การตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR

One-step multiplex RT-PCR method for detection and serotyping of foot and mouth disease virus

ร่มพฤกษ์ อุดล* สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย
Romphruke Udon* Sahawatchara Ungvanijban Kingkarn Boonsuya Seeyo

Abstract

Background: Foot and Mouth Disease is a severe disease in double hoofed animals causing economic impact. Early report of the serotypes is necessary for control and decrease the loss. Nowadays, we use World Organization for Animal Health standard method (OIE standard method) for diagnosis including ELISA typing and virus isolation. Disadvantage of ELISA typing is this method can done with high amount of viral agents in the sample. When low amount of viral agents in the sample, it has to increase the virus quantity using "virus isolation", then re-confirm by the ELISA typing test. One-step multiplex RT-PCR method had been developed, this method could identify the serotype of FMDV within one process and could work with low quantity of virus.

Method: The developed one-step multiplex RT-PCR method with some modification by changing the sequences in serotype O primer. The new primer was constructed follow FMDV serotype O in Thailand. 836 tissue samples (tongue, gum, coronary band and buccal mucosa of cattle, buffalo, goat and sheep) were used for finding diagnostic sensitivity and diagnostic specificity, from the local area in the country. They were submitted to Regional Reference Laboratory for FMD in South-East Asia (RRL) between 2017-2019 for diagnosis and identified of serotypes using OIE standard method (ELISA typing or ELISA typing and virus isolation) and one-step multiplex RT-PCR method.

Result: The diagnostic sensitivity and diagnostic specificity were 90.89% and 90.33%, respectively at 99% confidence interval and 2% margin of error. But 5.50% of the samples were not found serotypes by one-step multiplex RT-PCR method, but they could identify serotypes by OIE standard method.

Conclusion: From the result, the developed one-step multiplex RT-PCR method could be used for screening purpose in diagnosis and serotyping for FMDV infection. The advantage of the method was less time consuming and high efficacy. Nevertheless, we had to do OIE standard method for accurate result.

Keywords: foot and mouth disease, ELISA typing,virus isolation, one-step Multiplex RT-PCR

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้(ศออ.) ต.ปากช่อง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
*ผู้รับผิดชอบ: โทร0804642992แฟกซ์ 044314889 อีเมล: romphrukeudon@yahoo.com
Regional Reference Laboratory for FMD in South-East Asia, Pakchong, Nakhonratchasima 30130
*Corresponding author: Tel. 0804642992 Fax 044314889 e-mail: romphrukeudon@yahoo.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่รุนแรงในสัตว์กีบคู่ ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก การรายงานผลอย่างรวดเร็วจะทำให้สามารถควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็ว และลดความเสียหายได้ วิธีการตรวจที่ใช้ในปัจจุบัน ใช้วิธีมาตรฐานของ World Organisation for Animal Health (วิธีมาตรฐาน OIE) ได้แก่วิธี ELISA typing แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือตัวอย่างต้องมีปริมาณไวรัสจำนวนมาก จึงต้องมีการเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) จากนั้นจึงนำมาทดสอบซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี ELISA typing ทำให้การรายงานผลการตรวจล่าช้า จึงได้มีการพัฒนาวิธี one-step multiplex RT-PCR ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ในการตรวจเพียงครั้งเดียว

วิธีการ: ทำการพัฒนาวิธี one-step multiplex RT-PCR โดยเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในไพรเมอร์ของซีโรไทป์ O จากลำดับเบสของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้จากพื้นที่ในประเทศไทย เพื่อจะได้สามารถจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อที่เกิดขึ้นในประเทศ จากนั้นนำมาหาค่าความไวเชิงวินิจฉัย (diagnostic sensitivity) และความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (diagnostic specificity) โดยเปรียบเทียบกับวิธีทดสอบมาตรฐาน OIE ได้แก่ วิธี ELISA typing หรือวิธี ELISA typing ร่วมกับ วิธี virus isolation โดยใช้อวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ลิ้น เหงือก ไรกีบ และเยื่อบุภายในช่องปากของโค กระบือ แพะ และแกะ จำนวนรวม 836 ตัวอย่าง จากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทยที่ถูกส่งมาทดสอบที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ ระหว่างปี 2560-2562 โดยวิธีมาตรฐาน OIE และ one-step multiplex RT-PCR

ผล: ค่าความไวเชิงวินิจฉัย และความจำเพาะเชิงวินิจฉัยเท่ากับ 90.89% และ 90.33% ตามลำดับ ที่ค่าความเชื่อมั่น 99% และความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้คือ 2% แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบ 5.50% ของตัวอย่างที่นำมาทดสอบไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์จากการทำ one-step multiplex RT-PCR แต่สามารถจำแนกซีโรไทป์จากวิธีมาตรฐาน OIE

สรุป: การศึกษาในครั้งนี้พบว่าวิธี one-step multiplex RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำมาใช้เป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้น ในการตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามต้องทำการทดสอบโดยวิธีมาตรฐาน OIE ร่วมด้วย จึงจะให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: โรคปากและเท้าเปื่อย ELISA typing, virus isolation, one-step multiplex RT-PCR

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เป็นโรคระบาดที่สำคัญในสัตว์กีบคู่ เกิดจากเชื้อไวรัสในสกุล *Aphthovirus* จัดอยู่ในวงศ์ *Picornaviridae* เป็น RNA ไวรัสสายเดี่ยว (single-stranded RNA) ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมได้ง่าย (Reid *et al.,* 2014) สามารถพบชนิดของเชื้อไวรัสที่มีความแตกต่างกันถึง 7 ซีโรไทป์ (Rodriguez and Gay, 2011) ในประเทศไทยพบการระบาด 3 ซีโรไทป์ คือ O, A และ Asia1 รายงานการเกิดโรคปากและเท้าเปื่อยในประเทศไทยพบซีโรไทป์ O และ A เป็นหลัก (Wacharapon, 2008) โดยที่ซีโรไทป์ Asia1 ไม่พบการระบาดตั้งแต่ปี 2541 (รุ่มพฤกษ์และวิไล, 2549) แต่ยังมีการเฝ้าระวังซีโรไทป์นี้อยู่ การใช้วัคซีนสำหรับเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย พบว่าแต่ละซีโรไทป์ไม่มีความคุ้มกันโรคข้ามกันและอาจไม่ให้ความคุ้มกันโรคกับไทป์ย่อยของซีโรไทป์เดียวกัน (OIE, 2019c)

ห้องปฏิบัติการศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศออ.) กรมปศุสัตว์ ใช้วิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยตามวิธีมาตรฐานขององค์การสุขภาพสัตว์โลก หรือวิธีมาตรฐาน OIE (OIE, 2019c) ได้แก่วิธี ELISA typing อย่างเดียวหรือการเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) และตรวจยืนยันด้วย ELISA typing โดยที่วิธี ELISA typing ถึงแม้จะสามารถตรวจหาไวรัสได้ทั้งเชื้อเป็นและเชื้อตาย โดยให้ผลการทดสอบภายใน 1 วัน แต่เนื่องจากวิธีนี้มีความไวต่ำ (low sensitivity) (Reid *et al*., 2000; Hoffmann *et al.,* 2009) จึงเหมาะกับตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสจำนวนมากเท่านั้น อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่

ส่งตรวจมักจะมีเชื้อไวรัสจำนวนน้อย จึงต้องนำมาเพิ่มจำนวนโดย virus isolation ก่อน ซึ่งต้องเพิ่มเวลาในการตรวจอีก 3-14 วัน ทั้งนี้ virus isolation สามารถตรวจหาไวรัสเชื้อเป็นได้เท่านั้น จากนั้นจึงนำมาจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสเพื่อยืนยันผลด้วยวิธี ELISA typing โดยในปี พ.ศ.2559 พบว่าการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสของ ศออ. ต้องผ่าน virus isolation ถึง 45.70% (361/790 ตัวอย่าง) (เอกสารไม่ตีพิมพ์) ทำให้การรายงานผลการทดสอบล่าช้าเนื่องจากระยะเวลาในการทดสอบนานขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการควบคุมโรคต่อมา Vangrysperre and de Clercq (1996) ได้พัฒนาวิธี RT-PCR มาใช้กับการตรวจเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งสามารถตรวจซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสได้ และในปี 2011 Le *et al.* ได้พัฒนาวิธี one-step multiplex RT-PCR มาใช้ในประเทศเวียดนาม ซึ่งสามารถตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ในการตรวจเพียงครั้งเดียว โดยใช้เวลาไม่ถึง 1 วัน มีความไวและความจำเพาะสูงสามารถตรวจหาไวรัสปริมาณน้อย ๆ ได้ในตัวอย่างไวรัสทั้งมีและไม่มีชีวิต อีกทั้งเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นเชื้อชนิด single stranded RNA ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงตัวเองได้ง่าย ดังนั้น การที่จะนำเทคนิค one-step multiplex RT-PCR มาใช้ตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในประเทศไทยจึงต้องมีการปรับปรุงไพรเมอร์ให้เหมาะสมกับเชื้อไวรัสที่พบในประเทศ และนำวิธีนี้มาหาค่าความไวเชิงวินิจฉัย (diagnostic sensitivity, Dse) และค่าความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (diagnostic specificity, Dsp) โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน OIE

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

เนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ลิ้น เหงือก ไรกีบ และเยื่อบุภายในช่องปาก ของโค กระบือ แพะ และแกะ จำนวน 836 ตัวอย่างที่ถูกส่งมาตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ ศออ.ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562 จากทุกภาคของประเทศไทย ยกเว้นภาคตะวันออกที่ไม่พบการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ (OIE, 2019c)

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ 836 ตัวอย่าง ทำการแยกสกัดเชื้อไวรัสจากเนื้อเยื่อให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอย 10% suspension ใน 0.04 M PBS จากนั้นนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (refrigerated centrifuge) ที่ 1000 *x g* เป็นเวลา 20 นาที กรองด้วย syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 µm จากนั้นแยกเก็บตัวอย่างสารละลายแขวนลอย หลอดละ 1 ml

การตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี ELISA typing(OIE, 2019c)

เคลือบหลุมของ ELISA plate ด้วย rabbit trapping antibody ซีโรไทป์ที่ต้องการตรวจ ElISA plate วางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ค้างคืน) ล้าง ELISA plate 5 ครั้งด้วย PBS เตรียมสารละลายแอนติเจนควบคุม (control antigen) และสารละลายแขวนลอยของตัวอย่างลงในmicrotube โดยใช้ ELISA diluent (PBST) ทำการเจือจางแอนติเจนควบคุมแบบ 2 fold serial dilution ไป 3 dilution (สารละลายแขวนลอยของตัวอย่างไม่ต้องเจือจาง) หยอดลงใน ELISA plate 50 µl ต่อหลุมวางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 5 ครั้ง จากนั้นเติม guinea pig detecting antibody ซีโรไทป์ที่จะตรวจ วาง ELISA plate ลงบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย horseradish peroxidase conjugate 50 µl ต่อหลุม วางบนเครื่องเขย่าในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate 7 ครั้ง เติม 0.01 % tetramethylbenzidine substrate (TMB substrate) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติม stop solution (1 M H_2SO_4) เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate แล้วจึงนำไปอ่านค่า optical density (OD) ที่ ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่องอ่าน ELISA (Multiskan®)

การเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัส FMDV (virus isolation) (OIE, 2019c)

นำเซลล์ปฐมภูมิ ได้แก่ primary lamb kidney cell

ที่มีอายุ 5-10 วัน ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm^2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เติมสารละลายที่ได้จากการเตรียมตัวอย่าง ปริมาตร 1 ml บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม maintenance medium นำไปบ่มในในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน อ่านผลการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ทุกวัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope แยกเชื้อไวรัสออกจากเซลล์โดยการ freeze-thaw และนำไปปั่นเพื่อแยกส่วนของเหลวใสออกจากส่วนกากเซลล์ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็นที่ 1000 *x g* เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปเพาะลงบนเซลล์เพาะเลี้ยงอีกครั้ง ทำซ้ำรวมทั้งหมด 3 ครั้ง (3 passages) นำส่วนของเหลวใสไปทำการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อไวรัส ด้วยวิธี ELISA typing

การตรวจหาสารพันธุกรรมเพื่อจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี one-step multiplex RT-PCR

ออกแบบไพรเมอร์ โดยเปลี่ยนแปลงลำดับเบสใน forward ไพรเมอร์ของซีโรไทป์ O จากไรเมอร์ของ Le *et al.* (2011) เป็น RRL–IND-OFw เพื่อให้สามารถจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อที่ระบาดในประเทศไทย ส่วนอีก 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ forward ไพรเมอร์ ของซีโรไทป์ A, Asia1 ใช้ VN-AF, VN-As1F ตามลำดับ และ Reverse ไพรเมอร์ยังคงใช้ VN-VP1R ตามเดิม

นำตัวอย่าง 10% suspension ใน 0.04 M PBS จากนั้นกรองด้วย syringe filter นำมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด E.Z.N.A.® Viral RNA Kit (OMEGA, BIO-TEX, USA) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำแล้วจึงนำไปตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี one-step multiplex RT-PCR ตามวิธีการของ Le *et al.* (2011)

เตรียมน้ำยา master-mix สำเร็จรูป LightCycler® Multiplex RNA Virus Master (Roche Diagnostic, Germany) 11 µl ผสมกับไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 10 µM ทั้ง 4 ชนิด ๆ ละ 1 µl เติม RNA ของตัวอย่างจำนวน 5 µl รวมทั้งสิ้น 20 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง C1000 touch™ thermal cycler (Bio-rad®, USA) โดยเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน reverse transcription เป็น 50°C นาน 15 นาที และ enzyme activation ที่ 95°C นาน 15 นาที ตามด้วยขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณ DNA ดังนี้ denaturation 95°C 25 วินาที annealing 52°C 30 วินาที extension 72°C 1 นาทีรวม 40 รอบ และ final extension 72°C 5 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ใน 1.5% agarose ใน TBE buffer โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของซีโรไทป์ O, A และ Asia1 ที่มีขนาด 658, 427 และ 535 bp ตามลำดับ ส่วนไวรัสควบคุม (control virus) จะใช้เชื้อไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนของกรมปศุสัตว์ และตรวจยืนยันผล โดยวิธี nucleotide sequencing เป็น positive control (O/Udornthani/87, A/Lopburi/12, Asia1/Petchaburi/85)

การตรวจหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี nucleotide sequencing เพื่อตรวจยืนยันเชื้อไวรัส

ทำตามวิธีการของ Knowles *et al.* (2016) ดังนี้ นำตัวอย่าง RNA มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี RT-PCR ในส่วนของ VP1 gene โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์ O, A และ Asia1 ผสมกับน้ำยา master-mix สำเร็จรูป LightCycler® Multiplex RNA Virus Master (Roche Diagnostic, Germany) เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง thermocycler (Bio-Rad, USA) จากนั้น นำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) จากนั้นทำการหาลำดับเบสสารพันธุกรรมโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป BigDye® Terminator v3.1 Cycle

ตารางที่ 1 แสดง sequence ของไพรเมอร์ของซีโรไทป์ O, A และ Asia1 ที่ใช้ในการทดสอบ

Primer	Sequence 5'-3'	Sense	Gene	Product length (bp)	FMDV serotype	References
RRL–IND-OFw	AGATTTGTGAAARTNACACCR	+	1D	658	O	-
VN – AF	CTTGCACTCCCTTACACCGC	+	1D	427	A	Lee *et al.* (2011)
VN-As1F	GCGSTHRYYCACACAGGYCCGG	+	1D	535	Asia1	Lee *et al.* (2011)
VN – VP1R	CATGTCYTCYTGCATCTGGTT	-	2B	-	O, A, Asia1	Lee *et al.* (2011)

Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) ร่วมกับไพรเมอร์ข้างต้น กำจัดน้ำยา BigDye ส่วนเกินด้วย ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research Corporation, USA) และหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) ทำการสร้างและวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999) และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MEGA version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016)

การหาค่า diagnostic sensitivity และค่า diagnostic specificity ของวิธีทดสอบ

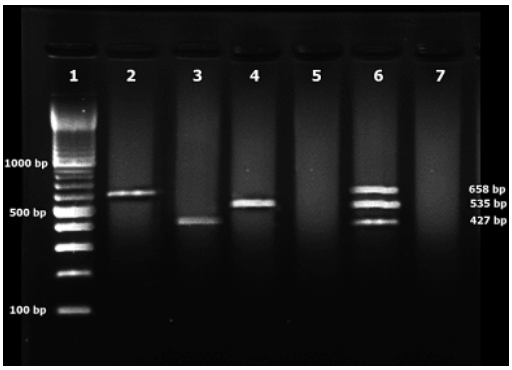
นำผลการทดสอบตัวอย่างทั้งหมด จำนวน 836 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ELISA typing อย่างเดียวหรือ ELISA typing ร่วมกับ virus isolation และวิธี one-step multiplex RT-PCR มาคำนวณหาค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity ที่ความเชื่อมั่น (confidence interval) 99% และความคลาดเคลื่อน 2% error (OIE, 2019a) ตามวิธี McNemar Chi-square (OIE, 2019b) ดังนี้

diagnostic sensitivity = [TP / (TP + FN)] x 100

diagnostic specificity = [TN / (TN + FP)] x 100

โดย TP และ FP = ค่า true positive และค่า false positive ตามลำดับ

TN และ FN = ค่า true negative และค่า false negative ตามลำดับ



รูปที่ 1 ผลของวิธีทดสอบ one-step multiplex RT-PCR: Lane 1 = DNA marker (100 bp); Lane 2 = positive serotype O; Lane 3 = positive serotype A; Lane 4 = positive serotype Asia1; Lane 5 = negative; Lane 6 = positive controls (serotypes O, A and Asia1); Lane 7 =negative control (PBS)

ผลและวิจารณ์

การที่ต้องใช้ตัวอย่างถึง 836 ตัวอย่าง เนื่องจากค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity ที่ยอมรับได้คือ 95% ที่ความเชื่อมั่น 99% และความคาดเคลื่อน 2% error จึงต้องใช้ตัวอย่างอย่างน้อย 788 ตัวอย่าง (OIE, 2019a)

การแสดงผลของวิธีทดสอบ one-step multiplex RT-PCR ได้ขนาดของผลผลิต PCR แบ่งตามชนิดของซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสดังนี้ ซีโรไทป์ O, A, Asia1 = 658, 427, 535 bp ตามลำดับ (รูปที่1)

พบว่าค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity ของวิธี one-step multiplex RT-PCR ได้ค่าดังนี้

diagnostic sensitivity = [(459/459+46) x 100] = 90.89%

diagnostic specificity = [(299/299+32) x 100] = 90.33%

จากตารางที่ 2 พบว่าค่า diagnostic sensitivity ที่ได้มีค่า 90.89% ใกล้เคียงกับ Gridharan *et al.* (2005) ที่ได้รายงานค่า diagnostic sensitivity 95.19% (99/104 ตัวอย่าง) โดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์เหมือนกันแต่ค่า diagnostic specificity ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีค่า 90.33% ต่างกับ Gridharan *et al.* (2005) ที่ได้ค่า diagnostic specificity เพียง 28.95% (11/38 ตัวอย่าง) แสดงว่า one-step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ มีความจำเพาะมากกว่าทั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่การศึกษาในครั้งนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์จากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่เกิดการระบาดขึ้นในประเทศไทย เมื่อนำผล

ตารางที่ 2 การหาค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity ของวิธี one-step multiplex RT-PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน OIE ได้แก่ วิธี ELISA typing และ virus isolation จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์ที่รวบรวมส่งตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ ศออ. จากพื้นที่ประเทศ ในปี พ.ศ. 2560-2562 จำนวนทั้งหมด 836 ตัวอย่าง

		วิธีมาตรฐาน OIE (วิธี ELISA typing และ virus isolation)	
		Positive	Negative
one-step multiplex RT-PCR	Positive	459	32
	Negative	46	299

ที่ได้เปรียบเทียบกับรายงานของ Le *et al*. (2011) ที่ได้พัฒนาวิธี one-step multiplex RT-PCR โดยใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์จากเชื้อที่มีการระบาดในประเทศเวียดนาม นำมาทดสอบร่วมกับ วิธี ELISA typing โดยใช้เชื้อไวรัสรวม 61 ตัวอย่าง พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะสูง แต่เมื่อนำมาใช้ในประเทศไทย พบว่าไม่สามารถนำมาใช้ตรวจจำแนกซีโรไทป์ O ได้ จึงต้องมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับซีโรไทป์ O ทำให้เมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างที่พบภายในประเทศได้ค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity 90.89% และ 90.33% ตามลำดับ

ปัจจัยอีกประการที่สร้างความแตกต่างของค่าทั้ง 2 คือชนิดของตัวอย่างที่นำมาใช้ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างที่เตรียมจากเนื้อเยื่อสัตว์ทั้ง 836 ตัวอย่าง สามารถตรวจได้ตรงกันโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR และวิธีตามมาตรฐาน OIE ถึง 90.67% (758/836 ตัวอย่าง) ในขณะที่ Gridharan *et al*., 2005 ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีทั้งสอง โดยใช้ตัวอย่างทั้งสองชนิดได้แก่ ตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์ 142 ตัวอย่างและตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง 38 ตัวอย่าง พบว่าผลการตรวจที่ได้โดยการใช้ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อสัตว์สามารถตรวจได้ตรงกันโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR และ ELISA เพียง 69.72% (99/142 ตัวอย่าง) แต่เมื่อใช้ตัวอย่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจะได้ผลการตรวจตรงกัน 100% (38/38 ตัวอย่าง) แสดงว่าในกรณีที่ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อเหมือนกัน one-step multiplex RT-PCR ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความไวเชิงวินิจฉัยต่อเชื้อไวรัสที่นำมาทดสอบมากกว่า

การรายงานผลการทดสอบ แบ่งผลออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มแรกจำนวน 220 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกของการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสจากตัวอย่าง ทั้งจากวิธี one-step multiplex RT-PCR และวิธี ELISA typing แสดงว่าในกลุ่มนี้มีเชื้อไวรัสในตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ทำให้สามารถจำแนกซีโรไทป์ O และ A ได้ผลตรงกันในขณะที่กลุ่มที่ 2 จำนวน 239 ตัวอย่างสามารถจำแนกซีโรไทป์ได้จากวิธี one-step multiplex RT-PCR ในขณะที่การตรวจตามวิธีมาตรฐาน OIE ต้องมีการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยวิธี virus isolation ก่อน แล้วจึงนำมาจำแนกซีโรไทป์โดยวิธี ELISA typing แสดงว่าเชื้อไวรัสในตัวอย่างมีจำนวนน้อย แต่ในกลุ่มที่ 3 มี 32 ตัวอย่างที่ one-step multiplex RT-PCR สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้ แต่ให้ผลลบตามวิธีมาตรฐาน OIE มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดจากตัวอย่างไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณตัวอย่างน้อย การเก็บตัวอย่างล่าช้า ตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นเวลานาน เก็บตัวอย่างจากอวัยวะที่มีปริมาณเชื้อไวรัสน้อย ได้แก่ ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อไรกีบจะมีเชื้อไวรัสน้อยกว่าเนื้อเยื่อลิ้นทำให้เชื้อไวรัสมีจำนวนน้อยจนไม่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี ELISA typing และ virus isolation อีกประการหนึ่งอาจมีการใช้ยาฆ่าเชื้อตอนเก็บตัวอย่าง บรรจุภัณฑ์ไม่เหมาะสม หรือการขนส่งไม่เหมาะสม จนทำให้เชื้อไวรัสถูกทำให้เสื่อมสภาพหรือตาย จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสด้วยวิธี virus isolation โดยจาก 32 ตัวอย่างนี้ พบว่ามี 22 ตัวอย่างที่ตรวจยืนยันด้วยวิธี nucleotide sequencing ซึ่งได้ผลตรงกับผลการหาซีโรไทป์ด้วย one-step multiplex RT-PCR อย่างไรก็ตาม วิธี nucleotide sequencing แม้จะเป็นวิธีทดสอบที่ใช้กันโดยทั่วไปแต่ไม่ได้ใช้ในงานตรวจจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสเป็นประจำเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง สำหรับตัวอย่างในกลุ่มที่ 4-5 เป็นตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์โดยวิธี one-step multiplex RT-PCR แต่สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้โดยวิธี ELISA typing เพียงอย่างเดียวจำนวน 20 ตัวอย่าง อีก 26 ตัวอย่างสามารถจำแนกซีโรไทป์ได้โดยวิธี virus isolation ร่วมกับวิธี ELISA typing ดังนั้นตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR แต่ให้ผลบวกโดยวิธีมาตรฐาน OIE คิดเป็น 5.50% (46/836)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบอย่างละเอียด โดยจำแนกตามวิธีการตรวจเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อย จำนวน 836 ตัวอย่าง

ที่	วิธีการทดสอบที่ใช้จำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัส			ผลการทดสอบ(ตัวอย่าง)			
	one-step multiplex RT-PCR	วิธีมาตรฐาน OIE		Type O	Type A	Type Asia 1	รวม
		ELISA typing	Virus isolation + ELISA typing				
1	+	+	-*	125	95	-	220
2	+	-	+	134	105	-	239
3	+	-	-	12	20	-	32
4	-	+	-*	16	4	-	20
5	-	-	+	12	14	-	26
6	-	-	-	-	-	-	299
						รวม	**836**

หมายเหตุ + (ผลบวก) หมายถึง ตัวอย่างที่จำแนกซีโรไทป์ได้
- (ผลลบ) หมายถึง ตัวอย่างที่จำแนกซีโรไทป์ไม่ได้
-* หมายถึง ไม่จำเป็นต้องทำ virus isolation เพื่อแยกซีโรไทป์

ดังแสดงในตารางที่ 2 ทั้งนี้อาจเนื่องจากไวรัสที่ระบาดในพื้นที่บางสายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมทำให้ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบไม่สามารถจับกับยีนในส่วน 1D เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายได้ โดยยีนส่วน 1D เป็นส่วนที่มีการผันแปรมากที่สุด และสร้างโปรตีนชนิด VP1 ซึ่งมีความจำเพาะต่อซีโรไทป์ (Bittle *et al*., 1982; Domingo *et al*., 2003) สำหรับกลุ่มที่ 6 ไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้ทั้ง 2 วิธี ทั้งวิธี one-step multiplex RT-PCR และวิธีมาตรฐานของ OIE ทางด้านระยะเวลาทดสอบ พบว่าการทดสอบโดยวิธี one-step multiplex RT-PCR จะทราบผลในการทดสอบเพียงครั้งเดียว และใช้เวลาไม่เกิน 1 วันแต่การทดสอบโดยวิธี ELISA typing ร่วมกับวิธี virus isolation ใช้เวลาในการทดสอบนานถึง 3-14 วัน ทำให้วิธี one-step multiplex RT-PCR สามารถทราบผลการทดสอบเร็วกว่าวิธี ELISA typing ร่วมกับ virus isolation อย่างไรก็ดีเมื่อพิจารณาค่า diagnostic sensitivity กับ diagnostic specificity ของวิธี one-step multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นแล้ว พบว่าวิธีนี้สามารถใช้เป็นวิธีตรวจคัดกรองที่ให้ผลการทดสอบเร็วส่งผลให้เจ้าหน้าที่สัตวแพทย์ในพื้นที่สามารถดำเนินการควบคุมโรคได้เร็วขึ้น

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบจากตารางที่ 3 พบว่าการจำแนกซีโรไทป์ด้วยวิธี one-step multiplex RT-PCR กับวิธี ELISA typing เพียงอย่างเดียว (ไม่ทำ virus isolation) สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้ 58.73% (491/836 ตัวอย่าง) และ 28.71% (240/836 ตัวอย่าง) ตามลำดับ สอดคล้องกับผลของ Sareyyupoglu and Burgu (2017) ที่ให้ผลบวกในการจำแนกซีโรไทป์ด้วยวิธี one-step multiplex RT-PCR กับวิธี ELISA typing เท่ากับ 73.91% (153/207 ตัวอย่าง) และ 37.75% (77/207 ตัวอย่าง) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าวิธี one-step multiplex RT-PCR ให้ผลบวกสูงกว่ากว่าวิธี ELISA typing และค่าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าทั้งวิธี one-step multiplex RT-PCR และวิธีมาตรฐาน OIE สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้ใกล้เคียงกัน คือ 58.73% (491/836 ตัวอย่าง) และ 60.41% (505/836 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ดังนั้นห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจหาซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ไม่สามารถทดสอบ virus isolation สามารถนำวิธี one-step multiplex RT-PCR มาใช้ในการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นการคัดกรองเบื้องต้น ซึ่งจะได้ประสิทธิผลใกล้เคียงกับการใช้วิธีมาตรฐาน OIE

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยตามวิธีมาตรฐาน OIE โดยวิธี ELISA typing นั้นในกรณีที่ตัวอย่างมีเชื้อไวรัสจำนวนน้อยจะต้องผ่านการเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัส ซึ่งทำให้ผลการตรวจออกมาล่าช้า จึงได้มีการนำวิธี one-step multiplex RT-PCR มาใช้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน OIE คือวิธี ELISA typing อย่างเดียว หรือ ELISA typing ร่วมกับ virus isolation พบว่ามีค่าความไวเชิงวินิจฉัย (diagnostic sensitivity) และค่าความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (diagnostic specificity) สูง สามารถนำวิธี one-step multiplex RT-PCR มาใช้คัดกรองเบื้องต้นในจำแนกชนิดของซีโรไทป์เพื่อให้รายงานผลได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถควบคุมการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยได้เร็ว แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องยืนยันผลการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน OIE ด้วยเพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และผู้อำนวยการสำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ ซึ่งเป็นผู้สนับสนุนทั้งด้านนโยบายและงบประมาณในการดำเนินงาน ขอขอบคุณผู้เชี่ยวชาญ สพ.ญ.ปราณี รอดเทียน และนางสาวกัญญ์ธนิศ ลิ้มวิบูลพงศ์ ที่เป็นที่ปรึกษาของงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่ให้ความร่วมมือในการเตรียมและตรวจตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

ร่มพฤกษ์ อุดล และวิไล ลินจงสุบงกช. 2549. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้จากประเทศไทย และในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในปี พ.ศ. 2547-2548. *สัตวแพทยสาร.* 57(1): 15-23.

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G. and Lerner, R.A. 1982. Protection against foot and mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*. 298: 30-33.

Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E, Nunez, J.I. and Sobrino, F. 2003. Evolution of foot and mouth disease virus. *Virus Res.* 91: 47-63.

Giridharan, P., Hemadri, D., Tosh, C., Sanyal, A. and Bandyopadhyay, S.K. 2005. Development and evaluation of a multiplex PCR for differentiation of foot-and-mouth disease virus strains native to India. *J. Virol. Method.* 126: 1-11.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

Hoffmann, B., Beer, M., Reid, S.M., Mertens, P., Oura, C.A., Van Rijn, P.A., Slomka, M.J., Banks, J., Brown, I.H., Alexander, D.J. and King, D.P. 2009. A review of RT-PCR technologies used in Veterinary Virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet. Microbiol.* 139: 1–23.

Knowles, N.J., Wadsworth, J., Bachanek-Bankowska, K. and King, D.P. 2016. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 35(3): 1-28.

Kumar, S., Stecher,G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol.Biol. evol.* 33: 1870-1874.

Le, V.P., Lee, K.N., Nguyen, T., Kim, S.M., Cho, I.S., Quyen, D.V., Khang, D.D. and Park, J.H. 2011. Development of one-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection and differentiation of foot and mouth disease virus serotypes O, A and Asia 1 circulating in Vietnam. *J. Virol. Methods*. 175: 101-108.

Réid, S.M., Ferris, N.P., Hutchings, G.H., Samuel, A.R. and Knowles, N.J. 2000. Primary diagnosis of foot and mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 89: 167-176.

Réid, S.M., Mioulet, V., Knowles, N.J., Shirazi, N., Belsham, G.J. and King, D.P. 2014. Development of tailored real-time RT-PCR assays for the detection and differentiation of serotype O, A and Asia-1 foot and mouth disease virus lineages circulating in the Middle East. *J. Virol. Methods.* 207: 146-153.

Rodriguez, L.L. and Gay, C.G. 2011. Development of vaccines toward the global control and eradication of foot and mouth disease. *Expert Rev. Vaccines.* 10: 377–387.

Sareyyupoglu, B. and Burgu, I. 2017. Development of multiplex RT-PCR for detection and differentiation of foot and mouth disease virus O and A in Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 41: 746-769.

Vangrysperre, W. and de Clercq, K. 1996. Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot and mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch. Virol*. 141: 331–344.

Wacharapon, C. 2008. Country report Thailand. In: SRR, O. (Ed.).11th Meeting of OIE SEAFMD National Coordinators. Chiang Mai, Thailand. p. 2008.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2019a. "Chapter 1.1.6 Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases, version adopted in May 2013." In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf. Accessed August 4, 2020.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2019b. "Chapter 2.2.5 Statistical Approaches to Validation, version adopted in May 2014." In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals2019. [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.05_STATISTICAL_VALIDATION.pdf. Accessed August 4, 2020.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2019c."Chapter 3.1.8 Foot and mouth disease (Infection with foot and mouth disease virus), version adopted in May 2017." In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf. Accessed April 1, 2020.