เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2558; 13(2): 81-91

บทความต้นฉบับ

ลักษณะทางโมเลกุลของยีนเอสวันของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตซึ่งเพาะแยกเชื้อได้จากการระบาดในจังหวัดเชียงใหม่ของประเทศไทย

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง[1,2*] สุชีวา จันทร์หนู[1,2] สุวิทย์ โชตินันท์[3]

[1]กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีการป้องกันโรคในปศุสัตว์
[2]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[3]ภาควิชาคลินิคสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางโมเลกุลในยีนเอสวันของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่เพาะแยกเชื้อได้จากการระบาดในจังหวัดเชียงใหม่ของประเทศไทย เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อจำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บตัวอย่างได้จากไก่ป่วยที่แสดงอาการและรอยโรคของระบบทางเดินหายใจและไตในพื้นที่ของจังหวัดเชียงใหม่ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554 ผ่านการเพาะแยกเชื้อในไข่ไก่ฟักแล้วนำมาตรวจหายีนเอสวันซึ่งครอบคลุมส่วนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบย้อนกลับได้ผลผลิตขนาด 988 คู่เบส ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบย้อนกลับถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปถอดรหัสพันธุกรรม การวิเคราะห์ความเหมือนและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่เพาะแยกได้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่เคยพบในประเทศไทยกลุ่มที่ 2 ซึ่งมีความคล้ายกับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ QX เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของนิวคลีโอไทด์พบว่าระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่มีค่าร้อยละ 99.4-100 และระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่กับเชื้อต้นกำเนิดสายพันธุ์ QX ที่เพาะแยกได้จากประเทศจีนมีค่าร้อยละ 97.3-97.5 เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของกรดอะมิโนในยีนเอสวันพบว่าระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่มีค่าร้อยละ 98.8-100 และระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่กับเชื้อต้นกำเนิดสายพันธุ์ QX ที่เพาะแยกได้จากประเทศจีนมีค่าร้อยละ 95-96.9 ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตซึ่งเพาะแยกเชื้อได้จากการระบาดในจังหวัดเชียงใหม่ของประเทศไทยปี พ.ศ. 2553-2554 เป็นกลุ่มที่มีความคล้ายกับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธ์ QX และเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเล็กน้อยภายในยีนเอสวัน
เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2558; 13(2): 81-91

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ ยีนเอสวัน การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ผู้รับผิดชอบบทความ: ธวัชชัย โพธิ์เฮือง ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002 E-mail address: ptawat@kku.ac.th วันที่ได้รับบทความ 23 มิถุนายน 2558

บทนำ

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ (infectious bronchitis) เป็นโรคติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจที่มีการระบาดรวดเร็วและก่อความเสียหายรุนแรงอีกโรคหนึ่งของสัตว์ปีก ระยะฟักตัวของโรคสั้นมากสามารถพบอาการป่วยได้ภายใน 18-36 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อ (Cavanagh and Naqi, 2003) การเกิดโรคพบได้ทุกช่วงอายุแต่ไก่อายุน้อยมีอาการป่วยรุนแรงและอัตราตายสูงกว่าไก่อายุมาก (Animas et al., 1994) ไก่เนื้อที่เกิดโรคจะแสดงอาการอ้าปากหายใจ ไอ จาม หายใจมีเสียงครืดคราดในหลอดลมและมีน้ำมูก (Alvarado et al., 2006) ส่งผลให้การเพิ่มน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่ดี อัตราการตายมักสูงสุดในช่วง 2 สัปดาห์สุดท้ายของการเลี้ยงก่อนส่งโรงฆ่าคือช่วงอายุประมาณ 5-6 สัปดาห์และตายเนื่องจากมีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ไก่ที่ติดเชื้อแต่ไม่ตายอาจถูกคัดซากทิ้งที่โรงฆ่าเนื่องจากสภาพถุงลมอักเสบ (Cavanagh and Naqi, 2003; Ziegler et al., 2002) ไก่ไข่ที่ติดเชื้อนอกจากจะแสดงอาการของระบบทางเดินหายใจแล้วอัตราการไข่ยังลดลงอีกด้วยโดยอาจลดลงถึง 30% หรือมากกว่านี้ รวมทั้งมีผลทำให้เปลือกไข่ผิดรูป สีซีด และไข่ขาวมักเหลวเป็นน้ำ (Cavanagh and Naqi, 2003) เนื่องจากเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคนี้มีหลายสายพันธุ์และบางสายพันธุ์ทำให้เกิดรอยโรคที่ไต (nephropathogenic strain) ซึ่งทำให้ไก่ที่ติดเชื้อแสดงอาการซึม และถ่ายเหลวเป็นน้ำมียูเรตมากขึ้น (Dhinakar Raj and Jones, 1997) อัตราการตายมักสูงกว่าสายพันธุ์ที่ก่อโรคเฉพาะในระบบทางเดินหายใจ สำหรับความเสียหายที่ไตจะพบไตอักเสบ บวม และมีการคั่งยูเรตในท่อไต ซึ่งการเกิดโรคในลักษณะนี้พบได้ทั้งในไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พ่อแม่พันธุ์ (Ziegler et al., 2002)

เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อจัดอยู่ในสกุล *Coronavirus* วงศ์ *Coronaviridae* เป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอเส้นเดี่ยวและมีเปลือกหุ้ม (enveloped, single-strand ribonucleic acid [RNA] virus) มีรายงานว่าสามารถพบเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อนี้ได้มากกว่า 20 ซีโรไทป์ทั่วโลก (Gelb et al., 1991) เชื้อไวรัสประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิดคือ นิวคลีโอแคปสิดโปรตีน (nucleocapsid protein, N), เมมเบรนไกลโคโปรตีน (membrane glycoprotein, M) เอนเวลอปโปรตีน (envelope protein, E) และ สไปค์ไกลโคโปรตีน (spike glycoprotein, S) โดย S glycoprotein จะอยู่ที่ผิวของเชื้อไวรัส มีลักษณะเป็นปุ่มยื่นออกไป สามารถแยกได้เป็น 2 ส่วน (subunit) คือ S1 subunit และ S2 subunit ทั้งนี้ S1 subunit เป็นส่วนสำคัญที่กระตุ้นร่างกายให้มีการสร้าง hemagglutination-inhibition antibody และส่วนใหญ่ของ virus-neutralizing (VN) antibody โดยความแตกต่างของรูปแบบกรดอะมิโนบน S1 subunit ทำให้เชื้อมีหลายซีโรไทป์ (serotype) (Cavanagh et al., 1992; Cavanagh and Naqi, 2003) เพราะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง VN antibody ได้แตกต่างกัน (Cavanagh and Naqi, 2003) ใน S1 subunit นี้ยังประกอบด้วยส่วนที่มีความหลากหลายสูง (hypervariable region) ซึ่งเป็นส่วนที่มักพบว่ามีความแตกต่างกันในเชื้อแต่ละ serotype จึงเป็นส่วนที่นิยมใช้ในการแยกกลุ่มทางพันธุกรรมของเชื้อ (Kusters et al., 1989)

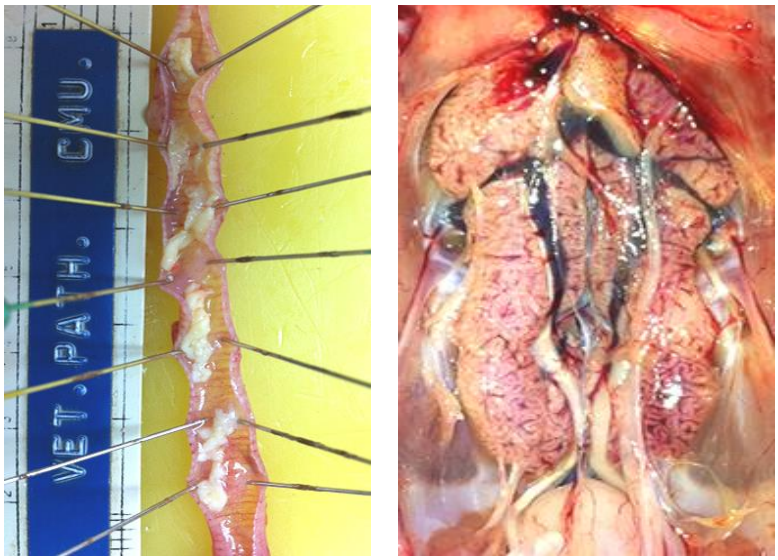
ในปัจจุบันมีการใช้วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่อย่างแพร่หลาย แต่ยังสามารถพบการเกิดโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ได้รับวัคซีน สาเหตุอาจเกิดจากเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ใหม่ซึ่งแตกต่างจากที่เคยมีรายงานหรือเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ทำให้ภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยวัคซีนไม่สามารถป้องกันโรคได้ จากผลการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลของเชื้อในปัจจุบัน ซึ่งส่วนใหญ่มักจะทำการวิเคราะห์ยีน S1 มากกว่ายีนอื่นๆ พบว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อเป็นเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างรวดเร็ว จึงทำให้เกิดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ใหม่อย่างต่อเนื่อง โดยพบรายงานการเกิดโรคของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ในหลายประเทศทั่วโลก (Gelb et al., 1991; Gough et al., 1992; Jia et al., 1995; Liu and Kong, 2004; Pohuang et al., 2009b) สำหรับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในประเทศไทยนั้น ได้มีรายงานการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมภายใน hypervariable region ของยีน S1 ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2541 จำนวน 1 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมส่วน hypervariable region ของยีน S1 แตกต่างไปจากเชื้อที่พบในประเทศอื่นๆ ที่มีรายงานใน GenBank database ในขณะนั้นจึงสรุปว่าเคยมีเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ใหม่ระบาดในประเทศไทย (Pohuang et al., 2009b) ต่อมาได้มีรายงานผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่ระบาดในปี พ.ศ. 2551 โดยวิเคราะห์ส่วนของยีน S1 ซึ่งครอบคลุม hypervariable region ด้วย ผลการศึกษาพบว่าเชื้อแยกได้นั้นแบ่งออกเป็น 2 genotype คือกลุ่มที่มีความเหมือนกับเชื้อที่แยกได้ในประเทศจีน กับกลุ่มที่เป็นเชื้อที่แยกได้เฉพาะในประเทศไทย และมีความใกล้เคียงกับเชื้อที่เคยแยกได้เมื่อ ปี 2541 (Pohuang et al., 2009a) ดังนั้นเพื่อให้สามารถเข้าใจ ถึงวิวัฒนาการของเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำ

การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมในยีน S1 ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่เพาะแยกเชื้อได้จากไก่ป่วยในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2553-2554 ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการป้องกันและการควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อไวรัส

ตัวอย่างท่อลมและไตจากไก่ป่วยจำนวน 5 ฟาร์มในเขตจังหวัดเชียงใหม่ (CMU1, CMU2, CMU3, CMU4 และ CMU5) ที่มีอาการของระบบทางเดินหายใจและมีรอยโรคท่อลมอักเสบและไตบวมในปี พ.ศ. 2553-2554 (รูปที่ 1) โดย CMU1 และ CMU2 เก็บตัวอย่างจากไก่ป่วยในเดือนเมษายนและพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2553 ตามลำดับ CMU3 และ CMU4 เก็บตัวอย่างจากไก่ป่วยในเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2554 และ CMU5 เก็บตัวอย่างจากไก่ป่วยในเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2554 นำชิ้นเนื้อมาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับเพาะแยกเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อโดยใช้ไข่ไก่ฟัก ตัวอย่างชิ้นเนื้อจะถูกบดแยกแต่ละฟาร์มแล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 (phosphate buffered saline; PBS pH 7.4) เพื่อทำให้เป็นสารละลายร้อยละ 10 (10% suspension) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 1,800 g เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรจะนำไปตรวจคัดกรองหาเชื้อด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบย้อนกลับ (reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR) สำหรับส่วนใสที่เหลือจะนำไปใช้เพาะแยกเชื้อในไข่ไก่ฟัก โดยการฉีดสารละลายเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน ทาง allantoic cavity จากนั้นนำไข่ไก่ฟักเข้าตู้ฟักไข่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วเก็บไข่ไก่ฟักในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง (Pohuang et al., 2009a) จากนั้นทำการเก็บ allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักแล้วนำไปฉีดเข้าไข่ไก่ฟักด้วยขั้นตอนดังกล่าวอีกหนึ่งครั้ง allantoic fluid ที่เก็บได้จากการฉีดเชื้อครั้งที่ 2 จะถูกนำไปใช้สำหรับหาลำดับพันธุกรรมของเชื้อต่อไป



รูปที่ 1 ท่อลมอักเสบและมีหนอง (ซ้าย) ไตบวมและมีการสะสมของยูเรต (ขวา)

การสกัดสารพันธุกรรมและปฏิกิริยา RT-PCR

ตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตรจะถูกนำไปทำการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Real Biotech, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต สารพันธุกรรมที่ได้จากการสกัดเข้าสู่ปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ AccessQuick™ RT-PCR System (Promega, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต สำหรับ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย primer ที่ใช้ในการตรวจคัดกรองหาเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบได้แก่ FOR2 (5´-CAG TGT TTG TCA CAC ATT GT-3´) และ RE2 (5´-CCA TCT GAA AAA TTG CCA GT-3´) ให้ขนาดผลผลิต 400 คู่เบส (Pohuang et al., 2009a) ส่วน primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมเพื่อหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ในยีน S1 ได้แก่ FOR23 (GCC AGT TGT TAA TTT GAA AAC) และ RE89 (TAA TAA CCA CTC TGA GCT GT) ให้ขนาดผลผลิต 988 คู่เบส (Pohuang et al., 2011) เริ่มเข้าสู่ปฏิกิริยา Reverse transcription ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส 45 นาที และที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้น

เข้าสู่ปฏิกิริยา PCR จำนวน 35 รอบ เพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที polymerization 72 องศาเซลเซียส 30 วินาทีและ final polymerization 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ผลผลิตจาก RT-PCR ที่ได้จะวิเคราะห์ผลด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide (0.5 ug/ml) แล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้อง ultraviolet transilluminator

การเตรียมผลผลิตจาก RT-PCR ให้บริสุทธิ์และการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์

ทำการตัดแยกแถบของผลผลิต RT-PCR จาก 1.2% agrose gel electrophoresis แล้วเตรียมผลผลิต RT-PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherrey-Nagel, Germany) นำผลผลิต RT-PCR ที่ผ่านการเตรียมให้บริสุทธิ์ส่งไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทเฟิร์สเบส ประเทศมาเลเซีย (First Base, Selangor, Malaysia)

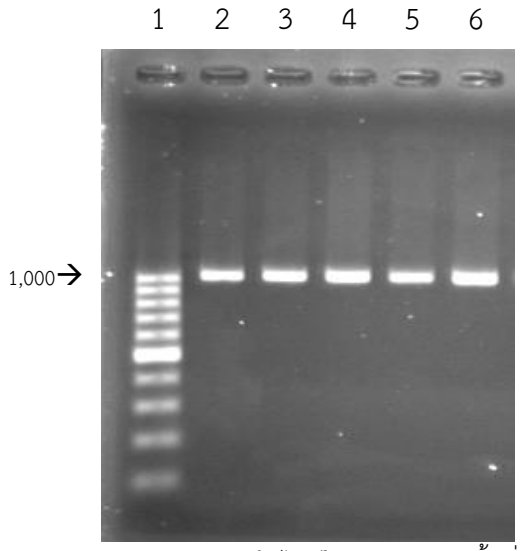
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่เพาะแยกได้กับยีน S1 ของสายพันธุ์ที่รายงานไว้ใน GenBank database โดยเปรียบเทียบร้อยละความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 (Hall, 1999) และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) ของเชื้อด้วยโปรแกรม MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011) ซึ่งยีน S1 ของสายพันธุ์ที่รายงานไว้ใน GenBank database ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ Ark_DPI (AF006624), JMK (L14070), Florida 18288 (AF027512), Connecticut (L18990), Ma5 (AY561713), M41 (AY561711), H120 (M21970), IBN (AAW83034), 4/91 (AF093794), UK/2/91 (Z83976), BJQ (DQ070839), QXIBV (AF193423), K069-01 (AY257061), LC2 (DQ480154), A2 (AY043312), SH (DQ480156), N1/62 (AIU29522), AustralianT (AY775779), Armidale (DQ490205), DLD Vaccine (EU589323), THA001(GQ906705), THA80151 (GQ503616), THA100151 (GQ503618), THA250152 (GQ885132), THA330352 (GQ885139), THA351052 (GU111581), THA20151 (GQ503610), THA40151 (GQ503612), THA50151 (GQ503613), THA60151 (GQ503614), THA90151 (GQ503617)

ผลการศึกษา

การตรวจหาเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อด้วยวิธี RT-PCR

ผลการตรวจคัดกรองหาเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อจากตัวอย่างท่อลมและไตของไก่ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าการวิเคราะห์ผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ตรวจพบผลผลิตขนาด 400 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ให้ผลบวกของวิธีการตรวจ ส่วนผลการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ที่ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่างในการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน S1 (รูปที่ 2) พบผลผลิตขนาด 988 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ให้ผลบวกของวิธีการตรวจ

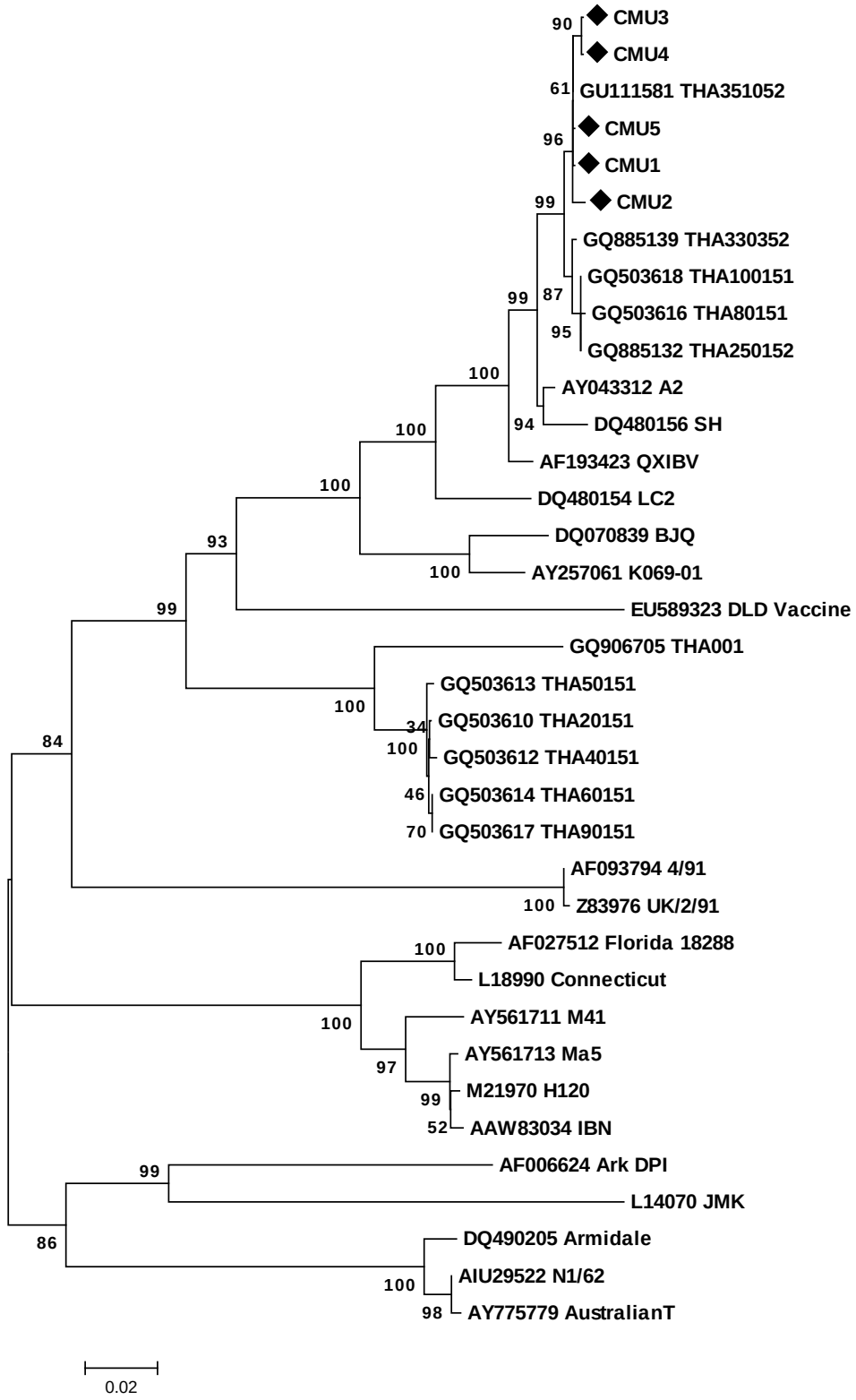


รูปที่ 2 ผลผลิตจาก RT-PCR สำหรับหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ในยีน S1 ของเชื้อที่แยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่ Lane 1, 100 bp marker; lane2-6, CMU1-CMU5 ตามลำดับ

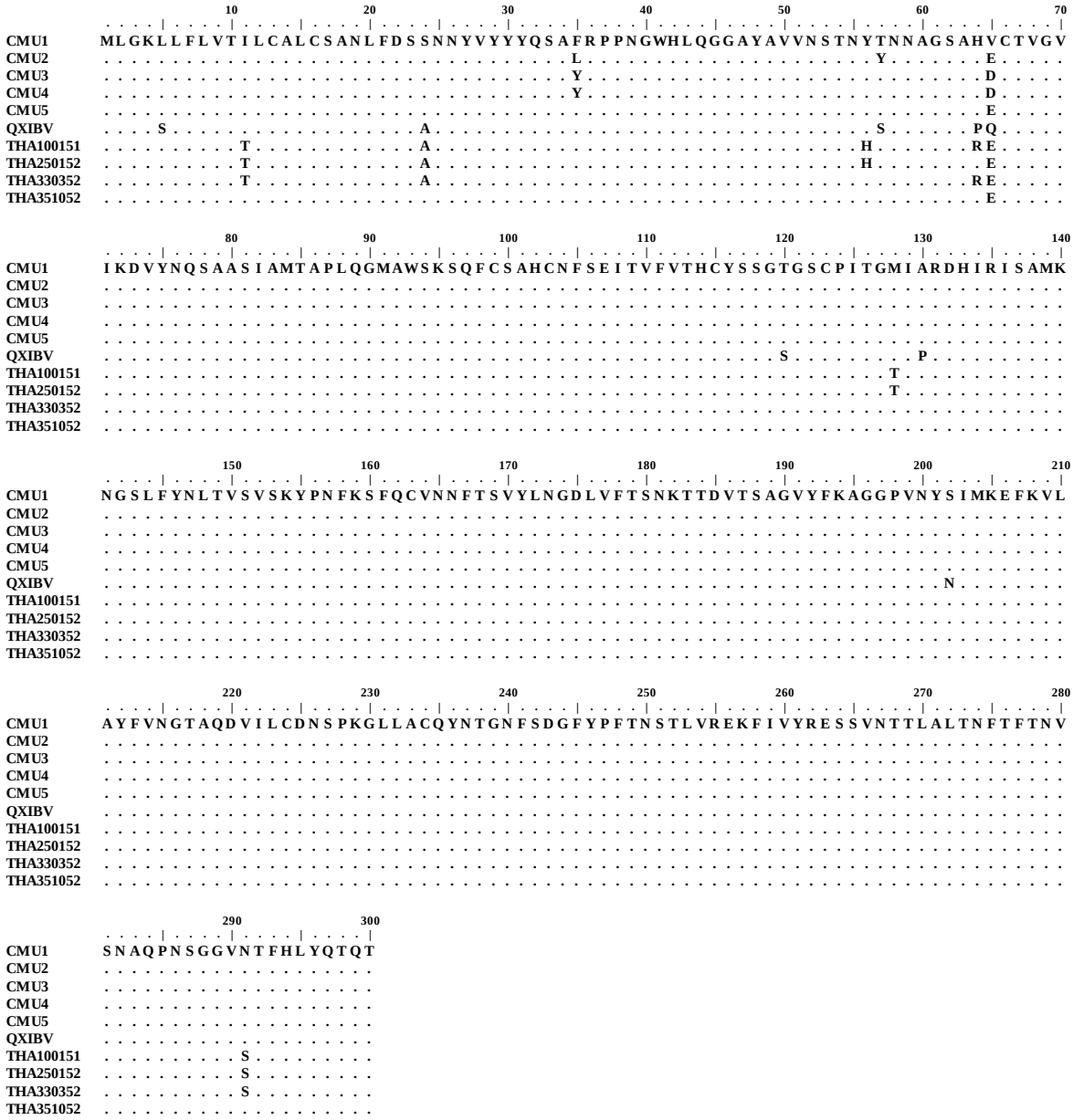
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การวิเคราะห์ความเหมือนและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (รูปที่ 3) พบว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่เพาะแยกได้จากไก่ป่วยในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2553-2554 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่พบในประเทศไทยกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความคล้ายกับเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ QX (QX-like IBV) ที่เพาะแยกได้จากประเทศจีน เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของนิวคลีโอไทด์พบว่าระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่มีค่าร้อยละ 99.4-100 ระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่กับเชื้อต้นกำเนิดสายพันธุ์ QX ที่เพาะแยกได้จากประเทศจีนมีค่าร้อยละ 97.3-97.5 และระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่กับเชื้อ QX-like IBV ในประเทศไทยมีค่าร้อยละ 98.8-100 เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของกรดอะมิโนในยีน S1 พบว่าระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่มีค่าร้อยละ 98.8-100 ระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่กับเชื้อต้นกำเนิดสายพันธุ์ QX ที่เพาะแยกได้จากประเทศจีนมีค่าร้อยละ 95-96.9 และระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่กับเชื้อ QX-like IBV ในประเทศไทยมีค่าร้อยละ 96.3-100

การเปรียบเทียบตำแหน่งของกรดอะมิโนในยีน S1 (รูปที่ 4) พบว่าระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่มีความแตกต่างกัน 3 ตำแหน่ง ได้แก่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 35, 57 และ 65 การเปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่กับเชื้อต้นกำเนิดสายพันธุ์ QX ที่เพาะแยกได้จากประเทศจีนพบความแตกต่างกัน 8 ตำแหน่ง ได้แก่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 5, 24, 57, 64, 65, 120, 130 และ 222 ส่วนการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่เพาะแยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่กับเชื้อ QX-like IBV ในประเทศไทยพบความแตกต่างกัน 7 ตำแหน่ง ได้แก่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 11, 24, 56, 64, 65, 128 และ 291



รูปที่ 3 phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน S1 ระหว่างเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่แยกได้จากไก่ป่วยในจังหวัดเชียงใหม่และสายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank database



รูปที่ 4 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนในยีน S1 ระหว่างเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่แยกได้จากไก่ป่วยในจังหวัดเชียงใหม่กับเชื้อต้นกำเนิดสายพันธุ์ QX ในประเทศจีนและ QX-like IBV ในประเทศไทย

วิจารณ์และสรุป

การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีน S1 เป็นวิธีการที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันสำหรับการวิเคราะห์และการแยกกลุ่มของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ เนื่องจากการแยกกลุ่มด้วยวิธีมาตรฐานทางซีรัมวิทยา (ซีโรไทป์) หรือ virus neutralization นั้นต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะสำหรับแต่ละซีโรไทป์ เมื่อใช้ตรวจแยกเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากซีโรไทป์ซึ่งมีแอนติบอดีที่จำเพาะอยู่ก็จะทำให้ไม่สามารถบอกซีโรไทป์ของเชื้อได้ (Keeler et al., 1998) วิธีการแยกกลุ่มโดยใช้ RT-PCR ที่มี primer จำเพาะ ในการเพิ่มจำนวนยีน S1 ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction fragment length polymorphism; RFLP) ก็เป็นวิธีที่มีรายงานการใช้ แต่มีบางกรณีพบว่าเชื้อบางซีโรไทป์ เช่น Gray กับ JMK มีรูปแบบของผลผลิตที่เกิดจากการตัดย่อยด้วยเอนไซม์แล้วเหมือนกัน ทำให้ไม่สามารถแยกซีโรไทป์ดังกล่าวออกจากกันได้ (Kwon et al., 1993) สำหรับการแยกกลุ่มโดยใช้การถอดรหัสและวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีน S1 นั้น มีรายงานทั้งการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์

ทั้งหมดของยีน S1 จำนวน 1720 คู่เบส (Huang et al., 2004) การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนที่เรียกว่า hypervariable region ซึ่งครอบคลุม hypervariable region I และ hypervariable region II ได้รับความนิยมจากนักวิจัยหลายท่าน โดยแต่ละรายงานใช้ขนาดของนิวคลีโอไทด์ที่ทำการวิเคราะห์แตกต่างกันไปได้แก่ 421 คู่เบส (Lee et al., 2001) 600 คู่เบส (Keeler et al., 1998) และ 706 คู่เบส (Gelb et al., 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วน hypervariable region I ซึ่งพบว่าสามารถแยกกลุ่มของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อได้สอดคล้องกับการแยกกลุ่มโดยใช้การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน S1 (Wang and Huang, 2000) แต่อย่างไรก็ตามการแบ่งกลุ่มโดยการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีน S1 อาจไม่สอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มทางซีรัมวิทยา ซึ่งสามารถพบได้ในกรณีที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยของยีน S1 ในตำแหน่งที่เป็น epitope แต่ไม่ได้ทำให้การตอบสนองทางซีรัมวิทยาเปลี่ยนแปลง เมื่อตรวจด้วยวิธี virus neutralization จะทำให้ตรวจพบเชื้อซีโรไทป์เดียวกัน แต่เมื่อทำการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์อาจทำให้ตรวจพบเชื้อคนละกลุ่ม (Ziegler et al., 2002) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีน S1 ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่แยกได้จากไก่ป่วยในจังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้ครอบคลุมทั้ง hypervariable region I และ hypervariable region II ดังนั้นส่วนของยีนที่ใช้จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์และสามารถแยกกลุ่มของไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อได้

ผลการแยกกลุ่มของเชื้อโดย phylogenetic tree พบว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่แยกได้จากไก่ป่วยในจังหวัดเชียงใหม่มีลักษณะทางพันธุกรรมในยีน S1 ใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์ QX ซึ่งเชื้อต้นกำเนิดสายพันธุ์ QX นั้นเพาะแยกได้จากประเทศจีน จากผลการวิเคราะห์พบว่ายีน S1 มีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนกับเชื้อต้นกำเนิดสายพันธุ์ QX ที่เพาะแยกได้จากประเทศจีนร้อยละ 97.3-97.5 และร้อยละ 95-96.9 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเล็กน้อยภายในยีน S1 เมื่อวิเคราะห์ตามข้อสรุปของ Kingham et al. (2000) ที่กล่าวว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่มีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ในยีน S1 น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 75 จัดเป็นเชื้อต่างซีโรไทป์กัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อสรุปของ Ziegler et al. (2002) ที่กล่าวว่าเชื้อสายพันธุ์ T, Holte, Gray, B1648 และ Bj1/01 มีความเหมือนของยีน S1 ร้อยละ 67.5-81.2 จัดเป็นเชื้อต่างกลุ่มกัน แสดงว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์ QX โดยในปัจจุบันเชื้อสายพันธุ์ QX ที่พบการระบาดในหลายประเทศทั่วโลก จะถูกเรียกว่า QX-like IBV เนื่องจากมีความแตกต่างทางพันธุกรรมไปบ้างจากเชื้อต้นกำเนิด (Beato et al., 2005; Bochkov et al., 2006; Gough et al., 2008) การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนแตกต่างไปเล็กน้อยจากเชื้อสายพันธุ์ QX ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตามมา จากรายงานของ Kant et al. (1992) พบว่าความแตกต่างของกรดอะมิโนในยีน S1 ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ D207 และเชื้อที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (variant) จากสายพันธุ์ D207 นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบส (base substitution) ภายในกรดอะมิโน โดยพบการเปลี่ยนแปลงของเบสหนึ่งตำแหน่งหรือมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนส่วนมากพบใน hypervariable region ของยีน S1 ทั้ง hypervariable region I ครอบคลุมกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 54-68 และ hypervariable region II ครอบคลุมกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 116-141 ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ก็พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าวเช่นเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบอาจส่งผลให้ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ QX-like IBV แตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ตามรายงานของ Benyeda et al. (2009) พบว่า ผลการศึกษาการก่อโรคของเชื้อ QX-like IBV ที่แยกได้จากประเทศจีน ฝรั่งเศส สโลวาเกีย กรีซ และฮังการี มีความรุนแรงไม่เท่ากัน โดยเชื้อที่ก่อโรครุนแรงน้อยที่สุดคือเชื้อที่แยกได้จากกรีซส่วนเชื้อที่ก่อโรครุนแรงที่สุดคือเชื้อที่แยกได้จากประเทศจีนซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อต้นกำเนิดที่สุด เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อเป็นเชื้อที่มีกลายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้มีเชื้อสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องทั่วโลก ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อเกิดจากกระบวนการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งพบได้บ่อยในเชื้อไวรัสที่มีพันธุกรรมเป็น RNA เนื่องจากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อเหล่านี้จะเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ซึ่งขาดคุณสมบัติของการตรวจพิสูจน์ความถูกต้อง (proofreading) ของการสร้างสายพันธุกรรม จึงทำให้สายพันธุกรรมที่สร้างขึ้นมาใหม่มีความแตกต่างไปจากเดิมได้ง่าย และเกิดเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ขึ้น (Lai and Holmes, 2001) กระบวนการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจทำให้เกิดการเปลียนแปลงเฉพาะ ตำแหน่งบนสายพันธุกรรม เช่น การเพิ่ม (insertion) หรือ การขาดหาย (deletion) ของนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่ง ส่งผลให้การสร้างกรดอะมิโนผิดปกติไปจากเดิม (Gelb et al., 1991; Gough et al., 1992; Jia et al., 1995) นอกจากนี้เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อยังเกิดการกลายพันธุ์ด้วยกระบวนการ recombination อีกด้วย กระบวนการ recombination เกิดขึ้นในกรณีที่มีการติดเชื้อไวรัส 2 สายพันธุ์ร่วมกันภายในเซลล์เดียว ขณะที่มีการสร้างสารพันธุกรรมนั้นเกิดการไขว้กันของสารพันธุกรรมของเชื้อ 2 สายพันธุ์นั้น ทำให้ RNA-

dependent RNA polymerase สร้างสายพันธุกรรมทั้งสองสายเชื่อมกัน (Tolskaya et al., 1987) ผลการศึกษาครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในยีน S1 ส่วนที่ทำการวิเคราะห์ซึ่งเป็นลักษณะของการเปลี่ยนแปลงเฉพาะตำแหน่ง

ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตซึ่งเพาะแยกเชื้อได้จากการระบาดในจังหวัดเชียงใหม่ของประเทศไทยปี พ.ศ. 2553-2554 เป็นกลุ่ม QX-like IBV และเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเล็กน้อยภายในยีน S1

References

Alvarado, I.R., Villegas, P., El-Attrache, J. and Jackwood, M.W. (2006). Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. Avian Diseases, 50(2), 299-297.

Animas, S.B., Otsuki, K., Hanayama, M., Sanekata, T. and Tsubokura, M. (1994). Experimental infection with avian infectious bronchitis virus (Kagoshima-34 strain) in chicks at diferrent ages. Journal of Veterinary Medical Science, 56(3), 443-447.

Beato, M.S., De Battisti, C., Terregino, C., Drago, A., Capua, I. and Ortali, G. (2005). Evidence of circulation of Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. Veterinary Record, 156, 720.

Benyeda, Z., Mato, T., Suveges, T., Szabo, E., Kardi, V., Abonyi-Toth, Z., Rusvai, M. and Palya, V. (2009). Comparison of the pathogenecity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. Avian Pathology, 38, 449-456.

Bochkov, Y.A., Batchenko, G.V., Shcherbakova, L.O., Borisov, A.V. and Drygin, V.V. (2006). Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. Avian Pathology, 35, 379-393.

Cavanagh, D., Davis, P.J. and Cook, J.K.A. (1992). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. Avian Pathology, 21, 401-408.

Cavanagh, D. and Naqi, S.A. (2003). Infectious bronchitis. Diseases of poultry 11th edition. Iowa, Iowa State Press.

Dhinakar Raj, G. and Jones, R.C. (1997). Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. Avian Pathology, 26, 677-706.

Gelb, J., Jr., Wolff, J.B. and Moran, C.A. (1991). Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. Avian Diseases, 35(1), 82-87.

Gough, R.E., Randall, C.J., Dagless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J. and Pearson, D. (1992). A 'new' strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. Veterinary Record, 130, 493-494.

Gough, R.E., Cox, W.J., Welchman, D., Worthington, K.J., Jones, R.C. (2008). Chinese QX strain of infectious bronchitis virus isolated in UK. Veterinary Record, 162, 99-100.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98.

Huang, Y.P., Lee, H.C., Cheng, M.C. and Wang, C.H. (2004). S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. Avian Diseases, 48(3), 581-589.

Jia, W., Karaca, K., Parrish, C.R. and Naqi, S.A. (1995). A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. Archive Virology, 140, 259-271.

Kant, A., Koch, G., Roozelaar, D.J., Kusters, J.G., Poelwijk, F.A.J. and van der Zeijst, B.A.M. (1992). Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopeptide. Journal of General Virology, 73, 591-596.

Keeler, C.L., Jr., Reed, K.L., Nix, W.A. and Gelb, J., Jr. (1998). Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S1) gene. Avian Diseases, 42, 275-284.

Kingham, B.F., Keeler, C.L., Jr, Nix, W.A., Ladman, B.S. and Gelb, J., Jr. (2000). Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S1 gene. Avian Diseases, 44, 325-335.

Kusters, G.J., Niesters, M.G.H., Lenstra, A.J., Horzinek, C.M. and van der Zeijst, M.A.B. (1989). Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. Virology, 169, 217-221.

Kwon, H.M., Jackwood, M.W., Brown, T.P. and Hilt, D.A. (1993). Polymerase chain reaction and a biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens. Avian Diseases, 37, 149-156.

Lai, M.M.C. and Holmes, K.V. (2001). Coronaviridae: the viruses and their replication. Fields virology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins.

Lee, C.W., Hilt, D.A. and Jackwood, M.W. (2001). Identification and analysis of the Georgia 98 serotype, a new serotype of infectious bronchitis virus. Avian Diseases, 45, 164-172.

Liu, S. and Kong, X. (2004). A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. Avian Pathology, 33, 321-327.

Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A. and Sasipreeyajan, J. (2009a). Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. Journal of Veterinary Science, 10, 219-223.

Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A. and Sasipreeyajan, J. (2009b). Pathogenesis of a new genotype infectious bronchitis virus isolated in chickens. The Indian Veterinary Journal, 86, 1110-1112.

Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A. and Sasipreeyajan, J. (2011). Sequence analysis of S1 genes of infectious bronchitis virus isolated in Thailand during 2008-2009: Identification of natural recombination in the field isolates. Virus Genes, 43(2), 254-260.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10), 2731-2739.

Tolskaya, E.A., Romanova, L.A., Blinow, V.M., Virtorova, E.G., Sinyakov, A.N., Kolesnikova, M.S. and Agol, V.I. (1987). Studies on the recombination between RNA genomes of poliovirus: the primary structure and nonrandom distribution of crossover regions in the genomes of intertypic poliovirus recombinants. Virology, 161, 54-61.

Wang, C.H. and Huang, Y.C. (2000). Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. Archive Virology, 145, 291-300.

Ziegler, A.F., Ladman, B.S., Dunn, P.A., Schneider, A., Davison, S., Miller, P.G., Lu, H., Weinstock, D., Slem, M., Eckroade, R.J. and Gelb, J., Jr. (2002). Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997-2000, Avian Diseases, 46,847-858.

Chiang Mai Veterinary Journal 2015; 13(2): 81-91

Original article

Molecular Characterization of S1 gene of Nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus Isolated from Disease Outbreaks in Chiang Mai Province, Thailand

Tawatchai Pohuang[1,2*], Sucheeva Junnu[1,2], Suwit Chotinun[3]

[1]Reseach Group of Preventive Technology in Livestock
[2]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002
[3]Department of Food Animal, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100

Abstract The purpose of this study was to determine the molecular characteristic in S1 gene of nephropathogenic infectious bronchitis virus (IBV) isolated from disease outbreaks in Chiang Mai, Thailand. Five field isolates of IBV were collected from chicken flocks which were suffering from respiratory and nephropathological symptoms and lesions in Chiang Mai province during 2010-2011. After propagation of the viruses in embryonated chicken eggs, 988 base pairs of the S1 gene covering a hypervariable region was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the purified RT-PCR products were sequenced. The homology and phylogenetic analysis showed that the isolates were grouped into group II Thai IBV, QX-like IBV. S1 gene of the isolates showed nucleotide identity of 99.4-100% with each other and 97.3-97.5% with original QXIBV. Analysis of the deduced amino acid sequences revealed that the isolates had 98.8-100% identity with each other and 95-96.9% with original QXIBV. These findings indicated that nephropathogenic IBVs isolated from field outbreaks in Chiang Mai, Thailand during 2010-2011 are the QX-like IBV and they have a minor change in their S1 gene. **Chiang Mai Vet J 2015; 13(2): 81-91**

Key Words: infectious bronchitis virus, S1 gene, phylogenetic analysis

Coresponding author: Tawatchai Pohuang, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 E-mail address: ptawat@kku.ac.th