หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

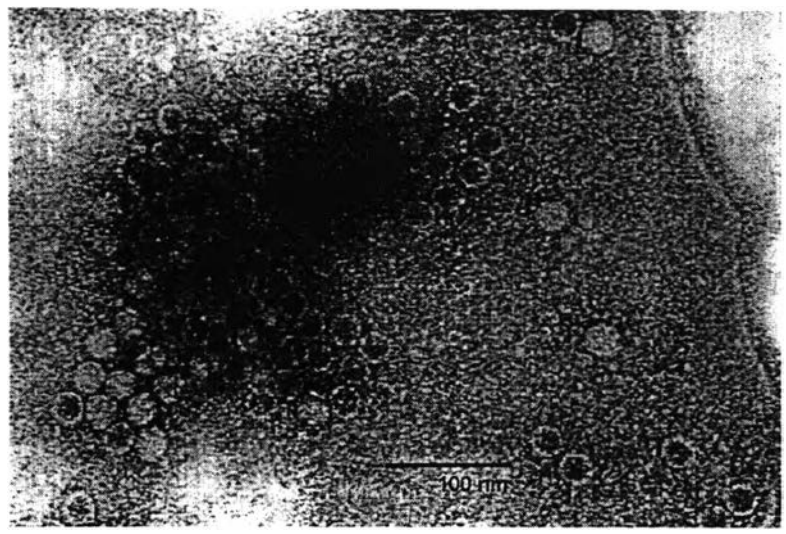
บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

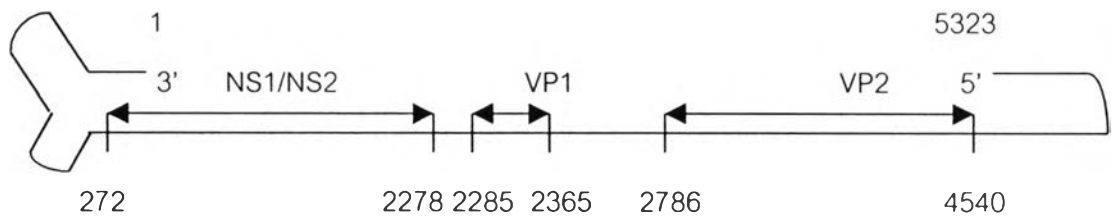
การเกิดโรคลำไส้อักเสบในสุนัข (Canine Enteritis) มีสาเหตุหลายประการ คือ พยาธิปากขอ (*Ancylostoma caninum*), enterotoxin จากเชื้อ *Escherichia coli*, *Campylobacter sp.*, *Samonella sp.*[1], *Clostridium perfringen*[2] และ เชื้อไวรัส

โรคลำไส้อักเสบจากเชื้อไวรัสในสุนัข (Canine Viral Enteritis) มีสาเหตุมาจากเชื้อพาร์โวไวรัส (Canine Parvovirus; CPV) โคโรน่าไวรัส (Canine Coronavirus; CCV) โรตาไวรัส (Canine Rotavirus; CRV) และ เชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (Canine Distemper Virus; CDV) อาการทางลำไส้อักเสบเป็นลักษณะเด่นที่พบได้ปกติในการติดเชื้อ CPV แต่อาการทางลำไส้อักเสบไม่ใช่เป็นลักษณะจำเพาะของการติดเชื้อ CDV [3] มีรายงานว่าการติดเชื้อ CPV เกี่ยวข้องกับอาการลำไส้อักเสบซึ่งนำไปสู่การเกิดท้องเสียจาก 48 รายใน 180 ราย (26.7%) [4]

ตระกูล *Parvoviridae* แบ่งออกเป็น 2 ตระกูลย่อย ได้แก่ *Parvovirinae* ซึ่งทำให้เกิดโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และ *Densovirinae* ซึ่งทำให้เกิดโรคในแมลง *Parvovirinae* แบ่งออกเป็น 3 จีนัส คือ *Parvovirus*, *Erythrovirus* และ *Dependovirus* ส่วน *Densovirinae* แบ่งออกเป็น 3 จีนัส คือ *Densovirus*, *Iteravirus* และ *Contravirus* [5,6] เชื้อพาร์โวไวรัส (Canine Parvovirus; CPV) ไข้หัดแมว (Feline Panleukopenia Virus; FPLV) และ ไวรัสที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในตัวมิ้งค์ (Mink Enteritis Virus; MEV) จัดอยู่ใน subgroup ของ Feline Parvovirus ในจีนัส Parvovirus CPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18-26 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 1 ประกอบด้วย DNA สายเดี่ยวที่ไม่มีเปลือกหุ้ม จีโนมมีเบสประมาณ 5,000 เบส ดังแสดงในรูปที่ 2 ประกอบด้วย 2 major open reading frames (ORFs) ORF ใน 3' มียีนสำหรับสร้าง nonstructural proteins NS1 และ NS2 ORF ใน 5' มียีนสำหรับสร้าง viral proteins VP1 และ VP2 [7] การศึกษาย้อนกลับทางซีรั่มวิทยาพบว่า CPV เกิดขึ้นครั้งแรกในยุโรปในช่วง 1974-1976 ปัจจุบันนี้เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดลำไส้อักเสบในสุนัขทั่วโลก [8]



รูปที่ 1 รูปร่างลักษณะของเชื้อ CPV ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน



รูปที่ 2 จีโนมของ CPV

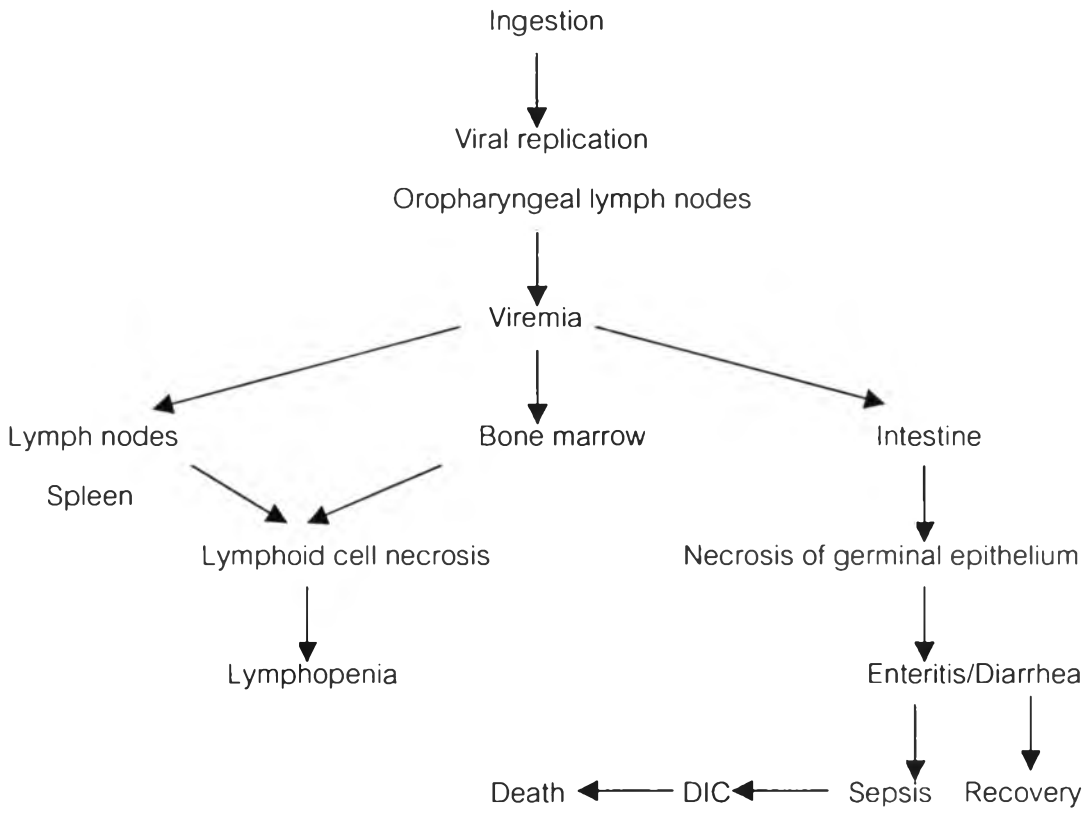
ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า CPV มีวิวัฒนาการมาจากไหน ถึงแม้ว่าการศึกษาที่ผ่านมานี้ชี้ว่า CPV มีต้นกำเนิดจากการกลายพันธุ์ของไวรัสในแมว (Feline Panleukopenia Virus) หรือ ในสัตว์กินเนื้อชนิดอื่น พบว่า CPV-2, Feline Panleukopenia Virus (FPLV) และ Mink Enteritis Virus (MEV) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยที่ลำดับดีเอ็นเอเหมือนกันประมาณ 98% Truyen และ คณะ (1995) เสนอแนะว่า CPV-2 อาจมีต้นกำเนิดมาจากการกลายพันธุ์ของ FPLV เกิดขึ้นก่อนในสัตว์ป่าในตระกูลสัตว์กินเนื้อ (carnivores) การศึกษาทางโปรตีนและลำดับเบสในดีเอ็นเอระหว่าง FPLV และ CPV พบว่ามีลักษณะคล้ายกัน แต่สามารถแยกไวรัสทั้งสองชนิดนี้ด้วย restriction enzyme mapping[9,10], antigen cross-reactivity[11] และ ความจำเพาะเจาะจงต่อโฮสต์[10] การผ่านเชื้อ CPV ใน feline และ canine cells หลายๆครั้งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของ CPV ขึ้นได้ สายพันธุ์แรกที่พบเป็น CPV-2 ซึ่งมีความแตกต่างและไม่มีความสัมพันธ์กับ minute virus of canines (CPV-1)[12]

CPV-1 แยกได้ในปี 1967 จากอุจจาระสุนัขปกติมีคุณสมบัติทางแอนติเจนและจีโนมต่างจาก CPV-2 CPV-1 เป็นสาเหตุทำให้เกิดปอดอักเสบและลำไส้อักเสบในลูกสุนัขที่เกิดใหม่ และทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนในแม่สุนัขที่ตั้งท้องในช่วงวันที่ 25 ถึง 35 ประมาณปี 1979 มีการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์จาก CPV-2 เป็น CPV-2a ในปี 1981 CPV-2a เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุนัขที่ป่วยเป็นโรคลำไส้อักเสบใน สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น เดนมาร์ก และ ออสเตรเลีย ในปี 1984 สายพันธุ์ใหม่คือ CPV-2b เข้ามาแทนที่ CPV-2a เป็นสาเหตุทำให้เกิดลำไส้อักเสบในสุนัข ตั้งแต่ปี 1986 สาเหตุของการเกิดลำไส้อักเสบที่เกิดจากเชื้อ CPV ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ CPV-2 โดยในปี 1988 CPV-2b กลายเป็นสายพันธุ์ที่พบได้ส่วนใหญ่ใน สหรัฐอเมริกา [13] จากการศึกษาโดยใช้ monoclonal antibodies พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง CPV-2, CPV-2a และ CPV-2b [14]

CPV และ FPLV/MEV มีคุณสมบัติทางชีวภาพ เช่น ความจำเพาะต่อเซลล์โฮสต์ และ pH ของการเกิด haemagglutination ที่แตกต่างกัน CPV สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนใน canine และ feline cell lines ส่วน FPLV และ MEV แบ่งตัวเพิ่มจำนวนใน canine cell line ได้ยาก CPV-2a และ CPV-2b สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในแมวได้ วัคซีนที่ทำจาก CPV-2 สามารถป้องกันโรคลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ CPV-2a และ CPV-2b ได้ แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าวัคซีนไข้หัดแมว (Feline Panleukopenia Virus Vaccine) มีประสิทธิภาพเพียงพอที่ป้องกันโรคลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ CPV-2a และ CPV-2b ได้หรือไม่ จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

การระบาดทั่วโลกของ CPV พบครั้งแรกในปี 1978 เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดลำไส้อักเสบ (enteritis) และ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis)โดยเฉพาะในลูกสุนัข [15] อัตราการป่วยและอัตราการตายสูง อาการจะรุนแรงเมื่อมีพยาธิร่วมอยู่ด้วย การแสดงออกของโรคทางเดินอาหาร (enteric form) เป็นอาการเด่นที่เป็นปัญหาในคอกสุนัขพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์และสุนัขซึ่งไม่ได้รับวัคซีน ไวรัสมีเนื้อเยื่อเป้าหมายกับอวัยวะที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในร่างกาย ได้แก่ เซลล์ในกลุ่มระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ไขกระดูก (bone marrow) และเซลล์ซึ่งบุอยู่บริเวณทางเดินอาหารโดยเฉพาะ crypt cells ของเยื่อบุลำไส้ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ CPV ในลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) และ mesenteric lymph nodes ของสุนัขเป็นลักษณะจำเพาะของ CPV [16] จากนั้นเซลล์ถูกทำลาย (lysed) ไวรัสจำนวนมากจึงขับออกมาพร้อมอุจจาระ พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อ CPV แสดงในรูปที่ 3 อาการทางคลีนิคของโรคลำไส้อักเสบที่เกิดจาก CPV มีอยู่ 2 รูปแบบ รูปแบบแรกและพบได้ส่วนใหญ่ คือ มีไข้ ซึม เบื่ออาหาร อาเจียน ถ่ายเหลวมีเลือดปน แห้งน้ำ สมดุลของกรด-ด่างเสียไป ช็อค และตายในที่สุด อีกรูปแบบหนึ่งมักเกิดกับลูกสุนัขที่อายุต่ำกว่า 3 เดือน ได้แก่ การตายจากการติดเชื้อที่หัวใจเป็นผลทำให้เกิดหัวใจวายอย่างเฉียบพลัน

อัตราการตายในลูกสุนัขที่มีอายุต่ำกว่า 5 เดือนสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์[17] อุจจาระเป็นแหล่งใหญ่ของเชื้อไวรัสที่จะแพร่ระหว่างสุนัขด้วยกัน และเป็นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาขั้นพื้นฐาน การติดต่อโดยการกินอาหาร น้ำดื่มที่ปนเปื้อนเชื้ออยู่ ระยะเวลา 3-10 วันหลังจากติดเชื้อจะพบไวรัสจำนวน 10^9 viral particles ต่อ 1 กรัมของอุจจาระ พบได้มากที่สุดประมาณ 4-7 วันหลังการติดเชื้อ[18] CPV สามารถมีชีวิตภายนอกตัวสุนัขได้นานหลายสัปดาห์หรือนานหลายเดือน



รูปที่ 3 พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อ CPV

วัคซีนป้องกันโรค CPV มีความปลอดภัยและสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ ปัญหาของการให้วัคซีน ได้แก่ ภูมิคุ้มกันที่ถ่ายทอดมาจากแม่ (maternal antibodies) มีผลต่อภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากการให้วัคซีน ในลูกสุนัข 90 % ของภูมิคุ้มกันของแม่ได้รับจากน้ำนมเหลือง (colostrum) ในช่วง 72 ชั่วโมงแรกหลังจากคลอด และจะมีค่าครึ่งชีวิต (half life) 9.7 วัน[19] maternal antibody ที่ HI ไตเตอร์มากกว่า 1:20 สามารถรบกวนภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการให้วัคซีนได้ maternal antibody ไม่สามารถป้องกันโรคในลูกสุนัขได้ตลอดเวลา เนื่องจาก maternal antibody จะค่อยๆลดลงจนหมดไป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลูกสุนัขที่มีภูมิคุ้มกัน HI ไตเตอร์ น้อยกว่า 1:80 ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ ดังนั้น การให้วัคซีนในลูกสุนัขที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ได้มีการแนะนำให้ทำทุกๆ 2 สัปดาห์ ในช่วงอายุระหว่าง 6-20 สัปดาห์ และทำซ้ำทุกปี

ปัจจุบันเชื้อ CPV ที่ระบาดอยู่เป็น ชนิด CPV-2a หรือ CPV-2b (field CPV strains) แตกต่างจาก CPV-2 (vaccine strain) ที่ใช้กันในทุกวันนี้ ดังนั้นปัญหาของการป่วยเป็นโรคลำไส้อักเสบหลังจากการให้วัคซีนสามารถพิสูจน์โดยใช้ monoclonal antibodies หรือ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

สำหรับในประเทศไทยมีการระบาดของโรคลำไส้อักเสบติดต่อในสุนัข ในช่วงระยะต้นปี 1979 โรคที่เกิดขึ้นมีลักษณะการระบาดรวดเร็ว สุนัขแสดงอาการอาเจียนและท้องร่วงอย่างรุนแรง ในสุนัขที่ตายพบรอยโรคที่ลำไส้เช่นเดียวกับที่มีรายงานในต่างประเทศ [20] จากการศึกษาต่อมาพิสูจน์ได้แน่ชัดว่าโรคลำไส้อักเสบจากเชื้อไวรัสในประเทศไทยมีสาเหตุมาจากเชื้อ CCV และ CPV [21] เช่นเดียวกันกับที่มีรายงานในประเทศญี่ปุ่น [22]

การวินิจฉัยโรคลำไส้อักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ CPV ประกอบด้วย ประวัติทางคลีนิค อาการ และ การตรวจร่างกาย ประวัติของการอยู่ร่วมกับสุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบ และอาการอาเจียน ถ่ายอุจจาระเหลวมีกลิ่นคาวจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวินิจฉัยโรค การวินิจฉัยโรคลำไส้อักเสบที่เกิดจากเชื้อไวรัส มี 3 วิธีการใหญ่ ๆ คือ

1. การตรวจหาเชื้อไวรัสในตัวอย่างอุจจาระ
2. การตรวจทางซีรั่มวิทยา (serology)
3. การผ่าซาก (necropsy) และ การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology)

การตรวจหาเชื้อไวรัสในตัวอย่างอุจจาระ โดยการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน (electron microscopy; EM) โดยทั่วไปไม่นิยมนำมาใช้ในการวินิจฉัย เนื่องจาก ค่อนข้างใช้เวลา เครื่องมือและค่าบำรุงรักษาเครื่องมือมีราคาแพง และบางครั้งได้ผลลบแม้ว่าสุนัขตัวนั้นติดเชื้อก็ตาม นอกจากนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสยังมีความยาก [23]

CPV สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของ rhesus monkeys และของสุกร เกิดการรวมกลุ่มกัน (agglutinate) ใน Hemagglutination test (HA) การตรวจหา hemagglutinin ในอุจจาระจะตรวจได้เมื่อไวรัสมีปริมาณระดับหนึ่ง โดยอุจจาระที่ใช้ตรวจนั้นอยู่ในรูปสารแขวนลอย แต่อย่างไรก็ตาม อาจมี non-specific hemagglutinin ในตัวอย่างอุจจาระได้ ดังนั้นควรจะมีการตรวจยืนยันผลดังกล่าวโดย ELISA หรือ Hemagglutination Inhibition test (HI) ด้วย specific CPV-serum ต่อไป hemagglutination เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ CPV เพราะว่าราคาไม่แพง และ ผลการทดสอบเห็นได้ชัดเจน อย่างไรก็ตาม มีข้อเสียหลายประการ ข้อแรกคือต้องอาศัยแหล่งของเม็ดเลือดแดง จาก rhesus monkeys และ จากสุกรอย่างต่อเนื่อง

ซึ่งเม็ดเลือดแดงสามารถเก็บไว้ได้เพียง 2-3 สัปดาห์เท่านั้น อีกประการหนึ่ง คือ อาจเกิดปัญหา non specific hemagglutination ในตัวอย่างอุจจาระได้

การวินิจฉัยจากรอยโรค เช่น การตายของเยื่อบุลำไส้บริเวณ crypts และ การตายของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ถึงแม้ว่ารอยโรคเหล่านี้เป็นพยาธิกำเนิดของโรคก็ตาม แต่จำเป็นต้องมีการยืนยันผลโดยการตรวจหาเชื้อ CPV ในรอยโรคนั้น เช่น การตรวจหากรดนิวคลีอิกหรือแอนติเจนของไวรัส โดยวิธี in situ hybridization หรือ immunohistochemistry ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม กรดนิวคลีอิกและแอนติเจนที่จำเพาะต่อ CPV อาจไม่สามารถเห็นได้ชัดเจน และยังจำกัดอยู่เฉพาะที่บริเวณลำไส้และเนื้อเยื่อน้ำเหลืองเท่านั้น ชุดตรวจ ELISA ที่มีขายเป็นการตรวจหาแอนติเจนในอุจจาระเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว อย่างไรก็ตาม ชุดตรวจ ELISA นี้ มีความไวน้อยกว่าการตรวจด้วย electron microscopy (EM) เมื่อทดสอบในสภาพแวดล้อมเดียวกัน [24]

แอนติบอดี้ต่อเชื้อ CPV เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแสดงอาการป่วย และ ยังคงอยู่ในระดับสูง เป็นเวลา 2-3 ปี [25] การตรวจพบแอนติบอดี้ต่อเชื้อ CPV ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าเชื้อ CPV เป็นสาเหตุของการเกิดโรค เนื่องจาก 25 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของสุนัขปกติสามารถตรวจพบแอนติบอดี้ซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการมาก่อนหน้านี้ โดยช่วงระยะเวลาดังกล่าวอาจตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในกระแสเลือด (viremia)

เนื่องจากธรรมชาติของการติดเชื้อเป็นไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการวินิจฉัยจึงต้องการความรวดเร็วเป็นสำคัญสำหรับการควบคุมและรักษาโรคอย่างเหมาะสม ตั้งแต่มีการค้นพบวิธีการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) มีความพยายามที่จะใช้เทคนิคที่มีศักยภาพนี้เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัย [26] มีการศึกษาการตรวจหาเชื้อ CPV ในตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธีการ PCR [27] และ มีการศึกษาถึงอัตราการตรวจพบเชื้อ CPV ในประเทศญี่ปุ่น[28] PCR ไม่เพียงแต่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) แต่ยังเป็นวิธีการที่ง่ายและเชื่อถือได้ในการตรวจหาเชื้อ CPV ในอุจจาระ เพราะว่า มี sensitivity สูงกว่า EM 10-100 เท่า โดย EM สามารถตรวจหาไวรัสได้ในระดับ $10^{4.5}$ PFU/ml ส่วน PCR สามารถตรวจหาไวรัสได้ในระดับ $10\text{-}10^{3}$ PFU/ml ประโยชน์อีกอย่างของ PCR คือ สามารถตรวจหาเชื้อ CPV ในเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการ fixed ด้วย formaldehyde และ paraffin embedding [29] นอกจากนั้นยังมีความต้องการที่จะแยกว่า สุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบที่ติดเชื้อ CPV เป็นผลมาจากการให้วัคซีน (CPV-2) หรือ การติดเชื้อตามธรรมชาติ (CPV-2a หรือ CPV-2b) โดยการนำเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ต่างๆที่ให้รูปแบบจากผลการตัดที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของเชื้อ CPV และแต่ละชนิดของเอนไซม์ ซึ่งหลักการดังกล่าวเรียกว่า Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ

1. ประเมินอัตราการตรวจพบเชื้อ CPV ในสุนัขที่ป่วยเป็นโรคลำไส้อักเสบและสุนัขปกติ โดยวิธี seminested PCR

2. ตรวจแยกชนิดของเชื้อ CPV-2 จาก CPV-2a และ CPV-2b โดยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

ข้อจำกัดในการวิจัย

จะจำกัดการแยกชนิด field strains (CPV-2a หรือ CPV-2b) และ vaccine strain (CPV-2) เท่านั้น เนื่องจากการศึกษานี้ไม่สามารถแยก CPV-2a และ CPV-2b ออกจากกันได้

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

สุนัขปกติ หมายถึง สุนัขที่มารับการให้วัคซีนและไม่เคยได้รับการให้วัคซีนมาก่อน

สุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบ หมายถึง สุนัขที่แสดงอาการ มีไข้ อาเจียนและถ่ายเหลว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ทราบอัตราการตรวจพบเชื้อ CPV ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในสุนัข และนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว ข้อมูลที่ได้นำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางระบาดวิทยา เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวางแผนป้องกันและควบคุมโรคโดยทำการให้วัคซีนป้องกันโรคให้กับสุนัขทุกตัวที่ยังไม่ได้ป่วยเป็นโรคลำไส้อักเสบ นอกจากนั้นยังสามารถแยกความแตกต่างของการเกิดโรคลำไส้อักเสบที่เกิดจากเชื้อ CPV ว่าเกิดจากการให้วัคซีน หรือเกิดจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ