การตายแบบอะปอปโตซีสของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ภายหลังฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ในลูกสุกรที่ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร

นายรชฎ ตันติเลิศเจริญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1920-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

APOPTOSIS OF LYMPHOID TISSUES AFTER CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS (CSFV) INOCULATION IN CSFV-VACCINATED PIGLETS

Mr. Rachod Tantilertcharoen

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Veterinary Pathobiology
Department of Pathology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-53-1920-1

Thesis Title	Apoptosis of Lymphoid Tissues after Classical Swine Fever Virus (CSFV) inoculation in CSFV-Vaccinated Piglets
By	Rachod Tantilertcharoen
Field of study	Veterinary Pathology
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Achariya Sailasuta
Thesis Co-advisor	Associate Professor Dr. Wijit Banlunara

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

.....Dean of the Faculty of Veterinary Science
(Professor Narongsak Chaiyabutr D.V.M., Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Lek Ousavaplangchai D.V.M., Dr.med.vet.)

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

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Wijit Banlunara D.V.M., Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Sanipa Suradhat D.V.M., Ph.D.)

..... Member
(Sudarat Damrongwatanapokin D.V.M., Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายรชฎ ตันติเลิศเจริญ : การตายแบบอะปอปโตซีสของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ภายหลังฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ในลูกสุกรที่ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร. (APOPTOSIS OF LYMPHOID TISSUES AFTER CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS (CSFV) INOCULATION IN CSFV-VACCINATED PIGLETS) อ. ที่ปรึกษา: รศ.สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไศละสูต, รศ.น.สพ.ดร.วิจิตร บรรลุนารา จำนวน 56 หน้า. ISBN 974-53-1920-1.

ได้ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการเกิดอะปอปโตซีสของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในสุกรที่ฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกร สุกรทดลองจากฟาร์มที่ปลอดโรคอหิวาต์สุกรอย่างน้อยสองปีถูกแบ่งเป็นสามกลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว กลุ่มเอและบีมีค่าเฉลี่ยระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอด $\geq$ 64 และ $\leq$ 8 ตามลำดับและได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สุกรที่อายุ 3 สัปดาห์ กลุ่มซีเป็นกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยระดับภูมิคุ้มกันถ่ายทอด $\leq$ 8 ถึง $\geq$ 64 สุกรทุกตัวถูกฉีดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์รุนแรง (Bangkok 1950) เมื่ออายุ 5 สัปดาห์ ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน และความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดอะปอปโตซีสและการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรของเซลล์ในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง โดยเก็บตัวอย่างเลือดที่ 0, 3, 7, 10, 14, และ 21 วันหลังฉีดเชื้อทับ (dpi) เพื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาว แยกเชื้อไวรัส และวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร สุกรที่ตายระหว่างการทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 21 dpi ทุกตัว ถูกศึกษาทางพยาธิวิทยา บันทึกรอยโรคและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อน้ำเหลืองเพื่อศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมีโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ gp55 ตรวจหาอะปอปโตซีสโดยวิธี TdT mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดอะปอปโตซีสและการติดเชื้อของเซลล์ ผลการทดลองพบว่าไม่มีสุกรกลุ่มเอและบีตายตลอดการทดลอง แต่สุกรกลุ่มซีทยอยตายวันละตัว รวม 5 จาก 6 ตัว สุกรทั้งสามกลุ่มมีการสร้างแอนติบอดีหลังฉีดเชื้อพิษทับต่างกัน โดยกลุ่มบีสูงกว่ากลุ่มเอและซีตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สุกรทุกกลุ่มมีเม็ดเลือดขาวลดลงและพบเชื้อไวรัสในเลือดที่ 3 dpi แต่กลุ่มเอและบี เพิ่มขึ้นสู่ระดับปกติและไม่พบเชื้อไวรัสในเลือดที่ 7 dpi แต่พบในกลุ่มซีทุกตัวจนสิ้นสุดการทดลอง การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองอย่างรุนแรง และพบแอนติเจนของเชื้อไวรัสในเซลล์ของสุกรกลุ่มซีทุกตัว โดยมีจำนวนเซลล์เฉลี่ย 22.9$\pm$9.1 เซลล์/0.1 มม^2 และไม่พบในทุกตัวอย่างของกลุ่มเอและบี จำนวนเฉลี่ยของเซลล์ที่เกิดอะปอปโตซีสในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองของสุกรกลุ่มซีเท่ากับ 3.0$\pm$1.7 เซลล์/0.1 มม^2 ต่ำกว่ากลุ่มเอ (14.8$\pm$6.8 เซลล์/0.1มม^2) และกลุ่มบี (23.4$\pm$7.8 เซลล์/0.1 มม^2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่าเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรมีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างอ่อน (r^2=0.21) ต่อการพบเซลล์ที่เกิดอะปอปโตซีส

ภาควิชา พยาธิวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4475567431 : MAJOR PATHOLOGY

KEY WORD: CLASSICAL SWINE FEVER / APOPTOSIS / PIGLETS/ VACCINE / LYMPHOID

RACHOD TANTILERTCHAROEN: APOPTOSIS OF LYMPHOID TISSUES AFTER CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS (CSFV) INOCULATION IN CSFV-VACCINATED PIGLETS. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.DR. ACHARIYA SAILASUTA, THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF.DR.WIJIT BANLUNARA, 56 pp. ISBN 974-53-1920-1.

A study on the immune response and apoptosis of lymphoid tissues in CSFV-vaccinated pig was performed. The pigs from CSF-free herd 2 years before study were classified into 3 groups, 6 pigs of each; group A and B had average maternal antibody (Ab) $\geq$ 64 in group A and $\leq$ 8 in group B and they were vaccinated at 3 weeks old; group C which had maternal Ab range from $\leq$8- $\geq$64 was a control group. All pigs were challenged with high virulent CSFV (Bangkok 1950 strain) at 5 weeks of age. To study the vaccine efficacy, the relationship between apoptosis and CSFV-infected cells in lymphoid tissues, the blood samples were collected at 0, 3, 7, 10, 14, and 21 days post infection (dpi) to evaluate white blood cell (WBC) count, virus isolation, and antibody level. All dead pigs, either during or at the end of experiment (21 dpi), were necropsied to collect lymphoid tissues for histopathology. Viral antigen detection was performed under immunohistochemistry using monoclonal Ab against gp55, while TdT mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) was used to detect apoptosis. At the end of observation, no pigs from either group A or B died whereas 5 out of 6 in group C gradually died. Pigs from all groups developed distinctive Ab response after challenged, group B significantly yielded higher Ab response than group A and group C respectively ($p<0.05$). Though, the decreased of WBC in all pigs and viremia were detected at 3 dpi, the appearances were soon recovered at 7 dpi in those group A and B while they were continuously demonstrated in group C. Histopathology showed severe lymphoid depletion and viral infected cells in lymphoid tissues of pigs in group C, the mean$\pm$SD of number of CSFV-infected cells was 22.9$\pm$9.1 cells/0.1mm^2, while none was found from either group A or B. Mean$\pm$SD of number of apoptotic cells in lymphoid tissues of pigs from group C was 3.0$\pm$1.7 cells/0.1mm^2, which was significantly the lowest among group A (14.8$\pm$6.8 cells/0.1mm^2) and group B (23.4$\pm$7.8 cells/0.1mm^2) respectively. In addition, the correlation between CSFV-infected cells and apoptotic cells in lymphoid tissues were weakly negative (r^2=0.21).

Department of Pathology
Field of study Veterinary Pathobiology
Academic year 2004

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thanks to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Achariya Sailasuta and co-advisor, Assoc. Prof. Dr. Wijit Banlunara for their merciful helps and guidance through the whole course of this work. My gratitude is also due to Assoc. Prof. Dr. Kanisak Oraveerakul and Assoc. Prof. Dr. Roongroje Thanawongnuwech for giving me the opportunity to perform the swine fever research project and to study in a higher level. I would like to express my special thanks to Dr. Chris Morissy, CSIRO, Australia for kindly provide CSFV-MAb, Dr.Sudarat Damrongwatanapokin, National Institute of Animal Health for providing CSFV and CSFV-MAb, Miss Sumitra Wattanodorn, Mr. Supradit Wangnaitham and Staffs of Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for their helpful co-operation in my laboratory work. I am grateful to Dr. Piyadit Jaroensuk, Piggy and Kik, for their kindly help in many ways that support me in making this work. Lastly, but not least I am very thankful to the National Research Council and the Faculty of Graduate Studies, Chulalongkorn University for granting me the research fund, without which this work would have been impossible.

My indebtedness is also due to my family especially Mama and Papa whose unwavering support to encourage me perseveres through the course of study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I Introduction.....1

II Review of the literatures

Classical Swine Fever.....3

Apoptosis.....9

III Materials and methods

Virus.....14

Animals 14

Experimental Designs 14

Postmortem Examination.....15

Virus Isolation.....16

Determination of Neutralizing Antibody to CSFV.....16

Detection of CSFV Ag in Lymphoid Tissues by Immunohistochemistry.....17

In situ Detection of Apoptosis of Lymphoid Tissues.....18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Agarose Gel Electrophoresis for the Detection of DNA 19
Ladder Formation in Apoptotic Lymphoid Tissues
Quantification of CSFV-infected Cells and 20
Apoptotic Cells in Lymphoid Tissues
Data Analysis.....20

IV Results

Clinical Signs.....22
White Blood Cell Count.....22
Virus Isolation 22
Serum Neutralizing Antibody.....23
Macroscopic Findings 25
Histopathological Findings.....25
CSFV-Ag Positive Cells in Lymphoid Tissues.....27
Apoptosis and Quantitation of Apoptotic Cells.....30
in Lymphoid Tissues
Correlation between CSFV Infected Cells and.....31
Apoptotic Cells

V Discussion, Comments and Conclusion

Discussion and Comments.....35
Conclusion 40

References.....41
Appendices.....51
Biography.....56

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Time table for clinical observation and laboratory investigation for experimental pigs	15
2	The number of pigs showed leukopenia after challenge with CSFV from 0-21 dpi	23
3	Virus detection in pigs after the challenge with CSFV from 0-21 dpi	23
4	The SN titer (means±SD) from 1 week-old pigs (-21 dpi) vaccinated with CSFV vaccine at -14 dpi followed by the challenge with CSFV	25
5	The histopathologic results of lymphoid depletion in lymphoid tissues following CSFV challenge	29
6	Means±SD of CSFV-Ag positive cells/ 0.1 mm^2 in lymphoid tissues	29
7	Means±SD of apoptotic cells/ 0.1 mm^2 in lymphoid tissues	31

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Diagram illustrating morphological change in necrosis and apoptosis	11
2	Regulation of apoptosis	12
3	Diagram illustrating of TUNEL method	13
4	The SN titer (means±SD) from 1 week-old pigs (-21 dpi) vaccinated with CSFV vaccine at -14 dpi followed by the challenge with CSFV	24
5	Gross lesions of lymphoid tissues from the pigs challenged with CSFV	26
6	Histopathological grading for lymphoid depletion	27
7	Immunohistochemistry of lymphoid tissues stained by anti-CSFV gp55 MAb	28
8	Microscopic findings of the apoptotic cells in lymphoid tissues detected by TUNEL method	32
9	Apoptotic figure of lymphoid tissues of pig in group A and B	33
10	The associated scatter diagram indicating a linear relationship between CSFV-infected cells and apoptotic cells	34
11	Comparative figure between CSFV-infected cells and apoptotic cells	34
12	The associated scatter diagram indicating a linear relationship between SN titer and apoptotic cells of vaccinated pigs	39

LIST OF ABBREVIATIONS

Ab	Antibody
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
APC	Antigen presenting cells
BD	Border disease virus
bp	Base pair(s)
BSA	Bovine serum albumin
BVD	Bovine viral diarrhea
°C	Degree Celsius
CMI	Cell-mediated immune
CPE	Cytopathic effect
CSF	Classical swine fever
CSFV	Classical swine fever virus
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
dNTPs	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
dpi	Day post-infection
dpv	Day post-vaccination
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
END	Exaltation of Newcastle disease virus
FCS	Fetal calf serum (free from BVD Ab)
g	Gram(s)
gp	Glycoprotein
HMI	Humoral mediated immune
hr	Hour(s)
HRP	Horse radish peroxidase

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ig	Immunoglobulin
kb	Kilo base pair
MAb	Monoclonal antibody
ml	Milliliter
NPLA	Neutralizing peroxidase linked assay
PBS	Phosphate buffer saline
PBST	Phosphate buffer saline with 0.5% Tween-20
rpm	Revolution per minute
RT	Room temperature
SDS	Sodium dodecyl sulfate
$TCID_{50}$	Tissue culture infective dose 50%
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-amimomethane hydrochloride
TUNEL	TdT-mediated dUTP -nicked end labeling assay
v/v	Volume/volume
w/v	Weight/volume
w/w	Weight/weight

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย