การตรวจวินิจฉัยโรค PRRSV จากตัวอย่าง Oral Fluid ของสุกรด้วยวิธี RT-PCR

Detection of PRRSV Infection in Swine Oral Fluid by RT-PCR

ธีรพร จิรธรรมคุณ*, เกรียงศักดิ์ เหล่าสกุล, ยุภาวรรณ ทาระศรี, อัษฎางค์ ธีระศรี, วิภาวี ธรรมวิทยากุล, สินทวี คู่เจริญถาวร และ ฉัตถพล มุงคุณดา

Theeraporn Jiratammakun*, Kriangsak Laosakul, Yupawan Tharasri, Atsadang Theerasri, Wipawee Thumvittayakul, Sintawee Khuchareontawon and Chatthapon Mungkundar

หน่วยงานอณูชีววิทยา, สำนักเทคนิคและวิชาการสัตว์บก, บริษัท ซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)

Department of Molecular Biology, Animal Health and Technical Service Office, CPF (Thailand) PLC

**Corresponding author: theeraporn.jir@cpf.co.th*

บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างสารคัดหลั่งในเยื่อบุช่องปาก (oral fluid) ออกมาอย่างต่อเนื่องทั้งในคนและสัตว์ เช่น การตรวจหาเชื้อ HIV หรือ AIV สำนักเทคนิคและวิชาการสัตว์บกจึงได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ PRRSV จาก oral fluid ของสุกร แต่เนื่องจากปริมาณเชื้อไวรัสใน oral fluid มีปริมาณไม่มากและยังมีสารยับยั้งอื่นๆ สำนักเทคนิคฯ จึงได้พัฒนาวิธีสกัดและตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ PRRSV โดยการบ่มด้วย proteinase K ก่อนนำไปสกัดสารพันธุกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ PRRSV จาก oral fluid ของสุกร และทำการเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ PRRSV พบว่าวันที่ 7 หลังจากให้วัคซีนสามารถตรวจพบเชื้อ PRRSV ในตัวอย่าง oral fluid และซีรั่มอย่างไม่มีความแตกต่างกัน

ABSTRACT

Currently, the detection of virus infection from oral fluid samples is developed in many laboratories, such HIV and AIV. Animal Health and Technical Service Office (AHTSO) laboratory developed the methods to detect PRRSV from swine oral fluid. The oral fluid has a few of viruses and a large amount of inhibitors. Therefore, our laboratory uses the proteinase K to incubate before extraction which can be analyzed the PRRSV infection in the swine oral fluid efficiency. On the 7th day after PRRSV vaccination, the results of detection between oral fluid and serum are not significant difference in every barn.

คำสำคัญ: PRRSV, น้ำลาย, proteinase K

Keywords: PRRSV, oral fluid, proteinase K

บทนำ

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีผลกระทบต่อฟาร์มสุกรเป็นอย่างมาก ปัจจุบันมีการตรวจหาเชื้อ PRRSV จากซีรั่มของสุกร โดยทำการเจาะเลือดจากบริเวณคอ (jugular vein) ซึ่งต้องใช้แรงงานและเวลามาก และทำให้เกิดสภาวะเครียดต่อสุกร ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส PRRS จากสารคัดหลั่ง เช่น oral fluid ซึ่งประกอบด้วย oral mucosal transudate และน้ำลาย เนื่องจาก oral fluid มีวิธีการเก็บที่ง่าย ใช้แรงงานน้อย และสามารถลดสภาวะเครียดในสุกร ทำให้ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับ oral fluid จำนวนมาก จากการศึกษาพบว่าสิ่งมีชีวิตที่มีการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียสามารถตรวจพบเชื้อ (pathogen) และแอนติบอดี (antibody) ใน oral fluid ได้ เช่น เชื้อ PRRSV, classical swine fever virus (CSFV), porcine circovirus type 2 (PCV2) และ swine fever virus (SIV) เป็นต้น (Kittawornrat et al., 2010) แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานวิธีการตรวจหาเชื้อ PRRSV จากตัวอย่าง oral fluid ในประเทศไทย สำนักเทคนิคฯ จึงได้พัฒนาวิธีการสกัดที่เหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อ PRRSV จากตัวอย่าง oral fluid เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความไวในการทดสอบ และทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อ PRRSV จากตัวอย่าง oral fluid กับตัวอย่างซีรั่ม เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและความไวในการทดสอบ และนำมาเป็นต้นแบบในการพัฒนาการเก็บตัวอย่างและตรวจหาเชื้อชนิดอื่นๆ จากตัวอย่าง oral fluid ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การคัดเลือกวิธีการสกัดสารพันธุกรรมจาก oral fluid ที่เหมาะสม**

1.1 การสกัดสารพันธุกรรม

เก็บตัวอย่าง oral fluid ที่ผ่านการตรวจหาเชื้อ PRRSV โดยวิธี RT-PCR จากสุกรที่ปราศจากการติดเชื้อ ผสมกับวัคซีนเชื้อเป็น PRRSV สายพันธุ์ EU (Amervac) และ สายพันธุ์ US (Ingelvac) ให้มีความเข้มข้นของเชื้อแต่ละสายพันธุ์เท่ากับ 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10^1 $TCID_{50}$/ml ตามลำดับ จากนั้นทำการสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธีมาตรฐาน (TRIzol) วิธีของชุดสกัด magnetic beads (จำนวน 6 ชุดการทดสอบ) วิธีของชุดสกัด spin column (Viral Nucleic Acid Extraction Kit II, Geneaid) และวิธีการประยุกต์โดยใช้ proteinase K ความเข้มข้น 20 mg/ml ปริมาตร 10 µl ทำปฏิกิริยาร่วมกับตัวอย่าง oral fluid เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธีของชุดสกัด spin column

1.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี RT-PCR

สารพันธุกรรมจะถูกนำมาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ได้แก่ 1010PLS (5'-ATGGCCAGCCAGTCAATCA-3') ร่วมกับ 1011PLR (5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTG-3') ซึ่งจะได้แถบ PCR product ของสายพันธุ์ EU และ US ที่มีขนาดประมาณ 393 และ 433 คู่เบส ตามลำดับ และ NSP2F (5'-AAAGACCAGATGGAGGAGGA-3') ร่วมกับ NSP2R (5'-GAGCTGAGTATTTTGGGCGTG-3') ได้แถบ PCR product ของสายพันธุ์ US และ US-CN ที่มีขนาดประมาณ 757 และ 667 คู่เบส ตามลำดับ

2. **การเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ PRRSV ในตัวอย่างซีรั่มและ oral fluid โดยวิธี RT-PCR**

นำสุกรที่ปราศจากเชื้อ PRRSV เลี้ยงในห้องทดลองจำนวน 2 ห้อง แต่ละห้องแบ่งสุกรออกเป็นเล้าละ 15 ตัว จำนวน 9 เล้า โดยเล้าที่ 1-3 ให้วัคซีนเชื้อเป็น PRRSV สายพันธุ์ US เล้าที่ 4-6 เป็นเล้าควบคุม และเล้าที่ 7-9 ให้วัคซีนเชื้อเป็น PRRSV สายพันธุ์ EU และทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปสกัดสารพันธุกรรมและเพิ่มจำนวนโดยวิธี RT-PCR ดังต่อไปนี้

2.1 ตัวอย่างซีรั่มสุกร

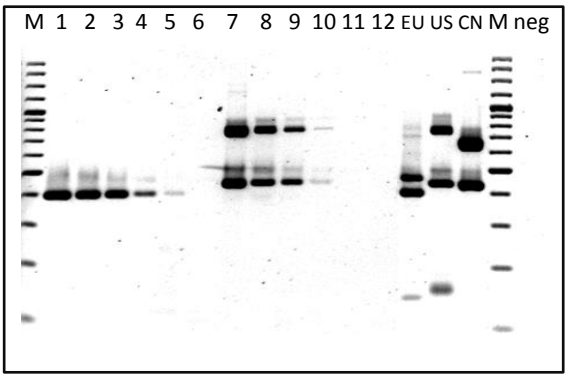
ทำการเจาะเลือดบริเวณคอสุกร ปริมาตร 8 ml ก่อนทำการทดลอง และสุ่มเก็บตัวอย่างซีรั่มสุกร 10 ตัวต่อเล้า ในวันที่ 0, 2, 5, 7, 14 และ 21 ภายหลังจากที่สุกรได้รับวัคซีน เพื่อนำมาสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ PRRSV โดยใช้วิธีของชุดสกัด spin column

2.2 ตัวอย่าง oral fluid สุกร

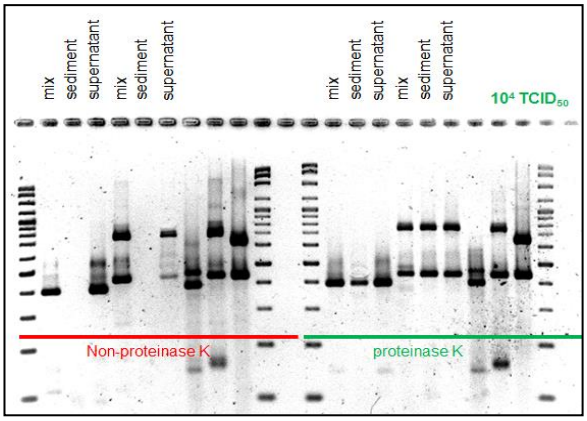
ให้สุกรกัดเชือกที่ผูกอยู่ภายในเล้าเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการรีด oral fluid เก็บในหลอดทดลองปริมาตร 13 ml และนำมาปั่นที่ 8,000g เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อแยกส่วนตะกอนและน้ำออกจากกันก่อนทำการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ PRRSV โดยวิธีการประยุกต์โดยใช้ proteinase K ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

เนื่องจาก oral fluid มีสารประกอบและเอนไซม์ต่างๆ เป็นจำนวนมาก ผู้ทดลองจึงทำการคัดเลือกวิธีการสกัดสารพันธุกรรมให้มีความเหมาะสมกับตัวอย่าง oral fluid ซึ่งผลการทดลองเปรียบเทียบวิธีสกัดสารพันธุกรรมแบบต่างๆ พบว่าวิธีสกัดมาตรฐาน (TRIzol) และวิธีของชุดสกัด magnetic beads บางชนิด ไม่สามารถสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ PRRSV ในตัวอย่าง oral fluid ได้ และวิธีการสกัดสารพันธุกรรมแบบ spin column สามารถสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ EU และ US ได้ดีที่สุด โดยความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของเชื้อ PRRSV ใน oral fluid ที่สามารถสกัดได้ประมาณ 10^1 และ 10^2 $TCID_{50}$/ml ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 เมื่อทำการประยุกต์วิธีการสกัดสารพันธุกรรมโดยบ่ม proteinase K กับตัวอย่าง oral fluid ก่อนทำการสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธี spin column จะช่วยเพิ่มความสามารถในการสกัดสารพันธุกรรมจากตะกอนของน้ำลายได้ ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1 แสดงผลการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ PRRSV จาก oral fluid ด้วยชุดสกัดแบบ spin column (lane M; 100 bp DNA ladder plus marker, lane 1-5 และ lane 7-11; เชื้อ PRRSV สายพันธุ์ EU และ US ใน oral fluid ที่ความเข้มข้นของเชื้อไวรัสเท่ากับ 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10^1 $TCID_{50}$/ml ตามลำดับ, lane 6 และ 12; ตัวอย่าง oral fluid มาตรฐานที่ปราศจากเชื้อ PRRSV, lane EU; PRRSV EU strain RNA positive control, lane US; PRRSV US strain RNA positive control, lane CN; PRRSV US-CN strain RNA positive control และ lane neg; negative control)



รูปที่ 2 แสดงผลเปรียบเทียบการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ PRRSV จากน้ำลายด้วยชุดสกัดแบบ spin column แบบปกติและ แบบบ่มด้วย proteinase K (lane mix; ตัวอย่าง oral fluid ที่ไม่ได้ปั่นตกตะกอน, lane sediment; ตัวอย่างตะกอน oral fluid และ lane supernatant; ตัวอย่างน้ำใสส่วนบนของ oral fluid หลังปั่นตกตะกอน)

ผลการเปรียบเทียบผลการตรวจสอบเชื้อ PRRSV ในตัวอย่างซีรั่มและ oral fluid จากการทดลอง พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ PRRSV สายพันธุ์ EU และ US ได้ตั้งแต่วันที่ 5 และสามารถตรวจพบครบทุกเล้าวันที่ 7 หลังให้วัคซีน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการเปรียบเปรียบเทียบผลการตรวจสอบเชื้อ PRRSV ในตัวอย่างซีรั่มและ oral fluid

Strain	US												EU											
House	7/1						7/2						7/1						7/2					
Barn	1		2		3		1		2		3		7		8		9		7		8		9	
Sample	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O
Day 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Day 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Day 14	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Day 21	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-

S = serum, O = oral fluid

สรุปผลการทดลอง

สำนักเทคนิคและวิชาการสัตว์บกสามารถพัฒนาวิธีการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ PRRSV จากตัวอย่าง oral fluid โดยการประยุกต์ใช้ proteinase K ร่วมกับชุดสกัดแบบ spin column ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารพันธุกรรมได้ดียิ่งขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ PRRSV จากตัวอย่าง oral fluid เพื่อใช้ทดแทนการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างซีรั่ม พบว่าจะให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 7 หลังให้วัคซีน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. อภิสิทธิ์ กิจถาวรรัตน์ และ Prof. Dr. Jeffrey Zimmerman จาก Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University

เอกสารอ้างอิง

Kittawornrat, A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, Patnayak D, Schwartz T, Whitney D, Olsen C, Schwartz K, Zimmerman J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) in serum and oral fluid samples from individual boars: Will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance?. Virus Research 2010;154:170-176.