รายงานการวิจัย

การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคข้อและสมองอักเสบในแพะ ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

Development of molecular diagnostics for Caprine Arthritis Encephalitis virus

คณะผู้วิจัย

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร	Nijjareeya Sirisriro
โสภิดา พุทธะสุภะ	Sopida Puttasupa
ภรณ์ทิพย์ ทองมณี	Porntip Thongmanee
มรกต แสงรุ่ง	Morakot Saengrung

คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากจากมหาวิทยาเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ.2561

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคข้อและสมองอักเสบในแพะด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2561 ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2560 ถึง กันยายน 2562 เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อก่อให้เกิดเทคนิคตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อที่สามารถตรวจได้รวดเร็วและแม่นยำ มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ให้บริการแก่เกษตรกรเจ้าของสัตว์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสัตวแพทย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดการวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีสมตามความตั้งใจ

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร

กันยายน 2562

การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคข้อและสมองอักเสบในแพะด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร[1], โสภิดา พุทธะสุภะ[1], ภรณ์ทิพย์ ทองมณี[1] และ มรกต แสงรุ่ง[1]

บทคัดย่อ

โรคข้อและสมองอักเสบในแพะเป็นโรคที่เกิดจากไวรัสสามารถพบได้แพะทุกช่วงอายุ แพะที่ได้รับเชื้ออาจจะไม่แสดงอาการ เป็นตัวแพร่ระบาดของเชื้อไปยังแพะตัวอื่น ๆ และมีผลผลิตลดลง ทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงแพะ โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจการติดเชื้อไวรัสข้อและสมองอักเสบในแพะสองเทคนิค คือ PCR และ LAMP มียีน CAEV gag เป็นเป้าหมาย ให้มีความจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ในประเทศไทย สามารถตรวจการติดเชื้อได้แม่นยำ และสามารถพัฒนาต่อยอดไปเป็นชุดตรวจที่ทำงานในภาคสนามได้

จากผลการทดสอบพบว่าทั้ง PCR และ LAMP มีความจำเพาะต่อการตรวจค่อนข้างสูง เนื่องจากให้ผลลบต่อเชื้อที่เป็นปรสิตในเลือดที่มีการระบาดในประเทศไทย สำหรับความไวในการตรวจพบว่า PCR มีค่าความไวของเทคนิคที่ 0.1 ng/µl ส่วนค่าความไวในการตรวจด้วยเทคนิค LAMP โดยทั่วไปจะค่าประมาณ 0.01 ng/µl เทคนิค LAMP ใช้เวลาประมาณ 1.5-2 ชั่วโมงในการทำ ใช้เวลาน้อยกว่า PCR ซึ่งต้องใช้เวลาทั้งหมดในการทำงานประมาณ 4-6 ชั่วโมง

คำสำคัญ: โรคข้อและสมองอักเสบ แพะ การตรวจวินิจฉัย

[1]อาจารย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จ.นครศรีธรรมราช

Development of molecular detections for Caprine Arthritis Encephalitis (CAE)

Nijjareeya Sirisriro[1], Sopida Puttasupa[1], Porntip Thongmanee[1] and Morakot Saengrung[1]

Abstract

Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) causes persistent disease, which is characterized by polyarthritis and mastitis in adult goats and progressive paresis in kids. The infection caused economic loss and farm management problems. The objective of this project was focused on the development of molecular detections of CAEV gag gene by PCR and a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. The results revealed that both PCR and LAMP provided high specificity against the target gene and no cross detection to other blood parasites. For sensitivity test, the results showed LAMP had more sensitivity than PCR as the technique can detect the target at 0.01 ng/µl, while the sensitivity of PCR was at 0.1 ng/µl. LAMP want 1.5-2 hours for the entire process and the LAMP result can be detected at 32 minutes after reaction started.

Keywords: Caprine arthritis encephalitis, goat, detection

[1]Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย	ช
บทนำ	1
1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
2. ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	7
วิธีการดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย และอภิปรายผล	13
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	24
บรรณานุกรม	26

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบ Caprine arthritis encephalitis viruss genome	3
2	เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคข้อและสมองอักเสบในแพะ	5
3	ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับทดสอบเทคนิค PCR	16
4	ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับทดสอบเทคนิค LAMP	20

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	จีโนมของ Caprine arthritis encephalitis (CAE) virus	2
2	การออกแบบ primers เพื่อให้มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย	7
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAEV gag	15
4	ผลผลิตพีซีอาร์จากการทดสอบไพร์เมอร์จำนวน 5 คู่ที่ใช้ในเทคนิค PCR	16
5	การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PCR ต่อยีน CAEV gag	17
6	การทดสอบความไวของเทคนิค PCR ต่อยีน CAEV gag	17
7	การทดสอบไพร์เมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจการติดเชื้อ CAEV	22
8	การทดสอบความจำเพาะเทคนิค LAMP ต่อยีน CAEV gag	22
9	การทดสอบความไวของเทคนิค LAMP ต่อยีน CAEV gag	23
10	การอ่านผลเทคนิค LAMP ด้วยการเติม SYBR dye และนำไปส่องด้วยแสงสีฟ้า	23

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

µl	=	Microliter
µM	=	Micromolar
BLAST	=	Basic Local Alignment Search Tool
bp	=	Base pair
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
kDa	=	Kilodalton
M	=	Molar
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
NCR	=	Non-coding region
ng	=	nanogram
NS	=	Non-structural protein
nt	=	Nucleotide
OD	=	Optical density
RNA	=	Ribonucleic acid
SDS	=	Sodium Dodecyl Sulfate
UTR	=	Untranslated region

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

พื้นที่ภาคใต้มีการเลี้ยงแพะมากเป็นอันดับ 1 ของประเทศ ในปี 2558 มีประชากรแพะคิดเป็นร้อยละ 50.36 ของประชากรแพะทั้งประเทศ ภาคใต้นอกจากจะมีการเลี้ยงแพะมากแล้วยังเป็นตลาดแพะเนื้อที่ใหญ่ที่สุดในประเทศด้วย จากการศึกษาแนวโน้มการบริโภคเนื้อแพะและแกะในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้พบว่าเนื้อแพะเป็นที่นิยมในการบริโภคสูงถึงร้อยละ 63.33 มีอุปสรรคทางการตลาด ได้แก่ แหล่งจำหน่ายมีน้อย ราคาสูง และควรเพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ (ปริญญา, 2558) ภาครัฐภายใต้การดูแลของกรมปศุสัตว์ และกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้มียุทธศาสตร์เชิงรุกตั้งแต่ปี 2552 เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงแพะและแกะเชิงพาณิชย์ เพื่อเพิ่มการตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่มีแนวโน้มสูงขึ้นทั้งภายในประเทศและประเทศเพื่อนบ้าน

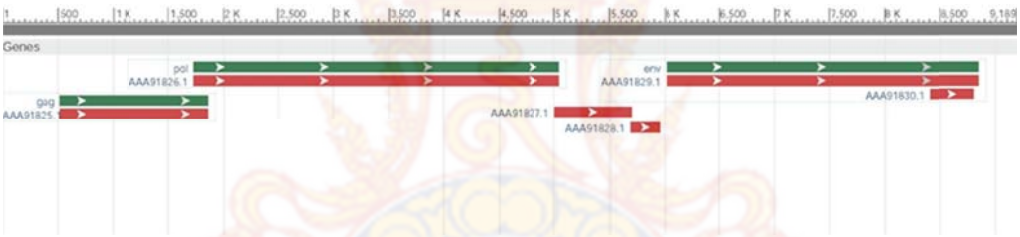
อย่างไรก็ตามการเลี้ยงแพะในประเทศไทย ยังไม่ขยายตัวแบบการเลี้ยงเชิงพาณิชย์เพื่อรองรับการเจริญเติบโตของตลาด เนื่องด้วยปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์แพะ ชนิดของอาหาร วิธีการเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ โรคและการควบคุมป้องกัน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบโรคระบาดที่สำคัญในแพะเป็นระยะ ๆ เช่น โรคแท้งติดต่อ โรคข้อและสมองอักเสบในแพะ เป็นต้น (ช้องมาศ และคณะ, 2554) ซึ่งปัญหาโรคระบาดจัดเป็นอุปสรรคสำคัญในการจัดตั้งฟาร์มแพะที่ได้มาตรฐานและปลอดโรค เพื่อจะลดปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อ ควรจะมีวิธีการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ จะสามารถช่วยควบคุมและกำจัดโรคระบาดเหล่านี้ได้เป็นอย่างดี

โรคข้อและสมองอักเสบในแพะ เป็นโรคที่มีความสำคัญต่อการผลิตแพะ และการซื้อขายแพะมีชีวิต โรคนี้เกิดจากไวรัส แพะที่ได้รับเชื้ออาจจะแสดงอาการหรือไม่แสดงอาการ แต่เมื่อได้รับเชื้อแล้ว จะเป็นพาหะแพร่เชื้อไวรัสได้ตลอดชีวิต The World Organization for Animal Health (OIE) จัดให้โรคข้อและสมองอักเสบในแพะ อยู่ในกลุ่ม List B - OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2016 และกำหนดให้มีการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคข้อและสมองอักเสบก่อนที่จะมีการขนย้ายสัตว์เพื่อการค้า เพื่อป้องกันการแพร่ของไวรัส ถ้าตรวจพบว่าแพะมีเชื้อนี้อยู่อาจจะมีผลให้เกิดการกีดกันการส่งออกแพะและผลิตภัณฑ์ไปยังพื้นที่ หรือประเทศที่ปลอดจากเชื้อดังกล่าวได้

2. ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคข้อและสมองอักเสบในแพะ

โรคข้อและสมองอักเสบในแพะ เกิดจากเชื้อไวรัส caprine arthritis encephalitis (CAE) จัดอยู่ในไวรัสวงศ์ (family) Retroviridae สกุล (genus) Lentivirus อยู่ในกลุ่ม small ruminant lentiviruses (SRLV) เช่นเดียวกับ Visna/Maedi Virus (VMV) ที่ก่อโรค ovine progressive pneumonia (OPP) CAEV และ VMV มีจีโนมที่คล้ายคลึงกันมาก (Larruskain and Jugo, 2013) CAEV เป็นไวรัสมีเปลือกหุ้ม สารพันธุกรรมเป็นสาย RNA สายเดียว มีความยาวประมาณ 9189 bp ที่ปลายทั้ง 2 ด้านจะมี 5′untranslated region (UTR) และ 3′ UTR ประกอบขึ้นด้วย 3 genes ที่สร้างโปรตีน ได้แก่ gag, pol และ env และมี putative virion protein gene (CaVgp4) ดังแสดงในรูปที่ 1 และตารางที่ 1



รูปที่ 1 จีโนมของ caprine arthritis encephalitis (CAE) virus (ACCESSION NC_001463, Saltarelli et al.,1990)

ในการสร้างโปรตีนของไวรัส สาย genomic RNA ทั้งสายจะถูกแปลรหัสเป็น polyprotein ขนาดใหญ่ ซึ่งต่อมาจะถูกตัดเป็นโปรตีนขนาดเล็กด้วย proteinase ของ CAEV เอง ยีน gag จะผลิตโปรตีนที่เรียกว่า gag gene protein (core nucleocapsid protein) ยีน pol จะผลิต retroviral aspartyl protease (RVP), และ Reverse transcriptases (RTs) ส่วนยีน env ก็จะเกี่ยวข้องกับการสร้างเปลือกหุ้มไวรัส (Saltarelli et al.,1990). proviral CAEV จะแฝงตัวอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte และ macrophage ของแพะที่ได้รับเชื้อไวรัสตลอดชีวิต (Harmache et al.,1995)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบ Caprine arthritis encephalitis virus genome

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
env ID: 1489974	envelope polyprotein;trans-regulatory splicing-like protein	NC_001463.1 (6012..8846)	CaVgp5
CaVgp4 ID: 1724701	protein S	NC_001463.1 (5688..5951)	CaVgp4
CaVgp3 ID: 1724700	protein Q	NC_001463.1 (5006..5695)	CaVgp3
pol ID: 1489976	pol protein	NC_001463.1 (1729..5046)	CaVgp2
gag ID: 1489975	gag protein	NC_001463.1 (512..1858)	CaVgp1

มีรายงานพบการแพร่กระจายของ CAEV ได้ในฟาร์มแพะหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะในฟาร์มแพะนม และฟาร์มที่มีการเลี้ยงเชิงอุตสาหกรรม มีจำนวนแพะอยู่อย่างหนาแน่น เช่น อเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา เม็กซิโก ซึ่งพบความชุกของโรคมากกว่า 65% (Kahn and Line, 2008) CAEV มีหลายสายพันธุ์และมีความรุนแรงในการก่อโรคแตกต่างกันไป การติดต่อมักจะเกิดจากสัมผัสแพะตัวที่มีเชื้อ แม่แพะสามารถถ่ายทอดเชื้อให้ลูกได้โดยผ่านทางน้ำนมและน้ำนมเหลือง ดังนั้นในฟาร์มที่มีการจัดการโดยรวมน้ำนมจากแม่แพะเข้าด้วยกันเพื่อเลี้ยงลูกแพะหลาย ๆ ตัวพร้อม ๆ กัน ก็จะทำให้ลูกแพะเหล่านั้นได้รับเชื้อไปพร้อมกันหมด และไวรัสชนิดนี้ยังไม่มีวัคซีนที่ให้ผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดี (Reina et al., 2009) CAEV ก่อโรคได้ในแพะทุกสายพันธุ์ แต่แพะจะแสดงอาการแตกต่างกันตามช่วงอายุ แพะอายุน้อย ทีอยู่ในช่วง 2-6 เดือนจะอ่อนแอ เดินขาพับ เป็นอัมพาต ส่วนอาการในสัตว์ที่โตเต็มที่ มีอายุมากกว่า 6 เดือนขึ้นไป คือ มีอาการอักเสบที่ข้อขา เต้านมอักเสบ มีอาการทางระบบประสาท (Minguijón et al., 2015)

ในฟาร์มที่มีการระบาดของ CAEV แล้วมักจะควบคุมการแพร่กระจายเชื้อได้ยาก เนื่องจากแพะที่ได้รับเชื้อจะสามารถแพร่กระจายเชื้อได้ก่อนที่จะมีภูมิคุ้มกัน และมักจะไม่แสดงอาการอย่างเด่นชัด หรืออาการที่พบคล้ายคลึงกับโรคอื่น เช่น ข้ออักเสบ เต้านมอักเสบ และการที่แพะอยู่ร่วมกัน

ในคอกที่แออัดก็ยิ่งเพิ่มโอกาสสัมผัสเชื้อได้มากขึ้น แพะที่ได้รับเชื้อ จะสร้างแอนติบอดี้ภายใน 3-12 สัปดาห์ แต่ถ้าไวรัสแฝงตัวอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาว สัตว์ก็อาจจะไม่สร้างแอนติบอดี้ขึ้นมาต่อต้าน (Larruskain and Jugo, et al., 2013)

สำหรับการวินิจฉัยโรคข้อและสมองอักเสบในแพะ จะใช้การตรวจร่างกาย การซักประวัติ ร่วมกับการตรวจตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ The World Organisation for Animal Health (OIE) (2008) ได้แนะนำวิธีการตรวจวินิจฉัยสำหรับโรคนี้ คือ

1) การจำแนกแยกเชื้อไวรัส

- เพาะแยกเชื้อจากตัวสัตว์
- เพาะแยกเชื้อจากซากสัตว์และตัวอย่างเนื้อเยื่อ
- การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ

2) การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา

- AGID-Agar gel immunodiffusion
- ELISA-Enzyme-linked immunosorbent assay ได้แก่ indirect ELISA และ Competitive ELISA

การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้ตรวจสัตว์เพื่อคัดกรองการติดเชื้อไวรัส ใช้ตรวจหาแพะที่เป็นพาหะของเชื้อในฝูง จากการเปรียบเทียบความไวของเทคนิค AGID และ ELISA พบว่า ELISA มีความไวมากกว่า AGID (Brinkhof et al., 2007) แต่ความจำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจน หรือสายพันธุ์ไวรัสที่ใช้ตรวจ เช่น recombinant core protein, p55gag เป็นแอนติเจนที่ดี เพิ่มความไวและความจำเพาะให้เทคนิค ELISA (Konishi et al., 2010) นอกจากที่ OIE ได้ระบุเทคนิคการตรวจวินิจฉัยไว้แล้ว ยังมีรายงานการพัฒนาเทคนิคการตรวจอีกหลายรายงานจากกลุ่มนักวิจัยต่าง ๆ ดังสรุปไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคข้อและสมองอักเสบในแพะ

เทคนิค	เอกสารอ้างอิง
quantitative real time polymerase chain reaction analysis	Jarczak et al., 2014
loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	Balbin et al., 2014
TaqMan-based qPCR	Li et al.,2013
real-Time polymerase chain reaction	Brajon et al.,2012
loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	Huang et al.,2012
ELISA and polymerase chain reaction	Brinkhof et al.,2010
polymerase chain reaction	Gil et al.,2006
semi-nested polymerase chain reaction using degenerate primers	Eltahir et al.,2006
semi-nested polymerase chain reaction	Celer et al.,2000
polymerase chain reaction	Wagter et al.,1998
reverse transcription- polymerase chain reaction	Leroux et al.,1997
in situ hybridization using fluorescein-labelled single-stranded RNA probes	Storset et al.,1996
polymerase chain reaction -generated single stranded nonradiolabelled probe	Clavijo et al.,1995
double-nested polymerase chain reaction	Barlough et al.,1994
polymerase chain reaction	Reddy et al.,1993
polymerase chain reaction	Zanoni et al.,1990

การระบาดของโรคข้อและสมองอักเสบในแพะในประเทศไทย

ในประเทศไทยมีการรายงานสำรวจพบเชื้อ CAEV ในหลายจังหวัดทั่วประเทศ ในปี 2528 อุราศรีและคณะ ตรวจพบแอนติบอดี้ต่อเชื้อ CAEV ในฝูงแพะนม จ ราชบุรี ที่นำเข้าแพะพันธุ์ชาแนนจากประเทศออสเตรเลียและพบ retrovirus เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน มีรายงานการสำรวจแพะที่มีแอนติบอดี้ต่อ CAEV ด้วยเทคนิค AGID พบว่ามีการระบาดของเชื้อในภาคเหนือ (ชัยวัธน์และคณะ 2533) และจังหวัดราชบุรี (สุพลและมนัสชัย 2547) ในปี 2552 นิอรและคณะ

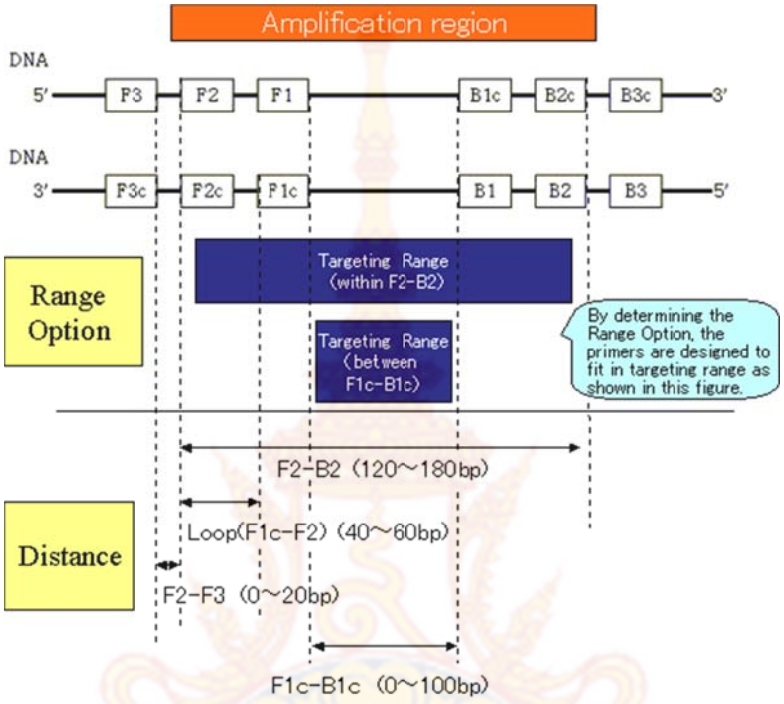
พบว่าในพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันตก มีความชุกรายฟาร์มของเชื้อ CAEV สูงถึง 47% เมื่อทำการตรวจด้วย ELISA ช้องมาศและคณะรายงานการตรวจพบ CAEV แอนติบอดี้ด้วยเทคนิค competitive ELISA ในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคใต้ ได้แก่ กระบี่ นครศรีธรรมราช พังงา สุราษฎร์ธานี สงขลา สตูล ตรัง และพัทลุง ในปี 2553 ตรวจพบแพะในจังหวัดนครปฐม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และกาญจนบุรี ให้ผลบวกเช่นกัน (ช้องมาศและคณะ 2554) จังหวัดราชบุรี เพชรบุรี และกาญจนบุรี มีรายงานพบเชื้อนี้ในแพะ ในปี 2554 (ลิน และคณะ 2554)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

วิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคระดับโมเลกุล (molecular technique) ที่มีความไวและความจำเพาะสูง ไม่ต้องการเครื่องมือจำเพาะที่มีราคาสูง ใช้เวลาตรวจไม่เกิน 60 นาที (Notomi et al., 2000; Fu et al., 2011) เทคนิคนี้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส แบคทีเรีย พยาธิ ได้ทั้งในระดับ DNA และ RNA สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ทั้งในระดับ genus และ species สามารถใช้กับตัวอย่างได้หลากหลาย โดยไม่มีปัญหาการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Nagamine et al., 2001) การตรวจสอบผลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ดูความขุ่นที่เกิดขึ้นกับตัวอย่างที่ให้ผลบวกอีกทั้งผู้ปฏิบัติไม่จำเป็นต้องมีทักษะสูง (Mori et al., 2001; Brinkhof et al., 2010)

เทคนิค LAMP สามารถใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งชนิด DNA และ RNA โดยใช้เอนไซม์ Bst DNA polymerase ที่ทำงานในอุณหภูมิคงที่ (isothermal enzyme) ระหว่าง 60 – 65 ^{O}C เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติแยกสายสารพันธุกรรม (strand displacement) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในอุณหภูมิเดียว เทคนิคนี้จะใช้ไพร์เมอร์ 2 – 3 คู่ที่จำเพาะต่อลำดับเบสที่แตกต่างกัน ทำให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นไปอย่างรวดเร็ว และมีความจำเพาะสูง โดยทั่วไปจะใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ ได้แก่ forward outer primer (F3), backward out primer (B3), forward internal primer (FIP) และ backward internal primer (BIP) การออกแบบไพร์เมอร์ด้วยโปรแกรม PrimerExplorer (http://primerexplorer.jp/e/) โปรแกรมจะให้ไพร์เมอร์ประกอบด้วย 4 เส้นหลัก F3, B3, FIP และ BIP ทั้งนี้โปรแกรมนี้สามารถช่วยออกแบบไพร์เมอร์พิเศษ forward loop (LoopF) และ backward loop (LoopB) ได้ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยไพร์เมอร์ที่เพิ่มขึ้นมาเพื่อเพิ่ม

ประสิทธิภาพของเทคนิค LAMP ด้วยการลดระยะเวลาการทำปฏิกิริยาและเพิ่มความไวของเทคนิคนี้ด้วย (Nagamine et al., 2002)



รูปที่ 2 การออกแบบ primers เพื่อให้มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย ใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (http://primerexplorer.jp/e/v5_manual/03.html#02)

วิธีการตรวจสอบผลของเทคนิค LAMP มีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจสอบความขุ่นของแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต (magnesium pyrophosphate) ด้วยตาเปล่า การใช้วิธีผ่านเจล การใช้สารสีสังเกตเห็นสีที่มีความแตกต่างของผลบวกและผลลบ นอกจากนี้อาจใช้ร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟฟิคหรือ lateral flow dipstick (LFD) (Mori et al., 2001)

3. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย/ โครงการวิจัย

พัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคข้อและสมองอักเสบในแพะให้มีความจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ในประเทศไทย และสามารถตรวจการติดเชื้อได้แม่นยำ ทำงานในภาคสนามได้

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเลือดแพะ

พื้นที่ในการศึกษาได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช ตรัง และกระบี่ แพะที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 312 ตัว มีอายุประมาณ 1 ปี - 2 ปี ไม่จำกัดเพศ แพะแสดงอาการข้อขาอักเสบ หรือเต้านมอักเสบ ระยะเวลาเก็บตัวอย่างในปี 2560 - 2561 การเก็บตัวอย่างจะเก็บในหลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวชนิด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดใหญ่บริเวณคอปริมาณ 5 มิลลิลิตร โดยเลือดปริมาณ 200 µl จะนำไปสกัด DNA เลือด 500 µl จะนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 3,500 rpm เพื่อเก็บน้ำเลือดไว้ทำการทดสอบด้วยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา ส่วนเลือดที่เหลือจะนำไปปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว และนำไปสกัด DNA ต่อไป

2. การสกัดสารพันธุกรรม

การสกัดสารพันธุกรรมจากเลือดและเม็ดเลือดขาวจะใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Kit (ThermoFisher, USA) โดยขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจะปฏิบัติตามคู่มือของบริษัท หลังจากสกัดแล้วจะทำการวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้จะทำการเก็บรักษาที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3. เทคนิค PCR

3.1 การออกแบบไพร์เมอร์สำหรับ PCR (PCR primer)

ในการออกแบบไพร์เมอร์ (forward และ backward primer) จะใช้โปรแกรม PrimerBlast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) โดยมีเป้าหมายคือยีน gag จาก CAE proviral genome (ACCESSION M33677.1, Saltarelli et al.,1990) ในการออกแบบจะคัดเลือกไพร์เมอร์ 2 – 3 คู่มาใช้สำหรับทดสอบและประเมินกับกลุ่มควบคุมบวก จากนั้นเลือก 1 – 2 คู่เพื่อใช้ทดสอบกับตัวอย่างจริงต่อไป

3.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR

การทำ PCR จะใช้ชุดเอนไซม์และบัฟเฟอร์ TopTaq Master Mix Kit (Qiagen, USA) ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วย

Component	Volume/reaction	Final concentration
10x TopTaq PCR Buffer*	5 µl	1X
dNTP mix (10 mM of each)	1 µl	200 µM of each dNTP
Primer A	Variable	0.1–0.5 µM
Primer B	Variable	0.1–0.5 µM
TopTaq DNA Polymerase	0.25 µl	1.25 units/reaction
DNA Template DNA	Variable	50 ng/ reaction
RNase-free water Template	Add to 50 µl	

ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะมีรอบการทำงานดังนี้

Initial denaturation 3 min 94^{O}C

3 step cycling : 35 cycles

Denaturation 30 sec 94^{O}C

Annealing 30 sec 63^{O}C

Extension 1 min 72^{O}C

Final extention 10 min 72^{O}C

ในการอ่านผล PCR จะนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไปทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) ที่ 1% agarose gel ใน Tris-Boric acid-EDTA buffer (TBE) ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตด้วยการย้อม SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, USA) และส่องดูด้วยแสงสีฟ้า (Blue-light transilluminator)

4. เทคนิค LAMP

4.1 การออกแบบไพร์เมอร์สำหรับ LAMP (LAMP primer)

เทคนิค LAMP จะใช้ไพร์เมอร์ 4 สาย การออกแบบไพร์เมอร์จะใช้ PrimerExplorer V5 (http:// http://primerexplorer.jp/e/) ในการออกแบบจะคัดเลือกไพร์เมอร์ 5 ชุด มาใช้สำหรับทดสอบและประเมินกับกลุ่มควบคุมบวก จากนั้นเลือก 1 – 2 ชุดเพื่อใช้ทดสอบกับตัวอย่างจริงต่อไป

4.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย LAMP

การทำ LAMP จะใช้ชุดเอนไซม์และบัฟเฟอร์ Bst 2.0 WarmStart® DNA Polymerase (NEB, USA) ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย

Component	Volume/reaction	Final concentration
10X Isothermal Amplification Buffer	2.5 µl	1X (contains 2 mM MgSO4)
MgSO4 (100 mM)	1.5 µl	6 mM (8 mM total)
dNTP Mix (10 mM)	3.5 µl	1.4 mM each
FIP/BIP Primers (25X)	1 µl	1.6 µM
F3/B3 Primers (25X)	1 µl	0.2 µM
LoopF/B Primers (25X)	1 µl	0.4 µM
Bst 2.0 DNA Polymerase (8,000 U/ml)	1 µl	320 U/ml
DNA Sample	variable	> 10 copies or more
Nuclease-free Water	to 25 µl	

ในการทำปฏิกิริยาจะทำที่อุณหภูมิ 60-65°C เป็นเวลา 30–60 นาที จากนั้นจะแช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ในการอ่านผล LAMP จะทำ 2 วิธี คือ Agarose gel electrophoresis และ SYBR Green dye

1) Agarose gel electrophoresis นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไปทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 1% agarose gel ใน Tris-Boric acid-EDTA buffer (TBE) ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตด้วยการย้อม SYBR Gold Nucleic

Acid Gel Stain (Invitrogen, USA) และส่องดูด้วยแสงสีฟ้า (Blue-light transilluminator) หลอดที่ทดสอบให้ผลบวกจะแสดงผลเป็นแถบยาวไม่สามารถระบุน้ำหนักโมเลกุลได้ชัดเจน (ladder-like band patterns)

2) SYBR Green dye เติม 10× SYBR Green dye (Invitrogen, USA) ปริมาตร 0.5 µl ลงในปฏิกิริยาที่เสร็จแล้ว และนำไปส่องดูด้วยแสงสีฟ้า ถ้าหลอดที่ทดสอบให้ผลบวกจะเรืองแสง ในขณะที่หลอดที่ให้ผลทดสอบลบจะยังคงสีส้มอยู่ ไม่มีการเรืองแสง

4.3 การทดสอบหาสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP

ปฏิกิริยาจะถูกทดสอบที่แตกต่างกัน 5 อุณหภูมิ คือ 61 ℃, 62 ℃, 63 ℃, 64 ℃, และ 65 ℃ และตรวจวัดการเกิดผลผลิตที่ช่วงเวลาต่างกัน 3 ช่วง คือ 15, 30, และ 45 min.

4.4 การทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค LAMP

ในการทดสอบความสามารถของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาว่าสามารถตรวจหา CAEV ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำเพียงใด จะทำโดยการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเชื้อในกระแสเลือดแพะที่มีรายงานในประเทศไทย ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย Anaplasma 16s ribosomal RNA gene, โปรโตซัว Theileria 18s ribosomal RNA gene และน้ำกลั่น

การหาความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยจะมีค่าที่เกี่ยวข้องคือ

ผลบวกจริง (true positive) มีการปนเปื้อนและตรวจพบได้

ผลบวกเท็จ (false positive) ไม่มีการปนเปื้อนแต่ตรวจพบ

ผลลบจริง (true negative) ไม่มีการปนเปื้อนและตรวจไม่พบ

ผลลบเท็จ (false negative) มีการปนเปื้อนแต่ตรวจไม่พบ

นำค่าเหล่านี้มาคำนวณหาความไวและความจำเพาะตามสูตรดังนี้

ความไว=จำนวนผลบวกจริง/(จำนวนผลบวกจริง+จำนวนผลลบเท็จ)×100

ความจำเพาะ=จำนวนผลลบจริง/(จำนวนผลลบจริง+จำนวนผลบวกเท็จ)×100

5. การหาลำดับเบส (nucleotide sequencing)

ตัวอย่างที่ให้ผล PCR ของยีนเป้าหมายเป็นบวก จะนำมาใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งผลผลิต PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน gag จาก CAE proviral genome (ACCESSION M33677.1, Saltarelli et al.,1990) และลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล NCBI Nucleotide (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) เพื่อศึกษาความเหมือนและความต่างด้วย NCBI Basic Local Alignment Search Tool

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การพัฒนาเทคนิค PCR ที่มีความจำเพาะต่อยีน CAEV gag

คณะผู้วิจัยได้ทำการออกแบบ คัดเลือกและหาความไวเชิงวิเคราะห์ของไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค PCR ใหม่แทนการเลือกใช้ชุดไพร์เมอร์ที่ได้ตีพิมพ์แล้ว (Eltahir et al.,2006; Gil et al.,2006; Brinkhof et al.,2010) เนื่องจาก 1) ชุดไพร์เมอร์ไม่ได้มีเป้าหมายที่ยีน gag 2) สถาวะของปฏิกิริยาและเอนไซม์ที่ใช้มีความแตกต่างกัน และ 3) ลำดับของนิวคลีไทด์ของ CAEV สายพันธุ์ในประเทศไทยมีความแตกต่างจากที่เคยรายงานในประเทศต่าง ๆ ทำให้ความจำเพาะแตกต่างจากที่ได้รายงานไป ดังนั้นเพื่อให้ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิคมีความเป็นจริงตามลักษณะของเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย ทางคณะผู้วิจัยได้ออกแบบไพร์เมอร์ใหม่จำนวน 5 คู่ (ตารางที่ 3) และได้ทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกไพร์เมอร์ที่ได้ให้ผลมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด โดยไพร์เมอร์ที่ออกแบบมาใหม่มีเป้าหมายอยู่ที่ยีน gag ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 512-1858 bp ของทั้ง CAEV proviral DNA (Accession NO M33677.1) และ CAEV complete genome (Accession NO NC_001463.1)

2. การทดสอบไพร์เมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจการติดเชื้อ CAEV

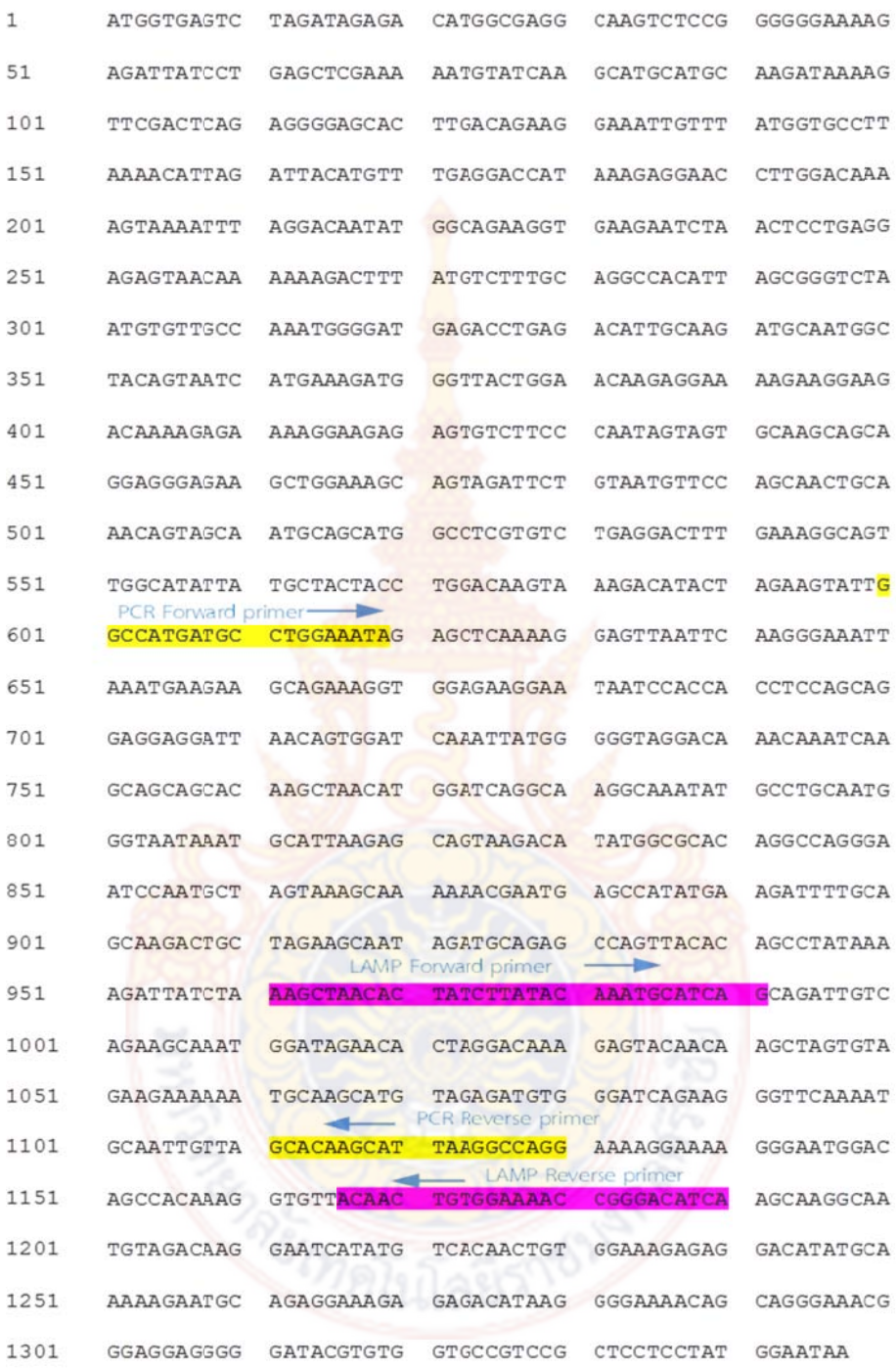
ปฏิกิริยาจะถูกทดสอบที่ Annealing temperature แตกต่างกัน 3 อุณหภูมิ คือ 61 ℃, 63 ℃, และ 65 ℃ โดยจะทำปฏิกิริยา 35 รอบ เอนไซม์ที่ใช้คือ TopTaq Master Mix Kit (Qiagen, USA) พบว่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันทั้ง 3 อุณหภูมิให้ผลการเกิดผลผลิตพีซีอาร์ไม่แตกต่างกัน น้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตเป็นไปตามที่คำนวน และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความถูกต้องเมื่อเทียบกับ DNA ต้นแบบ ยกเว้นการใช้ไพร์เมอร์ CAEV_1_F TTCGACTCAGAGGGGAGCAC และ CAEV_1_R AGCTTCTCCCTCCTGCTGCT ที่ได้ผลผลิตน้อยที่สุดในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ จากการทดสอบเทคนิค PCR จะใช้ Annealing temperature ที่อุณหภูมิ 63 ℃ และไพร์เมอร์ CAEV_5_F GGCCATGATGCCTGGAAATA และ CAEV_5_R CCTGGCCTTAATGCTTGTGC ได้ถูกเลือกมาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป เนื่องจากมีเป้าหมายในบริเวณเดียวกับเทคนิค LAMP

3. การทดสอบความจำเพาะ (specificity test) ของเทคนิค PCR

การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ทำโดยการทดสอบกับตัวอย่าง DNA จากเลือดของแพะที่มีการตรวจพบเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่มีการระบาดในประเทศไทย ได้แก่ *Anaplasma* spp และ *Theileria* spp ผลการทดสอบพบว่าไพร์เมอร์และสภาวะของ PCR ที่ใช้ให้ผลบวกเฉพาะยีน CAEV gag เท่านั้น

4. การทดสอบความไว (Sensitivity test) ของเทคนิค PCR

การทดสอบความไวของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ทำโดยการทดสอบกับตัวอย่าง DNA มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จากนั้นทำ 10-fold serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0.1 ng/µl, 0.01 ng/µl, และ 0.001 ng/µl นำ DNA แต่ละความเข้มข้นมาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการทำ PCR เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สภาวะและไพร์เมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยีนเป้าหมายได้ ผลจากการทดสอบพบว่าค่าความไวสูงสุดของเทคนิค PCR อยู่ที่ 0.1 ng/µl



รูปที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAEV gag ลูกศรแสดงทิศทางและตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR และ LAMP

ตารางที่ 3 ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับทดสอบเทคนิค PCR

Primer	Length (bp)	Tm (^{O}C)	GC (%)	Product Size (bp)
CAEV_1_F TTCGACTCAGAGGGGAGCAC	20	62.9	60.0	
CAEV_1_R AGCTTCTCCCTCCTGCTGCT	20	63.0	60.0	363
CAEV_2_F TTCGACTCAGAGGGGAGCAC	20	62.9	60.0	
CAEV_2_R TCTCATCCCCATTTGGCAAC	20	63.1	50.0	324
CAEV_3_F GTTCGACTCAGAGGGGAGCA	20	62.9	60.0	
CAEV_3_R TCTCATCCCCATTTGGCAAC	20	63.1	50.0	325
CAEV_4_F GGCCATGATGCCTGGAAATA	20	63.0	50.0	
CAEV_4_R TGTGGCTGTCCATTCCCTTT	20	62.8	50.0	558
CAEV_5_F GGCCATGATGCCTGGAAATA	20	63.0	50.0	
CAEV_5_R CCTGGCCTTAATGCTTGTGC	20	62.9	55.0	531

M : 100 bp DNA marker

1 : CAEV_1_F และ CAEV_1_R

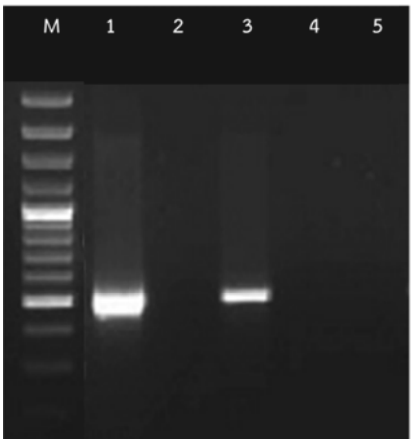
2 : CAEV_2_F และ CAEV_2_R

3 : CAEV_3_F และ CAEV_3_R

4 : CAEV_4_F และ CAEV_4_R

5 : CAEV_5_F และ CAEV_5_R

รูปที่ 4 ผลผลิตพีซีอาร์จากการทดสอบไพร์เมอร์จำนวน 5 คู่ที่ใช้ในเทคนิค PCR ที่จำเพาะต่อยีน CAEV gag



M : 100 bp DNA marker

1 : positive control

2 : negative control

3 : CAEV infected sample

4 : Anaplasma infected sample

5 : Theileria infected sample

รูปที่ 5 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PCR ต่อยีน CAEV gag

รูปที่ 6 การทดสอบความไวของเทคนิค PCR ต่อยีน CAEV gag

5. การพัฒนาเทคนิค LAMP ที่มีความจำเพาะต่อยีน CAEV gag

คณะผู้วิจัยได้ทำการออกแบบ ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาและหาความไวความจำเพาะของไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค LAMP เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบภาคสนามและนำไปให้บริการแก่เจ้าของสัตว์ทั้งรายย่อยและรายฟาร์ม เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิค LAMP มีความเป็นจริงตามลักษณะของเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย ทางคณะผู้วิจัยได้ออกแบบไพร์เมอร์ใหม่จำนวน 5 คู่ (ตารางที่ 4) เพื่อทดสอบคัดเลือกไพร์เมอร์ที่ให้ผลน่าเชื่อถือมากที่สุด โดยยีนเป้าหมายคือ CAEV gag มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 512-1858 bp ของทั้ง CAEV proviral DNA (Accession NO M33677.1) และ CAEV complete genome (Accession NO NC_001463.1) เช่นเดียวกับที่ได้พัฒนาในเทคนิค PCR

6. การทดสอบไพร์เมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจการติดเชื้อ CAEV ด้วยเทคนิค LAMP

ปฏิกิริยาจะถูกทดสอบที่ Annealing temperature แตกต่างกัน 3 อุณหภูมิ คือ 61 ℃, 63 ℃, และ 65 ℃ โดยจะทำปฏิกิริยา 60 นาที เอนไซม์ที่ใช้คือ Bst 2.0 WarmStart® DNA Polymerase (NEB, USA) พบว่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันทั้ง 3 อุณหภูมิให้ผลการเกิดผลผลิตแตกต่างกันเมื่อทำการอ่านผลปฏิกิริยาจะพบว่าที่อุณหภูมิ 65℃ จะเกิดผลเร็วที่สุด รองลงมาคือ 63℃ และ 61℃ ตามลำดับ และเวลาที่สามารถเริ่มอ่านผลได้ชัดเจนคือ 32 นาที

7. การทดสอบความจำเพาะ (specificity test) ของเทคนิค LAMP

การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP ทำโดยการทดสอบกับตัวอย่าง DNA จากเลือดของแพะที่มีการตรวจพบเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่มีการระบาดในประเทศไทย ได้แก่ *Anaplasma* spp และ *Theileria* spp ผลการทดสอบพบว่าไพร์เมอร์และสภาวะของ LAMP ที่ใช้ให้ผลบวกเฉพาะยีน CAEV gag เท่านั้น

8. การทดสอบความไว (Sensitivity test) ของเทคนิค LAMP

การทดสอบความไวของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP ทำโดยการทดสอบกับตัวอย่าง DNA มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จากนั้นทำ 10-fold serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0.1 ng/µl, 0.01 ng/µl, และ 0.001 ng/µl นำ DNA แต่ละความเข้มข้นมาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการทำ LAMP เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สภาวะและไพร์เมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยีนเป้าหมายได้ ผลจากการทดสอบพบว่าค่าความไวสูงสุดของเทคนิค LAMP อยู่ที่ 0.01 ng/µl ส่วนความเข้มข้น 0.001 ng/µl ให้ผลทดสอบไม่ชัดเจนเมื่อทำการอ่านผลด้วย SYBR dye และ Agarose gel electrophoresis

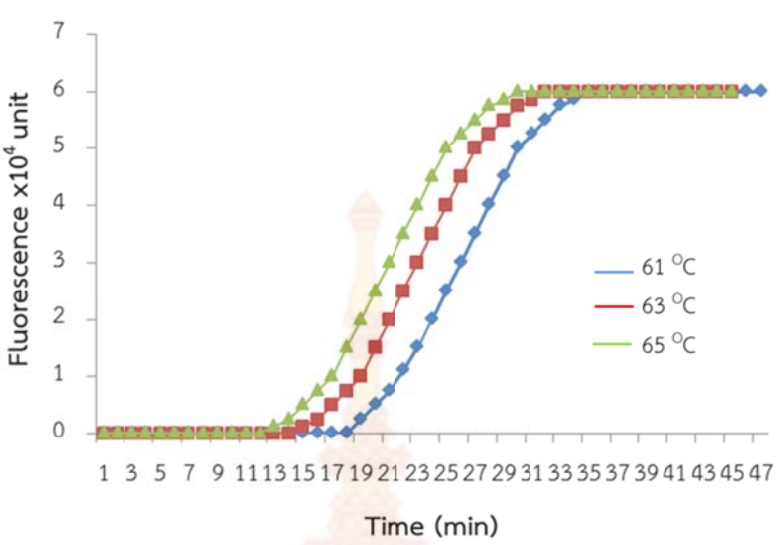
9. การทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิก (Evaluation of the assay)

การทดสอบความน่าเชื่อถือของเทคนิค PCR และ LAMP ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในโครงการนี้เพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อ CAEV ในแพะ ทำได้โดยการทดสอบกับตัวอย่างเลือดของแพะที่แสดงอาการข้ออักเสบหรือเต้านมอักเสบจำนวน 312 ตัวอย่าง เมื่อได้ผลแล้วได้ทำการยืนยันความถูกต้องด้วยเทคนิค nucleotide sequencing สรุปผลดังแสดงในตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าความสามารถในการตรวจการติดเชื้อทั้งสองเทคนิคมีค่าใกล้เคียงกันโดยเทคนิค PCR มีความแตกต่างจาก LAMP เพียง 1 ตัวอย่าง จากการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน gag พบว่า ทั้ง LAMP และ PCR สามารถตรวจการติดเชื้อได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

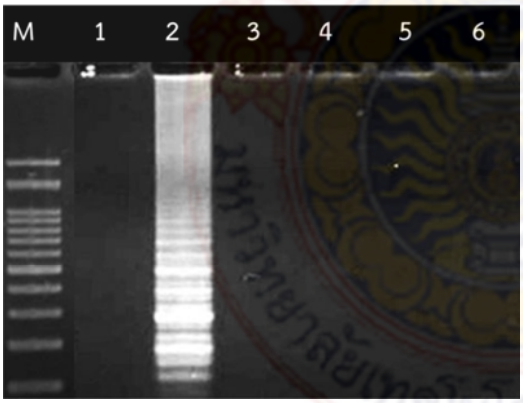
ตารางที่ 4 ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับทดสอบเทคนิค LAMP

Label	5'pos	3'pos	Length (bp)	Tm (^{O}C)	Sequence
F3	968	991	24	55.15	CACTATCTTATACAAATGCATCAG
B3	1166	1183	18	56.95	CCGGTTTTCCACAGTTGT
FIP			48		ACATCTCTACATGCTTGCATTTTTT-GATAGAACACTAGGACAAAGAGT
BIP			43		ATCAGAAGGGTTCAAAATGCAATTG-AACACCTTTGTGGCTGTC
F2	1012	1034	23	56.86	GATAGAACACTAGGACAAAGAGT
F1c	1055	1079	25	60.03	ACATCTCTACATGCTTGCATTTTTT
B2	1148	1165	18	56.97	AACACCTTTGTGGCTGTC
B1c	1083	1107	25	60.77	ATCAGAAGGGTTCAAAATGCAATTG
Label	**5'pos**	**3'pos**	**Length (bp)**	**Tm (^{O}C)**	**Sequence**
F3	267	285	19	55.8	CTTTATGTCTTTGCAGGCC
B3	451	468	18	57.6	TTTCCAGCTTCTCCCTCC
FIP			43		GCCATTGCATCTTGCAATGTCTC-CATTAGCGGGTCTAATGTGT
BIP			45		CATGAAAGATGGGTTACTGGAACA-CTACTATTGGGAAGACACTCT
F2	287	306	20	56.82	CATTAGCGGGTCTAATGTGT
F1c	328	350	23	62.81	GCCATTGCATCTTGCAATGTCTC
B2	419	439	21	55.53	CTACTATTGGGAAGACACTCT
B1c	360	383	24	60.77	CATGAAAGATGGGTTACTGGAACA
Label	**5'pos**	**3'pos**	**Length (bp)**	**Tm (^{O}C)**	**Sequence**
F3	370	388	19	56.42	GGGTTACTGGAACAAGAGG
B3	545	563	19	56.03	GCATAATATGCCAACTGCC
FIP			44		GCTTTCCAGCTTCTCCCTCC-

					GAAGACAAAAGAGAAAAGGAAGAG
BIP			45		AGTAGATTCTGTAATGTTCCAGCAA-TTTCAAAGTCCTCAGACACG
F2	397	420	24	57.43	GAAGACAAAAGAGAAAAGGAAGAG
F1c	451	470	20	62.14	GCTTTCCAGCTTCTCCCTCC
B2	525	544	20	57.14	TTTCAAAGTCCTCAGACACG
B1c	471	495	25	60.11	AGTAGATTCTGTAATGTTCCAGCAA
Label	**5'pos**	**3'pos**	**Length (bp)**	**Tm (^{O}C)**	**Sequence**
F3	1020	1041	22	56.45	ACTAGGACAAAGAGTACAACAA
B3	1228	1248	21	56.44	CATATGTCCTCTCTTTCCACA
FIP			45		GGCCTTAATGCTTGTGCTAACAATT-AATGCAAGCATGTAGAGATG
BIP			43		GGACAGCCACAAAGGTGTTAC-GTTGTGACATATGATTCCTTGT
F2	1059	1078	20	55.27	AATGCAAGCATGTAGAGATG
F1c	1103	1127	25	62.56	GGCCTTAATGCTTGTGCTAACAATT
B2	1206	1227	22	56.05	GTTGTGACATATGATTCCTTGT
B1c	1147	1167	21	60.98	GGACAGCCACAAAGGTGTTAC
Label	**5'pos**	**3'pos**	**Length (bp)**	**Tm (^{O}C)**	**Sequence**
F3	273	290	18	57.46	GTCTTTGCAGGCCACATT
B3	490	508	19	55.97	CTACTGTTTGCAGTTGCTG
FIP			43		CCATCTTTCATGATTACTGTAGCCA-TGTTGCCAAATGGGGATG
BIP			44		AGAGAAAAGGAAGAGAGTGTCTTCC-AATCTACTGCTTTCCAGCT
F2	304	321	18	57.22	TGTTGCCAAATGGGGATG
F1c	347	371	25	60.7	CCATCTTTCATGATTACTGTAGCCA
B2	460	478	19	55.47	AATCTACTGCTTTCCAGCT
B1c	406	430	25	61.81	AGAGAAAAGGAAGAGAGTGTCTTCC



รูปที่ 7 การทดสอบไพร์เมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจการติดเชื้อ CAEV ด้วยเทคนิค LAMP



M : 100 bp DNA marker

1 : negative control

2 : 1 ng infected sample

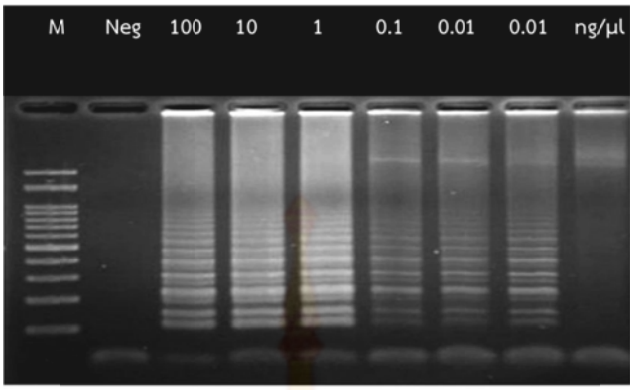
3 : 1 ng Anaplasma infected sample

4 : 10 ng Anaplasma infected sample

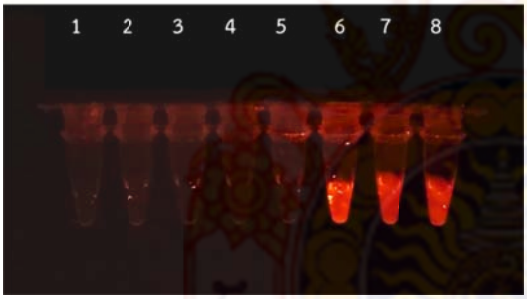
5 : 1 ng Theileria infected sample

6 : 10 ng Theileria infected sample

รูปที่ 8 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค LAMP ต่อยีน CAEV gag



รูปที่ 9 การทดสอบความไวของเทคนิค LAMP ต่อยีน CAEV gag



1 : 1 ng Anaplasma infected sample

2 : 10 ng Anaplasma infected sample

3 : 1 ng Theileria infected sample

4 : 10 ng Theileria infected sample

5 : negative control

6 : positive control

7 : 0.1 ng infected sample

8 : 0.01 ng infected sample

รูปที่ 10 การอ่านผลเทคนิค LAMP ด้วยการเติม SYBR dye และนำไปส่องด้วยแสงสีฟ้า

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคข้อและสมองอักเสบในแพะให้มีความจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ในประเทศไทย สามารถตรวจการติดเชื้อได้แม่นยำ สะดวก และทำงานในภาคสนามได้ โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อนำมาใช้ตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคข้อและสมองอักเสบในแพะ

เทคนิคการตรวจการติดเชื้อไวรัสที่ได้พัฒนาขึ้นมีอยู่ด้วยกัน 2 เทคนิค คือ PCR และ LAMP โดยที่เทคนิคทั้งสองมียีนเป้าหมายเดียวกันคือ CAEV gag ที่สามารถตรวจ CAEV proviral DNA และ CAEV complete genome ได้ นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเป้าหมายยังเป็นส่วนที่คงลำดับ ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ และเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ซ้ำหรือใกล้เคียงกับเชื้อชนิดอื่นที่มีการระบาดในประเทศไทย อย่างไรก็ตามทั้งสองเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นมามีความแตกต่างกันในความสามารถของการตรวจการติดเชื้อ ความไว ความจำเพาะ เวลาที่ใช้ในการตรวจ และความต้องการเครื่องมือใช้ในการตรวจ

1. ไพร์เมอร์และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจการติดเชื้อ CAEV มีดังนี้

PCR : ทำ 35 รอบ โดยกำหนดสภาวะ Initial denaturation 3 min 94^{O}C, Denaturation 30 sec 94 ^{O}C, Annealing 30 sec 63 ^{O}C, Extension 1 min 72 ^{O}C, Final extention 10 min ^{O}C

ไพร์เมอร์ที่ใช้ CAEV_5_F GGCCATGATGCCTGGAAATA และ CAEV_5_R CCTGGCCTTAATGCTTGTGC

LAMP : กำหนดอุณหภูมิ 65^{O}C 60 min เริ่มอ่านผลได้ในนาทีที่ 32

ไพร์เมอร์ที่ใช้	F3	GTCTTTGCAGGCCACATT
	B3	CTACTGTTTGCAGTTGCTG
	FIP	CCATCTTTCATGATTACTGTAGCCA-TGTTGCCAAATGGGGATG
	BIP	AGAGAAAAGGAAGAGAGTGTCTTCC-AATCTACTGCTTTCCAGCT
	F2	TGTTGCCAAATGGGGATG
	B2	AATCTACTGCTTTCCAGCT

2. ความจำเพาะของการตรวจการติดเชื้อ

การตรวจการติดเชื้อด้วยเทคนิค PCR และ LAMP มีความจำเพาะต่อการตรวจค่อนข้างสูง เนื่องจากให้ผลลบต่อการทดสอบด้วยเชื้ออื่น ๆ ที่มีการระบาดอยู่ในแพะในพื้นที่เดียวกันคือ *Anaplasma* spp. และ *Theileria* spp.

3. ความไวของการตรวจการติดเชื้อ

โดยทั่วไปค่าความไวในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายของเทคนิค PCR จะมีค่าประมาณ 0.1-100 ng/µl หรือ 10^{2}-10^{6} copy/µl ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ ความสามารถในการจับกับเป้าหมายของไพร์เมอร์ ความยาวของผลผลิต PCR คุณภาพของ DNA เป็นต้น ในการพัฒนาเทคนิค PCR ตรวจการติดเชื้อ CAEV ได้ค่าความไวของเทคนิคที่ 0.1 ng/µl นับว่าเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง

ส่วนค่าความไวในการตรวจด้วยเทคนิค LAMP โดยทั่วไปจะค่าประมาณ 10 fg/µl – 10 ng/µl ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความซับซ้อนและความบริสุทธิ์ของ DNA เป้าหมาย โครงสร้างผลผลิต LAMP ในโครงการนี้ค่าความไวของการตรวจการติดเชื้อ CAEV ด้วย LAMP มีค่า 0.01 ng/µl ส่วนความเข้มข้น 0.001 ng/µl ให้ผลทดสอบไม่ชัดเจนเมื่อทำการอ่านผลด้วย SYBR dye และ agarose gel electrophoresis และสามารถเริ่มอ่านผลการทดสอบได้ตั้งแต่นาทีที่ 32

4 ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจ

เทคนิค LAMP ใช้เวลาประมาณ 1.5-2 ชั่วโมงในการทำเริ่มตั้งแต่การสกัด DNA เตรียมปฏิกิริยาจนถึงการอ่านผล ซึ่ง LAMP สามารถเริ่มอ่านผลการทดสอบได้เร็วกว่าเทคนิค PCR อย่างเห็นได้ชัดเจน และในการทำงานทั้งหมด LAMP ใช้เวลาน้อยกว่า PCR ซึ่งต้องใช้เวลาทั้งหมดในการทำงานประมาณ 4-6 ชั่วโมง

โครงการวิจัยการพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคข้อและสมองอักเสบในแพะด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล ได้พัฒนาเทคนิค PCR และ LAMP ขึ้นมาให้มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทย โดยเทคนิคทั้งสองที่ได้พัฒนาขึ้นมาสามารถนำไปใช้ในการตรวจการติดเชื้อในแพะ และให้บริการแก่เกษตรกรเจ้าของสัตว์ได้ นอกจากนี้ข้อมูลของสายพันธุ์ไวรัสที่ได้ และข้อมูลเชิงระบาดวิทยาจะเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการวางแผนและควบคุมป้องกันโรคต่อไป

บรรณานุกรม

ช้องมาศ อันตรเสน, ตระการศักดิ์ แพไธสง และพิไลพร เจติยวรรณ. 2554 ความชุกทางซีรัมวิทยาและปัจจัยเสี่ยงการติดเชื้อ Brucella melitensis และ caprine arthritis-encephalitis virus ในแพะภาคตะวันตกของประเทศไทย วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 23 (1):61-86

นิอร รัตนภพ, ธีระ รักความสุข และ สิริลักษณ์ จาละ. 2552. ความชุกทางซีรัมวิทยาของการติดเชื้อไวรัสข้ออักเสบและสมองอักเสบในแพะที่เลี้ยงในภาคกลางและภาคตะวันตกของประเทศไทย 63-69. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 (สาขาสัตวแพทยศาสตร์).มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปริญญา เฉิดโฉม, กนกพร ภาคีฉาย, อุไรวรรณ อินทศร, ปราโมทย์ เพชรศรี. 2558 แนวโน้มการบริโภคเนื้อแพะและแกะในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับสังคมศาสตร์และมนุษยศาสตร์ 21 : 1 : 201-222

สุพล จันทโคตร และ มนัสชัย วัฒนกุล. 2547. กรณีศึกษาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสข้ออักเสบและสมองอักเสบในแพะที่ฟาร์มในจังหวัดราชบุรี. จุลสารปศุสัตว์เขต 7 9(1-3) : 58-69.

ลิน ตัน นยี สาโรช งามขำ คณิศักดิ์ อรวีระกุล ปราจีน วีรกุล มงคล เตชะกำพุ 2554 ความชุกและปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวพันกับการติดเชื้อไวรัสข้ออักเสบและสมองอักเสบในแพะในภาคตะวันตกของประเทศไทย เวชชสารสัตวแพทย์ 41;3:353-360

อุราศรี ตันตสวัสดิ์, วัฒนา วัฒนวิจารณ์, วาสนา ภิญโญชนม์, อารุณี มาลยมาน, อารี ทรัพย์เจริญ และ สุจิรา ปาจริยานนท์. 2528. Caprine arthritis-encephalitis like virus infection ในแพะพันธุ์ซาเนน, 376-377. ใน รายงานการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 12, สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

Brinkhof, J. and C.van Maanen. 2007. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. Clinical and Vaccine Immunology. 14(9): 1210-1214.

Brinkhof JM, Houwers DJ, Moll L, Dercksen D, van Maanen C. 2010. Diagnostic

performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. Vet Microbiol. 142(3-4):193-8.

Fu S, Qu G, Guo S, Ma L, Zhang N, Zhang S, Gao S, Shen Z. 2011. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. Appl Biochem Biotechnol. 163(7):845-50.

Harmache A, Vitu C, Russo P, Bouyac M, Hieblot C, Peveri P, Vigne R, Suzan M. 1995. The caprine arthritis encephalitis virus tat gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo. J Virol. 69(9):5445-54.

Harmache A, Vitu C, Guiguen F, Russo P, Bertoni G, Pepin M, Vigne R, Suzan M. Priming with tat-deleted caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats from challenge with pathogenic CAEV. J Virol. 1998;72(8):6796-804

Kahn, C.M. and Line S., editors. 2008. The Merck veterinary manual Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Caprine arthritis-encephalitis.

Konishi, M., T. Yamamoto, T. Shimada, H. Shirafuji, K. Kameyama, H. Suntsui, and K.Murakami. 2010. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody against caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant protein of the precursor of the major core protein, p55gag. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 22: 415-419.

Larruskain A, Jugo BM. 2013. Retroviral infections in sheep and goats: small ruminant lentiviruses and host interaction. Viruses. 5(8):2043-61.

Minguijón E, Reina R, Pérez M, Polledo L, Villoria M, Ramírez H, Leginagoikoa I, Badiola JJ, García-Marín JF, de Andrés D, Luján L, Amorena B, Juste RA. 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. Vet Microbiol. 181(1-2):75-89

Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun. 289(1):150-4.

Nagamine K, Hase T, Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes. 16(3):223-9.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28(12):E63

Office International des Epizooties (OIE). 2008. Caprine arthritis-encephalitis and maedi-visna, pp.983-991. In Manual of Standards for diagnostic Test and Vaccines for terrestrial animals (mammal, birds and bees). Ed. OIE, 6th ed., Volume 2, OIE, Paris, France.

Reina R, Berriatua E, Luján L, Juste R, Sánchez A, de Andrés D, Amorena B. 2009. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. Vet J. 182(1):31-7.

Saltarelli M, Querat G, Konings DA, Vigne R, Clements JE. 1990 Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. Virology. 179(1):347-64.