การศึกษาด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ ที่ระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2548 - 2550

ปณิธาน ทองทา* วิไล ลินจงสุบงกช รัตนีย์ ทองทา

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-4427-9112 โทรสาร 0-4431-48890 Email-address: ekkpasang3dld@hotmail.com

บทคัดย่อ

การนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และ nucleotide sequencing มาใช้ศึกษาและวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2548-2550 จากตัวอย่างไวรัสไทป์โอ 15 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผ่านการตรวจวินิจฉัยด้วย ELISA typing นำมาเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ specific primer 1C-609/NK61 ให้ PCR product ขนาด 816 bp นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุล โดยวิธี nucleotide sequencing เพื่อดูการเรียงลำดับเบสบนสาย cDNA ในส่วนของ VP1 gene จนได้ complete genome ที่มีความยาว 639 เบส ทำการวิเคราะห์ผลโดยแสดงในรูปของ phylogenetic tree พบว่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ที่ระบาดในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่ม Cathay topotype และ SEA topotype ซึ่งการศึกษาและวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลในครั้งนี้ นับว่าเป็นประโยชน์สำหรับการสืบกลับถึงไวรัสต้นกำเนิดที่ทำให้เกิดโรคระบาดในพื้นที่ และใช้สนับสนุนการคัดเลือก seed vaccine virus สำหรับผลิตวัคซีนให้มีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ระบาดวิทยาระดับโมเลกุล PCR Sequencing

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดสัตว์ที่สามารถติดต่อได้ง่ายและแพร่กระจายอย่างรวดเร็วในสัตว์เศรษฐกิจ ได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ (Thomson, 1994) ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในด้านอุตสาหกรรมปศุสัตว์ในประเทศไทย ไม่สามารถส่งสัตว์ไปยังต่างประเทศหรือในประเทศที่ปลอดจากโรคปากและเท้าเปื่อยได้ สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อไวรัสแอฟโทไวรัส (Aphthovirus) จัดอยู่ในกลุ่มพิคอร์น่าไวรัส (Picornavirus) มีขนาดเล็กมาก เป็น RNA สายเดี่ยว (single strand RNA) การระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยมีโอกาสที่จะเกิดจากเชื้อที่มีความแตกต่างกันทางคุณสมบัติด้านแอนติเจนและพันธุกรรม มีรายงานการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ (Udon and Linchongsubongkoch, 2006), Linchongsubongkoch et al. (เอกสารรอการตีพิมพ์) พบว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจน ส่วนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอ มีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางแอนติเจนมากกว่าไทป์อื่น ๆ และจากการศึกษาด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุล โดย Thongtha and Linchongsubongkoch (2006) พบว่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอ ที่ระบาดในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ.2547-2548 ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรม โดยดูจากการวัดค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับเบสในส่วน VP1 gene ของเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ความต่างกันน้อยมาก แสดงว่าอาจจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน หากจะสืบกลับถึงไวรัสต้นกำเนิดที่ทำให้เกิดโรคระบาดน่าจะมาจากเชื้อไวรัสตัวเดียวกัน

การศึกษาด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอในครั้งนี้ เป็นการศึกษาต่อเนื่องโดยใช้แนวทางจากการศึกษาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์เอ ที่ผ่านมา โดยวิธี nucleotide sequencing หาการเรียงลำดับเบสบนสาย cDNA ในส่วน VP1 gene เนื่องจาก VP1 gene มีความสำคัญในขบวนการยึดเกาะ กลไกการเข้าสู่เซลล์ รวมถึงความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อ (Jackson et al., 2003) และยังเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรค (Mason et al., 1994; McKenna et al., 1995) และการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ทางด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ที่ระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2548-2550 โดยแสดงผลในรูป phylogenetic tree ให้เห็นถึงกลุ่มพื้นที่ของการระบาด (topotype) ว่าจัดอยู่ในกลุ่มใด เนื่องจากไวรัสที่ระบาดในพื้นที่แต่ละครั้งนั้นมีโอกาสเกิดจากเชื้อที่มีคุณสมบัติทั้งด้านแอนติเจนและพันธุกรรมแตกต่างไปได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างเชื้อไวรัส

ตัวอย่างเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ จำนวน 15 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเชื้อท้องที่ที่เกิดการระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี 2548-2550 ซึ่งผ่านการตรวจจำแนกชนิดไวรัส ด้วยวิธี ELISA Typing ตามวิธีการของ Roeder and LeBlanc Smith (1987) นำมาผ่านลงใน BHK-21 cell จำนวน 2 passage ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2548-2550

Virus name	Sample code	Province	Region	Host species	Year
14/05	O/TAI/14/05	Songkhla	S	Cattle	2005
21/05	O/TAI/21/05	Kalasin	NE	Cattle	2005
$35/05B_2$	O/TAI/35/05	Nakhonphanom	NE	Pig	2005
53-2/05	O/TAI/53/05	Suphanburi	C	Pig	2005
64-1/05	O/TAI/64-1/05	Ratchaburi	W	Cattle	2005
$4/06R_1B_1$	O/TAI/4/06	Satun	S	Cattle	2006
25/06	O/TAI/25/06	Songkhla	S	Cattle	2006
70/06	O/TAI/70/06	Chiangmai	N	Cattle	2006
9-1/07	O/TAI/9-1/07	Khonkaen	NE	Buffalo	2007
12-2/07	O/TAI/12-2/07	Petchaburi	W	Cattle	2007
16/07	O/TAI/16/07	Phatthalung	S	Buffalo	2007
18/07	O/TAI/18/07	Udonthani	NE	Cattle	2007
24/07	O/TAI/24/07	Surat Thani	S	Cattle	2007
33/07	O/TAI/33/07	Nongbualumphu	NE	Cattle	2007
34-2/07	O/TAI/34-2/07	Nakhon Sithammarat	S	Cattle	2007

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

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

การแยกสกัด RNA

ตัวอย่างเชื้อไวรัสนำมาสกัด RNA โดยการใช้ reagent kit สำเร็จรูป ได้แก่ Trizol® LS reagent (Invitrogen™, USA) วิธีการและขั้นตอนตามข้อบ่งใช้ของผู้ผลิต

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Reverse Transcription (RT) เป็นขั้นตอนการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase มีวิธีการดังนี้คือ ในปฏิกิริยา 25 µl ประกอบด้วย 1X buffer, 1mM dNTPs (each), 10 mM DTT, 20 U RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 0.8 µM primer NK61 (Knowles and Samuel, 1998),

200 U M-MLV เอนไซม์ (Promega, USA), ตัวอย่าง RNA 10 µl และเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ให้ปริมาตรครบ 25 µl นำเข้าเครื่อง Thermal Cycler (Touch Down, UK) ตั้งโปรแกรมที่ 42ºC เป็นเวลา 60 นาที, 95 ºC เป็นเวลา 5 นาที

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ cDNA มีวิธีการดังนี้คือ ในปฏิกิริยา 50 µl ประกอบด้วย cDNA 10 µl, 200 µM dNTPs (each), 1X buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.4 µM primer 1C-609, 0.4 µM primer NK61, 2.5 U *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA) และเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ให้ปริมาตรครบ 50 µl นำเข้าเครื่อง Thermal Cycler (Touch Down, UK) โดยตั้งโปรแกรมที่ 94ºC เป็นเวลา 4 นาที 1 รอบ ทำขั้นตอน denaturation ที่ 94ºC เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่ 55ºC เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72ºC เป็นเวลา 1.5 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72ºC เป็นเวลา 5 นาที อีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยนำ PCR product มาแยกขนาดของ DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ผ่าน 1.2% agarose gel ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder (Promega, USA) จากนั้นย้อม DNA บน gel ด้วยสารละลาย ethidium bromide นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV trans-illuminator

Nucleotide Sequencing

เป็นการหาการเรียงลำดับเบสบนสาย cDNA ในส่วนของ VP1 gene เริ่มจากการนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, Germany) และนำมาติดฉลากด้วยสาร Big-Dye® terminator cycle kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) โดยมีวิธีการติดฉลากดังนี้คือ ในปฏิกิริยา 10 µl ประกอบด้วย PCR product 1 µl, Big-Dye® terminator cycle kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) 2 µl, 0.32 µM Primer และเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ให้ปริมาตรครบ 10 µl นำเข้าเครื่อง Thermal Cycler (Touch Down, 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 ทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยใช้ Centri-Sep™ columns (Applied Biosystems, USA) และทำให้แห้ง โดยใช้เครื่อง Vacuum Centrifuge จากนั้นละลายด้วย Hi Di formamide ปริมาตร 15 µl และนำเข้าเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (ABI 3130 Genetic Analyzer) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ต้องการตัดต่อให้ได้ complete VP1 ดังนั้นใน 1 ตัวอย่าง จึงแบ่งออกเป็น 3 ตัวอย่างย่อยกับการใช้ primer ทั้งหมด 3 primer ได้แก่ 1C-609, NK61 และ NK72

ตารางที่ 2 แสดง sequence primer ที่ใช้ในการทำ RT-PCR และ sequencing ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ

Primer designation	Primer sequence 5'-3'	Location	Product length (bp)
1C-609	TAGTGCTGGTAAAGACTTTGAGCT	1C	813-816
NK72	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC	2A	Universal primer
NK61	GACATGTCCTCCTGCATCTG	2B	Universal primer

การวิเคราะห์ผล nucleotide sequencing

อ่านผลการเรียงลำดับเบส A, C, G และ T บนสาย cDNA ในส่วน VP1 gene ที่มีความยาว 639 bp ทำการ alignment และวิเคราะห์ผล โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GENETYX-WIN version 4 (Software development, Tokyo, Japan)

การแสดงผล phylogenetic tree

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

ผล

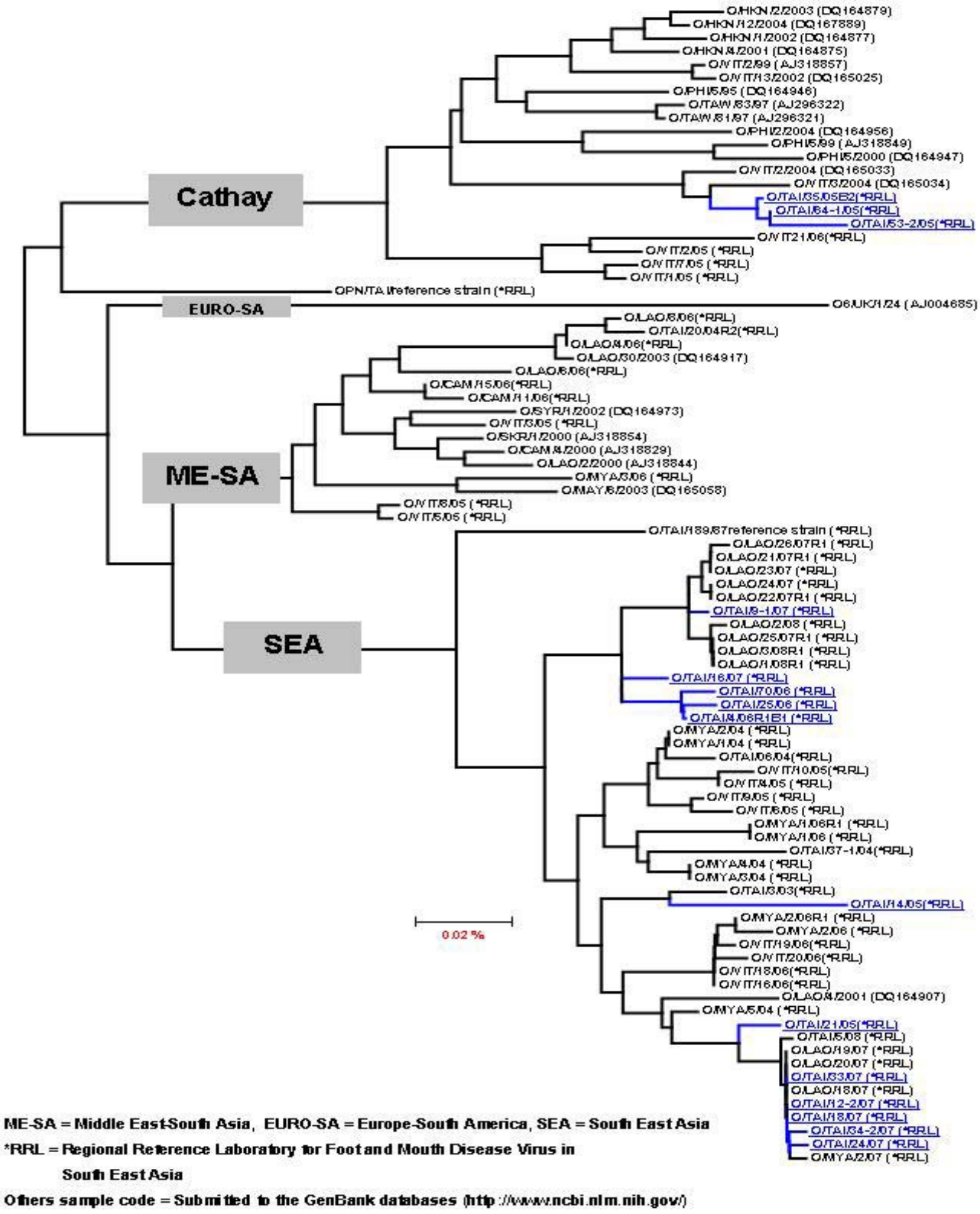
ผลการวิเคราะห์ nucleotide sequencing ในส่วนที่เป็น VP1 gene ซึ่งมีความยาวเท่ากับ 639 bp แสดงในรูปของ phylogenetic tree พบว่าการระบาดของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ จัดอยู่ในกลุ่ม Cathay topotype จำนวน 3 ตัวอย่าง และ SEA topotype จำนวน 12 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 1

วิจารณ์

การใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ จากตัวอย่างเชื้อท้องที่ที่เกิดการระบาดในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย รวมทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยใช้ primer 1C-609/NK61 จะได้ PCR product ขนาด 816 bp (Knowles and Samuel, 1994) เมื่อนำมาหาการเรียงลำดับเบสบนสาย cDNA และ alignment ในส่วนของ VP1 gene ของตัวอย่างทั้งหมด แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างเชื้อไวรัสไทป์โอ ที่ระบาดในต่างประเทศบริเวณต่าง ๆ ทั่วโลก โดยนำ

sequence ทั้งหมดมาจากฐานข้อมูลของ GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ทำการวิเคราะห์ในรูป phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004) เพื่อหาความแตกต่างในจำนวนกลุ่มของ nucleotide บน VP1 gene ของไวรัสแต่ละตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของไวรัสไทป์โอ ที่เกิดการระบาดในท้องที่ จัดอยู่ในกลุ่ม Cathay topotype จำนวน 3 ตัวอย่าง และ SEA topotype จำนวน 12 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าไวรัสไทป์โอ ที่ระบาดในประเทศไทยเกิด topotype ใหม่ คือ Cathay topotype ซึ่งกลุ่มพื้นที่ของการระบาดเดิมจะอยู่ที่ประเทศฮ่องกง ไต้หวัน เวียดนาม และฟิลิปปินส์ สาเหตุอาจเกิดจากการเคลื่อนย้ายสัตว์จากพื้นที่ของการระบาดเข้ามาในพื้นที่ตามแนวชายแดนประเทศ โดยไม่มีมาตรการการควบคุมที่เคร่งครัด (Sutmoller et. al., 2003) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่พบว่าการระบาดของไวรัสในพื้นที่มีสาเหตุหลักมาจากการเคลื่อนย้ายสัตว์ถึง 70% (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) และการระบาดของไวรัสในพื้นที่แต่ละครั้งมีโอกาสเกิดจากเชื้อไวรัสที่มีคุณสมบัติทั้งด้านแอนติเจนและพันธุกรรมแตกต่างจากเชื้อที่พบมาก่อน ข้อมูลจาก phylogenetic tree นี้จะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นแนวทางสำหรับการวางแผนป้องกันและควบคุมโรค สนับสนุนการคัดเลือก seed vaccine virus สำหรับผลิตวัคซีนเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด การผลิตวัคซีนที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพให้ความคุ้มกันและป้องกันโรคได้ตรงกับสายพันธุ์ของไวรัสที่ทำให้เกิดโรคระบาดนั้นเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งจากการศึกษาของ Udon and Linchongsubongkoch (2006) ได้ตรวจหาค่าความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา (r-value) กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน พบว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอทั้งหมด ให้ r-value มากกว่า 0.40 แสดงให้เห็นว่าวัคซีนสำหรับโรคปากและเท้าเปื่อยที่ใช้อยู่ในปัจจุบันยังมีประสิทธิภาพ สามารถครอบคลุมสายพันธุ์ของเชื้อที่เกิดการระบาดได้ และข้อมูล phylogenetic tree ยังเป็นประโยชน์ในการควบคุมป้องกันโรคระดับภูมิภาคในกลุ่มประเทศสมาชิก OIE ภายใต้โครงการ South East Asia foot and mouth disease control campaign รวมถึงโครงการความร่วมมือระหว่างประเทศ Bilateral multilateral project และโครงการนำเข้าสัตว์ชายแดน นอกจากนี้การมีมาตรการควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ที่เคร่งครัดโดยเฉพาะตามเขตแนวชายแดน การเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ทั่วประเทศด้วยการฉีดวัคซีน การสร้างเครือข่ายและส่งเสริมให้เกิดความร่วมมือ เพื่อแลกเปลี่ยนข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาเกี่ยวกับโรคปากและเท้าเปื่อยของประเทศต่าง ๆ ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันและควบคุมโรคในระดับภูมิภาคให้มีประสิทธิภาพได้

รูปที่ 1 Phylogenetic tree ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2548-2550 (ขีดเส้นใต้)



สรุป

การนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และ nucleotide sequencing มาใช้ศึกษาและวิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ ที่ระบาดในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2548-2550 พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม Cathay topotype และ SEA topotype และให้ผลเช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์จาก World Reference Laboratory เมือง Pirbright ประเทศอังกฤษ

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการใช้เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ และขอขอบคุณ Nick J. Knowles, Dr. Donald King และ Dr. David Paton, World Reference Laboratory เมือง Pirbright ประเทศอังกฤษ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจยืนยันผลการวิเคราะห์ nucleotide sequencing ในรูปของ phylogenetic tree

เอกสารอ้างอิง

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.

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

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.

NCBI [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). [Online]. Available : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

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.

Sutmoller, P., Barteling, S.S., Olascoaga, R.C. & Sumption, K.J. 2003. Control and eradication of foot-and-mouth disease. Virus Res. 91: 101-144.

Thongtha, P. and Linchongsubongkoch, W. 2006. Molecular Epidemiology Analysis of Foot and Mouth Disease Virus Type A Field Outbreaks in Thailand During 2004-2005. Thai-NIAH eJournal. 1 (1): 44-54. [Online]. Available : http://www.dld.go.th/niah/Publishing/eJournal/Index_v1n1.html

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

Udon, R. and Linchongsubongkoch, W. 2006. Antigenic variation of foot and mouth disease field isolates from Thailand and South East Asia region during 2004-2005. J. Thai Vet. Med. Assoc. 57(1): 15-23.

Molecular Epidemiology Analysis of Foot and Mouth Disease Virus Type O Field Outbreaks in Thailand during 2005-2007

Panithan Thongtha* Wilai Linchongsubongkoch Rattanee Thongtha

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

*Corresponding author Tel. 0-44-279112 Fax 0-4431-4889 Email-address: ekkpasang3dld@hotmail.com

ABSTRACT

Fifteen samples of foot and mouth disease virus field outbreaks in Thailand during 2005-2007 were tested by polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequencing. All samples were detected by ELISA typing and amplified of cDNA by PCR technique using specific primer 1C-609/NK61. The PCR product (816 bp) which is specific to FMDV was shown clearly in each sample. The PCR products were then sequenced at VP1 genomic region in order to study on molecular epidemiological analysis. The complete sequence of 639 bp VP1 genome from each virus isolate was compared and analyzed as phylogenetic tree. It was found that all of type O viruses belonged to Cathay topotype and SEA 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 vaccine virus selection to enhance the efficacy of vaccine production.

Key words: FMDV, Molecular epidemiology, PCR, Sequencing