบก่อโรคได้บ่อยที่สุด และรุนแรงที่สุด การระบาดใหญ่ระดับโลกที่เคยเกิดขึ้นในอดีต มีสาเหตุเกิดจาก type A ทั้งสิ้น ไวรัส type A นี้มีการติดเชื้อในคน และสัตว์หลายชนิด เช่น สัตว์ปีก สุกร ม้า แมวน้ำ แมว เสือ แม้กระทั่งปลาวาฬ

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ type A ยังสามารถแบ่งย่อยออกไปเป็นชนิดย่อย (subtype) ตามความแตกต่างของแอนติเจนที่สำคัญสองชนิด คือ ฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin, H) และ นิวรามินิเดส (Neuraminidase, N) โดยแอนติเจน H ถูกแบ่งออกเป็น 16 subtypes (H1...H16) และแอนติเจน N ถูกแบ่งออกเป็น 9 subtypes (N1...N9) ส่วนเชื้อไข้หวัดใหญ่ type B และ C ยังไม่มีการแบ่งฮีแมกกลูตินิน ออกเป็น subtype

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ type A ที่ก่อการติดเชื้อในคนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีเพียงสายพันธุ์ H1, H2 และ H3 เท่านั้น แต่ในปัจจุบันไม่พบเชื้อ H2 แล้ว

ในขณะที่ทุกสายพันธุ์ คือ ตั้งแต่ H1...H16 และ N1...N9 พบได้ในนกน้ำ (aquatic bird) นักวิทยาศาสตร์จึงเชื่อว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดนกเป็นบรรพบุรุษของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ type A สายพันธุ์ต่างๆ

## การแพร่กระจายของเชื้อไวรัส

นกน้ำเป็นสัตว์สำคัญในวงจรการแพร่เชื้อ โดยเฉพาะเป็ดป่า (Mallard-Anas platyrhynchos) เนื่องจากสามารถแยกไวรัสทุก subtypes ได้จากสัตว์ชนิดนี้ ในการศึกษาของนักวิจัยเมื่อ 10 ปีเศษ พบแอนติบอดีในเป็ด ถึงร้อยละ 50 ซึ่งแสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสเกิดขึ้นบ่อยๆ ในช่วงชีวิตของสัตว์ ซึ่งอาจจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เพราะเชื้อไวรัสนั้นมีอยู่มากมายในระบบทางเดินอาหารและมูลเป็ด ในน้ำที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อไวรัสอยู่ได้นาน 2-3 วัน แต่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะอยู่ได้ถึงเดือน นอกจากนกน้ำ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่บาง subtype ก็ยังมีการติดเชื้อในคนและสัตว์ชนิดอื่น เช่น H3N8 พบในม้า H3N3, H4N5, H4N6 และ H7N7 พบในแมวน้ำ H1N3 และ H3N2 ในปลาวาฬ H10N7 ในมิงค์

สำหรับไวรัส H5N1 ในปัจจุบัน พบว่าเริ่มมีการติดเชื้อในสัตว์ปีกก่อน และแพร่ไปสู่คนและสัตว์อื่น เช่น เสือประเภทต่างๆ แมว และสุนัข ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคในประเทศไทย มีรายงานตรวจพบแอนติบอดีในสุนัขถึงร้อยละ 25 และแมวร้อยละ 7 ซึ่งอาจคิดเชื้อมาจากการกินสัตว์ปีกที่มีเชื้อ ในเวียดนามรายงานการติดเชื้อใน Owston's Civet ในยุโรปพบการติดเชื้อใน Marten (สัตว์ประเภท

ฟังกอน) และในมิงค์ และประมาณการว่ามีนกในธรรมชาติประมาณร้อยละ 60 ติดเชื้อและตายจากไวรัสนี้

### Highly pathogenic avian influenza และ Low pathogenic avian influenza

เชื้อไวรัสที่พบในนกน้ำนั้นมักเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง (low pathogenic avian influenza-LPAI) สัตว์ที่ติดเชื้อไม่เกิดอาการ หรือมีเพียงอาการของโรคระบบทางเดินหายใจอย่างอ่อน เมื่อแพร่มาสู่สัตว์ปีกบนบกแล้วจึงกลายเป็น highly pathogenic avian influenza – HPAI ในปัจจุบันนี้ subtypes ที่เป็น HPAI นั้น มีเพียง H5 และ H7 เท่านั้น จากทั้งหมด 16 H subtypes การที่ไวรัส LPAI กลายเป็นไวรัส HPAI น่าจะเกิดจากการที่มีการเพิ่มขึ้นของเบส (insertion) แล้วทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ multiple basic amino acid ที่ตำแหน่งตัดของ hemagglutinin polypeptide precursor (HA<sub>0</sub>)

**คำอธิบาย** เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะสร้าง hemagglutinin precursor molecule (HA<sub>0</sub>) ขึ้นก่อนซึ่งจะต้องถูกตัดด้วยเอนไซม์ ให้เกิดเป็น 2 ส่วน คือ ส่วน HA<sub>1</sub> และ HA<sub>2</sub> ซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) เชื้อไวรัสจึงจะมี infectivity เกิดขึ้น การเพาะเลี้ยงไวรัส human influenza ในเซลล์เพาะเลี้ยงจะต้องเติม trypsin TPCK ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อช่วยในการตัดที่ตำแหน่งดังกล่าวของ HA<sub>0</sub> ถ้าเป็นการติดเชื้อไวรัส human influenza ภายในร่างกาย เชื้อไวรัสจะใช้เอนไซม์ trypsin จากเซลล์ที่อยู่ในทางเดินหายใจ ในการตัดที่ตำแหน่งซึ่งเป็น monobasic amino acid แต่ถ้าเป็นเชื้อ HPAI เช่นเชื้อไข้หวัดนกในปัจจุบัน ตำแหน่งตัดจะมี basic amino acid หลายตัวเรียงกัน ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบนี้ทำให้ไวรัสสามารถใช้เอนไซม์ protease ที่มีอยู่ในเซลล์หลากหลายชนิด เชื้อไข้หวัดนกจึงมีการติดเชื้อนอกระบบทางเดินหายใจได้ ดังนั้น เชื้อที่มี multiple basic amino acid ที่ตำแหน่งตัด จึงจัดเป็นไวรัส HPAI

### การติดต่อข้าม species จากสัตว์สู่คน

การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน เกิดโดยหายใจเอาละอองฝอยที่มีเชื้อเข้าสู่ทางเดินหายใจ (droplet infection) แต่ในสัตว์ปีกจะแพร่เชื้อ โดยทาง fecal-oral route หรือโดย droplet infection ความสามารถในการติดเชื้อของไวรัสจะขึ้นกับความจำเพาะต่อ cell receptor สองส่วน คือ ที่ sialic acid species ซึ่งได้แก่ N-acetylneuraminic acid (NeuAc) หรือ N-glycolylneuraminic acid (NeuGc) และที่พันธะที่เชื่อมระหว่าง sialyloligosaccharide กับ galactose โดยไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน มีความชอบที่จะเกาะกับ sialic acid ที่เชื่อมอยู่กับ galactose โดย α-2,6 linkage ซึ่งส่วนใหญ่เป็น NeuAc α-2,6 Gal ในขณะที่ไวรัสไข้หวัดนกมีความชอบที่จะจับกับ NeuAc α-2,3 Gal การติดเชื้อโดยทั่วไปจึงค่อนข้างมีความจำเพาะต่อ species (host range restriction)

อย่างไรก็ดีได้พบว่า human tracheobronchial epithelium เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงจะเกิด differentiation สร้าง α-2,3 linkage บนผิวของ ciliated cell ในขณะที่พบ α-2,6 linkage บนผิวของ nonciliated cell เชื้อไข้หวัดนกจึงอาจติดเชื้อในเซลล์คนได้ด้วยเหตุนี้ นอกจากนี้ยังมีกลุ่มนักวิจัยได้พบว่า เชื้อไวรัส H5N1 สามารถที่จะติดเชื้อ และเพิ่มจำนวนใน epithelial tissue ของ nasopharynx, adenoid และ tonsil ที่นำมาเพาะเลี้ยงได้ (ex vivo) ทั่วๆไปที่เนื้อเยื่อเหล่านี้มี α-2,3 linkage อยู่บ่อยมาก ซึ่งชี้แนะว่า การเข้าสู่เซลล์ของไวรัสไข้หวัดนกอาจเกิดขึ้นด้วย binding site แบบอื่น

### เชื้อไข้หวัดนกที่เคยแพร่มาสู่มนุษย์

การแพร่ของเชื้อไข้หวัดนกจากสัตว์ปีกมาสู่คน น่าจะเคยเกิดขึ้นมาก่อนปี พ.ศ. 2540 แต่ไม่ได้รายงานไว้เป็นหลักฐาน การระบาดใหญ่ทั่วโลก ซึ่งเกิดขึ้นในปี พ.ศ. 2461 (Spanish flu) ก็น่าจะเกิดจากการที่ เชื้อไข้หวัดนกจากสัตว์ปีกแพร่มาสู่คนโดยตรง เชื้อไข้หวัดนกที่เคยแพร่มาสู่คน คือ H5N1, H9N2, H7N7, H7N2, H7N3 และในผู้มีอาชีพเกี่ยว

กับการล่าสัตว์ป่าพบว่าการติดเชื้อ H11N9

นับตั้งแต่เริ่มการระบาดในปี 2546 จนกระทั่งปัจจุบัน ไวรัส H5N1 แพร่กระจายไปหลายทวีป ในเกือบ 50 ประเทศ ตั้งแต่เอเชีย ตะวันออกกลาง ยุโรป แอฟริกา แต่ส่วนใหญ่เป็นการระบาดในสัตว์ปีก และนกในธรรมชาติ และนับถึงวันที่ 12 พฤศจิกายน 2550 มีรายงานผู้ป่วยไข้หวัดนกที่ได้รับการยืนยันแล้วทั้งสิ้น 335 ราย ตาย 206 ราย (อัตราตายร้อยละ 61.5) จาก 12 ประเทศ และประเทศที่มีผู้ป่วยมากที่สุด 4 อันดับแรกคือ อินโดนีเซีย (113 ราย) เวียดนาม (100 ราย) อียิปต์ (38 ราย) และ ไทยและจีน ซึ่งอยู่ในอันดับเดียวกันคือมีผู้ป่วยประเทศละ 25 ราย และตามมาด้วย ตุรกี อาเซอร์ไบจัน กัมพูชา อิรัก ลาว คิวบิ และ ไนจีเรีย อย่างไรก็ตาม ไทยไม่มีผู้ป่วยไข้หวัดนกมาตั้งแต่เดือนกันยายน ปี 2549 และในผู้ป่วยทั้งหมด 25 ราย ตาย 17 ราย (อัตราตายร้อยละ 68.0)

**ลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่**

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีรูปร่างได้หลายแบบ ได้แก่ ค่อนข้างกลม หรือเป็นสายยาว อนุภาคมีขนาดโดยเฉลี่ย 100 นาโนเมตร ไวรัสมีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายลบ และเป็น segment 7-8 ชิ้น RNA แต่ละชิ้นถูกล้อมรอบด้วย nucleoprotein (NP) รวมเรียกโครงสร้างนี้ว่า ribonucleoprotein complex (RNP) และมีเอนไซม์ RNA polymerase complex อยู่ใน RNA ทั้งหมดถูกล้อมรอบด้วย lipid envelope ซึ่งทำให้ไวรัส ถูกทำลายได้ด้วยสารละลายไขมันและไม่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมและความแห้งแล้ง

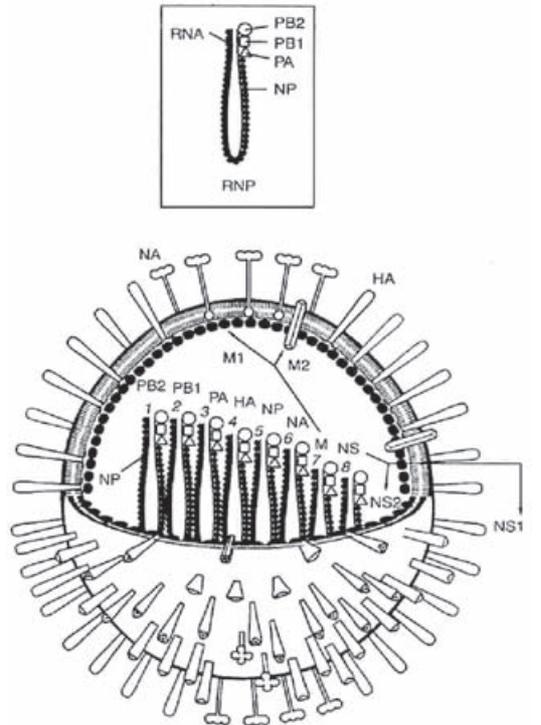
อนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยรอบมี glycoprotein spike อยู่ 3 ชนิด คือ H ซึ่งพบมากที่สุด N ซึ่งพบมารองลงมาและโปรตีน M2 ซึ่งทำหน้าที่เป็น ion channel

**ยีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่**

โครงสร้างสารพันธุกรรม (genome) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ type A และ B ประกอบขึ้นด้วยยีน

ทั้งหมด 8 ชิ้น (ภาพที่ 1) สร้างโปรตีนอย่างน้อย 10 ชนิดเพื่อทำหน้าที่ต่างๆ กันดังนี้

- PB2, PB1 และ PA แต่ละ component เป็นเอนไซม์ RNA transcriptase complex
- H (HA) เป็น ฮีแมกกลูตินิน
- NP เป็น โปรตีนหน่วยย่อยเพื่อประกอบเป็น nucleoprotein หรือโปรตีน capsid
- N (NA) คือ นิวรามินิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลาย receptor
- M สร้างโปรตีน matrix 2 ชนิด คือ M1 และ M2 โดย M1 จะเป็น major component ของอนุภาคไวรัส อยู่ใต้ envelope ส่วน M2 เป็น spike ซึ่งทำหน้าที่เป็น ion channel และเป็นเป้าหมาย (target) สำหรับยา amatadine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ type A



ภาพที่ 1 โดอะแกรมของอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Wright and Webster 2001)

NS สร้างโปรตีน 2 ชนิด คือ NS1 และ NS2 โดย NS1 ไม่พบในอนุภาค พบในเซลล์ติดเชื้อเท่านั้น แต่ NS2 พบได้ในอนุภาคไวรัส โดยจับ (interact) กับโปรตีน M1 สำหรับ NS1 มีหน้าที่หลายอย่างที่สำคัญ ได้แก่ การยับยั้งการทำงานของ interferon ใน host cell การควบคุมการ splice ของ viral mRNA และการขนส่ง mRNA ออกจากนิวเคลียสเข้าสู่ไซโทพลาซึม ส่วน NS2 ทำหน้าที่ในการขนส่ง RNP ออกสู่ไซโทพลาซึม

**แอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่** (พิไลพันธ์, 2005; Wright and Webster, 2001)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่มีแอนติเจนที่สำคัญ 2 ชนิด คือ

**1. ฮีแมกกลูตินิน (H)** เป็น trimer และแต่ละ trimer เป็นพอลิเพปไทด์ ซึ่งมี 2 subunits ต่อกัน ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ คือ HA1 และ HA2 โดย HA1 เป็นส่วนที่มี receptor binding activity และ HA2 เป็นส่วนที่มี fusion activity ฮีแมกกลูตินินทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่มีเลือดโอและสัตว์บางชนิดเช่น ห่าน และหูกะเภา เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (agglutination) คุณสมบัตินี้นำมาใช้ตรวจหาไวรัสได้ แอนติบอดีต่อฮีแมกกลูตินิน จัดเป็น neutralizing antibody และมีผลในการคุ้มกันโรค คือเป็น protective antibody ด้วย

**2. นิเวรามินิเดส (N)** เป็น receptor destroying enzyme (RDE) คือเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย receptor site บนผิวเซลล์แล้วทำให้ progeny virion หลุดเป็นอิสระจากเซลล์ เมื่อเมื่ออนุภาคเดินทางเข้าจับไวรัสไว้ ไวรัสจะใช้เอนไซม์นี้ย่อยทำให้เมือกใสขึ้น ไวรัสจึงหลุดออกไปบุกรุกเซลล์เยื่อทางเดินหายใจที่อยู่ลึกลงไป แอนติบอดีต่อนิวรามินิเดส ไม่ใช่ neutralizing antibody มีผลในการคุ้มกันโรคเพียงบางส่วน (partial immunity) โดยแอนติบอดีต่อนิวรามินิเดส ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในขั้นตอนการปลดปล่อยไวรัส

ออกจากเซลล์

### การกลายพันธุ์ (genetic variation)

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ type A เป็น type ที่มีการกลายพันธุ์สูงสุดในบรรดา 3 type ด้วยกัน การเปลี่ยนแปลงยีนทำให้แอนติเจนซึ่งเป็นผลผลิตของยีนเปลี่ยนแปลงไปด้วย คือมี antigenic variation เกิดขึ้น ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

**1. Antigenic shift** คือ การเปลี่ยนแปลงที่แอนติเจนใหม่แตกต่างไปจากแอนติเจนเดิมอย่างมาก พบเฉพาะในไวรัสไข้หวัดใหญ่ type A เท่านั้น เกิดขึ้นจากขบวนการ gene reassortment คือการที่ไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2 ชนิด ซึ่งเป็น type A เหมือนกันมีการติดเชื้อในเซลล์เดียวกัน ในขั้นตอน self assembly เพื่อประกอบขึ้นเป็นอนุภาค อาจมีการนำชิ้นจีโนมบางชิ้นของไวรัสชนิดหนึ่งใส่เข้าไปในอนุภาคของไวรัสอีกชนิดหนึ่ง จึงได้อนุภาคของไวรัสชนิดใหม่ ซึ่งมีแอนติเจนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ไวรัสลูกผสมที่เกิดขึ้นเรียกว่า reassortant การระบาดใหญ่ที่เกิดขึ้นหลายครั้ง เกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อมี antigenic shift ที่ H หรือ H และ N และประชาชนไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส subtype ใหม่

การที่เชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ยังคงระบาดอยู่โดยควบคุมไม่ได้ ไวรัสมีการเพิ่มจำนวนอยู่ตลอดเวลา จึงมีโอกาสที่จะเกิด reassortment กับไวรัส subtype อื่น ที่มาจากคนหรือสัตว์ แต่จากการสำรวจเชื้อไวรัส H5N1 ที่แยกได้จากคนในระหว่างปี 2546-2549 ก็ยังไม่พบว่ามีไวรัสลูกผสมเกิดขึ้น (Auewarakul et al., 2007)

**2. Antigenic drift** คือ การเปลี่ยนแปลงที่แอนติเจนใหม่แตกต่างไปจากแอนติเจนเดิมไม่มากนัก เชื่อว่าเกิดจากกระบวนการ point mutation ได้แก่ substitution, deletion และ insertion ภายในสายยีนแอนติเจนเปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย ไม่มากพอที่จะเป็น H และ N subtypes ใหม่ พบได้ในไวรัสไข้หวัดใหญ่ทุก type แต่ antigenic drift อาจทำให้เกิด

การระบาด (epidemic) ได้ในวงไม่กว้างนัก

### การจัดจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดนก

องค์การอนามัยโลกได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และแอนติเจนของยีน HA (phylogenetic analysis) ของเชื้อไข้หวัดนก H5N1 ซึ่งแยกได้ในช่วงการระบาด 2547-2548 และแบ่งไวรัสออกเป็น 2 lineage คือ clade 1 และ clade 2 และจัดไวรัสที่แยกได้ในฮ่องกงในช่วงปี 2546 เป็น clade 1' และ พ.ศ. 2540 เป็น clade 3 (The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network, 2005)

ในกลางปี 2550 องค์การอนามัยโลกได้จัดกลุ่มไวรัส H5N1 ใหม่ โดยแบ่งไวรัสทั้งหมด ออกเป็น 10 phylogenetic clade (genetic group) คือ clade 0-9 ไวรัสใน clade เหล่านี้ อยู่ในสภาพภูมิศาสตร์ต่างกัน คือ

*Clade 0* คือไวรัสที่ก่อการระบาดในฮ่องกง ในปี 2540 รวมทั้ง A/goose/Guangdong/1/96 ซึ่งเป็นบรรพบุรุษของไวรัสที่ระบาดในฮ่องกงเมื่อปี 2540 และการระบาดในปัจจุบัน

*Clade 1* เป็นไวรัสที่ระบาดอยู่ใน กัมพูชา ไทย และเวียดนาม มีการติดเชื้อทั้งในสัตว์ และ คนในระหว่างปี 2547-2550 Clade 1 ยังไม่มีการแบ่งเป็น subclade

*Clade 2* แบ่งออกเป็นอย่างน้อย 3 subclade พบในภูมิภาคต่างๆกัน

*Clade 2.1* แบ่งต่อไปอีกเป็น clade 2.1.1-2.1.3 พบในอินโดเนเซีย แยกเชื้อได้ทั้งจากในสัตว์ปีก และ คน

*Clade 2.2* พบระบาดในนก ในบางประเทศในแอฟริกา เอเชีย และ ยุโรป เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในคน ในอียิปต์ อิรัก และ ไนจีเรีย

*Clade 2.3* แบ่งต่อไปอีกเป็น clade 2.3.1-2.3.4 พบในการระบาดประปรายในจีน และลาว ไวรัสใน clade 2.3.4 ได้เข้าสู่ประเทศไทยที่จังหวัดนครพนม

ตั้งแต่กลางปี 2549 และในปี 2550 ไวรัสใน clade นี้ พบได้ในหลายจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ

*Clade 3-9* เป็นไวรัสที่แยกได้จากสัตว์ปีก รวมทั้งนกอพยพ ในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศจีน

การจัดแบ่งไวรัส H5N1 ออกเป็น clade นั้น อาศัยลำดับเบสของยีน HA แต่ก่อนหน้านั้นคือ ในปี 2547 กลุ่มนักวิจัยจากประเทศต่างๆ นำโดย Prof. Malik Peiris (Li *et al.*, 2004) จากมหาวิทยาลัยฮ่องกง ได้แบ่งไวรัส H5N1 ออกเป็นจีโนไทป์ต่างๆ โดยอาศัยกำเนิดที่มา และลักษณะของยีนทั้ง 8 ชิ้น (gene constellation) ทั้งนี้เนื่องจากการ reassortment ระหว่างสายพันธุ์ และ subtype ของไวรัสไข้หวัดนก เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา เชื้อไวรัส H5N1 เหล่านี้มียีน HA และ NA มาจากบรรพบุรุษเดียวกัน คือ A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) (Gs/Gd) ในปี 2544 คณะผู้วิจัยได้แบ่งไวรัสลูกผสม H5N1 reassortant ออกเป็น 6 จีโนไทป์ คือ A, B, C, D, E, และ Xo และในปี 2545 ได้พบไวรัสใหม่เกิดขึ้นอีก 8 จีโนไทป์ คือ V, W, X1, X2, X3, Y, Z และ Z<sup>+</sup> โดยจีโนไทป์ใหม่เหล่านี้เกิดขึ้นจากการ reassortment เช่นกัน โดยมีจีโนไทป์เดิมเป็นบรรพบุรุษ และเมื่อมีจีโนไทป์ใหม่เกิดขึ้นแล้ว จีโนไทป์เดิม รวมทั้ง Gs/Gd ก็ค่อยๆ หายไป จีโนไทป์ที่ยังคงอยู่ได้จะเป็นไวรัสที่มีความสามารถในการปรับตัวเพื่ออยู่รอด จีโนไทป์ Z<sup>+</sup> ต่างจากจีโนไทป์ Z โดยที่จะไม่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโน 20 ชนิด ในส่วน stalk ของโปรตีน NA ในปัจจุบันไวรัสที่ยังพบการระบาดอยู่คือจีโนไทป์ Z ซึ่งพบครั้งแรกในปี 2545 และจีโนไทป์ V ซึ่งพบในปี 2548 โดยเชื้อที่ก่อการระบาดทั่วโลกเป็นจีโนไทป์ Z เชื้อไวรัส H5N1 ที่ระบาดในประเทศไทยตั้งแต่ปลายปี 2546 เป็นต้นมา คือจีโนไทป์ Z (Puthavathana *et al.*, 2005) และพบจีโนไทป์ V ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จีโนไทป์ V นี้ คือไวรัสใน clade 2.3.4 (Chutinimitkul *et al.*, 2007) จีโนไทป์ Z และ V มีความแตกต่างกันที่ยีน PA

ตัวอย่างการจัดกลุ่มไวรัส H5N1 โดยแบ่งตาม clade และจีโนไทป์ เช่น

ไวรัสของประเทศไทยเกือบทั้งหมดเป็น จีโนไทป์ Z, clade 1

ไวรัสของประเทศอินโดเนเซียส่วนใหญ่เป็น จีโนไทป์ Z, clade 2

ไวรัสของประเทศเวียดนามเป็น จีโนไทป์ Z, clade 1 พบจีโนไทป์ V บ้าง

### พยาธิกำเนิดของโรคไข้หวัดนก

ผู้ป่วยไข้หวัดนกส่วนใหญ่ติดเชื้อจากสัตว์ปีกที่มีเชื้อ นอกจากนี้มีรายงานติดต่อโดยการสัมผัสใกล้ชิดกับผู้ป่วยในครอบครัว ระยะฟักตัวของโรคในคน ยาวประมาณ 2-8 วัน โดยเฉลี่ย 4 วัน (Chotpitayasunondh *et al.*, 2005)

ในขณะที่โรคไข้หวัดใหญ่จากในคน มักก่อพยาธิสภาพจำกัดอยู่ในระบบทางเดินหายใจเท่านั้น โรคไข้หวัดนกในคนจะก่อพยาธิสภาพกับอวัยวะหลายแห่ง (multi-organ dysfunction) นอกเหนือจากระบบทางเดินหายใจ และแม้ว่าการเพิ่มจำนวนของเชื้อไข้หวัดนกในคนจะไม่ดีนัก แต่เชื้อสามารถแพร่ออกไปเพิ่มจำนวนนอกระบบทางเดินหายใจ ดังมีรายงานจากผู้ป่วยเวียดนามว่านอกจากแยกเชื้อไวรัสได้จากระบบทางเดินหายใจแล้วยังแยกเชื้อได้จากเลือด น้ำไขสันหลัง และอุจจาระด้วย รายงานจากประเทศไทยก็ตรวจพบจีโนม และ mRNA ของเชื้อไวรัสในลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และตับ เช่นกัน (Uiprasertkul *et al.*, 2005) แต่ตรวจไม่พบ viral antigen และไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากอวัยวะเหล่านี้ ซึ่งแสดงว่าปริมาณไวรัสมีไม่มากนัก อย่างไรก็ตามก็ยังสามารถแยกเชื้อได้จากอุจจาระของผู้ป่วยของไทยด้วย

### Influenza pandemic phase

องค์การอนามัยโลกได้เคยให้แนวทางในการเตรียมรับการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั่วโลกมาแล้ว เมื่อปี พ.ศ. 2542 และได้ปรับปรุงแก้ไขในปี พ.ศ.

2548 โดยแบ่งระยะการระบาดออกเป็น 4 ช่วง คือ

**1. Interpandemic phase** (เป็นช่วงเวลาระหว่างการระบาดใหญ่ที่ผ่านมากับการระบาดใหญ่ที่จะเกิดขึ้นอีกในอนาคต) แบ่งออกเป็น 2 phase คือ  
*Phase 1:* เป็นช่วงเวลาที่ไม่มีพบว่ามีเชื้อไข้หวัดใหญ่ subtype ใหม่เกิดขึ้นในคน แต่อาจพบ subtype ที่มีการติดเชื้อในคนก่อนการติดเชื้อในสัตว์ด้วย และถ้าพบการติดเชื้อในสัตว์ ความเสี่ยงต่อการติดเชื้อหรือเกิดโรคในคนจะยังอยู่ในระดับต่ำ

*Phase 2:* ไม่มีพบเชื้อ subtype ใหม่ก่อนการติดเชื้อในคน ส่วน subtype ที่มีการติดเชื้อในสัตว์อาจจะก่อความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในคนได้

**2. Pandemic alert phase** (เป็นระยะตื่นตัวเพื่อรองรับการระบาดใหญ่) แบ่งออกเป็นอีก 3 phase

*Phase 3:* พบว่ามีกรณีติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ subtype ใหม่ เกิดขึ้นในคน แต่ยังไม่มีการแพร่เชื้อจากคนสู่คน หรือถ้าพบการแพร่เชื้อไปสู่ผู้สัมผัสใกล้ชิดก็เกิดขึ้นน้อยมาก

*Phase 4:* พบกลุ่มผู้ติดเชื้อเกิดขึ้นเป็นกลุ่มเล็กๆ การแพร่เชื้อยังจำกัดอยู่ในวงแคบ ซึ่งแสดงว่าเชื้อไวรัสยังปรับตัวให้ก่อการติดเชื้อในคนได้ไม่ดีนัก

*Phase 5:* พบกลุ่มผู้ติดเชื้อขนาดใหญ่ขึ้นแต่การแพร่เชื้อจากคนสู่คนยังอยู่ในวงจำกัด ซึ่งแสดงว่าไวรัสมีการปรับตัวดีขึ้นในการก่อการติดเชื้อในคน แต่ยังแพร่กระจายได้ไม่เต็มที่ เป็นระยะเสี่ยงที่จะเกิดการระบาดใหญ่

**3. Pandemic period** (ระยะระบาดใหญ่ทั่วโลก) มีเพียง phase เดียว

*Phase 6:* การระบาดเกิดขึ้นเป็นวงกว้าง พบในประชากรทั่วไป

**4. Postpandemic phase** เป็นช่วงสุดสิ้นการระบาดใหญ่ และกลับคืนเข้าสู่ระยะ interpandemic phase อีกครั้ง

**WHO case definition** (WHO Case Definitions for Human Infections with Influenza A (H5N1) Virus,

2007)

ในขณะนี้การระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ อยู่ในระยะก่อนการระบาดทั่วโลก (prepandemic phase) ระยะ 3 ต่อ ระยะ 4 เมื่อวันที่ 29 สิงหาคม 2549 องค์การอนามัยโลกได้ตั้งนิยามของผู้ป่วยไข้หวัดนกไว้ 3 ระดับ นิยามนี้อาจปรับเปลี่ยนได้อีก เมื่อข้อมูลทางระบาดวิทยาเปลี่ยนไป

**1. Suspected H5N1 case** (ผู้ป่วยที่ต้องสงสัยว่าเป็นโรคไข้หวัดนก) ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีอาการของโรคระบบทางเดินหายใจส่วนล่างเฉียบพลัน และไม่ทราบสาเหตุ มีไข้สูงกว่า 38 องศาเซลเซียส ไอ หายใจหอบ หรือหายใจลำบาก และ ภายใน 7 วัน ก่อนมีอาการดังกล่าว มีประวัติการสัมผัสเชื้อไข้หวัดนกอย่างน้อย 1 ประการ

1.1 สัมผัสใกล้ชิดกับภายในระยะ 1 เมตร เช่น ดูแลรักษาพยาบาล พุดคุย สัมผัสกับร่างกายกับบุคคลซึ่งสงสัยว่าจะป่วยเป็นไข้หวัดนก โดยบุคคลนั้นอาจจะเป็น suspected, probable หรือ confirmed H5N1 case

1.2 สัมผัสกับสัตว์ปีก (poultry) หรือ นกในธรรมชาติ หรือ ชาก หรือ สิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยมูลสัตว์ โดยพื้นที่นั้นเป็นพื้นที่ที่ต้องสงสัยว่าอาจมีการติดเชื้อ หรือได้รับการยืนยันว่ามีการติดเชื้อ H5N1 ในสัตว์หรือคน ในเดือนที่ผ่านมา

1.3 บริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกแบบดิบๆ หรือ สุกไม่เพียงพอ โดยในพื้นที่นั้นเป็นพื้นที่ที่ต้องสงสัยว่าอาจมีการติดเชื้อ หรือได้รับการยืนยันว่ามีการติดเชื้อ H5N1 ในสัตว์หรือคน ในเดือนที่ผ่านมา

1.4 สัมผัสใกล้ชิดกับสัตว์ที่มีไข้สัตว์ปีกหรือ นกในธรรมชาติ เช่น หมู หรือ แมว และสัตว์นั้นได้รับการยืนยันว่าติดเชื้อไข้หวัดนก

1.5 ทำการทดสอบตัวอย่างตรวจในห้องปฏิบัติการ หรือ ปฏิบัติงานในลักษณะอื่นๆ โดยตัวอย่างตรวจนั้นมาจาก สัตว์ หรือ คน ที่ต้องสงสัยว่ามีเชื้อไวรัส H5N1

**2. Probable H5N1 case** (ผู้ป่วยที่อาจเป็น

โรคไข้หวัดนก) ผู้ป่วยที่ถูกจัดอยู่ในกรณีนี้ต้องแจ้งให้องค์การอนามัยโลกทราบ นิยามของผู้ป่วย probable case มีอยู่ 2 นิยาม คือ

2.1 นิยามที่ 1 คือ ครบเกณฑ์ของผู้ป่วย suspected case ร่วมกับเกณฑ์เพิ่มเติมอีก อย่างน้อย 1 อย่าง คือ

2.1.1 ผลการถ่ายภาพรังสีทรวงอกพบว่ามี infiltration หรือ มีปอดบวมเฉียบพลัน ร่วมกับภาวะความล้มเหลวของระบบหายใจ (ภาวะขาดออกซิเจนในเลือด-hypoxemia, หายใจเร็วมาก-severe tachypnea) หรือ

2.1.2 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการยืนยันว่าติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ type A แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นไวรัส H5N1

2.2 นิยามที่ 2 คือ บุคคลที่ถึงแก่กรรมด้วยโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันโดยไม่ทราบสาเหตุ และมีหลักฐานทางระบาดวิทยา ทั้งด้านเวลา สถานที่ การสัมผัสเชื้อ ที่เชื่อมโยงได้กับผู้ป่วยที่เป็น probable หรือ confirmed H5N1 case

**3. Confirmed H5N1 case** (ผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันทางห้องปฏิบัติการว่าป่วยเป็นโรคไข้หวัดนก H5N1) เป็นผู้ป่วยที่ต้องรายงานให้องค์การอนามัยโลกทราบ นิยามของผู้ป่วยคือ เป็นผู้ป่วยที่ครบเกณฑ์ของ suspected case หรือ probable case ร่วมกับการตรวจจากห้องปฏิบัติการที่เชื่อถือได้ ให้ผลการทดสอบเป็นบวกอย่างน้อย 1 ข้อ คือ

3.1 แยกเชื้อไวรัส H5N1 ได้

3.2 ผลการทดสอบ RT-PCR เป็นบวก จากการใส่ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายสองชุด เช่น ชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะกับไวรัส influenza A และชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ H5 HA อีก 1 ชุด

3.3 พบการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีในซีรัมคู่อย่างน้อย 4 เท่า จากการตรวจโดยวิธี neutralization test โดยเจาะ acute blood ภายใน 7 วัน หลังจากที่มีอาการ และ convalescent blood จะต้องมียอด titer  $\geq$  1:80 (1:80 ในที่นี้คือ 1:40 ในระบบสากลที่ใช้กันอยู่

ทั่วไป ทั้งนี้เนื่องจากห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จะถือเอา dilution คือ 1:40 ของซีรัมเป็น titer ด้วย ในขณะที่ระบบขององค์การอนามัยโลกได้เอาปริมาณในหลุมทดสอบมากำหนดร่วมด้วย)

3.4 ถ้าสามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้เพียงครั้งเดียว ภายหลังจากที่ผู้ป่วยมีอาการมาแล้ว 14 วัน หรือนานกว่านั้น จะต้องได้ antibody titer อย่างน้อย 1:80 โดยวิธี neutralization test และจะต้องมีผลบวกจากการทดสอบโดยวิธีอื่นร่วมด้วย เช่น การทดสอบโดยวิธี hemagglutination inhibition โดยใช้ เลือดม้า ได้ antibody titer ไม่ต่ำกว่า 1:160 หรือ การทดสอบโดยวิธี Western blot แสดงว่ามีแอนติบอดีต่อแอนติเจน H5

### การระบาดใหญ่ทั่วโลก (pandemic)

การระบาดใหญ่ที่ผ่านมา 3 ครั้ง มีชื่อเรียกและสาเหตุจากสายพันธุ์ดังนี้

#### Spanish flu (H1N1)

การระบาดเกิดขึ้น 3 แห่ง พร้อมกันในสหรัฐอเมริกา ในปี 2461 คือที่ Detroit, South Carolina และที่เรือนจำ San Quentin โรคระบาดอย่างรวดเร็วข้ามมหาสมุทรแอตแลนติก และแปซิฟิกภายในไม่กี่เดือน มีทหารอเมริกันเสียชีวิตเป็นจำนวนมากในระหว่างการเดินทางสู่ยุโรป การระบาดครั้งนี้ได้รับชื่อว่า Spanish flu เนื่องจากมีการรายงานโรคเป็นครั้งแรกที่กรุง Madrid ประเทศสเปน โรคได้ระบาดเป็นวงกว้าง และได้ฆ่าชีวิตคนถึง 50 ล้านคน ภายในเวลาเพียง 10 เดือน ซึ่งมากกว่าจำนวนคนตายจากสงครามโลกในระหว่างปี 2457-2461 การระบาดสิ้นสุดลงในปี 2462

#### Asian flu (H2N2)

การระบาดเริ่มขึ้นที่มณฑลยูนนาน ประเทศจีน ในเดือนมีนาคม 2500 และแพร่กระจายลงสู่เอเชียอาคเนย์ และแพร่ขึ้นไปสู่ญี่ปุ่น การระบาดโลกเกิดขึ้นภายในเวลาเพียง 6 เดือน เชื่อว่าประชากรโลกร้อยละ 40-50 มีการติดเชื้อ และมีผู้ถึงแก่กรรมประมาณ 1

ล้านคน

#### Hong Kong flu (H3N2)

การระบาดเริ่มขึ้นในประเทศจีน ในเดือนกรกฎาคม 2511 และแพร่สู่ฮ่องกง และประเทศอื่นๆ ภายในเดือนเดียวกัน โรคแพร่ไปสู่รัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา โดยทหารที่กลับจากเวียดนามนำไป เมื่อเปรียบเทียบกับการระบาดครั้งก่อนๆ แล้ว Hong Kong flu มีความรุนแรงน้อยกว่า มีผู้ถึงแก่กรรมระหว่างห้าแสนถึงหนึ่งล้านคน ความรุนแรงที่ลดลงนี้สันนิษฐานว่าเกิดจากภูมิคุ้มกันที่มีต่อ N2 ของเชื้อไวรัส H2N2 ที่มีอยู่ในชุมชนในขณะนั้น

จากการศึกษาชิ้นของไวรัส ได้พบว่า ยีนทั้ง 8 ของเชื้อ Spanish flu เหมือนกับที่พบในไวรัสไข้หวัดนก ในขณะที่ Asian flu มียีน 5 ชิ้น เหมือนกับไวรัส H1N1 ของคน ส่วนยีนอีก 3 ชิ้น คือ H, N และ PB1 เหมือนกับยีนของไวรัสไข้หวัดนก และ Hong Kong flu ก็มียีน H และ PB1 เหมือนกับยีนของไวรัสไข้หวัดนกเช่นกัน จากข้อมูลเหล่านี้แสดงว่าไวรัสที่จะก่อการระบาดทั่วโลกนั้น อาจเกิดขึ้นได้จากสองกระบวนการ คือ adaptation เช่น ในกรณีของ Spanish flu ซึ่งไวรัสจากสัตว์ปีกมีการปรับตัวจนเพิ่มจำนวน และแพร่เชื้อติดต่อจากคนสู่คนได้ดี และ reassortment คือมียีนของไวรัสไข้หวัดนกเข้าไปรวมตัวกับยีนของไวรัสไข้หวัดในคนแล้วได้ไวรัสลูกผสมที่เป็น subtype ใหม่เกิดขึ้น เนื่องจากประชากรทั่วไปยังไม่มีภูมิคุ้มกัน จึงเกิดการระบาดใหม่ขึ้น

#### เอกสารอ้างอิง

- พิไลพันธ์ พุฒวัฒน์. 2005. ไวรัสวิทยาของเชื้อไข้หวัดนก (H5N1 viruses). *Siriraj Med J* 57: 283-90.
- Auewarakul, P., Sangsiriwut, K., Chaichoune, K., Thitithayanont, A. Wiriyarat, W., Songserm, T., Ponak-nguen, R., Prasertsopon, J., Pooruk, P., Sawanpanyalert, P., Ratanakorn, P. and Puthavathana, P. 2007. Surveillance for reassortant

- virus by multiplex reverse transcription-PCR specific for eight genomic segments of avian influenza A H5N1 viruses. *J Clin Microbiol* 45: 1637-1639.
- Chotpitayasunondh, T., Ungchusak, K., Hanshaoworakul, W., Chunsuthiwat, S., Sawanpanyalert, P., Kijphati, R., Lochindarat, S., Srisan, P., Suwan, P., Osotthanakorn, Y., Anantasetagoon, T., Kanjanawasri, S., Tanupattarachai, S., Weerakul, J., Chaiwirattana, R., Maneerattanaporn, M., Poolsavathitikoool, R., Chokephaibulkit, K., Apisarnthanarak, A. and Dowell, S.F. 2005. Human disease from Influenza A (H5N1), Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis* 11: 201-209.
- Chutinimitkul, S., Songserm, T., Amonsin, A., Payungporn, S., Suwannakarn, K., Damrongwatanapokin, S., Chaisingh, A., Nuansrichay, B., Chieochansin, T., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2007. New strain of influenza A virus (H5N1), Thailand. *Emerg Infect Dis* 13: 506-507.
- Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J.D., Xu, K.M. and Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. and Peiris, J.S. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430: 209-213.
- Puthavathana, P., Auewarakul, P., Charoenying, P.C., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Boonnak, K., Khanyok, R., Thawachsupa, P., Kijphati, R. and Sawanpanyalert, P. 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* 86: 423-433.
- The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis* 11: 1515-1521.
- Uprasertkul, M., Puthavathana, P., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Srisook, K., Peiris, M., Nicholls, J.M., Chokephaibulkit, K., Vanprapar, N. and Auewarakul, P. 2005. Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis* 11: 1036-41.
- WHO Case Definitions for Human Infections with Influenza A (H5N1) Virus. 2007. Available at [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/case\\_definition2006\\_08\\_29/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/case_definition2006_08_29/en/index.html), 1 December 2007.
- Wright, P.F. and Webster, R.G. 2001. Orthomyxoviruses. In: D.M. Knipe and P.M. Howley (eds.). *Fields' Virology*. 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1533-1579.