ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนฮีแมกกลูตินินและฟอสโฟโปรตีนของไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้จากในประเทศไทย

นางสาวณ ทยา เจริญวิศาล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF HEMAGGLUTININ AND PHOSPHOPROTEIN GENES OF THAI ISOLATED CANINE DISTEMPER VIRUS

Miss Na taya Charoenvisal

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Sciences

Chulalongkorn University

Academic year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

510621

Thesis Title	THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF HEMAGGLUTININ AND PHOSPHOPROTEIN GENES OF THAI ISOLATED CANINE DISTEMPER VIRUS.
By	Miss Na taya Charoenvisal
Field of study	Veterinary Pathobiology
Thesis Principal advisor	Associate Professor Anudep Rungsipipat, D.V.M., Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Kanisak Oraveerakul, D.V.M., Ph.D.
	Professor Yong Pooworawan, M.D., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Veterinary Science
(Professor Annop Kunavongkrit, D.V.M., Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Achariya Sailasuta, D.V.M., Ph.D.)

.....Thesis Principal advisor
(Associate Professor Anudep Rungsipipat, D.V.M., Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Kanisak Oraveerakul, D.V.M., Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Professor Yong Pooworawan, M.D., Ph.D.)

.....External member
(Professor Ryoji Yamaguchi, D.V.M., Ph.D.)

ณ ทยา เจริญวิศาล : ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนฮีแมกกลูตินินและฟอสโฟโปรตีนของไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้จากในประเทศไทย (THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF HEMAGGLUTININ AND PHOSPHOPROTEIN GENES OF THAI ISOLATED CANINE DISTEMPER VIRUS) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.น.สพ.ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์, อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.น.สพ.ดร. คณิศักดิ์ อรวีรกุล และ ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ, 74 หน้า.

โรคไข้หัดสุนัขเป็นโรคติดต่อที่สำคัญในสัตว์และพบได้ทั่วโลก สาเหตุจากเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัข ซึ่งแม้ว่าจะมีการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคมาอย่างต่อเนื่อง ยังสามารถพบสุนัขและสัตว์ชนิดอื่นที่มีความไวต่อโรค ติดเชื้อไวรัสไข้หัดสุนัขอยู่ จุดประสงค์ของการศึกษาคือวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนฮีแมกกลูตินินไกลโคโปรตีนและจีนฟอสโฟโปรตีนของไวรัสไข้หัดสุนัขสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์วัคซีนและสายพันธุ์ก่อโรคอื่นๆ ที่พบในหลายประเทศทั่วโลก โดยการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากสุนัขที่แสดงอาการและเสียชีวิตด้วยโรคไข้หัดสุนัขจำนวน 9 ตัว เมื่อผ่าซากสุนัขเหล่านี้พบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของโรคไข้หัดสุนัข และนำตัวอย่างอวัยวะเป้าหมายของไวรัสมาศึกษาด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา วิธีอิมมิวโนฮีสโตเคมี และศึกษาทางไวรัสวิทยาโดยบดตัวอย่างชิ้นเนื้อและแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero-DST จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาทำปฏิกิริยารีเวิสทรานสคริปเตสลูกโซ่โพลิเมอเรส และหาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นในธนาคารจีน ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคจำเพาะของไวรัสไข้หัดสุนัขในปอด ม้าม ต่อมน้ำเหลือง และสมอง ส่วนการศึกษาอิมมิวโนฮีสโตเคมีพบแอนติเจนของไวรัสในปอด ม้าม ลำไส้เล็กและสมอง ส่วนผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้จากในประเทศไทย มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากสายพันธุ์วัคซีน และแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่จัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ Asia1 และกลุ่มที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มใดที่มีข้อมูลอยู่ในธนาคารจีน เนื่องจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หัดสุนัขสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยในงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งศึกษาโดยใช้จีนนิวคลีโอเคปสิดพบว่าสามารถแบ่งไวรัสออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์วัคซีน และกลุ่มที่เหมือนสายพันธุ์ก่อโรคอื่นๆ ดังนั้นจึงสรุปผลการศึกษานี้ว่ามีไวรัสไข้หัดสุนัขอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ที่แพร่ระบาดอยู่ในประเทศไทย

ภาควิชา.....พยาธิวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....ณ ทยา เจริญวิศาล.....

สาขาวิชา.พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2551..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4975559931 : MAJOR: VETERINARY PATHOBIOLOGY

KEYWORDS: CDV/ PHYLOGENETIC ANALYSIS/ THAI ISOLATES/ HEMAGGLUTININ PROTEIN GENE/ PHOSPHOPROTEIN GENE

NA TAYA CHAROENVISAL : THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF HEMAGGLUTININ AND PHOSPHOPROTEIN GENES OF THAI ISOLATED CANINE DISTEMPER VIRUS. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : ASSOC. PROF. ANUDEP RUNGSIPIPAT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. KANISAK ORAV EERAKUL, Ph.D., AND PROF. YONG POOVORAWAN, Ph.D., 74 pp.

Canine distemper disease is an important disease with worldwide distribution, caused by the Canine distemper virus (CDV). CDV vaccines have been developed for many decades but infected dogs are still reported. The aim of this study is to analyze Thai isolates CDV nucleotide sequences of Hemagglutinin glycoprotein (H) gene and Phosphoprotein (P) gene regions and compare them with vaccines and other virulent strains in the Genbank. Nine clinical samples that showed CDV clinical signs and pathologic lesions were used in routine histopathological process, Immunohistochemistry (IHC) staining and virological study. The fresh samples of each cases were homogenized and isolated in Vero cell expressing canine signaling lymphocyte activation molecules with a tag (Vero-DST), followed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, nucleotide sequencing and compared with vaccine strains and other new isolates in the Genbank. Slide sections showed eosinophilic inclusion bodies in target cells from the lung, spleen and brain. CDV antigens were prominently found in the spleen, lung and intestine samples, but very few antigens were found in the brain samples. The result showed that our CDVs were not related to the vaccine lineage and could be divided in to 2 groups; one that joined the Asia-1 lineage and the other that didn't join any previous found lineages. A previous Thai CDV study, on the nucleocapsid protein (N) gene found that the virus could be separated into 2 clusters, the vaccine lineage and the other virulent lineage. Thus, there are at least 3 strains of CDVs circulating in Thailand.

Department.....Veterinary Pathology... Student's signature Na taya Charoenvisal

Field of study.Veterinary Pathobiology. Principal advisor's signature

Academic year.....2008..... Co- advisor's signature

Co- advisor's signature Yong Poo

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and sincere thank you to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Anudep Rungsipipat for his kindness supported me and this study throughout my master degree course. My appreciation is also expressed to my kind co-advisors, Assoc. Prof. Dr. Kanisak Oraveerakul and Prof. Yong Pooworawan, for the useful advices. My gratitude also extended to the thesis committee members, Assoc. Prof. Dr. Achariya Sailasuta and Prof. Dr. Ryoji Yamaguchi, for the very helpful comments.

I am sincerely and gratefully thank you Prof. Dr. Ryoji Yamaguchi for being my very kind and supportive host in Japan. I would like to say thank you for my laboratory colleagues in the Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, especially, Dr. Nguyen Thi Lan, Miss Madoka Oda, Mr. Riki Hiromatsu, Mr. Toshiki Ueda, Mr. Hiroaki Kondo, Miss Yurie Kinoshita, and Miss Miyako Onchi, for kind warm take care and helpful supports.

My special thanks also extend to all of graduated course colleagues in Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for their supportive and friendship. I am grateful to express my special thank to all of the teachers and the laboratory staffs, Mr. Supradit Wangnaitham, for the advices.

This works was supported in part by Japan Student Services Organization (JASSO 2006-2007) for exchange student program in Miyazaki, Japan.

Finally, I would like to express the deepest thank to my family for their supportive and understanding. I am a lucky person to be borned in a very kind and caress family.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai)	iv
ABSTRACT (English)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	ix
LIST OF ABBREVIATIONS	x
CHAPTER	
I.INTRODUCTION	1
II.LITERATURES REVIEW	2
Literatures review	2
III.MATERIALS AND METHOD	12
Animals	12
Histopathological examination and Immunohistochemistry	12
Virus isolation	13
RT-PCR, sequencing and phylogenetic analyse	14
IV.RESULTS	19
Pathological examination	19
Histopathological examination	20
Virus isolation	30
RT-PCR, sequencing and phylogenetic analyses	32
V.DISCUSSION AND CONCLUSION	47
Discussion and conclusion	47
REFERENCES	54
APPENDICES	58
BIOGRAPHY	74

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Primers for RT-PCR and sequence analysis of CDV, P and H gene.....	14
2. General information of samples.....	18
3. Clinical signs and gross lesions.....	19
4. Pathological findings.....	21
5. Virus titrations.....	29
6. The RT-PCR results.....	32
7. Percentages of nucleotide sequences homology between each samples of the P gene region.....	36
8. Homology of nucleotide sequences of P gene.....	37
9. Homology of nucleotide and amino acid sequences of H gene.....	39

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Morbillivirus structure	6
2. Homogenizers	17
3. Monolayer of normal Vero-DST cell line	17
4. The 24 well culture plate, 5 ml culture bootle and 20 ml culture bottle	17
5. Phase contrast microscope	17
6. Histopathological and immunohistochemistry of brain	23
7. Histopathological and immunohistochemistry of lung	24
8. Histopathological and immunohistochemistry of intestine	25
9. Histopathological and immunohistochemistry of liver	26
10. Histopathological and immunohistochemistry of spleen	27
11. Histopathological and immunohistochemistry of lymph node	28
12. CPE in Vero-DST cell	30
13. RT-PCR result of P gene region	33
14. RT-PCR result of H gene region	33
15. Nucleotide sequence alignment of P gene	39
16. The P gene region nucleotide sequence alignment of isolated sample 270BR and 270LU	40
17. Amino acid sequence alignment of H gene	41
18. Phylogenetic analysis of CDV, P gene region	45
19. Phylogenetic analysis of CDV, H gene region	46

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pair (s)
BR	brain
°C	degree celsius (centrigrade)
CDV	canine distemper virus
CNS	central nervous system
CPE	cytopathic effect
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMV	dolphin morbillivirus
DNA	deoxyribonucleic acid
DST	dog SLAM tag
et al.	et alii, and others
F	fusion protein
FCS	fetal bovine serum
g	gram (s)
H	hemagglutinin glycoprotein
H&E	hemagglutinin and eosin staining
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IN	intestine
L	large protein
LI	liver
LN	lymph node
LSAB	labeled streptavidin-biotin method
LU	lung
M	matrix protein
ml	milliliter (s)
ug	microgram (s)
ul	microliter (s)

um	micrometer (s)
mM	micromole (s)
MD	missing data
MLV	modified live vaccine
MV	measles virus
N	nucleocapsid protein
ND	not done
No.	Number
P	phosphoprotein
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PCV	phocine distemper virus
PMV	purpoise morbillivirus
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
rpm	revolution per minute
%	percentage
SLAM	signaling lymphocyte activation molecule
SP	spleen
TBE	tris borate EDTA
$TCID_{50}$	50% tissue culture infectious dose
TPB	tryptose phosphate broth
UV	ultraviolet
Vero DST cells	vero cell expressed canine SLAM tag
-	negative
+	positive