

การพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ
Ehrlichia canis, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis* and *Anaplasma platys* ในสุนัข
Development of Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection
of *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis* and *Anaplasma platys* in Dogs

เพ็ญภา ตาคำ¹ เรือนแก้ว ประพฤติ² แสงทอง พงษ์เจริญกิต³ และวสิน เจริญตันธนกุล^{1*}

Pennapa Takam¹, Reankeaw Praphet², Saengtong Pongjareankit³
and Wasin Charentantanakul^{1*}

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

³สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

¹Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

²Institute of Product Quality and Standardization, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

³Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: wasin@mju.ac.th

Received: April 30, 2020

Revised: March 24, 2021

Accepted: July 15, 2021

Abstract

This study developed multiplex polymerase chain reaction (mPCR) as a diagnostic technique for canine blood parasite infections. It was improved from our previous version of technique that could detect only *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* (protozoa), and *Babesia canis* (protozoa). In this study, we developed mPCR for simultaneous detection of *VirB9* gene of *E. canis*, *18S rRNA* gene of *H. canis* and *B. canis*, and *groEL* of *Anaplasma platys* in canine blood sample. All four pathogens require brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) as carrier. Infected dogs usually present similar symptoms, i.e. anemia, anorexia, and lethargy. Current diagnostic techniques employ Wright Giemsa staining of thin blood smear, immunochromatographic assay for detection of specific antibody, and PCR. Among these techniques, PCR has the highest sensitivity, but it is time-consuming, particularly when used for detection of individual pathogen. The mPCR technique developed in this study should reduce duration of assay for simultaneous detection of these four pathogens.

Keywords: *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis*, *Anaplasma platys*, multiplex PCR

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้พัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ เพื่อช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดในสุนัข โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นต่อยอดจากเทคนิคที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้ ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* (โปรโตซัว) และ *Babesia canis* (โปรโตซัว) โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้สามารถตรวจหา *VirB9* ของเชื้อ *E. canis*, ยีน *18S rRNA* ของเชื้อ *H. canis* และ *B. canis* และยีน *groEL* ของเชื้อ *Anaplasma platys* จากตัวอย่างเลือดของสุนัข เชื้อก่อโรคทั้งสี่ชนิดมีพาหะร่วมกันคือเห็บสุนัขสีน้ำตาล (*Rhipicephalus sanguineus*) และทำให้สุนัขแสดงอาการป่วยที่คล้ายกัน ได้แก่ ซีด เบื่ออาหาร และอ่อนแรง วิธีการวินิจฉัยการติดเชื้อเหล่านี้ในปัจจุบันใช้วิธีการย้อมฟิล์มเลือดบางด้วยสี Wright-Giemsa วิธี Immunochromatographic เพื่อตรวจหาแอนติบอดี และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในวิธีต่างๆ เหล่านี้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสให้ความไวในการตรวจพบเชื้อสูงที่สุด แต่ใช้ระยะเวลาในการตรวจนานที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อตรวจหาเชื้อก่อโรคทีละเชื้อ เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ที่พัฒนาขึ้นนี้จะช่วยลดระยะเวลาในการวินิจฉัยการติดเชื้อโรคทั้งสี่ชนิดได้

คำสำคัญ: *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis*, *Anaplasma platys*
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

บทนำ

โรคพยาธิในเลือด (Blood parasites) เป็นโรคที่พบได้บ่อยในสุนัขในประเทศไทย โรคนี้เกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัว ได้แก่ *Hepatozoon canis*, *Babesia canis* และ *Babesia gibsoni* เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bartonella*

vinsonii, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma platys* และ *Anaplasma phagocytophila* (Little, 2010; Baneth, 2011; Chomel, 2011; Solano-Gallego et al., 2016) โรคนี้มีพาหะ คือ เห็บสุนัขสีน้ำตาล (*Rhipicephalus sanguineus*) ที่มีเชื้อก่อโรคอยู่ภายในตัว สำหรับประเทศไทยเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อย ได้แก่ *E. canis* (ก่อโรคชื่อว่า Ehrlichiosis), *H. canis* (ก่อโรคชื่อว่า Hepatozoonosis), *B. canis* (ก่อโรคชื่อว่า Babesiosis) และ *A. platys* (ก่อโรคชื่อว่า Anaplasmosis) (Jittapalapong et al., 2006; Laummaunwai et al., 2014; Piratae et al., 2015; Liu et al., 2016) สุนัขติดเชื้อ *E. canis*, *B. canis* และ *A. platys* จากการถูกเห็บที่มีเชื้อกัดและเชื้อถูกปล่อยผ่านทางน้ำลายของเห็บเข้าสู่กระแสเลือดของสุนัข และติดเชื้อ *H. canis* จากการกินเห็บที่มีเชื้อเข้าไป (Pantchev et al., 2015)

เมื่อเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดของสุนัข เชื้อจะติดเข้าสู่เซลล์เป้าหมายต่างๆ ได้แก่ เชื้อ *E. canis*, *E. chaffeensis* และ *E. ewingii* จะติดเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (Monocyte) และลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) เชื้อ *H. canis* ติดเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ และนิวโทรฟิล (Neutrophil) เชื้อ *B. canis* และ *B. gibsoni* ติดเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง เชื้อ *A. platys* และ *A. phagocytophila* ติดเข้าสู่เกล็ดเลือด (Platelets) และเชื้อ *B. vinsonii* ติดเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (Endothelial cells) (Skotarczak, 2003; Carrade et al., 2009; Baneth et al., 2015) เชื้อเหล่านี้มีระยะฟักตัวประมาณ 2-3 สัปดาห์ ก่อนจะแสดงอาการทางคลินิก ซึ่งที่พบบ่อย ได้แก่ โลหิตจาง เยื่อเมือกซีด ไข้และซึม สุนัขบางตัวที่ติดเชื้อ *E. canis* จะมีเลือดกำเดาออกง่ายและอาจแสดงอาการทางประสาทร่วมด้วย สุนัขบางตัวที่ติดเชื้อ *H. canis* อาจแสดงอาการเจ็บกล้ามเนื้อขาโดยเฉพาะขาหลัง ทำให้ขาหลังไม่มีแรงลุกยืนลำบาก จนถึงเป็นอัมพาตของขาหลัง สุนัขอายุน้อยมักจะตายถ้าไม่ได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้องและได้รับการรักษาทันเวลา

ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคพยาธิในเลือดในสุนัขสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (Rapid test kit) ซึ่งให้ผลตรวจรวดเร็ว สามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *E. canis*, *E. ewingii*, *A. platys* และ *A. phagocytophila* ได้ แต่ยังไม่สามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้ออื่นๆ นอกเหนือจากนี้ได้ วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ สามารถบอกได้เพียงว่าสุนัขมีแอนติบอดีต่อเชื้อ แต่ไม่สามารถแยกแยะได้ว่าแอนติบอดีนั้นเกิดจากการที่สุนัขกำลังติดเชื้อหรือเป็นแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อครั้งก่อน วิธีการทำฟิล์มเลือดบาง (Thin blood smear) และย้อมด้วยสี Wright–Giemsa เพื่อตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้มีข้อดี คือ ให้ผลตรวจรวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายน้อย แต่มีข้อจำกัด คือ มีความไว (Sensitivity) ต่ำ และต้องอาศัยความชำนาญของผู้ตรวจ และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งมีทั้งวิธีปฏิกิริยา PCR แบบทั่วไป (Conventional PCR) ที่ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อทีละเชื้อ และวิธีปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์ (Multiplex real-time PCR) ที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมได้ตั้งแต่ 2 เชื้อขึ้นไปพร้อมกัน (Bell and Patel, 2005; Peleg *et al.*, 2010; Harrus and Waner, 2011; Allison and Little, 2013; Kongklieng *et al.*, 2014; René-Martellet *et al.*, 2015; Modrý *et al.*, 2017) ซึ่งวิธีปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์ต้องอาศัยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบเวลาจริงที่มีราคาสูงมากไม่ได้มีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป วิธีปฏิกิริยา PCR มีข้อดี คือ มีความไวและความจำเพาะ (Specificity) สูง สามารถตรวจได้ทุกชนิดเชื้อและเป็นวิธีทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ตรวจวินิจฉัยยืนยันการติดเชื้อพยาธิในเลือด แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ มีขั้นตอนที่ซับซ้อนและใช้เวลานานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นโดยเฉพาะเมื่อตรวจทีละเชื้อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาต่อยอดเทคนิคการตรวจหาเชื้อพยาธิในเลือดด้วยวิธีปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์ (multiplex PCR; mPCR) โดยในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิค mPCR

ที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. canis*, *H. canis* และ *B. canis* พร้อมกันได้ (Nithikadpanich *et al.*, 2019) ในงานวิจัยนี้เทคนิค mPCR ถูกพัฒนาขึ้นให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. Canis*, *H. canis*, *B. canis* และ *A. platys* ได้พร้อมกัน 4 ชนิด โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจะช่วยลดระยะเวลาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างเลือดสุนัข

เจาะเก็บเลือดปริมาตร 2 มล. จากหลอดเลือดดำขาหน้า (Cephalic vein) ของสุนัขจากศูนย์พักพิงสุนัขในอำเภอตอยสะเกิด และอำเภอสนป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวนรวม 195 ตัว ใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA (BD Vacutainer, USA) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C. ในระหว่างรอการสกัดดีเอ็นเอ งานวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (Approval No. MACUC 005S/2562)

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดทำภายใน 12 ชั่วโมงหลังได้รับเลือด โดยเปิดตัวอย่างเลือดปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มล. กลับหลอด 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มล. ผสมตะกอนกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสทำซ้ำ 1 ครั้ง แล้วเติมสาร 5% Chelex resin (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Proteinase K (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 มก./มล.) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56°C. นาน 30 นาที แล้วบ่มต่อ

ที่อุณหภูมิ 95°ซ. นาน 10 นาที จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เก็บส่วนใสให้หลอดปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่แล้วเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ -20°ซ. ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร โดยเครื่อง Nanodrop 2000/2000C spectrophotometer V1.0 (Thermo Fisher Scientific, USA)

การตรวจสอบยีน *VirB9* ของ *E. canis*, *18S rRNA* ของ *H. canis* และ *B. canis* และ *groEL* ของ *A. platys*

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด Quick Taq® HS DyeMix (Toyobo, Japan) โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Primer sequence for *VirB9* gene of *E. canis*, *18S rRNA* gene for *H. canis* and *B. canis*, and *groEL* gene for *A. platys*

Pathogen	Gene	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (base pair; bp)	T _m
<i>E. canis</i>	<i>VirB9</i>	Ehr1401F	CCATAAGCATAGCTGATAACCCTGTTACAA	380	62
		Ehr1780R	TGGATAATAAAACCGTACTATGTATGCTAG		
<i>H. canis</i>	<i>18S</i>	Hs462F	TGTGTACAAAGGGCAGGGACG	462	62
	<i>rRNA</i>	Hs462R	GCGGCTTAATTTGACTCAACAC		
<i>B. canis</i>	<i>18S</i>	Ba103F	CCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACA	619	68
	<i>rRNA</i>	Ba721R	CCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCTCAAG		
<i>A. platys</i>	<i>groEL</i>	Ap724F	AAGGCGAAAGAAGCAGTCTTA	724	58
		Ap724R	CATAGTCTGAAGTGGAGGAC		

สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายทั้ง 4 ยีนเหมือนกัน ได้แก่ Initial-denaturation (94°ซ. นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ) Denaturation (94°ซ. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) Annealing (58°ซ. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) Extension (68°ซ. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) และ Final extension (72°ซ. นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ)

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาแยกตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจล (Agarose gel; Biobasic, Canada) ที่ความเข้มข้น 2% และใช้ 1x Tris-

Borate-EDTA (TBE) buffer (Biobasic) เป็นตัวนำไฟฟ้า ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 60 นาที ย้อมเจลด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) (Biobasic) เพื่อให้เห็นแถบดีเอ็นเอ ตัดเจลของแถบดีเอ็นเอที่ขึ้นตรงตำแหน่งขนาด 380 bp (สำหรับยีน *VirB9*) 462 bp (สำหรับยีน *18S rRNA* ของ *H. canis*) 619 bp (สำหรับยีน *18S rRNA* ของ *B. canis*) และ 724 bp (สำหรับยีน *groEL*) มาทำบริสุทธิ์ด้วย PCR Clean-Up & Gel Extraction Kit (Bio-Helix, Taiwan) แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) ที่บริษัท 1st Base จำกัด ประเทศมาเลเซีย เปรียบเทียบลำดับ

นิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST ใช้ดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (Positive control) ของปฏิกิริยา mPCR ต่อไป

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน Annealing

เตรียมปฏิกิริยา PCR ที่สภาวะ Initial-denaturation (94°C. นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ) Denaturation (94°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) Annealing (57, 58, 59 และ 60°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) Extension (68°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) และ Final extension (72°C. นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ) ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพโรเมอร์ที่ความเข้มข้น 500 nM และดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร (10⁴ copy numbers) ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร อ่านผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงเหนือม่วง (Ultraviolet) บันทึกภาพด้วยเครื่อง GelMax® UV Gel Imager (Labortechnik, Germany) เลือกอุณหภูมิ Annealing ที่สามารถให้ความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน *VirB9*, *18S rRNA* และ *AgroEL* มากที่สุด และไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น เพื่อใช้ในปฏิกิริยา mPCR ต่อไป

การศึกษาความเข้มข้นของไพโรเมอร์ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา PCR ที่สภาวะ Initial-denaturation (94°C. นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ) Denaturation (94°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) Annealing (58°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) Extension (68°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) และ Final extension (72°C. นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ) ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพโรเมอร์ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 nM

และดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร (10⁴ copy numbers) ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอหลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส เลือกความเข้มข้นของไพโรเมอร์ที่ให้ความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน *VirB9*, *18S rRNA* และ *AgroEL* มากที่สุดและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น เพื่อใช้ในปฏิกิริยา mPCR ต่อไป

การศึกษาปริมาณของดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่สามารถ

ตรวจพบผลิตภัณฑ์ด้วยปฏิกิริยา mPCR

เตรียมปฏิกิริยา PCR ที่สภาวะ Initial-denaturation (94°C. นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ) Denaturation (94°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) Annealing (58°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) Extension (68°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) และ Final extension (72°C. นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ) ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นที่ 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ และ 10⁰ copy numbers ไพโรเมอร์ที่ความเข้มข้น 400 nM ของ Ap724F และ Ap724R, ที่ 200 nM ของ Ehr1401F, Ehr1780R, Ba103F และ Ba721R และที่ 100 nM ของ Hs462F และ Hs462R ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอหลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

การศึกษาความจำเพาะในการตรวจพบยีน *VirB9*, *18S rRNA* และ *AgroEL* ด้วยปฏิกิริยา mPCR ในตัวอย่างเลือดของสุนัขป่วย

นำตัวอย่างเลือดสุนัขที่ตรวจพบยีน *VirB9* ของ *E. canis*, *18S rRNA* ของ *B. canis* และ *H. canis* และ/หรือ *groEL* ของ *A. platys* มาศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยา mPCR โดยเตรียมปฏิกิริยา mPCR ที่สภาวะ

Initial–denaturation (94°C. นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ) Denaturation (94°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) Annealing (58°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) Extension (68°C. นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ) และ Final extension (72°C. นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ) ปฏิกริยา mPCR ประกอบด้วย Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร (0.5 นาโนกรัม) ไพริเมอร์ที่ความเข้มข้น 400 nM ของ Ap724F และ Ap724R ที่ 200 nM ของ Ehr1401F, Ehr1780R, Ba103F และ Ba721R และที่ 100 nM ของ Hs462F และ Hs462R ปริมาตรรวมของปฏิกริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร

ผลการวิจัยและวิจารณ์

เมื่อนำดีเอ็นเอซึ่งเตรียมขึ้นจากปฏิกริยา PCR ด้วยคู่ไพริเมอร์ Ehr1401F/Ehr1780R, Hs462F/Hs462R, Ba103F/Ba721R และ Ap724F/Ap724R มาวิเคราะห์ความเหมือน (Identity) กับยีน *VirB9* ของเชื้อ *E. canis* ยีน *18S rRNA* ของเชื้อ *H. canis* และ *B. canis* และยีน *AgroEL* ของเชื้อ *A. platys* ตามลำดับ ด้วยโปรแกรม BLAST กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมขึ้นมีความเหมือนกับยีน *VirB9* ของ *E. canis* ยีน *18S rRNA* ของ *B. canis* และยีน *AgroEL* ของ *A. platys* ร้อยละ 100 และมีความเหมือนกับยีน *18S rRNA* ของ *H. canis* ร้อยละ 99.74 (Table 2)

Table 2 Nucleotide sequence homology of *VirB9*, *18S rRNA* and *groEL* PCR products compared to NCBI database

Pathogen	Homologous gene	GenBank accession No.	BLAST details			
			Max score	% Query coverage	% Identity	E-value
<i>E. canis</i>	<i>VirB9</i>	CP025749.1	1853	100	100	0.0
<i>H. canis</i>	<i>18S rRNA</i>	MH615006.1	712	99	99.74	0.0
<i>B. canis</i>	<i>18S rRNA</i>	MG586235.1	1947	100	100	0.0
<i>A. platys</i>	<i>groEL</i>	LC428207.1	1125	100	100	0.0

นำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมาใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน Annealing เพื่อนำไปใช้ในปฏิกริยา mPCR ต่อไป โดยเลือกอุณหภูมิทดสอบ 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 57, 58, 59 และ 60°C. พบว่าที่อุณหภูมิ 58°C. สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวของนิวคลีโอไทด์ตรงกับที่ต้องการ คือ 380 bp

สำหรับ *E. canis*, 462 bp สำหรับ *H. Canis*, 619 bp สำหรับ *B. canis* และ 724 bp สำหรับ *A. platys* และมีความเข้มและความคมชัดมากกว่าที่อุณหภูมิ 57, 59 และ 60°C. และไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น (Figure 1) ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 58°C. เป็นอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ในปฏิกริยา mPCR ต่อไป

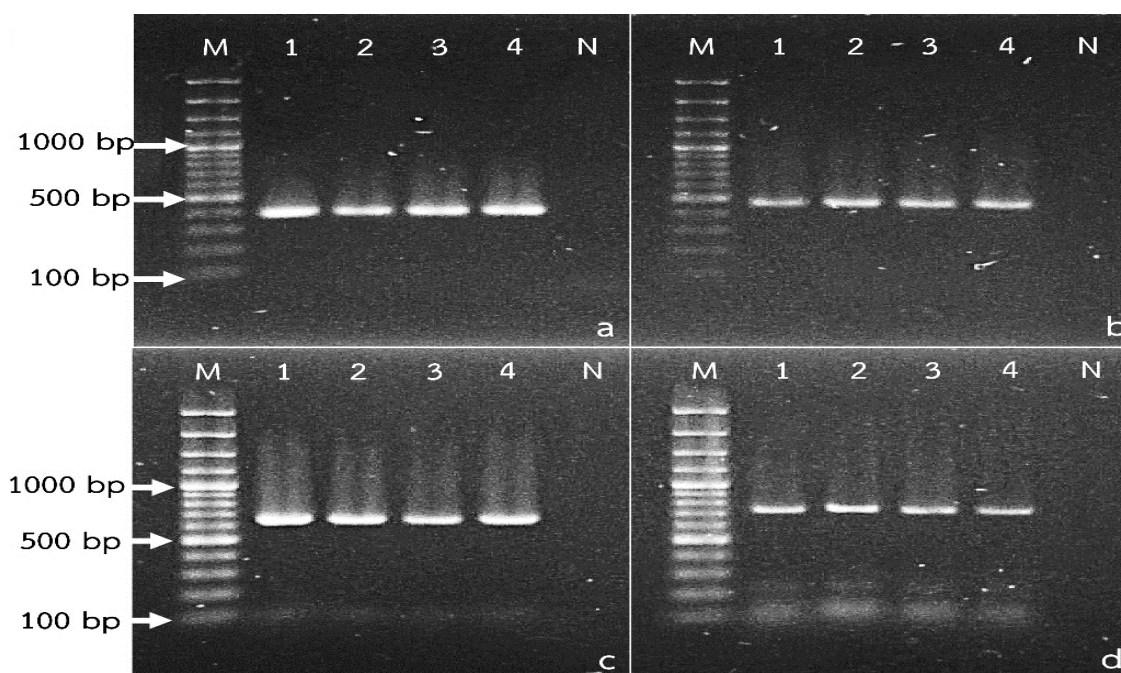


Figure 1 Optimization of annealing temperature for (a) *VirB9* of *E. canis*; (b) *18S rRNA* of *H. canis*; (c) *18S rRNA* of *B. canis* and (d) *groEL* of *A. platys*. (Lane M = 100 bp plus DNA marker; 1 = 57°C; 2 = 58°C; 3 = 59°C; 4 = 60°C; N = negative control)

นำชิ้นดีเอ็นเอของกลุ่มควบคุมเชิงบวกมาศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ โดยเลือกความเข้มข้นที่ทดสอบ 10 ความเข้มข้น ได้แก่ 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 nM พบว่าที่ความเข้มข้น 100 nM ขึ้นไป สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวของนิวคลีโอไทด์ตรงกับที่ต้องการ แต่แถบที่เกิดจากความเข้มข้น 200 nM สำหรับไพรเมอร์

Ehr1401F/Ehr1780R และ Ba103F/Ba721R, 100 nM สำหรับไพรเมอร์ Hs462F/Hs462R และ 400 nM สำหรับไพรเมอร์ Ap724F/Ap724R มีความเข้มข้นและความคมชัดมากกว่าที่ความเข้มข้นอื่น (Figure 2) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นดังกล่าวของแต่ละไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา mPCR ต่อไป

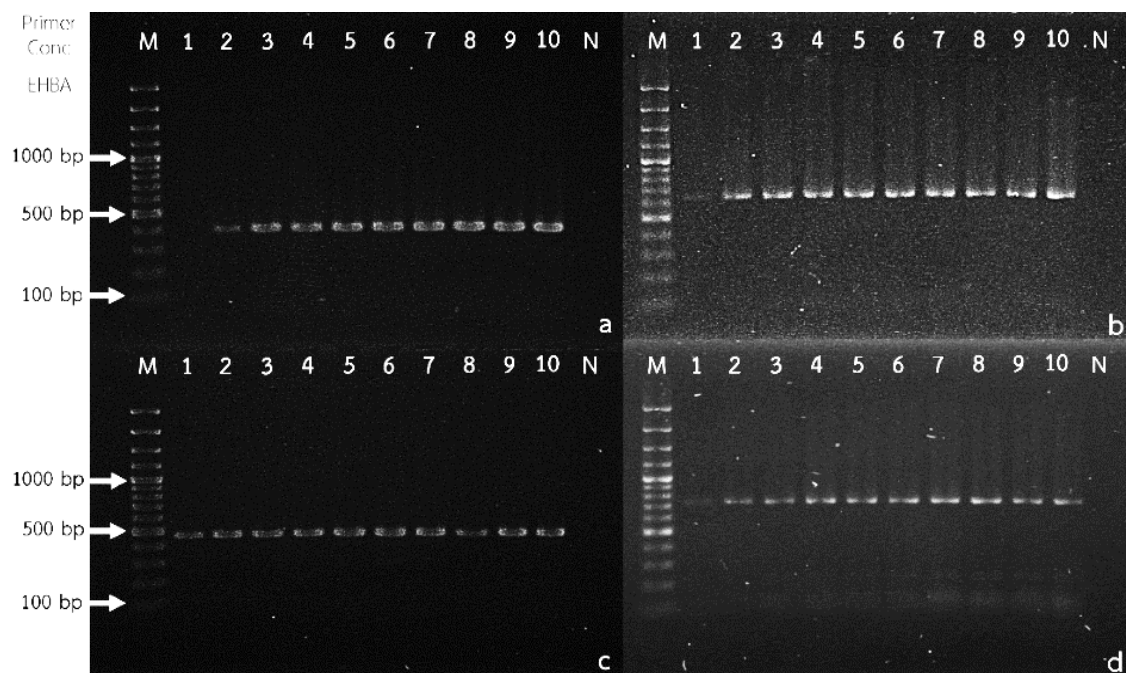


Figure 2 Optimization of primer concentration for (a) *VirB9* of *E. canis*; (b) *18S rRNA* of *H. canis*; (c) *18S rRNA* of *B. canis* and (d) *groEL* of *A. platys*. (Lane M = 100 bp plus DNA marker; 1 = 50 nM; 2 = 100 nM; 3 = 150 nM; 4 = 200 nM; 5 = 250 nM; 6 = 300 nM; 7 = 350 nM; 8 = 400 nM; 9 = 450 nM; 10 = 500 nM; N = negative control)

นำชิ้นดีเอ็นเอของกลุ่มควบคุมเชิงบวกมาศึกษาต่อเพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยที่สุดที่ปฏิกิริยา PCR สามารถตรวจพบได้ โดยศึกษาปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 และ 10^0 copy numbers พบว่าปฏิกิริยา PCR สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่เห็นได้ชัดของยีน *VirB9* ของ *E. canis*, *18S rRNA*

ของ *H. canis* และ *B. canis* และ *groEL* ของ *A. platys* ได้ที่ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบเท่ากับ 10^1 copy numbers ของเชื้อ *E. canis* และ *B. canis*, 10^4 copy numbers ของเชื้อ *H. canis* และ 10^3 copy numbers ของเชื้อ *A. platys* (Figure 3)

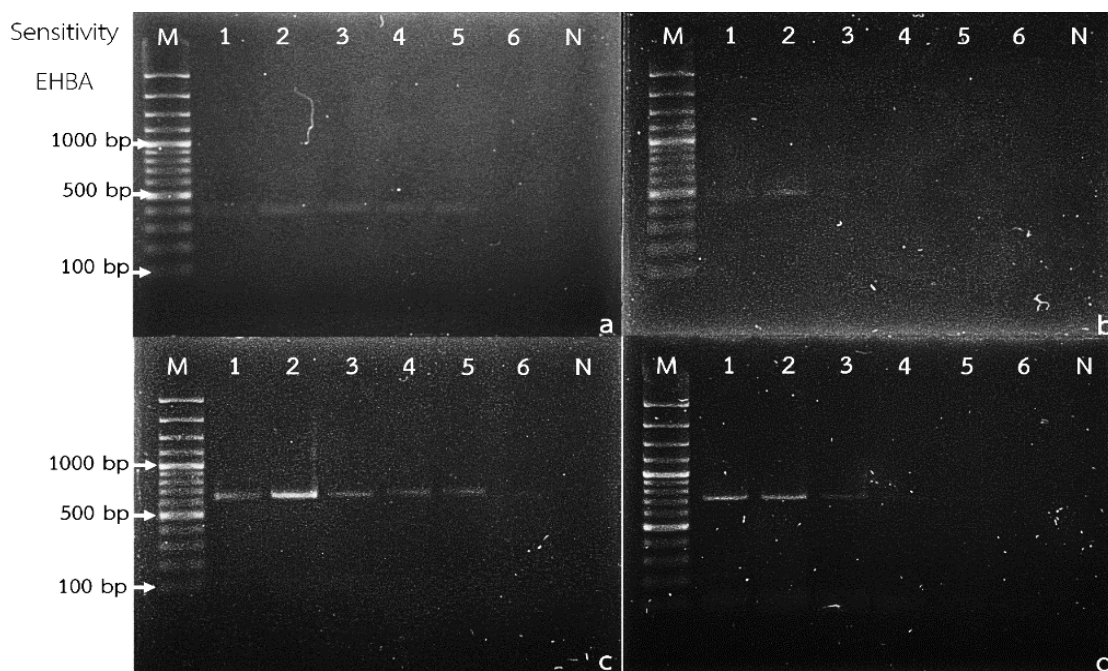


Figure 3 Determination of least detectable DNA template by PCR for (a) *VirB9* of *E. canis*; (b) *18S rRNA* of *H. canis*; (c) *18S rRNA* of *B. canis* and (d) *groEL* of *A. platys*. (Lane M = 100 bp plus DNA marker; 1-6 = 10^5 - 10^0 copy numbers, respectively; N = negative control)

ศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยา mPCR ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่แยกได้จากเลือดสุนัขที่ป่วยจากการติดเชื้อ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* หรือ *A. platys* อย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกัน พบว่าจากตัวอย่างเลือดสุนัขที่ติดเชื้อ *E. canis* เพียงอย่างเดียว ปฏิกิริยา mPCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถสร้างแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลตรงกับยีน *VirB9* ของ *E. canis* และไม่สร้างแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลตรงกับยีน *18S rRNA* ของ *H. canis* และ *B. canis* และยีน *groEL* ของ *A. platys* และจากตัวอย่างเลือดสุนัขที่ติดเชื้อ *H. canis* หรือ *B. canis* เพียงอย่างเดียว ปฏิกิริยา mPCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถสร้างแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลตรงกับยีน *18S rRNA* ของ *H. canis* และ *B. canis* และไม่สร้างแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลตรงกับยีน *VirB9* ของ *E. canis* และยีน *groEL* ของ *A. platys* และจาก

ตัวอย่างเลือดสุนัขที่ติดเชื้อ *A. platys* เพียงอย่างเดียว ปฏิกิริยา mPCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถสร้างแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลตรงกับยีน *groEL* ของ *A. platys* และไม่สร้างแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลตรงกับยีน *VirB9* ของ *E. canis* และยีน *18S rRNA* ของ *H. canis* และ *B. canis*

จากตัวอย่างเลือดสุนัขที่ติดเชื้อทั้ง *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* และ *A. platys* ปฏิกิริยา mPCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถสร้างแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลตรงกับทั้งยีน *VirB9* ของ *E. canis*, *18S rRNA* ของ *H. canis* และ *B. canis* และ *groEL* ของ *A. platys* (Figure 4) ซึ่งผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าปฏิกิริยา mPCR ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะในการตรวจพบยีน *VirB9* ของ *E. canis*, *18S rRNA* ของ *H. canis* และ *B. canis* และ *groEL* ของ *A. platys*

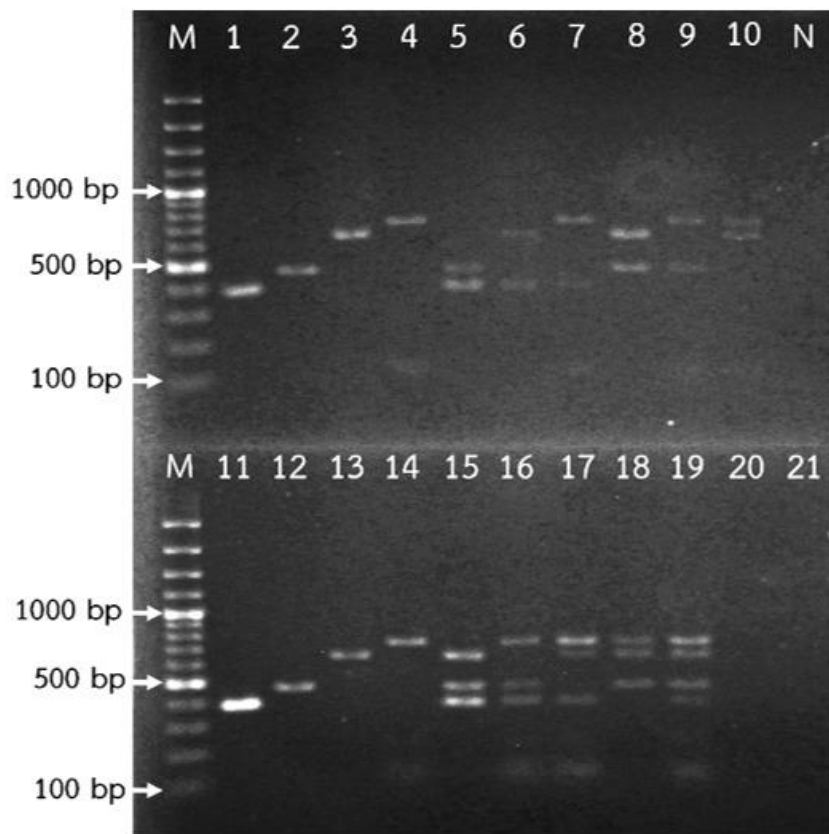


Figure 4 Determination of specificity of mPCR (Lane M = 100 bp plus DNA marker; 1 and 11 = *VirB9* of *E. canis*; 2 and 12 = *18S rRNA* of *H. canis*; 3 and 13 = *18S rRNA* of *B. canis*; 4 and 14 = *groEL* of *A. platys*; 5 = *VirB9* of *E. canis* and *18S rRNA* of *H. canis*; 6 = *VirB9* of *E. canis* and *18S rRNA* of *B. canis*; 7 = *VirB9* of *E. canis* and *groEL* of *A. platys*; 8 = *18S rRNA* of *B. canis* and *H. canis*; 9 = *18S rRNA* of *H. canis* and *groEL* of *A. platys*; 10 = *18S rRNA* of *B. canis* and *groEL* of *A. platys*; 15 = *VirB9* of *E. canis* and *18S rRNA* of *H. canis* and *B. canis*; 16 = *VirB9* of *E. canis*, *18S rRNA* of *H. canis* and *groEL* of *A. platys*; 17 = *VirB9* of *E. canis*, *18S rRNA* of *B. canis* and *groEL* of *A. platys*; 18 = *18S rRNA* of *H. canis* and *B. canis* and *groEL* of *A. platys*; 19 = *VirB9* of *E. canis*, *18S rRNA* of *H. canis* and *B. canis*, and *groEL* of *A. platys*; 20 = blood sample from an uninfected dog; 21 = empty lane; N = negative control)

ผลการศึกษาจะเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยการติดเชื้อ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* และ *A. platys* ในสุนัข โดยจะช่วยลดระยะเวลาในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพราะสามารถตรวจหา 4 เชื้อพร้อมกันได้ในเวลาเดียวกัน และจะช่วยลดค่าใช้จ่ายของเจ้าของสุนัขในการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการด้วย

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้พัฒนาเทคนิคปฏิกิริยา mPCR เพื่อตรวจหายีน *VirB9* ของ *E. canis*, *18S rRNA* ของ *H. canis* และ *B. canis* และ *groEL* ของ *A. platys* เพื่อช่วยในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการต่อโรคติดเชื้อทั้งสี่ชนิดนี้ในสุนัข ผลที่ได้จากการศึกษาคือสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา mPCR ที่สามารถตรวจพบยีน *VirB9* ของ *E. canis*, *18S rRNA* ของ *H. canis* และ *B. canis* และ *groEL* ของ *A. platys* ได้อย่างแม่นยำและประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาคือ การช่วยลดระยะเวลาของการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* และ *A. platys* ในสุนัข

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

เอกสารอ้างอิง

- Allison, R.W. and S.E. Little. 2013. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology** 42(2): 127-144.
- Baneth, G. 2011. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology** 181(1): 3-11.
- Baneth, G., S. Harrus, A. Gal and I. Aroch. 2015. Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. **Veterinary Parasitology** 208(1): 30-34.
- Bell, C.A. and R. Patel. 2005. A real-time combined polymerase chain reaction assay for the rapid detection and differentiation of *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 53: 301-306.
- Carrade, D.D., J.E. Foley, D.L. Borjesson and J.E. Sykes. 2009. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 23: 1129-1141.
- Chomel, B. 2011. Tick-borne infections in dogs-an emerging infectious threat. **Veterinary Parasitology** 179(4): 294-301.

- Harrus, S. and T. Waner. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **The Veterinary Journal** 187: 292-296.
- Jittapalapong, S., O. Rungphisutthipongse, S. Maruyama, J.J. Schaefer and R.W. Stich. 2006. Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1081: 479-488.
- Kongklieng, A., T. Thanchomnang, P.M. Intapan, T. Boonmars, P. Janwan, O. Sanpool, V. Lulitanond, P. Taweethavonsawat, S. Chungpivat, N. Morakote and W. Maleewong. 2014. Detection of *Ehrlichia canis* in canine blood samples by real-time fluorescence resonance energy transfer (FRET) PCR and melting curve analysis. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 45(5): 1149-1156.
- Laummaunwai, P., P. Sriraj, R. Aukkanimart, T. Boonmars, S. Boonjaraspinyo, S. Sangmaneedet, P. Potchimplee, P. Khianman and W. Maleewong. 2014. Molecular detection and treatment of tick-borne pathogens in domestic dogs in Khon Kaen, northeastern Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 45(5): 1157-1166.
- Little, S.E. 2010. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America; Small Animal Practice** 40(6): 1121-1140.
- Liu, M., N. Ruttayaporn, V. Saechan, C. Jirapattharasate, P. Vudriko, P.F. Moumouni, S. Cao, T. Inpankaew, A.P. Ybañez, H. Suzuki and X. Xuan. 2016. Molecular survey of canine vector-borne diseases in stray dogs in Thailand. **Parasitology International** 65(4): 357-361.
- Modrý, D., R. Beck, K. Hrazdilová and G. Baneth. 2017. A review of methods for detection of *Hepatozoon* infection in carnivores and arthropod vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** 17(1): 66-72.
- Nithikadpanich, C., P. Takam and W. Charerntantanakul. 2019. Development of multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and *Babesia canis* in canine blood. **Journal of Agricultural Research and Extension** 36(2): 80-90. [in Thai]

- Pantchev, N., S. Pluta, E. Huisinga, S. Nather, M. Scheufelen, M.G. Vrhovec, A. Schweinitz, H. Hampel and R.K. Straubinger. 2015. Tick-borne diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian dogs: Status quo and review of distribution, transmission, clinical findings, diagnostics and prophylaxis. **Parasitology Research** 114(Suppl.1): S19-54.
- Peleg, O., G. Baneth, O. Eyal, J. Inbar and S. Harrus. 2010. Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. **Veterinary Parasitology** 173(3-4): 292-299.
- Piratae, S., K. Pimpjong, K. Vaisusuk and W. Chatan. 2015. Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in stray dogs in Mahasarakham province, Thailand. **Annals of Parasitology** 61(3): 183-187.
- René-Martellet, M., I. Lebert, J. Chêne, R. Massot, M. Leon, A. Leal, S. Badavelli, K. Chalvet-Monfray, C. Ducrot, D. Abrial, L. Chabanne and L. Halos. 2015. Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. **Parasites & Vectors** 8(1): 3.
- Skotarczak, B. 2003. Canine ehrlichiosis. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine** 10: 137-141.
- Solano-Gallego, L., A. Sainz, X. Roura, A. Estrada-Peña and G. Miró. 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. **Parasites & Vectors** 9(1): 336.