ลักษณะทางอณูชีววิทยาของยีนสไปค์และยีนนิวคลีโอแคปซิดของเชื้อไวรัสโรคท้องร่วงติดต่อในสุกร (ไวรัสพีอีดี) ที่แยกได้จากฟาร์มสุกร

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวสุพรรษา ต่วนทัพ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 4 7 5 3 2 5 1 3 1

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE SPIKE AND NUCLEOCAPSID GENES OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) ISOLATED FROM PIG FARMS

Miss Supansa Tuanthap

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

550641

Thesis Title	MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE SPIKE AND NUCLEOCAPSID GENES OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) ISOLATED FROM PIG FARMS
By	Miss Supansa Tuanthap
Field of Study	Veterinary Medicine
Thesis Advisor	Suphot Wattanaphansak, D.V.M., Ph.D.
Thesis Co-advisor	Pornchalit Assavacheep, D.V.M., Ph.D.
	Juthatip Keawcharoen, D.V.M., Ph.D.

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

M. Techakumphu ..... Dean of the Faculty of Veterinary Science

(Professor Mongkol Techakumphu, D.V.M., Doctorat de 3e cycle)

THESIS COMMITTEE

Achara Tawat ..... Chairman

(Associate Professor Achara Tawatsin, B.Sc., M.Sc.)

Suphot Watt ..... Thesis Advisor

(Suphot Wattanaphansak, D.V.M., Ph.D.)

P. Assavacheep ..... Thesis Co-advisor

(Pornchalit Assavacheep, D.V.M., Ph.D.)

J Keawcharoen ..... Thesis Co-advisor

(Juthatip Keawcharoen, D.V.M., Ph.D.)

..... Examiner

(Professor Roongroje Thanawongnuwech, D.V.M., Ph.D.)

S. ..... Examiner

(Associate Professor Supol Luengyosluechakul, D.V.M., Ph.D.)

Boonmee Sunyasootcharee ..... External Examiner

(Associate Professor Boonmee Sunyasootcharee, D.V.M., M.Sc.)

สุพรรษา ต่วนทัพ : ลักษณะทางอณูชีววิทยาของยีนสไปค์และยีนนิวคลีโอแคปซิดของเชื้อไวรัสโรคท้องร่วงติดต่อในสุกร (ไวรัสพีอีดี) ที่แยกได้จากฟาร์มสุกร (MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE SPIKE AND NUCLEOCAPSID GENES OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) ISOLATED FROM PIG FARMS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ.น.สพ.ดร.สุพจน์ วัฒนะพันธ์ศักดิ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ.น.สพ.ดร. พรชลิต อัศวชีพ, อ.สพ.ญ.ดร. จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ, 88 หน้า

เชื้อไวรัสโรคท้องร่วงติดต่อในสุกรหรือเชื้อไวรัสพีอีดีก่อให้เกิดอาการท้องเสียเฉียบพลัน, อาเจียน และขาดน้ำอย่างรุนแรง ซึ่งส่งผลให้ลูกสุกรที่มีอายุน้อยกว่า 7 วันตายอย่างรวดเร็ว โดยประเทศไทยพบการระบาดของไวรัสพีอีดีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 และในปัจจุบันยังคงพบการระบาดของโรคในบางพื้นที่ โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและทำการจัดกลุ่มสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพีอีดีที่แยกได้จากสุกรป่วยจำนวน 21 ตัวอย่าง ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2555 โดยการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนสไปค์และยีนนิวคลีโอแคปซิดกับสายพันธุ์อ้างอิงของประเทศไทย, สายพันธุ์วัคซีน และสายพันธุ์อ้างอิงที่มีรายงานในฐานข้อมูล ผลการศึกษาพบว่าไวรัสพีอีดีที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2555 ในส่วนยีนสไปค์แสดงความใกล้เคียงทางพันธุกรรมต่อกันระหว่าง 90.50-100% ยกเว้น 1 สายพันธุ์ที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์อื่นที่ 90.50-93.55% ทำให้สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างนี้ไม่ถูกจัดรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับสายพันธุ์ไทยส่วนใหญ่ ส่วนการวิเคราะห์ในส่วนยีนนิวคลีโอแคปซิด พบว่าไวรัสพีอีดีที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2555 มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมต่อกันระหว่าง 97.67-100% และทุกสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้การวิเคราะห์ในส่วนในส่วนยีนสไปค์ของไวรัสพีอีดีที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2555 กับสายพันธุ์อ้างอิง พบว่ามีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับไวรัสพีอีดีของประเทศไทยที่แยกได้ในอดีตและไวรัสพีอีดีสายพันธุ์จากประเทศจีนที่ 90.50-99.53% และ 96.26-98.82% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการวิเคราะห์ในส่วนยีนนิวคลีโอแคปซิด แสดงว่าไวรัสพีอีดีที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมสายพันธุ์จากประเทศจีน ที่ 94.00-99.52% ดังนั้นไวรัสพีอีดีที่แยกได้ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2555 อาจมีต้นกำเนิดมาจากเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ประเทศจีน

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต สุพรรษา ต่วนทัพ

สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5475325131: MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEYWORDS: NUCLEOTIDE SEQUENCE/ PIGS/ PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV)/ THAILAND

SUPANSA TUANTHAP: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE SPIKE AND NUCLEOCAPSID GENES OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS (PEDV) ISOLATED FROM PIG FARMS. ADVISOR: SUPHOT WATTANAPHANSAK, Ph.D., CO-ADVISOR: PORNCHALIT ASSAVACHEEP, Ph.D., JUTHATIP KEAWCHAROEN, Ph.D. 88 pp.

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) causes acute diarrhea, vomiting, severe dehydration and lead to sudden death in neonatal pigs less than 7 days old. The outbreak of PEDV in Thailand has been found since 2007 and remains spreading into many areas. In this study, the genetic diversity of twenty-one PEDV isolates from pig cases during 2011-2012 based on partial spike (S) and nucleocapsid (N) gene sequences was investigated by comparing with previous Thai isolates, PED vaccine strains and reference PEDV isolates. Based on partial S gene sequence, the current Thai isolates shared genetic similarity between 90.50-100%. Among this comparison, only one isolate was separated from main cluster and shared the lowest nucleotide identity ranging from 90.50-93.55% to others. Regarding to partial N gene sequence, the genetic relationship among current isolates had more close relationship with a ranging from 97.67-100% of nucleotide identity and all current isolates were located in the same clade. Furthermore, the current isolates had S gene sequence closely related to previous Thai and Chinese isolates by sharing nucleotide identity between 97.55-99.53% and 96.26-98.82%, respectively. For partial N gene sequence analysis, current Thai isolates also shared high nucleotide similarity to Chinese isolates between 94.00-99.52%. Therefore, the Thai PEDV isolates during 2011-2012 might have been originated from Chinese clade.

Department	Veterinary Medicine	Student's Signature	Supansa Tuanthap
Field of Study	Veterinary Medicine	Advisor's Signature	Suphot Wattanaphansak
Academic Year	2012	Co-advisor's Signature	P. Assavacheep
		Co-advisor's Signature	J Keawcharoen

ACKNOWLEDGEMENTS

This research thesis would have not been possible without helpfulness from many people. First of all, I would like to express my grateful to my advisor, Dr. Suphot Wattanaphansak for useful guidance to perform the research and continuous kindly support throughout the master degree program. My deepest grateful is also expressed to my both co-advisor, Dr. Juthatip Keawcharoen and Dr. Pornchalit Assavacheep for their kindly suggestions and persistent help for all my requests. In addition, I am grateful to Assoc. Prof. Dr. Kanisak Oraveerakul to encourage my molecular works in laboratory of Virology unit and his fully supported in many ways for my successful works. My sincere thanks also go to Prof. Yong Poovorawan and his staffs in molecular laboratory of Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for kindly suggestion and good guidance in the molecular techniques. My appreciation is also expressed to Assoc. Prof. Dr. Pariwat Poolperm for supporting samples in this research. I would like to thank the thesis committee members, Prof. Dr. Roongroje Thanawongnuwech, Assoc. Prof. Dr. Supol Luengyosluechakul, Assoc. Prof. Achara Tawatsin and Assoc. Prof. Boonmee Sunyasootcharee for valuable suggestions. I am very grateful to have received the financial and academic support granted by H.M. King Bhumibol Adulyadej's 72nd Birthday Anniversary Scholarship Chulalongkorn University during studying for Master Degree in Faculty of Veterinary Science.

Lastly, I would like to thank you my beloved family that giving confidence in any my decision, greatest love without conditions and encouragement given throughout my life.

CONTENTS

Page

ABSTRACT IN THAI iv

ABSTRACT IN ENGLISH v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES viii

LIST OF FIGURES ix

LIST OF ABBREVIATIONS xi

CHAPTER I INTRODUCTION 1

CHAPTER II LITERATURE REVIEW 3

2.1 Characteristic of PEDV 3

2.2 Molecular biology of PEDV 3

2.3 Disease distribution and epidemiology 9

2.4 Molecular epidemiology of PEDV 12

CHAPTER III METERIAL AND METHOD 14

3.1 Sample collection 14

3.2 RNA extraction and RT-PCR 17

3.3 Sequence analysis 18

3.4Phylogenetic analysis 21

CHAPTER IV RESULTS 22

4.1 Viral RNA detection 22

4.2 Sequence and phylogenetic analyses 25

4.3 Sequence homology analysis 31

CHAPTER V DISCUSSION AND CONCLUSSION 43

REFERENCES 54

APPENDIX 62

BIOGRAPHY 88

LIST OF TABLES

Table Page

1 The data of PEDV samples which were submitted during 2011-2012 15

2 Primer sequences of S and N gene 17

3 The reference PEDV isolates used for partial S gene comparisons 18

4 The reference isolates of PEDV used for partial N gene comparisons 20

5 PEDV isolate groups were categorized base on partial S gene sequences 25

6 PEDV isolate groups were categorized base on partial N gene sequences 28

7 The partial S gene sequence identity between current Thai isolates and reference isolated divided by the groups 33

8 The partial N gene sequence identity between current Thai isolates and reference isolates divided by the 36

LIST OF FIGURES

Figure Page

1 The structure of coronavirus ... 3

2 The genomic organization of alpha coronavirus group ... 4

3 Coronavirus accessory genes ... 5

4 Spike protein structure of coronavirus ... 7

5 Membrane protein structure ... 8

6 RT-PCR products of S gene fragments ... 22

7 RT-PCR products of N1 gene fragments ... 23

8 RT-PCR products of N2 gene fragments ... 23

9 RT-PCR products of N3 gene fragments ... 24

10 RT-PCR products of N4 gene fragments ... 24

11 Phylogenetic tree based on partial S gene sequences ... 27

12 Phylogenetic tree based on partial N gene sequences ... 30

13 The amino acid sequences alignment of current Thai isolates based on partial S gene ... 37

14 The amino acid sequences alignment of re-outbreak samples based on partial S gene ... 38

15 The partial N gene nucleotide sequences alignment of current Thai isolates ... 39

16 The nucleotide substitutions of some current Thai isolates that represented minor deletions and insertion based on partial N gene sequences ... 40

17 The amino acid substitutions of some current Thai isolates that represented minor deletions and insertion based on partial N gene sequences ... 41

18 The amino acid sequences of current Thai isolates from Chachoengsao Province (TH/CS-866/12, TH/CS-80712/12, TH/CS1019/12 and TH/CS-65/12) were compared to the other current Thai isolates ... 42

19 The partial S gene nucleotide sequences alignment of current Thai isolates as compared to reference isolates ... 63

20 The partial S gene amino acid sequences alignment of current Thai isolates

Figure Page

as compared to reference isolates 68

21 The partial N gene nucleotide sequences alignment of current Thai isolates as compared to reference isolates 70

22 The partial N gene amino acid sequences alignment of current Thai isolates as compared to reference isolates 83

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	=	base pair (S)
°C	=	degree Celsius (centrigrade)
EM technique	=	electron microscope technique
FA technique	=	fluorescent antibody technique
IgA	=	immunoglobulin A
kb	=	kilobase
M gene	=	membrane gene
N gene	=	nucleocapsid gene
nm	=	nanometer
ORF gene	=	open reading frame gene
pol gene	=	polymerase gene
rep gene	=	replicase gene
rpm	=	revolutions per minute
RT-PCR	=	reverse transcriptase polymerase chain reaction
TAE buffer	=	tris-acetic acid-EDTA buffer
µl	=	microliter
µM	=	micron