# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

**อุบัติการณ์ของวัณโรคในเป็ดในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย: การตรวจคัดแยกด้วยเทคนิค High-resolution melting real-tim PCR**


โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรศักดิ์ แก้วก่อง



สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน

เลขทะเบียน i 1039322

เลขเรียกหนังสือ ว SF 995 .6T8 ว4475 2562


เดือน กันยายน ปี พ.ศ. 2562

สัญญาเลขที่ R2558C034

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

# อุบัติการณ์ของวัณโรคในเป็ดในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย: การตรวจคัดแยกด้วยเทคนิค High-resolution melting real-tim PCR

โดย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรศักดิ์ แก้วก่อง
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดย
งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ 2558

# Executive summary

การตรวจพบการติดเชื้อในสิ่งส่งตรวจจากสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์เศรษฐกิจในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างเป็นปัญหาสำคัญและส่งผลต่อการมีชีวิตของสัตว์ คุณภาพของผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ส่งผลกระทบในวงกว้างต่อระบบเศรษฐกิจทั้งการปศุสัตว์และคุณภาพชีวิตของเกษตรกรผู้เลี้ยง การสำรวจข้อมูลโรคติดเชื้อต่างๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อปรสิต หรือเชื้อไวรัส ไม่ว่าจะเป็นข้อมูลชนิดของเชื้อ อุบัติการณ์ ระบาดวิทยา หรือข้อมูลพื้นฐานทางปศุสัตว์จึงมีความสำคัญในการศึกษาวิจัยเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว โดยความร่วมมือของผู้วิจัยทั้งทางชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล ทางจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ (ศวพ.) ภาคเหนือตอนล่าง จ.พิษณุโลก นำโดยผู้อำนวยการศูนย์วิจัย สัตวแพทย์หญิง ดร.จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด และคณะ ซึ่งประกอบไปด้วยนายสัตวแพทย์ชำนาญการด้านการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ รวมถึงบุคลากรในสังกัดโดยเฉพาะนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ได้ตระหนักถึงปัญหาที่เกิดขึ้น โจทย์วิจัยที่สำคัญในพื้นที่ และร่วมปรึกษาหารือเพื่อวิเคราะห์หาแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น โดยในเบื้องต้นพบว่าปัญหาของโรคติดเชื้อที่สำคัญ ได้แก่ การติดเชื้อแบคทีเรีย (*Burkholderia pseudomallei* สาเหตุของโรคเมลิออโดซิส และ *Microbacterium* spp. โดยเฉพาะ *M. avium* ในเป็ด สาเหตุของโรควัณโรคในเป็ด ซึ่งเป็นอุบัติการณ์ใหม่ที่น่าสนใจ) การติดเชื้อปรสิต (*Trypanosoma* spp., *Anaplasma* spp. และ *Babesia* spp. โดยเฉพาะในกลุ่มโคนม ซึ่งพบได้บ่อยครั้งที่มีการตรวจหาการติดเชื้อประจำปีของสถานีวิจัยทดสอบพันธุ์สัตว์พิษณุโลก ตากและนครสวรรค์ หรือ *Fasciola* spp. ในโค กระบือ) และการติดเชื้อไวรัส (FMD virus สาเหตุของโรคปากเท้าเปื่อย โดยเฉพาะในโค) ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการพัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจหาหรือตรวจคัดแยกการติดเชื้อ เนื่องจากปัญหาทางด้านระบาดวิทยาที่ทำให้การแพร่กระจายของเชื้อที่รวดเร็วและมีโฮสต์ที่สามารถเป็นเจ้าบ้านให้กับเชื้อต่างๆได้หลากหลายมากขึ้น นำไปสู่ความรุนแรงของโรคการแพร่กระจายไปในวงกว้างทั้งในกลุ่มสัตว์ด้วยกันเองหรือเกษตรกรผู้เลี้ยง อีกทั้ง วิธีมาตรฐานหรือการตรวจยืนยันที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น การย้อมสีดูใต้กล้องจุลทรรศน์ การเพาะเลี้ยงเชื้อ หรือแม้กระทั่งเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาเองก็ตาม ก็ยังมีให้ค่าผลบวกและ/หรือลบปลอมได้ ทำให้ค่าความไวและความจำเพาะของการตรวจคัดแยกเชื้อต่ำ ใช้เวลานาน และจำเป็นต้องใช้บุคลากรผู้มีความเชี่ยวชาญเป็นอย่างสูงในการตรวจวินิจฉัยและรายงานผล ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงมีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจคัดแยกความจำเพาะของการติดเชื้อที่สำคัญ เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะ ลดระยะเวลาและต้นทุน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เป็นการลงพื้นที่สำรวจและคัดกรองการติดเชื้อในกลุ่มตัวอย่างปริมาณมาก เนื่องจากทาง ศวพ. เอง นอกเหนือจากสิ่งส่งตรวจจากฟาร์ม จากเกษตรกร หรือ จากเจ้าของสัตว์แล้ว ก็ยังมีพันธกิจในการตรวจคัดกรองการติดเชื้อที่สำคัญในสถานีวิจัยทดสอบพันธุ์สัตว์ ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างอีกด้วย ดังนั้น ทั้งผู้วิจัยและ ศวพ. เองจึงมีความคาดหวังว่าผลงานวิจัยนี้จะเกิดประโยชน์และสามารถนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ได้จริงในอนาคต

# บทคัดย่อ

โรควัณโรคในสัตว์ปีกมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Mycobactrium avium* โดยเชื้อชนิดนี้มี 2 สับสปีชีส์ที่สำคัญ คือ *M. avium avium* (Maa) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรควัณโรคในสัตว์ปีก เช่น เป็ด ไก่ นก และ *M. avium paratuberculosis* (Map) ที่สามารถก่อโรคข้ามสายพันธุ์ไปยังสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค กระบือ กวาง เรียกว่าโรคพาราทูเบอร์คูโลซิสหรือ Johne's disease ได้ โดยวิธีมาตรฐานของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค คือ การย้อมสีทนกรดและยืนยันผลด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ซึ่งใช้เวลานานและมักรายงานผลลบปลอมเนื่องจากข้อจำกัดด้านความไวของวิธี ในการศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุล คือ เทคนิค Real-time PCR ควบคู่กับการวิเคราะห์ผลแบบ High-resolution melting เพื่อคัดแยกเชื้อ Maa และ Map ออกจากกัน โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับบริเวณของยีนเป้าหมาย (*hed* gene) ในทั้ง 2 สับสปีชีส์ ผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าค่าอุณหภูมิและรูปแบบผลการวิเคราะห์ด้วย High-resolution melting ของเชื้อทั้ง 2 สับสปีชีส์มีความแตกต่างกัน โดย Maa มีค่า Melting temperature โดยเฉลี่ยเท่ากับ 83.32°C และ Map เท่ากับ 84.76°C ผู้วิจัยจึงสรุปว่าการตรวจคัดแยกเชื้อ *Mycobactrium avium* ด้วยวิธีนี้มีความจำเพาะในระดับสับสปีชีส์ รวดเร็วและไม่จำเป็นต้องใช้ตัวติดตามหรือการตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังการทำ PCR ซึ่งทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายลงอีกด้วย



คำสำคัญ: สับสปีชีส์ของ *Mycobacterium avium*, Real-time PCR, High Resolution Melting analysis

# Abstract

Tuberculosis is one of important disease in avian (duck, chicken or bird) that caused by infection of *Mycobacterium avium*. Two main pathogenic subspecies are *M. avium avium* (Maa) and *M. avium paratuberculosis* (Map). Maa cause the tuberculosis in avian whereas Map is cross-infect to ruminant host ( cow, buffalo or deer) and progressing to paratubeculosis as Johne's disease. The standard method for diagnosis of the infections is acid fast bacilli (AFB) staining and following confirm by bacterial culture. However, the problems are false negative result regarding to limit of detection and time-consuming to culture this slow-growing bacteria. This study apply the molecular approach using Real-time PCR coupling with high resolution melting (HRM) Analysis for differential detection of Maa and Map. Using of only one primer pair which designed to targeting partial sequence of *hed* gene. The distinct characteristics of HRM patterns were analysed, and the melting temperatures peaked at 83.32°C and 84.76°C for Maa and Map, respectively. The method is subspecies-specific, rapid, and does not require fluorescent probes or post-PCR processing for discrimination of these 2 subspecies of pathogenic mycobacterium.



Key words: *Mycobacterium avium* subspecies, Real-time PCR, High Resolution Melting analysis

## เนื้อหางานวิจัย

มีการรายงานอุบัติการณ์การตรวจพบการติดเชื้อวัณโรค *Mycobacterium avium* ในเป็ดในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างและภาคกลางตอนบน ซึ่งพบว่าการติดเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุทำให้เกิดพยาธิสภาพในตัวเป็น เกิดแผลรอยโรควัณโรคในอวัยวะต่างๆ และนำไปสู่การตายและการสูญเสียทางเศรษฐกิจของผู้เลี้ยง รวมทั้งส่งผลกระทบไปในวงกว้างโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชิงระบาดวิทยา

การเกิดวัณโรค (Tuberculosis) นั้น เกิดจากการติดเชื้อ Mycobacteria ซึ่งเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีหลายสปีชีส์ซึ่งมีการก่อโรคที่แตกต่างกัน (Devuder et al., 2005) รวมทั้งในโฮสต์ที่จำเพาะแตกต่างกันด้วย (Prasanna and Mehra., 2013) การเกิดโรคสามารถพบได้ทั้งในคนโดยเชื้อ *M. tuberculosis* และสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น โค กระบือ (*M. brovis*) สัตว์ปีก (*M. avium*)เป็นต้น ทั้งนี้ทั้งนั้นก็พบการติดเชื้อร่วมกันและการติดเชื้อที่ไม่จำเพาะต่อโฮสต์เกิดขึ้นได้ด้วย (Endly and Ackerman, 2014) โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการมุ่งเน้นไปยังการติดเชื้อในเป็ด ซึ่งเคยมีรายการการติดเชื้อและสาเหตุของการติดเชื้อ รวมถึงรายงานตรวจพบโรคติดเชื้อ Mycobacteriosis ในเป็ด (Saggese et al., 2007) นอกจากนี้ยั งมีโอกาสที่เกิดจากการติดเชื้อต่างสับสปีชีส์ได้ด้วย คือ *M. avium avium และ M. avium paratuberculosis* จึงนำมาสู่การศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ปัจจุบันมีการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลในด้านต่างๆอย่างแพร่หลายทั้งทางการแพทย์ (Erali et al., 2008) โดยเฉพาะโรคติดเชื้อของงานด้านจุลชีววิทยา (Tong and Giffard, 2012; Cebula et al., 2005) ซึ่งส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่การตรวจหาและการตรวจคัดแยกความจำเพาะของเชื้อ และเทคนิคที่ได้มีการประยุต์ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันเทคนิคหนึ่ง คือ เทคนิค High-resolution melting (HRM) ร่วมกับเทคนิค Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) (Reed GH., 2007; Wittwer et al., 2003) ทั้งเพื่อการตรวจคัดแยกเชื้อจากเชื้อตัวอื่นที่ใกล้เคียงกัน หรือการตรวจคัดแยกระหว่างเชื้อจีนัสเดียวกันแต่ต่างสปีชีส์หรือสับสปีชีส์ ไม่ว่าจะเป็นไวรัส (Towler et al., 2010) แบคทีเรีย (Ohshima et al., 2014; Cai et al., 2013; Gori et al., 2012; Zeinzinger et al., 2012; Jin et al., 2012) เชื้อรา (Gago et al., 2014) หรือเชื้อปรสิต (Kaewkong et al., 2013; Thanchomnang et al., 2013) สำหรับเชื้อ Microbactirum เองก็เคยมีการศึกษาวิจัยที่ประยุกต์ใช้เทคนิคนี้เช่นกันแต่เป็นการตรวจคัดแยกสายพันธุ์ดื้อยา (Chen et al., 2011)

การศึกษาครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อใช้เทคนิค HRM ร่วมกับเทคนิค Real-time PCR เพื่อตรวจหาและตรวจคัดแยกความจำเพาะของเชื้อวัณโรคในเป็ดทั้งในระดับสปีชีส์ (*Mycobacterium spp.*) และสับสปีชีส์ (*M. avium avium* และ *M. avium paratuberculosis*) และเพื่อพัฒนาเทคนิคให้มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจหาและตรวจคัดแยกความจำเพาะของเชื้อเพื่อประยุกต์ใช้ได้จริงในห้องปฏิบัติการนอกจากนี้ โดยผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจคัดกรองในการลงพื้นที่ตรวจในกลุ่มตัวอย่างจำนวนมากและเป็นการเฝ้าระวังเพื่อป้องกันการระบาดของโรควัณโรคในเป็ดและตรวจติดตามเพื่อป้องกันและควบคุมการแพร่เชื้อต่อไป นอกจากในทางคลินิกแล้วยังส่งผลไปสู่การพัฒนาคุณภาพชีวิตของเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และสุขอนามัยของกลุ่มผู้บริโภค

**วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล**

1) การกำหนดโครงร่างวิจัยและทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย (การติดเชื้อ ความสำคัญของเชื้อ *Mycobacterium* spp.) เทคนิคที่ใช้ (Real-time PCR ร่วมกับ High-resolution melting analysis) การประยุกต์ใช้และการนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง รวมถึงผลการศึกษาวิจัยด้วยเทคนิคดังกล่าวนี้ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ
   สถานที่: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2) การสำรวจและรวบรวมข้อมูลทางระบาดวิทยาของการติดเชื้อวัณโรคในเป็ด โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างและ/หรือภาคกลางตอนบน
   สถานที่: ศวพ. ภาคเหนือตอนล่าง

3) การเก็บตัวอย่างส่งตรวจและการเตรียมตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างส่งตรวจแผลวัณโรค (Tuberculosis lesion) จากเป็ดติดเชื้อ การเตรียมตัวอย่างทดสอบในห้องปฏิบัติการ การสกัดดีเอ็นเอและการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการควบคุมผลบวกจริง (Positive control plasmid)
   สถานที่: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ ศวพ. ภาคเหนือตอนล่าง

4) การทดลองปฏิบัติการ: การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีดั้งเดิม (AFB staining) และวิธีมาตรฐาน (การเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Löwenstein-Jensen medium) การออกแบบชุดทดสอบและการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ High-resolution melting analysis การวิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะสถานที่: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ ศวพ. ภาคเหนือตอนล่าง

5) การสรุปและวิเคราะห์ผลที่ได้
   สถานที่: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ ศวพ. ภาคเหนือตอนล่าง

6) การเขียนผลงานตีพิมพ์หรือนำเสนอทางวิชาการ
   สถานที่: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลงานวิจัย

**ผลการทดลองที่ 1** ภาพแสดงขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อ Maa (ขนาด 76 คู่เบส) ที่แยกได้จากเป็ด (P1 และ P2) ขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อ Map (ขนาด 100 คู่เบส) ที่แยกได้จากวัว (R1) และกวาง (R2)

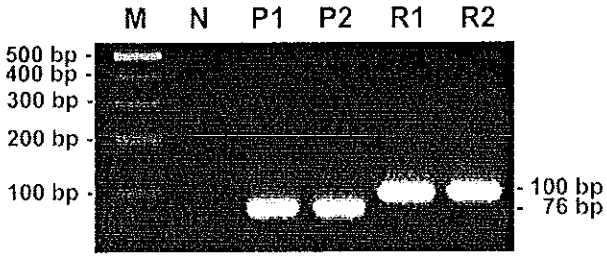



**Figure 1.** The 2.0% agarose gel electrophoresis presents 76 bp and 100 bp PCR products indicating Maa and Map DNA, respectively. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane N: Negative control (no DNA template); Lane P1 and P2: DNA samples from Maa infected ducks; Lane R1 and R2: DNA samples from Map infected cow and deer, respectively.

**ผลการทดลองที่ 2** ภาพแสดงข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของเชื้อ Maa (76 คู่เบส) ที่แยกได้จากเป็ด และข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของเชื้อ Map (100 คู่เบส) ที่แยกได้จากวัวและกวาง

```
                1        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                |---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Mav100-F        ATGAAAGCCATACCCGACGTCCCT
P1-DUCK01       ATGAAAGCCATACCCGACGTCCCT--------------CCATGGGAC-ATGGAACAG---------CAGGGGACA-AAGGACAGCATGATCGAGTACCGCA
P2-DUCK02       ATGAAAGCCATACCCGACGTCCCT--------------CCATGGGAC-ATGGAACAG---------CAGGGGACA-AAGGACAGCATGATCGAGTACCGCA
R1-COW01        ATGAAAGCCATACCCGACGTCCCTGGGCAATTCGAAGCCTAAGGCCGACGGCCCCGAACACCCTTCAAGAAAGGTAAGGACAGCATGATCGAGTACCGCA
R2-DEER01       ATGAAAGCCATACCCGACGTCCCTGGGCAATTCGAAGCCTAAGGCCGACGGCCCCGAACACCCTTCAAGAAAGGTAAGGACAGCATGATCGAGTACCGCA
Mav100-RC                                                                                   AGGACAGCATGATCGAGTACCGCA
```

**Figure 2.** Alignment of Mav100 forward and reverse primers with the sequence obtained from sequencing of amplification products from DNA samples of Maa infected ducks (P1-DUCK01 and P2-DUCK02), Map infected cow (R1-COW01) and Map infected deer (R2-DEER01).

**ผลการทดลองที่ 3** ภาพแสดงค่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันเมื่อทำการแยกสายดีเอ็นเอของเชื้อ Maa และ Map ด้วยเทคนิค High-resolution melting analysis

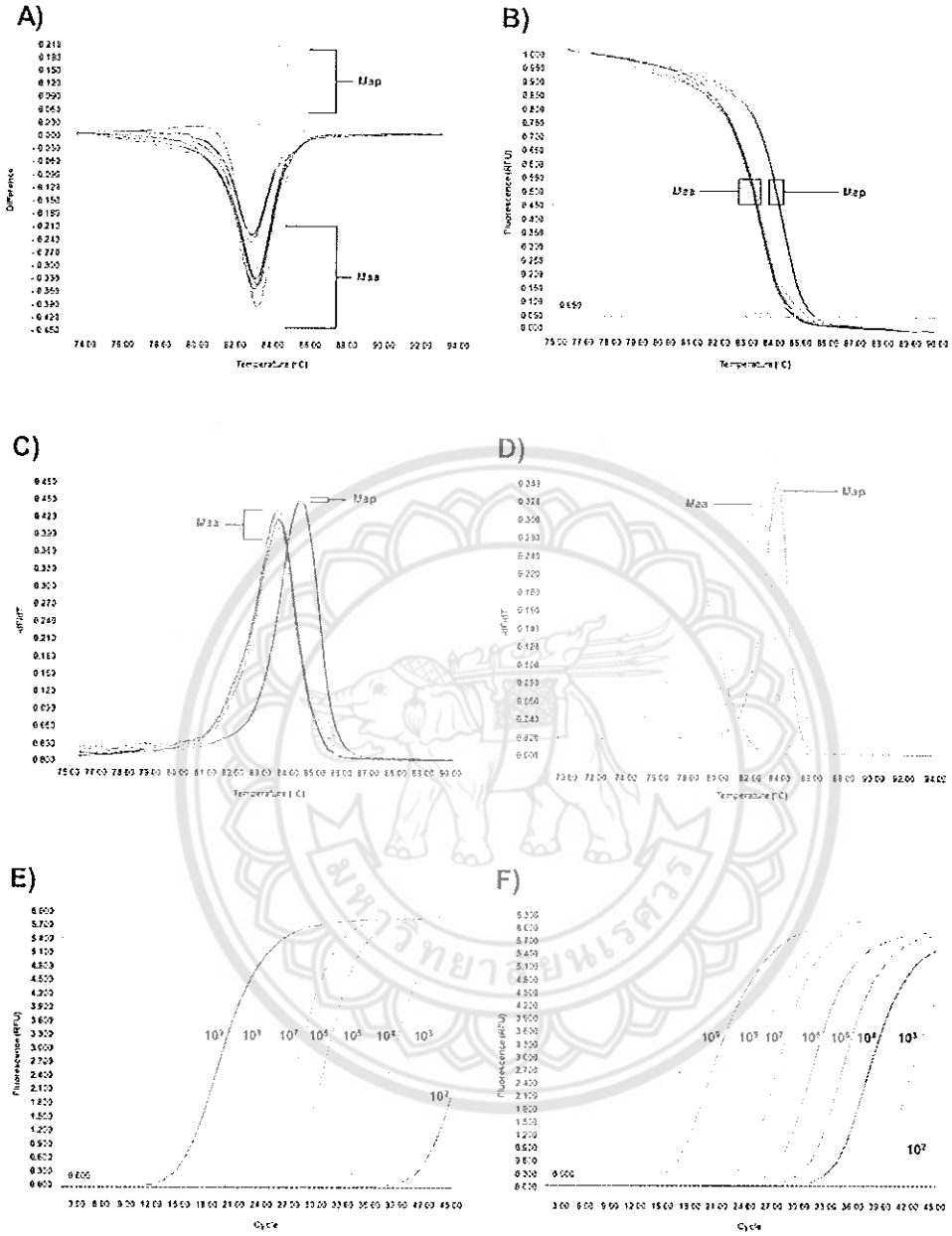



**Figure 3.** HRM analyses of amplification products for differential detection of Maa and Map. The difference plots (A), normalized melting curves (B) and melting peaks (C) show the different melting temperatures of Maa and Map DNA amplified. Melting peak analyses shows the specificity for differential detection of Maa and Map from other bacterial species (D) and the amplification curves presents the analytical sensitivity for detecting the 10-folded serial dilution plasmids (from $10^9$ to $10^2$ copies) of Maa (E) and Map (F).

## เอกสารอ้างอิง


Cai XQ, Yu HQ, Ruan ZX, Yang LL, Bai JS, Qiu DY, et al. Rapid detection and simultaneous genotyping of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula using real-time PCR and high resolution melting (HRM) analysis. PLoS One 2013; 8(6): e67082.

Cebula TA, Brown EW, Jackson SA, Mammel MK, Mukherjee A, LeClerc JE. Molecular applications for identifying microbial pathogens in the post-9/11 era. Expert. Rev. Mol. Diagn. 2005; 5: 431-445.

Chen X, Kong F, Wang Q, Li C, Zhang J, Gilbert GL. Rapid detection of isoniazid, rifampin, and ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using high-resolution melting analysis. J Clin Microbiol. 2011; 49(10): 3450-7.

Devulder G, Pérouse de Montclos M, Flandrois JP. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus Mycobacterium as a model. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55(1): 293-302.

Endly D, Ackerman L. Disseminated cutaneous *mycobacterium avium* complex in a person with AIDS. Dermatol Online J. 2014; 20(5): 22616.

Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. Exp Mol Pathol. 2008; 85(1): 50-8.

Gago S, Alastruey-Izquierdo A, Marconi M, Buitrago MJ, Kerhornou A, Kersey PJ, et al. Ribosomic DNA intergenic spacer 1 region is useful when identifying *Candida parapsilosis spp.* complex based on high-resolution melting analysis. Med Mycol. 2014; [Epub ahead of print].

Gori A, Cerboneschi M, Tegli S. High-resolution melting analysis as a powerful tool to discriminate and genotype Pseudomonas savastanoi pathovars and strains. PLoS One. 2012; 7(1): e30199.

Jin D, Luo Y, Zhang Z, Fang W, Ye J, Wu F, Ding G. Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis. FEMS Microbiol Lett. 2012; 330(1): 72–80.

Kaewkong W., Intapan P.M., Sanpool O., Janwan P., Thanchomnang T., Laummaunwai P., et al. Molecular Differentiation of *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* Eggs by Multiplex Real-Time PCR with High Resolution Melting Analysis. Korean J Parasitol. 2013; 51(6): 689-694.

Ohshima C, Takahashi H, Phraephaisarn C, Vesaratchavest M, Keeratipibul S, Kuda T, et al. Establishment of a simple and rapid identification method for *Listeria spp.* by using high-resolution melting analysis, and Its application in food industry. PLoS One. 2014; 9(6):e99223.

Prasanna AN, Mehra S. Comparative phylogenomics of pathogenic and non-pathogenic *mycobacterium*. PLoS One. 2013; 8(8): e71248.

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics. 2007; 8(6): 597-608.

Saggese MD, Riggs G, Tizard I, Bratton G, Taylor R, Phalen DN. Gross and microscopic findings and investigation of the aetiopathogenesis of mycobacteriosis in a captive population of white-winged ducks (*Cairina scutulata*). Avian Pathol. 2007; 36(5): 415-22.

Thanchomnang T., Intapan P. M., Tantrawatpan C., Lulitanond V., Chungpivat S., Taweethavonsawat P., et al. Rapid Detection and Identification of *Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, B. pahangi* and *Dirofilaria immitis* in Mosquito Vectors and Blood Samples by High Resolution Melting Real-Time PCR. Korean J Parasitol. 2013; 51(6): 645-650.

Tong SY, Giffard PM. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3418-21.

Towler WI, James MM, Ray SC, Wang L, Donnell D, Mwatha A, et al. Analysis of HIV diversity using a high-resolution melting assay. AIDS Res Hum Retroviruses. 2010; 26(8): 913-8.

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution melting genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. Clin Chem. 2003; 49: 853-860.

Zeinzinger J, Pietzka AT, Stöger A, Kornschober C, Kunert R, Allerberger F, et al. One-step triplex high-resolution melting analysis for rapid identification and simultaneous subtyping of frequently isolated *Salmonella* serovars. Appl Environ Microbiol. 2012 May;78(9):3352-60.

**ภาคผนวก**

**บทความสำหรับการเผยแพร่**
**และกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์**

การประชุมวิชาการ
พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19
"พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์: จากการศึกษาระดับโมเลกุลสู่การประยุกต์"

National Genetics Conference 2015 (NGC 2015)
"Genetics and Genomics: from Molecular Studies to Applications"

15 – 17 กรกฎาคม 2558
โรงแรมเซ็นทาราแอมบาสซาดอร์ขอนแก่น จ. ขอนแก่น
www.ngc2015.kku.ac.th

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และการตอบสนองทางสรีรวิทยาของไก่ลูกผสมพื้นเมืองไทยกลุ่มสายพันธุ์ KUDC 70 3 ๑๔๑

ปิยพร ศิริพานิช ประพาฬ ประดิษฐ์ เชาวรินทร์ ยอดมณี และ ณ.วัช ศุภปัญญา

วิวัฒนาการและตัวบ่งชี้ยีนควบคุมการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ ๑๑๖

วัฒนพงษ์ จิตรัตนโอฬาร

การศึกษาสารสกัดเบื้องต้นจากเชื้อราจากดินบริเวณรากต้นข่าที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคเน่าคอดินและรากเน่าในมะเขือเทศ ๑๑๖

วิไล [illegible] ปัญจ [illegible]

การศึกษาการใช้ประโยชน์ที่ต่างกันของโคเนื้อพื้นเมืองเพศเมียโดยการวัดความต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางหลอดเลือดแดงใต้ผิวหนังบริเวณ ๑๑๗

[illegible]

ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกลุ่ม *Dendrobium* Section *Latouria* (Rchb.f.) Schltr. และ *Callista* (Lour.) Seidenf. ที่ใช้ไมโทคอนเดรียเป็นตัวแทนทางพันธุกรรม ๑๑๗

[illegible]

การใช้ชีวิตชีวาของเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสม GMAS และ ASS ที่มีความต้านทานต่อสารกลุ่มอัลคาลอยด์ไซยูเดอร์ในมะเขือเทศสายพันธุ์ ๑๑๘

ปรีชญา [illegible] ปัญญา [illegible] ปิยพร ศิริพานิช [illegible]

การศึกษาและการเรียนรู้ของนักเรียนเกษตรด้านการน้ำแข็ง ๑๑๑

[illegible]

การวิจัยการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Aspergillus* L.) โดยใช้เครื่องหมาย ITS และ RAPD ๑๑๑

[illegible]

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางพันธุกรรมของกุหลาบพันธุ์ลูกผสมที่ใช้ตัวแม่เป็น *Rosa* [illegible] ๑๑๑

[illegible]

การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอนเอที่มีความละเอียดสูง (High-resolution melting analysis: HRM) ๑๑

[illegible]

การตรวจวัดระดับเมทาโบไลท์ของเชื้อราก่อโรคในมะเขือเทศ *Alternaria solani* ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในระบบสกัดเฟส ๑๑๑

[illegible]

# การพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ย่อยเชื้อ *Mycobacterium avium* ด้วยเทคนิค High-resolution melting real-time PCR

# Development of Subspecies Differentiation of *Mycobacterium Avium* Using High-Resolution Melting Real-Time PCR

[illegible]

Phattada POTIPAK[1], Sunnida SUWANMANEE[1], Chularee ANUPHAP[2], Sakol SINGAM[3], Usanee THAMNAN-POOL[4] and Wanwan KAEWKES[1*]

[1] [illegible]
[2] [illegible]
[3] [illegible]
[4] [illegible]
[*] [illegible]

**บทคัดย่อ** [illegible]

**ABSTRACT** [illegible]



[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

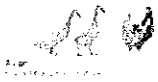
[illegible]

# Development of subspecies differentiation of *Mycobacterium avium* using high-resolution melting real-time PCR

**Phattarin Pothipan[1], Gunticha Suwanmanee[1], Chalinee Anuphap[1], Seksit Singjam[2], Chanpen Chamnanpood[2], Worasak Kaewkong[1,*]**

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok Province, THAILAND
[2] Veterinary Development and Research Center Lower Northern region, Phitsanulok Province, Department of Livestock Development, THAILAND
[*] Corresponding author, e-mail: worasak@nu.ac.th

## INTRODUCTION

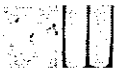


*Mycobacterium avium* infection are significant potential cause of morbidity in grazing ducks in lower-northern Thailand. Evidently *M. avium* was also described as pathogenic species in other host such as ruminant and human. Especially in human host, the reports of *M. avium* complex (MAC) were found in immunodeficiency patients.

Different subspecies were presented their host specificity. Two main subspecies including: *M. avium avium* (Maa) is causing tuberculosis in avian whereas *M. avium paratuberculosis* (Map) can cross-infect to ruminant.

Routine methods for laboratory detection of *M. avium* is microscopic examination of acid fast bacilli (AFB) staining and culture in Löwenstein-Jensen medium for 6-8 weeks which time-consuming and false negatives were often resulted.

**OBJECTIVE**: To overcome the problems in current detection method for *M. avium* infection, this present study aimed to apply HRM real-time PCR for differential detection of 2 main *M. avium* subspecies (Maa and Map) in animal lesion specimens.



## MATERIALS and METHODS

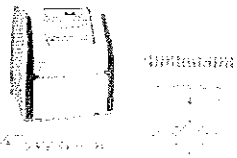
*M. avium* infected tissue from animals

DNA isolation

Conventional PCR

DNA cloning and Sequencing

High-resolution melting Real-time PCR



### Biological specimens

*M. avium* infected ducks (n=21)
*M. avium* infected mice (n=1) and deer (n=1)

### DNA isolation

The DNA from infected tissue specimens were extracted using QIAamp DNA tissue kit.

### Primer design and PCR

Mav100 primer was designed to target the host expression dependent region of Maa (AJ016878) and Map (AJ011628).
Conventional PCR were run by optimized procedure.

### Plasmid construction and Sequencing

PCR product were cloned into pCR2.1-TOPO® vector and propagated in *E. coli* DH5α.
The obtained sequences were complete, involved to the sequences from animal specimens as well.
Ten-folded serial dilution of plasmids in copies unit were used to evaluate the sensitivity of detection.

### High-resolution melting real-time PCR

LightCycler® 96 Instrument and Quantification system were performed using High Resolution Melting Master Kit.
Amplification cycle was run under optimized condition.
Amplicon products were melted from 60 to 95°C (increment 0.2°C).
Melting profiles and Tm was determined.

## RESULTS

Figure 1. The PCR product of Mav100 primer (A) and corresponded sequencing results of amplified DNA (B) from each subspecies infected samples

A)

B)

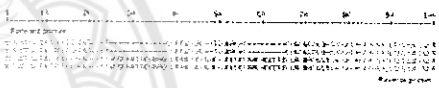


Figure 2. HRM melting curve (A), melting peaks (B) and Tm of Maa and Map

A)

B)

Figure 3. Sensitivity of HRM real-time PCR for detection of Maa (A) and Map (B)

A)

B)

## CONCLUSION and DISCUSSION

- This reported Tm can distinguish 2 main subspecies of *M. avium*, Maa (82.11±0.09°C) and Map (83.49±0.10°C).
- Sensitivity of detection of Maa is $10^2$ copies whereas Map is $10^3$ copies. Therefore, this technique can detect just the once early infection stage.
- Specificity is planned to further evaluate in related pathogenic bacterial strains.
- Few reports presented the HRM technique in *M. avium* infection (Pang et al., 2013) but not yet study in differentiation of Avian-Maa and Ruminant-Map.

**The High-resolution melting (HRM) real-time PCR is an alternative technique for differential detection of animal-pathogenic subspecies of *Mycobacterium avium* which present high sensitivity, more rapid, accuracy and does not require fluorescent probe or post-PCR processing.**

**ACKNOWLEDGEMENTS**: This research was supported by the research grant of Naresuan University (R2558C034) and National Research Council of Thailand (P2559B049). The biological specimens used in this study were kindly provided from Veterinary Research and Development Centre Lower Northern Region, Phitsanulok and National Institute of Animal Health of Thailand.

BIOCHEMISTRY

**ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้**
**และกิจกรรมที่ดำเนินมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ**

**<u>โครงการ</u>**
**อุบัติการณ์ของวัณโรคในเป็ดในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย:**
**การตรวจคัดแยกด้วยเทคนิค High-resolution melting real-tim PCR**
**<u>สัญญาเลขที่ R2558C034</u>**

| วัตถุประสงค์ | กิจกรรมที่วางแผนไว้ | กิจกรรมที่ดำเนินมา | ผลที่ได้รับตลอดโครงการ |
|---|---|---|---|
| 1.เพื่อสำรวจข้อมูลทางระบาดวิทยา วิเคราะห์หาการติดเชื้อที่สำคัญ อุบัติการณ์ของการติดเชื้อและการติดเชื้อร่วม<br><br>2.เพื่อหาโจทย์วิจัยที่สำคัญและสามารถแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในทางปศุสัตว์เมื่อมีการติดเชื้อในสัตว์เศรษฐกิจในพื้นที่<br><br>3.เพื่อพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลในการตรวจคัดแยกความจำเพาะของเชื้อในห้องปฏิบัติการจริง<br><br>4.เพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐานและผลปฏิบัติการเบื้องต้นในการการขอทุนวิจัยจากหน่วยงานภายนอก<br><br>5.เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปทำการศึกษาวิจัยต่อยอด การสร้างกลุ่มวิจัยทางด้านโรคติดเชื้อระบาดใหม่ทั้งที่เป็นการติดเชื้อในคนและสัตว์ต่อไปในอนาคต | 1.กำหนดโครงร่างวิจัยและทบทวนวรรณกรรม<br><br>2.สำรวจและรวบรวมข้อมูลทางระบาดวิทยา<br><br>3.เก็บตัวอย่างส่งตรวจ<br><br>4.เตรียมตัวอย่างและทดลองปฏิบัติการ<br><br>5.สรุปและวิเคราะห์ผล<br><br>6.เขียนผลงานตีพิมพ์/นำเสนอทางวิชาการ | 1.กำหนดโครงร่างวิจัยและทบทวนวรรณกรรม<br><br>2.สำรวจและรวบรวมข้อมูลทางระบาดวิทยา<br><br>3.เก็บตัวอย่างส่งตรวจ<br><br>4.เตรียมตัวอย่างและทดลองปฏิบัติการ<br><br>5.สรุปและวิเคราะห์ผล<br><br>6.เขียนผลงานตีพิมพ์/นำเสนอทางวิชาการ (มีการไปนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับชาติ การนำเสนอผลงานด้วยโปสเตอร์ ใน National Genetics Conference 2015; NGC 2015) วันที่ 15-17 กรกฎาคม 2558 ณ โรงแรมเซ็นทารา แอนด์ คอนเวนชั่นเซนเตอร์ ขอนแก่น | 1. ทราบข้อมูลทางระบาดวิทยา วิเคราะห์หาการติดเชื้อที่สำคัญ อุบัติการณ์ของการติดเชื้อและการติดเชื้อร่วม<br><br>2.สนับสนุนและส่งเสริมความร่วมมือด้านงานวิจัยและการเรียนการสอนระหว่างนักวิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ (ศวพ.) ภาคเหนือตอนล่าง (ปัจจุบัน ผู้อำนวยการศ ศวพ. เป็นนิสิตระดับปริญญาเอก สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร)<br><br>3.ต่อยอดไปสู่โจทย์วิจัยที่สำคัญ ได้องค์ความรู้พื้นฐานและผลปฏิบัติการเบื้องต้นในการการขอทุนวิจัยจากหน่วยงานภายนอก โดยนักวิจัยหัวหน้าโครงการได้รับทุน<br><br>4.มีนิสิตเข้ามาฝึกประสบการณ์วิจัย ทั้งในลักษณะของรายวิชาเลือกระดับปริญญาตรี (ปัญหาพิเศษทางชีวเคมี) และวิทยานิพนธ์ในสาขาวิชาชีวเคมี |

มหาวิทยาลัยนเรศวร