การศึกษาด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ เอ ที่ระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2547-2548

ปณิธาน ทองทา* และวิไล ลินจงสุบงกช

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทร. 044-279112; Email-address: ekkpasang3dld@hotmail.com

บทคัดย่อ

การนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และ nucleotide sequencing มาใช้ศึกษาและวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ ที่ระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2547-2548 ไวรัสไทป์เอ จำนวน 15 ตัวอย่าง ถูกนำมาเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ specific primer 1C-612/NK61 ให้ผล PCR product band ที่ 813 bp เมื่อเทียบกับ DNA มาตรฐาน (100 bp Ladder) นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุล โดยวิธี nucleotide sequencing เพื่อดูการเรียงลำดับเบสบนสาย cDNA ในส่วนของ VP1 gene จนได้ complete genome ที่มีความยาวเท่ากับ 636 nucleotide ทำการวิเคราะห์ผลโดยแสดงในรูปของ phylogenetic tree พบว่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ ที่ระบาดในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด คือ Asia topotype โดยมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อยมาก ซึ่งการศึกษาและวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลในครั้งนี้ นับว่าเป็นประโยชน์สำหรับการสืบกลับถึงไวรัสต้นกำเนิดที่ทำให้เกิดโรคระบาดในพื้นที่และใช้สนับสนุนการคัดเลือก seed virus สำหรับผลิตวัคซีนให้มีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ระบาดวิทยาระดับโมเลกุล พีซีอาร์ ซีเควนซิ่ง

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาด ที่สามารถติดต่อได้ง่ายและระบาดรวดเร็วในสัตว์กีบคู่ทุกชนิด ได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ สุกร กวาง (Thomson, 1994) ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในด้านอุตสาหกรรมปศุสัตว์ในประเทศไทยและทั่วโลก สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสแอฟโทไวรัส (Aphthovirus) จัดอยู่ในกลุ่มพิคอร์น่าไวรัส (Picornavirus) มีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่พบทั่วโลก มีทั้งหมด 7 ไทป์ (O, A, Asia1, C, SAT1, SAT2 และ SAT3) ในประเทศไทยพบมีระบาดอยู่ 3 ไทป์ คือ O, A และ Asia1 ไวรัสแต่ละ ไทป์ ไม่ทำให้เกิดความคุ้มโรคข้ามซึ่งกันและกัน

การชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการสังเกตอาการไม่เพียงพอ เพราะไม่สามารถบอกถึงไทป์ของเชื้อไวรัสได้ จึงจำเป็นต้องใช้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย การตรวจวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและรวดเร็วมีความสำคัญในการป้องกันการแพร่กระจายของโรค การป้องกันที่ได้ผลดีที่สุด คือการฉีดวัคซีน และวัคซีนจะต้องมีประสิทธิภาพ ให้ความคุ้มโรคสูง ดังนั้นการทราบถึงไวรัสต้นกำเนิดและการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางด้านพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ที่เกิดการระบาดในพื้นที่ของประเทศไทยจะมีประโยชน์และมีความสำคัญอย่างยิ่งในการใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในการคัดเลือก seed virus สำหรับใช้ผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพได้

ปัจจุบันการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุล มีการนำเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) มาใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยและศึกษาด้านระบาดวิทยาของโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ ในประเทศไทย (Linchongsubongkoch et al., 2000; Thongtha et al., 2003) และมีการนำเทคนิค nucleotide sequencing มาใช้ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพื่อจำแนกไวรัสชนิดย่อย (subtype) ของโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในทวีปยุโรป (Beck and Strohmaier, 1987; Weddel et al., 1985) โดยการศึกษาการเรียงลำดับเบสบนสาย cDNA ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ในส่วน VP1 gene ที่เป็นส่วนจำเพาะ (conserve region) เนื่องจาก VP1 gene มีความสำคัญในขบวนการยึดเกาะ กลไกการเข้าสู่เซลล์ รวมถึงความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อ (Jackson et al., 2003) และยังเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคด้วย (Mason et al., 1994; McKenna et al., 1995) ดังนั้นการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จึงเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากไวรัสที่ระบาดในพื้นที่แต่ละครั้งนั้น มีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทั้งด้านแอนติเจนและด้านพันธุกรรมได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ (Linchongsubongkoch, 2003) ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ทางด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ ที่ระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2547-2548 โดยแสดงผลในรูป phylogenetic tree ให้เห็นถึงกลุ่มพื้นที่ของการระบาด (topotype) ว่าจัดอยู่ในกลุ่มใด

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างเชื้อไวรัส

ตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ จำนวน 15 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเชื้อท้องที่ที่เกิดการระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี 2547-2548 ซึ่งผ่านการตรวจจำแนกชนิดไวรัสแล้ว โดยวิธี ELISA Typing โดยวิธีของ Roeder and LeBlanc Smith (1987) นำมาผ่านลงบนเซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21 เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส สำหรับใช้ในการตรวจสอบทาง PCR และ nucleotide sequencing ตาม table 1

Table 1 Foot and Mouth Disease Virus type A field outbreak in Thailand during 2004-2005

Virus name	Sample code.	Province	Region	Host species	Year
A/TAI/YSN/2/04	$2/04R_2$	Yasothon	NE	Cattle	2004
A/TAI/UDN/4/04	$4/04R_2$	Udonthani	NE	Cattle	2004
A/TAI/KLS/6-3/04	6-3/04	Kalasin	NE	Pig	2004
A/TAI/SRN/8/04	$8/04R_2$	Surin	NE	Cattle	2004
A/TAI/PTL/11/04	11/04	Phattalung	S	Cattle	2004
A/TAI/SRB/14-1/04	14-1/04	Saraburi	C	Cattle	2004
A/TAI/SKL/24/04	28/04	Songkhla	S	Cattle	2004
A/TAI/SRB/45/04	45/04	Saraburi	C	Cattle	2004
A/TAI/ROT/48-2/04	$48\text{-}2/04R_2$	Roi Et	NE	Cattle	2004
A/TAI/NKM/66/04	$66/04R_1$	Nakhon Sithammarat	S	Cattle	2004
A/TAI/CHM/3507/47	$3507/47R_2$	Chiangmai	N	Cattle	2004
A/TAI/SKL/1/05	$1/05R_2B_2$	Songkhla	S	Cattle	2005
A/TAI/NKR/3-3/05	3-3/05	Nakhonratchasima	NE	Cattle	2005
A/TAI/RAT/4/05	$4/05R_1$	Ratchaburi	W	Cattle	2005
A/TAI/YAL/6/05	6/05	Yala	S	Cattle	2005

NE = North East, S = South, C = Central, N = North, W = West

R = primary lamb kidney cell, B = BHK_{21} cell

การแยกสกัด RNA

ตัวอย่างเชื้อไวรัสจากน้ำเลี้ยงเซลล์ 750 µl สกัด RNA โดยการใช้ reagent kit สำเร็จรูป ได้แก่ Trizol LS reagent (Gibco®, BRL) และละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase 30 µl (วิธีการและขั้นตอนตามข้อบ่งใช้ของผู้ผลิต)

Reverse Transcription (RT)

เป็นขั้นตอนการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase มีวิธีการดังนี้คือ ในปฏิกิริยา 25 µl ประกอบด้วยตัวอย่าง RNA 10 µl, 10 mM dNTPs 2.5 µl, 5X buffer 5 µl, 0.1 M DTT 2.5 µl, RNasin Inhibitor 0.5 µl, เอนไซม์ M-MLV (200 U/µl, Promega, USA) 1 µl, primer NK61 (20 pmol) 1µl เป็น universal primer (Knowles and Samuel, 1998) และเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ให้ปริมาตรครบ 25 µl ในขั้นตอนนี้ RNA จะถูกเปลี่ยนเป็น cDNA โดยเอนไซม์ M-MLV ในเครื่อง Thermal Cycler (Omnigene, Hybaid, UK) โดยตั้งโปรแกรมที่ 42 ºC เป็นเวลา 60 นาที, 95 ºC เป็นเวลา 5 นาที จะได้ RT product

Polymerase Chain Reaction (PCR)

เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ cDNA โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณ มีวิธีการดังนี้คือ ในปฏิกิริยา 50 µl ประกอบด้วย cDNA หรือ RT product 10 µl, 10 mM dNTPs 1.0 µl, 10X buffer 5 µl, 25 mM $MgCl_2$ 3 µl, primer 1C-612 (20 pmol) 1 µl, primer NK61 (20 pmol) 1 µl, เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA) 0.5 µl และเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ให้ปริมาตรครบ 50 µl แล้วหยดทับด้วย mineral oil 10 µl ในขั้นตอนนี้เป็นการเพิ่มปริมาณ cDNA โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase และใช้ primer คู่ ในการสร้างสาย cDNA ได้แก่ primer 1C-612 ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ (Knowles and Samuel, 1998) ร่วมกับ primer NK61 ในเครื่อง Thermal Cycler (Omnigene, Hybaid, UK) โดยตั้งโปรแกรมที่ 94 ºC เป็นเวลา 4 นาที 1 รอบ ทำขั้นตอน denaturation ที่ 94 ºC เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่ 55 ºC เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 ºC เป็นเวลา 1.5 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 ºC เป็นเวลา 5 นาที อีก 1 รอบ จะได้ PCR product

การตรวจวิเคราะห์ผล PCR product

ตรวจวิเคราะห์ผล PCR product โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยนำ PCR product ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณแล้วมาแยกขนาดของ DNA ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ผ่าน 1.2% agarose gel ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เปรียบเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Promega, USA) ที่ทราบขนาดแน่นอน จากนั้นย้อม DNA บนแผ่น gel ด้วยสาร ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้เครื่อง UV Transilluminator

Nucleotide Sequencing

เป็นการศึกษาการเรียงลำดับเบสบนสาย cDNA โดยการนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN®, UK) จากนั้นติดฉลากด้วยสาร Big-Dye terminator labeling kit (ABI) กับการใช้ primer ทั้งหมด 4 primer ได้แก่ 1C-612, 1C-562, NK72 และ NK61 เพื่อให้ได้ complete VP1 ดังแสดงในตารางที่ 2 ในเครื่อง Thermal Cycler (Omnigene, Hybaid, UK) โดยตั้งโปรแกรมที่ 96 ºC เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ, 96 ºC เป็นเวลา 30 วินาที 50 ºC เป็นเวลา 15 วินาที 60ºC เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 25 รอบ แล้วทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยใช้ Centri-Sep spin columns (Applied Biosystems) ทำ sequencing ในเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (ABI 310 Genetic Analyzer V. 3.1)

Table 2 The oligonucleotide primer used for RT-PCR and sequencing of foot and mouth disease virus type A

Primer designation	Primer sequence 5'-3'	Location	Product length (bp)
1C-612	TAGCGCCGGCAAAGACTTTGA	1C	813-816
1C-562	TACCAAATTACACACGGGAA	1C	863-866
NK72	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC	2A	Universal primer
NK61	GACATGTCCTCCTGCATCTG	2B	Universal primer

การวิเคราะห์ผล Nucleotide Sequencing

อ่านผลการเรียงลำดับเบส A, C, G และ T บนสาย cDNA ของตัวอย่างเชื้อไทป์เอทั้งหมดที่ได้จากการทำ sequencing ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ แล้วทำการวิเคราะห์ผล nucleotide sequencing โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GENETYX-WIN version 4 (Software development, Tokyo, Japan) ในการทำ alignment

การแสดงผล Phylogenetic tree

ทำการวิเคราะห์ผล alignment ของเชื้อไวรัสไทป์เอ จำนวนทั้งหมด 15 ตัวอย่าง แสดงในรูป phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004) เพื่อหาความแตกต่างจำนวนกลุ่มของ nucleotide บน VP1 gene ของไวรัสแต่ละตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงด้านพันธุกรรมของไวรัสที่ระบาดในท้องที่และใช้เป็นแนวทางในการสืบกลับถึงไวรัสต้นกำเนิดที่ทำให้เกิดโรคระบาด

ผล

การตรวจหาเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ โดยวิธี PCR จำนวน 15 ตัวอย่างให้ผล PCR product band เป็น positive ที่ตำแหน่ง 813 bp ชัดเจน ดังแสดงใน Figure 1

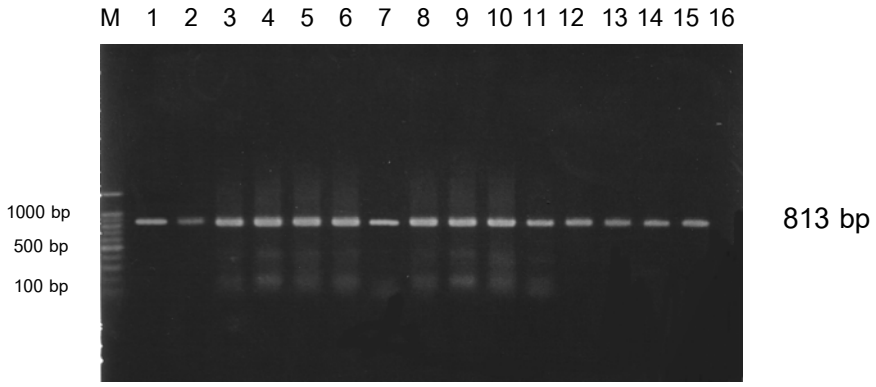


Figure 1 Analysis of Foot and Mouth Disease Virus field outbreak virus type A by PCR. The FMDV specific band is at 813 bp.

M = 100 bp DNA Ladder marker (Promega, USA).

No.1-15 = PCR product using 1C-612/NK61 primer set giving product band at 813 bp.

No.16 = Negative control (RNase-Free H_2O).

ผลการวิเคราะห์ nucleotide sequencing ในรูปของ phylogenetic tree พบว่าการระบาดของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด คือ Asia topotype เมื่อทำการเทียบผลกับ topotype อื่นๆ ที่เกิดขึ้นในประเทศต่างๆ โดยการเชื่อมโยงข้อมูลเข้ากับ GenBank ดังแสดงใน Figure 2

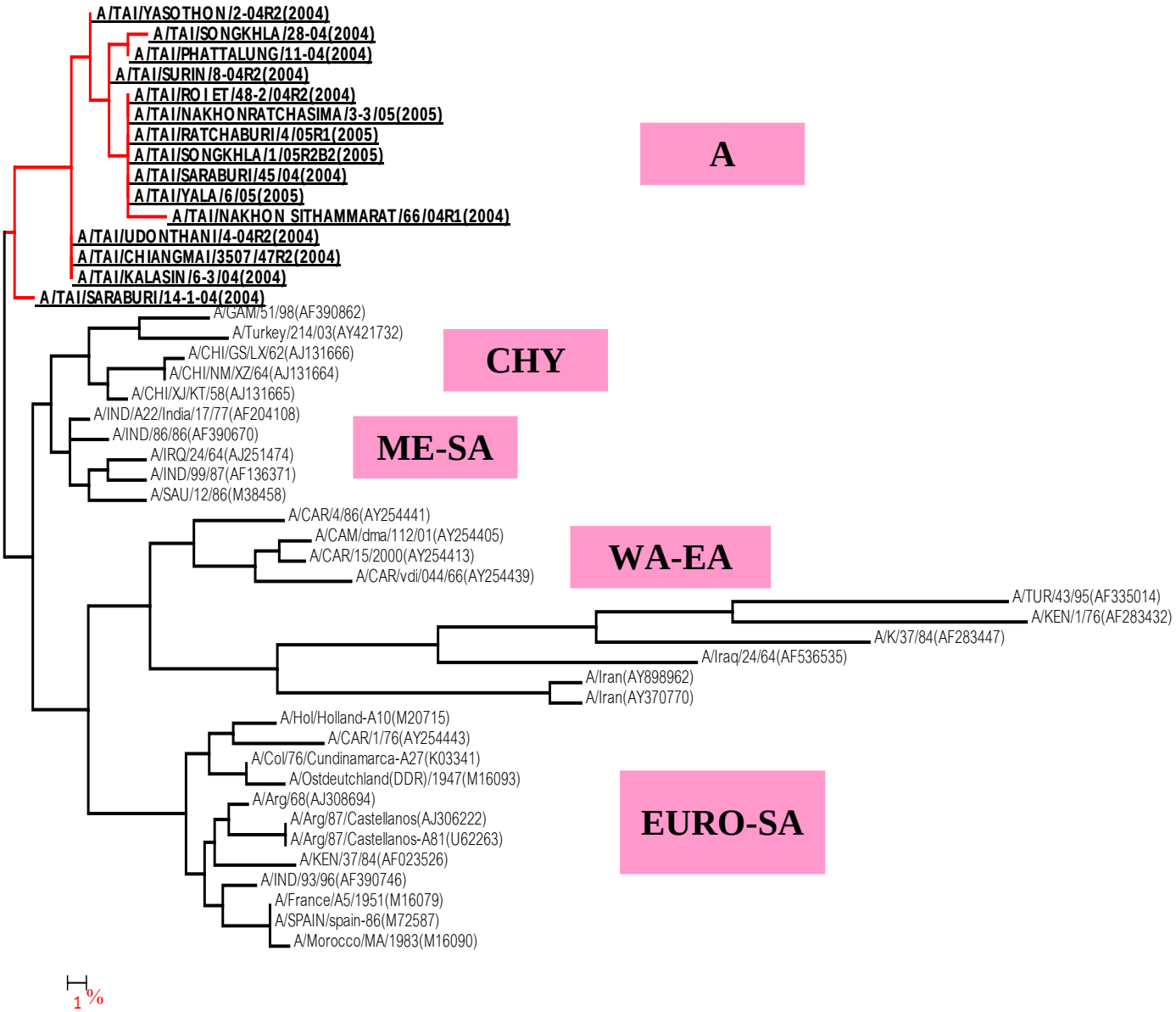
วิจารณ์

การนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ จากตัวอย่างเชื้อท้องที่ที่เกิดการระบาดในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย รวมทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยใช้ primer 1C-612/NK61 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไทป์เอ แล้วตรวจสอบผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าให้ PCR product band เมื่อเทียบกับ DNA มาตรฐานของ 100 bp DNA Ladder ที่ตำแหน่ง 813 bp ได้ชัดเจน (Knowles and Samuel, 1994) และพบว่าไม่มีการปนเปื้อนในขั้นตอนการทำ เนื่องจาก negative control ไม่มี product band เกิดขึ้น

จากการทำ nucleotide sequencing ของตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ เมื่อใช้ primer 1C-612, 1C-562, NK72 และ NK61 (Knowles and Samuel, 1998) เพื่อหาการเรียงลำดับเบสบนสาย cDNA ที่เป็น complete VP1 ทั้งสาย โดยใช้เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ แสดงผลในรูปกราฟของการเรียงลำดับเบส A, C, G และ T เมื่อใช้โปรแกรมวิเคราะห์สำเร็จรูป GENETYX-WIN version 4 (Software development, Tokyo, Japan) ในการทำ alignment ทำให้ได้ยีนในส่วนที่เป็น complete VP1 ของตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์เอ ซึ่งมีความยาวทั้งหมดเท่ากับ 636 nucleotide จากนั้นทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความต่างของ nucleotide ของเชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยแต่ละตัวอย่าง รวมทั้งตัวอย่างเชื้อไวรัสไทป์เอ ที่ระบาดในต่างประเทศบริเวณต่าง ๆ ทั่วโลก โดยนำข้อมูล sequence ทั้งหมดจาก GenBank มาทำการวิเคราะห์ในรูป phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004) เพื่อหาความแตกต่างในจำนวนกลุ่มของ nucleotide บน VP1 gene ของไวรัสแต่ละตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสที่เกิดการระบาดในท้องที่ ส่วนใหญ่ยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือในกลุ่มของ Asia topotype ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสไทป์เอ จำนวน 15 ตัวอย่าง ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี 2547-2548 ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรม โดยดูจากการวัดค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างของ nucleotide ของเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์นั้นมีเปอร์เซ็นต์ความต่างใกล้เคียงกันมากหรือเกือบจะไม่แตกต่างกันเลย แสดงว่ามีความเหมือนกันมาก หรืออาจจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน หากจะสืบกลับถึงไวรัสต้นกำเนิดที่ทำให้เกิดโรคระบาดในพื้นที่ช่วงปี 2547-2548 นั้น น่าจะมาจากเชื้อไวรัสตัวเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่พบว่าการระบาดของไวรัสในพื้นที่ มีสาเหตุหลักมาจากการเคลื่อนย้ายสัตว์ถึง 70 % (เอกสารไม่ได้ตีพิมพ์) จากการรายงานของ Knowles et al., 2005 เปอร์เซ็นต์ความต่างของ nucleotide สูงเกิน 15 % แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมมากและจัดเป็นไวรัสที่ต่าง topotype กัน

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอ ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี 2547-2548 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อยมาก และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด คือ Asia topotype ในขณะเดียวกันศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ ได้ส่งไวรัส ทั้ง 15 ตัวอย่าง ไปยังหน่วยงาน World Reference Laboratory เมือง Pirbright ประเทศอังกฤษ เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ sequencing พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน (เอกสารไม่ได้ตีพิมพ์) หากจะสืบกลับถึงไวรัสต้นกำเนิดที่ทำให้เกิดโรคระบาดในพื้นที่ในช่วงนั้นน่าจะเกิดจากไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งข้อมูลจาก phylogenetic tree นี้จะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการคัดเลือก seed virus สำหรับผลิตวัคซีนเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดแก่วงการปศุสัตว์ของประเทศไทย

Figure 2 Phylogenetic tree of FMD type A field outbreak in Thailand from 2004-2005 (Underline).



A = Asia, CHY = Cathay, ME-SA = Middle East-South Asia, WA-EA = West Africa-East Africa, EURO-SA = Europe-South America

สรุป

การนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และ nucleotide sequencing มาใช้ศึกษาและวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอ ที่ระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2547-2548 พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด คือ Asia topotype และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจวิเคราะห์จาก World Reference Laboratory เมือง Pirbright ประเทศอังกฤษ

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณ นายนิมิตร ไตรวนาธรรม ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการใช้เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ และขอขอบคุณ Nick J. Knowles และ Jean-Francois Valarcher, World Reference Laboratory เมือง Pirbright ประเทศอังกฤษ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจยืนยันผลการวิเคราะห์ nucleotide sequencing ในรูปของ phylogenetic tree และขอขอบคุณนางสาวรัตนีย์ จันทะดี ที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมสารและดำเนินการตรวจสอบทางด้าน PCR และ sequencing ตลอดจนการรวบรวมผล วิเคราะห์และสรุปผล

เอกสารอ้างอิง

Beck, E. and Strohmaier, K. 1987. Subtyping of european foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequencing determination. J. Virol. 61:1621-1629.

Jackson, T., King, A.M.Q., Stuart, D.I. and Fry, E. 2003. Structure and receptor binding. Virus Res. 91:33-46.

Knowles, N.J. and Samuel, A.R. 1994. Polymerase chain reaction amplification and cycle sequencing of the 1D (VP1) gene of foot and mouth disease viruses. In: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease. Vienna, Austria. 19-22 September. p. 45-53.

Knowles, N.J. and Samuel, A.R. 1998. RT-PCR and sequencing protocols of standards for the molecular epidemiology of exotic virus diseases of animal. Pirbright: Institute for Animal Health. p. 5-8.

Knowles, N.J., Samuel, A.R., Davies, P.R., Midgley, R.J. and Valarcher, J-F. 2005. Pandemic

strain of foot-and-mouth disease virus serotype O. Emerg. Infect. Dis. 11: 1887-1893.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform. 5:150-163.

Linchongsubongkoch, W., Janukit, T., Romlumdoan, S. and Phusirimongkol, A. 2000. The use of molecular biology techniques for the diagnosis and epidemiological study of foot and mouth disease virus in Thailand. Proceedings of a final Research Co-ordination meeting. IAEA TECDOC-1150:105-118.

Linchongsubongkoch, W. 2003. Recent characteristic of FMD virus in Thailand. Proceeding in the 11th international symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology. November 9-13. p.9-15.

Mason, P.W., Rieder, E. and Baxt, B. 1994. RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be by passed by an antibody-dependent enhancement pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:1932-1936.

McKenna, T.S., Lubroth, J., Rieder, E., Baxt, B. and Mason, P.W. 1995. Receptor-binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. J. Virol. 69:5787-5790.

Roeder, P.L. and LeBlanc Smith, P.M. 1987. Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay : a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. Res. Vet. Sci. 43: 225-232.

Thomson, G.R. 1994. Foot-and-mouth disease. In: Infectious disease of livestock with special reference to southern Africa. 2nd ed edited by Coetzer, J.A.W., Thomson, G.R., Tustin, R.C. and Kriek, N.P.J. Oxford University Press. Cape Town. p. 825-852.

Thongtha, P., Inoue, T., Janukit, T., Nuansrichay, B., Knowles, N.J., Kamolsiripichaiporn, S. and Linchongsubongkoch, W. 2003. Molecular epidemiology analysis of recent Thai isolates of foot and mouth disease virus type O (2001-2002). Proceeding in the 11th international symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology. November 9-13. p.68-69.

Weddel, G.N., Yasura, D.G., Dowbenko, D.J., Hoatlin, M.E., Grubman, M.J., Moore, D.M. and Kleid, D.G. 1985. Sequence variation in the gene for immunogenic capsid protein VP1 of foot and mouth disease virus type A. Proc Natl Acad. Sci USA. 82:2618-2622.

Molecular Epidemiology Analysis of Foot and Mouth Disease Virus Type A Field Outbreaks in Thailand During 2004-2005

Panithan Thongtha* and Wilai Linchongsubongkoch

Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, Pakchong, Nakhon Ratchasima 30130, Thailand

*Corresponding author Tel. 044-279112; Email-address: ekkpasang3dld@hotmail.com

ABTRACT

The Polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequencing technique have been used to study on molecular epidemiological analysis of type A foot and mouth disease viruses (FMDV) causing outbreak in Thailand during 2004-2005. Totally fifteen virus isolates were amplified the cDNA by PCR technique using specific primer 1C-612/NK61. The 813 bp PCR products band which specific to FMDV were shown clearly when compared to DNA standard (100 bp Ladder). The PCR products were sequenced at VP1 genomic region in order to study on molecular epidemiological analysis. The complete sequence of 636 bp VP1 genome from each virus isolate was compared and analyzed as phylogenetic tree. It was found that all of type A viruses were belonged to the Asia topotype. The molecular epidemiological information in this study is useful for tracing back to the original virus causing outbreak in the field and can be used to support the seed virus selection to enhance the efficacy of vaccine production.

Key words: FMDV, Molecular epidemiology, PCR, Sequencing