

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนฮีแมกกลูตินินและฟอสโฟโปรตีนของไวรัสไข้หัดสุนัขที่แยกได้จากใน  
ประเทศไทย



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

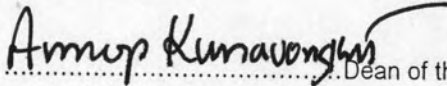
Copyright of Chulalongkorn University

510621

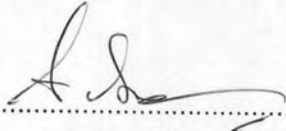
Thesis Title THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF HEMAGGLUTININ AND  
PHOSPHOPROTEIN GENES OF THAI ISOLATED CANINE DISTEMPER  
VIRUS.  
By Miss Na taya Charoenvisal  
Field of study Veterinary Pathobiology  
Thesis Principal advisor Associate Professor Anudep Rungsipipat, D.V.M., Ph.D.  
Thesis Co-advisor Associate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

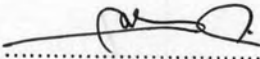
---


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

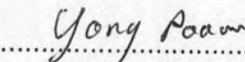
  
.....Dean of the Faculty of Veterinary Science  
(Professor Annop Kunavongkrit, D.V.M., Ph.D.)

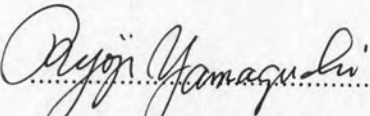
THESIS COMMITTEE

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

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


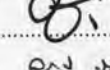
  
.....Thesis Co-advisor  
(Associate Professor Kanisak Oraveerakul, D.V.M., Ph.D.)

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

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

ณ ทยา เจริญวิศาล : ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนฮีแมกกลูตินินและฟอสโฟโปรตีนของไวรัส  
ใช้หัดสุนัขที่แยกได้จากในประเทศไทย (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. คณิศศักดิ์ อรรวีรุกล และ ศ.  
นพ. ยง ภูววรรณ, 74 หน้า.

โรคใช้หัดสุนัขเป็นโรคติดต่อที่สำคัญในสัตว์และพบได้ทั่วโลก สาเหตุจากเชื้อไวรัสใช้หัดสุนัข ซึ่งแม้ว่า  
จะมีการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคมาอย่างต่อเนื่อง ยังสามารถพบสุนัขและสัตว์ชนิดอื่นที่มีความไวต่อโรค ติด  
เชื้อไวรัสใช้หัดสุนัขอยู่ จุดประสงค์ของการศึกษาคือวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนฮีแมกกลูตินินไกลโค  
โปรตีนและจีนฟอสโฟโปรตีนของไวรัสใช้หัดสุนัขสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์  
วัคซีนและสายพันธุ์ก่อโรคอื่นๆ ที่พบในหลายประเทศทั่วโลก โดยการเก็บตัวอย่างขึ้นเนื้อจากสุนัขที่แสดงอาการ  
และเสียชีวิตด้วยโรคใช้หัดสุนัขจำนวน 9 ตัว เมื่อผ่าซากสุนัขเหล่านี้พบรอยโรคทางมหาวิทยาลัยของโรคใช้หัด  
สุนัข และนำตัวอย่างอวัยวะเป้าหมายของไวรัสมาศึกษาด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และศึกษา  
ทางไวรัสวิทยาโดยบดตัวอย่างขึ้นเนื้อและแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero-DST จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มา  
ทำปฏิกิริยาริเวสทรานสคริปเตสลูกโซ่โพลีเมอเรส และหาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นใน  
ธนาคารจีน ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคจำเพาะของไวรัสใช้หัดสุนัขในปอด ม้าม ต่อมมน้ำเหลือง  
และสมอง ส่วนการศึกษอิมมูโนฮิสโตเคมีพบแอนติเจนของไวรัสในปอด ม้าม ลำไส้เล็กและสมอง ส่วนผลการ  
เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ไวรัสใช้หัดสุนัขที่แยกได้จากในประเทศไทย มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจาก  
สายพันธุ์วัคซีน และแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่จัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ Asia 1 และกลุ่มที่ไม่สามารถจัดอยู่  
ในกลุ่มใดที่มีข้อมูลอยู่ในธนาคารจีน เนื่องจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสใช้หัดสุนัขสายพันธุ์ที่แยก  
ได้ในประเทศไทยในงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งศึกษาโดยใช้จีนนิวคลีโอเคปสิดพบว่าสามารถแบ่งไวรัสออกเป็น 2  
กลุ่มคือกลุ่มที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์วัคซีน และกลุ่มที่เหมือนสายพันธุ์ก่อโรคอื่นๆ ดังนั้นจึง  
สรุปผลการศึกษานี้ว่ามีไวรัสใช้หัดสุนัขอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ที่แพร่ระบาดอยู่ในประเทศไทย

ภาควิชา.....พยาธิวิทยา.....	ลายมือชื่อนิสิต.....	ณ ทยา เจริญวิศาล
สาขาวิชา.....พยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....	
ปีการศึกษา.....2551.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....	
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....	ยง ภูววรรณ

## 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.....*[Signature]*.....

Academic year.....2008.....

Co- advisor's signature.....*[Signature]*.....

Co- advisor's signature.....*Yong Poovorawan*.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and sincere thank you to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Anudep Rungsipat 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 Wangnaitam, 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 (centigrade)
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 <sub>50</sub>	50% tissue culture infectious dose
TPB	tryptose phosphate broth
UV	ultraviolet
Vero DST cells	vero cell expressed canine SLAM tag
-	negative
+	positive