

การพัฒนาวิธี Loop-mediated Isothermal Amplification ในการตรวจหาเชื้อ
Ichthyophthirius multifiliis อย่างรวดเร็ว

Development of Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of
Ichthyophthirius multifiliis

ปัญญา โปติบุตร^{1*} ทองกร มีแย้ม² สรุดา ติวนันทกร² และ สุรัช พิกุลแก้ว³

Panyisa Potibut^{1*} Tongkorn Meeyam² Saruda Tiwananthagorn² and Surachai Pikulkaew³

^{1*} นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาสัตวแพทยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50100

² ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50100

³ ภาควิชาคลินิกสัตว์บก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50100

^{1*} Graduate Student in Master of Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University,
Chiang Mai, Thailand 50100

² Department of Veterinary Biosciences and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50100

³ Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50100

*Corresponding author, Email: mamepoko_beau@hotmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อพัฒนาเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยใช้หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้อุณหภูมิเดียว เพื่อตรวจหาเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* (*I. multifiliis*) สาเหตุของโรคจุดขาวในปลาน้ำจืด โดยทำการออกแบบ 4 ชุดไพรเมอร์ของ LAMP ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วน 18S ribosomal RNA ของเชื้อ *I. multifiliis* ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาคือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อต่ำที่สุดที่สามารถพบปฏิกิริยาได้คือ 5 พิโคกรัม สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของเทคนิค LAMP ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสของ 1.5 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลที่เชื่อมด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์ นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้เพียงเครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลองก็สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *I. multifiliis* ได้ สรุปได้ว่า เทคนิค LAMP สามารถตรวจหาเชื้อ *I. multifiliis* ได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคในภาคสนามได้

คำสำคัญ: Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP, ปลาน้ำจืด, *Ichthyophthirius multifiliis*

Abstract

The objective of this study was to develop Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay, a molecular technique which amplify nucleic acid under isothermal condition, to detect *Ichthyophthirius multifiliis* (*I. multifiliis*), causative agent of white spot disease in freshwater fish. A set of four specific LAMP primers was designed based on the nucleotide sequence of the 18S region of ribosomal RNA of *I. multifiliis*. The results showed that the optimal condition of reaction was incubation at 65 °C for 60 minutes and the lowest LAMP product was found at 5 pg of *I. multifiliis* DNA. Detection of LAMP products were electrophoresed using 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide and observed under UV illumination. In addition, heating block can be used in LAMP technique to detect *I. multifiliis* DNA. In conclusion, LAMP technique can detect *I. multifiliis* that is rapid, specific and can develop to use in the field.

Keywords: Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP, freshwater fish, *Ichthyophthirius multifiliis*

1. บทนำ

Ichthyophthirius multifiliis (*I. multifiliis*) เป็นโปรโตซัวที่ใช้ชีวิตในการเคลื่อนที่ ก่อให้เกิดโรคจุดขาวในปลาน้ำจืด (Freshwater white spot disease) เกือบทุกชนิด ก่อโรครุนแรงอาจพบอัตราการตายได้ถึงร้อยเปอร์เซ็นต์ (Dickerson, 2006) วงจรชีวิตของเชื้อ *I. multifiliis* ประกอบด้วย ระยะก่อโรคเรียกว่า theront ซึ่งว่ายอิสระในน้ำ เคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่ผิวหนังและ/หรือเหงือกของปลา ทำให้เชื้อบุผิวหนังถูกทำลาย และนำไปสู่การติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนอื่นๆ ตามมา เช่น *Aeromonas hydrophila* (Xu et al., 2012(a)) และ *Edwardsiella ictaluri* (Xu et al., 2012(b)) จากนั้นเชื้อจะพัฒนาไปเป็นระยะกินอาหารเรียกว่า trophont มีลักษณะเป็นจุดสีขาวบนตัวปลา สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า จากนั้นมีการสร้างถุงซีสต์กลายเป็นระยะแบ่งตัวเรียกว่า tomont โดยภายในถุงซีสต์มีการแบ่งตัวแบบ binary fission จนได้ตัวอ่อนจำนวนมากเรียกว่า tomite ซึ่งเมื่อพัฒนาเต็มที่จะเจริญเป็น theront และก่อโรคต่อไป (Lom and Dykova, 1992; Matthews, 2005)

สำหรับการตรวจวินิจฉัยขั้นพื้นฐานของเชื้อ *I. multifiliis* คือการตรวจเยื่อเมือกบริเวณผิวหนังหรือเหงือกของปลาที่พบลักษณะจุดขาว นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จะพบเชื้อระยะ trophont มีลักษณะกลม มีชีวิตโดยรอบ และพบเมโครนิวเคลียสเป็นรูปเกือกม้า (horse-shoe shape) นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาได้อีกด้วย (Noga, 2010) ซึ่งการพบเชื้อระยะนี้แสดงว่าปลามีการดำเนินของโรคเป็นระยะเวลาพอสมควรแล้ว ทำให้ประสิทธิภาพของการรักษาไม่ได้ผลเท่าที่ควร ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคตั้งแต่ระยะเริ่มต้นอาจช่วยลดปัญหา และความรุนแรงของโรคได้ การพัฒนาเทคนิคเพื่อช่วยในการตรวจวินิจฉัยโรคในกรณีที่มีปริมาณของเชื้อที่น้อย ทำให้สามารถทราบการเกิดโรคก่อนพบอาการทางคลินิกจึงมีความจำเป็น จากรายงานการศึกษาพบว่า ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยา ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะสูง มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *I. multifiliis* โดยใช้เทคนิค real-time PCR ร่วมกับ SYBR GreenTM ในการตรวจหาเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ theront (Jousson et al., 2005)

อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายสูง และค่อนข้างยุ่งยาก เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ถูกพัฒนา และนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้เพียงอุณหภูมิเดียว โดยทั่วไปคือ 65 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติเป็น strand displacement (แยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว) ซึ่งมีข้อดีคือ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง thermocycler ที่มีราคาแพง สามารถตรวจโรคในภาคสนามได้ดี ใช้เวลาในการปฏิบัติการสั้น โดยปฏิกิริยาทั้งหมดเกิดจากการทำงานร่วมกันของไพรเมอร์ 4 ตัว คือ Forward Inner Primer (FIP), Forward Outer Primer (F3), Backward Inner Primer (BIP), Backward Outer Primer (B3) ซึ่งตรวจสอบยีนที่มีความจำเพาะ 6 ตำแหน่ง จึงมีความจำเพาะสูง โดยกลไกการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเทคนิค LAMP ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ Starting structure producing step และ Cycle amplification step (Notomi et al., 2000) ซึ่งจากรายงานการศึกษาพบว่าเทคนิค LAMP ให้ผลการตรวจที่มีความไวกว่าเทคนิค PCR และ nested PCR (Kono et al., 2004; Nimitphak et al., 2010) อีกด้วย

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาเทคนิค LAMP ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ความแม่นยำสูงแต่มีค่าใช้จ่ายน้อย เพื่อมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *I. multifiliis* ที่ก่อโรคสำคัญในปลาน้ำจืด

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification ในการตรวจหาเชื้อ *I. multifiliis* ที่ก่อโรคจุดขาวในปลาน้ำจืด

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 สัตว์ทดลอง

คัดเลือกปลาป่วยจากร้านขายปลาสวยงามในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ที่แสดงอาการทางคลินิก โดยพบจุดขาวตามลำตัว และครีบ มีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บเชื้อ *I. multifiliis* จากตัวปลา โดยการใช้สัตว์ทดลองได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการจริยบรรณสัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2 การเก็บเชื้อจุดขาว

เก็บโปรโตซัว *I. multifiliis* ในระยะ trophont จำนวน 100 trophont (ทำการศึกษา 3 replication) จากปลาโดยวิธีการบุดตรวจเยื่อเมือก และทำการขึ้นย่นเชื้อ โดยนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 40-100 เท่า จะพบเชื้อมีลักษณะกลม มีขี้เลื่อย และเคลื่อนที่รอบตัวตลอดเวลา และพบแมโครนิวเคลียสรูปเกือกม้า ซึ่งเป็นการตรวจวินิจฉัยเพื่อยืนยันเชื้อก่อโรคจุดขาวในทางคลินิก (Noga, 2010) จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อใส่หลอดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดสารพันธุกรรม

3.3 สกัดสารพันธุกรรม

ทำการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดสกัด Qiamp DNA minikit (Fermentus[®]) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต และทำการเก็บตัวอย่าง Genomic DNA ของเชื้อระยะ trophont ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเครื่องตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร

3.4 การออกแบบไพรเมอร์

ทำการเลือกลำดับเบสจาก 18S ของ ribosomal RNA (rRNA) (Jousson et al., 2005) ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อเชื้อ *I. multifiliis* โดยใช้ฐานข้อมูลจากเว็บไซต์ PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้โปรแกรม Primer Explorer program version3 (<http://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>) รวมทั้งการศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.5 การพัฒนาเทคนิค LAMP

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ชุด ICM242 (<http://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>) ตารางที่ 1) ทำการเลือกลำดับเบสจาก 18S ของ ribosomal RNA (rRNA) (Jousson et al., 2005) โดยสารเคมีในการทำปฏิกิริยา LAMP ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10mM MgSO₄ (ทดสอบความเข้มข้นหลากหลายของสารตั้งแต่ 2-10 mM), 1M Betaine (ทดสอบความเข้มข้นหลากหลายของสารตั้งแต่ 0.2-10 M), 0.6mM dNTPs (ทดสอบความเข้มข้นหลากหลายของสารตั้งแต่ 0.2-0.6 mM), 1.6μM Inner primer (FIP, BIP) (ทดสอบความเข้มข้นหลากหลายของสารตั้งแต่ 0.8-0.6 μM), 0.2μM Outer primer (F3, B3), 1X thermopol buffer (20mM Tris-HCl (pH 8.8), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100), 8U Bst DNA polymerase (Lucigen®) และ Genomic DNA ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (ปรับอุณหภูมิตั้งแต่ 56-65

องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 60 นาที (ปรับเวลาตั้งแต่ 10-60 นาที) และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ด้วยเครื่อง thermocycle (LongGene®) จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ LAMP ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.6 การทดสอบปริมาณเชื้อต่ำสุดที่เทคนิค LAMP สามารถตรวจพบได้

เตรียม Genomic DNA ที่ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นทำการเจือจาง 10 เท่า จนได้ปริมาณดีเอ็นเอสุดท้ายเท่ากับ 0.5 อัดโดกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา LAMP

3.7 การตรวจสอบความจำเพาะผลิตภัณฑ์ของ LAMP โดยการใช้ชุดเอนไซม์จำเพาะ

ตรวจสอบความจำเพาะของผลิตภัณฑ์ LAMP ที่ได้ต่อเชื้อ *I. multifiliis* ด้วย restriction enzyme *AluI* (New England BioLabs® Inc.) ตามคำแนะนำของบริษัท ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หากผลิตภัณฑ์ LAMP ที่ได้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *I. multifiliis* จะพบแถบดีเอ็นเอประมาณ 95 คู่เบส ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *AluI* เท่านั้น

3.8 การศึกษาปฏิกิริยา LAMP ด้วยเครื่องให้ความร้อน แก่หลอดทดลอง (Heating block) ทำการศึกษาปฏิกิริยา LAMP ด้วยเครื่อง Heating block (Major Science®) โดยสารเคมีในการทำปฏิกิริยา LAMP ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10mM MgSO₄, 1M Betaine, 0.6mM dNTPs, 1.6μM Inner primer (FIP, BIP), 0.2μM Outer primer (F3, B3), 1X thermopol buffer (20mM Tris-HCl (pH 8.8), 10mM KCl, 10mM

(NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100), 8U Bst DNA polymerase (Lucigen[®]) และ Genomic DNA ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ LAMP ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ ICM242 ใช้ในการทำปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจสอบเชื้อ *I. multifiliis*

Primer	Sequence (5' → 3')
F3	AACAGCACACCAGAAGTG
B3	GGTTAAGGTCTCGTTCGTAA
FIP (F1c-F2)	AATCCCTTCTCTGTCTTGCGCTTTT ACCTGCGGCTTAATTGAC
BIP (B1c-B2)	TGAGAGCTCTTTCTGATTCTTGG TTTGAATTAACCAGACAAATCACT CC

3.9 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ LAMP และเอนไซม์จำเพาะด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

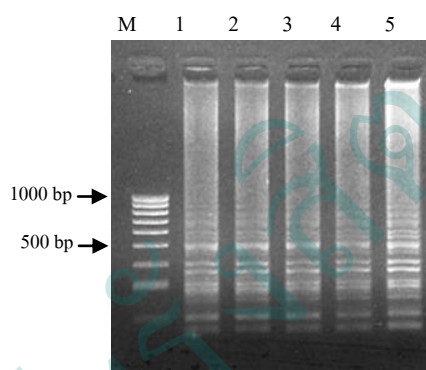
นำผลิตภัณฑ์ของ LAMP และเอนไซม์จำเพาะจำนวน 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye จากนั้นวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลเชื่อมด้วยสารเฮดียมโบรไมด์ (150 โวลต์, 20 นาที) ภายใต้ UV illumination โดยผลิตภัณฑ์ของ LAMP จะพบลักษณะคล้ายขั้นบันไดเทียบกับ 100 bp ladder

4. ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

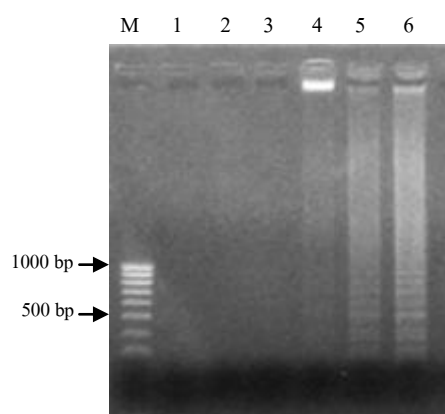
4.1 ผลการพัฒนาเทคนิค LAMP

ผลที่ได้จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่ 56, 58, 60, 63 และ 65 องศาเซลเซียส สามารถทำปฏิกิริยาได้ทุกอุณหภูมิ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 65 องศาเซลเซียส (รูปที่ 1) สำหรับเวลาที่เริ่มเกิดปฏิกิริยา

ของเทคนิค LAMP พบว่า เริ่มเกิดปฏิกิริยาดังแต่นาทีที่ 40 โดยเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยาคือ 60 นาที (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *I. multifiliis* (50 นาโนกรัม) โดยตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส : lane M, DNA marker; lane 1, 56 °C; lane 2, 58 °C; lane 3, 60 °C; lane 4, 63 °C; lane 5, 65 °C



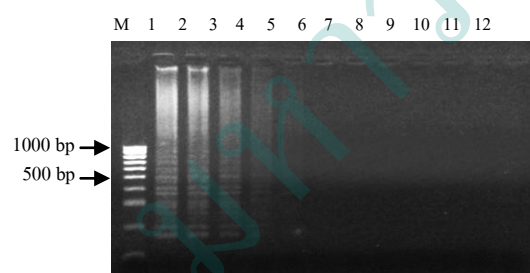
รูปที่ 2 ผลการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *I. multifiliis* (50 นาโนกรัม) โดยตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส : lane M, DNA marker; lane 1, 10 นาที; lane 2, 20 นาที; lane 3, 30 นาที; lane 4, 40 นาที; lane 5, 50 นาที; lane 6, 60 นาที

4.2 ผลการทดสอบปริมาณเชื้อต่ำสุดที่เทคนิค LAMP สามารถตรวจพบได้

ในสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ในการตรวจหาเชื้อ *I. multifiliis* คือทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ตั้งแต่ 5 พิโคกรัม ซึ่งให้ผลไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 3 ซ้ำ (รูปที่ 3)

4.3 ผลการตรวจสอบโดยใช้ตัดเอนไซม์จำเพาะ

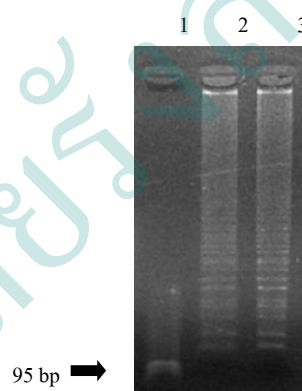
การตรวจสอบความจำเพาะของการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ *I. multifiliis* ของเทคนิค LAMP โดยการใช้ *AhaI* restriction enzyme ในการย่อยผลิตภัณฑ์ของเทคนิค LAMP พบว่า สามารถย่อยผลิตภัณฑ์โดยเห็นแถบดีเอ็นเอที่ 95 คู่เบส ในขณะเดียวกัน ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ย่อยด้วย *ApaI* restriction enzyme และ *BanI* restriction enzyme ซึ่งไม่มีตำแหน่งตัดจำเพาะกับเชื้อ *I. multifiliis* ยังคงพบเป็นแถบชั้นบันได (รูปที่ 4)



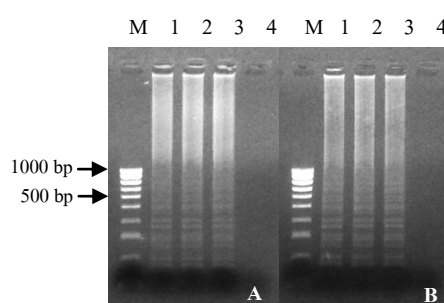
รูปที่ 3 ผลการทดสอบปริมาณเชื้อ *I. multifiliis* ต่ำสุดที่เทคนิค LAMP สามารถตรวจพบได้ โดยตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส: lane M, DNA marker; lane 1, 50 ng/μl; lane 2, 5 ng/μl; lane 3, 0.5 ng/μl; lane 4, 50 pg/μl; lane 5, 5 pg/μl; lane 6, 0.5 pg/μl; lane 7, 50 fg/μl; lane 8, 5 fg/μl; lane 9, 0.5 fg/μl; lane 10, 50 ag/μl; lane 11, 5 ag/μl; lane 12, Negative control

4.4 ผลการศึกษาปฏิกิริยา LAMP ด้วยเครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง

ผลที่ได้จากการทดลองโดยการทำปฏิกิริยาเทคนิค LAMP โดยใช้เครื่อง Heating block พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ ซึ่งให้ผลบวกเช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยาดังเครื่อง Thermocycler ในการทำการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ผลการทดสอบเทคนิค LAMP โดยวิธีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส: lane 1, *AhaI*; lane 2, *ApaI*; lane 3, *BanI*



รูปที่ 5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *I. multifiliis* (50 นาโนกรัม) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้เครื่อง Thermocycler (A) และเครื่อง Heating block (B) โดยตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส: lane M, DNA marker; lane 1, เชื้อ *I. multifiliis* ตัวอย่างที่ 1; lane 2, เชื้อ *I. multifiliis* ตัวอย่างที่ 2; lane 3, เชื้อ *I. multifiliis* ตัวอย่างที่ 3; lane 4, negative control

5. การอภิปรายผล

โรคจุดขาวในปลาน้ำจืดก่อความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างมาก โดยสาเหตุเกิดจากเชื้อโปรโตซัว *I. multifiliis* การดำเนินของโรคในระยะหนึ่ง ส่งผลให้ผลการรักษาไม่ดีเท่าที่ควร การตรวจวินิจฉัยโรคในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อจึงมีความสำคัญมาก จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เทคนิค LAMP สามารถตรวจหาเชื้อ *I. multifiliis* ได้

การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ถึง 4 ตัว ซึ่งจำเพาะกับ 6 ตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย (Notomi et al., 2000) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้คือไพรเมอร์ชุด ICM242 โดยวางตัวในส่วนของ 18S ของ ribosomal RNA (rRNA) (Jousson et al., 2005) ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อเชื้อ *I. multifiliis* โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบเชื้อพยาธิตัวกลม *Angiostrongylus cantonensis* ที่ก่อโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบ อีโอซิโนฟิลิก (Eosinophilic meningoencephalitis) ในคน (Chen et al., 2011) และเชื้อโปรโตซัว *Toxoplasma gondii* ที่ก่อโรคบิดในคน (Kong et al., 2012) ซึ่งใช้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ในการเกิดเช่นเดียวกัน นอกจากนี้พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ตั้งแต่เวลาที่ 40 โดยเห็นผลเป็น smear band และผลจะค่อยๆ เข้มขึ้นเป็นแถบขึ้นบันไดเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อที่น้อยที่สุดที่สามารถพบปฏิกิริยาได้คือ 5 พิโคกรัม อย่างไรก็ตามจากการศึกษาอื่นพบว่า การตรวจสอบเชื้อโปรโตซัว *Trypanosoma brucei rhodesiense* ซึ่งก่อให้เกิดโรคเหงาหลับในคน โดยใช้จำนวนเชื้อเพียง 1 พิโคกรัม ก็สามารถตรวจสอบเชื้อได้ (Njiru et al.,

2008) เมื่อทำการยืนยันผลการเกิดปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ซึ่งมีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ *I. multifiliis* พบว่า ให้ผลที่ 95 คู่เบส ซึ่งให้ผลแตกต่างจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApaI* และ *BanI* โดยเห็นผลเป็นลักษณะของแถบขึ้นบันได เนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApaI* และ *BanI* มีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ *Mycobacterium* spp. จึงไม่สามารถย่อยผลิตภัณฑ์ได้

นอกจากนี้ในการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ตั้งแต่อุณหภูมิที่ 56 – 65 องศาเซลเซียส จึงสามารถเลือกใช้เครื่อง Heating block ได้ เนื่องจากเป็นอุปกรณ์ที่มีความกว้างของอุณหภูมิค่อนข้างสูง (± 2 องศาเซลเซียส) โดยจากการศึกษาพบว่า ผลของการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบเชื้อ *I. multifiliis* โดยใช้เครื่อง Thermocycler เปรียบเทียบกับเครื่อง Heating block พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกัน โดยให้ผลบวกเป็นแถบขึ้นบันไดเหมือนกันทั้ง 3 ชั่วโมง ดังนั้นการประยุกต์ใช้เครื่อง Heating block จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค LAMP ซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายในการวินิจฉัยได้ เนื่องจากใช้อุปกรณ์ที่ราคาไม่สูงในการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของเทคนิค LAMP ยังสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น การดูความขุ่นของผลิตภัณฑ์ ซึ่งเกิดจากการตกตะกอนของสาร magnesium pyrophosphate และยังสามารถตรวจสอบโดยการย้อมสีผลิตภัณฑ์โดยใช้สารกลุ่ม intercalating dye เช่น SYBR Green I stain ซึ่งมีคุณสมบัติ high binding affinity กับดีเอ็นเอโดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเห็นเป็นสีเขียวสะท้อนแสง ด้วยตาเปล่า (Mori et al., 2001) นอกจากนี้การย้อมด้วยสาร Hydroxy naphthol blue (HNB) ก่อนการเกิดปฏิกิริยา เป็นอีกวิธี

หนึ่งที่สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งสาร HNB มีคุณสมบัติเป็น indicator สำหรับสารพวกแคลเซียม และเป็น colorimetric reagent สำหรับสารประกอบแอลคาไลน์ โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีฟ้า (Goto et al., 2009) ทั้งนี้ข้อจำกัดของเทคนิค LAMP คือเป็นเทคนิคที่ค่อนข้างไวต่อการปนเปื้อนจึงมักพบผลบวกปลอม (Savan et al., 2005) และการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อค่อนข้างยากเนื่องจากต้องใช้ไพรเมอร์ถึง 4 สาย ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการศึกษาในครั้งนี้มุ่งพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีความรวดเร็ว แม่นยำ สะดวก และค่าใช้จ่ายไม่สูง ดังนั้นเทคนิค LAMP จึงเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *I. multifiliis* ได้ แต่อย่างไรก็ตามในอนาคตควรมีการศึกษาในเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ theront และ ระยะ tomont ด้วย และควรมีการศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อโปรโตซัวชนิดอื่นที่พบบ่อยในการก่อโรคทางคลินิกในสัตว์น้ำ เช่น *Cryptocaryon irritans*, *Chilodonella* spp. และ *Tetrahymena* spp. เป็นต้น

6. บทสรุป

เทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อ *I. multifiliis* ที่ก่อโรคจุดขาวในปลาน้ำจืดได้อย่างรวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอของเชื่อน้อย และใช้อุปกรณ์ไม่ยุ่งยาก อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงความจำเพาะของเทคนิคนี้ โดยเปรียบเทียบกับเชื้อโปรโตซัวก่อโรคตัวอื่นที่พบบ่อยในปลาน้ำจืด และเชื้อ *I. multifiliis* จากปลาชนิดอื่น เพื่อเพิ่มความแม่นยำของเทคนิค และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกและการตรวจวินิจฉัยภาคสนามต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ทุนเงินรายได้คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี พ.ศ. 2554

8. เอกสารอ้างอิง

- Chen, R., Tong, Q., Zhang, Y., Lou, D., Kong, Q., Lv, S., Zhuo, M., Wen, L. & Lu, S. (2011). *Loop-mediated isothermal amplification: rapid detection of Angiostrongylus cantonensis infection in Pomacea canaliculata*. Parasites & Vectors. 204(4): 1-7.
- Dickerson, H.W. (2006). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora) In: Woo PTK, editor. Fish diseases and disorders, Protozoan and Metazoan Infections. Wallingford: CAB International. 181-227.
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A. & Hanak, K.I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl naphthol blue. BioTechnique. 46: 167-172.
- Jousson, O., Pretti, C., Di Bello, D. & Cognetti-Varriale, A.M. (2005). *Non-invasive detection and quantification of the parasitic ciliate Ichthyophthirius multifiliis by real-time PCR*. Diseases of Aquatic Organisms. 65: 251-255.
- Kong, Q.M., Lu, S.H., Tong, Q.B., Lou, D., Chen, R., Zheng, B., Kumagai, T., Wen, L.Y., Ohta, N. & Zhou, X.N. (2012). *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Early*

- detection of Toxoplasma gondii infection in mice.* Parasites & Vectors. 5(2): 1-7.
- Kono, T., Savan, R., Sakai, M. & Itami, T. (2004). *Detection of white spot syndrome virus in shimp by loop-mediated isothermal amplification.* Journal of Virological Methods. 115: 59-65.
- Lom, J. & Dyková, I. (1992). *Ciliates (Phylum Ciliophora Doflein).* In: Lom J, Dyková I (eds).(1991). *Protozoan parasites of fishes.* Developments in Aquaculture and Fisheries Science series, volume 26. Elsevier Science, The Netherlands. 237–288.
- Matthews, R.A. (2005). *Ichthyophthirius multifiliis fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts.* Advances in Parasitology. 59: 159-214.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. & Notomi, T. (2001). *Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation.* Biochemical and Biophysical Research Communications. 289, 150-154.
- Nimitphak, T., Meemetta, W., Arunrut, N., Senapin, S.n & Kiatpathomchai, W. (2010). *Rapid and sensitive detection of Penaeus monodon nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick.* Molecular and Cellular Probes. 24: 1-5.
- Njiru, Z.K., Mikosza, A.S., Matovu, E., Enyaru, J.C., Ouma, J.O., Kibona, S.N., Thompson, R.C. & Ndung'u, J.M. (2008). *African trypanosomiasis: Sensitive and rapid detection of the sub genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA.* Internayional Journal for Parasitology. 38: 589-599.
- Noga, E.J. (2010). *Fish Disease Diagnosis and treatment.* 2 nd ed. Singapore: A John Wiley and Sons, Inc.,Publication.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. (2000). *Loop-mediated isothermal amplification of DNA.* Nucleic Acids Research. 28, E63.
- Savan, R., Kono, T., Itami, T. & Sakai, M. (2005). *Loop-mediated isothermal amplification: an emerging technology for detection of fish and shellfish pathogen.* Journal of fish disease. 28: 573–581.
- Xu, D.H. Pridgeon, J.W. Klesius, P.H. & Shoemaker C.A. (2012(a)). *Parasitism by protozoan Ichthyophthirius multifiliis enhanced invasion of Aeromonas hydrophila in tissues of channel catfish.* Veterinary Parasitology. 184: 101–107.
- Xu, D.H., Shoemaker, C.A., Martins, M.L., Pridgeon, J.W. & Klesius, P.H. (2012(b)). *Enhanced susceptibility of channel catfish to the bacterium Edwardsiella ictaluri after parasitism by Ichthyophthirius multifiliis.* Veterinary Microbiology. 158: 216–219.