การใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ในโค

โดย

นายธีรเจต เลาหเสถียร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ในโค

โดย
นายธีรเจต เลาหเสถียร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) FOR RAPID DETECTION OF LSDV AND MRSA IN CATTLE.

By

MR. Teerajet LAOHASATIAN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for Master of Science ANIMAL SCIENCE

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2021

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ในโค
โดย	ธีรเจต เลาหเสถียร
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ดร. ภวัต เสรีตระกูล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี มานะไตรนนท์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร.ภวัต เสรีตระกูล)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นรินทร์ ปริยวิชญภักดี)

.... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(สัตวแพทย์หญิง ดร.อรพรรณ อาจคำภา)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

631120004 : สัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : โรคลัมปีสกิน, โรคเต้านมอักเสบ, Lumpy skin disease virus, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

นาย ธีรเจต เลาหเสถียร: การใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ในโค อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร. ภวัต เสรีตระกูล

เชื้อ Lumpy skin disease virus (LSDV) และเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นเชื้อก่อโรคที่ส่งผลกระทบต่อปศุสัตว์ที่เลี้ยงโคเป็นอย่างมาก โดยเชื้อ LSDV เป็นเชื้อก่อโรคลัมปีสกิน ซึ่งเป็นโรคที่ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เนื่องจากทำให้โคซูบผอม ทำให้เกิดรอยโรคเป็นตุ่มนูนบริเวณผิวหนัง จึงส่งผลให้มูลค่าของโคต่ำลง เชื้อ MRSA เป็นสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบในโค ส่งผลให้ปริมาณน้ำนมลดลง และคุณภาพของน้ำนมต่ำลง จึงไม่สามารถส่งนมออกจำหน่ายได้ ในปัจจุบันนี้เชื้อ LSDV และ MRSA สามารถตรวจวินิจฉัยได้ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งจำเป็นที่จะต้องทำในห้องปฏิบัติการ และจำเป็นที่จะต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญด้านอณูชีววิทยาในการตรวจวินิจฉัย นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน ซึ่งส่งผลให้เกิดความล้าช้าและอาจส่งผลให้รักษาไม่ทันได้ ดังนั้นการเก็บตัวอย่างที่สามารถทำได้ง่าย และนำมาตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ได้อย่างรวดเร็วจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อที่จะป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อที่จะพัฒนาต้นแบบการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ด้วยเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ได้อย่างสะดวก รวดเร็ว และแม่นยำยิ่งขึ้น เพื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR โดยเก็บตัวอย่างจากโคที่เป็นโรคลัมปีสกินและโรคเต้านมอักเสบ และนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP โดยออกแบบไพร์เมอร์ให้จำเพาะต่อยีน GPCR ในเชื้อ LSDV และยีน *mecA* ในเชื้อ MRSA ซึ่งพบว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ได้ โดยมีความไวในการตรวจวินิจฉัยเทียบเท่ากับเทคนิค PCR ซึ่งบ่งชี้ว่าสามารถพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อนำมาวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA จากโคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

631120004 : Major ANIMAL SCIENCE
Keyword : Lumpy skin disease, Mastitis, Lumpy skin disease virus, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

MR. TEERAJET LAOHASATIAN : LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) FOR RAPID DETECTION OF LSDV AND MRSA IN CATTLE. THESIS ADVISOR : DR. PAWAT SERITRAKUL

Lumpy skin disease virus (LSDV) and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are the most economically significant diseases of cattle. LSDV is the cause of Lumpy skin disease, resulting in considerable economic losses due to emaciation, damage to skin epithelial cells, and lowered of commercial value. MRSA is a major cause of mastitis in cattle, resulting in milk production loss and economic losses to livestock as well as public health concerns. Currently, normal detection of LSDV and MRSA in laboratory is performed using PCR assay, which is time-consuming in sample preparation, and requires specialized personnel and equipment. Therefore, a simpler method of sample collection and rapid detection of LSDV and MRSA are needed to effectively preventing the spread of the pathogens. The aim of the present study was to develop a prototype of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay, which can detect LSDV and MRSA more conveniently, quickly, and accurately, and to compare this method to the conventional PCR assay. The sample was collected from cattle with lumpy skin disease and mastitis. The LAMP primers were designed to target GPCR gene in LSDV and *mecA* gene in MRSA. We found that LSDV and MRSA samples can be detected by both PCR and LAMP assays. This indicates that the LAMP assay can effectively detects GPCR gene in LSDV and with equal sensitivity to PCR assays *mecA* gene in MRSA from cattle.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลืออนุเคราะห์ทางด้านการปฏิบัติการและทางด้านวิชาการ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดีโดยตลอดจากคณาจารย์หลาย ๆ ท่าน นักวิทยาศาสตร์ และสำนักงานต่าง ๆ

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. ภวัต เสรีตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนตรวจสอบวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ทำให้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และให้โอกาสได้เรียนรู้สิ่งใหม่ ๆ ได้ให้คำแนะนำและแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ รวมถึงให้ความเชื่อมั่นในการทำงาน จนทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยไปได้อย่างราบรื่น

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นรินทร์ ปริยวิชญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ส่งผลให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี มานะไตรนนท์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และ สัตวแพทย์หญิง ดร. อรพรรณ อาจคำภา ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ที่มากขึ้น

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ ธีระยุทธ ชาวุฒิ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ กรมปศุสัตว์ และวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเพชรบุรี ที่ได้อนุเคราะห์ในด้านการเก็บตัวอย่างงานวิจัย

ขอขอบคุณ ดร. สุภาวดี ฉิมทอง นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร ที่ได้ให้คำแนะนำทางด้านการปฏิบัติการ

ท้ายที่สุดขอขอบคุณ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี สำหรับอุปกรณ์และสถานที่ดำเนินงานวิจัย

นาย ธีรเจต เลาหเสถียร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.......... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.......... จ

กิตติกรรมประกาศ.......... ฉ

สารบัญ.......... ช

สารบัญตาราง.......... ญ

สารบัญภาพ.......... ฏ

บทที่ 1.......... 15

บทนำ.......... 15

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.......... 15

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.......... 18

1.3 สมมติฐานของการศึกษา.......... 18

1.4 ขอบเขตการศึกษา.......... 18

บทที่ 2.......... 19

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.......... 19

2.1 Lumpy skin disease virus (LSDV).......... 19

2.2 กลไกการติดเชื้อ LSDV ในโฮสต์เซลล์.......... 19

2.3 อาการและรอยโรคของโรคลัมปีสกินในโค.......... 21

2.4 การแพร่ของเชื้อ LSDV.......... 22

2.5 การระบาดของโรคลัมปีสกิน.......... 23

2.6 การวินิจฉัยเชื้อ LSDV.......... 24

2.7 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).......... 24

มหาวิทยาลัยศิลปากร

2.8 กลไกการติดเชื้อ *S. aureus* 25

2.9 Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) 25

2.10 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus* 26

2.11 การวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ 27

2.12 เทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 27

2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 29

บทที่ 3 34

ขั้นตอนการศึกษา 34

3.1 การเก็บตัวอย่าง 36

3.2 การแยกเชื้อ *S. aureus* จากน้ำนมโค 37

3.3 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility test) 38

3.4 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง 38

3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) 41

3.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 42

3.7 ศึกษาความไว (Sensitivity) ของเทคนิค LAMP และ PCR 44

3.8 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LSDV 44

บทที่ 4 45

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 45

4.1 การเก็บตัวอย่าง LSDV 45

4.2 การวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค PCR 45

4.3 การวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค LAMP 47

4.4 ความแตกต่างของตัวอย่างในการวินิจฉัยเชื้อ LSDV 51

4.5 เปรียบเทียบความไว (Sensitivity) ของเทคนิค PCR และ LAMP ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV 52

มหาวิทยาลัยศิลปากร

4.6 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LSDV 54

4.7 การเก็บตัวอย่าง MRSA..... 62

4.8 การจำแนกเชื้อ *S. aureus* จากน้ำนมโค..... 62

4.9 การวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค PCR..... 63

4.10 การวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค LAMP 64

4.11 เปรียบเทียบความไว (Sensitivity) ของเทคนิค PCR และ LAMP ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MRSA..... 66

4.12 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility test)..... 67

4.13 วิจารณ์ผลการทดลอง 69

บทที่ 5 76

สรุปผลการทดลอง..... 76

รายการอ้างอิง 77

ภาคผนวก..... 86

ภาคผนวก ก 87

ภาคผนวก ข 91

ภาคผนวก ค 96

ประวัติผู้เขียน..... 104

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1: การวินิจฉัยโรคลัมปีสกินจากชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังและเลือดที่จากโคโดยใช้ PCR และ DBH 30

ตารางที่ 2: การเปรียบเทียบการวินิจฉัยเชื้อในกลุ่ม CaPVs โดยใช้เทคนิค PCR และ LAMP (LAMP1 และ LAMP2) 32

ตารางที่ 3: การใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจหายีน femA, mecA และ lukS ของเชื้อในกลุ่ม methicillin-resistant staphylococci 33

ตารางที่ 4: แสดงลำดับเบสไพร์เมอร์ของยีน GPCR และ P32 ของเชื้อ LSDV สำหรับ PCR 41

ตารางที่ 5: แสดงลำดับเบสไพร์เมอร์ของยีน femA, blaZ และ mecA ของเชื้อ MRSA สำหรับ PCR 41

ตารางที่ 6: แสดงลำดับเบสไพร์เมอร์ของยีน GPCR ของเชื้อ LSDV สำหรับ LAMP 42

ตารางที่ 7: แสดงลำดับเบสไพร์เมอร์ของยีน mecA ของเชื้อ MRSA สำหรับ LAMP 43

ตารางที่ 8: ผลการวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากยีน P32 และ GPCR จากตัวอย่างเลือด อุจจาระ น้ำลาย และ nasal swab ของโค ด้วยเทคนิค PCR 46

ตารางที่ 9: ผลการวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากยีน GPCR จาก nasal swab ของโค ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับ positive control และ no-template control 50

ตารางที่ 10: การวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินด้วยเทคนิค PCR จากประเภทตัวอย่างที่แตกต่างกัน ได้แก่ เลือด อุจจาระ nasal swab และ น้ำลาย ประเภทละ 30 ตัวอย่าง 51

ตารางที่ 11: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน P32 จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 56

ตารางที่ 12: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 57

ตารางที่ 13: แสดงความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน P32 จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน P32 ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank 60

ตารางที่ 14: แสดงความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน GPCR ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank 60

ตารางที่ 15: ความชุกของเชื้อ S. aureus ที่แยกได้จากน้ำนมโคในจังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 62

ตารางที่ 16: ผลการวินิจฉัยเชื้อ MRSA จากตัวอย่าง S. aureus ที่แยกได้จากน้ำนมโค ด้วยเทคนิค PCR 63

ตารางที่ 17: ผลการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MRSA จากยีน mecA ด้วยเทคนิค LAMP 66

ตารางที่ 18: การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท (I1-I10) และเชื้อ MRSA สายพันธุ์อ้างอิง (RI) 68

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1: องค์ประกอบของ LSDV 19

ภาพที่ 2: กระบวนการติดเชื้อ LSDV ในโฮสต์เซลล์ 20

ภาพที่ 3: อาการและรอยโรคของโรคลัมปีสกินในโค 21

ภาพที่ 4: การแพร่กระจายของ LSDV 22

ภาพที่ 5: Methicillin-resistance Staphylococcus aureus (MRSA) 24

ภาพที่ 6: การดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β–lactams ของ MRSA 26

ภาพที่ 7: การเกิดปฏิกิริยา LAMP 27

ภาพที่ 8: การวินิจฉัยโดยเทคนิค LAMP และ LAMP-LFD 30

ภาพที่ 9: แผนภาพแสดงการดำเนินการทดลอง 34

ภาพที่ 10: การวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากดีเอ็นเอตัวอย่าง PCR+ และ PCR- ร่วมกัน positive control และ no-template control ด้วยเทคนิค LAMP 47

ภาพที่ 11: การวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากดีเอ็นเอตัวอย่าง PCR+ และ PCR- ร่วมกับ positive control และ no-template control ด้วยเทคนิค LAMP และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis 47

ภาพที่ 12: การวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินด้วยเทคนิค LAMP จากประเภทตัวอย่างที่แตกต่างกัน 51

ภาพที่ 13: ผลการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค PCR ของยีน P32 และ GPCR และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis 52

ภาพที่ 14: ผลการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค LAMP ของยีน GPCR และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis 53

ภาพที่ 15: ผลการวิเคราะห์ sequence alignment ของยีน P32 จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน P32 ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank 57

ภาพที่ 16: ผลการวิเคราะห์ sequence alignment ของยีน GPCR จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน GPCR ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank....................... 58

ภาพที่ 17: ผลวิเคราะห์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน P32 จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน P32 ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank 61

ภาพที่ 18: ผลวิเคราะห์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน GPCR จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน GPCR ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank 61

ภาพที่ 19: ผลการตรวจหายีน femA, blaZ และ mecA จากเชื้อ S. aureus ที่แยกได้จากน้ำนมโค ด้วยเทคนิค PCR และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis....................................... 64

ภาพที่ 20: ผลการวินิจฉัยเชื้อ MRSA จากยีน mecA ของเชื้อ S. aureus ที่แยกได้จากน้ำนมโค ด้วยเทคนิค LAMP 65

ภาพที่ 21: ผลการวินิจฉัยเชื้อ MRSA จากยีน mecA ของเชื้อ S. aureus ที่แยกได้จากน้ำนมโค ด้วยเทคนิค LAMP และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis 65

ภาพที่ 22: ผลการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค PCR จากยีน mecA และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis.. 67

ภาพที่ 23: ผลการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างด้วยวิธี antimicrobial susceptibility test... 68

ภาพที่ 24: ชุดทดสอบ Lateral flow dipstick (LFD) 75

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันนี้เกษตรกรในประเทศไทยได้มีการเลี้ยงโคจำนวนมากและคาดว่าจะมากขึ้นในอนาคต ดังนั้นการเกิดโรคในโคจึงเป็นปัญหาที่สำคัญและร้ายแรงต่อเกษตรกร ส่งผลกระทบต่อระบบการผลิตสัตว์เศรษฐกิจ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของโรคและเกิดเป็นโรคระบาดที่ยากต่อการควบคุม หนึ่งในวิธีการจัดการและควบคุมโรคคือการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เนื่องจากหากพบสัตว์ที่ป่วยจะสามารถเข้าควบคุมพื้นที่ไม่ให้แพร่เชื้อและจัดการวางแผนการรักษาได้อย่างทันท่วงที ซึ่งจะสามารถลดการสูญเสียได้เป็นอย่างมาก ดังนั้นเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลจึงเข้ามามีบทบาทที่สำคัญเนื่องจากสามารถนำมาใช้วินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันหลาย ๆ โรคมีการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลในการวินิจฉัย เช่น เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นต้น

โรคลัมปีสกิน (Lumpy skin disease; LSD) มีสาเหตุมาจากเชื้อ Lumpy skin disease virus (LSDV) โรคลัมปีสกินเกิดการระบาดครั้งแรกปี ค.ศ. 1929 ที่ประเทศแซมเบีย ทวีปแอฟริกา หลังจากนั้นเกิดการระบาดอย่างรวดเร็วสู่ประเทศในทวีปแอฟริกาใต้ ยุโรป และเอเชีย ส่งผลกระทบที่รุนแรงอย่างมากต่อเกษตรกรที่เลี้ยงโครวมไปถึงเศรษฐกิจ เนื่องจากทำให้โคมีไข้สูง ซึม ซูบผอม เบื่ออาหาร ต่อมน้ำเหลืองโต ปริมาณน้ำนมลดลงอย่างรวดเร็ว ไปจนถึงตายได้ ก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยรอยโรคในระยะเริ่มต้นบริเวณผิวหนังจะเป็นตุ่มที่มีลักษณะเป็นก้อนแข็ง กลม นูน โรคลัมปีสกินสามารถแพร่กระจายผ่านแมลงพาหะ เช่น ยุง แมลงวันดูดเลือด และ เห็บ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถแพร่เชื้อผ่านทางน้ำนมและน้ำเชื้ออีกด้วย ทำให้มีการแพร่กระจายของโรคได้อย่างรวดเร็ว หากโคที่ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่ช้าอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายได้

Lumpy skin disease virus (LSDV) เป็นดีเอ็นเอไวรัสชนิดหนึ่งใน Genus: *Capripoxvirus* (CaPVs) (Tulman et al., 2001) เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคลัมปีสกินในโคและกระบือ โดยส่วนมากเชื้อ LSDV จะเข้าสู่โฮสต์ผ่านแมลงพาหะ หลังจากนั้นจะเข้ายึดเซลล์เพื่อจำลองและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Replication) ของไวรัสก่อนที่จะกลายเป็นไวรัสตัวใหม่ออกจากเซลล์ ในปัจจุบัน LSDV มีการเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดการระบาดที่ยากจะควบคุม LSDV มียีน G-protein-coupled chemokine receptor (GPCR) ที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์ของโฮสต์

ส่งผลให้เกิดรอยโรคในโฮสต์และยังกดภูมิคุ้มกันของโฮสต์เพื่อให้โฮสต์อ่อนแออีกด้วย (El-Tholoth & El-Kenawy, 2016) การวินิจฉัยเชื้อ LSDV ในปัจจุบันสามารถทำได้หลากหลายวิธี แต่ที่นิยมเป็นอย่างมากคือการนำตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังมาวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ในการเก็บตัวอย่างนั้นจะต้องมีการเจาะเลือดโคและผ่าตัดชิ้นเนื้อในบริเวณรอยโรคของโค ซึ่งอาจจะทำให้เกิดความยากลำบากในการเก็บตัวอย่างจากโคในจำนวนมาก ๆ และจะทำให้โคเกิดความเจ็บปวดจากการเจาะเลือดและตัดชิ้นเนื้ออีกด้วย นอกจากนี้การใช้เทคนิค PCR ในการตรวจวินิจฉัยยังจำเป็นที่จะต้องทำในห้องปฏิบัติการโดยใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญด้านอณูชีววิทยาซึ่งมีจำนวนน้อย และใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน ดังนั้นการเก็บตัวอย่างที่สามารถทำได้ง่าย เช่น เก็บจากน้ำลายและน้ำมูกของโคนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคที่สะดวกและรวดเร็วจึงเป็นสิ่งสำคัญ

โรคเต้านมอักเสบในโค (Mastitis) เป็นอีกปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบที่รุนแรงต่อเกษตรกรและเศรษฐกิจ เนื่องจากจะทำให้ปริมาณน้ำนมลดลง และคุณภาพของน้ำนมต่ำลง จึงไม่สามารถส่งนมออกจำหน่ายได้ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อตัวโคทำให้มีอาการอักเสบบริเวณเต้านม มีไข้สูง อ่อนแอ ไปจนถึงตายในที่สุด โรคเต้านมอักเสบในโคเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) และ *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) ภายในเต้านม โดยเฉพาะเชื้อ *S. aureus* จะมีความสำคัญต่อการเกิดโรคเต้านมอักเสบเป็นอย่างมาก (Monistero et al., 2018) ในโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบในระยะเริ่มต้นนั้นจะยังคงไม่แสดงอาการของการอักเสบและไม่แสดงอาการป่วย เมื่อเวลาผ่านไปโคจึงแสดงอาการขอโรคเต้านมอักเสบออกมา การวินิจฉัยอย่างรวดเร็วจึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการรักษา หากสามารถตรวจพบว่าโคเป็นโรคในระยะที่ยังไม่แสดงอาการ จะส่งผลให้สามารถรักษาได้อย่างทันท่วงทีและลดการสูญเสียได้เป็นอย่างมาก

S. aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ในกลุ่ม staphylococci ที่ย้อมติดสีแกรมบวก มีการเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์คู่สายสั้น ๆ หรือรวมตัวกันเป็นกลุ่ม ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ แต่สร้างแคปซูลได้ ส่งผลให้เชื้อสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อม รวมไปถึงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและยาปฏิชีวนะ *S. aureus* เป็นสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบเนื่องจากสามารถผลิตสารต่าง ๆ เช่น enterotoxin, hyaluronidase, hemolysin, leukocidin, coagulase และ ไบโอฟิล์ม (Biofilm) เป็นต้น เพื่อทำลายเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของต่อมน้ำนมและก่อให้เกิดการอักเสบขึ้น (Aguilar and Iturralde, 2001) ซึ่ง *S. aureus* จะมียีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของผนังเซลล์ที่จะพบได้ในทุกเซลล์ คือ ยีนในกลุ่มของ Factor essential for the expression of methicittine resistant (*fem*) (Mehrotra et al., 2000) จะประกอบไปด้วยยีน *femA*, *femB* และ *femD* นอกจากนี้ยังมียีนที่ควบคุมการดื้อต่อยา penicillin คือยีน *blaZ* ที่ถูกควบคุมโดยยีน *blaI* และ *blaR1* โดยยีนเหล่านี้จะอยู่ในทรานสโพซอน Tn552 (Tn552-like transposon) (Rowland & Dyke, 1989)

Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นสายพันธุ์หนึ่งของ *S. aureus* ที่มีการพัฒนาให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม methicillin โดยจะมียีนที่ควบคุมการดื้อต่อยา methicillin คือยีน *mecA* อยู่บนพันธุกรรมเคลื่อนที่ที่เรียกว่า Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome, 2009) โดยยีน *mecA* จะสร้างโปรตีน Penicillin-binding protein 2a (PBP2a) ขึ้นมาทดแทน Penicillin-binding protein (PBPs) เดิม (Hartman & Tomasz, 1984) จึงทำให้มีบริเวณ active site เปลี่ยนไป ส่งผลให้ยาปฏิชีวนะ methicillin ไม่สามารถเข้าจับและทำลายกระบวนการสร้าง cross-link peptidoglycan ได้ (Kirmusaolu, 2017) จะเห็นได้ว่าในปัจจุบันเชื้อ *S. aureus* ได้มีการพัฒนาให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้น ส่งผลให้ยากต่อการรักษาและยังเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบาดที่ยากต่อการควบคุมอีกด้วย ในปัจจุบันการวินิจฉัยเชื้อ MRSA ที่ก่อโรคเต้านมอักเสบในโคสามารถทำได้หลากหลายวิธี การวินิจฉัยเบื้องต้นจะใช้การตรวจด้วยน้ำยาซีเอ็มที (California mastitis test; CMT) เพื่อใช้บอกว่าโคเป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยการรีดน้ำนมลงบนจานทดสอบและเติมน้ำยาซีเอ็มที วนเป็นวงกลมอย่างรวดเร็วเพื่อให้น้ำนมและน้ำยาซีเอ็มทีผสมกันและอ่านผล ซึ่งผลการทดสอบจะมีตั้งแต่ 0 ถึง +3 ตามระดับการเปลี่ยนแปลงของน้ำนมโดยจะจับตัวกันเป็นวุ้น แต่การตรวจด้วยน้ำยาซีเอ็มทีนั้นไม่สามารถบ่งบอกเชื้อก่อโรคได้ และยังมีโอกาสผิดพลาดที่สูง จึงต้องนำไปวินิจฉัยทางแบคทีเรียวิทยา อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางแบคทีเรียวิทยาจะใช้เวลาที่ค่อนข้างนานส่งผลให้เกิดการล่าช้าในการวินิจฉัยและอาจก่อให้เกิดการสูญเสียที่มากขึ้นได้ การใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลในการวินิจฉัยจึงเป็นสิ่งจำเป็นเนื่องจากมีความสะดวกรวดเร็วและแม่นยำเป็นอย่างมาก

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลที่ค่อนข้างใหม่ เป็นวิธีที่จะเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายคล้ายกับเทคนิค PCR แต่จะมีข้อดีกว่าเทคนิค PCR เนื่องใช้เวลาในการดำเนินการน้อยกว่าและมีความแม่นยำที่มากกว่า โดยปฏิกิริยาของ LAMP เกิดขึ้นได้ในอุณหภูมิคงที่ประมาณ 70 องศาเซลเซียส และเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลง (Thermocycler) เทคนิค LAMP ยังสามารถอ่านผลได้ง่ายและหลากหลายวิธี โดยสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากความขุ่นในหลอดทดลองและสามารถอ่านได้จากการเรืองแสง fluorescent ผ่านหลอด UV นอกจากนี้ยังสามารถอ่านผลจากค่าการเรืองแสงของสีย้อม green fluorescent dye ในช่องแสง FAM channel จากเครื่อง Real-time fluorescent detector และยืนยันผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟเลสิส (Gel electrophoresis) ได้อีกด้วย เนื่องจากปฏิกิริยาของ LAMP สามาถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิและยังสามารถอ่านผลได้อย่างง่าย จึงสะดวกต่อการนำไปใช้ในภาคสนาม ทำให้สามารถวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ได้อย่างรวดเร็ว

การพัฒนาเทคนิค LAMP ในการวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ที่ก่อโรคในโคจึงเป็นทางเลือกที่สามารถทำให้การวินิจฉัยเป็นไปอย่างสะดวก รวดเร็วและแม่นยำ ทำให้ง่ายต่อการวางแผนรักษาและควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงส่งผลให้ช่วยลดอัตราการสูญเสียได้

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค LAMP ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Lumpy skin diseases virus (LSDV) และ Methicillin-resistance Staphylococcus aureus (MRSA) ในโค

2. เพื่อเปรียบเทียบการวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR และ LAMP เชื้อ Lumpy skin diseases virus (LSDV) และ Methicillin-resistance Staphylococcus aureus (MRSA) ในโค

3. เพื่อพัฒนาต้นแบบชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ Lumpy skin diseases virus (LSDV) และ Methicillin-resistance Staphylococcus aureus (MRSA) อย่างง่ายด้วยเทคนิค LAMP

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

1. เทคนิค LAMP มีประสิทธิภาพที่สูงในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Lumpy skin diseases virus (LSDV) และ Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ในโค

2. การใช้ตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ง่ายและลดความเจ็บปวดในสัตว์สามารถนำมาตรวจวินิจฉัยทางอณูชีวโมเลกุลได้

1.4 ขอบเขตการศึกษา

เป็นการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ใน การตรวจวินิจฉัย เชื้อ Lumpy skin diseases virus (LSDV) และเชื้อ Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่ก่อโรคลัมปีสกินและเต้านมอักเสบในโค ในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และสุ่มเก็บตัวอย่าง เลือด อุจจาระ น้ำลาย และ nasal swab จากโคที่เป็นโรคลัมปีสกิน จำนวน 30 ตัว

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

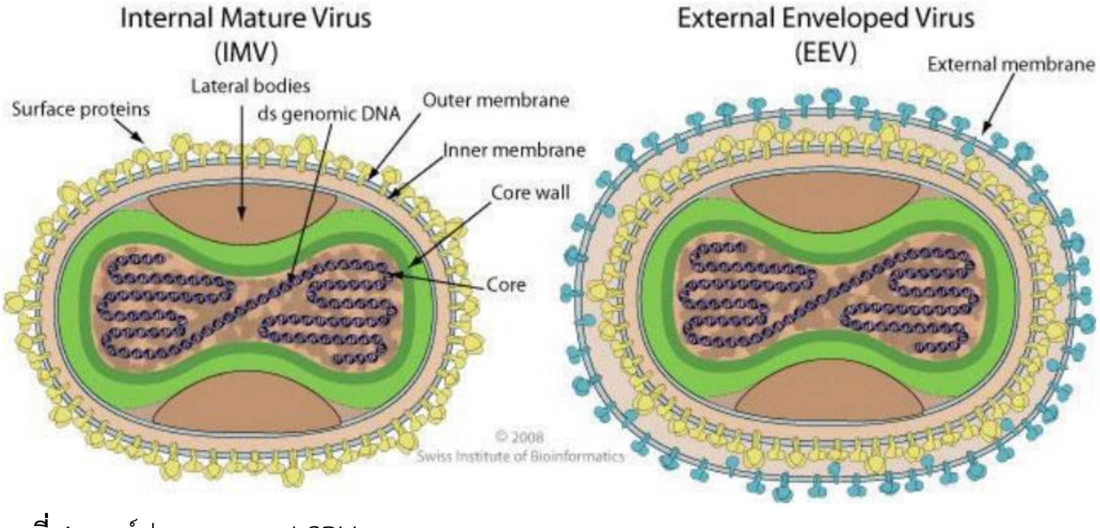
2.1 Lumpy skin disease virus (LSDV)

Lumpy skin disease virus (LSDV) เป็นดีเอ็นเอไวรัสชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มของไวรัสฝีดาษ กลุ่มเดียวกับ Sheep pox virus (SPPV) และ Goat pox viruses (GTPV) ซึ่งอยู่ใน Genus: *Capripoxvirus* (CaPVs), Subfamily: *Chordopoxvirinae* และ Family: *Poxviridae* เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคลัมปีสกิน (Lumpy skin disease; LSD) LSDV มีความยาว 294±20 นาโนเมตร และกว้าง 262±22 นาโนเมตร (Kitching & Smale, 1986) ไวรัสจะมีพอลิเปปไทด์มากกว่า 100 สาย จัดเรียงอยู่ใน core, lateral bodies, outer membrane และ envelope โดยบริเวร core ของไวรัสจะมีรูปร่างคล้ายดัมเบล (Dumbbell-shaped) ซึ่งภายในจะบรรจุสารพันธุกรรมและเอนไซม์ต่าง ๆ ไว้ จีโนมของไวรัสในกลุ่ม CaPVs มีขนาดประมาณ 151 kilobase (kb) ประกอบด้วย 156 genes โดยจีโนมของเชื้อในกลุ่ม CaPVs แต่ละตัวจะมีความเหมือนกันถึง 97-100% (Tulman et al., 2001) แต่ LSDV จะมีโครงสร้างเฉพาะตัวในการถอดรหัสยีน (Encoding genes) ที่จะส่งผลกระทบต่อความรุนแรงในโฮสต์ที่มากขึ้น (El-Nahas et al., 2013) ซึ่งเชื้อ LSDV จะมียีน P32 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน envelope ของไวรัส (Tulman et al., 2001) โดยยีน P32 เป็นยีนที่ได้รับความนิยมในการนำมาตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ LSDV ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลเป็นอย่างมาก (El-Kholy et al., 2008) นอกจากนี้ยีน GPCR ยังเป็นอีกหนึ่งยีนที่นิยมนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ LSDV ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลเช่นกัน โดยเป็นยีนที่เกี่ยวข้องการการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ในบริเวณรอยโรคและในการติดเชื้อ LSDV ยีนนี้ยังช่วยกดภูมิคุ้มกันของโฮสต์ให้ต่ำลงอีกด้วย (El-Tholoth & El-Kenawy, 2016)

2.2 กลไกการติดเชื้อ LSDV ในโฮสต์เซลล์

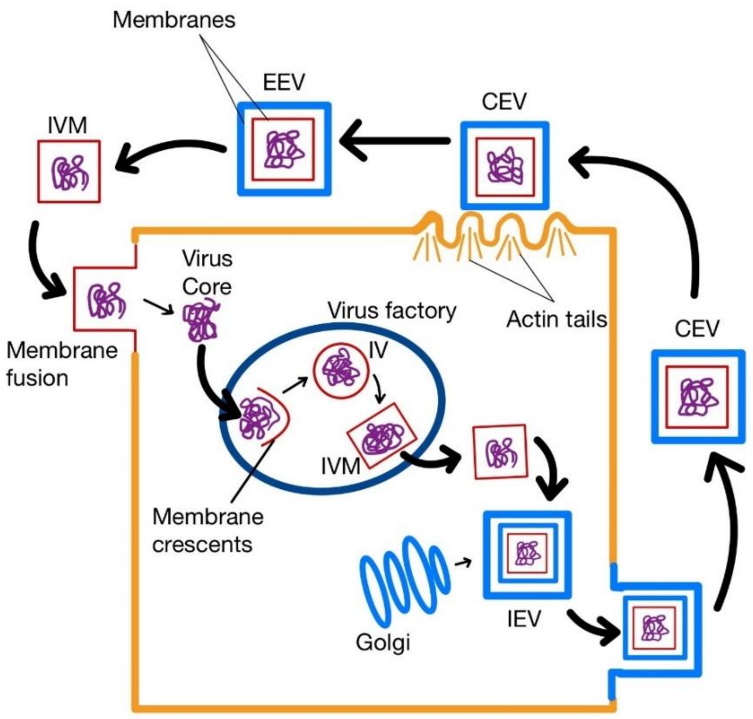
เชื้อ LSDV ในระยะ External enveloped viruses (EEV) จะแพร่กระจายเข้าสู่โฮสต์ ก่อนจะเข้าสู่เซลล์ไวรัสจะมีการฟอร์มตัวเข้าสู่ระยะ Intracellular mature virions (IMV) (ภาพที่ 1) และเข้าสู่เซลล์โฮสต์ด้วยกระบวนการ micropinocytosis โดยเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์จะถูกกระตุ้นโดย phosphatidylserine ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มของไวรัส ผ่านตัวรับ Glycosaminoglycans (GAGs) (Ayelet et al., 2014) และเกิดการรวมตัวกันของเยื่อหุ้มชั้นนอกของ IMV กับ เยื่อหุ้มเซลล์

ของโฮสต์ จากนั้นไวรัสจะปล่อย core เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ (Moss, 2006; Tuppurainen et al., 2015) หลังจาก core เข้าสู่เซลล์โฮสต์แล้วจะเกิดกระบวนการติดเชื้อขึ้น โดย core ของไวรัสที่ประกอบด้วย โปรตีนต่าง ๆ ดีเอ็นเอสายคู่ และ เอนไซม์ ฯลฯ จะเคลื่อนเข้าสู่ไมโครทูบูล (Microtubules) ผ่านไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) (Carter et al., 2003) และก่อตัวเป็น viral factories เพื่อจำลองและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Replication) ของไวรัส หลังจากการติดเชื้อประมาณ 2 ชั่วโมงจะเริ่มมีการแสดงออกของยีนของไวรัส (Gene expression) เริ่มต้นการแสดงออกของยีนของไวรัสซึ่งจะเป็นพวก non-structural protein จะมีหน้าที่ในการปรับเปลี่ยนสภาวะของเซลล์โฮสต์เพื่อให้ช่วยในการหลบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์แลช่วยในการจำลองเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไวรัส (Carroll & Moss, 1997) หลังจากนั้นจะเริ่มมีแสดงออกของยีนพวก structural protein เพื่อสร้างเยื่อหุ้มและองค์ประกอบต่าง ๆ ของไวรัสที่ประกอบด้วย single layer lipid membrane และ viral proteins และฟอร์มตัวเป็น Immature virion (IV) และ IVM ตามลำดับก่อนที่จะออกจาก viral factories (Rosel et al., 1986) หลังจากเคลื่อนที่ออกมาแล้ว IVM จะถูกห่อหุ้มด้วยเยื้อหุ้ม trans-golgi apparatus และฟอร์มตัวเข้าสู่ระยะ Intracellular enveloped virions (IEV) และเคลื่อนที่ออกนอกเซลล์ผ่านกระบวนการ exocytosis โดยเยื้อหุ้มชั้นนอกสุดของไวรัสจะรวมตัวเข้ากับเยื่อหุ้มเซลล์และปล่อยไวรัสระยะ cell-associated enveloped virus (CEV) ออกมา ในระยะนี้จะมีการสร้าง actin tails และกลายเป็นระยะ EEV ในที่สุด (MacLachlan & Dubovi, 2011) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1: องค์ประกอบของ LSDV

ที่มา: Swiss institute of bioinformatics., 2008



ภาพที่ 2: กระบวนการติดเชื้อ LSDV ในโฮสต์เซลล์

หมายเหตุ: IV; immature virion, IMC; intracellular mature virus, IEV; intracellular enveloped virus, EEV; extracellular enveloped virus, CEV; cell-associated enveloped virus

ดัดแปลงจาก: Swiss institute of bioinformatics., 2008

2.3 อาการและรอยโรคของโรคลัมปีสกินในโค

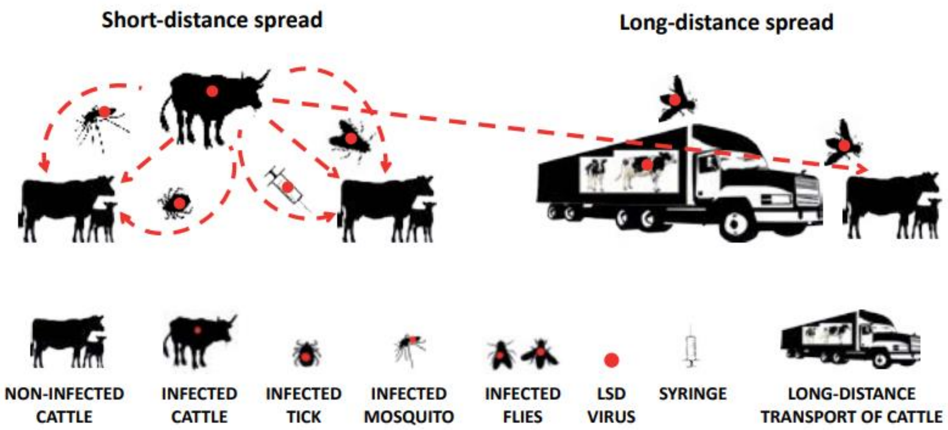
เมื่อเชื้อ LSDV แพร่กระจายเข้าสู่เซลล์ของโคและเกิดการติดเชื้อ จะส่งผลให้โคมีอาการไข้สูง ซึม ซูบผอม เบื่ออาหาร ต่อมน้ำเหลืองโต มีน้ำมูกและน้ำลายมากกว่าปกติ ปริมาณน้ำนมลดลงอย่างรวดเร็ว มีการอักเสบในบริเวณเยื่อบุจมูกและตา อาจส่งผลให้เป็นหมันชั่วคราว และสัตว์ที่ตั้งท้องอาจเกิดการแท้งได้ รอยโรคในระยะเริ่มต้นบริเวณผิวหนังจะเป็นตุ่มที่มีลักษณะเป็นก้อนแข็ง กลม นูน หรือตุ่มน้ำ ในบริเวณหัว คอ ขา เต้านม และ อวัยวะเพศ ตุ่มมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-50 มิลลิเมตร และหลังจากนั้นตุ่มจะเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้นเริ่มตกสะเก็ดและอาจกลายเป็นเนื้อตาย นอกจากนี้อาจจะส่งผลให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ ในบริเวณตุ่มแผลนั้น ๆ ด้วย (OIE, 2017) (ภาพที่ 3) โดยความรุนแรงของโรคนั้นจะขึ้นอยู่กับ อายุ ระบบภูมิคุ้มกัน และสายพันธุ์ของโฮสต์ ซึ่งโคเขตหนาว (*Bos taurus*) จะมีความไวโรคมากกว่าโคเขตร้อน (*Bos indicus*) โดยโคที่อยู่ในช่วงให้นมลูกจะมีความเสี่ยงต่อโรคมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าในกลุ่มโคพันธุ์เดียวกันที่เลี้ยงไว้

ด้วยกันภายในสภาพแวดล้อมเดียวกัน แต่มีการแสดงออกของอาการที่แตกต่างกันอย่างมาก ตั้งแต่การติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการไปจนถึงจนถึงป่วยและตาย (Carn & Kitching, 1995)

ภาพที่ 3: อาการและรอยโรคของโรคลัมปีสกินในโค
ที่มา: Tuppurainen et al. (2017)

2.4 การแพร่ของเชื้อ LSDV

การแพร่กระจายของ LSDV ส่วนมากจะแพร่เชื้อผ่านทางแมลงดูดเลือดที่เป็นพาหะ เช่น เห็บ (*Rhipicephalus* และ *Amblyomma spp.*), แมลงวันคอกสัตว์ (*Stomoxys spp.*), เหลือบ (*Tabanus spp.*) และยุง (*Aedes aegypti*) (ภาพที่ 4) ไวรัสยังอาจสามารถแพร่กระจายเชื้อผ่านทางการสัมผัสสัตว์ที่ป่วยแต่อาจจะมีอัตราการแพร่ที่ต่ำ (Virusforschung & Einzeldarstellungen, 1968) นอกจากนี้ยังสามารถแพร่เชื้อผ่านทางน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่เป็นโรค หรือผ่านทางรก และไวรัสอาจแพร่ไปยังลูกโคที่ดูดนมผ่านทางน้ำนมที่ติดเชื้อ หรือจากแผลที่ผิวหนังในจุกนมได้อีกด้วย (Tuppurainen et al., 2017)



ภาพที่ 4: การแพร่กระจายของ LSDV

ที่มา: Tuppurainen et al. (2017)

2.5 การระบาดของโรคลัมปีสกิน

มีการรายงานการพบโรคลัมปีสกินครั้งแรกในปี ค.ศ. 1929 ที่ประเทศแซมเบีย ทวีปแอฟริกา และในปี ค.ศ. 1947 เชื้อไวรัสได้แพร่กระจายเข้าสู่ประเทศบอตสวานา ต่อมาได้แพร่กระจายไปยังทวีปแอฟริกาใต้ หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1970 มีรายงานการระบาดของโรคลัมปีสกินทางเหนือของประเทศซูดาน (Khalafalla et al., 1993) ในปี ค.ศ. 1974 ได้แพร่กระจายไปทางตะวันตกของซูดานไปจนถึงไนจีเรีย (Nawathe et al., 1982) และในปี ค.ศ. 1977 มีรายงานการระบาดที่ประเทศมอริเตเนีย มาลี กานา และไลบีเรีย ถัดมาในช่วงปี ค.ศ. 1988-1989 ได้มีรายงานการแพร่กระจายของไวรัสออกมานอกทวีปแอฟริกา โดยเริ่มจากประเทศอียิปต์ และอิสราเอล (Brenner et al., 2006) หลังจากปี ค.ศ. 1989 เป็นต้นมาได้มีรายงานการพบเชื้อไวรัสที่ประเทศบาห์เรน คูเวต โอมาน เยเมน เลบานอน และจอร์แดน (Awad et al., 2010; Gari et al., 2012) จนกระทั่งในช่วงปี ค.ศ. 2014-2015 ได้มีรายงานการระบาดของไวรัสที่ประเทศตุรกี (Sevik & Dogan, 2017) และในปี ค.ศ. 2015-2016 ที่ประเทศกรีซ บอลข่าน และรัสเซีย (Agianniotaki et al., 2017; Mercier et al., 2018; Sprygin et al., 2018) ในช่วงปี ค.ศ. 2017-2018 มีรายงานการระบาดที่ประเทศยูกันดา (Ochwo et al., 2020) และได้มีการกลับมาระบาดอีกครั้งที่ประเทศอียิปต์ (Allam et al., 2020) จนกระทั่งปี ค.ศ. 2019 เป็นต้นมาเชื้อไวรัสได้ระบาดกระจายไปในหลายประเทศทั่วทวีปเอเชีย เช่น จีน อินเดีย เนปาล ภูฏาน ไต้หวัน ลาว และไทย เป็นต้น (Hasib et al., 2021; Lu et al., 2021; Roche et al., 2020)

2.6 การวินิจฉัยเชื้อ LSDV

การตรวจวินิจฉัยโรคลัมปีสกินที่เป็นวิธีมาตรฐานในปัจจุบันได้แก่วิธี virus isolation, electron microscopy, PCR, virus neutralization และ indirect fluorescent antibody test โดยเฉพาะเทคนิค PCR เป็นวิธีที่นิยมใช้มากในปัจจุบันเนื่องจากสามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือ และมีความแม่นยำที่สูงในการตรวจหายีนในจีโนมของ LSDV ซึ่งสามารถวินิจฉัยจากตัวอย่างที่หลากหลาย เช่น เลือด ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงไวรัส เนื้อเยื่อ และน้ำเชื้อ เป็นต้น (Heine et al., 1999; Ireland & Binepal, 1998; Tuppurainen et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR ซึ่งมีรายงานว่าสามารถวินิจฉัยได้เร็วกว่าและยังมีความไวสูงกว่า (Bowden et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีการรายงานการใช้เทคนิค quantitative real-time PCR ในการแยกความแตกต่างระหว่าง LSDV SPPV และ GTPV อีกด้วย (Lamien et al., 2011)

2.7 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

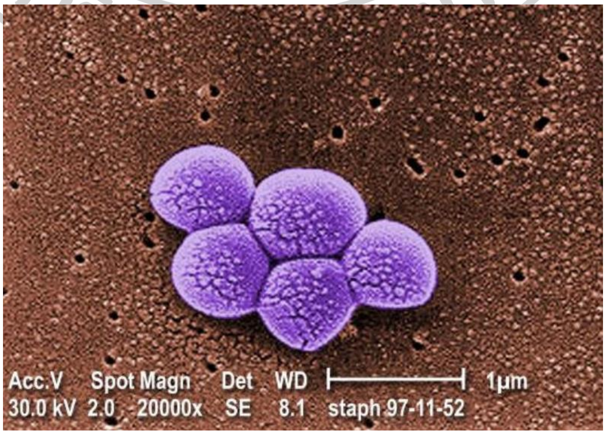
S. aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก อยู่ในกลุ่ม staphylococci มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร มีการเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์คู่สายสั้น ๆ หรือรวมตัวกันเป็นกลุ่ม ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ แต่สร้างแคปซูลได้ ส่งผลให้เชื้อสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อม รวมไปถึงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและยาปฏิชีวนะและยังสามารถเพิ่มความรุนแรงในการก่อโรคอีกด้วย สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) โคโลนีมีลักษณะกลม นูน และมีสีเหลืองทองนวล เนื่องจากมีรงควัตถุประเภทแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ที่เรียกว่า staphyloxanthin ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-4 มิลลิเมตร *S. aureus* จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ สามารถก่อโรคได้หลายรูปแบบ เช่น ปอดอักเสบ (Pneumonia) การติดเชื้อในกระแสเลือด (Septicemia) และการติดเชื้อในแผลผ่าตัด (Surgical-wound infections) เป็นต้น (Carrel et al., 2015; Carroll et al., 2017; Turner et al., 2019) ซึ่ง *S. aureus* จะมียีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของผนังเซลล์ที่จะพบได้ในทุกเซลล์ คือ ยีนในกลุ่มของ Factor essential for the expression of methicittine resistant (*fem*) (Mehrotra et al., 2000) จะประกอบไปด้วยยีน *femA*, *femB* และ *femD* ซึ่ง *S. aureus* ยังเป็นสาเหตุที่สำคัญในการก่อโรคเต้านมอักเสบในโคอีกด้วย โดยส่วนใหญ่เชื้อแบคทีเรียจะเกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อในขณะรีดนม โดยเชื้อ *S. aureus* ที่อยู่ที่บริเวณเต้านม ปลายหัวนม หรือในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ จะสามารถเข้าสู่ภายในเต้านมโคได้ผ่านทางรูของหัวนมในขณะรีดนม ส่งผลให้โคติดเชื้อในบริเวณเต้านมเกิดการอักเสบ เรื้อรัง และยากต่อการรักษา (Monistero et al., 2018)

2.8 กลไกการติดเชื้อ *S. aureus*

เมื่อรูหัวนมเปิดออก *S. aureus* จำนวนมากจะเข้าสู่ภายในเต้านมผ่านทางรูหัวนม และหลั่งโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดเกาะ (Adhesion protein) เพื่อเกาะติดกับเนื้อเยื่อบุผิวของต่อมน้ำนม (Mammary gland epithelium) (Lowy et al., 1988) นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เช่น กรดเทโชอิก (Teichoic acid) ที่ช่วยในการยึดเกาะอีกด้วย (Tuchscherr et al., 2015) ซึ่งแบคทีเรียจะสามารถอาศัยอยู่ในเซลล์ non-professional phagocytic ได้เป็นเวลานาน (Gunther et al., 2017; Zaatout et al., 2019) หลังจากนั้น *S. aureus* จะผลิตสารต่าง ๆ เช่น enterotoxin, hyaluronidase, hemolysin, leukocidin, coagulase และ ไบโอฟิล์ม (Biofilm) เป็นต้น เพื่อปกป้องเซลล์แบคทีเรียและทำลายเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของต่อมน้ำนม (Aguilar & Iturralde, 2001) ส่งผลให้ร่างกายโคมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อในเต้านม ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาว (Leucocytes) เคลื่อนที่มาในบริเวณที่ติดเชื้อและกำจัดแบคทีเรียหรือสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเต้านมส่งผลให้ในน้ำนมมีปริมาณ somatic cell ที่สูง

2.9 Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA)

MRSA เป็นสายพันธุ์หนึ่งของ *S. aureus* ที่มีการพัฒนาให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม methicillin นอกจากนี้ MRSA ยังสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่น เช่น ampicillin, nafcillin cephalosporins, sulfonamide, aminoglycoside และ tetracycline เป็นต้น (Taj et al., 2010) จะเห็นได้ว่าในปัจจุบันเชื้อ *S. aureus* ได้มีการพัฒนาให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้นและส่งผลให้ยากต่อการรักษา (ภาพที่ 5)



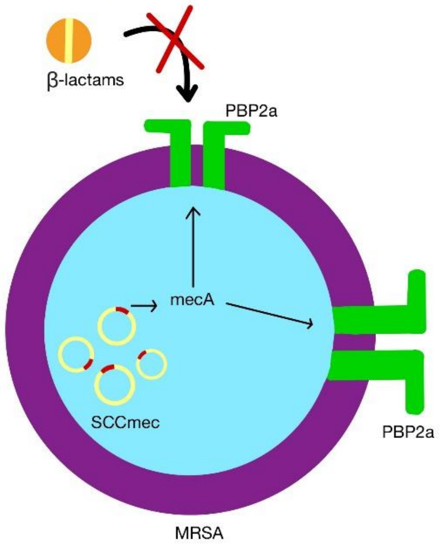
ภาพที่ 5: Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA)
ที่มา: CDC, (2019)

2.10 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus*

โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถถูกกำจัดได้โดยยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactam โดยยาปฏิชีวนะที่ถูกใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจาก *S. aureus* มากที่สุดในช่วงแรกคือยา penicillin มีโครงสร้างประกอบด้วย β-lactam ring เชื่อมติดกับ thiazolidine ring โดยตัวยาจะเข้าจับกับบริเวณ active site ของ Penicillin-binding proteins (PBP) เพื่อเข้าทำลาย cross-link peptidoglycan ซึ่งเป็นสิ่งที่จำเป็นในการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้แบคทีเรียหยุดการสร้างผนังเซลล์และตาย

เนื่องจากมีการใช้ยาในกลุ่ม β-lactam กันอย่างแพร่หลายส่งผลให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ โดยจะมีการสร้างเอนไซม์ penicillinase (β-lactamase) เพื่อเข้าไปแยกพันธะเพปไทด์ (Peptide bond) ของ β–lactams ring ทำให้ไม่สามารถเข้าจับและทำลายบริเวณ active site ของ PBP ได้ ส่งผลให้แบคทีเรียทนทานต่อยาในกลุ่ม β-lactam โดยเฉพาะ penicillin (Rayner & Munckhof, 2005) เอนไซม์ β-lactamase จะถูกสร้างโดยยีน *blaZ* ที่ถูกควบคุมโดยยีน *blaI* และ *blaR1* โดยยีนเหล่านี้จะอยู่ในทรานสโพซอน Tn552 (Tn552-like transposon) (Rowland & Dyke, 1989)

หลังจากที่เชื้อเกิดการดื้อยา penicillin จึงได้มีการเปลี่ยนมารักษาโรคที่เกิดจาก *S. aureus* โดยใช้ยา methicillin แทน ซึ่งเป็นยากลุ่มเพนิซิลินกึ่งสังเคราะห์ (Semisynthetic penicillin) ที่มีโครงสร้าง β–lactams ring เหมือนกับยา penicillin แต่สามารถทนต่อการถูกทำลายโดยเอนไซม์ β-lactamase จึงยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา penicillin หลังจากยาปฏิชีวนะ methicillin ถูกนำเข้ามาใช้มากขึ้น จึงส่งผลให้เชื้อ *S. aureus* เกิดการกลายพันธุ์อีกครั้งให้มีความทนทานต่อยา methicillin ซึ่งจะเรียกเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยา methicillin ว่า Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยจะมียีน *mecA* อยู่บนพันธุกรรมเคลื่อนที่ที่เรียกว่า Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome, 2009) โดยยีน *mecA* จะสร้างโปรตีน Penicillin-binding protein 2a (PBP2a) ขึ้นมาทดแทน PBPs เดิม (Hartman & Tomasz, 1984) จึงทำให้มีบริเวณ active site เปลี่ยนไป ส่งผลให้ยาปฏิชีวนะ methicillin ไม่สามารถเข้าจับและทำลายกระบวนการสร้าง cross-link peptidoglycan ได้ (ภาพที่ 6) และแบคทีเรียยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ซึ่งยีน *mecA* จะถูกควบคุมการสร้าง PBP2a โดยยีน *mecR1*และ *mecI* (Kirmusaolu, 2017)



ภาพที่ 6: การดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β–lactams ของ MRSA

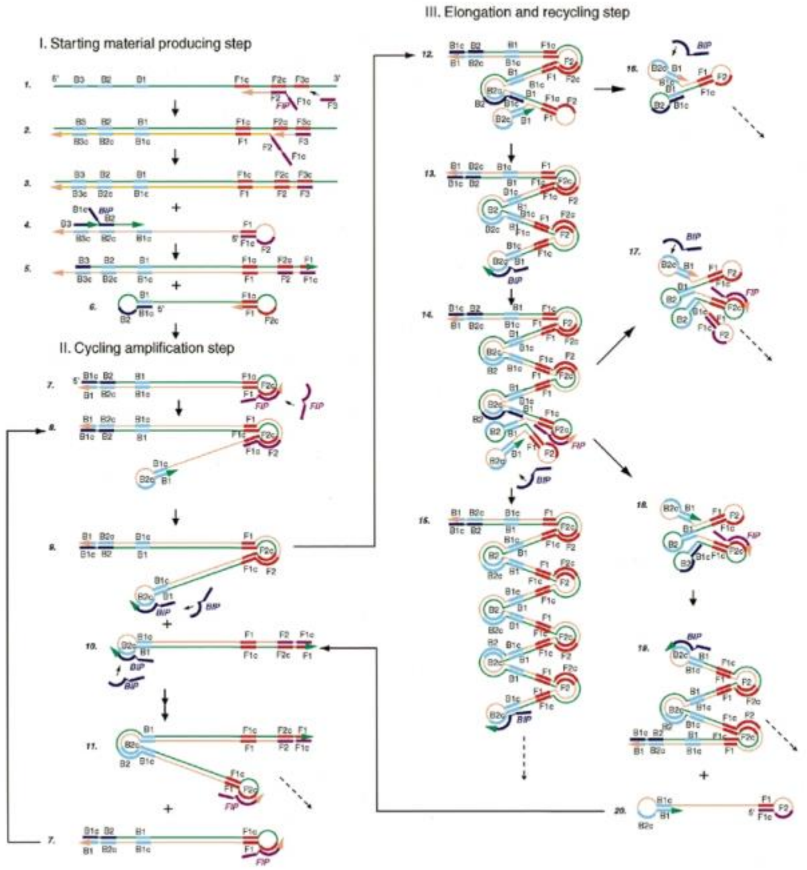
2.11 การวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ

ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบในโคสามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว การตรวจด้วยน้ำยาซีเอ็มที (California mastitis test; CMT) การเพาะเชื้อจากน้ำนม เป็นต้น โดยการวินิจฉัยเบื้องต้นจะใช้การตรวจด้วยน้ำยาซีเอ็มที เพื่อใช้บ่งบอกว่าโคเป็นโรคเต้านมอักเสบ แต่ไม่สามารถบ่งบอกถึงเชื้อก่อโรคได้ จึงต้องนำมาวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางแบคทีเรียวิทยา หรือเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล

2.12 เทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลที่ค่อนข้างใหม่ ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 2000 (Notomi et al., 2000) เป็นวิธีที่จะเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย ในสภาวะอุณหภูมิที่คงที่ คล้ายกับเทคนิค PCR แต่จะมีข้อดีกว่าเทคนิค PCR คือใช้เวลาในการดำเนินการน้อยกว่า และมีความแม่นยำที่มากกว่า เนื่องจากมีการใช้ไพร์เมอร์จำนวน 4-6 สาย ซึ่งทำให้มีความจำเพาะและแม่นยำมากกว่า PCR ที่ใช้ไพร์เมอร์เพียงแค่ 2 สาย โดยไพร์เมอร์ของ LAMP ทั้ง 6 สาย จะประกอบไปด้วย ไพร์เมอร์ที่ทำให้เกิด loop 2 สาย ประกอบด้วย outer primer และ internal primer จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยจับกันเป็น loop วนไปเรื่อย ๆ เกิดโมเลกุลที่เชื่อมต่อกันยาวคล้ายลูกโซ่ (ภาพที่ 7) เทคนิคนี้ยังสามารถอ่านผลได้ง่ายและหลากหลายวิธี โดยสามารถอ่านผลด้วยตาเปล่าจากความขุ่นของตะกอน magnesium pyrophosphate สีขาว ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาและสามารถอ่านได้จากการเรืองแสง fluorescent ผ่านหลอด UV ซึ่งเกิดจาก

สารที่เติมไว้ก่อนเริ่มปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังสามารถอ่านผลจากค่าการเรืองแสงของสีย้อม green fluorescent dye ในช่องแสง FAM channel จากเครื่อง Real-time fluorescent detector และยืนยันผลด้วยวิธี gel electrophoresis ได้อีกด้วย ซึ่งปฏิกิริยาของ LAMP เกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิคงที่ 70 องศาเซลเซียส และเกิดขึ้นอย่าง รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลง (Thermocycler) จึงสะดวกต่อการนำไปใช้ในภาคสนามได้ ทำให้สามารถวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ได้อย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 7: การเกิดปฏิกิริยา LAMP
ที่มา: Notomi et al. (2000)

2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

El-Tholoth and El-Kenawy (2016) ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CaPVs ในโคและกระบือในประเทศอียิปต์ โดยใช้ยีน G-protein-coupled chemokine receptor (GPCR) ของไวรัสในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และมีการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมกับงานวิจัยอื่น ๆ เมื่อดูจากลำดับของนิวคลีโอไทด์แล้วจะเห็นว่า LSDV ในโคและกระบือมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ 4 ตำแหน่ง และ LSDV ทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์อยู่ 9 ตำแหน่งเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ LSDV/Ismailyia88 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (Reference strain) และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ SPPV และ GTPV ในงานวิจัยอื่น ๆ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR มีการแทรกของนิวคลีโอไทด์ 21 ตำแหน่ง และมีการลบของนิวคลีโอไทด์ 12 ตำแหน่ง การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic) แสดงให้เห็นว่ายีน GPCR ของ LSDV ในโคและกระบือมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมเป็นอย่างมาก ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่าอาจมีแพร่กระจายของเชื้อ LSDV จากโคสู่กระบือและจากกระบือสู่โคได้

Zeedan et al. (2019) ได้ศึกษาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค Indirect fluorescent antibody technique (IFAT), Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA), Polymerase chain reaction (PCR), Real-time PCR (RT-PCR) และ Fluorescent antibody technique (FAT) จากตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังของโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินและซีรัมของโคที่ไม่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินในประเทศอียิปต์ ในเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลได้ใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน P32 ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากการทดลองพบว่าการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลในการวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังของโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินและให้ผลเป็นบวก มีอัตราส่วนคิดเป็นร้อยละดังนี้ 36.95 และ 39.13 โดยใช้เทคนิค RT-PCR, 28.26 และ 34.78 โดยใช้เทคนิค PCR, 26.8 และ 32.6 โดยใช้เทคนิค FAT ตามลำดับ การวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยาจากตัวอย่างซีรัมของโคที่ไม่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินและให้ผลเป็นบวก มีอัตราส่วนคิดเป็นร้อยละดังนี้ 17.93 และ 14.48 โดยเทคนิค ELISA และ IFAT ตามลำดับ การวินิจฉัยโรคลัมปีสกินจากตัวอย่างโคที่แสดงอาการของโรค จะเห็นได้ว่าเทคนิค RT-PCR สามารถวินิจฉัยได้อย่างแม่นยำที่สุด นอกจากนี้เทคนิค RT-PCR ยังสามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็วกว่าอีกด้วย

Awad et al. (2010) ได้ศึกษาการวินิจฉัยโรคลัมปีสกินโดยใช้เทคนิค Viral isolation (VI), PCR, Dot blot hybridization (DBH) และ iELISA โดยแบ่งกลุ่มโคออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกิน 25 ตัว กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยโคที่ไม่แสดงอาการอื่นนอกจากมีไข้ 9 ตัว กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยโคปกติที่ไม่แสดงอาการและไม่มีไข้แต่อยู่ร่วมฝูงกับโคที่ป่วย 21 ตัว เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนัง (จากโคกลุ่มแรก) เลือด และซีรัม (จากโคทุกกลุ่ม) ชิ้นเนื้อ

บริเวณผิวหนังและเลือดจะถูกนำไปวินิจฉัยด้วยเทคนิค VI, PCR และ DBH ส่วนซีรัมจะถูกนำไปวินิจฉัยด้วยเทคนิค iELISA จากการทดลองพบว่า การวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิค VI จากชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังและเลือดในโคกลุ่มแรก ให้ผลเป็นบวกร้อยละ 72 และ 20 ตามลำดับ และจากเลือดของโคในกลุ่ม 2 พบว่าให้ผลเป็นบวกร้อยละ 33.3 ส่วนการวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิค PCR และ DBH จากชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังของโคกลุ่มแรกพบผลเป็นบวกร้อยละ 100 จากทั้งสองเทคนิค และจากตัวอย่างเลือดโค ในกลุ่มแรกพบผลเป็นบวกร้อยละ 100 และ 84 ตามลำดับ ในกลุ่มที่ 2 พบผลเป็นบวกร้อยละ 77.8 และ 66.6 ตามลำดับ ในกลุ่มที่ 3 พบผลเป็นบวกจากทั้งสองเทคนิคร้อยละ 19.1 (ตารางที่ 1) การวินิจฉัยด้วยเทคนิค iELISA ในตัวอย่างซีรัมของโคกลุ่ม 1 และ 2 พบผลบวกร้อยละ 56 และ 11.1 ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มที่ 3 ไม่พบแอนติบอดีต่อไวรัส จะเห็นได้ว่าการใช้เทคนิค PCR ในการวินิจฉัยโรคลัมปีสกินมีความแม่นยำที่สูงที่สุด

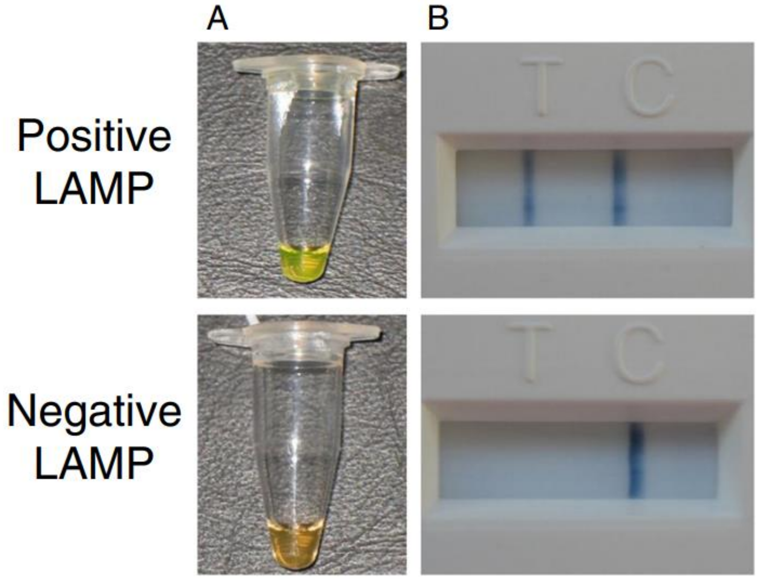
ตารางที่ 1: การวินิจฉัยโรคลัมปีสกินจากชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังและเลือดที่จากโคโดยใช้ PCR และ DBH

No. of cows	Skin biopsies				Blood in EDTA			
	PCR		DBH		PCR		DBH	
	Positive	%	Positive	%	Positive	%	Positive	%
Group 1 (25)	25	100	25	100	25	100	21	84
Group 2 (9)	-				7	77.8	6	66.6
Group 3 (21)	-				4	19.1	4	19.1

ดัดแปลงจาก: Awad et al. (2010)

Murray et al. (2013) ได้พัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP) ในการวินิจฉัยเชื้อในกลุ่ม CaPVs (SPPV, GTPV และ LSDV) จากตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังของโคที่เป็นโรคลัมปีสกินโดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน P32 พบว่าเทคนิค LAMP มีความจำเพาะ (Specificity) ต่อเชื้อในกลุ่ม CaPVs ที่สูง โดยจะไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อในกลุ่ม Poxviruses ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นนอกจาก CaPVs และยังมีความไว (Sensitivity) ในการทดสอบที่สูง โดยจะต้องใช้ดีเอ็นเอของเชื้ออย่างน้อย 163 สายต่อไมโครลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเทคนิค RT-PCR นอกจากนี้ยังมีการนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Lateral flow devices (LFD) เพื่อให้ง่ายและสะดวกต่อการนำไปวินิจฉัยในภาคสนามพบว่าสามารถวินิจฉัยได้อย่างแม่นยำอีกด้วย (ภาพที่ 8)

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 8: การวินิจฉัยโดยเทคนิค LAMP และ LAMP-LFD
หมายเหตุ: (A) แสดงการเปลี่ยนสีของ LAMP product จากตัวอย่างที่ให้ผลการติดเชื้อเป็นบวกและลบหลังจากเติมสารเรืองแสง picogreen (B) แสดงการวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP-LFD จากตัวอย่าง LAMP product (C=Control line, T=Test line)
ที่มา: Murray et al. (2013)

Mwanandota et al. (2018) ได้ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบ (Detection rate) ของเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน P32 และเทคนิค LAMP ที่ใช้ไพร์เมอร์ 2 ชุด โดย LAMP ชุดที่ 1 จะใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน Poly(A) polymerase small subunit (VP39) และ LAMP ชุดที่ 2 จะใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน P32 ในการวินิจฉัยเชื้อในกลุ่ม CaPVs จากตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อบริเวณผิวหนังจากสัตว์ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ CaPVs และ กลุ่มที่ติดเชื้อ CaPVs จากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่ติดเชื้อ CaPVs มีอัตราการตรวจพบของเทคนิค PCR, LAMP1 และ LAMP2 คิดเป็นร้อยละ 13.56, 38.98 และ 23.73 ตามลำดับ และในกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ CaPVs มีอัตราการตรวจพบของเทคนิค PCR, LAMP1 และ LAMP2 คิดเป็นร้อยละ 0, 14.3 และ 1.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) นอกจากนี้เทคนิค LAMP ยังมีความไวและความจำเพาะที่สูง โดยจะไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้ออื่นนอกจากเชื้อในกลุ่ม CaPVs และสามารถใช้ดีเอ็นเอของเชื้อได้น้อยที่สุดเพียง 8 สายต่อไมโครลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP สามารถใช้วินิจฉัยเชื้อในกลุ่ม CaPVs ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ

ตารางที่ 2: การเปรียบเทียบการวินิจฉัยเชื้อในกลุ่ม CaPVs โดยใช้เทคนิค PCR และ LAMP (LAMP1 และ LAMP2)

Assay	กลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ (%)	กลุ่มที่ติดเชื้อ CaPVs (%)
LAMP1	14.28 (15 of 105)	38.98 (23 of 59)
PCR	0 (0 of 105)	13.56 (8 of 59)
LAMP2	1.9 (2 of 105)	23.73 (14 of59)

ดัดแปลงจาก: Mwanandota et al. (2018)

Trakulsomboon et al. (2001) ได้ศึกษาและรายงานเชื้อ MRSA ที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin ที่มากขึ้นในประเทศไทย โดยการนำตัวอย่างเชื้อ MRSA 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย MR135 และ MR187 148 ไอโซเลท และ MR209 7 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ vancomycin และ teicoplanin โดยใช้เทคนิค Minimal inhibitory concentration (MIC) พบว่าโดยส่วนใหญ่เชื้อมีความไวต่อยา vancomycin โดยมีค่า MIC 0.5-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยา teicoplanin โดยมีค่า MIC 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ก็ยังมีเชื้อบางส่วนของสายพันธุ์ MR135, MR187 และ MR209 ที่สามารถเจริญเติบโตได้จนถึงในความเข้มข้นของยา vancomycin 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งบ่งบอกว่าสายพันธุ์เหล่านี้เริ่มมีความทนทานต่อยา vancomycin ที่มากขึ้น

Davoodi et al. (2015) ได้ศึกษาการใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจหายีน *femA*, *mecA* และ *lukS* ของเชื้อในกลุ่ม methicillin-resistant staphylococci จากตัวอย่างที่แยกได้จากโรงพยาบาล 130 แห่ง เพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ blood-MacConkey agar เพื่อแยกเชื้อ *S. aureus* และ coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) หลังจากนั้นจึงนำมานำมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจหายีน *femA*, *mecA* และ *lukS* โดยเทคนิค Multiplex PCR พบว่าทุกไอโซเลทของ *S. aureus* พบยีน *femA* ส่วนยีน *mecA* ที่บ่งบอกว่าเป็นเชื้อ MRSA พบใน *S. aureus* และ CoNS ร้อยละ 56 และ 70 ตามลำดับ และร้อยละ 9 ของ *S. aureus* ที่พบยีน *lukS* (ตารางที่ 3) การใช้เทคนิค Multiplex PCR แสดงให้เห็นถึงวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำ สำหรับการตรวจหายีนของเชื้อในกลุ่ม methicillin-resistant staphylococci

ตารางที่ 3: การใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจหายีน *femA*, *mecA* และ *lukS* ของเชื้อในกลุ่ม methicillin-resistant staphylococci

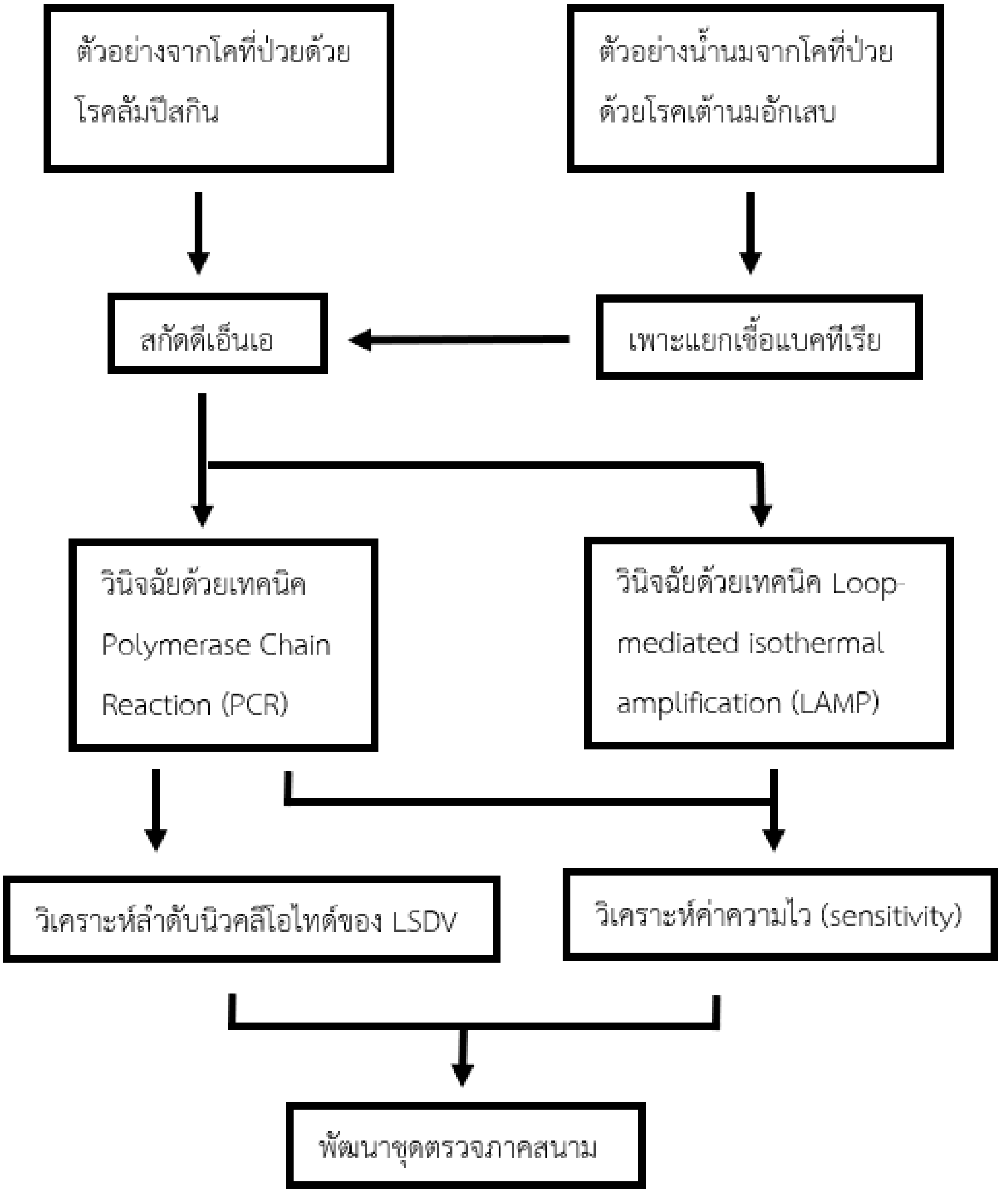
Staphylococci	***femA***	***mecA***	***lukS***
S. aureus	100/100 (100%)	56/100 (56%)	9/100 (9%)
CoNS	0/30 (0%)	21/30 (70%)	0/30 (0%)
Total	100/130 (76.9%)	77/130 (59.2%)	9/130 (6%)

ดัดแปลงจาก: Davoodi et al. (2015)

บทที่ 3

ขั้นตอนการศึกษา

ในการวิจัยเริ่มจากขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือด อุจจาระ nasal swab และ น้ำลาย ของโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกิน รวมถึงแมลงพาหะของโรคลัมปีสกินที่พบในบริเวณคอกสัตว์ที่ป่วย และเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จากฟาร์มในจังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยในการเก็บตัวอย่างเชื้อ LSDV ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (Project ID: 17/2564) และการเก็บตัวอย่างเชื้อ MRSA ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร (Project ID: 07/2562) หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ด้วยเทคนิค PCR และ LAMP โดยเชื้อ LSDV ใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน P32 และ GPCR และเชื้อ MRSA ใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *femA*, *blaZ* และ *mecA* หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบความไว (Sensitivity) ในการตรวจวินิจฉัย เพื่อนำไปพัฒนาต้นแบบการวินิจฉัยอย่างรวดเร็วในภาคสนามโดยใช้เทคนิค LAMP นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำมาศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของ LSDV เพื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่พบก่อนหน้านี้ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9: แผนภาพแสดงการดำเนินการทดลอง

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่าง LSDV และ MRSA ถูกเก็บจากฟาร์มโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินและเต้านมอักเสบในจังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งตัวอย่าง LSDV ในโคแต่ละตัวจะถูกเก็บจากเลือด อุจจาระ nasal swab และ น้ำลาย จากโคเนื้อและโคนมจำนวน 30 ตัว นอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างแมลงพาหะของโรคลัมปีสกินที่พบในบริเวณคอกสัตว์ที่ป่วย และตัวอย่าง MRSA เก็บจากน้ำนมของโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยในการเก็บตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ กรมปศุสัตว์ และวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเพชรบุรี (นายสัตวแพทย์ ธีระยุทธ ชาวุฒิ) ทั้งนี้การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ดำเนินการตามขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐาน (standard operating procedures: SOP) ของหน่วยงานราชการแต่ละหน่วยงาน

ก) การเก็บตัวอย่าง LSDV จากเลือด อุจจาระ nasal swab และ น้ำลาย ของโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกิน นอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างแมลงพาหะของโรคลัมปีสกินที่พบในบริเวณคอกสัตว์ที่ป่วย การเก็บตัวอย่างเลือดโคโดยการเจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดดำที่คอ (Jugular vein) หรือเส้นเลือดดำที่โคนหาง (Coccygeal vein) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร และเก็บลงในหลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว (Ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) การเก็บตัวอย่างอุจจาระโคจะล้วงเก็บอุจจาระจากทวารหนักของโคโดยใช้ถุงมือผสมเทียม นำตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว แยกตัวละถุง ปิดปากถุงเพื่อป้องกันการปนเปื้อน การเก็บตัวอย่าง nasal swab จะใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วสอดเข้าไปในรูจมูกของโค แล้วถูเข้า-ออกให้ปลายสำลีสัมผัสผนังของรูจมูกด้านใน และการเก็บตัวอย่างน้ำลายโดยใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วป้ายในบริเวณในช่องปากในบริเวณกระพุ้งแก้ม ผนังช่องปากด้านบน และ ลิ้น ของโค หลังจากนั้นนำไม้พันสำลีที่เก็บตัวอย่างแล้วใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่างและปิดฝาให้สนิท การเก็บตัวอย่างแมลงพาหะของโรคลัมปีสกินโดยการดักจับแมลงพาหะของโรคลัมปีสกินในบริเวณคอกสัตว์ ได้แก่ ยุง (*Aedes aegypti*), แมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) แมลงวันคอก (*Stomoxys calcitrans*) เหลือบ (*Tabanidae spp*) และ เห็บ (*Rhipicephalus* และ *Amblyomma spp.*) ชนิดละ 30 ตัว โดยใช้สวิงและเครื่องดักจับแมลงในการจับ ตัวอย่างแมลงในแต่ละฟาร์มจะถูกแยกใส่หลอดทดลอง ตัวอย่างทุกชนิดจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

ข) การเก็บตัวอย่าง MRSA จากน้ำนมของโค เริ่มจากการทำความสะอาดบริเวณเต้านมด้วยแอลกอฮอล์ 70% รอให้แห้ง และรีดนมเพื่อนำมาตรวจหาโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบเบื่องต้นด้วยน้ำยาซีเอ็มที (California Mastitis test; C.M.T.) โดยจะเก็บตัวอย่างน้ำนมของโคที่ให้ผลของน้ำยาซีเอ็มทีเป็นบวก รีดน้ำนมทิ้ง 2-3 ครั้งก่อนรีดน้ำนมใส่ลงในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วเพื่อเก็บตัวอย่าง ปิดฝาให้สนิท ตัวอย่างน้ำนมจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การแยกเชื้อ *S. aureus* จากน้ำนมโค

ดูดตัวอย่างน้ำนม 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง mannitol salt agar และ spread plate หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 20-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth และ streak plate บนอาหารแข็ง mannitol salt agar และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 20-24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

ก) การย้อมสีแกรม (Gram staining)

นำโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็ง mannitol salt agar มาป้ายและสเมียร์ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและทิ้งให้แห้ง หลังจากนั้นนำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟเพื่อตรึงเซลล์แบคทีเรียเพื่อให้แบคทีเรียแห้งติดกับแผ่นสไลด์ หยด ammonium oxalate crystal violet ลงบนแผ่นสไลด์ที่ตรึงเชื้อแบคทีเรียแล้ว ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที และเทสีทิ้ง หยดสารละลาย iodine ลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที และเทสารละลายทิ้ง หลังจากนั้นล้างด้วย 95% ethanol เป็นเวลา 15 วินาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยด safranin ลงบนแผ่นสไลด์ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที หลังจากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นและนำไปส่องดูการย้อมติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CX23, Germany) ที่กำลังขยาย 40X (Smith & Hussey, 2005)

ข) Coagulase test

เตรียมหลอดทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติม coagulase plasma ที่มีส่วนผสมของ EDTA ลงในหลอดทดลอง ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ดูดเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี coagulase plasma และเขย่าหลอดทดลองให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และสังเกตการจับตัวเป็นก้อนทุกชั่วโมงจนครบ 4 ชั่วโมงแรก หากยังไม่เกิดการจับตัวเป็นก้อน ให้บ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส จนครบเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาอ่านผล (SenGupta & Sengupta, 2016)

ค) Catalase test

เตรียมแผ่นสไลด์ที่สะอาดหยด 3% hydrogen peroxide (H_2O_2) 1 หยด ลงบนแผ่นสไลด์ นำโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็ง mannitol salt agar มาป้ายลงใน hydrogen peroxide บนแผ่นสไลด์และสังเกตการเกิดฟองทันที (Reiner, 2013)

3.3 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility test)

นำโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็ง mannitol salt agar มาละลายลงในสารละลาย 0.85% sodium chloride (NaCl) ปรับความขุ่นที่ 0.5 McFarland (10^8 CFU/ml) โดยนำมาเปรียบเทียบความขุ่นกับหลอด 0.5 McFarland turbidity standard ซึ่งเป็นหลอดความขุ่นมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบกับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มและป้ายให้ทั่วหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller-Hinton agar ที่ผสมกับ 2 % NaCl ทิ้งไว้ให้แห้งและวางแผ่นยาปฏิชีวนะ oxacillin 1 ไมโครกรัม และ cefoxitin 30 ไมโครกรัม บนผิวหน้าอาหาร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง อ่านผลจากการวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง (Inhibition zone) ซึ่งจะเป็นวงใส ไม่เห็นโคโลนีของแบคทีเรียรอบแผ่นยา โดยอาศัยเกณฑ์วินิจฉัยการดื้อต่อยา methicillin ตามข้อกำหนดของ Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) โดยเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่มยา methicillin จะมี inhibition zone ของยา oxacillin และ cefoxitin น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร และ 21 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะในแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยเทคนิค Antimicrobial susceptibility test จะถูกกำหนดเป็นมาตรฐานโดย Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Brown et al., 2005; institute, 2015)

3.4 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

ก) การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดโดยใช้ชุด gSYNC™ DNA extraction kit (Geneaid, Taiwan) ตามวิธีการของบริษัท โดยนำเลือด 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube เติม Proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 20 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 5 นาที เติม GSB Buffer 200 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 5 นาที เพื่อกำจัด RNA เติม 100% Ethanol 200 ไมโครลิตร และเขย่า จากนั้นดูดสารละลายใส่ใน column ที่อยู่บน collecting tube จนหมด นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 1 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยน collecting tube ใหม่ เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เทส่วนที่เป็นของเหลวใน collecting tube ทิ้ง เติม wash buffer 600 ไมโครลิตร ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เทส่วนที่เป็นของเหลวใน collecting tube ทิ้งและปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที ย้าย column ลงใน microtube เติม elution buffer 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที จากนั้นจะนำส่วนที่เป็นของเหลวไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ข) การสกัดดีเอ็นเอจากอุจจาระตามวิธีการของ Zhang et al. (2006) นำตัวอย่างอุจจาระ 1-1.5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง 15 มิลลิลิตร เติม 100% Ethanol 5 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที 2 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม TE 5 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย Tris 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8) เติม TNE 5 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย Tris-Cl 10 โมลต่อลิตร, 0.5% SDS, $CaCl_2$ 1 โมลต่อลิตร) และเติม Proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที 1 นาที ดูดของเหลวด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ที่มีแป้งมันฝรั่ง 3 กรัม จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer 1 นาที จนสารในหลอดเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที 3 นาที หลังจากนั้นดูดของเหลวด้านบน 600 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microtube และเติมสารละลาย NaCl 150 ไมโครลิตร (3.5 โมลต่อลิตร) สารละลาย Cetyl trimethyl-ammonium bromide (CTAB) 250 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย NaCl 0.7 โมลาร์, 10% CTAB) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที ดูดของเหลวด้านบนใส่ในหลอด microtube ใหม่ เติม binding buffer (ประกอบด้วย guanidine hydrochloride 4 โมลาร์, potassium acetate 1 โมลาร์ ที่ pH 5.5) ในปริมาณเท่ากับของเหลวในหลอด จากนั้นดูดสารละลายใส่ใน column ที่อยู่บน microtube จนหมด นำไปปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งเติม 75% ethanol 750 ไมโครลิตร ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที 1 นาที เปลี่ยน microtube ใหม่ เติม TE 200 ไมโครลิตรและ RNase 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที 1 นาที จากนั้นจะนำส่วนที่เป็นของเหลวไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ค) การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำลายและ nasal swab โดยใช้ชุด gSYNC™ DNA extraction kit (Geneaid, Taiwan) ตามวิธีการของบริษัท โดยนำตัวอย่างน้ำลายและ nasal swab ปรับปริมาตรให้ได้ 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube เติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 5 นาที เติม GSB Buffer 200 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 5 นาที หลังจากนั้นเติม RNase A 5 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 5 นาที เพื่อกำจัด RNA เติม 100% Ethanol 200 ไมโครลิตร และเขย่า จากนั้นดูดสารละลายใส่ใน column ที่อยู่บน collecting tube จนหมด นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 1 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยน collecting tube ใหม่ เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เทส่วนที่เป็นของเหลวใน collecting tube ทิ้ง เติม wash buffer 600 ไมโครลิตร ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เทส่วนที่เป็นของเหลวใน collecting tube ทิ้งและปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที ย้าย column ลงใน microtube เติม elution buffer 100

ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที จากนั้นจะนำส่วนที่เป็นของเหลวไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ง) การสกัดดีเอ็นเอจากแมลงตามวิธีการของ Georg Dietzl (2012) โดยเตรียม squishing buffer (SB) (ประกอบด้วย Proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Tris 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 25 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8.2) ดูด SB 50 ไมโครลิตร เข้ามาไว้ใน tip จากนั้นนำตัวอย่างแมลงมาบดในหลอดทดลอง และใช้ปลาย tip ที่มี SB ค่อย ๆ บดแมลงโดยไม่ต้องปล่อย SB ออก เมื่อบดเสร็จแล้วจึงปล่อย SB ที่เหลือใน tip ออกและผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 95 องศาเซลเซียส 3 นาที หลังจากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนและดูดส่วนที่เป็นของเหลวไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

จ) การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแบคทีเรียโดยใช้ชุด Presto™ mini bacteria kit (Geneaid, Taiwan) ตามวิธีการของบริษัท โดยดูดแบคทีเรียที่เลี้ยงใน nutrient broth ใส่หลอด microtube ไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนแลเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง เตรียม lysozyme 0.8 มิลลิกรัม และ gram+ buffer 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองใหม่ ผสมให้เข้ากันจากนั้นดูดไปใส่ในหลอดแบคทีเรีย นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที หลังจากนั้นเติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที เติม GB buffer 200 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที เติม 100% Ethanol 200 ไมโครลิตร และเขย่า จากนั้นดูดสารละลายใส่ใน column ที่อยู่บน collecting tube จนหมด นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 2 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยน collecting tube ใหม่ เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เทส่วนที่เป็นของเหลวใน collecting tube ทิ้ง เติม wash buffer 600 ไมโครลิตร ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เทส่วนที่เป็นของเหลวใน collecting tube ทิ้งและปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที ย้าย column ลงใน microtube เติม elution buffer 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที 30 วินาที จากนั้นจะนำส่วนที่เป็นของเหลวไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือด อุจจาระ nasal swab น้ำลาย และ แมลง มาเพิ่มปริมาณยีน P32 และ GPCR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ LSDV และดีเอ็นเอจากแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณยีน *femA*, *blaZ* และ *mecA* สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีนที่จำเพาะต่อเชื้อ LSDV (GPCR และ P32) (ตารางที่ 4) และเชื้อ MRSA (*femA*, *blaZ* และ *mecA*) (ตารางที่ 5) โดยใช้โปรแกรม Primer3 (https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0)

ตารางที่ 4: แสดงลำดับเบสไพร์เมอร์ของยีน GPCR และ P32 ของเชื้อ LSDV สำหรับ PCR

Gene		Primer sequence	Amplicon (bp)
GPCR	F	5’-CCAATGCTAATACTACCAGCACTAC-3’	1,130
	R	5’-CTTAGTACAGTTAGTAGCGCAACC-3’	
P32	F	5’-ACAAACTCTCATTGGTGTTCGG-3’	975
	R	5’-TGGTCGCGAAATTTCAGATGT-3’	

หมายเหตุ: F: Forward primer, R: Reverse primer

ตารางที่ 5: แสดงลำดับเบสไพร์เมอร์ของยีน *femA*, *blaZ* และ *mecA* ของเชื้อ MRSA สำหรับ PCR

Gene		Primer sequence	Amplicon (bp)	Ref.
femA	F	5’-CGATCCATATTTACCATATCA-3’	450	(Davoodi et al., 2015)
	R	5’-ATCACGCTCTTCGTTTAGTT-3’		
blaZ	F	5’-TACAACTGTAATATCGGAGGG-3’	774	Wilailuckana (2005)
	R	5’-AGGTTCAGATTGGCCCTTAGG-3’		
mecA	F	5’-TGTCCGTAACCTGAATCAGC-3’	519	Wilailuckana (2005)
	R	5’-TGCTATCCACCCTCAAACAG-3’		

หมายเหตุ: F: Forward primer, R: Reverse primer

เมื่อได้ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมแล้ว ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย OneTaq Hot Start master mix buffer (New England Biolabs, USA) 12.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ forward primer 0.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ reverse primer 0.5 ไมโครลิตร, template DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 10.5 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจะนำหลอด PCR ใส่ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิและตั้งค่าอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยเริ่มจากขั้นตอน initial denaturation สายดีเอ็นเอให้เกิดการแยกสายออกจาก

กันเป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งหมด 40 รอบ โดยเริ่มที่การ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที ตามด้วยขั้นตอน annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นตอน extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที หลังจากจบขั้นตอนนี้จะวนกลับไปสังเคราะห์ที่ขั้นตอน denaturation จนครบ 40 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อไปที่ 72 องศาเซลเซียสอีก 10 นาที และคงรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปผสมกับ loading dye และอ่านผลโดยวิธี gel electrophoresis ผ่าน 1% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย ethidium bromide เปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้กับ 100 bp DNA ladder ตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA โดย UV transilluminator เพื่อยืนยันการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมาย

3.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือด อุจจาระ nasal swab น้ำลาย และแมลง มาเพิ่มปริมาณยีน GPCR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ LSDV และดีเอ็นเอจากแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณยีน *mecA* สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค LAMP เนื่องจากยีน GPCR เป็นยีนที่มีความสำคัญต่อ LSDV ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ในบริเวณรอยโรคและกดภูมิคุ้มกันของโฮสต์ให้ต่ำลงในขณะติดเชื้อ และยีน *mecA* เป็นยีนที่ใช้ระบุเชื้อที่เป็น MRSA โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีนที่จำเพาะต่อเชื้อ LSDV (GPCR) (ตารางที่ 6) และเชื้อ MRSA (*mecA*) (ตารางที่ 7) จากโปรแกรม PrimerExplorer (https://primerexplorer.jp)

ตารางที่ 6: แสดงลำดับเบสไพร์เมอร์ของยีน GPCR ของเชื้อ LSDV สำหรับ LAMP

Primer	Primer sequence
F3	5’-TGCTACGCAATCGTAAAAGC-3’
B3	5’-TCAGTATTGTTTTTACTCCCATT-3’
FIP	5’-AGCTGAAATTGTGTCTCTATGTCATTAGTAAATTCTCTACTACAAAACGC-3’
BIP	5’-GAACTGCAAGGTTGACAAATCTTAAAGTGTAACTGTATTTGTTTCATCGT-3’

ตารางที่ 7: แสดงลำดับเบสไพร์เมอร์ของยีน *mecA* ของเชื้อ MRSA สำหรับ LAMP

Primer	Primer sequence
F3	5’-GCGACTTCACATCTATTAGGTT-3’
B3	5’-GCCATCTTTTTTCTTTTTCTCT-3’
FIP	5’-GTCCCTTTTTACCAATAACTGCATCATGTTGGTCCCATTAACTCTG-3’
BIP	5’-AAGCTCCAACATGAAGATGGCCGATTGTATTGCTATTATCGTCAA-3’

เมื่อได้ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมแล้ว ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม LAMP reaction mixture 25 ไมโครลิตร ซึ่งจะถูกแบ่งเป็น 3 ประเภท คือ 1) หลอด positive control ประกอบด้วย DNA master mix (2X) 12.5 ไมโครลิตร, green fluorescent dye 1 ไมโครลิตร, DNA positive control LAMP primer mix 2.5 ไมโครลิตร, positive control DNA 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 8 ไมโครลิตร 2) หลอด no-template control ประกอบด้วย DNA master mix (2X) 12.5 ไมโครลิตร, target-specific primer mix (10X) ประกอบไปด้วย 2 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3, 16 ไมโครโมลาร์ FIP และ BIP 2.5 ไมโครลิตร, green fluorescent dye 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 9 ไมโครลิตร 3) หลอดตัวอย่าง ประกอบด้วย DNA master mix (2X) 12.5 ไมโครลิตร, target-specific primer mix (10X) ประกอบไปด้วย 2 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3, 16 ไมโครโมลาร์ FIP และ BIP 2.5 ไมโครลิตร, green fluorescent dye 1 ไมโครลิตร, template DNA 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 8 ไมโครลิตร หลังจากนั้นใส่หลอดทดลองลงในเครื่อง real-time fluorescent detector และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยเริ่มที่การ amplification ที่ 72 องศาเซลเซียส 20-60 นาที และคงรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส โดย LAMP product สามารถนำมาอ่านผลได้หลากหลายวิธี โดยสามารถอ่านได้จากค่าการเรืองแสงของสีย้อม green fluorescent dye ในช่องแสง FAM channel จากเครื่อง real-time fluorescent detector และสามารถอ่านด้วยตาเปล่าจากความขุ่นของตะกอน magnesium pyrophosphate สีขาวที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา และสามารถอ่านผลได้จากการเรืองแสง fluorescent ผ่านหลอด UV ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ LAMP product สามารถนำมายืนยันผลผ่าน gel electrophoresis ที่ 1% (w/v) agarose gel ได้อีกด้วย

3.7 ศึกษาความไว (Sensitivity) ของเทคนิค LAMP และ PCR

ศึกษาความไวในการวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ของเทคนิค LAMP และ PCR โดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างมาเจือจางให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ลดลงในแต่ละหลอดทดลอง โดยยีน P32 จะมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมด (total DNA) ที่ 48.5, 26.25, 12.13, 6.06, 3.03, 1.52, 0.76, 0.38, 0.19, 0.09. 0.04, 0.02, 0.01 และ 0.005 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ยีน GPCR จะมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมด ที่ 48.5, 4.85, 0.49, 0.04, 0.004, 0.0004, 0.00004 และ 0.000004 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ยีน *mecA* จะมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมด ที่ 33.6, 3.36, 0.33, 0.03, 0.003, 0.0003, 0.00003 และ 0.000003 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และใช้ดีเอ็นเอในแต่ละระดับการเจือจางมาเป็น template ในการวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP และ PCR เพื่อหาระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยได้

เมื่อได้ผลการทดสอบความไวของแต่ละเทคนิคแล้ว นำผลมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบเพื่อนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นชุดตรวจที่สามารถใช้ตรวจในภาคสนามได้

3.8 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LSDV

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน P32 และ GPCR โดยนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนและต่างกัน (nucleotide alignment) กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime โดยการ BLAST เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน และหลังจากนั้นจึงคัดเลือกมาเปรียบเทียบความเหมือนและต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยตั้งค่า Cost Matrix ที่ 93% similarity และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) เพื่อแสดงถึงการวิวัฒนาการของเชื้อ LSDV โดยใช้โปรแกรม MEGA ด้วยวิธี neighbor joining

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่าง LSDV

ผลการเก็บตัวอย่างจากสัตว์เพื่อตรวจหาเชื้อ LSDV จากฟาร์มโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินในจังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยเชื้อ LSDV ถูกเก็บจากตัวอย่าง เลือด อุจจาระ nasal swab และ น้ำลาย จากโคจำนวน 30 ตัว ทุกเพศและทุกช่วงอายุ โดยโคจะแสดงอาการซึม ซูบผอม มีไข้ มีรอยโรคเป็นตุ่มนูนบริเวณลำตัว รวมตัวอย่างประเภทละ 30 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างแมลงพาหะของโรคลัมปีสกินในบริเวณคอกสัตว์ ได้แก่ ยุง (*Aedes aegypti*), แมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) แมลงวันคอก (*Stomoxys calcitrans*) เหลือบ (*Tabanidae spp.*) และ เห็บ (*Rhipicephalus* และ *Amblyomma spp.*) ในการเก็บตัวอย่างจากสัตว์เพื่อตรวจหาเชื้อ LSDV ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (Project ID: 17/2564)

4.2 การวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค PCR

ผลการวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากตัวอย่างเลือด อุจจาระ nasal swab และ น้ำลาย จากโคจำนวน 30 ตัว (C1-C30) และตัวอย่างแมลง (F1-F7) พบว่าเมื่อนำดีเอ็นเอจากตัวอย่างต่าง ๆ มาเพิ่มปริมาณยีน P32 และ GPCR ด้วยเทคนิค PCR และนำมาอ่านผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% (w/v) agarose gel พบว่าตัวอย่างจากโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกิน 30 ตัว มีการตรวจพบยีน P32 และ GPCR ทั้งหมด 5 ตัว (16.67%) ได้แก่ C1, C4, C5, C19 และ C22 โดยพบว่าตัวอย่าง nasal swab มีการตรวจพบยีน P32 และ GPCR ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ได้แก่ C1, C4, C5, C19 และ C22 ส่วนตัวอย่างน้ำลายมีการตรวจพบยีน P32 และ GPCR ทั้งหมด 1 ตัวอย่าง ได้แก่ C22 แต่ไม่พบยีน P32 และ GPCR ในการวินิจฉัยจากตัวอย่างเลือดและอุจจาระ (ตารางที่ 8) นอกจากนี้ยังไม่พบยีน P32 และ GPCR ของเชื้อ LSDV ในแมลง (0%) อีกด้วย

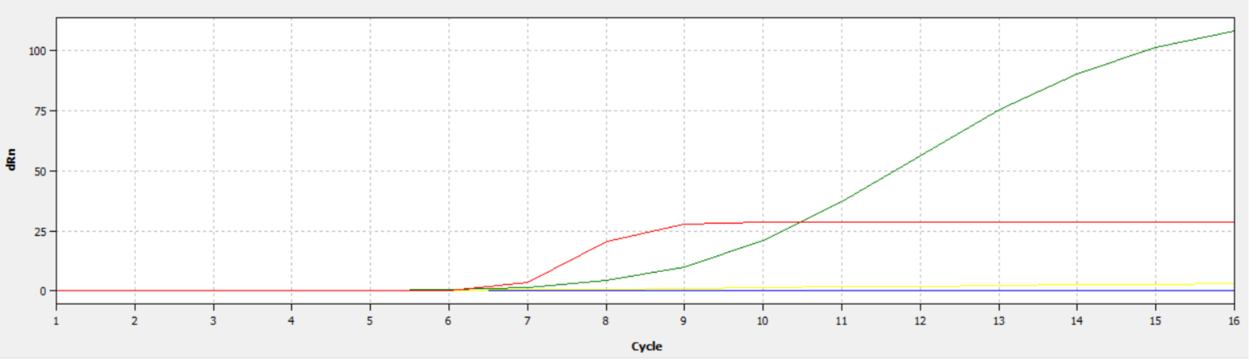
ตารางที่ 8: ผลการวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากยีน P32 และ GPCR จากตัวอย่างเลือด อุจจาระ น้ำลาย และ nasal swab ของโค ด้วยเทคนิค PCR

ตัวอย่าง	เทคนิค PCR							
	ยีน P32				ยีน GPCR			
	เลือด	อุจจาระ	Nasal swab	น้ำลาย	เลือด	อุจจาระ	Nasal swab	น้ำลาย
C1	-	-	+	-	-	-	+	-
C2	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	+	-	-	-	+	-
C5	-	-	+	-	-	-	+	-
C6	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	-	-	-	-	-	-	-	-
C8	-	-	-	-	-	-	-	-
C9	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	-
C13	-	-	-	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	-	-	-	-
C15	-	-	-	-	-	-	-	-
C16	-	-	-	-	-	-	-	-
C17	-	-	-	-	-	-	-	-
C18	-	-	-	-	-	-	-	-
C19	-	-	+	-	-	-	+	-
C20	-	-	-	-	-	-	-	-
C21	-	-	-	-	-	-	-	-
C22	-	-	+	+	-	-	+	+
C23	-	-	-	-	-	-	-	-
C24	-	-	-	-	-	-	-	-
C25	-	-	-	-	-	-	-	-
C26	-	-	-	-	-	-	-	-
C27	-	-	-	-	-	-	-	-
C28	-	-	-	-	-	-	-	-
C29	-	-	-	-	-	-	-	-
C30	-	-	-	-	-	-	-	-

4.3 การวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค LAMP

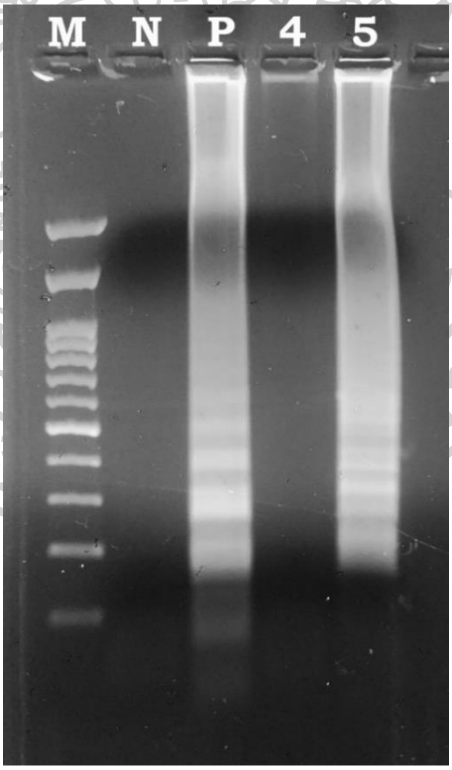
นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีผลการวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR เป็นบวก (PCR+) และลบ (PCR-) มาเพิ่มปริมาณยีน GPCR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับ positive control และ no-template control ด้วยเครื่อง real-time fluorescent detector จากช่วงแสง FAM พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของกราฟจากหลอดทดลอง positive control และ PCR+ โดยมีค่า Tp (Time to positive) เท่ากับ 16.62 นาที แต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของกราฟในหลอดทดลอง no-template control และ PCR- (ภาพที่ 10) และเมื่อนำมาอ่านผลจากความขุ่นของการทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองด้วยตาเปล่า และอ่านผลจากการเรืองแสง fluorescent ภายใต้หลอด UV พบว่าความขุ่นและความเข้มของการเรืองแสง fluorescent ในแต่ละหลอดทดลองมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยหลอดที่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟจากการอ่านผลที่ช่องแสง FAM ด้วยเครื่อง real-time fluorescent detector จะมีความขุ่นและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับหลอดที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟ และเมื่อนำมาวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่าหลอดทดลอง positive control และ PCR+ มีค่า OD ที่สูงกว่าหลอดทดลอง no-template control และ PCR- หลังจากนั้นนำมายืนยันผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% (w/v) agarose gel และย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide พบว่าปรากฏแถบการแยกตัวของดีเอ็นเอของตัวอย่าง PCR+ แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มปริมาณยีน GPCR ในตัวอย่าง PCR+ โดยแถบที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นแบบ ladder smear (ภาพที่ 11) จากการวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค LAMP แสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP สามารถวินิจฉัยเชื้อ LSDV ได้เช่นเดียวกับเทคนิค PCR

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 10: การวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากดีเอ็นเอตัวอย่าง PCR+ และ PCR- ร่วมกัน positive control และ no-template control ด้วยเทคนิค LAMP

หมายเหตุ: เส้นสีแดง: positive control, เส้นสีน้ำเงิน: no-template control, เส้นสีเขียว: PCR+ และ เส้นสีเหลือง: PCR-



ภาพที่ 11: การวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากดีเอ็นเอตัวอย่าง PCR+ และ PCR- ร่วมกับ positive control และ no-template control ด้วยเทคนิค LAMP และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ: lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2: no-template control, lane 3: positive control, lane 4: PCR- และ lane 5: PCR+

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง nasal swab จากโคที่มีผลการวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR เป็นบวกและลบทั้งหมด 30 ตัว (C1-C30) และตัวอย่างแมลง (F1-F7) มาเพิ่มปริมาณยีน GPCR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกัน positive control และ no-template control ด้วยเครื่องเครื่อง real-time fluorescent detector จากช่วงแสง FAM แสดงผลผ่านโปรแกรม qPCRsoft (Jena, Germany) โดยให้โปรแกรมคำนวณจุดแบ่งผลการทดสอบเป็นบวกและลบ โดยกำหนดตัวอย่างที่เป็น no-template control หลังจากนั้นโปรแกรมจะคำนวณจุดตัดที่เหมาะสมเพื่อแบ่งผลการทดสอบเป็นบวกและลบ พบว่ามีการตรวจพบยีน GPCR ทั้งหมด 11 ตัวอย่าง (36.67%) ได้แก่ C1, C4, C5, C6, C7, C9, C11, C13, C19, C22 และ C26 (ตารางที่ 9) แต่ไม่พบยีน GPCR ในการวินิจฉัยในตัวอย่างแมลง (0%)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 9: ผลการวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากยีน GPCR จาก nasal swab ของโค ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับ positive control และ no-template control

ตัวอย่าง	เทคนิค LAMP	
	ผลการวินิจฉัย	Tp value (นาที)
Positive Control		15.18
No-template control		No Tp
C1	+	26.56
C2	-	No Tp
C3	-	31.80
C4	+	27.99
C5	+	25.68
C6	+	25.24
C7	+	20.83
C8	-	34.26
C9	+	24.67
C10	-	No Tp
C11	+	26.37
C12	-	No Tp
C13	+	23.68
C14	-	43.60
C15	-	No Tp
C16	-	43.83
C17	-	No Tp
C18	-	39.88
C19	+	29.13
C20	-	No Tp
C21	-	43.13
C22	+	23.98
C23	-	40.30
C24	-	34.56
C25	-	37.74
C26	+	23.60
C27	-	39.25
C28	-	No Tp
C29	-	38.09
C30	-	38.21

หมายเหตุ: Tp: Time to positive

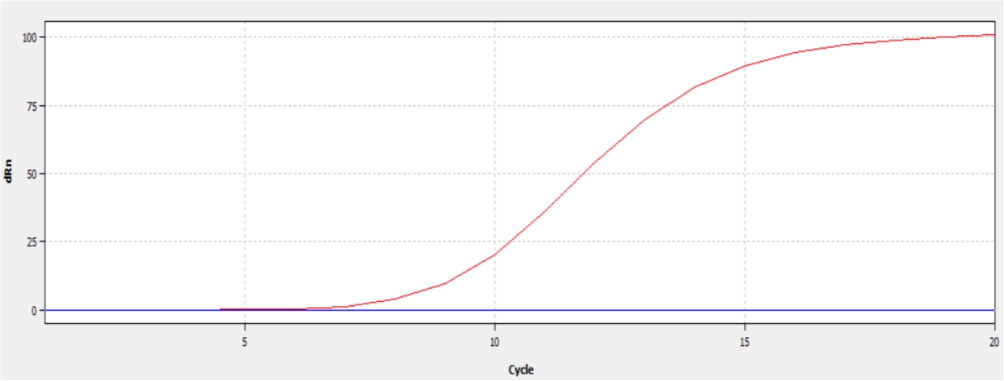
มหาวิทยาลัยศิลปากร

4.4 ความแตกต่างของตัวอย่างในการวินิจฉัยเชื้อ LSDV

ความแตกต่างของตัวอย่างที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินด้วยเทคนิค PCR โดยในการวินิจฉัยเชื้อ LSDV ในประเภทตัวอย่างที่แตกต่างกัน ได้แก่ เลือด อุจจาระ nasal swab และ น้ำลาย ประเภทละ 30 ตัวอย่าง พบว่ามีอัตราการตรวจพบเชื้อ LSDV สูงที่สุดจากตัวอย่าง nasal swab โดยมีอัตราการตรวจพบ 16.67% ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างน้ำลายมีอัตราการตรวจพบ 3.33% ของตัวอย่างทั้งหมด ส่วนตัวอย่างเลือดและอุจจาระไม่สามารถตรวจพบเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค PCR (ตารางที่ 10) เมื่อนำตัวอย่างในแต่ละประเภทที่แตกต่างกัน ได้แก่ เลือด อุจจาระ nasal swab และ น้ำลาย จากโคตัวเดียวกัน (C22) ประเภทละ 1 ตัวอย่าง มาตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค LAMP พบว่าสามารถวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากตัวอย่าง nasal swab ชนิดเดียวเท่านั้น ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ LSDV จากตัวอย่างประเภทอื่น ๆ ด้วยวิธี LAMP (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 10: การวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินด้วยเทคนิค PCR จากประเภทตัวอย่างที่แตกต่างกัน ได้แก่ เลือด อุจจาระ nasal swab และ น้ำลาย ประเภทละ 30 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	คิดเป็นร้อยละ
เลือด	0
อุจจาระ	0
Nasal swab	16.67
น้ำลาย	3.33
รวม	100

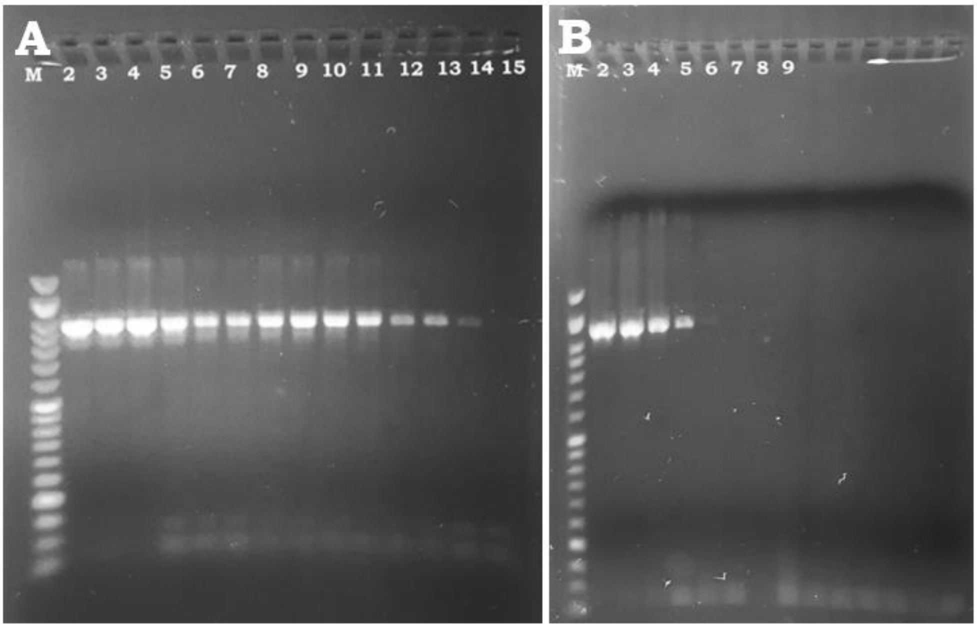


ภาพที่ 12: การวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินด้วยเทคนิค LAMP จากประเภทตัวอย่างที่แตกต่างกัน

หมายเหตุ: เส้นด้านบน: ตัวอย่างจาก nasal swab, เส้นด้านล่าง: ตัวอย่างจาก เลือด น้ำลาย และอุจจาระ

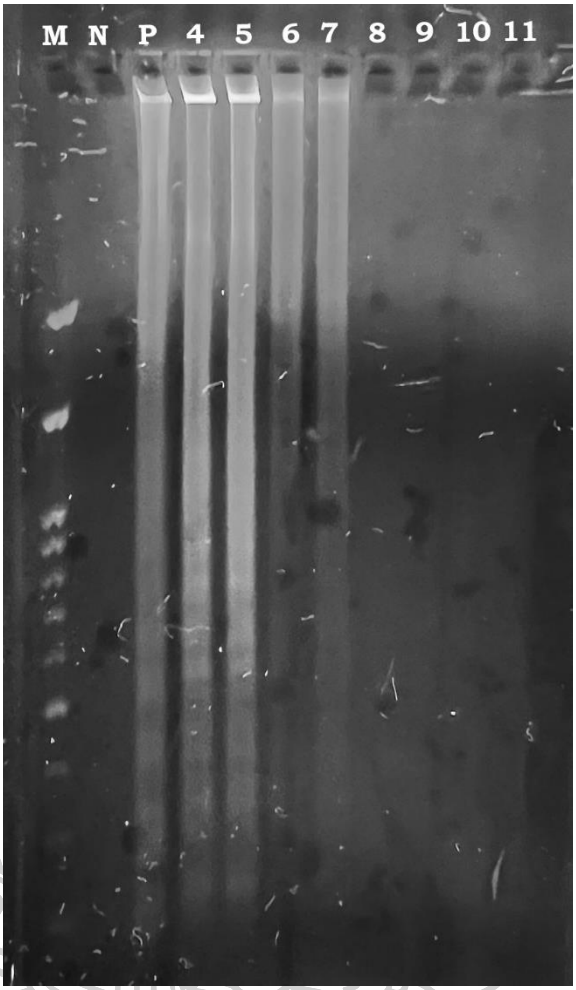
4.5 เปรียบเทียบความไว (Sensitivity) ของเทคนิค PCR และ LAMP ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV

นำตัวอย่างของโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินมาสกัดดีเอ็นเอ และวัดปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (Eppendorf BioSpectrometer® basic, Germany) ก่อนที่จะนำไปหาค่าความไวในการตรวจวินิจฉัยของแต่ละเทคนิค โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณ 48.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจาง ยีน P32 จะถูกนำมาเจือจางครั้งละ 2 เท่า (2-fold dilution series) โดยมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดในแต่ละหลอด ที่ 48.50, 26.25, 12.13, 6.06, 3.03, 1.52, 0.76, 0.38, 0.19, 0.09. 0.04, 0.02, 0.01 และ 0.005 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ยีน GPCR จะนำมาเจือจางครั้งละ 10 เท่า (Ten-fold dilution series) โดยมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดในแต่ละหลอด ที่ 48.50, 4.85, 0.49, 0.04, 0.004, 0.0004, 0.00004 และ 0.000004 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้และดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วในแต่ละระดับไปทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค PCR และ LAMP พบว่าเมื่อนำมาวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR และนำมาอ่านผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% (w/v) agarose gel มีอัตราการตรวจพบดีเอ็นเอของยีน P32 และ GPCR ที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ 0.01 และ 0.04 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 13) เมื่อนำมาวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP พบว่ามีอัตราการตรวจพบดีเอ็นเอของยีน GPCR โดยมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้อยู่ที่ 0.04 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 14) เช่นเดียวกับเทคนิค PCR



ภาพที่ 13: ผลการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค PCR ของยีน P32 และ GPCR และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ: (A) ยีน P32; lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2: ดีเอ็นเอต้นฉบับที่สกัดได้ ความเข้มข้น 48.50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, lanes 3-15: ดีเอ็นเอที่ถูกเจือจางลงทีละ 2 เท่า (2-fold dilution series) โดยมีความเข้มข้น 26.25, 12.13, 6.06, 3.03, 1.52, 0.76, 0.38, 0.19, 0.09. 0.04, 0.02, 0.01 และ 0.005 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (B) ยีน GPCR; lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2: ดีเอ็นเอต้นฉบับที่สกัดได้ ความเข้มข้น 48.50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, lanes 3-9: ดีเอ็นเอที่ถูกเจือจางลงทีละ 10 เท่า (Ten-fold dilution series) โดยมีความเข้มข้น 4.85, 0.49, 0.04, 0.004, 0.0004, 0.00004 และ 0.000004 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 14: ผลการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค LAMP ของยีน GPCR และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ: lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2: no-template control, lane 3: positive control, lane 4: ดีเอ็นเอต้นฉบับที่สกัดได้ ความเข้มข้น 48.50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, lanes 5-11: ดีเอ็นเอที่ถูกเจือจางลงทีละ 10 เท่า โดยมีความเข้มข้น 4.85, 0.49, 0.04, 0.004, 0.0004, 0.00004 และ 0.000004 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

4.6 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LSDV

ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน P32 และ GPCR จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ BTseq (U2Bio, Thailand) มีความยาวของ amplicon อยู่ที่ 964 และ 1,066 bp ตามลำดับ (ตารางที่ 11 และ 12) และเมื่อนำไปทำ sequence alignment เพื่อดูความเหมือนและต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 17 และ 18) และนำมาวิเคราะห์ในเชิงวิวัฒนาการ ร่วมกับยีน P32 และ GPCR ของเชื้อ LSDV, SPPV และ GTPV

จากฐานข้อมูลใน GenBank (ภาพที่ 15 และ 16) พบว่ายีน P32 ของตัวอย่าง C22 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ LSDV MW355944 (China, 2020), MW732649 (Hong Kong, 2020), MN598005 (Xinjiang, 2019) และ MZ577073 (Vietnam, 2021) มากที่สุด โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100% มีความเหมือนกันกับสายพันธุ์อ้างอิง AF325528 (Neethling 2490, Africa) อยู่ 99.4% และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อที่อยู่ในจีนัสเดียวกัน ได้แก่ KF661977 (SPPV, China, 2013) และ JN596275 (GTPV, China, 2012) พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับทั้ง 2 ตัว อยู่ที่ 98.0% (ตารางที่ 13) ในส่วนของยีน GPCR ของตัวอย่าง C22 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ LSDV MW251475 (China, 2021), MW355944 (China, 2020), MW732649 (Hong Kong, 2020), MZ577073 (Vietnam, 2021), MZ577074 (Vietnam, 2021) และ MZ577075 (Vietnam, 2021) มากที่สุด โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 100% และมีความเหมือนของลำดับนิวคลีไทด์กับ MN508357 (China, 2019) และ MN598006 (Xinjiang, 2019) อยู่ที่ 99.9% และมีความเหมือนกันกับสายพันธุ์อ้างอิง AF325528 (Neethling 2490, Africa) อยู่ 99.2% นอกจากนี้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อที่อยู่ในจีนัสเดียวกัน ได้แก่ KF661979 (SPPV, China,2013) และ KF495252 (GTPV, India, 2015) พบว่า มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 95.6% และ 96.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

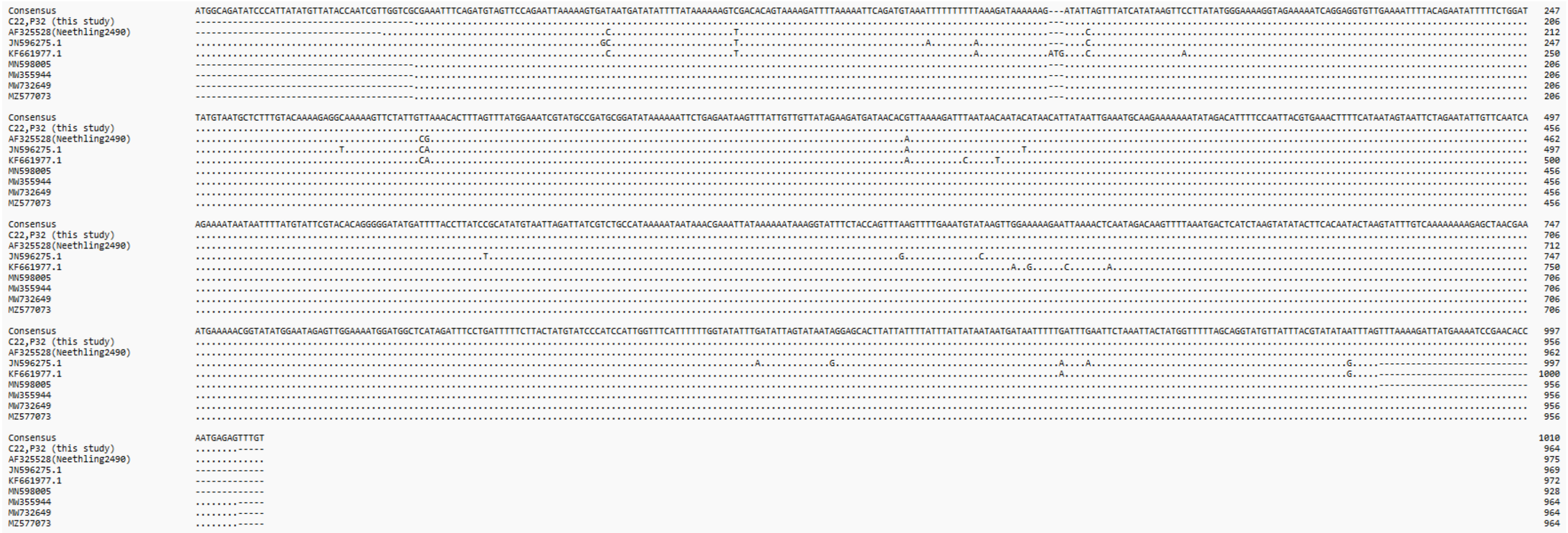
มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 11: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน P32 จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22

1	CGAAATTTCAGATGTAGTTCCAGAATTAAAAAGTGATAATGATATATTTTATAAAAAAGTCGACACAGTAAAAGATTTTAAAAATTCAGATGTAAATTTT	100
101	TTTTTTAAAGATAAAAAAGATATTAGTTTATCATATAAGTTCCTTATATGGGAAAAGGTAGAAAAATCAGGAGGTGTTGAAAATTTTACAGAATATTTTT	200
201	CTGGATTATGTAATGCTCTTTGTACAAAAGAGGCAAAAAGTTCTATTGTTAAACACTTTAGTTTATGGAAATCGTATGCCGATGCGGATATAAAAAATTC	300
301	TGAGAATAAGTTTATTGTTGTTATAGAAGATGATAACACGTTAAAAGATTTAATAACAATACATAACATTATAATTGAAATGCAAGAAAAAAATATAGAC	400
401	ATTTTCCAATTACGTGAAACTTTTCATAATAGTAATTCTAGAATATTGTTCAATCAAGAAAATAATAATTTTATGTATTCGTACACAGGGGGATATGATT	500
501	TTACCTTATCCGCATATGTAATTAGATTATCGTCTGCCATAAAAATAATAAACGAAATTATAAAAAATAAAGGTATTTCTACCAGTTTAAGTTTTGAAAT	600
601	GTATAAGTTGGAAAAAGAATTAAAACTCAATAGACAAGTTTTAAATGACTCATCTAAGTATATACTTCACAATACTAAGTATTTGTCAAAAAAAAGAGCT	700
701	AACGAAATGAAAAACGGTATATGGAATAGAGTTGGAAAATGGATGGCTCATAGATTTCCTGATTTTTCTTACTATGTATCCCATCCATTGGTTTCATTTT	800
801	TTGGTATATTTGATATTAGTATAATAGGAGCACTTATTATTTTATTTATTATAATAATGATAATTTTTGATTTGAATTCTAAATTACTATGGTTTTTAGC	900
901	AGGTATGTTATTTACGTATATAATTTAGTTTAAAAGATTATGAAAATCCGAACACCAATGAGAG	964

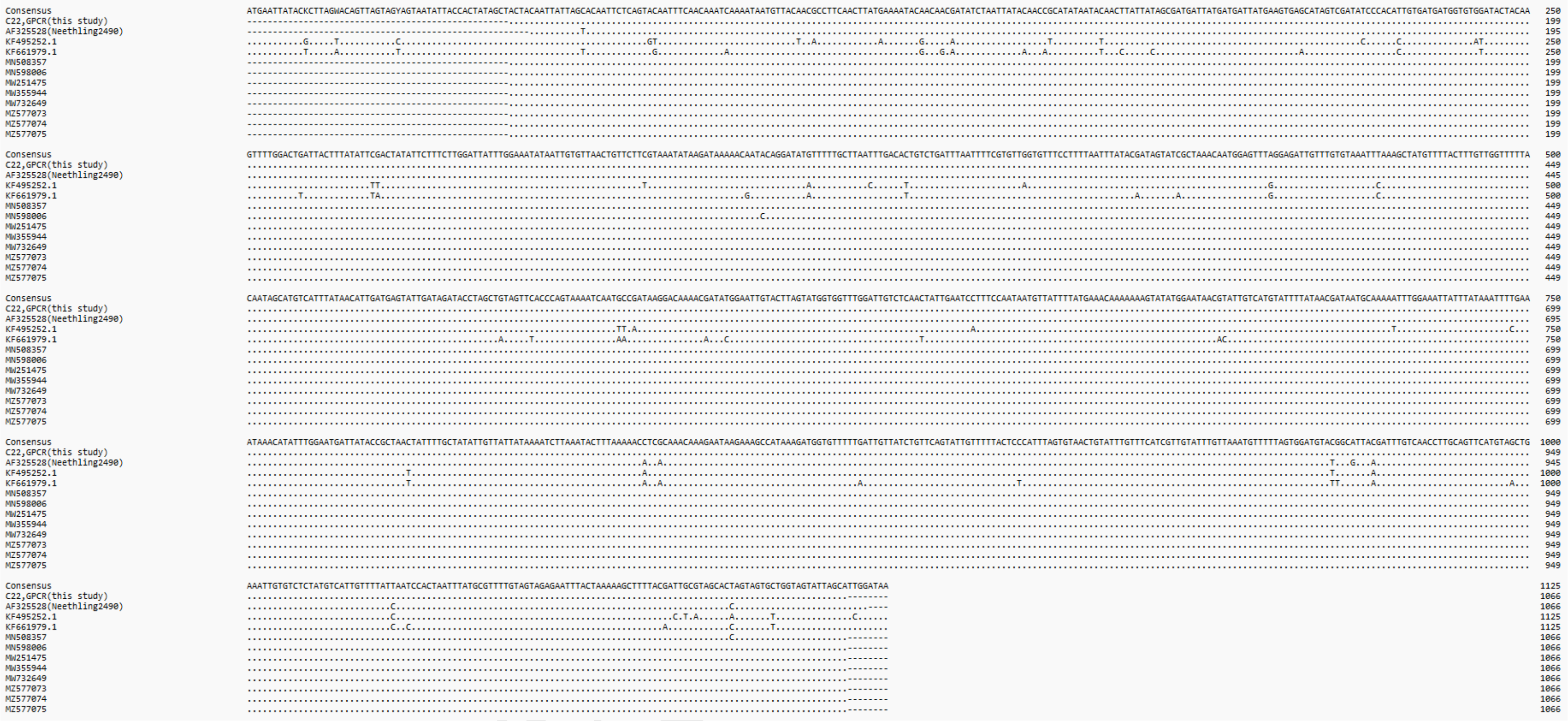
ตารางที่ 12: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22

1	ACTACAATTATTAGCACAATTCTCAGTACAATTTCAACAAATCAAAATAATGTTACAACGCCTTCAACTTATGAAAATACAACAACGATATCTAATTATA	100
101	CAACCGCATATAATACAACTTATTATAGCGATGATTATGATGATTATGAAGTGAGCATAGTCGATATCCCACATTGTGATGATGGTGTGGATACTACAAG	200
201	TTTTGGACTGATTACTTTATATTCGACTATATTCTTTCTTGGATTATTTGGAAATATAATTGTGTTAACTGTTCTTCGTAAATATAAGATAAAAACAATA	300
301	CAGGATATGTTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTTAATTTTCGTGTTGGTGTTTCCTTTTAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	GAGATTGTTTGTGTAAATTTAAAGCTATGTTTTACTTTGTTGGTTTTTACAATAGCATGTCATTTATAACATTGATGAGTATTGATAGATACCTAGCTGT	500
501	AGTTCACCCAGTAAAATCAATGCCGATAAGGACAAAACGATATGGAATTGTACTTAGTATGGTGGTTTGGATTGTCTCAACTATTGAATCCTTTCCAATA	600
601	ATGTTATTTTATGAAACAAAAAAAGTATATGGAATAACGTATTGTCATGTATTTTATAACGATAATGCAAAAATTTGGAAATTATTTATAAATTTTGAAA	700
701	TAAACATATTTGGAATGATTATACCGCTAACTATTTTGCTATATTGTTATTATAAAATCTTAAATACTTTAAAAACCTCGCAAACAAAGAATAAGAAAGC	800
801	CATAAAGATGGTGTTTTTGATTGTTATCTGTTCAGTATTGTTTTTACTCCCATTTAGTGTAACTGTATTTGTTTCATCGTTGTATTTGTTAAATGTTTTT	900
901	AGTGGATGTACGGCATTACGATTTGTCAACCTTGCAGTTCATGTAGCTGAAATTGTGTCTCTATGTCATTGTTTTATTAATCCACTAATTTATGCGTTTT	1,000
1,001	GTAGTAGAGAATTTACTAAAAAGCTTTTACGATTGCGTAGCACTAGTAGTGCTGGTAGTATTAGCA	1,066



ภาพที่ 15: ผลการวิเคราะห์ sequence alignment ของยีน P32 จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน P32 ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank

หมายเหตุ: บริเวณที่เป็นจุด (.) แสดงความเหมือนกันของแต่ละนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 16: ผลการวิเคราะห์ sequence alignment ของยีน GPCR จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน GPCR ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank

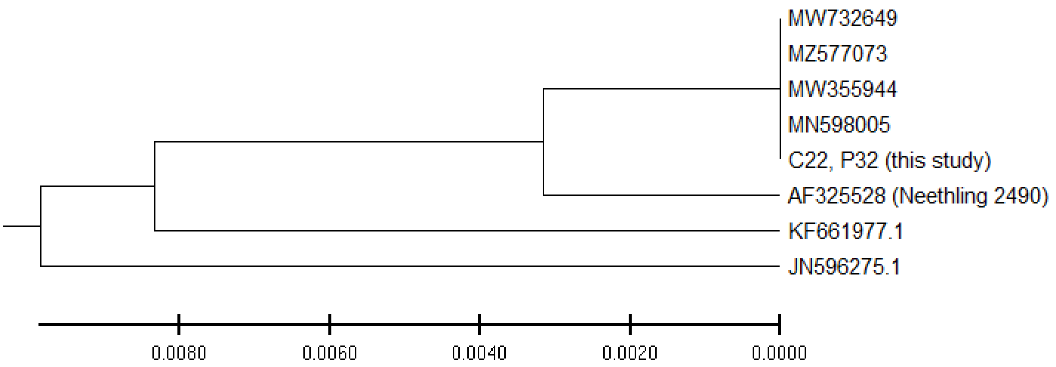
หมายเหตุ: บริเวณที่เป็นจุด (.) แสดงความเหมือนกันของแต่ละนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 13: แสดงความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน P32 จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน P32 ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank

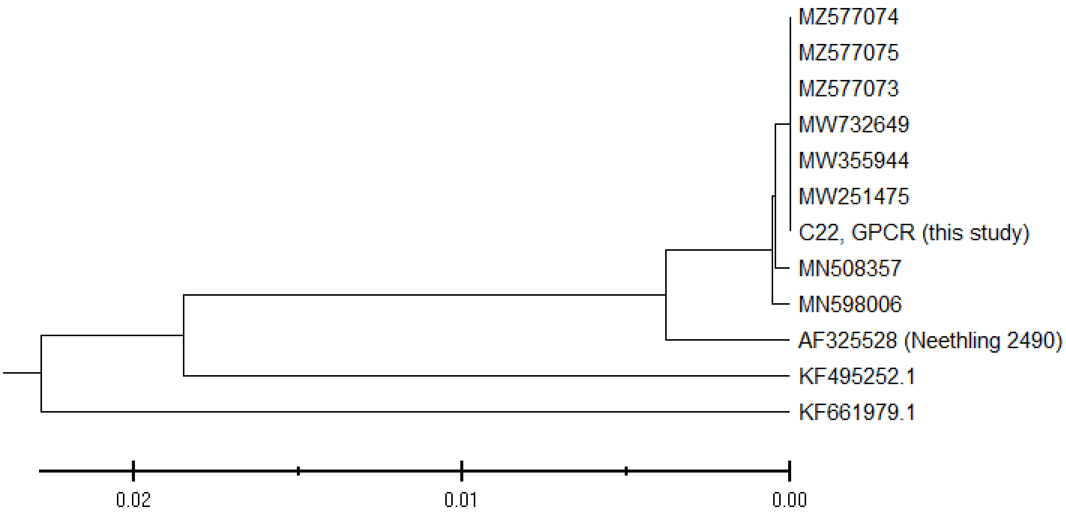
Sequence	AF325528	C22,P32	MN598005	MW355944	MW732649	MZ577073	KF661977	JN596275
AF325528(Neethling2490)								
C22,P32 (this study)	99.4							
MN598005(Xinjiang,2019)	99.4	100.0						
MW355944(China,2020)	99.4	100.0	100.0					
MW732649(HongKong,2020)	99.4	100.0	100.0	100.0				
MZ577073(Vietnam,2021)	99.4	100.0	100.0	100.0	100.0			
KF661977(SPPV,China,2013)	98.5	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0		
JN596275(GTPV,China,2012)	98.5	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	97.9	

ตารางที่ 14: แสดงความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน GPCR ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank

Sequence	AF325528	C22,GPCR	MN508357	MN598006	MW251475	MW355944	MW732649	MZ577073	MZ577074	MZ577075	KF495252	KF661979
AF325528(Neethling2490)												
C22,GPCR(this study)	99.2											
MN508357(China,2019)	99.3	99.9										
MN598006(Xinjiang,2019)	99.2	99.9	99.8									
MW251475(China,2021)	99.2	100.0	99.9	99.9								
MW355944(China,2020)	99.2	100.0	99.9	99.9	100.0							
MW732649(HongKong,2020)	99.2	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0						
MZ577073(Vietnam,2021)	99.2	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0	100.0					
MZ577074(Vietnam,2021)	99.2	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0	100.0	100.0				
MZ577075(Vietnam,2021)	99.2	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0			
KF495252(GTPV,India,2015)	96.4	96.4	96.4	96.3	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4		
KF661979(SPPV,China,2013)	96.2	95.6	95.7	95.5	95.6	95.5	95.6	95.5	95.6	95.5	95.4	



ภาพที่ 17: ผลวิเคราะห์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน P32 จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน P32 ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank



ภาพที่ 18: ผลวิเคราะห์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน GPCR จาก nasal swab ของตัวอย่าง C22 ร่วมกับยีน GPCR ของ LSDV, SPPV และ GTPV จากฐานข้อมูลใน GenBank

4.7 การเก็บตัวอย่าง MRSA

ผลการเก็บตัวอย่างเชื้อ MRSA จากฟาร์มโคที่แสดงอาการของโรคเต้านมอักเสบในจังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ตัวอย่างเชื้อ MRSA ถูกเก็บน้ำนมจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบโดยตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นด้วยน้ำยา CMT (ผล +1 ขึ้นไป) รวมทั้งหมด 145 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างจากสัตว์เพื่อตรวจหาเชื้อ MRSA ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (Project ID: 07/2562)

4.8 การจำแนกเชื้อ *S. aureus* จากน้ำนมโค

การเพาะแยกเชื้อ *S. aureus* จากน้ำนมโค จำนวนทั้งหมด 145 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างน้ำนมมาเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง mannitol salt agar พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 153 ไอโซเลท และหลังจากนำมาทดสอบด้วย catalase test, coagulase test และย้อมสีแกรม พบว่าเชื้อที่แสดงลักษณะของ *S. aureus* คือ ให้ผลการทดสอบ catalase test และ coagulase test เป็นบวก และย้อมแกรมติดสีแกรมบวก มีจำนวน 10 ไอโซเลท (6.54%) และเชื้อในกลุ่มของ Coagulase Negative *Staphylococcus* (CNS) มีจำนวน 17 ไอโซเลท (11.11%) ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่เหลือเป็นเชื้อที่ไม่แสดงลักษณะของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* มีจำนวน 126 ไอโซเลท (82.35%) โดยอาจเป็นเชื้อในกลุ่มของ *Escherichia coli* (*E. coli*) และ *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15: ความชุกของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำนมโคในจังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

แบคทีเรีย	จำนวน (ไอโซเลท)	คิดเป็นร้อยละ
S. aureus	10	6.54
CNS	17	11.11
อื่น ๆ	126	82.35
รวม	**153**	**100**

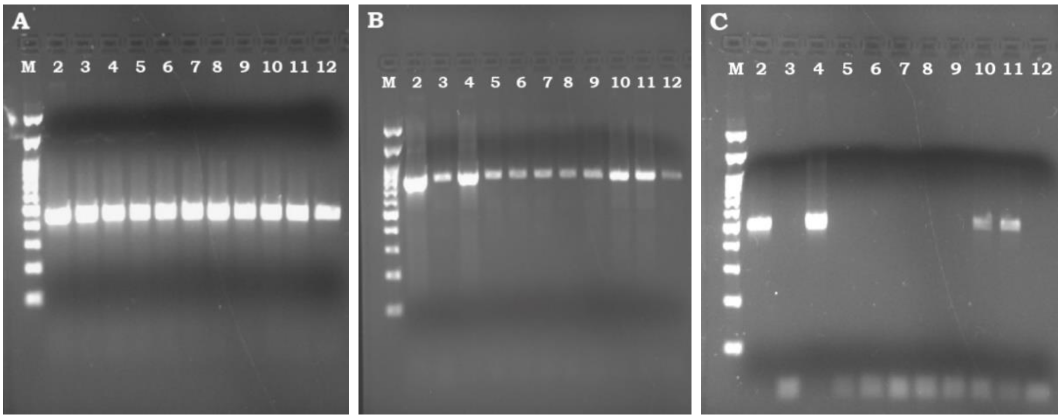
4.9 การวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างแบคทีเรียที่แสดงลักษณะของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำนม จำนวน 10 ไอโซเลท (I1-I10) และดีเอ็นเออ้างอิงของเชื้อ MRSA (Reference strain; RI) มาเพิ่มปริมาณยีน *femA*, *blaZ* และ *mecA* สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค PCR และนำมาอ่านผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% (w/v) agarose gel พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทพบยีน *femA* และ *blaZ* (100%) แต่ยีน *mecA* พบเพียงแค่ในสายพันธุ์อ้างอิง RI และในตัวอย่าง 3 ไอโซเลท ได้แก่ I2, I8 และ I9 (30%) เท่านั้น (ตารางที่ 16) (ภาพที่ 19) จากผลการวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบว่า เชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทเป็นเชื้อ *S. aureus* ที่มียีนดื้อต่อยา penicillin และเชื้อไอโซเลท I2, I8 และ I9 เป็นเชื้อที่มียีนดื้อต่อยา methicillin ซึ่งระบุว่าเป็นเชื้อ MRSA

ตารางที่ 16: ผลการวินิจฉัยเชื้อ MRSA จากตัวอย่าง S. aureus ที่แยกได้จากน้ำนมโค ด้วยเทคนิค PCR

S. aureus	เทคนิค PCR		
	femA	*blaZ*	*mecA*
RI	+	+	+
I1	+	+	-
I2	+	+	+
I3	+	+	-
I4	+	+	-
I5	+	+	-
I6	+	+	-
I7	+	+	-
I8	+	+	+
I9	+	+	+
I10	+	+	-

มหาวิทยาลัยศิลปากร



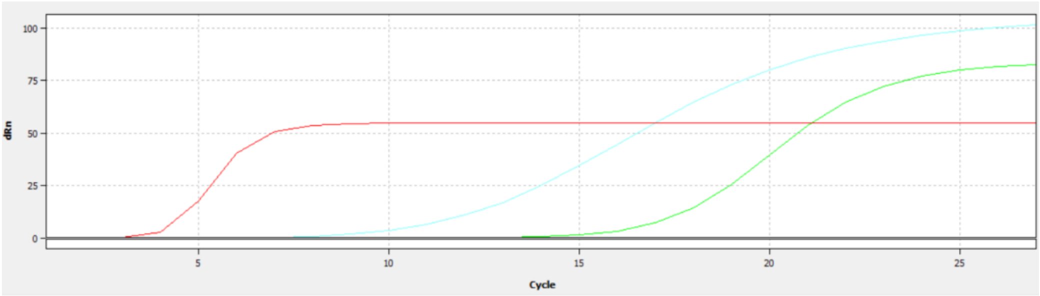
ภาพที่ 19: ผลการตรวจหายีน *femA*, *blaZ* และ *mecA* จากเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำนมโคด้วยเทคนิค PCR และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ: (A) ยีน *femA* ขนาด 450 bp, (B) ยีน *blaZ* ขนาด 774 bp และ (C) ยีน *mecA* ขนาด 519 bp; lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2: MRSA reference strain (RI), lanes 3-12: ตัวอย่าง *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำนมโค (I1-I10 ตามลำดับ)

4.10 การวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค LAMP

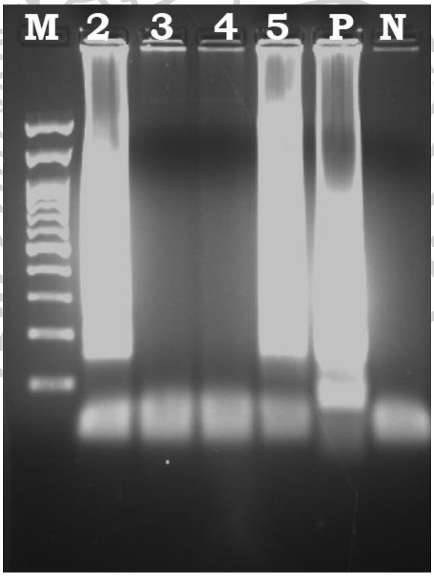
เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างแบคทีเรียที่ทดสอบด้วยเทคนิค PCR และให้ผลที่แสดงลักษณะของเชื้อ MRSA (ยีน *mecA* เป็นผลบวก) จำนวน 3 ไอโซเลท (I2, I8 และ I9) ร่วมกับดีเอ็นเออ้างอิงของเชื้อ MRSA (RI) มาเพิ่มปริมาณยีน *mecA* สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกัน positive control และ no-template control ด้วยเครื่องเครื่อง real-time fluorescent detector โดยอ่านผลจาก fluorescent dye ที่เติมลงในหลอดทดลอง จากช่องแสง FAM พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของกราฟในหลอดทดลอง positive control, I2 และ RI โดยมีค่า Tp ของ I2 และ RI เท่ากับ 14.62 และ 27.72 ตามลำดับ ส่วนหลอดทดลอง no-template control, I8 และ I9 ไม่พบการเพิ่มขึ้นของกราฟ (ภาพที่ 20) เมื่อนำมาอ่านผลจากความขุ่นของการทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองด้วยตาเปล่า และอ่านผลจากการเรืองแสง fluorescent ภายใต้หลอด UV พบว่าความขุ่นและการเรืองแสง fluorescent ในแต่ละหลอดทดลองมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยหลอดที่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟจากการอ่านผลที่ช่องแสง FAM ด้วยเครื่อง real-time fluorescent detector จะมีความขุ่นและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับหลอดที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟ และเมื่อนำมาวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่าหลอดทดลอง positive control, I2 และ RI ที่ จะมีค่า OD ที่สูงกว่าหลอดทดลอง no-template control, I8 และ I9 อีกด้วย หลังจากนั้นนำมายืนยันผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% (w/v) agarose gel และย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium พบว่าปรากฏ

แถบการแยกของดีเอ็นเอของหลอด positive control, RI และ I2 โดยแถบที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นแบบ ladder smear (ภาพที่ 21) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มปริมาณยีน *mecA* ในตัวอย่าง RI และ I2



ภาพที่ 20: ผลการวินิจฉัยเชื้อ MRSA จากยีน *mecA* ของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำนมโค ด้วยเทคนิค LAMP

หมายเหตุ: เส้นสีแดง: positive control, เส้นสีฟ้า: I2, เส้นสีเขียว: RI, เส้นสีเทาด้านล่าง: ประกอบไปด้วย no-template control, I8 และ I9



ภาพที่ 21: ผลการวินิจฉัยเชื้อ MRSA จากยีน *mecA* ของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำนมโค ด้วยเทคนิค LAMP และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ: lane 1:100 bp DNA ladder, lane 2-4: ตัวอย่าง *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำนมโค (I2, I8 และ I9 ตามลำดับ), lane 5: MRSA reference strain (RI), lane 6: positive control และ lane 7: no-template control

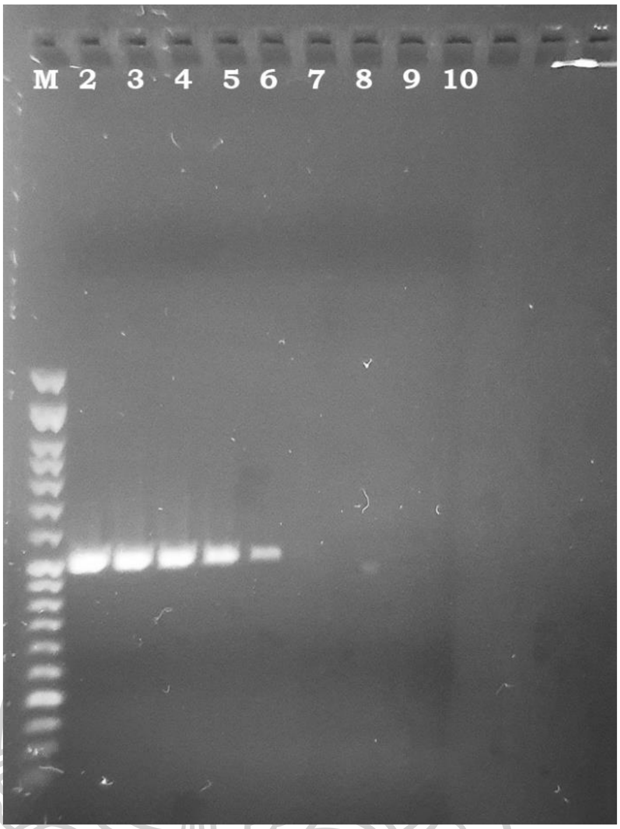
4.11 เปรียบเทียบความไว (Sensitivity) ของเทคนิค PCR และ LAMP ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MRSA

เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อ MRSA reference strain (RI) มาวัดปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (Eppendorf BioSpectrometer® basic, Germany) ก่อนที่จะนำไปหาค่าความไวในการตรวจวินิจฉัยของแต่ละเทคนิค โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดมีปริมาณ 33.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางทีละ 10 เท่า โดยมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดในแต่ละหลอด ที่ 33.60, 3.36, 0.33, 0.03, 0.003, 0.0003, 0.00003 และ 0.000003 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้และดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วไปทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MRSA จากยีน *mecA* พบว่าเมื่อนำมาวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR และนำมาอ่านผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% (w/v) agarose gel มีอัตราการตรวจพบดีเอ็นเอของยีน *mecA* ที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ 0.003 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 22) เมื่อนำมาวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP ด้วยเครื่องเครื่อง real-time fluorescent detector จากช่วงแสง FAM แสดงผลผ่านโปรแกรม qPCRsoft (Jena, Germany) โดยให้โปรแกรมคำนวณจุดแบ่งผลการทดสอบเป็นบวกและลบ โดยกำหนดตัวอย่างที่เป็น no-template control หลังจากนั้นโปรแกรมจะคำนวณจุดตัดที่เหมาะสมเพื่อแบ่งผลการทดสอบเป็นบวกและลบ พบว่ามีอัตราการตรวจพบดีเอ็นเอของยีน *mecA* โดยมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้อยู่ที่ 0.003 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 17) เช่นเดียวกับเทคนิค PCR

ตารางที่ 17: ผลการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MRSA จากยีน mecA ด้วยเทคนิค LAMP

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ml)	ผลการวินิจฉัย	Tp value (นาที)
RI	33.6	+	25.51
Dilute 1	3.36	+	24.55
Dilute 2	0.33	+	23.51
Dilute 3	0.03	+	25.30
Dilute 4	0.003	+	27.07
Dilute 5	0.0003	-	35.18
Dilute 6	0.00003	-	38.08
Dilute 7	0.000003	-	41.80

หมายเหตุ: Tp: Time to positive



ภาพที่ 22: ผลการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค PCR จากยีน mecA และอ่านผลโดย 1.0% agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ: lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2: ดีเอ็นเอต้นฉบับที่สกัดได้ ความเข้มข้น 33.60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, lane 3-10: ดีเอ็นเอที่ถูกเจือจางลงทีละ 10 เท่า โดยมีความเข้มข้น 3.36, 0.33, 0.03, 0.003, 0.0003, 0.00003 และ 0.000003 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

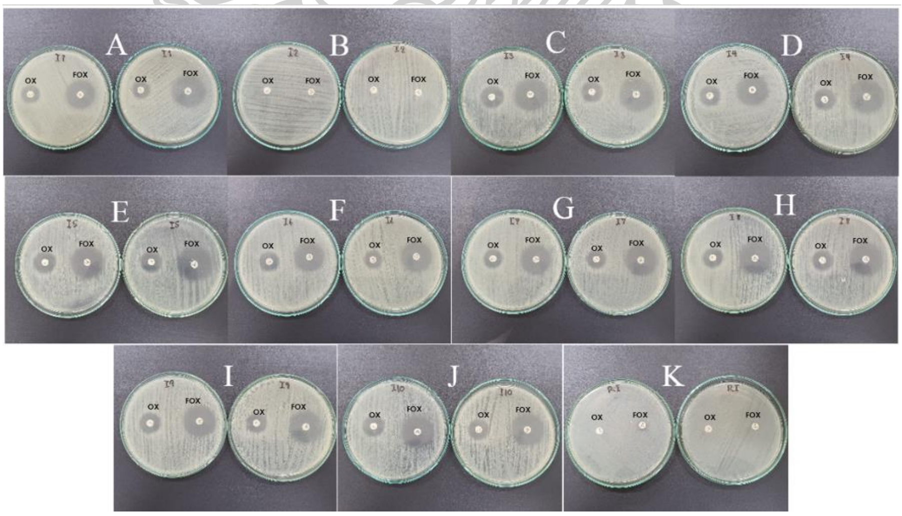
4.12 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility test)

ตัวอย่างเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 10 ไอโซเลท และเชื้อ MRSA อ้างอิงที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง mannitol salt agar เมื่อนำมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี antimicrobial susceptibility test พบว่าเชื้อที่แสดงลักษณะของการดื้อยา oxacillin และ cefoxitin มีเพียงแค่เชื้อ MRSA สายพันธุ์อ้างอิง RI และในตัวอย่าง 1 ไอโซเลท ได้แก่ I2 (10%) เท่านั้น โดยมี inhibition zone ซึ่งจะเป็นวงเคลียใส ไม่เห็นโคโลนีของแบคทีเรียรอบแผ่นยา น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร ใน oxacillin และ 21 มิลลิเมตร ใน cefoxitin (ตารางที่ 18) (ภาพที่ 23)

ตารางที่ 18: การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท (I1-I10) และเชื้อ MRSA สายพันธุ์อ้างอิง (RI)

Isolate	Antimicrobial susceptibility test			
	Oxacillin 1 µg		Cefoxitin 30 µg	
	Inhibition zone (mm)	Drug sensitivity	Inhibition zone (mm)	Drug sensitivity
RI	0	R	6.5	R
I1	15.5	S	26.5	S
I2	0	R	0	R
I3	20.5	S	30.5	S
I4	18.0	S	28.5	S
I5	20.0	S	30.0	S
I6	17.5	S	25.5	S
I7	17.0	S	28.0	S
I8	17.0	S	29.0	S
I9	17.5	S	29.5	S
I10	19.0	S	28.5	S

หมายเหตุ: S: ไวต่อยาปฏิชีวนะ, R: ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ



ภาพที่ 23: ผลการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างด้วยวิธี antimicrobial susceptibility test

หมายเหตุ: วัดจาก inhibition zone ซึ่งจะเป็นวงเคลียใส ไม่เห็นโคโลนีของแบคทีเรียรอบแผ่นยา ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร ใน oxacillin และ 21 มิลลิเมตร ใน cefoxitin ถึงระบุได้ว่าเชื้อมีการดื้อต่อยา (A-J) ตัวอย่างเชื้อ S. aureus 10 ไอโซเลท I1-I10 ตามลำดับ (K) เชื้อแบคทีเรีย MRSA สายพันธุ์อ้างอิง RI; OX: oxacillin และ FOX: cefoxitin

4.13 วิจารณ์ผลการทดลอง

โรคลัมปีสกินและโรคเต้านมอักเสบเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาที่รุนแรงต่อเกษตรกรที่เลี้ยงโคเป็นอย่างมาก โดยจะส่งผลกระทบต่อระบบการผลิตสัตว์เศรษฐกิจ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของโรคและเกิดเป็นโรคระบาดที่ยากต่อการควบคุม ซึ่งทั้ง 2 โรคนี้เกิดจากเชื้อก่อโรคต่างชนิดกัน ได้แก่ เชื้อ LSDV ที่ก่อโรคลัมปีกิน และเชื้อ *S. aureus* ที่ก่อโรคเต้านมอักเสบ โดยทั้ง 2 โรคในปัจจุบันจะนิยมตรวจวินิจฉัยและยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิคนี้จะใช้เวลาที่ค่อนข้างนาน และต้องส่งตัวอย่างเข้าห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือและบุคลากรที่เชี่ยวชาญ ส่งผลให้เกิดการล่าช้าในการวินิจฉัยและอาจก่อให้เกิดการสูญเสียที่มากขึ้นได้ จึงมีความจำเป็นที่จะพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อให้เข้ามามีบทบาทในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ซึ่งจะสามารถช่วยลดระยะเวลาในการวินิจฉัยได้และยังสามารถลดการสูญเสียได้อีกด้วย

การวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค PCR ในการตรวจหายีน P32 และ GPCR จากตัวอย่างจากโคและตัวอย่างแมลงพาหะของโรคลัมปีสกิน โดยยีน P32 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน envelope ของไวรัสซึ่งเป็นเปลือกหุ้มด้านนอกรอบตัวของไวรัส เป็นส่วนที่จำเป็นที่ใช้ในการเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์และการรวมตัวกันของเยื่อหุ้มของไวรัสกับโฮสต์ (Tulman et al., 2001) และยีน GPCR เป็นยีนที่เกี่ยวข้องการการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ในบริเวณรอยโรคและกดภูมิคุ้มกันของโฮสต์ให้ต่ำลงในขณะติดเชื้ออีกด้วย (El-Tholoth & El-Kenawy, 2016) ในปัจจุบันทั้ง 2 ยีนนี้เป็นยีนที่นิยมนำมาวินิจฉัยเชื้อ LSDV (El-Kholy et al., 2008) ในการวินิจฉัยเชื้อ LSDV ในงานวิทยานิพนธ์นี้พบว่ามีการพบยีน P32 และ GPCR ในโค 5 ตัว คิดเป็น 16.67% โดยในทั้ง 2 ยีนนี้มีอัตราการตรวจพบจากตัวอย่าง nasal swab มากที่สุดคิดเป็น 16.67% รองลงมาคือจากตัวอย่างน้ำลายคิดเป็น 3.33% ในการวินิจฉัยสามารถบ่งบอกได้ว่ามีการติดเชื้อ LSDV ในโคแค่บางตัวเท่านั้น แต่ตัวอย่างจากโคทั้งหมดที่นำมาวินิจฉัยถูกเก็บมาจากโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกิน ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่าตัวอย่าง nasal swab สามารถนำมาตรวจวินิจฉัยโรคลัมปีสกินได้โดยไม่ทำให้โคเจ็บปวดจากการเก็บตัวอย่าง แต่มีอัตราการตรวจพบเชื้อที่ค่อนข้างต่ำ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้มีการรายงานว่าการตรวจวินิจฉัยโรคลัมปีสกินจากตัวอย่างผิวหนังในบริเวณรอยโรค จะมีอัตราการตรวจพบสูงที่สุด (Awad et al., 2010)

จากการวินิจฉัยเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค LAMP พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของยีน GPCR ในตัวอย่าง nasal swab ของโค คิดเป็น 36.37% ซึ่งไม่สอดคล้องกับการวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ที่สามารถตรวจพบได้เพียง 16.67% โดยในตัวอย่างจากโคที่เทคนิค PCR วินิจฉัยวินิจฉัยว่าติดเชื้อ LSDV ในเทคนิค LAMP สามารถวินิจฉัยว่าติดเชื้อได้เช่นกัน แต่มีบางตัวอย่างที่เทคนิค LAMP วินิจฉัยว่าติดเชื้อ LSDV แต่ไม่สามารถวินิจฉัยได้ในเทคนิค PCR ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่าเทคนิค

LAMP มีความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV มากกว่าเทคนิค PCR โดยคาดว่าเกิดจากการออกแบบไพรเมอร์ LAMP 4 สายที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ LSDV ที่ค่อนข้างสูงจึงทำให้มีอัตราการตรวจพบที่สูงกว่า และการอ่านผล PCR อ่านจากเจลซึ่งให้ผลเป็นบวกหรือลบ ส่วน LAMP อ่านจากเครื่อง real-time ซึ่งให้ค่าเป็นความเข้มของแสงที่เกิดขึ้นจริง ทำให้สามารถตรวจจับได้ในระดับ threshold ที่ต่ำกว่า

ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากประเภทของตัวอย่างที่แตกต่างกัน ได้แก่ เลือด nasal swab น้ำลาย และ อุจจาระ ส่งผลให้มีอัตราการตรวจพบเชื้อ LSDV ในแต่ละประเภทของตัวอย่างที่ต่างกัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบจากวิธีการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละประเภทของตัวอย่างแล้ว ตัวอย่างเลือด nasal swab และ น้ำลาย จะถูกสกัดโดยวิธีการและชุดสกัดที่เหมือนกัน โดยใช้ชุด gSYNC™ DNA extraction kit (Geneaid, Taiwan) และทำตามวิธีการของบริษัท ซึ่งผลการวินิจฉัยพบเชื้อ LSDV เพียงแค่ในตัวอย่าง nasal swab 5 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำลาย 1 ตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อ LSDV ในตัวอย่างเลือด จึงสามารถระบุได้ว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด nasal swab และน้ำลาย ไม่มีผลต่ออัตราการตรวจพบเชื้อ LSDV แต่ในตัวอย่างอุจจาระจะถูกสกัดตามวิธีการของ Zhang et al. (2006) ซึ่งในอุจจาระจะประกอบไปด้วยแบคทีเรีย ผนังลำไส้ที่หลุดลอก สารอาหาร และเยื่อใยต่าง ๆ รวมไปถึงโปรตีน ไขมัน และสารอนินทรีย์อื่น ๆ (Lukas et al., 2005) ในการสกัดดีเอ็นเอจากอุจจาระนั้นไม่ได้มีการกรองด้วย column หรือกำจัดองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับสารพันธุกรรมออกก่อน ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้อาจส่งผลให้เกิดการรบกวนหรือขัดขวางกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ LSDV ในเทคนิค PCR และ LAMP ได้

การวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินจำนวน 30 ตัว โดยมีอัตราการตรวจพบเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค PCR 16.67% (5/30) และมีอัตราการตรวจพบเชื้อ LSDV ด้วยเทคนิค LAMP 36.67% (11/30) ซึ่งในตัวอย่างของเชื้อ LSDV ที่นำมาวินิจฉัยจะถูกเก็บจากโคที่แสดงอาการของโรคลัมปีสกินทั้งหมด ได้แก่ ซึม ซูบผอม มีไข้ และมีรอยโรคเป็นตุ่มนูนบริเวณลำตัว จะเห็นได้ว่าจากตัวอย่างที่นำมาวินิจฉัยมีอัตราการตรวจพบเชื้อ LSDV ที่ค่อนข้างต่ำ คาดว่าเนื่องมาจากโคที่ถูกเก็บตัวอย่างเป็นโคของเกษตรกรในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งในขณะเกิดโรคลัมปีสกินนั้นไม่ได้มีการบันทึกอาการของโคในฟาร์มและระยะเวลาของการติดเชื้อที่ชัดเจน โดยโคบางตัวอาจอยู่ในระยะท้ายของโรคจึงส่งผลให้เชื้อ LSDV จะไปอยู่บริเวณเซลล์เยื่อบุต่าง ๆ โดยส่วนมากจะเป็นบริเวณตุ่มบริเวณรอยโรคซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมาย (Target cell) จึงส่งผลให้พบเชื้อในตัวอย่างที่เก็บมาค่อนข้างต่ำ และโคบางตัวอยู่ในระยะที่ใกล้หายจากโรค จึงส่งผลให้การตรวจวินิจฉัยไม่พบเชื้อ LSDV เนื่องจากโรคลัมปีสกินมีอัตราการตาย (Mortality) ที่ค่อนข้างต่ำเพียง 1-2% (MacLachlan & Dubovi, 2011) ดังนั้นโคส่วนใหญ่ที่ติดเชื้อจึงสามารถฟื้นตัวและหายจากโรคได้ ซึ่งโคที่อยู่ในระยะฟื้นตัวและหายจากโรคหรือไม่มีการติดเชื้อ LSDV แล้ว ในช่วงแรกจะพบเพียงรอยโรคที่เป็นตุ่มนูนบริเวณ

ลำตัวที่เหลือไว้เท่านั้น ในบางอาการของโคที่ถูกเก็บตัวอย่างเพื่อมาวินิจฉัยเชื้อ LSDV ในวิทยานิพนธ์นี้ เช่น มีไข้ ซึม ซูบผอม อาจเป็นผลมาจากการติดเชื้ออื่น ๆ หลังจากการติดเชื้อโรคลัมปีสกิน เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียในตุ่มบริเวณผิวหนังที่เกิดการแตกออกจนเป็นแผลติดเชื้อ การเกิดโรคปอดบวมหรือปอดอักเสบ (Pneumonia) และโรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) เป็นต้น (Tuppurainen et al., 2017) จึงส่งผลให้ไม่พบเชื้อ LSDV ในการวินิจฉัยเช่นกัน

ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LSDV จากยีน P32 และ GPCR พบว่าทั้ง 2 ยีนมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับเชื้อ LSDV ที่พบในประเทศ จีน เวียดนาม และฮ่องกง โดยอาจเป็นไปได้ว่าการระบาดในประเทศไทยเกิดจากการนำเข้าโคที่ติดเชื้อมาจากประเทศดังกล่าวหรือเกิดจากการนำเข้าโคติดเชื้อมาจากแหล่งที่มาเดียวกับประเทศดังกล่าว จึงส่งผลให้เชื้อ LSDV ที่พบในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันมีพันธุกรรมเหมือนกับเชื้อ LSDV ที่พบในประเทศ จีน เวียดนาม และฮ่องกง นอกจากนี้ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LSDV ที่ศึกษายังมีความแตกต่างกันกับสายพันธุ์อ้างอิงจากประเทศแอฟริกา (Neethling strain) เล็กน้อย ซึ่งเป็นประเทศที่ได้มีการเริ่มระบาดของโรคลัมปีสกินในช่วงแรกในปี ค.ศ. 1929-1988 คาดว่าเกิดจากในการระบาดของโรคลัมปีสกินนั้นมีการแพร่กระจายออกไปในหลายประเทศเป็นระยะเวลานาน ซึ่งจะเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ LSDV มาโดยตลอดระยะเวลาการระบาด จนกระทั่งเมื่อมีการเข้ามาระบาดในทวีปเอเชียรวมถึงประเทศไทย จึงทำให้เชื้อ LSDV ที่พบในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์มีการกลายพันธุ์จนมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อ LSDV สายพันธุ์อ้างอิง และคาดว่าเชื้อ LSDV ที่ระบาดในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อจากวัคซีนป้องกันโรคลัมปีสกินที่เป็นวัคซีนประเภทเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Live qttenuated virus vaccine) เนื่องจากวัคซีนที่ใช้ในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ เป็นวัคซีนสายพันธุ์ Neethling-type (MSD Animal Health) หากการระบาดในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์เกิดจากวัคซีนที่ใช้ พันธุกรรมของเชื้อ LSDV ควรจะเหมือนกันกับ Neethling strain จากประเทศแอฟริกามากที่สุด

การวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบโดยวินิจฉัยจากเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมโคจากตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีผลการตรวจด้วยน้ำยาซีเอ็มทีเป็นบวกทั้งหมด 145 ตัวอย่าง โดยผลการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำนมดิบของเกษตรกรในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันพบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 153 ไอโซเลท หลังจากนำมาทดสอบด้วย catalase test, coagulase test และย้อมสีแกรม พบว่ามีความชุกของเชื้อ *S. aureus* คิดเป็น 6.54% ซึ่งผลลัพธ์แตกต่างจากกับการศึกษาความชุกของเชื้อ *S. aureus* ในประเทศเนปาลและเอธิโอเปีย ซึ่งมีความชุกของเชื้อ *S. aureus* คิดเป็น 15.2% และ 17.2% ตามลำดับ นอกจากนี้จากการศึกษาความชุกของเชื้อในกลุ่ม Coagulase Negative Staphylococcus (CNS) คิดเป็น 11.11%

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาความชุกของเชื้อในกลุ่ม CNS ในประเทศเนปาลและเอธิโอเปีย โดยมีความชุกคิดเป็น 15.7% และ 39.1% ตามลำดับ (Balemi et al., 2021; Shrestha et al., 2021) จากการศึกษาความชุกของเชื้อแบคทีเรียจากน้ำนมของโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จะเห็นได้ว่าความชุกของเชื้อ *S. aureus* และเชื้อในกลุ่ม CNS ในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันมีความชุกของเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างต่ำกว่าในประเทศเนปาลและเอธิโอเปียเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟาร์มของเกษตรกรโคนมในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์มีการจัดการทางด้านสุขศาสตร์การรีดนมและการจัดการทางด้านสภาพแวดล้อมและการป้องกันโรคที่ดีกว่าประเทศเนปาลและเอธิโอเปีย แต่จากผลการศึกษาความชุกยังคงแสดงให้เห็นว่าการจัดการทางด้านต่าง ๆ ข้างต้นของฟาร์มโคนมในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันยังดีไม่เพียงพอที่จะสามารถป้องกันการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคได้ เนื่องจากยังพบโคที่ติดโรคเต้านมอักเสบและพบเชื้อที่ก่อโรคเต้านมอักเสบอยู่

การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำนม 10 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค PCR ในการตรวจหายีน *famA* พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับการทดสอบทางจุลชีววิทยา เนื่องจากทุกไอโซเลทพบยีน *famA* สามารถบ่งบอกได้ว่าเชื้อทุกไอโซเลทเป็นเชื้อ *S. aureus* ซึ่งยีน *famA* เป็นยีนที่ใช้จำแนกเชื้อ *S. aureus* เนื่องจากสามารถพบได้ในจีโนมของเชื้อ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ (Maidhof et al., 1991; Mehrotra et al., 2000) นอกจากนี้เชื้อทุกไอโซเลทยังพบยีน *blaZ* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ penicillinase (β-lactamase) ที่ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อต่อยา penicillin (Takayama et al., 2018) ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่าเชื้อทุกไอโซเลทดื้อต่อยา penicillin สำหรับยีน *mecA* ที่อยู่บนพันธุกรรมเคลื่อนที่ที่เรียกว่า Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome, 2009) โดยยีน *mecA* จะสร้างโปรตีน Penicillin-binding protein 2a (PBP2a) ขึ้นมาทดแทน PBPs เดิม (Hartman & Tomasz, 1984) จึงทำให้มีบริเวณ active site เปลี่ยนไป ส่งผลให้ยาปฏิชีวนะ methicillin ไม่สามารถเข้าจับและทำลายกระบวนการสร้าง cross-link peptidoglycan ได้จึงส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มของ methicillin หรือบ่งบอกว่าเป็นเชื้อ MRSA

จากการวินิจฉัยเชื้อ MRSA โดยใช้ยีน *mecA* ด้วยเทคนิค PCR พบเพียงแค่ 3 ไอโซเลท ได้แก่ I2, I8 และ I9 เมื่ออ่านผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% (w/v) agarose gel จะพบว่าแถบดีเอ็นเอของยีน *mecA* ที่ปรากฏขึ้นของตัวอย่าง I2 มีความสว่างและชัดเจนเป็นอย่างมาก แต่แถบดีเอ็นเอของยีน *mecA* ที่ปรากฏขึ้นของตัวอย่าง I8 และ I9 มีความสว่างที่น้อยกว่า เมื่อนำมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี antimicrobial susceptibility test โดยใช้ยาในกลุ่มเดียวกับ methicillin ได้แก่ oxacillin 1 ไมโครกรัม และ cefoxitin 30 ไมโครกรัม พบว่าเชื้อแบคทีเรีย I8

และ I9 ไม่แสดงการดื้อต่อยาทั้ง 2 ชนิด ซึ่งผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะขัดแย้งกับผลการวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR โดยคาดว่าเกิดจากทั้ง 2 ไอโซเลท (I8 และ I9) มีจำนวนพลาสมิด SCCmec ที่น้อย จึงส่งผลให้มีจำนวนยีน *mecA* ที่อยู่บนพลาสมิด SCCmec น้อยเช่นกัน ทำให้การดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มของ methicillin ของเชื้อ 2 ไอโซเลทนี้อยู่ในระดับที่ต่ำ แต่ยังสามารถพบยีน *mecA* ได้ด้วยเทคนิค PCR ในอีกกรณีหนึ่งคือ ยีน *mecA* ของ I8 และ I9 เกิดการหยุดการทำงานของยีน (Gene silencing) จึงส่งผลให้พบยีน *mecA* ด้วยเทคนิค PCR แต่ไม่ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ เนื่องจากยีน *mecA* เกิดการหยุดการทำงาน ซึ่งเคยปรากฏในงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้าในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) โดยตัวอย่างแบคทีเรียที่ใช้ทดลองมีการตรวจพบยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในจีโนมของแบคทีเรีย แต่แบคทีเรียจะไม่แสดงลักษณะดื้อต่อยา ซึ่งสันนิษฐานว่ายีนที่ทำให้ดื้อยาปฏิชีวนะถูกทำให้หยุดการทำงานโดยกลไกบางอย่างที่ยังไม่ทราบ (Enne et al., 2006) เมื่อเปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR กับการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ สามารถบ่งบอกได้ว่าเทคนิค PCR มีความไวและความแม่นยำในการตรวจหายีนที่ดื้อยามากกว่าการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำยีน *femA*, *blaZ* และ *mecA* มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในโฮสต์ชนิดอื่นเช่นกัน (Badua et al., 2020; Davoodi et al., 2015; Mehrotra et al., 2000; Wang et al., 2018) จากผลการวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR พบยีน *femA* และ *blaZ* ในเชื้อ *S. aureus* ทุกไอโซเลท แสดงให้เห็นว่า ไม่มีความจำเป็นที่จะต้องตรวจหาทั้ง 2 ยีนในเทคนิค LAMP ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นในการตรวจหายีน *mecA* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา methicillin ในการวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค LAMP

จากการวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค LAMP พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของยีน *mecA* ในเชื้อ RI และ I2 แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวนของยีนนี้ในเชื้อ I8 และ I9 ซึ่งไม่สอดคล้องกับการวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR แต่สอดคล้องกับการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อ I8 และ I9 ไม่แสดงออกถึงลักษณะการดื้อยา ในกรณีนี้คาดว่าความไวของการทดสอบ PCR นั้นสูงกว่าการทดสอบแบบ LAMP อาจเกิดจากการออกแบบไพรเมอร์ของ PCR ที่จำเพาะมากกว่า ทำให้สามารถตรวจพบยีน *mecA* บนพลาสมิด SCCmec ที่มีจำนวนน้อยได้ เนื่องจากมีจำนวนยีน *mecA* ที่ต่ำมากจึงส่งผลให้เชื้อไม่แสดงลักษณะของการดื้อยาออกมา แต่ในเทคนิค LAMP ที่มีความไวต่ำกว่าเทคนิค PCR เล็กน้อย ไม่สามารถตรวจพบยีน *mecA* ในเชื้อที่ไม่มีการแสดงลักษณะของการดื้อยาได้ซึ่งถือว่าถูกต้องตามข้อเท็จจริง

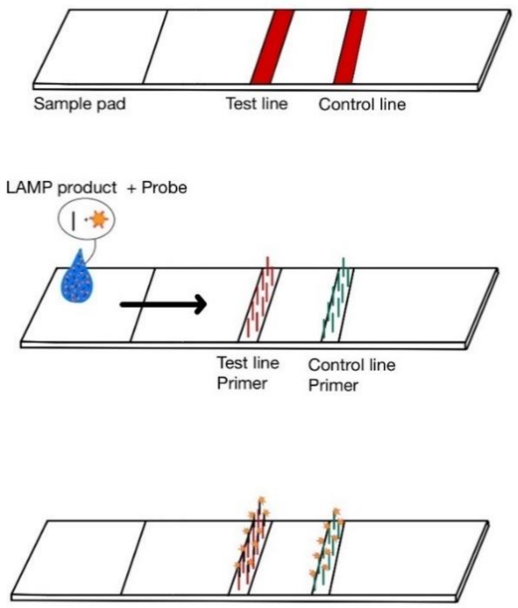
การเปรียบเทียบความไวในการตรวจวินิจฉัยของเทคนิค PCR และ LAMP ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA พบว่าทั้ง 2 เทคนิคนั้นมีความไวในการตรวจวินิจฉัยที่เท่ากันหรือ

ใกล้เคียงกันมาก ทั้งนี้ขึ้นกับการออกแบบไพรเมอร์ในเทคนิคต่าง ๆ ให้มีความจำเพาะที่สูงต่อยีนที่เป็นเป้าหมาย จึงทำให้ทั้ง 2 เทคนิคสามารถวินิจฉัยเชื้อได้ในตัวอย่างนี่มีปริมาณของดีเอ็นเอที่น้อย เนื่องจากผลการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยบ่งบอกว่าเทคนิค LAMP มีความไวเทียบเท่ากับเทคนิค PCR ซึ่งส่งผลให้สามารถพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อที่จะนำไปวินิจฉัยโรคภาคสนามได้ในอนาคต

จากผลการวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ด้วยเทคนิค LAMP ในการอ่านผลจากความขุ่นของการทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองด้วยตาเปล่า พบว่าในทุกหลอดทดลองมีความขุ่นที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อนำมาวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่าหลอดที่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟจากการอ่านผลที่ช่องแสง FAM ด้วยเครื่อง real-time fluorescent detector จะมีค่า OD ที่สูงกว่าหลอดที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟ ซึ่งผลการอ่านค่าความขุ่นจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สอดคล้องกับการอ่านผลจากกราฟด้วยเครื่อง real-time fluorescent detector เพียงแค่การอ่านผลความขุ่นด้วยตาเปล่าจะสามารถแยกออกได้ค่อนข้างยาก ในการอ่านผลจากการเรืองแสง fluorescent ภายใต้หลอด UV ด้วยตาเปล่า พบว่าในทุกหลอดทดลองมีการเรืองแสง fluorescent แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้นโดยหลอดที่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟจากการอ่านผลที่ช่องแสง FAM ด้วยเครื่อง real-time fluorescent detector จะมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับหลอดที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟ คาดว่าเกิดจากการที่ green fluorescent dye ที่ใส่ในหลอดทดลองเพื่ออ่านผลจากช่องแสง FAM ด้วยเครื่อง real-time fluorescent detector มีประสิทธิภาพที่สูง โดยเมื่อมีการจับกันเพียงเล็กน้อยของลำดับนิวคลีโอไทด์ในหลอดทดลองจะส่งผลให้เมื่อนำไปส่องภายใต้หลอด UV จะเกิดการเรืองแสง fluorescent ทันที แม้ว่าจะไม่มีการเพิ่มขึ้นของกราฟในเครื่อง real-time fluorescent detector ก็ตาม

แนวทางการพัฒนาชุดตรวจที่สามารถใช้วินิจฉัยในภาคสนามได้ โดยพัฒนาจากการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างโดยตรง ด้วยวิธีที่ง่ายที่สามารถทำได้ในภาคสนาม เช่น การทดสอบการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำนมดิบของโคหรือนมที่ผสมเชื้อ MRSA เพื่อทดสอบการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MRSA ด้วยเทคนิค LAMP ในภาคสนาม และพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อใช้วินิจฉัย เนื่องจากเทคนิค LAMP สามารถวิเคราะได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในอุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถอ่านผลได้ง่ายด้วยตาเปล่า จึงเหมาะแก่การนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยในภาคสนาม โดยจำเป็นต้องมีการพัฒนาเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้มีความสะดวกในการเคลื่อนย้าย มีต้นทุนที่ต่ำ และยังสามารถพัฒนาเทคนิค LAMP ไปใช้ร่วมกับเทคนิค Lateral flow dipstick (LFD) (ภาพที่ 24) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ทดสอบบนแผ่นกระดาษ สามารถอ่านผลได้อย่างง่าย

จาก test line และ control line บนแผ่นทดสอบ โดยในบริเวณ test line จะถูกตรึงไปด้วยไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้จับจำเพาะต่อยีนของเชื้อที่ต้องการทดสอบ และ control line ถูกตรึงไปด้วยไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้จับจำเพาะต่อโพรบต่าง ๆ เช่น gold nanoparticles, SYBR-Green เป็นต้น ในการตรวจวินิจฉัยเริ่มจากการเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผ่านการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค LAMP ในสารละลายเพื่อปรับสภาวะให้เหมาะสมกับปฏิกิริยาก่อนจะนำไปวินิจฉัย ซึ่งจะผสมให้ดีเอ็นเอติดกับสีย้อมหรือโพรบก่อน หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอตัวอย่างหยดลงบนแผ่น LFD ซึ่งจะมีการเคลื่อนที่ของตัวอย่างไปสู่ปลายอีกด้านหนึ่ง โดยจะผ่าน test line ที่มีไพรเมอร์ที่จะจับจำเพาะต่อยีนที่ต้องการทดสอบและแสดงการเรืองแสงจากสีย้อมหรือโพรบที่ติดลงไป และผ่าน control line ซึ่งจะจับกับโพรบที่เหลืออยู่และแสดงการเรืองแสงขึ้นเพื่อตรวจสอบคุณภาพและองค์ประกอบต่าง ๆ ของชุดตรวจ หลังจากนั้นอ่านผลจากเส้นการเรืองแสงที่เกิดขึ้น โดยหากเกิดเส้นบริเวณ test line และ control line ระบุว่าผลเป็นบวก หากเกิดเส้นบริเวณ control line เพียงอย่างเดียวระบุว่าผลเป็นลบ หากเกิดเส้นอื่น ๆ นอกเหนือจากนี้หรือไม่เกิดเส้นขึ้นเลยให้ระบุว่าชุดตรวจอาจมีปัญหา (Jauset-Rubio et al., 2016) Jauset-Rubio et al. (2016)โดยชุดตรวจ LFD สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ นอกจากนี้ชุดตรวจ LFD ยังมีขนาดเล็กจึงสามารถนำไปใช้ได้ง่ายในภาคสนาม เพียงแค่หยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงบนชุดตรวจ และรออ่านผลการทดสอบ เช่นเดียวกับชุดทดสอบการตั้งครรภ์ และชุดตรวจ Antigen Test Kit (ATK) ซึ่งจะเพิ่มความสะดวกในการใช้งานและการอ่านผลที่มากขึ้น



ภาพที่ 24: ชุดทดสอบ Lateral flow dipstick (LFD)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาทดลองและพัฒนาการใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในโค ได้แก่ เชื้อ Lumpy skin disease virus (LSDV) ที่ก่อโรคลัมปีสกิน และเชื้อ Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ซึ่งเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ที่ก่อโรคเต้านมอักเสบและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ methicillin จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สามารถนำเทคนิค LAMP มาตรวจวินิจฉัยเชื้อ LSDV และ MRSA ได้ โดยเทคนิค LAMP ยังมีความไวในการตรวจวินิจฉัยเทียบเท่ากับเทคนิค PCR อีกด้วย ในการวินิจฉัยเชื้อ LSDV จากตัวอย่าง nasal swab มีอัตราการตรวจวินิจฉัยที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างเลือด อุจจาระ และน้ำลาย ส่วนในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากน้ำนมดิบของโค เชื้อแบคทีเรียจะต้องมีจำนวนของพลาสมิด SCCmec ที่ค่อนข้างสูง เพื่อที่จะได้ตรวจวินิจฉัยอย่างแม่นยำ ในการพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค จำเป็นที่จะต้องคำนึงถึงเรื่องการปนเปื้อนเป็นอย่างมาก เนื่องจากเทคนิค LAMP มีความไวที่ค่อนข้างสูง ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลบวกปลอม (False positive) ได้ นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงการออกแบบไพรเมอร์ 4-6 สายให้มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายที่สูง ซึ่งหากเริ่มปฏิกิริยาแล้วไพรเมอร์มีการจับกันเอง (Primer dimer) ก็จะส่งผลให้เกิดผลบวกปลอมได้เช่นกัน ทั้งนี้การพัฒนาเทคนิค LAMP ในการวินิจฉัยโรคจากงานวิจัยชิ้นนี้เป็นเพียงต้นแบบเท่านั้น ในการนำไปใช้จริงในภาคสนามจะต้องมีการพัฒนาเพิ่มเติมในด้านของการลดต้นทุนการวินิจฉัย และการเพิ่มความสะดวกและรวดเร็วในการวินิจฉัยอีกด้วย

รายการอ้างอิง

Agianniotaki, E. I., Tasioudi, K. E., Chaintoutis, S. C., Iliadou, P., Mangana-Vougiouka, O., Kirtzalidou, A., Alexandropoulos, T., Sachpatzidis, A., Plevraki, E., Dovas, C. I., & Chondrokouki, E. (2017). Lumpy skin disease outbreaks in Greece during 2015-16, implementation of emergency immunization and genetic differentiation between field isolates and vaccine virus strains. *Vet Microbiol*, 201, 78-84.

Aguilar, B., & Iturralde, M. (2001). Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. *Vet Microbiol*, 82(2), 165-175.

Allam, A. M., Elbayoumy, M. K., Abdel-Rahman, E. H., Hegazi, A. G., & Farag, T. K. (2020). Molecular characterization of the 2018 outbreak of lumpy skin disease in cattle in Upper Egypt. *Vet World*, 13(7), 1262-1268.

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. *Trop Anim Health Prod*, 42(4), 777-783.

Ayelet, G., Haftu, R., Jemberie, S., Belay, A., Gelaye, E., Sibhat, B., Skjerve, E., & Asmare, K. (2014). Lumpy skin disease in cattle in central Ethiopia: outbreak investigation and isolation and molecular detection of the virus. *Rev Sci Tech*, 33(3), 877-887.

Badua, A. T., Boonyayatra, S., Awaiwanont, N., Gaban, P. B. V., & Mingala, C. N. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) associated with mastitis among water buffaloes in the Philippines. *Heliyon*, 6(12), e05663.

Balemi, A., Gumi, B., Amenu, K., Girma, S., Gebru, M., Tekle, M., Rius, A. A., D'Souza, D. H., Agga, G. E., & Kerro Dego, O. (2021). Prevalence of Mastitis and Antibiotic Resistance of Bacterial Isolates from CMT Positive Milk Samples Obtained from Dairy Cows, Camels, and Goats in Two Pastoral Districts in Southern Ethiopia. *Animals (Basel)*, 11(6).

Bowden, T. R., Babiuk, S. L., Parkyn, G. R., Copps, J. S., & Boyle, D. B. (2008). Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 371(2), 380-393.

Brenner, J., Haimovitz, M., Oron, E., Stram, Y., Fridgut, O., Bumbarov, V., Kuznetzova, L., Oved, Z., Waserman, A., Garazzi, S., Perl, S., Lahav, D., Edery, N., & Yadin, H. (2006). Lumpy Skin Disease (LSD) in a large dairy herd in Israel. *J.Vet.Med*, 61, 73-77.

Brown, D. F., Edwards, D. I., Hawkey, P. M., Morrison, D., Ridgway, G. L., Towner, K. J., & Wren, M. W. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother*, 56(6), 1000-1018.

Carn, V. M., & Kitching, R. P. (1995). The clinical response of cattle experimentally infected with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Arch Virol*, 140(3), 503-513.

Carrel, M., Perencevich, E. N., & David, M. Z. (2015). USA300 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 2000-2013. *Emerg Infect Dis*, 21(11), 1973-1980.

Carroll, D. E., Marr, I., Huang, G. K. L., Holt, D. C., Tong, S. Y. C., & Boutlis, C. S. (2017). *Staphylococcus aureus* Prostatic abscess: a clinical case report and a review of the literature. *BMC Infect Dis*, 17(1), 509.

Carroll, M. W., & Moss, B. (1997). Poxviruses as expression vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(5), 573-577.

Carter, G. C., Rodger, G., Murphy, B. J., Law, M., Krauss, O., Hollinshead, M., & Smith, G. L. (2003). Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J Gen Virol*, 84(Pt 9), 2443-2458.

Davoodi, N. R., S. D. Siadat, F. Vaziri, J. V. Yousefi, N. Harzandi, A. Rafi, B. Rajaei, M. Zanganeh, A. J. Nejad, S. N. Peerayeh, & Bahrmand., A. R. (2015). Identification of *staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNs) as well as detection of methicillin resistance and Panton-Valentine Leucocidin by multiplex PCR. *J. Pure Appl. Microbiol*, 9, 467-471.

El-Kholy, A., Soliman, H., & Abdelrahman, K. (2008). Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of a recent lumpy skin disease virus incursion to Egypt. *Arab J. Biotechnol.*, 11.

El-Nahas, E. M., El-Habbaa, A. S., El-Bagoury, G. F., & Radwan, M. E. I. (2013). Isolation and Identification of Lumpy Skin Disease Virus from Naturally Infected Buffaloes at Kaluobia , Egypt.

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. *Transbound Emerg Dis*, 63(6), e288-e295.

Enne, V. I., Delsol, A. A., Roe, J. M., & Bennett, P. M. (2006). Evidence of Antibiotic Resistance Gene Silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 3003-3010.

Gari, G., Grosbois, V., Waret-Szkuta, A., Babiuk, S., Jacquiet, P., & Roger, F. (2012). Lumpy skin disease in Ethiopia: seroprevalence study across different agro-climate zones. *Acta Trop*, 123(2), 101-106.

Gunther, J., Petzl, W., Bauer, I., Ponsuksili, S., Zerbe, H., Schuberth, H. J., Brunner, R. M., & Seyfert, H. M. (2017). Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Sci Rep*, 7(1), 4811.

Hartman, B. J., & Tomasz, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 158(2), 513-516.

Hasib, F. M. Y., Islam, M. S., Das, T., Rana, E. A., Uddin, M. H., Bayzid, M., Nath, C., Hossain, M. A., Masuduzzaman, M., Das, S., & Alim, M. A. (2021). Lumpy skin disease outbreak in cattle population of Chattogram, Bangladesh. *Vet Med Sci*, 7(5), 1616-1624.

Heine, H. G., Stevens, M. P., Foord, A. J., & Boyle, D. B. (1999). A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *J Immunol Methods*, 227(1-2), 187-196.

institute, C. l. s. (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Twenty-Third Informational Supplement. *CLSI document M*100-*S*23 (*ISBN* 1-56238-865-7).

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome, E. (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(12), 4961-4967.

Ireland, D. C., & Binepal, Y. S. (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J Virol Methods*, 74(1), 1-7.

Khalafalla, A. I., Gaffar Elamin, M. A., & Abbas, Z. (1993). Lumpy skin disease: observations on the recent outbreaks of the disease in the Sudan. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 46(4), 548-550.

Kirmusaolu, S. (2017). MRSA and MSSA: The Mechanism of Methicillin Resistance and the Influence of Methicillin Resistance on Biofilm Phenotype of *Staphylococcus aureus*. In *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus*.

Kitching, R. P., & Smale, C. (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Research in Veterinary Science*, 41(3), 425-427.

Lamien, C. E., Lelenta, M., Goger, W., Silber, R., Tuppurainen, E., Matijevic, M., Luckins, A. G., & Diallo, A. (2011). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *J Virol Methods*, 171(1), 134-140.

Lowy, F. D., Fant, J., Higgins, L. L., Ogawa, S. K., & Hatcher, V. B. (1988). *Staphylococcus aureus*--human endothelial cell interactions. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, 98(2), 137-146.

Lu, G., Xie, J., Luo, J., Shao, R., Jia, K., & Li, S. (2021). Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019. *Transbound Emerg Dis*, 68(2), 216-219.

MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2011). *Fenner's veterinary virology* (E. J. Dubovi, Ed.).

Maidhof, H., Reinicke, B., Blümel, P., Berger-Bächi, B., & Labischinski, H. (1991). *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol*, 173(11), 3507-3513.

Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol*, 38(3), 1032-1035.

Mercier, A., Arsevska, E., Bournez, L., Bronner, A., Calavas, D., Cauchard, J., Falala, S., Caufour, P., Tisseuil, C., Lefrancois, T., & Lancelot, R. (2018). Spread rate of lumpy skin disease in the Balkans, 2015-2016. *Transbound Emerg Dis*, 65(1), 240-243.

Monistero, V., Graber, H. U., Pollera, C., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Bottini, E., Ceballos-Marquez, A., Lasso-Rojas, L., Kroemker, V., Wente, N., Petzer, I. M., Santisteban, C., Runyan, J., Veiga Dos Santos, M., Alves, B. G., Piccinini, R., Bronzo, V., Abbassi, M. S., Said, M. B., & Moroni, P. (2018). *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. *Toxins (Basel)*, 10(6).

Moss, B. (2006). Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology*, 344(1), 48-54.

Murray, L., Edwards, L., Tuppurainen, E. S. M., Bachanek-Bankowska, K., Oura, C. A. L., Mioulet, V., & King, D. P. (2013). Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 90.

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. *Vet Dermatol*, 29(6), 532-e178.

Nawathe, D. R., Asagba, M. O., Abegunde, A., Ajayi, S. A., & Durkwa, L. (1982). Some observations on the occurrence of lumpy skin disease in Nigeria. *Zentralbl Veterinarmed B*, 29(1), 31-36.

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

Ochwo, S., VanderWaal, K., Ndekezi, C., Nkamwesiga, J., Munsey, A., Witto, S. G., Nantima, N., Mayanja, F., Okurut, A. R. A., Atuhaire, D. K., & Mwiine, F. N.

(2020). Molecular detection and phylogenetic analysis of lumpy skin disease virus from outbreaks in Uganda 2017-2018. *BMC Vet Res*, 16(1), 66.

OIE. (2017). Lumpy Skin Disease, Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control

Rayner, C., & Munckhof, W. J. (2005). Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Intern Med J*, 35 *Suppl* 2, S3-16.

Reiner, K. (2013). Catalase Test Protocol. *American Society for Microbiology*, 1-9.

Roche, X., Rozstalnyy, A., TagoPacheco, D., Pittiglio, C., Kamata, A., Beltran Alcrudo, D., Bisht, K., Karki, S., Kayamori, J., Larfaoui, F., Raizman, E., VonDobschuetz, S., Dhingra, M. S., & Sumption, K. (2020). *Introduction and spread of lumpy skin disease in South, East and Southeast Asia*. FAO.

Rosel, J. L., Earl, P. L., Weir, J. P., & Moss, B. (1986). Conserved TAAATG sequence at the transcriptional and translational initiation sites of vaccinia virus late genes deduced by structural and functional analysis of the HindIII H genome fragment. *J Virol*, 60(2), 436-449.

Rowland, S. J., & Dyke, K. G. (1989). Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. *EMBO J*, 8(9), 2761-2773.

SenGupta, M., & Sengupta, M. (2016). Coagulase test. *Practicals in Microbiology*, 71-71.

Sevik, M., & Dogan, M. (2017). Epidemiological and Molecular Studies on Lumpy Skin Disease Outbreaks in Turkey during 2014-2015. *Transbound Emerg Dis*, 64(4), 1268-1279.

Shrestha, A., Bhattarai, R. K., Luitel, H., Karki, S., & Basnet, H. B. (2021). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and pattern of antimicrobial resistance in mastitis milk of cattle in Chitwan, Nepal. *BMC Vet Res*, 17(1), 239.

Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). Gram stain protocols. *American Society for Microbiology*, 1:14.

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. *Transbound Emerg Dis*, 65(6), 1514-1521.

Taj, Y., Abdullah, F. E., & Kazmi, S. U. (2010). Current pattern of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates and the emergence of vancomycin resistance. *J Coll Physicians Surg Pak*, 20(11), 728-732.

Takayama, Y., Tanaka, T., Oikawa, K., Fukano, N., Goto, M., & Takahashi, T. (2018). Prevalence of blaZ Gene and Performance of Phenotypic Tests to Detect Penicillinase in *Staphylococcus aureus* Isolates from Japan. *Ann Lab Med*, 38(2), 155-159.

Trakulsomboon, S., Danchaivijitr, S., Rongrungruang, Y., Dhiraputra, C., Susaemgrat, W., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2001). First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. *J Clin Microbiol*, 39(2), 591-595.

Tuchscherr, L., Bischoff, M., Lattar, S. M., Noto Llana, M., Pfortner, H., Niemann, S., Geraci, J., Van de Vyver, H., Fraunholz, M. J., Cheung, A. L., Herrmann, M., Volker, U., Sordelli, D. O., Peters, G., & Loffler, B. (2015). Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog*, 11(4), e1004870.

Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F., & Rock, D. L. (2001). Genome of lumpy skin disease virus. *J Virol*, 75(15), 7122-7130.

Tuppurainen, E., Alexandrov, T., & Beltrán-Alcrudo, D. (2017). Lumpy skin disease, A field manual for veterinarians. FAO.

Tuppurainen, E. S., Venter, E. H., & Coetzer, J. A. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort J Vet Res*, 72(2), 153-164.

Tuppurainen, E. S., Venter, E. H., Coetzer, J. A., & Bell-Sakyi, L. (2015). Lumpy skin disease: attempted propagation in tick cell lines and presence of viral DNA in field ticks collected from naturally-infected cattle. *Ticks Tick Borne Dis*, 6(2), 134-140.

Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol*, 17(4), 203-218.

Virusforschung, D. I. E., & Einzeldarstellungen, I. N. (1968). *Virology monographs die Virusforschung in Einzeldarstellungen*.

Wang, W., Lin, X., Jiang, T., Peng, Z., Xu, J., Yi, L., Li, F., Fanning, S., & Baloch, Z. (2018). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Cultured From Raw Milk Taken From Dairy Cows With Mastitis in Beijing, China. *Front Microbiol*, 9, 1123.

Wilailuckana, C. (2005). Molecular characteristic Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Mahidol University.

Zaatout, N., Ayachi, A., & Kecha, M. (2019). Interaction of primary mammary bovine epithelial cells with biofilm-forming staphylococci associated with subclinical bovine mastitis. *Iran J Vet Res*, 20(1), 27-32.

Zeedan, G. S. G., Mahmoud, A. H., Abdalhamed, A. M., El-Razik, K., Khafagi, M. H., & Zeina, H. (2019). Detection of lumpy skin disease virus in cattle using real-time polymerase chain reaction and serological diagnostic assays in different governorates in Egypt in 2017. *Vet World*, 12(7), 1093-1100.

Zhang, B. W., Li, M., Ma, L. C., & Wei, F. W. (2006). A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochem Genet*, 44(11-12), 503-512.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

มหาวิทยาลัยศิลปากร

1. การเตรียม stock 10X Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

NaCl	80	กรัม
KCl	2	กรัม
Na_2HPO_4	14.4	กรัม
KH_2PO_4	2.4	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับ pH ด้วย HCl ให้มีค่า pH 7.4 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึง 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ก่อนนำมาใช้ ทำการเจือจาง 10X PBS ให้เป็น 1X PBS โดยมีอัตราส่วน 10X PBS 100 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 900 มิลลิลิตร

2. การเตรียม Squishing Buffer (SB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบ

1M Tris-Cl pH 8.0	10	ไมโครลิตร
100 mM EDTA	10	ไมโครลิตร
5M NaCl	5	ไมโครลิตร
20mg/ml proteinase K	10	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	965	ไมโครลิตร

ในการเตรียม SB จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เริ่มจากผสมส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นกันโดยเรียงลำดับการใส่สารจากสารที่ใส่ปริมาณมากไปน้อย หลังจากนั้นจึงผสมให้เข้ากัน

มหาวิทยาลัยศิลปากร

3. การเตรียมสารเคมีในกระบวนการ gel electrophoresis

3.1 การเตรียม stock 10X TBE ปริมาตร 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

Tris base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
0.5 M EDTA	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึง 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ก่อนนำมาใช้ ทำการเจือจาง 10X TBE ให้เป็น 1X TBE โดยมีอัตราส่วน 10X TBE 100 มิลลิลิตร ต่อ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 900 มิลลิลิตร

3.2 การเตรียม 1% agarose gel ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบ

ผง agarose	0.5	กรัม
1X TBE	50	มิลลิลิตร

ผสมผง agarose ลงใน 1X TBE ทำให้ละลายโดยใช้ความร้อน เมื่อละลายหมดทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง จนเริ่มอุ่นจึงนำไปเทลงชุดเซ็ตเจล

3.3 การเตรียม loading dye 6X (Bromophenol blue) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบ

Bromophenol blue	25	มิลลิกรัม
Xylene cyanol FF	25	มิลลิกรัม
Glycerol	3.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.7	มิลลิลิตร

ผสม bromophenol blue ลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและเติม xylene cyanol FF หลังจากนั้นจึงเติม glycerol ผสมให้เข้ากันและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

ลำดับเบสของของยีน

มหาวิทยาลัยศิลปากร

1. LSDV

1.1 ลำดับเบสของของยีน P32 จากตัวอย่าง nasal swab ของ C22

1	CGAAATTTCAGATGTAGTTCCAGAATTAAAAAGTGATAATGATATATTTTATAAAAAAGTCGACACAGTAAAAGATTTTAAAAATTCAGATGTAAATTTT	100
101	TTTTTTAAAGATAAAAAAGATATTAGTTTATCATATAAGTTCCTTATATGGGAAAAGGTAGAAAAATCAGGAGGTGTTGAAAATTTTACAGAATATTTTT	200
201	CTGGATTATGTAATGCTCTTTGTACAAAAGAGGCAAAAAGTTCTATTGTTAAACACTTTAGTTTATGGAAATCGTATGCCGATGCGGATATAAAAAATTC	300
301	TGAGAATAAGTTTATTGTTGTTATAGAAGATGATAACACGTTAAAAGATTTAATAACAATACATAACATTATAATTGAAATGCAAGAAAAAAATATAGAC	400
401	ATTTTCCAATTACGTGAAACTTTTCATAATAGTAATTCTAGAATATTGTTCAATCAAGAAAATAATAATTTTATGTATTCGTACACAGGGGGATATGATT	500
501	TTACCTTATCCGCATATGTAATTAGATTATCGTCTGCCATAAAAATAATAAACGAAATTATAAAAAATAAAGGTATTTCTACCAGTTTAAGTTTTGAAAT	600
601	GTATAAGTTGGAAAAAGAATTAAAACTCAATAGACAAGTTTTAAATGACTCATCTAAGTATATACTTCACAATACTAAGTATTTGTCAAAAAAAAGAGCT	700
701	AACGAAATGAAAAACGGTATATGGAATAGAGTTGGAAAATGGATGGCTCATAGATTTCCTGATTTTTCTTACTATGTATCCCATCCATTGGTTTCATTTT	800
801	TTGGTATATTTGATATTAGTATAATAGGAGCACTTATTATTTTATTTATTATAATAATGATAATTTTTGATTTGAATTCTAAATTACTATGGTTTTTAGC	900
901	AGGTATGTTATTTACGTATATAATTTAGTTTAAAAGATTATGAAAATCCGAACACCAATGAGAG	964

1.2 ลำดับเบสของของยีน GPCR จากตัวอย่าง nasal swab ของ C22

1	ACTACAATTATTAGCACAATTCTCAGTACAATTTCAACAAATCAAAATAATGTTACAACGCCTTCAACTTATGAAAATACAACAACGATATCTAATTATA	100
101	CAACCGCATATAATACAACTTATTATAGCGATGATTATGATGATTATGAAGTGAGCATAGTCGATATCCCACATTGTGATGATGGTGTGGATACTACAAG	200
201	TTTTGGACTGATTACTTTATATTCGACTATATTCTTTCTTGGATTATTTGGAAATATAATTGTGTTAACTGTTCTTCGTAAATATAAGATAAAAACAATA	300
301	CAGGATATGTTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTTAATTTTCGTGTTGGTGTTTCCTTTTAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	GAGATTGTTTGTGTAAATTTAAAGCTATGTTTTACTTTGTTGGTTTTTACAATAGCATGTCATTTATAACATTGATGAGTATTGATAGATACCTAGCTGT	500
501	AGTTCACCCAGTAAAATCAATGCCGATAAGGACAAAACGATATGGAATTGTACTTAGTATGGTGGTTTGGATTGTCTCAACTATTGAATCCTTTCCAATA	600
601	ATGTTATTTTATGAAACAAAAAAAGTATATGGAATAACGTATTGTCATGTATTTTATAACGATAATGCAAAAATTTGGAAATTATTTATAAATTTTGAAA	700
701	TAAACATATTTGGAATGATTATACCGCTAACTATTTTGCTATATTGTTATTATAAAATCTTAAATACTTTAAAAACCTCGCAAACAAAGAATAAGAAAGC	800
801	CATAAAGATGGTGTTTTTGATTGTTATCTGTTCAGTATTGTTTTTACTCCCATTTAGTGTAACTGTATTTGTTTCATCGTTGTATTTGTTAAATGTTTTT	900
901	AGTGGATGTACGGCATTACGATTTGTCAACCTTGCAGTTCATGTAGCTGAAATTGTGTCTCTATGTCATTGTTTTATTAATCCACTAATTTATGCGTTTT	1,000
1,001	GTAGTAGAGAATTTACTAAAAAGCTTTTACGATTGCGTAGCACTAGTAGTGCTGGTAGTATTAGCA	1,066

2. MRSA

2.1 ลำดับเบสของของยีน *femA* จากตัวอย่าง GenBank: ABD21750.1

1	ATGAAATTAATTAACGAGAGACAAATAGGAGTAATGATAATGAAGTTTACAAATTTAACAGCTAAAGAGTTTGGTGCCTTTACAGATAGCATGCCATACA	100
101	GTCATTTCACGCAAACTGTTGGCCACTATGAGTTAAAGCTTGCTGAAGGTTATGAAACACATTTAGTGGGAATAAAAAACAATAATAACGAGGTCATTGC	200
201	AGCTTGCTTACTTACTGCTGTACCTGTTATGAAAGTGTTCAAGTATTTTTATTCAAATCGCGGTCCAGTGATTGATTATGAAAATCAAGAACTCGTACAC	300
301	TTTTTCTTTAATGAATTATCAAAATATGTTAAAAAACATCGTTGTCTATACCTACATATCGATCCATATTTACCATATCAATACTTGAATCATGATGGCG	400
401	AGATTACAGGTAATGCTGGTAATGATTGGTTCTTTGATAAAATGAGTAACTTAGGATTTGAACATACTGGATTCCATAAAGGATTTGATCCTGTGCTACA	500
501	AATTCGTTATCACTCAGTGTTAGATTTAAAAGATAAAACAGCAGATGACATCATTAAAAATATGGATGGACTTAGAAAAAGAAACACGAAAAAAGTTAAA	600
601	AAGAATGGTGTTAAAGTAAGATTTTTATCTGAAGAAGAACTACCAATTTTTAGATCATTTATGGAAGATACGTCAGAATCAAAAGCTTTTGCTGATCGTG	700
701	ATGACAAATTTTACTACAATCGCTTAAAATATTACAAAGACCGTGTGTTAGTACCTTTAGCGTATATCAACTTTGATGAATATATTAAAGAACTAAACGA	800
801	AGAGCGTGATATTTTAAATAAAGATTTAAATAAAGCGTTAAAGGATATTGAAAAACGTCCTGAAAATAAAAAAGCACATAACAAGCGAGATAACTTACAA	900
901	CAACAACTTGATGCAAATGAGCAAAAGATTGAAGAAGGTAAACGTCTACAAGAAGAACATGGTAATGAATTACCTATCTCTGCTGGTTTCTTCTTTATCA	1,000
1,001	ATCCATTTGAAGTTGTTTATTATGCTGGTGGTACATCAAATGCATTCCGTCATTTTGCCGGAAGTTATGCAGTGCAATGGGAAATGATTAATTATGCATT	1,100
1,101	AAATCATGGCATTGACCGTTATAATTTCTATGGTGTTAGTGGTAAATTTACAGAAGATGCTGAAGATGCTGGTGTAGTTAAATTCAAAAAAGGTTACAAT	1,200
1,201	GCTGAAATTATTGAATATGTTGGTGACTTTATTAAACCAATTAATAAACCTGTTTACGCAGCATATACCGCACTTAAAAAAGTTAAAGACAGAATTTTTTAG	1,302

มหาวิทยาลัยศิลปากร

2.2 ลำดับเบสของของยีน *blaZ* จากตัวอย่าง GenBank: BX571856.1

1	AAATTACAACTGTAATATCGGAGGGTTTATTTTGAAAAAGTTAATATTTTTAATTGTAATTGCTTTAGTTTTAAGTGCATGTAATTCAAACAGTTCACAT	100
101	GCCAAAGAGTTAAATGATTTAGAAAAAAAATATAATGCTCATATTGGTGTTTATGCTTTAGATACTAAAAGTGGTAAGGAAGTAAAATTTAATTCAGATA	200
201	AGAGATTTGCCTATGCTTCAACTTCAAAAGCGATAAATAGTGCTATTTTGTTAGAACAAGTACCTTATAATAAGTTAAATAAAAAAGTACATATTAACAA	300
301	AGATGATATAGTTGCTTATTCTCCTATTTTAGAAAAATATGTAGGAAAAGATATCACTTTAAAAGCACTTATTGAGGCTTCAATGACATATAGTGATAAT	400
401	ACAGCAAACAATAAAATTATAAAAGAAATCGGTGGAATCAAAAAAGTTAAACAACGTCTAAAAGAACTAGGAGATAAAGTAACAAATCCAGTTAGATATG	500
501	AGATAGAATTAAATTACTATTCACCAAAGAGCAAAAAAGATACTTCAACACCTGCTGCTTTCGGTAAGACTTTAAATAAACTTATCGCAAATGGAAAATT	600
601	AAGCAAAGAAAACAAAAAATTCTTACTTGATTTAATGTTAAATAATAAAAGCGGAGATACTTTAATTAAAGACGGTGTTCCAAAAGACTATAAGGTTGCT	700
701	GATAAAAGTGGTCAAGCAATAACATATGCTTCTAGAAATGATGTTGCTTTTGTTTATCCTAAGGGCCAATCTGAACCTATTGTTTTAGTCATTTTTACGA	800
801	ATAAAGACAATAAAAGTGATAAGCCAAATGATAAGTTGATAAGTGAAACCGCCAAGAGTGTAATGAAGGAATTTTAAT	878

2.3 ลำดับเบสของของยีน *mecA* จากตัวอย่าง GenBank: KC243783.1

1	ATGAAAAAGATAAAAATTGTTCCACTTATTTTAATAGTTGTAGTTGTCGGGTTTGGTATATATTTTTATGCTTCAAAAGATAAAGAAATTAATAATACTA	100
101	TTGATGCAATTGAAGATAAAAATTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGAT	200
201	AAAAATATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAA	300
301	ATTAAAACAAACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTC	400
401	CAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAATTTTAGACCGAAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAAC	500
501	AGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAA	600
601	ATGGATCAAAATTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTCGCAAAAAAATTTCATCTTA	700
701	CAACTAATGAAACAAAAAGTCGTAACTATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACTCTGAAGAATTAAAACAAAA	800
801	AGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTCACA	900
901	ATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAAGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAA	1,000
1,001	AGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAGCACACCTTCATATGA	1,100
1,101	CGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACAACTTCA	1,200
1,201	CCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTGGGTTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAA	1,300
1,301	AAGATAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTT	1,400
1,401	TGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAAT	1,500
1,501	GCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAA	1,600
1,601	TCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAAAGACACGAAAAACAAAGTTTGGAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAA	1,700
1,701	TATCAATCTATTAACTGATGGTATGCAACAAGTCGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAATCCGGTACT	1,800
1,801	GCAGAACTCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTGGGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTA	1,900
1,901	AAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAATCTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGA	2,000
2,001	TGAATAACAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAAGTGCTGTTACTTCTCCCTTAAATACAATTTC	2,100
2,101	TTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACA	2,129

ภาคผนวก ค

การดีไซน์ไพร์เมอร์

มหาวิทยาลัยศิลปากร

1. PCR primers

1.1 LSDV

การดีไซน์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน P32 GenBank: AF325528

Forward →

1	GGCTATTTTACAAACTCTCATTGGTGTTCGGATTTTCATAATCTTTTAAACTAAATTATATACGTAAATAACATACCTGCTAAAAACCATAGTAATTTAG	100
101	AATTCAAATCAAAAATTATCATTATTATAATAAATAAAATAATAAGTGCTCCTATTATACTAATATCAAATATACCAAAAAATGAAACCAATGGATGGGA	200
201	TACATAGTAAGAAAAATCAGGAAATCTATGAGCCATCCATTTTCCAACTCTATTCCATATACCGTTTTTCATTTCGTTAGCTCTTTTTTTTGACAAATAC	300
301	TTAGTATTGTGAAGTATATACTTAGATGAGTCATTTAAAACTTGTCTATTGAGTTTTAATTCTTTTTCCAACTTATACATTTCAAAACTTAAACTGGTAG	400
401	AAATACCTTTATTTTTTATAATTTCGTTTATTATTTTTATGGCAGACGATAATCTAATTACATATGCGGATAAGGTAAAATCATATCCCCCTGTGTACGA	500
501	ATACATAAAATTATTATTTTCTTGATTGAACAATATTCTAGAATTACTATTATGAAAAGTTTCACGTAATTGGAAAATGTCTATATTTTTTTCTTGCATT	600
601	TCAATTATAATGTTATGTATTGTTATTAAATCTTTTAATGTGTTATCATCTTCTATAACAACAATAAACTTATTCTCAGAATTTTTTATATCCGCATCGG	700
701	CATACGATTTCCATAAACTAAAGTGTTTCGCAATAGAACTTTTTGCCTCTTTTGTACAAAGAGCATTACATAATCCAGAAAAATATTCTGTAAAATTTTC	800
801	AACACCTCCTGATTTTTCTACCTTTTCCCATATAAGGAACTTATATGATAAACTGATATCTTTTTTATCTTTAAAAAAAAAATTTACATCTGAATTTTTA	900
901	AAATCTTTTACTGTGTCAACTTTTTTATAAAATATATCATTGTCACTTTTTAATTCTGGAACTACATCTGAAATTTCGCGACCAACGATTGGTATAACAT	1,000
1,001	ATAATGGGATATCTGCCATTTTTGATA	1,027

← Reverse

การดีไซน์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน GPCR GenBank: AF325528

Forward

1 TTATCCAATGCTAATACTACCAGCACTACTGGTGCTACGCAATCGTAAAAGCTTTTTAGTAAATTCTCTACTACAAAACGCATAAATTAGTGGATTGATA 100

101 AAACAATGACATAGAGACACAATTTCAGCTACATGAACTGCAAGGTTGACAAATCTTAACGCCATACATCCACTAAAAACATTTAACAAATACAACGATG 200

201 AAACAAATACAGTTACACTAAATGGGAGTAAAAACAATACTGAACAGATAACAATCAAAAACACCATCTTTATGGCTTTCTTATTCTTTGTTTGTGATGT 300

301 CAGGATATGTTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTTAATTTTCGTGTTGGTGTTTCCTTTTAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG 400

401 ATTTTTGCATTATCGTTATAAAATACATGACAATACGTTATTCCATATACTTTTTTTGTTTCATAAAATAACATTATTGGAAAGGATTCAATAGTTGAGA 500

501 CAATCCAAACCACCATACTAAGTACAATTCCATATCGTTTTGTCCTTATCGGCATTGATTTTACTGGGTGAACTACAGCTAGGTATCTATCAATACTCAT 600

601 CAATGTTATAAATGACATGCTATTGTAAAAACCAACAAAGTAAAACATAGCTTTAAATTTACACAAACAATCTCCTAAACTCCATTGTTTAGCGATACTA 700

701 TCGTATAAATTAAAAGGAAACACCAACACGAAAATTAAATCAGACAGTGTCAAATTAAGCAAAAACATATCCTGTATTGTTTTTATCTTATATTTACGAA 800

801 GAACAGTTAACACAATTATATTTCCAAATAATCCAAGAAAGAATATAGTCGAATATAAAGTAATCAGTCCAAAACTTGTAGTATCCACACCATCATCACA 900

901 ATGTGGGATATCGACTATGCTCACTTCATAATCATCATAATCATCGCTATAATAAGTTGTATTATATGCGGTTGTATAATTAGATATCGTTGTTGTATTT 1,000

1,001 TCATAAGTTGAAGGCGTTGTAACATTATTTTGATTTGTTGAAATTGTACTGAGAATTGTACTAATAATTGTAGTAGCTATAGTGGTAATATTACTGCTAC 1,100

1,101 TATTATACATCGTTGCGCTACTAACTGTACTAAGAGTATAATTCAT 1,146

Reverse

1.2 MRSA

การดีไซน์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *femA* GenBank: ABD21750.1

1	ATGAAATTAATTAACGAGAGACAAATAGGAGTAATGATAATGAAGTTTACAAATTTAACAGCTAAAGAGTTTGGTGCCTTTACAGATAGCATGCCATACA	100
101	GTCATTTCACGCAAACTGTTGGCCACTATGAGTTAAAGCTTGCTGAAGGTTATGAAACACATTTAGTGGGAATAAAAAACAATAATAACGAGGTCATTGC	200
201	AGCTTGCTTACTTACTGCTGTACCTGTTATGAAAGTGTTCAAGTATTTTTATTCAAATCGCGGTCCAGTGATTGATTATGAAAATCAAGAACTCGTACAC	300
301	TTTTTCTTTAATGAATTATCAAAATATGTTAAAAAACATCGTTGTCTATACCTACATATCGATCCATATTTACCATATCAATACTTGAATCATGATGGCG	400
401	AGATTACAGGTAATGCTGGTAATGATTGGTTCTTTGATAAAATGAGTAACTTAGGATTTGAACATACTGGATTCCATAAAGGATTTGATCCTGTGCTACA	500
501	AATTCGTTATCACTCAGTGTTAGATTTAAAAGATAAAACAGCAGATGACATCATTAAAAATATGGATGGACTTAGAAAAAGAAACACGAAAAAAGTTAAA	600
601	AAGAATGGTGTTAAAGTAAGATTTTTATCTGAAGAAGAACTACCAATTTTTAGATCATTTATGGAAGATACGTCAGAATCAAAAGCTTTTGCTGATCGTG	700
701	ATGACAAATTTTACTACAATCGCTTAAAATATTACAAAGACCGTGTGTTAGTACCTTTAGCGTATATCAACTTTGATGAATATATTAAAGAACTAAACGA	800
801	AGAGCGTGATATTTTAAATAAAGATTTAAATAAAGCGTTAAAGGATATTGAAAAACGTCCTGAAAATAAAAAAGCACATAACAAGCGAGATAACTTACAA	900
901	CAACAACTTGATGCAAATGAGCAAAAGATTGAAGAAGGTAAACGTCTACAAGAAGAACATGGTAATGAATTACCTATCTCTGCTGGTTTCTTCTTTATCA	1,000
1,001	ATCCATTTGAAGTTGTTTATTATGCTGGTGGTACATCAAATGCATTCCGTCATTTTGCCGGAAGTTATGCAGTGCAATGGGAAATGATTAATTATGCATT	1,100
1,101	AAATCATGGCATTGACCGTTATAATTTCTATGGTGTTAGTGGTAAATTTACAGAAGATGCTGAAGATGCTGGTGTAGTTAAATTCAAAAAAGGTTACAAT	1,200
1,201	GCTGAAATTATTGAATATGTTGGTGACTTTATTAAACCAATTAATAAACCTGTTTACGCAGCATATACCGCACTTAAAAAAGTTAAAGACAGAATTTTTTAG	1,302

การดีไซน์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *blaZ* GenBank: BX571856.1

Forward

1 AAATTACAACTGTAATATCGGAGGGTTTATTTTGAAAAAGTTAATATTTTTAATTGTAATTGCTTTAGTTTTAAGTGCATGTAATTCAAACAGTTCACAT 100

101 GCCAAAGAGTTAAATGATTTAGAAAAAAAATATAATGCTCATATTGGTGTTTATGCTTTAGATACTAAAAGTGGTAAGGAAGTAAAATTTAATTCAGATA 200

201 AGAGATTTGCCTATGCTTCAACTTCAAAAGCGATAAATAGTGCTATTTTGTTAGAACAAGTACCTTATAATAAGTTAAATAAAAAAGTACATATTAACAA 300

301 AGATGATATAGTTGCTTATTCTCCTATTTTAGAAAAATATGTAGGAAAAGATATCACTTTAAAAGCACTTATTGAGGCTTCAATGACATATAGTGATAAT 400

401 ACAGCAAACAATAAAATTATAAAAGAAATCGGTGGAATCAAAAAAGTTAAACAACGTCTAAAAGAACTAGGAGATAAAGTAACAAATCCAGTTAGATATG 500

501 AGATAGAATTAAATTACTATTCACCAAAGAGCAAAAAAGATACTTCAACACCTGCTGCTTTCGGTAAGACTTTAAATAAACTTATCGCAAATGGAAAATT 600

601 AAGCAAAGAAAACAAAAAATTCTTACTTGATTTAATGTTAAATAATAAAAGCGGAGATACTTTAATTAAAGACGGTGTTCCAAAAGACTATAAGGTTGCT 700

Reverse

701 GATAAAAGTGGTCAAGCAATAACATATGCTTCTAGAAATGATGTTGCTTTTGTTTATCCTAAGGGCCAATCTGAACCTATTGTTTAGTCATTTTTACGA 800

801 ATAAAGACAATAAAAGTGATAAGCCAAATGATAAGTTGATAAGTGAAACCGCCAAGAGTGTAATGAAGGAATTTTAAT 878

การดีไซน์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mecA* GenBank: KC243783.1

1 ATGAAAAAGATAAAAATTGTTCCACTTATTTTAATAGTTGTAGTTGTCGGGTTTGGTATATATTTTTATGCTTCAAAAGATAAAGAAATTAATAATACTA 100

101 TTGATGCAATTGAAGATAAAAATTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGAT 200

201 AAAAATATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAA 300

301 ATTAAAACAAACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTC 400

401 CAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAATTTTAGACCGAAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAAC 500

501 AGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAA 600

601 ATGGATCAAAATTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTCGCAAAAAAATTTCATCTTA 700

701 CAACTAATGAAACAAAAAGTCGTAACTATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACTCTGAAGAATTAAAACAAAA 800

801 AGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTCACA 900

Reverse

901 ATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAAGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAA 1,000

1,001 AGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAGCACACCTTCATATGA 1,100

1,101 CGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACAACTTCA 1,200

1,201 CCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTGGGTTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAA 1,300

1,301 AAGATAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTT 1,400

1,401 TGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAAT 1,500

Forward

1,501 GCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAA 1,600

1,601 TCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAAAGACACGAAAAACAAAGTTTGGAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAA 1,700

1,701 TATCAATCTATTAACTGATGGTATGCAACAAGTCGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAATCCGGTACT 1,800

1,801 GCAGAACTCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTGGGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTA 1,900

1,901 AAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAATCTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGA 2,000

2,001 TGAATAACAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAAGTGCTGTTACTTCTCCCTTAAATACAATTTC 2,100

2,101 TTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACA 2,129

2. LAMP primers

2.1 LSDV

การดีไซน์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน GPCR GenBank: AF325528

F3 F2 F1c B1c B2 B3

1	TTATCCAATGCTAATACTACCAGCACTACTGGTGCTACGCAATCGTAAAAGCTTTTTAGTAAATTCTCTACTACAAAACGCATAAATTAGTGGATTGATA	100
101	AAACAATGACATAGAGACACAATTTCAGCTACATGAACTGCAAGGTTGACAAATCTTAACGCCATACATCCACTAAAAACATTTAACAAATACAACGATG	200
201	AAACAAATACAGTTACACTAAATGGGAGTAAAAACAATACTGAACAGATAACAATCAAAAACACCATCTTTATGGCTTTCTTATTCTTTGTTTGTGATGT	300
301	CAGGATATGTTTTTGCTTAATTTGACACTGTCTGATTTAATTTTCGTGTTGGTGTTTCCTTTTAATTTATACGATAGTATCGCTAAACAATGGAGTTTAG	400
401	ATTTTTGCATTATCGTTATAAAATACATGACAATACGTTATTCCATATACTTTTTTTGTTTCATAAAATAACATTATTGGAAAGGATTCAATAGTTGAGA	500
501	CAATCCAAACCACCATACTAAGTACAATTCCATATCGTTTTGTCCTTATCGGCATTGATTTTACTGGGTGAACTACAGCTAGGTATCTATCAATACTCAT	600
601	CAATGTTATAAATGACATGCTATTGTAAAAACCAACAAAGTAAAACATAGCTTTAAATTTACACAAACAATCTCCTAAACTCCATTGTTTAGCGATACTA	700
701	TCGTATAAATTAAAAGGAAACACCAACACGAAAATTAAATCAGACAGTGTCAAATTAAGCAAAAACATATCCTGTATTGTTTTTATCTTATATTTACGAA	800
801	GAACAGTTAACACAATTATATTTCCAAATAATCCAAGAAAGAATATAGTCGAATATAAAGTAATCAGTCCAAAACTTGTAGTATCCACACCATCATCACA	900
901	ATGTGGGATATCGACTATGCTCACTTCATAATCATCATAATCATCGCTATAATAAGTTGTATTATATGCGGTTGTATAATTAGATATCGTTGTTGTATTT	1,000
1,001	TCATAAGTTGAAGGCGTTGTAACATTATTTTGATTTGTTGAAATTGTACTGAGAATTGTACTAATAATTGTAGTAGCTATAGTGGTAATATTACTGCTAC	1,100
1,101	TATTATACATGGTTGCGCTACTAACTGTACTAAGAGTATAATTCAT	1,146

2.2 MRSA

การดีไซน์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mecA* GenBank: KC243783.1

1 ATGAAAAAGATAAAAATTGTTCCACTTATTTTAATAGTTGTAGTTGTCGGGTTTGGTATATATTTTTATGCTTCAAAAGATAAAGAAATTAATAATACTA 100

101 TTGATGCAATTGAAGATAAAAATTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGAT 200

201 AAAAATATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAA 300

301 ATTAAAACAAACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTC 400

401 CAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAATTTTAGACCGAAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAAC 500

501 AGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAA 600

601 ATGGATCAAAATTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTCGCAAAAAAATTTCATCTTA 700
701 CAACTAATGAAACAAAAAGTCGTAACTATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACTCTGAAGAATTAAAACAAAA 800
801 AGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTCACA 900
901 ATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAAGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAA 1,000

1,001 AGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAGCACACCTTCATATGA 1,100

1,101 CGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACAACTTCA 1,200

1,201 CCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTGGGTTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAA 1,300

1,301 AAGATAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTT 1,400

1,401 TGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAAT 1,500

1,501 GCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAA 1,600

1,601 TCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAAAGACACGAAAAACAAAGTTTGGAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAA 1,700

1,701 TATCAATCTATTAACTGATGGTATGCAACAAGTCGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAATCCGGTACT 1,800

1,801 GCAGAACTCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTGGGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTA 1,900

1,901 AAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAATCTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGA 2,000

2,001 TGAATAACAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAAGTGCTGTTACTTCTCCCTTAAATACAATTTC 2,100

2,101 TTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACA 2,129

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ธีรเจต เลาหเสถียร
วัน เดือน ปี เกิด	16 กรกฎาคม 2540
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร อมรรัตนโกสินทร์ มหินทรายุธยา มหาดิลกภพ นพรัตน์ ราชธานีบุรีรมย์ อุดมราชนิเวศมหาสถาน อมรพิมานอวตารสถิต สักกทัตติยะ วิษณุกรรมประสิทธิ์
วุฒิการศึกษา	วท.บ. (สัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร) เกียรตินิยมอันดับ 2 มหาวิทยาลัยศิลปากร (2562)
ที่อยู่ปัจจุบัน	999/95 หมู่บ้านเศรษฐกิจ31-11 แขวงบางแคเหนือ เขตบางแค กทม. 10160
ผลงานตีพิมพ์	-ธีรเจต เลาหเสถียร, ภวัต เสรีตระกูล, กนกอร นนท์ศิริ และ ศิริชัย เอียดมุสิก. (2565). ความชุกของเชื้อ Staphylococcus aureus และ Methicillin-resistance Staphylococcus aureus (MRSA) ที่แยกได้จากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบในจังหวัดเพชรบุรี. แก่นเกษตร 50(2): 409-418. -Laohasatian, T., Eardmusic, S. and Seritrakul, P. (2022). Development of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) for rapid detection of Methicillin-resistance Staphylococcus aureus (MRSA) from dairy cattle. International Journal of Agricultural Technology 18(2):651-666.
รางวัลที่ได้รับ	-Certification for Oral Presenter at the ninth International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (9th ICIST 2021) -Certification for Best Oral Presentation at the ninth International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (9th ICIST 2021)