การแยกชนิดของตัวอย่างเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยและเชื้อไวรัสวัคซีนอหิวาต์สุกร โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

นางสาวสรินนา ทุมาภา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0539-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20124752 25 ก.พ. 2547

DIFFERENTIATION OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS (CSFV) AMONG THAI ISOLATES AND VACCINE STRAINS BY REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS

Miss Sarinna Tumapa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0539-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกชนิดของตัวอย่างเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยและเชื้อไวรัสวัคซีนอหิวาต์สุกร โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ
โดย	นางสาวสรินนา ทุมาภา
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	สัตวแพทย์หญิง ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.ณรงศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.เล็ก อัศวพลังชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(สัตวแพทย์หญิง ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.วัฒนา วัฒนวิจารณ์)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

นางสาวสรินนา ทุมาภา : การแยกชนิดของตัวอย่างเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่แยกได้ในประเทศไทยและเชื้อไวรัสวัคซีนอหิวาต์สุกรโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Differentiation of Classical Swine Fever Virus (CSFV) among Thai Isolates and Vaccine Strains by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphisms) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : สัตวแพทย์หญิง ดร. สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน, 70 หน้า. ISBN 974-03-0539-3

ทำการเพิ่มจำนวนยีนในส่วนของ gp 55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primers A8 (5' CCAYTTCCGTGACATTCGAGCTCCT 3') และ 1R (5' TAGCTGTCCCTGGGCTCATARTACTT 3') ได้ผลผลิตขนาด 717 คู่เบส และทำการวิเคราะห์สารพันธุกรรมที่ได้นั้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* II และ *Ppu* MI โดยเปรียบเทียบรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวกับสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน สายพันธุ์ต่างประเทศ สายพันธุ์อ้างอิง ALD และสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย พบว่าสามารถแบ่งรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวได้สามรูปแบบคือ กลุ่มที่ 1 รูปแบบของกลุ่มสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนและสายพันธุ์ที่พบการระบาดในต่างประเทศ กลุ่มที่ 2 รูปแบบของสายพันธุ์อ้างอิง ALD และกลุ่มที่ 3 รูปแบบของสายพันธุ์ที่ใช้แยกได้ในประเทศไทย เมื่อนำตัวอย่างจากสุกรที่เป็นโรคอหิวาต์สุกรจำนวน 20 ตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วย primers คู่ดังกล่าวจำนวน 15 ตัวอย่างและให้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่หลากหลาย คือได้รูปแบบการตัดของทั้งสามกลุ่ม การศึกษานี้ช่วยลดระยะเวลาในการวินิจฉัยและทำให้สามารถทราบถึงระบาดวิทยาของโรคอหิวาต์สุกรโดยไม่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับสารพันธุกรรม ซึ่งจะช่วยให้สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ง่ายขึ้น

ภาควิชาพยาธิวิทยา
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
ปีการศึกษา 2544

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

4175567131 : Major Pathobiology

KEY WORD: Classical Swine Fever Virus/ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction/ Restriction Fragment Length Polymorphisms /

SARINNA TUMAPA : THESIS TITLE (DIFFERENTIATION OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS (CSFV) AMONG THAI ISOLATES AND VACCINE STRAINS BY REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS) THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. DR. KANISAK ORAVEERAKUL, THESIS COADVISOR DR. SUDARAT DUMRONGWATANAPOKIN, 70 pp. ISBN 974-03-0539-3

Amplification of gp55 region of classical swine fever virus by RT-PCR with forward primer A8 (5' CCAYTTCCGTGACATTCGAGCTCCT 3') and reverse primer 1R (5' TAGCTGTCCCTGGGCTCATARTACTT 3'), then the 717 bp amplicon were generated. Differentiation between viral strains were achieved by cutting the RT-PCR amplified products with the restriction endonuclease *Ppu* MI and *Xho* II. Using of these enzymes it was possible to distinguish three groups of CSFV; group I contained vaccine and foreign field strains, group II contained ALD reference strain and group III contained Thai field isolates. Twenty positive field samples by virus isolation and identification were analyzed but only fifteen samples were amplified with A8 and 1R. Various pattern or restriction fragments were observed and could be classified into three groups. This indicates the genomic diversity of CSFV among Thai Isolates. In addition, the study reveals the potential of using RT-PCR together with RFLPs for diagnosis of CSFV infection.

Department of Pathology

Field of study Veterinary Pathobiology

Academic year 2001

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและหน่วยงานต่างๆ ดังนี้

รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล อาจารย์ที่ปรึกษา และสัตวแพทย์หญิง ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโภคิน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ด้วยดีมาตลอด

คณาจารย์ทุกท่านในคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

เจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยไวรัสวิทยา และหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทย-ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและความรู้ในงานวิจัยครั้งนี้

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการอหิวาต์สุกร รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.คณิศักดิ์ อรวีระกุล ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนทำการวิจัยในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญภาพ ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ 19

บทที่ 4 ผลการทดลอง 28

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ 45

รายการอ้างอิง 53

ภาคผนวก 58

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 70

สารบัญตาราง

หน้า

1 ตารางกลุ่มสายพันธุ์ของไวรัสอหิวาต์สุกร และรหัสจาก GeneBank 20

2 แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรม ของไวรัสอหิวาต์สุกรกลุ่มต่าง ๆ 28

3 แสดงผลการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อการตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรแต่กลุ่ม 29

4 ตารางการจำแนกกลุ่มของตัวอย่างตามประวัติ 30

5 ตารางการจำแนกกลุ่มของตัวอย่างตามประวัติจากผลการทดสอบ เมื่อทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธี Immunoperoxidase Test 30

6 แสดงผลของการตัดสาย DNA ของตัวอย่างด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 44

7 แสดงตัวอย่างที่เก็บได้ในปีต่าง ๆ และรูปแบบการตัดด้วย Restriction enzyme ของตัวอย่าง 44

สารบัญภาพ

		หน้า
1	แสดงแผนภาพยีโนมของไวรัสอหิวาต์สุกร	17
2	แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำ RT-PCR ด้วย primers แบบต่าง ๆ	18
3	แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำงานวิจัย	27
4	แสดงการเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย primers 2 คู่ คือ gp55.1:gp55. และ gp55.3:gp55.2	32
5	แสดงการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR ด้วย primer gp55.3 และ gp55.2	33
6	แสดงความไวของเทคนิค RT-PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers gp55.3 และ gp55.2 ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD	34
7	แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรด้วย primers gp55.3 และ gp55.1	35
8	แสดงผลการตัดสาย DNA ในบริเวณ gp55 ของส่วนผลผลิตขนาด 696 คู่เบส ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และ Chinese ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* II และ *Ppu* MI	36
9	แสดง PCR product ของ primer 13 คู่	38
10	แสดงการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR ด้วย primer A8 และ 1R ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD	39
11	แสดงความไวของเทคนิค RT-PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers A8 และ 1R ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD	40
12	แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกร	
13	ด้วย primers 324 และ 326	41
14	แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรด้วย primers A8 และ 1R	42
15	แสดงผลการตัดสาย DNA ในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนได้ และสายพันธุ์ Chinese ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* II และ *Ppu* MI	43