



27 MAR 1990

STUDY ON MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF GENITAL HERPES
AND
DEVELOPMENT OF NUCLEIC ACID PROBES FOR DETECTION OF
HERPES SIMPLEX VIRUSES

WASUN CHANTRATITA

๗

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MICROBIOLOGY)

อภินันท์นาการ

จาก

นักศึกษาระดับปริญญาโท ๗ มีนาคม

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1989

Copyright by Mahidol University

13863

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาระบาดวิทยาของโรคเริ่มอวัยวะเพศในระดับโมเลกุล และการพัฒนาการตรวจหาเชื้อไวรัสเริ่มโดยใช้กรดนิวคลีอิกตรวจสอบ

ผู้วิจัย นาย วสันต์ จันทราทิพย์

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

1. นาง ชโลบล อยู่สุข, ประ.ด.
2. นาย พรชัย มาตังคสมบัติ, พ.บ., ประ.ด.
3. นาย สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา, ประ.ด.
4. นาย ปิเตอร์ บิลลิง, ประ.ด.
5. นางสาว กาญจนา ปาณิกบุตร, พ.บ.

วันที่สำเร็จการศึกษา 6 มิถุนายน พศ 2532

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของการศึกษานี้คือ ต้องการจัดจำแนกไวรัสเริ่มที่แยกได้จากอวัยวะเพศของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเริ่มในประเทศไทย โดยเกณฑ์การจัดจำแนกกลุ่มอาศัยตำแหน่งของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของไวรัส ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยกระแสไฟฟ้าให้เคลื่อนที่แยกกันตามขนาดบนแผ่นวุ้น ชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวได้มาจากการย่อยยีนโนมของไวรัสเริ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามชนิด คือ BamHI, KpnI และ EcoRI จำนวนและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสเริ่มที่แยกได้จากผู้ป่วยแต่ละรายขึ้นกับจำนวนตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนยีนโนมของไวรัสที่มีปรากฏขึ้นหรือสูญหายไป นอกจากนี้ลักษณะการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง Terminal และ Joint regions ของไวรัสยีนโนม ได้ถูกนำมาใช้ในการพิจารณาการจัดกลุ่มไวรัสเริ่มด้วย

โดยอาศัยเทคนิคดังกล่าวตรวจวินิจฉัยสิ่งส่งตรวจซึ่งพบว่ามีไวรัสเริ่มจำนวน 120 รอย จากสถานกามโรคบางรัก กองกามโรค กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร 114 ราย (95.0%) เป็นไวรัสเริ่มทัยป์ 2, 2 ราย (1.7%) เป็นทัยป์ 1, 3 ราย (2.5%) เป็นการติดเชื้อร่วมของไวรัสเริ่มทัยป์ 2 และ 1 ราย (0.8%) เป็นการติดเชื้อร่วมระหว่างทัยป์ 1 และ 2 และโดยอาศัยเกณฑ์การจัดจำแนก

กลุ่มข้างต้น สามารถแบ่งกลุ่มไวรัสเริ่มในประเทศไทยได้เป็น 25 กลุ่ม ซึ่งมีตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอหลังการเคลื่อนที่บนแผ่นวุ้นแตกต่างกัน และการกระจายของจำนวนสมาชิกในแต่ละกลุ่มพบว่าต่างจากประเทศอื่น

ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบเทคนิคการหัยป์ไวรัสเริ่ม ระหว่างการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะกับการใช้ โมโนโคลนัลแอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่อแต่ละหัยป์ของไวรัสเริ่ม โดยใช้ไวรัสเริ่มที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ 94 ราย ซึ่งสุ่มมาจาก 120 รายข้างต้น พบว่า การใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะให้ผลที่ดีกว่าการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี เนื่องจากสามารถบ่งชี้การติดเชื้อร่วมของไวรัสเริ่มในรายเดียวกันได้ แต่เมื่อใช้ โมโนโคลนัลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อหัยป์ ปรากฏว่าไม่สามารถบ่งชี้การติดเชื้อร่วมของไวรัสเริ่มได้ ผลสรุปได้เพียงว่า 2 ราย (2.1%) เป็นหัยป์ 1 และ 92 ราย (97.9%) เป็นหัยป์ 2

ขั้นตอนที่สองได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสเริ่มอย่างรวดเร็ว โดยการใช้ อาร์เอ็นเอตรวจสอบ ซึ่งเตรียมจากการถอดรหัสออกมาจากชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอ พาหะ pGEM3 ซึ่งเป็นทรานสคริปชันเวกเตอร์ อาร์เอ็นเอตรวจสอบ ซึ่งพัฒนามาจาก BamHI ชิ้นส่วน Q ของไวรัสเริ่มหัยป์ 1 สามารถไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอ ไวรัสเริ่ม ทั้งหัยป์ 1 และ 2 ในขณะที่ อาร์เอ็นเอตรวจสอบ ซึ่งพัฒนามาจาก EcoRI ชิ้นส่วน I และตัดซ้ำอีกครั้งด้วย HindIII และ PvuII สามารถไฮบริไดซ์ได้กับไวรัสเริ่มหัยป์ 1 เท่านั้น ผลการศึกษา โดยการใช้อาร์เอ็นเอตรวจสอบ ซึ่งเป็นชนิดที่ใช้ตรวจร่วมสำหรับไวรัสเริ่มทั้งสองหัยป์ และที่เป็นชนิดจำเพาะต่อหัยป์ 1 เท่านั้น ตรงกับการใช้ โมโนโคลนัล แอนติบอดี และการศึกษาโดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของไวรัส หลังการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ นอกจากนี้ อาร์เอ็นเอตรวจสอบดังกล่าวไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอของซัยโตเมกะโลไวรัส เอนสโตน์-บาร์ไวรัส เชื้ออีสุกอีใส-งูสวัด หรือซูโดเทอเรบัสไวรัสซึ่งอยู่ในแฟมิลีเดียวกัน

ขั้นตอนที่สามของการศึกษาได้พยายามเพิ่มความไวในการตรวจหาชิ้นของไวรัสเริ่มในระดับเซลล์เดียวโดยไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี ในขั้นตอนนี้ได้ทำการพัฒนาเทคนิค อินซิติวไฮบริไดซ์เซชัน โดยทำการติดฉลากสารไบโอดีนเข้ากับ ดีเอ็นเอสายคู่ของไวรัสโดยวิธีที่ใช้ไฟโตไบโอดีน การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้สามารถย่นระยะเวลาการตรวจหาไวรัสซึ่งเพาะเลี้ยงกับเซลล์ในหลอดทดลองได้ โดยสามารถตรวจพบสัญญาณภายในนิวเคลียส การติดฉลากสารไบโอดีน เข้ากับดีเอ็นเอสายคู่ด้วยวิธีนี้สามารถกระทำได้ง่ายไม่ยุ่งยากเหมือนการติดฉลากดีเอ็นเอสายคู่ด้วยวิธีนิคทรานสเลชัน ซึ่งใช้กันแพร่หลายในขณะนี้

Hospital, Ministry of Public Health, Bangkok, were analyzed. Results revealed that 114 (95.0%) were HSV-2, 2 (1.7%) were HSV-1, 3 (2.5%) mixed HSV-2 infection and 1 (0.8%) mixed HSV-1 and HSV-2 infection. According to the criteria used in the present study, the DNAs of Thai HSV-2 isolates were highly conserved and could be classified into 25 groups which have distinct RE cleavage patterns and distributions from isolates of other countries.

In order to verify a correlation of typing methods between RE analysis and tissue culture-fluorescent antibody staining (TC-FA) technique using type-specific monoclonal antibodies, 94 genital herpes isolates randomly selected from the 120 clinical isolates were used. Restriction endonucleases were apparently superior to monoclonal antibodies since they could also reveal identity of virus in mixed HSV populations. Type-specific monoclonal antibodies failed to distinguish identity of virus in mixed infection; they identified 2 (2.1%) and 92 (97.9%) of isolates as type 1 and type 2, respectively.

To rapidly detect and distinguish between the 2 types, a nucleic acid hybridization assay to identify clinical isolates of HSV was developed using *in vitro* synthesized, radioactively labeled RNA transcripts from HSV-specific DNA fragments cloned in transcription vector pGEM3. The RNA probe derived from the HSV-1 BamHI-Q DNA fragment hybridized strongly with HSV-1 and HSV-2, while the RNA probe derived from HSV-1 HindIII - PvuII DNA fragment

hybridized with HSV-1 DNA only. The results of HSV typing using both common and type-specific probes correlated well with typings by TC-FA and RE analysis. Neither of these probes bound to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, varicella zoster virus, nor pseudorabies virus DNA.

In order to increase the sensitivity of HSV detection and to detect the viral gene at a single cell level without use of radioisotope material, an in situ hybridization with Photobiotin-labeled double-stranded (ds) DNA probes prepared from HSV DNA was utilized. This assay provided an earlier detection of virus in cell culture by producing a signal at the site of virus replication, i.e., in the nucleus with an ease of preparation of Photobiotin-labeled ds DNA compared to biotinylated ds DNA using conventional nick translation.