การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี Virus Isolation และ Real-Time RT PCR

สมใจ กมลศิริพิชัยพร * ปณิธาน ทองทา รัตนีย์ ทองทา จุฬานีย์ น่วมจิตร์

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
* ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 044-279112 Email-address: sjkamol@gmail.com

บทคัดย่อ

ตัวอย่างส่งตรวจเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 127 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างส่งตรวจที่เก็บจากท้องที่ในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2555 นำมาศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี virus isolation และ ELISA typing แสดงผลพบเชื้อ 83 ตัวอย่าง (65.35%) จำแนกเป็นไทป์ O จำนวน 27 ตัวอย่าง (21.26%) และไทป์ A จำนวน 56 ตัวอย่าง (44.09%) และไม่พบเชื้อ จำนวน 44 ตัวอย่าง (34.65%) ในขณะที่การตรวจโดยวิธี real-time RT PCR แสดงผลเป็นบวกจำนวน 126 ตัวอย่าง (99.21%) และผลเป็นลบ จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.79%) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี real-time RT PCR มีความไวในการตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสน้อย และสามารถตรวจหาไวรัสได้ทั้งมีชีวิตและไม่มีชีวิต ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยในเบื้องต้นได้ เพื่อเป็นแนวทางในการวางแผนป้องกันและควบคุมโรคให้เกิดประสิทธิภาพและทันกับสถานการณ์ของการเกิดโรค และใช้เป็นวิธีคัดกรองตัวอย่างจำนวนมากในการสำรวจโรคระบาดในพื้นที่

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย virus isolation real-time RT PCR

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดสัตว์ที่สามารถติดต่อได้ง่ายและแพร่กระจายอย่างรวดเร็วในสัตว์เศรษฐกิจ ได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ (Thomson, 1994) ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในด้านอุตสาหกรรมปศุสัตว์ในประเทศไทย เนื่องจากไม่สามารถส่งสัตว์ไปยังต่างประเทศหรือในประเทศที่ปลอดจากโรคปากและเท้าเปื่อยได้ สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อไวรัสแอฟโทไวรัส (Aphthovirus) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพิคอร์น่าไวรัส (Picornavirus) ในการชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อยโดยการสังเกตอาการเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ จึงจำเป็นต้องใช้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย การตรวจวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและรวดเร็วมีความสำคัญในการป้องกันการแพร่กระจายของโรคเป็นอย่างยิ่ง วิธีการตรวจวินิจฉัยที่เป็นวิธีมาตรฐานได้แก่วิธี virus isolation และ ELISA typing การทำ virus isolation โดยเพิ่มปริมาณบนเซลล์เพาะเลี้ยงในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสน้อย แต่ในบางกรณีการตรวจวินิจฉัยให้ผลไม่พบเชื้อ (No virus detected; NVD) แต่ในความเป็นจริงแล้วสัตว์กำลังเริ่มแสดงอาการป่วยด้วยโรคปากและเท้าเปื่อย ดังนั้นจึงไม่สามารถบ่งบอกหรือจำแนกชนิดของไวรัสที่ทำให้เกิดโรคได้ เนื่องจากมีปริมาณไวรัสอยู่น้อยเกินกว่าที่จะตรวจพบได้โดยวิธี ELISA จากข้อมูลของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ ระหว่างปี พ.ศ.2553-2555 การตรวจให้ผลไม่พบเชื้อมีเปอร์เซ็นต์สูง เนื่องจากคุณภาพตัวอย่างไม่ดี หรือเก็บได้น้อย หรือสัตว์มีภูมิคุ้มกันโรคเพียงบางส่วนทำให้เกิดวิการไม่เด่นชัด ทำให้การตรวจวินิจฉัยได้ผลลบจำนวนมากขึ้น และการทำ virus isolation ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณไวรัสมีขั้นตอนซับซ้อนในการเพาะเลี้ยงเซลล์และต้องใช้เวลานานหลายวันกว่าจะได้ผล และตัวอย่างต้องมีไวรัสที่มีชีวิต จึงมีการนำวิธี real-time RT PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย (Reid et al., 2003; Zhang and Alexandersen, 2003; Shaw et al., 2004) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณไวรัสในระดับชีวโมเลกุลที่สามารถติดตามดูปฏิกิริยาได้ทุกระยะระหว่างที่กำลังดำเนินงานอยู่จริง ได้ผลลัพธ์มากขึ้น รวดเร็ว และลดโอกาสการปนเปื้อน ทั้งยังเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง ในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสน้อยก็สามารถเพิ่มปริมาณจนตรวจพบได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถนำมาใช้สนับสนุนหรือยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีมาตรฐานได้ การศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากตัวอย่างท้องที่ในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2553-2555 โดยวิธี virus isolation และ real-time RT PCR เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนโครงการเฝ้าระวังและสำรวจโรคของกรมปศุสัตว์ สำหรับใช้เป็นแนวทางในการวางแผนป้องกันและเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคให้ทันกับสถานการณ์ของการเกิดโรคระบาดในพื้นที่ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างเชื้อไวรัสและการเพิ่มปริมาณไวรัส (virus isolation)

ตัวอย่างส่งตรวจเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 127 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างส่งตรวจประกอบด้วยเนื้อเยื่อลิ้น กีบ เหงือก และขอบปาก ที่เก็บจากท้องที่ในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2555 นำมาเพิ่มปริมาณไวรัสโดยวิธีการผ่านเชื้อไวรัสลงบนเซลล์เพาะเลี้ยง primary lamb kidney cell จำนวน 1-3 passage เมื่อเซลล์เกิด Cytopathic effect (CPE) 100% จึงนำมาตรวจจำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธี ELISA Typing ตามวิธีการของ Roeder และ LeBlanc Smith (1987)

2. การแยกสกัด RNA

ตัวอย่างส่งตรวจนำมาสกัด RNA โดยการใช้ reagent kit สำเร็จรูป ได้แก่ Trizol® LS reagent (Invitrogen™, USA) วิธีการและขั้นตอนตามข้อบ่งใช้ของผู้ผลิต

3. Reverse Transcription (RT)

Reverse Transcription (RT) เป็นขั้นตอนการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase มีวิธีการดังนี้คือ ในปฏิกิริยา 25 µl ประกอบด้วย 1X buffer, 1mM dNTPs (each), 10 mM DTT, 20 U RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 0.8 µM primer NK61 (Knowles and Samuel, 1998), 200 U M-MLV เอนไซม์ (Promega, USA), ตัวอย่าง RNA 10 µl และเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ให้ปริมาตรครบ 25 µl นำเข้าเครื่อง Thermal Cycler (Touch Down, UK) ตั้งโปรแกรมที่ 42ºC เป็นเวลา 60 นาที, 95 ºC เป็นเวลา 5 นาที จะได้ DNA template สำหรับนำไปทำขั้นตอน Real-Time PCR

4. รายละเอียดลำดับเบส (sequence) ของ primer และ probe

Primer และ probe ที่มีความจำเพาะต่อ 3D gene ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่ง probe ที่ใช้เป็นชนิด hydrolysis probe ติดฉลากด้วย FAM (6-carboxyfluorescein) ที่ด้านปลาย 5’ ทำหน้าที่เป็น reporter dye และ TAMRA (tetramethylrhodamine) ที่ด้านปลาย 3’ เป็น quencher (Callahan et al., 2002) โดยมีรายละเอียดลำดับเบสแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดลำดับเบส (sequence) ของ primer และ probe

Name	Primer sequence 5’-3’	Length (bp)
Forward primer	ACT GGG TTT TAC AAA CCT GTG A	22
Reverse primer	GCG AGT CCT GCC ACG GA	17
Probe	(FAM)-TCC TTT GCA CGC CGT GGG AC-(TAMRA)	20

5. Real-Time PCR

การทำปฏิกิริยา Real time PCR ใช้เครื่อง LightCycler® 480 (Roche Germany) โดยแต่ละปฏิกิริยามีปริมาตร 20 µl ประกอบด้วยน้ำยา LightCycler®480 Probes Master (Roche Germany)(2X) 10 µl, Forward-primer, Reverse-primer และ probe (Sigma-Proligo, Singapore) เข้มข้น 10 µM อย่างละ 0.5 µl น้ำกลั่น 6.5 µl และ DNA template 2 µl โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ Pre-incubation 95ºC เป็นเวลา 10 นาที, Amplification 95ºC เป็นเวลา 10 วินาที และ 60ºC เป็นเวลา 40 วินาที จำนวน 45 รอบ และ Cool 40ºC เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์จะได้ค่า Crossing point (Cp) ซึ่งเป็นจำนวนรอบที่แสดงผลเป็น positive ที่ตรวจวัดสัญญาณได้ด้วย Software ของเครื่อง LightCyCler®480 โดยตัวอย่างที่ให้ผลเป็น negative และ negative control จะได้ค่า Cp มากกว่า 45 รอบ (Callahan et al, 2002)

ผล

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจากตัวอย่างส่งตรวจ จำนวน 127 ตัวอย่าง โดยวิธี virus isolation และ ELISA typing แสดงผลพบเชื้อ จำนวน 83 ตัวอย่าง (65.35%) จำแนกเป็นไทป์ O จำนวน 27 ตัวอย่าง (21.26%) และไทป์ A จำนวน 56 ตัวอย่าง (44.09%) และแสดงผลไม่พบเชื้อ จำนวน 44 ตัวอย่าง (34.65%) ในขณะ

ที่การตรวจโดยวิธี real-time RT PCR แสดงผลเป็นบวก (positive) จำนวน 126 ตัวอย่าง (99.21%) และแสดงผลเป็นลบ (negative) จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.79%) ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย จากตัวอย่างส่งตรวจ ที่ระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2553 -2555 จำนวน 127 ตัวอย่าง โดยวิธี virus isolation และ ELISA typing กับวิธี real-time RT PCR

No. of samples	Virus isolation and ELISA typing results			Real-time RT PCR results	
	O	A	NVD	Positive	Negative
127	27 (21.26%)	56 (44.09%)	44 (34.65%)	126 (99.21%) Cp ≤ 45	1 (0.79%) Cp > 45

O = Serotype O
A = Serotype A
NVD = No virus detected
Cp = จำนวนรอบที่แสดงผลเป็น positive

สรุปและวิจารณ์

การตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทางห้องปฏิบัติการ วิธีมาตรฐานที่ใช้ได้แก่วิธี virus isolation และ ELISA typing โดย virus isolation เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณไวรัสบนเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อโรคและมีขั้นตอนซับซ้อนต้องใช้เวลาในการเพาะเซลล์ 2-3 วัน ตัวอย่างที่จะให้ผลตรวจเป็นพบเชื้อต้องเป็นตัวอย่างที่เก็บจากรอยโรคของสัตว์ที่แสดงอาการภายใน 7-10 วัน ซึ่งมี live virus อยู่ (Alexandersen et al., 2003) และตัวอย่างส่งตรวจที่มีปริมาณไวรัสน้อยการตรวจวินิจฉัยอาจให้ผลไม่พบเชื้อ (No virus detected; NVD) ในปัจจุบันจึงมีการนำวิธี real-time RT PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณไวรัสโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่สามารถตรวจได้รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง และสามารถตรวจตัวอย่างได้ทั้งมีและไม่มีชีวิตอยู่ (King et al., 2006) การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี virus isolation และ ELISA typing กับวิธี real-time RT PCR จากตัวอย่างส่งตรวจที่เก็บจากท้องที่ที่เกิดการระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2555 จำนวน 127 ตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่าการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี virus Isolation และ ELISA typing แสดงผลพบเชื้อ จำนวน 83 ตัวอย่าง ซึ่งตรงกับผลการตรวจโดยวิธี real-time RT PCR ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าตัวอย่างที่ตรวจมีเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอยู่จริง ดังจะเห็นได้จากค่า Cp ซึ่งเป็นจำนวนรอบที่แสดงผลเป็น positive มีค่าน้อยกว่า 35 รอบ (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Shaw และคณะ (2004) และแสดงผลไม่พบเชื้อ จำนวน 44 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจโดยวิธี real-time RT PCR แสดงผลเป็นบวก (positive) จำนวน 126 ตัวอย่าง และแสดงผลเป็นลบ (negative) จำนวน 1 ตัวอย่าง นอกจากนี้การศึกษายังพบว่า virus isolation และ ELISA typing แสดงผลไม่พบเชื้อ แต่ real-time RT PCR ให้ผลเป็นบวก มีจำนวน 43 ตัวอย่าง และค่า Cp มีค่ามากกว่า 35 รอบ ซึ่งแสดงว่าถ้ามีการใช้

virus isolation และ ELISA typing ในการตรวจวินิจฉัยเพียงวิธีเดียวอาจทำให้เกิดผลการตรวจคลาดเคลื่อนไป 34.65% เนื่องจากในตัวอย่างมีไวรัสอยู่น้อยมาก หรือไม่มี live virus อยู่ในตัวอย่างส่งตรวจ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ferris และคณะ (2004) และในกรณีที่ผลการทำ virus isolation และ ELISA typing แสดงผลไม่พบเชื้อ และผลของ real-time RT PCR ก็เป็นลบเช่นเดียวกัน จำนวน 1 ตัวอย่าง ดังจะเห็นได้จากผลของค่า Cp ซึ่งเป็นจำนวนรอบที่แสดงผลมีค่ามากกว่า 45 รอบ จึงเป็นการยืนยันว่าตัวอย่างที่ตรวจไม่มีเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งในขั้นตอนของการทำ real-time RT PCR มีการควบคุมการปฏิบัติงาน เพื่อป้องกันการปนเปื้อน โดยมีการใช้ internal control ทั้ง negative และ positive control ทุกครั้ง เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูงอาจจะทำให้เกิดผล false positive และ false negative ได้ (Shaw et al., 2004)

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าวิธี real-time RT PCR มีความไวในการตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสน้อย โดยสามารถตรวจได้ 10-100 virus genomes ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Callahan และคณะ (2002) และการศึกษาของ King และคณะ (2006) ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถนำมาใช้สนับสนุน หรือยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีมาตรฐานได้ การนำเทคนิค real-time RT PCR เข้ามาประยุกต์ใช้จะช่วยลดขั้นตอนและประหยัดเวลา และสามารถใช้เทคนิคนี้เป็นตัวคัดกรองตัวอย่างสำหรับการสำรวจโรคซึ่งต้องทดสอบตัวอย่างจำนวนมากๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนป้องกันและควบคุมโรคให้เกิดประสิทธิภาพและทันกับสถานการณ์ของการเกิดโรคระบาดในพื้นที่ แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของไวรัสเป็นไทป์ได้ ทั้งนี้อยู่ระหว่างการศึกษาหา primer ที่จำเพาะต่อซีโรไทป์ เพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและสนับสนุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A.I. and Garland, A.J. 2003. Pathogenesis and diagnosis of foot- and- mouth disease. J. Comp. Pathol. 129(I): 1-36.

Callahan, J.D., Brown, F., Osario, F.A., Sur, J.H., Kramer, E., Long, G.W., Lubroth, J., Ellis, S.J., Shoulars, K.S., Gaffney, K.L., Rock, D.L. and Nelson, W.M. 2002. Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 220:1636-1642.

Ferris, N.P., Reid, S.M., King, D.P., Hutchings, G.H. and Shaw, A.E. 2004. Prospects for improved laboratory diagnosis of FMD using real time RT-PCR. Report of the session of the research group of the standing technical committee of the European Commission for the control of foot and mouth disease. Rome, Italy. p. 261-267.

King, D.P., Ferris, N.P., Shaw, A.E., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Giuffre, A.C., Robida, J.M., Callahan, J.D., Nelson, W.M. and Beckhan, T.R. 2006. Detection of foot-and-mouth disease virus: comparative diagnosis sensitivity of two independent real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. J. Vet. Diagn. Invest. 18: 93-97.

Knowles, N.J. and Samuel, A.R. 1998. RT-PCR and sequencing protocols of standards for the molecular epidemiology of exotic virus diseases of animal. Institute for Animal Health, Pirbright. p. 5-8.

Reid, S.M., Grierson, S.S., Ferris, N.P., Hutchings, G.H. and Alexanderse, S. 2003. Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus. J. Virol. Methods. 107(2): 129-39.

Roeder, P.L. and LeBlanc Smith, P.M. 1987. Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay : a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. Res. Vet. Sci. 43: 225-232.

Shaw, A.E., Reid, S.M., King, D.P., Hutchings, G.H. and Ferris, N.P. 2004. Enhanced laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time polymerase chain reaction, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 23: 1003–1009.

Thomson, G.R. 1994. Foot-and-mouth disease. In: Infectious disease of livestock with special reference to southern Africa. 2nd ed., edited by J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson, R.C. Tustin, and N.P.J. Kriek. Oxford University Press, Cape Town, Southern Africa. p. 825-852.

Zhang, Z. and Alexandersen, S. 2003. Detection of carrier cattle and sheep persistently infected with foot-and-mouth disease virus by a rapid real time RT-PCR assay. J. Virol. Methods. 111: 95-100.

Comparison of Foot and Mouth Disease Virus Diagnosis by Virus Isolation and Real-Time RT PCR

Somjai Kamolsiripichaiporn* Panithan Thongtha Rattanee Thongtha Julanee Nuamchit

Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, Pakchong, Nakhon Ratchasima 30130, Thailand
* Corresponding author Tel. 044-279112; Email-address: sjkamol@gmail.com

Abstract

The comparison of foot and mouth disease virus diagnosis by virus isolation and real-time RT PCR was studied in 127 tissue samples submitted to the Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia during 2010-2012. It was found that virus isolation and ELISA typing test gave positive results of 83 samples (65.35%), which are 27 type O samples (21.26%), 56 type A samples (44.09%) and 44 no viral detected samples (34.65%), respectively. The real-time RT PCR technique gave positive results of 126 samples (99.21%) and one negative sample (0.79%). The results indicated that real-time RT PCR for FMD is a more sensitive technique and can be used as a confirmation test for FMD diagnosis. In addition, real-time RT PCR technique will be a useful screening method for effective control of foot and mouth disease outbreak.

Key words: Foot and mouth disease virus, virus isolation, real-time RT PCR