

การวิเคราะห์ยีนโนอาร์เอ็นเอของเชื้อโรตาไวรัสสุกร

RNA Genome Analysis of Porcine Rotavirus

มลิวัลย์ ชูณอนอม¹

Maliwan Choontanom

ABSTRACT

The 12 positive porcine rotavirus of fecal specimens from Nakhon Pathom, Chachoengsao, Chon Buri and Ratchaburi tested by direct electron microscopy (EM) and enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) methods, were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). RNA genome showed long pattern of 11 segments. Their genome electropherotypes of the same province showed no difference. The differences were detected among samples from different provinces.

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ยีนโนอาร์เอ็นเอของเชื้อโรตาไวรัสในมูลสุกรป่วยด้วยอาการท้องเสีย จำนวน 12 ตัวอย่าง จาก 4 จังหวัด ได้แก่ นครปฐม ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และ ราชบุรี ซึ่งได้ตรวจดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยตรง และตรวจด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ไปแล้ว และนำมาตรวจยืนยันด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ลักษณะยีนโนมของอาร์เอ็นเอมี 11 segments เรียงเป็นชนิด long pattern อาร์เอ็นเอของเชื้อโรตาไวรัสจากจังหวัดเดียวกัน จะมีลักษณะการเรียงตัวคล้ายกัน แต่ที่ยิบระหว่างจังหวัดจะแตกต่างกัน

คำนำ

การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรตาไวรัส มีการพัฒนาวิธีการตรวจหลายวิธี เช่น Complement fixation test (Thouless *et al.*, 1977) Neutralization test (Beards *et al.*, 1980) ELISA technique (มลิวัลย์ และคณะ, 2529 และ Yolken *et al.*, 1978) ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยตรง (มลิวัลย์ และคณะ, 2529) และการตรวจวิธี Reverse passive haemagglutination (Beards *et al.*, 1984) แต่วิธีการเหล่านี้ ไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อ (serotype) ได้ ถึงแม้จะมีการนำเอาเชื้อมาเลี้ยงในเซลล์เลี้ยง ยังพบมีปัญหานี้เนื่องจากเชื้อบางสายพันธุ์เลี้ยงยาก (Beards and Flewett, 1984) ต่อมา

¹ หมวดยุสชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Microbiology Division, Dept. of Pathology, Faculty of Veterinary

Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

สามารถแสดง gene segments ได้ด้วยการสกัดแยกเอาส่วนของอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส โดยการทำให้ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ทำให้พบความแตกต่างของเชื้อโรตาไวรัสหลาย electropherotypes (Holmes, 1983) รูปแบบการเคลื่อนที่ของอาร์เอ็นเอใน PAGE ของโรตาไวรัสในคนมี 2 รูปแบบคือ long และ short pattern (Espejo *et al.*, 1979 และ Rodger *et al.*, 1981) ส่วนโรตาไวรัสในสัตว์พบชนิด long pattern เพียงอย่างเดียว (Beards, 1982)

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างมูลสุกรท้องเสียด้วยเชื้อโรตาไวรัส จากจังหวัดนครปฐม ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และ ราชบุรี ซึ่งได้ทำการตรวจวิธี ELISA และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จำนวน 12 ตัวอย่าง นำมาทดสอบหาลักษณะการเคลื่อนที่ของอาร์เอ็นเอ ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ตามวิธีของ Herring *et al.*, 1982 ; Rodger *et al.*, 1979 และ Sammon *et al.*, 1981 ซึ่งมีขั้นตอนพอสรุปได้ดังนี้คือ

1. การสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อโรตาไวรัส : นำตัวอย่างมูลสุกรมาผสมกับ dilution buffer (0.02 M Tris - HCl, 0.2 M NaCl, 0.04 M EDTA, 1.0% SDS) อัตราส่วน 1 : 1 แล้วนำมาสกัดแยกอาร์เอ็นเอด้วย saturated phenol อัตราส่วน 1 : 1 ปั่นแยกเก็บส่วนของเหลวมาสกัดอีกครั้งด้วย saturated phenol ผสม chloroform (1 : 1) อัตราส่วน 1 : 1 ปั่นเก็บส่วนของเหลวมาแยก phenol ที่ปนอยู่กับอาร์เอ็นเอด้วย ether ปั่นเอาส่วนของเหลวไปวิเคราะห์

2. วิเคราะห์การเคลื่อนที่ของอาร์เอ็นเอด้วย PAGE : นำส่วนของเหลวจาก 1 มาวิเคราะห์การ

เคลื่อนที่ของอาร์เอ็นเอ ด้วย 3% stacking gel และ 10% separating gel ใช้กระแสไฟ 20 mA นาน 3 ชั่วโมง

3. การย้อม gel ด้วยสารละลายเงิน (silver staining) นำ gel จาก 2 มาย้อมด้วย 11 mM silver nitrate และหยุดปฏิกิริยาการย้อมด้วย 5% acetic acid

ผล

มูลสุกรท้องเสีย 12 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างจาก 4 จังหวัด ในรูปจากขวาไปซ้าย จังหวัดนครปฐม ได้แก่ หมายเลข 1, 10 ; จังหวัดฉะเชิงเทรา หมายเลข 20, 41 43 ; จังหวัดชลบุรี หมายเลข 57, 58, 60 และจังหวัดราชบุรี หมายเลข 72, 73, 74, 78 เปรียบเทียบกับเชื้อโรตาไวรัสในเด็ก (HRV) 2 ตัวอย่างแรกซ้ายมือ ลักษณะอาร์เอ็นเอยีนอมของเชื้อโรตาไวรัสแยกได้เป็น 11 segments แบ่งการเคลื่อนที่ของยีนอมได้เป็น 4 กลุ่ม ประกอบด้วยยีนส์ 4, 2, 3 และ 2 segments ตามลำดับจากบนลงล่าง ในรูปแบบ “long pattern”

จากการตรวจดูลักษณะยีนอม พบมีความแตกต่างระหว่างยีนส์ segment ที่ 2, 3, 7, 8 และ 9 โดยพบว่าเชื้อโรตาไวรัสในมูลสุกรที่มาจากจังหวัดเดียวกัน จะมีลักษณะการเรียงตัวของอาร์เอ็นเอยีนอมใกล้เคียงกัน หรืออาจแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เช่น ตัวอย่างมูลสุกรหมายเลข 20, 41, 43 จากจังหวัดฉะเชิงเทรา มีอัตราการเคลื่อนที่ของอาร์เอ็นเอยีนอมใกล้เคียงกัน ยกเว้น segment ที่ 7, 8, 9 ของมูลสุกรหมายเลข 20 ก่อนข้างชิดกัน ต่างจากหมายเลข 41 และ 43 ส่วนตัวอย่างมูลสุกรหมายเลข 57, 60 จากจังหวัดชลบุรี ยีนส์ segment ที่ 7 และ 8 ชิดกัน ส่วนหมายเลข 72, 73, 74 จากจังหวัดราชบุรี ยีนส์ segment ที่ 8 และ 9 ชิดกัน เชื้อโรตาไวรัส

ในเด็กมีลักษณะยีนส์แยกเป็นกลุ่มคล้ายเชื้อโรตา มุล
สูตรหมายเลข 41, 43 แต่ต่างกันที่ยีนส์ segment
ที่ 2,3

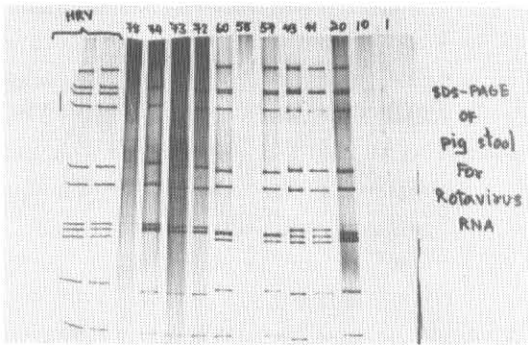


Figure 1. Electrophoretic patterns of rotaviral RNAs shown by silver staining of 10% polyacrylamide gels. Migration was from top to bottom. Two panels (from left) show human rotaviral RNAs. Panel 3 to 12 show porcine rotaviral RNAs.

วิจารณ์

การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรตาไวรัสด้วยวิธี PAGE เป็นการตรวจที่เสียค่าใช้จ่ายในการเตรียม reagents รวมทั้งอุปกรณ์ใช้ตรวจ มีราคาถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและ ELISA อีกทั้งยังสามารถแยกให้เห็นความแตกต่างของอาร์-เอ็นเอ ระหว่างชนิดของเชื้อไวรัสได้ โดยที่การตรวจวิธีอื่นไม่สามารถบอกได้

การเปรียบเทียบผลของการตรวจ มุลสูตรหมายเลข 1, 10, 58 และ 78 ให้รายละเอียดของลักษณะ ยีนส์น้อยหรือค่อนข้างจางมากในวิธี PAGE นี้ ซึ่งจากการตรวจเชื้อโรตาไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ก็ต้องใช้เวลาหาค่อนข้างนาน และใช้แอนติ-ซีรัมร่วมด้วย ผลของ ELISA ก็ให้เป็นผลบวกอย่างอ่อน (slightly positive) เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อโรตาไวรัส (negative sample) แต่ถ้าพิจารณา

ให้ดี ๆ โดยนำแผ่น gel ที่ได้วางบนพื้นสีดำ จะพบ ทั้ง 4 ตัวอย่าง แยกเป็น segments ของยีนส์ พอสังเกตได้ ที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะจำนวนเชื้อโรตาไวรัสมีไม่มาก ทำให้การสกัดแยกอาร์เอ็นเอของเชื้อได้จำนวนน้อยเช่นกัน

ฉะนั้นการตรวจวินิจฉัยการระบาดของโรตาไวรัส ซึ่งแต่ก่อนจำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และวิธีการยุ่งยาก และในขณะที่การเปลี่ยนแปลงเชื้อในเซลล์เลี้ยงค่อนข้างลำบาก การแยก serotype ก็เช่นกัน อย่างน้อยจะได้ใช้วิธี PAGE ซึ่งสามารถแยกได้ถึงยีนส์ของอาร์เอ็นเอของเชื้อได้ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาระบาดวิทยาของโรตาไวรัสระหว่างสัตว์ต่อสัตว์ และสัตว์ต่อคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเด็กเล็กที่อยู่ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ซึ่งมักมีแมลงวันจำนวนมาก ตอมมูลสัตว์ที่มีเชื้อโรตาไวรัส อาจมาตอมอาหารหรือหน้าตาเด็ก ยากที่จะหลีกเลี่ยงได้ จึงทำให้คาดว่า เชื้ออาจมีโอกาสปะปนกระจายในหมู่วัยเดียวกัน และอาจมาสู่คนได้เช่นกัน ซึ่งผู้ทำการทดลองมีความสนใจ ในการติดตามตรวจสอบสูตร รวมทั้งอุจจาระของผู้ที่อยู่หรือเกี่ยวข้องในฟาร์ม เพื่อหาข้อมูลละเอียดต่อไป

คำขอบคุณ

ภาควิชาไวรัสวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหา-วิทยาลัยมหิดล ที่ช่วยอนุเคราะห์เครื่องมือ electrophoresis ตลอดจนสถานที่ห้องปฏิบัติการและภาพถ่าย

เอกสารอ้างอิง

- มลิวัลย์ ชุนถนอม, เยาวภา พงษ์สุวรรณ 2529. การศึกษาเชื้อโรตาไวรัสที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคท้องเสียในสุกร สัตวแพทยสาร ปีที่ 37 เล่ม 4 ประจำเดือนธันวาคม หน้า 179 - 184.

- Beards, G.M. 1982. Polymorphism of genomic RNAs within rotavirus serotypes and subgroups. *Arch. Virol.* 74 : 65 - 70.
- Beards, G.M., A.D. Campbell, N.R. Cottrell, J.S.M. Peiris, N. Rees, R.C. Sanders, J.A. Shirley, H.C. Wood and T.H. Flewett, 1984. Enzyme linked immunosorbent assay based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. *J. Clin. Microbiol.* 19 : 248 - 254.
- Beards, G.M. and T.H. Flewett, 1984. Serological characterization of human rotaviruses propagated in cell culture. *Arch. Virol.* 80 : 231 - 237.
- Beards, G.M., J.M. Pilford, M.I. Thouless and T.H. Flewett, 1980. Rotavirus serotypes by serum neutralization. *J. Med. Virol.* 5 : 231 - 237.
- Espejo, R.T., E. Calderon, N. Gonzales and A. Solomon, 1979. Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City, 1977. *J. Infect. Dis.* 139 : 474 - 477.
- Herring, A.J., N.F. Inglis, C.K. Ojeh, D.R. Snodgrass and J.D. Menzies, 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16 : 473 - 477.
- Holmes, I.H., 1983. *The Reoviridae*. Plenum Publishing Co. New York. 359 - 423.
- Rodger, S.M., R.F. Bishop, C. Birch, B. Mclean and I.H. Holmes, 1981. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia from 1973 to 1976., as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid *J. Clin. Microbiol.* 13 : 272 - 278.
- Rodger, S.M. and I.H. Holmes, 1979. Comparison of the genome of simian, bovine and human rotaviruses by electrophoresis and detection of genome variation among bovine isolates. *J. Virol.* 30 : 839 - 846.
- Sammon, D.W. and L.D. Adams, 1981. Ultrasensitive silver - based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 2 : 135 - 141.
- Thouless, M.E., A.S. Bryden, T.H. Flewett and G.M. Woode, 1977. Serological relationships between rotaviruses from different species as studies by complement fixation and neutralization. *Arch. Virol.* 53 : 287 - 294.
- Yolken, R.H., R.G. Wyatt, G. Zisis and H.B. Greenberg, 1978. Epidemiology of human rotavirus type 1 and 2 as studied by enzyme linked immunosorbent assay. *New England J. of Med.* 299 : 1156 - 1161.