

## การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขจากเซลล์เม็ดเลือดขาว โมโนนิวเคลียร์ในกระแสเลือด โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (RT-PCR)

วีระวรรณ ทิวนันทกร<sup>1</sup> ศิริชัย จุลสุวรรณรักษ์<sup>2</sup> อัจฉริยา ไสละสูต<sup>2</sup>  
อนุเทพ รังสีพิพัฒน์<sup>2\*</sup> สมพร เตชะงามสุวรรณ<sup>2</sup> สรรพสิริ สิริพรประเสริฐ<sup>2</sup>  
ชูชุม ทะทะยามะ<sup>3</sup> เรียวจิ ยามากุชิ<sup>3</sup> คะซุยุกิ อุชิดะ<sup>3</sup>

### Abstract

Weerawan Tiwananthakorn<sup>1</sup> Sirichai Junsuwanaruk<sup>2</sup> Achariya Sailasuta<sup>2</sup> Anudep Rungsipipat<sup>2\*</sup>  
Somporn Techangamsuwan<sup>2</sup> Sapasiri Siripornprasert<sup>2</sup> Susumu Tateyama<sup>3</sup> Ryoji Yamaguchi<sup>3</sup> and  
Kazuyuki Uchida<sup>3</sup>

### THE APPLICATION OF A RT-PCR TECHNIQUE FOR THE DIAGNOSIS OF CANINE DISTEMPER USING PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

The application of a Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) on 37 canine distemper cases was performed by the amplification of the nucleocapsid gene derived from the canine distemper virus or CDV-infected mononuclear cells (PBMCs). The animals were divided into 2 groups according to their clinical signs. The first group of animals showed signs of distemper, such as respiratory and/or digestive signs. The second group showed the same signs as first group but with nervous involvements. The findings revealed that 74.1% (20/27) of group 1 tested positive with the RT-PCR assay compared to 60% (6/10) of group 2. These results suggested that RT-PCR is a useful early diagnostic tool for CDV infected animals.

**Keywords :** Canine distemper, peripheral blood mononuclear cells, RT-PCR

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Chiangmai University, Muang District, Chiangmai 50100.

<sup>2</sup>Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

<sup>3</sup>Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki 889-2192 Japan

\*Corresponding author

<sup>1</sup>คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50100

<sup>2</sup>ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

<sup>3</sup>ภาควิชาพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมิยาซากิ มิยาซากิ 889-2192 ญี่ปุ่น

\*ผู้รับผิดชอบบทความ

## บทคัดย่อ

วีระวรรณ ติวนันทกร<sup>1</sup> สิริชัย จุลสุวรรณรักษ์<sup>2</sup> อัจฉริยา ไสละสุต<sup>2</sup> อนุเทพ รังสีพิพัฒน์<sup>2\*</sup> สมพร เตชะงามสุวรรณ<sup>2</sup> สรรพสิริ สิริพรประเสริฐ<sup>2</sup> ชูชนู ทะทะยามะ<sup>3</sup> เรียวจิ ยามากุชิ<sup>3</sup> คะซุยุกิ อุซึดะ<sup>3</sup>

## การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์ในกระแสเลือด โดยวิธีปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส (RT-PCR)

การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส (RT-PCR) ในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่อยู่ในกระแสเลือดของสุนัขป่วยพบว่าสุนัขในกลุ่มที่ 1 ซึ่งแสดงอาการของระบบทางเดินหายใจและ/หรือระบบทางเดินอาหาร ให้ผลบวกเท่ากับ 74.1% (20/27) และสุนัขในกลุ่มที่ 2 ซึ่งแสดงอาการแบบกลุ่มที่ 1 ร่วมกับอาการทางระบบประสาท ให้ผลบวกเท่ากับ 60% (6/10) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ( $p > 0.05$ ) จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าวิธี RT-PCR อาจนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขทางคลินิกร่วมกับวิธีอื่นได้ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

**คำสำคัญ :** โรคไข้หัดสุนัข เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ ปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส

## บทนำ

การวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขในขณะที่ยังมีชีวิตจากอาการป่วยของสุนัขที่แสดงไม่สามารถยืนยันได้ว่ากลุ่มอาการที่พบนั้นเนื่องมาจากสุนัขติดเชื้อและเป็นโรคไข้หัดสุนัข การวินิจฉัยยืนยันโรคไข้หัดสุนัขโดยการตรวจหาระดับของแอนติบอดีทำได้ สองวิธี คือ การตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี serum neutralization test และวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ในช่วงเวลาห่างกันประมาณ 2-3 สัปดาห์เพื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี ซึ่งการตรวจระดับแอนติบอดีนี้มีข้อจำกัด คือ ในสัปดาห์แรกๆ ของการติดเชื้อซึ่งสุนัขแสดงอาการจะมีภูมิต้านทานต่ำ (Shin et al., 1995) ในทางกลับกัน ลูกสุนัขที่อายุน้อยซึ่งได้รับภูมิต้านทานจากแม่ยังอยู่ในระดับสูง จึงมีปัญหาที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าภูมิต้านทานที่ตรวจพบสูงเกิดจาก

การติดเชื้อโดยตรงหรือได้รับภูมิต้านทานที่ถ่ายทอดมาจากแม่ (Appel, 1987) การตรวจหาเชื้อไวรัสจากเซลล์เยื่อ หรือเซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่ วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี อาจให้ผลลบลง ในกรณีที่สัตว์เป็นโรคในช่วงระหว่างเฉียบพลันหรือเรื้อรัง เนื่องจากปริมาณไวรัสที่น้อย การแยกเชื้อไวรัสซึ่งเป็นวิธีที่แน่นอนและจำเพาะนั้น ต้องใช้เวลานานเป็นสัปดาห์ และมักจะไม่ได้ผลถ้าสัตว์ป่วยนั้นไม่อยู่ในระยะเฉียบพลัน (Shin et al., 1995) ในปัจจุบันมีการนำวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม morbillivirus มากขึ้น Godec et al. (1990) ศึกษาลำดับเบสบนยีนของไวรัสไข้หัดในคน (measles virus) จากตัวอย่างสมองคนที่มียโรค subacute sclerosing panencephalitis เพื่อศึกษาโครงสร้างยีนหลักของ measles virus ทั้ง 5 ชนิด Haas et al. (1991) ทำการตรวจหา

RNA ของ phocid distemper virus จากเนื้อเยื่อของเมาน้ำ โดยวิธี slot hybridization และ PCR เพื่อศึกษา ลักษณะของยีนที่แตกต่างจากไวรัสไข้หัดสุนัข และ Shin et al. (1995) พัฒนาวิธีการตรวจหานิวคลีโอโปรตีนเยื่อหุ้ม (NP gene) ของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากเม็ดเลือดขาว ชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) ที่อยู่ในกระแสเลือด โดยวิธี RT-PCR และรายงานว่าเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิก

จุดประสงค์ของการรายงานครั้งนี้คือ เพื่อศึกษา ถึงความเป็นไปได้ของการนำวิธี RT-PCR มาประยุกต์ ใช้ในการวินิจฉัยตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจาก ตัวอย่างเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์ของสุนัขป่วยที่ยัง มีชีวิตซึ่งสงสัยว่าเป็นโรคไข้หัดสุนัข และเปรียบเทียบ ผลการตรวจที่ได้กับการแสดงอาการทางคลินิก ในช่วง เวลาต่างๆของการเป็นโรคไข้หัดสุนัข

## วัสดุและวิธีการ

### ตัวอย่างเลือด

สุนัขป่วยที่วินิจฉัยทางคลินิกว่าเป็นโรคไข้หัด สุนัขที่ได้รับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะ สัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 16 ตัวและโรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยมิยาซากิ ประเทศ ญี่ปุ่น จำนวน 21 ตัว รวม 37 ตัว โดยใช้หลักเกณฑ์ ในการพิจารณาจากประวัติ เช่น อายุ ประวัติการทำวัคซีน และกลุ่มอาการ แบ่งสุนัขออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะ อาการ โดย กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สุนัขที่แสดงอาการของ ระบบทางเดินหายใจ เช่น มีน้ำมูก น้ำตา ไอหรือจาม ปอด หรือหลอดลมอักเสบ และ/หรือร่วมกับอาการของ ระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องเสียและอาเจียน จำนวน 27 ตัว (ตารางที่ 1) กลุ่มที่ 2 ได้แก่สุนัขที่แสดงอาการ เหมือนกลุ่มแรก ร่วมกับอาการของระบบประสาท เช่น อาการชัก กล้ามเนื้อสั่นหรือกระตุก จำนวน 10 ตัว (ตารางที่ 2)

หลังจากชักประวัติ ตรวจร่างกาย เจาะเก็บเลือด ในปริมาณ 2-5 มล. นอกจากนี้ได้ทำการเจาะเก็บเลือด สุนัขในกลุ่มที่ 1 จำนวน 7 ตัว ในวันที่ 0, 3, 6, และ 9 เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจในช่วงเวลาต่างๆ

### การตรวจตัวอย่าง

1. ค่าทางโลหิตวิทยา ตรวจจาก whole blood (Hematology series cell counter 150; Baker, New York, USA) โดยตรวจค่าต่างๆ ดังนี้ ปริมาณเม็ด เลือดแดง ฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต เม็ดเลือดขาว และ แยกชนิดเม็ดเลือดขาว

2. ปริมาณแอนติบอดีชนิดอิมมูโนโกลบูลิน เอ็มและจี (IgM และ IgG) จากพลาสมาด้วยวิธี ELISA โดยส่งตัวอย่างเลือดไปตรวจที่ศูนย์ Advance Technology Laboratory (Oita, Japan)

3. ตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธีลูกโซ่ โพลีเมอเรส (RT-PCR) จาก PBMCs

การแยก PBMCs จากเลือด โดยประยุกต์วิธี การของ Strasser et al. (1998) ดังนี้ เติม Histopaque® 1119 (Polysucrose and Sodium diatrizoate, density 1.119 g/ml; Sigma, USA) ปริมาณ 3 มล. เติม Histopaque® 1077 (Polysucrose and Sodium diatrizoate, density 1.077 g/ml) ปริมาณ 3 มล. ลง บนชั้นของ Histopaque® 1119 เติมตัวอย่างเลือดปริมาณ 2-5 มล. ลงบน Histopaque® 1077 นำมาปั่นด้วยความ เร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แยกส่วน ตะกอนเม็ดเลือดขาว ล้างด้วย 0.01M Phosphate buffer solution (PBS) ปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบ ต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนเม็ดเลือดขาวด้วย 0.01M PBS และทำให้ตะกอนกระจายตัวใน 0.01M PBS เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C.

ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส RT-PCR (วีระวรรณ และคณะ, 2000)

**ตารางที่ 1** แสดงประวัติ ลักษณะอาการ และผลการตรวจ RT-PCR ของสุนัขกลุ่มที่ 1

| สุนัข<br>หมายเลข* | กลุ่มอาการที่แสดง |    |                                | ระดับภูมิคุ้มกัน |       | ผล RT-PCR |    |     |
|-------------------|-------------------|----|--------------------------------|------------------|-------|-----------|----|-----|
|                   | Resp              | GI | Others                         | IgM              | IgG   | P1        | P2 | รวม |
| 1                 | -                 | +  | hard pad                       | NT               | NT    | +         | -  | +   |
| 2                 | +                 | -  | hard pad                       | NT               | NT    | -         | -  | -   |
| 3                 | +                 | +  | hard pad, fever                | NT               | NT    | -         | -  | -   |
| 4                 | +                 | -  | fever, papule                  | NT               | NT    | +         | -  | +   |
| 5                 | +                 | +  | fever                          | NT               | NT    | -         | -  | -   |
| 6                 | +                 | -  | fever, papule, hard pad        | NT               | NT    | +         | -  | +   |
| 7                 | -                 | +  | papule                         | NT               | NT    | -         | -  | -   |
| 8                 | +                 | -  | hard pad                       | NT               | NT    | +         | -  | +   |
| 9                 | -                 | -  | fever, pustule, conjunctivitis | NT               | NT    | +         | -  | +   |
| 10                | +                 | +  | fever, conjunctivitis          | NT               | NT    | +         | +  | +   |
| 11                | +                 | +  | fever                          | NT               | NT    | -         | -  | -   |
| 12                | +                 | +  | fever                          | NT               | NT    | -         | -  | -   |
| 13                | +                 | -  | hard pad                       | 400              | 1600  | +         | -  | +   |
| 14                | +                 | -  | hard pad                       | 1600             | 1600  | +         | +  | +   |
| 15                | +                 | -  | fever                          | 200              | >1600 | -         | +  | +   |
| 16                | +                 | +  | fever                          | 1600             | 800   | +         | +  | +   |
| 17                | +                 | -  | fever                          | 800              | >1600 | +         | +  | +   |
| 18                | +                 | +  | fever                          | 400              | 800   | +         | +  | +   |
| 19                | +                 | -  | fever                          | 1600             | 800   | +         | +  | +   |
| 20                | +                 | -  |                                | 400              | >1600 | -         | +  | +   |
| 21                | +                 | -  |                                | 1600             | 1600  | -         | +  | +   |
| 22                | +                 | +  | fever                          | 50               | 1600  | -         | -  | -   |
| 23                | +                 | +  | fever                          | 100              | 50    | +         | -  | +   |
| 24                | +                 | +  | fever                          | 400              | 200   | -         | +  | +   |
| 25                | +                 | -  | fever                          | 100              | 400   | +         | +  | +   |
| 26                | +                 | -  | fever                          | 200              | <25   | +         | +  | +   |
| 27                | +                 | -  | fever                          | 50               | <25   | +         | -  | +   |

Resp: Respiratory signs; including purulent oculonasal discharge, lung crackle, panting, cough and/or sneeze,

GI: Gastrointestinal signs; including diarrhea, and/or vomiting, NT: Not test, P1 and P2: Primer No.1 and 2

\*สุนัขหมายเลข 1-12 ตัวอย่างจากประเทศไทย \*สุนัขหมายเลข 13-27 ตัวอย่างจากประเทศญี่ปุ่น

**ตารางที่ 2** แสดงประวัติ ลักษณะอาการ และผลการตรวจ RT-PCR ของสุนัขกลุ่มที่ 2

| สุนัข<br>หมายเลข* | กลุ่มอาการที่แสดง |    |     |                       | ผล RT-PCR |    |     |
|-------------------|-------------------|----|-----|-----------------------|-----------|----|-----|
|                   | Resp              | GI | CNS | Others                | P1        | P2 | รวม |
| 1                 | +                 | +  | +   | fever                 | +         | +  | +   |
| 2                 | +                 | +  | +   | fever, hard pad       | -         | -  | -   |
| 3                 | +                 | -  | +   | hard pad              | +         | -  | +   |
| 4                 | -                 | -  | +   |                       | -         | -  | -   |
| 5                 | -                 | -  | +   | fever                 | +         | +  | +   |
| 6                 | -                 | +  | +   | fever, hard pad       | +         | -  | +   |
| 7                 | +                 | -  | +   | hard pad              | -         | -  | -   |
| 8                 | +                 | +  | +   | fever                 | +         | -  | +   |
| 9                 | -                 | +  | +   | fever, conjunctivitis | -         | -  | -   |
| 10                | +                 | +  | +   | fever                 | +         | -  | +   |

Resp: Respiratory signs; including purulent oculonasal discharge, lung crackle, panting, cough and/or sneeze,

GI: Gastrointestinal signs; including diarrhea, and/or vomiting,

CNS: Central nervous system; including tremor, trembling, chewing and/or convulsion

P1 and P2: Primer No.1 and 2

\*สุนัขหมายเลข 1-4 ตัวอย่างจากประเทศไทย \*สุนัขหมายเลข 5-10 ตัวอย่างจากประเทศญี่ปุ่น

ในการทดลองครั้งนี้ ใช้ primer จำนวน 2 คู่ คือ P1 และ P2 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะกับสาย cDNA ของนิวคลีโอโปรตีนชั้นนอกของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข เสตรน Onderstepoort (Shin et al., 1995) ลำดับเบสของ primer คือ P1: forward 5' TAGACGACCCTGATGTAAGC 3', reverse 5' CTAATTTCTCCGACCACACG 3' P2: forward 5' GCCGGCAAAGTAAGCTCTG 3', reverse 5' ACTGATGCAAGCCTGGTCTTGA 3' ตัวควบคุมบวก คือ Vero cell ที่ใส่เชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขเสตรน Onderstepoort ปริมาณ  $4 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> ตัวควบคุมลบ คือ Vero cell, Vero cell ที่ใส่เชื้อไวรัส adenovirus type 2, parvovirus, coronavirus, parainfluenza virus และ herpesvirus และน้ำกลั่น ขั้นตอน RT-PCR แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนย่อย (Shin et al., 1995) ดังต่อไปนี้

1. ขั้นตอนการสกัด RNA จากตัวอย่าง PBMCs โดยวิธี acid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform (Shin et al., 1995) ที่เตรียมได้จากขั้นตอนข้างต้น จำนวน 50 ไมโครลิตร (μl) เติม lysis buffer (0.7% 2-Mercaptoethanol, Chaos buffer, 10 x Phenol extraction buffer) จำนวน 450 μl นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายของ chloroform และ isoamyl alcohol ปริมาณ 250 μl ทำการตกตะกอน RNA และละลายด้วยน้ำกลั่น 5 μl

2. ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA สารละลายของ RNA จำนวน 5 μl จากขั้นตอนที่ 1 เติม reverse primer (ความเข้มข้น 50 pmol.) จำนวน 1 μl ผสมให้เข้ากัน ทำให้อุ่นที่อุณหภูมิ 100°C. นาน 1 นาที และทำให้เย็นทันที เติมส่วนผสม 15 μl (ปริมาณต่อ

หนึ่งตัวอย่าง น้ำกลั่น 6  $\mu$ l 10mM dNTP mix 1  $\mu$ l 10mM DTT 2  $\mu$ l 40,000 units/ml of RNase inhibitor 1  $\mu$ l 200 U/mcl. of M-MLV reverse transcriptase 1  $\mu$ l 5X buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15mM  $MgCl_2$ ) 4 (l) ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากัน แบ่งส่วนผสมที่ได้ปริมาณ 15  $\mu$ l ต่อหลอด เติมสารละลาย RNA จำนวน 5  $\mu$ l นำเข้าเครื่อง PCR อัดโนมิตี (Gene Amp PCR System 2400; Perkin Elmer Inc., USA) ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ คือ อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมาเปลี่ยนเป็น อุณหภูมิ 95 $^{\circ}$ ซ. นาน 5 นาที และสุดท้ายที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ ซ.

3. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ เตรียม PCR solution (ปริมาณต่อหนึ่งตัวอย่าง น้ำกลั่น 28.75  $\mu$ l 2.5 mmol dNTPs mix 5  $\mu$ l 25 mmol  $MgCl_2$  4.5  $\mu$ l 10XTaq buffer 0.5  $\mu$ l Taq DNA Polymerase 0.25  $\mu$ l 50 pmol/mcl forward primer 0.5  $\mu$ l 50 pmol/mcl reverse primer 0.5  $\mu$ l ผสมในปริมาณ 45  $\mu$ l ต่อหลอด เติม cDNA ที่ได้จากขั้นตอน 2 ปริมาณ 5  $\mu$ l นำเข้าเครื่อง PCR ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ดังนี้ ช่วงที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 $^{\circ}$ ซ. นาน 5 นาที ช่วงที่ 2 อุณหภูมิ 94 $^{\circ}$ ซ. นาน 1 นาที อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$ ซ. นาน 2 นาที และอุณหภูมิ 72 $^{\circ}$ ซ. นาน 3 นาที จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา ช่วงที่ 3 อุณหภูมิ 74 $^{\circ}$ ซ. นาน 7 นาที การตรวจ PCR product โดยใช้ 1.2% agarose gel (Takara, Japan) ใน TAE buffer เปิดเครื่อง Mupid electrophoresis (Cosmo Bio, Japan) โดยใช้ไฟฟ้านาด 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 20-30 นาที ย้อมสีโดยใช้ 10% ethidium bromide ตรวจดูแถบขนาดของ DNA และบันทึกภาพ

### ผล

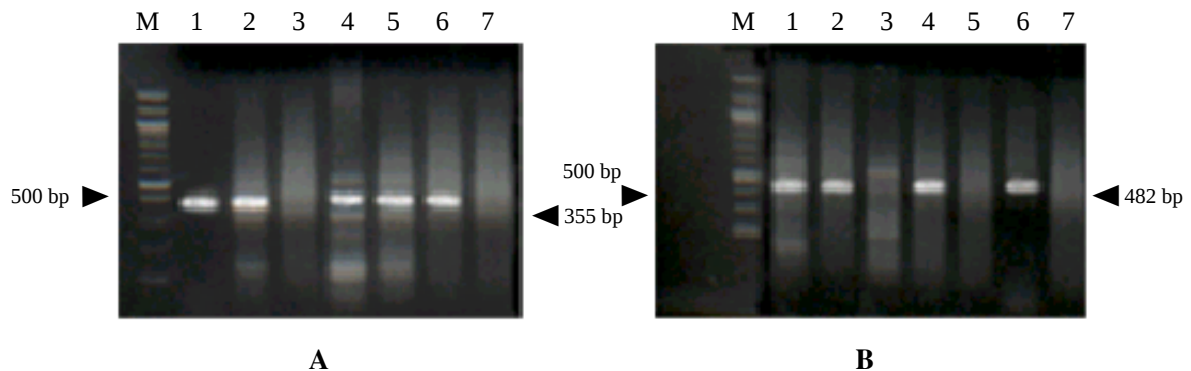
ตารางที่ 1 และ 2 แสดงประวัติและลักษณะอาการของสุนัขป่วยด้วยโรคไข้หัดสุนัข กลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ สุนัขกลุ่มที่ 1 และ 2 มีอายุอยู่ในช่วง

อายุน้อยกว่า 6 เดือน เท่ากับ 55.6% (15/27) และ 60% (6/10) ตามลำดับ สุนัขในกลุ่มที่ 1 จำนวน 81.5% (22/27) และกลุ่มที่ 2 จำนวน 100% (10/10) ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนไข้หัดสุนัข สุนัขในกลุ่มที่ 1 มีระดับ IgM และ IgG แตกต่างกันตั้งแต่ 1:50 ถึง 1:1,600 โดยมีค่าแอนติบอดีชนิด IgM  $\geq$  1:200 เท่ากับ 66.7% (10/15) ในการศึกษาช่วงเวลาต่างๆของระยะการเป็นโรคไข้หัดสุนัข เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 6 และ 9 พบว่าระดับของแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG เปลี่ยนแปลงไปตามช่วงเวลา โดยพบว่าเมื่อระยะเวลาการเป็นโรคมามากขึ้น ระดับของ IgM มีแนวโน้มที่ลดลง ในขณะที่ระดับ IgG จะคงที่อยูในระดับที่สูง (1: 1,600) เป็นระยะเวลานาน

ผลการตรวจหาผลผลิตของ RT-PCR จาก PBMCs ของ primer คู่ที่ 1 และ 2 เท่ากับ 355 และ 482 bp ตามลำดับ ซึ่งแสดงในรูปที่ 1 และ 2 ในสุนัขกลุ่มที่ 1 ให้ผลบวกเมื่อใช้ primer คู่ที่ 1 และ 2 เท่ากับ 59.3% (16/27) และ 44.4% (12/27) ตามลำดับ และให้ผลรวมเท่ากับ 74.1% (20/27) ในสุนัขกลุ่มที่ 2 ให้ผลบวกเมื่อใช้ primer คู่ที่ 1 และ 2 เท่ากับ 60% (6/10) และ 20% (2/10) ตามลำดับ และให้ผลรวมเท่ากับ 60% (6/10)

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ IgM และ IgG กับผลการตรวจ RT-PCR พบว่าในกลุ่มที่ 1 ที่ให้ผลบวกมีค่า IgM  $\geq$  1:100 ยกเว้นในสุนัขหมายเลข 27 (ตารางที่ 1) สุนัขที่ให้ผลบวกมีค่า IgG แตกต่างกันมากตั้งแต่ 1:50 จนถึง 1:1,600

ผลการตรวจ RT-PCR ในช่วงเวลาต่างๆ (รูปที่ 3) พบว่าผลการตรวจเปลี่ยนจากผลบวกเป็นลบ ในวันที่ 3 และ 6 3/7 และ 4/7 รายตามลำดับ สุนัขหมายเลข 14, 17, และ 20 มีผลการตรวจเปลี่ยนแปลงจากผลบวกเป็นลบในวันที่ 3, 6 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งมีระดับ IgM ลงที่เท่ากับ 1: 1,600, 1:400, และ 1:400 ตามลำดับ สุนัขหมายเลข 15, 19, และ 21 ผลการตรวจ

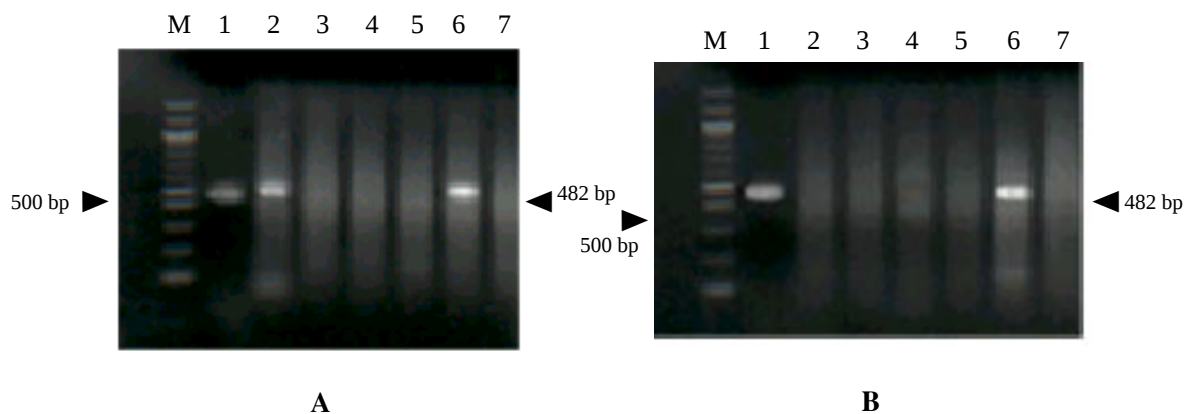


**รูปที่ 1** แสดงตัวอย่างผลการตรวจหาส่วนนิวคลีโอแคปสิดโปรตีนชั้นโดยวิธี RT-PCR จากเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ของสุนัขกลุ่มที่ 1

A: ผลการตรวจโดยใช้ primer P1; สุนัขหมายเลข 6-10

B: ผลการตรวจโดยใช้ primer P2; สุนัขหมายเลข 6-10

(M: 100 bp DNA ladder marker, Lane 1: positive control (CDV-infected Vero cells), Lane 2-6: PBMCs ของสุนัขหมายเลข 6-10 ตามลำดับ, Lane 7: negative control (น้ำกลั่น))

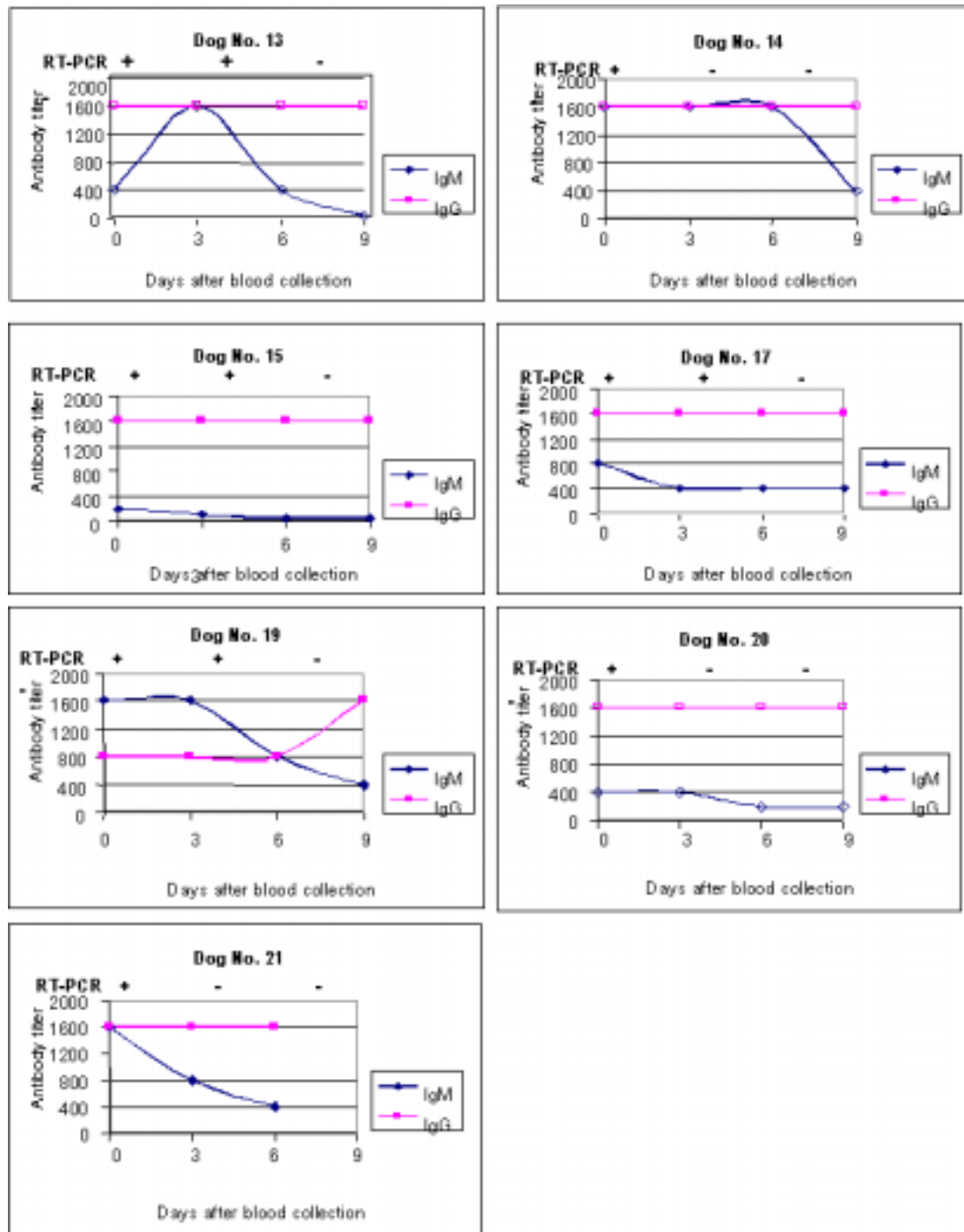


**รูปที่ 2** แสดงตัวอย่างผลการตรวจหาส่วนนิวคลีโอแคปสิดโปรตีนชั้นโดยวิธี RT-PCR จากเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ของสุนัขกลุ่มที่ 2

A: ผลการตรวจโดยใช้ primer P1; สุนัขหมายเลข 1-5

B: ผลการตรวจโดยใช้ primer P2; สุนัขหมายเลข 1-5

(M: 100 bp DNA ladder marker, Lane 1: positive control (CDV-infected Vero cells), Lane 2-6: PBMCs ของสุนัขหมายเลข 1-5 ตามลำดับ, Lane 7: negative control (น้ำกลั่น))



รูปที่ 3 แสดงระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG และผลการตรวจ RT-PCR ของสุนัขกลุ่มที่ 1

เปลี่ยนจากผลบวกเป็นลบในวันที่ 6, 6 และ 3 ตามลำดับ โดยพบว่าระดับ IgM ในช่วงเวลานี้มีค่าลดลงเป็น 2 เท่า คือระดับ IgM เปลี่ยนแปลงจาก 1:100 เป็น 1:50, 1:800 เป็น 1:400 และ 1:800 เป็น 1:400 ตามลำดับ และในสุนัขหมายเลข 13 ซึ่งผลการตรวจเปลี่ยนจากผลบวกเป็นลบในวันที่ 6 และพบว่ามีระดับ IgM มีค่าลดลง 4 เท่า คือมีระดับ IgM เปลี่ยนแปลงจาก 1:1,600 เป็น 1:400

### วิจารณ์

การนำวิธีการตรวจหา NP ยีนของเชื้อไข้หัดสุนัข โดยวิธี RT-PCR จากตัวอย่าง PBMCs ของสุนัขที่สงสัยว่าป่วยด้วยอาการทางคลินิกของโรคไข้หัดสุนัข ดังในกลุ่มที่ 1 และ 2 จากผลการทดลองพบว่าอาการของสุนัขป่วยไม่มีความสัมพันธ์กับผลการตรวจโดยวิธี RT-PCR คือ ยังไม่สามารถพยากรณ์โรคได้ว่าสุนัขป่วยที่มาหาสัตวแพทย์ป่วยอยู่ในระยะใดของการเป็นโรค วิธีการตรวจในการศึกษาครั้งนี้มีความจำเพาะต่อไวรัสไข้หัดสุนัขเสตรน Onderstepoort ซึ่งสามารถตรวจสอบปริมาณไวรัสที่น้อยในตัวอย่างคอบวม และการให้ผลลบต่อไวรัสชนิดต่างๆในสุนัขของตัวอย่างคอบวม การนำ primer ทั้ง 2 กลุ่มมาใช้ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการให้ผลบวก จึงสามารถเลือกนำไปใช้ศึกษาต่อได้แต่วิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในการตรวจ คือ การพิจารณาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างเลือดในสุนัขป่วย

พิจารณาประวัติการทำวัคซีนและผลการตรวจ RT-PCR ในกลุ่มที่ 1 สุนัขหมายเลข 1 และ 10 ได้รับวัคซีนภายใน 6 และ 17 วันก่อนการเก็บตัวอย่างเลือดตามลำดับ RT-PCR ให้ผลบวก ส่วนผล RT-PCR ของสุนัขหมายเลข 3 ซึ่งเก็บตัวอย่างเลือดหลังจากได้รับวัคซีน 18 วันซึ่งให้ผลลบ กล่าวได้ว่าหลังจากการทำวัคซีนอย่างน้อย 18 วันก็จะไม่สามารถตรวจพบ NP ยีนของไวรัสโดยวิธี RT-PCR ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ

Shin et al. (1995) พบว่าหลังจากทำวัคซีนให้สุนัขภายใน 14 วัน สุนัขบางตัวอาจตรวจไม่พบ NP ยีนของไวรัสไข้หัดสุนัขจาก PBMCs

ดังนั้นยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าผลบวกของสุนัขหมายเลข 1 และ 10 ที่เกิดขึ้น เป็นผลบวกเนื่องจากสุนัขได้รับไวรัสจากการติดเชื้อตามธรรมชาติหรือเป็นผลบวกหลงเนื่องจากไวรัสที่อยู่ในวัคซีน แต่ในสุนัขหมายเลข 8 และ 25 ซึ่งได้รับวัคซีนก่อนทำการเก็บตัวอย่างเลือด 65 และ 68 วันตามลำดับ ผลบวกที่เกิดขึ้นน่าจะเนื่องจากการได้รับเชื้อจากธรรมชาติ

จากผลการตรวจ RT-PCR และผลทางซีรั่มวิทยาพบว่าระดับ IgM มีความสัมพันธ์กับผลการตรวจคือสุนัขที่ระดับ IgM  $\geq 1:100$  จะให้ผลบวก ยกเว้นสุนัขหมายเลข 27 ที่ค่า IgM เพียง 1:50 อาจเนื่องจากสุนัขเพิ่งได้รับเชื้อ หรือร่างกายอ่อนแอไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ โดยทั่วไปร่างกายจะสร้างภูมิต้านทาน IgM และ IgG ในระยะแรกของการติดเชื้อ โดยที่ IgM จะอยู่ในร่างกายเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ ถึง 3 เดือน หลังจากได้รับเชื้อ ส่วน IgG จะอยู่ในร่างกายต่อไปเป็นปีหรือตลอดชีวิต (Appel, 1987)

ระดับ IgG ไม่มีความสัมพันธ์กับผล RT-PCR สุนัขที่ให้ผลบวกมีค่า IgG แตกต่างกันตั้งแต่ 1:25 จนถึง 1:1,600 ส่วนสุนัขหมายเลข 22 ที่มีระดับ IgG สูง (IgM 1:50 และ IgG 1:1,600) แต่ให้ผลลบ อาจเป็นไปได้หลายสาเหตุได้แก่ ร่างกายสามารถกำจัดไวรัสที่อยู่ในกระแสเลือด ในตัวอย่างมี NP ยีนอยู่ในระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ อาจได้รับเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม และอาจเนื่องจากติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่ไม่ใช่เสตรน Onderstepoort (Shin et al., 1995)

การเปลี่ยนแปลงของ NP ยีนของไวรัสจากแหล่งธรรมชาติ พบได้เช่นกันในสุนัขกลุ่มที่ 1 จำนวน 12 ตัว (หมายเลข 1, 4, 6, 8, 9, 13, 15, 20, 21, 23, 24, และ 27) และในสุนัขกลุ่มที่ 2 จำนวน 4 ตัว

(หมายเลข 3, 6, 8, และ 10) ซึ่งให้ผลบวกเมื่อใช้ primer เพียงคู่ใดคู่หนึ่งเท่านั้นในการเพิ่มขยายยีน ซึ่งพบได้ในรายงานของ Shin et al. (1995) และการเปลี่ยนแปลงของยีนเกิดได้เช่นเดียวกับ measles virus ซึ่งเป็นตระกูลเดียวกับไวรัสไข้หัดสุนัข (Giraudon et al., 1988)

จากผลการตรวจในช่วงเวลาต่างๆ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า เชื้อจะอยู่ใน PBMCs เป็นเวลา 3-6 วัน หลังจากที่เราของสุนัขสังเกตเห็นอาการป่วยของสุนัข Rockborn (1957) พบว่าไวรัสจะอยู่ใน PBMCs เป็น 2 ช่วง คือในวันที่ 6-9 และ 16-19 วันหลังจากการติดเชื้อ และไปที่เซลล์เยื่อของท่อน้ำไขสันหลังตั้งแต่วันที่ 9 (Appel, 1987) และประมาณวันที่ 14-21 หลังการติดเชื้อจะแสดงอาการของระบบต่างๆ (Swango, 1995) อาจสรุปได้ว่า ณ วันที่เจ้าของสัตว์พาสุนัขป่วยมาหาสัตวแพทย์ สุนัขป่วยอยู่ในระยะแรกของการเป็นโรค คืออยู่ในช่วง 14-21 หลังจากการติดเชื้อ ซึ่งผลบวกแสดงถึง PBMCs ที่ติดเชื้ออยู่ในร่างกายอย่างน้อย 3-6 วัน และเป็น PBMCs ที่อาจอยู่ในช่วงที่ 2 (วันที่ 16-19) อย่างไรก็ตามพยาธิกำเนิดของโรคขึ้นกับตัวสัตว์และสเตรนของเชื้อไวรัสด้วย (Cornwell, 1991)

### กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2542 และ AIEJ (Association of International Exchange student program of Japan ปี 1996-1998) ที่สนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการศึกษาครั้งนี้ Dr. Seigo Yamamoto และ Dr. Syuji Yoshino จาก Institute for Public Health and Environment of Miyazaki Prefecture ประเทศญี่ปุ่น ช่วยเหลือทางด้านเทคนิค RT-PCR อ.น.สพ. ทนง อัสวากัญจน์ น.สพ. อนุชา พรพัฒน์เกียรติ และ น.สพ. ทนง เขมกุล ช่วยเหลืองานด้านห้องปฏิบัติการ

### เอกสารอ้างอิง

- วีระวรรณ ตีวะนันท์กร ศิริชัย จุลสุวรรณรักษ์ อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ อัจฉริยา ไสละสุต สมพร เตชะงามสุวรรณ สรรพสิริ สิริพรประเสริฐ ชูชุม ทาทะยามะ เรียวจิ ยามากุชิ และ คะซุยุกิ อุซึดะ 2000 (2543) การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัข โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (RT-PCR) เวชสารสัตวแพทย์ 30(4): 25-40.
- Appel, M.J.G. 1987. Canine distemper virus. In: Virus infections of carnivores: virus infection of vertebrates, vol.1. Amsterdam: Elsevier Sci. 133-159.
- Cornwell, H.J.C. 1991. Distemper. Specific infections. In: Canine Medicine and Therapeutics. 3<sup>rd</sup>ed. Oxford: Blackwell. 496-505.
- Giraudon, P., Jacquier, M.F. and Wild, T.F. 1988. Antigenic analysis of African measles virus field isolates identification and localization of the conserved and two variable epitope sites on the NP protein. Virus Res. 10: 137-152.
- Godec, M.S., Asher, D.M., Swolveland, P.T., Eldadah, Z.A., Feinstone, S.M., Goldfarb, L.G., Gibbs, C.J.Jr. and Gajdusek, D.C. 1990. Detection of measles virus genomic sequences in SSPE brain tissue by the polymerase chain reaction. J. Med. Virol. 30: 237-244.
- 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.

- Rockborn, G. 1957. Viremia and neutralizing antibodies in experimental distemper in dogs. (abstract) Arch. Gesamte. Virusforsch. 7: 168-182.
- Shin, Y.S., Mori, T., Okita, M., Gemma, T., Kai, C. and Mikami, T. 1995. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. J. Vet. Med. Sci. 57(3): 439-445.
- Strasser, A., Kalmar, E. and Niedermuller, H. 1998. A simple method for the simultaneous separation of peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells in the dogs. Vet. Immunol. Immunopathol. 62: 29-35.
- Swango, L.J. 1995. Canine distemper. Canine viral diseases. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and cat. vol. 1 4<sup>th</sup>ed. Philadelphia: W.B. Saunder. 400-402.