

PRELIMINARY STUDY OF ANTIBODIES AGAINST SEVERE FEVER WITH THROMBOCYTOPENIA SYNDROME VIRUS (SFTSV) AMONG DOGS IN SAMUT SAKHON PROVINCE

Preeyaporn PLOYPICHAJ¹, Benyapa KRIEBKAJON¹, Torntun CHINARAK¹, Jirasin SRIDAPHAN¹, Nattakarn NAIMON¹, Anamika KRITIYAKAN¹, Noppadol PRASERTSINCHAROEN¹, Worawut RERKAMNUAYCHOKE² and Thanmaporn PHICHITRASILP^{1*}

1 Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Thailand; cvtttp@ku.ac.th (Corresponding Author)

2 Faculty of Veterinary Medicine, Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Bangphra Campus

ARTICLE HISTORY

Received: 16 February 2024

Revised: 8 March 2024

Published: 15 March 2024

ABSTRACT

In 2023, there was the first report of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus (SFTSV) infection which causes the SFTS among dogs in Thailand. SFTSV antibodies can be detected in a variety of animals including humans. Dogs are one kind of animal that have high seropositive rate and could play an important role of SFTSV spreading. For these reasons, the antibodies against SFTSV were detected by using an Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay among the total of 99 dog sera ($n = 99$), which were collected from Samut Sakhon province between April and May 2023. The result shows 4/99 (4.04%) positive samples for SFTSV antibody detection. Statistical analysis reveals that there is a significant difference in both gender and age factors ($P\text{-value} < 0.05$). Accordingly, this study confirms the spreading of SFTSV has already occurred among dogs in Thailand.

Keywords: Dogs, Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antibody

CITATION INFORMATION: Ploypichai, P., Kriebkajon, B., Chinarak, T., Sridaphan, J., Naimon, N., Kritiyakan, A., Prasertsincharoen, N., Rerkamnuaychoke, W., & Phichitrasilp, T. (2024). Preliminary Study of Antibodies against Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus (SFTSV) among Dogs in Samut Sakhon Province. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 2(3), 19

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการมีภูมิคุ้มกันที่มีต่อไวรัสก่อโรคที่มีอาการไข้ ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรงในสุนัขในจังหวัดสมุทรสาคร

ปริยาภรณ์ พลอยพิชัย¹, เบญญาภา กลีบขจร¹, ธรณัชนัย ชินารักษ์¹, จิรสิน ศรีดาพันธ์¹, ณัฐกาญจน์ นายมอญ¹, อนามิกา กฤติยาภรณ์¹, นพดล ประเสริฐสินเจริญ¹, วรุฒิ ฤกษ์อำนวยโชค² และ ธรรมมาพร พิจิตราศิลป์^{1*}

1 ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; cvtttp@ku.ac.th
(ผู้ประพันธ์บรรณกิจ)

2 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตบางพระ จังหวัดชลบุรี

บทคัดย่อ

ในปี พ.ศ.2566 พบรายงานการติดเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคที่มีอาการไข้ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคที่มีอาการไข้ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรงในสุนัขครั้งแรกในประเทศไทย โดยภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV สามารถตรวจจับได้ในสัตว์หลายชนิดรวมถึงมนุษย์ สุนัขเป็นหนึ่งในสัตว์ที่ตรวจพบภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ได้สูงและมีบทบาทในการแพร่กระจายเชื้อได้ การศึกษานี้จึงได้ทดสอบการมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส SFTSV ของสุนัข โดยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ทางอ้อม ในตัวอย่างซีรัมสุนัขทั้งหมด 99 ตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรสาครที่เก็บในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ.2566 พบสุนัขที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส SFTSV 4/99 (4.04%) นอกจากนี้เพศและอายุของสุนัขได้ถูกนำมาศึกษาปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัส SFTSV พบว่าทั้งสองปัจจัยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาในครั้งนี้ยืนยันได้ว่าเชื้อไวรัส SFTSV พบการระบาดในสุนัขในประเทศไทยแล้ว

คำสำคัญ: เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ทางอ้อม, ภูมิคุ้มกันต่อไวรัสก่อโรคที่มีอาการไข้ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง, โรคที่มีอาการไข้ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง, สุนัข

ข้อมูลการอ้างอิง: ปริยาภรณ์ พลอยพิชัย, เบญญาภา กลีบขจร, ธรณัชนัย ชินารักษ์, จิรสิน ศรีดาพันธ์, ณัฐกาญจน์ นายมอญ, อนามิกา กฤติยาภรณ์, นพดล ประเสริฐสินเจริญ, วรุฒิ ฤกษ์อำนวยโชค และ ธรรมมาพร พิจิตราศิลป์. (2567). การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการมีภูมิคุ้มกันที่มีต่อไวรัสก่อโรคที่มีอาการไข้ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรงในสุนัขในจังหวัดสมุทรสาคร. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 2(3), 19

บทนำ

โรคที่มีกลุ่มอาการไข้ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) คือ โรคติดเชื้ออุบัติใหม่และเป็นโรคสัตว์สู่คน (Zoonosis) เกิดจากไวรัสก่อโรคที่มีกลุ่มอาการไข้ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus; SFTSV) ซึ่งเป็นไวรัสติดเชื้อชนิดใหม่ในวงศ์ฟีนูอิริดี (family *Phenuiviridae*) ในอันดับบันยาไวรัสเลส (order *Bunyavirales*) และ สกุลบันยังไวรัส (genus *Banyangvirus*) โดยมีเห็บ *Haemaphysalis longicornis* เป็นรังโรคและพาหะหลักในการแพร่กระจาย สามารถติดเชื้อได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด เช่น สัตว์ป่า สัตว์เลี้ยง สัตว์ปศุสัตว์ รวมถึงมนุษย์ (Li, 2022) SFTS ถูกรายงานครั้งแรกในประเทศจีน เมื่อปี พ.ศ.2553 จากนั้นเกิดการระบาดต่อมาในประเทศญี่ปุ่นและเกาหลีใต้ เมื่อปี พ.ศ.2555 (Li, 2021) พบอัตราการเสียชีวิตในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้อยู่ที่ 6.18%, 27% และ 23.3% ตามลำดับ (Casel, 2021) อาการที่เด่นชัดจากการติดเชื้อไวรัส SFTSV คือ มีไข้ อาเจียน ท้องเสีย เกล็ดเลือดต่ำ เม็ดเลือดขาวต่ำ ต่อม้ำเหลืองโต เกิดอาการทางระบบทางเดินอาหารและระบบประสาท หากเกิดอาการรุนแรงอวัยวะสำคัญจะถูกทำลายจนถึงขั้นเสียชีวิต (Li, 2022)

มีรายงานว่าสุนัขเป็นหนึ่งในสัตว์ที่มีการตรวจพบผลบวกภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในประเทศจีน อยู่ที่ 7.4%-37.9% ในประเทศญี่ปุ่น อยู่ที่ 0.53%-1.9% และในประเทศเกาหลีใต้ อยู่ที่ 13.9%-21.4% (ishijima, 2023) นอกจากนี้ยังพบรายงานการแพร่กระจายของเชื้อจากสุนัขไปสู่มนุษย์ได้โดยผู้ป่วยสัมผัสกับน้ำลายของสุนัขติดเชื้อ ไวรัส SFTSV และแสดงอาการหลังจากการติดเชื้อซึ่งผู้ป่วยไม่มีประวัติการโดนเห็บกัดมาก่อน (Kobayashi, 2020) ผู้ป่วยชายแสดงอาการป่วยภายใน 10 วัน หลังจากดูแลสุนัขป่วยที่มีอาการคล้ายกับการติดเชื้อไวรัส SFTSV และได้รับการวินิจฉัยในภายหลังว่าติดเชื้อไวรัส SFTSV (Oshima, 2022) นอกจากนี้ มีการตรวจพบความคล้ายคลึงกันของสายพันธุ์เชื้อไวรัส SFTSV ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสุนัขป่วยในประเทศเกาหลีใต้ (Lee, 2019) จากกรณีดังกล่าวมานี้แสดงให้เห็นว่าสุนัขเป็นอีกหนึ่งปัจจัยเสี่ยงที่สามารถแพร่กระจายเชื้อไวรัส SFTSV ไปยังมนุษย์ได้

ปัจจุบันมีการศึกษาการระบาดของเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัข โดยการตรวจจบบัญภูมิคุ้มกันชนิดจี (Immunoglobulin G; IgG) ที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ด้วยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ทางอ้อม (Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Indirect ELISA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจจบบัญภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัข สามารถบ่งบอกได้ถึงการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส SFTSV ในบริเวณนั้นและประเมินปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อเพื่อควบคุมการระบาดของเชื้อไวรัส SFTSV ได้ (Ishijima, 2022)

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าเชื้อไวรัส SFTSV เป็นไวรัสติดเชื้ออุบัติใหม่และสามารถแพร่กระจายจากสัตว์ไปสู่มนุษย์ได้ด้วยเหตุนี้องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) จึงจัดให้มีการเฝ้าระวังและต้องการการวิจัยอย่างเร่งด่วน เนื่องจากเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดอาการรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต มีความสำคัญมากทางด้านสาธารณสุข นอกจากนี้ยังไม่มียา วัคซีนหรือการรักษาที่จำเพาะเจาะจงต่อการติดเชื้อไวรัสนี้ ดังนั้นการระบาดของเชื้อไวรัส SFTSV จึงเป็นเรื่องที่พึงระวัง (Li, 2022)

การทบทวนวรรณกรรม

โรคที่มีกลุ่มอาการไข้ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) คือโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และเป็นโรคสัตว์สู่คน (Zoonosis) เกิดจากไวรัสก่อโรคที่มีกลุ่มอาการไข้ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus; SFTSV) โดยมีเห็บ *Haemaphysalis longicornis* เป็นรังโรคและพาหะหลักในการแพร่กระจาย สามารถติดเชื้อได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดเช่น สัตว์ป่า สัตว์เลี้ยง สัตว์ปศุสัตว์ รวมถึงมนุษย์ (Li, 2022) SFTSV คือไวรัสติดเชื้อที่มีสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวลบและมีเปลือกหุ้มอยู่ในวงศ์ฟีนูอิริดี (family *Phenuiviridae*) อันดับบันยาไวรัสเลส (order *Bunyavirales*) และ สกุลบันยังไวรัส (genus *Banyangvirus*) แบ่งได้ 6 จีโนไทป์ คือ A, B, C, D, E และ F (Li, 2021)

SFTSV ถูกรายงานครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ.2553 มีต้นกำเนิดมาจากภูเขาตอยเบง (Dabei Mountain) และเกิดการระบาดบริเวณจุดตัดของมณฑลเหอหนาน (Henan) หูเป่ย์ (Hubei) และ อันฮุย (Anhui) ในภาคกลางของประเทศไทย จากนั้นระบาดไปยังมณฑลใกล้เคียงคือ มณฑลเจียงซู (Jiangsu) เจ้อเจียง (Zhejiang) ซานตง (Shandong) และเหลียวหนิง (Liaoning) โดยจีโนไทป์ (Genotype) หลักที่ระบาด คือ F, A และ B จากนั้นเกิดการระบาดในประเทศญี่ปุ่นและเกาหลีใต้เมื่อปี พ.ศ.2555 โดยจีโนไทป์ (Genotype) หลักที่พบคือ F (Li, 2021) พบอัตราการเสียชีวิตในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้อยู่ที่ 6.18%, 27% และ 23.3% ตามลำดับ (Casel, 2021) SFTSV มักจะเกิดการระบาดในบริเวณที่เป็นภูเขา เนินเขาที่มีป่าปกคลุม หรือบริเวณทุ่งหญ้าที่มีสภาพอากาศชื้นหรือกึ่งเขตร้อนปานกลาง มีอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยต่อปีอยู่ที่ 12.5-17.5 องศาเซลเซียส, 63%-82% และ 700-2,250 มิลลิเมตร ตามลำดับ เกิดการระบาดในช่วงเดือนเมษายน-เดือนตุลาคม และระบาดหนักในเดือนพฤษภาคม โดยช่องทางการส่งผ่านเชื้อ SFTSV แบ่งเป็น 3 ช่องทาง คือ การส่งผ่านเชื้อจากเห็บสู่สัตว์หรือมนุษย์จากการกัด การส่งผ่านเชื้อจากสัตว์สู่มนุษย์จากการโดนสัตว์กัดหรือกัดหรือสัมผัสสารคัดหลั่งของสัตว์ติดเชื้อ และการส่งผ่านเชื้อจากมนุษย์สู่มนุษย์โดนสัมผัสสารคัดหลั่งของผู้ป่วย (Li, 2022)

มนุษย์หรือสัตว์ที่ติดเชื้อจะมีอาการที่เด่นชัด คือ มีไข้ อาเจียน ท้องเสีย เกิดเลือดต่ำ เม็ดเลือดขาวต่ำ ต่อม้ำเหลืองโต เกิดอาการทางระบบทางเดินอาหารและระบบประสาท หากเกิดอาการรุนแรงจะสำคัญจะถูกทำลายจนถึงขั้นเสียชีวิต (Li, 2022) อาการทางคลินิกจะพบได้ภายใน 7-14 วัน (เฉลี่ย 9 วัน) หลังจากติดเชื้อ โดยอาการจะแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ 1) ระยะไข้ (Fever stage) พบไข้สูง ปริมาณไวรัสในซีรัมสูง เกิดเลือดต่ำ เม็ดเลือดขาวต่ำ ต่อม้ำเหลืองโต 2) ระยะอวัยวะสำคัญถูกทำลาย (Multiple Organ Dysfunction stage) เกิดขึ้นประมาณ 5 วันหลังระยะไข้ พบเลือดออกหลายจุดสำคัญ รวมถึงอาการทางระบบประสาท เช่น ชี้น ชัก กล้ามเนื้อสั่น เกิดเลือดลดลงอย่างต่อเนื่อง เกิดการแข็งตัวของเส้นเลือด (DIC) และอวัยวะล้มเหลวจนเสียชีวิต 3) ระยะพักฟื้น (Convalescence stage) หากสัตว์หรือผู้ป่วยมีอาการที่ไม่รุนแรงจะเข้าสู่ระยะนี้ (Casel, 2021)

มีรายงานว่าสุนัขเป็นหนึ่งในสัตว์ที่มีการตรวจพบผลบวกภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในประเทศจีนอยู่ที่ 7.4%-37.9% ในประเทศญี่ปุ่น อยู่ที่ 0.53%-1.9% และในประเทศเกาหลีใต้ อยู่ที่ 13.9%-21.4% (ishijima, 2023) นอกจากนี้ยังพบรายงานการแพร่กระจายเชื้อจากสุนัขไปสู่สุนัขได้ โดยผู้ป่วยสัมผัสกับน้ำลายของสุนัขติดเชื้อไวรัส SFTSV และแสดงอาการหลังจากการติดเชื้อซึ่งผู้ป่วยไม่มีประวัติการโดนเห็บกัดมาก่อน (Kobayashi, 2020) ผู้ป่วยชายแสดงอาการป่วยภายใน 10 วันหลังจากดูแลสุนัขป่วยที่มีอาการคล้ายกับการติดเชื้อไวรัส SFTSV และได้รับการวินิจฉัยในภายหลังว่าติดเชื้อ SFTSV (Oshima, 2022) นอกจากนี้ มีการตรวจพบความคล้ายคลึงกันของสายพันธุ์เชื้อไวรัส SFTSV ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสุนัขป่วยในประเทศเกาหลีใต้ (Lee, 2019) จากกรณีดังกล่าวมานี้แสดงให้เห็นว่าสุนัขเป็นอีกหนึ่งปัจจัยเสี่ยงที่สามารถแพร่กระจายเชื้อ SFTSV ไปยังมนุษย์ได้

ปัจจุบันมีการตรวจหาภูมิคุ้มกันที่มีต่อ SFTSV ในสุนัขด้วยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ทางอ้อม (Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Indirect ELISA) เป็นเทคนิคตรวจภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพในสุนัข เนื่องจากสามารถเลือกตรวจภูมิคุ้มกันได้หลายชนิด โดยเทคนิคนี้ไม่เพียงแต่ทราบถึงการมีอยู่ของภูมิคุ้มกันแต่ยังสามารถบ่งบอกได้ถึงถึงการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส SFTSV ในบริเวณนั้นเพื่อประเมินปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อและควบคุมการระบาดของเชื้อไวรัส SFTSV ได้ (Ishijima, 2022)

จากที่กล่าวมาข้างต้นนี้จะเห็นได้ว่าเชื้อไวรัส SFTSV เป็นเชื้อไวรัสอุบัติใหม่และสามารถแพร่กระจายจากสัตว์ไปสู่มนุษย์ได้ (Li, 2022) ดังนั้นการสำรวจและศึกษาภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัขจึงเป็นอีกหนึ่งการศึกษาที่มีความน่าสนใจ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการระบาดรวมถึงการป้องกันและการจัดการอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการเก็บตัวอย่างซีรัมสุนัข

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดสุนัขทั้งหมด 99 ตัวอย่าง ($n = 99$) ในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ.2566 พร้อมจำแนกเพศ (เพศผู้และเพศเมีย) และอายุของสุนัข (1 เดือน-6 เดือน, 6 เดือน-2 ปี และ 2 ปี-7 ปี) จากจังหวัดสมุทรสาครในประเทศไทย โดยทำการเจาะเก็บเลือดบริเวณเส้นเลือด Cephalic vein หรือ Femoral vein ปริมาณ 2 ซีซี ใส่ในหลอดที่ปราศจากสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำมาปั่นแยกเก็บซีรัมด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ตูบเก็บซีรัมใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งใช้งาน

วิธีการผลิตสารก่อภูมิ (Antigen) สำหรับเทคนิค Indirect ELISA

สารก่อภูมิที่ผลิตจากการฉีดเชื้อไวรัส (Infected antigen) ในการทดลองนี้ เริ่มจากการเลี้ยงเซลล์ตับที่แยกได้จากมนุษย์ (Human hepatoma cell line; HuH-7 cells) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% Fetal bovine serum (FBS) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 2% FBS และทำการใส่เชื้อ SFTSV สายพันธุ์ HB-29 ในปริมาณไวรัสต่อเซลล์ (Multiplicity of Infection: MOI) อยู่ที่ 0.1 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 3 วัน ทำการล้างด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) และทำให้เซลล์แตกด้วย 1% Nonidet P-40 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที นำสารน้ำที่ได้จากการทำให้เซลล์แตก (Lysate) มาใส่หลอด Polypropylene และทำให้เชื้อ SFTSV ที่อยู่ใน lysate หมดฤทธิ์ด้วยรังสียูวีบี 302 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นแยกเก็บสารน้ำด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 13,200 x g เป็นเวลา 5 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้งาน ในส่วนของสารก่อภูมิที่ผลิตจากการไม่ใส่เชื้อไวรัส (Mock antigen) นั้นทำขั้นตอนเดียวกันกับสารก่อภูมิที่ผลิตจากการใส่เชื้อไวรัส (Infected antigen) (Ishijima, 2022)

วิธีการตรวจจับภูมิคุ้มกันที่มีต่อ SFTSV ของสุนัข ด้วย Indirect ELISA

นำ Antigen มาเจือจางกับ 0.05 M Carbonate-bicarbonate buffer ความเข้มข้นที่ 5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเคลือบลงบน 96-well microplate จำนวน 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใส่ 1% Block Ace จำนวน 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และล้างเพลทด้วย 1XPBS-tween จากนั้น ใส่ Primary antibody จำนวน 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วล้างเพลทด้วย 1XPBS-tween และทำการใส่ Secondary antibody ที่ติดฉลากด้วย Horseradish peroxidase จำนวน 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วทำการล้างเพลทด้วย 1XPBS-tween จากนั้นใส่ซับสเตรต 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) จำนวน 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที และเติม 1% Sodium dodecyl sulfate จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นบวกโดยพิจารณาจากค่าตัดสินเป็นบวก (Cut-off value) และคำนวณอัตราบวกภูมิคุ้มกัน (Seropositive rate) โดย

$$\frac{\text{จำนวนตัวอย่างบวกต่อภูมิคุ้มกัน}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100$$

ดำเนินการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Fisher's exact test เพื่อเปรียบเทียบระหว่างเพศ และใช้ Chi-squared test เพื่อเปรียบเทียบระหว่าง 3 ช่วงอายุ กำหนด $P\text{-value} < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

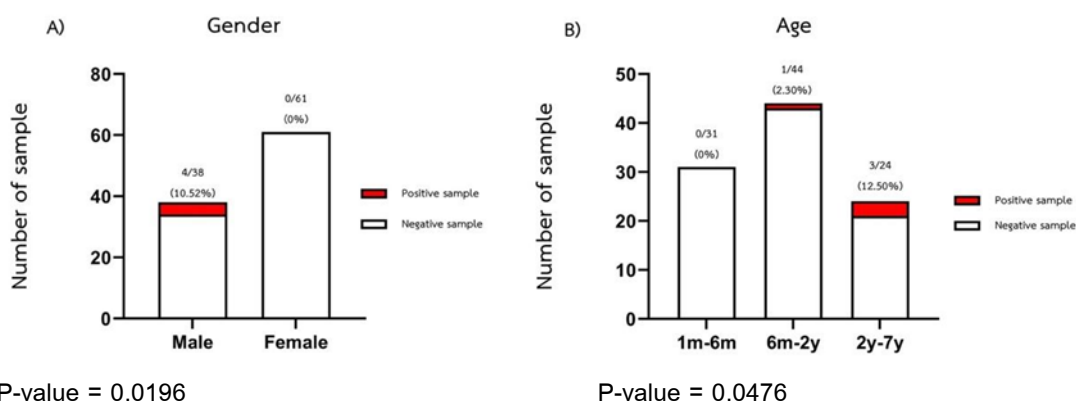
ผลการวิจัย

ตัวอย่างซีรัมสุนัขทั้งหมด 99 ตัวอย่าง (n = 99) ทำการตรวจจับภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV พบว่า มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส SFTSV อยู่ที่ 4/99 (4.04%) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจจับภูมิคุ้มกันของสุนัขที่มีต่อเชื้อ SFTSV ด้วย Indirect ELISA

ตัวอย่าง	จำนวน	ผลบวก	เปอร์เซ็นต์ (%)
สุนัข	99	4	4.04%

จากการศึกษาเพศและอายุที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัขพบว่า 4/38 (10.52%) ของเพศผู้และ 0/61 (0%) ของเพศเมีย ให้ผลบวกต่อภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV และเมื่อคำนวณทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P-value = 0.0196) (ภาพที่ 1A) ในส่วนของการศึกษาอายุพบว่า 0/31 (0%) ของช่วงอายุ 1 เดือน-6 เดือน, 1/44 (2.30%) ของช่วงอายุ 6 เดือน-2 ปี และ 3/24 (12.50%) ของช่วงอายุ 2 ปี-7 ปี ให้ผลบวกต่อภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV และเมื่อคำนวณทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P-value = 0.0476) (ภาพที่ 1B)



P-value = 0.0196

P-value = 0.0476

ภาพที่ 1 A) กราฟแสดงผลการตรวจจับภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในเพศของสุนัข B) กราฟแสดงผลการตรวจจับภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในอายุของสุนัข

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ไวรัสก่อโรคที่มีกลุ่มอาการไข้ร่วมกับเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus: SFTSV) คือ ไวรัสติดเชื้ออุบัติใหม่ที่สามารถติดเชื้อได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดเช่น สัตว์ป่า สัตว์เลี้ยง สัตว์ปศุสัตว์ รวมถึงมนุษย์ ถูกรายงานครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ.2553 (Li, 2022) และพบการติดเชื้อในสุนัขเมื่อปี พ.ศ.2556 (Ishijima, 2023) ตรวจพบความชุกของภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัขในประเทศเกาหลีใต้ อยู่ที่ 59/426 (13.9%) เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค IFA และยืนยันผลด้วยเทคนิค VNT (Lee, 2018) พบความชุกของภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัขในญี่ปุ่น อยู่ที่ 11/114 (9.6%) เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA (Matsu, 2021) และพบความชุกของภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัขในประเทศจีน ได้ 19/35 (35.9%) เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Double antigen sandwich ELISA (Shujun, 2014) นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นของการแพร่กระจายเชื้อไวรัส SFTSV จากสุนัขไปยังสัตว์ มนุษย์ รวมถึงพื้นที่อื่นๆ อีกด้วย (Li, 2022)

ในปี พ.ศ.2566 พบรายงานการติดเชื้อไวรัส SFTSV ในสัตว์รายงานแรกและรายงานเดียวของประเทศไทย โดยตรวจพบภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัขด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส SFTSV อยู่ที่ 106/458 (23.1%) โดยความชุกที่พบมีความคล้ายคลึงกับความชุกที่พบในประเทศจีน เมื่อทำการตรวจหาสาร

พันธุกรรมอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส SFTSV ด้วยเทคนิค RT-PCR และศึกษาสายพันธุ์ด้วย Phylogenetic tree พบว่ามีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ตรวจพบในประเทศจีนมากกว่าประเทศอื่น (Ishijima, 2023) จากรายงานที่กล่าวมาข้างต้น สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ คือการตรวจพบภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัข 4/99 (4.04%) จากจังหวัดสมุทรสาครในประเทศไทย บ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัส SFTSV ได้เกิดการระบาดขึ้นในสุนัขในประเทศไทยแล้ว เพื่อทราบถึงสายพันธุ์และการระบาดอย่างแน่ชัดควรศึกษาถึงสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SFTSV และเส้นทางการระบาดเพิ่มเติมในอนาคต

ในส่วนของการศึกษาปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัส SFTSV ของสุนัขจากการคำนวณทางสถิติ พบว่าเพศมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P\text{-value} < 0.05$) บ่งชี้ได้ว่า เพศเป็นปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัข ในขณะที่การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เพศไม่ใช่ปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ (Lee, 2018) ในกรณีนี้อาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจนมากขึ้น

นอกจากนี้ การศึกษาปัจจัยเสี่ยงในอายุจากการคำนวณทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P\text{-value} < 0.05$) เช่นกัน บ่งชี้ได้ว่าอายุก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ SFTSV ในสุนัขด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา คือ สัตว์ที่มีอายุเยอะมักจะมีแนวโน้มติดเชื้อไวรัส SFTSV ได้มากกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อย เนื่องจากการถดถอยของภูมิคุ้มกันทำให้เสี่ยงต่อการติดเชื้อมากกว่า (Matsuu, 2021)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สุนัขในจังหวัดสมุทรสาครมีภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัส SFTSV ยืนยันได้ว่า เชื้อไวรัส SFTSV ได้เกิดการระบาดขึ้นในสุนัขในประเทศไทยแล้วและมีแนวโน้มแพร่กระจายไปยังพื้นที่ใกล้เคียงได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า เพศและอายุก็เป็นปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัขด้วยเช่น โดยผลการวิจัยนี้สามารถเป็นข้อมูลต่อยอดในการศึกษาการระบาดของเชื้อไวรัส SFTSV ในสุนัขในประเทศไทย รวมถึงกำหนดมาตรการควบคุมการแพร่กระจายอย่างมีประสิทธิภาพได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ Prof. Ken Maeda, Dr. Keita Ishijima, Dr. Yudai Kuroda, Dr. Masakatsu Taira, Dr. Kango Tatemoto, Dr. Eunsil Park, Dr. Milagros Virhuez Mendoza, Dr. Yusuke Inoue, Dr. Michiko Harada, Dr. Tsukasa Yamamoto, Dr. Ayano Nishino และ Dr. Aya Matsuu จากแผนกวิทยาศาสตร์ทางสัตวแพทย์ (Department of Veterinary Science) สถาบันวิจัยโรคติดเชื้อในสัตว์แห่งชาติ ประเทศญี่ปุ่น (The National Institute of Infectious Diseases; NIID) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการถ่ายทอดความรู้ พร้อมทั้งอำนวยความสะดวกสำหรับสารเคมี อุปกรณ์ รวมถึงสถานที่ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณการสนับสนุนจากงบประมาณทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Casel, M. A., Park, S. J., & Choi, Y. K. (2021). Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: emerging novel phlebovirus and their control strategy. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(5), 713-722.
- Ding, S., Yin, H., Xu, X., Liu, G., Jiang, S., Wang, W., . . . Wang, X. (2014). A cross-sectional survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection of domestic animals in Laizhou City, Shandong Province, China. *Jpn J Infect Dis*, 67(1), 1-4.
- Ishijima, K., Phichitraslip, T., Naimon, N., Ploypichai, P., Kriebkajon, B., Chinarak, T., . . . Maeda, K. (2023). High Seroprevalence of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection among the Dog Population in Thailand. *Viruses*, 15(12).

- Ishijima, K., Tatemoto, K., Park, E., Kimura, M., Fujita, O., Taira, M., . . . Maeda, K. (2022). Lethal Disease in Dogs Naturally Infected with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *14*(9), 1963.
- Kobayashi, Y., Kato, H., Yamagishi, T., Shimada, T., Matsui, T., Yoshikawa, T., . . . Oishi, K. (2020). Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Japan, 2013-2017. *Emerg Infect Dis*, *26*(4), 692-699
- Lee, S. H., Kim, H. J., Lee, M. J., Byun, J. W., Kim, D. Y., Kim, N. H., . . . Nam, H. M. (2018). Prevalence of antibodies against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in shelter dogs in the Republic of Korea. *Ticks Tick Borne Dis*, *9*(2), 183-187.
- Lee, S. Y., Kang, J. G., Jeong, H. S., Kim, W. M., Son, K. D., Kim, J. S., . . . Chae, J. S. (2019). Complete Genome Sequences of Two Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Strains Isolated from a Human and a Dog in the Republic Of Korea. *Microbiol Resour Announc*, *8*(31).
- Li, A., Liu, L., Wu, W., Liu, Y., Huang, X., Li, C., . . . Liang, M. (2021). Molecular evolution and genetic diversity analysis of SFTS virus based on next-generation sequencing. *Biosafety and Health*, *3*(2), 105-115.
- Li, J. C., Zhao, J., Li, H., Fang, L. Q., & Liu, W. (2022). Epidemiology, clinical characteristics, and treatment of severe fever with thrombocytopenia syndrome. *Infectious Medicine*, *1*(1), 40-49.
- Matsuu, A., Hamakubo, E., & Yabuki, M. (2021). Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals in Kagoshima Prefecture, Japan, and development of Gaussia luciferase immunoprecipitation system to detect specific IgG antibodies. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *12*(5), 101771.
- Oshima, H., Okumura, H., Maeda, K., Ishijima, K., Yoshikawa, T., Kurosu, T., . . . Saijo, M. (2022). A Patient with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) Infected from a Sick Dog with SFTS Virus Infection. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, *75*(4), 423-426.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2024 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).