


การตรวจหาไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่างทางคลินิกโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส



นางสาวพุลทรัพย์ รุ่งนิศากร

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-670-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF CANINE DISTEMPER VIRUS
IN CLINICAL SAMPLES



Miss Poonsup Rungnisakorn

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-346-670-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่างทางคลินิกโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอร์เรส
โดย	นางสาวพุลทรัพย์ รุ่งนิศากร
ภาควิชา	พยาธิวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร. คณิตศักดิ์ อรวีระกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.เล็ก อัสวาลังชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิตศักดิ์ อรวีระกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.วัฒนา วัฒนวิจารย์)

..... กรรมการ
(อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.อนุเทพ รังสีพิพัฒน์)

นางสาวพูลทรัพย์ รุ่งนิศากร : การตรวจหาไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่างทางคลินิกโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส. (POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF CANINE DISTEMPER VIRUS IN CLINICAL SAMPLES) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิตศักดิ์ อรวีระกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ , 56 หน้า. ISBN 974-346-670- 3.

ทำการศึกษากาโรวินิจฉัยในสุนัขป่วยที่มีอาการสงสัยว่าเป็นไข้หัดสุนัขจำนวน 65 ตัว โดยใช้ตัวอย่างพลาสมาและ buffy coat ณ ขณะที่ป่วยด้วยวิธีการตรวจคือ การเพาะแยกเชื้อไวรัสการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะชนิดIgM โดยวิธีELISA และการตรวจหากรดนิวคลีอิกของไวรัสไข้หัดสุนัข โดยวิธีnested-reverse transcriptase polymerase chain reaction(nested RT-PCR) ผลที่ได้พบว่าจากตัวอย่างดังกล่าว ไม่สามารถทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสได้จากตัวอย่าง ใน IgM antibody ให้ผลบวกจำนวน 23/65 ตัวอย่าง (35.38%) ซึ่งสุนัขส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ การตรวจด้วย nested RT-PCR ในพลาสมาให้ผลบวกจำนวน 14/65 ตัวอย่าง(21.53%) ซึ่งอยู่ในกลุ่มอาการทางระบบทางเดินหายใจร่วมกับทางเดินอาหารทั้งหมด ส่วนใน buffy coat ให้ผลบวก 56/65(86.15%) โดยสามารถตรวจพบได้ทุกช่วงอาการของสัตว์ป่วย ผลการศึกษาแสดงถึงศักยภาพที่จะนำเทคนิค nested RT-PCR มาใช้ในการวินิจฉัยโรคไวรัสไข้หัดสุนัข ซึ่งตัวอย่างที่นำมาตรวจควรที่จะเป็นตัวอย่างที่มาจาก buffy coat

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาพยาธิวิทยา
สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4075559031 : MAJOR Pathobiology

KEY WORD: Canine Distemper Virus / nested RT-PCR / Clinical samples / Detection /

Poonsup Rungnisakorn : THESIS TITLE. (POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF CANINE DISTEMPER) THESIS ADVISOR : Assoc. Prof. Dr. Kanisak Oraveerakul, THESIS COADVISOR : Prof. Dr.Yong Poovorawan, 56 pp. ISBN 974-346-670-3.

Diagnosis of canine distemper virus was studied in 65 clinical canine distemper suspected dogs: Plasma and buffy coat were collected during clinical presentation. Virus isolation in vero cell line, IgM antibodies detected by ELISA and viral RNA detected by nested RT-PCR were included. CDV was not recovered in the isolation. IgM antibodies were detected in 35.38% of samples(23/65) which mostly appeared in dogs with respiratory and gastrointestinal signs. Nested RT-PCR method revealed viral RNA in plasma 21.53% of samples (14/65) among dogs with respiratory and gastrointestinal signs. In buffy coat samples, viral RNA were evident 86.15% of samples (56/65) from those with CDV sign observed. The results suggest a potential of developing nested RT-PCR method for diagnosis of various clinical CDV infection.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Pathology

Field of study Veterinary Pathobiology

Academic year 2000

Student's signature

Advisor's signature

Co-advisor's signature

Poonsup Rungnisakorn
Dr.
Yong Poovorawan

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและหน่วยงานต่างๆ ดังนี้

รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร. คณิตศักดิ์ อรวีระกุล และศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาพร้อม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ ด้วยดีมาตลอด

คณาจารย์ทุกท่านในคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

เจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยไวรัสวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาในคำแนะนำและความรู้ในงานวิจัยครั้งนี้

คุณอภิรดี เทียมบุญเลิศและเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยไวรัสตับอักเสบ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและความรู้ในงานวิจัยครั้งนี้

โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นายสัตวแพทย์ สุวิทย์ กัมทรทิพย์ ตลอดจนสัตวแพทย์ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยในการเก็บตัวอย่าง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่1 บทนำ	1
บทที่2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	17
บทที่4 ผลการทดลอง	24
บทที่5 สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ	35
รายการอ้างอิง	40
ภาคผนวก	47
ประวัติผู้เขียน	56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

1	ตารางการจำแนกกลุ่มสุนัขที่สงสัยใช้เห็ดสุนัขจำนวน 65 ตัวอย่าง24 และสุนัขปกติจำนวน 23 ตัวอย่าง รวม 88 ตัวอย่าง	24
2	แสดงผลการตรวจระดับแอนติบอดีชนิด IgM ต่อไวรัสใช้เห็ดสุนัข โดยวิธี ELISA.....26	26
3	แสดงผลการตรวจแอนติบอดีชนิด IgM ต่อไวรัสใช้เห็ดสุนัขที่ให้ผลตัดสินไม่ได้.....27 แยกตามวันที่ตรวจพบอาการทางคลินิก	27
4	แสดงผลการตรวจแอนติบอดีชนิด IgM ต่อไวรัสใช้เห็ดสุนัขที่ให้ผลบวก.....27 แยกตามกลุ่มอาการทางคลินิก	27
5	แสดงผลการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP ของไวรัสใช้เห็ดสุนัข.....31 จากตัวอย่างพลาสมาโดยพิจารณาตามกลุ่มอาการทางคลินิก	31
6	แสดงผลการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP ของไวรัสใช้เห็ดสุนัขจาก.....32 ตัวอย่างพลาสมาในกลุ่มที่แสดงอาการทั้งหมด พิจารณาตามจำนวนวันที่ ตรวจพบอาการทางคลินิก	32
7	แสดงผลการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP ของไวรัสใช้เห็ดสุนัข.....33 ด้วยวิธี nested RT-PCR จากตัวอย่าง buffy coat ของเลือดสุนัข โดยพิจารณาแบ่งตามกลุ่มอาการทางคลินิก	33
8	แสดงผลการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP ของไวรัสใช้เห็ดสุนัข.....34 ด้วยวิธี nested RT-PCR จากตัวอย่าง buffy coat ของเลือดสุนัข โดยพิจารณาตามช่วงวันที่ตรวจพบอาการทางคลินิก	34

สารบัญภาพ

	หน้า
1	พยาธิกำเนิดของไวรัสไข้หัดสุนัข.....12
2	การตอบสนองของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัข13
3	โครงสร้างระดับโมเลกุลของไวรัสไข้หัดสุนัข14
4	ยีนโนมของไวรัสไข้หัดสุนัข ขยายในส่วนยีน NP.....15
5	ขั้นตอนการทำ nested RT-PCR.....16
6	แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดลอง.....23
7	กราฟแสดงผล IgM ELISA.....26
8	ความไวของวิธี nested RT-PCR ในการตรวจหา RNA.....28 ของไวรัสไข้หัดสุนัขเสตรน Onderstepoort
9	แสดงขนาดของผลผลิตของ nested RT-PCR ในการตรวจหา30 RNA genome ส่วนยีน NP ของไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่าง พลาสมาของสุนัข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไข้หัดสุนัขเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (Canine Distemper Virus; CDV) เป็น single stranded RNA จัดอยู่ในตระกูล Paramyxoviridae มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ measles และ rinderpest viruses โดยจัดอยู่ในจีนัส morbillivirus (Robert and Daniel, 1996) อาการของโรคที่พบได้ คือ มีไข้ ซึม ถ่ายเหลว มีตุ่มหนองหรือผื่นแดงขึ้นบริเวณใต้ท้อง มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ อาการทางระบบประสาทและสัตว์ป่วยตายลง ด้วยสาเหตุเนื่องจากตัวไวรัสเองหรือภาวะการติดเชื้อแทรกซ้อนอันเป็นผลจากการกดภูมิคุ้มกัน ที่เกิดจากเชื้อไวรัสดังกล่าว (Theodore, 1987)

โดยทั่วไปการวินิจฉัยทางคลินิกอาศัยอาการที่ปรากฏในสุนัข ส่วนการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันว่าเป็นไข้หัดสุนัขทำได้ด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสโดยตรงด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent Antibody Test, FA) การตรวจหา inclusion body เช่น จากเนื้อเยื่อปอด กระเพาะปัสสาวะ ต่อมน้ำเหลือง โดยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา การแยกพิสูจน์เชื้อไวรัส ซึ่งอาจทำได้โดยการฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง และการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง วิธีการดังกล่าวได้ในตัวอย่างซึ่งได้มาจากขณะสัตว์มีชีวิตหรือตายแล้ว การตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา โดยการตรวจหาซีรัมแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัข โดยวิธี serum neutralization และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ทำได้ในขณะสัตว์มีชีวิตอยู่ (สงคราม, 2533; Blixenkron-Moller *et al.*, 1991)

การตรวจวินิจฉัยโดยสังเกตอาการทางคลินิกในขณะสุนัขยังมีชีวิตอยู่หากสุนัขมีลักษณะการติดเชื้อแบบ classical CDV การวินิจฉัยโรคจะทำได้ค่อนข้างง่าย แต่ส่วนใหญ่จะพบว่าอาการไม่ชัดเจนทำให้การวินิจฉัยโรคโดยวิธีดังกล่าวทำได้ยาก การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่พบว่ามีข้อจำกัดในแต่ละวิธี คือ การตรวจหาแอนติเจนโดยตรงโดยวิธี FA test อาจตรวจไม่พบแอนติเจนหากเป็นโรคที่เกิดมานานและการอ่านผลต้องอาศัยความชำนาญ การแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นต้องใช้เวลา 2-3 สัปดาห์และไม่ค่อยประสบความสำเร็จเนื่องจากขาดเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีความไวรับต่อไวรัสที่เกิดโรคจากเนื้อเยื่อสัตว์ป่วยโดยตรง อาจต้องมีการปรับให้ไวรัสเพิ่มจำนวนให้ได้ในเซลล์ดังกล่าวเช่น vero cell หรือเซลล์ที่มีความไวต่อไวรัสเช่น primary lung macrophage มีความไวรับดีกว่า แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องเตรียมจากสุนัขที่ปลอดเชื้อ (SPF) ส่วนการแยกเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลองมีข้อ

จำกัดที่ต้องใช้สุนัขที่เป็นสุนัขที่ปลอดเชื้อเช่นกัน การตรวจทางซีรั่มวิทยา เช่น serum neutralization มีข้อจำกัดในการอ่านผลในสุนัขได้รับการฉีดวัคซีนและมีระดับของ neutralizing antibodies สูง ส่วน ELISA นั้นจะเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจ ซึ่งอาศัยการเลือกตรวจหา IgM และ IgG antibodies อย่างไรก็ตามถ้าสุนัขนั้นมีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic distemper) ซึ่งมีการลดลงของ IgM จะทำให้การอ่านผลผิดพลาดได้ (Shin et al., 1991)

วิธีการทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาที่มีการพัฒนากันอย่างแพร่หลาย คือ วิธีการที่จะตรวจหา กรดนิวคลีอิกของไวรัสโดยตรง ซึ่งรวดเร็ว และแม่นยำในการวินิจฉัย ในปี 1995 Shin และคณะ ได้ทำการทดลองตรวจหานิวคลีโอโปรตีนเยื่อหุ้มของไวรัสไข้หัดสุนัขใน mononuclear cells จากตัวอย่างเลือดโดยวิธี RT-PCR ซึ่งให้ผลที่ดีและมีความแม่นยำ รวดเร็วในการตรวจ แต่วิธีนี้มีขั้นตอนการแยกเม็ดเลือดขาวที่ยุ่งยาก สิ้นเปลือง และในขั้นตอน RT-PCR ต้องใช้ primers จับที่ตำแหน่งต่างกัน 2 ที่ โดยใช้ primer 2 คู่แยกเป็น 2 reaction และผลที่ได้บางครั้งไม่สอดคล้องกันกับวิธีการอื่น เช่น การทำ serum neutralization ให้ผลบวกแต่ผลการตรวจจากการทำ RT-PCR ในผลลบ จึงน่าจะได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจดังกล่าวและประยุกต์ใช้ในการตรวจหาหลักฐานการติดเชื้อไวรัสโดยตรงจากตัวอย่างที่ได้จากสัตว์ป่วยที่ยังมีชีวิตอยู่ทำการตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขในเลือด โดยใช้เม็ดเลือดขาวจากการแยกชั้น buffy coated และตัวอย่างที่ได้จากการแยกพลาสมา และนำมาเพิ่มจำนวนยีนโดยพัฒนาเทคนิค nested PCR primers เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจซึ่งถ้าผลที่ได้ออกมามีประสิทธิภาพในการตรวจจะสามารถลดขั้นตอนการทำงาน ค่าใช้จ่ายและนำมาประยุกต์ใช้งานได้เหมาะสม

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อพัฒนา nested RT-PCR มาประยุกต์ในการตรวจหากรดนิวคลีอิกของไวรัสไข้หัดสุนัข และเพื่อนำเทคนิค nested RT-PCR มาประยุกต์ใช้ในตัวอย่างทางคลินิก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

โรคไข้หัดสุนัขเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (Canine Distemper Virus; CDV) ทำให้เกิดอาการทางระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาทส่วนกลางและสัตว์ป่วยตายลงด้วยสาเหตุเนื่องมาจากตัวไวรัสเองหรือภาวะการติดเชื้อแทรกซ้อนอันเป็นจากการกดภูมิคุ้มกัน โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกอาศัยอาการที่ปรากฏในสุนัข ส่วนการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันว่าเป็นไข้หัดสุนัขทำได้ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การตรวจหาแอนติเจนไวรัสโดยตรงด้วยวิธีอิมมูโนเรืองแสง โดยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา การตรวจวินิจฉัยโดยการแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัสในสัตว์ทดลองหรือเซลล์เพาะเลี้ยง การตรวจวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยา ซึ่งในแต่ละวิธีมีข้อจำกัดในการตรวจต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิค nested RT-PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาหลักฐานการติดเชื้อไวรัสจากสัตว์ป่วยที่ยังมีชีวิตอยู่ทำการตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขโดยใช้เม็ดเลือดขาวจากการแยกชั้น buffy coated และตัวอย่างที่ได้จากพลาสมา ซึ่งถ้าผลที่ได้ออกมามีประสิทธิภาพในการตรวจจะสามารถลดขั้นตอนในการทำงาน ค่าใช้จ่าย และนำมาประยุกต์ใช้งานได้อย่างเหมาะสม

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคไข้หัดสุนัขเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขซึ่งได้รับการยืนยันพิสูจน์โดย Dunkin และ Laidlaw (1926) เชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขเป็น single stranded RNA ในตระกูล Paramyxoviridae จีแนส Morbillivirus มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Measles (MV) Rinderpest virus (RV) และ Pest des petits ruminants virus (PPRV) (Fenner, 1976) มีรูปร่างแบบ spherical บางครั้งเป็น filament เส้นผ่าศูนย์กลาง 100-700 nm (Robert and Daniel, 1996)

โรคนี้ปัจจุบันควบคุมด้วยวัคซีน attenuated live virus เริ่มพัฒนาโดย Cabasso และคณะ (1962) มีรายงานการเกิดโรคอย่างต่อเนื่องในสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว เช่นการระบาดของโรคไข้หัดสุนัขในฟินแลนด์ในสุนัขที่มีการฉีดวัคซีน (Ek-Kommon *et al.*, 1997) Gemma และ คณะ (1996) ได้ทำการสำรวจการระบาดของโรคไข้หัดสุนัขในประเทศญี่ปุ่นในลักษณะเดียวกัน ทำให้เกิด

แนวคิดที่ว่าชนิดของไวรัสที่แยกได้จากสัตว์ป่วยโดยตรงอาจมีความแตกต่างกับไวรัสสเตรนที่นำมาทำวัคซีน นอกจากนี้ไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดโรคในสุนัขแล้วยังมีรายงานทำให้เกิดโรคในสัตว์อื่น เช่น เสือชีตาร์ (Chistian and Anna, 1995) ใน spotted hyenas (Haas *et al.*, 1996) raccoon dogs (Machida *et al.*, 1993) และในสุนัขป่า (Lopez-Pena *et al.*, 1994)

ระบาดวิทยาของโรค (Epizootiology)

โรคไข้หัดสุนัขเป็นโรคติดต่อร้ายแรงที่สำคัญของสุนัข พบได้ทั่วโลก สัตว์ที่เป็นโรคนี้ในสภาพธรรมชาติได้แก่สัตว์ใน Order Carnivora, sub-order Fissipeda (terrestrial Carnivora) ซึ่งตระกูลที่มีความไวต่อการติดเชื้อได้แก่ ตระกูล Canidae สัตว์ในตระกูลนี้ได้แก่ สุนัข สุนัขดิงโก้ สุนัขจิ้งจอก สุนัขป่า coyote และสัตว์ในตระกูล Mustelidae ซึ่งได้แก่ mink, skunk, ferret, และ weasel นอกจากนี้ก็มีสัตว์บางชนิดในตระกูล Procyonidae เช่น raccoon เป็นต้น (Goss, 1948) ส่วนแมวซึ่งอยู่ใน suborder นี้เช่นเดียวกันแต่อยู่ในตระกูล Felidae พบว่าสามารถติดเชื้อจากสุนัขป่วยได้แต่ไม่ปรากฏอาการให้เห็นโดยการพบการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองเท่านั้นไม่พบการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์เยื่อ และเซลล์ในระบบประสาทเลย ในสัตว์ชนิดอื่นเคยมีรายงานการทำให้ติดเชื้อโดย intranasal inoculation ได้เหมือนกันเช่น สุนัขสามารถติดโรคได้ในลักษณะเดียวกับแมว สัตว์สองชนิดนี้ตรวจพบ neutralizing antibody ต่อเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในวันที่ 7 หลังการติดเชื้อและพบว่าไม่มีบทบาทในการแพร่โรค (Appel *et al.*, 1974)

สุนัขเป็นสัตว์เก็บกักโรคและแพร่โรคที่สำคัญเพราะสุนัขป่วยจะขับเชื้อไวรัสออกมาทั้งสิ่งคัดหลั่งทุกชนิด เช่น น้ำมูก ขี้ตา และน้ำลาย (Gorham 1960) ในอุจจาระและปัสสาวะของสุนัขป่วยก็พบว่ามีเชื้อไวรัสที่ทำให้แพร่กระจายโรคได้ (Gillespie and Timoney, 1981) โดยในส่วนของน้ำปัสสาวะนั้นพบว่าเชื้อไวรัสจะถูกขับออกมาในน้ำปัสสาวะตั้งแต่วันที่ 6 หลังการติดเชื้อ (Shen *et al.*, 1981) พบว่าช่วงระยะที่ฟื้นตัวจากการป่วยจะยังคงมีเชื้อไวรัสถูกขับออกมาอีกหลายสัปดาห์ และตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในสิ่งขับถ่ายต่าง ๆ เมื่อสุนัขหายป่วยโดยสมบูรณ์ สำหรับเชื้อไวรัสจากวัคซีนจะไม่มีการขับแพร่โรค (shedding) ในสุนัข (Appel, 1977)

การติดต่อของโรค (Transmission)

ในสภาพธรรมชาติช่องทางของการติดเชื้อที่สำคัญที่สุด คือการติดต่อโดยผ่านทางระบบหายใจ (aerosol route) การฟุ้งกระจายของเชื้อไวรัสในละอองสิ่งขับถ่ายโดยเฉพาะในน้ำมูก น้ำลายและขี้ตาเป็นแหล่งสำคัญของการติดเชื้อ (Gorham and Brandy, 1953) การติดต่อโดยการสูดดมเข้าทางลมหายใจนี้อาจเกิดจากการสัมผัสโดยตรงหรือลมพัดพา มีรายงานการติดต่อผ่านทางรกจากในสภาพธรรมชาติและทดลอง (Krakowka *et al.*, 1977)

พยาธิกำเนิด (Pathogenesis)

เมื่อสุนัขได้รับเชื้อไวรัสใช้หลอดสุนัขผ่านเข้าทางระบบหายใจจะสามารถตรวจพบเชื้อที่ต่อมน้ำเหลืองของหลอดลม (bronchial lymph nodes) และต่อมทอนซิลในวันที่ได้รับเชื่อนั้น และจะตรวจพบเชื้อในวันที่ 2 และ 3 (เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells) ซึ่งในช่วงระยะ 6 วันแรกนี้เชื้อจะเพิ่มจำนวนขึ้นในเนื้อเยื่อระบบน้ำเหลือง ซึ่งตรวจพบเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells ที่ติดเชื้อได้ทั่วร่างกาย ทำให้เชื้อไวรัสแพร่ขยายเข้าไปในเยื่อบุ (epithelial cells) ทั่วร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระบบทางเดินอาหาร ระบบหายใจ ระบบขับถ่ายปัสสาวะ ระบบสืบพันธุ์ รวมตลอดถึงระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งเชื้อจะผ่านเข้าไปทาง CSF หรือใน meningeal macrophage การแพร่ขยายการติดเชื้อเข้าไปใน epithelial tissue ทั่วร่างกายเช่นนี้เป็นผลทำให้ปรากฏอาการของการป่วยหลายๆระบบพร้อม (Appel, 1969) (รูปที่ 2.1)

อาการของโรค (Clinical signs)

อาการของโรคระยะเฉียบพลัน (acute) จะเกิดขึ้นในช่วง 3-6 วัน หลังจากที่สุนัขได้รับเชื้อ อาการเริ่มแรก คืออาการไข้ซึ่งจะเกิดขึ้นเพียง 1-2 วัน ร่วมกับอาการเบื่ออาหาร เยื่อตาขาวอักเสบร่วมด้วยแล้วอาการต่างๆ ที่พบในระยะแรกนี้จะหายไป สุนัขที่ติดเชื้อแต่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคเกิดขึ้นในระดับที่ป้องกันโรคได้จะแสดงอาการไข้เกิดขึ้นอีกเป็นครั้งที่สอง โดยอาจทิ้งช่วงห่างจากครั้งแรกหลายวัน การเกิดอาการไข้ครั้งที่สองนี้จะเกิดขึ้นร่วมกับอาการอื่น ๆ เป็นต้นว่า ซึม เบื่ออาหาร พร้อมกันแสดงอาการของระบบหายใจ และระบบทางเดินอาหารอันได้แก่ มีน้ำมูก ขี้ตา ไอ และอาการ

อาเจียนและท้องเสียเกิดขึ้นควบคู่กันไป ระยะถัดมาติดเชื้อแบคทีเรีย ที่ผิวหนังอาจพบตุ่มหนองหรือลักษณะของ impetigo หรือผดผื่นเกิดขึ้นพบได้บ่อยที่ผิวหนังหน้าท้อง ซึ่งอาจเกิดจาก allergic response ต่อเชื้อไวรัส ต่อมาสุขภาพจะทรุดโทรมลงอย่างรวดเร็ว บางรายพบสภาพการขาดน้ำชัดเจน ในที่สุดจะตายโดยอาจไม่แสดงอาการชักล่วงหน้า สุนัขป่วยบางรายแสดงอาการดีขึ้นระยะหนึ่งแล้วแสดงอาการทางระบบประสาทในเวลาต่อมา ซึ่งอาการชักอาจรุนแรงและคงอยู่จนกระทั่งตาย อาการทางระบบประสาทที่เกิดขึ้นนี้เปลี่ยนแปลงได้มาก ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของระบบประสาทส่วนกลางที่ถูกเชื้อไวรัสทำลาย อาการชัก อาการเคลื่อนไหวเกิน (hypermotility) การเดินหรือวิ่งวนและ psychic changes มักเนื่องมาจากการเกิดรอยโรคที่สมองส่วน cerebrum ถ้าสมองส่วนกลาง ส่วน cerebellum ส่วน vestibular และส่วน medulla oblongata เกิดเสียหายจะทำให้การย่างก้าวลำบาก ทำทางผิดไป ถ้าส่วนไขสันหลังเสียหายจะทำให้การใช้ขาไม่สัมพันธ์กัน (ataxia) reflexes ต่างๆ จะผิดไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของไขสันหลังที่เสียหาย บางครั้งการพบรอยโรคที่ประสาทตาและส่วนเรติน่า ทำให้การมองเห็นผิดไปหรือถึงขั้นทำให้ตาบอดได้ การกระตุกของมัดกล้ามเนื้ออย่างเป็นจังหวะที่เรียกว่า chorea หรือ tic หรือ tremor หรือ myoclonus เป็นอาการทางระบบประสาทอีกรูปแบบหนึ่ง ซึ่งอาจเกิดขึ้นขณะที่กำลังแสดงอาการของโรคหรือเกิดขึ้นตามหลังอาการต่างๆ ที่ทุเลาลง การกระตุกดังกล่าวนี้พบได้บ่อยๆ ที่กล้ามเนื้อส่วนใบหน้า โดยเฉพาะกล้ามเนื้อที่ใช้ขบเคี้ยวและกล้ามเนื้อของส่วนขา (Farrow and Love, 1983) การเกิดกระตุกอย่างเป็นจังหวะของกล้ามเนื้อนี้ พบว่าเป็นปรากฏการณ์เฉพาะที่ที่เกิดจาก intrinsic neural mechanisms ของไขสันหลังเฉพาะส่วน ไม่ได้เกิดจาก higher center แต่ higher center

ความรุนแรงของโรคไข้หัดสุนัข กระบวนการของโรค และการพยากรณ์โรค (prognosis) ขึ้นอยู่กับช่วงอายุของสุนัขที่ได้รับเชื้อ ลูกสุนัขอายุน้อยมากๆ ที่ไม่ได้รับภูมิกุ้มโรคจากแม่ เมื่อได้รับเชื้อจะตายอย่างรวดเร็ว ลูกสุนัขอายุ 5-7 วันที่ทำให้ติดเชื้อ พบว่าทำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจเสื่อมจนถึงกล้ามเนื้อตายบางส่วนด้วย (Higgins *et al.*, 1981) ลูกสุนัขในช่วงอายุหมดภูมิกุ้มโรคจากแม่ สุนัขรุ่น และสุนัขอายุน้อยถ้าติดโรคจะแสดงอาการของโรคแบบเฉียบพลันอย่างชัดเจน แต่ในสุนัขอายุมากมักไม่แสดงอาการของโรคให้เห็นอย่างเป็นขั้นตอน อาจพบเพียงอาการของสมองอักเสบเกิดขึ้นโดยไม่มีอาการล่วงหน้ามาก่อน ที่เรียกว่า "old dog encephalitis" หรือ subacute diffuse encephalomyelitis (Lincoln *et al.*, 1971) อย่างไรก็ตาม ODE เป็นกลุ่มอาการที่ยังไม่ยืนยันแน่ชัดว่าเกิดจาก canine distemper virus

พยาธิคลินิก (Clinical Pathology)

ในการติดเชื้อโรคไข้หัดสุนัขนั้น ค่าทางโลหิตวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีในซีรัมมักไม่เด่นชัดนัก กล่าวคือสภาพ leukopenia มักพบในช่วงที่เกิดอาการไข้ครั้งแรก การปรากฏอาการอย่างเด่นชัดของโรคในช่วงที่มีไข้ครั้งที่สองมักมีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนเข้าไปเกี่ยวข้อง (Farrow and Love, 1983) ได้มีการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาในสุนัขที่เป็นโรคไข้หัดสุนัขจำนวน 46 ราย พบว่าเพียงร้อยละ 12.5 เท่านั้นที่พบสภาพ leukopenia และร้อยละ 23.4 พบอยู่ในสภาพ leukocytosis ส่วนมากที่สุดร้อยละ 64.1 อยู่ในเกณฑ์ระหว่าง low normal ถึง high normal ($6,000-17,000/\text{mm}^3$) แต่สิ่งที่พบได้เสมอคือ สภาพ lymphopenia นอกจากนี้พบว่าค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และ pack cell volume (PCV) ส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่าค่าปกติ สำหรับค่าเฉลี่ยของ total plasma protein นั้นมักพบอยู่ในเกณฑ์ปกติ (Schalm *et al.*, 1975)

ในสุนัขป่วยที่เกิดสมองอักเสบอาจพบโปรตีนและ mononuclear cells ในน้ำไขสันหลังเพิ่มขึ้นและพบ specific neutralizing canine distemper antibody ในน้ำไขสันหลังด้วย (Farrow and Love, 1983)

รอยโรคทางพยาธิวิทยา (Pathological Lesion)

รอยโรคที่มองเห็นด้วยตาเปล่า เมื่อผ่าซากสุนัขที่ตายด้วยโรคไข้หัดสุนัขจะพบรอยโรคที่อวัยวะต่างๆ ที่แตกต่างกันออกไปได้มาก ขึ้นอยู่กับช่วงระยะเวลา กล่าวคือถ้าทำให้สุนัขตายในขณะที่มีอาการสมองอักเสบเพียงอย่างเดียวอาจไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่มองเห็นด้วยตาเปล่าที่อวัยวะภายในต่างๆ เลย แต่ถ้าตายภายในช่วงระยะที่กำลังแสดงอาการป่วยเกี่ยวข้องกับระบบต่างๆ (systemic phase) จะพบรอยโรคต่างๆ ได้ รอยโรคส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ รอยโรคที่ระบบทางเดินหายใจที่พบเสมอคือการเกิดปอดอักเสบ (lung edema) และในลูกสุนัขต่อมไทมัสจะลดขนาดลงเป็นอย่างมาก ส่วนต่อมน้ำเหลืองอื่นๆ พบสภาพบวมน้ำและมีเลือดคั่ง ในช่วงระยะก่อนตายอาจพบลักษณะของท้องเสียแบบมีมูก แต่ถ้ามีอาการของสมองอักเสบเกิดขึ้นก่อนตายอาจพบภาวะเลือดคั่งที่เยื่อหุ้มสมองด้วย

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบปอดที่เกิดปอดอักเสบ interstitial pneumonia โดยพบผนังถุงลมหนาตัวขึ้นเนื่องจากการแทรกตัวของเนื้อเยื่อพังผืด มี hyperplasia และ proliferation ของ alveolar epithelium ต่อมน้ำเหลืองต่างๆ และม้ามจะพบลักษณะของ lymphoid depletion โดย

lymphoid cells ลดจำนวนลง แต่ reticular cells บวมพองและมี proliferation ทำให้เห็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองมีเซลล์น้อยลงและมีสภาพบวม น้ำ เนื้อสมองพบได้ตั้งแต่การอักเสบเพียงเล็กน้อย หรือพบลักษณะ perivascular cuffing ที่ส่วนเยื่อหุ้มสมองและเนื้อสมอง จนถึงการเกิด meningoencephalomyelitis ซึ่งมี demyelination และ gliosis เกิดขึ้นด้วย ในลูกสุนัขอ่อน (อายุ 5-7 วัน) ที่ติดเชื้อไข้หัดสุนัขอาจพบลักษณะความเสื่อมของเซลล์ที่หัวใจและไตเกิดขึ้น รายงานพบว่าเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขทำให้กล้ามเนื้อหัวใจตายแล้วมีแคลเซียมไปจับเกาะอยู่ด้วย

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่นับว่ามีความสำคัญและเป็นลักษณะจำเพาะของโรค คือการตรวจพบ inclusion bodies ที่ เซลล์เยื่อต่างๆหลาย เช่นที่ผนังกระเพาะอาหาร ผนังของทางเดินปัสสาวะ และที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหาได้แก่ที่ เยื่อถุงลมปอด ในส่วนของระบบประสาท inclusion bodies ตรวจหาได้ใน glia cells และ neurones พบได้ที่ส่วนของ optic, cerebellar peduncle และ white matter ของ spinal cord (Jubb and Kennedy, 1970 ; Higgins *et al.*, 1981 ; Farrow and Love, 1983)

การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อไวรัสไข้หัดสุนัข (immunity)

การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในช่วงแรกสุนัขมักเกิด lymphopenia และ immunosuppression (Steven and Osburn, 1976) Neutralizing antibodies (SN) พบในช่วง 10-20 วันหลังการติดเชื้อ และสูงสุดในเวลาต่อมา complement dependent humoral cytotoxicity เกิดในรูปแบบเดียวกัน virus -specific IgM และ IgG พบในช่วงแรกของการติดเชื้อ โดยสามารถตรวจพบ IgM ได้ตั้งแต่วันที่ 7 หลังการติดเชื้อและสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ของการติดเชื้อ และในสัปดาห์ที่ 4-5 เริ่มมีการลดลงของระดับ IgM ในอัตราส่วน 2-4 เท่า แต่ระดับ SN ในซีรัม (SN) ลดลงค่อนข้างน้อย ในสัปดาห์ที่ 5-6 เริ่มมีการตรวจพบระดับของ IgG ซึ่งพบว่าระดับของ SN ที่มากกว่า 1:100 แสดงว่ามีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสไข้หัดสุนัข (Noon *et al.*, 1980) (รูปที่ 2.2) และ virus-specific cytotoxic T cell พบหลังติดเชื้อ 10-14 วัน สูงสุด 14-21 วันหลังติดเชื้อ (Appel, 1987)

โครงสร้างระดับโมเลกุลของไวรัสไข้หัดสุนัข (Molecular Characterization)

ไวรัสไข้หัดสุนัขมีโครงสร้างที่สำคัญประกอบด้วยส่วนของ envelope และ nucleocapsid envelope ประกอบด้วยโปรตีน M และ F nucleocapsid ประกอบด้วยโปรตีน N P และ L ในโปรตีนแต่ละส่วนมีหน้าที่ดังนี้ ส่วนของ H โปรตีนเป็นส่วนของ haemagglutinin ทำงานร่วมกับ F โปรตีน (cell fusion และ haemolytic function) M (matrix) โปรตีน เป็นส่วนพื้นผิวด้านในของ envelope N(nucleoprotein) โปรตีนเป็นส่วนของ nucleocapsid ส่วน P และ L โปรตีนทำหน้าที่เอนไซม์ polymerase (Robert and Daniel., 1996) (รูปที่ 2.3) Rozenblatt และคณะ (1985) ได้เปรียบเทียบ nucleotide sequence ระหว่างไวรัสไข้หัดสุนัข (CDV)และไวรัสไข้หัดในคน (MV) ในส่วนของ nucleocapsid gene พบว่ามีความเหมือนโดยแบ่งออกเป็น 3 บริเวณ ช่วง nucleotide 501-1215 มีความเหมือนกันสูง (77%) ช่วง nucleotide 1-500 เหมือนปานกลาง (59%) และไม่เหมือนกันในช่วง nucleotide ที่ 1216-1625 ทำให้บางครั้งเมื่อมีการทดลองเกี่ยวกับ MV สามารถประยุกต์ใช้กับ CDV ได้ ยีนทั้งหมดของไวรัสไข้หัดสุนัขมีความยาว 15,616 nucleotide และมีความยาวสั้นกว่า MV 277 nucleotide ยีนที่มี conserved region คือ N M และ F gene และ variable region ในส่วนของ H และ L gene (Mohinderjit *et al.*, 1993) (รูปที่ 2.3)

การวินิจฉัยโรค (Diagnosis)

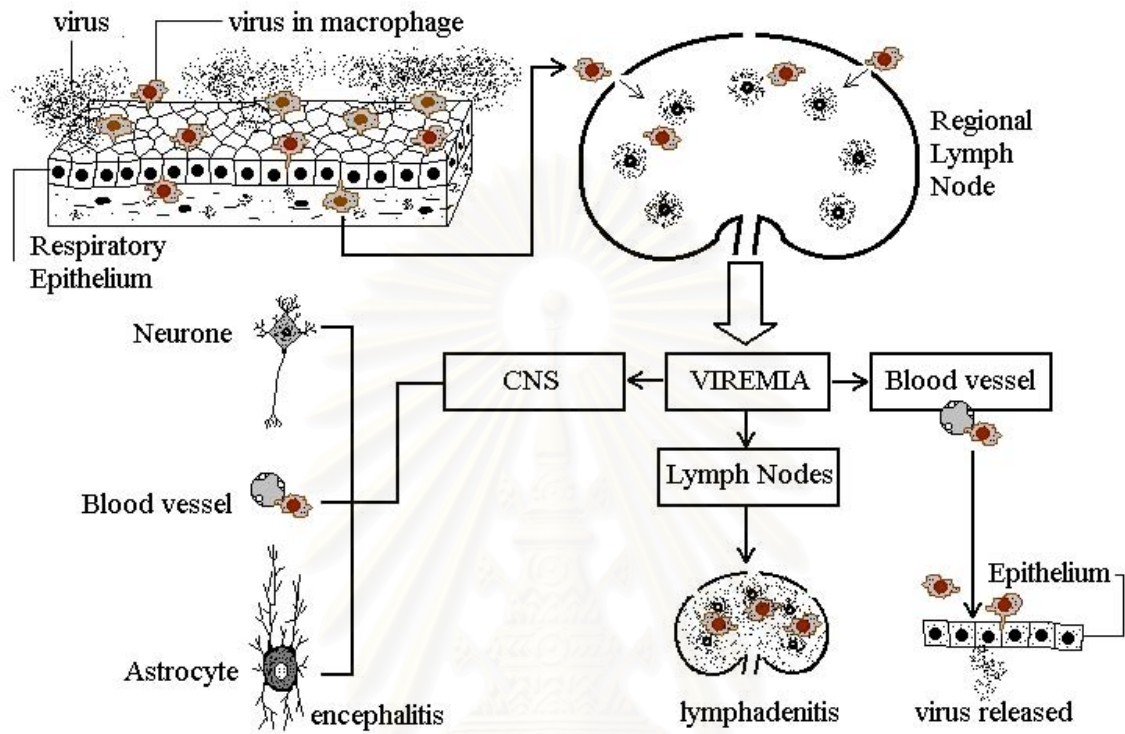
การวินิจฉัยโรคเบื้องต้น (Tentative Diagnosis) ในกรณีที่สุนัขป่วยแสดงอาการของโรคแบบเฉียบพลันโดยเฉพาะในสุนัขอายุน้อย การปรากฏอาการไข้ครั้งแรกมักไม่สังเกตเห็นทางคลินิก แต่การปรากฏอาการไข้ครั้งที่สองประกอบกับอาการทางระบบหายใจและระบบทางเดินอาหารที่เกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน ลักษณะอาการที่กล่าวนี้จึงค่อนข้างจะเป็นลักษณะจำเพาะของโรคที่ช่วยในให้การวินิจฉัยโรคเบื้องต้นได้ ร่วมกับอาการทางระบบประสาทหรือพบการหนาแข็งตัวของฝ่าเท้า (hard pads) อย่างไรก็ตามในกรณีที่สัตว์ป่วยไม่แสดงอาการที่เป็นรูปแบบของโรคเป็นเรื้อรังยากที่จะให้การวินิจฉัยโรคโดยอาศัยเพียงอาการอย่างเดียว ดังนั้นจึงต้องมีการวินิจฉัยโรคร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ มีดังนี้ เช่น การแยกเชื้อไวรัสสามารถทำได้ในไข่ไก่ฟักโดยดู pock ที่เกิดขึ้นบน chorioallantoic membrane หรือแยกในเซลล์เพาะเลี้ยง vero cell ซึ่งมีปัญหาคือต้องทำหลาย passage หรือ เซลล์ B95-a (marmoset B lymphocyte cell line) ในการแยกเชื้อไวรัสจากสัตว์ป่วยทางคลินิก โดยทำ co-cultivation กับ mononuclear cell ให้ความไว

ในการตรวจมากกว่า อย่างไรก็ตามการแยกเชื้อไวรัสคงต้องอาศัยเวลาในการวินิจฉัย (Kai *et al.*, 1993) การตรวจหา viral antigen โดยตรงจากตัวอย่างด้วยการใช้ Immunohistochemistry และ Immunofluorescence (FA) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะแต่ต้องตรวจพบไวรัสในระยะเฉียบพลัน (Iwatsuki *et al.*, 1995) การวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยาที่นิยมทำกันเป็นมาตรฐานคือ serum neutralization ต้องอาศัยการตรวจแอนติบอดีที่เปรียบเทียบกัน (paired serum) และใช้เวลาห่างกันประมาณ 3 สัปดาห์ สามารถตรวจพบได้แล้วประมาณ 10-20 วันหลังการติดเชื้อ (Appel and Robson, 1973) Blixenkron-Moller และคณะ (1991) ได้พัฒนา IgM และ IgG ELISA มาใช้ตรวจแอนติบอดีที่จำเพาะดังกล่าว ซึ่งตรวจได้ตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 50 หลังการติดเชื้อ แต่ในรายที่ติดเชื้อมานานแล้วจะไม่สามารถตรวจพบได้หรืออยู่ในระดับต่ำ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) มาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยมากขึ้นโดยเป็นการตรวจหากรดนิวคลีอิกและมีความไว ความแม่นยำ และความจำเพาะมาก เช่น การใช้เทคนิค nested RT-PCR มาตรวจหากรดนิวคลีอิกของ MV ใน nasal secretion ของผู้ป่วย ซึ่งพบว่าให้ผลดี (Shimizu *et al.*, 1993) ในโรคไข้หัดสุนัข Shin และคณะ (1991) ได้นำ RT-PCR มาใช้ในการตรวจหากรดนิวคลีอิกใน mononuclear cell พบว่าให้ผลดีแต่ยังมีปัญหาในด้านขั้นตอนและความไวของการตรวจวัดที่จำกัด ซึ่งยังต้องมีการพัฒนาวิธีและออกแบบ primer ต่อไป

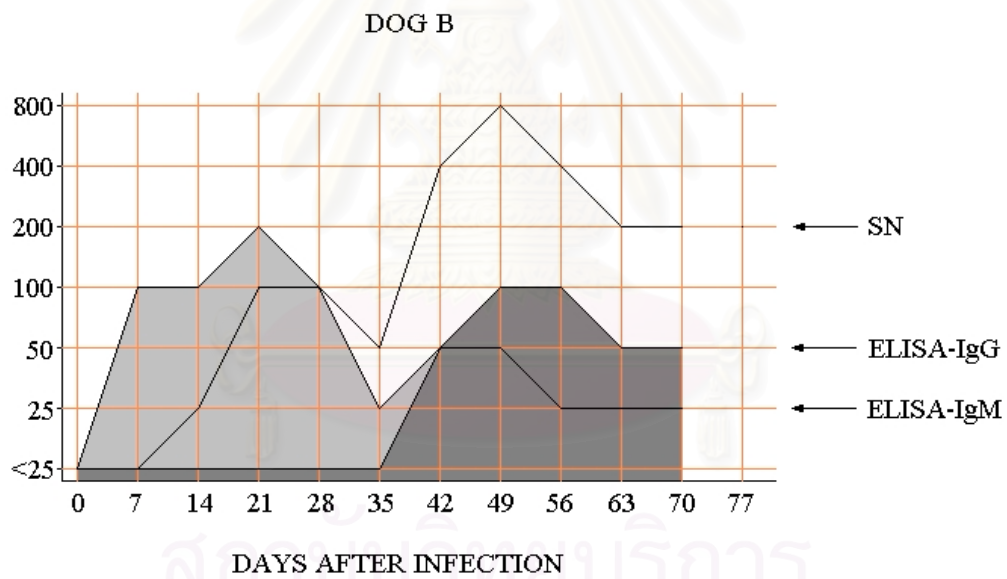
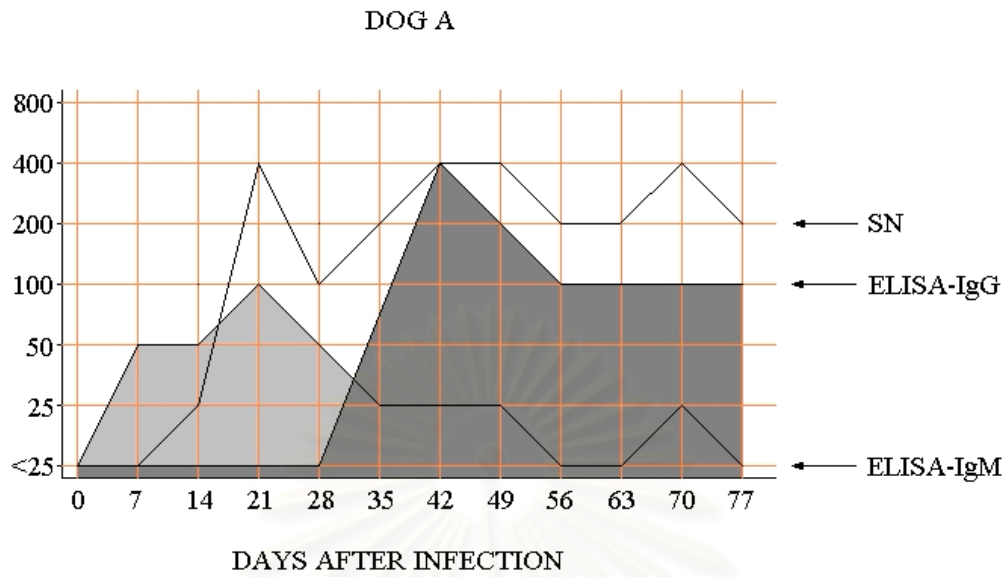
วิธี nested RT-PCR

เทคนิค PCR ที่นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ RNA เรียกว่าเทคนิค RT-PCR โดยขั้นตอนสำคัญ เริ่มต้นโดยการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ แล้วใช้ RNA นี้เป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับปฏิกิริยา reverse transcription ให้สังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) จากนั้นจะใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primers สองสาย ที่สังเคราะห์มาเพื่อขยายตำแหน่งที่สนใจบน cDNA นั้น ผลผลิต PCR ที่ขยายจำนวน cDNA สามารถตรวจวิเคราะห์ขนาดของผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

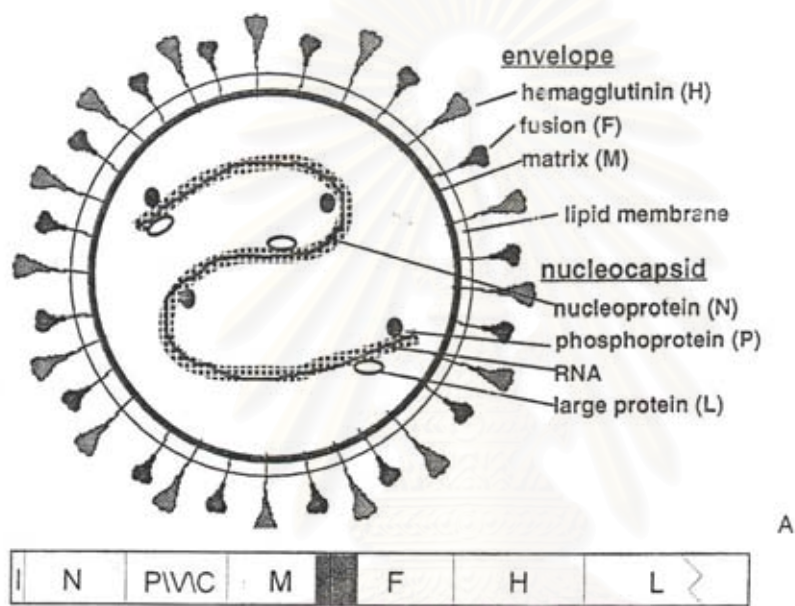
การเพิ่มขยายจำนวน target DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 1 คู่ (one-pair primer PCR) กับ DNA ทั้งหมดที่แยกสกัดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งส่งตรวจซึ่งมี DNA อื่น ๆ ปนอยู่เป็นจำนวนมากนั้น มักให้ผลผลิตที่ต้องการจำนวนน้อยจนไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ติดตามด้วยการย้อมสี ethidium bromide ได้ บางกรณีอาจจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ยุงยาก ทั้งนี้ target DNA ที่ไม่เกี่ยวข้องจำนวนมาก ทำให้ primer แต่ละสายมีโอกาสจับ (anneal) กับตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมบน target DNA ได้ยาก จึงเป็นผลให้ผลผลิตของ target DNA เพิ่มขยายได้จำนวนน้อย และส่วนใหญ่จะมีผลผลิตที่ไม่ต้องการ (nonspecific product) ปนมาด้วยค่อนข้างมาก การดัดแปลงเทคนิค PCR พื้นฐานในสามารถขยายจำนวน target DNA ให้ได้มากขึ้นโดยลดจำนวนผลผลิตที่ไม่จำเพาะให้เหลือน้อยที่สุด ทำได้โดยเทคนิค nested PCR ซึ่งเป็นปฏิกิริยา PCR 2 ขั้นตอน (two-step PCR) ด้วย primer 2 คู่ ได้แก่ bracket primers และ nested primers ในปฏิกิริยาช่วงแรกของ nested PCR จะใช้ bracket primers ซึ่งเป็น primers ที่อยู่รอบนอก target DNA และใช้ crude DNA ให้เกิดปฏิกิริยา PCR จำนวน 20-25 รอบทำให้ได้ผลผลิตที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับเพิ่มจำนวนให้ได้ผลผลิตของ target DNA อยู่ภายในแต่มีขนาดยาวกว่า ซึ่งสัมพันธ์กับตำแหน่งของ bracket primers ที่ออกแบบไว้ จำนวนผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ช่วงแรกนี้จะเทียบเท่ากับจำนวนผลผลิตที่เพิ่มขยายได้จากเทคนิค PCR พื้นฐานด้วย primer คู่เดียว ในปฏิกิริยาช่วงที่สองของ nested PCR ทำโดยใช้ผลผลิตจาก PCR ช่วงแรกเป็นแม่พิมพ์ (template) และใช้ nested primers ซึ่งออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับเพิ่มจำนวนให้ได้ผลผลิตของ target DNA อยู่ถัดเข้ามาด้านในจาก bracket primer ให้เกิดปฏิกิริยา 25-30 รอบ จะทำให้ได้ผลผลิตของ target DNA มีความบริสุทธิ์สูงและได้จำนวนขยายเพิ่มมากขึ้นปัจจุบันเทคนิค nested PCR ได้รับความนิยมแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งประยุกต์ใช้เพื่อการชันสูตรโรค (วัชรวิ, 1994) (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงพยาธิกำเนิด (Pathogenesis) ของไวรัสไข้หัดสุนัข

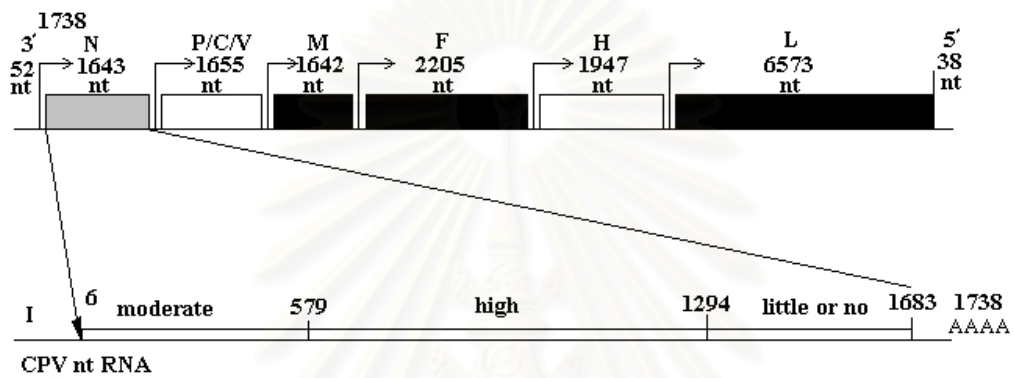


รูปที่ 2.2 การเกิดการตอบสนองของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัขในสุนัขทดลอง 2 ตัว A และ B แสดงผลของ SN, ELISA ของแอนติบอดีชนิด IgG และ ELISA ของแอนติบอดีชนิด IgM (Noon et al., 1980)



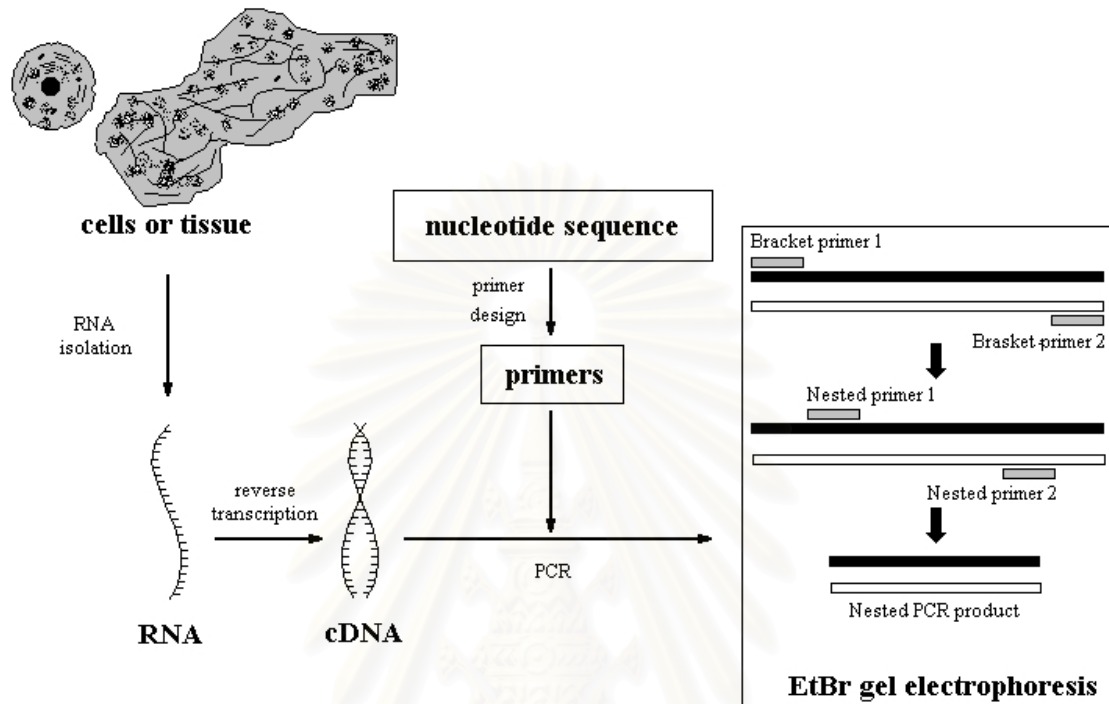
รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างระดับโมเลกุลของไวรัสไข้หวัดสุนัข (Robert and Daniel , 1996)

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 แสดงแผนภาพยีนโนมของไวรัสไข้หัดสุนัข และขยายในส่วน ยีน NP ที่มีระดับความเหมือนต่างๆ กันเมื่อเปรียบเทียบกับ genus morbillivirus (Frisk *et al.*, 1999)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.5 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำ nested RT-PCR

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ไวรัส

ไวรัสไข้หัดสุนัข สเตรน Onderstepoort (เชื้อพื่อจาก Dr. K. Platt, National Veterinary Service Laboratory, Ames, Iowa) นำมาทำการเพาะเลี้ยงและหาความเข้มข้นของเชื้อ (infectivity) ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด vero cell

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด African Green Monkey kidney (vero cell) ได้มาจากหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด minimum essential medium (MEM) ใน 5% fetal calf serum ใน CO₂ incubator และใช้เวลาในการอ่านผลในแต่ละ passage ประมาณ 5 วัน

ตัวอย่างเลือดจากสุนัข

เก็บตัวอย่างเลือดจากสุนัขที่เข้ารับบริการการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หรือคลินิกเอกชน ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2541- เดือนมีนาคม 2542 ปริมาตร 2 ml ในขวดที่มีสารกับการแข็งตัวของเลือด ethylene diamine tetra acetate (EDTA) 2 mg โดยสุนัขแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เข้ามารับการฉีดวัคซีนเข็มแรกและสัตวแพทย์ได้ทำการตรวจแล้วว่ามีสุขภาพที่ปกติ จำนวน 23 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นสุนัขป่วยที่สัตวแพทย์ได้ทำการวินิจฉัยเบื้องต้นทางคลินิกว่ามีอาการของการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข เช่น อาการไข้ซึม มีขี้ตา น้ำมูก ฝื่นแดงตามท้อง ชัก กระตุกของกล้ามเนื้อบริเวณหน้า อัมพาต และอาการติดเชื้อแทรกซ้อน จำนวน 65 ตัวอย่าง ทำการบันทึกประวัติและอาการทางคลินิก เป็นวันที่สัตว์เริ่มแสดงอาการป่วย

แยกสัต์ว์ตามลักษณะอาการป่วยที่สังเกตเห็น เป็นกลุ่มระบบทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร หรือระบบประสาท และนำตัวอย่างที่ได้ไปทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ตามแผนภาพที่ 3.1

วิธีการ

การแยกส่วนตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดจำนวน 2 ml ที่เก็บใน ethylene diamine teta acetate (EDTA) มาปั่นแยกพลาสมาออกด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูส่วนของพลาสมาออกใส่ในหลอด Eppendorf ส่วนเม็ดเลือดที่เหลืออยู่ใส่ red cell lysis buffer (RCLB) [ภาคผนวก] จำนวน 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที หลังจากนั้นเทส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง ทำขั้นตอนข้างต้น จนกระทั่งส่วนของ supernatant ไม่มีสีแดง และเห็นส่วน buffy coat ที่มีสีขาวตรงส่วนก้นหลอด eppendorf แล้วปั่นล้างเซลล์ buffy coat ด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) 3 ครั้งในครั้งสุดท้ายใส่ PBS จำนวน 0.5 ml แล้วเก็บที่ -70°C ส่วนตัวอย่างพลาสมาเก็บที่ -70°C

การแยกสกัด RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัข

นำตัวอย่างพลาสมาหรือ buffy coat เติม RNA extraction buffer [mono-phasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate] (Trizol®), Gibco BRL, USA) จำนวน 0.75 ml ผสมให้เข้ากันและอบที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วใส่ chloroform จำนวน 0.2 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ต่อมาทำการแยกโปรตีนออกโดยปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดส่วนใสที่ได้ออกมาใส่ใน eppendorf แล้วใส่ isopropanol จำนวน 0.5 ml ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาทีและนำไปปั่นตกตะกอน RNA ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำการล้างส่วนตะกอน RNA ด้วย 70% ethanol แล้วทำให้แห้งใน desiccator pump ใส่ 0.1 DEPC water 20 μl ละลายตะกอน RNA ให้เป็นสารละลาย

การออกแบบ Primer

ในการทดลองครั้งนี้เลือกบริเวณที่ออกแบบ primer จากส่วนของยีนบริเวณ nucleoprotein gene (NP) ของไวรัสไข้หัดสุนัข โดยลำดับเบส DNA ของไวรัสได้จาก GENE BANK (Access No X02000 M10242) และนำไปโปรแกรม Williamstone (internet free software, USA) มาทำการวิเคราะห์ช่วยในการออกแบบ Primer ซึ่งทำให้ได้ primer ที่มีลำดับเบสดังนี้

Outer primers

Forward primer (CDV1): (location; nt572-nt591)

5' CCC-AGC-AAA-GAC-GTG-TGG-TCG 3'

Reverse primer (CDV4): (location; nt1020-nt1000)

5' CCC-TCC-CAT-GGA-GTT-TTC-AAG 3'

Inner Primers

Forward primer (CDV2): (location; nt631-nt651)

5' AGA-AAC-AGG-ATT-GCT-GAG-GAC 3'

Reverse primer (CDV3): (location; nt908-nt888)

5' TAC-GGT-GCT-GTT-TCA-CCC-ATC 3'

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเพิ่มขยายจำนวนสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง

(Nested Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Nested RT-PCR))

cDNA synthesis

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1.5 mM dNTP, 3.2 mM MgCl₂, 50 pmol primer CDV1, 20U Rnase inhibitor, 200 U M-MLV ใน 12 reaction volume แล้วนำ RNA ที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 65⁰ C นาน 5 นาที ใส่ cDNA mixture 12 ไมโครลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็ง 2 นาที นำไปใส่ water bath ที่อุณหภูมิ 37⁰ C นาน 1 ชั่วโมง

เทคนิค Nested PCR

ใน 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา PCR ช่วงแรก ประกอบด้วย 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 37.5 pmole ของ primer CDV1 และ primer CDV4, 200 uM dNTPs, 0.5 unit ของ Taq DNA polymerase, ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น นำหลอด microtubes ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer 9600; CA, USA) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนดังนี้

เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95⁰ C นาน 1 นาที และ 55⁰ C นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation 95⁰ C 30 วินาที

Annealing 55⁰ C 30 วินาที

Extension 72⁰ C 1.5 นาที

ทำซ้ำ 30 รอบ

เมื่อครบรอบสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 95 °C นาน 1 นาที, 55 °C นาน 2 นาที, 72 °C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นแช่หลอด (soak) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำไปสู่ขั้นตอน Nested RT-PCR ต่อไป

ใน 25 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา PCR ช่วงสอง ประกอบด้วย 5 mM Tris-HCl (pH8.3), 25 mM KCl, 0.75 mM MgCl₂, 18.75 pmole ของ primer CDV2 และ primer CDV3, 100 uM dNTPs, 0.25 unit ของ Taq polymerase, ผลิตภัณฑ์จาก PCR ช่วงแรก 1.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น นำหลอด microtubes ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนเหมือนกับการทำ PCR ช่วงแรก

ความไวของเทคนิค Nested RT-PCR

นำไวรัสไข้หัดสุนัขจรดุน Onderstepoort ที่มีความเข้มข้น 10⁴ TCID₅₀ มาทำการเจือจางทีละสิบเท่าไปจนถึง 10⁻⁴ TCID₅₀ จากนั้นนำไปทำการตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขตามขั้นตอนการแยกสกัด RNA ที่กล่าวมาข้างต้นโดยทำการเปรียบเทียบกับ non-infected vero cell เป็นตัวควบคุม

การตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยา (Product detection)

โดยการใส่ผลผลิตของปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตรลงบน 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ที่ 100 โวลต์นาน 40 นาที ย้อมสีด้วย ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดูด้วยกล้อง UV light ขนาดของผลผลิต PCR วัดโดยเทียบกับ molecular weight marker 100 bp DNA ladder (New England, Biolabs) โดยคาดว่าผลผลิตที่ได้จะอยู่ในช่วง 278 bp

การหาแอนติบอดีจำเพาะชนิด IgM โดยวิธี ELISA

การตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะชนิด IgM ต่อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี ELISA (เพื่อเพื่อชุดตรวจจาก Dr.A.Osterhaus, Erasmus University, The Netherlands) ซึ่งมีวิธีการทำดังนี้

ทำการเคลือบ 96-well microtiterplate ด้วย seal antidog-IgM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้ว incubate นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วล้าง plate ด้วย washing buffer (0.05% tween-20 ในน้ำ) 3 ครั้ง ต่อมาใส่พลาสมา 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1:100 ใน buffer (PBS+ 0.01% Merthiolate)) incubate 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C ล้าง plate ด้วย washing buffer 3 ครั้ง หลังจากนั้นเตรียม Canine distemper virus- Horse raddish peroxidase (CDV-HRPO) conjugate โดยใส่ CDV-PO buffer (ที่มาพร้อมกับชุดตรวจ) แล้วใส่ลงไปใน plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37° C ล้าง plate ด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเตรียม substrate โดยผสม Tetramethylbenzidine (TMB) กับ substrate buffer(5% acetone, 10% DSO ใน PBS) แล้วใส่ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution (1 N H₂SO₄) แล้วนำไปอ่านค่าที่ OD₄₅₀ โดยค่าที่ให้ผลบวกต้องมากกว่า 2 เท่าของ negative control (ที่มาพร้อมกับชุดตรวจ)

การแยกเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่างเลือดสุนัข

นำ buffy coat จำนวน 200 ไมโครลิตร ไปทำการเพาะเลี้ยงรวม (co-cultivated) กับ เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด vero cell โดยเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี 5% fetal calf serum ทำการเพาะเลี้ยงจนถึง passage ที่ 4 แล้วอ่านผลโดยดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง ถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์แบบ syncytial formation พิจารณาให้ผลบวกต่อไวรัสไข้หัดสุนัข

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Dog suspected of CDV infection and healthy dog



Plasma ← Whole blood → buffy coated



- IgM ELISA

- Nested RT-PCR



- IgM ELISA

- Nested RT-PCR

รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำงานวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ในการประเมินวิธีการตรวจหาหลักฐานการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในสุนัขมีชีวิต ซึ่งปรากฏอาการต่างๆ ที่สงสัยจะติดเชื้อไวรัสดังกล่าว ได้ประเมินวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หัดสุนัขรวมทั้งการตรวจหา RNA genome ในส่วนยื่น NP ของไวรัสดังกล่าวโดยวิธี nested RT-PCR

จากตัวอย่างทั้งหมด 88 ตัวอย่างสามารถแบ่งกลุ่มสุนัขที่สงสัยว่าเป็นไข้หัดสุนัขได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร จำนวน 39 ตัวอย่าง กลุ่มที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจและระบบประสาท จำนวน 17 ตัวอย่าง กลุ่มที่มีอาการทางระบบประสาท จำนวน 9 ตัวอย่าง โดยมีสุนัขสุขภาพปกติซึ่งจำนวน 23 ตัวอย่างเป็นกลุ่มควบคุมดังแสดงใน ตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตารางการจำแนกกลุ่มสุนัขที่สงสัยไข้หัดสุนัขจำนวน 65 ตัวอย่าง และสุนัขปกติจำนวน 23 ตัวอย่าง รวม 88 ตัวอย่าง

อาการทางคลินิก	จำนวน
ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร	39
ระบบทางเดินหายใจและระบบประสาท	17
ระบบประสาท	9
กลุ่มควบคุม	23
รวม	88

การเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข

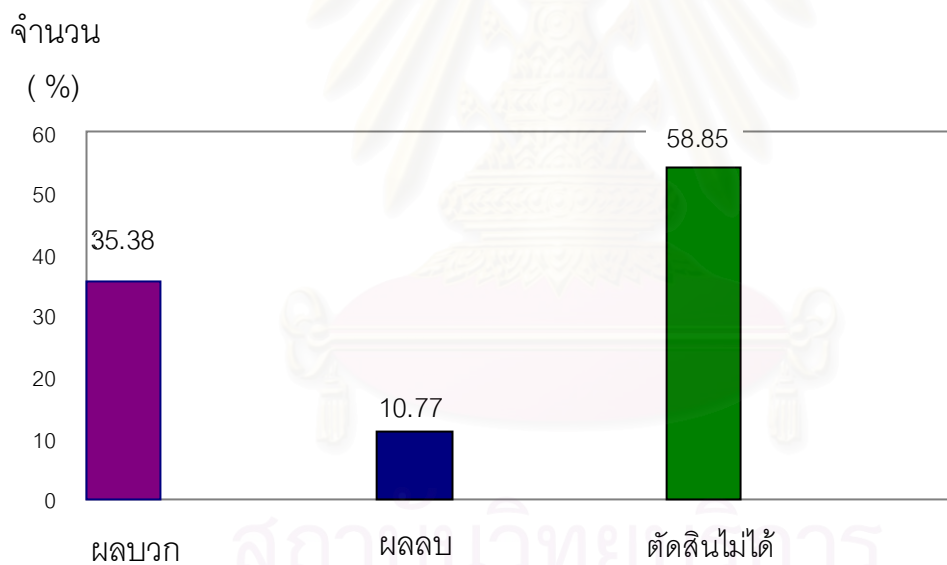
ในการเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากชั้น buffy coats ของตัวอย่างเลือด จำนวน 30 ตัวอย่างจาก 65 ตัวอย่างของสุนัขที่มีอาการสงสัยเป็นไข้หัดสุนัข ผลการทดลองตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวในการ passage ทั้ง 4 ครั้ง ไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสดังกล่าวในเซลล์เพาะเลี้ยง vero cell

การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี ELISA

จากการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อไวรัสไข้หัดสุนัข (CDV-IgM) โดยวิธี ELISA ค่า cut-off ที่จะตัดสินว่าให้ผลบวกที่ค่า OD_{450} ของตัวอย่างที่มากกว่ากลุ่มควบคุม ($OD_{450} = 0.1285$) อย่างน้อยสองเท่าคือ 0.2570 เป็นกลุ่มที่ให้ผลบวก ซึ่งค่า OD_{450} ที่น้อยกว่า 0.1285 เป็นกลุ่มที่ให้ผลลบ ส่วนกลุ่มที่อยู่ระหว่างค่า 0.1286-0.257 เป็นกลุ่มที่ตัดสินไม่ได้ พบว่ามีตัวอย่างซึ่งตรวจพบ CDV-IgM คิดเป็น 35.38% (23/65) ที่ให้ผลลบจำนวน 7.69%(5/65) และในกลุ่มที่ตัดสินไม่ได้จำนวน 35/65 (53.85%) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 , 4.3 และรูปที่ 4.1 ในกลุ่มที่ตรวจพบ CDV-IgM เมื่อพิจารณาอาการทางคลินิกที่สุนัขแสดงออกในกลุ่มต่างๆ พบว่า ตรวจพบ CDV-IgM ในกลุ่มทางเดินหายใจร่วมกับทางเดินอาหาร กลุ่มทางเดินหายใจร่วมกับระบบประสาท และกลุ่มระบบประสาท จำนวน 20/39 (51.28%) 2/17 (11.76%) และ 1/9 (11.11%) ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อไวรัสไข้หัดสุนัข โดยวิธี ELISA

ผลของ IgM ELISA	จำนวน/ตัวอย่างตรวจ	(ร้อยละ)
ผลบวก	23/65	35.38%
ผลลบ	7/65	10.77%
ตัดสินไม่ได้	35/65	53.85%



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงผลที่ได้จากการทำ IgM ELISA

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการตรวจการแอนติบอดีชนิด IgM ต่อไวรัสไข้หัดสุนัขที่ให้ตัดสินไม่ได้ แยกตามวัน
วันที่สังเกตพบอาการ

ช่วงเวลาที่สังเกตพบ อาการ (วัน)	กลุ่มให้ผลบวก	กลุ่มให้ผลลบ	กลุ่มให้ผลตัดสินไม่ได้
	จำนวน/จำนวนในกลุ่ม ทั้งหมด (%)	จำนวน/จำนวนในกลุ่ม ทั้งหมด (%)	จำนวน/จำนวนในกลุ่ม ทั้งหมด (%)
1-10	13/23 (56.52)	4/7 (57.14)	15/35 (42.86)
11-20	7/23 (30.43)	2/7 (28.57)	10/35 (28.57)
21-30	2/23 (8.70)	0/7 (0)	3/35 (8.57)
51-60	1/23 (4.35)	1/7 (14.29)	7/35 (20)
รวม	23/23 (100)	7/7 (100)	35/35 (100)

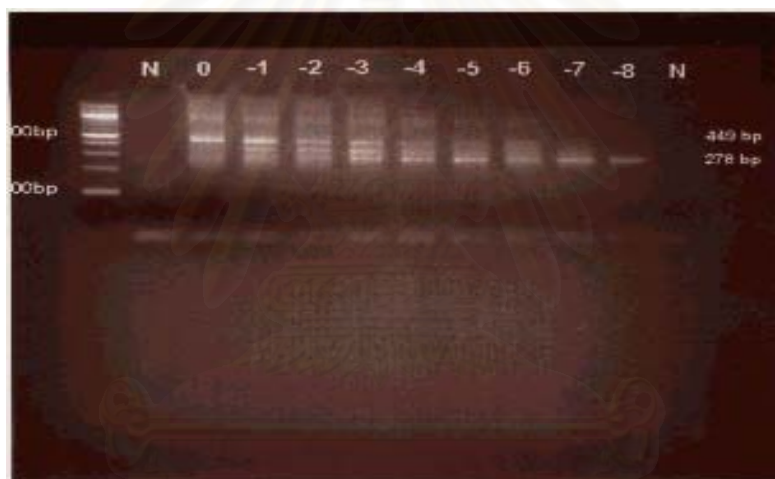
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการตรวจแอนติบอดีชนิด IgM ต่อไวรัสไข้หัดสุนัขที่ให้ผลบวก แยกตามกลุ่ม
อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิก	จำนวน	(ร้อยละ)
กลุ่มทางเดินหายใจ และทางเดินอาหาร	20/39	(51.28%)
กลุ่มทางเดินหายใจ และระบบประสาท	2/17	(11.76%)
กลุ่มระบบประสาท	1/9	(11.11%)
รวม	23/65	(35.38%)

การตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี nested RT-PCR

ก. ความไวของวิธี nested RT-PCR

การประเมินความไวของวิธี nested RT-PCR ในการตรวจหา nucleoprotein (NP) gene ของไวรัสไข้หัดสุนัขโดยใช้ primer 2 คู่ โดยคู่แรก (outer primer) คือ CDV1-CDV4 ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 449 คู่เบส และคู่ที่สอง (inner primer) คือ CDV2-CDV3 ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 278 คู่เบส ที่ได้จากการเจือจางไวรัสไข้หัดสุนัขเสตรอน Onderstepoort ที่ละ 10 เท่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^4 TCID₅₀ จนถึง 10^{-4} TCID₅₀ และตรวจหาไวรัส RNA ของไวรัส โดยวิธี nested RT-PCR โดยมี RNA จาก non-infected vero cell culture เป็นตัวควบคุมลบ พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบ RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขได้ถึงที่มากกว่าหรือเท่ากับ 10^{-4} TCID₅₀ ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.1



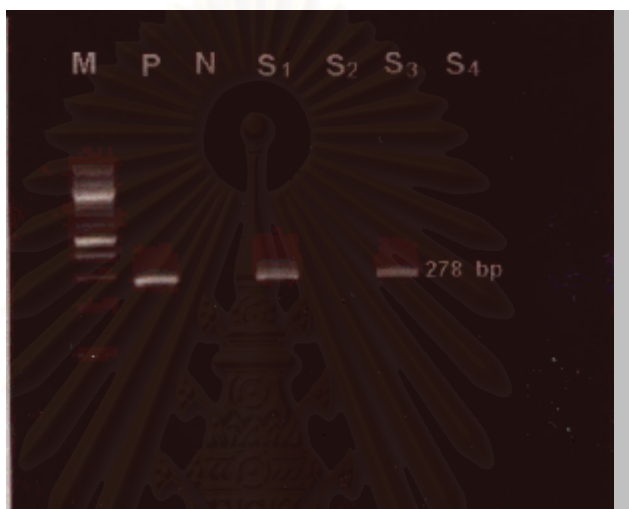
สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.2 แสดงความไวของวิธี nested RT-PCR ในการตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขเสตรอน Onderstepoort ที่ความเข้มข้นเจือจางที่ละ 10 เท่าจาก 10^4 TCID₅₀ ถึง 10^{-4} TCID₅₀ (lane 0- lane -8) เปรียบเทียบกับ non-infected vero cell culture control (N)

ข. การตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขในตัวอย่างพลาสติกโดยวิธี nested RT-PCR

การตรวจหา RNA genome ส่วน nucleoprotein (NP) gene ของไวรัสไข้หัดสุนัข โดยวิธี nested RT-PCR ได้ใช้ primer จำนวนสองคู่ ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นในตัวอย่างพลาสติกของสุนัขจำนวน 88 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลผลิตที่ 278 คู่เบส (รูปที่ 4.2) พบว่าให้ผลลบในสุนัขกลุ่มควบคุมสุนัขในกลุ่มที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจร่วมกับระบบประสาท และกลุ่มที่มีอาการทางระบบประสาท แต่สามารถตรวจพบได้เฉพาะในกลุ่มที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหารจำนวน 14/39 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 21.53% (14/65) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ในกลุ่มสุนัขที่แสดงอาการทั้งหมดนี้ สามารถตรวจพบยีน NP สูงสุดได้จำนวน 8/33 ตัวอย่าง ในกลุ่มสุนัขที่พบอาการใน 10 วัน กลุ่มที่พบอาการมาแล้วในช่วง 11-20 วันตรวจพบยีน NP ของไวรัสได้จำนวน 5/18 ตัวอย่าง และตรวจพบยีน NP จำนวน 1/5 ตัวอย่าง ในกลุ่มที่พบอาการมาแล้วในช่วง 21-30 วันหลังจากนั้นไม่สามารถตรวจพบได้ (ตารางที่ 4.6)



รูปที่ 4.3 แสดงขนาดของผลผลิต RT-PCR ในการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP ของไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่างพลาสมาของสุนัข M= 100bp ladder marker P= ตัวอย่างควบคุมจาก CDV infected vero cell N= ตัวอย่างควบคุมจาก non-infected vero cell control S1-S4= ตัวอย่างพลาสมาสุนัขที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อ CDV 4 ราย (S1 และ S3 แสดงผลบวกต่อเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข)

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP ของไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่างพลาสมาโดยพิจารณาตามกลุ่มอาการทางคลินิก

อาการทางคลินิก	ผลบวก/จำนวนทั้งหมด	(ร้อยละ)
กลุ่มอาการทางระบบหายใจ	14/39	(35.89%)
ร่วมกับทางเดินอาหาร		
กลุ่มอาการทางเดินหายใจ	0/17	(0%)
ร่วมกับระบบประสาท		
กลุ่มอาการทางระบบประสาท	0/9	(0%)
รวมกลุ่มที่แสดงอาการทั้งหมด	14/65	(21.53%)
กลุ่มควบคุม	0/23	(0%)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP ของไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่าง พลาสมาในกลุ่มที่แสดงอาการทั้งหมด พิจารณาตามจำนวนวันที่ตรวจพบอาการ

ช่วงเวลาที่ตรวจพบอาการ(วัน)	ผลบวก/จำนวนทั้งหมด	(ร้อยละ)
1-10	8/33	(24.24%)
11-20	5/18	(27.78%)
21-30	1/5	(20%)
51-60	0/9	(0%)
รวม	14/65	(21.53%)

ค. การตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขในตัวอย่าง buffy coat เลือดสุนัข โดยวิธี nested RT-PCR

เมื่อพิจารณาใช้ตัวอย่าง buffy coat ของเลือดสุนัขซึ่งมีองค์ประกอบของเม็ดเลือดขาวแทนการใช้พลาสมาในการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP โดยวิธี nested RT-PCR และ primer 2 คู่ดังกล่าวข้างต้นผลที่ได้พบว่า สามารถตรวจพบยื่น NP ของไวรัส 56/65 ตัวอย่างของกลุ่มที่แสดงอาการคิดเป็น 86.15% ในจำนวนนี้เป็นกลุ่มสุนัขที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจร่วมกับระบบทางเดินอาหาร 36/39 (92.31%) ตัวอย่าง ในกลุ่มที่มีอาการทางเดินหายใจร่วมกับระบบประสาทจำนวน 15/17 ตัวอย่าง (88.24%) ในกลุ่มที่มีอาการทางระบบประสาทจำนวน 5/9 ตัวอย่าง (55.56%) ส่วนในกลุ่มควบคุมตรวจไม่พบยื่น NP ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 4.7)

และเมื่อพิจารณาตามช่วงวันที่ตรวจพบอาการพบว่า วิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบ RNA ของไวรัสได้ไม่น้อยกว่า 60 วัน ของการตรวจพบอาการ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP ของไวรัสไข้หัดสุนัข ด้วยวิธี nested RT-PCR จากตัวอย่าง buffy coat ของเลือดสุนัข โดยพิจารณาแบ่งตามกลุ่มอาการทางคลินิก

อาการทางคลินิก	ผลบวก/จำนวนทั้งหมด	(ร้อยละ)
กลุ่มระบบทางเดินหายใจ และทางเดินอาหาร	36/39	(92.31%)
กลุ่มทางเดินหายใจ และระบบประสาท	15/17	(88.24%)
กลุ่มระบบประสาท	5/9	(55.56%)
รวม	56/65	(86.15%)
กลุ่มควบคุม	0/23	(0%)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP ของไวรัสไข้หัดสุนัข ด้วยวิธี nested RT-PCR จากตัวอย่าง buffy coat ของเลือดสุนัขโดยพิจารณาตามช่วงวันที่ตรวจพบอาการ

ช่วงเวลาที่สังเกตพบอาการ (วัน)	ผลบวก/จำนวนทั้งหมด	(ร้อยละ)
1-10	27/33	(81.82%)
11-20	18/18	(100%)
21-30	3/5	(60%)
51-60	8/9	(88.89%)
รวม	56/65	(86.15%)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข

การเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากชั้น buffy coat ของตัวอย่างเลือด มีสมมติฐานที่ไวรัสดังกล่าวจะเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง vero และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง vero จนกระทั่งถึง passage ที่ 4 ซึ่งข้อจำกัดอาจอยู่ที่ความไวของเซลล์เพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมที่นำมาสำหรับเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่ได้มาจากสัตว์ป่วย ได้มีการศึกษาพบว่าปริมาณความเข้มข้นของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด vero cell ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้นั้นต้องมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 10^6 TCID₅₀ ซึ่งความเข้มข้นของไวรัสในชั้น buffy coat อาจไม่ถึง 10^6 TCID₅₀ ทำให้ไม่สามารถพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวได้ อีกประการหนึ่งอาจจำกัดด้วยธรรมชาติของไวรัสที่ได้มาจากสัตว์ป่วยที่แตกต่างจากไวรัสเสตรอนอั้งอิง (Onderstepoort) ในการเพิ่มจำนวนในเซลล์ดังกล่าว แตกต่างกันเช่นเดียวกันกับที่เกิดกับไวรัสไข้หัดคนที่เพิ่มจำนวนในเซลล์ vero cell เดียวกันนี้ (Kobune *et al.*, 1990) จากการสังเกตการแยกเพาะเลี้ยงไวรัสใน vero cell ใน passage แรก ๆ พบว่าประมาณ 50% ของการเพาะแยกเชื้อไวรัสเกิดมี small foci ขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ใน passage ต่อมาเซลล์กลับมีรูปร่างที่ปกติ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการพบของ Kobune และคณะ (1990) ซึ่งได้ให้เหตุผลว่าเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้มีความไวจำกัดต่อไวรัสไข้หัดสุนัขที่ได้มาจากสัตว์ป่วยโดยตรง

จากปัญหาที่เกิดขึ้นได้มีการพัฒนาใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด B95a มาทำการเพาะแยกเพาะเลี้ยงไวรัสไข้หัดสุนัขพบว่าสามารถทำให้เกิด cytopathic effect ได้ใน passage แรก ซึ่งได้มีการทดลองพบว่ามีความไวมากกว่า vero cell ถึง 10,000 เท่า (Kai *et al.*, 1993) ดังนั้นจึงมีการแนะนำให้ใช้ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ในการทดลองของ Shin และคณะในปี 1995 นั้นได้ใช้ B95a cell มาทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสแต่ไม่สามารถแยกได้จากตัวอย่างสัตว์ป่วย ซึ่ง Shin และคณะสรุปว่าอาจเนื่องมาจากความไวของเซลล์อาจไม่พอสำหรับไวรัสที่เป็น wild type หรือเกิดมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย

ในอดีตที่ผ่านมาเซลล์เพาะเลี้ยงที่พบว่ามีมีความไวต่อไวรัสไข้หัดสุนัขชนิด wild type นั้นควรเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด primary cell แต่ก็มีปัญหาในเรื่องที่จะต้องใช้สุนัขที่ปลอดเชื้อ ซึ่งใน

ประเทศไทยนั้นหาได้ยาก มีราคาแพง มีความยุ่งยากในการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง และเซลล์มีอายุการใช้งานที่สั้น

โดยวิธีการแยกพิษุน้เชื้อดังนั้นการพิษุน้สุนัขติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธีการแยกพิษุน้เชื้อ ควรที่จะมีการตรวจสอบวิธีอื่นด้วย เช่น IFA, IHC

การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี ELISA

จากการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี ELISA พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ตัดสินไม่ได้เป็นจำนวนมากคือ 35/65 ตัวอย่าง(53.85%) ใน 35 ตัวอย่างนี้พบว่าส่วนใหญ่ 15/35 (42.86%) อยู่ในกลุ่มที่ตรวจพบอาการมาแล้วในช่วงเพียง 1-10 วัน (ประมาณ 7-17 วันหลังการติดเชื้อ) และ 10/35 (28.57%) อยู่ในกลุ่มแสดงอาการมาแล้วในช่วง 11-20 วัน (ประมาณ 18-27 วันหลังการติดเชื้อ) ควรเป็นช่วงเดียวกับเวลาที่จะตรวจพบ IgM ได้ รายงานระดับของ IgM จะตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 7 หลังการติดเชื้อขึ้นสูงสุดในวันที่ 21 หลังการติดเชื้อและเริ่มลดลงในวันที่ 28 ถึงวันที่ 35 ของการติดเชื้อ (Noon *et al.*, 1980) ผลการตรวจน่าจะจำกัดโดยค่า cut off ที่กำหนดโดยชุดตรวจดังกล่าว ซึ่งควรได้ทำการประเมินและพิจารณาปรับใช้ค่าที่เหมาะสมต่อไป

เมื่อแจกแจงผลการตรวจในกลุ่มซึ่งตัดสินไม่ได้จำนวนมากนี้ IgM ที่ให้ผลบวกพบว่าส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร(51.28%) และพบได้น้อยในกลุ่มที่มีอาการทางระบบประสาท(11.11%) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทำการทดลองของ Blixenkron-Moller และคณะ(1991) ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มที่มีอาการป่วยเฉียบพลัน (89.80%) และพบน้อยในกลุ่มที่มีอาการป่วยเรื้อรัง (60%) ดังนั้นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อไวรัสไข้หัดสุนัขนั้นควรที่จะทำการตรวจหาในสุนัขที่เริ่มมีอาการป่วยมากกว่าสุนัขที่ป่วยเรื้อรังมานาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี nested RT-PCR

ก. ความไวของวิธี nested RT-PCR

ในการทดสอบความไวของวิธี nested RT-PCR นั้นพบว่ามีความสามารถตรวจพบไวรัสได้ที่มีความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 10^{-4} TCID₅₀ ซึ่งจะพบว่าวิธีนี้มีความไวมากในการตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัข Shin และคณะ(1995) ได้ทำการหาความไวของวิธี RT-PCR พบว่าสามารถตรวจหาไวรัสได้ที่ 200 copies cDNA หรือ one infected cell แต่ได้ออกแบบ primers สำหรับตรวจหา RNA ที่ช่วงลำดับเบสต่างกัน 2 ตำแหน่งคือ ที่ 453-563 (129 bp) และ 1108-1562 (478 bp) Frisk และคณะ (1999) ได้ออกแบบ primers ของ RT-PCR สำหรับตรวจหา RNA ของไวรัสแต่ไม่ได้ระบุความไวของวิธีนี้ ซึ่ง primer ที่ออกแบบมาตรวจหา RNA อยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 764-1055 (287 bp) ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบลำดับเบสแล้วพบว่าลำดับช่วงเบสของ primers ที่ใช้อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน จากการนำไปตรวจหา RNA ของไวรัสในสัตว์ป่วยนั้นพบว่า วิธีของ Shin และคณะตรวจได้ 53.13% วิธีของ Frisk และคณะตรวจได้ 86% ในซีรัม และ 88% ใน clotted blood ซึ่งค่าที่ได้ของ Frisk และคณะใกล้เคียงกับการทดลองครั้งนี้ (86.15% ใน buffy coat และ 21.56% ในพลาสมา)

ผลที่ได้จากการตรวจหาความไวของวิธี nested RT-PCR จากรูปที่ 4.1 นั้นจะพบว่าใน lane ที่ 0 และ -1 ขนาดของผลผลิตที่ได้จะอยู่ที่ 449 bp ใน lane ที่ -2 และ -3 จะแสดงขนาดของผลผลิต 3 ขนาด คือที่ 449 bp ระหว่าง 449-278 bp และที่ 278 bp และใน lane ที่ -4 ถึง -8 มีผลผลิตที่ 278 bp ผลที่ได้นี้น่าจะเกิดจากการแย่งจับกันระหว่าง primers ชุดแรกและ primers ชุดที่สองของการทำ nested RT-PCR ซึ่งในช่วงแรกการเจือจางความเข้มข้นของไวรัสนั้น primers ชุดแรกที่ใช้มีจำนวนมากอาจจับกับ RNA ของไวรัสทำให้ได้ขนาดผลผลิตที่ 449 bp การแสดงผลผลิตทั้งสามขนาดอาจมีการแย่งจับกันได้ทั้งสอง primers และมีการเกิด semi nested RT-PCR ขึ้นด้วยทำให้มีผลผลิตขึ้นระหว่างกลาง ส่วนในตอนท้ายที่ผลผลิตมีขนาดที่ 278 bp นั้น ไวรัสมีความเข้มข้นน้อย primers ชุดแรกจับแต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้มากพอที่จะแสดงขนาดของผลผลิต 449 bp แต่เมื่อเข้าสู่รอบของ primers ชุดที่สองมีการเพิ่มจำนวนของยีนมากขึ้นทำให้แสดงขนาดของผลผลิตที่ได้จาก primers ชุดที่สอง (278 bp)

ข. การตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขในตัวอย่างพลาสมาโดยวิธี nested RT-PCR

จากการตรวจหา RNA genome ส่วนยื่น NP ของไวรัสไข้หัดสุนัขในพลาสมา นั้นสามารถตรวจพบได้ในสุนัขที่อยู่ในกลุ่มที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร หรือเมื่อแบ่งตามวันที่ตรวจพบอาการก็ตรวจพบได้จนถึงวันที่ 30 ซึ่งจากผลที่ได้แสดงว่ามีไวรัสอิสระอยู่ในพลาสมาซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมาของ Krakowka และคณะ(1980) เมื่อนำ พลาสมาที่ได้จากสุนัขที่ติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขไปเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง vero cell สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง สามารถตรวจพบไวรัสอิสระ ได้ตั้งแต่วันที่ 7 ของการติดเชื้อ และพบสูงสุดในวันที่ 21 ของการติดเชื้อ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอาการที่พบแล้วจะเป็นช่วงที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร ซึ่งในระยะหลังไม่สามารถตรวจหา RNA ของไวรัสอาจเนื่องมาจากการลดลงของไวรัสอิสระ จนไม่สามารถตรวจพบได้ ผลดังกล่าวขัดแย้งต่อการทดลองของ Frisk และคณะ(1999) เพราะผลการทดลองนั้นสามารถตรวจพบไวรัสได้ในซีรัมของสุนัขที่มีอาการป่วยทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง

ค. การตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขในตัวอย่าง buffy coat เลือดสุนัข โดยวิธี nested RT-PCR

จากผลที่ได้พบว่าสามารถตรวจพบ RNA ของไวรัสได้ในทุกระยะที่แสดงอาการของระบบต่างๆ แสดงว่าไวรัสอยู่ในเม็ดเลือดขาวทุกระยะของการติดเชื้อซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cornwell (1965) ซึ่งมีการพบเชื้อไวรัสอย่างต่อเนื่องหากสุนัขตัวนั้นไม่มีภูมิคุ้มกันเพียงพอที่จะขับไวรัสออกจากกระแสเลือดได้ และสอดคล้องกับการทดลองของ Frisk และคณะ(1999) ซึ่งสามารถตรวจพบ RNA ของไวรัสได้ในทุกระยะของการติดเชื้อ ในการวิจัยตรวจพบไวรัสใน buffy coat มากกว่าในพลาสมา

Axthelm และคณะ (1987) พบว่าเมื่อนำไวรัสชนิด virulence เสตรนมาทำการทดลอง พบการเกิด lymphopenia ได้ตั้งแต่ 7 วันหลังการติดเชื้อ และในสุนัขที่มีอาการทางระบบประสาทพบการเกิด lymphopenia ลดลง ซึ่งในการทดลองของ Axthelm และคณะนี้ได้ติดตามจนถึงวันที่ 35 หลังการติดเชื้อ พบแนวโน้มการลดลงของสภาวะ viremia ในช่วงหลังของการติดเชื้อ แต่วิธี nested RT-PCR นี้ยังสามารถทำการตรวจพบ RNA ของไวรัสได้ การลดลงของไวรัสในกระแสเลือดหรือในเม็ดเลือดขาวนั้นอาจต้องพิสูจน์โดยใช้ Quantitative RT-PCR ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

จากผลที่ได้ทั้งหมดแสดงว่าวิธี nested RT-PCR มีศักยภาพในการนำมาวินิจฉัยโรคไข้หัดสุนัขในสุนัขที่มีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งสามารถตรวจพบไวรัสได้ในทุกระยะของการแสดงอาการโดยใช้ตัวอย่าง buffy coat อย่างไรก็ดีตาม ควรได้มีการประเมินวิธีการตรวจดังกล่าวกับตัวอย่างทางคลินิกอื่นๆ เพื่อลดขั้นตอนการปฏิบัติ และง่ายต่อการเก็บตัวอย่างของสัตว์แพทย์ เช่น ตัวอย่างน้ำมูก น้ำลาย ปัสสาวะ หรือ whole blood เป็นต้น และอาจทำการพัฒนาวิธีการดังกล่าวร่วมกับวิธีทางห้องปฏิบัติการอื่น [Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)] เพื่อแยกแยะไวรัสระหว่างเสตรน เช่น เสตรนที่ใช้เป็นวัคซีน กับ isolates ที่ได้จากการติดเชื้อโดยธรรมชาติ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สงคราม เหลืองทองคำ 1990 โรคไข้หัดสุนัข โรคของสุนัขและโรคสำคัญทางคลินิก โรงพิมพ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ หน้า 1-24

วัชร อรรถทิพพหลคุณ 1994 เทคนิค PCR ขั้นสูง ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR

Technology โรงพิมพ์เรือนแก้ว กรุงเทพฯ หน้า 85-86

ภาษาอังกฤษ

Appel M. 1969 Pathogenesis of Canine Distemper Virus. Am J Vet Res. 30(7) : 1167-1182.

Appel M. 1987. Canine Distemper Virus. In: Virus infection of Carnivores. Elsevier,

Amsterdam.133-159.

Appel MJG. Canine distemper. 1977. In: Current Veterinary Therapy VI. Small Animal

Practice. R.W. Kirk Ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia.1418.

Appel MJG, Robson DS. 1973. A Microneutralization Test for Canine Distemper Virus. Am J

Vet Res. 34(11) : 1459-1463.

Appel MJG, Sheffy BE, Percy DH, Gaskin JM. 1974. Canine distemper virus in domesticated

cats and pigs. Am J Vet Res. 35: 803-806.

- Axthelm Mk, Krakowka S, Gorham JR. 1987. Canine distemper virus: In vivo virulence of in vitro passaged persistent virus strains. Am J Vet Res.48(2): 227-234.
- Blixenkron-Moller M, Pedersen IR, Appel M, Groit C. 1991. Detection of IgM against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). J Vet Diagn Invest 1991. 3: 3-9.
- Cabasso VJ, Douglas JM, Stebbins MR, Cox HR. 1995. Propagation of canine distemper virus in suckling hamster. Proc Soc Exptl Biol Med. 88: 199-202.
- Cabasso VJ, Kiser K, Stebbins MR, Cooper HK. 1962. Canine distemper vaccine of tissue culture origin. Am J Vet Res. 23: 394-402.
- Cornwell HJG, Vantsis JT, Cambell RSF. 1965. Studies in Experimental canine distemper .II. Virology, inclusion body studies and hematology. J Comp Pathol . 75: 19-34.
- Christian W, Anna K. 1995. Progressive hind limb paralysis in adult cheetahs (*Acinonyx Jubatus*). J Zoo Wild Med. 26(3): 430-435.
- Dunkin GW, Laidlaw PP. 1926 Studies in dog distemper II. Experimental distemper in the dog. J Comp Pathol Therap. 39: 213-221.
- Ek-Kommon C, Sihovnen L, Pekkanen K, Rikula U, Nuotio L. 1997. Outbreak off canine distemper in vaccinated dogs in Finland. Vet Rec. 141(15): 380-383.

- Farrow BRH, Love DN. 1983. Bacterial, viral and other infectious problems. In Veterinary Internal Medicine Disease of the Dog and Cat. Vol.I. S.T, Ettinger (Ed.) 2 nd Ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia. 1124.
- Fenner F. 1976. Paramyxoviridae. Intervirology. 7: 59-60.
- Frisk AL, Konig M, Moritz A, 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: 3634-3643.
- Gemma T, watari T, Akiyama K, Miyashita N, Shin Y, Iwatsuki K, Kai C, Mikami T. 1996. Epidemiological Observation on Recent Outbreak of Canine Distemper in Tokyo Area. J Vet Med Sci. 58(6): 547-550.
- Gillespie JH, Timoney JF. 1981. Hagan and Bruner' s infectious Diseases of Domestic Animals. 7 th Ed. Cornell University Press. 851.
- Gorham JR. 1960. Canine distemper. In Advanced in Veterinary Science and Comparative Medicine. Vol.6 C.A. Brandy and E L Jungherr (Eds.) Academic Press New York. 287-351.
- Gorham JR. 1966. The epizootiology of distemper. J A V M A. 149: 610-618.
- Gorham JR, Brandy CA. 1953. The transmission of distemper among ferret and mink. Proc Book Am Vet Med Assoc.90 th Ann Meeting.129-141.

- Goss LJ. 1948. Species susceptibility to the virus of Carre and feline enteritis. Am J Vet Res. 9: 65-68.
- Hass L, Hofer H, East M, Wohlsein P, Liess B, Barrett T. 1996. Canine Distemper Virus infection in Serengeti spotted hyenas. Vet Microbiol.49(1-2): 147-152.
- Higgin RJ, Krakowka S, Metzler AE, Koestner A. 1981. Canine distemper virus- associated cardiac necrosis in the dog. Vet Pathol.18: 472-486.
- Iwatsuki K, Okita M, Ochikubo F, Gemma T, Shin S, Miyashita N, Mikami T, Kai C. 1995. Immunohistochemical Analysis of the Lymphoid organs of dogs Naturally Infected with Canine Distemper Virus. J Comp Path. 113: 185-190.
- Jubb KVF, Kenedy PC. 1970. Pathology of Domestic Animal. 2 nd Ed. Vol I Academic Press. New York. 593.
- Kai C, Ochikubo F, Okita M, Inuma T, Mikami T, Kobune F, Yamanouchi K. 1993. Use of B95-a cells Isolation of Canine Distemper Virus from clinical cases. J Vet Med Sci. 55(6): 1067-1070.
- Krakowka S, Hoover EA, Koestner A, Ketring K. 1977. Experimental and naturally occurring transplacental transmission of canine distemper virus. Am J Vet Res. 38: 919-922.
- Krakowka S, Higgins RJ, Metzler AE. 1980. Plasma Phase Viremia in Canine Distemper Virus Infection. Am J Vet Res. 41(1): 144-156.

- Kobune F, Sakata H, Sugiura A. 1990. Marmoset Lymphoblastoid cell as a Sensitive Host for Isolation of Measles Virus. J Virol. 64: 700-705.
- Lopez-Pena M, Quiroga MI, Vazques S, Neito JM. 1994. Detection of Canine Distemper Viral Antigen in Foxes (*Vulpes vulpes*) in Northwestern Spain. J Wild Dis. 30(1): 95-98
- Machida N, Kirya K, Oh-ishi K, Kanda E, Izunisawa N, Nagamura T. 1993. Pathology and Epidemiology of Canine Distemper in Raccoon Dogs (*Nyctereustes procyonoides*). J Comp Path. 108: 383-392.
- Marion LT, Deborah MH, Susan MT, Vikram M. 1996. Feline leukemia virus detection by ELISA and PCR in peripheral blood from 68 cats with high, moderate, or low suspicion of having FeLV- related disease. J Vet Diagn Invest. 8: 25-30.
- Mohiderjit S, Sidhu SM, Husar W, Cook DS, Dowling CP, Udem AS. 1993. Canine Distemper Terminal and Intergenic Non-protein Coding Nucleotide Sequence: Completion of the Entire CDV genome Sequence. Virology. 193: 66-72.
- Morse HC, Chow TL, Brandly CA. 1953. Propagation of a strain of egg-adapted distemper virus in suckling mice. Proc Soc Exptl Biol Med. 84: 10-12.
- Noon KF, Rogyl M, Binn LN, Keefe TJ, Marchwicki RH, Appel M. 1980. Enzyme- linked Immunosorbent Assay for Evaluation of Antibody to Canine Distemper Virus. Am J Vet Res. 41(4): 605-609.

- Robert AL, Daniel K. 1996. Paramyxoviridae. In: Field Virology. Vol 1 B.N.Field, D.M.Kinpe, P.M.Howley, et al (Ed.) 3 rd Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.1177-1204.
- Rockborn G. 1958. Further studies on viremia and neutralizing antibodies in naturally acquired distemper in dogs. Arch Gesamte Virusforsch. 8: 500-510.
- Rozenblatt S, Eizenberg O, Ben-Levy R, Lavie V, Bellini W. 1985. Sequence Homology Within the Morbilliviruses. J Virol. Feb: 684-690.
- Schalm OW, Jain NC, Carroll EJ. 1975. Veterinary Hematology. 3 rd Ed. Lea and Febiger Philadelphia. 807.
- Shen DT, Gorham JR, Pedersen V. 1981. Viruria in dogs infected with canine distemper. VM/SAC. 76: 1175-1177.
- Shimizu H, McCarthy CA, Smaron MF, Burns JC. 1993. Polymerase Chain Reaction for Detection of Measles Virus in Clinical Samples. J Clin Microbiol. May: 1034-1039.
- Shin Y, Mori T, Okita M, Gemma T, Kai C, Mikami T. 1995. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein Gene in Canine Peripheral Blood Mononuclear cells by RT-PCR. J Vet Med Sci. 57(3): 439-445.
- Stevens D, Osburn B.1976. Immune Deficiency in aDog with Distemper. J Am Vet Med Assoc. 168(8): 493-498.

Theodore AR. 1987. Canine Distemper Virus: Infection and Prevention. Canine Practice. 14

(3): 16-20.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

การเตรียมสารอาหารเลี้ยงเซลล์

1. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum Essential Medium จำนวน 1 ซอง
2. ใส่ pyruvic acid 0.11 g
3. ใส่ sodium bicarbonate 2.2 g
4. ใส่ lactalbumin ที่ละลายเรียบร้อยแล้ว (2 g)
5. ใส่ Sterile water 1,000 cc
6. นำไป stirring ให้เข้ากัน
7. นำไปกรอง ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน

การเตรียม MEM 5% fetal calf serum

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM มา 100 ml เติม fetal calf serum จำนวน 5 ml

ส่วนประกอบ 5X buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.3)

75 mM KCl

3 mM MgCl₂

10 mM DTT

ส่วนประกอบ 70% ethanol

absolute ethanol 70 ml

0.1% DEPC water 30 ml

การเตรียม 0.1% DEPC water

DEPC 1 ml เติม sterile water 999 ml เขย่าให้เข้ากัน

การเตรียม 5X TBE

Tris base 27 g

Boric acid 13.75 g

0.5 EDTA(pH 8) 10 cc

เติมน้ำในครบ 1,000 ml

การเตรียม 1X TBE

นำ 5X TBE 200 ml เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 ml

การเตรียม RCLB

1 M Tris (pH 7.6) 10 cc

0.5 M NaCl 2 cc

1 M MgCl₂ 5 cc

เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 ml

การเตรียม 1M Tris

Tris HCl 21 g เติมน้ำกลั่นครบ 1,000 ml ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ 7.6

การเตรียม 0.5 NaCl

NaCl 20 g เติมน้ำกลั่นครบ 1,000 ml

การเตรียม 0.5 M EDTA

EDTA 186.1 g เติมน้ำกลั่นครบ 1,000 ml ปรับ pH ด้วย NaOH ให้ได้เท่ากับ 8

การเตรียม 1M MgCl₂

MgCl₂ 95 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml

การเตรียม 1.5% Agarose gel

ชั่ง Agarose 1.5 g ละลายใน 1X TBE ให้มีปริมาตรทั้งหมด 100 ml เติม ethidium bromide 10 ไมโครลิตร

การเตรียม PBS

นำ Dulbecco's Phosphate Buffer Saline 1 ห่อ (9.6 g) ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml

การเตรียม Loading buffer

SDS 0.5 g

Bromophenolblue 0.05 g

0.1 M EDTA 10 cc

Glycerol 25 cc

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 cc

การเตรียมเจลแบบแผ่นนอกราบ

เตรียมเจลขนาด 20x10x2 cm โดยใช้ชุดเตรียม Horizontal gel electrophoresis, Bio-Rab, USA โดยเสียบหัวและเทเจล 1.5% Agarose ให้มีความหนา 5 mm. ปลอ่ยเจลทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว

สารเคมีและแหล่งที่มา

สารเคมี	แหล่ง
Agarose	Promega, USA
Boric acid	Merck, Germany
2'- Deoxynucleotide-5'-triphosphate, dNTP	Pharmacia, Sweden
Ethidium bromide	Sigma, Germany
EDTA	Sigma, Germany
Hydrochloride acid (HCl)	Sigma, Germany
10x buffer	Pharmacia, Sweden
5x buffer	Pharmacia, Sweden
Phosphate Buffer Saline	Gibco BRL, USA
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, Germany
Tris	Amersham, USA
Minimum Essential Media	Gibco BRL, USA

เครื่องมือ

Analytic balance, Mettler Toledo, Switzerland

Automatic pipette, Gilson, France

Bubble plastic rack, Scienceware, USA

Centrifuge H-103N, Kokusan, Japan

Centrifuge Micro-6, Iwaki, Japan

Centrifuge tube 15 ml, Elkay, USA

Freezer -20°C , Sanyo, Japan

Freezer -70°C , Forma Scientific, USA

Gel Doc 1000, Bio-Rad, USA

Horizontal gel electrophoresis, Bio-Rad, USA

Hydroclave MC10, Harvey, USA

Microcentrifuge tube 0.2 ml, Axygen, USA

Microcentrifuge tube 1.5 ml, Elkay, USA

Multi-block heater, Lab-Lime Instrument Inc, USA

Pipette tips 0.5-10 ul, Axygen, USA

Pipette tips 200 ul, Axygen, USA

Pipette tips 200-1000 ul, Eurolab, Germany

PH meter, ORION 520, Orion Research Inc, USA

Thermal cycler 9600, Perkin-Elmer Cetus, USA

Timer, Canon, Japan

UV-visible recoding spectrophotometer, UV-160A, Shimadzu, Japan

Vortex mixer, Genie-2TM, Scientific Industries, USA

ลำดับเบสของส่วน Nucleocapsid gene ที่นำมาออกแบบ primer

LOCUS PAMYCDV1 1599 bp mRNA VRL 15-JUL-1998

DEFINITION Canine distemper virus (CDV) mRNA for nucleocapsid protein fragment.

ACCESSION X02000 M10242

VERSION X02000.1 GI:60921

KEYWORDS nucleocapsid.

SOURCE canine distemper virus.

ORGANISM canine distemper virus

Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;

Paramyxoviridae; Paramyxovirinae; Morbillivirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1599)

AUTHORS Rozenblatt,S., Eizenberg,O., Ben-Levy,R., Lavie,V. and Bellini,W.J.

TITLE Sequence homology within the morbilliviruses

JOURNAL J. Virol. 53 (2), 684-690 (1985)

MEDLINE 85108164

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1599

/organism="canine distemper virus"

/db_xref="taxon:11232"

CDS <1..1545

/codon_start=1

/product="put. nucleocapsid protein"

/protein_id="CAA26032.1"

/db_xref="GI:60922"

/db_xref="SWISS-PROT:P04865"

/translation="LFKRTRDQPPLASGSGGASRGIKHVIIVLIPGDSSIVTRSRLLD

RLVRLVGDPNVNGPKLTGILISILSLFVESPGQLIQRIDDPDVSIKLVEVIPSINS

CGLTFASRGASWILRADEFFKIVDEGSKAQQQLGWLENKDIVDIEVDNAEQFNILLAS

ILAQIWILLAKAVTAPDTAADSEMRRWIKYTQQRVVGFRMKNKIWLDIRNRRIAEDL
 SLRRFMVALILDIKRSPGNKPRIAEMICDIDNYIVEAGLASFILTIKFGIETMYPALG
 LHEFSGELTTIESLMMLYQQMGETAPYMVILENSVQNKFSAGSYPLLSYAMGVGVEL
 ENSMGGLGFGRSYFDPAYFRLGQEMVRRSAGKVSSALAAELGITKEEAQLVSEIASKT
 TEDRTIRATGPKQSQITFLHSERSEVANQQPPTINKRSENQGGDKYPIHFSDERLLGY
 TPDVNSSERSGSRYDTQIVQDDGNDDDRKSMEIAIAKMRMLTKMLSQPGTSEDNSPVYN
 DKELLN"

polyA_site 1598

BASE COUNT 476 a 335 c 378 g 410 t

ORIGIN

1 ctgttcaaga ggactcggga ccaaccccct cttgcctctg gctccggggg agcatcaaga
 61 ggaataaagc atgtcattat agtcctaata cggggtgatt caagcattgt tacaagatct
 121 cgactattgg atagacttgt taggttggtt ggtgatccaa atgtcaacgg ccctaaatta
 181 actgggatct taatcagat cctctccttg tttgtggaat ccctggaca gttgatccag
 241 aggatcatag acgaccctga tgtaagcadc aagttagtag aggtaatacc aagcatcaac
 301 tctgcttgcg gtcttacatt tgcattcaga ggagcaagct ggattctgag ggcagatgag
 361 ttctcaaaa tttagacga agggctgaaa gctcaagggc aattaggctg gttagagaat
 421 aaggatatag tagacataga agttgataat gctgagcaat tcaatatatt gctagcttcc
 481 atcttggctc aaatttggat cctgctagct aaagcgggta ctgctcctga tactgcagcc
 541 gactcggaga tgagaagggt gattaagtat acccagcaaa gacgtgtggt cggagaattt
 601 agaatgaaca aaatctggct tgatattgtt agaaacagga ttgctgagga cctatctttg
 661 aggcgattca tgggtggcgt catcttggac atcaaacgat cccagggaaa caagcctaga
 721 attgctgaaa tgatttga tatagataac tacattgtgg aagctgggtt agctagttc
 781 atcctaacta tcaagtttg cattgaaact atgtatccgg ctcttgggtt gcatgagttt
 841 tccggagaat taacaactat tgaatccctc atgatgctat atcaacagat ggggtgaaaca
 901 gcaccgtaca tggttatctt ggaaaactct gttcaaaaca aatttagtgc agggctctac
 961 ccattgctct ggagttatgc tatgggggtt ggtgttgaac tgaaaactc catgggaggg
 1021 ttgggtttcg gtcgatctta cttgaccca gcttactca gactcgggca agaaatggtt
 1081 aggagatctg ccggcaaagt aagctctgca ctgcccgg agcttggcat caccaaggag
 1141 gaagctcagc tagtgtcaga aatagcatcc aagacaacag aggaccggac aattcagct

1201 actggtccta agcaatccca aatcactttt ctgcactcgg aaagatccga agtcgccaat
1261 caacaacccc caaccatcaa caagaggctc gaaaaccagg gaggagacaa ataccccatt
1321 cacttcagtg acgaaaggct tctagggat accccagatg tcaacagttc tgaacggagt
1381 gggtcacgct atgacacca aattgtcaa gatgatggaa atgacgatga tcggaaatcg
1441 atggaagcaa tcgccaagat gaggatgctt actaagatgc tcagtcaacc tgggaccagt
1501 gaagataatt ctctgttta taatgacaaa gagctactca attaaatatt caagaccagt
1561 ctgcatcag tcaacaatta tcattctaaa ctattata



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพุลทรัพย์ รุ่งนิศากร เกิดวันที่ 31 พฤษภาคม พ.ศ.2515 ที่โรงพยาบาลประจำจังหวัดลพบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิตจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ.2540 ปัจจุบันเป็นสัตวแพทย์ประจำโรงพยาบาลสัตว์ลาดปลาเค้า



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย