RESEARCH ARTICLE

Development of Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assays for Detecting and Subtyping Swine Influenza Viruses

Jinpanee Na nakorn[1,2], Porntippa Lekcharoensuk[3], Visanu Boonyawiwat[1,2,4], Wilairat Chumsing[4], Worawidh Wajjwalku[1,5*]

Abstract

Objective — To develop multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (m-RT-PCR) assays for simultaneous detecting and subtyping swine influenza viruses.

Materials and Methods — The specific primer set for M gene (M52C and M253R) of type A influenza virus was test with the specific primers for hemagglutinin gene [H1 (H1F/R) and H3 (H3F/R)] and neuraminidase gene [(N1 (N1F/R) and N2 (N2F/R)] subtypes to find the optimum condition for m-RT-PCR.

Results — The developed m-RT-PCR can detect the type A virus and simultaneously identify 2 hemagglutinins (H1 and H3) and 2 neuraminidases (N1 and N2) subtypes that are commonly isolated from swine in Thailand. The m-RT-PCR DNA products with unique sizes characteristic of each subtype of influenza A virus consisted of fragments of 1006 bp for H1, 663 bp for H3, 754 bp for N1, 502 bp for N2 and 244 bp for M gene of type A influenza virus.

Conclusion — These results demonstrate that the developed m-RT-PCR can use to detect and subtype swine influenza viruses, simutaneously. Moreover, this m-RT-PCR could detect type A influenza virus in various animals.

KKU Vet J. 2009;19(1):5-15 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Keywords: Influenza virus; Swine; Subtype; m-RT-PCR

[1]Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand 73140

[2]Center for Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE)

[3]Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900

[4]Department of Farm Resources and Production Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhon Pathom, Thailand 73140

[5]Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900

***Corresponding author** E-mail: fvetwww@yahoo.com

การพัฒนาวิธี Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction เพื่อตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์ย่อยของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร

จินต์ภาณี ณ นคร[1,2], พรทิพภา เล็กเจริญสุข[3], วิศณุ บุญญาวิวัฒน์[1,2,4], วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์[4],
วรวิทย์ วัชชวัลคุ[1,5*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธี multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (m-RT-PCR) สำหรับใช้ตรวจยืนยันชนิดและตรวจแยกสายพันธุ์ย่อยไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรได้ภายในขั้นตอนเดียว

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ชุดของไพร์เมอร์ที่เคยได้รับการเผยแพร่คือไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน M ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ คือ ไพร์เมอร์ M52C และ M253R ชุดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการแยกสายพันธุ์ย่อย HA คือ H1 (H1F/R) และ H3 (H3F/R) และชุดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการแยกสายพันธุ์ย่อย NA คือ N1 (N1F/R) และ N2 (N2F/R) ถูกนำมาศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการพัฒนา m-RT-PCR

ผลการศึกษา วิธีดังกล่าวสามารถตรวจยืนยันไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอได้ และสามารถจำแนกสายพันธุ์ย่อยของไวรัสที่มีโปรตีนฮีแมกกลูตินิน ชนิด H1 และ H3 และโปรตีนนิวรามินิเดส ชนิด N1 และ N2 ซึ่งเป็นไวรัสชนิดที่มีรายงานการตรวจพบได้ในสุกรในประเทศไทยได้ในเวลาเดียวกัน แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา m-RT-PCR ของยีนแต่ละชนิดจะมีขนาดไม่เท่ากัน ซึ่งจะประกอบไปด้วย H1 มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 1006 คู่เบส H3 มีขนาด 663 คู่เบส N1 มีขนาด 754 คู่เบส N2 มีขนาด 502 คู่เบส และยีน M มีขนาด 244 คู่เบส ซึ่งแสดงว่าไวรัสที่ตรวจสอบอยู่นั้นเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

ข้อสรุป ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธี m-RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจสอบการติดโรคไข้หวัดใหญ่สุกร และสามารถจำแนกสายพันธุ์ย่อยของไวรัสได้ ภายในขั้นตอนเดียว นอกจากนั้นวิธี m-RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจสอบการติดโรคจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในสัตว์ชนิดต่างๆ ได้อีกด้วย

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2552;19(1):5-15 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ: ไวรัสไข้หวัดใหญ่ สุกร สายพันธุ์ย่อย มัลติเพล็ก อาร์ที-พีซีอาร์

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[2]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา
[3]ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900
[4]ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[5]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900
***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail: fvetwww@yahoo.com

บทนำ

โรคไข้หวัดใหญ่สุกรเป็นโรคทางระบบหายใจในสุกร ทำให้มีไข้สูง อ่อนเพลีย น้ำหนักลด หายใจลำบาก มีน้ำมูก ไอและจาม ความรุนแรงขึ้นกับชนิดของเชื้อที่ได้รับ อายุ ภูมิคุ้มกันโรค สภาพการเลี้ยง ความเครียด และการติดเชื้อชนิดอื่นๆ แทรกซ้อน [1] โรคไข้หวัดใหญ่สุกรมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ซึ่งจัดอยู่ในตระกูล *Orthomyxoviridae* เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว มีเปลือกหุ้ม [2] เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถแบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยตามคุณสมบัติทางแอนติเจนของฮีแมกกลูตินิน (HA) มี 16 ชนิด และ นิวรามินิเดส (NA) มี 9 ชนิด โดยสายพันธุ์ย่อยที่พบในสุกรปัจจุบันคือ H1N1 H1N2 และ H3N2 [2] มีการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ย่อย H1N1 เป็นครั้งแรก ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาและเชื้อไวรัสได้แพร่กระจายไปยังประเทศต่างๆในภายหลัง [3] ส่วนสายพันธุ์ย่อย H1N2 พบว่ามีการระบาดทำให้เกิดโรคทางระบบหายใจในประชากรสุกรอย่างกว้างขวางในประเทศญี่ปุ่นและประเทศอังกฤษ [4, 5] และสายพันธุ์ย่อย H3N2 เป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดของโรคระบบทางเดินหายใจ และเกิดการแท้งในประชากรสุกรที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1998 [6] ยังไม่พบรายงานความเสียหายของสุกรจากการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรในประเทศไทย แต่จากการสำรวจทางเซรุมวิทยาสามารถพบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรทั้งสายพันธุ์ย่อย H1N1 และ H3N2 ได้ในแม่สุกรที่เลี้ยงในฟาร์มของประเทศไทย [7]

ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในห้องปฏิบัติการใช้วิธีการฉีดเชื้อลงในไข่ฟัก (embryonated chicken egg) หรือวิธีการเพาะเลี้ยงในเซลล์ Madin-Darby canine Kidney (MDCK) และตรวจแยกสายพันธุ์ โดยวิธี hemagglutination inhibition และวิธี neuraminidase inhibition test โดยใช้ monospecific antiserum ของแต่ละสายพันธุ์เป็นตัวทดสอบ [8] ถึงแม้ว่าวิธีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเป็นวิธีที่มีความไว แต่ต้องใช้ระยะเวลานานหลายวันเพื่อรอให้เซลล์เกิด cytopathic effect (CPE) ที่จะมองเห็นได้ชัดเจน และตัวอย่างส่งตรวจต้องมีไวรัสที่มีชีวิต จึงได้มีการพัฒนาการวินิจฉัยโดยใช้พื้นฐานของ nucleoprotein antigen เช่นวิธี immunofluorescent staining และ enzyme-linked immunororbent assays [9]

ในปัจจุบันมีชุดสำเร็จทางการค้าที่สามารถใช้ตรวจสอบหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสุกร ได้แก่ชุด antigen-capture ELISA (Directigen®, Becton-Dickinson, Spark, MD) ซึ่งผลิตขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในของเหลวที่เก็บได้จากลำคอ และจมูกของมนุษย์ อย่างไรก็ตามชุดทดสอบดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการตรวจโรคไข้หวัดใหญ่สุกรได้สำเร็จ หรือ specific antiserum ที่สามารถตรวจสอบในเนื้อเยื่อที่เก็บดองในฟอร์มาลินด้วยวิธี fluorescent antibody เป็นต้น วิธีการดังกล่าวทำให้เราสามารถทำการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ในสุกรได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น แต่วิธีการดังกล่าวไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสออกเป็นสายพันธุ์ย่อย เช่น H1N1 H1N2 และ H3N2 ได้ [10]

ความสามารถในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและข้อมูลของสายพันธุ์ย่อยที่พบนั้นมีความสำคัญมากต่อการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคในสุกร เช่นการเลือกใช้ชนิดของวัคซีนในการ

กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เนื่องจากมีหลักฐานยืนยันว่า ภูมิคุ้มกันต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ที่มีโปรตีนชนิด H1 ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ ที่มีโปรตีนชนิด H3 ได้ [10] นอกจากนั้น ข้อมูลความชุกของการระบาดของไข้หวัดใหญ่ในแต่ละสายพันธุ์ย่อยในสุกร ยังมีประโยชน์อย่างยิ่ง ในการเฝ้าระวังไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์และสัตว์ปีกในประเทศนั้นๆ เนื่องจากสุกรสามารถรับไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ทั้งจากสัตว์ปีกและมนุษย์ หรือเรียกได้ว่าสุกรเป็น 'mixing vessels' ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ [11] วิธี Reverse Transcription - polymerase chain Reaction (RT-PCR) ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ทดสอบหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในมนุษย์ [12] และในสุกร [13] จากนั้นมีรายงานการพัฒนาการตรวจแยกชนิดย่อยของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยการใช้เทคนิค multiplex RT-PCR โดยการรวมไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HA ไว้ด้วยกันในปฏิกิริยาหนึ่งและไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน NA ไว้ในอีกปฏิกิริยาหนึ่ง ซึ่งระบบดังกล่าวสามารถใช้ในการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ย่อย H1N1 H1N2 และ H3N2 จากตัวอย่างที่ผ่านการแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง สิ่งคัดหลั่งจากจมูก และเนื้อเยื่อของปอดได้สำเร็จ[10] รวมทั้งมีรายงานการพัฒนาวิธี multiplex RT-PCR โดยการรวมไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HA และ NA ไว้ในปฏิกิริยาเดียวกันได้สำเร็จ [14] แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีดังกล่าวไม่สามารถตรวจสอบแยกชนิดของไวรัส (เอ บี ซี) ร่วมกับการแยกสายพันธุ์ย่อยของเชื้อไวรัสได้ในขั้นตอนเดียวกัน จำเป็นต้องใช้วิธีการทดสอบอื่นๆ ร่วมเพื่อแยกชนิดของไวรัส

มีการพัฒนาวิธี RT-PCR ขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน matrix (M) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ทั้งในสุกร [15] ในม้า [16] และในสัตว์ปีก [17] นอกจากนั้นมีการพัฒนา multiplex RT-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน M ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ร่วมกับไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนส่วน nonstructural protein (NS) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี ทำให้สามารถตรวจยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ว่าเป็นชนิดเอ หรือ บี ได้ [18]

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ก็เพื่อพัฒนาวิธีการ multiplex RT-PCR assays ในการแยกตรวจยืนยันชนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ร่วมกับการตรวจแยกสายพันธุ์ย่อยของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในสุกรที่พบระบาดในประเทศไทยภายในขั้นตอนเดียว ซึ่งวิธีดังกล่าวจะทำให้การวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ในสุกรมีความสะดวกและรวดเร็วมากขึ้น รวมทั้งสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้ด้วย

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

เชื้อไวรัสตัวอย่าง

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ย่อย H1N1 และสายพันธุ์ย่อย H3N2 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไข้หวัดใหญ่ในสุกรที่พบได้บ่อยในประเทศไทย รวมทั้งสายพันธุ์ย่อย H5N1 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไข้หวัดนก ถูกใช้เป็นไวรัสอ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้ โดยมีรายละเอียดของตัวอย่างไวรัสอ้างอิงที่ใช้ในการทดลองนี้ **(Table 1)** ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสโดยเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MDCK

โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย 1 μg/ml TPCR treated trypsin และ 0.3% bovine serum albumin (Sigma) หลังจาก inoculation จะเก็บ flask ที่บรรจุเซลล์ที่มีไวรัสไว้ในตู้ CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37˚C นาน 48-72 ชั่วโมง จนสังเกตเห็นลักษณะของ CPE ที่เกิดขึ้น ทำการดูดเก็บเซลล์เพาะเลี้ยงพร้อมน้ำเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดใส่หลอด นำไปปั่นที่ 1,500 rpm นาน 5 นาที ดูดเก็บน้ำใสส่วนบนและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

Table 1. Reference Viruses Used in the Study

Reference Virus	Subtype	Source
A/SW/Thailand/KU7.2/04	H3N2	Chon Buri, Thailand
A/SW/Thailand/KU5.2/04	H3N2	Suphan Buri, Thailand
A/SW/Thailand/KU6.1/04	H3N2	Nakhon Pathom, Thailand
A/SW/Iowa/15/30	H1N1	Iowa, USA
A/chicken/Thailand/1-SPB/04	H5N1	Suphan Buri, Thailand

การสังเคราะห์ไพร์เมอร์

รายละเอียดชื่อ ลำดับเบส ความจำเพาะของไพร์เมอร์ต่อยีน และขนาดของ RT-PCR product (คู่เบส) ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ **(Table 2)** ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อ M ยีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ คือ ไพร์เมอร์ M52C และ M253R [17] ชุดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการแยกสายพันธุ์ย่อย HA คือ H1 (H1F และ H1R) และ H3 (H3F และ H3R) รวมทั้งสายพันธุ์ย่อย NA คือ N1 (N1F และ N1R) และ N2 (N2F และ N2R) [10] ไพร์เมอร์ทั้ง 5 คู่ได้สังเคราะห์ขึ้นโดย BioDesign Co., Ltd (Bangkok, Thailand) ไพร์เมอร์ทั้งหมดถูกทำให้ละลายใน Tris-EDTA (TE) buffer pH 7.4 โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 μM และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C จนกว่าจะนำไปใช้

การสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่แยกเก็บไว้ด้วย Trizol® (Invitrogen) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสจำนวน 500 μl เติม Trizol® (Invitrogen) 500 μl ผสมเบาๆให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม chloroform 200 μl เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปปั่นที่ 11,000 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4˚C แล้วย้ายส่วนใสไปยัง microcentrifuge tube ใหม่ แล้วเติม isopropanol ในปริมาตรเท่ากัน เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20˚C นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 11,000 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4˚C ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 500 μl ของ 75% Ethanol นำตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น เพื่อใช้ในการทำ RT-PCR และ multiplex RT-PCR ต่อไป

Table 2. Specific Primers for Influenza Virus Type A and Subtype Specific Target Gene Amplification by m-RT-PCR

Primer	Sequence (5′-3′)[a]	SIV Subtype/ Gene	Product Size (bp)	Source of Primers
H1F	GGG ACA TGT TAC CCA GGA GAT	H1	1006	[10]
H1R	GCA TTG TAT GTC CAA ATA TCC A	H1		
H3F	TAT GCC TGG TTT TCG CTC AA	H3	663	[10]
H3R	TTC GGG ATT ACA GTT TGT TG	H3		
N1F	GGT TCC AAA GGA GAC ATT TTT G	N1	754	[10]
N1R	CTA TCC AAA CAC CAT TGC CAT A	N1		
N2F	TGC GAT CCT GAC AAG TGT TAT C	N2	502	[10]
N2R	CAG ACA CAT CTG ACA CCA GGA T	N2		
M52	CCTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG	M	244	[17]
M253R	AGG GCA TTT TGG ACA AAK CGT CTA	M		

[a]Codes for mixed base positions : K=G/T

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำ One step RT-PCR

เพื่อต้องการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ One step RT-PCR ของแต่ละคู่ไพร์เมอร์ ดังตารางที่ 2 ก่อนที่จะนำไพร์เมอร์เหล่านั้นไปใช้ประกอบกันในวิธี Multiplex RT-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์เพียง 1 คู่ในแต่ละปฏิกิริยา และเปรียบเทียบอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ระหว่าง 53˚C และ 55˚C

ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 μl ประกอบไปด้วย 2x reaction mix (Invitrogen) จำนวน 12.5 μl ไพร์เมอร์ forward และ reverse ที่มีความเข้มข้น 10 pmol/μl อย่างละ 2.5 μl เอนไซม์ SuperScripTMIII RT/Platinum® Taq Mix (Invitrogen) จำนวน 0.5 μl และอาร์เอ็นเอ จำนวน 7μl โดยตั้งอุณหภูมิ cDNA synthesis ที่ 45˚C นาน 60 นาที ต่อด้วย pre-denaturation ที่ 94˚C นาน 10 นาที และต่อด้วย denature ที่ 94˚C นาน 30 วินาที annealing ที่ 53˚C หรือ 55˚C นาน 30 วินาที extension ที่ 72˚C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72˚C นาน 10 นาที ทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยเปรียบเทียบกับ standard DNA (DNA marker) โดยใช้ 1.0 % agarose gel เป็นตัวกลางในการทำ electrophoresis โดยผ่านสนามไฟฟ้าขนาด 100 volt นาน 30 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบขนาดภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV illuminator

การตรวจสอบอาร์เอ็นเอไวรัสด้วยวิธี Multiplex RT-PCR assays

แบ่งไพร์เมอร์ จำนวน 5 คู่ที่ใช้ในการศึกษาออกเป็นสองชุด ไพร์เมอร์ชุดแรกประกอบไปด้วยไพร์เมอร์ H1F H1R H3F และ H3R สำหรับยีน H และไพร์เมอร์ M52C และ M253R สำหรับยีน M

ส่วน ไพร์เมอร์ชุดที่สองประกอบด้วยไพร์เมอร์ N1F N1R N2F และ N2R สำหรับยีน N และไพร์เมอร์ M52C และ M253R สำหรับยีน M โดยในแต่ละชุดผสมรวมเข้าไปในปฏิกิริยาเดียวกัน

ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 μl ประกอบไปด้วย 2x reaction mix (Invitrogen) จำนวน 12.5 μl ไพร์เมอร์แต่ละเส้นที่มีความเข้มข้น 10 μMl อย่างละ 1 μl เอนไซม์ SuperScripTMIII RT/Platinum® Taq Mix (Invitrogen) จำนวน 0.5 μl และอาร์เอ็นเอ จำนวน 6 μl โดยตั้งอุณหภูมิ cDNA synthesis ที่ 45 ˚C นาน 60 นาที ต่อด้วย pre-denaturation ที่ 94 ˚C นาน 10 นาที และต่อด้วย denature ที่ 94˚C นาน 30 วินาที annealing ที่ 55˚C นาน 30 วินาที extension ที่ 72˚C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72˚C นาน 10 นาที ทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยเปรียบเทียบกับ standard DNA (DNA marker) โดยใช้ 1.0 % agarose gel เป็นตัวกลางในการทำ electrophoresis และใช้ 1xTA (Tris-actate) เป็น buffer ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของ PCR product โดยผ่านสนามไฟฟ้าขนาด 100 volt นาน 30 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบขนาดภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV illuminator

ผลการศึกษา

One step RT-PCR

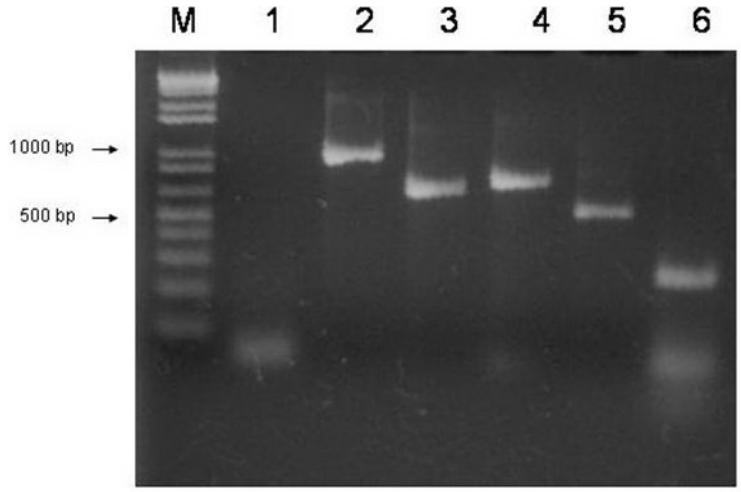
ใช้วิธี One step RT-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์แต่ละคู่ของยีน เพื่อที่จะทราบสภาวะที่เหมาะสมในการทำ One step RT-PCR โดยใช้ ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละชนิดแยกกันในแต่ละปฏิกิริยาที่มีสภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 55˚C ปรากฏแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจนขนาด 1006 คู่เบส 663 คู่เบส 754 คู่เบส 502 คู่เบส และ 244 คู่เบส ของยีน H1 H3 N1 N2 และ M ตามลำดับ **(Figure 1)** โดยปฏิกิริยาในแถวที่ 2 4 และ 6 ใช้อาร์เอ็นเอตัวอย่างที่สกัดจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ย่อย H1N1 เป็นแม่แบบ และ แถวที่ 3 และ 5 ใช้อาร์เอ็นเอตัวอย่างที่สกัดจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกรสายพันธุ์ย่อย H3N2 เป็นแม่แบบ แต่พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาที่สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 53˚C น้อยกว่าเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 55˚C (ไม่ได้แสดงผล) จึงสรุปได้ว่าไพร์เมอร์ทุกคู่ที่ใช้ในการศึกษานี้ สามารถใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 55˚C ได้ ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลนี้ในการตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนา multiplex RT-PCR ต่อไป

Multiplex RT-PCR

จากการทดสอบตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ย่อย H1N1 H3N2 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไข้หวัดใหญ่ในสุกร และสายพันธุ์ย่อย H5N1 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไข้หวัดนก (Avian influenza) ด้วยวิธี multiplex RT-PCR พบว่าในปฏิกิริยาที่ผสมไพร์เมอร์ทั้ง 5 คู่ร่วมกันจะไม่เกิดแถบดีเอ็นเอใดๆแม้ว่าจะได้พยายามปรับปรุงสภาวะในการทำปฏิกิริยาแล้วก็ตาม (ไม่ได้แสดงผล) อย่างไรก็ตามเมื่อแยกการทำปฏิกิริยาออกเป็น 2 หลอด โดยในปฏิกิริยาหนึ่งผสมไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะต่อยีน M ร่วมกับ H (H1 และ H3) และ อีกปฏิกิริยาหนึ่งผสมไพร์เมอร์คู่ที่จำเพาะต่อยีน M ร่วมกับ N (N1 และ N2) เพื่อตรวจสอบในแต่ละตัวอย่าง พบว่าสามารถเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้

ดังแสดงผล **(Figure 2)** โดยสายพันธุ์ย่อย H3N2 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 663 คู่เบส 502 คู่เบส และ 244 คู่เบส (แถวที่ 2-3, 6-7 และ 8-9) สายพันธุ์ย่อย H1N1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1006 คู่เบส 754 คู่เบสและ 244 คู่เบส (แถวที่ 4-5) และสายพันธุ์ย่อย H5N1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบที่มีขนาด 754 คู่เบส และ 244 คู่เบส (แถวที่ 10-11) เท่านั้น นอกจากนั้นในกรณีที่มีการปรากฏขึ้นของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกรมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ย่อยในตัวอย่างเดียวกัน เช่น การผสมกันของสายพันธุ์ย่อย H1N1 และ H3N2 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1000 คู่เบส 663 คู่เบสและ 244 คู่เบส (แถวที่ 12) และ 754 คู่เบส 502 คู่เบส และ 244 คู่เบส (แถวที่13) จากผลที่ได้เราจะพบว่าไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน M สามารถทำให้มีการปรากฏขึ้นของแถบดีเอ็นเอขนาด 244 คู่เบส ในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธี multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบการปรากฏขึ้นของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในตัวอย่าง และสามารถตรวจแยกสายพันธุ์ย่อยของไวรัสที่มียีน HA ชนิดที่ 1 และ 3 และยีน NA ชนิดที่ 1 และ 2 ได้ในเวลาเดียวกัน

Figure 1. RT-PCR Assay



Lane M: DNA marker; lane 1: negative control; lane 2-6: primers specific for H1, H3, N1, N2 and M, respectively. RNA from influenza virus type A (H1N1) was amplified and loaded in lanes 2, 4 and 6; RNA from influenza virus type A (H3N2) was amplified and loaded in lanes 3 and 5.

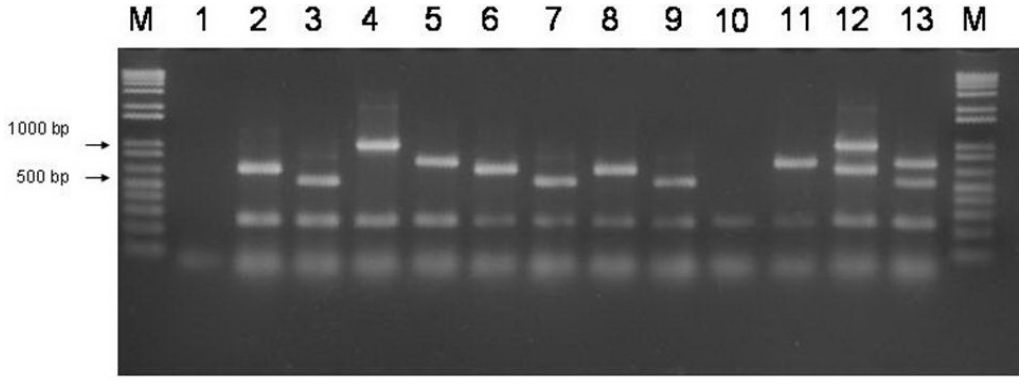
วิจารณ์

ในการศึกษานี้เราสามารถนำไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน M ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ คือ ไพร์เมอร์ M52C และ M253R ซึ่งพัฒนาโดย Fouchier และคณะ [17] มาปรับให้สามารถทำงานร่วม

กับชุดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการแยกสายพันธุ์ย่อย H1 H3 N1 และ ซึ่งพัฒนาโดย Choi และคณะ [10] ที่อุณภูมิ annealing และสภาวะเดียวกันได้สำเร็จ

วิธี multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้สามารถใช้ตรวจสอบแยกสายพันธุ์ย่อยของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในสุกรที่มีรายงานการพบได้ในประเทศไทยคือ สายพันธุ์ย่อย H1N1 H1N2 หรือ H3N2 ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ โดยการใช้ ไพร์เมอร์ 2 ชุด คือจากชุดยีน H (H1 และ H3) และ ชุดยีน N (N1 และ N2) นอกจากนั้นวิธีการตรวจสอบนี้ยังสามารถตรวจสอบยืนยันชนิดของของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ได้จากคู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน M ได้ในขั้นตอนเดียวกัน โดยที่ไพร์เมอร์คู่นี้ได้มีการตรวจสอบยืนยันแล้วว่าไม่มีลำดับเบสที่เหมือนกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดใด ที่มีรายงานใน GenBank [17] จากคุณสมบัตินี้ทำให้เรามีข้อมูลมากขึ้นเพื่อใช้ในการเฝ้าระวังการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ที่มีฮีแมกกลูตินินโปรตีนหรือ นิวรามินิเดสโปรตีนชนิดอื่นนอกเหนือจาก H1 H3 N1 และ N2 ตามลำดับ ตัวอย่างเช่น จากการทดลองของสายพันธุ์ย่อย H5N1 จะพบแค่แถบดีเอ็นเอในตำแหน่งของยีน M และ N1 เท่านั้น แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน H ขึ้น จากผลการตรวจครั้งนี้แสดงว่าเชื้อไวรัสที่นำมาตรวจสอบเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ แต่ยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ย่อยได้ จำเป็นต้องใช้วิธีการตรวจสอบอื่นเพื่อยืนยันต่อไป นอกจากนั้นวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบหาการแพร่กระจายตัวของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในสัตว์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีหลักฐานที่บ่งว่าเชื้อไข้หวัดนกสามารถติดต่อสู่สัตว์ชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่เจ้าบ้านโดยธรรมชาติได้ [11,19]

Figure 2. Detecting and Subtyping of Type A Influenza Virus by Multiplex RT-PCR Assay



Lane M: DNA marker; lane 1: negative control: lane 2, 4, 6, 8, 10 and 12:H3N2 (A/SW/Thailand/KU7.2/04), H1N1 (A/SW/Iowa/15/30), H3N2 (A/SW/Thailand/KU5.2/04), H3N2 (A/SW/Thailand/KU6.1/04), H5N1 and both H1N1 and H3N2 with H1, H3 and M primers; lane 3, 5, 7, 9, 11 and 13: H3N2 (A/SW/Thailand/KU7.2/04), H1N1 (A/SW/Iowa/15/30), H3N2 (A/SW/Thailand/KU5.2/04), H3N2 (A/SW/Thailand/KU6.1/04), H5N1 and both H1N1 and H3N2 with N1, N2 and M primers.

อย่างไรก็ตามวิธี multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นยังต้องใช้การทดสอบสองปฏิกิริยา (หลอด) ต่อหนึ่งตัวอย่างอยู่ กล่าวคือต้องทำปฏิกิริยาแยกกันระหว่างชุดไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน HA กับปฏิกิริยาของชุดไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน NA ในการศึกษานี้ได้มีการทดลองที่รวมไพร์เมอร์ทั้ง 5 คู่เข้าไปในปฏิกิริยาเดียวกัน แต่ผลปรากฏว่าไม่เกิดการสร้างแถบดีเอ็นเอใดๆ (ไม่ได้แสดงผล) ผลดังกล่าวอาจเกิดจากการไม่เข้ากันของชิ้นส่วนไพร์เมอร์ ซึ่งส่งผลให้เกิดไพร์เมอร์ -ไดเมอร์ในปฏิกิริยาและส่งผลกระทบในเชิงลบต่อการสร้างผลผลิตดีเอ็นเอ [20] หรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเช่น ความเข้มข้นของไพร์เมอร์ที่จำเพาะของแต่ละยีน ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในปฏิกิริยา RT-PCR และความเข้มข้นที่ไม่สมดุลกันของ แมกนีเซียม คลอไรด์ และ ดีออกซีนิวคลิโอไทด์ เป็นต้น [21] ซึ่งเป็นสิ่งที่ควรศึกษาและปรับสภาวะของ m-RT-PCR ต่อไปเพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบที่สะดวกยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

1. Easterday BC, Hinshaw VS. Swine influenza A. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D' Allaire SD, Taylor DJ, eds. *Diseases of Swine.* Ames: Iowa State Press; 1992. p. 349-57.
2. Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Reserch.* 2002;85: 199-210.
3. Robert DH, Cartwright SF, Wibberley G. Outbreaks of classical swine influenza in pigs in England in 1986. *Vet Rec.* 1987;121:53-55.
4. Brown IH, Chakraverty P, Harris P, Alexander D. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. *Vet Rec.* 1995;136:328-329.
5. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol.* 1998;72:7367-73.
6. Webby RJ, Senne DA, Krauss SL, Gerrish PJ, Webster RG. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol.* 2000;74:8243-8251.
7. วรวิทย์ วัชชวัลคุ, วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์, อรวรรณ์ บุตรดี, สิริลักษณ์ เจริญผล, สมเกียรติ พันธ์ธรรม, ชลลดา อานันท์รัตนกุล และคณะ. รายงานเบื้องต้นทางเซรุมวิทยาโรคไข้หวัดสุกรในฟาร์มสุกรในประเทศไทย. *การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 2.* 2548 หน้า 106 - 107.
8. Murphy BR, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology.* Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 1397-445

9. Takimoto S, Grandien M, Ishida MA, Pereira MS, Paiva TM, Ishimaru T, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence assay, and virus isolation for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions. *J Clin Microbiol.* 1991;29:470-474.
10. Choi YK, Joo H S. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J Virol Methods.* 2002;102:53-59.
11. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chamber TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992;56:152-179.
12. Bressoud A, Whitcomb J, Pourzand C, Haller O, Cerutti P. Rapid detection of influenza virus H1 by the polymerase chain reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;167: 425-430.
13. Schorr E, Wentworth D, Hinshaw VS. Use of polymerase chain reaction to detect swine influenza virus in nasal swab specimens. *Am J Vet Res.* 1994;55:952-956.
14. Lee CS, Kang BK, Lee DH, Lyou SH, Park BK, Ann SK, et al. One-step multiple RT-PCR for detection and subtyping of swine influenza H1, H3, N1, N2 viruses in clinical samples using a dual priming oligonucleotide (DPO) system. *J Virol Methods.* 2008;151:30-34.
15. Foni E, Chiapponi C, Fratta E, Garbarino C, Barigazzi G, Merenda M. Detection of swine influenza virus by RT-PCR and standard methods. *Proceeding of 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*; 2003 June 29-July 2; Rome. p. 270-271.
16. Quinlivan M, Cullinane A, Nelly M, Maanen KV, Heldens J, Arkins S. Comarison of sensitivities of virus isolation, antigen detection of Equine Influenza Virus *J Clin Microbiol.* 2004;42:759-763.
17. Fouchier RAM, Bestebroer TM, Herfst S, Kemp LVD, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. Detection of Influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the Matrix Gene. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4096-4101.
18. Poddar SK. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J Virol Methods.* 2002;99:63-70.
19. Kyoung CH, Park JH, Song MS, Oh TK, Kim SY, Kim CJ, et al. Development of Multiplex RT-PCR assays for rapid detection and subtyping of Influenza Type A Viruses from clinical specimens. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18:1164-1169.
20. Rachlin J, Ding CM, Cantor C, Kasif S. Computational tradeoffs in multiplex PCR assay design for SNP genotyping. *BMC Genomics.* 2005;6:102.
21. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques.* 1997;23:504-511.