การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทย และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่ง open reading frame 5

นางสาว นุสรา พันธุ์ประภา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3797-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21170435

PATHOLOGICAL STUDY OF THE SELECTED THAI ISOLATES OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS OF OPEN READING FRAME 5.

Miss Nusara Punprapa

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 2003
ISBN 974-17-3797-1

Thesis Title	Pathological study of the selected Thai isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and restriction fragment length polymorphism analysis of open reading frame 5.
By	Nusara Punprapa
Field of study	Vet.Pathology
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Roongroje Thanawongnuwech
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Anudep Rungsipipat

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

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

THESIS COMMITTEE

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

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Roongroje Thanawongnuwech D.V.M., Ph.D.)

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

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

..... Member
(Professor Yong Pooworawan M.D., MS)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นุสรา พันธุ์ประภา: การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของสุกรที่ฉีดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทย และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่ง open reading frame 5 (Pathological study of selected Thai isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and restriction fragment length polymorphism analysis of open reading frame 5) อ.ที่ปรึกษา: รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, อ. ที่ปรึกษาร่วม: อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ จำนวนหน้า 88 หน้า. ISBN 974-17-3797-1

ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 10 ตัวอย่าง ถูกนำมาเพิ่มจำนวนที่ตำแหน่งถอดรหัสโปรตีนที่ 5 โดยวิธีรีเวอร์สทรานสคริปเตส ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับสายพันธุ์อเมริกาคือ *Mlu*I *Hinc*II *Sac*II *Hae*III และสายพันธุ์ยุโรปคือ *Pst*I *Hae*II *Cla*I ไม่พบรูปแบบการตัดที่เหมือนกับวัคซีนเชื้อเป็น แต่พบการตัดได้หลายรูปแบบในแต่ละสายพันธุ์ สรุปได้ว่าเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมในไวรัสนี้ในประเทศไทย ซึ่งอาจเกิดจากการนำสายพันธ์ใหม่เข้ามาในพื้นที่หรือจากการวิวัฒนาการของไวรัสภายในพื้นที่ การทดลองให้ไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทยเพื่อศึกษาถึงพยาธิกำเนิด โดยใช้สุกรจำนวน 21 ตัวแบ่งเป็น 3 กลุ่มโดยการสุ่ม โดยมีสุกร 3 ตัวอยู่ในกลุ่มควบคุม สุกร 9 ตัวอยู่ในกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัส 01NP1 (สายพันธุ์อเมริกา) และ 9 ตัวอยู่ในกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัส 02SB3 (สายพันธุ์ยุโรป) โดยสุกรที่ได้รับไวรัสสายพันธุ์อเมริกามีอาการทางคลินิกและรอยโรคที่รุนแรงกว่าสายพันธุ์ยุโรป สามารถพบรอยโรคที่ปอดได้ตั้งแต่วันที่ 5 จนถึงวันที่ 15 หลังการได้รับเชื้อ พบต่อมน้ำเหลืองขยายขนาดขึ้น 2-4 เท่าตลอดการทดลองโดยเฉพาะวันที่ 15 มีการขยายขนาดมากที่สุด การอักเสบแบบไม่มีหนองที่สมองและกล้ามเนื้อหัวใจพบได้ในวันที่ 15 หลังได้รับเชื้อในสายพันธุ์อเมริกาเท่านั้น การพบจุดเลือดออกกระจายบนเปลือกนอกของไตในสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสในแต่ละสายพันธุ์อาจสรุปได้ว่าเกิดจากการเหนี่ยวนำของไวรัสพี อาร์ เอส เนื่องจากไม่พบร่องรอยของไวรัสอหิวาต์สุกรหรือพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกรทดลองโดยวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัส ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส และการทดสอบนิวทรอลไลเซชั่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....พยาธิวิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....พยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4475563931 :Veterinary Pathobiology

KEY WORD: PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME / PATHOLOGICAL STUDY / RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM / OPEN READING FRAME 5.

Nusara punprapa : THESIS TITLE. (Pathological study of the selected Thai isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and restriction fragment length polymorphism analysis of open reading frame 5.) THESIS ADVISOR : Roongroje Thanawongnuwech, THESIS COADVISOR : Anudep Runsipipat, PAGES 88 pp. ISBN 974-17-3797-1

The 10 selected Thai isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) were amplified at the open reading frame 5 by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and cut with restriction enzymes; *Mlu*I, *Hinc*II, *Sac*II and *Hae*III for the US genotype and with *Pst*I, *Hae*II and *Cla*I in the EU genotype. None of the field isolates had similar cutting pattern to the MLV vaccines. However, several cutting patterns were obtained from those study. The results suggested that genetic variation occurred among the Thai isolates, even within the same genotypes. The variation may cause by the introduction of a new variant into the area or by local evolution. In order to study of the pathogenesis of the Thai isolates, twenty-one PRRSV-free pigs were randomly divided into 3 groups, 3 pigs for negative control group, 9 pigs for 01NP1(US genotype)-infected group and 9 pigs for 02SB3 (EU genotype)-infected group. Pigs-infected with the US genotype had more severe clinical signs and lung lesions than those infected with the EU genotype. The lung lesions were observed as early as 5 day post inoculation (dpi) and persisted until 15 dpi. Lymphadenopathy characterized by enlargement of lymph node (2-4x) was seen at all necropsied date but greater at 15 dpi. The non-suppurative encephalitis and non-suppurative myocarditis were seen at 15 dpi only in the US group. Petechial hemorrhage on the renal cortex may be induced by PRRSV. No evidence of classical swine fever or pseudorabies virus was found in those study with virus isolation, PCR or Neutralization test.

Department.....Pathology.....Student signature..Nusara punprapa.....

Field of study.....Veterinary Pathology.....Advisor's signature.....

Academic year....2003.....Co-advisor's signature.....

Acknowledgements

This thesis could not be completed without the help of my advisor and co-advisor. The funding was provided by the Graduated college of Chulalongkorn University and Ministry of Academic Affair.

I would like to thank Dr. Sanipa suradhat, Division of Microbiology for her valuable suggestion. My special thank to Dr. Nareerat Viseshakul, Parasitology unit for her useful advice. My thanks also express to Dr. Sawang Kesdangsakulwut and other undergraduated students for their helps during these experiments.

My sincere and warm appreciation is express to the Veterinary Diagnostic Laboratory staffs particularly, Ms. Amornrat Tasanakit and Mr. Piya Wongyanin for their good assistance in PCR and viral isolation techniques, Ms. Somsri Duangpean for her laboratory assistance. My thank is also extend to Ms. Chailai Kuwattananukul, Department of Veterinary Public Health for her helping in electrophoresis. Last but not least, my best technician, Mr. Supradit Wangnaithum and Ms. Khwanruthai Chaomuangkhong for their best performance. Finally, I gratefully acknowledge to my friends and my family, Mr. Apisak, Mrs. Oranuch, Ms. Atchara and Mr. Komkrit Punprapa who always encourage me to pursue the higher degree and the goal of my life.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Contents

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of tables.....	viii
List of figures.....	ix
Abbrevations.....	x
Chapter 1 Introduction.....	1
Chapter 2 Review literatures.....	4
Chapter 3 Materials and methods	
Part 1 Restriction fragment length polymorphism of ORF5 in selected Thai isolates of PRRSV.....	19
Part 2 Pathological studyu of the selected Thai isolates of PRRSV.....	25
Chapter 4 Results	
Part 1 Restriction fragment length polymorphism of ORF5 in selected Thai isolates of PRRSV.....	31
Part 2 Pathological studyu of the selected Thai isolates of PRRSV.....	36
Chapter 5 Discussion.....	49
References.....	56
Appendices.....	70
Vita.....	88

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of tables

Table		Page
1	Restriction sites, sources and appropriate buffer for restriction enzymes used for US genotype (*Mlu*II , *Hinc*II , *Sac*II and *Hae*III) and EU genotype (*Pst*I , *Hae*II and *Cla*I).....	24
2	Sources and RFLP patterns of PRRSV isolates in Thailand.....	35
3	Respiratory scores of PRRSV inoculated pigs.....	37
4	Relative humidity	38
5	Gross and microscopic lung scores.....	41

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figure		Page
1	Schematic representation of the PRRSV.....	6
2	Schematic diagram of the PRRSV genome and gene organization	7
3	Pathogenesis of PRRSV infection.....	12
4	Gross lung lesion scoring system (100 points).....	28
5	The RFLP patterns of ORF5 of the Thai isolates (US genotypes) and the US-MLV vaccine. ORF5-PCR products were treated with 4 restriction endonuclease enzymes.....	33
6	The RFLP patterns of ORF5 of Thai isolates (EU genotypes) and the EU-MLV vaccine. ORF5-PCR products were treated with 3 restriction enzymes.....	34
7	Lungs from 02SB3 - infected, 01NP1 - infected and control pigs.	39
8	Lungs from PRRSV-infected pigs showing multifocal interstitial pneumonia and PRRSV-positive cells were stained with SDOW17 showing brown granular staining.....	40
9	Lymphoid necrosis in tracheobronchial lymph node.....	44
10	Mild lymphoplasmacytic rhinitis and suppurative exudate.....	44
11	Enlargement of inguinal lymph node (2x)	45
12	Diffuse petechial hemorrhage on the renal cortex.....	45
13	Mild to moderate non-suppurative encephalitis with multifocal gliosis.....	46
14	Non-suppurative myocarditis.....	46
15	Viral titer and ELISA titer of 01NP1 - infected pigs.....	47
16	Viral titer and ELISA titer of 02SB3 - infected pigs.....	48

Abbreviations

A	ampare
bp	base pairs
°c	degree celsius (centrigate)
CU-VDL	Veterinary Diagnostic Laboratory, Chulalongkorn University
dpi	day post inoculation
DW	distrilled water
ELISA	enzyme-linked immunosorbant assay
EU	European genotype
et al.	et alii, and others
g	gram (s)
GP	glycoprotein
h	hour (s)
H & E	hematoxylin & eosin
Ig	Immunoglobulin
IHC	immunohistochemistry
IPMA	Indirect immunoperoxidase monolayer assay
ISH	in situ hybridization
kb	kilobase pair
kd	kilodalton

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Mab	Monoclonal antibody
min	minute(s)
ml	millilitre (s)
MLV	modified live virus
mm^3	millimetre (s)
µl	microlitre
NPLA	Neutralization peroxidase-linked assay
OD	optical density
ORF	open reading frame
PAMs	pulmonary alveolar macrophage
pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
PIMs	pulmonary intravascular macrophage
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome
RFLP	restriction fragment length polymorphism
rpm	round per minutes
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SD	standard deviation
sec	second (s)
$TCID_{50}$/ml	tissue culture infectious dose
US	American genotype
V	Volt

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย