รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2531

เรื่อง

การตรวจหาไวรัสของชะนีโดยวิธีจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

DETECTION OF GIBBON VIRUS BY ELECTRON MICROSCOPY

วัฒนา วัฒนวิจารณ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF GIBBON VIRUS BY ELECTRON MICROSCOPY

Wattana Wattanavijarn

ABSTRACT

BHK-21 and MA 104 cell line were examined by inverted, light and electron microscopes after inoculation with virus from ulcerated lips of the gibbons. Both cell lines were completely destroyed within 24 hours. Inclusion bodies in the cell nuclei, and typical herpesvirus were found in both cell lines.

Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri Dunant Street, Bangkok 10330.

การตรวจหาไวรัสของชะนีโดยวิธีจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

วัฒนา วัฒนวิจารณ์

พระมหากรุณาธิคุณ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทย่อ

ได้นำเซลล์เลี้ยง BHK-21 และ MA 104 มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หักลับแสงสว่าง และอิเล็กตรอน ภายหลังที่ได้เพาะเชื้อไวรัสจากแผลที่ปากของชะนี พบว่าเซลล์เลี้ยงถูกทำลายทั้งหมดภายในเวลา 24 ชั่วโมง มีอินคลูชันบอดีในนิวเคลียสของเซลล์ และพบลักษณะเฉพาะของ herpesvirus ในเซลล์เลี้ยงทั้งสองชนิด

บทนำ

เนื่องจากได้มีการนำลิงหลาย species มาใช้การวิจัยทางด้านการแพทย์ จึงได้มีการศึกษาโรคที่เกิดขึ้นในสัตว์เหล่านี้ ความรู้เรื่องการติดเชื้อ herpesvirus ในลิงได้ทราบกันมากขึ้นในระยะ 10-20 ปีมานี้เอง หลังจากที่ได้พบ B virus (Herpesvirus simiae หรือ Herpes-B) ในปี ค.ศ.1934 Sabin และ Wright ได้แยกเชื้อไวรัสจากสมองของคนไข้ที่ตายโดยถูกลิงรีซัส (Macaca mulatta)กัด การติดเชื้อ herpesvirus ในลิงส่วนใหญ่ปรากฏว่าลิงมักจะเป็นตัวอมโรค ซึ่งลิงแสดงอาการป่วยเล็กน้อย หรือไวรัสแฝงอยู่ในตัวลิงโดยไม่ปรากฏอาการเลย เมื่อไวรัสนี้ไปติดสัตว์ species อื่นก็ทำให้ตายได้ สำหรับคนที่ติดเชื้อ herpes simplex (H hominis) มักจะอมโรค และเมื่อเชื้อไวรัสนี้ไปติดลิงหรือชะนีทำให้ตายได้ ส่วนลิงกังที่ติดเชื้อ B virus จะแสดงอาการเล็กน้อย หรือเชื้อไวรัสอาจจะแฝงตัวอยู่ในลิง แต่เมื่อเชื้อนี้ไปติดคนก็ทำให้คนตายได้ B virus พบครั้งแรกในลิงรีซัส แต่ก็พบในลิงกังและลิงชนิดอื่น การติดเชื้อในฝูงลิงมีจำนวนค่อนข้างต่ำ แต่บางโอกาสลิงที่นำเข้ามาใหม่ทั้งฝูงจะติดเชื้อและการติดเชื้ออาจจะแพร่ไปในฝูงลิงอย่างรวดเร็ว การเกิดโรคในลิงปกติใช้เวลาประมาณ 14 วัน จะมีเม็ดตุ่มขนาดเล็กเกิดขึ้นและแตกออกซึ่งต่อมากลายเป็นแผล มีเสก็ดแห้งปกคลุมแผล ซึ่งพบได้บ่อย

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ กทม 10330

ที่ลิ้นและริมฝีปากรวมทั้งที่บริเวณใบหน้าและลำตัว ถ้าเกิดในปากจะมีแผ่นใสสีเทา-เหลืองปิดอยู่ แผลจะหายจะหายภายใน 7-14 วัน ไวรัสอาจทำให้เกิดเยื่อตาขาวอักเสบ หรือตาแดง (conjunctivitis) การวินิจฉัยชั่วคราวใช้ฉีดเชื้อเข้ากระต่ายและหาอินคลูชันบอดีที่นิวเคลียสในเซลล์รอบๆบริเวณขอบแผล ซึ่งเป็นลักษณะของการติดเชื้อ herpes virus ส่วนการวินิจฉัยที่แน่นอนใช้ virus neutralization test ไวรัสพบได้ในน้ำลายของลิงที่ติดเชื้อและของเสียที่ร่างกายขับออกมา (excretion) B virus ติดต่อจากลิงที่ติดเชื้อมายังคนโดยการกัดและข่วน รวมทั้งเข้าทางผิวหนังที่มีบาดแผลโดยติดมาจากเครื่องมือเครื่องแก้วที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัส การติดต่อจากลิงตัวหนึ่งไปยังลิงตัวอื่นๆสามารถเป็นไปได้เมื่อมีเชื้อไวรัสปนเปื้อนในน้ำดื่ม และอาหาร รวมทั้งการสัมผัส หรือทางอากาศ

เนื่องจากมีชะนีป่วยซึ่งมีรอยโรคคล้ายคลึงกับรอยโรคของ B virusดังนั้นจึงได้นำเชื้อจากปากของชะนีมาเพาะในเซลล์เลี้ยง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดจากไวรัส โดยใช้วิธีการทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

อุปกรณ์และวิธีการ

ไวรัส :

นำสำลีที่ม้าเชื้อแล้วป้ายแผลซึ่งมีไวรัสอยู่ที่บริเวณปากของชะนี แล้วนำมาใส่ใน transport medium หลังจากเขย่าให้กระจายใน medium ดีแล้ว ก็นำ medium นี้จำนวน 0.3 และ 0.1 มิลลิลิตร มาใส่ในเซลล์เลี้ยง BHK-21 และ MA 104 ซึ่งอยู่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ซม^2 และในหลอดเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีเซลล์เกาะอยู่บนแผ่นแก้ว แล้วปล่อยทิ้งไว้นานประมาณ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C หลังจากนั้นล้าง media ที่อยู่บนเซลล์เลี้ยงออกด้วย PBS (phosphate buffered saline) pH 7.2 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปประมาณ 7 มิลลิลิตรในขวดเลี้ยงเซลล์ และ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดเลี้ยงเซลล์ แล้วนำเข้าอบที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ นอกจากนั้นยังได้เก็บขวดเลี้ยงเซลล์และหลอดเลี้ยงเซลล์แต่ไม่ได้ใส่เชื้อไวรัสไว้ และดำเนินการเช่นเดียวกันเพื่อเก็บไว้เป็นสิ่งเปรียบเทียบ

ภายหลัง 24 ชั่วโมง ก็ได้นำเซลล์มาตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าเซลล์ในขวดและหลอดมีการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด ก็ได้นำน้ำเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีไวรัสอยู่ด้วยมาผ่านเซลล์อีกต่อไป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีก 3 ครั้ง

จุลพยาธิวิทยา :

ภายหลังที่พบว่าเซลล์บนแผ่นแก้วได้เปลี่ยนเป็นรูปกลมแล้ว จึงนำแผ่นแก้วออกจากหลอดแล้วล้างด้วย PBS pH 7.2 แล้วนำไปใส่ใน 10 % buffered formalin นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปย้อมด้วย hematoxylin และ eosin (Luna, 1964)

จุลทรรศน์อิเล็กตรอน :

ภายหลังที่พบว่าเซลล์ BHK-21 และ MA 104 ในขวดได้เปลี่ยนแปลงเป็นรูปกลมและหลุดลอยมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วก็นำเซลล์เหล่านี้มาปั่นที่ 120 g นาน 20 นาที ที่ 4 C เก็บเซลล์ที่ก้นหลอด หลังจากนั้นนำเซลล์มาใส่ใน 2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 ที่ 4 C ไว้นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ใน 1 % osmium tetroxide นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไประเหยน้ำออกโดย ethanol ในระดับต่างๆ และฝังใน Epon-Araldite ตัดด้วยมีดแก้วและย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน JEM-200CX ที่ 80 KV ส่วนกลุ่มเปรียบเทียบซึ่งไม่ได้เพาะเชื้อไวรัสนั้นก็ดำเนินการเช่นเดียวกัน

ผล

พบว่าชะนีป่วยมีเม็ดตุ่มและแผลเลือดออกบริเวณริมฝีปากรวมทั้งในช่องปากและลิ้น (รูปที่ 1 และ 2) เมื่อใช้สำลีป้ายแผลที่มีไวรัสอยู่ และนำไปเลี้ยงในเซลล์เลี้ยง ปรากฏว่าเซลล์เลี้ยง BHK-21 และ MA 104 ทั้งสองชนิดถูกทำลายทั้งหมดภายใน 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3) และเมื่อเพาะเชื้อไวรัสต่อไปอีก 3 ครั้ง ก็พบว่าให้ผลเช่นเดิม หลังจากที่นำเซลล์เลี้ยงที่ถูกทำลายแล้วไปย้อมด้วย hematoxylin และ eosin ก็ปรากฏว่าพบอินคลูชันบอดีในนิวเคลียสของเซลล์ (รูปที่ 4) ซึ่งแสดงว่ามีไวรัสชนิด DNA อยู่ในเซลล์เหล่านี้แน่นอน และเมื่อนำเซลล์เลี้ยงไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนก็พบไวรัสซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นลักษณะเฉพาะของ herpesvirus อยู่ในเซลล์เลี้ยงเหล่านี้ (รูปที่ 5-9) ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้เพาะเชื้อที่ทำเปรียบเทียบกัน ก็พบว่าไม่มีเชื้อไวรัสอยู่ในเซลล์เลย

วิจารณ์

จากการที่เชื้อไวรัสสามารถทำลายเซลล์เลี้ยง BHK-21 และ MA 104 ได้ทั้งหมดภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงรวมทั้งพบอินคลูชันบอดีในนิวเคลียสของเซลล์เลี้ยงเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อไวรัสจากชะนีต้องเป็น DNA virus อย่างแน่นอน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจต่อไปว่าเป็นไวรัสชนิดไหนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

โดยทั่วไปส่วนประกอบของ herpesvirion มี core, capsid, tegument และ envelope ได้มีรายงานว่า core ของไวรัสเป็น DNA (Epstein, 1962) เนื่องจากว่าไวต่อ DNase แต่ไม่ไวต่อ RNase หรือ proteolytic enzyme ต่อมาพบว่า DNA นี้พบอยู่ใน electron-dense region (Furlong et. al., 1972) ส่วน capsid ที่เห็นจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยวิธี thin section เป็นภาพหกเหลี่ยมทึบแสงอิเล็กตรอนหรือเป็นวงแหวนแยกจาก core โดย electron-translucent shell ขนาดของ capsid แตกต่างกันมาก แต่โดยทั่วไปประมาณ 85-110 nm (Wolf and Darlington, 1971., Nayak, 1971, Wildy et. al.,1960) ซึ่งส่วนประกอบของ capsid เป็น protein tegument เป็นส่วนที่อยู่ระหว่าง capsid และ envelope ซึ่งเป็น fibrous coat หุ้มรอบ capsid (Shipkey et. al., 1967) ภาพถ่ายที่ปรากฏจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็น amorphous material ซึ่งแน่นทึบกว่าcapsid หรือ envelope สารซึ่งประกอบเป็น tegument นี้พบได้ใน virion เกือบทั้งหมด แต่จำนวนแตกต่างกันแม้แต่มาจากเซลล์เดียวกัน virion ของ Marek's disease virus ซึ่งมีสารนี้อยู่ ทำให้ขนาดของ envelope ขยายถึง 250-260 nm (Nazerian และ Witter,1970) ส่วน envelope เป็นโครงสร้างที่อยู่ชั้นนอกสุดของ herpesvirion ประกอบด้วย trilaminar membrane ซึ่งมี spike ยื่นออกมาจากผิวนอกสุด (Wildy et. al., 1960) จากการตรวจดูภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าไวรัสที่พบในชะนีนี้มีลักษณะของ herpesvirus ซึ่งมีการพัฒนามากในนิวเคลียสของเซลล์ BHK-21 และ MA104 เหมือนกันทั้ง 2 ชนิด capsid ที่พบมีลักษณะต่างๆกันหลายชนิด เช่น empty capsids พบว่าบริเวณตรงกลาง capsid จะโปร่งแสงอิเล็กตรอน และพบ capsid ซึ่งมี core ตรงกลางขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 35-45 nm รวมทั้ง capsid ซึ่งมี core เป็นรูปวงแหวนมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 45-55 nm มีรายงานการ budding ของ

herpesvirus ว่าเกือบทั้งหมดเกิดที่ inner nuclear membrane (Dillard et. al., 1972) และที่อื่นๆเช่น Golgi apparatus, endoplasmic reticulum และเข้าไปใน vacuoles ใน cytoplasm (Fong และ Hsuing, 1972) พบว่าบริเวณ budding ที่ inner nuclear membrane มีความหนาเพิ่มขึ้นและโค้งขึ้น (Dillard et. al., 1972) หลังจากไวรัสผ่าน inner membrane ไปแล้วพบว่า enveloped virion อยู่ใน perinuclear space ในขณะที่ capsid ผ่าน inner nuclear membrane จะรับเอา dense material ซึ่งอยู่ที่ด้านข้างของ นิวเคลียส นี่รวมทั้ง membrane บางส่วนด้วย ซึ่งสารนี้เรียกว่า tegument เชื่อกันว่า tegument ไม่ได้มาจากที่นี่แต่เพียงส่วนเดียว เพราะว่าในนิวเคลียสที่ capsids ซึ่งไม่มี envelope หุ้มอยู่ก็ยังพบสารนี้ได้เช่นกัน (Nazerian, 1971) ส่วนไวรัสของชะนีนี้พบว่าส่วนใหญ่ budding ผ่าน nuclear membrane และพบบ้างที่มี budding ผ่าน cytoplasmic membrane ซึ่งขบวนการ buddingนี้ก็มีขบวนการเช่นเดียวกับ herpesvirus ตัวอื่นที่เคยมีรายงานมาแล้ว

การวินิจฉัยโรคที่เกิดจาก herpesvirus ทำได้โดย ดูรอยโรค แต่ถ้าจะให้ได้ผลแน่นอนต้องแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อไวรัส การที่มี neutralizing antibodies ในซีรัมเพิ่มขึ้นจะยืนยันผลการวินิจฉัยโรค herpesvirus ที่ทำให้เกิดโรคในคนและ primate ที่ไม่ใช่คนเท่าที่ทราบในขณะนี้มี herpes simplex type 1, H. simiaeหรือ B virus, H. saimiri, H. ateles, H. tamarinus สำหรับ herpesvirus ที่พบในชะนีรายนี้จากประวัติ อาการรอยโรค และการทำลายของเซลล์เลี้ยง และจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สรุปว่าไม่ใช่ herpesvirus 3 ตัวหลัง ไวรัสที่น่าสงสัยว่าเป็นไปได้คือ H. simplex type 1 และ B virus แต่ชะนีกลุ่มนี้เป็นชะนีที่นำออกมาจากป่า และมีอาการติดโรคมาจากป่า การที่จะพิสูจน์ให้แน่ชัดลงไปต้องอาศัยทางซีรัมวิทยา เช่น neutralization testซึ่งผู้เขียนได้ติดต่อ Dr. Donald S. Burke ซึ่งเป็นหัวหน้าแผนกโรคไวรัสที่ Walter Reed Army ที่ Institute of Research, Washington D.C, ไว้แล้ว จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รวมทั้งประวัติทั้งหมดก็ได้รับคำตอบว่า น่าจะเป็น B virus ซึ่งทำให้คนตายได้จึงไม่อาจทำการตรวจให้แน่ชัดลงไป เนื่องจากเกรงว่าจะติดเชื้อมายังผู้ทำงาน ถึงแม้ว่าจะมีรายงานการติดเชื้อ herpesvirus ในคน (Smith, 1958)ก็ตาม แต่ผลจากห้องปฏิบัติการอีกแห่งหนึ่งได้ทำการสกัด DNA และทำ electrophoresis ของไวรัสตัวนี้ ก็พบว่าไม่เหมือนกับ herpesvirus ในคน (herpes simplex type 1) ดัง

นั้นโอกาศที่จะเป็น B virus จึงเป็นไปได้สูงมาก

เอกสารอ้างอิง

Diliard, S.H., Cluatham, W.J., and Moss, L.H., 1972, Electron micrograph of zosteriform herpes simplex infection in the mouse. Lab. Invest. 26, 391-402.

Ebstein, M.A., 1962, Observationsoon the fine struture of mature herpes simplex virus and on the composition of its nucleoid. J. Exp. Med.115, 1-11.

Fong, C.K.Y., and Hsuing, G.D., 1972, Develop ent of an equine herpesvirus in two cell culture systems : Light and electron microscopy. J. Infect. Immun, 6, 865-875.

Furlong, D., Swif, H., and Roizman, B., 1972, Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. J. Virol. 10, 1071-1074.

Luna, L.G., 1964, Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology. Third Edition. THe Blakiston Division, McGraw-Hill Book Company, New York, 258 pp.

Nayak, D.P., 1971, Isolation and characterization of a herpesvirus from leukemic quinea pigs, J. Virol. 8, 579-588.

Nazerian, K., 1971, Further studies on the replication of Marek's disease virus in the chicken and in cell culture. J. Natl. Cancer Inst. 47, 207-217.

Nazerian, K., and Witter, R.L., 1970, Cell free transmission and in vitro replication of Marek's disease virus. J. Virol. 5, 388-397.

Sabin, A.B., and Wright, A.M., 1934, Acute as emding myelitis following a monkey bite, with isolation of a virus capable of reproducing

the disease. J. Exper. Med. 59, 115-136.

Shipkey, F.H., Erlandson, R.A., Baily, R.B., Babcoek, V.I., and Santham, C.M., 1967, Virus biographics II. Growth of herpes simplex virus in tissue culture. Exp. Mol. Pathol. 6, 39-67.

Smith, P.C., Ynill, T.M., and Buchanan, R.D., 1958, Natural and experimental infection of gibbon with Herpesvirus hominis. Ann. Prog. Report SEATO Med. Res. Lab. and SEATO Clinical Res. Cen., Bangkok, Thailand., 258-261.

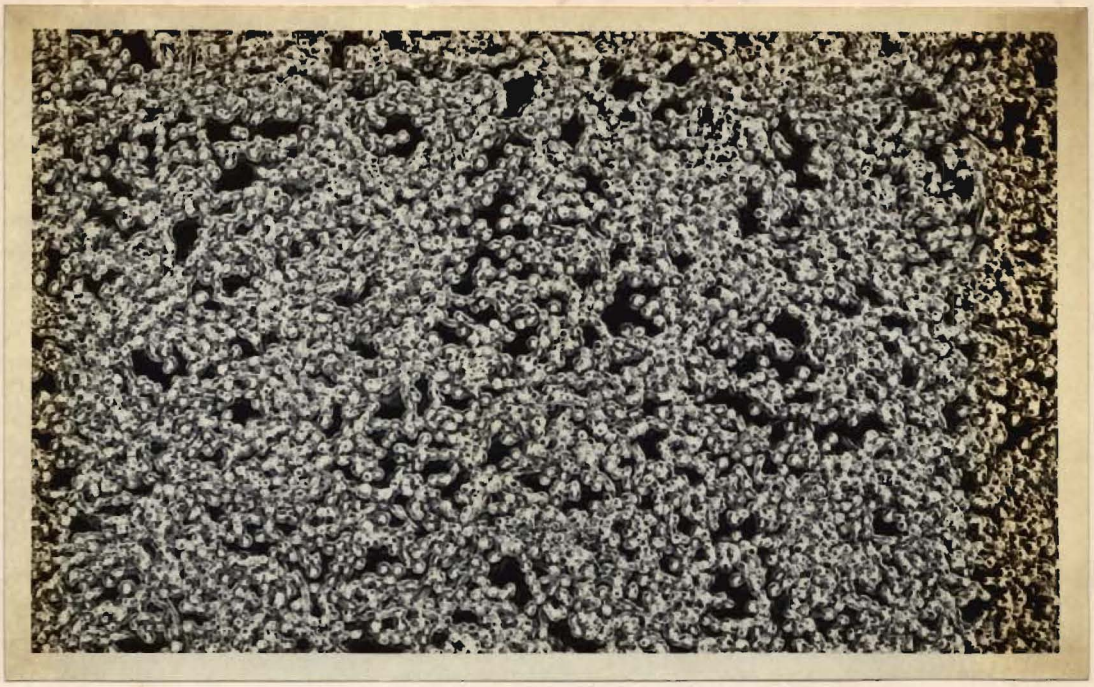
Wildy, P., Rusull, W.C., and Horne, R.W., 1960, The morphology of herpesvirus. Virol. 12, 204-224.

Wolf, K., and Darlington, R.W., 1971, Channel catfish virus : A new herpesvirus of ictalurid fish. J. Virol. 8,525-533.

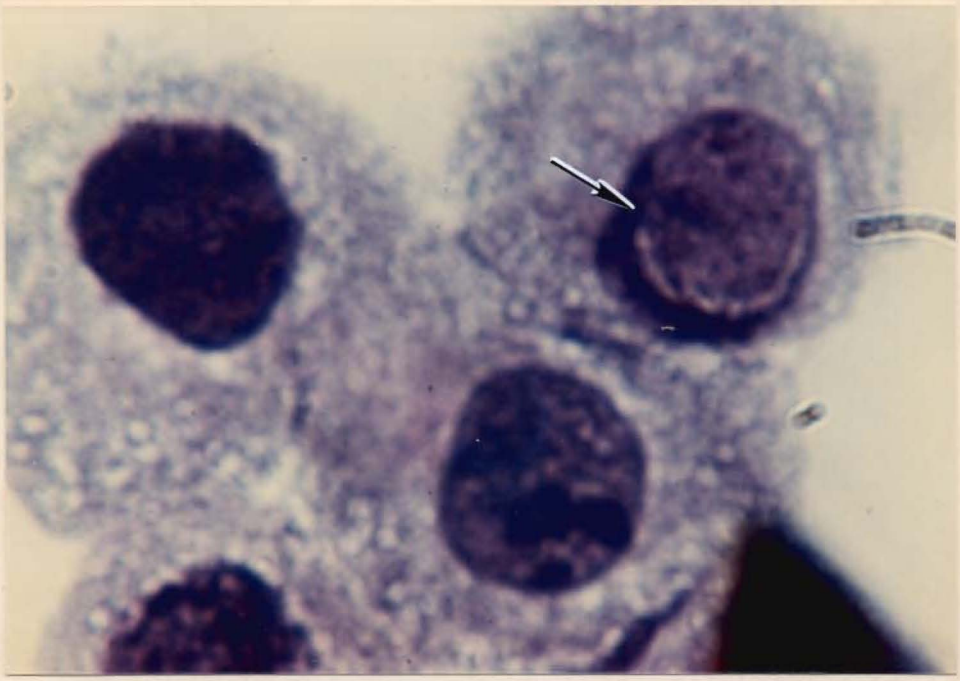
รูปที่ 1. แผลที่ริมฝีปากชะนี

บรรณสารการ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

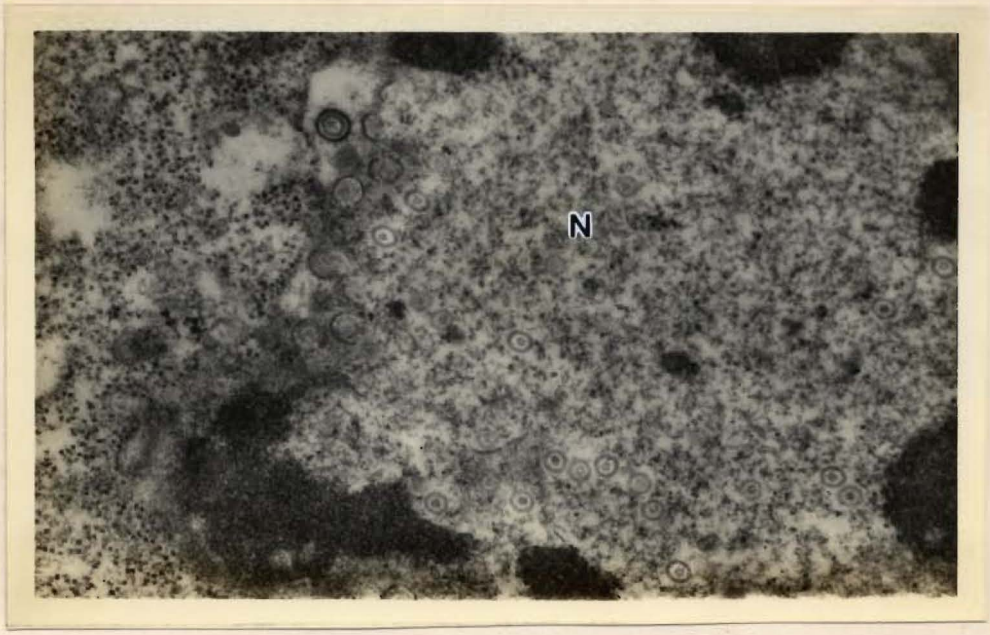
รูปที่ 2. แผลที่ในช่องปากชะนี



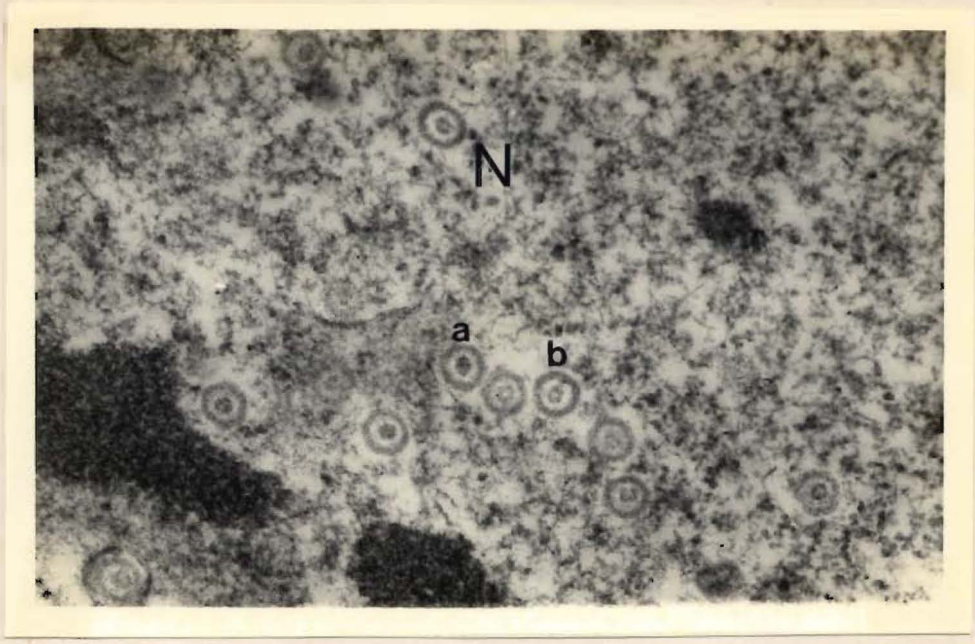
รูปที่ 3. เซลล์เลี้ยง BHK-21 เปลี่ยนเป็นรูปกลมและหลุดลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส



รูปที่ 4. อินคลูชันบอดีในนิวเคลียส (ศรชี้) ที่พบในเซลล์เลี้ยง BHK-21 (ภาพโดย ดร. เล็ก อัศวพลังชัย)



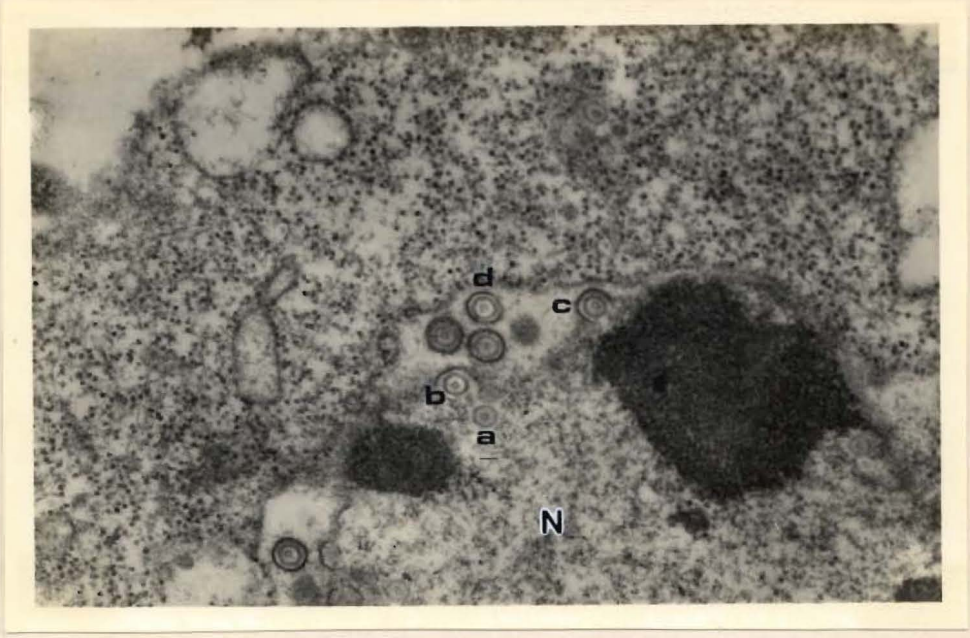
รูปที่ 5. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง capsid และ core กำลังพัฒนาภายในนิวเคลียสของเซลล์เลี้ยง BHK-21 N = นิวเคลียส
ภาพขยาย 28,200 เท่า



รูปที่ 6. ภาพขยายของรูปที่ 5 แสดง capsid ที่มี core แน่นทึบ (a) และ capsid ที่มี coreเป็นรูปวงแหวน (b) N = นิวเคลียส ภาพขยาย 56,500 เท่า

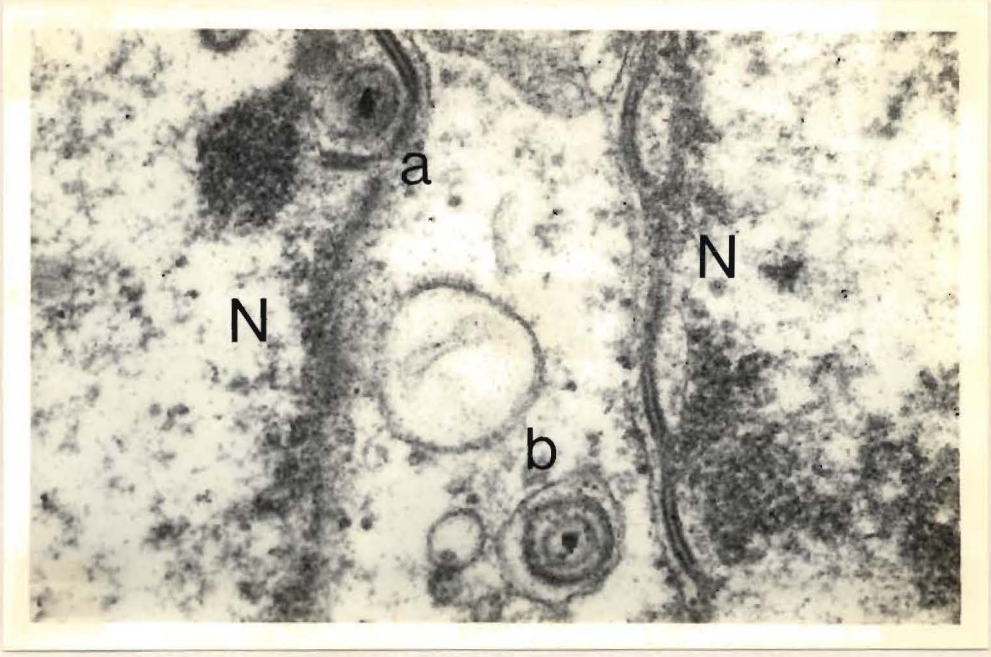
049867

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

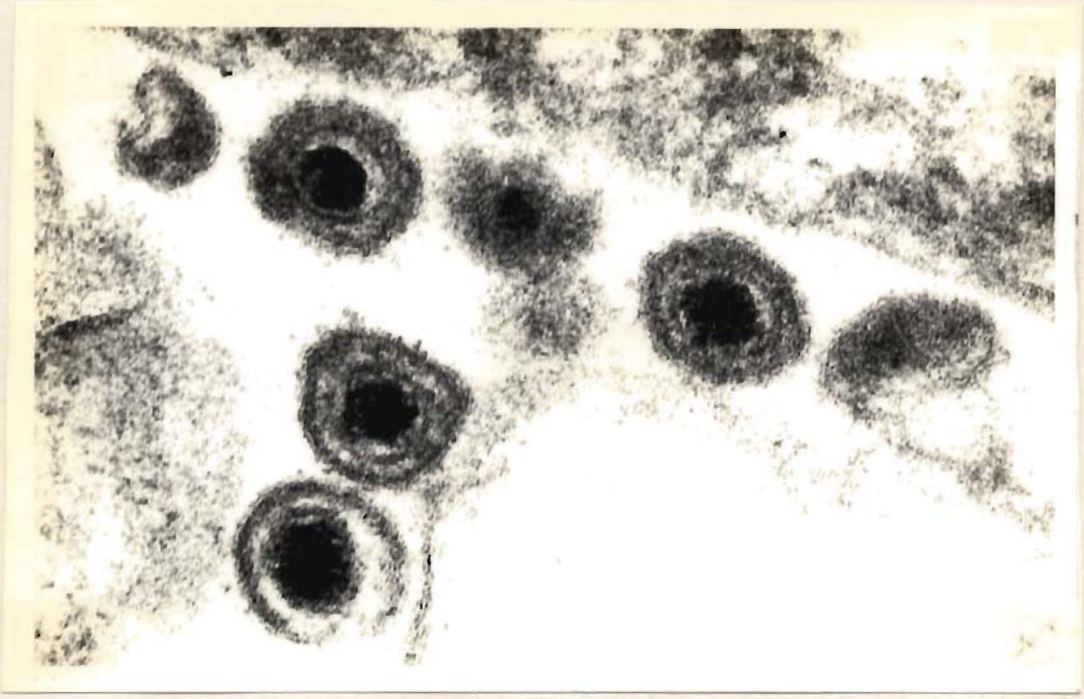


รูปที่ 7. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง capsid ที่อยู่ในขบวนการ envelopment (a, b, c, d) N = นิวเคลียส
ภาพขยาย 29,400 เท่า

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง inner membrane ของ neuclear envelope หนาขึ้น และยืดออกรวมทั้งโค้งมากขึ้น (a) ส่วนไวรัสที่สร้างเสร็จสมบูรณ์แล้วหลุดมาอยู่ในช่องว่างรอบนิวเคลียส (b) ภาพขยาย 75,800 เท่า



รูปที่ 9. Complete mature herpesvirus ใน cytoplasm ของเซลล์ BHK-21 ภาพขยาย 150,000 เท่า

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย