

# Using of CRFK and HeLa Dual Cell-Culture System to Isolate Canine Distemper Virus

Jarupha Taowan<sup>1</sup> Pruksa Julapanthong<sup>2</sup> Wanvisa Surarith<sup>1</sup> Natthapat Ketchim<sup>1</sup>  
Chalisa Mongkolphan<sup>1</sup> Kridsada Chaichoun<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>The Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Disease in Wildlife and Exotic Animals,

<sup>2</sup>Internal Medicine Unit, Prasu Arthorn Animal Hospital,

<sup>3</sup>Department of Pre-clinic and Applied Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakorn Pathom, Thailand.

\*Corresponding author, E-mail address: kridsada.cha@mahidol.edu

Received: 4 March 2021; Revised: 28 May 2021; Accepted: 31 May 2021

## Abstract

Canine distemper virus (CDV) is a common infectious agent that affects respiratory and nervous systems in canine, pet and wildlife worldwide. The virus isolation using cell culture is one of laboratory diagnostic methods for detection of virus infections. Many different types of cultured cells can be used for isolation of distemper virus, which provides the different outcome. This study aimed to evaluate the efficacy of dual cell-culture system, Crandell-Rees feline kidney (CRFK) and HeLa cells for virus isolation. A total of 13 clinical specimens were taken by nasal and oropharynx swab from dogs with clinical signs compatible with CDV infection. These specimens were positively confirmed CDV by using Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) for viral genome detection. The CDV RT-PCR positive specimens were then taken to isolate in both cell-lines for five passages, and were confirmed by RT-PCR again. By using CRFK and HeLa cells, the successful viral isolation with CDV positive specimens was recorded at 7/13 (53.84%) in CRFK and 6/13 (46.15%) in HeLa cells, respectively. The dual cell-culture system showed an increase of the successful isolation at 8/13 (61.53%). Our results suggested that the application of dial cell-culture system was more effective than using single cell-culture for isolation of canine distemper virus.

**Keywords:** canine distemper virus, CDV, virus isolation

# การใช้เซลล์ CRFK และ HeLa ควบคู่กันเพื่อแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข

จารุภา เถาว์ลัย<sup>1</sup> พุกษา จุฬพันธ์ทอง<sup>2</sup> วันวิสาข์ สุราฤทธิ<sup>1</sup> นัทธภัทร เกตุฉิม<sup>1</sup>  
ชลิตา มงคลพันธุ์<sup>1</sup> กฤษฎา ใจชื่น<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่นและสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
<sup>2</sup>หน่วยอายุรกรรม โรงพยาบาลสัตว์ประจวบคีรีขันธ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
<sup>3</sup>ภาควิชาปริคลินิกและสัตวศาสตร์ประยุกต์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

\*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: kridsada.cha@mahidol.edu

Received: 4 March 2021; Revised: 28 May 2021; Accepted: 31 May 2021

## บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (canine distemper; CDV) เป็นเชื้อที่พบก่อโรคได้บ่อยต่อระบบทางเดินหายใจและระบบประสาทในสุนัข สัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าทั่วโลก การแยกไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเป็นหนึ่งในวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาการติดเชื้อไวรัส เซลล์เพาะเลี้ยงหลายประเภทสามารถใช้ในการแยกไวรัสไข้หัดสุนัขซึ่งให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกัน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้เซลล์ Crandell-Rees feline kidney (CRFK) และเซลล์ HeLa สำหรับการแยกเชื้อไวรัส ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างทางคลินิกทั้งหมด 13 ตัวอย่างถูกนำมาโดยการป้ายโพรงจมูก (nasal swab) และหอยหอย (oropharynx) จากสุนัขที่มีอาการทางคลินิกที่เข้ากันได้กับการติดเชื้อไข้หัดสุนัข ตัวอย่างเหล่านี้ได้รับการตรวจยืนยันผลบวกของไวรัสไข้หัดสุนัขโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบย้อนกลับ (RT-PCR) สำหรับการตรวจหาจีโนมของไวรัส จากนั้นตัวอย่างที่ให้ผลบวก ถูกนำไปแยกเชื้อในเซลล์ทั้งสองชนิดเป็นจำนวน 5 รอบ (passage) โดยแต่ละรอบได้รับการตรวจยืนยันโดย RT-PCR อีกครั้ง จากการใช้เซลล์ CRFK และ HeLa แยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข เมื่อใช้เซลล์ CRFK ชนิดเดียวมีผลสำเร็จของการแยกเชื้อไวรัสจำนวน 7 ตัวอย่างจาก 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 53.84) เมื่อใช้เซลล์ HeLa ชนิดเดียวมีผลสำเร็จของการแยกเชื้อไวรัสจำนวน 6 ตัวอย่างจาก 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 46.15) ตามลำดับ และเมื่อใช้ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์คู่ พบว่าผลสำเร็จของการแยกเชื้อไวรัสจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 8 ตัวอย่างจาก 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 61.53) ผลการศึกษานี้ให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์คู่เพื่อแยกเชื้อไวรัสสุนัขมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์เดียว

คำสำคัญ : โรคไข้หัดสุนัข CDV การแยกเชื้อไวรัส

## บทนำ

โรคไข้หัดสุนัข (canine distemper) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (canine distemper virus; CDV) การติดเชื้อไวรัสชนิดนี้เกิดขึ้นทั่วโลกซึ่งก่อโรครุนแรงทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ป่าและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในทะเล (Gemma et al., 1996; Woma and van Vuuren 2009) ไวรัสไข้หัดสุนัขเป็นไวรัสชนิดที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) อนุภาคไวรัสมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอชนิดสายลบจำนวนหนึ่งเส้น (single-stranded negative-sense RNA virus) ถูกจัดอยู่ในสกุล Morbillivirus ในวงศ์ Paramyxoviridae เชื้อไวรัสในวงศ์นี้มักจะก่อให้เกิดโรครุนแรงและเชื้อมีความสามารถในการติดต่อสูง ตัวอย่างเชื้อไวรัสอื่นในวงศ์นี้ ได้แก่ เชื้อไวรัสไข้หัด (Measles morbillivirus; MeV) ในมนุษย์ และเชื้อไวรัสริ้นเดอร์เพสต์ (rinderpest viruses; RPV) ในโคและกระบือ เชื้อไวรัสในสกุลนี้เกือบทุกชนิดก่อโรคที่แสดงอาการที่คล้ายคลึงกันและมักจะพบเชื้อปรากฏในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะเป้าหมายที่คล้ายคลึงกันในโฮสต์ของไวรัสแต่ละชนิด เชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขและเชื้อไวรัสอื่นๆ ในสกุลนี้ติดต่อโดยแพร่กระจายในละอองฝอยในอากาศและการปนเปื้อนบนวัตถุ (fomite) ก่อให้เกิดการติดเชื้อและแสดงอาการทางคลินิกที่คล้ายคลึงกัน ได้แก่ มีไข้ มีน้ำมูก และไอ รวมไปถึงแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร ซึ่งอาจจะมีการติดเชื้อแทรกซ้อนโดยเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วยก็ได้ (Beineke et al., 2008; Cavalho et al., 2012)

สัตว์ที่เป็นโฮสต์ตามธรรมชาติ (natural host spectrum) ของเชื้อไข้หัดสุนัข คือ สัตว์ที่อยู่ในอันดับ Carnivora ในวงศ์สุนัข (Canidae) โดยสุนัขเลี้ยงเป็นสัตว์ชนิดที่แสดงอาการรุนแรงจากการติดเชื้อนี้ได้มากที่สุด ส่วนในสัตว์ในวงศ์เสือและแมว (Felidae) มีการแสดงอาการที่หลากหลาย เมื่อแมวบ้าน (*Felis catus*) ติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขมักจะไม่พบการแสดงอาการป่วยไวรัสไข้หัดสุนัขแต่ในกลุ่มแมวขนาดใหญ่หรือเสือเมื่อมีการติดเชื้อจะพบการแสดงอาการได้ (Carvalho et al., 2012) สุนัขที่ติดเชื้อไข้หัดสุนัขประมาณร้อยละ 25-70 จะไม่แสดงอาการของโรค แต่อาจมีสุนัขบางส่วนที่ภูมิคุ้มกันถูกกดหลังการติดเชื้อนี้ และปลดปล่อย (shed)

อนุภาคเชื้อไวรัสออกมา มีรายงานพบว่าสุนัขบางกลุ่มเมื่อติดเชื้อแล้วมีอาการของโรคพัฒนาไปได้เร็วส่งผลให้มีอัตราการตายของสุนัขกลุ่มนี้มากกว่าร้อยละ 50 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์สุนัขและชนิดของเชื้อไวรัส โดยทั่วไปแล้วสุนัขที่ติดเชื้อไข้หัดสุนัขและแสดงอาการจะมีอาการทางคลินิกที่รุนแรง ในคอกเลี้ยงของสุนัข (shelters) มีอัตราการตายประมาณร้อยละ 50±20 หลังจากป่วยด้วยอาการปอดบวม (pneumonia) ตามมาด้วยการติดเชื้ออื่นๆ ร่วมด้วยซึ่งเป็นผลมาจากระบบภูมิคุ้มกันของสุนัขถูกกดการทำงาน (Newbury et al., 2009) อาการทางคลินิกอื่น ๆ ที่พบ คือ มีไข้สูงแบบ 2 ระยะ (biphasic fever) มีน้ำมูกไหล และมีอาการทางระบบประสาท หรือมีอาการทั้งสองแบบร่วมกัน สุนัขป่วยแสดงอาการของระบบต่างๆแบบเฉียบพลัน และอาการทางระบบประสาทเรื้อรังแสดงออกมาให้เห็นอย่างชัดเจนมักจะปรากฏตามมา นอกจากนี้ยังพบอาการผิดปกติแบบต่างๆ ได้แก่ ภาวะไข้สมองอักเสบในสุนัขแก่ (old dog encephalitis) และอาการฝ่าเท้าหนา (hard pad) ในระยะแสดงอาการเฉียบพลัน เชื้อไวรัสจะถูกตรวจพบได้จากมูลและสารคัดหลั่งที่ขับออก (secretion) จากร่างกาย รวมทั้งเริ่มมีอาการเกิดผื่นและกลายเป็นกลุ่มพุพองที่ผิวหนังในระยะต่อมา มีไข้ต่ำและอาการเบื่ออาหาร (anorexia) ท้องเสีย ตามด้วยอาการทางระบบทางเดินหายใจร่วมกับอาการทางระบบทางเดินอาหาร มักจะพบการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนเป็นลำดับต่อไป และพบระบบประสาทถูกทำอันตราย มีอาการทางระบบประสาทได้หลากหลายและมีพัฒนาการในทางเลวร้ายลงไปอย่างต่อเนื่อง อาการที่พบได้ในระยะนี้ คือ กล้ามเนื้อกระดูกตึงกระดูก ภาวะกล้ามเนื้อทำงานไม่ประสานกัน สูญเสียปฏิกิริยาการทรงตัว (postural reaction) และกล้ามเนื้ออ่อนแรงหรือเป็นอัมพาต (Ek-Kommonen et al., 2003; Greene and Appel 2006; Beineke et al., 2009)

การใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็น (modified-live canine distemper virus; MLV-CDV vaccines) เพื่อป้องกันโรคเริ่มมีการใช้ตั้งแต่ทศวรรษที่ 1950 ซึ่งช่วยควบคุมการระบาดของโรคเป็นอย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามการระบาดของโรคติดเชื้อไข้หัดสุนัขก็ยังพบมีรายงานได้จนถึงปัจจุบันและมีรายงาน

พบการติดเชื้อในสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีนอยู่บ่อยครั้ง (Ek-Kommonen et al., 1997) การพบสุนัขป่วยถึงแม้จะได้รับการทำวัคซีนแล้วพบได้อยู่บ่อยครั้งจากรายงานในบทความทางวิชาการ ซึ่งสอดคล้องกับการใช้วัคซีนที่ไม่เหมาะสม (Blixenkrone-Muller et al., 1993; Rzeutka and Mizak 2003; Decaro et al., 2004; Keawcharoen et al., 2005) และเกี่ยวข้องกับกลไกการใช้วัคซีนอย่างผิดกฎหมายในประเทศฟินแลนด์ (Ek-Kommonen et al., 1997)

การตรวจเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาจากชิ้นเนื้อเยื่อในทางเดินหายใจและทางเดินอาหารของสัตว์ติดเชื้อที่ป่วยตาย (van de Bildt et al., 2002) การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากตัวอย่าง หรือการป้ายเชื้อจากช่องจมูก (nasal swab) ช่องคอหอย (oropharyngeal swab) ช่องทวาร (rectal swab) หรือตรวจจากตัวอย่างมูลสัตว์ (fecal specimen) ของสุนัขป่วย โดยวิธีปฏิกิริยา Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction (RT-PCR) (Iwatsuki et al., 1997) เพื่อหาปริมาณเชื้อไวรัสและระดับแอนติบอดี (Twark and Dodds 2000; Mouzin et al., 2004) การแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (virus isolation) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งมีรายงานว่าในการแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขสามารถใช้เซลล์เพาะเลี้ยงได้หลายชนิด เช่น เซลล์ B95a (Kai et al., 1993) เซลล์ Vero (African green monkey kidney cells) (Del Puerto et al., 2011) เซลล์ Vero.DogSLAM ซึ่งเป็นเซลล์ Vero ที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมให้แสดงออกโปรตีน canine signaling lymphocyte activation molecule อยู่บนผิวเซลล์ (Woma and Vuuren 2009) เซลล์ MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) และเซลล์ MV1Lu (mink lung cells) (Lednicky et al., 2004) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีวิธีการแยกเชื้อ CDV โดยใช้การฉีดเชื้อเข้าไปในไข่ไก่ฟัก (chicken embryonated eggs) อายุ 9-11 วัน อีกด้วย (Woma and Vuuren 2009) เซลล์ทั่วไปที่นิยมใช้แพร่หลายในห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเชื้อ CDV ได้แก่ เซลล์ HeLa (human epithelial adenocarcinoma cells) (Schmid et al., 2000) เซลล์ MDCK (Lednicky et al., 2004; Tan et al., 2011) เซลล์ Vero (Oglesbee et al., 1989; Lednicky et al.,

2004) เป็นต้น เซลล์เหล่านี้มีข้อจำกัดสำหรับการแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่แตกต่างกันไป เช่น เซลล์ MDCK จะให้ผลการแยกเชื้อที่ดีที่สุดแต่การติดเชื้อจะไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect; CPE) ที่ชัดเจนทำให้ยากต่อการติดตามผลการแยกเชื้อ ส่วนเซลล์ Vero สามารถให้ผลแสดงการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์หรือแสดง CPE ที่ชัดเจนแต่ก็แสดง CPE ได้เช่นกันเมื่อมีการติดเชื้อ Encephalomyocarditis virus (EMCV) ซึ่งเป็นไวรัสที่สามารถเกิดการติดเชื้อร่วมกับไวรัสไข้หัดสุนัขได้ ซึ่งเชื้อ EMCV นี้ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในเซลล์ Vero แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในเซลล์ MDCK (Lednicky et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้เซลล์ Vero.DogSLAM ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ซึ่งพบว่าให้ผลการแยกเชื้อที่ดีมากเนื่องจากเซลล์ชนิดนี้ได้ถูกทำให้แสดงตัวรับ (receptor) ชนิด signaling lymphocyte activated molecule อยู่บนผิวเซลล์ และเป็นโมเลกุลตัวรับที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข (Woma and Vuuren 2009) แต่มีการใช้เซลล์ Vero.DogSLAM ชนิดนี้อาจจำกัดในกลุ่มผู้พัฒนาเซลล์ยังไม่เป็นที่แพร่หลายสำหรับเซลล์ CRFK (Crandell-Rees feline kidney cells) แม้จะยังไม่นิยมนำมาใช้ในการแยกเชื้อ CDV แต่มีการนำมาใช้ศึกษาโดย Fujita et al. (2007) โดยทดลองความสามารถของการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมด 17 ชนิด พบว่าเซลล์ที่ให้ผลดีที่สุดคือเซลล์ B95a ส่วนเซลล์ CRFK ให้ผลที่ด้อยลงมา และตามมาด้วยเซลล์ HeLa ตามลำดับ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการแยกเชื้อไข้หัดสุนัขโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วไป 2 ชนิดควบคู่กัน คือ เซลล์ CRFK (ATCC® CCL-94) และเซลล์ HeLa (ATCC® CCL-2) และทดสอบความสามารถในการแยกเชื้อไข้หัดสุนัขของการใช้เซลล์ทั้งสองควบคู่กัน ซึ่งคาดหวังว่าจะเพิ่มความไวของการแยกเชื้อและลดโอกาสแยกได้เชื้อไวรัสชนิดอื่นปนมากับเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ซึ่งคาดว่าวิธีการนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้แยกเชื้อไข้หัดสุนัขสำหรับงานทางห้องปฏิบัติการต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ในการศึกษานี้ได้คัดเลือกสุนัขจำนวน 19 ตัว ที่เข้ารับการรักษาในคลินิกอายุรกรรม ของโรงพยาบาลประจวบฯ มหาวิทยาลัยมหิดล จ.นครปฐม ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556 สุนัขทั้งหมดแสดงอาการป่วยสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ได้แก่ มีไข้ น้ำมูกไหล น้ำหนักลด ผิวหนังบริเวณฝ่าเท้าและจมูกหนา เติมน้ำในช่องท้อง เป็นต้น ประวัติของสุนัขกลุ่มนี้ถูกซักถามจากเจ้าของ บันทึกอาการป่วยและประวัติการได้รับวัคซีนไวรัสไข้หัดสุนัขก่อนหน้าแสดงอาการป่วย เก็บตัวอย่างจากสุนัขกลุ่มเป้าหมายโดยการป้ายช่องคอหอย (oropharyngeal swab) นำตัวอย่างเก็บในน้ำยารักษาสภาพเพื่อตรวจเชื้อไวรัส (viral transport medium; VTM) ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย Hanks balance salt solution (Gibco®, U.S.A.) 5%NaHCO<sub>3</sub> 1.0 M HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Gibco®, U.S.A.] และยาต้านจุลชีพ Penicillin G, Streptomycin และ Fungizone (Gibco®, U.S.A.) แบ่งตัวอย่างปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ไปตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข โดยวิธี Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction (RT-PCR) และนำตัวอย่างอีกส่วนปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้เพื่อทดสอบการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์ CRFK และเซลล์ HeLa โดยนำไปกรองด้วย Millipore® membrane ที่มีรูกรองผ่านขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำส่วนที่ถูกกรอง (filtrate) ไปใช้แยกเชื้อไวรัส ในทุก ๆ ตัวอย่างจะแยกเชื้อไวรัสในเซลล์ทั้ง 2 ชนิดและนำไปเลี้ยงต่อเนื่อง (sub-passage) เป็นจำนวน 5 รอบ (passages) สังเกตการเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ใช้แยกไวรัส โดยการส่องตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope (model CKX41, Olympus®, Japan) ที่กำลังขยาย 100 - 400 เท่า และนำน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละรอบ (passage) ไปตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธี RT-PCR ในกระบวนการเก็บตัวอย่างจากสุนัขได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงสัตว์และการใช้สัตว์ เพื่องานวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ MUVS-2013-25

### 2. การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์โพลีเมอร์ส (RT-PCR)

ในการตรวจด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ในการศึกษานี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีนนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein; NP gene) โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข จำนวน 49 complete genome sequences จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) ได้แก่ accession number: AB474397, AB475097, AB475099, AB475101, AB476401-AB476403, AB490670, AB490672, AB490674, AB490676, AB490678-AB490681, AB687720, AB687721, AB753775-AB753776, AB823706-AB823707, AB687721, AF014953, AF164967, AF305419, AF378705, AY386315-AY386316, AY443350, AY445077, AY466011, AY542312, AY649446, EU310405, EU716337, EU726268, GU138403, HM046486, HM063009, HM852904, JN896331, JN896987, JX681125, KC427278, KF914669, KJ123771, KJ466106, NC\_001498 และ NC\_001921 โดยคัดเลือกบริเวณลำดับเบสที่มีความคงตัว (conserved sequence) เพื่อการออกแบบคู่ไพรเมอร์ ซึ่งได้ forward primer คือ CDV-NP-238F (5'-GCATTGTTACAAGATCTCGACTATTGG-3') และ reverse primer คือ CDV-NP-708R (5'-GGTATACTTAATCCACC TTCTCATCTCCG-3') ซึ่ง PCR product ที่ได้มีความยาว 470 คู่เบส การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสใช้ชุดสกัด QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) โดยทำตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นทำปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งได้เตรียมน้ำยา master mix สำหรับทำปฏิกิริยาปริมาณ 25 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยาในหลอดทดลองแบบผนังบางขนาด 0.2 มิลลิลิตร (0.2-ml thin-wall tube) ขั้นตอนการเตรียมน้ำยา master mix ทำโดยเติม nuclease free water ปริมาณ 15.75 ไมโครลิตร เติม 5X One-step RT-PCR buffer (iNtRON®, Korea) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร เติม 10mM dNTPs ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ CDV-NP-238F และ CDV-NP-708R (ความ

เข้มข้น 100 µM) ในปริมาณชนิดละ 0.125 ไมโครลิตร และ เติมเอนไซม์ QIAGEN One Step Enzyme Mix ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (5 unit) จากนั้นเติมอาร์เอ็นเอแม่แบบที่ได้จาก ไวรัสตัวอย่างในปริมาณ 2 ไมโครลิตร และนำไปทำปฏิกิริยา ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น C1000™ Thermal cycler (BioRad®, U.S.A.) ในขั้นปฏิกิริยา reverse transcription ตั้งค่าเครื่องเพิ่มปริมาณสารที่ 45°C เป็นเวลานาน 30 นาที และตั้งค่าอุณหภูมิ เวลาและจำนวนรอบใน ปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้ ในขั้น initial denature ทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้น ทำปฏิกิริยาในขั้น denature ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลานาน 30 วินาที ในขั้น annealing ที่ 50°C เป็นเวลา 30 วินาที ใน ขั้น extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำเป็นจำนวน 30 รอบ จากนั้นเพิ่มขึ้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อทำปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วนำ ดีเอ็นเอผลผลิต (PCR product) ที่ได้จากข้างต้น ปริมาณ 5-10 ไมโครลิตร ไปแยกขนาดดีเอ็นเอในวุ้นอะกาโรสด้วยกระแส ไฟฟ้า (1.5% agarose gel electrophoresis) ใน 0.5X Tris-borate buffer โดยย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสีเรืองแสง GelRed™ (Biotium Inc., U.S.A.) แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ผลผลิต (DNA product) โดยส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เทียบขนาดดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้กับขนาดของ 100 base-pair DNA ladder (New England Biolab®, U.S.A.) จากนั้นนำ ดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้นำไปหาลำดับเบส (nucleotide sequencing) ในส่วน NP gene โดยวิธี dideoxy dye terminators (Sanger and Coulson 1975) โดยใช้ไพรเมอร์ CDV-NP-238F และเตรียมปฏิกิริยาโดยใช้ BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, U.S.A.) และอ่าน ลำดับเบสโดยเครื่อง DNA Sequencer ABI3130xl (Applied Biosystems, U.S.A.) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ DNA product ในปฏิกิริยา RT-PCR

### 3. การเตรียมเซลล์และการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์ CRFK และเซลล์ HeLa

เซลล์ที่ใช้สำหรับทดสอบแยกเชื้อไวรัสให้หัดสุนัขมี 2 ชนิดคือเซลล์ CRFK (Fujita et al., 2007) และเซลล์ HeLa (Schmid et al., 2000) เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดโดยใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์ 10%FBS-MEM Growth Medium ซึ่ง ประกอบด้วย MEM (Gibco®, U.S.A.) 10%heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco®, U.S.A.) 2mM L-glutamine (Gibco®, U.S.A.) 200 IU/mL Penicillin 200µg/mL Streptomycin และ 0.25µg/mL Amphotericin B (Gibco®, U.S.A.) เลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงแผ่ขยายประมาณร้อยละ 85-90 ของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ แบ่งเซลล์ด้วยวิธีการ trypsinization ลงในเพลทเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (Nunc®, U.S.A.) เพื่อนำ ไปแยกเชื้อไวรัส

การทดสอบแยกเชื้อและเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสให้ หัดสุนัขโดยใช้เซลล์ HeLa และเซลล์ CRFK จากวิธีการ เตรียมเซลล์ดังกล่าวข้างต้นที่ได้ร้อยละ 80 ถึง 90 ของ ภาชนะเพาะเลี้ยง (80-90% confluent) มาล้างด้วย MEM ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม จำนวน 2 ครั้ง แล้วเติม ตัวอย่างลงไปปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรต่อหลุม โดยทำสองซ้ำ (duplication) ในแต่ละตัวอย่าง และบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5%CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงดูด ตัวอย่างออกทิ้งแล้วเติม 2%FBS-MEM maintenance medium ลงไป 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C และมี 5%CO<sub>2</sub> สังเกตการเกิด CPE ของ เซลล์ทุกวันจนครบ 3 วันจึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาปริมาตร 140 ไมโครลิตร เพื่อสกัดและตรวจยืนยันผลการแยกเชื้อโดยการ ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสให้หัดสุนัขโดยวิธี RT-PCR ตามวิธีการข้างต้น และใช้ F-test เป็นวิธีทางสถิติเพื่อทดสอบ ความแตกต่างของความไวต่อการแยกเชื้อไวรัส

## ผลการทดลอง

### 1. การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในตัวอย่างส่งตรวจโดยวิธี RT-PCR

ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยา RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข โดยคู่ไพรเมอร์ CDV-NP-238F และ CDV-NP-708R เมื่อนำดีเอ็นเอผลผลิตไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้ากระแสตรงผ่านวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% ให้ดีเอ็นเอผลผลิตขนาด 470 คู่เบส ตรงตามที่ได้ออกแบบไว้ (รูปที่ 1) และเมื่อนำดีเอ็นเอผลผลิตไปหาลำดับกรดนิวคลีอิก (nucleotide sequencing) ด้วยวิธี di-deoxy dye terminators แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR นี้ ตรงกับ nucleoprotein (NP) gene ของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขทุกประการ (100% identity) ซึ่งแสดงว่าสามารถใช้คู่ไพรเมอร์นี้สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขได้ต่อไป จากการตรวจตัวอย่างส่งตรวจจากสุนัขป่วยและสงสัยการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจำนวน 19 ตัวอย่าง โดยวิธี RT-PCR พบว่าให้ผลบวกจำนวน 13 ตัวอย่าง ซึ่งนำไปทดสอบการแยกเชื้อไวรัสต่อไป

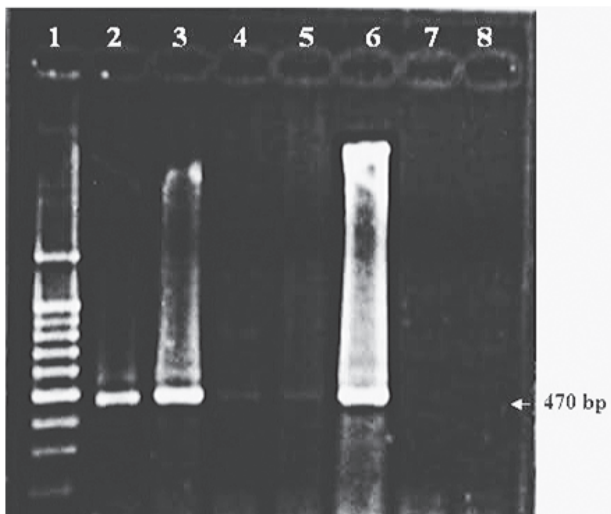
### 2. การทดสอบแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยใช้เซลล์ CRFK และเซลล์ HeLa และยืนยันผลการเพาะเลี้ยงด้วยวิธี RT-PCR

เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดนี้เป็นเซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถแบ่งแยกเซลล์ไปเลี้ยงใหม่ (sub passage) โดยเฉลี่ย 2 ครั้งต่อสัปดาห์ (duplication time ประมาณ 3 วัน) เมื่อทำการแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในเซลล์ HeLa และเซลล์ CRFK จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขด้วยวิธี RT-PCR จำนวน 13 ตัวอย่าง (รูปที่ 1) เมื่อนำตัวอย่างส่งตรวจดังกล่าวไปแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์ HeLa สามารถแยกเชื้อได้จาก 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 46.15) เมื่อใช้เซลล์ CRFK สามารถแยกเชื้อได้จาก 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 53.84) และสามารถแยก

เชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิดควบคู่กันได้ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 61.53) โดยมี 1 ตัวอย่างที่แยกได้จากใช้เซลล์ HeLa เพียงชนิดเดียว และ 2 ตัวอย่างที่แยกได้จากการใช้เซลล์ CRFK เพียงชนิดเดียว นอกจากนั้นอีก 5 ตัวอย่าง สามารถแยกได้จากการใช้ทั้งเซลล์ HeLa และ CRFK ร่วมกัน (ตารางที่ 1) เมื่อคุณลักษณะเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าในทุกรอบของการแยกเชื้อ (passage) ตั้งแต่รอบ ที่ 1 ถึง 5 ที่ให้ผลบวกจากการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด ไม่พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงไปจากเซลล์ปกติไม่พบเซลล์ทั้งสองชนิดมี cytopathic effect อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 2

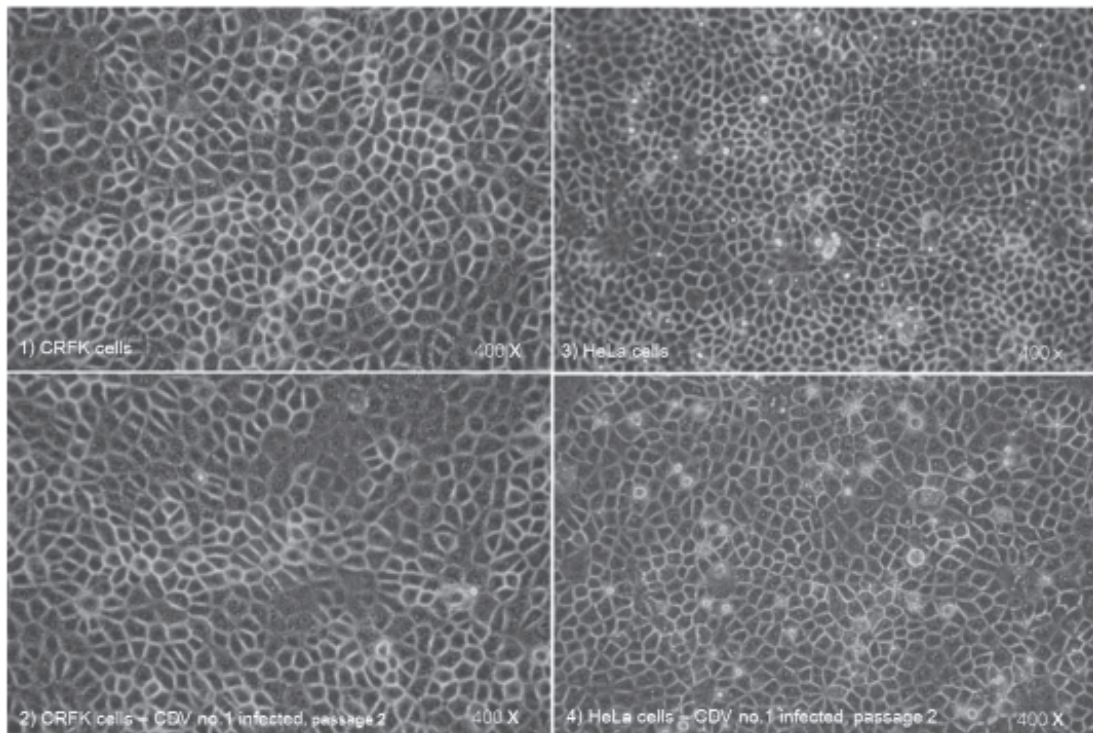
## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบแยกเชื้อจากตัวอย่างส่งตรวจที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไข้หัดสุนัขโดยวิธี RT-PCR ทั้ง 13 ตัวอย่าง โดยทดสอบการแยกเชื้อไวรัสด้วยเซลล์ CRFK ควบคู่กับเซลล์ HeLa พบว่าผลการทดสอบความไวในการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้ทั้งเซลล์ CRFK (ร้อยละ 46.15) และเซลล์ HeLa (ร้อยละ 53.84) เมื่อเทียบกับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างส่งตรวจโดยตรง ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Fujita et al. (2007) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้โมเลกุลตัวรับของเชื้อ recombinant CDV ซึ่งพบว่าเซลล์ CRFK มีความไวต่อการแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข เท่ากับร้อยละ 50.5 และความไวต่อการแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขโดยใช้เซลล์ HeLa เท่ากับร้อยละ 30.0 ตามลำดับ ผลการทดลองในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้เซลล์ CRFK ควบคู่กับเซลล์ HeLa สำหรับการแยกเชื้อไข้หัดสุนัขทำให้ความไวของการแยกเชื้อสูงขึ้น ซึ่งทำให้เพิ่มโอกาสความสำเร็จในการแยกเชื้อไวรัสให้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบโดย F-test (C.I.< 0.01) ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการนำเชื้อไวรัสไปศึกษาต่อทางด้านพันธุกรรม ศึกษาการก่อโรคในสัตว์ทดลอง ศึกษาคุณสมบัติของยาด้านไวรัส และการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในสุนัขและสัตว์ชนิดอื่นต่อไป



- ช่องที่ 1 100-base pair DNA ladder  
 ช่องที่ 2 ตัวอย่าง CDV no.1 ที่แยกเชื้อด้วยเซลล์ CRFK (Passage 2)  
 ช่องที่ 3 ตัวอย่าง CDV no.1 ที่แยกเชื้อด้วยเซลล์ HeLa (Passage 2)  
 ช่องที่ 4 ตัวอย่าง CDV no.1 ที่แยกเชื้อด้วยเซลล์ CRFK (Passage 1)  
 ช่องที่ 5 ตัวอย่าง CDV no.1 ที่แยกเชื้อด้วยเซลล์ HeLa (Passage 1)  
 ช่องที่ 6 ตัวควบคุมบวก (positive control)  
 ช่องที่ 7 ตัวควบคุมลบ ไม่เติมอาร์อาร์เอ็นเอ (mock control)  
 ช่องที่ 8 ตัวควบคุมลบ จากสิ่งตรวจให้ผลตรวจเป็นลบ (negative control)

**รูปที่ 1** แสดงผลการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้โดยเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยวิธี RT-PCR และแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้ากระแสตรงผ่านในวุ้นอะกาโรส ตัวอย่างที่ให้ผลตรวจเป็นบวกจากการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์ HeLa (ช่องที่ 2 และ 4) ใช้เซลล์ CRFK (ช่องที่ 3 และ 5) และตัวควบคุมบวก (positive control) พบแถบดีเอ็นเอผลผลิตมีขนาด 470 คู่เบส (basepair) ช่องที่ 7 แสดงผลตรวจของตัวควบคุมลบไม่เติมอาร์เอ็นเอ (mock control) และช่องที่ 8 แสดงตัวควบคุมลบ จากสิ่งส่งตรวจให้ผลตรวจเป็นลบ (negative control)



**รูปที่ 2** แสดงภาพเซลล์ CRFK และเซลล์ HeLa ในวันที่ 3 หลังการแยกเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่กำลังขยาย 400 เท่า 1) เซลล์ CRFK ปกติ 2) เซลล์ CRFK ที่ใช้แยกเชื้อ CDV no.1 (passage 2) 3) เซลล์ HeLa ปกติ 4) HeLa ที่ใช้แยกเชื้อ CDV no.1 (passage 2) ซึ่งเซลล์ทั้งสองชนิดไม่แสดง cytopathic effect ให้เห็น

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบการแยกเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่และยีนพันธุกรรมวิธี RT-PCR ในการให้ผลบวกต่อเชื้อไข้หัดสุนัข

Dog ID	Sex	Age (y/m)	Breed	Clinical signs	Vaccination history	PCR direct detection	RT-PCR detection from	
							HeLa cells	CRFK cells
1	Male	6 y	Poodle	depression, anorexia	none	positive	positive	positive
2	Male	4 m	Pomeranian	cough, nasal discharge	vaccinated	positive	negative	positive
3	Male	2 m	Golden Retriever	cough	none	positive	positive	negative
4	Female	6 y	Crossbreed	cough, diarrhea	none	positive	negative	positive
5	Male	1 y 4 m	Thai	fever, anorexia, mild conjunctivitis, mild mucoïd ocular discharge, wide abdominal cramp, dehydration, weakness	none	positive	positive	positive
6	Female	2 m	Golden Retriever	purulent nasal discharge, moderate dyspnea, depression, ataxia, hard pad, thick nose, ocular discharge, conjunctivitis, dull and increase lung sound, nystagmus	vaccinated	positive	positive	positive
7	Female	3 m	Pug	dyspnea, mild purulent nasal discharge, hard pad, cough, crackle lung sound, alopecia, crust and erythema on face	vaccinated	positive	positive	positive
8	Female	3 m	Golden Retriever	depression, dyspnea, emaciated dog, abdominal breathing both side crackle lung sound, purulent ocular discharge, mild conjunctivitis scale, serous nasal discharge, hard pad	vaccinated	positive	positive	positive
9	Female	9 y	Shih Tzu	purulent ocular discharge scale, melanin pigment conjunctivitis, mild crackle lung sound	none	positive	negative	negative
10	Female	3 m	Shih Tzu	purulent ocular discharge, purulent nasal discharge, mild crackle lung sound, mild dyspnea, cough, sneezing	none	positive	negative	negative
11	Female	2 m	Beagle	anorexia, cough, hemorrhagic diarrhea, crackle lung sound, interstitial pattern lung	none	positive	negative	negative

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบการแยกเชื้อไวรัสโดยชุดทดสอบและยืนยันผลด้วยวิธี RT-PCR ในการให้ผลบวกต่อเชื้อไข้หัดสุนัข (ต่อ)

Dog ID	Sex	Age (y/m)	Breed	Clinical signs	Vaccination history	PCR direct detection	RT-PCR detection from	
							HeLa cells	CRFK cells
12	Female	1 y	Thai	depression, vomiting, diarrhea, dry and crusty nose, mild dyspnea, papule occurred at ventral abdomen, cloudy cornea, serous purulent nasal discharge, crackle lung sound	none	positive	negative	negative
13	Male	5 m	Crossbreed	night time myoclonus, ring worm lesion on dorsal part of body	vaccinated	positive	negative	negative
14	Female	5 y	Thai	bedsore hold body, left head turn, nystagmus, myoclonus, fever	none	negative	negative	negative
15	Male	8 y	Pomeranian	cough, mild ocular discharge, crackle lung sound, sneezing	none	negative	negative	negative
16	Male	2 m	Pomeranian	mild productive cough, anorexia, mild anemia, crackle lung sound, depression, thrombocytopenia, mucous diarrhea, leukopenia	none	negative	negative	negative
17	Male	6 m	Pomeranian	chronic vomiting, depress, dull lung sound, mild serous nasal discharge, abdominal palpate spasm, found <i>E. canis</i> in blood smear	vaccinated	negative	negative	negative
18	Male	3 y	Thai	myoclonus, seizures, mucous and ocular discharge	none	negative	negative	negative
19	Female	2 y	Shih Tzu	ocular discharge, conjunctivitis, lateral strabismus, ataxia, vertical strabismus	vaccinated	negative	negative	negative

เมื่อพิจารณาถึงความไวของการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์ แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน น่าจะมีสาเหตุมาจากไวรัสไข้หัดสุนัขสามารถให้โมเลกุลตัวรับ ได้มากกว่า 1 ชนิด และพบโมเลกุลตัวรับในเซลล์ที่แตกต่างกัน โมเลกุลตัวรับบางชนิดบนผิวเซลล์สามารถจับกับ hemagglutinin (H) และ fusion (F) protein ของเชื้อไวรัสได้ เช่น โมเลกุล SLAM (CD150) เป็นโมเลกุลตัวรับที่สำคัญ (Tatsuo et al., 2000; Tatsuo et al., 2001) ไวรัสไข้หัดสุนัขยังอาจจะใช้โมเลกุลกลุ่ม Glycosaminoglycan (GAG) ที่อยู่บนผิวเซลล์หลาย ๆ ชนิด เป็นโมเลกุลตัวรับของเชื้อไวรัสได้ ซึ่งทำให้ไวรัสสามารถเข้าและเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่มี GAGs ที่เหมาะสมกับการจับโปรตีน H และ F บนอนุภาคเชื้อไวรัสได้

นอกจากนี้จากประวัติสัตว์ป่วย ยังพบความล้มเหลวของการทำวัคซีนป้องกันโรคไข้หัดสุนัขในลูกสุนัข สุนัขที่ให้ผลบวกต่อ RT-PCR ทั้ง 13 ตัว ที่มีช่วงอายุอยู่ในช่วง 2 เดือน ถึง 9 ปี มีจำนวน 5 ตัว จาก 13 ตัว (คิดเป็น 38.46%) มีประวัติเคยได้รับการฉีดวัคซีน (แสดงตามตารางที่ 1) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นลูกสุนัขในช่วงอายุประมาณ 2-5 เดือน และตามประวัติได้รับการฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็นในวัคซีนรวมชนิด 6 เชื้อ (combine hexavalent vaccine) ซึ่งสาเหตุของความล้มเหลวของการทำวัคซีนในสุนัขกลุ่มนี้อาจจะมีหลายสาเหตุทั้งจากตัวสัตว์และสภาพแวดล้อม ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญที่ทำให้การทำวัคซีนล้มเหลว ได้แก่ ระดับแอนติบอดีที่ได้รับผ่านนม น้ำเหลืองจากแม่สุนัข (passive maternal immunity) มีระดับสูงเกินไป การปฏิบัติด้านเก็บรักษาและขนส่งวัคซีน (chain of custody) ไม่ถูกต้อง ช่องทางการได้รับวัคซีน (vaccinated route) ไม่เหมาะสม ปริมาณเชื้อที่ได้รับไม่เหมาะสม ภาวะ

ทุพโภชนาการของสัตว์ (malnutrition status) นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยด้านสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส ซึ่งได้แก่ ความเหมือนหรือความแตกต่างในระดับยีนของ hemagglutinin ระหว่างเชื้อไวรัสสายพันธุ์วัคซีนกับสายพันธุ์ท้องถิ่นที่พบการระบาด เป็นต้น (Adams, 2015) การสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ในประเทศไทยนิยมฉีดวัคซีนครั้งแรกเมื่อลูกสุนัขอายุ 2 เดือน โดยใช้วัคซีนชนิดเชื้อเป็นที่ผสมรวมกับวัคซีนชนิดอื่น ๆ อีก 4 หรือ 5 ชนิด ในรูปแบบวัคซีนรวมเชื้อ 5 ชนิด (combine pentavalent vaccine) หรือวัคซีนรวมเชื้อ 6 ชนิด (combine hexavalent vaccine) สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ สายพันธุ์ Snyder Hill สายพันธุ์ Onderstepoort สายพันธุ์ Rock born เป็นต้น (Griot-Wenk et al., 2001; Martella et al., 2011) ระดับแอนติบอดีที่เพิ่มระดับสูงพอถึงระดับป้องกัน (protective antibody level) ควรจะพบที่อีก 2 สัปดาห์ ซึ่งหากความแตกต่างของ hemagglutinin gene ของเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยเทียบกับเชื้อสายพันธุ์วัคซีนสูงมากกว่าร้อยละ 10 ก็อาจจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การทำวัคซีนในสุนัขไม่ประสบผลสำเร็จได้ ซึ่งต้องมีการศึกษาในระดับยีนเพื่อการพิสูจน์ในลำดับต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการและบุคลากร โรงพยาบาลสัตว์ ประศูอาทร สำหรับการอำนวยความสะดวกตลอดการศึกษานี้ โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนวัสดุและอุปกรณ์ จากศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่าสัตว์ต่างถิ่นและสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

### เอกสารอ้างอิง

- Adams AP. Veterinary vaccines In: Vaccinology - An essential guide ed. Milligan GN, Barrett ADT. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, UK. 2015. p.181-91.
- Beineke A, Markus S, Borlak J, Thum T, Baumgärtner W. Increase of pro-inflammatory cytokine expression in non-demyelinating early cerebral lesions in nervous canine distemper. *Viral Immunol.* 2008;21(4): 401-10.
- Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;127(1-2):1-18.
- Blixenkronne-Muller M, Svansson V, Have P, Orvell C, Appel M, Pedersen IR, et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet Microbiol.* 1993; 37:163-73.
- Carvalho OV, Botelho CV, Ferreira CG, Scherer PO, Soares-Martins JA, Almeida MR. et al. Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper. *Adv Virol.* 2012;163860.
- Decaro N, Camero M, Greco G, Zizzo N, Tinelli A, Campolo M, et al. Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol.* 2004;27:177-82.
- Del Puerto HL, Martins AS, Braz GF, Alves F, Heinemann MB, Rajão DS, et al. Vero cells infected with the Lederle strain of canine distemper virus have increased Fas receptor signaling expression at 15 h post-infection. *Genet Mol Res.* 2011;10(4):2527-33.
- Ek-Kommonen C, Rudbäck E, Anttila M, Aho M, Huovilainen A. Canine distemper of vaccine origin in European mink, *Mustela lutreola* - a case report. *Vet Microbiol.* 2003;92(3):289-93.
- Ek-Kommonen C, Sihvonen L, Nuotio L, Pekkanen K, Rikula U. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet Record.* 1997;141:380-3.
- Fujita K, Miura R, Yoneda M, Shimizu F, Sato H, Muto Y, et al. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement of heparin-like molecule in CDV infection. *Virology.* 2007; 359(2):324-35.
- Gemma T, Watari T, Akiyama K, Miyashita N, Shin YS, Iwatsuki K, et al. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *J Vet Med Sci.* 1996;58:547-50.
- Greene CE, Appel MJ. *Infectious Diseases of the Dog and Cat 3rd Edition.* Missouri: Elsevier Publishing. 2006. p.1-33.
- Griot-Wenk ME, Cherpillod P, Koch A, Zurbriggen R, Bruckner L, Wittek R, et al. The humoral immune response to recombinant nucleocapsid antigen of canine distemper virus in dogs vaccinated with attenuated distemper virus or DNA encoding the nucleocapsid of wild-type virus. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2001;48(5):295-302.

- Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, Gemma T, Shin YS, Mori T, et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J Gen Virol.* 1997;78(Pt 2):373-80.
- Kai C, Ochikubo F, Okita M, Inuma T, Mikami T, Kobune F, et al. Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. *J Vet Med Sci.* 1993;55(6):1067-70.
- Keawcharoen J, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Rungsipipat A, Poovorawan Y, Oraveerakul K. Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet Microbiol.* 2005;105:137-42.
- Lednicky JA, Meehan TP, Kinsel MJ, Dubach J, Hungerford LL, Sarich NA, et al. Effective primary isolation of wild-type canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes. *J Virol Methods.* 2004;118(2):147-57.
- Martella V, Blixenkrone-Møller M, Elia G, Lucente MS, Cirone F, Decaro N, et al. Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. *Vaccine.* 2011;29(6):1222-7.
- Mouzin DE, Lorenzen MJ, Haworth JD, King VL. Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;224(1):55-60.
- Newbury S, Larson LJ, Schultz RD. Canine distemper virus. In: Miller L, Hurley K. editors. *Infectious disease management in animal shelters.* New Jersey: Wiley-Blackwell Publishing. 2009. p. 161-72.
- Oglesbee M, Tatalick L, Rice J, Krakowka S. Isolation and characterization of canine distemper virus nucleocapsid variants. *J Gen Virol.* 1989; 70(Pt 9):2409-19.
- Rzeutka A, Mizak B. Sequence analysis of the fragment of the phosphoprotein gene of Polish distemper virus isolates. *Arch Virol.* 2003;148:1623-31.
- Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-8.
- Schmid E, Zurbriggen A, Gassen U, Rima B, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibits canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. *J Virol.* 2000;74(16):7554-61.
- Tan B, Wen YJ, Wang FX, Zhang SQ, Wang XD, Hu JX, et al. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain ZJ7 isolate from domestic dogs in China. *Virology.* 2011;8:520.
- Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* 2000;406(6798):893-7.
- Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol.* 2001; 75(13):5842-50.

- Twark L, Dodds WJ. Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 2000;217(7):1021-4.
- van de Bildt MW, Kuiken T, Visee AM, Lema S, Fitzjohn TR, Osterhaus AD. Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(2):211-3.
- Woma TY, van Vuuren M. Isolation of canine distemper viruses from domestic dogs in South Africa using Vero. DogSLAM cells and its application to diagnosis. *African J Microbiol Res*. 2009;3(3): 111-8.