บทที่ 1

บทนำ

โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคติดเชื้อร้ายแรงที่มนุษย์รู้จักมานาน โรคนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางระบบประสาทในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไม่ว่าจะเป็นสัตว์เลี้ยงหรือสัตว์ป่าก็ตาม สำหรับสัตว์เลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง สุนัขมีความไวต่อการติดเชื้อค่อนข้างมากและถือเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ กล่าวคือผู้เสียชีวิตถึงร้อยละ 95-96(1) เกิดจากถูกสุนัขบ้ากัดในประเทศที่การควบคุมสุนัขและการให้วัคซีนไม่ดีหรือไม่ทั่วถึง ในแง่ของระบาดวิทยาโรคนี้พบได้ในทุกภาคของประเทศโดยเฉพาะภาคกลางนั้นมีปัญหามากกว่าภาคอื่น ๆ (2)

การติดต่อของโรคพิษสุนัขบ้า ส่วนใหญ่เชื้อไวรัสจะเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผลจากการกัด ส่วนน้อยเท่านั้นที่จะเข้าทางเยื่อบุและทาง aerosol exposure ในกรณีของการกัดเมื่อไวรัสเข้าสู่ร่างกายแล้ว จะเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อตรงบริเวณนั้น (3,4) และเดินทางตามเส้นประสาทไปยังระบบประสาทส่วนกลางเข้าไปเพิ่มจำนวนมากมายในสมองส่วนต่าง ๆ จากนั้นจะเดินทางตามเส้นประสาทออกมายังอวัยวะอื่น (centrifugal spread) อาการของโรคจะปรากฏต่อเมื่อเซลล์สมองจำนวนมากติดเชื้อ และจะมีผลทำให้ผู้ป่วยถึงแก่กรรมในเวลาอันรวดเร็ว (5)

ระยะฟักตัวของไวรัสในคนโดยเฉลี่ยประมาณ 1-2 เดือน แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานตั้งแต่ 1 วัน - 5 ปี (6,7) ซึ่งไม่ทราบเหตุผลแน่นอน

แต่ก็อาจจะขึ้นกับตำแหน่งและอวัยวะที่ถูกกัดด้วย ถ้าเชื้ออยู่ในตำแหน่งใกล้ศีรษะย่อมมีระยะฟักตัวสั้นกว่าแขนหรือขา (8) นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากความรุนแรงของแผลที่ถูกกัด ปริมาณของเชื้อที่เข้าไปในบาดแผล ชนิดของสัตว์ที่กัด และสายพันธุ์ต่าง ๆ ของไวรัส ซึ่งผู้ถูกสัตว์ที่มีเชื้อกัดทุกรายไม่ได้เสียชีวิตทุกคน แม้ว่าจะไม่ได้รับการรักษา อัตราตายจะอยู่ในช่วง 35-57% (9,10) ทั้งนี้อาจจะขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น รวมทั้งวิธีบฏิบัติเบื้องต้น เช่น การล้างแผลภายหลังถูกสัตว์กัดด้วย (11,12)

โรคพิษสุนัขบ้าเกิดจากไวรัสชนิด single stranded RNA - virus ที่มีรูปร่างคล้ายลูกปืน ลักษณะนี้จัดเป็นลักษณะจำเพาะของไวรัสในวงศ์ Rhabdoviridae (13) ซึ่งมีเพียง 2 genus คือ Vesiculovirus และ Lyssavirus สำหรับ Lyssavirus นั้น จากการวิเคราะห์รดยใช้ monoclonal และ polyclonal antibody ทำให้สามารถจัดแบ่งได้ดังนี้ คือ :

Serotype 1 : prototype strain คือ challenge standard virus (CVS) ซึ่งจะรวมถึงกลุ่มที่แยกได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไปรวมทั้งจากค้างคาวกินผลไม้ในทวีปอเมริกาเหนือ และ ค้างคาวดูดเลือดในประเทศแถบละตินอเมริกา และ fixed laboratory strains

Serotype 2 : prototype strain คือ Lagos bat ซึ่งแยกได้ครั้งแรกจากสมองของค้างคาวในไนจีเรีย (Lagos-bat 1) ต่อจากนั้นยังพบในค้างคาวในบริเวณ Central African Republic (Lagos-bat 2) และจาก

ค้างคาวใน Guinea และแมวใน Zimbabwe (Lagos-bat 3)

Serotype 3 : prototype strain คือ Mokola ซึ่งแยกได้ครั้งแรกจาก shrews ใน Nigeria และจากคน (Mokola 1) นอกจากนั้นยังพบใน shrews อีกใน Cameroon (Mokola 2) ใน Central African Republic (Mokola 3) และจากสุนัขใน Zimbabwe (Mokola 4)

Serotype 4 : prototype strain คือ Duvenhage ซึ่งแยกได้ครั้งแรกจากคนใน South Africa (Duvenhage1) และจากค้างคาวใน South Africa (Duvenhage 2) และ Zimbabwe (Duvenhage 3)

นอกจากนี้ยังมีไวรัสที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ชัดเจน ได้แก่ European bat lyssaviruses (EBL) จากค้างคาว Eptesicus serotinus (EBL) และค้างคาว Myotis (EBL 2) รวมทั้ง EBL ที่แยกได้จากคนที่สัมผัสกับค้างคาวใน Finland และ Ukraine

ปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับกันว่า โรคพิษสุนัขบ้าเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขโรคหนึ่งของประเทศ แม้ว่าจำนวนผู้เสียชีวิตจะลดลงเหลือเพียงปีละประมาณ 100-200 คน ก็ตาม (17) แต่จำนวนผู้รับการฉีดวัคซีนป้องกันหลังจากรับเชื้อ หรือสงสัยว่ารับเชื้อแล้วมีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ คือ ปีละประมาณ 80,000-100,000 คน (17,18)

ในกรณีที่ถูกสุนัขหรือแมวกัดและสัตว์ที่กัดนั้นยังมีชีวิตอยู่ WHO (1982) แนะนำให้เฝ้าสังเกตอาการเป็นเวลา 10 วัน(15) โดยยังไม่ต้องทำการรักษา จนกว่าสัตว์นั้นจะเริ่มมีอาการ ตามคำแนะนำดังกล่าวนี้ยังไม่ปลอดภัยเท่าที่ควร เพราะสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งสุนัขที่เป็นพาหะนำโรคดังกล่าว อาจมีไวรัสในน้ำลายได้โดยไม่แสดงอาการผิดปกติ (20) Fekadu รายงานการตรวจพบไวรัสในน้ำลายได้เป็นเวลาถึง 2 สัปดาห์ก่อนที่สัตว์ทดลองจะแสดงอาการ(21) ยิ่งไปกว่านั้นการเริ่มต้นให้การรักษาหลังจากที่รอดูอาการดังกล่าว ทำให้พลาดโอกาสสำคัญไปในช่วง 72 ชั่วโมงแรก และมีผู้เสียชีวิตจากการเฝ้าดูอาการดังกล่าว ดังนั้น WHO จึงแปลี่ยนคำแนะนำใหม่ในปี 1992 เป็นให้เริ่มการรักษาไปทันทีเลย และหยุดการรักษาต่อเมื่อสุนัขหรือแมวยังปกติอยู่ภายใน 10 วัน

ในกรณีที่สัตว์ตายและผลการตรวจด้วย fluorescent antibody test (FAT) ในสมองให้ผลลบก็ตาม แต่ถ้าลักษณะของสัตว์น่าสงสัย ก็ยังคงต้องได้รับการฉีดวัคซีน จนกว่าจะทราบผลการตรวจสอบยืนยันด้วย mouse inoculation test (MIT) (22) เนื่องจาก FAT สามารถให้ผลลบเทียมได้ ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ถ้าสมองที่ส่งตรวจเริ่มเน่าเสีย จะไม่สามารถแปลผล FAT และ MIT ได้เลย

จากเงื่อนไขดังกล่าว ทำให้ผู้ต้องสงสัยว่าสัมผัสโรคต้องได้รับวัคซีนทันที และรับไปแล้วถึง 3 เข็มคือวันที่ 0,3,7 ในกรณีที่สัตว์ยังมีชีวิตอยู่ (11) หรืออาจจะถึง 4 เข็ม (0,3,7,14) ในกรณีที่ต้องรอผล MIT ซึ่งการแปลผลต้องรอถึง 14-21 วัน วัคซีนที่นิยมใช้ในปัจจุบันต้องสั่งเข้าจากต่างประเทศทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงอันได้แก่ ค่าใช้จ่ายซึ่งเกิดจากการจัดบริการทางสาธารณสุข และทางอ้อม อาทิเช่นค่าเดินทางมารับบริการ ค่าเสียเวลาเป็นต้น (17)

การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการได้มีการพัฒนาเรื่อยมาเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสม เพื่อจะสามารถตรวจสอบยืนยันผลจาก FAT ได้ในเวลาอันรวดเร็วและมีความแม่นยำสูงสุด Ermine และคณะ (23) ใช้เทคนิคด้าน recombinant DNA ตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า โดยอาศัย DNA hybridization probes ตรวจหา specific rabies RNA จากสิ่งส่งตรวจ ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจ total RNA ที่มีปริมาณเพียง 80 ng ได้ และจากการตรวจสิ่งส่งตรวจ 20 ตัวอย่างด้วยวิธี DNA hybridization พบว่าผลมีความสัมพันธ์กันดีกับวิธี FAT และวิธีการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง (rabies tissue culture infection test)

ต่อมา Sacramento (24) รายงานการตรวจไวรัสพิษสุนัขบ้าด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจยืนยัน PCR product ที่ได้ด้วย rabies N probes พบว่าผลที่ได้มีความสัมพันธ์กับการตรวจด้วย FAT, rabies tissue culture infection test (RTCIT) และ rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID) ร้อยเปอร์เซนต์

เนื่องจากการตรวจด้วยวิธี PCR เพียงขั้นตอนเดียวนั้นไม่เพียงพอจำเป็นต้องตรวจยืนยันผลด้วยวิธีอื่น เช่น hybridization โดยอาศัย isotope probes ซึ่งสารกัมมันตภาพรังสีอาจเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติได้

Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) เป็นวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อขยายสารพันธุกรรมเป้าหมายถึง 2 ต่อ ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหลอดทดลองจนสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต การตรวจด้วย nested PCR จะเป็นการเพิ่มความไวและพิสูจน์ความจำเพาะโดยไม่ต้องอาศัย hybridization probe ปัจจุบันเทคนิค nested PCR ถูกนำมาใช้ช่วยวินิจฉัยโรคติดเชื้อที่สำคัญหลายชนิด อาทิเช่น human immunodeficiency

virus, hepatitis B virus, human papilloma virus เป็นต้น (25, 26,27)

ดังนั้นเทคนิค nested PCR จึงควรเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าทางห้องปฏิบัติการอีกวิธีหนึ่ง

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนผลลบเทียม (false negative) ของ Fluorescent Antibody Test ระหว่างปี 2528 ถึง 2534 ของหน่วยชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้า สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

ปี / จำนวน	2528	2529	2530	2531	2532	2533	2534
MIT positive	32	19	11	4	4	3	2
FAT negative	1932	2253	2191	2209	1962	1730	1482
false negative (%)	1.66	0.84	0.50	0.18	0.20	0.15	0.13

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อประเมินวิธี nested PCR ในการตรวจไวรัสพิษสุนัขบ้าจากสิ่งส่งตรวจประจำวันในแง่ความไว และความจำเพาะของวิธีรดยเปรียบเทียบกับ FAT และ MIT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน
2. เพื่อศึกษาการตรวจไวรัสจากสมองสัตว์ที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28-33° ที่เวลา 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชม.หลังจากเก็บสมองสัตว์ด้วยวิธี nested PCR, FAT และ MIT
3. เพื่อศึกษาปริมาณ virus specific RNA และ total RNA ที่น้อยที่สุดที่วิธี nested PCR สามารถตรวจได้