



<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pajrnu/index>

บทความวิจัย

การพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส โรค ลัมปี สกิน ในโค

ธีระยุทธ ชววุฒิ^{1*} อรพรรณ อางคำภา² ธีรเจต เลหาเสถียร³ ภาวัต เสรีตระกูล³ และ นรินทร์ ปรียวิญญูศักดิ์³

¹ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเพชรบุรี อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี 76120

² สำนักงานปศุสัตว์เขต 4 อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย 40000

³ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี 76120

ข้อมูลบทความ

Article history

รับ: 17 เมษายน 2567

แก้ไข: 9 กรกฎาคม 2567

ตอบรับการตีพิมพ์: 27 กรกฎาคม 2567

ตีพิมพ์ออนไลน์: 21 สิงหาคม 2567

คำสำคัญ

โรคลัมปี สกิน

เทคนิคแลมป์

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ความจำเพาะ

ความไว

บทคัดย่อ

โรคลัมปี สกิน (LSD) เกิดจากเชื้อไวรัสในสกุล *Capripoxviruses* (CaPVs) เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและส่งผลกระทบต่อสุขภาพในอุตสาหกรรมเลี้ยงโคและกระบือ สามารถแพร่กระจายของเชื้อไวรัสโดยมีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะนำโรค นอกจากนี้ยังสามารถติดต่อได้ผ่านการสัมผัสตัวป่วยโดยตรง ผ่านทางน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่เป็นโรคหรือผ่านทางรกได้ ลักษณะอาการของโรค มีไข้ ต่อม้ำเหลืองบวมโต พบตุ่มนูนแข็ง และเป็นแผลตามผิวหนัง อาจมีแผลบริเวณเนื้อเยื่อที่ปาก การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีการที่รวดเร็วจึงมีความสำคัญในการควบคุมการระบาดของโรค เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้นให้ง่าย และรวดเร็ว เนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อโรคด้วยอุณหภูมิคงที่และเหมาะสำหรับการใช้ภาคสนาม วัตถุประสงค์ในการวิจัยในครั้งนี้เพื่อพัฒนาเทคนิค LAMP ตรวจหาเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน (LSDV) จากตัวอย่างโคที่แสดงอาการป่วยเป็นโรคลัมปี สกิน (LSD) โดยการเปรียบเทียบกับการตรวจด้วยเทคนิค PCR จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง (เลือดในหลอด EDTA จำนวน 100 ตัวอย่าง และเนื้อเยื่อผิวหนัง จำนวน 86 ตัวอย่าง) พบว่าตัวอย่างร้อยละ 56.98 (106/186) ให้ผลบวกต่อการตรวจด้วยเทคนิค PCR และตัวอย่างร้อยละ 63.97 (119/186) ให้ผลบวกต่อการตรวจด้วยเทคนิค LAMP จากผลการวิจัยทำให้สรุปได้ว่าเทคนิค LAMP มีประสิทธิภาพสูงกว่าเทคนิค PCR นอกจากนี้ยังพบว่ามีความไวสูงที่ระดับการเจือจาง 10^{-5} ng/ μ l และมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน (LSDV) โดยไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านสายพันธุ์มีคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน (LSDV) ที่เคยพบในประเทศจีน ยองกง และเวียดนาม ทำให้สรุปได้ว่าเทคนิค LAMP มีความไวและความจำเพาะสูง เหมาะสำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคลัมปี สกิน ในพื้นที่ภาคสนาม ที่ไม่ต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่ทันสมัย

บทนำ

โรคลัมปี สกิน (Lumpy skin disease: LSD) เป็นโรคที่องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties, OIE) ได้บันทึกไว้เป็นโรคระบาดที่เกิดจากการมีพาหะนำโรคไปยังโค และกระบือ ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์และผลกระทบต่อเศรษฐกิจเป็นอย่างมากในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา เนื่องจากสามารถแพร่กระจายเชื้อโรคไปยังพื้นที่อื่นได้เริ่มต้นที่ทวีปแอฟริกาไปยังพื้นที่ทั่วโลก พบอัตราการเกิดโรคสูงถึงแม้จะมีอัตราการตายต่ำ (Abutarbush et al., 2015) การสูญเสียที่เกิดขึ้นในสัตว์ได้แก่ สภาพร่างกายสัตว์ซูบผอม ผิวหนังถูกทำลาย ประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ต่ำลงทั้งเพศผู้และเพศเมีย การเกิดโรคเต้านมอักเสบส่งผลให้ผลิตน้ำมน้อยลง และเกิดภาวะการแท้งลูก (Tuppurainen & Oura 2012) การส่งออกทั้งสัตว์มีชีวิตและผลิตภัณฑ์ลดลงทำให้สูญเสียเงินจำนวนมหาศาลในภาคอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์ อุตสาหกรรมการผลิตนม อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์และอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมเหล่านี้พบว่าเกษตรกรต้องสูญเสียรายได้ จากการเลี้ยงสัตว์ที่ผลผลิตลดลง และค่าบริการด้านรักษาสัตว์ป่วย (Gari et al., 2010) พบการระบาดครั้งแรกในประเทศแซมเบีย เมื่อปี ค.ศ. 1929 และได้

แพร่กระจายไปทั่วทั้งทวีปแอฟริกา ตะวันออกกลาง ยุโรปตะวันออกเฉียงใต้ ภาคกลางของเอเชียและล่าสุดระบาดไปยังแถบเอเชียใต้และประเทศจีน ปัจจุบันโรคนี้เป็นโรคประจำถิ่นในหลายพื้นที่ ในปีค.ศ. 2019 พบการระบาดครั้งแรกในพื้นที่ทวีปเอเชียใต้ โดยพบที่ประเทศบังกลาเทศ ในปี ค.ศ. 2019 พบโรคนี้พบในประเทศอินเดีย (Sudhakar et al., 2020) และภาคตะวันตกของประเทศจีน ที่มีพรมแดนติดกับประเทศคาซัคสถาน ได้หวัน ยองกง และประเทศภูฏาน (Lu et al., 2021) หลังจากนั้นพบในประเทศเมียนมาร์ และประเทศเวียดนาม (Tran et al., 2021)

สำหรับประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรค LSD เป็นครั้งแรกในโคเนื้อพบแสดงอาการป่วยคล้ายโรค LSD ได้แก่ พบตุ่มนูนที่ผิวหนัง มีไข้สูง ไม่ค่อยกินอาหาร และพบเส้นเลือดที่ขาและต่อมเหงื่อเหลืองขยายใหญ่ ได้รับการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัส โรคลัมปี สกิน (Lumpy skin disease virus, LSDV) โดยเทคนิค Real-time PCR จากตัวอย่างเลือด (Blood EDTA) และสะเก็ดแผลของผิวหนัง (Scabs and skin lesion) เชื้อไวรัสได้รับแยกชนิดและการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่ยืนยันการติดเชื้อ (Arjokumpa et al., 2021) ผลการวิเคราะห์วิวัฒนาการของสายพันธุ์ (Phylogenetic tree) พบว่าเชื้อไวรัส LSDV มีความคล้ายกับเชื้อไวรัส LSDV ที่แพร่ระบาดในประเทศ

*Corresponding author

E-mail address: chawut98@gmail.com (T. Chawut)

Online print: 21 August 2024 Copyright © 2024. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2024.35>

รัสเซีย ประเทศอินเดีย และประเทศเคนยา ในปี ค.ศ. 2019 ประมาณ ร้อยละ 99.80 - 100 การวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยยืนยันเชื้อไวรัส LSDV ทางอนุชีววิทยา นิยมใช้เทคนิค PCR มากที่สุด เนื่องจากมีความไวและแม่นยำสูง แต่การใช้เทคนิค PCR ในการตรวจวินิจฉัยจำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการโดยใช้ บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญด้านอนุชีววิทยาซึ่งมีจำนวนน้อย และใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน (Ochwo et al., 2020) สำหรับเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุล เพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมคล้ายกับเทคนิค PCR แต่จะมีข้อดีกว่าเนื่องใช้เวลาในการดำเนินการน้อยกว่าและมีความแม่นยำที่มากกว่า โดยปฏิกิริยาของ LAMP เกิดขึ้นได้ในอุณหภูมิคงที่ประมาณ 70 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาประมาณ 45 - 60 นาที โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลง (Thermocycler) เทคนิค LAMP ยังสามารถอ่านผลได้ง่ายและหลากหลายวิธี โดยสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากความขุ่นและยืนยันผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) สะดวกต่อการนำไปใช้ในภาคสนาม ทำให้สามารถวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ได้อย่างรวดเร็ว (Notomi et al., 2000) วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อพัฒนาเทคนิค LAMP ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างโคที่มีการระบาดของโรค LSD ในพื้นที่ศึกษา

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 1) ตัวอย่างเลือด ที่ดูดเก็บจากเส้นเลือดดำที่คอหรือโคนหาง (3 มิลลิลิตร) ในหลอดเก็บเลือด EDTA 2) ตัวอย่างจากก้อนเนื้อผิวหนังที่ได้จากการขูดแบบปลอดเชื้อ (Skin scabs) วิธีการเก็บตัวอย่างปฏิบัติตามคำแนะนำของ OIE ตัวอย่างเชื้อไวรัส LSDV ถูกเก็บจากฟาร์มโคที่แสดงอาการของโรค LSD ในจังหวัดเพชรบุรี (Figure 1) ซึ่งตัวอย่างเชื้อไวรัส LSDV จะถูกเก็บจากโคจำนวน 100 ตัว โดยในการเก็บตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากสำนักงาน ปศุสัตว์จังหวัดเพชรบุรี กรมปศุสัตว์ ทั้งนี้การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ดำเนินการตามขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐาน (Standard operating procedures, SOP) ของหน่วยงานราชการแต่ละหน่วยงาน โดยในการเก็บตัวอย่างเชื้อไวรัส LSDV ได้รับการได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (Project ID: 05/2565)



Figure 1 Clinical signs of lumpy skin disease in cattle in the study area. Generalized indigenous Ulcerative Nodular skin lesion covering whole body.

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

ใช้ชุด gSYNC™ DNA extraction kit (Geneaid, Taiwan)

โดยการดูดตัวอย่างเลือด 200 ไมโครลิตร ใส่ 1.5 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ปรับปริมาตร ที่ 200 ไมโครลิตร กับ PBS แล้วเติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จากนั้นเติม GSB Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จับพลิกหลอดทุก ๆ 2 นาที เติมน Absolute ethanol 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่างทันที และเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที หากเกิดตะกอน ให้ใช้ปิเปตดูดส่วนใสใส่ใน GS column ที่รองด้วย 2.0 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งหลอดตัวอย่าง แล้วย้าย GS column ไปยัง 2.0 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ใหม่ เติมน W1A Buffer 400 ไมโครลิตร ใน GS column ที่รองด้วย 2.0 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ย้าย GS column ไปยัง 2.0 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ใหม่ เติมน Wash buffer 600 ไมโครลิตร ในหลอด GS column ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ย้าย GS column ไปยัง 2.0 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ใหม่ ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ย้าย GS column ที่แห้งไปยังหลอด 1.5 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube เติมน pre-heated Elution buffer 100 ไมโครลิตร ใส่ TE buffer หรือ Water ในตรงกลาง Column matrix ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 3 นาที เมื่อ TE buffer หรือ Water ละลายสมบูรณ์แล้ว นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จะได้ DNA ที่บริสุทธิ์ เก็บ Genomic DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Zhang et al., 2006)

การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อผิวหนัง (Tissue Genomic DNA)

ใช้ชุด gSYNC™ DNA extraction kit (Geneaid, Taiwan)

โดยนำเนื้อเยื่อผิวหนังอย่างน้อย 25 มิลลิกรัม ใส่ 1.5 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ถ้าตัวอย่างมีปริมาณเซลล์มาก ให้ลดปริมาตรลงเหลือ 10 mg เติมน GST buffer 200 ไมโครลิตร และ เติมน 20 ไมโครลิตร ของ Proteinase K หมุนวนให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาข้ามคืน นำมาปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้ายส่วนที่เป็นของเหลวมาไว้ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube เติมน GSB buffer 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาที เติมน Absolute ethanol 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่างทันที และเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที หากเกิดตะกอน ให้ใช้ปิเปตดูดส่วนใสใส่ใน GS column ที่รองด้วย 2.0 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งหลอดตัวอย่าง แล้วย้าย GS column ไปยัง 2.0 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ใหม่ เติมน W1A buffer 400 ไมโครลิตร ใน GS column ที่รองด้วย 2.0 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ย้าย GS Column ไปยัง 2.0 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ใหม่ เติมน Wash buffer 600 ไมโครลิตร ในหลอด GS column ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ย้าย GS column ไปยัง 2.0 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube ใหม่ ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็น

เวลา 3 นาที ย้าย GS column ที่แห้งไปยังหลอด 1.5 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube เติม pre-heated Elution buffer 100 ไมโครลิตร ใส่ TE buffer หรือ Water ในตรงกลาง Column matrix ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 3 นาที เมื่อ TE Buffer หรือ Water ละลายสมบูรณ์แล้ว นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จะได้ DNA ที่บริสุทธิ์ เก็บ Genomic DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดและเนื้อเยื่อผิวหนังมาเพิ่มปริมาณยีน GPCR ด้วยเทคนิค PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีนที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส LSDV (GPCR) โดยใช้โปรแกรม Primer3 (You et al., 2008) เมื่อได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมแล้ว ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Standard Taq reaction buffer 2.5 ไมโครลิตร, dNTPs 0.5 ไมโครลิตร และ Forward primer และ Reverse primer อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร, Template DNA 1.0 ไมโครลิตร, Taq DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร และ Nuclease free water 19.8 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจะนำหลอด PCR ใส่ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิและตั้งค่าอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยเริ่มจากขั้นตอน Initial denaturation สายดีเอ็นเอให้เกิดการแยกสายออกจากกันเป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งหมด 35 รอบ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 60 วินาที Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที หลังจากจบขั้นตอนนี้จะวนกลับไปยังกระบวนการที่ขั้นตอน Denaturation จนครบ 35 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อไปที่ 72 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที และคงรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปผสมกับ Loading dye และอ่านผลโดยวิธี Gel electrophoresis ผ่านร้อยละ 2 (w/v) Agarose gel และย้อม DNA ด้วย Ethidium bromide เปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้กับ 100 bp DNA ladder ตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA โดย UV transilluminator เพื่อยืนยันการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมาย

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อผิวหนังมาเพิ่มปริมาณยีน สำหรับวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค LAMP โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีนที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส LSDV จากโปรแกรม PrimerExplorer (Tomita et al., 2008) เตรียม LAMP reaction mixture 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 12.5 ไมโครลิตร ของ DNA master mix (LavaLAMP kit), target-specific primer mix ประกอบด้วย 0.5 ไมโครลิตร ของ F3 และ B3, 2.0 ไมโครลิตร ของ FIP และ BIP, 1.0 ไมโครลิตร ของ FLP และ BLP, 1.0 ไมโครลิตร ของ green fluorescent dye, 1.0 ไมโครลิตร ของ template DNA และ 3.5 ไมโครลิตร ของ Nuclease free water หลังจากนั้นใส่หลอดทดลองลงในเครื่อง Real-time fluorescent detector (Analytik Jena instruments) และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยเริ่มที่การ amplification ที่ 70 องศาเซลเซียส 60 นาที และคงรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส โดย LAMP product สามารถนำมา

อ่านผลได้หลากหลายวิธี โดยสามารถอ่านได้จากค่าการเรืองแสงของสี ย้อม Green fluorescent dye ในช่องแสง FAM channel จากเครื่อง Real-time fluorescent detector และสามารถอ่านด้วยตาเปล่าจากความขุ่นของตะกอน Magnesium pyrophosphate สีขาวที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา และสามารถอ่านผลได้จากการเรืองแสง Fluorescent ผ่านหลอด UV ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ LAMP product สามารถนำมายีนย่นผลผ่าน Gel ที่ร้อยละ 2 ของ Agarose gel electrophoresis

ศึกษาความจำเพาะ (Specificity) ของเทคนิค LAMP

นำ DNA ของเชื้อชนิดอื่น ได้แก่เชื้อ *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Salmonella spp.* มาใช้ในการทำ LAMP reaction เพื่อหาความจำเพาะ โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อบริสุทธิ์จากกลุ่มงานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

ศึกษาความไว (Sensitivity) ของเทคนิค PCR และเทคนิค LAMP

ศึกษาความไวในการวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ของเทคนิค LAMP และ PCR โดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างมาเจือจางให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ลดลงในแต่ละหลอดทดลอง โดยยีน GPCR จะมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมด ที่ 44.5, 4.45, 0.44, 0.04, 0.004, 0.0004, 0.00004 และ 0.000004 ng/μl ตามลำดับ และใช้ดีเอ็นเอในแต่ละระดับการเจือจางมาเป็น Template ในการวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP และ PCR เมื่อได้ผลการทดสอบความไวของแต่ละเทคนิคแล้ว นำผลมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบเพื่อนำไปใช้ตรวจในภาคสนามได้

การวิเคราะห์และลำดับนิวคลีโอไทด์

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR โดยนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนและต่างกัน (Nucleotide alignment) กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานใน GenBank ตำแหน่งและเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ LSDV โดยใช้ Geneious Prime (Kearse et al., 2012) และ โปรแกรม BioEdit (Hall, 1999)

การวิเคราะห์ของสายพันธุ์เชื้อไวรัส LSDV

วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MEGA X (Kumar et al., 2021) ใช้สำหรับวิเคราะห์วิวัฒนาการสายพันธุ์เชื้อไวรัส LSDV ของยีน GPCR ในประเทศที่มีการระบาดของโรคล้มปี่ สกน เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV, SPPT และ GTPV อื่น ๆ ใน GenBank (Benson et al., 2013)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) เป็นค่าจำนวนนับ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และแสดงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส LSDV เป็น Phylogenetic tree โดยในการศึกษารุ่นนี้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม ไมโครซอฟท์ เอ็กเซล และโปรแกรม R (Table 1)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

การวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค LAMP

นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีผลการวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR เป็นบวก มาเพิ่มปริมาณยีนสำหรับวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้เครื่อง Real-time fluorescent detector จากช่องแสง

FAM พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของกราฟจากหลอดทดลอง (Figure 2) และเมื่อนำมาอ่านผลจากความชันของการทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองด้วยตาเปล่า และอ่านผลจากการเรืองแสง Fluorescent ภายใต้หลอด UV พบว่าความชัน ในแต่ละหลอดทดลองมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยหลอดที่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟจากการอ่านผลที่ช่องแสง FAM ด้วยเครื่อง Real-time fluorescent detector จะมีความชัน และเมื่อนำมาวัดค่าดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer พบว่าหลอดทดลอง Positive control และ PCR+ มีค่า OD ที่สูงกว่าหลอดทดลองควบคุม (no-Template control) และหลอดที่ใส่ผล PCR เป็นลบ อ่านผลโดยร้อยละ 2 ของ Agarose gel electrophoresis (Figure 3)

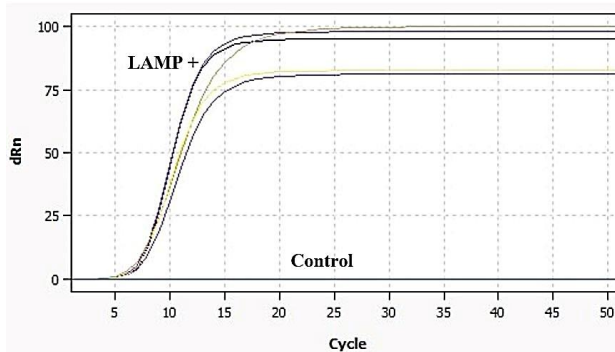


Figure 2 Analysis of LAMP technique by fluorescent assay in real-time fluorescent detector in the FAM channel.

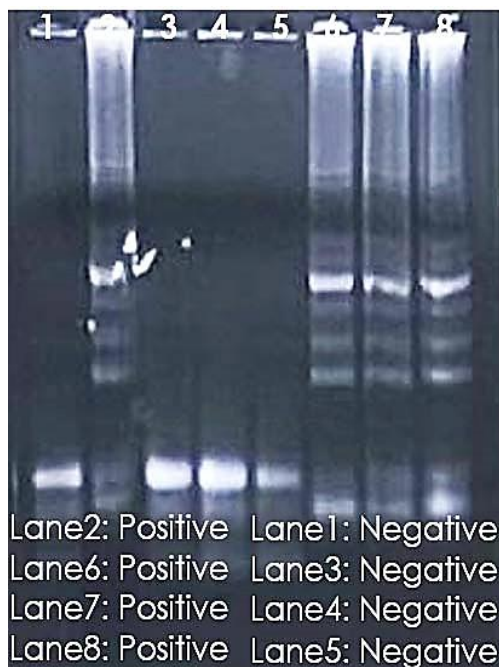


Figure 3 Analysis of the LAMP technique by running on a 2 % agarose gel electrophoresis showing the amplification products Lane 1: negative, lane 2: positive, lane 3: negative, lane 4: negative, lane 5: negative, lane 6: positive, lane 7: positive, lane 8: positive.

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR จากตัวอย่างโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ BTseq และเมื่อนำไปทำ Sequence alignment เพื่อดูความเหมือนและต่างกันของลำดับ

นิวคลีโอไทด์ และนำมาวิเคราะห์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน GPCR ของเชื้อ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ายีน GPCR ของตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ LSDV/MW355944/China/2020 (Lu et al., 2021), LSDV/MW732649/Hong Kong/2020 (Flannery et al., 2022), LSDV/MN598005/Xinjiang/2019 (Zan et al., 2022) และ LSDV/MZ577073/Vietnam/2021 (Trinh et al., 2022) มากที่สุด โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 100 มีความเหมือนกันกับสายพันธุ์อ้างอิง AF325528/Africa/Neethling/2490 (Chibssa et al., 2021) อยู่ร้อยละ 99.40 และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อที่อยู่ในจีนัสเดียวกัน ได้แก่ KF661977/SPPV/China/2013 (Ma et al., 2022) และ JN596275/GTPV/China/2012 (Su et al., 2015) พบว่ามีความเหมือนกันอยู่ที่ร้อยละ 98 โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 100 และมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ LSDV/MN508357/China/2019 (Wang et al., 2022) และ LSDV/MN598006/Xinjiang/2019 (Zan et al., 2022) อยู่ที่ร้อยละ 99.90 และมีความเหมือนกันกับสายพันธุ์อ้างอิง LSDV/AF325528/Africa/Neethling/2490 (Chibssa et al., 2021) อยู่ร้อยละ 99.20 นอกจากนี้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อที่อยู่ในจีนัสเดียวกัน ได้แก่ SPPV/KF661979/China/2013 (Yang et al., 2017) และ GTPV/KF495252/India/2015 (Kumar et al., 2021) พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 95.60 และร้อยละ 96.40 ตามลำดับ (Figure 4)

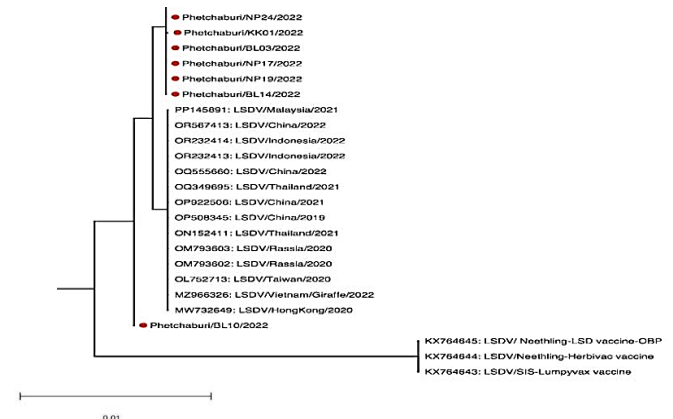


Figure 4 The neighbor-joining phylogenetic analyses of GPCR gene in cattle tissue sample with the GPCR gene sequences of LSDV, GTPV, and SPPV available in the GenBank.

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสโรคล้มปัส สกีน (LSDV) ในโคด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

การศึกษาความจำเพาะ (Specificity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDVจากการตรวจความจำเพาะในตรวจเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค LAMP พบว่าสามารถตรวจเชื้อไวรัส LSDV ได้ทุกตัวอย่างที่ทดสอบโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *E.coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* (Figure 5)

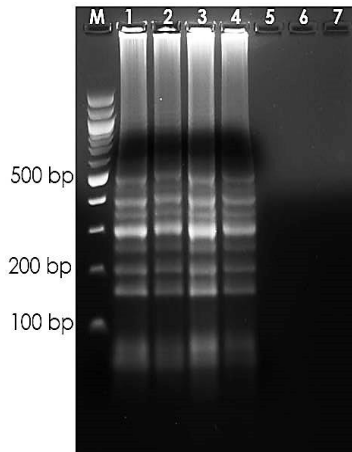


Figure 5 Specificity of LAMP assay to goat lumpy skin disease virus (LSDV), *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. Lane M: 100 bp DNA ladder, lanes 1-4: positive, lane 5: *E. coli*, lane 6: *Staphylococcus aureus* and lane 7: *Bacillus cereus*.

เปรียบเทียบความไว (Sensitivity) ของเทคนิค PCR และ LAMP ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV

นำตัวอย่างของโคที่แสดงอาการของโรค LSD มาสกัดดีเอ็นเอ และวัดปริมาณของดีเอ็นเอด้วย Nanodrop spectrophotometer (Eppendorf BioSpectrometer® basic, Germany) ก่อนที่จะนำไปหาค่าความไวในการตรวจวินิจฉัยของแต่ละเทคนิค โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณ 44.5 ng/μl หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางย่น GPCR ครึ่งละ 10 เท่า (Ten-fold dilution series) โดยมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดในแต่ละหลอด ที่ 44.50, 4.45, 0.44, 0.04, 0.004, 0.0004 และ 0.00004 ng/μl ตามลำดับ และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้และดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วในแต่ละระดับไปทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค LAMP พบว่าเมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR และนำมาอ่านผลด้วยร้อยละ 2 ของ Agarose gel electrophoresis มีอัตราการตรวจพบดีเอ็นเอของยีน GPCR ที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ 0.04 ng/μl (10^{-4} dilution) (Figure 6) เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP พบว่าอัตราการตรวจพบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้อยู่ที่ 0.004 ng/μl (10^{-5} dilution) ซึ่งสูงกว่าเทคนิค PCR (Figure 7)

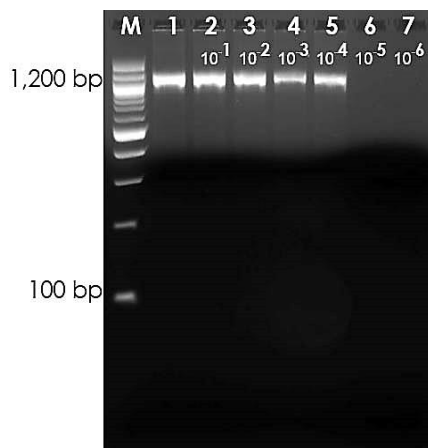


Figure 6 Sensitivity test of PCR assay in GPCR gene on 2 % agarose gel electrophoresis. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: original DNA concentration 44.50 ng/μl, Lanes 2-6: ten-fold serially-diluted DNA at 4.45, 0.44, 0.04, 0.004, 0.0004 and 0.00004 ng/μl.

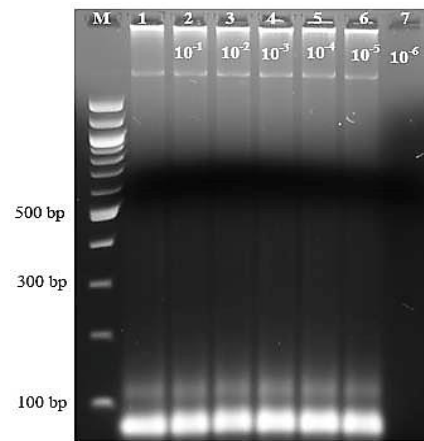


Figure 7 Sensitivity test of LAMP assay on 2 % agarose gel electrophoresis. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: original DNA concentration 44.50 ng/μl, Lanes 2-6: ten-fold serially-diluted DNA at 4.45, 0.44, 0.04, 0.004, 0.0004 and 0.00004 ng/μl.

การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยโรค LSD ในตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR กับ เทคนิค LAMP ในพื้นที่ศึกษา

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV จากตัวอย่างเลือด (จำนวน 100 ตัวอย่าง) และตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนัง (จำนวน 86 ตัวอย่าง) ด้วยเทคนิค LAMP และเทคนิค PCR อ่านผลโดยร้อยละ 2 ของ Agarose gel electrophoresis พบว่าเทคนิค PCR จากตัวอย่างเลือดให้ผลบวก 26 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26 ตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังให้ผลบวก 80 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 93 เมื่อนำดีเอ็นเอจากตัวอย่างต่าง ๆ มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค LAMP และนำมาอ่านผลด้วยร้อยละ 2 ของ Agarose gel electrophoresis พบว่าตัวอย่างเลือดให้ผลบวก 36 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 36 ตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังให้ผลบวก 83 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 96.51 แสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส LSDV ได้สูงกว่าเทคนิค PCR (Table 2)

โรค LSD เป็นโรคติดเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในด้านการเลี้ยงปศุสัตว์ และการระบาดทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากสำหรับปศุสัตว์และอุตสาหกรรมการผลิตโคทั่วโลก (Bamouh et al., 2021) มีการแพร่ระบาดของโรคอย่างรวดเร็วระหว่างสัตว์ผ่านแมลงที่เป็นพาหะเช่น ยุง (*Culex tritaeniorhynchus* และ *Aedes natiionus*) เห็บ (*Rhipicephalus appendiculatus* และ *Amblyomma hebraeum*) และแมลงวันกัด (*Stomoxys calcitrans* และ *Bimomyia fasciata*) นอกจากนี้ โรค LSD สามารถแพร่เชื้อได้ทางน้ำเชื้อ นม และรกในแม่โคที่ติดเชื้ (Tuppurainen et al., 2005) อย่างไรก็ตามการสัมผัสโดยตรงในโคอาจเป็นสาเหตุของการแพร่เชื้อ LSD เพียงเล็กน้อย (Elhaig et al., 2017) ดังนั้นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำจึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการป้องกันการแพร่กระจายของ โรค LSD ในปัจจุบันใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยและยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิคนี้จะใช้เวลาที่ค่อนข้างนาน และต้องส่งตัวอย่างเข้าห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือและบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ ส่งผลให้เกิดการล่าช้าในการวินิจฉัยโรคและอาจก่อให้เกิดการสูญเสียที่มากขึ้นได้ สอดคล้องกับผลการวิจัย การเปรียบเทียบความไวของเทคนิค LAMP พบว่ามากกว่าเทคนิค PCR อยู่ 10 เท่า เมื่อเทียบกับระยะเวลาการอ่านผลพบว่าเทคนิค LAMP ใช้ระยะเวลาประมาณ 30-45 นาที ซึ่งเทคนิค PCR ใช้

ระยะเวลาประมาณ 3-5 ชั่วโมง และต้องใช้วิธีการที่ยุงยากในการอ่านผล ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค LAMP ใช้การอ่านผลจากความขุ่นหรือการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาในหลอดทดลอง ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรค LSD ที่รวดเร็วและแม่นยำ ซึ่งจะสามารถช่วยลดระยะเวลาในการวินิจฉัยและยังสามารถลดการสูญเสียได้อีกด้วย การวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR ในการตรวจหาชิ้น GPCR จากตัวอย่าง โดยพบว่าชิ้น GPCR เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ในบริเวณรอยโรคและกดภูมิคุ้มกันของโฮสต์ให้ต่ำลงในขณะติดเชื้อ (El-Tholoth & El-Kenawy, 2016) ในปัจจุบันจึงเป็นยีนที่นิยมนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส LSDV (El-Kholy et al., 2008)

ปัจจุบันนี้ชิ้น GPCR นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจหาระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัส LSDV ในโคและกระบือ (Cêtre-Sossah et al., 2017) ตัวอย่างที่นำมาตรวจมีรายงานพบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อไวรัส LSDV สูงในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังที่พบรอยโรค (Awad et al., 2010) ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างจากเลือดสดคล่องกับรายงานวิจัยที่มีการศึกษามาพบว่าเนื้อเยื่อผิวหนังที่พบในโคที่แสดงอาการป่วยของโรค LSD เชื้อไวรัสสามารถที่มีชีวิตอยู่ได้นานถึง 35 วัน และการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสพบได้นานถึง 3 เดือน ทำให้สรุปได้ว่าการเก็บตัวอย่างเพื่อการวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV จากตัวอย่างเลือดนั้นจะต้องเก็บในระหว่างการติดเชื้อในกระแสเลือดโดยปกติแล้วมีระยะเวลาสั้น ๆ ประมาณ 4-11 วัน หลังการติดเชื้อไวรัส LSDV จะเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสที่เนื้อเยื่อผิวหนัง (Tuppurainen et al., 2005) ดังนั้นเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังจึงเป็นตัวอย่างที่ดีสำหรับการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส LSDV มากกว่าตัวอย่างจากเลือด

ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV จากชิ้น GPCR พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับเชื้อไวรัส LSDV ที่พบในประเทศจีน ประเทศเวียดนาม และฮ่องกง โดยอาจเป็นไปได้ว่าการระบาดในประเทศไทยเกิดจากการนำเข้าโคที่ติดเชื้อมาจากประเทศดังกล่าวหรือเกิดจากการนำเข้าโคติดเชื้อไวรัส LSDV มาจากแหล่งที่มาเดียวกับประเทศดังกล่าว จึงส่งผลให้เชื้อไวรัส LSDV ที่พบในจังหวัดเพชรบุรีมีพันธุกรรมเหมือนกับเชื้อไวรัส LSDV ที่พบในประเทศจีน ประเทศเวียดนาม และฮ่องกง นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส LSDV ที่ศึกษา ยังมีความแตกต่างกันกับสายพันธุ์อ้างอิงจากประเทศแอฟริกา (Neethling strain) เล็กน้อย ซึ่งเป็นประเทศที่ได้มีการเริ่มระบาดของโรค LSD ในช่วงแรกใน ปีค.ศ. 1929-1988 คาดว่าเกิดจากการระบาดของโรค LSD นั้นมีการแพร่กระจายออกไปในหลายประเทศเป็นระยะเวลานาน ซึ่งจะเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัส LSDV มาโดยตลอดระยะเวลาการระบาด จนกระทั่งเมื่อมีการเข้ามาระบาดของโรคในทวีปเอเชียรวมถึงประเทศไทยทำให้เชื้อไวรัส LSDV ที่พบในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์มีการกลายพันธุ์จนมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อ LSDV สายพันธุ์อ้างอิงและคาดว่าเชื้อไวรัส LSDV ที่ระบาดในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อจากวัคซีนป้องกันโรค LSD ที่เป็นวัคซีนประเภทเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Live attenuated virus vaccine) เนื่องจากวัคซีนที่ใช้ในจังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เป็นวัคซีนสายพันธุ์ Neethling-type (MSD Animal Health) หากการระบาดในจังหวัด

เพชรบุรีและจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เกิดจากวัคซีนที่ใช้พันธุกรรมของเชื้อไวรัส LSDV ควรจะเหมือนกันกับ Neethling strain จากประเทศแอฟริกามากที่สุด

การหาความจำเพาะของการตรวจเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค LAMP ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่ามีความจำเพาะสูงเนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) กับเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ทดสอบ (Chu et al., 2011) การเปรียบเทียบความไวในการตรวจวินิจฉัยของเทคนิค PCR และเทคนิค LAMP พบว่าเทคนิค LAMP มีความไวในการตรวจวินิจฉัยสูงกว่าเทคนิค PCR ทั้งนี้อาจจะขึ้นกับการออกแบบไพรเมอร์ในเทคนิค LAMP ให้มีความจำเพาะที่สูงต่อยีนที่เป็นเป้าหมาย จึงทำให้สามารถวินิจฉัยเชื้อไวรัสได้ในตัวอย่างที่มีปริมาณของดีเอ็นเอน้อย เนื่องจากผลการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยบ่งบอกว่าเทคนิค LAMP มีความไวสูง ซึ่งส่งผลให้สามารถพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อที่จะนำไปวินิจฉัยโรคได้มากขึ้น ในภาคสนามได้ การอ่านผลจากความขุ่นของการทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองด้วยตาเปล่าของเทคนิค LAMP พบว่าในทุกหลอดทดลองมีความขุ่นที่ใกล้เคียงกันแตเมื่อนำมาวัดค่าดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer พบว่าหลอดที่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟจากการอ่านผลที่ช่องแสง FAM ด้วยเครื่อง Real-time fluorescent detector จะมีค่า OD ที่สูงกว่าหลอดที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟ ซึ่งผลการอ่านค่าความขุ่นจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm สอดคล้องกับการอ่านผลจากกราฟด้วยเครื่อง Real-time fluorescent detector เมื่อนำมาอ่านผลโดยร้อยละ 2 ของ Agarose gel electrophoresis พบว่าสามารถแยกผลการทดสอบได้ชัดเจน สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีรายงานไว้พบว่าเทคนิค LAMP มีความไวที่ระดับ 10^{-5} ng/ μ l และไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อชนิดอื่น ๆ (Mwanandota et al., 2018)

การศึกษาตัวอย่างที่มีการระบาดของโรคได้มากขึ้นในพื้นที่ศึกษา เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและยืนยันการติดเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค LAMP โดยใช้ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อผิวหนังและตัวอย่างเลือดที่เก็บในโคเนื้อที่แสดงอาการป่วยโรค LSD พบว่าการตรวจด้วยเทคนิค LAMP ให้ผลบวกทั้งในตัวอย่างเลือดและตัวอย่างจากเนื้อเยื่อผิวหนังสูงกว่าเทคนิค PCR สอดคล้องกับรายงานที่มีตรวจพบในประเทศรัสเซีย (Sprygin et al., 2018) และประเทศอาเซอร์ไบจาน (Zeynalova et al., 2016) ข้อสังเกตที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการตรวจตัวอย่างเลือดให้ผลบวกต่ำกว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังมากเมื่อตรวจด้วยทั้งเทคนิค LAMP และเทคนิค PCR สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่มีการศึกษามาพบว่าเนื้อเยื่อผิวหนังที่พบในโคที่แสดงอาการป่วยโรค LSD เชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 35 วัน และสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสได้จนถึง 3 เดือน ทำให้สรุปได้ว่าการเก็บตัวอย่างเพื่อการวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV จากตัวอย่างเลือดนั้นจะต้องเก็บในระหว่างการติดเชื้อในกระแสเลือดโดยปกติแล้วจะมีระยะเวลาสั้น ๆ ประมาณ 4-11 วัน หลังการติดเชื้อไวรัส LSDV หลังจากนั้นปริมาณของเชื้อไวรัสจะเพิ่มปริมาณที่เนื้อเยื่อผิวหนัง (Tuppurainen et al., 2005) ดังนั้นเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังที่เกิดการรอยโรคจึงเป็นตัวอย่างที่ดีสำหรับการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส LSDV ด้วยเทคนิค LAMP มากกว่าตัวอย่างจากเลือด

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ที่ก่อโรคล้มปี่ สกิ้นในโค จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสามารถนำเทคนิค LAMP มาตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส LSDV ได้โดยเทคนิค LAMP มีความจำเพาะสูงโดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้ออื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบความไวในการตรวจวินิจฉัยสูงกว่าเทคนิค PCR อีกด้วย การพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค LSD จำเป็นที่จะต้องคำนึงถึงเรื่องการปนเปื้อนเป็นอย่างมาก เนื่องจากเทคนิค LAMP มีความจำเพาะและความไวที่ค่อนข้างสูง อาจก่อให้เกิดผลบวกปลอม (False positive) ได้นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงการออกแบบไพรเมอร์ 4-6 สาย ให้มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย ซึ่งหากเริ่มปฏิกิริยาแล้วไพรเมอร์มีการจับกันเอง (Primer dimer) ก็จะมีผลให้เกิดผลบวกปลอมได้เช่นกัน ทั้งนี้การพัฒนาเทคนิค LAMP ในการวินิจฉัยโรคจากงานวิจัยนี้เป็นเพียงต้นแบบเท่านั้น ในการนำไปใช้จริงในภาคสนามจะต้องมีการ

พัฒนาเพิ่มเติมในด้านของการลดต้นทุนของชุดตรวจ และการเพิ่มความสะดวกและรวดเร็วในการวินิจฉัยโรคอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส โรค ล้มปี่ สกิ้น ในโค ขอขอบคุณ สำนักวิจัยและพัฒนาการอาชีวศึกษา สำนักงานคณะกรรมการการอาชีวศึกษา ที่สนับสนุนทุนการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ทำให้โครงการวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์และให้โอกาสได้เรียนรู้สิ่งใหม่ ๆ แนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ รวมถึงให้ความเชื่อมั่นในการทำงาน จนทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยไปได้อย่างราบรื่น

ขอขอบคุณ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี สำหรับการอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ วัสดุและอุปกรณ์สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

Table 1 Target genes for primers and their sequences

Target gene	Primer	Length	Sequence (5'-3')
LAMP	FIP	44	ACAAAGAGCATTACATAATCCAGAATAGAAAAATCAGGAGGTGT
	BIP	47	ACAAAAGAGGCCAAAAAGTTCTATTGCAAAATTTTATATCCGCATCG
	F3	22	AAGTTACTTATATGCGAAAAGG
	B3	23	GTGTTATCATCTTCTATAACAAC
	FLP	14	CTGTAAAAATTTTCA
GPCR	BLP	15	AACACTTTAGTTTAT
	Forward	25	CCAATGCTAATACTACCAGCACTAC
	Reverse	22	CTTAGTACAGTTAGTAGCAACC

Table 2 The results of LAMP and PCR assays for LSDV for samples from study area

Sites	Tissue detected positive					Blood detected positive				
	Tissue	Blood	PCR	LAMP	PCR %	LAMP %	PCR	LAMP	PCR %	LAMP %
Ban Lat	38	38	35	36	92.10	94.73	11	15	28.94	39.47
Tha Yang	18	22	16	17	88.88	94.44	5	7	22.72	31.81
Kaeng Krachan	15	20	14	15	93.33	100.00	4	6	25.00	30.00
Nong Ya Pong	15	20	15	15	100.00	100.00	6	8	30.00	40.00
Total	86	100	80	86	93.00	96.51	26	36	26.00	36.00

References

- Abutarbush, S. M., Ababneh, M. M., Al Zoubi, I. G., Al Sheyab, O. M., Al Zoubi, M. G., Aleksh, M. O., & Al Gharabat, R. J. (2015). Lumpy skin disease in Jordan: disease emergence, clinical signs, complications and preliminary-associated economic losses. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(5), 549-554. doi: 10.1111/tbed.12177
- Arjkumpa, O., Suwannaboon, M., Boonrawd, M., Punyawan, I., Laobannu, P., Yantaphan, S., Bungwai, A., Ponyium, V., Suwankitwat, N., Boonpomprasert, P., Nuansrichay, B., Kaewkalong, S., Ounpomma, D., Charoenlarp, W., Pamaranon, N., Prakotcheo, R., Buameetoo, N., Punyapornwithaya, V., & Songkasupa, T. (2021). First emergence of lumpy skin disease in cattle in Thailand, 2021. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(6), 3002-3004. doi: 10.1111/tbed.14246
- Awad, W. S., Ibrahim, A. K., Mahran, K., Fararh, K. M., & Abdel Moniem, M. I. (2010). Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin disease in cows. *Tropical Animal Health and Production*, 42(4), 777-783. doi: 10.1007/s11250-009-9486-5
- Bamouh, Z., Hamdi, J., Fellahi, S., Khayi, S., Jazouli, M., Tadlaoui, K. O., Fihri, O. F., Tuppurainen, E., & Elharrak, M. (2021). Investigation of post vaccination reactions of two live attenuated vaccines against lumpy skin disease of cattle. *Vaccines (Basel)*, 9(6), 621. doi: 10.3390/vaccines9060621

- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36-D42. doi: 10.1093/nar/gks1195
- Cêtre-Sossah, C., Dickmu, S., Kwiatek, O., & Albina, E. (2017). A G-protein-coupled chemokine receptor: a putative insertion site for a multi- pathogen recombinant capripoxvirus vaccine strategy. *Journal of Immunological Methods*, 448, 112-115. doi: 10.1016/j.jim.2017.05.007
- Chibssa, T. R., Sombo, M., Lichoti, J. K., Adam, T. I. B., Liu, Y., Elraouf, Y. A., Grabherr, R., Settypalli, T. B. K., Berguido, F. J., Loitsch, A., Sahle, M., Cattoli, G., Diallo, A., & Lamien, C. E. (2021). Molecular analysis of East African lumpy skin disease viruses reveals a mixed isolate with features of both vaccine and field isolates. *Microorganisms*, 9(6), 1142. doi: 10.3390/microorganisms 9061142
- Chu, Y., Yan, X., Gao, P., Zhao, P., He, Y., Liu, J., & Lu, Z. (2011). Molecular detection of a mixed infection of Goatpox virus, Orf virus, and *Mycoplasma capricolum* subsp. capripneumoniae in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 786-789. doi: 10.1177/1040638711407883
- Elhaig, M. M., Selim, A., & Mahmoud, M. (2017). Lumpy skin disease in cattle: frequency of occurrence in a dairy farm and a preliminary assessment of its possible impact on Egyptian buffaloes. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 84(1), e1-e6. doi: 10.4102/ojvr.v84i1.1393
- El-Kholy, A. A., Soliman, H. M. T., & Abdelrahman, K. A. (2008). Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of a recent lumpy skin disease virus incursion to Egypt. *Arab Journal of Biotechnology*. 11(2), 293-302.
- El-Tholoth, M., & El-Kenawy, A. A. (2016). G-protein-coupled chemokine receptor gene in lumpy skin disease virus isolates from cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(6), e288-e295. doi: 10.1111/tbed.12344
- Flannery, J., Shih, B., Haga, I. R., Ashby, M., Corla, A., King, S., Freimanis, G., Polo, N., Tse, A. C. N., Brackman, C. J., Chan, J., Pun, P., Ferguson, A. D., Law, A., Lycett, S., Batten, C., & Beard, P. M. (2022). A novel strain of lumpy skin disease virus causes clinical disease in cattle in Hong Kong. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(4), e336-e343. doi: 10.1111/tbed.14304
- Gari, G., Waret-Szkuta, A., Grosbois, V., Jacquet, P., & Roger, F. (2010). Risk factors associated with observed clinical lumpy skin disease in Ethiopia. *Epidemiology & Infection*, 138(11), 1657-1666. doi: 10.1017/S0950268810000506
- 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(41), 95-98.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199
- Kumar, N., Chander, Y., Kumar, R., Khandelwal, N., Riyesh, T., Chaudhary, K., Shanmugasundaram, K., Kumar, S., Kumar, A., Gupta, M. K., Pal, Y., Barua, S., & Tripathi, B. N. (2021). Isolation and characterization of lumpy skin disease virus from cattle in India. *PLoS One*, 16(1), e0241022. doi: 10.1371/journal.pone.0241022
- Lu, G., Xie, J., Luo, J., Shao, R., Jia, Kun, J., & Li, S. (2021). Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(2), 216-219. doi: 10.1111/tbed.13898
- Ma, J., Yuan, Y., Shao, J., Sun, M., He, W., Chen, J., & Liu, Q. (2022). Genomic characterization of lumpy skin disease virus in southern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), 2788-2799. doi: 10.1111/tbed.14432
- Mwanandota, J. J., Macharia, M., Ngeleja, C. M., Sallu, R. S., Yongolo, M. G., Mayenga, C., & Holton, T. A. (2018). Validation of a diagnostic tool for the diagnosis of lumpy skin disease. *Veterinary Dermatology*, 29(6), 532-e178. doi: 10.1111/vde.12690
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28(12), e63-e63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63
- Ochwo, S., VanderWaal, K., Ndekezi, C., Nkamwesiga, J., Munsey, A., Witto, S. G., Nantima, N., Mayanja, F., Okurut, A. R. A., Atuhare, D. K., & Mwiine, F. N. (2020). Molecular detection and phylogenetic analysis of lumpy skin disease virus from outbreaks in Uganda 2017–2018. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1-10. doi: 10.1186/s12917-020-02288-5
- Sprygin, A., Artyuchova, E., Babin, Y., Prutnikov, P., Kostrova, E., Byadovskaya, O., & Kononov, A. (2018). Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1514-1521. doi: 10.1111/tbed.12889

- Su, H. L., Jia, H. J., Yin, C., Jing, Z. Z., Luo, X. N., & Chen, Y. Y. (2015). Phylogenetic analysis of Gansu sheep pox virus isolates based on P32, GPCR, and RPO30 genes. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1887-1898. doi: 10.4238/2015.March.13.17
- Sudhakar, S. B., Mishra, N., Kalaiyarasu, S., Jhade, S. K., Hemadri, D., Sood, R., Bal, G. C., Nayak, M. K., Pradhan, S. K., & Singh, V. P. (2020). Lumpy skin disease (LSD) outbreaks in cattle in Odisha state, India in August 2019: epidemiological features and molecular studies. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(6), 2408-2422. doi: 10.1111/tbed.13579
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), 877-882. doi: 10.1038/nprot.2008.57
- Tran, H. T. T., Truong, A. D., Dang, A. K., Ly, D. V., Nguyen, C. T., Chu, N. T., Van Hoang, T., Nguyen, H. T., Nguyen, V. T., & Dang, H. V. (2021). Lumpy skin disease outbreaks in Vietnam, 2020. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(3), 977-980. doi: 10.1111/tbed.14022
- Trinh, T. B. N., Nguyen, V. T., Nguyen, T. T. H., Mai, N. T. A., Le, P. N., Lai, T. N. H., Phan, T. H., Tran, D. H., Pham, N. T., Dam, V. P., Nguyen, T. L., Ambagala, A., Babiuk, S., & Le, V. P. (2022). Molecular and histopathological characterization of lumpy skin disease in cattle in northern Vietnam during the 2020–2021 outbreaks. *Archives of Virology*, 167(11), 2143-2149. doi: 10.1007/s00705-022-05533-4
- Tuppurainen, E. S. M., & Oura, C. A. L. (2012). Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(1), 40-48. doi: 10.1111/j.1865-1682.2011.01242.x
- Tuppurainen, E. S. M., Venter, E. H., & Coetzer, J. A. W. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 72(2), 153-164. doi: 10.4102/ojvr.v72i2.213
- Wang, Y., Zhao, L., Yang, J., Shi, M., Nie, F., Liu, S., Wang, Z., Huang, D., Wu, H., Li, D., Lin, H., & Li, Y. (2022). Analysis of vaccine-like lumpy skin disease virus from flies near the western border of China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(4), 1813-1823. doi: 10.1111/tbed.14159
- Yang, Y., Qin, X., Zhang, X., Zhao, Z., Zhang, W., Zhu, X., Cong, G., Li, Y., & Zhang, Z. (2017). Development of real-time and lateral flow dipstick recombinase polymerase amplification assays for rapid detection of goatpox virus and sheeppox virus. *Virology Journal*, 14(1), 131. doi: 10.1186/s12985-017-0792-7
- You, F. M., Huo, N., Gu, Y. Q., Luo, M.-C., Ma, Y., Hane, D., Lazo, G. R., Dvorak, J., & Anderson, O. D. (2008). BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 253. doi: 10.1186/1471-2105-9-253
- Zan, X., Huang, H., Guo, Y., Di, D., Fu, C., Wang, S., Wu, Y., Wang, J., Ma, Y., Chai, C., Su, R., Song, Q., & Wang, W. (2022). Molecular characterization of a novel subgenotype of lumpy skin disease virus strain isolated in Inner Mongolia of China. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 295. doi: 10.1186/s12917-022-03383-5
- Zeynalova, S., Asadov, K., Guliyev, F., Vatani, M., & Aliyev, V. (2016). Epizootology and molecular diagnosis of lumpy skin disease among livestock in Azerbaijan. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1022. doi: 10.3389/fmicb.2016.01022
- Zhang, B. W., Li, M., Ma, L. C., & Wei, F. W. (2006). A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochemical Genetics*, 44(11-12), 503-512. doi: 10.1007/s10528-006-9050-1

Research article

Development of LAMP technique for detection on lumpy skin disease virus in cattle

Teerayut Chawut^{1*} Orapun Arjkumpa² Teerajet Laohasatian³ Pawat Seritrakul³
and Narin Preyavichyapugdee³

¹ Animal Science College of Agriculture and Technology Phetchaburi, Cha-am District, Phetchaburi Province, 76120

² The 4th Regional Livestock office, Mueang District, Khon Kaen Province, 40000

³ Animal Sciences and Agricultural Technology, Silpakorn University, Cha-am District, Phetchaburi Province 76120

ARTICLE INFO**Article history**

Received: 17 April 2024

Revised: 9 July 2024

Accepted: 27 July 2024

Online published: 21 August 2024

Keyword

Lumpy skin disease virus (LSDV)

Loop-mediated isothermal amplification
technique

Polymerase

chain reaction technique

Specificity

Sensitivity

ABSTRACT

Lumpy skin disease (LSD), caused by a virus of the genus *Capripoxvirus* (CaPVs), represents a significant economic concern in cattle livestock management. LSD has the potential for rapid transmission, facilitated by blood-sucking insects that serve as vectors for the virus (LSDV). Additionally, transmission can occur through direct contact with infected animals, via the semen of an infected breeder, or transplacentally. The disease is characterized by fever, enlarged lymph nodes, firm and circumscribed nodules on the skin, and ulcerative lesions, particularly on the mucous membranes of the mouth. A key to preventing the spread of LSDV in cattle is rapid and accurate detection. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay is a novel technique that works by amplifying the specific target nucleic acid at a constant temperature, which is simple, fast, and easy to use in the field. The objective of this study was to develop a prototype LAMP assay to detect LSDV from various cattle samples and compare it to the conventional PCR assay. The results indicated that, of the 186 samples collected (comprising 100 EDTA blood samples and 86 skin scab samples) from cattle exhibiting clinical signs of lumpy skin disease (LSD), 56.98 % (106/186) tested positive for LSDV using the PCR assay. In contrast, 63.97 % (119/186) tested positive for LSDV using the LAMP assay, suggesting that the LAMP assay demonstrates higher sensitivity compared to the conventional PCR assay. Moreover, sensitivity analysis showed a detection limit of 10^{-5} ng/ μ L. The specificity analysis test showed no cross-detection with other infectious agents. Additionally, the nucleotide alignment was 100 % identical to the LSDV strains from China, Hong Kong, and Vietnam. The LAMP assay detailed in this report is simple, cost-effective, highly sensitive, and particularly well-suited for the diagnosis of LSDV in laboratories with limited equipment and in resource-constrained rural settings.

*Corresponding author

E-mail address: chawut98@gmail.com (T. Chawut)

Online print: 21 August 2024 Copyright © 2024. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2024.35>