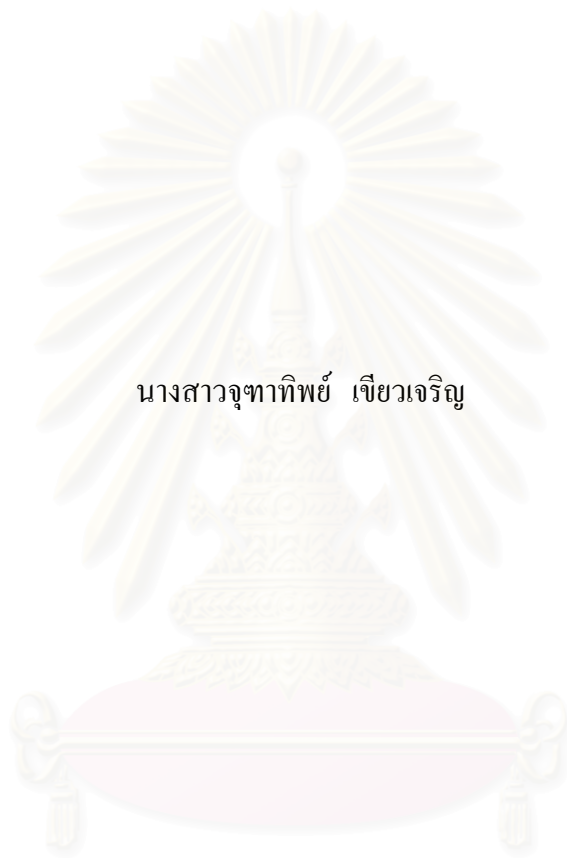


การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนยีนของไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้ในประเทศไทย



นางสาวจุฑาทิพย์ เจียวเจริญ

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1786-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF NUCLEOCAPSID PROTEIN GENE  
OF CANINE DISTEMPER VIRUS ISOLATES IN THAILAND



Miss Juthatip Keawcharoen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement  
for the Degree of Master of Science in Veterinary Pathobiology  
Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic year 2002

ISBN 974-17-1786-5



นางสาวจุฑาทิพย์ เขียวเจริญ : การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนยีนของไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้ในประเทศไทย. (NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF NUCLEOCAPSID PROTEIN GENE OF CANINE DISTEMPER VIRUS ISOLATES IN THAILAND) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิตศักดิ์ อรวิระกุล, อ.ที่ปรึกษา ร่วม : ศาสตราจารย์นายแพทย์ยัง ภู่วรรณ จำนวนหน้า 73 หน้า. ISBN 974-17-1786-5

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 13 ตัวอย่าง ที่มีประวัติอายุ อาการป่วยที่แสดงออกกระบบต่างๆ รอยโรคทางพยาธิวิทยา การปรากฏ Inclusion bodies การปรากฏ แอนติเจนด้วยวิธี Immunohistochemistry และการปรากฏของ RNA ของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับไวรัสวัคซิ่น (Onderstepoort strain) และสเตรนอื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (Yanaka, Ueno, Adashi, Hamamatsu และ 2544/Han95) และสเตรนอ้างอิงชนิดรุนแรง (A75/17) ในตำแหน่งเดียวกัน พบว่าในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับไวรัสวัคซิ่น จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ 99.10% และ 97.61% ตามลำดับ และกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับสเตรนอื่นๆ และสเตรนอ้างอิงชนิดรุนแรง จำนวน 11 ตัวอย่าง ที่ 94.63-99.10% สำหรับลำดับของกรดอะมิโนที่อนุมานจากลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ที่สอดคล้องกันกับกลุ่มที่แบ่งโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้ ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับประวัติวัคซิ่นอายุ อาการที่แสดงออกทางระบบต่างๆ และการปรากฏของแอนติเจน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พยาธิวิทยา

สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์

ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4475552031 :MAJOR PATHOBIOLOGY

KEY WORD: NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS / CANINE DISTEMPER VIRUS /

NUCLEOCAPSID PROTEIN GENE

JUTHATIP KEAWCHAROEN : THESIS TITLE. (NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF NUCLEOCAPSID PROTEIN GENE OF CANINE DISTEMPER VIRUS ISOLATES IN THAILAND) THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. DR. KANISAK ORAVEERAKUL, THESIS COADVISOR : PROF. DR. YONG POOVORAWAN, 73 pp. ISBN 974-17-1786-5

The C-terminal part of nucleocapsid protein gene from 13 canine distemper virus (CDV) isolates in Thailand were analyzed for nucleotide and amino acid sequences. All of the canine distemper virus infected dog histories were recorded for age, clinical findings, pathological lesions, inclusion bodies appearances, evidences of antigen by immunohistochemistry and evidences of CDV-specific RNA by reverse transcriptase polymerase chain reaction. The result revealed that the nucleotide sequences were divided into 2 groups. One exhibited greater homology closely related to vaccine strain (Onderstepoort strain), of total 2 samples, at 99.10% and 97.61% respectively. Another one exhibited greater homology closely related to the other virulent strain reported in GeneBank database (Yanaka, Ueno, Adachi, Hamamatsu and 2544/Han95) and the virulent reference strain (A75/17), of total 11 samples, at 94.63-99.10% at the same position. The deduced amino acid sequences were divided into 2 groups that correlated to the nucleotide sequences. However, there were no association among these CDV groups to their vaccination histories, sex, ages, clinical findings and tissue presentation evidences of viral antigen.

Department Pathology

Field of study Veterinary Pathobiology

Academic Year 2002

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและหน่วยงานต่างๆ ดังนี้  
รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.กนิศศักดิ์ อรวิระกุล อาจารย์ที่ปรึกษา และ  
ศาสตราจารย์นายแพทย์ยัง ภู่วรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำและช่วย  
ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องาน  
วิจัยนี้ด้วยดีมาตลอด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำ  
แนะนำในด้านการปฏิบัติงาน Immunohistochemistry

อาจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำใน  
เรื่อง Phylogenetic analysis

คณาจารย์ทุกท่านในคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้จน  
สำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

เจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยไวรัสวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหา  
วิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและความรู้ในงานวิจัยครั้งนี้

คุณอภิรดี เทียมบุญเลิศ คุณพจนานถ จันทรัมย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยปฏิบัติ  
การไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและความรู้ใน  
งานวิจัยครั้งนี้

อาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยพยาธิวิทยา และหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะ  
สัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาช่วยเก็บตัวอย่างและให้คำแนะนำในงานด้าน ห้องป  
ปฏิบัติการ

ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่  
กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์  
ทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก ในสถาบันอุดมศึกษาของ  
รัฐทบวงมหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2545 ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์

โครงการเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศาสตราจารย์นายแพทย์ยัง ภู่วรรณ ที่กรุณาให้ทุน  
อุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจ กำลังใจ และความช่วย  
เหลือตลอดมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่1 บทนำ.....	1
บทที่2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
บทที่3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	18
บทที่4 ผลการทดลอง.....	24
บทที่5 สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	41
รายการอ้างอิง.....	49
ภาคผนวก.....	55
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	73

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1	ตารางการจำแนกกลุ่มอาการสุนัขที่ติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจำนวน 13 ตัว.....	24
2	ตารางแสดงประวัติและอาการที่แสดงออก.....	26
3	แสดงผลทางจุลพยาธิวิทยา.....	27
4	แสดงผล Viral inclusion bodies, Immunohistochemistry และ Nested RT-PCR.....	29
5	แสดงการเปรียบเทียบร้อยละความเหมือน (% homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์.....	33
	ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ใน	
	ประเทศไทย และไวรัสวัคซีน (Onderstepoort strain)	
6	แสดงการเปรียบเทียบร้อยละความเหมือน (% homology) ของลำดับกรดอะมิโน.....	37
	ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ใน	
	ประเทศไทย และไวรัสวัคซีน (Onderstepoort strain)	



1	แสดงแผนภาพยีนโนมของไวรัสไข้หัดสุนัข และขยายในส่วน.....16 nucleocapsid protein gene
2	แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำ Nested RT-PCR.....17
3	แสดงความไวของวิธี Nested RT-PCR ในการตรวจหา RNA ของไวรัสสุนัขสเตอร์น.....30 Onderstepoort
4	แสดงขนาดของผลิตภัณฑ์ Nested RT-PCR ในการตรวจหา RNA genome .....31 ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัข
5	แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ nucleocapsid protein gene ..... 36 ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย ไวรัสวัคซัน (Onderstepoort strain) และสเตอร์น อื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (Yanaka, Ueno, Hamamatsu, 2544/Han95 และ A75/17)
6	แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ของ nucleocapsid protein gene.....38 ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย ไวรัสวัคซัน (Onderstepoort strain) และสเตอร์น อื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (Yanaka, Ueno, Hamamatsu, 2544/Han95 และ A75/17)
7	แสดง Phylogenetic relationship ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nucleocapsid.....39 protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัข ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย ไวรัสวัคซัน (Onderstepoort strain) สเตอร์นอื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (Yanaka, Ueno, Hamamatsu Adachi , 2544/Han95 และ A75/17)
8	แสดง Phylogenetic relationship ของลำดับนิวคลีโอไทด์ nucleocapsid protein .....40 gene ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย ไวรัสวัคซัน (Onderstepoort strain) และ สเตอร์นอื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (Yanaka, Ueno, Hamamatsu, 2544/Han95 และ A75/17) เปรียบเทียบกับ Measles virus และ Mump virus โดยโปรแกรม Clustal X

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไข้หัดสุนัขเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (Canine Distemper Virus : CDV) โรคไข้หัดสุนัข เป็นโรคติดต่อร้ายแรงที่สำคัญโรคหนึ่งในสุนัข และตระกูลสัตว์กินเนื้อ (carnivore) อื่นๆ (Appel, 1987) ไวรัสไข้หัดสุนัขเป็น single stranded RNA, nonsegmented และ negative sense RNA virus จัดอยู่ในตระกูล *Paramyxoviridae* สกุล *Morbillivirus* มีความสัมพันธ์กับ measles virus (MV), rinderpest virus (RPV), peste des petits ruminants virus (PPRV) และ phocid distemper virus (PDV) ซึ่งก่อให้เกิดโรคติดต่อร้ายแรงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ โดยสัตว์ที่ได้รับเชื้อและเป็นโรคจะแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร ที่ผิวหนังพบคุ่มหนองหรือผดผื่นเกิดขึ้นมากที่ผิวหนังหน้าท้อง นอกจากนี้สัตว์ป่วยบางตัวยังสามารถพบอาการทางระบบประสาท (Appel, 1987) การรักษาโดยทั่วไปในสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อเป็นการรักษาตามอาการ สำหรับการควบคุมและป้องกันโรคทำได้โดยการฉีดวัคซีน ซึ่งมีการรายงานว่ามีคนนำ Attenuated CDV vaccine มาใช้ตั้งแต่ปีค.ศ. 1950 ซึ่งได้ผลในการควบคุมที่ดี แต่ต่อมาพบว่าเริ่มมีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสในกลุ่มประชากรสุนัขที่ได้รับวัคซีนมากขึ้นในหลายประเทศ เช่น ประเทศแถบยุโรป (Blixenkron-Möller et al., 1993) รวมทั้งในเอเชีย เช่น ประเทศญี่ปุ่น (Kai et al., 1993 ; Shin et al., 1995 ; Gemma et al., 1996) ซึ่งสอดคล้องกับการแพร่ระบาดของโรคหัดในเด็กที่ได้รับวัคซีน (Rota et al., 1992)

โรคไข้หัดสุนัขนอกจากจะพบการแพร่ระบาดในประชากรสุนัขแล้ว ยังพบการรายงานถึงการแพร่ระบาดของโรคไข้หัดสุนัขในสัตว์อื่นๆ มีผลทำให้มีสัตว์ป่วยและตายเป็นจำนวนมาก เช่น แมว น้ำสิงโต เสือ จากัวร์ แรคคูน มิงค์ ไฮยีน่า เป็นต้น จากปัญหาดังกล่าวได้มีการตั้งสมมติฐานว่าน่าจะมี ความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของตัวเชื้อไวรัสที่พัฒนาปรับตัว จึงทำให้สัตว์อื่นสามารถติดเชื้อและก่อให้เกิดโรคได้ ทำให้มีผู้ให้ความสนใจในการศึกษาถึงระดับโครงสร้างยีนของไวรัส โดยมีสมมติฐานว่า ถ้าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสก็จะก่อให้เกิดความหลากหลายในกลุ่มไวรัสในธรรมชาติที่แตกต่างไปจากไวรัสวัคซีน ทำให้การฉีดวัคซีนป้องกันโรคในสุนัขไม่ได้ผลในการป้องกันโรค ทำให้มีผู้ทำการศึกษถึงความแตกต่างระหว่างไวรัสที่ก่อโรคทางธรรมชาติ และไวรัสวัคซีนจากในประเทศ

ต่างๆ โดยนำเชื้อไวรัสที่แยกได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความแตกต่างกันของเชื้อไวรัส (Stettler and Zurbriggen, 1995 ; Haas, 1997 ; Iwatsuki et al., 1998 ; Ohashi et al., 1998 ; Yoshida et al., 1998 ; Frisk et al., 1999 ; Wakasa et al., 2000)

สำหรับในประเทศไทย มีการตั้งข้อสังเกตจากสัตวแพทย์จากโรงพยาบาลสัตว์ และคลินิกว่ามีการแพร่ระบาดของไวรัสไข้หัดสุนัขในสุนัขที่ไม่ได้รับวัคซีนเป็นจำนวนมากเช่นกัน และแม้จะมีการป้องกันโดยการฉีดวัคซีนก็ยังพบว่าสุนัขยังสามารถติดเชื้อและเป็นโรคไข้หัดสุนัขได้อีก โดยพบว่ามีรายงานการวิจัยในด้านระบาดวิทยา (epidemiology) ซีรัมวิทยา (serology) และจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ในญี่ปุ่น (Gemma et al., 1996) พบว่าเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขสายพันธุ์ใหม่ๆ จะมีการเปลี่ยนแปลง antigenicities และ/หรือ pathogenicities ให้ต่างไปจากสายพันธุ์เดิม (Yoshida et al., 1998) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตัวเชื้อไวรัสเปลี่ยนแปลงไปทำให้มีอวัยวะเป้าหมายแตกต่างกัน จึงทำให้สัตว์แสดงอาการของโรคที่แตกต่างกัน อีกทั้งในประเทศไทยยังไม่มีผู้ที่ทำการศึกษาวินิจฉัยลำดับของนิวคลีโอไทด์ เพื่อหาความแตกต่างระหว่างเชื้อไวรัสที่แยกได้จากธรรมชาติและไวรัสวัคซีน จึงมีแนวคิดว่าจะมีการทำการศึกษาโดยเลือกส่วนของนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน ยีนมาทำการศึกษา เนื่องจากเป็นส่วนสำคัญที่มีการเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมกันมากเป็นส่วนสำคัญทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของไวรัส และโครงสร้างของยีนส่วนนี้มีส่วนที่มีความหลากหลาย (variable region) อยู่ระหว่างส่วนที่มีความอนุรักษ์สูง (conserved region) จึงเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจในการศึกษา และนำวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นเทคนิคมีความไวในการชันสูตรโรคสูง จากนั้นนำไวรัสที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนยีนของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่พบในธรรมชาติในประเทศไทย ที่แสดงอาการเด่นในระบบต่างๆ ที่แตกต่างกัน และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์วัคซีน และสายพันธุ์ที่พบในต่างประเทศ

## บทที่ 2

### Soodkhet Imlao

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

โรคไข้หัดสุนัขเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (canine distemper virus) ทำให้เกิดอาการทางระบบต่างๆ เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และระบบประสาทส่วนกลาง โดยสัตว์ป่วยอาจตาย ด้วยสาเหตุของเชื้อไวรัสเองหรือจากภาวะติดเชื้อแทรกซ้อน ปัจจุบันการควบคุมและป้องกันโรคโดยใช้ attenuated vaccine ในสุนัขที่มีอายุ 8 สัปดาห์ แต่ยังคงพบว่ามีสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้วยังคงเกิดเป็นโรคไข้หัดสุนัขได้อีก ซึ่งพบการรายงานได้ทั้งในต่างประเทศและในประเทศไทย การแพร่ระบาดของโรคไข้หัดสุนัขยังพบได้ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ อีก เช่น สุนัขจิ้งจอก แรคคูน หมูแพนด้า มิงค์ เพอเร็ท เสือ สิงโต และแมวน้ำ เป็นต้น ทั้งนี้การแพร่ระบาดของไวรัสในสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีน และการปรับตัวของไวรัสในการก่อโรคในสัตว์ชนิดต่างๆ ได้นั้น มีผู้อธิบายและสันนิษฐานว่าอาจมีสาเหตุจากความหลากหลายของหน่วยพันธุกรรมในระดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส ซึ่งมีการศึกษาในต่างประเทศ ถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ ที่แยกได้จากสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากธรรมชาติและจากวัคซีนด้วยเช่นกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเสนอการวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ชนิดนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนฮิน เปรียบเทียบระหว่างเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่พบในธรรมชาติกับสายพันธุ์วัคซีน และเปรียบเทียบกับข้อมูลรายงานที่มีของสายพันธุ์ต่างประเทศ โดยทำการเลือกเชื้อไวรัสในประเทศ และพิสูจน์การติดเชื้อไวรัสดังกล่าวจากชิ้นเนื้อตัวอย่าง และนำมาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ต่อไป ซึ่งจะได้ผลข้อมูลที่ได้ไปเป็นพื้นฐานเพื่อใช้ในการงานวิจัยอื่นๆต่อไป

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคไข้หัดสุนัขเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (Canine Distemper Virus) เป็น single stranded RNA, nonsegmented, negative sense RNA virus อยู่ในตระกูล *Paramyxoviridae* สกุล *Morbillivirus* มีความสัมพันธ์กับ measles virus (MV), rinderpest virus (RPV), peste des petits ruminants virus (PPRV) และ phocid distemper virus (PDV) มีรูปร่างแบบ spherical บางครั้งเป็น filament เส้นผ่าศูนย์กลาง

กลาง 100-700 nm โรคไข้หัดสุนัขเป็นโรคติดต่อร้ายแรงที่สำคัญโรคหนึ่งในสุนัขและตระกูลสัตว์กินเนื้อ (carnivore) อื่นๆ (Appel, 1987) โดยความรุนแรงในการเกิดโรคจะขึ้นกับชนิดของสัตว์ที่ได้รับเชื้อ และอัตราการตายในช่วงที่มีการระบาดของโรคในสุนัขจะมีมากกว่าร้อยละ 80 สุนัขที่ได้รับเชื้อไวรัสจะแสดงอาการป่วยที่ระบบต่างๆของร่างกาย (Appel, 1987) สำหรับการควบคุมและป้องกันโรคในปัจจุบันได้มีการผลิตวัคซีนเชื้อเป็นชนิด Attenuated live vaccine มาใช้ป้องกันโรคไข้หัดสุนัข เช่น Onderstepoort strain, Rockborn strain และ Lederle strain เป็นต้น (Harder and Osterhaus, 1997) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่ายังคงพบการระบาดของโรคในลูกสุนัขและสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีนเพิ่มมากขึ้น โดยมีรายงานในประเทศแถบยุโรป (Blixenkron-Möller et al., 1993) ในประเทศญี่ปุ่น (Gemma et al., 1996) และในอีกหลายประเทศทั่วโลก พบว่าโดยทั่วไปเชื้อไวรัสชนิดที่เป็น attenuated virus สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เยื่อในอวัยวะต่างๆได้ แต่ไม่สามารถพบได้ในเซลล์ของระบบประสาท ในขณะที่ virulent virus นอกจากจะสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อ และแมคโครฟาจ ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ที่ระบบประสาท สำหรับความล้มเหลวในการทำงานของวัคซีนอาจมาจากการที่ภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่รบกวนเชื้อไวรัสในวัคซีน การได้รับเชื้อไวรัสก่อนได้รับวัคซีนหรือจากการเปลี่ยนแปลงของตัวเชื้อไวรัสเอง (antigenic change) ทำให้วัคซีนที่ใช้ไม่ได้ผล (Kai et al., 1993) โดยการเปลี่ยนแปลงตัวเชื้อไวรัสทำให้การควบคุมโรคด้วยวัคซีนไม่ได้ผลนั้นยังสามารถพบได้ในโรคติดเชื้อไวรัส อื่นๆอีก เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and mouth disease) มีการทำการศึกษาระบาดของโรคในระยะยาว พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับของเชื้อไวรัสประมาณ 1% ต่อปี (Haydon et al., 2001) โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ (Infectious bronchitis) มีการรายงานการพบความหลากหลายของสเตรนของเชื้อ และมีการเกิดชิโรไทป์ใหม่ๆขึ้นในหลายประเทศทำให้การใช้วัคซีนในการควบคุมโรคไม่ได้ผล (Villegas, 1998) และโรค Swine influenza พบว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสชนิด H3N2 ในการแพร่ระบาดของโรคในแม่สุกรสาวที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคด้วยเชื้อชนิด H1N1 (Gene, 1999)

### ระบาดวิทยาของโรค (Epizootiology)

โรคไข้หัดสุนัขสามารถพบการแพร่ระบาดได้ทั่วโลก (enzootic worldwide) และในมีสัตว์หลายชนิดที่สามารถติดโรคได้ โดยสัตว์ในตระกูลสัตว์กินเนื้อ (carnivores) เช่น ในแฟมมีลี Canidae (สุนัขคิงโก้ สุนัขจิ้งจอก สุนัขป่า) แฟมมีลี Mustelidae (เฟอร์เรท มิงค์ สกั้งค์ แบดเจอร์ ออเทเตอร์) แฟมมีลี Procyonidae (โคลตี แรคคูน หมิแพนด้าแดง) แฟมมีลี Hyaenidae (ไฮยีน่า) แฟมมีลี Ursidae (หมี) และ แฟมมีลี Viverridae เป็นต้น จะมีความไวต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขสูง (Appel, 1987) นอกจาก



นี้ยังสามารถแสดงอาการของโรคและแพร่เชื้อไวรัสได้ในระยะเฉียบพลัน โดยพบว่ายูโรเปียนเฟอเรท จะไวต่อการติดเชื้อไข้หัดสุนัขมาก โดยจะพบปอดอักเสบ (pneumonia) หรือสมองอักเสบ (encephalitis) (Welter et al., 2000) นอกจากนี้ในสัตว์ตระกูลแมว (Felidae) เช่น แมวสามารถติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากการทดลองฉีดเชื้อและจากธรรมชาติ โดยสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสนี้ แต่ไม่แสดงอาการของโรค รวมทั้งไม่มี การแพร่กระจายของโรค (Appel et al., 1974 ; Ikeda et al., 2001) สำหรับในเสือเบงกอลที่ติดเชื้อโรคไข้หัดสุนัข พบการเกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบเรื้อรัง (chronic encephalomyelitis) ในสิงโตพบการเกิดโรคทางระบบประสาท (fatal neurological diseases) และสามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในชิ้นเนื้อของสิงโต และเสือที่แสดงอาการที่ระบบต่างๆ ในสวิตเซอร์แลนด์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Myers et al., 1997) หลังจากพบการระบาดของโรคไข้หัดสุนัขใน Tanzanian Serengeti National Park (Ikeda et al., 2001) และยังพบการติดเชื้อไวรัสนี้ได้ ในสิงโต เสือ และจิ้งจอก ที่สวนสัตว์ในอเมริกาเหนือ ในซาฟารีปาร์ค (Harder and Osterhaus, 1997) นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อโรคไข้หัดสุนัขใน Japanese primates (*Macaca fuscata*), collared peccaries (*Tayassu tajacu*) และ Lake Baikal seal (*Phoca sibirica*) โดยเมื่อทำการชันสูตรซากของแมวน้ำที่เสียชีวิต 17 ตัว และแมวน้ำที่ป่วยหนักทางตอนเหนือของไอซ์แลนด์พบว่ารอยโรคหลักที่พบคือ ปอดอักเสบอย่างรุนแรง (severe pneumonia) สมองอักเสบ (encephalitis) และตาอักเสบ (ophthalmitis) และเมื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าที่สมองพบ intracytoplasmic และ intranuclear acidophilic inclusion bodies เป็นจำนวนมากซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ โรคไข้หัดสุนัขที่ติดเชื้อใน neuron และ astrocyte รอยโรคที่ปอดพบการอักเสบแบบกระจายทั่วไป (diffuse interstitial pneumonia) และพบ syncytial formation ที่ปอดอีกด้วย (Kennedy et al., 1988)

สุนัขทุกอายุจะมีความไวต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข แต่จะพบการติดเชื้อมากในลูกสุนัขที่เพิ่งหมดภูมิคุ้มกันโรคจากแม่ (maternal immunity) สุนัขที่ติดเชื้อในระยะเฉียบพลันจะขับเชื้อไวรัสออกมาทางสิ่งคัดหลั่งทุกชนิดจากร่างกาย แม้ว่าจะแสดงอาการของโรคหรือไม่ก็ตามเชื้อไวรัสจะเริ่มถูกขับออกมาในวันที่ 7 หลังการติดเชื้อ แม้ว่าจะไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากสิ่งคัดหลั่งในสุนัขที่ติดเชื้อในระยะกึ่งเฉียบพลัน (subacute distemper encephalitis) และติดเชื้อแบบคงอยู่ (persistent infection) แต่สุนัขเหล่านี้ยังคงสามารถขับเชื้อไวรัสออกมาได้เช่นกัน (Appel , 1987)

### การติดต่อของโรค (Transmission)

การติดต่อของโรคส่วนใหญ่จะผ่านทาง การหายใจ ซึ่งจะพบการฟุ้งกระจายของเชื้อไวรัส ในอากาศ โดยจะพบเชื้อไวรัสจำนวนมากในสิ่งคัดหลั่ง (serous excretions) จากน้ำมูก น้ำตา น้ำลาย ปัสสาวะ และอุจจาระ (John et al., 1988) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าในลูกสุนัขสามารถติดเชื้อผ่านทางรก (Transplacental infection) ได้ ทั้งจากการทดลองและทางธรรมชาติ (Krakowka et al., 1977) ซึ่งลูกสุนัขอาจจะแสดงอาการทางระบบประสาทในช่วง 4-6 สัปดาห์แรกของชีวิต โดยที่แม่สุนัขอาจจะแสดงอาการเพียงเล็กน้อยหรือไม่แสดงอาการ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับระยะของการตั้งท้องที่จะทำให้เกิดความผิดปกติ เช่น การแท้ง (abortions) การตายแรกคลอด (stillbirths) หรือลูกที่คลอดอ่อนแอ และลูกสุนัขที่รอดจากการติดเชื้อ อาจพบความผิดปกติทางภูมิคุ้มกันอย่างถาวร (permanent immunodeficiencies) (Greene and Appel., 1998)

### พยาธิกำเนิด (Pathogenesis)

หลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสผ่านทาง การหายใจภายใน 24 ชั่วโมงเชื้อไวรัสจะมีการเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphatic tissues) ที่ระบบทางเดินหายใจ โดยจะพบการเพิ่มจำนวนใน macrophages T และ B lymphocytes จากนั้นจะแพร่ไปสู่เนื้อเยื่อน้ำเหลืองอื่นๆ ทางเซลล์ดังกล่าวที่เคลื่อนที่ไป เช่น ม้าม ไทมัส ต่อม้ำเหลือง ไขกระดูก ชั้น lamina propria ของกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก และ Kupffer cells ของตับ โดยใช้เวลา 4-6 วันหลังการติดเชื้อ นอกจากนี้ในวันที่ 8-9 หลังการติดเชื้อ พบการแพร่ของ เชื้อไวรัสทางกระแสเลือดไปสู่เยื่อและเนื้อเยื่อระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสถานะทางภูมิคุ้มกันของสุนัข และในวันที่ 14 หลังการติดเชื้อ ถ้าสุนัขมีระดับแอนติบอดี และภูมิคุ้มกันแบบพาสเซอร์เพียงพอจะสามารถกำจัดเชื้อไวรัสออกจากร่างกายได้และไม่แสดงอาการของโรค แต่ถ้าสุนัขมีภูมิคุ้มกันในระดับปานกลางคือ cell-mediated immunoresponsiveness ร่วมกับ delayed antibody titers จะพบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเข้าสู่ epithelial tissues เช่น uveal tissues, neurons และ integument และแม้ว่าจะมีระดับแอนติบอดีที่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้ แต่จะพบการยังอยู่ของเชื้อในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้การแพร่กระจายและการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อเหล่านี้ อาจทำให้เกิด delayed CNS signs และ digital hyperkeratosis ได้ในสุนัขบางตัว และกรณีที่สุนัขมีภาวะภูมิคุ้มกันที่ไม่ดีพอเชื้อไวรัสจะแพร่ไปสู่เนื้อเยื่อที่ระบบต่างๆ ของร่างกาย เช่น ระบบต่อมไร้ท่อผิวหนัง ระบบ

ทางเดินอาหารระบบทางเดินหายใจ และระบบขับถ่ายปัสสาวะร่วมกับการแสดงอาการทางคลินิก (Greene and Appel, 1998)

### อาการของโรค (Clinical signs)

การแสดงอาการของโรคไข้หัดสุนัขหลังจากที่สุนัขได้รับเชื้อ จะขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์ขณะได้รับ เชื้อสภาพของร่างกายก่อนได้รับเชื้อ ภาวะภูมิคุ้มกัน และสเตรนของเชื้อไวรัส โดยที่ 50-70% ของสัตว์ที่ ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการของโรค และสุนัขที่ได้รับเชื้อบางตัวจะแสดงอาการเพียงเล็กน้อย เช่น เบื่ออาหาร เป็นไข้ ไอ อาเจียน หรือท้องเสียเล็กน้อย lymphadenopathy และ oculonasal discharge ดังนั้นการวินิจฉัย โรคด้วยการสังเกตอาการจึงเป็นไปได้ยาก (Dunn, 1999)

สำหรับอาการของโรคจะพบการเริ่มต้นด้วยการเป็นไขใน 3-6 วันหลังการติดเชื้อ ซึ่งอาจจะไม่สามารถสังเกตได้ จากนั้นจะสัตว์ป่วยจะเริ่มแสดงอาการเป็นไข้ขึ้นๆลงๆ ร่วมกับมีน้ำมูกใส (serous nasal discharge) เยื่อตาขาวอักเสบ (conjunctivitis) และเบื่ออาหาร (anorexia) จากนั้นจะเริ่มแสดงอาการที่ระบบต่างๆตามมา เช่นระบบทางเดินหายใจจะพบซีตาและน้ำมูกข้น ไออย่างรุนแรงและมีเสมหะ ปอดอักเสบ ร่วมกับการหายใจเร็ว ตื้น และพบเสียงการหายใจที่ดัง นอกจากนี้จะพบการขยายใหญ่ขึ้นของต่อมทอลซิล และต่อมน้ำเหลืองที่บริเวณคอ ที่ระบบทางเดินอาหารจะพบท้องเสียแบบขี้หนียว บางครั้งอาจมีเลือดปน และอาเจียน ในสุนัขบางตัวจะมีภาวะแห้งน้ำที่ผิวหนัง ในสุนัขที่ติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขรุนแรงจะพบการเกิด hyperkeratosis 30% ที่บริเวณผิวหนังฝ่าเท้า และจมูกในลูกสุนัขบางตัวอาจพบการเกิดตุ่มหนองที่ผิวหนังบริเวณช่องท้องได้ นอกจากนี้ถ้าเป็นโรคในระยะเวลานานจะสามารถพบ enamel hypoplasia และ keratoconjunctivitis sicca ได้ (Appel, 1987 ; Dunn, 1999)

สำหรับการแสดงอาการทางระบบประสาท อาจเกิดตามหรือร่วมกับการแสดงอาการที่ระบบอื่นๆในร่างกาย โดยจะมีความสัมพันธ์กับ acute grey matter หรือ subacute white matter disease สัตว์ที่ติดเชื้อแสดงอาการการชัก (convulsive seizures) การกระตุกของมัดกล้ามเนื้ออย่างเป็นจังหวะแบบ myoclonus ร่วมกับ hyperesthesia และซึ่ม มักจะเกิดในกรณีของ gray matter disease ส่วนการเคลื่อนไหวของขาที่ไม่สัมพันธ์ การเป็นอัมพาต และการกระตุกของมัดกล้ามเนื้ออย่างเป็นจังหวะแบบ tremors มักจะเกิดในกรณีของ white matter disease และสำหรับ hyperesthesia และ cervical rigidity จะสามารถพบได้ในเนื้อสมองทั้งสองส่วน นอกจากนี้การกระตุกของกล้ามเนื้อส่วนใหญ่จะมีผลต่อกล้ามเนื้อส่วน



ไบรอน้ำ โดยเฉพาะที่ไขข้อและกล้ามเนื้อขา นอกจากนี้ไวรัสไข้หัดสุนัขอาจจะมีผลต่อตาและเรตินาได้ เช่น anterior uveitis , optic neuritis และ focal retinal degeneration ในสุนัขที่แสดงอาการทางระบบประสาทส่วนใหญ่มักจะตาย แต่ถ้าหายอาจจะมีอาการทางประสาทหลงเหลืออยู่ เช่น myoclonus (Appel, 1987 ; Appel and Summers, 1999)

ลูกสุนัขในช่วงอายุหกเดือนมีคุ้มกันโรคจากแม่ และสุนัขอายุน้อยถ้าติดโรคจะแสดงอาการของโรคแบบเฉียบพลัน แต่ในสุนัขอายุมากอาจพบเพียงอาการสมองอักเสบ (old dog encephalitis (ODE)) โดยสุนัขไม่ได้แสดงอาการของโรคล่วงหน้ามาก่อน ซึ่ง ODE เป็นกลุ่มอาการที่ยังไม่ยืนยันแน่ชัดว่าเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (Lincoin et al., 1973)

### พยาธิวิทยาของโรค (Pathology)

รอยโรคที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หลังการผ่าซากสุนัขที่ตายด้วยโรคไข้หัดสุนัขในระยะที่แสดงอาการป่วยเกี่ยวข้องกับระบบต่างๆในร่างกาย (systemic phase) พบว่าในลูกสุนัขจะมีต่อมไทมัสที่ลดขนาดลง (thymus atrophy) ในลูกสุนัขที่โตขึ้นจะพบการอักเสบของปอดชนิด broncopneumonia และการอักเสบของลำไส้ชนิด catarrhal enteritis นอกจากนี้ยังสามารถพบ hyperkeratosis ที่ฝ่าเท้าและจมูก เยื่อบุตาขาวอักเสบ (conjunctivitis) น้ำมูก น้ำตาข้น (mucopurulent oculonasal discharge) และผิวหนังมีตุ่มหนอง (skin pustules) ถ้าสุนัขตายขณะที่มีการแสดงอาการทางสมองเพียงอย่างเดียว อาจจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดที่อวัยวะภายใน และทางมีอาการสมองอักเสบเกิดขึ้นก่อนตาย อาจพบภาวะเลือดคั่งที่เยื่อหุ้มสมองได้

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าในระยะการเกิดโรคแบบเฉียบพลันจะพบการลดจำนวนลงของ T และ B lymphocyte นอกจากนี้พบการเพิ่มจำนวนของ reticular cells ในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphatic tissue) และยังสามารถพบ intracytoplasmic inclusion bodies และการเกิด syncytial formation ใน lymphocyte , reticular cells และ hematopoietic precursor cells ได้ สำหรับรอยโรคที่ปอดในระยะเฉียบพลัน จะพบ diffuse interstitial pneumonia ได้ ร่วมกับการหนาตัวของ alveolar walls จากการเพิ่มขึ้นของ fibrous tissue การขยายตัว (hyperplasia) และเพิ่มจำนวน (proliferation) ขึ้นของ alveolar epithelium การพบ epithelial cells และ macrophages ใน alveoli และการพบ intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies และ syncytial formation ใน bronchial epithelium นอก

จากนี้ยังสามารถพบ การเปลี่ยนแปลงแบบ degenerative changes และ inclusions ใน epithelium ที่ ภาวะอาหาร ลำไส้เล็ก และท่อน้ำดี พบ intracytoplasmic inclusions ได้ในภาวะพิษสภาวะ กรวยไต และผนังมดลูก และพบการเกิด interstitial epididymitis และ orchitis ได้

สำหรับรอยโรคที่ระบบประสาทส่วนกลาง อาจพบเซลล์อักเสบหรือไม่ก็ได้ โดยสามารถพบ eosinophilic intranuclear และ intracytoplasmic inclusion bodies ได้ใน neuron , ependymal และ meningeal cells นอกจากนี้สามารถพบการเกิด astocytosis ในระยะแรกเริ่มหลังจากที่เกิด demyelination และการเข้ามาของ lymphocytes และ plasma cells หรือที่เรียกว่า perivascular cuffing สำหรับการเปลี่ยนแปลงของเส้นเลือด พบว่าที่เส้นเลือดแดงและดำฝอยจะขยายและมีการกั่งเลือด (hyperemia) ร่วมกับการขยายขนาด (hypertrophy) และการเพิ่มจำนวน (hyperplasia) ของ perivascular cells สำหรับการเกิด demyelination มักจะเกิดร่วมกับการแสดงอาการทางประสาทของสุนัขที่ได้รับเชื้อไวรัส โดยในระยะแรกจะพบ vacuole ร่วมกับโปรตีนบางตัวของ myelin โดยไม่พบการสะสมของ เซลล์อักเสบใน white matter ในระยะหลังที่มีการแตกตัวของ myelin และ axons จะพบ lymphocytes และ macrophages ในบริเวณนั้น ซึ่งการลดลงของ myelin จะมีผลความเกี่ยวข้องกับการลดจำนวนลงของ oligodendrocyte (Schobesberger et al., 2002) นอกจากนี้สามารถพบ degenerative changes ใน retinal ganglion cells การเพิ่มจำนวนของ pigment epithelium การสะสมของ leucocyte ใน ciliary body และการเกิด syncytial formation และการพบเซลล์อักเสบที่ anterior uvea และสามารถพบการเสื่อมของเซลล์ที่หัวใจและไตในลูกสุนัขอายุ 5-7 วัน ได้ (Appel, 1987)

#### การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน (Immune Response)

ในช่วง 1 สัปดาห์หลังการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข จะพบ lymphopenia และ immunosuppression ในสุนัขที่ได้รับเชื้อ มีการลดจำนวนลงของ T และ B cells นอกจากนี้ยังพบการตาย (necrosis) ของ lymphatic tissues สุนัขที่หายจากโรคในระยะเริ่มแรก จะสามารถตรวจพบการตอบสนองของ humoral และ cellular immunity โดยจะสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ core proteins (NP และ P) ในวันที่ 6-8 หลังการติดเชื้อ ด้วยวิธี ELISA หรือ Immunoprecipitation และสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ envelope protein (H และ F) ในวันที่ 10 ถึง 12 หลังการติดเชื้อ ด้วยวิธี Virus neutralizing antibody นอกจากนี้สามารถตรวจพบ virus specific IgM ได้ตั้งแต่ 6 วัน ถึง 3 เดือนหลังการติดเชื้อ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการติดเชื้อ และ สเตรนของไวรัส โดยที่จะพบ IgM นี้ในสุนัขที่ได้รับ

วัคซีนเพียง 3 สัปดาห์เท่านั้น สำหรับการตอบสนอง ด้วย cell mediated immune โดย cytotoxic T cells ในกระแสเลือด จะพบในวันที่ 10-14 หลังการติดเชื้อ และจะพบสูงที่สุดในวันที่ 14-28 หลังการติดเชื้อ และจะค่อยๆลดระดับ และหายไปในช่วง 6-10 สัปดาห์ หลังการติดเชื้อ

สำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสุนัขที่ติดเชื้อในระยะเฉียบพลัน (acute) หรือกึ่งเฉียบพลัน (subacute) จะพบการตอบสนองทั้งแบบ humoral neutralizing antibody และ cellular mediated immunity เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย สำหรับสุนัขที่ติดเชื้อในระยะเรื้อรัง (chronic) ที่ระบบประสาทส่วนกลาง จะมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันที่แข็งแรง นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบแอนติบอดีและอินเตอร์เฟอรอน ในน้ำไขสันหลังได้ในสุนัขที่หายจากการติดเชื้อโรคไข้หัดสุนัข สำหรับสุนัขที่ตายด้วยการติดเชื้อที่ระบบประสาทส่วนกลางแบบเฉียบพลัน จะสามารถตรวจพบอินเตอร์เฟอรอน แต่จะไม่พบแอนติบอดี ในน้ำไขสันหลัง สำหรับในสุนัขที่ติดเชื้อระยะกึ่งเฉียบพลันและเรื้อรังที่แสดงอาการทางระบบประสาท ส่วนกลางจะพบอินเตอร์เฟอรอน และอาจพบแอนติบอดีในน้ำไขสันหลังได้เช่นกัน (Appel and Summers , 1999)

### โครงสร้างระดับโมเลกุล (Molecular Characterization)

ไวรัสไข้หัดสุนัข มีโครงสร้างที่สำคัญประกอบด้วย envelope และ helical nucleocapsid ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหลัก 6 ชนิด คือส่วนของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ประกอบด้วยโปรตีน HN (hemagglutinin neuraminidase protein) และ โปรตีน F (fusion protein) โดยจะทำหน้าที่ร่วมกันเป็นส่วน ที่สำคัญที่ทำให้เชื้อไวรัสสัมผัส และรวมเข้ากับผนังเซลล์ของสัตว์ที่ติดเชื้อได้ โปรตีน NP (nucleocapsid protein) เป็นส่วนของ nucleocapsid โดยจะจับอย่างเหนียวแน่นกับ RNA โปรตีน M (matrix protein) เป็นส่วนที่อยู่ระหว่าง enveloped glycoprotein และ nucleocapsid โปรตีน L (polymerase protein) และ โปรตีน P (phosphoprotein) ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ polymerase ซึ่งมีความสำคัญในการ transcription และ replication ของเชื้อไวรัส (Murphy et al., 1999) เชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขมีความยาวของจีโนม 15,616 นิวคลีโอไทด์ มีส่วนของยีนที่มีความอนุรักษ์ (conserved region) สูง คือยีน NP, M และ F และส่วนของยีนที่พบการเกิดการเปลี่ยนแปลง (variation) มากคือยีน H และ L (Sidhu et al., 1993)

จากการศึกษาที่ทำให้ทราบถึงลักษณะของยีนของเชื้อไวรัสนี้ ทำให้มีผู้ทำการทดลองทำการศึกษาถึงความแตกต่างของสเตรนไวรัสไข้หัดสุนัข ดังเช่นการทดลองของ Iwatsuki และคณะ (1998) ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ และลำดับของกรดอะมิโนของฟิวชั่นโปรตีน (fusion protein) ในไวรัสโรคลไข้หัดสุนัขในประเทศญี่ปุ่น โดยวิธี Radioimmunoprecipitation ไม่พบความแตกต่างของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสทั้งสองสเตรน และขนาดของโมเลกุล จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสด้วย วิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) และวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์พบว่าเชื้อไวรัสจากธรรมชาติ (Yanaka strain) มีความเหมือนกับไวรัสวัคซีน (Onderstepoort strain) ในส่วนของนิวคลีโอไทด์ 90.1% และระดับกรดอะมิโน 95.7% และในปีเดียวกัน Ohashi และคณะ ได้ทำการศึกษาลักษณะโมเลกุล ในส่วนของ H โปรตีนของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในประเทศญี่ปุ่นโดยวิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ด้วย เอนไซม์ *EcoRV* จากเนื้อเยื่อและเลือดของสุนัขที่ติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในธรรมชาติ เมื่อเทียบกับไวรัสวัคซีน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 650 ในเชื้อไวรัสที่แยกจากธรรมชาติ และในปีค.ศ. 2000 Wakasa และคณะ ทำการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ชนิดฟอสโฟโปรตีนยีน (phosphoprotein gene) ที่แยกจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในประเทศญี่ปุ่น พบว่าลำดับของกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสที่แยกจากสุนัขที่ติดเชื้อธรรมชาติ มีความเหมือนกับไวรัสวัคซีน (Onderstepoort strain) ในส่วนของกรดอะมิโนของ P, C และ V protein 93%, 90-91% และ 92% ตามลำดับโดยพบว่าความแตกต่างนี้มีความสัมพันธ์กับความแตกต่างทางพยาธิสภาพ และการแพร่กระจายของโรค

นอกจากการศึกษายีนของโปรตีนดังกล่าวแล้ว ยังพบว่าการทำการ ศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวคลีโอแคบซิดโปรตีนยีนอีกด้วย เนื่องจากเป็นส่วนที่มีความสำคัญในการควบคุมการสร้าง (viral transcription) การเพิ่มจำนวนของเชื้อ (viral replication) และการประกอบตัวของไวรัส (virus assembly) จากการศึกษาโครงสร้างของนิวคลีโอแคบซิดโปรตีนยีนของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข พบว่าสามารถแบ่งได้ เป็น 3 ส่วนคือ ส่วน N terminal (ช่วงกรดอะมิโนที่ 17-159) ส่วน middle part และส่วน C terminal (ช่วงกรดอะมิโนที่ 408-519) โดยส่วน N และ C terminal จะมีความหลากหลายมาก (variable region) ส่วน middle part จะเป็นส่วนที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (conserved region) (Yoshida et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโครงสร้างของนิวคลีโอแคบซิดโปรตีนยีนของไวรัสในกลุ่ม morbilliviruses (Rima et al., 1995) (รูปที่ 2.1) ทำให้มีผู้ทำการทดลอง ทำการศึกษาถึงความแตกต่างของสเตรนไวรัสไข้หัดสุนัขที่บริเวณโปรตีนส่วนนี้ โดยในปีค.ศ. 1995 Stettler และ Zurbriggen ศึกษา ลำดับของนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของนิวคลีโอแคบซิดโปรตีนยีนของไวรัสไข้หัดสุนัข ในสาย

พันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง (virulent strain) คือ A 75/17-CDV strain ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด dog brain cell cultures (DBCC) พบว่ามีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกับสายพันธุ์ไม่ก่อโรคคือ Onderstepoort strain 105 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความเหมือน (homologous) 93.8% โดยมี 3 ตำแหน่งที่บริเวณ 3' และ 5 ตำแหน่งที่บริเวณ 5' non-coding region และ 97 นิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ coding region ซึ่งมีความแตกต่างของกรดอะมิโน 22 ตัว โดยพบว่ามีความแตกต่างของกรดอะมิโน 10 ตัวที่ N terminal region และ 12 ตัวที่ C terminal region และพบว่าที่บริเวณ middle region ไม่มีความแตกต่างในปีค.ศ. 1998 Yoshida และคณะ ศึกษา นิวคลีโอแคบซิด โปรตีน ยีน จากการแยกเชื้อโรคไข้หัดสุนัขในประเทศญี่ปุ่นจากไวรัสที่ติดเชื้อจากธรรมชาติที่ก่อให้เกิดโรคที่ระบบต่างๆ ในสุนัขและเพาะแยกเซลล์เพาะเลี้ยง ชนิด B95a cells พบว่ามี 4 สายพันธุ์ที่แยกได้คือ Yanaka, Ueno, Hamamatsu (แยกได้จากสุนัขที่แสดงอาการที่ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และระบบประสาท) และ Adachi strain (แยกได้จากสุนัขที่แสดงอาการที่ระบบประสาทอย่างเฉียบ) จากนั้นมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับ Onderstepoort strain พบว่า Yanaka strain มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,683 นิวคลีโอไทด์ และมีความเหมือน (homologous) กับ Onderstepoort strain 93.2% มีกรดอะมิโน 523 ตัว โดยมีความเหมือน (homologous) กับ Onderstepoort strain และ A 75/17-CDV strain 95.2% และ 99% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ในส่วน of 3' terminal variable region พบว่า Yanaka strain มีความแตกต่างจาก Onderstepoort strain 36 นิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก Ueno และ Adachi strain 1 นิวคลีโอไทด์ และแตกต่างจาก Hamamatsu strain 2 นิวคลีโอไทด์ และในปีค.ศ. 1999 Frisk และคณะ ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ชนิดนิวคลีโอโปรตีนจากซีรัม เลือด และน้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid) จากสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไข้หัดสุนัข พบว่าเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากสัตว์ป่วยมีความเหมือนกับไวรัสวักซีนชนิด Rockborn strain 97-99% และ Onderstepoort strain 94-95% จากการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้จากการแยกเชื้อจากสัตว์ที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติและไวรัสวักซีนในประเทศต่างๆ ซึ่งความแตกต่างนี้น่าจะมีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพที่ต่างกันและทำให้มีความชุกของโรคไข้หัดสุนัขเพิ่มขึ้น

### การวินิจฉัยโรค (Diagnosis)

การวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขในระยะเฉียบพลัน (acute) และกึ่งเฉียบพลัน (subacute) สามารถวินิจฉัยได้จากอาการทางคลินิก และประวัติวักซีนในลูกสุนัข ซึ่งจะเป็นการยากในการวินิจฉัยแยกจากโรคติดเชื้ออื่นๆ เช่น kennel cough ในระยะเริ่มแรก (Kim et al., 2001) สำหรับการวินิจฉัยทางซีรัม



วิทยา (Serologic diagnosis) เช่น CDV specific neutralizing precipitating หรือ cytotoxic antibody อาจทำร่วม วิธี ELISA เพื่อตรวจหา anti-CDV IgM antibody โดยที่จะพบ IgM ในสุนัขที่ติดเชื้อโรคไขหัดสุนัขตั้งแต่ 5 สัปดาห์ ถึง 3 เดือน ขึ้นกับสเตรนของเชื้อและการตอบสนองของตัวสัตว์ (Blixenkron-Möller et al., 1991 ; Appel and summers, 1999) หรือตรวจหา anti-CDV IgG antibody ซึ่งสามารถตรวจพบการตอบสนองของ IgG ต่อไวรัสไขหัดสุนัขใน ระยะ 6 – 10 วันแรกหลังได้รับเชื้อ (Noon et al., 1980 ; Bernard et al., 1982) วิธี ELISA นี้เป็นวิธีที่เร็วและมีความไว (sensitivity) สูงแต่พบว่ายังคงมีข้อจำกัดในสุนัขที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคไขหัดสุนัขภายใน 3 อาทิตย์ก่อนทำการตรวจ (Kim et al., 2001)

การใช้วิธี Fluorescent antibody (FA) test สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสไขหัดสุนัขในเซลล์ได้ เช่นจากเยื่อบุตาขาว เลือด ระบบทางเดินหายใจ หรือกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งการทดสอบด้วยวิธีนี้จะมีความจำเพาะ (specificity) แต่ขาดความไว (sensitivity) (Haines et al., 1999) และในสุนัขที่ได้รับวัคซีน อาจทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ และทำการตรวจจากกรวยที่เป็นใน ระยะเฉียบพลันเท่านั้น เนื่องจากในระยะกึ่งเฉียบพลันหรือเรื้อรังร่างกายจะมีการสร้างแอนติบอดีออกมาต่อต้านแอนติเจน ทำให้ขัดขวางการทำงานของ fluorescein-conjugated CDV-Ab (Poston and England, 1992) การเพาะแยกเชื้อไวรัส (Viral isolation) ก็เป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ โดยดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ซึ่งมีหลายชนิดที่น่าสนใจ เช่น Vero cells, Canine lung macrophage, Canine หรือ ferret lymphocyte และ B95a เป็นต้น (Kai et al., 1993 ; Iwatsuki et al., 1999) แต่วิธีนี้จะใช้เวลานาน และไม่ได้ผลดีในสัตว์ที่ติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (Kim et al., 2001)

การตรวจน้ำไขสันหลัง (CSF analysis) ในสุนัขที่ติดเชื้อไขหัดสุนัขร่วมกับการแสดงอาการทางประสาท จะมีปริมาณโปรตีน (specific anti CDV globulin (IgG)) และความเข้มข้นของ mononuclear cell ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นลิมโฟไซต์สูงขึ้นในน้ำไขสันหลัง ซึ่งเป็นการยืนยันการวินิจฉัย Distemper encephalitis โดยจะไม่สามารถพบแอนติบอดีในน้ำไขสันหลังในสุนัขหลังจากได้รับวัคซีน นอกจากนี้ในระยะเฉียบพลัน ยังสามารถทำการวินิจฉัยด้วยการตรวจทางโลหิตวิทยา (Hematology) ซึ่งจะสามารถพบ lymphopenia และ thrombocytopenia ซึ่งจะมีการเพิ่มขึ้นของโมโนไซต์ นอกจากนี้ยังสามารถวินิจฉัยด้วยวิธี Immunocytochemistry หรือ Immunohistochemistry ซึ่งใช้ในการตรวจหาไวรัสแอนติเจนในเนื้อเยื่อเลือด buffy coat (Appel and summers, 1999) เส้นขน เนื้อเยื่อในช่องจมูก (nasal mucosa) และ footpad epithelium (Haines et al., 1999) อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) (Iwatsuki et

al., 1995) นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธีนี้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิสภาพของระบบประสาทส่วนกลาง (Rungsipipat et al., 2000) แต่วิธีนี้จะสามารถให้ผลลบ (negative result) ได้ในสัตว์ที่ป่วยระยะกึ่งเฉียบพลัน หรือเรื้อรัง (Appel, 1987) ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งใช้ในการตรวจหากรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ซึ่งวิธีนี้มีความจำเพาะและความไวที่สูงมาตรวจหาเชื้อไวรัสในสุนัขที่แสดงอาการของโรคไข้หัดสุนัข (Shin et al., 1995) โดยการวินิจฉัยด้วยวิธีนี้สามารถทราบผลได้รวดเร็ว ทำให้มีประโยชน์ในการรักษา ควบคุม และการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างรวดเร็ว

### วิธี nested RT-PCR และ DNA sequencing

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) มาใช้ในการวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขมากขึ้น โดยนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ RNA ของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข จากนั้นนำ RNA ที่สกัดได้มาเป็นแม่พิมพ์ สำหรับปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) และนำมาเป็นแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primers คู่ที่เหมาะสมมาเพื่อขยายตำแหน่งเป้าหมาย ดังเช่นการตรวจ NP gene ของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ในกระแสเลือด (Shin et al., 1995 ; Tiwananthakorn et al., 2002) เนื้อเยื่อที่ระบบต่างๆ (Tiwananthakorn et al., 2000) และการตรวจหาเชื้อในซีรัม เลือด และน้ำไขสันหลัง (Frisk et al., 1999) ต่อมาได้มีการดัดแปลงเทคนิค PCR พื้นฐานให้สามารถเพิ่มขยายจำนวน target DNA ให้ได้ผลผลิตที่ต้องการ การเพิ่มมากขึ้นโดยที่ลดจำนวนผลิตภัณฑ์ที่ไม่จำเพาะให้เหลือน้อยที่สุด โดยเทคนิค Nested PCR ซึ่งเป็น ปฏิกิริยา PCR 2 ขั้นตอน ด้วยการใส่ primers 2 คู่ได้แก่ bracket primers และ nested primers โดยการใส่วิธี nested RT-PCR (รูปที่ 2.2) นี้มีความไวและความจำเพาะที่สูง ดังการศึกษาของ Kim และคณะในปี 2001 พบว่าการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในตัวอย่างเลือดด้วยวิธี one step RT-PCR ร่วมกับ nested PCR ทำให้มีความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคที่สูงขึ้นกว่าการใช้เฉพาะวิธี one step RT-PCR นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการวินิจฉัยไข้หัดสุนัขในสุนัข และสัตว์ที่มีขน (fur animals) (Rzezutka and Mizak , 2002)

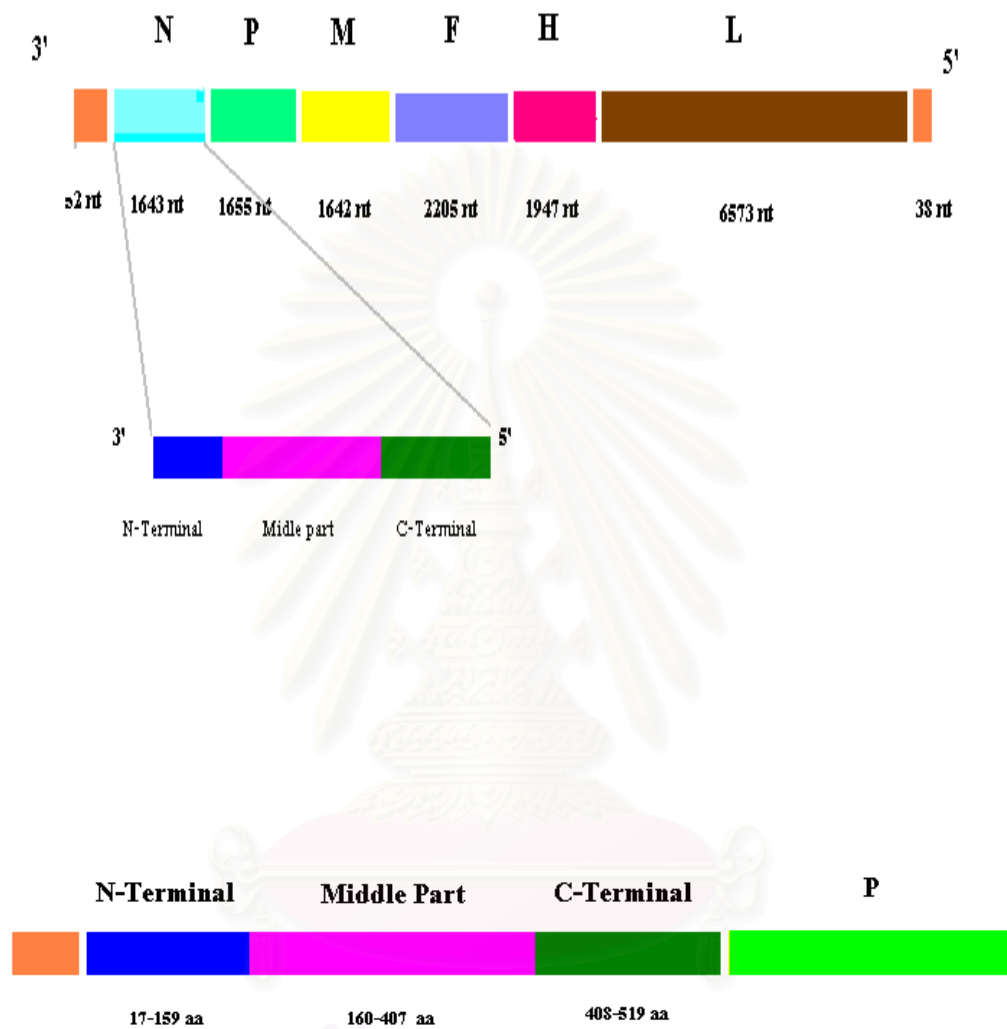
เนื่องจากในปัจจุบันวิธี PCR ได้เข้ามามีบทบาทในการประยุกต์ใช้ร่วมกับงานทางอณูชีววิทยาหลายประเภท ดังนั้นการตรวจความถูกต้องของลำดับเบสของ PCR product ที่ได้ก่อนนำไปใช้งานอื่นๆ ต่อไปจึงเป็นสิ่งจำเป็นมาก ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่ากำลังทำงานอยู่กับชิ้นส่วน DNA ที่ถูกต้อง สำหรับ

การหาลำดับเบสของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ได้มีการนำมาใช้เพื่อศึกษาหาความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้จากสุนัขที่ติดเชื่อในธรรมชาติและไวรัสวัคซีน (Iwatsuki et al., 1998 ; Yoshida et al., 1998 ; Frisk et al., 1999 ; Haas et al., 1999 ; Wakasa et al., 1999) ระหว่างสเตรนของเชื้อไวรัส (Stettler and Zurbriggen, 1995) และเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ต่างชนิดกัน (Harder et al., 1995 ; Kennedy et al., 2000) จากนั้นนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ไปทำ phylogenetic tree ศึกษาความสัมพันธ์ต่อไป

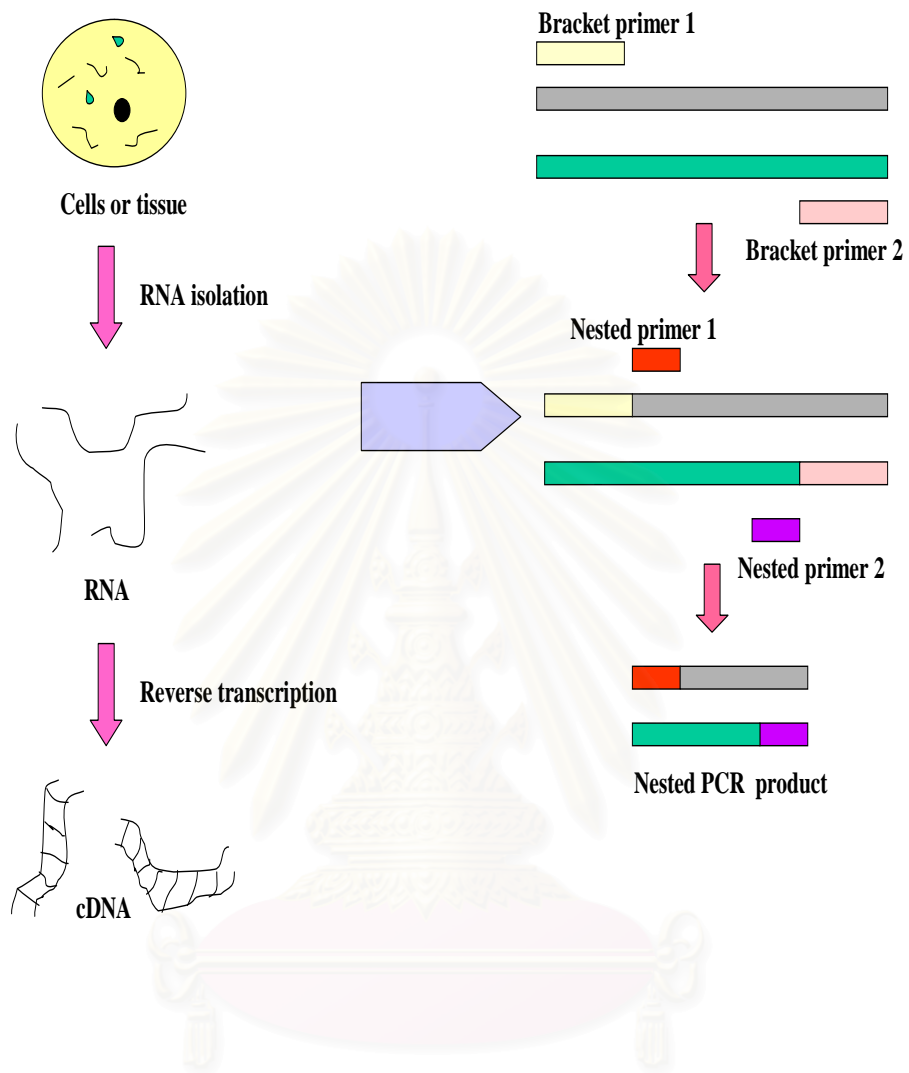


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 2.1 แสดงแผนภาพยีนโนมของไวรัสไข้หวัดสุนัข และขยายในส่วน nucleocapsid protein gene



สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำ Nested RT-PCR

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### สุนัขที่นำมาทำการศึกษา

สุนัขที่เสียชีวิตที่เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโรงพยาบาลสัตว์หรือคลินิกเอกชน โดยสุนัขแสดงอาการป่วยและได้รับการวินิจฉัยอาการทางคลินิกเบื้องต้นจากสัตวแพทย์ว่าป่วยเป็นโรคไข้หัดสุนัข โดยสุนัขที่ศึกษาแสดงอาการเด่นที่ระบบต่างๆ (ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร หรือระบบประสาท) เช่น ไข้ ซึม มีไข้ น้ำมูกขึ้น ท้องเสีย ผื่นแดงตามท้อง ชัก กระตุกของกล้ามเนื้อ อัมพาต จากนั้นทำการเก็บรวบรวมบันทึกข้อมูลประวัติ เพศ พันธุ์ อายุ ประวัติวัคซีน และอาการทางคลินิกของสุนัขทุกตัวทำการเก็บตัวอย่างสมอง ปอด กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ม้าม ต่อมน้ำเหลืองที่ระบบทางเดินหายใจ ต่อมน้ำเหลืองที่ระบบทางเดินอาหาร และ/หรือกระเพาะปัสสาวะ ทำการชันสูตรซากที่หน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นแยกชิ้นเนื้อสดเก็บที่  $-70^{\circ}\text{C}$  เพื่อรอการสกัด RNA และอีกส่วนเก็บใน 10% ฟอรัมาลิน เพื่อทำการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาและตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธี Immunohistochemistry ทำการจัดกลุ่มคัดเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ให้ผลสอดคล้องกันของอาการทางคลินิก รอยโรค และการปรากฏของแอนติเจนและ RNA ของไวรัสมาเพื่อศึกษาลำดับเบสของ nucleocapsid protein gene จาก PCR product ต่อไป

#### เชื้อไวรัสอ้างอิง

ไวรัสไข้หัดสุนัข Onderstepoort strain (เชื้อเพื่อโดย Dr. Kenneth Platt, National Veterinary Service Laboratory, Ames, Iowa)

## วิธีการ

### การยืนยันการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี Immunohistochemistry

ชิ้นเนื้อจากสุนัขที่ให้ผลผ่าซาก และ/หรือทางจุลพยาธิวิทยา (การพบ intracytoplasmic หรือ intranuclear inclusion bodies ใน astrocytes neurons หรือ glia cells ที่สมอง หรือใน epithelial cells ที่อวัยวะในระบบต่างๆ) ซึ่งสงสัยว่ามีผลจากการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ซึ่งนำมายืนยันโดยการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วย Immunohistochemistry โดยวิธี Avidin-Biotin Peroxidase Complex method (ABC) โดยนำชิ้นเนื้อที่รักษาสภาพใน 10% ฟอร์มอลิน แล้วนำไปฝังลงในพาราฟิน จากนั้นนำบล็อกพาราฟินที่ทำการฝังเนื้อเยื่อมาตัดเพื่อทำสไลด์ที่ความหนา 4 ไมครอน จากนั้นทำการละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ในไซลีน จากนั้นทำการจุ่มสไลด์ในแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 100 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เพื่อเป็นการเติมน้ำเข้าชิ้นเนื้อ จากนั้นทำการ pretreatment โดยการนำสไลด์เข้าเครื่อง autoclave ที่ 121° ซ นาน 5 นาที ใน PBS และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการขจัดเอนไซม์ endogenous peroxidase โดยใช้ 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ใน methanol ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นทำการ nonspecific background blocking ด้วย 10% bovine serum albumin (BSA) ที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 30 นาที ใน moisture chamber ทำปฏิกิริยากับ primary antibody ชนิด rabbit polyclonal antibody against CDV strain Onderstepoort (Advanced technology Lab, Oita, Japan) ที่ความเข้มข้น 1:400 ที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 30 นาที และนำมาทำปฏิกิริยากับ secondary antibody ชนิด goat anti-rabbit IgG biotinylated antibody ที่ความเข้มข้น 1:400 ที่อุณหภูมิ 4° ซ ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ avidin-biotin peroxidase complex solution (ABC kit) (DAKO, Denmark) แล้วทำให้เกิดสีด้วยน้ำยา DAB (0.05% 3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride ใน 0.05 M Tris-HCl pH 7.6 และ 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma, St. Louis, USA) จากนั้นย้อมทับด้วย Mayer's hematoxylin ทำการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และแช่ในไซลีน ปิดสไลด์ด้วย cover glass ด้วยน้ำยา mounting media จากนั้นตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยผลบวกที่แสดง viral antigen จะย้อมติดสีน้ำตาลเข้ม

### การสกัด RNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ทำการสกัด RNA ด้วยวิธี QIAamp<sup>®</sup> viral RNA Mini Kit (QIAGEN, USA) โดยเลือก ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากสุนัขที่ตายด้วยอาการ และแสดงรอยโรคเด่นของระบบที่แตกต่างกันและให้ผลบวกต่อ

การยืนยันการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขด้วยวิธี Immunohistochemistry จำนวน 1 กรัม มาบดให้ละเอียด เติม PBS ทำให้เป็น 10 % suspension นำไปปั่น 2000-3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ นาน 10 นาที ดูดส่วนใสที่มีเซลล์ของเนื้อเยื่อที่มี RNA ของไวรัสผสมอยู่ออกมา จากนั้นนำตัวอย่าง 140 ul มาข่อยด้วย buffer AVL containing carrier RNA 560 ul ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติม 100% ethanol 560 ul เพื่อเพิ่มการจับของ RNA กับ QIAamp membrane ล้างสิ่งปนเปื้อนบนแผ่นกรองด้วย AW1 และ AW2 ในชุดสกัด RNA ถ้าเสร็จรูปดังกล่าว จากนั้นเติม buffer AVE 60 ul (ซึ่งมีส่วนประกอบของ 0.04% sodium azide เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สร้าง Rnase) เพื่อล้างชะสาย RNA ที่ดูดซับอยู่บนแผ่นกรองออก จากนั้นรักษาสภาพของ RNA ใน buffer AVE ที่ -20° ซ เตรียมนำไปใช้ในงานต่อไป

### การออกแบบ Primer

ทำการเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้เป็น primer จากส่วนของ nucleoprotein gene ที่อยู่ในส่วน C terminal region และส่วนของ phosphoprotein gene ซึ่งเป็นส่วนที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง โดยออกแบบ primer ด้วยโปรแกรม Clustal X และเลือกจาก oligonucleotide primers (Bio Basic Inc., Canada) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

#### Outer primers

Forward primer (CDV1) : location; nt1223-nt1253

5' TGCCGGCAAAGTAAGCTCTGC 3'

Reverse primer (CDV4) : location; nt1817-nt1837

5' GCCCTTTGCTGACATGGTAGG 3'

#### Inner primers

Forward primer (CDV2) : location; nt1287-nt1309

5' GTGTCAGAAATAGCATCCAAGAC 3'

Reverse primer (CDV3) : location; nt1739-nt1760

5' TTTGTTGGACCTGGGTCCTAAG 3'

### ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา Nested RT-PCR

นำ RNA ที่ได้จากการสกัดจำนวน 5 ul มาสังเคราะห์ เป็น cDNA โดยใช้ QIAGEN® One Step RT-PCR Kit (QIAGEN, USA) นำ cDNA มาเป็นตัวตั้งต้นนำไปเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิก ตามอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบ ซึ่งคำนวณจาก primer ที่ออกแบบไว้ในเครื่อง Thermocycle (Perkin Elmer Cetus 9600, CA, USA) ดังนี้

เข้าสู่ปฏิกิริยา Reverse transcription ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 30 นาที

เริ่มต้นปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 1 นาที และ 55 °C นาน 1 นาทีจำนวน 1 รอบ

แต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาจำนวน 35 รอบดังนี้

Denaturation 95 °C 30 วินาที

Annealing 55 °C 30 วินาที

Extension 72 °C 1.5 นาที

ตามด้วยอุณหภูมิ 95 °C นาน 1 นาที 55 °C นาน 2 นาที และ 72 °C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ และแช่หลอดไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เพื่อนำไปสู่ขั้นตอน Nested RT-PCR ต่อไป

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้จำนวน 5 ul มาเข้าสู่ปฏิกิริยา Nested RT-PCR โดยใช้ QIAGEN® One Step RT-PCR Kit (QIAGEN, USA) และนำเข้าเครื่อง Thermocycle โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาของแต่ละขั้นตอนเหมือนกับการทำ PCR ในช่วงแรก

ซึ่งขั้นตอนการตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขนี้ จะทำการเปรียบเทียบกับ non-infected vero cell ซึ่งเป็น negative control และ CDV onderstepoort strain infected vero cell ซึ่งเป็น positive control

### ความไวของเทคนิค Nested RT-PCR

นำเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขสเตรน Onderstepoort ที่มีความเข้มข้น  $10^4$  TCID<sub>50</sub> มาทำการเจือจางทีละสิบเท่าไปจนถึง  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub> จากนั้นทำการตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น เปรียบเทียบกับ non-infected vero cell เป็นตัวควบคุมลบ

### การตรวจหา RT-PCR product

นำผลผลิตที่ได้จำนวน 5 ul ไปวิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel โดยมี 100bp DNA ladder (GIBCO BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg) เป็น marker เปรียบเทียบ และย้อมสีด้วย ethidium bromide (2 ug/ml) ควบคุมด้วยกล้อง UV light ซึ่งจะได้ผลผลิตที่ขนาด 474 bp

### ขั้นตอนการเตรียม PCR product ให้บริสุทธิ์

นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, USA) เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับเบสต่อไป

### การหาลำดับเบสของ nucleoprotein gene จาก PCR product

ทำการตรวจหาลำดับเบสของ nucleoprotein gene จาก PCR product จำนวน 13 ตัวอย่าง โดยวิธี ABI Prism<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Original and version 2.0) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในเอกสารของบริษัทผู้ผลิต (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) โดยย่อดังนี้ นำ PCR product ที่ได้มาเป็น DNA ต้นแบบ (template) จากนั้นทำการเตรียม reaction mixture ประกอบด้วย Terminator ready reaction mix (A-Dye Terminator labelled with dichor[R6G], C-Dye Terminator labelled with dichor[ROX], G-Dye Terminator labelled with dichor[R110], T-Dye Terminator labelled with dichor[TAMRA], Deoxynucleoside triphosphates, AmpliTaq DNA Polymerase, MgCl<sub>2</sub> และ Tris-HCl buffer pH 9.0), Template, Primer (forward และ reverse) และ Deionized water จากนั้นนำไปขยายจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) และติดฉลากด้วย dye terminator ด้วยเครื่อง the GeneAmp PCR System 9600 นำ product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Isopropanol precipitation เพื่อกำจัด dye terminator ที่มีมากเกินไปใน Sequencing reaction ซึ่งจะมีผลต่อการอ่านลำดับเบสได้ จากนั้นนำไปอ่านผลด้วย ABI Prism 310 Genetic Analyzer

## การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดกลุ่มสเตรนของไวรัสไข้หัดสุนัข

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แยกได้ในประเทศไทยกับสายพันธุ์ที่รายงานไว้ใน GeneBank database จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Clustal X และ PHYLIP 95 เพื่อเรียงลำดับข้อมูลและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### ประวัติและอาการทางคลินิก

จากตัวอย่างชิ้นเนื้อของสุนัขที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 13 ตัว ที่ให้ผลการยืนยันการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี Immunohistochemistry และ/หรือให้ผลบวกต่อการตรวจหา RNA genome ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของไวรัสดังกล่าวโดยวิธี nested RT-PCR พบว่ามาจากสุนัขเพศเมียจำนวน 5 ตัว และเพศผู้จำนวน 8 ตัว โดยอายุเฉลี่ยของสุนัขที่ใช้ในการศึกษาคือ 3.3 เดือน (ช่วง 2-8 เดือน) สำหรับประวัติการฉีดวัคซีน พบว่ามีสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้วจำนวน 4 ตัว ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนจำนวน 2 ตัว และไม่ทราบประวัติการฉีดวัคซีน 7 ตัว นอกจากนี้พบว่าสุนัขป่วย การแสดงอาการทางคลินิกในแต่ละระบบดังนี้ ระบบประสาท เช่น อาการชักร้อยละ 46.15 (6/13) ระบบทางเดินหายใจ เช่น ไอ จาม หายใจหอบ น้ำมูกขึ้น เลือดกำเดาไหลร้อยละ 92.30 (12/13) ระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องเสีย อาเจียนร้อยละ 69.23 (9/13) และระบุนอนในช่วงมีไข้สูงร้อยละ 15.38 (2/13) (ตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 ตารางการจำแนกกลุ่มอาการสุนัขที่ติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจำนวน 13 ตัว

อาการทางคลินิก	จำนวน
ระบบทางเดินหายใจ	2
ระบบประสาทและระบบทางเดินหายใจ	2
ระบบประสาทและระบบทางเดินอาหาร	2
ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร	5
ระบบประสาท ระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินหายใจ	2

## พยาธิวิทยา และ Immunohistochemistry

ผลการชันสูตรทางพยาธิวิทยา (ตารางที่ 4.3) สามารถวินิจฉัยว่าสุนัขป่วยและเสียชีวิตจากโรคไข้หัดสุนัขร้อยละ 46.15 (6/13) โดยที่ระบบประสาทส่วนกลาง เช่น เลือดคั่งในสมอง (brain congestion) สมองอักเสบแบบไม่มีหนอง (non-suppurative encephalitis) การอักเสบกึ่งเฉียบพลันของ Choroid แบบมี หนอง (subacute suppurative choroiditis) พบ inclusion bodies (IB) ใน neuron, glial cell, microglia และ parenchymal cell การอักเสบแบบเนื้อตายของเซลล์ประสาท (neuronal necrosis) gliosis และ spongiosis ที่ระบบทางเดินหายใจ เช่น ปอดอักเสบแบบ interstitial pneumonia, suppurative broncopneumonia, พบ inclusion bodies ที่เซลล์เยื่อหุ้หลอดลม และผนังถุงลมฝอย, การอักเสบที่หลอดลม (tracheitis) และ กล่องเสียงอักเสบ (laryngitis) ที่ระบบทางเดินอาหาร เช่น มีการอักเสบแบบมีเมือกของลำไส้เล็ก และกระเพาะอาหาร ร่วมกับพบ inclusion bodies ที่เยื่อหุ้กระเพาะอาหาร นอกจากนี้ที่อวัยวะอื่นๆ เช่น ตับ พบจุดเนื้อตายกระจายอยู่ทั่วไป (multifocal necrotic foci in liver) ม้าม พบการอักเสบแบบมีหนอง (suppurative splenitis), การอักเสบแบบเนื้อตายแบบแข็งตัว (multifocal coagulative necrotic splenitis) ร่วมกับพบ inclusion bodies ใน macrophage ที่ต่อมน้ำเหลือง พบการอักเสบแบบมีหนอง (suppurative lymphadenitis) การอักเสบแบบเนื้อตาย (multifocal necrotic lymphadenitis) ร่วมกับ lymphoid depletion, lymphoid necrosis หรือลักษณะ follicular atrophy ที่กระเพาะปัสสาวะ การอักเสบที่กระเพาะปัสสาวะ (cystitis) และพบ inclusion bodies ที่เยื่อหุ้กระเพาะปัสสาวะ นอกจากนี้พบการหนาตัวขึ้นของฝาเท้า และพบ inclusion bodies ที่ชั้น squamous epithelium จากตารางที่ 4.4 พบว่าสามารถตรวจหา inclusion bodies ได้จากระบบประสาทส่วนกลาง ร้อยละ 25 (3/12) และระบบทางเดินหายใจร้อยละ 38.46 (5/13)

ผลทาง immunohistochemistry (ตารางที่ 4.4) พบว่าสามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัส โดยพบในระบบประสาทส่วนกลางร้อยละ 58.33 (7/12) และที่ระบบทางเดินหายใจร้อยละ 83.33 (10/12) โดยสามารถพบแอนติเจนของเชื้อไวรัสได้ตามเซลล์เยื่อหุ้ เช่นที่ระบบประสาทส่วนกลางพบได้ทั้งใน นิวเคลียส และ/หรือไซโตพลาสซึมของเซลล์ประสาท (neuron) และเซลล์ก้ำจุน (glial cell, microglia และ astrocytes) และบริเวณเส้นใยประสาทที่ระบบทางเดินหายใจพบได้ทั้งในนิวเคลียส และ/หรือไซโตพลาสซึมของ alveolar epithelium, bronchiolar epithelium และ alveolar macrophage และยัง สามารถพบได้ที่เซลล์เยื่อหุ้กระเพาะอาหาร เซลล์เยื่อหุ้กระเพาะปัสสาวะ และชั้น squamous epithelium เป็นต้น

ตารางที่ 4.2 แสดงประวัติและอาการที่แสดงออกของสุนัขจำนวน 13 ตัว

สุนัขตัวที่	พันธุ์	อายุ	เพศ	ประวัติวัคซีน	อาการทางคลินิก
466	German Shepherd	8 mths.	M	NI	Convulsion , Conjunctivitis , Nasoocular discharge , Hard foot pad
577	Beagle	2 mths.	M	NI	Convulsion , Diarrhea
443	Duchshund	6 mths.	F	NI	Convulsion , Purulent nasoocular discharge , Vomitting , Diarrhea
438	Rottweier	2 mths.	M	Vaccinated**	Convulsion , Nasoocular discharge
230	Mongrel	2 mths.	M	NI	Convulsion , Cough , Vomitting , Depress , Epistaxis , Increase vesicular sound
621	Siberian Husky	2 mths.	F	NI	Convulsion , Cough , Bloody diarrhea , Hard foot pad
418	Dalmatian	3 mths.	M	No vaccination	Cough , Purulent nasal discharge
034	Mongrel	2 mths.	M	NI	Depress , Purulent nasal discharge , Anemia , Diarrhea
442	Mongrel	2 mths.	F	No vaccination	Cough , Purulent nasal discharge , Diarrhea
207	Golden Retriever	2 mths.	M	NI	Fever , Depress , Purulent nasal discharge , Vomitting
171	Golden Retriever	3 mths.	M	Vaccinated*	High fever , Mucopurulent nasal discharge
468	Shizu	3 mths.	F	Vaccinated*	Cough , Nasoocular discharge , Diarrhea
400	Shizu	6 mths.	F	Vaccinated***	Cough , Purulent nasal discharge , Diarrhea

หมายเหตุ NI: No information available

\* ฉีดวัคซีนรวม 1 ครั้ง

\*\* ฉีดวัคซีนรวม 2 ครั้ง

\*\*\* ฉีดวัคซีนรวม 2 ครั้ง และวัคซีนป้องกันพิษสุนัขบ้า 1 ครั้ง

ตารางที่ 4.3 แสดงผลทางจุลพยาธิวิทยาจากตัวอย่างสุนัขจำนวน 13 ตัว

Dog No.	จุลพยาธิวิทยา							
	CNS	RT	GI	CS	LS	UT	Liver	IS
466	- Spongiosis - IN & IC inclusion bodies in neuron and glial cell	- Interstitial pneumonia	-	-	-	-	-Multifocal necrotic foci	- IN & IC inclusion bodies in squamous epithelium
577	- Brain congestion - IN inclusion bodies in parenchymal cells - Diffuse gliosis	- Suppurative hemorrhagic BP with IN inclusion bodies in alveolar epithelium	- Catarrhal enteritis - IN & IC inclusion bodies in mucosa epithelium (stomach)	-	-	- IC inclusion bodies in intransitional epithelium cell	-	-
443	-	- Interstitial pneumonia with IC inclusion bodies	- Catarrhal enteritis	-Multifocal non-suppurative myocarditis with dystrophic calcification	- Lymphadenitis	- Kidney congestion	-	-
438	-	- Severe suppurative BP with pulmonary edema	-	- Marked myocardial degeneration with dystrophic calcification	- Suppurative splenitis	-	-	-
230	-	- Mild degree of alveolar hemorrhage	-	-	-	-	- Mild degree of panlobular necrosis - Activated of kuffer's cell and juppiter,s cell	-
621	- Slight degree of gliosis	- Pneumonia - IN & IC inclusion bodies in bronchial epithelium	-	-	-	-	- Severe diffuse liver cell degeneration (vacuolar type)	-
418	- Subacute suppurative choroiditis	- Multifocal interstitial pneumonia - Suppurative BP - IC inclusion bodies in bronchiolar epithelium & IN inclusion bodies in macrophage	- Catarrhal enteritis - Catarrhal gastritis with inclusion bodies in mucosa	-	- Histiocytic tonsilitis - Lymphoid necrosis with IN & IC inclusion bodies - Moderate multifocal coagulative necrotic splenitis with IN inclusion bodies in macrophage - Suppurative lymphadinitis - Multifocal necrotic lymphadinitis with lymphoid depletion	- IC inclusion bodies in transitional epithelium cell	-	-
034	-	-Suppurative BP with IC inclusion bodies in bronchial epithelium -Tracheitis with IC inclusion bodies in epithelial cell	- Enteritis	-	- Lymphoid necrosis	-	-	-Hyperkeratosis

442	-	- Multifocal suppurative BP	-	-	-	-	-	-
207	-	- Bronchitis	-	-	-	-	-	-
171	- Brain congestion	- Suppurative BP	-	-	- Follicular atrophy - Moderate suppurative splenitis with histiocytic hyperplasia	-	- Hepatic congestion	-
468	- Encephalitis	- Purulent pneumonia	- Catarrhal enteritis	-	-	-	-	-
400	- Brain congestion and some neuronal necrosis & hemorrhage	- Necrotizing suppurative pneumonia with IN & IC inclusion bodies	-	-	-	- IC inclusion bodies in transitional epithelium cell	-	-

หมายเหตุ IN : Intranuclear, IC : Intracytoplasmic, BP : Broncopneumonia, CNS : Central nervous system  
 RT : Respiratory tract, GI : Gastrointestinal tract, CS : Cardiovascular system, LS : Lymphoid system, UT : Urinary tract, IS : Integument system



สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 แสดงผล Viral inclusion bodies , Immunohistochemistry และ Nested RT-PCR ในตัวอย่างจากสุนัขจำนวน 13 ตัว

สุนัขตัวที่	ระบบประสาทส่วนกลาง			ระบบทางเดินหายใจ		
	IB*	IHC**	nested RT-PCR	IB*	IHC***	nested RT-PCR
466	+	+	+	-	+	ND
577	+	+	+	+	+	+
443	+	+	+	+	+	+
438	-	-	+	-	+	+
230	-	ND	+	-	+	+
621	-	-	+	-	+	+
418	ND	+	+	+	+	+
034	-	+	+	+	+	+
442	-	-	+	-	ND	ND
207	-	-	+	-	-	+
171	-	-	+	-	-	+
468	-	+	+	-	+	+
400	-	+	+	+	+	+

หมายเหตุ IB : Inclusion bodies , IHC : Immunohistochemistry , ND : Non determined

\* ตำแหน่งที่พบดังตารางที่ 4.3

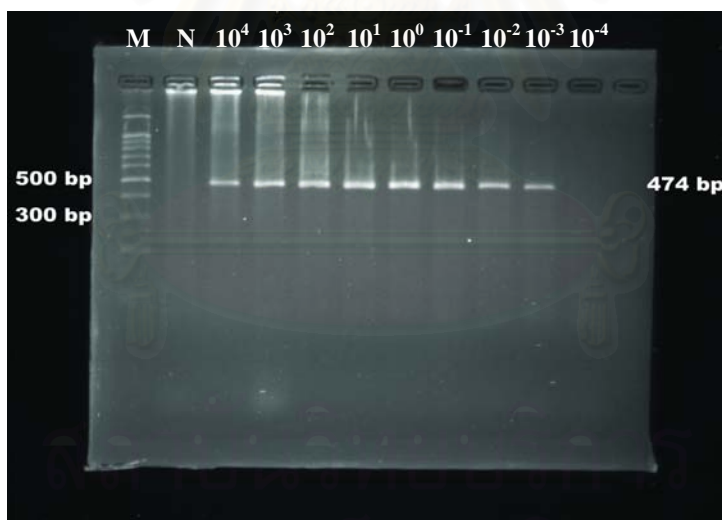
\*\* พบแอนติเจนภายในนิวเคลียส และ/หรือไซโตพลาสซึมของ neuron, glial cell, parenchymal cell และเส้นใยประสาท

\*\*\* พบแอนติเจนภายในนิวเคลียส และ/หรือไซโตพลาสซึมของ alveolar epithelium, bronchial epithelium, bronchiolar epithelium และ alveolar macrophage

## การตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี nested RT-PCR

### ก. ความไวของวิธี nested RT-PCR

ประเมินความไวของวิธี nested RT-PCR ในการตรวจหาส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัข โดยใช้ primer 2 คู่ โดยคู่แรก (outer primer) คือ CDV1 และ CDV4 ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 615 คู่เบส และคู่ที่สอง (inner primer) คือ CDV2 และ CDV3 ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 474 คู่เบส โดยได้จากการเจือจางไวรัสไข้หัดสุนัขสเตรน Onderstepoort ที่ละ 10 เท่า ที่ความเข้มข้นตั้งแต่  $10^4$  TCID<sub>50</sub> จนถึง  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub> และตรวจหาไวรัสโดยวิธี nested RT-PCR โดยมี RNA จาก non-infected vero cell culture เป็นตัวควบคุมลบ พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบ RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขได้ต่ำสุดที่  $10^{-3}$  TCID<sub>50</sub> equivalent โดยผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงความไวของวิธี nested RT-PCR ในการตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขสเตรน Onderstepoort ที่ความเข้มข้นเจือจางที่ละ 10 เท่าจาก  $10^4$  TCID<sub>50</sub> จนถึง  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub> (lane3 –lane 12) เปรียบเทียบกับ non-infected vero cell culture control (N) และ 100 bp ladder marker (M)



### ข. การตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่างชิ้นเนื้อโดยวิธี nested RT-PCR

ทำการตรวจหา RNA genome ของไวรัสไข้หัดสุนัขในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene จากตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วยวิธี nested RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบ RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อจำนวน 13 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.3) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 474 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงขนาดของผลิตภัณฑ์ nested RT-PCR ในการตรวจหา RNA genome ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่างชิ้นเนื้อของสุนัข (M = 100bp ladder marker , P = ตัวอย่างควบคุมบวกจาก CDV-infected vero cell , N = ตัวอย่างควบคุมลบจาก non-infected vero cell และ S<sub>1</sub>- S<sub>13</sub>= RT-PCR product จากตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย)

**การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัข จาก nested RT-PCR product และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์**

ทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วน C-terminal ที่มีนิวคลีโอไทด์จำนวน 335 นิวคลีโอไทด์ ครอบคลุม 19.90% ของ nucleocapsid protein gene โดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1342 ถึง 1676 จากตัวอย่างชิ้นเนื้อสมองสุนัขจำนวน 13 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสเตรนและทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หัดสุนัขสเตรนวัคซีน Onderstepoort ในตำแหน่งเดียวกันที่รายงานโดย Sidhu และคณะ (1993) พบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัข 11 ตัวอย่าง (207, 577, 230, 034, 418, 621, 400, 468, 438, 443 และ 466) มีร้อยละความเหมือนกับไวรัสวัคซีน (onderstepoort strain) 90.75-91.94 และตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 442 และ 171 มีร้อยละความเหมือนกับสเตรนวัคซีน (onderstepoort strain) 97.61 และ 99.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขในประเทศไทย พบว่าตัวอย่างเบอร์ 207, 577, 230 และ 034 มีร้อยละความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100 และตัวอย่างเบอร์ 418 และ 621 มีร้อยละความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100 โดยพบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัข 11 ตัวอย่าง (207, 577, 230, 034, 418, 621, 400, 468, 438, 443 และ 466) มีร้อยละความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 96.42-99.10 โดยมีร้อยละความเหมือนกับตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 442 และ 171 89.55-90.75 และ 91.04-92.24 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 442 และ 171 พบว่ามีร้อยละความเหมือน 97.31 (ตารางที่ 4.5)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขในประเทศไทยกับสเตรนอื่นๆที่รายงานใน GeneBank database เช่น Yanaka, Ueno, Hamamatsu และ Adachi (สเตรนที่แยกได้ในประเทศญี่ปุ่น), 2544/Han95 (สเตรนที่แยกได้ในประเทศเยอรมัน) และ A75/17 (สเตรนของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่ก่อให้เกิดโรครุนแรง) พบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัข 11 ตัวอย่าง (207, 577, 230, 034, 418, 621, 400, 468, 438, 443 และ 466) มีความเหมือนกับ Yanaka, Ueno, Hamamatsu, Adachi, 2544/Han95 และ A75/17 ร้อยละ 97.01-98.80, 97.31-99.10, 97.61-99.40, 97.31-99.10, 94.63-96.42 และ 97.31-99.10 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัข เบอร์ 171 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ Yanaka, Ueno, Hamamatsu, Adachi, 2544/Han95 และ A75/17 ร้อยละ 91.04, 91.34, 91.64, 91.34, 90.45 และ 93.13 ตามลำดับ และตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัข

เบอร์ 442 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ Yanaka, Ueno, Hamamatsu, Adachi, 2544/Han95 และ A75/17 ร้อยละ 89.55, 89.85, 90.14, 89.85, 89.55 และ 91.64 ตามลำดับ (รูปที่ 4.3)

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบร้อยละความเหมือน (% Homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย และไวรัสวักซิน (Onderstepoort strain)

	171	442	207	577	230	034	418	621	400	468	438	443	466	CDV- OND
<b>171</b>	<b>100</b>													
<b>442</b>	97.31	<b>100</b>												
<b>207</b>	91.64	90.14	<b>100</b>											
<b>577</b>	91.64	90.14	100	<b>100</b>										
<b>230</b>	91.64	90.14	100	100	<b>100</b>									
<b>034</b>	91.64	90.14	100	100	100	<b>100</b>								
<b>418</b>	91.04	89.55	98.80	98.80	98.80	98.80	<b>100</b>							
<b>621</b>	91.04	89.55	98.80	98.80	98.80	98.80	100	<b>100</b>						
<b>400</b>	91.34	89.85	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	<b>100</b>					
<b>468</b>	91.64	89.55	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	98.21	97.91	<b>100</b>				
<b>438</b>	92.24	90.75	97.61	97.61	97.61	97.61	97.01	97.01	96.72	96.42	<b>100</b>			
<b>443</b>	91.34	89.85	99.10	99.10	99.10	99.10	98.80	98.80	98.21	97.91	97.31	<b>100</b>		
<b>466</b>	91.04	90.45	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	98.51	97.91	98.21	96.42	97.91	<b>100</b>	
<b>CDV- OND</b>	99.10	97.61	91.34	91.34	91.34	91.34	90.75	90.75	91.04	90.75	91.94	91.04	90.75	<b>100</b>

CDV-OND CTAAGCAATCCCAAATCACTTTTCTGCACTCGGAAAGATCCGAAGTCGCCAATCAACAAC : 1401  
 171 .C..... : 1401  
 442 .....T..... : 1401  
 230 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 577 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 207 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 034 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 418 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 621 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 400 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 468 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 438 .C.....T.....C.....A.....A.T..... : 1401  
 466 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 443 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 Yanaka .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 Ueno .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 Hamamatsu .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 Adachi .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 2544/Han95 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401  
 A75/17 .C.....T.....A.....A.T..... : 1401

CDV-OND CCCC AACATCAACAAGAGGTCCGAAAACCAGGGAGGAGACAAATACCCCATTCACCTTCA : 1461  
 171 ..... : 1461  
 442 ...T...C...G...CTG... : 1461  
 230 .....A.....C..... : 1461  
 577 .....A.....C..... : 1461  
 207 .....A.....C..... : 1461  
 034 .....A.....C..... : 1461  
 418 .....A.....T..C..... : 1461  
 621 .....A.....T..C..... : 1461  
 400 .....A.....T..C..... : 1461  
 468 .T.....A.....T..C..... : 1461  
 438 .....A.....C..... : 1461  
 466 .T..T.....A.....C.....T..C..... : 1461  
 443 .....C.....A.....C..... : 1461  
 Yanaka T.....A.....C..... : 1461  
 Ueno T.....A.....C..... : 1461  
 Hamamatsu .....A.....C..... : 1461  
 Adachi T.....A.....C..... : 1461  
 2544/Han95 T.....G.....A.....C..... : 1461  
 A75/17 .....A.....C..... : 1461

CDV-OND GTGACGAAAGGCTTCCAGGGTATACCCAGATGTCAACAGTTCTGAATGGAGTGAGTCAC : 1521  
 171 ..... : 1521  
 442 ..... : 1521  
 230 A..T..C..T.....C...T.....C..C.....A... : 1521  
 577 A..T..C..T.....C...T.....C..C.....A... : 1521  
 207 A..T..C..T.....C...T.....C..C.....A... : 1521  
 034 A..T..C..T.....C...T.....C..C.....A... : 1521  
 418 A..T..C..T...T...C...T.....C..C.....A... : 1521  
 621 A..T..C..T...T...C...T.....C..C.....A... : 1521  
 400 A..T..C..T..T...C...T.....C..C.....A... : 1521  
 468 A..T..C..T.....C...T.....C..C.....A... : 1521  
 438 ...T..C..T.....C...C.....A... : 1521  
 466 A..T..C.....C...T.....C..C.....A... : 1521  
 443 A..T..C..T.....C...T.....C..C.....A... : 1521  
 Yanaka A..T..C..T...T...C...T.....C..C.....A... : 1521  
 Ueno A..T..C..T...T...C...T.....C..C.....A... : 1521  
 Hamamatsu A..T..C..T...T...C...T.....C..C.....A... : 1521  
 Adachi A..T..C..T...T...C...T.....C..C.....A... : 1521  
 2544/Han95 ...T..C..T...G...C...G..C..C.....A... : 1521  
 A75/17 ...T..C..T.....C..C.....A... : 1521

CDV-OND GCTATGACACCCAAATTATCCAAGATGATGGAAATGACGATGATCGGAAATCGATGGAAG : 1581  
 171 ..... : 1581  
 442 ..... : 1581  
 230 .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 577 .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 207 .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 034 .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 418 .....T.T..G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 621 .....T.T..G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 400 .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 468 .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 438 .....T.....CC.T.....C.....C..... : 1581  
 466 .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 443 .....T.....G.C...T.....A...C.....C..... : 1581  
 Yanaka .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 Ueno .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 Hamamatsu .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 Adachi .....T.....G.C...T.....C.....C..... : 1581  
 2544/Han95 .....T.....C...T.....C.....C.....A..... : 1581  
 A75/17 .....T.....C...T.....C.....C..... : 1581

CDV-OND CAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACTAAGATGCTCAGTCAACCTGGGACCAGTGAAGATA : 1641  
 171 ..... : 1641  
 442 ..... : 1641  
 230 .....A.....A.....G..... : 1641  
 577 .....A.....A.....G..... : 1641  
 207 .....A.....A.....G..... : 1641  
 034 .....A.....A.....G..... : 1641  
 418 .....A.....G..... : 1641  
 621 .....A.....G..... : 1641  
 400 .....A.....C.....G..... : 1641  
 468 .....A.....A.....G..... : 1641  
 438 .....A.....G..... : 1641  
 466 .....A.....G..... : 1641  
 443 .....A.....G..... : 1641  
 Yanaka .....A.....G..... : 1641  
 Ueno .....A.....G..... : 1641  
 Hamamatsu .....A.....G..... : 1641  
 Adachi .....A.....G..... : 1641  
 2544/Han95 .....A.....C.....T.C.....G..... : 1641  
 A75/17 .....A.....G..... : 1641

CDV-OND ATTCTCCTGTTTATAGTGATAAAGAGCTACTCAAT : 1676  
 171 .....A.....G..... : 1676  
 442 .....A..... : 1676  
 230 G.....C.....A.....G..... : 1676  
 577 G.....C.....A.....G..... : 1676  
 207 G.....C.....A.....G..... : 1676  
 034 G.....C.....A.....G..... : 1676  
 418 G.....C.....A.....G..... : 1676  
 621 G.....C.....A.....G..... : 1676  
 400 G.....C.....A.....G..... : 1676  
 468 G.....C.....A.....GG..... : 1676  
 438 G.....C..C.A.....G..... : 1676  
 466 G.....C.....A.....G..... : 1676  
 443 G.....C.....A.....G..... : 1676  
 Yanaka GA.....C.....A.....G..... : 1676  
 Ueno G.....C.....A.....G..... : 1676  
 Hamamatsu G.....C.....A.....G..... : 1676  
 Adachi G.....C.....A.....G..... : 1676  
 2544/Han95 G.....C..C.....A.....G..... : 1676  
 A75/17 G.....C.....A.....G..... : 1676

**รูปที่ 4.3** แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ตำแหน่งที่ 1342 ถึง 1676 ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย (171 (AY238607), 442 (AY241572), 230 (AY241577), 577 (AY241573), 207 (AY241576) , 034 (AY241574), 418 (AY241579), 621 (AY241581), 400 (AY241578), 468 (AY241580), 438 (AY241575), 466 (AY278994), 443 (AY278995)) ไวรัสวัคซิ้น (Onderstepoort strain) (AF014953) และสเตรนอื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (Yanaka (D89014), Ueno, Hamamatsu, Adachi, 2544/Han95 (AJ009656) และ A75/17 (AF16496))

#### การอนุมานลำดับกรดอะมิโน

ทำการตรวจหาลำดับกรดอะมิโนในส่วน C-terminal ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 111 ตัว โดยเริ่มจากตำแหน่งที่ 413 ถึง 523 จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสไข้หัดสุนัขสเตรนวัคซิ้น Onderstepoort ในตำแหน่งเดียวกัน พบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัข 11 ตัวอย่าง (207, 577 , 230, 034, 418, 621, 400, 468, 438, 443 และ 466) มีร้อยละความเหมือนกับไวรัสวัคซิ้น (onderstepoort strain) 90.99-93.69 และตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 442 และ 171 มีความเหมือนกับไวรัสวัคซิ้น (onderstepoort strain) 97.30 และ 99.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขในประเทศไทยด้วยกัน พบว่าตัวอย่างเบอร์ 621, 468, 418, 207, 577, 230 และ 034 มีร้อยละความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโน 100 โดยพบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัข 11 ตัวอย่าง (207, 577, 230, 034, 418, 621, 400, 468 , 438, 443 และ 466) มีร้อยละความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโน 96.40-100 โดยมีร้อยละความเหมือนกับตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 442 และ 171 90.10-94.60 และ 91.89-94.60 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 442 และ 171 พบว่ามีความเหมือน 100 (ตารางที่ 4.6)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขในประเทศไทยกับสเตรนอื่นๆ พบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัข 11 ตัวอย่าง (207, 577, 230, 034, 418, 621, 400, 468, 438, 443 และ 466) มีความเหมือนกับ Yanaka, Ueno, Hamamatsu, Adachi, 2544/Han95 และ A75/17 ร้อยละ 97.30-99.10, 97.30-99.10, 98.20-100, 97.30-99.10, 95.50-99.10 และ 97.30-99.10 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 171 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ Yanaka, Ueno,



Adachi, 2544/Han95 และ A75/17 ร้อยละ 92.79 เท่ากัน และเหมือนกับ Hamamatsu ร้อยละ 93.69 และตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 442 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ Yanaka, Ueno, Adachi, 2544/Han95 และ A75/17 ร้อยละ 90.99 และเหมือนกับ Hamamatsu ร้อยละ 91.89 (รูปที่ 4.4)

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบร้อยละความเหมือน (% Homology) ของลำดับกรดอะมิโนใน ส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย และไวรัสวักซีน (Onderstepoort strain)

	171	442	207	577	230	034	418	621	400	468	438	443	466	CDV-OND
<b>171</b>	<b>100</b>													
<b>442</b>	100	<b>100</b>												
<b>207</b>	93.69	91.89	<b>100</b>											
<b>577</b>	93.69	91.89	100	<b>100</b>										
<b>230</b>	93.69	91.89	100	100	<b>100</b>									
<b>034</b>	93.69	91.89	100	100	100	<b>100</b>								
<b>418</b>	92.79	90.99	100	100	100	100	<b>100</b>							
<b>621</b>	93.69	91.89	100	100	100	100	100	<b>100</b>						
<b>400</b>	93.69	91.89	99.10	99.10	99.10	99.10	99.10	99.10	<b>100</b>					
<b>468</b>	93.69	91.89	100	100	100	100	100	100	99.10	<b>100</b>				
<b>438</b>	94.60	94.60	99.10	99.10	99.10	99.10	99.10	99.10	98.20	99.10	<b>100</b>			
<b>443</b>	91.89	90.10	98.20	98.20	98.20	98.20	98.20	98.20	97.30	98.20	100	<b>100</b>		
<b>466</b>	94.60	94.60	98.20	98.20	98.20	98.20	98.20	98.20	97.30	98.20	98.20	96.40	<b>100</b>	
<b>CDV-OND</b>	99.10	97.30	92.79	92.79	92.79	92.79	92.79	92.79	91.89	92.79	93.69	90.99	92.79	<b>100</b>

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CDV-OND	KQSQITFLHSESEVANQQPPTINKRSENQGGDKYPIHFSDERLPGYTPDVNSSEWSES	: 473
171	.....	: 473
442	.....T.....L.....	: 473
230	.....T.....N..F.....	: 473
577	.....T.....N..F.....	: 473
207	.....T.....N..F.....	: 473
034	.....T.....N..F.....	: 473
418	.....T.....N..F.....	: 473
621	.....T.....N..F.....	: 473
400	.....T.....N..FS.....	: 473
468	.....T.....N..F.....	: 473
438	.....T.....N..F.....	: 473
466	.....T.....Q.....N.....	: 473
443	.....T.....P.....N..F.....	: 473
Yanaka	.....T..L.....N..F.....	: 473
Ueno	.....T..L.....N..F.....	: 473
Hamamatsu	.....T.....N..F.....	: 473
Adachi	.....T..L.....N..F.....	: 473
2544/Han95	.....T...A.....F.....G.....	: 473
A75/17	.....T..L.....N..F.....	: 473

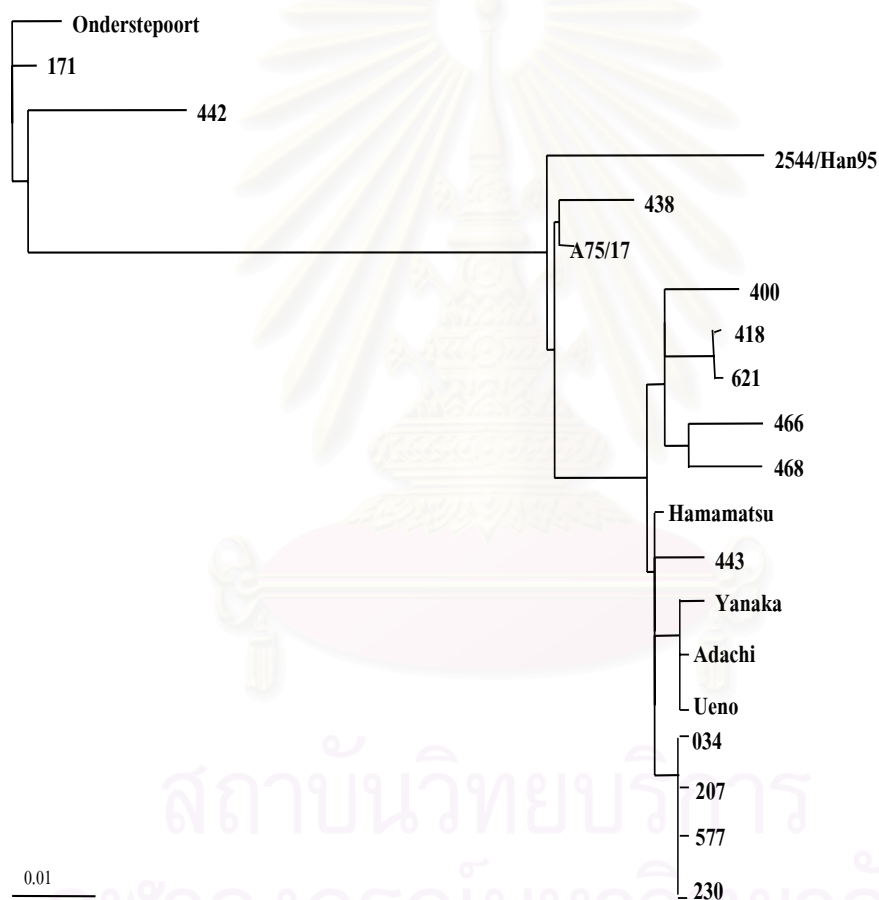
CDV-OND	YDTQIIQDDGNDDRRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEDNSPVYSDKELLN	: 523
171	.....N.....	: 523
442	.....N.....	: 523
230	.....T.....ES...N.R....	: 523
577	.....T.....ES...N.R....	: 523
207	.....T.....ES...N.R....	: 523
034	.....T.....ES...N.R....	: 523
418	.....T.....ES...N.R....	: 523
621	.....T.....ES...N.R....	: 523
400	.....T.....ES...N.R....	: 523
468	.....T.....ES...N.R....	: 523
438	.....T.....ES...N.R....	: 523
466	.....T.....ES...N.R....	: 523
443	.....T...R.....ES...N.R....	: 523
Yanaka	.....T.....ER...N.R....	: 523
Ueno	.....T.....ES...N.R....	: 523
Hamamatsu	.....T.....ES...N.R....	: 523
Adachi	.....T.....ES...N.R....	: 523
2544/Han95	.....T.....ES...N.R....	: 523
A75/17	.....T.....ES...N.R....	: 523

**รูปที่ 4.4** แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene จากตำแหน่งที่ 413 ถึง 523 ระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย ไวรัสวัคซึน (Onderstepoort strain) และสเตรนอื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (Yanaka , Ueno , Hamamatsu และ Adachi , 2544/Han95 และ A75/17)

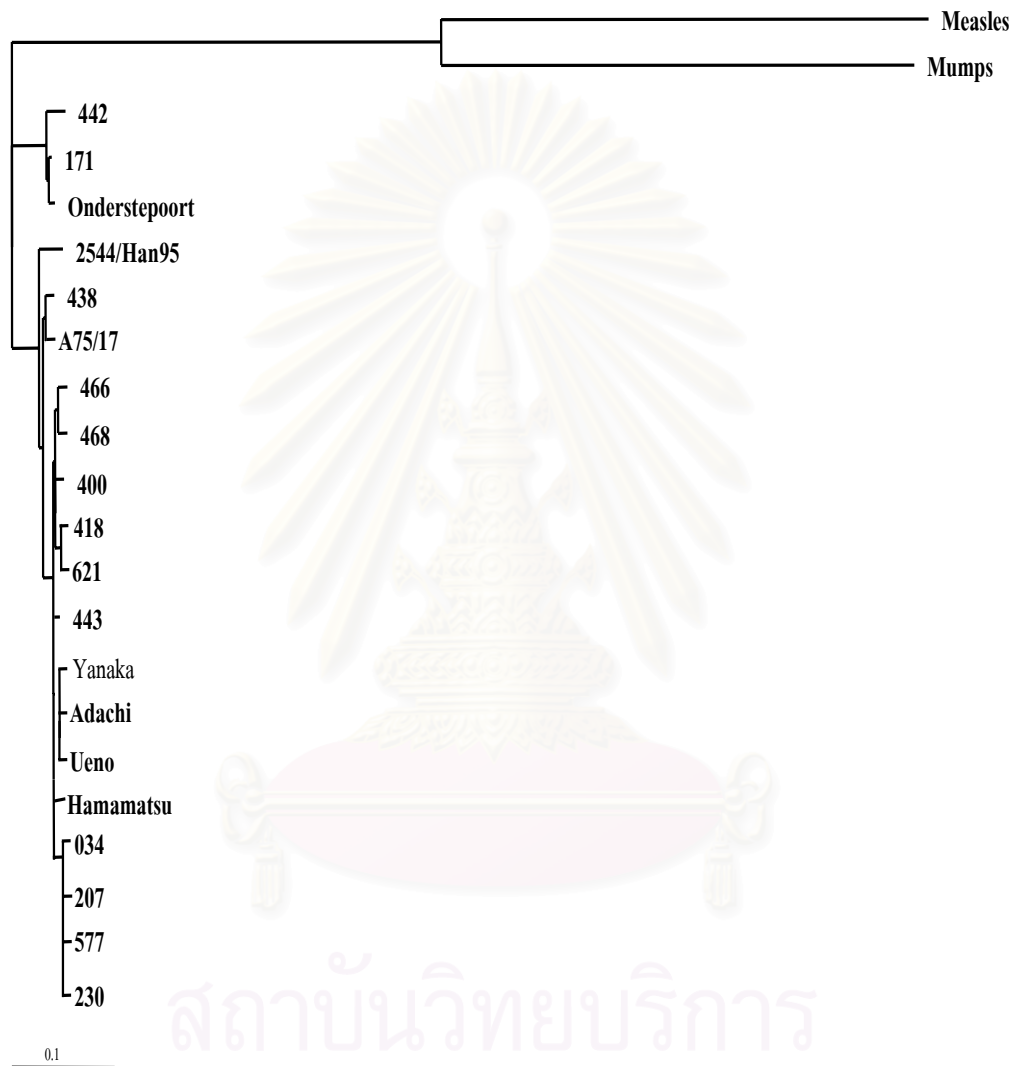
#### การศึกษา Phylogenetic relationship

จากผลการศึกษา phylogenetic relationship ในส่วนของ C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัขระหว่างเชื้อไวรัสที่แยกได้จากจีนเมื่อสมองสุนัขในประเทศไทย ไวรัสวัคซึน (Onderstepoort strain) และสเตรนอื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (Yanaka, Ueno, Hamamatsu

Adachi , 2544/Han95 และ A75/17) และเชื้อไวรัสนอกกลุ่ม (Measles virus และ Mumps virus) พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์ออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับไวรัสวัคซีน (ตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 442 และ 171) และกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับและสเตรนอื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (ตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 207, 577, 230, 034, 418, 621, 400, 468, 438, 443 และ 466) ซึ่งมีความแตกต่างจากเชื้อไวรัสนอกกลุ่มอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.5 และ 4.6)



รูปที่ 4.5 แสดง Phylogenetic relationship ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัขระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย ไวรัสวัคซีน (Onderstepoort strain) สเตรนอื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (Yanaka, Ueno, Hamamatsu Adachi , 2544/Han95 และ A75/17)



รูปที่ 4.6 แสดง Phylogenetic analysis ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัขระหว่างตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย ไวรัสวัคซิม (Onderstepoort strain) ไวรัสไข้หัดสุนัขสายพันธุ์อื่นๆ ที่รายงานใน GeneBank database (Yanaka, Ueno, Hamamatsu, Adachi, 2544/Han95 และ A75/17) และไวรัสนอกกลุ่ม (Measles virus และ Mumps virus) โดย Clustal X program

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

ในการศึกษารุ่นนี้ ได้พัฒนา nucleotide primers ขึ้นจาก nucleocapsid protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัข เพื่อใช้ในเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ในการเพิ่มจำนวน RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขในตัวอย่างเนื้อเยื่อสุนัข ปัจจุบันมีการนำเทคนิค RT-PCR มาวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขกันอย่างแพร่หลายมากขึ้นเนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง ดังเช่นการศึกษาของ Haas และคณะ (1991) ได้นำวิธีดังกล่าวมาตรวจวินิจฉัย Phocine distemper virus จาก phosphoprotein ในเนื้อเยื่อเมาน้ำที่ได้รับการติดเชื้อ Shin และคณะ (1995) ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจาก nucleocapsid protein gene จากตัวอย่างเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ และลิมโฟไซต์ ที่พบในกระแสเลือดในสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไข้หัดสุนัข Tiwananthakorn และคณะ (2000) ทำการศึกษาเพื่อทดสอบการใช้เทคนิค RT-PCR เป็นวิธีการวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขในส่วน nucleocapsid protein gene โดยใช้ตัวอย่างจากชิ้นเนื้อสดจากสัตว์ป่วย และตาย Tiwananthakorn และคณะ (2002) ศึกษาความเป็นไปได้ของการนำวิธี RT-PCR มาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยตรวจหาเชื้อไข้หัดสุนัขจากตัวอย่างเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์ของสุนัขป่วยที่ยังมีชีวิตซึ่งสงสัยว่าเป็นโรคไข้หัดสุนัข Wakasa และคณะ (2000) ทำการนำวิธี RT-PCR มาทำการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในส่วน phosphoprotein จากตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศญี่ปุ่นก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ Frölich และคณะ (2000) ได้นำวิธีดังกล่าวมาตรวจหาการแพร่ระบาดของไวรัสไข้หัดสุนัขในสัตว์กินเนื้ออื่นๆ ในประเทศเยอรมัน และ Hashimoto และคณะ (2001) นำวิธีดังกล่าวมาใช้ในการตรวจ และเพิ่มจำนวนไวรัสไข้หัดสุนัขในส่วน Hemagglutinin gene ก่อนนำไปศึกษาเพื่อจัดลำดับยีนในไทย นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาเพิ่มความไวของวิธี RT-PCR โดยการนำวิธี one step RT-PCR มาใช้ร่วมกับ nested PCR ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจมากขึ้น

สำหรับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ nucleocapsid protein gene ในส่วน C-terminal โดยที่ nucleocapsid protein gene เป็นส่วนของโปรตีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับ RNA ของไวรัส มีผลต่อการประกอบตัวของเชื้อไวรัส และยังคงควบคุมหน้าที่บางอย่างที่เกี่ยวข้องกับ viral transcription และ viral replication (Stettler and Zurbriggen, 1995) ส่วนของยีนดังกล่าวใช้ในการศึกษากันมากในการเปรียบเทียบกลุ่ม morbilliviruses ต่างๆ และในไวรัสแต่ละชนิด โดยพบว่าเป็นบริเวณที่มีความหลากหลาย

สูง (Blixenkron-Möller et al., 1994 ; Stettler and Zurbriggen, 1995 ; Yoshida et al., 1998 ; Haas, 1997 ; Rima et al., 1995) จากการศึกษ Measles virus พบว่าสามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณดังกล่าวในการแบ่งไวรัสได้เป็น 7 ยีนโอไทป์ โดยสมมติฐานได้ว่าความหลากหลายในไวรัสกลุ่ม morbilliviruses นี้ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนในส่วนดังกล่าวและอาจมีผลในการทำหน้าที่ และทำให้โครงสร้างของ nucleocapsid protein ที่เปลี่ยนแปลงไป (Rima et al., 1995)

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อนำลำดับของนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนในส่วนของยีนดังกล่าวจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้จากตัวอย่างสมองสุนัขในประเทศไทย (13 ตัวอย่าง) มาเปรียบเทียบกับไวรัสวัคซิ่น (Onderstepoort strain) และสเตรนอื่นๆที่รายงานใน GenBank database (Yanaka , Ueno , Adachi , Hamamatsu และ 2544/Han95) และสเตรนอ้างอิง (A75/17) พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีร้อยละความเหมือนใกล้เคียงกับไวรัสวัคซิ่น (Onderstepoort strain) จำนวน 2 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 171 และ 442) และกลุ่มที่มีร้อยละความเหมือนใกล้เคียงกับสเตรนรุนแรงอื่นๆที่รายงานใน GenBank database (Yanaka, Ueno, Adachi, Hamamatsu และ 2544/Han95) และสเตรนอ้างอิงชนิดรุนแรง (A75/17) จำนวน 11 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 207, 577, 230, 034, 418, 621, 400, 468, 438, 443 และ 466)

สำหรับกลุ่มที่มีร้อยละความเหมือนใกล้เคียงกับวัคซิ่นสเตรน (Onderstepoort strain) เมื่อ ศึกษาจากประวัติและอาการ พบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 171 อายุ 3 เดือน และมีประวัติเพิ่งได้รับการฉีดวัคซิ่นไม่เกิน 1 เดือน ก่อให้เกิดคำถามหรือข้อสันนิษฐานว่าไวรัสในวัคซิ่นเป็นตัวก่อให้เกิดโรคไข้หัดสุนัข หรือที่สอดคล้องกับรายงาน Post-vaccinal Canine Distemper Encephalitis (Bestetti et al., 1978 ; Krakowka et al., 1982 ; Cornwell et al., 1988 ) ซึ่งมักจะพบในลูกสุนัขโดยเฉพาะลูกสุนัขที่มีอายุต่ำกว่า 6 เดือน และได้รับการฉีดวัคซิ่นป้องกันโรคชนิดเชื้อเป็น โดยอาจเกิดขึ้นได้จากขั้นตอนการผลิตวัคซิ่นที่มีการทำให้เชื้อไวรัสอ่อนแรงลงไม่เพียงพอเป็นผลให้มีการติดเชื้อที่ระบบประสาทส่วนกลาง การฉีดวัคซิ่นมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ (latent infection) การเกิดจากโรคจากส่วนประกอบอื่นๆในวัคซิ่น หรือสัตว์มีความไวต่อเชื้อไวรัสสูง เช่นในสัตว์ที่มีภาวะกดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppression) โดยจะมีการแสดงอาการทางคลินิกภายใน 1 ถึง 2 อาทิตย์หลังจากได้รับวัคซิ่น (Braund, 2003) นอกจากนี้พบการรายงานถึงการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ Measles virus ที่แยกได้ในประเทศแอฟริกาใต้ เปรียบเทียบกับวัคซิ่นสเตรน (Edmonston wild-type strain) ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene พบว่ามี 3 ตัวอย่างที่มีความเหมือนของกรดอะมิโนสูงเมื่อเทียบกับวัคซิ่น



สเตรน (Edmonston wild-type strain) ซึ่งกล่าวได้ว่าผู้ป่วยได้รับการติดเชื้อจากไวรัสวัคซิม (Kreis et al., 1997) สำหรับตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 442 อายุ 2 เดือน และไม่มีประวัติการได้รับการฉีดวัคซีน แต่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนใกล้เคียงกับวัคซิมสเตรน อาจเป็นไปได้ว่าสุนัขดังกล่าวมีการสัมผัสกับไวรัสวัคซิมในขณะที่มีภาวะภูมิคุ้มกัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานถึงการติดต่อของไวรัสไข้หัดสุนัขจากการสัมผัสกับสัตว์ที่ได้รับวัคซีน โดยพบว่ามี การติดต่อของโรคไข้หัดสุนัขในลูกสุนัขที่ยังกินนมแม่ที่เพิ่งได้รับการกระตุ้นวัคซิมรวม 5 โรค โดยลูกสุนัขแสดงอาการทางระบบประสาท ใน 18 วัน หลังจากที่แม่สุนัขได้รับการกระตุ้นวัคซิม เมื่อทำการชันสูตรซากพบว่ามียอยโรคที่สมอง และการตรวจทางซีรัมวิทยาพบว่าลูกสุนัขได้รับเชื้อไวรัสจากวัคซิมมากกว่าเชื้อจากธรรมชาติ (Braund, 2003) และแม้ว่าสุนัขทั้งสองตัวไม่ได้มีอาการแสดงอาการ และผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา และอิมมูโนฮิสโตเคมีให้ผลลบต่อการตรวจที่ระบบประสาท แต่พบว่าสามารถตรวจพบและเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในส่วน ของ C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ได้โดยวิธี nested RT-PCR ในชิ้นเนื้อจากสมองได้

สำหรับกลุ่มที่มีร้อยละความเหมือนใกล้เคียงกับสเตรนรุนแรงอื่นๆที่รายงานใน GenBank database (Yanaka , Ueno , Adachi , Hamamatsu และ 2544/Han95) และสเตรนอ้างอิงชนิดรุนแรง (A75/17) ได้แก่ตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 207 577 230 034 418 621 400 468 438 443 และ 466 ซึ่งน่าจะกล่าวได้ว่าสุนัขทั้งหมดมีการติดเชื้อไวรัสที่มีการแพร่ระบาดในธรรมชาติ โดยเมื่อพิจารณาจาก ประวัติการฉีดวัคซีน พบว่ามีสุนัขจำนวน 3 ตัวที่ได้รับการฉีดวัคซีน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่เชื้อไวรัสที่สุนัขได้รับจากธรรมชาติมีลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนในส่วนของ C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ซึ่งเป็นส่วนที่มีความหลากหลายสูงที่แตกต่างไปจากวัคซิมสเตรน (Onderstepoort strain) ทำให้มีผลกระตุ้นต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่อาจแตกต่างกัน ซึ่งมีการรายงานว่าใน Influenza viruses ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงแม้เพียงเล็กน้อยในบริเวณที่มีความหลากหลาย (variable domain) จะพบว่ามีผลในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันของสัตว์ที่ติดเชื้อ Morbillivirus อาจมีลักษณะแตกต่างเช่นกัน (Rima et al., 1995) การติดเชื้อจากไวรัสที่มีความแตกต่างจากวัคซิม (variant viruses) แม้ว่าจะสามารถพบ anti-N antibodies สูง แต่พบว่าการทำงานของระบบ humoral immunity ก็ไม่ใช่ทางระบบที่ดีที่สุดในการกำจัดเชื้อไวรัส โดยพบว่าความหลากหลายของตัวเชื้อไวรัสจะมีผลต่อกลไกกระตุ้นภูมิคุ้มกันผ่าน T cell และไวรัสที่มีความหลากหลายนี้จะไปมีผลต่อ immunodominant epitopes บน T cell cytotoxicity mediated effect ทำให้ร่างกายไม่สามารถกำจัดเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสได้ออกไปได้ (Allen and Zinkernagel, 1994) และนอกจากนี้อาจเกิดจากการที่สุนัขได้รับเชื้อไวรัสมาก่อนที่จะฉีดวัคซีนทำให้การทำงานของวัคซีนล้มเหลว (Kai et al., 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการ

รายงานการแพร่ระบาดของ Measles virus ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ในกลุ่มประชากรที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคเป็นจำนวน 50% ของประชากรที่เป็นโรค ในปีค.ศ. 1989-1990 จึงมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนในส่วนของ glycoprotein genes จากเชื้อไวรัสที่แยกได้จากธรรมชาติ (wild-type measles virus) เปรียบเทียบกับวัคซีนสเตอร์น (Moraten strain) พบว่ามีความหลากหลายเกิดขึ้นในส่วนของ hemagglutinin gene สูงกว่าในส่วนของการ fusion gene (Rota et al., 1992) และจากผลการศึกษายังพบว่ามีสุนัขที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนจำนวน 1 ตัว และไม่ทราบประวัติวัคซีนที่แน่นอนจำนวน 7 ตัว ซึ่งนำไปได้ว่าสุนัขดังกล่าวติดเชื้อไวรัสจากธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yoshida และคณะในปีค.ศ. 1998 โดยทำการวิเคราะห์ส่วน nucleocapsid protein ที่แยกได้จากไวรัสไข้หัดสุนัขในประเทศญี่ปุ่น พบว่าสเตอร์นที่แยกได้จากธรรมชาติ (Yanaka) จะมีร้อยละความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างสเตอร์นอ้างอิงชนิดรุนแรง (A75/17) สูงกว่าวัคซีนสเตอร์น (Onderstepoort strain)

จากการจัดกลุ่มเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้จากตัวอย่างสมองสุนัขในประเทศไทย ที่ขึ้นกับลำดับของนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนในส่วนของ C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับความแตกต่างของกลุ่มอาการที่แสดงออก เนื่องจากในกลุ่มที่มีร้อยละความเหมือนใกล้เคียงกับวัคซีนสเตอร์น (ตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 171 และ 442) พบว่าสุนัขทั้งสองตัวแสดงอาการที่ระบบทางเดินหายใจร่วมกับระบบทางเดินอาหาร และกลุ่มที่มีร้อยละความเหมือนใกล้เคียงกับสเตอร์นอื่นๆที่รายงานใน GenBank database (ตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 207 577 230 034 418 621 400 468 438 443 และ 466) พบว่าสุนัขแสดงอาการที่ระบบประสาทร่วมกับระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร 4 ตัว ระบบทางเดินหายใจร่วมกับระบบทางเดินอาหาร 4 ตัว ระบบประสาทร่วมกับระบบทางเดินอาหาร 1 ตัว ระบบประสาทร่วมกับระบบทางเดินหายใจ 1 ตัว และระบบทางเดินหายใจ 1 ตัว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yoshida และคณะในปีค.ศ. 1998 ที่พบว่ากลุ่มของไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้ในประเทศญี่ปุ่น ไม่มีความสัมพันธ์กับระหว่างลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่แยกได้กับความแตกต่างทางกลุ่มอาการที่แสดงออกเช่นกัน หลังจากได้รับการติดเชื้อไวรัสการที่สัตว์จะแสดงอาการของระบบต่างๆ ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างทั้งจากตัวสัตว์และไวรัสสาเหตุ เช่น ชนิดของเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมายในระบบต่างๆ จากการศึกษาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข พบว่ามีเซลล์เยื่อ ภูมิโพไซท์ และโมโนไซท์หรือแมคโครฟาจ เป็นเซลล์เป้าหมายในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส โดยพบว่าเชื้อไวรัสจะเข้าไปเพิ่มจำนวนในภูมิโพไซท์ และแมคโครฟาจก่อน จากนั้นเซลล์ดังกล่าวจะเป็นตัวพาเชื้อไวรัสเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายต่างๆ ทางหลอดเลือด และท่อน้ำเหลือง และถ้าร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสออกไปได้ เชื้อไวรัสจะแพร่เข้าสู่เยื่อของระบบต่างๆ เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ ระบบขับ

ถ่ายปัสสาวะ และ/หรือระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งจากเหตุการณ์ดังกล่าวจะทำให้สัตว์แสดงอาการทางคลินิกตามมาหลังเกิดการติดเชื้อเฉพาะที่ได้ (Appel and Summers, 1999) ส่วนประกอบของตัวเชื้อไวรัสหรือผลผลิตของยีนของเชื้อไวรัสมีผลโดยตรงต่อเซลล์ที่ได้รับการติดเชื้อ เช่น hemagglutinin ซึ่งไวรัสใช้จับกับตัวรับบนผิวเซลล์ เป็นส่วนแรกที่เชื้อไวรัสใช้ในการสัมผัสกับเซลล์ เป็นส่วนที่มีการแสดงออกบนผิวเซลล์ที่มีการติดเชื้อ และเป็นเป้าหมายของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่าส่วนนี้เป็นส่วนที่มีความหลากหลายสูง อาจเป็นผลทำให้เชื้อไวรัสสามารถรอดพ้นจากการกำจัดของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และสามารถเข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลล์ได้ สำหรับส่วน nucleocapsid protein เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับ viral transcription และ viral replication และมีผลต่อการประกอบตัวของเชื้อไวรัส ซึ่งมีผลต่อหน้าที่ของเซลล์ปกติ ส่วน phosphoprotein และ polymerase protein เป็นส่วนของ viral nucleocapsid และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ RNA ของไวรัส โดยทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ polymerase เป็นต้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการสร้างต่างๆ อาจมีผลต่อโปรตีนนั้นๆ ทั้งโครงสร้างและหน้าที่ เป็นผลให้มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสในร่างกายสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อ และการแสดงออกของโรคได้ โดยลักษณะกลไกการก่อโรคของไวรัส ไม่ได้มีผลมาจากยีนใดยีนหนึ่ง หรือองค์ประกอบใดองค์ประกอบหนึ่งของไวรัส ทำให้ความรุนแรงของไวรัสขึ้นกับหลายๆยีนประกอบกัน นอกจากนี้ตัวสัตว์ที่ได้รับเชื้อไวรัสเอง อาจเป็นผลให้เกิดการแสดงของโรคได้ เช่นสัตว์ที่มีความไวต่อเชื้อไวรัสสูง เช่นในรายที่มีภาวะภูมิคุ้มกัน (Appel, 1987) และนอกจากการแสดงอาการหรือรอยโรคจะเป็นผลจากการเพิ่มจำนวนของไวรัสแล้ว ยังอาจเป็นผลมาจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ ที่อาจเป็นสาเหตุให้เกิดรอยโรคการอักเสบของระบบต่างๆ ทำให้สัตว์แสดงอาการที่ระบบนั้นๆ ออกมาได้ เช่น การตอบสนองของ nonspecific immunity การผลิต IFN การทำงานของ NK cells และ macrophage ซึ่งการทำงานของแมคโครฟาจ อาจทำให้เกิดการอักเสบมากขึ้น จากการหลั่ง Inflammatory cytokines หรือ mediator เช่น Interleukin I , Phostaglandin E (Vandeveldel et al., 1995) เป็นผลทำให้เกิดรอยโรคการอักเสบที่รุนแรงขึ้น และแสดงอาการตามมาได้ เช่น การหลั่ง cytotoxic enzymes จากแมคโครฟาจ หรือ astroglial cells ที่ติดเชื้อไวรัสให้หัดสุนัขในระบบประสาทส่วนกลาง เป็นผลทำให้เกิด demyelination สำหรับการตอบสนองของ humoral immunity และ cellular immunity พบว่าการทำงานของแอนติบอดีจะสามารถป้องกันการติดเชื้อจากไวรัสทำให้สัตว์หายป่วย และอาจเป็นผลทำให้เกิด persistent infection ได้ โดยที่ระบบภูมิคุ้มกันจะไม่สามารถควบคุมและทำลายการติดเชื้อไวรัสได้ ถ้ามีไวรัสแอนติเจนปรากฏบนผิวเซลล์ในจำนวนน้อย โดยเฉพาะ hemagglutinin และ fusion protein ของเซลล์ประสาทที่มีการติดเชื้อ และเชื้อไวรัสไม่มีการขับตัวออกมาโดยการ budding ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงการเพิ่มจำนวนของไวรัสนอกเหนือไปจากนี้ จะพบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจะกลายเป็นเหนียวนำไปเกิดการทำลายเนื้อเยื่อสมองได้

สำหรับการตรวจยืนยันผลด้วยวิธี Immunohistochemistry พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข และกลุ่มที่ให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากชิ้นเนื้อที่ระบบประสาท และ/หรือระบบทางเดินหายใจ โดยพบว่าตัวอย่างจากชิ้นเนื้อทั้งสองระบบสามารถตรวจพบ และเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้โดยวิธี nested RT-PCR ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tiwananthakorn และคณะ (2000) สำหรับวิธี nested RT-PCR ได้มีการรายงานว่า เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความรวดเร็ว ในการตรวจสูง (Shin et al., 1995 ; Frisk et al., 1999 ; Tiwananthakorn et al., 2000 ; Kim et al., 2001) อย่างไรก็ตามความไวของการตรวจตัวอย่างด้วยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับทางเลือก primers ในตำแหน่งต่างๆของ ยีน (Frisk et al., 1999) สำหรับการที่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขด้วยตรวจวิธี Immunohistochemistry เนื่องจากวิธีดังกล่าวอาจให้ผลลบลงได้ โดยเฉพาะในรายที่เป็นโรคแบบกึ่งเฉียบพลันหรือแบบเรื้อรัง (Appel, 1987 ; Shin et al., 1995) เมื่อเปรียบเทียบผลของการตรวจยืนยันผลด้วยวิธี Immunohistochemistry กับผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน พบว่าในกลุ่มที่ให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข จากชิ้นเนื้อที่ระบบประสาทส่วนกลาง และระบบทางเดินหายใจ (ตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 400 466 577 443 418 034 และ 468) จากผลดังกล่าว สอดคล้องกับกลไกการกระจายตัวของไวรัสไข้หัดสุนัข ที่เป็นสเตรนที่ก่อโรครุนแรง (virulent strain) โดยเมื่อเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางจะพบเชื้อไวรัสในลิมโฟซัยท์ ในช่องว่างรอบหลอดเลือด (perivascular spaces) ของระบบประสาทส่วนกลาง 10 วันหลังการติดเชื้อ และยังสามารถพบว่าไวรัสสามารถเข้าสู่สมอง โดยผ่านทางน้ำไขสันหลังจากการนำของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับการติดเชื้อ จากนั้นจึงเกิดรอยโรคที่สมองตามมาได้ (Vandeveldt et al., 1995) สำหรับกลุ่มที่ให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข สามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มที่ให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติเจนทั้งระบบประสาทส่วนกลาง และระบบทางเดินหายใจ (ตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 207 และ 171) กลุ่มที่ให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติเจนทั้งระบบประสาทส่วนกลางเพียงอย่างเดียว (ตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 438 และ 621) โดยพบว่ามีตัวอย่างที่แยกได้จากสมองสุนัขเบอร์ 207 438 และ 621 ซึ่งจัดว่าอยู่ในกลุ่มที่มีร้อยละความเหมือนใกล้เคียงกับสเตรนรุนแรงอื่นๆที่รายงานใน GenBank database และสเตรนอ้างอิงชนิดรุนแรง ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของไวรัสในส่วนต่างๆบนผิวเซลล์ของระบบประสาทที่จำกัด การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคทั่วไป พบว่าเมื่อมีการเคลื่อนตัวเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง แล้วจะใช้เวลานานกว่าที่จะมีการปรากฏรอยโรคบนสมอง นอกจากนี้ยังพบการจำกัดของการแสดงออกของแอนติเจนบางชนิด เช่น hemagglutinin และ fusion protein บนผิวเซลล์ในระบบประสาท (Vandeveldt et al., 1995) และการแสดงอาการทางระบบประสาท อาจพบ



ได้ในระยะท้ายของอาการที่ปรากฏ แต่ทำการเก็บตัวอย่างก่อนการแสดงอาการชัดเจน ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ด้วยวิธี Immunohistchemistry หรืออาจเกิดได้จากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่นในกรณีที่แอนติบอดีเข้าจับกับแอนติเจน ทำให้เกิดการบดบังตัวแอนติเจนทำให้การตรวจด้วยวิธีนี้ไม่ได้ผล

จากการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาแรกที่รายงานลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในส่วนของ C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้ในประเทศไทย จากผลการศึกษาพบว่าลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ได้แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีร้อยละความใกล้เคียงกับวัคซีนสเตอร์น (Onderstepoort strain) สูง และกลุ่มที่มีร้อยละความใกล้เคียงกับวัคซีนสเตอร์น (Onderstepoort strain) ต่ำ โดยในกลุ่มที่มีร้อยละความใกล้เคียงกับวัคซีนสเตอร์นต่ำ จะมีร้อยละความใกล้เคียงกับลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่แยกได้ และมีการรายงานในส่วนอื่นๆของโลก (ประเทศญี่ปุ่น และประเทศเยอรมัน) และไวรัสอ้างอิงชนิดรุนแรง นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในทั้ง 2 กลุ่ม ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับประวัติวัคซีน อาการที่แสดงออกทางระบบต่างๆ และการปรากฏของแอนติเจน

#### ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาให้ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene ของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้จากเนื้อเยื่อสมองของสุนัขในประเทศไทยเท่านั้น สำหรับการศึกษานี้ต่อไปควรมีการศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนในส่วนอื่นๆ เพื่อจะได้ทราบถึงลักษณะของเชื้อไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกใช้ reverse primer ในส่วนของ outer primer มาเป็นตัวเริ่มต้นในการเปลี่ยน RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขมาเป็น cDNA ซึ่งผลจากการใช้ primer ดังกล่าวจะให้ผลที่จำกัดต่อส่วนของ nucleocapsid protein gene เท่านั้น ดังนั้นเพื่อประโยชน์ในการเก็บ cDNA ให้ได้ครอบคลุมในส่วนต่างๆ ของตัวเชื้อไวรัสดังกล่าวทั้งหมด ควรเลือกใช้ random hexamers primer ซึ่งเป็น primer ที่สามารถเข้าไปจับกับหลายๆ ตำแหน่งบน genomic RNA ของเชื้อไวรัส และเมื่อต้องการที่จะศึกษายีนในส่วนใดของไวรัส จึงค่อยเลือก gene-specific primer เพื่อเพิ่มจำนวนยีนในส่วนที่ต้องการต่อไปได้

สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอนการทำ PCR นี้เป็น Taq polymerase ซึ่งมีรายงานถึงความผิดพลาดที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากการที่ไม่มี proof reading เช่น  $2.0 \times 10^{-5}$  errors/bp (Lundberg et al., 1991) หรือ  $1.1 \times 10^{-4}$  errors/bp (Barnes, 1992) เป็นต้น ซึ่งความผิดพลาดดังกล่าวจะไปมีผลต่อการอ่านลำดับของนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปอาจมีการทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เช่น เอนไซม์ Pfu จาก *Pyrococcus furiosus* ซึ่งมีรายงานความผิดพลาดที่  $1.6 \times 10^{-6}$  errors/bp (Lundberg et al., 1991), เอนไซม์ Klen Taq จาก *Thermus aquaticus* (N-terminal deletion mutant) มีรายงานความผิดพลาดที่  $5.1 \times 10^{-5}$  errors/bp (Barnes, 1992) หรือ เอนไซม์ Vent จาก *Thermococcus litoralis* เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ต่างๆ เหล่านี้จะมี 3' – 5' exonuclease (proof reading) activity โดยใช้เพื่อเป็นการยืนยันผลของการทำงานของ Taq polymerase และเพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง

และการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หัดสุนัข จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสมองโดยตรง ซึ่งตัวอย่างชิ้นเนื้อนี้อาจจะมีเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขอยู่ร่วมกันหลากหลายชนิด (quasispecies) และอาจจะมีผลต่อการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดได้ ดังนั้นในการศึกษาอาจจะมีการเพิ่มการทดลองอื่นๆ เช่น การศึกษา RNA จากไวรัสที่ผ่านการ Plaque purification เพื่อให้ได้เชื้อไวรัสที่มีเพียงชนิดเดียว สำหรับวิธีการหลังจะมีข้อจำกัดในเรื่องเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้แยกเชื้อไวรัส เนื่องจากไวรัสแต่ละตัวอาจมีข้อจำกัดในการเพิ่มจำนวนได้บนเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น ไวรัสที่เป็น non-virulent strain มักจะผ่านการทำให้อ่อนแรงลงในเซลล์เพาะเลี้ยงมาก่อนแล้ว จึงปรับตัวสามารถเติบโตได้บนเซลล์เพาะเลี้ยง สำหรับไวรัสที่เป็น virulent strain ที่แยกได้จากการติดเชื้อในธรรมชาติ อาจสามารถเติบโตได้บนเซลล์เพาะเลี้ยงได้น้อยกว่า

สำหรับการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างของเชื้อไวรัส กับประวัติและอาการที่แสดงออก ควรมีการควบคุมการออกแบบการเก็บตัวอย่างที่จำเพาะมากกว่านี้สำหรับในการศึกษาครั้งต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## รายการอ้างอิง

- Allen P.M. and Zinkernagel R.M. 1994. Promethean virus? Nature. 369:355-356.
- Appel M. 1987. Canine Distemper Virus. In: Virus infection of Carnivores. Elsevier, Amsterdam. 133-159.
- Appel M., Sheffy B.E., Percy D.H. and Gaskin J.M. 1974. Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. Am. J. Vet. Res. 35(6):803-806.
- Appel M.J.G. and Summers B.A. 1999. Canine distemper: Current status. In L.E. Carmichael (ed.), Recent Advances in Canine Infectious Disease. International Veterinary Information Service Available from : [www.ivis.org](http://www.ivis.org) (23 Nov. 1999)
- Barnes W.M. 1992. The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. Gene. 112(1):29-35.
- Bernard S.L., Shen D.T. and Gorham J.R. 1982. Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. Am.J.Vet.Res. 43(12):2266-2269.
- Bestetti G., Fatzer R. and Frankhauser R. 1978. Encephalitis following vaccination against distemper and infectious hepatitis in the dog. An optical and ultrastructural study. Acta.Neuropathol (Berl). 7;43(1-2):69-75.
- Blixenkrone-Möller M., Pedersen I.R., Appel M.J. and Griot C. 1991. Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J.Vet.Diagn.Invest. 3:3-9.
- Blixenkrone-Möller M., Bolt G., Gottschalck E. and Kenter M. 1994. Comparative analysis of the gene encoding the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirus reveals its distant evolutionary relationship to measles virus and ruminant morbilliviruses. J.Gen.Virol. 75:2829-2834
- Blixenkrone-Möller M., Svansson V., Have P., Orvell C., Appel M., Pedersen I.R. Dietz H.H. and Henriksen P. 1993. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. Vet. Microbiol. 37:163-173.

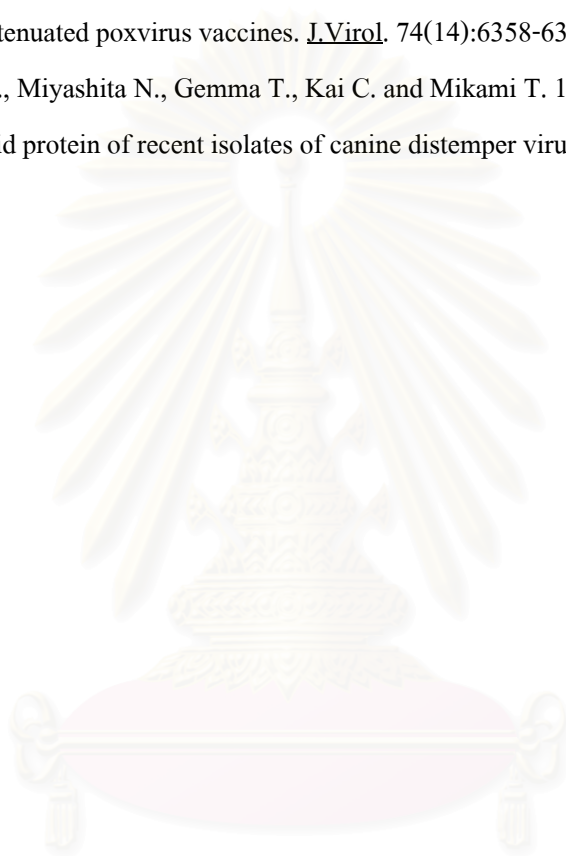
- Braund K.G. 2003. Inflammatory diseases of the central nervous system. In : Braund K.G. (ed.), Clinical Neurology in Small Animals-Localization, Diagnosis and treatment. International Veterinary Information Service, Ithaca NY. Available from : [www.ivis.org](http://www.ivis.org), 2003;B0228.0203
- Cornwell H.J., Thompson H., McCandlish I.A., Macartney L. and Nash A.S. 1988. Encephalitis in dogs associated with a batch of canine distemper (Rockborn) vaccine. Vet.Rec. 16;122(3):54-9
- Dunn J.K. 1999. Textbook of small animal medicine. W.B. Saunders company. Philadelphia. 927-929
- Frisk A.L., Konig M., Moritz A. and Baumgartner W. 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. J.Clin.Microbiol. 37(11):3634-3643.
- Frölich K, Czupalla O., Haas L., Hentschke J., DeDek J. and Fickel J. 2000. Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. Vet.Microbiol. 74:283-292.
- Gemma T., Watari T., Akiyama K., Miyashita N., Shin Y.S., Iwatsuki K., Kai C. and Mikami T. 1996. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. J. Vet. Med. Sci. 58:547-550.
- Gene A.E. 1999. How to determine if H3N2 swine influenza is in your herd. Focus on porcine respiratory disease complex. Schering-Plough Animal Health Corporation. New Jersey. 4(8).
- Greene C.E. and Appel M.J. 1998. Canine distemper. In: Greene C.E.(ed.), Infectious disease of the dog and cat (2<sup>th</sup> ed), . W.B. Saunders company. Philadelphia. 9-21.
- Haas L.1997. Molecular epidemiology of animal virus diseases. J. Vet. Med.44:257-272.
- Haas L., Subbarao S.M., Harder T., Liess B. and Barrette T. 1991. Detection of phocid distemper virus RNA in seal tissues using slot hybridization and the polymerase chain reaction amplification assay: genetic evidence that the virus is distinct from canine distemper virus. J.Gen.Virol. 72:825-832.
- Haas L., Liermann H., Hardera T.C., Barrettb T., LoEchelc M., von Messlinga V., BaumgaErtnerd W. and Greiser-Wilkea I. 1999. Analysis of the H gene, the central untranslated region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper viruses. Vet.Microbiol. 69:15-18.

- Haines D.M., Martin K.M., Chelack B.J., Sargent R.A., Outerbridge C.A. and Clark E.G. 1999. Immunohistochemical detection of canine distemper virus in haired skin, nasal mucosa and footpad epithelium: a method for antemortem diagnosis of infection. J.Vet.Diagn.Invest. 11:396-399.
- Harder T.C. and Osterhaus A.D.M.E.1997. Canine distemper virus a morbillivirus in search of new hosts ? Trends Microbiol. 5(3):120-124.
- Harder T.C., Kenter M., Appel M.J.G., Roelke-Parker M.E., Barrett T and Osterhaus A.D.M.E. 1995. Phylogenetic evidence of canine distemper virus in Serengeti's lions. Vaccine. 13(6):521-523.
- Hashimoto M., Une Y. and Mochizuki M. 2001.Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in japan. Arch.Virol. 146:149-155.
- Haydon D.T., Samuel A.R. and Knowles N.J. 2001. The generation and persistence of genetic variation in foot-and-mouth disease virus. Prev. Vet. Med. 20;51(1-2):111-124.
- Ikeda Y., Nakamura K., Miyazawa T., Chen M.C., Kuo T.F., Lin J.A. Mikami T., Kai C. and Takahashi E. 2001. Seroprevalence of canine distemper virus in cats. Clin Diag Lab Immunol. 8(3):641-644.
- Iwatsuki K., Ikeda Y., Ohashi K., Nakamura K. and Kai C. 1999. Establishment of a persistent mutant of canine distemper virus. Microbes and Infection.1:987-991.
- Iwatsuki K., Okita M., Ochikubo F., Gemma T., Shin Y.S., Miyashita N., Mikami T. and Kai C. 1995. Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. J.Comp.Path. 113:185-190.
- Iwatsuki K., Miyashita N., Yochida E., Shin Y.S., Ohashi K.,Kai C. and Mikami T.1998. The nucleotide and predicted amino acid sequence of the fusion protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. J.Vet.Med.Sci. 60(3):381-385.
- John F.T., James H.G., Fredric W.S. and Jeffrey E.B. 1988. Hagan & Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals. 8<sup>th</sup> ed. Cornell University Press. London. 792-802.
- Kai C., Ochikubo F., Okita M., Linuma T., Mikami T. and Yamanouchi K. 1993. Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. J.Vet.Med.Sci. 55:1067-1070.
- Kennedy S.,Kuiken T., Jepson P.D., Deaville R., Forsyth M., Barrett T., van de Bildt M.W., Osterhaus A.D., Eybatov T., Duck C., Kydyrmanov A., Mitrofanov I and Wilson S. 2000. Mass die-off of caspian seals caused by canine distemper virus. Emerg.Infect.Dis. 6(6):637-9.

- Kennedy S., Smyth J.A., McCullough S.J., Allan G.M. and Mcneilly F. 1988. Conformation of cause of recent seal deaths. Nature. 335:404.
- Kim Y.H., Cho K.W., Youn H.Y., Yoo H.S. and Han H.R. 2001. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. J.Vet. Med. Sci. 2(1):59-63.
- Krakowka S., Hoover E.A., Koestner A. and Ketring K. 1977. Experimental and naturally occurring transplacental transmission of canine distemper virus. Am.J.Vet.Res. 38:919-922.
- Krakowka S., Olsen R.G., Axthelm M.K., Rice J. and Winters. 1982. Canine parvovirus infection potentiates canine distemper encephalitis attributable to modified live-virus vaccine. J.Am.Vet.Med.Assoc. 15;180(2):137-9.
- Kreis S., Vardas E. and Whistler T. 1997. Sequence analysis of the nucleocapsid gene of measles virus isolations from South Africa identifies a new genotype. J.Gen.Virol. 78:1581-1587.
- Lincoln D.R., Gorham J.R., Davis C.D. and Ott R.L. 1973. Studies of old dog encephalitis. Vet pathol. 10:124-129.
- Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W., Short J.M., Sorge J.A. and Mathur E.J. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus Furiosus*. Gene. 108(1):1-6.
- Myers A.L., Zurbriggen A., Lutz H. and Pospischil A. 1997. Distemper: Not a new disease in lions and tigers. Clin.Diagn.Lab.Immunol. 4(2):180-184.
- Murphy F.A., Paul E., Gibbs J., Horzinek M.C. and Studdert M.J. 1999. Veterinary Virology. 3<sup>rd</sup>. Academic Press. California. 411-428.
- Noon K.F., Rogyl M., Binn L.N., Keefe T.J., Marchwicki R.H. and Appel M.J. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for for evaluation of antibody to canine distemper virus. Am.J.Vet.Res. 41(4):605-609.
- Ohashi K., Iwatsuki K., Nakamura K., Mikami T. and Kai C.1998. Molecular identification of a recent type of canine distemper virus in Japan by restriction fragment length Polymorphism. J.Vet. Med. Sci. 60(11):1209-1212.
- Poston R.P. and England J.J. 1992. Canine distemper. In : Castro A.E. and Heuschele W.P.(eds), Veterinary Diagnostic Virology- A pratitioners guide. St Louise, Mosby Year Book, 135-138.
- Rima B.K., Wishaupt R.G.A., Welsh M.J. and Earle J.A.F. 1995. The evolution of morbilliviruses: a comparison of nucleocapsid gene sequences including a porpoise morbillivirus. Vet Microbiol. 44:127-134.

- Rota J.S., Hummer K.R., Rota P.A. and Bellini W.J. 1992. Genetic variability of sequences of the H, F and N coding gene of measles virus vaccine strains. Virus Research. 31:317-330.
- Rungsipipat A., Sailasuta A., Techangamsuwan S., Uchida K., Yamaguchi R. and Tateyama S. 2000. Immunohistochemical examinations of central nervous system lesions related to canine distemper virus infection. J.Thai Vet.Med.Assoc. 51(3):49-55.
- Rzezutka A. and Mizak B. 2002. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. Vet.Microbiol. 2;88(1):95-103.
- Schodesberger M., Zurbriggen A., Doherr M.G., Weissenbock H., Vandeveldel M., Lassmann H. and Griot C. 2002. Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis. Acta Neuropathol. 103:11-19.
- Shin Y.S., Mori T., Okita M., Gemma T., Kai C. and Mikami T. 1995. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. J.Vet.Med.Sci. 57:439-445.
- Sidhu M.S., Husar W., Cook S.D., Dowling P.C. and Udem S.A. 1993. Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. Virology. 193:66-72.
- Stettler M. and Zurbriggen A. 1995. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. Vet.Microbiol. 44:211-217.
- Tiwananthakorn W., Junsuwanaruk S., Rungsipipat A., Sailasuta A., Techangamsuwan S., Siripornprasert S., Tateyama S., Yamaguchi R and Uchida K. 2000. The diagnosis of canine distemper disease using RT-PCR. Thai J.Vet.Med. 30(4)26-39.
- Tiwananthakorn W., Junsuwanaruk S., Sailasuta A., Rungsipipat A., Techangamsuwan S., Siripornprasert S., Tateyama S., Yamaguchi R and Uchida K. 2002. The application of a RT-PCR technique for the diagnosis of canine distemper using peripheral blood mononuclear cells. Thai J.Vet.Med. 32(3):72-81.
- Vandeveldel M. and Zurbriggen A. 1995. The neurobiology of canine distemper virus infection. Vet.Microbiol. 44:271-280.
- Villegas P. 1998. Viral disease of the respiratory system. Poult. Sci. 77(8):1143-1145

- Wakasa C., Iwatsuki K., Ohashi K., Nakamura K. and Kai C. 2000. Sequence analysis of the genes encoding the phosphoprotein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. J.Vet. Med. Sci. 62(1):97-101.
- Welter J., Taylor J., Tartaglia J., Paoletti E. and Stephensen C. 2000. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. J.Virol. 74(14):6358-6367.
- Yoshida E., Iwatsuki K., Miyashita N., Gemma T., Kai C. and Mikami T. 1998. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. Vet.Microbiol. 59:237-244.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก

### การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15	กรัม

เติม sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

### การเตรียม 10x Tris-borate EDTA buffer (TBE)

Tris base	10.8	กรัม
Boric acid	5.5	กรัม
Na <sub>2</sub> EDTA	9.3	กรัม

เติม sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

### การเตรียม 1x TBE

นำ 10X TBE 100 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

### การเตรียม 2% Agarose gel

ชั่ง Agarose 2 กรัม ละลายใน 1X TB ให้มีปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารเคมีและแหล่งที่มา

สารเคมี	แหล่ง
EDTA	Sigma, Germany
Tris base	Amersham, USA
Agarose	Gibco BRL, USA
Boric acid	Merck, Germany
Ethidium bromide	Sigma, Germany
Avidin-Biotin peroxidase complex solution (ABC kit)	DAKO A/S, Denmark
DAB	Sigma, St. Louis, USA
QIAamp <sup>®</sup> viral RNA Mini Kit	QIAGEN, USA
Oligonucleotide primers	Bio Basic Inc., Canada
QIAGEN <sup>®</sup> One Step RT-PCR Kit	QIAGEN, USA
100 bp DNA ladder	Gibco BRL, Gaitherberg
QIAquick PCR purification Kit	QIAGEN, USA
Sequence ABI 310 Kit	Perkin-Elmer, Boston, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Fluka, Switzerland

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เครื่องมือ

Bubble plastic rack, Scienceware, USA  
Refrigerated Universal Centrifuge, Hermle Labortechnik, Germany  
Mini-Centrifuge, Quick spin, LABNET, USA  
Vortex mixer, Genie-2™, Scientetific Industries, USA  
Freezer -20<sup>0</sup> C, Sanyo, Japan  
Freezer -70<sup>0</sup> C, Forma Scientific, USA  
Horizontal midi-gel systems, C.B.S. Scientific, USA  
Power supplies, C.B.S. Scientific, USA  
Microcentrifuge tube 1.5 ml, Axygen, USA  
Microcentrifuge tube 0.5 ml, Elkay, USA  
Microcentrifuge tube 0.2 ml, Axygen, USA  
Pipette tips 0.5-10 ul, Axygen, USA  
Filter pipette tips 200 ul, Axygen, USA  
Filter pipette tips 200-1000 ul, Axygen, USA  
Thermal cycler 9600/Perkin-Elmer, Cetus, USA  
Timer, Citizen, Japan  
Dyna Chill Portable Cooler, LABNET, USA  
Refrigerator, Mitsubishi Electric, Japan  
Water bath, Bosstech, England  
UV-visible recording spectrophotometer, UV-160A, Shimadzu, Japan

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน C-terminal ของ nucleocapsid protein gene จากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้  
จากตัวอย่างสมองสุนัขในประเทศไทย

LOCUS AY241580 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 468/2001 from Thailand  
 nucleocapsid protein (N) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY241580  
 VERSION AY241580.1 GI:29653027  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama  
 4, Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="468/2001"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /country="Thailand"  
[gene](#) <1..>335  
 /gene="N"  
[CDS](#) <1..>335  
 /gene="N"  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AA088254.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29653028"  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVTNQPPPTINKRSENQGGDKYPIHFNDERF  
 PGYTPDVNSSEWSESRYDTQTIQDDGNDDDRKSMEAIAMRMLTKMLSQPGTSEESSP  
 VYNDRELLN"  
 BASE COUNT 117 a 82 c 68 g 68 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact tttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 ctccaacat caacaagagg tccgaaaacc aaggaggaga caaataccct atccacttca  
 121 atgatgaacg gtttccaggg tacacccttg atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgatac ccgactatt caagatgatg gaaatgacga tgaccggaaa tcgatggaag  
 241 caatcgcaa gatgagaatg cttactaaga tgctcagtca accagggacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctataatgat agggagctac tcaat

//



LOCUS AY241581 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 621/2001 from Thailand  
 nucleocapsid protein (N) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY241581  
 VERSION AY241581.1 GI:29653029  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama  
 4, Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="621/2001"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /country="Thailand"  
[gene](#) <1..>335  
 /gene="N"  
[CDS](#) <1..>335  
 /gene="N"  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AAO88255.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29653030"  
  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVTNQPPPTINKRSENQGGDKYPIHFNDERF  
 PGYTPDVNSSEWSESRDYDTQTIQDDGNDDDRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEESSP  
 VYNDRELLN"  
 BASE COUNT 116 a 83 c 67 g 69 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact tttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 cccaaccat caacaagagg tccgaaaacc aaggaggaga caaataccct atccacttca  
 121 atgatgaacg gtttcctggg tacacccttg atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgatac tcagactatt caagatgatg gaaacgacga tgaccggaaa tcgatggaag  
 241 caatcgcaa gatgagaatg cttactaaga tgctcagtca acctgggacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctataatgat agagagctac tcaat  
 //

LOCUS AY241579 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 418/2001 from Thailand  
 nucleocapsid protein (N) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY241579  
 VERSION AY241579.1 GI:29653025  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama  
 4, Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="418/2001"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /country="Thailand"  
[gene](#) <1..>335  
 /gene="N"  
[CDS](#) <1..>335  
 /gene="N"  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AAO88253.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29653026"  
  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVTNQQPPTINKRSENQGGDKYPIHFNDERF  
 PGYTPDVNSSEWSESRDYDTQTIQDDGNDDDRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEESSP  
 VYNDRELLN"  
 BASE COUNT 116 a 83 c 67 g 69 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact tttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 cccaaccat caacaagagg tccgaaaacc aaggaggaga caaataccct atccacttca  
 121 atgatgaacg gtttcctggg tacacccttg atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgatac tcagactatt caagatgatg gaaacgacga tgaccggaaa tccgatggaag  
 241 caatcgccaa gatgagaatg cttactaaga tgctcagtca acctgggacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctataatgat agagagctac tcaat  
 //

LOCUS AY241578 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 400/2001 from Thailand  
 nucleocapsidprotein (N) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY241578  
 VERSION AY241578.1 GI:29653023  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama  
 4, Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="400/2001"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /country="Thailand"  
[gene](#) <1..>335  
 /gene="N"  
[CDS](#) <1..>335  
 /gene="N"  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AAO88252.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29653024"  
  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVTNQQPPTINKRSENQGGDKYPIHFNDERF  
 SGYTPDVNSSEWSESRDYDTQTIQDDGNDDDRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEESSP  
 VYNDRELLN"  
 BASE COUNT 117 a 85 c 67 g 66 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact tttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 cccaaccat caacaagagg tccgaaaacc aaggaggaga caaataccct atccacttca  
 121 atgatgaacg gttttcaggg tacacccttg atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgacac ccagactatt caagatgatg gaaacgacga tgaccggaaa tcgatggaag  
 241 caatcgcaa gatgagaatg ctactaaga tgctcagtca acctgggacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctataatgat agagagctac tcaat  
 //

LOCUS AY241577 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 230/2001 from Thailand  
 nucleocapsid protein (N) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY241577  
 VERSION AY241577.1 GI:29653021  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama  
 4, Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="230/2001"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /country="Thailand"  
[gene](#) <1..>335  
 /gene="N"  
[CDS](#) <1..>335  
 /gene="N"  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AAO88251.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29653022"  
  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVTNQPPPTINKRSENQGGDKYPIHFNDERF  
 PGYTPDVNSSEWSESRDYDTQTIQDDGNDDDRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEESSP  
 VYNDRELLN"  
 BASE COUNT 118 a 85 c 66 g 66 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact tttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 cccaaccat caacaagagg tccgaaaacc aaggaggaga caaatacccc atccacttca  
 121 atgatgaacg gtttccaggg tacacccttg atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgatac ccagactatt caagatgatg gaaacgacga tgaccggaaa tccgatggaag  
 241 caatcgccaa gatgagaatg cttactaaga tgctcagtca acctggaacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctataatgat agagagctac tcaat  
 //

LOCUS AY241576 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 207/2001 from Thailand  
 nucleocapsid protein (N) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY241576  
 VERSION AY241576.1 GI:29653019  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama  
 4, Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="207/2001"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /country="Thailand"  
[gene](#) <1..>335  
 /gene="N"  
[CDS](#) <1..>335  
 /gene="N"  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AAO88250.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29653020"  
  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVTNQPPPTINKRSENQGGDKYPIHFNDERF  
 PGYTPDVNSSEWSESRDYDTQTIQDDGNDDDRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEESSP  
 VYNDRELLN"  
 BASE COUNT 118 a 85 c 66 g 66 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact tttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 cccaaccat caacaagagg tccgaaaacc aaggaggaga caaatacccc atccacttca  
 121 atgatgaacg gtttccaggg tacacccttg atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgatac ccagactatt caagatgatg gaaacgacga tgaccggaaa tcatggaag  
 241 caatcgcaa gatgagaatg cttactaaga tgctcagtca acctggaacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctataatgat agagagctac tcaat

LOCUS AY241575 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 438/2001 from Thailand  
 nucleocapsid protein (N) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY241575  
 VERSION AY241575.1 GI:29653017  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama  
 4, Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="438/2001"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /country="Thailand"  
[gene](#) <1..>335  
 /gene="N"  
[CDS](#) <1..>335  
 /gene="N"  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AA088249.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29653018"  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVTNQPPPTINKRSENQGGDKYPIHFSDERF  
 PGYTPDVNSSEWSESRYDTQTIQDDGNDDDRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEESSP  
 VYNDRELLN"  
 BASE COUNT 118 a 87 c 67 g 63 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact ttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 ccccaaccat caacaagagg tccgaaaacc aaggaggaga caaatacccc atccacttca  
 121 gtgatgaacg gtttccaggg tataccccag atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgatac ccaaacatt caagatgatg gaaacgacga tgaccggaaa tcgatggaag  
 241 caatcgcaa gatgagaatg cttactaaga tgctcagtca acctgggacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctacaatgat agagagctac tcaat  
 //



LOCUS AY241574 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 034/2001 from Thailand  
 nucleocapsid protein (N) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY241574  
 VERSION AY241574.1 GI:29653015  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama  
 4, Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="034/2001"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /country="Thailand"  
[gene](#) <1..>335  
 /gene="N"  
[CDS](#) <1..>335  
 /gene="N"  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AAO88248.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29653016"  
  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVTNQQPPTINKRSENQGGDKYPIHFNDERF  
 PGYTPDVNSSEWSESRDYDTQTIQDDGNDDDRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEESSP  
 VYNDRELLN"  
 BASE COUNT 118 a 85 c 66 g 66 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact tttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 cccaaccat caacaagagg tccgaaaacc aaggaggaga caaatacccc atccacttca  
 121 atgatgaacg gtttccaggg tacacccttg atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgatac ccagactatt caagatgatg gaaacgacga tgaccggaaa tcgatggaag  
 241 caatcgcaa gatgagaatg cttactaaga tgctcagtca acctggaacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctataatgat agagagctac tcaat  
 //

LOCUS AY241573 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 577/2001 from Thailand  
 nucleocapsid protein (N) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY241573  
 VERSION AY241573.1 GI:29653013  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama  
 4, Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="577/2001"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /country="Thailand"  
[gene](#) <1..>335  
 /gene="N"  
[CDS](#) <1..>335  
 /gene="N"  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AAO88247.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29653014"  
  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVTNQQPPTINKRSENQGGDKYPIHFNDERF  
 PGYTPDVNSSEWSESRDYDTQTIQDDGNDDDRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEESSP  
 VYNDRELLN"  
 BASE COUNT 118 a 85 c 66 g 66 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact tttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 cccaaccat caacaagagg tccgaaaacc aaggaggaga caaatacccc atccacttca  
 121 atgatgaacg gtttccaggg tacacccttg atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgatac ccagactatt caagatgatg gaaacgacga tgaccggaaa tccgatggaag  
 241 caatcgccaa gatgagaatg cttactaaga tgctcagtca acctggaacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctataatgat agagagctac tcaat  
 //

LOCUS AY241572 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 442/2001 from Thailand  
 nucleocapsid protein (N) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY241572  
 VERSION AY241572.1 GI:29653011  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama  
 4, Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="442/2001"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /country="Thailand"  
[gene](#) <1..>335  
 /gene="N"  
[CDS](#) <1..>335  
 /gene="N"  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AAO88246.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29653012"  
  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVANQQPPTITKRSENQGGDLYPIHFSDERL  
 PGYTPDVNSSEWSESRDYDQIIQDDGNDDDRKSMEIAKMRMLTKMLSQPGTSEDNSP  
 VYNDKELLN"  
 BASE COUNT 110 a 82 c 71 g 72 t  
 ORIGIN  
 1 ctaagcaatc ccaaatcact tttctgcact cggaaagatc cgaagtcgct aatcaacaac  
 61 cccctaccat caccaagagg tccgagaacc agggaggaga cctgtacccc attcacttca  
 121 gtgacgaaa gcttccaggg tataccccag atgtcaacag ttctgaatgg agtgagtcac  
 181 gctatgacac ccaaattatc caagatgatg gaaatgacga tgatcggaaa tcgatggaag  
 241 caatcgcaa gatgaggatg cttactaaga tgctcagtca acctgggacc agtgaagata  
 301 attctcctgt ttataatgat aaagagctac tcaat  
  
 //

LOCUS AY238607 335 bp RNA linear VRL 09-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus isolate 171 nucleocapsid protein gene,  
 partial cds.  
 ACCESSION AY238607  
 VERSION AY238607.1 GI:29650294  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (18-FEB-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama4,  
 Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /mol\_type="genomic RNA"  
 /isolate="171"  
 /db\_xref="taxon:11232"  
[CDS](#) <1..>335  
 /codon\_start=3  
 /product="nucleocapsid protein"  
 /protein\_id="[AA088059.1](#)"  
 /db\_xref="GI:29650295"  
  
 /translation="KQSQITFLHSERSEVANQQPPTINKRSENQGGDKYPIHFSDERL  
 PGYTPDVNSSEWSESRDYDTQIIQDDGNDDDRKSMEAIKMRMLTKMLSQPGTSEDNSP  
 VYNDKELLN"  
 BASE COUNT 115 a 82 c 70 g 68 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc ccaaatcact tttctgcact cggaaagatc cgaagtcgcc aatcaacaac  
 61 ccccaaccat caacaagagg tccgaaaacc agggaggaga caaatacccc attcacttca  
 121 gtgacgaaag gttccaggg tataccccag atgtcaacag ttctgaatgg agtgagtcac  
 181 gctatgacac ccaaattatc caagatgatg gaaatgacga tgatcggaaa tcgatggaag  
 241 caatcgccaa gatgaggatg cttactaaga tgctcagtca acctgggacc agtgaagata  
 301 attctcctgt ttataatgat aaggagctac tcaat  
  
 //

LOCUS bankit529600 (AY278994) 335 bp RNA linear  
 VRL 17-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus N gene , Thai isolate 466/2001  
 ACCESSION bankit529600(AY278994)  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (17-APR-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama4,  
 Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /map="nucleocapsid"  
 BASE COUNT 115 a 85 c 67 g 68 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact tttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 ctctaccat caacaagagg tccgaaaacc aaggaggaga ccaataccct atccacttca  
 121 atgatgaacg gttccaggg tacaccctg atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgatac ccagactatt caagatgatg gaaacgacga tgaccggaaa tcgatggaag  
 241 caatcgccaa gatgagaatg cttactaaga tgctcagtca acctgggacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctataatgat agagagctac tcaat  
 //

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS bankit529602(AY278995) 335 bp RNA linear  
 VRL 17-APR-2003  
 DEFINITION Canine distemper virus N gene , Thai isolate 443/2001  
 ACCESSION bankit529602(AY278995)  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Canine distemper virus  
 ORGANISM [Canine distemper virus](#)  
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;  
 Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Canine Distemper Virus in Thailand  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 335)  
 AUTHORS Keawcharoen,J., Theamboonlers,A., Jantaradsamee,P.,  
 Rungsipipat,A.,  
 Oraveerakul,K. and Poovorawan,Y.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (17-APR-2003) Pediatric, Chulalongkorn University,  
 Rama4,  
 Bangkok 10330, Thailand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..335  
 /organism="Canine distemper virus"  
 /virion  
 /db\_xref="taxon:11232"  
 /map="nucleocapsid"  
 BASE COUNT 118 a 86 c 66 g 65 t  
 ORIGIN  
 1 ccaagcaatc tcaaatcact tttctgcact cagaaagatc cgaagtcact aatcaacaac  
 61 ccccaaccat caacaagagg cccgaaaacc aaggaggaga caaatacccc atccacttca  
 121 atgatgaacg gtttccaggg tacaccctg atgtcaacag ctccgaatgg agtgaatcac  
 181 gctatgatac ccagactatt caagatgata gaaacgacga tgaccggaaa tcgatggaag  
 241 caatcgccaa gatgagaatg cttactaaga tgctcagtca acctgggacc agtgaagaga  
 301 gttctcctgt ctataatgat agagagctac tcaat  
 //

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจุฑาทิพย์ เขียวเจริญ เกิดวันที่ 6 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2522 ที่โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543 และเข้าศึกษาต่อระดับ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ.2544



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย