The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 35
Issue 4 *December, 2005*

Article 7

12-1-2005

THE DETECTION OF CANINE DISTEMPER VIRUS BY A NESTED REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION IN BLOOD SAMPLES COLLECTED AFTER VACCINATION

Nawawan Anansuchatgul

Raweewan Buasri

Ratchaneekorn Chencharoen

Sumittra Watanodorn

Juthatip Keawcharoen

See next page for additional authors

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

Anansuchatgul, Nawawan; Buasri, Raweewan; Chencharoen, Ratchaneekorn; Watanodorn, Sumittra; Keawcharoen, Juthatip; and Oraveerakul, Kanisak (2005) "THE DETECTION OF CANINE DISTEMPER VIRUS BY A NESTED REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION IN BLOOD SAMPLES COLLECTED AFTER VACCINATION," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 35: Iss. 4, Article 7.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol35/iss4/7

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

THE DETECTION OF CANINE DISTEMPER VIRUS BY A NESTED REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION IN BLOOD SAMPLES COLLECTED AFTER VACCINATION

Authors

Nawawan Anansuchatgul, Raweewan Buasri, Ratchaneekorn Chencharoen, Sumittra Watanodorn, Juthatip Keawcharoen, and Kanisak Oraveerakul

This article is available in The Thai Journal of Veterinary Medicine: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol35/iss4/7

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในกระแสเลือดโดยวิธีเนสเตด รีเวอร์สทรานสคริปเตส-โพลิเมอเรสเชนรีแอคชันหลังจากการฉีดวัคซีน

นววรรณ อนันต์สุชาติกุล[1] รวีวรรณ บัวศรี[1] รัชนีกร เจนเจริญ[1]
สุมิตรา วัฒโนดร[2] จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ[2] คณิศักดิ์ อรวีระกุล[2*]

Abstract

Nawawan Anansuchatgul[1] Raweewan Buasri [1] Ratchaneekorn Chenchar oen[1]
Sumittra Watanodorn[2] Juthatip Keawcharoen[2] Kanisak Oraveerakul[2*]

THE DETECTION OF CANINE DISTEMPER VIRUS BY A NESTED REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION IN BLOOD SAMPLES COLLECTED AFTER VACCINATION

The nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (nested RT-PCR) was used to study the canine distemper virus (CDV) could be detected in blood samples collected after vaccination. Blood samples were collected from 16 healthy puppies from 4 different litters on days 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, and 24, after vaccination with an attenuated, canine distemper virus, combined vaccine(Nobivac® Puppy DP) and from 3 puppies used as non-vaccinated controls. Vaccines were given subcutaneously either once on day 0 or two times on days 0 and 14, starting at the age of 8 weeks. A total of 152 blood samples were collected. The results revealed CDV could be detected in 2 vaccinated puppies (12.5%) by nested RT-PCR on days 7 and 10 after vaccination, but was not detected in the other 14 puppies (87.5%) or in the non-vaccinated control puppies. CDV-specific antibody titers were investigated before and after vaccination by a serum neutralization test (SN test). The CDV-specific antibody titer of all puppies was undetectable before vaccination. The $\log_2$ (geometric mean titers) were 2.00±1.87, 5.91±2.51, 8.33±0.58 and 7.38±2.67 on days 10, 14, 21, and 24 respectively. This study indicated that CDV could be detected by nested RT-PCR 7 and 10 days after vaccination in blood samples of vaccinated puppies that showed no CDV-specific clinical signs.

Keywords : canine distemper vaccine, nested RT-PCR, buffy coat, puppies

[1]6th year student, Academic year 2004.
[2]Virology unit, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330.
*Corresponding author

[1]นิสิตชั้นปีที่ 6 ปีการศึกษา 2547
[2]หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

นววรรณ อนันต์สุชาติกุล[1] รวีวรรณ บัวศรี[1] รัชนีกร เจนเจริญ[1] สุมิตรา วัฒโนดร[2] จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ[2] คณิศักดิ์ อรวีระกุล[2*]

การตรวจเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขในกระแสเลือดโดยวิธีเนสเตดรีเวอร์สทรานสคริปเตส-โพลิเมอเรสเชนรีแอคชันหลังจากการฉีดวัคซีน

ในการศึกษาระยะเวลาที่สามารถตรวจพบไวรัสจากการทำวัคซีนไข้หัดสุนัข ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบเนสเตดรีเวอร์สทรานสคริปเตส-โพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (nested RT-PCR) โดยการเก็บตัวอย่างเลือดในลูกสุนัขอายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 16 ตัว จาก 4 ครอก ระยะเวลาทำการศึกษา 24 วัน ที่ทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคไข้หัดสุนัข (Nobivac® Puppy DP; attenuated canine distemper virus เฉพาะวันที่ 0 หรือ ในวันที่ 0 และ 14 ของการศึกษา โดยลูกสุนัขที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนจำนวน 3 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม เก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 และ 24 รวมตัวอย่างที่เก็บเป็นจำนวน 152 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าในลูกสุนัขที่ได้รับวัคซีนจำนวน 14 ใน 16 ตัว (87.5%) ให้ผลลบในวันที่ 3, 7, 10, 14, 17, 21 และ 24 และตรวจพบไวรัส 2 ใน 16 ตัว (12.5%) ในวันที่ 7 และวันที่ 10 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมรวม 3 ตัว ให้ผลลบตลอดระยะเวลาในการศึกษา การตรวจหาระดับแอนติบอดีก่อนและหลังจากการทำวัคซีน ด้วยวิธี serum neutralization test พบว่า ณ วันที่ลูกสุนัขได้รับวัคซีนครั้งแรก ไม่ปรากฏว่าลูกสุนัขตัวใดที่ตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัข และลูกสุนัขที่ได้รับวัคซีนทุกตัวมีการตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนดังกล่าว โดยให้ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัข (log_2 titer) เป็น 0, 2.00±1.87, 5.91±2.51, 8.33±0.58 และ 7.38±2.67 ในวันที่ 0, 10, 14, 21, และ 24 หลังการฉีดวัคซีนตามลำดับ การศึกษานี้สรุปได้ว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจากวัคซีนในตัวอย่างเลือดสุนัขโดยไม่แสดงอาการป่วยด้วยวิธีดังกล่าวได้จำกัด ในระยะเวลาไม่เกิน 10 วัน

คำสำคัญ : วัคซีนไข้หัดสุนัข ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส ชั้นเม็ดเลือดขาว ลูกสุนัข

บทนำ

โรคไข้หัดสุนัข (Canine distemper) เป็นโรคติดเชื้อที่มีความรุนแรงโรคหนึ่ง สาเหตุเกิดจากไวรัสไข้หัดสุนัขจัดเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสสายเดี่ยว จีนัสโมบิลลิไวรัส *(Genus Morbillivirus)* แฟมิลีพารามิกโซวิริดี (Family Paramyxoviridae) ซึ่งมีความใกล้ชิดกับโรคไข้หัด (measles) ในไพรเมท และโรครินเดอร์เปส (Rinderpest) ในปศุสัตว์

Lappin (2003) รายงานว่าเมื่อสัตว์ได้รับเชื้อเข้าไปในร่างกาย ไวรัสจะเพิ่มจำนวนที่เนื้อเยื่อน้ำเหลืองหลังจากที่สัตว์หายใจเอาเชื้อเข้าไป ไวรัสจะถูกเก็บกินโดยมาโครฟาจ และถูกพาไปยังเนื้อเยื่อน้ำเหลืองทอนซิล คอหอย และต่อมน้ำเหลืองหลอดลมปอด โดยผ่านไปตามทางเดินน้ำเหลืองภายใน 24 ชม. หลังจากนั้นไวรัสก็เริ่มเพิ่มจำนวน เชื้อไวรัสจะเข้าไปยังเนื้อเยื่อของระบบประสาทส่วนกลาง และเซลล์เยื่อบุประมาณ 8-14 วันหลังได้รับเชื้อ โรคไข้หัดสุนัขมักเกิดในลูกสุนัขอายุ 3-6 เดือน แต่ก็เกิดได้ในสุนัขทุกอายุที่ไม่มีภูมิคุ้ม การเพิ่มจำนวนของไวรัสจะมีมากที่เยื่อบุของระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์ในสุนัขที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ หรือไม่มีภูมิคุ้มกันในวันที่ 9-14 หลังได้รับเชื้อ ส่วนในสุนัขที่มีระดับภูมิคุ้มกันที่สูงจะสามารถกำจัดไวรัสออกจากร่างกายได้ในวันที่ 14 หลังได้รับเชื้อ

การวินิจฉัยทำได้โดยดูจากประวัติโดยเฉพาะประวัติการป่วย และการสัมผัสสัตว์ป่วยตัวอื่น การตรวจร่างกายทั่วไป การตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยค่าทางโลหิตวิทยามักพบว่าเม็ดเลือดขาวอยู่ในระดับต่ำ (leukopenia) และเกล็ดเลือดต่ำเล็กน้อย (mild thrombocytopenia) การเกิด interstitial และ alveolar pulmonary infiltrate (Lappin, 2003) การใช้การตรวจเฉพาะ เช่น การตรวจทางซีรั่มวิทยา โดยการตรวจหาแอนติบอดี้ต่อไวรัสไข้หัดสุนัข โดยวิธี serum neutralization หรือ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสโดยตรงด้วยวิธีอิมมูนเรืองแสง (Fluorescent antibody test, FA) การตรวจหา

inclusion body เช่น จากเนื้อเยื่อปอด กระเพาะปัสสาวะ ต่อมน้ำเหลือง การตรวจน้ำในไขสันหลัง (CSF) ในรายที่มีการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขจะตรวจพบ IgG ใน CSF ซึ่งตามปกติการทำวัคซีนไม่สามารถตรวจพบภูมิคุ้มกันดังกล่าวได้ใน CSF (Michael, 2003) ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่จำเพาะ มีความไวสูง และเป็นวิธีการที่สามารถทราบผลได้รวดเร็ว (Shin et al., 1995) ในส่วนของการป้องกันและควบคุมทำได้โดยแยกสุนัขที่ป่วยออกจากสุนัขตัวอื่น ให้ลูกสุนัขได้รับภูมิคุ้มกันจากแม่สุนัขซึ่งจะอยู่ได้นาน 9-12 สัปดาห์ แต่ภูมิคุ้มกันจากแม่สุนัขจะเป็นตัวรบกวนการทำวัคซีนครั้งแรก ในลูกสุนัขที่มีระดับภูมิคุ้มกันจากแม่สูงนั้น มีการใช้วัคซีน measles ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Heterotypic antigen กับเชื้อไข้หัดสุนัข โดยเชื้อ measles จะไม่ถูกภูมิคุ้มกันจากแม่ทำลาย สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคไข้หัดสุนัข และยังคงอยู่ในระยะเวลาหนึ่งหลังจากภูมิคุ้มกันของแม่ลดลง และเมื่อหลังจากนั้น ที่ลูกสุนัขอายุ 12 สัปดาห์จึงทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคไข้หัดสุนัข (Chalmer and Baxandale, 1994) ซึ่งควรมีการทำวัคซีนป้องกันโรคไข้หัดสุนัขเป็นประจำทุกปี โดยวัคซีนไข้หัดสุนัขนั้นจะเป็นวัคซีนเชื้อเป็นที่ทำให้อ่อนกำลังลง ซึ่งผลิตจากเซลล์ไข่ไก่ฟักหรือจากเซลล์เพาะเลี้ยงของสุนัขซึ่งวัคซีนที่ทำนั้นมีหลายสเตรน เช่น Onderstepoort strain, Rockborn strain, Synder Hill strain เป็นต้น ทั้งนี้วัคซีนที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงของสุนัขไม่ควรใช้ในลูกสุนัขที่อายุต่ำกว่า 6 สัปดาห์ เพราะมีความเสี่ยงสูงที่จะทำให้เกิดสมองอักเสบ (encephalitis) หลังจากการทำวัคซีน (Pastoret et al., 1997) บางครั้งอาจพบว่าเกิดปัญหาของระบบประสาท การเกิดสมองอักเสบ แสดงอาการป่วย หลังจากที่ได้ทำวัคซีน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจาก การที่ลูกสุนัขได้รับเชื้อก่อนการทำวัคซีน แม่สุนัขได้รับ modified lived vaccine ขณะตั้งท้อง หรือในรายที่ลูกสุนัขมีภูมิคุ้มกันที่ต่ำมาก หรืออาจเกิดจากตัววัคซีนเองที่ไม่ได้ประสิทธิภาพ

นอกจากนี้ มักพบปัญหาบ่อยๆ จากการที่สุนัขป่วยด้วยอาการของโรคไข้หัดสุนัขภายหลังได้รับการฉีดวัคซีน (จุฑาทิพย์, 2002; Bestetti et al.,1978; Cornwell et al., 1988) เมื่อทำการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวโดยวิธี Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่ามีการตรวจพบเชื้อไวรัสได้ในกระแสเลือดและสับสนว่าเป็นไวรัสจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ หรือจากไวรัสวัคซีน

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ คือ เพื่อศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อประกอบการวินิจฉัยด้วยการตรวจหาไวรัสโดยวิธี Nested RT-PCR จากชั้นเม็ดเลือดขาวภายหลังการฉีดวัคซีน

วัสดุและวิธีการ

สุนัข

ลูกสุนัข 4 ครอก จำนวนครอกละ 5, 7, 3 และ 4 ตัวตามลำดับ รวม 19 ตัว อายุประมาณ 8 สัปดาห์ ไม่เคยได้รับการทำวัคซีนใดๆมาก่อน และไม่มีประวัติการป่วย สุขภาพแข็งแรง ในแต่ละครอกที่ทำการศึกษาจะมีลูกสุนัข 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนไข้หัดสุนัขรวม 16 ตัว และกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับการฉีดวัคซีนจำนวน 3 ตัว

ตัวอย่างเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 และ 24 (โดยในวันที่ 0 และ 14 ทำการเก็บตัวอย่างเลือดก่อนการฉีดวัคซีน) จาก cephalic vein หรือ saphenous vein ครั้งละ 1.5 มล./ตัว โดยมีสารกันเลือดแข็งตัวได้แก่เฮปพาริน ความเข้มข้น 2,500 IU/มล. ปริมาตร 20 ไมโครลิตร/เลือด 1 มล. เก็บในอุณหภูมิ 4°ซ. ไม่เกิน 24 ชม. เพื่อรอทำการแยกส่วนตัวอย่างเม็ดเลือดขาวจากชั้น buffy coat พลาสมา และทำการตรวจอื่นๆ ต่อไป

วัคซีน และโปรแกรมวัคซีนในกลุ่มการทดลอง

วัคซีนที่ใช้ในการทดลอง คือ Nobivac® Puppy DP (Intervet, The Netherlands) ซึ่งเป็นวัคซีนป้องกันโรคไข้หัดสุนัขและป้องกันการเกิดโรคลำไส้อักเสบ มีส่วนประกอบของ attenuated canine distemper virus (Oderstepoort strain): titer $\geq 10^5$ $TCID_{50}$/ml และ attenuated canine parvovirus (C154 strain: CPV type2): titer $\geq 10^7$ $TCID_{50}$/ml) ทำการฉีดวัคซีนเข้าใต้ผิวหนัง โดยในสุนัข 2 ครอกแรก ทำการฉีดวัคซีนจำนวน 1 เข็มในวันที่ 0 ส่วนลูกสุนัขอีก 2 ครอกจะได้รับวัคซีน 2 เข็มโดยฉีดเข็มแรกในวันที่ 0 และเข็มที่ 2 ในวันที่ 14 ของการศึกษา

เชื้อไวรัสอ้างอิง

ไวรัสไข้หัดสุนัข Oderstepoort strain เพาะแยกใน Vero cell line ซึ่งเพาะเลี้ยงใน minimum essential media; MEM (Gibco BRL, USA เอื้อเฟื้อโดย Dr.Ken Platt, Iowa State University, Ames, IA.)

วิธีการ

การแยกส่วนตัวอย่างเลือด นำตัวอย่างเลือด 1.5 มล. มาปั่นแยกพลาสมาออกด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดแยกส่วนพลาสมาออกใส่หลอด microcentifuge tube เก็บไว้ที่ -20°ซ. เพื่อรอการตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัขต่อไป ส่วนเม็ดเลือดแดงที่เหลืออยู่ใส่ red cell lysis buffer (RCLB, 10mM Tris, pH7.6), 10mMNaCl, 5mM $MgCl_2$) จำนวน 500 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที นาน 1 นาที หลังจากนั้นเทส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้งจนกระทั่งไม่เหลือส่วนที่เป็นสีแดง และเห็นส่วนที่เป็น buffy coat ที่มีสีขาวตรงส่วนก้นหลอด microcentifuge tube ปั่นล้างเซลล์ buffy coat ด้วย Phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วเก็บที่ -70°ซ. เพื่อรอการสกัด RNA ต่อไป

การสกัด RNA

สกัด RNA ด้วย QIAamp® viral RNA Mini Kit (QIAGEN, USA) ดูดสารตัวอย่าง 140 ไมโครลิตร ลงในหลอด microcentifuge tube เติม buffer AVL containing carrier RNA 560 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติม absolute ethanol 560 ไมโครลิตร เพื่อเพิ่มการจับของ RNA กับ QIAamp® membrane ล้างสิ่งปนเปื้อนบนแผ่นกรองโดย AW1 และ AW2 ในชุดสกัด RNA สำเร็จรูปดังกล่าว จากนั้นเติม Buffer AVE 60 ไมโครลิตร (ซึ่งมีส่วนประกอบของ 0.04% sodium azide เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สร้าง RNase) เพื่อชะล้างสาย RNA ที่ดูดซับอยู่บนแผ่นกรองออก จากนั้นรักษาสภาพของ RNA ใน buffer AVE ที่ -20°ซ. เพื่อเตรียมไปใช้งานต่อไป

Primers ไวรัสไข้หัดสุนัข

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ primer ของไวรัสไข้หัดสุนัขซึ่งมีความจำเพาะต่อ nucleocapsid protein gene จากการศึกษาของ จุฑาทิพย์ (2002) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

Outer primers

Forward primers (CDV1): location; nt1223-nt1253; 5'GTGTCAGAAATAGCATCCAAGAC3'

Reverse primers (CDV4): location; nt1817-nt1837; 5'GCCCTTTGCTGACATGGTAGG3'

Inner primers

Forward primers (CDV2): location; nt1287-nt1309; 5'GTGTCAGAAATAGCATCCAAGAC3'

Reverse primers (CDV3): location; nt1739-nt1760; 5'TTTGTTGGACCTGGGTCCTAAG3'

Primers ของ gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

Forward primers GAPDH : 5'-CTTCACCACCA TGGAGAAGGC-3'

Reverse primers GAPDH : 5'-GTTGTCATGGA TGACCTTGGC-3'

Nested RT-PCR

นำ RNA ที่สกัดจำนวน 5 ไมโครลิตร มาสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้ Access Quick™ RT-PCR System (Promega, USA) นำ cDNA มาเป็นตัวตั้งต้นนำไปเพิ่มจำนวนกรดนิวคลิอิก ตามอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบ ซึ่งคำนวณ จาก primers ที่ออกแบบไว้ในเครื่อง Thermocycle ดังนี้

เข้าสู่ปฏิกิริยา Revesese transcription ที่อุณหภูมิ 48°ซ. นาน 45 นาที เริ่มต้น ปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 95°ซ. นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ แต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิ และ เวลาจำนวน 35 รอบ ดังนี้ denaturation 95°ซ. นาน 30 วินาที annealing 55°ซ. นาน 30 วินาที และ extension 72°ซ. นาน 1.5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 95°ซ. นาน 1 นาที 55°ซ. นาน 2 นาที และ 72°ซ. นาน 10 นาที และแช่หลอดไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ. เพื่อนำไปสู่ขั้นตอน nested RT-PCR ต่อไป

จากนั้นนำ PCR Product ที่ได้จำนวน 5 ไมโครลิตร มาเข้าสู่ปฏิกิริยา nested RT-PCR โดยใช้ Access Quick™ RT-PCR System (Promega, USA) และนำเข้าเครื่อง thermocycle โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาของแต่ละขั้นตอนเหมือนกับการทำ PCR ในช่วงแรก

ซึ่งขั้นตอนการตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขจะทำการเปรียบเทียบกับ non-infected vero cell ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ และ CDV Onderstepoort strain infected vero cell ซึ่งเป็น ตัวควบคุมบวก และใช้ primers ที่จำเพาะต่อการตรวจหาจีน GAPDH ซึ่งเป็นจีนที่พบได้ในเซลล์ของสัตว์ทุกชนิด โดยใช้เป็นตัวควบคุมเพื่อวัดประสิทธิภาพในการสกัด RNA ขั้นตอนการตรวจหาจีน GAPDH จะทำการเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ และเนื้อเยื่อไก่ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวกโดยมีขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้

เข้าสู่ปฏิกิริยา reverse transcription ที่อุณหภูมิ 48°ซ. นาน 45 นาที เริ่มต้น ปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 94°ซ. นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ แต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนด

อุณหภูมิ และ เวลาจำนวน 40 รอบ ดังนี้ denaturation 94°ซ. นาน 30 วินาที annealing 56°ซ. 30 วินาที extension 72°ซ. นาน 30 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 72°ซ. นาน 7 นาที และแช่หลอดไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ.

RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างทำการตรวจ PCR product ด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis และส่องดูตัวอย่างภายใต้รังสีอุลตราไวโอเล็ตหลังจากการย้อมด้วย ethidium bromide ทำการรายงานผลการตรวจเป็นร้อยละจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลตรวจเป็นบวกของลูกสุนัขทั้งหมด

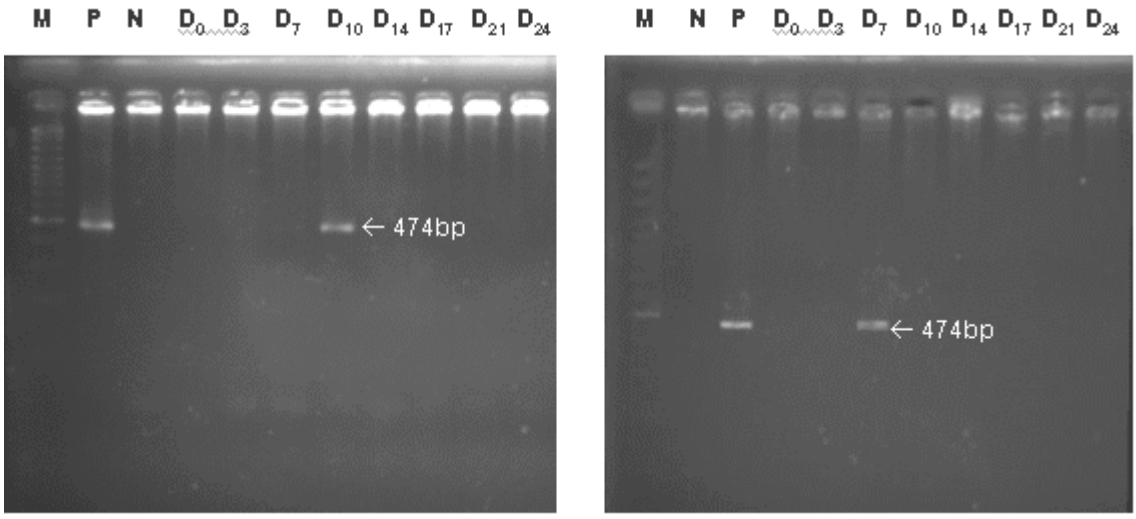
Serum Neutralization Test

ทำการตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัขด้วยวิธี Serum neutralization test ดัดแปลงจากวิธีของ Appel and Robson(1973) ซึ่งอ้างโดย วรพรและคณะ(2000) ดังนี้ เริ่มจากทำการอุ่น พลาสมาที่อุณหภูมิ 56°ซ. เป็นเวลา 30 นาที เพื่อ inactivate complement เจือจาง พลาสมาเป็น serial 2-fold dilutions ใน MEM ซึ่งมี 2% fetal calf serum เติมไวรัสไข้หัดสุนัขที่ความเข้มข้น 100 $TCID_{50}$/50 ไมโครลิตร นำไปอบที่ 37°ซ. 5%CO_2 เป็นเวลา 1 ชม. ก่อนเติม trypsinized Vero cell จำนวน 100 ไมโครลิตร โดยมี back titration control ทำการอบที่ 37°ซ. 5%CO_2 อ่านผลโดยการตรวจดู syncytial formation ซึ่งพบ cytopathic effect ที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุมภายหลัง 72 ชม.หลังการเติมเชื้อ ทำการอ่านค่าระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัขของแต่ละตัวอย่าง

ผล

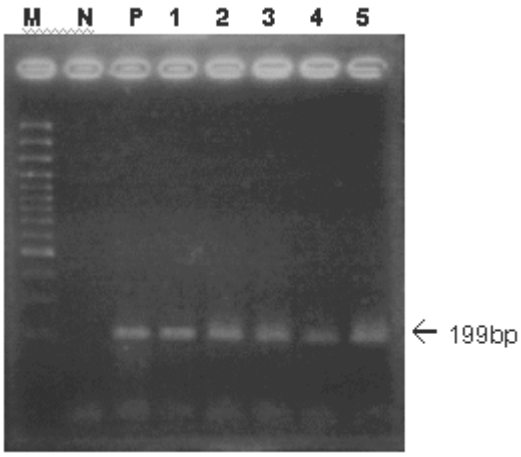
จากการตรวจหาไวรัสไข้หัดสุนัขในชั้นเม็ดเลือดขาวของตัวอย่างเลือด หลังจากการทำวัคซีนด้วย nested RT-PCR ตามตารางที่ 1 พบว่า ก่อนการทำวัคซีนเข็มแรก ลูกสุนัขทุกตัวตรวจไม่พบไวรัส (วันที่ 0) ลูกสุนัขในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับการฉีดวัคซีนตรวจไม่พบไวรัสตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ในลูกสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีน 1 เข็มในวันที่ 0 มีการตรวจพบไวรัสจำนวน 1 ตัวโดยตรวจพบในวันที่ 10 ของการศึกษา ส่วนอีก 6 ตัวตรวจไม่พบไวรัสตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ในลูกสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีน 2 เข็มในวันที่ 0 และ 14 มีการตรวจพบไวรัสจำนวน 1 ตัวโดยตรวจพบในวันที่ 7 ของการศึกษา ส่วนอีก 8 ตัวตรวจไม่พบไวรัสตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้มีสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีนทั้งสิ้น 16 ตัว ตรวจพบไวรัสในชั้นเม็ดเลือดขาว 2 ตัว คิดเป็น 12.5% ของลูกสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีนทั้งหมด ผลการตรวจไวรัสไข้หัดสุนัขด้วย RT-PCR ของตัวอย่างแสดงไว้ในรูปที่ 1 และผลในการตรวจหาจีน GAPDH ในตัวอย่างเลือดจากลูกสุนัข พบว่าสามารถตรวจพบจีน GAPDH ในทุกตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่ากระบวนการสกัด RNA ที่ใช้มีประสิทธิภาพซึ่งแสดงในรูปที่ 2

เมื่อศึกษาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัขก่อนและหลังจากการฉีดวัคซีนป้องกันโรคไข้หัดสุนัข พบว่าก่อนการทำวัคซีนเข็มแรกลูกสุนัขทุกตัวตรวจไม่พบระดับ

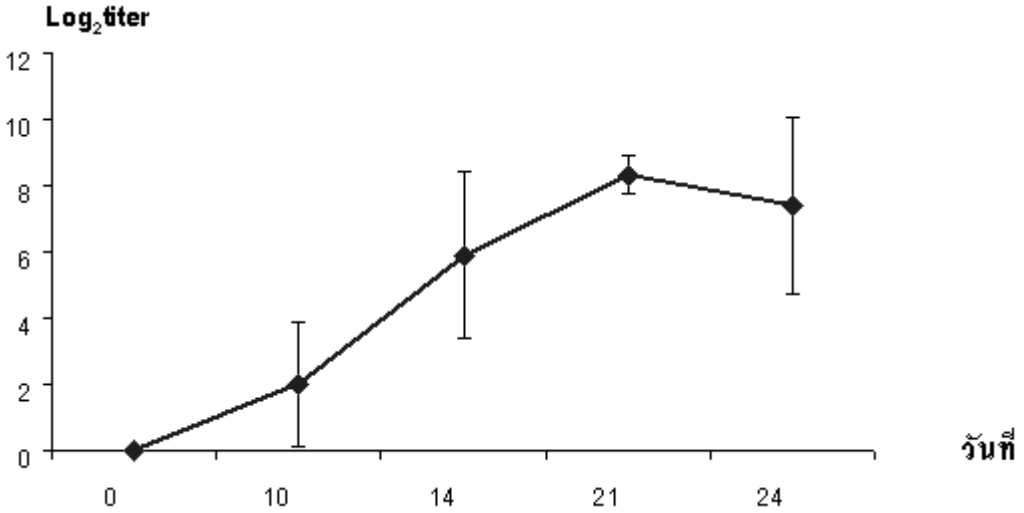


1 A **1 B**

รูปที่ 1 แสดงผลผลิตภัณฑ์ nested RT-PCR จากการตรวจหา RNA ของไวรัสไข้หัดสุนัขจากชั้นเม็ดเลือดขาวในลูกสุนัข จำนวน 2 ตัว (1A,1B) (M: 100bp ladder marker, P: ตัวอย่างควบคุมบวกจาก CDV-infected vero cell, N: ตัวอย่างควบคุมลบจาก non-infected vero cell, และ D: วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง)



รูปที่ 2 แสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR ในการตรวจหา RNA GAPDH ในตัวอย่างเลือดจากลูกสุนัข (M: 100bp ladder marker, P: ตัวอย่างควบคุมบวกจากเนื้อเยื่อไก่, N: ตัวอย่างควบคุมลบ (น้ำกลั่น), 1-5: ตัวอย่างเลือดจากลูกสุนัข)



รูปที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ $\log_2$ titer ในลูกสุนัขหลังจากฉีดวัคซีนป้องกันโรคไข้หัดสุนัข

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจหาไวรัสไข้หัดสุนัขในกระแสเลือดด้วยวิธี nested RT-PCR

ลูกสุนัข	จำนวน	จำนวนสุนัขที่ตรวจพบไวรัส ณ วันที่ทำการศึกษา (ตัว)							
	(ตัว)	0	3	7	10	14	17	21	24
ได้รับวัคซีนในวันที่ 0									
ควบคุม	1	-	-	-	-	-	-	-	-
วัคซีน	7	-	-	-	1	-	-	-	-
ได้รับวัคซีนในวันที่ 0 และ 14									
ควบคุม	2	-	-	-	-	-	-	-	-
วัคซีน	9	-	-	1	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย log2titer และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับของแอนติบอดีภายหลังการฉีดวัคซีนไข้หัดสุนัข

	วันที่ทำการศึกษา				
	0	**10**	**14**	**21**	**24**
log_2 titer	0	2.00	5.91	8.33	7.38
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0	1.87	2.51	0.58	2.67

แอนติบอดีของไวรัสไข้หัดสุนัข แต่เริ่มมีการตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัขตั้งแต่วันที่ 10 ของการศึกษา ดังตารางที่ 2 โดยให้ค่าเฉลี่ยระดับภูมิคุ้มกัน (log_2 titer) ที่ 0, 2.00±1.87, 5.91±2.51, 8.33±0.58 และ 7.38±2.76 ในวันที่ 0, 10, 14, 21 และ 24 หลังจากการทำวัคซีนตามลำดับ (ตารางที่ 2 และรูปที่3)

วิจารณ์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาไวรัสไข้หัดสุนัขในชั้นเม็ดเลือดขาวด้วยเหตุผลที่ว่าในทางปฏิบัติเราสามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้จากสัตว์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และการตรวจจากชั้นเม็ดเลือดขาวนี้สามารถตรวจพบไวรัสได้ทุกระยะที่แสดงอาการของระบบต่างๆ แสดงว่า ไวรัสอยู่ในเม็ดเลือดขาวทุกระยะของการติดเชื้อ พูลทรัพย์(2000) ได้ทำการศึกษาการตรวจหาไวรัสในสุนัขป่วยพบว่าสามารถตรวจพบไวรัสในส่วนชั้นเม็ดเลือดขาวได้มากกว่าในพลาสมา โดยตรวจได้จากชั้นเม็ดเลือดขาวพบ 86.15% ส่วนในพลาสมาพบ 21.53% นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาการตรวจหาไวรัสจากตัวอย่างต่างๆ โดยวิธี RT-PCR ไม่ว่าจะเป็นจากชิ้นเนื้อ (Tiwannanthakarn et al., 2000; Keawcharoen et al., 2005) ตัวอย่างเลือด ตัวอย่างซีรัม น้ำไขสันหลัง (Frisk et al., 1999) ตัวอย่างพลาสมา ตรวจจากส่วน buffy coat หรือ ชั้นเม็ดเลือดขาว (Shin et al., 1995; Tiwannanthakorn et al., 2002) ซึ่งสามารถตรวจพบได้เช่นกัน ซึ่งตัวอย่างเลือดโดยเฉพาะอย่างยิ่งชั้นเม็ดเลือดขาวเป็นตัวอย่างที่สามารถเลือกเก็บเพื่อการวินิจฉัยได้ง่ายจากสัตว์ป่วยที่ยังมีชีวิตอยู่

จากผลการศึกษาพบว่าหลังจากการฉีดวัคซีนไข้หัดสุนัขจะตรวจพบไวรัสในกระแสเลือดได้จำกัด เฉพาะวันที่ 7 ในลูกสุนัข 1 ตัว และในวันที่ 10 ในลูกสุนัขอีก 1 ตัว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kim และคณะ(2001) ที่ได้ทำการตรวจหาไวรัสในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียว (peripheral blood mononuclear cells) หลังจากการทำวัคซีนในลูกสุนัขจำนวน 5 ตัว โดยสามารถตรวจพบไวรัสได้ในวันที่ 2 (5 ตัว) และในวันที่ 7 (4 ตัว) และตรวจไม่พบในวันที่ 14 หลังการทำวัคซีน ซึ่งจากข้อมูลที่ได้พบว่าการตรวจพบไวรัสจากวัคซีนมีความแตกต่างจากการตรวจพบไวรัสที่เกิดจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ และมีความแตกต่างกันในวัคซีนต่างชนิดกันในแง่ของระดับที่ถูกทำให้อ่อนกำลังลง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติบางประการของไวรัสในวัคซีนซึ่งถูกทำให้อ่อนกำลังลงเพื่อลดความรุนแรง ไม่ก่อให้เกิดโรค โดยในการทำวัคซีนให้อ่อนกำลังลงนั้นทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสให้อยู่ในสภาวะที่แตกต่าง หรือไม่เหมาะสมจากการเพิ่มจำนวนในธรรมชาติ วัคซีนป้องกันไข้หัดสุนัขจะผลิตโดยผ่านเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงจากสัตว์ปีก (egg-adapted or avian cell culture adapted) เช่น สเตรน Onderstepoort หรือผ่านเข้าเซลล์เพาะเลี้ยงจากไตสุนัข เช่น สเตรน Rockborn (Pastoret et al., 1997) โดยไวรัสในวัคซีนจะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในเซลล์ น้อยกว่าไวรัสที่มีความรุนแรง และความสามารถในการแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่ออวัยวะอื่นๆ ต่างจากการแพร่กระจายของไวรัสในธรรมชาติ แต่ยังกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เกิดขึ้นได้ (Ian, 2000) ดังจะเห็นได้จากการที่มีการตรวจพบระดับแอนติบอดีด้วยวิธี serum neutralization test ซึ่งลูกสุนัขทุกตัวมีระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นหลังจากฉีดวัคซีน โดยไม่แสดงอาการป่วยของโรคไข้หัดสุนัข และแสดงให้เห็นว่าวัคซีนไข้หัดสุนัขที่ใช้ในการศึกษายังคงมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ประสิทธิภาพของเทคนิคการสกัด RNA และการรบกวนของฮีโมโกลบินอาจมีผลต่อการตรวจด้วยวิธี nested RT-PCR ทั้งนี้ได้มีการตรวจสอบประสิทธิภาพในการสกัด RNA ในการศึกษานี้ตัวอย่างทุกตัวสามารถตรวจพบ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) ซึ่งใช้เป็น internal control จากตัวอย่างเลือด โดยจีนดังกล่าวสามารถตรวจพบได้ในเซลล์ของสัตว์ทุกชนิดแสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการสกัด RNA ไม่ได้เป็นข้อจำกัดในการศึกษาครั้งนี้ ส่วนในขั้นตอน RT-PCR

อาจมีการปนเปื้อนฮีโมโกลบินจากเม็ดเลือดแดงที่สามารถรบกวนหรือยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยา PCR อันอาจส่งผลให้เกิดการแปรผลลบผิดพลาดขึ้นได้ (วัชรี, 1993) จึงทำการลดผลจากฮีโมโกลบิน โดยการกำจัดเม็ดเลือดแดง และปั่นล้างหลายๆ รอบ พบว่าฮีโมโกลบินไม่มีผลรบกวนวิธีตรวจด้วย PCR ในการศึกษานี้ดังจะเห็นได้จากผลการตรวจหา GADPH ในตัวอย่างเช่นกัน

อย่างไรก็ตามยังมีข้อสงสัยถึงไวรัสในวัคซีนว่าอาจเป็นสาเหตุทำให้สุนัขแสดงอาการป่วยหลังจากการทำวัคซีน กรณีดังกล่าวอาจมีสาเหตุจากระดับการทำให้เชื้ออ่อนกำลังลงของวัคซีนไม่เพียงพอ หรือขึ้นอยู่กับ อายุ พันธุ์สุนัขที่มีความไวต่อการติดเชื้อ ดังตัวอย่างวัคซีนไข้หัดสุนัขสเตรน Rockborn ที่เกิดจากการทำให้เชื้ออ่อนกำลังลงโดยผ่านเข้าเซลล์เพาะเลี้ยงจากสุนัข และมีคำแนะนำว่าไม่ควรใช้ในลูกสุนัขที่อายุต่ำกว่า 6 สัปดาห์ (Pastoret et al., 1997) และมีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าไวรัสที่แยกได้จากสุนัขที่ป่วยด้วยอาการของไข้หัดสุนัขมีลักษณะพันธุกรรมคล้ายคลึงกับไวรัสวัคซีน จุฑาทิพย์ (2002) พบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากสุนัข จำนวน 2 ตัวใน 13 ตัวที่แสดงอาการป่วย มีลำดับนิวคลิโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับไวรัสวัคซีนสเตรน (Oderstepoort strain) โดยหนึ่งตัวเป็นลูกสุนัขอายุ 3 เดือน และมีประวัติได้รับวัคซีนไม่เกิน 1 เดือน ส่วนอีกตัวอย่างเป็นลูกสุนัขอายุ 2 เดือน และไม่มีประวัติการได้รับวัคซีน นอกจากนี้มีรายงานการเกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningoencephalitis) ในระยะเวลา 7-14 วันหลังจากการได้รับวัคซีนไข้หัดสุนัขชนิดเชื้อเป็น (modified live virus-canine distemper vaccine) (Taylor, 2003) การทำวัคซีนชนิดอื่นร่วมกับวัคซีนไข้หัดสุนัข โดยเฉพาะวัคซีน Canine Parvovirus หรือการใช้ยาที่กดระดับภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive drug) ในช่วงที่มีการทำวัคซีน เช่น corticosteroids, cytotoxic drug หรือยาต้านจุลชีพที่กดการทำงานของไขกระดูก เช่น phenylbutazone, estrogens, 1%thiacetarsamide sodium และ organophosphate ก็อาจมีผลทำให้วัคซีนที่ใช้ให้ผลที่ไม่พึงประสงค์ และก่อให้เกิดอาการของโรคตามมา ซึ่งพิสูจน์ได้จากผลการตรวจพบไวรัสในกระแสเลือด (Quinn et al., 2002)

การศึกษาครั้งนี้มีการตรวจพบไวรัสจำกัดในวันที่ 7-10 หลังจากการทำวัคซีน และไม่ปรากฏว่ามีลูกสุนัขแสดงอาการป่วยของโรคแต่อย่างใด ซึ่งความแตกต่างของจำนวนวันที่ตรวจพบไวรัสในธรรมชาติ และไวรัสวัคซีนอาจจะขึ้นกับความต้านทานหรือความไวต่อการติดเชื้อของลูกสุนัขที่ศึกษาหรืออาจขึ้นกับระดับของการทำให้อ่อนกำลังของวัคซีนไวรัสที่แตกต่างกัน ระยะดังกล่าวหากเป็นการติดเชื้อชนิดรุนแรงจะอยู่ในช่วงระยะฟักตัวหรือระยะต้นของโรคเท่านั้น และการติดเชื้อนั้นจะสามารถตรวจพบไวรัสได้ทุกระยะของการแสดงอาการ ดังนั้นการใช้เทคนิค nested RT-PCR เพื่อประกอบการวินิจฉัยการป่วยด้วยอาการของโรคไข้หัดสุนัขในสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีนในช่วง 10 วันแรก ควรมีการตรวจยืนยันอีกครั้งหนึ่ง หากผลการตรวจยังคงพบไวรัสอาจให้น้ำหนักการวินิจฉัยว่ามีการเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ส่วนจะเป็นไวรัสจากการติดเชื้อ ไวรัสวัคซีน หรือไวรัสที่มีความคล้ายคลึงกับไวรัสวัคซีนนั้นต้องอาศัยหลักฐานการพิสูจน์อื่นต่อไป เนื่องจากการตรวจหาไวรัสไข้หัดสุนัขโดยใช้ primer ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าไวรัสที่ตรวจพบนั้นเป็นไวรัสวัคซีน หรือ ไวรัสในธรรมชาติ

สรุป

ผลจากการศึกษาพบว่าหลังการฉีดวัคซีนไข้หัดสุนัขจะตรวจพบไวรัสในกระแสเลือดจากชั้นเม็ดเลือดขาวโดยวิธี nested RT-PCR ได้จำกัดไม่เกิน 10 วันหลังจากทำวัคซีนโดยลูกสุนัข ดังกล่าวจะยังคงมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อวัคซีน และไม่ปรากฏอาการของโรคไข้หัดสุนัข

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการเสริมทักษะการวิจัย ปีการศึกษา 2547 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บริษัทอินเตอร์เว็ท (ประเทศไทย) จำกัด ที่เอื้อเฟื้อชุดสกัด RNA ชุดตรวจ RT-PCR และวัคซีน Nobivac® Puppy DP ที่ใช้ในการทดลอง โรงพยาบาลสัตว์สุวรรณชาด โรงพยาบาลสัตว์ศรีวรา คุณทรงศิริ สุรินสมบูรณ์ และคุณวัลลภ ลิขิตสุนทรวงศ์ ที่เอื้อเฟื้อลูกสุนัขในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ. 2002. (2545) การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนยีนของไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์. สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: หน้า 42-43.

พูลทรัพย์ รุ่งนิศากร. 2000. (2543) การตรวจหาไวรัสไข้หัดสุนัขจากตัวอย่างทางคลีนิคโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส. วิทยานิพนธ์. สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทาง

สัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: หน้า 29, 32.

วรพร สุขุมาวาสี บุญเลิศ ลีพงษ์ ศิลศักดิ์ แก้วมณีรัตน์ สุวิทย์ กัมทรทิพย์ มนคน ตรีศิริโรจน์ ประวีณา กิติคุณ สุมิตรา วัฒโนดร และคณิศักดิ์ อรวีระกุล. 2000. (2543) ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หัดสุนัขในกลุ่มสุนัขก่อนและหลังทำวัคซีนรวมที่มีวัคซีนป้องกันโรคไข้หัดสุนัข เวชชสารสัตวแพทย์ 30(4): 13-23.

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ. 1993. (2536) เทคนิค PCR ขั้นสูง ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. โรงพิมพ์เรือนแก้ว กรุงเทพ. หน้า 85-86.

Bestetti G., Fatzes R. and Frankhauser R. 1978. Encephalitis following vaccination against distemper and infectious hepatitis in the dog. An optical and ultrastructural study. Acta. Neuropathol(Berl) 73(1-2): 69-75.

Chalmers W.S.K. and Baxendale W. 1994. A comparison of canine distemper vaccine and measles vaccine for prevent canine distemper in young puppies. Vet. Rec. 135: 349-353.

Cornwell H.j., Thompson H., McCandlish I.A., Macartney L. and Nash A.S. 1988. Encephalitis in dogs associated with a batch of canine distemper (Rockborn) vaccine. Vet. Rec. 122(3): 54-9

Frisk A.L., Koing M., Moritz A., and Baumgartner W., 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dog with distemper. J. Clin. Microbiol. 37(11): 3634-3643.

Ian R.T. 2000. Veterinary immunology an introduction. In : Vaccine and vaccination. 6th ed. W.B. Saunders, Philadelphia : 235-240.

Keawcharoen J., Theamboonlers A., Jantaradsamee P., Rungsipipat A., Oraveerakul K., and Poovorawan Y., 2005. Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. Vet. Microbiol. 105 (2):137-142.

Kim Y., Cho K., Youn H., Yoo H., and Han H., 2001. Detection of canine distemper virus(CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR, J. Vet. Sci. 2(1): 59-63.

Lappin M.R., 2003. Infectious Diseases. In : Small Animal Internal Medicine. 3rd ed. Nelson R.W. and Couto C.G. (eds.), Mosby, Inc., Missouri:1273-1275.

Michael S. 2003. Infectious disease. In: Clinical medicine of dog and cat. Manson Publishing Ltd., Spain: 80-81.

Pastoret P.P., Blancou J. and Verschueren C. 1997. Verterinary vaccinology .1st ed The Netherland: 131-137, 326-330.

Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J., and Leonard F.C. 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Science : 383-385.

Shin Y.S., Mori T., Okita M., Gemma T., Kai C. and Mikami T., 1995. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. J. Vet. Med. Sci. 57: 439-445.

Taylor S.M., 2003. Neuromuscular Disorders. In : Small Animal Internal Medicine. 3rd ed. Nelson R.W. and Couto C.G. (eds.), Mosby, Inc., Missouri :1015-1016.

Tiwanathakorn W., Junsuwanaruk S., Rungsipipat A., Sailasuta A., Techangamsuwan S., Siripornpasert S., Teteyama S., Yamaguchi R. and Uchida K. 2000. The diagnosis of canine distemper disease using RT-PCR. Thai J. Vet. Med. 30(4): 26-39.

Tiwanathakorn W., Junsuwanaruk S., Rungsipipat A., Sailasuta A., Techangamsuwan S., Siripornpasert S., Teteyama S., Yamaguchi R. and Uchida K. 2002. The application of a RT-PCR technique for the diagnosis of canine distemper using peripheral blood mononuclear cells. Thai J. Vet. Med.32(3): 72-81.