การตรวจหาและแยกชนิดเชื้อพาร์โวไวรัสในอุจจาระของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบ

นายกมล สกุลวิระ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-740-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19016797

DETECTION AND TYPING OF CANINE PARVOVIRUS IN FECAL SPECIMENS FROM CLINICALLY ENTERITIC DOGS

Kamol Sakulwira

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-333-740-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาและแยกชนิดเชื้อพาร์โวไวรัสในอุจจาระของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบ
โดย	นายกมล สกุลวิระ
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงนันทนา ศิริทรัพย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

นายกมล สกุลวิระ: การตรวจหาและแยกชนิดเชื้อพาร์โวไวรัสในอุจจาระของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบ. (Detection and Typing of Canine Parvovirus in Fecal Specimens from Clinically Enteritic Dogs) อ. ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล, 43 หน้า. ISBN 974-333-740-7.

Canine Parvovirus (CPV) อยู่ใน จีนัส *Parvovirus* ประกอบด้วย DNAสายเดี่ยวที่ไม่มีเปลือกหุ้ม จีโนมมีเบสประมาณ 5,000 เบส ประกอบด้วยยีนสำหรับสร้าง viral proteins 1 และ 2 (VP1 และ VP2) และยีนสำหรับสร้าง nonstructural proteins 1 และ 2 (NS1 และ NS2) เชื้อ CPV พบครั้งแรกในปี 1978 เป็นชนิด CPV-2 ประมาณปี 1979 มีการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์จาก CPV-2 เป็น CPV-2a ในปี 1984 มีสายพันธุ์ใหม่คือ CPV-2b ซึ่งแตกต่างจาก CPV-2a ในการศึกษานี้เป็นการตรวจหาเชื้อ CPV ในอุจจาระของสุนัขปกติและของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบที่แสดงอาการอาเจียนและท้องเสียอย่างละ 55 ตัวอย่างรวมทั้งวัคซีนจาก 1 บริษัทโดยวิธี seminested Polymerase Chain Reaction โดยการขยายเพิ่มจำนวนยีนบริเวณที่สร้าง VP2 ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของ capsid protein ของ CPV ที่กระตุ้นการสร้าง neutralizing antibody ปรากฏว่า ไม่พบเชื้อ CPV ในอุจจาระของสุนัขปกติ พบเชื้อ CPV ในอุจจาระของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบ 34 ตัวอย่าง (61.8%) และพบเชื้อ CPV ในวัคซีน จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกและผลผลิตของปฏิกิริยาจากวัคซีนมาแยกชนิดเชื้อโดยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism โดยใช้เอนไซม์ *Rsa* I และ *Hph* I พบว่าชนิดของเชื้อ CPV ที่พบในอุจจาระของสุนัขทุกตัวที่ป่วยด้วยลำไส้อักเสบ (CPV-2a หรือ CPV-2b) มีความแตกต่างจากชนิดของเชื้อ CPV ที่พบได้ในวัคซีน (CPV-2) การศึกษาทางระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสดังกล่าวใช้เป็นแนวทางในการศึกษาทางระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อ CPV

ภาควิชา -
สาขา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

Kamol Sakulwira : THESIS TITLE. (Detection and Typing of Canine Parvovirus from Clinically Enteritic Dogs) THESIS ADVISOR : Prof. Yong Poovorawan, THESIS COADVISOR : Assoc. Prof. Dr. Kanisak Oraveerakul, 43 pp.
ISBN 974-333-740-7.

Canine Parvovirus (CPV) is a member of the genus *Parvovirus*. CPV contains about 5,000 bases of non-enveloped single stranded DNA encoding two viral proteins, VP1 and VP2 and two nonstructural proteins, NS1 and NS2. CPV was first observed in 1978. The original 1978 isolate was here designated CPV type2 (CPV-2). Around 1979, a variant CPV strain (designated CPV type2a (CPV-2a)) became widespread. A further antigenic variant (designated CPV type2b (CPV-2b)) emerged around 1984 and the CPV-2b antigenic type subsequently replaced CPV-2a. Fifty five fecal samples from healthy dogs, fifty five fecal samples from dogs with signs of gastroenteritis (vomiting and diarrhea) and one vaccine strain were amplified by seminested Polymerase Chain Reaction (PCR), aimed at specifically studying the gene encoding the most abundant capsid protein VP2. Positive specimens comprised 34 samples (61.8%) and one vaccine which were amplied by seminested PCR using primers different from those used for virus detection. Identifying the difference of types between field strains and vaccine strain by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) using the enzymes *Rsa* I and *Hph* I has shown every field strain (CPV-2a or CPV-2b) to differ from the vaccine strain (CPV-2). Molecular epidemiology of these viruses is an important criterion regarding vaccination of dogs at risk and thus, control of virus dissemination.

ภาควิชา -
สาขา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร. คณิศักดิ์ อรวีระกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณ คณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยวิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและความรู้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนสัตวแพทย์ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยในการเก็บตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุมัติให้ลาศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	29
รายการอ้างอิง	35
ภาคผนวก	39
ประวัติผู้เขียน	43

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตำแหน่งการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีความแตกต่างกันในบริเวณ VP2 gene ระหว่าง FPLV, CPV-2 และ CPV-2a/2b.....	9
2	รายละเอียดของแต่ละ primers.....	17
3	ผลของการตรวจหา Canine Parvoviral DNA โดยวิธี seminested PCR.....	25
4	ผลของการตรวจหา Canine Parvoviral DNA โดยวิธี seminested PCR จำแนกตามเพศ.....	26
5	ผลของการตรวจหา Canine Parvoviral DNA โดยวิธี seminested PCR จำแนกตามอายุ.....	26
6	ผลของการตรวจหา Canine Parvoviral DNA โดยวิธี seminested PCR จำแนกตามพันธุ์.....	27

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ		หน้า
1	รูปร่างลักษณะของเชื้อ CPV ศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน	2
2	จีโนมของ CPV.....	2
3	พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อ CPV.....	4
4	การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสและกรดอะมิโนบริเวณ VP2 gene ระหว่าง FPLV และ CPV-2.....	10
5	การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสและกรดอะมิโนบริเวณ VP2 gene ระหว่าง CPV-2, CPV-2a และ CPV-2b.....	11
6	CLUSTAL X (1.64 b) multiple sequence alignment.....	13-17
7	รูปแบบ RFLP ของ CPV Products ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Rsa* I.....	22
8	รูปแบบ RFLP ของ CPV Products ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Hph* I.....	22
9	ตำแหน่ง primers ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ CPV.....	24
10	ผลของการตรวจหา CPV DNA โดยวิธี seminested PCR.....	24
11	ตำแหน่ง primers ที่ใช้ในการแยกชนิดเชื้อ CPV.....	27
12	รูปแบบ RFLP ของ CPV Products ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Rsa* I.....	28
13	รูปแบบ RFLP ของ CPV Products ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Hph* I.....	28