

การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัข
โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (RT-PCR)

วีระวรรณ ทิวนันทกร* ศิริชัย จุตสุวรรณรักษ์** อนุเทพ รังสีพิพัฒน***
อัจฉริยา ไสละสูต** สมพร เตชะงามสุวรรณ** สรรพสิริ สิริพรประเสริฐ**
ชูชুমุ ทะทะยามะ*** เรียวจิ ยามากุชิ*** คะซุยุกิ อุชิดะ***

Abstract

Weerawan Tiwananthakorn* Sirichai Junsuwanaruk** Anudep Rungsipipat**
Achariya Sailasuta** Somporn Techangamsuwan** Sapisiri Siripornprasert**
Susumu Tateyama*** Ryoji Yamaguchi*** Kazuyuki Uchida***

THE DIAGNOSIS OF CANINE DISTEMPER
DISEASE USING RT-PCR

The diagnosis of canine distemper (CD) by a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) technique using 2 sets of primer which were specific to two regions on the cDNA of nucleocapsid protein (NP) gene of the canine distemper virus (CDV), Onderstepoort strain. Together with pathology and immunohistochemistry, the RT-PCR test was used to confirm the diagnosis of canine distemper in 20 dogs. Histopathological examination revealed that 70% (14/20) had pneumonia, 50% (10/20) had non-suppurative encephalitis, 33% (7/20) had splenic follicular necrosis and 35% (7/20) had gastroenteritis. Immunohistochemical detection of CDV antigens in the brain, lungs, and the gastrointestinal mucosa were 85% (17/20), 58% (11/19) and 40% (6/15), respectively. In addition, the positive detection of amplified NP gene by RT-PCR from the brain, lungs, and gastrointestinal tissues were 100% (18/18), 83% (15/18) and 75% (12/16), respectively. Necropsy diagnosis made by histopathology and immunohistochemistry corresponded to the positive results shown by RT-PCR.

Keywords : Canine distemper, immunohistochemistry, RT-PCR, histopathology

* Faculty of Veterinary Medicine, Chiangmai University, Chiangmai 50100

** Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330

*** Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki 889-2192 Japan

* คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50100

** ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*** ภาควิชาพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมิยาซากิ มิยาซากิ 889-2192 ประเทศญี่ปุ่น

บทคัดย่อ

วีระวรรณ ติวะนันทร* สิริชัย จุลสุวรรณรักษ์** อนุเทพ รังสีพิพัฒน์** อัจฉรียา ไสละสุต**
สมพร เตชะงามสุวรรณ** สรรพสิริ สิริพรประเสริฐ** ชูชุมุ ทะทะยามะ*** เรียวจิ ยามากุชิ*** กะซุยูกิ อุซึดะ***

การตรวจวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัข โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (RT-PCR)

ศึกษาการประยุกต์ใช้วิธี RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขร่วมกับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา และอิมมูโนฮิสโตเคมี ในสุนัขที่ป่วยและตายด้วยโรคไข้หัดสุนัข 20 ตัว โดยใช้ primer 2 ชุดที่มีความจำเพาะกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสาย cDNA ของนิวคลีโอโปรตีนยื่นของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข เสตรน Onderstepoort ผลทาง จุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคปอดอักเสบ 70% (14/20) สมองอักเสบแบบไม่มีหนอง 50% (10/20) การตายของเม็ด น้ำเหลืองของต่อมน้ำเหลืองที่หลอดลมและขั้วลำไส้ 35% (7/20) และทางเดินอาหารอักเสบ 35% (7/20) ผล อิมมูโนฮิสโตเคมีตรวจพบแอนติเจนของไวรัสไข้หัดสุนัขในเนื้อเยื่อปอด สมอง และเยื่อทางเดินอาหาร เท่ากับ 85% (17/20) 58% (11/19) และ 40% (6/15) ตามลำดับ และผลของวิธี RT-PCR จากเนื้อเยื่อสมอง ปอด และเยื่อ ภูทางเดินอาหาร ให้ผลบวกเท่ากับ 100% (18/18) 83% (15/18) และ 75% (12/16) ตามลำดับ การตรวจวินิจฉัย โรคไข้หัดสุนัขจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา และวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับการ ตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี RT-PCR

คำสำคัญ : โรคไข้หัดสุนัข ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส อิมมูโนฮิสโตเคมี จุลพยาธิวิทยา

บทนำ

โรคไข้หัดสุนัขเป็นโรคติดต่อร้ายแรงที่สำคัญของ สุนัข เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวชนิดลบ อยู่ในตระกูล Paramyxoviridae สกุล Morbillivirus การระบาดของโรคเกิดขึ้นได้ทั่วไปและกว้างขวาง เนื่องจากมีสัตว์หลายชนิดรวมทั้งสัตว์ป่าบางชนิดเป็นและ แพร่โรคนี้ได้ เช่น สุนัขจิ้งจอก มิงค์ เฟอร์เร็ท และ แรคคูน (Appel, 1987) ส่วนแมวที่อยู่ในตระกูล Felidae พบว่ามีโรคติดเชื้อไข้หัดสุนัขจากสุนัขป่วยได้แต่ไม่แสดง อาการทางคลินิก และไม่มีบทบาทในการแพร่โรค (Appel et al., 1974) มีรายงานพบอุบัติการณ์การติดเชื้อและเกิด โรคไข้หัดสุนัขได้ในสัตว์พวก large felid เช่น เสือ และสิงโต (Appel, 1987; Harder et al., 1996)

เมื่อสุนัขได้รับเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขซึ่งส่วนมาก ติดต่อผ่านทางระบบหายใจ จะสามารถตรวจพบเชื้อที่ต่อม น้ำเหลืองของหลอดลมและต่อมทอนซิลในวันแรกที่ ติดเชื้อ ในระหว่างวันที่ 6-9 สามารถพบเม็ดเลือดขาว โมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่ติดเชื้อได้ทั่วร่างกายที่สอดคล้อง กับอาการไข้ อาการป่วยของสุนัขหลังการติดเชื้อขึ้นกับ ระดับภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้าง การที่เชื้อไวรัสเข้าไปใน เซลล์เยื่อทั่วร่างกายทำให้สัตว์แสดงอาการป่วยของ หลายๆ ระบบในเวลาใกล้เคียงกัน (Appel, 1969) เช่น ระบบหายใจ เช่น มีน้ำมูกขึ้น หอบ หายใจลำบาก ระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องเสีย อาเจียน และระบบ ประสาทส่วนกลาง เช่น ชักเกร็ง (Appel, 1987)

ในการวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขทำได้หลายวิธีเช่น การตรวจหาระดับแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี serum neutralization test และ enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) และการตรวจหาเชื้อไวรัสในร่างกายจากสิ่งคัดหลั่งต่างๆ จากเซลล์เยื่อหูหรือจากเซลล์เม็ดเลือดขาวได้แก่ วิธี immunofluorescent antibody assay วิธี immunohistochemistry และวิธีการแยกเชื้อไวรัส การวินิจฉัยขั้นสุดหลังจากสุนัขตายโดยวิธีทางพยาธิวิทยา เช่น การปรากฏอินclusion bodies) ในเนื้อเยื่อสร้างเม็ดน้ำเหลือง เซลล์เยื่อหูของอวัยวะทั่วร่างกาย เซลล์ประสาท และเซลล์ก้ำจุนในสมองและไขสันหลัง เป็นต้น นอกจากนี้มีการนำวิธีทางอิมมูโน โนฮิสโตเคมีใช้ในการวินิจฉัยโรคซึ่งสามารถแสดงแอนติเจนของไวรัสไข้หัดสุนัขได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิค reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัข จากการใช้น้ำเยื่อของสัตว์ป่วยที่ติดเชื้อไข้หัดสุนัข โดยทำการตรวจหา NP gene ของเชื้อไวรัสที่อยู่ในเนื้อเยื่อ โดย Hass et al. (1991) ทำการตรวจหา Phocine distemper virus จากฟอสฟอโปรตีนในเนื้อเยื่อเมวน้ำที่ได้รับการติดเชื้อ Shin et al. (1995) ได้ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนอื่นจากตัวอย่างเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์และลิมโฟไซต์ที่พบในกระแสเลือดในสุนัขที่ป่วยเป็นโรคไข้หัดสุนัข

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้านี้ เพื่อทดสอบการใช้เทคนิค RT-PCR เป็นวิธีการวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขในสัตว์ป่วยและตายโดยใช้ตัวอย่างจากชิ้นเนื้อสด เพื่อศึกษาถึงประโยชน์ ประสิทธิภาพ และความแม่นยำ โดยทำการเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาและอิมมูโน โนฮิสโตเคมี

วัสดุและวิธีการ

สัตว์

คัดเลือกสุนัขที่แสดงอาการป่วย และวินิจฉัยอาการทางคลินิกว่าป่วยเป็นโรคไข้หัดสุนัขจำนวน 20 ตัว จากโรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยมิยาซากิ ประเทศญี่ปุ่น โดยสุนัขที่ศึกษาทุกตัวแสดงอาการป่วยอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งหมด ทางระบบทางเดินหายใจ เช่น ไอ หอบ หายใจลำบาก มีน้ำมูกขึ้น ระบบทางเดินอาหาร เช่น อาเจียน ท้องเสีย และระบบประสาท เช่น มีอาการชัก เก็บรวบรวมข้อมูล ประวัติ เพศ พันธุ์ อายุ ประวัติวัคซีน อาการทางคลินิกของสุนัขทุกตัว

พยาธิวิทยา

ชันสูตรซากสุนัขจำนวน 20 ตัว บันทึกรอยโรคทางมหัพยาศวิทยา และจุลพยาธิวิทยา โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ เช่น ปอด กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ตับ ม้าม ไต กระเพาะปัสสาวะ สมองและไขสันหลัง ต่อม้ำเหลืองที่หลอดลม (tracheo-bronchial lymph nodes) โดยแบ่งบางส่วนไปตรวจทาง RT-PCR และส่วนอื่นเก็บในน้ำยา 10% buffered formalin ผ่านกระบวนการทางฮิสโตวิทยาและนำมาตัดที่ความหนา 4 ไมครอน ย้อมด้วยสี hematoxylin & eosin (H&E) และ luxol fast blue สำหรับเนื้อเยื่อสมองและไขสันหลัง นำไปศึกษาโรคทางจุลพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

อิมมูโนโนฮิสโตเคมี

โดยวิธี Streptavidin-biotin complex method (SAB kit, Histofine, Nichirei, Tokyo, Japan) โดยใช้ primary antibody ชนิด rabbit polyclonal antibody against CDV strain Onderstepoort (Advanced Technology Lab, Oita, Japan) ที่ความเข้มข้น 1:300 นำมาทำปฏิกิริยากับ secondary goat anti-rabbit IgG antibody และ streptavidin-biotin complex kit ทำให้เกิดสีด้วย 0.05% DAB (3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride, Sigma, St. Louis, USA) ย้อมทับ

ด้วยสี Mayer's hematoxylin ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Palmer et al., 1990)

ปฏิกิริยาอุทกโซโพลิเมอร์ส (RT-PCR)

ในการทดลองครั้งนี้โดยใช้ Oligonucleotide primers จำนวน 2 คู่ คือ P1 (forward 5' TAGAC-GACCCTGATGTAAGC 3', reverse 5' CTAAATTC-TCGACCACACG 3') และ P2 (forward 5' -3', reverse 5' ACTGATGCAAGCCTGGTCTTGA 3') เป็น primer ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะกับสาย cDNA ของนิวคลีโอโปรตีนฮีน (NP gene specific primer) ของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข เสตรอน Onderstepoort (Shin et al., 1995) ตัวควบคุมบวก คือ Vero cell ที่ใส่เชื้อไข้หัดสุนัขเสตรอน Onderstepoort ปริมาณ 4×10^3 TCID₅₀ และตัวควบคุมลบ คือ Vero cell และน้ำกลั่น ขั้นตอน RT-PCR แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนย่อย ดังต่อไปนี้

1. การสกัด RNA จากชิ้นเนื้อสด โดยวิธี acid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform (Chomczynski and Sacchi, 1987) นำชิ้นเนื้อสดมาบดและผสมใน phosphate buffer saline (PBS) 300 ไมโครลิตร (μ l.) เติม lysis buffer (0.7% 2-Mercaptoethanol, Chaos buffer, 10X Phenol extraction buffer) จำนวน 450 μ l. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65^oซ นาน 30 นาที เติมสารละลายของ chloroform และ isoamyl alcohol ปริมาณ 250 μ l. และนำส่วนตะกอน RNA มาละลายด้วยน้ำกลั่น 5 μ l.

2. การสังเคราะห์ cDNA (Shin et al., 1995) สารละลายของ RNA จำนวน 5 μ l. จากขั้นตอน 1 เติม reverse primer (ความเข้มข้น 50 pmol.) จำนวน 1 μ l. ผสมให้เข้ากัน ทำให้อุ่นที่อุณหภูมิ 100^oซ นาน 1 นาที ทำให้เย็นทันที เตรียมส่วนผสม (ปริมาณต่อหนึ่งตัวอย่าง) น้ำกลั่น 6 μ l. 10 mM deoxynucleotide triphosphate mixture (dNTP mix) (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) 1 μ l. 10 mM dithiothreitol (DTT) 2 μ l. 40,000 units/ml. of RNase inhibitor (Toyobo Bio.,

Tokyo, Japan) 1 μ l. 200 U/ μ l. of M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL, New York, USA) 1 μ l. 5X buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 4 μ l. ผสมสารต่างๆให้เข้ากัน แบ่งส่วนผสมที่ได้ปริมาณ 15 μ l. ต่อหลอด เติมสารละลาย RNA จำนวน 5 μ l. นำเข้าเครื่อง PCR อัดโนมัติ (Gene Amp PCR System 2400; Perkin Elmer Inc., Norwalk, USA) ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ คือ อุณหภูมิ 37^oซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมาอุณหภูมิ 95^oซ นาน 5 นาที และสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 4^oซ

3. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR (Shin et al., 1995) เตรียม PCR master mix (ปริมาณต่อหนึ่งตัวอย่าง น้ำกลั่น 28.75 μ l. 2.5 mmol. dNTPs mix 5 μ l. 25 mmol. MgCl₂ 4.5 μ l. 10X Taq buffer (Boehringer Mannheim, East Sussex, UK) 0.5 μ l. Taq DNA Polymerase (Promega Corp., Madison, USA) 0.25 μ l. 50 pmol./ μ l. forward primer 0.5 μ l. 50 pmol./ μ l. reverse primer 0.5 μ l.) ผสมให้เข้ากันในปริมาณ 45 μ l. ต่อหลอด เติม cDNA ที่ได้จากขั้นตอน 2 ปริมาณ 5 μ l. นำเข้าเครื่อง PCR ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ดังนี้ ช่วงที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94^oซ นาน 5 นาที ช่วงที่ 2 มี 3 อุณหภูมิ สำหรับ 3 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR คือ อุณหภูมิ 94^oซ นาน 1 นาที สำหรับ DNA template denaturation อุณหภูมิ 60^oซ นาน 2 นาที สำหรับ primer annealing และอุณหภูมิ 72^oซ นาน 3 นาที สำหรับ primer extension จำนวนรอบของปฏิกิริยา 30 รอบ ช่วงที่ 3 ที่อุณหภูมิ 74^oซ นาน 7 นาที

การตรวจ PCR product โดยใช้ 1.2% agarose gel (Takara, Kyoto, Japan) ใน TAE buffer เปิดเครื่อง Mupid electrophoresis (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) โดยใช้ไฟขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 20-30 นาที ย้อมสีโดยใช้ 10% ethidium bromide ตรวจดูแถบ (band) ขนาดของ DNA ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และบันทึกภาพ

ผล

สุนัขที่ใช้ในการศึกษานี้จำนวน 20 ตัว พบอาการทางคลินิกที่แสดงออกในแต่ละระบบ ดังนี้ ระบบประสาท เช่น อาการชัก 55% (11/20) อาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่น ไอ หอบ มีน้ำมูกขึ้น 35% (7/20) อาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องเสีย อาเจียน 35% (7/20) และมีไข้สูง 60% (12/20) (ตารางที่ 1)

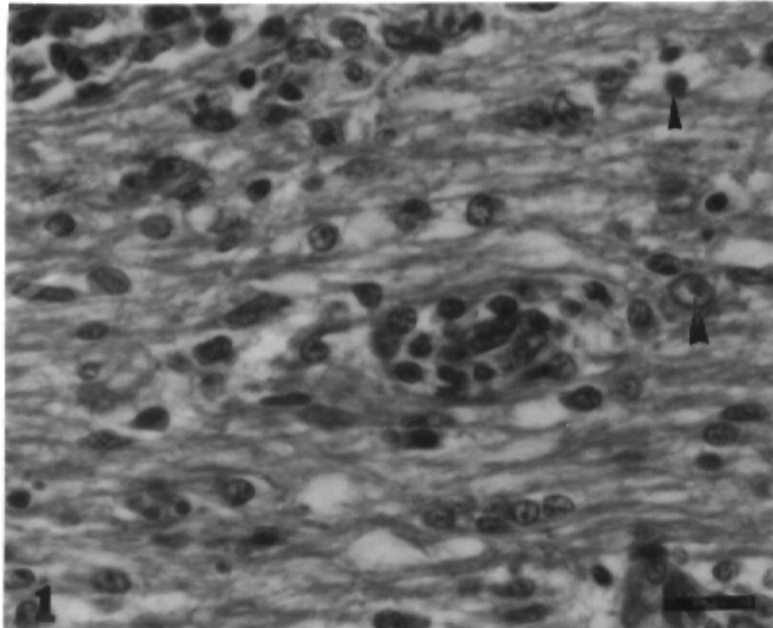
ผลการชันสูตรทางพยาธิวิทยา (ตารางที่ 2) สามารถวินิจฉัยว่าสุนัขป่วยและเสียชีวิตจากโรคไข้หัดสุนัข 70% (14/20) ระบบประสาทพบว่าส่วนใหญ่มีการอักเสบของสมอง เยื่อหุ้มสมองและไขสันหลังแบบไม่มีหนอง (non-suppurative meningoencephalomyelitis) 50% (10/20) ตรวจพบ inclusion bodies (IB) ในเซลล์ประสาท (neuron) และเซลล์ก้ำจุน (glial cell) 50% (10/20) (รูปที่ 1, 2, 3 และ 4) ระบบทางเดินหายใจส่วนใหญ่พบปอดอักเสบแบบ interstitial pneumonia 45% (9/20), suppurative bronchopneumonia 25% (5/20) และพบ IB ที่เซลล์เยื่อหุ้หลอดลมและผนังถุงลมฝอย 40% (8/20) ระบบทางเดินอาหารพบการอักเสบที่บริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้แบบมีเมือก (catarrhal gastroenteritis) 15% (3/20) และมีการอักเสบแบบเนื้อตาย (necrotizing gastroenteritis) 20% (4/20) นอกจากนี้ที่อวัยวะอื่นๆ เช่น ม้าม พบลักษณะของ lymphoid depletion หรือลักษณะ follicular necrosis 35% (7/20) พบการอักเสบที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณทางเดินอาหารและปอด 15% (3/20) จากตารางที่ 3 พบว่า สามารถตรวจหา IB ได้ที่อวัยวะตามระบบต่างๆ ดังนี้ ระบบประสาทส่วนกลาง 50% (10/20) ระบบหายใจ 40% (8/20) ระบบทางเดินอาหาร 24% (4/17) อวัยวะอื่นๆ 33% (6/18)

ผลทางภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมี (ตารางที่ 3) และพบว่าสามารถตรวจพบ IB ได้มากกว่าการตรวจแบบจุลพยาธิวิทยาทั่วไป โดยตรวจพบในระบบประสาทส่วนกลาง ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร

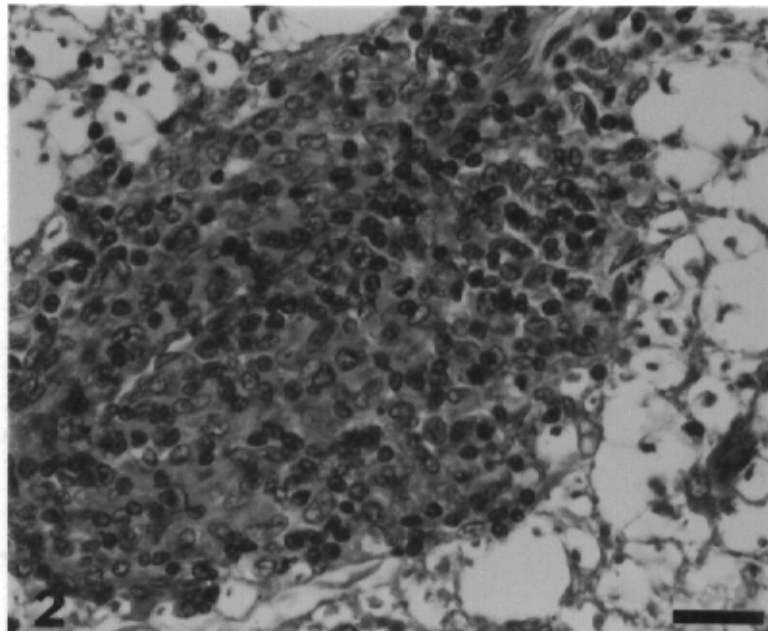
และอวัยวะส่วนอื่นๆ ได้ 85%, 58%, 40%, และ 38% ตามลำดับ โดยส่วนใหญ่พบแอนติเจนของไวรัสตามเซลล์เยื่อ เช่น ระบบทางเดินหายใจพบทั้งภายในนิวเคลียสและ/หรือไซโตพลาสซึมของเซลล์ alveolar epithelium, bronchial epithelium และ alveolar macrophage (รูปที่ 5 และ 6) ระบบประสาทพบทั้งภายในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของเซลล์ประสาท (neuron) และเซลล์ก้ำจุน (glial cell, microglia และ astrocytes) และบริเวณเส้นใยของเซลล์ประสาท ในระบบทางเดินอาหารพบทั้งภายในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อหุ้ผิวทางเดินอาหารและที่อวัยวะอื่น เช่น ม้ามพบกระจายอยู่ใน lymphoid cells ที่บริเวณส่วนของ white pulp (รูปที่ 7 และ 8)

ผลทางปฏิกิริยาภูทิวโพลีเมอเรส (ตารางที่ 3) พบว่าให้ผลบวกในเนื้อเยื่อของระบบประสาทส่วนกลาง ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และอวัยวะอื่นๆ ได้ 100%, 83%, 75% และ 80% ตามลำดับ (รูปที่ 9)

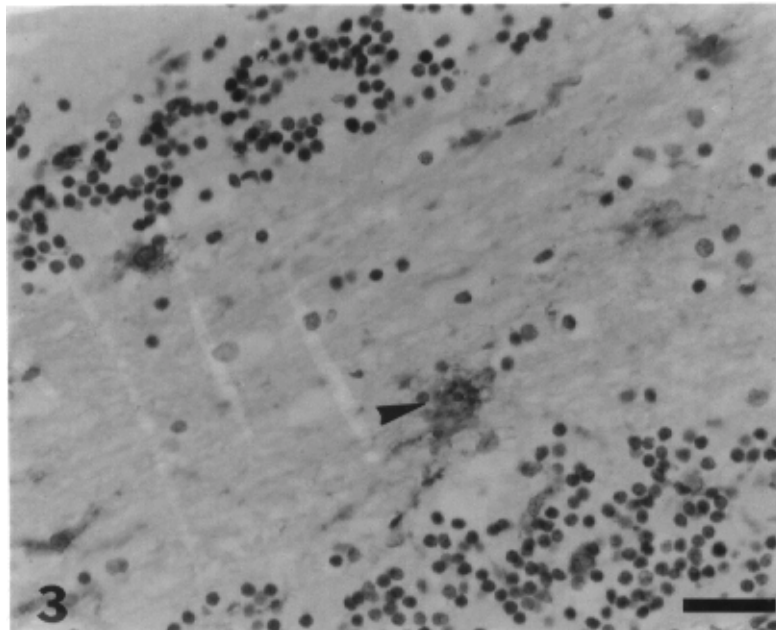
ผลของ RT-PCR มีความสอดคล้องกับผลทางจุลพยาธิวิทยาและภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมี (ตารางที่ 3) พบว่า 14 ตัวจาก 20 ตัว ให้ผลบวกกับทั้ง 3 วิธี นอกจากนี้ยังมีผลในแต่ละวิธีที่ไม่สอดคล้องกัน เช่น ในสุนัขตัวที่ 5 วิธีจุลพยาธิวิทยาตรวจไม่พบ IB แต่ตรวจพบเชื้อไข้หัดสุนัขได้โดยวิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมีและ RT-PCR ในสุนัขตัวที่ 7 ที่ระบบทางเดินหายใจ วิธีจุลพยาธิวิทยาตรวจไม่พบ IB และภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมีตรวจไม่พบแอนติเจนของไวรัส แต่ตรวจพบเชื้อด้วยวิธี RT-PCR ในสุนัขตัวที่ 9 ที่ระบบทางเดินหายใจ วิธี RT-PCR ตรวจไม่พบเชื้อแต่ตรวจพบด้วยวิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมี ในสุนัขตัวที่ 20 ที่ระบบประสาทส่วนกลาง วิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมีตรวจไม่พบแอนติเจนของไวรัส แต่ตรวจพบ IB ได้จากวิธีทางจุลพยาธิวิทยาและให้ผลบวกโดยวิธี RT-PCR ในสุนัขตัวที่ 16 มีเพียง RT-PCR เท่านั้นที่ตรวจพบเชื้อไข้หัดสุนัข



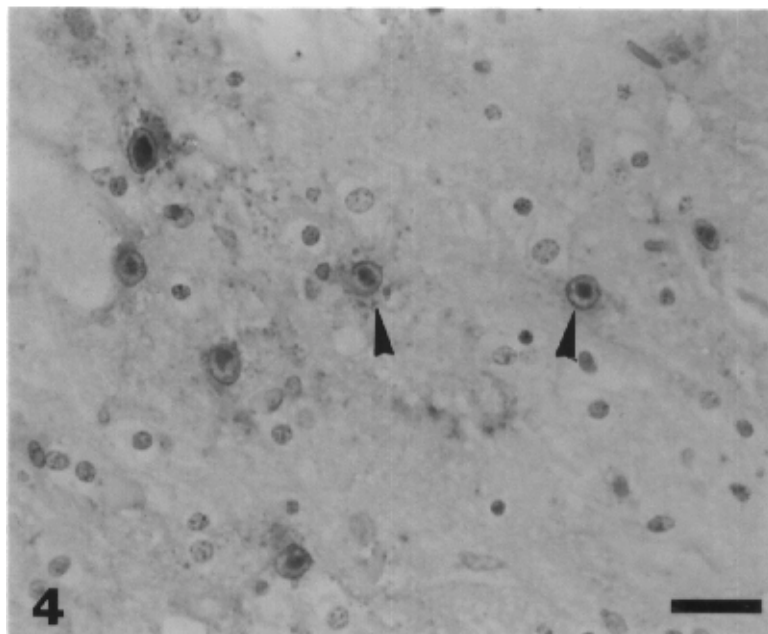
รูปที่ 1 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของก้านสมอง non-suppurative encephalitis with perivascular cuffing, demyelination, intranuclear IB (ลูกศรเล็ก) (HE, bar=20 μ m)



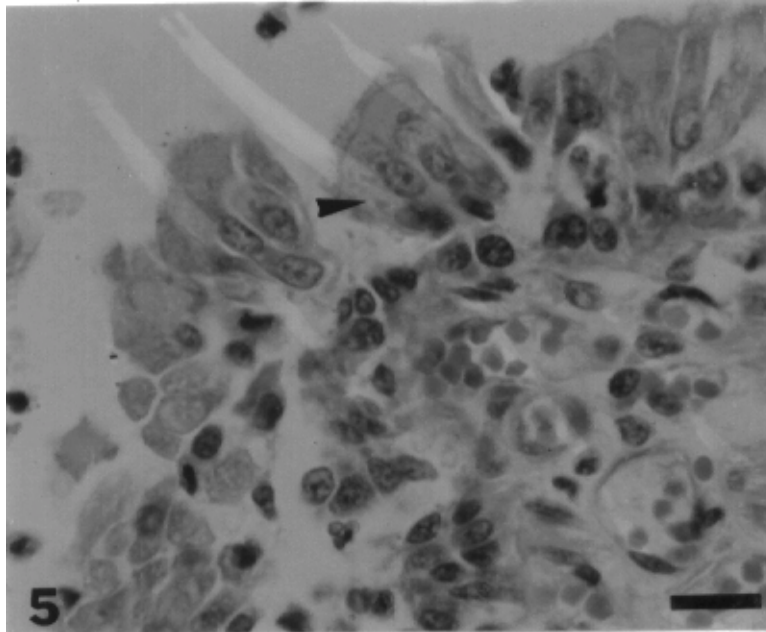
รูปที่ 2 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไขสันหลัง non-suppurative granulomatous myelitis with demyelination (HE, bar = 25 μ m)



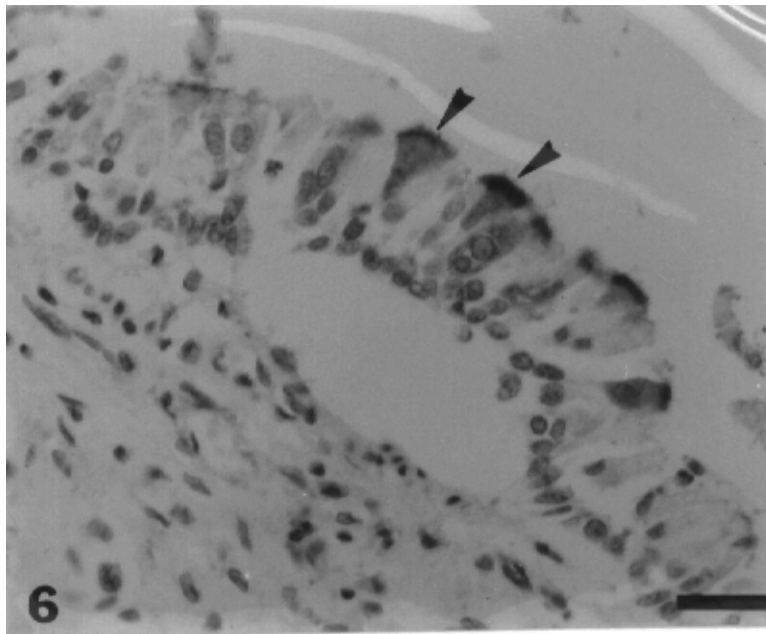
รูปที่ 3 แสดงแอนติเจนของไวรัสไข้หัดสุนัขภายในนิวเคลียส ไซโตพลาสซึม และเส้นใยประสาทของ glial cells (ลูกศร) ใน cerebellum (IHC, bar = 40 μ m)



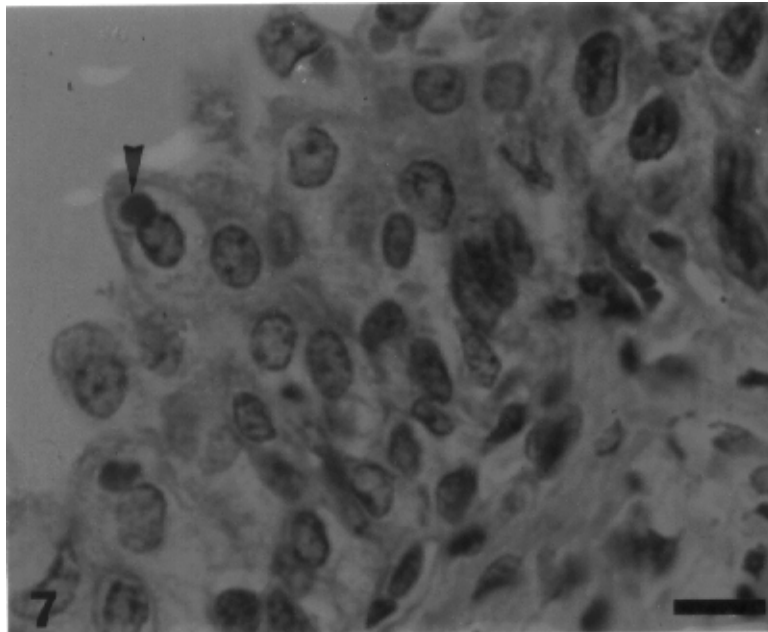
รูปที่ 4 แสดงแอนติเจนของไวรัสไข้หัดสุนัขภายในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม ของ neuron (ลูกศร) ที่ cerebellum (IHC, bar = 40 μ m)



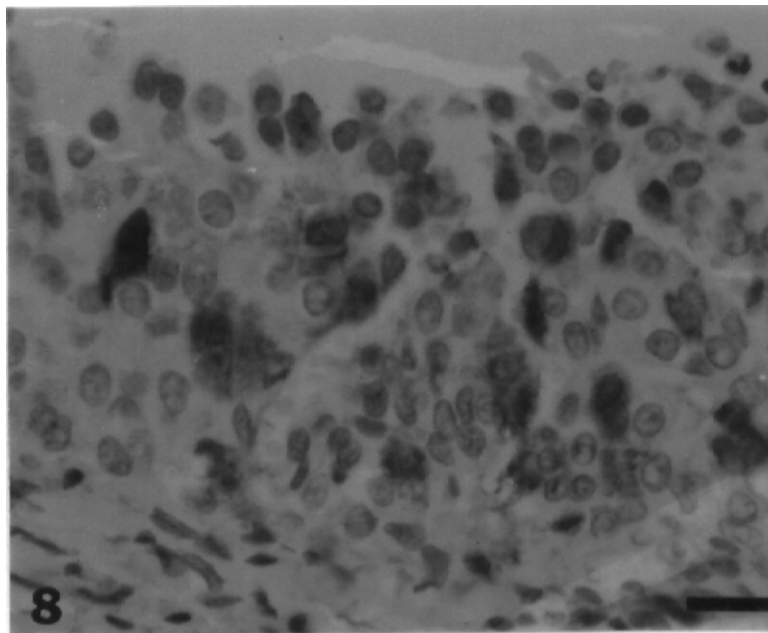
รูปที่ 5 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปอด แสดงอินคลูชันบอดีภายในเซลล์เยื่อหลอดเลือดฝอย (ลูกศร) (HE, bar = 20 μ m)



รูปที่ 6 แสดงแอนติเจนของไวรัสในเซลล์เยื่อหลอดเลือดฝอยภายในปอด (ลูกศร) (IHC, bar = 25 μ m)

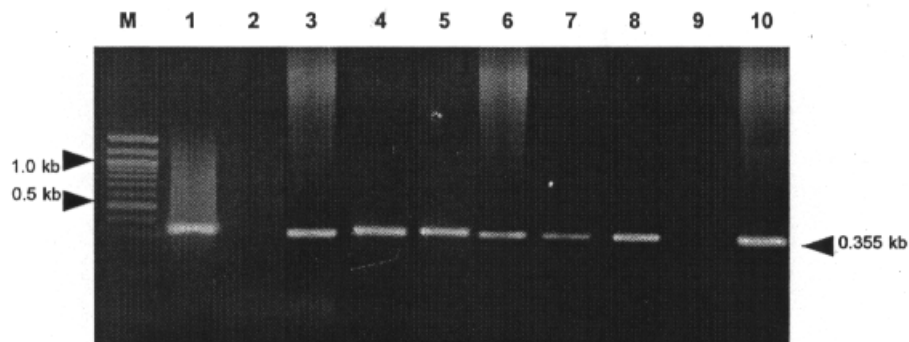


รูปที่ 7 รอยโรคทางจุลพยาธิ แสดงอินคลูชันบอดี ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ เยื่อบุกระเพาะปัสสาวะ (ลูกศร) (HB, bar = 10 μ m)



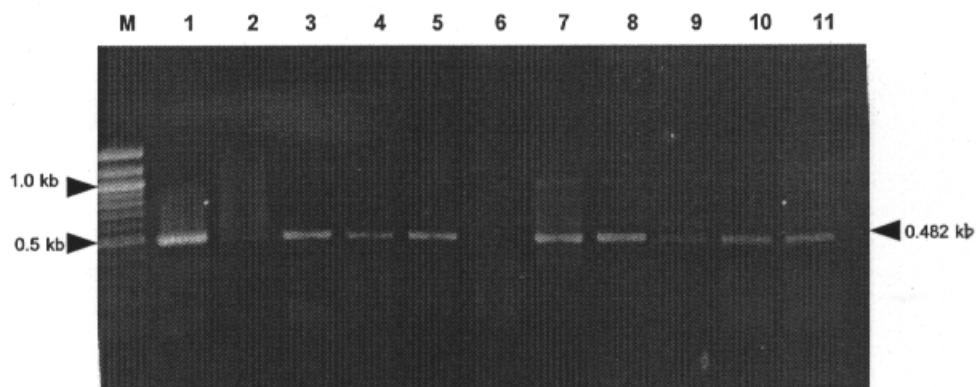
รูปที่ 8 แสดงแอนติเจนของไวรัสในเซลล์เยื่อบุของกระเพาะปัสสาวะ (IHC, bar = 20 μ m)

รูปที่ 9A แสดงตัวอย่างผลการตรวจหาส่วนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนชั้นโดยวิธี RT-PCR โดยใช้ primer P1 จากชิ้นเนื้อสดของสุนัขหมายเลข 12



(M: 100 bp DNA ladder marker, Lane 1: positive control (CDV-infected vero cells), Lane 2: negative control (น้ำกลั่น) Lane 3: cerebrum, Lane 4: cerebellum, Lane 5: spinal cord, Lane 6: lung, Lane 7: tracheobronchial lymph node, Lane 8: stomach, Lane 9: spleen, Lane 10: urinary bladder)

รูปที่ 9B แสดงตัวอย่างผลการตรวจหาส่วนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนชั้นโดยวิธี RT-PCR โดยใช้ primer P2 จากชิ้นเนื้อสดของสุนัขหมายเลข 12



(M: 100 bp DNA ladder marker, Lane 1: positive control (CDV-infected vero cells), Lane 2: cerebrum, Lane 3: cerebellum, Lane 4: spinal cord, Lane 5: lung, Lane 6: negative control (น้ำกลั่น), Lane 7: tracheobronchial lymph node, Lane 8: stomach, Lane 9: spleen, Lane 10: urinary bladder, Lane 11: mesenteric lymph node)

ตารางที่ 1 แสดงประวัติของสุนัขและอาการที่แสดงออก

สุนัขตัวที่	พันธุ์	อายุ	เพศ	ประวัติและอาการทางคลินิก
1	Shiba-ken	3 mos.	F	No vaccination, fever, pneumonia, diarrhea
2	Mongrel	8 mos.	M	No vaccination, diarrhea, vomiting, convulsion, hard pad
3	Mongrel	16 yrs.	M	Cannot stand, ascites
4	Shetland Sheepdog	4 mos.	M	Vaccination, convulsion
5	Shitzu	3 mos.	F	No vaccination, fever, IgM 200 IgG 25, pneumonia, nervous sign
6	Labrador Retriever	2 mos.	M	Fever, IgM 100 IgG <25, diarrhea, convulsion, purulent ocular discharge, hard pad
7	Mongrel	1 yr. 5 mos.	M	Fever, vomiting, cramping
8	Shetland Sheepdog	2 mos.	F	Fever, nasal discharge
9	Shetland Sheepdog	3 mos.	F	Fever, nasal discharge
10	Labrador	3 mos.	F	Fever, leukocytosis, mild diarrhea, spasm of Rt. posterior leg, nervous sign
11	Shiba-ken	2 mos.	F	Fever, diarrhea, cramp of jaw, nervous sign, ocular discharge
12	Irish Setter	4 mos.	M	Fever, cough, diarrhea, cramp of jaw, purulent ocular discharge
13	Golden Retriever	2 mos.	M	Coccidial enteritis
14	Duchshund	4 mos.	M	Vaccination, fever, cough, nasal discharge, conjunctivitis, nervous sign
15	Duchshund	4 mos.	M	Fever, cough, purulent ocular discharge
16	Duchshund	3 mos.	M	Fever, ocular discharge
17	Burnese Mountain	3 mos.	F	No vaccination, diarrhea, mild nervous sign
18	Maltese	4 mos.	F	Progressive nervous sign
19	Duchshund	2 mos.	M	Lost activity
20	Mongrel	2 mos.	F	No vaccination, fever, nasal discharge, vomiting, diarrhea

ตารางที่ 2 แสดงผลทางจุลพยาธิวิทยา

สุนัขตัวที่	จุลพยาธิวิทยา*
1	NS-MEM with IB, interstitial pneumonia with IB, splenic lymphoid depletion with IB and follicular necrosis
2	NS-GMEM with IB, lung congestion, plasmacytic lymphadenitis
3	NS-ME, interstitial pneumonia with IB
4	NS-MEM with IB and demyelination, bronchopneumonia, membranous glomerulonephritis and cystitis, splenic follicular necrosis
5	NS-NMEM, severe acute broncho-interstitial pneumonia with IB, catarrhal enteritis, splenic follicular necrosis
6	NS-MEM with IB, interstitial pneumonia with IB, IB in urinary bladder
7	NS-MEM, lung edema, proliferative glomerulonephritis
8	Suppurative bronchopneumonia
9	Severe muco-purulent bronchopneumonia
10	NS-MEM with IB and demyelination, extramedullary hemopoiesis in spleen, interstitial pneumonia, IB in urinary bladder
11	NS-MEM with IB, pneumonia with IB, catarrhal gastritis with IB, splenic follicular necrosis
12	NS-MEM with IB, broncho - interstitial pneumonia with IB, lymphadenitis with IB, necrotizing enteritis
13	Bronchopneumonia, catarrhal gastroenteritis, lymphadenitis, splenic follicular necrosis
14	NS-MEM with IB, chronic interstitial pneumonia, necrotizing enteritis
15	NS-MEM, interstitial pneumonia with IB, cystitis with IB, splenic follicular necrosis
16	S-ME, multifocal pneumonia, lymphadenitis
17	Necrotizing suppurative pneumonia, chronic necrotizing enteritis, splenic follicular necrosis
18	NS-MEM, demyelination, lung congestion, extramedullary erythropoiesis of spleen
19	Suppurative bronchopneumonia with IB
20	NS-ME with IB, interstitial pneumonia

*หมายเหตุ IB: viral inclusion body, NS-ME: non-suppurative meningoencephalitis, NS-MEM: non-suppurative meningoencephalomyelitis, NS-GMEM: non-suppurative granulomatous meningoencephalitis, NS-NMEM: non-suppurative necrotizing meningoencephalomyelitis, S-ME: suppurative meningoencephalitis

ตารางที่ 3 แสดงผล viral inclusion body, อิมมูนโนฮิสโตเคมี และ RT-PCR

สุนัขตัวที่	ระบบประสาทส่วนกลาง			ระบบทางเดินหายใจ			ระบบทางเดินอาหาร			UB, spleen, Tracheo-bronchial LN		
	IB	IHC	RT-PCR	IB	IHC	RT-PCR	IB	IHC	RT-PCR	IB	IHC	RT-PCR
1	+	+	ND	+	+	+	+	ND	ND	+	+	ND
2	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	+	+	ND	+	+	+	-	-	ND	-	-	ND
4	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
5	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+(UB)
8	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
9	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	+	+	ND	ND	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	ND	+(UB)
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
15	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+(spleen)
17	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	+	+	-	-	ND	-	ND	ND	-	-	ND
19	-	+	+	+	+	+	-	+	+	ND	ND	+
20	+	-	+	-	-	+	ND	ND	+	-	-	+
รวม	50%	85%	100%	40%	58%	83%	24%	40%	75%	33%	38%	80%

หมายเหตุ : + : positive, - : negative, ND : not done, IB :viral inclusion body, IHC : immunohistochemistry, RT-PCR : reverse transcriptase polymerase chain reaction, UB : urinary bladder, LN : lymph node

วิจารณ์

รอยโรคที่พบส่วนใหญ่มีความสอดคล้องกับรอยโรคไข้หัดสุนัข เช่น สมองอักเสบแบบไม่มีหนอง demyelination บางรายตรวจพบ IB แสดงให้เห็นว่าไข้หัดสุนัขได้กระจายไปสู่สมองซึ่งจะพบลักษณะ lymphocytic perivascular cuffing ที่เยื่อหุ้มสมองและเนื้อสมอง gliosis และ demyelination การที่ไข้ไวรัสผ่านไปยังสมองได้เนื่องจากไข้ไวรัสที่อยู่เป็นอิสระในกระแสเลือดผ่านทาง endothelial cells ในสมอง หรือจากการกระจายตัวของโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่มีไข้หัดสุนัขเข้าสู่สมองทาง blood-brain barrier (Krakowka et al., 1980; Jubb et al., 1993) สุนัข 12 ตัวพบรอยโรคที่แสดงถึงระยะท้ายของโรค คือ พบการอักเสบและ demyelination ของระบบประสาทส่วนกลาง (Bernard et al., 1993) ในระบบทางเดินอาหารและทางเดินหายใจพบมีการกระจายของไข้ไวรัสเข้าไปในเซลล์เยื่อหู จึงมีผลทำให้เกิดการอักเสบขึ้นกับอวัยวะนั้นๆ และตรวจพบอินคลูชันบอดีได้ง่าย (Jubb et al., 1993; Nelson and Guillermo, 1998)

ผลทางภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมีสอดคล้องกับผลทางจุลพยาธิวิทยาโดยพบประมาณ 80% ของจำนวนตัวอย่าง เช่น รอยโรค follicular necrosis ของม้ามร่วมกับการตรวจพบ IB ในเซลล์ lymphocyte สอดคล้องกับรายงานการตรวจพบแอนติเจนของไวรัสโดยเฉพาะใน T-cell lymphocyte (Iwatsuki et al., 1995) ในระบบประสาทส่วนกลาง แอนติเจนของไวรัสที่ตรวจพบจะกระจายอยู่ตามเซลล์ประสาทและเซลล์ก้ำจุน แสดงให้เห็นถึงการกระจายของไข้หัดสุนัขไปยังเซลล์เป้าหมายในสมอง โดยที่เซลล์ดังกล่าวนี้เป็นเซลล์เป้าหมายสำหรับการเพิ่มจำนวนของไข้ไวรัส (Zurbriggen and Vandeveld, 1983) ซึ่งเริ่มพบได้ในระหว่างวันที่ 6-9 ของการติดเชื้อ (Appel, 1987; Nelson and Guillermo, 1998)

ผล RT-PCR พบว่า สุนัข 14 ตัวมีการติดเชื้อไข้หัดสุนัขสามารถทำการวินิจฉัยได้จากวิธีจุลพยาธิวิทยา

ภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมี และ RT-PCR และมีจำนวน 5 ตัวถูกวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อจากวิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมี และ RT-PCR ผลวินิจฉัยในบางรายให้ผลไม่สอดคล้องกัน เช่น ในสุนัขตัวที่ 5 ที่ระบบประสาทส่วนกลาง วิธีทางจุลพยาธิวิทยาตรวจไม่พบ IB แต่ตรวจพบโดยวิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมี และ วิธี RT-PCR ในสุนัขตัวที่ 7 สมองอักเสบแบบไม่มีหนอง และสามารถตรวจพบไข้หัดสุนัขด้วยวิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมีและ RT-PCR แสดงถึงสุนัขตัวนี้มีการติดเชื้อไข้หัดสุนัขที่สมองและป่วยเป็นโรคไข้หัดสุนัขเพียงแต่ตรวจไม่พบ IB และแอนติเจนของไวรัสที่ปอด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสายพันธุ์ไวรัสและความต้านทานการติดเชื้อของเซลล์เป้าหมาย (Comwell, 1991) หรืออาจมีไข้ในปริมาณที่น้อยจึงสามารถตรวจพบด้วยวิธี RT-PCR เท่านั้น ในสุนัขตัวที่ 9 พบการอักเสบของสมองแบบไม่มีหนอง และตรวจพบไข้หัดสุนัขด้วยวิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมีและ RT-PCR แสดงถึงสุนัขตัวนี้มีการติดเชื้อไข้หัดสุนัข แต่การที่ไม่สามารถตรวจพบไข้ที่ปอดด้วยวิธี RT-PCR นั้น อาจเป็นเพราะบริเวณที่เก็บตัวอย่างไม่ตรงกับจุดที่เกิดรอยโรค ดังนั้นการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ตัวอย่างที่เก็บมาตรวจควรมีปริมาณมากพอ และควรเก็บบริเวณที่พบรอยโรคชัดเจน (Hass et al., 1991)

RT-PCR ให้ผลบวกในอวัยวะอื่นๆ เช่น ปอด เยื่อหูทางเดินอาหาร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสุนัขตัวนี้มีการติดเชื้อไข้หัดสุนัขจริงส่วนการที่ไม่พบไข้หัดสุนัขที่ปอดด้วยวิธีตรวจทางภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมี เนื่องจากวิธีดังกล่าวอาจให้ผลลบลงได้ โดยเฉพาะในรายที่เป็นโรคแบบกึ่งเฉียบพลันหรือแบบเรื้อรัง (Shin et al., 1995)

สรุปได้ว่า วิธี RT-PCR ให้ผลบวกในสัดส่วนที่สูงกว่าอีก 2 วิธี (ตารางที่ 3) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธี RT-PCR ที่สามารถตรวจพบไข้ไวรัสในปริมาณน้อยที่ระดับความความเข้มข้นอย่างน้อย 4×10^3 TCID₅₀ การตรวจไข้หัดสุนัขโดยวิธี RT-PCR ควรเก็บตัวอย่างให้มีความสัมพันธ์กับรอยโรค ปริมาณ

มากพอ และหลายตำแหน่ง โดยเฉพาะในกรณีที่สัตว์ป่วยในระยะแรกหรือเชื้อไม่ได้เข้าสู่ระบบประสาท จากนั้นควรตรวจอวัยวะอื่นๆ ที่เป็นอวัยวะเป้าหมายของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข เช่น ปอด กระเพาะปัสสาวะ ลำไส้ เป็นต้น โดยเฉพาะการตรวจสัตว์ที่ป่วยในระยะต้น (Hass et al., 1991)

สำหรับการทดลองครั้งนี้ได้นำเทคนิค RT-PCR มาวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขในสัตว์ที่ป่วยและตาย เพื่อประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยยืนยันร่วมกับผลทางจุลพยาธิวิทยา อิมมูโนฮิสโตเคมี และใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการตรวจได้จากสัตว์ติดเชื้อในระยะต้นๆ ในเซลล์อื่นๆของร่างกาย เช่น การตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ในกระแสเลือด สิ่งคัดหลั่ง หรือน้ำไขสันหลัง อันจะเป็นประโยชน์ทำให้วินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขได้รวดเร็วขึ้นและ สามารถทำการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขในขณะที่สัตว์ยังมีชีวิต

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, Institute for Public Health and Environment of Miyazaki Prefecture, Japan ช่วยเหลือทางด้านเทคนิค RT-PCR อ.น.สพ. ทนง อัสวกาญจน์ น.สพ. อนุชา พรพัฒน์เกียรติ และ น.สพ. ทนง เขมกุล ช่วยเหลืองานด้านห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

Appel, M.J.G. 1969. Pathogenesis of canine distemper. *Am. J. Vet. Res.* 30: 1167-1182.
 Appel, M.J.G., Sheffy, B.E., Percy, D.H. and Gaskin, J.M. 1974. Canine distemper virus in

domesticated cats and pigs. *Am. J. Vet. Res.* 35: 803-806.
 Appel, M.J.G. 1987. Canine distemper virus. In: *Virus Infections of Carnivores: Virus Infection of Vertebrates*, Vol.1. Elsevier Science, Amsterdam. 133-159.
 Bernard, A., Montange, M.F., Bencsik, A., Giraudon, P., Wild, T.F., Confavreux, C. and Belin, M.F. 1993. Brain structures selectively targeted by canine distemper virus in a mouse model infection. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52(5): 471-480.
 Cornwell, H.J.C. 1991. Distemper specific infections. In: *Canine Medicine and Therapeutics*. 3rded. Blackwell, Oxford. 496-505.
 Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
 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.
 Harder, T.C., Kenter, M., Vos, H., Siebelink, K., Huisman, W., Amerongen, van G., Orvell, C., Barrette, T., Appel, M.J.G. and Osterhaus, A.D.M.E. 1996. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol.* 77: 397-405.

- 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.
- Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Nigel, P. 1993. The respiratory system. In: *Pathology of Domestic Animals*. Vol.2 4thed. Academic press, San Diago. 613.
- Krakovka, S., Higgins, R.J. and Metzler, A.E. 1980. Plasma phase viremia in canine distemper virus infection. *Am. J. Vet. Res.* 41(1): 144-146.
- Nelson, R.W. and Guillermo, C.C. 1998. Canine distemper. In: *Small Animal Internal Medicine*. 2nded. Mosby, U.S.A. 1286-1294.
- Palmer, D.G., Huxtable, C.R.R. and Thomas, J.B. 1990. Immunohistochemical demonstration of canine distemper virus antigen as an aid in the diagnosis of canine distemper encephalomyelitis. *Res. Vet. Sci.* 49: 177-181.
- 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.
- Zurbriggen, A. and Vandeveld, M. 1983. Canine distemper virus- induced glial cell changes *in vitro*. *Acta. Neuropathol.* 62: 51-58.