บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการศึกษานี้ทำการศึกษาจากตัวอย่างอุจจาระของสุนัขที่สงสัยว่าป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ CPV จำนวน 55 ตัวอย่าง โดยทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยกรด-ด่าง และ ทำ seminested PCR ให้ผลบวก 34 รายใน 55 ราย (61.8 %) ดังแสดงในตารางที่ 3 รายงานของ Mochizuki M และ คณะ (1993) ทำการศึกษาจากตัวอย่างอุจจาระของสุนัขที่มีอาการท้องเสียทั่วไปจำนวน 59 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย phenol-chloroform และ ทำ seminested PCR ให้ผลบวก 22 รายใน 59 ราย (37.3%) ขณะที่ Hirasawa และ คณะ (1993) ทำการศึกษาจากตัวอย่างอุจจาระของสุนัขที่มีอาการท้องเสียทั่วไปจำนวน 74 ตัวอย่าง ทำ nested PCR ปรากฏว่าให้ผลบวก 40 รายใน 74 ราย (54.1%) รายงานของ Schunck B และคณะ (1995) ทำการศึกษาจากตัวอย่างอุจจาระของสุนัขที่สงสัยว่าป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ CPV จำนวน 65 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างได้มาจากอุจจาระของสุนัขที่เข้ามารับการรักษาที่ I. Medical Animal Clinic หรือ ตัวอย่างจากที่อื่นส่งมายัง Institute for Medical Microbiology ที่ Veterinary School ใน Munich ทำการสกัดดีเอ็นเอ ด้วย phenol-chloroform และทำ PCR เพียงครั้งเดียว โดย denature 5 นาที และ touch-down PCR ประกอบด้วย 94^{0}C 1 นาที 54^{0}C 1 นาที และ 72^{0}C 2 นาที ทำซ้ำ 10 รอบ ตามด้วย 94^{0}C 1 นาที 45^{0}C 1 นาที และ 72^{0}C 2 นาที ทำซ้ำ 35 รอบ สิ้นสุดปฏิกิริยาด้วย 72^{0}C 10 นาที ปรากฏว่าให้ผลบวก 54 รายใน 65 ราย (83.1%) การศึกษาของ Doreen และคณะ[37] พบว่าสุนัขพันธุ์แท้ เช่น พันธุ์ Rottweilers, American Pit Bull Terriers, Doberman Pinschers และ German Shepherd มีอัตราเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อ CPV และ สุนัขเพศผู้มีอัตราการติดเชื้อสูงกว่าสุนัขเพศเมียถึง 2 เท่า สุนัขทุกตัวที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ CPV มีประวัติไม่ได้รับการฉีดวัคซีนมาก่อนหน้านี้ สุนัขโตอายุมากกว่า 6 เดือน จะมีภูมิคุ้มกันต่อ CPV จากการติดเชื้อตามธรรมชาติที่ไม่แสดงอาการหรือที่เคยได้รับวัคซีนมาก่อนหน้านี้ [38] ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าลูกสุนัขอายุน้อยกว่า 6 สัปดาห์มีความไวต่อการติดเชื้อ CPV ได้มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 5 เพศ และพันธุ์ ไม่มีผลต่อความไวของการติดเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 6 ตามลำดับ นอกจากนี้ไม่สามารถตรวจพบ CPV DNA โดยวิธี seminested PCR ในทุกตัวอย่างอุจจาระของสุนัขปกติ

มีการศึกษาถึงความไว (sensitivity) ของ PCR ในการตรวจหาเชื้อ CPV พบว่าการทำ PCR เพียงรอบเดียวสามารถตรวจหาปริมาณ CPV DNA ได้ในระดับต่ำสุดถึง เฟมโตกรัม (10^{-15}) ในขณะที่การทำ PCR สองรอบ (nested) สามารถตรวจหาปริมาณ CPV DNA ได้ในระดับต่ำสุดถึง ออตโตกรัม (10^{-18})[39] การใช้ PCR ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่เพียงแต่จะมีความไวที่สูงแล้ว ยังมีความจำเพาะสูง เนื่องจากการทำ nested PCR นอกจากจะเลือกใช้ primers คู่นอกที่จำเพาะต่อลำดับเบสของ CPV ทำการขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแล้วยังเลือกใช้ primers คู่ในที่จำเพาะต่อลำดับเบสของ CPV ทำการขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อไปอีก รวมทั้งทำการตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลังจากทำ nested PCR ด้วยเอนไซม์ที่ตำแหน่งจำเพาะต่อเชื้อ CPV จึงเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากการเพิ่มจำนวน CPV DNA นอกจากนั้น Canine Coronavirus, Canine Rotavirus และ Canine Distemper Virus ที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ เป็น RNA virus จึงไม่สามารถทำการเพิ่มจำนวนได้หลังจากทำการสกัดดีเอ็นเอเพียงวิธีเดียว เพราะขั้นตอนการขยายเพิ่มจำนวน RNA virus จะต้องผ่านการ reverse transcripe เป็น cDNA ดังนั้นโอกาสที่จะเกิดผลลัพธ์บวกปลอม (false positive) จากการขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้ออื่นที่ไม่ใช่ CPV มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมาก

ปัญหาการปนเปื้อน (contamination) ของปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นได้ง่ายมาก เพราะเป็นปฏิกิริยาที่มีความไวสูง อาจเริ่มตั้งแต่ก่อนทำปฏิกิริยา (pre-PCR contamination) สิ่งปนเปื้อนเหล่านี้จะปรากฏให้เห็นหลังจากการตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยา การปนเปื้อนอาจมาจากตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอในระหว่างการเก็บ หรือ อาจมาจากผู้ที่ทำการทดลองก็ได้ เช่น อาจมาจากผม ผิวหนัง ฯลฯ หรืออาจมาจากห้องทดลองหรือพื้นโต๊ะที่ใช้ทำการทดลอง อากาศที่ไม่สะอาด สารเคมีที่ใช้ในการทดลองที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยา จะมีโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนได้ทั้งสิ้น

วิธีการหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของปฏิกิริยามีหลายขั้นตอน เช่น

- จัดแบ่งพื้นที่สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ไว้โดยเฉพาะ
- เครื่องมือที่ใช้สำหรับปฏิกิริยารวมทั้งสารเคมีควรเก็บไว้ต่างหากรวมทั้ง autoclave materials ก็ควรเก็บไว้ต่างหากด้วย
- สารเคมีบัฟเฟอร์ และ stock solution ต่างๆ ควรแบ่งมาใช้พอกับปฏิกิริยา
- สวมถุงมือเสมอเมื่อทำการทดลอง
- มี good laboratory practice (GLP)
- ตรวจสอบการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นโดยใช้ positive และ negative control ทุกครั้งที่ใช้เทคนิค PCR

- Positive control หรือ ผลิตภัณฑ์ของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา ควรเจือจางและทำลายในพื้นที่อื่น

ในทางปฏิบัติผู้วิจัยได้คำนึงถึงและวางมาตรการในการป้องกันการปนเปื้อนอยู่แล้ว

ความไวที่สูงของ PCR ใช้ประโยชน์ในการตรวจหาเชื้อ CPV ในระดับต่ำระหว่างช่วงต้นและช่วงปลายของการติดเชื้อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อกับคอกเพาะพันธุ์สุนัข โดยการตรวจหาและแยกตัวที่เป็นแหล่งแพร่เชื้อออกได้อย่างรวดเร็ว ความไวของการตรวจหา Canine Parvoviral DNA โดย PCR ขึ้นอยู่กับ 3 ขั้นตอน คือ การสกัดดีเอ็นเอออกจากตัวอย่างอุจจาระ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและ การตรวจหาผลิตภัณฑ์ภายหลังจากการทำ PCR ปัญหาของการใช้ PCR สำหรับการตรวจหา viral DNA ใน non-homogenous materials เช่น สิ่งคัดหลั่งและสิ่งขับถ่าย โดยเฉพาะกับตัวอย่างอุจจาระพบว่ามีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase จำเป็นต้องมีการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากตัวอย่างอุจจาระโดยวิธี phenol-chloroform extraction [34] หรือ gel filtration [40] ความไวของ PCR ในการตรวจหา Canine Parvoviral DNA สูงถึง 10^3 อนุภาค ต่อน้ำหนักอุจจาระ 1 กรัม มีความไวมากกว่าการตรวจหาเชื้อ CPV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน 10-100 เท่า [27] นอกจากนั้น PCR มีความไวเท่ากับ viral isolation โดยใช้ Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell culture และ มีความไวมากกว่า viral isolation โดยใช้ Crandell feline kidney (CRFK) cell culture[34]หรือ HA assay เพื่อที่จะเพิ่มความไวของการตรวจหา CPV ดังนั้น seminested PCR จึงถูกนำมาใช้ศึกษาเพื่อเพิ่มจำนวนขึ้นมาใหม่ของดีเอ็นเอ รวมทั้งเป็นการลดสารที่ไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR ผลลัพธ์ลบที่ได้เป็นผลลบจริง เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการได้ แสดงว่าไม่มีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR และ สามารถตรวจพบดีเอ็นเอภายหลังจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยกรด-ด่าง ชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยกรด-ด่างในการศึกษาครั้งนี้ได้

จากการเลือกใช้ restriction enzymes ในการตัดแยก CPV-2 ออกจาก CPV-2a และ CPV-2b โดยคาดว่าเอนไซม์ *Rsa* I ตัดผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง (CPV-2a หรือ CPV-2b) จากการทำ seminested PCR ขนาด 747 เบส ออกเป็น 149, 50, 146 และ 402 เบส และ ตัดผลิตภัณฑ์วัคซีน (CPV-2) จากการทำ seminested PCR ขนาด 747 เบส ออกเป็น 149, 50 และ 548 เบส ดังแสดงในรูปที่ 7 แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถเห็นแถบดีเอ็นเอด้วย UV light ขนาด 149, 146 และ 402 เบสจากการใช้เอนไซม์ *Rsa* I ตัดผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง (CPV-2a หรือ CPV-2b) และ เห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 149 และ 548 เบส จากการตัดผลิตภัณฑ์วัคซีน (CPV-2) ด้วยเอนไซม์ *Rsa* I ดังแสดงในรูปที่ 12 แถบดีเอ็นเอขนาด 50 เบส เมื่อทำ electrophoresis เทียบกับ Marker 100 เบส ไม่สามารถมองเห็นได้บน 2% agarose gel

การที่จะตรวจสอบแถบดีเอ็นเอขนาด 50 เบสดังกล่าว จำเป็นต้องเลือกใช้ Marker ที่สามารถแยกเบสดังกล่าวได้ ใช้ agarose gel ที่เปอร์เซ็นต์สูงขึ้น และ ทำ electrophoresis ที่โวลต์ต่ำและใช้เวลานานขึ้น คาดว่าเอนไซม์ *Hph* I ตัดผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง (CPV-2a หรือ CPV-2b) จากการทำ seminested PCR ขนาด 747 เบส ออกเป็น 220, 348 และ 179 เบส และ ตัดผลิตภัณฑ์วัคซีน (CPV-2) จากการทำ seminested PCR ขนาด 747 เบส ออกเป็น 220, 147 และ 380 เบส ดังแสดงในรูปที่ 8 การศึกษาครั้งนี้ พบว่า สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอด้วย UV light ขนาด 220, 348 และ 179 เบสจากการใช้เอนไซม์ *Hph* I ตัดผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง (CPV-2a หรือ CPV-2b) และ เห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 220, 147 และ 380 เบส จากการตัดผลิตภัณฑ์วัคซีน (CPV-2) ด้วยเอนไซม์ *Hph* I ดังแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งเป็นไปตามความคาดหมาย

ผลของการศึกษาหาชนิดของเชื้อ CPV ที่ตรวจพบในตัวอย่างอุจจาระจำนวน 34 ตัวอย่าง และ ใน Modified Live CPV Vaccine คือ Parvodog (Rhone-Merieux) โดยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ของการศึกษานี้ในผลิตภัณฑ์ขนาด 747 เบส พบว่า รูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I และ *Hph* I ของเชื้อ CPV ในทุกตัวอย่างอุจจาระดูเป็นรูปแบบเดียว และมีความแตกต่างจากรูปแบบของเชื้อ CPV ที่พบได้ในวัคซีน เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Sagazio P และ คณะ (1998) ที่ทำการเพิ่มจำนวน CPV DNA จากตัวอย่างอุจจาระที่มีเชื้อ CPV จำนวน 28 ตัวอย่าง และ จาก Modified Live CPV Vaccines 4 บริษัท คือ Parvodog (Rhone-Merieux), Nobivac Puppy (Intervet), Enduracell (Pfizer) และ Dohyvac (Solvay)[36] ในผลิตภัณฑ์ขนาด 2.2 กิโลเบส พบว่าผลิตภัณฑ์ของ CPV-2 vaccine strain มีความแตกต่างจาก CPV-2a และ CPV-2b ภายหลังย่อยด้วยเอนไซม์ *Rsa* I

จากการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลสนับสนุนว่า ในปัจจุบันนี้ CPV-2 ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ CPV ในตามธรรมชาติ การที่สามารถแยก CPV-2 ออกจาก CPV-2a หรือ CPV-2b ได้ ใช้เป็นประโยชน์ในการพิสูจน์หาสาเหตุของการเกิดโรคลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ CPV ภายหลังจากการทำวัคซีนว่า เกิดจากการทำวัคซีน (CPV-2) หรือ เกิดจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ (CPV-2a หรือ CPV-2b) ถ้าเกิดจากการติดเชื้อ CPV ตามธรรมชาติ อุจจาระของสุนัขจะมีเชื้อ CPV ทั้งจากธรรมชาติและจากวัคซีนที่ได้รับ แต่ในกรณีที่เกิดจากวัคซีน อุจจาระของสุนัขที่ป่วยจะตรวจพบเชื้อจากวัคซีนเพียงชนิดเดียว[36] ซึ่งการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบันของเชื้อ CPV เช่น HA, ELISA, IF เป็นต้น ไม่สามารถแยกความแตกต่างดังกล่าวได้

Greenwood (1995) ได้ใช้ restriction enzymes 21 ชนิด ในการตัด genome ทั้งหมดของ Canine Parvoviral DNA ขนาด 5.3 กิโลเบส พบว่า *Mbo* I และ *Hph* I สามารถแยก CPV-2 ออกจาก CPV-2a และ CPV-2b ส่วน restriction enzymes *Hae* III, *Hinf* I, *Dra* I และ *Hha* I จะสามารถแยก CPV-2b ออกจาก CPV-2 และ CPV-2a [35] ในขณะที่การศึกษานี้ได้ทำการเพิ่มจำนวน CPV DNA ที่อยู่ในบริเวณ VP2 gene ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 747 เบส และจากรูปที่ 5 แสดงถึงความแตกต่างระหว่างลำดับเบสและกรดอะมิโนบริเวณ VP2 gene ระหว่าง CPV-2, CPV-2a และ CPV-2b พบว่าที่ลำดับเบสที่ 4062 และ 4449 สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง CPV-2a และ CPV-2b การศึกษานี้ได้ทำการหาเอนไซม์ที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่าง CPV ทั้งสองชนิดนี้ โดยใช้ Graphic map / Table by enzyme name จาก internet web site Http://www.ccsi.com/firstmarket/cutter ปรากฏว่าไม่มีเอนไซม์ใดที่สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างได้ จึงทำได้เพียงแยก CPV-2 (vaccine strain) ออกจาก CPV-2a หรือ CPV-2b (field strains) เท่านั้น การที่จะแยก CPV-2a ออกจาก CPV-2b จะต้องใช้ monoclonal antibodies หรือ เลือก primer ที่มีปลายทางด้าน 3' ต่อ CPV ชนิดนั้นๆ หรืออาจจะเลือกใช้การ sequencing ตรงลำดับเบสนั้นๆ

การเปลี่ยนแปลงจาก CPV-2 มาเป็น CPV-2a และCPV-2b ของเชื้อ CPV เป็นผลมาจากความกดดันต่อไวรัสจากการกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสุนัข VP2 gene มีความสำคัญในการกำหนดชนิดของโฮสต์ [11,32,41] อัตราการเปลี่ยนแปลงของ CPV บริเวณ VP-2 gene ที่ผ่านมา 12 ปี นับตั้งแต่ปี 1979 เท่ากับ 1.69×10^{-4}/ nt/ ปี น้อยกว่า influenza virus บริเวณ HA gene 10 ถึง 100 เท่า [42,43] เท่ากับ หรือ มากกว่า hepadnavirus [44] CPV DNA แบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยอาศัย DNA polymerase จากโฮสต์ ซึ่งมีอัตราการผิดพลาดต่ำ

PCR สามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ เพราะว่าประโยชน์ของการทำ PCR มีดังต่อไปนี้

1. PCR สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหา CPV DNA ได้ตั้งแต่ระยะต้นๆ เมื่อเทียบกับการวินิจฉัยโดยวิธีอื่น
2. เมื่อผลของการวินิจฉัยด้วยวิธีการอื่นๆในห้องปฏิบัติการให้ผลลบ แต่ประวัติและอาการคิดว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ CPV PCR เป็นทางเลือกวิธีหนึ่งที่จะใช้ทดสอบการติดเชื้อ CPV

ปัญหาของการระบาดของโรค คือ การที่สุนัขอาศัยรวมอยู่ในที่ที่จำกัดทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในพื้นที่เมืองหลวงและเขตปริมณฑล การควบคุม CPV โดยการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อ และ ทำการฉีดวัคซีนป้องกันให้กับสุนัขทุกตัว

ไม่มียาตัวใดใช้รักษาการติดเชื้อ CPV ได้ การรักษาจะเกี่ยวข้องกับการให้สารน้ำบำบัดอาการแห้งน้ำ (rehydrate) และให้สารอาหารแก่สุนัขที่ป่วย การรักษาเพิ่มเติมโดยการป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อน (secondary bacterial infection) และให้ยาควบคุมการอาเจียนและท้องเสีย

จากการทำ seminested PCR ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคลำไส้อักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ CPV ได้ถูกต้องและรวดเร็ว เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวางแผนป้องกันและควบคุมโรคต่อไป นอกจากนั้นวิธี PCR และ RFLP สามารถแยกความแตกต่างของการเกิดโรคลำไส้อักเสบในสุนัขที่เกิดจากเชื้อ CPV ว่าเกิดจากการให้วัคซีน (CPV-2) หรือเกิดจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ (CPV-2a หรือ CPV-2b) เนื่องจากการศึกษานี้ไม่สามารถแยก CPV-2a ออกจาก CPV-2b เพื่อนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานทางระบาดวิทยาของ CPV ที่พบได้ในประเทศไทย จำเป็นต้องมีการใช้ monoclonal antibodies หรือ เลือก primer ที่มีปลายทางด้าน 3' ต่อ CPV ชนิดนั้นๆ หรือ อาจจะใช้การ sequencing ตรงลำดับเบสนั้น เพื่อจะได้รู้ว่า CPV ที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในประเทศไทยเป็นชนิด CPV-2a หรือ CPV-2b