

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VIRUT GÂY BỆNH CARÊ PHÂN LẬP TRÊN ĐÀN CHÓ NUÔI TẠI HÀ NỘI.

Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Hữu Nam, Nguyễn Thị Huyền
Khoa thú y, Trường đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã làm rõ thêm một số đặc tính sinh học của virus Carê (Canine Distemper Virus – CDV) phân lập trên dòng tế bào Vero-DST. Các mẫu bệnh phẩm của chó mắc bệnh Carê như : phổi, hạch lympho, ruột cho khả năng phân lập virus rất cao. Tế bào Vero-DST là tế bào thích hợp để phân lập virus CDV. Virus nhân lên nhanh trong tế bào Vero-DST và gây bệnh tích tế bào điển hình thể Syncytium - thể hợp bào. Bệnh tích tế bào xuất hiện sau 12h gây nhiễm, đạt cao nhất sau 60 giờ gây nhiễm và phá hủy muộn nhất là 96 giờ sau gây nhiễm. Để tìm hiểu sâu hơn về đặc tính sinh học của virus phân lập được, chúng tôi không chỉ tiến hành nghiên cứu với những virus phân lập được mà còn đồng thời tiến hành đối với cả chủng virus vaccin Onderstepoort. Virus CDV4-H phân lập được có khả năng phá hủy tế bào mạnh hơn virus vaccin chủng Onderstepoort. Virus CDV4-H đạt hiệu giá cao nhất sau 36 giờ gây nhiễm với CPE đạt 90%. Hai chủng virus này đều tồn tại trong tế bào và ngoài tế bào, hiệu giá virus trong tế bào cao hơn hiệu giá virus giải phóng ra ngoài tế bào. Kết quả này có ý nghĩa cho người làm nghiên cứu virus có thể xác định được thời điểm thu hoạch virus dựa vào việc quan sát bệnh tích tế bào (CPE).

Từ khóa: Chó, Bệnh Carê, Virus, Đặc tính sinh học.

Some biological characteristics of Canine distemper virus isolated from dogs in Ha Noi city

Nguyen Thi Lan, Nguyen Huu Nam, Nguyen Thi Huyen
SUMMARY

Some biological characteristics of Canine Distemper Virus (CDV) that isolated on Vero-DST cell lines were studied in the present research. The samples including lung, lymphonodes, intestine from dogs infected with CDV were used for isolation of virus. Vero-DST cells are suitable to isolate CDV virus in the present research. CDV caused typical syncytium cytopathogenic effect in Vero-DST cells as early as 12 hour post inoculation. Order to understand more the biological characteristics of isolated virus, we studied both isolated CDV4-H virus and the Onderstepoort strain virus. CDV4-H virus caused cytopathogenic effect (CPE) earlier than Onderstepoort strain virus. CDV4-H had the highest virus titer at 36 hour post inoculation with 90% CPE. With both virus strains, cell associated virus titer was higher than released virus titer. The results was useful for researchers to know the good time for harvesting virus by only watching CPE.

Key words: Dog, Canine distemper, Virus, Biological characteristic.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Carê hay bệnh sài sốt ở chó là một bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm thường xảy ra ở chó non, lây lan nhanh và tỷ lệ chết rất cao. Nó được biết tới là căn bệnh nguy hiểm nhất trên chó trong nửa đầu thế kỷ 19. Bệnh được báo cáo lần đầu tiên ở châu Âu vào năm 1760 (Appel và Gillespie, 1972a). Các triệu chứng lâm sàng và tiến triển của bệnh đã được mô tả lần đầu tiên vào năm 1809 bởi Edward Jenner (Appel và Gillespie, 1972b; Shell, 1990), và virus Carê đã được phân lập vào năm 1905 (Carré, 1905). Bệnh Carê diễn ra rộng rãi trên toàn thế giới, xảy ra ở một số nước như Mỹ, Argentina, Brazil, Mexico, Nam Phi và

hiều nước ở Châu Âu, gần đây nhất là ở các nước châu Á như Nhật Bản (Lan và cs, 2006), Thái Lan (Keawcharoen và cs, 2005), Hàn Quốc (An và cs, 2008) và Ấn Độ (Latha và cs, 2007b). Nguyên nhân gây bệnh Carê trên chó là do Canine distemper virus (CDV). CDV là một thành viên của giống Morbillivirus, thuộc họ Paramixoviridae. Các thành viên khác của giống Morbillivirus như virus gây bệnh sởi trên người (MV), virus dịch tả trâu bò (RPV), virus gây bệnh trên động vật nhai lại nhỏ (PPRV), virus gây bệnh trên động vật có vú dưới nước (cá heo, hải cẩu) (Griffin, 2001; Murphy, 1999). Virus Carê cũng gây bệnh trên động vật hoang dã ăn thịt và hổ (Appel và cs, 1994; Frolich và cs, 2000; Martella và cs, 2002). Virus Carê có cấu tạo gồm một sợi RNA đơn không phân đoạn gồm khoảng 15.690 nucleotide. Trong cấu trúc bộ gen gồm 6 gen mã hóa cho một protein tạo lớp vỏ bọc (M), hai glycoprotein (yếu tố kết dính (H), yếu tố dung hợp (F)), hai protein có liên quan tới khả năng phiên mã (phosphoprotein – P và large protein – L) và nucleocapsid N đóng gói RNA của virus (Sidhu và cs, 1993). CDV là virus gây nhiễm hướng lympho, niêm mạc và mô thần kinh. Trước đây, các nhà nghiên cứu đã tiến hành phân lập CDV trên các môi trường như dòng tế bào biểu mô và nguyên bào sợi, tế bào lympho chó (Appel và cs, 1992), đại thực bào phế nang chó (Appel, 1978; Appel và Jones, 1967), đại thực bào màng bụng chồn sương (Poste, 1971; Whetstone và cs, 1981), màng phôi gà (Ezeibe, 2005; Haig, 1956). Tuy nhiên việc phân lập và hiệu giá virus CDV diễn ra rất khó khăn do không có dòng tế bào thích hợp để virus sinh trưởng và gây bệnh tích tế bào điển hình (CPE). Seki và cs (2003) đã nghiên cứu và chứng minh được những tế bào Vero biểu hiện SLAM của chó rất nhạy cảm để phát hiện CDV trong những mẫu lâm sàng và có thể phục hồi dòng đại diện của CDV mà không cần có sự chọn lọc hay thích ứng. NT Lan và cs (2005) đã nghiên cứu thành công đặc tính sinh trưởng cụ thể của một số chủng CDV trên dòng tế bào Vero có gắn receptor tương ứng với virus Carê (Vero-DogSLAMtag hay Vero-DST). Nghiên cứu của Seki và cs (2003) đã làm rõ những đặc tính sinh trưởng khác nhau khi gây nhiễm các CDV lên tế bào Vero và tế bào Vero-DST. Qua đó, có thể nhận thấy, tế bào Vero-DST là dòng tế bào thích hợp, có thể sử dụng để phân lập và xác định hiệu giá virus (Lan và cs, 2005). Việc tìm hiểu về đặc tính sinh học của virus Carê phân lập được trên môi trường tế bào Vero-DST là rất cần thiết làm cơ sở cho việc chọn chủng virus chế vaccine phòng bệnh hiệu quả, chế tạo kit chẩn đoán, chế tạo kháng nguyên dùng trong chẩn đoán. Với mục đích như vậy trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số đặc tính sinh học của virus gây bệnh Carê phân lập tại Hà Nội trên môi trường tế bào Vero-DST.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Mẫu bệnh phẩm lấy từ các cơ quan phủ tạng như ruột, hạch lâm ba màng treo ruột, phổi, hạch lâm ba phổi, hạch amidal, lách, não, mí mắt,... của chó mắc bệnh Carê tại địa bàn Hà Nội.
- Tế bào Vero-DST được nuôi cấy trên khay nuôi cấy tế bào hoặc đĩa lòng. Môi trường tế bào được sử dụng là môi trường DMEM có chứa 5% FCS.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân lập virus gồm 3 bước:

Bước 1 chuẩn bị tế bào phân lập: Tế bào Vero – DST được đưa vào nuôi cấy trong môi trường và điều kiện thích hợp, môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) có bổ sung 5% FCS (Fetal calf serum) làm ấm trong tủ 37°C trong 30 phút trước khi gây nhiễm virus.

Bước 2 chuẩn bị mẫu phân lập: Mẫu bệnh phẩm được nghiền nát bằng chày và cối vô trùng sau đó được đồng nhất trong dung dịch MEM. Ly tâm tốc độ cao thu được hỗn dịch, hỗn dịch đồng nhất qua lọc được lấy để gây nhiễm vào tế bào Vero – DST.

Bước 3 gây nhiễm virus và quan sát kết quả: Từ các đĩa lồng tế bào đã chuẩn bị ở bước 1 hút bỏ môi trường nuôi cấy và bổ sung 100 µl mẫu đã chuẩn bị ở bước 2. Tế bào gây nhiễm virus được ủ ở 37°C với 5% CO₂ trong 30 phút. Bổ sung 1,5 ml môi trường DMEM có chứa 10% TPB (Tryptose Phosphate Broth) vào đĩa lồng và để ở 37°C với 5% CO₂. Hàng ngày theo dõi sự phá hủy tế bào bằng kính hiển vi soi nổi và thu virus khi tế bào bị phá hủy đạt 80% - 90% diện tích đáy của đĩa lồng.

- Phương pháp xác định hiệu giá virus TCID₅₀: Tế bào Vero-DST được chuẩn bị trên khay 96 giếng (2,0 x 10⁴ tế bào/giếng). Huyền dịch chứa bệnh phẩm được ly tâm bỏ cặn và lấy phần nước trong và được pha loãng theo cơ số 10 rồi đem ủ trên bề mặt tế bào một lớp các giếng theo thứ tự đánh dấu trước (25µl/giếng), mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần. Sau 1 giờ ủ, dung dịch duy trì DMEM (10% TBP) được bổ sung vào (100 µl/giếng). CPE được quan sát hàng ngày cho đến ngày thứ 5 sau khi gây nhiễm. TCID₅₀ được xác định theo phương pháp của Behrens – Karber (Lan NT và cs, 2005).

- Phương pháp xác định đường cong sinh trưởng của virus: Virus CDV trên môi trường tế bào Vero-DST một lớp với MOI = 0,01. Xác định hiệu giá virus tự do và virus nằm trong tế bào ở các thời điểm 6, 12, 36, 48, 72, 96, 120, 144 giờ sau gây nhiễm virus. Đường biểu diễn sự nhân lên của virus được xây dựng có biến là log₁₀ của TCID₅₀ tại mỗi thời điểm thu virus.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập virus Carê trên môi trường tế bào Vero-DST

Bằng kỹ thuật RT-PCR, chúng tôi đã khẳng định chắc chắn sự có mặt của virus Carê trong 4 chó thu tại Hà Nội. Sau đó chúng tôi tiến hành phân lập virus Carê từ các cơ quan tổ chức khác nhau của chó mắc bệnh trên môi trường tế bào một lớp Vero-DST. Kết quả phân lập virus Carê được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập virus Carê trên môi trường tế bào Vero-DST

Chó	Cơ quan	CPE	Tên virus phân lập
C1	Phổi	+	CDV1-P
	Ruột	+	CDV1-R
	Hạch lympho	+	CDV1-H
	Não	+	CDV1-N
C2	Phổi	+	CDV2-P
	Ruột	+	CDV2-R
	Hạch lympho	+	CDV2-H
	Não	+	CDV2-N
C3	Phổi	+	CDV3-P
	Ruột	+	CDV3-R
	Hạch lympho	+	CDV3-H
	Não	+	CDV3-N
C4	Phổi	+	CDV4-P
	Ruột	+	CDV4-R
	Hạch lympho	+	CDV4-H
	Não	+	CDV4-N

Chú thích:

CPE: Bệnh tích tế bào (Cytopathogenic Effect)

(+) : Có bệnh tích tế bào

Qua bảng 1 cho thấy, trong tổng số 16 mẫu bệnh phẩm dùng cho phân lập virus, từ 4 chó bị mắc bệnh Carê, thì tất các mẫu đều gây bệnh tích tế bào ở các mức độ khác nhau. Sau khi quan sát thấy có bệnh tích tế bào, chúng tôi đã dùng phương pháp hóa miễn dịch tế bào để khẳng định bệnh tích tế bào do virus Carê gây nên. Qua các mẫu bệnh phẩm đó ta phân lập được chủng virus tương ứng. Với mỗi chủng virus phân lập được từ các cơ quan, bộ phận khác nhau thì khả năng gây bệnh tích tế bào là khác nhau. Chúng tôi tiến hành thu virus bảo quản ở -80°C để dùng cho các nghiên cứu tiếp theo và đặt tên các virus phân lập được như bảng 1.

3.2. Khả năng gây bệnh tích tế bào (CPE) của virus Carê

Sau khi phân lập virus từ các mẫu bệnh phẩm, chúng tôi tiến hành lựa chọn 4 chủng virus đại diện là CDV1-R, CDV2-P, CDV3-P, CDV4-H để tìm hiểu sâu về khả năng gây bệnh tích tế bào của virus Carê. Chúng tôi không chỉ tiến hành với những virus phân lập được mà còn đồng thời tiến hành đối với cả chủng virus vaccin Onderstepoort.

Để đánh giá một cách khách quan khả năng gây bệnh tích tế bào, virus phân lập được xác định hiệu giá để tính toán giá trị TCID₅₀. Sau đó mới đem gây nhiễm lên môi trường tế bào Vero-DST ở cùng một tỷ lệ MOI là 0.01. Kết quả theo dõi bệnh tích tế bào (CPE) chúng tôi dựa trên môi trường tế bào Vero-DST được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu khả năng gây bệnh tích tế bào của virus Carê

Virus	CPE (%)							
	6hpi	12hpi	24hpi	36hpi	48hpi	60hpi	72hpi	96hpi
CDV1-R	-	*	40	60	90	100	B	B
CDV2-P	-	-	*	25	50	80	100	B
CDV3-P	-	*	30	50	85	100	B	B
CDV4-H	-	10	50	90	100	B	B	B
Ond	-	*	40	55	90	100	B	B

Chú thích:

Ond : Chủng virus vaccin Onderstepoort

- : không có bệnh tích tế bào (CPE)

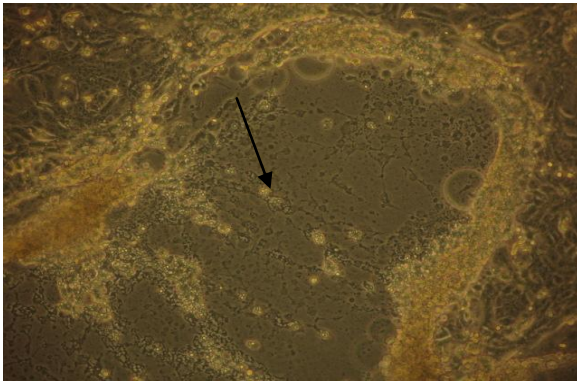
* : CPE dưới 5%

B: Tế bào bong tróc khỏi bề mặt nuôi cấy

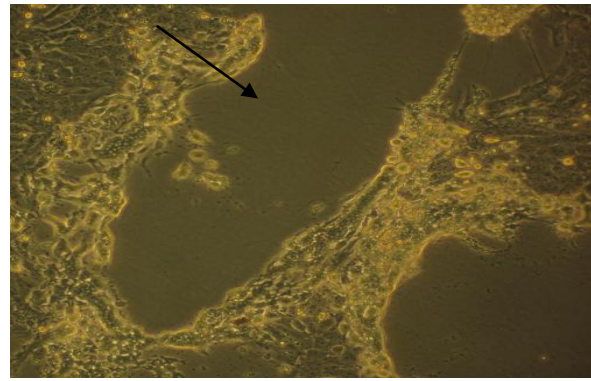
hpi: hour post inoculation (giờ sau gây nhiễm virus)

Qua bảng 2 nhận thấy sự có mặt của virus ở các cơ quan, bộ phận của chó mắc Carê là không giống nhau. Mẫu virus CDV1-R và CDV3-P có khả năng gây bệnh tích tế bào tương đối giống nhau và giống với chủng Onderstepoort. Bệnh tích tế bào (CPE) được quan sát bằng kính hiển vi soi nổi. Bệnh tích tế bào (CPE) xuất hiện sớm ở 12 giờ sau khi gây nhiễm virus CDV4-H, CDV1-R, CDV3-P và virus chủng Onderstepoort. Lúc này virus Carê bắt đầu phá hủy tế bào và gây bệnh tích kiểu Syncytium hay thể hợp bào bệnh lý đó là các tế bào co cụm lại, hòa màng, bao quanh các nhân tạo thành. Sau 24 giờ gây nhiễm, virus CDV3-P đã phá hủy 30% tế bào; 2 virus CDV1-R và Onderstepoort phá hủy 40% tế bào. Virus CDV4-H đã phá hủy 50% tế bào sau 24 giờ gây nhiễm, CPE đạt 90% sau 36 giờ gây nhiễm (Hình 1) trong khi đó chủng Onderstepoort mới chỉ phá hủy 55% tế bào. Sau 48 giờ, CPE đều đạt 85%-90% ở hầu hết các chủng virus như CDV1-R, CDV3-P và chủng Onderstepoort (Hình 2), virus đã phá hủy hoàn toàn tế bào, thậm chí nhân tế bào cũng đang

dần biến mất, chỉ còn một hai nhóm nhỏ các tế bào còn bám trên bề mặt bình nuôi cấy. CPE đạt 100% được sau 60 giờ gây nhiễm virus CDV1-R, CDV3-P và chủng Onderstepoort, lúc này không còn cụm tế bào nào bám vào đáy bình, các tế bào đều đã bị tan vỡ bong tróc khỏi bề mặt nuôi cấy, màng tế bào và nhân bị dồn thành cụm. Riêng virus CDV4-H gây bệnh tích tế bào đạt 100% chỉ sau 48 giờ gây nhiễm. Bên cạnh đó, khi gây nhiễm virus trên môi trường tế bào Vero-DST 24 giờ, virus CDV2-P gây ra CPE muộn hơn so với chủng virus vaccin Onderstepoort và các virus phân lập từ các chó khác. Đồng thời mức độ phá hủy môi trường tế bào của chủng CDV2-P cũng chậm hơn với chủng Onderstepoort và các virus phân lập khác.



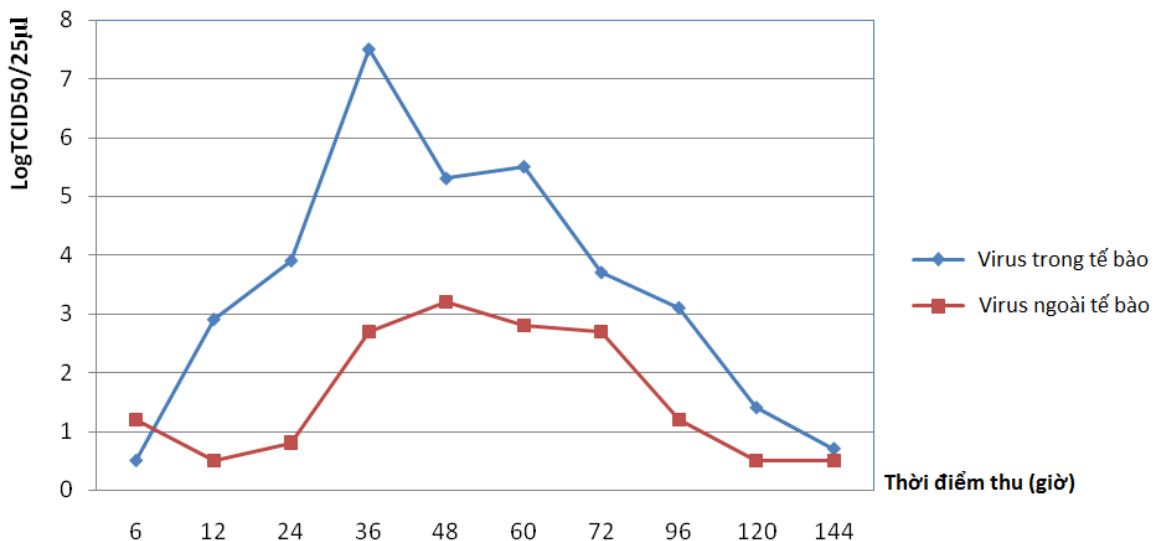
Hình 1. CPE do CDV4-H gây ra sau 36 giờ gây nhiễm



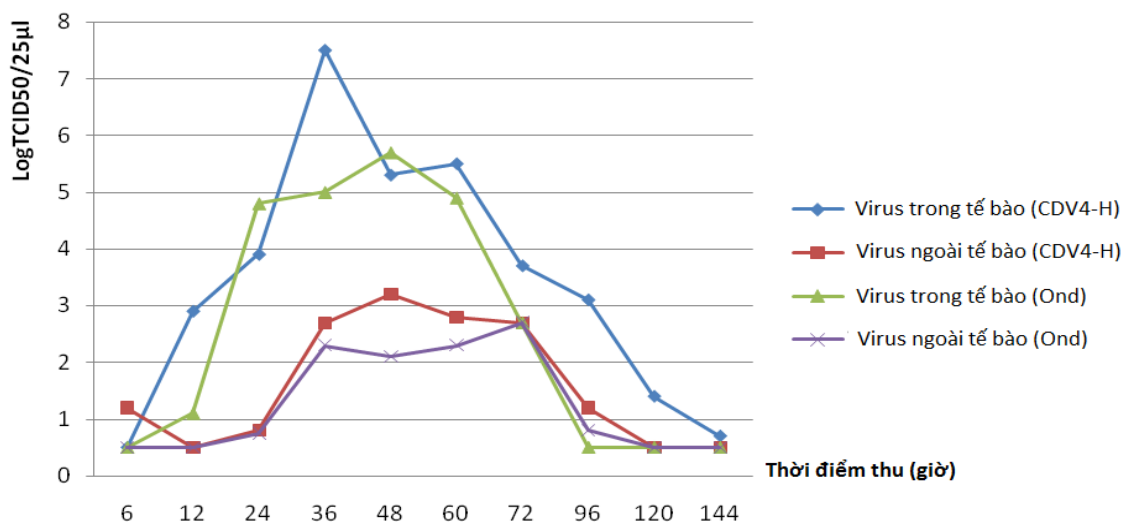
Hình 2. CPE do Onderstepoort (virus vaccin) gây ra sau 48 giờ gây nhiễm

3.3. Quy luật nhân lên của virus Carê

Chúng tôi lựa chọn virus phân lập từ hạch lympho của chó C4 (CDV4-H) để tiếp tục nghiên cứu xây dựng đường biểu diễn quy luật nhân lên của virus Carê, và so sánh với chủng virus vaccin Onderstepoort. Kết quả được thể hiện qua hình 3 và hình 4.



Hình 3. Đường biểu diễn sự nhân lên của virus phân lập CDV4-H



Hình 4. So sánh đường cong biểu diễn sự nhân lên của virus phân lập và virus vaccin

Chú thích: CDV4-H: Virus Carê phân lập được từ hạch lympho của chó C4

Ond: Virus vaccin chủng Onderstepoort

Qua phân tích hình 3 cho thấy, virus phân lập CDV4-H xâm nhập và nhân lên nhanh trong tế bào Vero-DST, đạt mức cao nhất tại thời điểm 36 giờ sau khi gây nhiễm (3.16×10^7 TCID₅₀/25µl). Sau đó, hàm lượng virus giảm mạnh xuống 1.48×10^5 TCID₅₀/25µl ở 48 giờ sau khi gây nhiễm. Sở dĩ hàm lượng virus giảm khi thu virus từ các tế bào sau 36 giờ có nguyên nhân chủ yếu là sự suy giảm số lượng tế bào do virus phá hủy. Tuy nhiên, ở những thời điểm tiếp theo, sự suy giảm hàm lượng virus diễn ra chậm hơn.

Trong khi lượng virus liên kết với tế bào tăng mạnh sau 6 giờ gây nhiễm thì những dấu hiệu tăng của lượng virus giải phóng tự do ngoài dịch nổi chỉ được ghi nhận sau 12 giờ gây nhiễm. Giá trị này tiếp tục tăng nhẹ trong các thời gian tiếp theo và đạt ngưỡng 1.48×10^3 TCID₅₀/25µl khi thu ở 48 giờ sau khi gây nhiễm. Sau đó, hàm lượng virus giảm dần.

Để so sánh đặc tính sinh trưởng của mẫu virus phân lập được với chủng virus vaccin, hình 4 thể hiện đồng thời hai đường biểu diễn sự nhân lên của virus vaccin và virus phân lập. Qua hình 4, ta nhận thấy cả virus CDV4-H phân lập được và virus vaccin chủng Onderstepoort đều có hàm lượng virus tồn tại trong tế bào nhiều hơn hàm lượng virus giải phóng tự do bên ngoài tế bào.

CDV4-H xâm nhập và nhân lên trong tế bào nhanh hơn so với virus vaccin. Tại các thời điểm thu virus giống nhau, hàm lượng virus phân lập CDV4-H tồn tại trong tế bào thường cao hơn hàm lượng virus vaccin tồn tại trong tế bào. Hàm lượng virus vaccin nằm trong tế bào tăng nhẹ sau 6 giờ gây nhiễm, bắt đầu tăng mạnh từ thời điểm 12 đến 24 giờ sau khi gây nhiễm. Trong khi đó, lượng virus phân lập nằm trong tế bào liên tục tăng mạnh ngay sau 6 giờ gây nhiễm và đạt mức cao nhất sau 36 giờ gây nhiễm virus. Kết quả là lượng virus vaccin đạt cao nhất là 1.48×10^5 TCID₅₀/25µl ở 48 giờ sau gây nhiễm. Hàm lượng virus giải phóng tự do, tồn tại trong dịch nổi của hai mẫu virus qua các thời điểm ít có sự khác biệt ngoại trừ khoảng thời gian từ 36 đến 72 giờ sau khi gây nhiễm. Trong khoảng thời gian từ 36 đến 48 giờ, hàm lượng CDV4-H giải phóng khỏi tế bào tăng khá nhanh, còn hàm lượng virus vaccin giải phóng khỏi tế bào lại giảm. Ngược lại, từ 48 giờ đến 72 giờ sau khi gây nhiễm, hàm lượng CDV4-H giải phóng khỏi tế bào giảm thì hàm lượng virus

vacxin giải phóng lại tăng. Xem xét vấn đề này trong mối liên quan với hàm lượng virus tồn tại trong tế bào ở thời điểm tương ứng ta có thể nhận thấy điểm khác nhau cơ bản giữa 2 loại virus.

Sự sinh trưởng của virus khi nuôi cấy trên môi trường tế bào không phải là một quá trình liên tục, đồng đều. Cả virus vaccin chủng Onderstepoort và virus phân lập CDV4-H đều thể hiện rằng chúng xâm nhập, nhân lên trong tế bào mạnh hay yếu tùy từng thời điểm nhất định. Như vậy, virus CDV4-H và virus vaccin chủng Onderstepoort có đặc tính sinh trưởng khác nhau trên tế bào Vero-DST.

IV. KẾT LUẬN

CDV là virus gây nhiễm hướng lympho, niêm mạc và mô thần kinh, đã phân lập được virus CDV từ các mẫu bệnh phẩm chó mắc bệnh Carê. Tế bào Vero-DST là tế bào thích hợp để phân lập virus CDV, virus nhân lên nhanh trong tế bào và gây bệnh tích điển hình. Bệnh tích tế bào được biểu hiện là các tế bào co cụm lại, hòa màng, bao quanh các nhân tạo thành. Tế bào Vero-DST bị CDV phá hủy trung bình sau 12h gây nhiễm, đạt mức cao nhất sau 60 giờ gây nhiễm, và bị phá hủy muộn nhất là 96h. Virus CDV4-H phân lập được phá hủy tế bào mạnh hơn virus vaccin chủng Onderstepoort, cả 2 chủng virus này đều tồn tại chủ yếu trong tế bào, ít tồn tại tự do ngoài tế bào và có đặc tính sinh trưởng khác nhau trên tế bào Vero-DST. Virus CDV4-H đạt hiệu giá cao nhất ở 36 giờ sau khi gây nhiễm, khi đó virus phá hủy khoảng 90% tế bào. Điều này có ý nghĩa quan trọng giúp cho người làm nghiên cứu có thể xác định được thời điểm thu virus tốt nhất dựa vào việc quan sát bệnh tích tế bào đã có thể ước tính được hiệu giá virus.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Appel, M. J. G., and O. R. Jones (1967). Use of alveolar macrophages for cultivation of canine distemper virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126:571-574.
2. Appel, M. J. G. (1978). Reversion to virulence of attenuated canine distemper virus in vivo and in vitro. *J. Gen. Virol.* 41:385-393.
3. Ezeibe, M. C. O. (2005). Canine distemper in local dogs in Nsukka, Nigeria. *Veterinary Record* 156, 840-842.
4. Frolich K, Czupalla O, Haas L, Hentschke J, Dedek J., Fickel J. Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Vet Microbiol* 74: 283-292, 2000.
5. Keawcharoen, J., Theamboonlers, A., Jantaradsamee, P., Rungsipipat, A., Poovorawan, Y. & Oraveerakul, K. (2005). Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Veterinary Microbiology* 105, 137-142.
6. Lan NT, Yamaguchi R, Uchida K (2005), Growth Profiles of Recent Canine Distemper Isolates on Vero Cells Expressing Canine Signalling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM), *J. Comp. Pathol.*
7. Lan, N. T., Yamaguchi, R., Inomata, A., Furuya, Y., Uchida, K., Sugano, S. & Tateyama, S. (2006). Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary Microbiology* 115, 32-42.
8. Whetstone, C. A., Bunn, T. O. & Gourlay, J. A. (1981). Canine distemper virus titration in ferret peritoneal macrophages. *Cornell Veterinarian* 71, 144-148.