

การพัฒนาและประเมินวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าใน
สมองสุนัขโดยวิธี TaqMan real – time one step RT-PCR



นางสาวจิตตะภาวัลย์ สุติปัญญา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

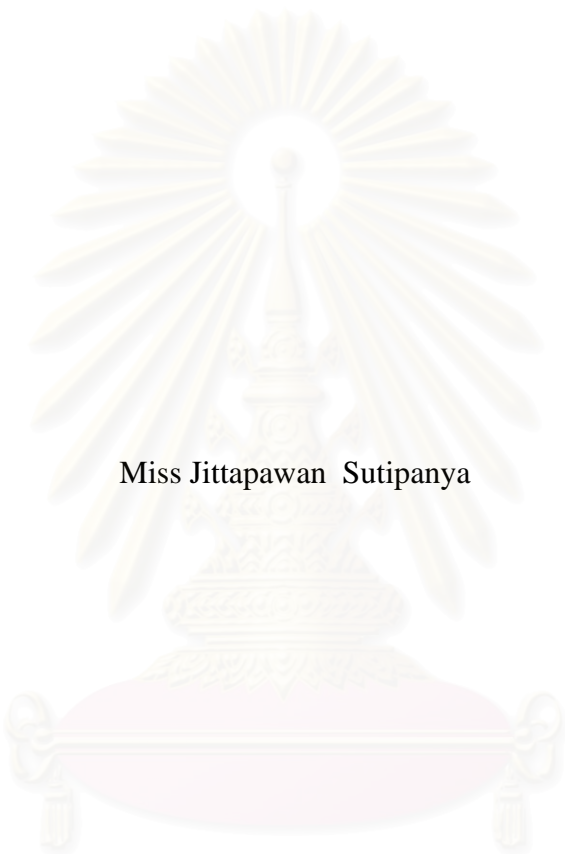
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF RABIES DIAGNOSIS IN DOG
BRAIN BY TAQMAN REAL-TIME ONE STEP RT-PCR.



Miss Jittapawan Sutipanya

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

จิตตะภาวัลย์ สุทธิปัญญา : การพัฒนาและประเมินวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า
 ในสมองสุนัขโดยวิธี TaqMan real-time one step RT-PCR (DEVELOPMENT AND
 EVALUATION OF RABIES DIAGNOSIS IN DOG BRAIN BY TAQMAN
 REAL-TIME ONE STEP RT-PCR) อ. ที่ปรึกษา : ศ.นพ. ชีระวัฒน์ เหมะจุฑา,
 75 หน้า.

โรคพิษสุนัขบ้าพบในสัตว์เลี้ยงดูที่มนุษย์ เป็นโรคที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยอาการสมอง
 อักเสบอย่างฉับพลัน สุนัขเป็นสัตว์ที่สำคัญในการแพร่เชื้อประจำท้องถิ่น การตรวจหาแอนติเจนใน
 สมองสุนัขด้วยวิธี Direct fluorescent antibody (DFA) technique เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยขั้นต้น
 อย่างไรก็ตาม การตรวจวินิจฉัยโดยวิธี TaqMan real-time one step RT-PCR เป็นวิธีทางอณู
 ชีววิทยาที่รวดเร็วและจำเพาะ ซึ่งใช้ในการตรวจหาปริมาณและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ
 nucleocapsid gene โดยในการศึกษานี้วิเคราะห์ความเหมาะสมของ primer และ probe ที่
 ออกแบบ จากข้อมูลที่ได้ ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า 245 ตัวอย่าง ทั่วประเทศ
 ไทยและ 6 ตัวอย่าง จากประเทศเพื่อนบ้าน โดยมีตัวอย่างจำนวน 173 ตัวอย่าง ไม่เกิด sequence
 mismatches มีตัวอย่าง 6 กลุ่ม ที่เกิด mismatches ในตำแหน่ง forward primer, reverse
 primer หรือ probe โดยไม่มีตัวอย่างใดที่มีการเกิด sequence mismatches ทั้ง 3 ส่วน การ
 ทดสอบพบว่า sequence mismatches ดังกล่าวไม่มีผลต่อผลการตรวจ ในการศึกษา นิยมใช้
 ทดสอบกับ challenge rabies virus (CVS) ซึ่งเป็น fixed strain มี sequence mismatches ทั้ง
 3 ส่วน งานวิจัยนี้แสดงว่าการประยุกต์ใช้วิธี TaqMan real-time one step RT-PCR สามารถ
 นำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัย ยืนยันผลและแยกแยะตัวอย่างไวรัสพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์
 ที่เกิดขึ้นใหม่ (non-canine rabies virus variants) ที่อาจมีการระบาดในประเทศไทยที่สามารถ
 ตรวจสอบขั้นต่อไปได้ หลังจากได้ทำ amplified product โดยการทำให้ sequencing หรือ การใช้
 variant-specific probe

สาขาวิชา... วิทยาศาสตร์การแพทย์...
 ปีการศึกษา2550.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4874714530 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

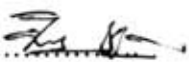
KEYWORD : RABIES VIRUS / DIAGNOSIS / REAL-TIME PCR / BRAIN
TISSUE / TAQMAN PROBE.

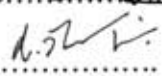
JITTAPAWAN SUTIPANYA : DEVELOPMENT AND EVALUATION OF
RABIES DIAGNOSIS IN DOG BRAIN BY TAQMAN REAL-TIME ONE
STEP RT-PCR. THESIS ADVISOR : PROF. THIRAVAT HEMACHUDHA,
M.D., PH.D, 75 PP.

Rabies is acute and fatal viral encephalitis found in mammals causes by neurotropic virus. Dogs are the major reservoirs and play a pivotal role in rabies transmission, particularly in countries where rabies is endemic. The diagnosis of rabies relies on postmortem examination of brain tissue. Direct fluorescent antibody (DFA) technique for detection of rabies antigen on brain impression smear is used as the most important primary test. TaqMan real-time one step RT-PCR is a rapid and specific technique which can be used to quantify and analyze the sequence variations. In this study, the appropriate primers and probe for TaqMan real-time PCR have been designed based on groups of rabies nucleocapsid gene sequence variations. Based on 245 available isolates from all over Thailand and 6 isolates from neighboring countries, 173 had no mismatches. The remaining isolates were defined into 6 groups of mismatches in forward primer, reverse primer or probe; None had mismatches in all three regions. There is no effect on any mismatch pattern of street virus except fixed challenge rabies virus strain (CVS). This study demonstrates that TaqMan real-time one step RT-PCR can be applied for rabies diagnostic assay in Thailand and may serve as a surveillance tool for newly emerged non-canine variants which can be confirmed by sequencing or using of variant-specific primers and probe.

Field of study ...Medical..Science...

Academic year.....2007.....

Student's Signature.....

Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำของอาจารย์ที่ปรึกษา ศ. นพ. ชีระวัฒน์ เหมะจุฑา อาจารย์ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคสมองและโรคพิษสุนัขบ้า คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผศ. ดร. วิไล อโนมะศิริ อาจารย์ภาควิชา ชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศ. นพ. ชีระพงษ์ ตันทวีเชียร อาจารย์ผู้เชี่ยวชาญด้านอายุศาสตร์โรคติดเชื้อ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สพญ. ดร. สุदारัตน์ คำรงค์วัฒนโกสิน อาจารย์ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคติดต่อ ปัจจุบันดำรงตำแหน่งอยู่ที่สถาบันสุขภาพสัตว์และ United States Agency for International Development (USAID) รวมทั้งขอขอบคุณที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยโรคทางสมอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อนที่คอยให้กำลังใจ และหน่วยงานที่ให้ข้อมูล อาทิ สถานเสาวภา ศูนย์วิจัยพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ รวมทั้งกรมปศุสัตว์ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	5
3 วัสดุและวิธีการทดลอง.....	15
4 ผลการทดลอง.....	18
5 สรุปและวิจารณ์ผลกาทดลอง.....	55
รายกอ้างอิง.....	59
ภาคผนวก.....	61
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	75

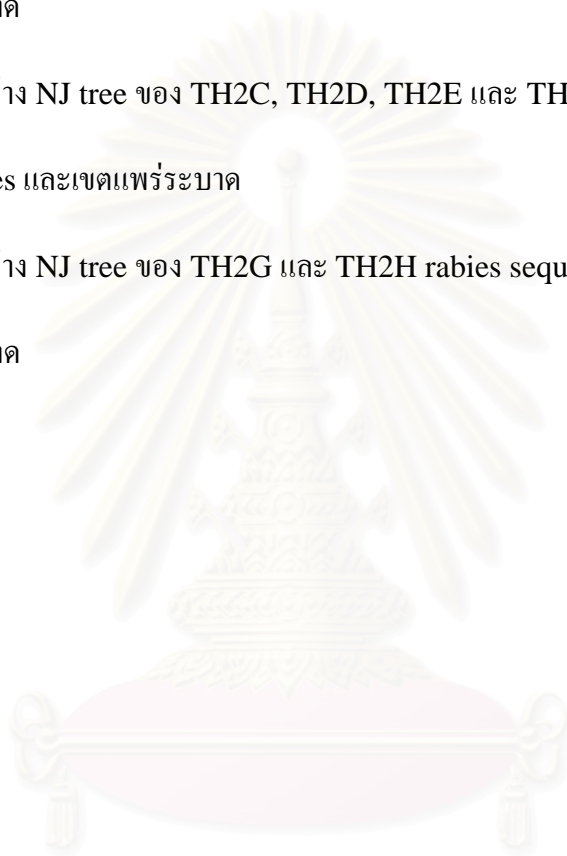
สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่ม 1 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 26 ตัวอย่าง....	25
2 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่ม 2 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 22 ตัวอย่าง...	27
3 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่ม 3 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 10 ตัวอย่าง....	29
4 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่ม 4 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 6 ตัวอย่าง.....	31
5 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่ม 5 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 2 ตัวอย่าง.....	33
6 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่ม 6 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 2 ตัวอย่าง.....	35
7 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่ม 7 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 6 ตัวอย่าง....	37
8 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่ม 8 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 1 ตัวอย่าง.....	39
9 แสดงผลการตรวจวัด sensitivity.....	40
10 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคเหนือ 20 ตัวอย่าง.....	44
11 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคใต้ 10 ตัวอย่าง.....	45
12 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 13 ตัวอย่าง.....	46
13 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคตะวันออก 77 ตัวอย่าง.....	47
14 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคตะวันออก (ต่อ).....	48
15 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคตะวันออก (ต่อ)	49
16 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขจากประเทศพม่าที่ตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR.....	52
17 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขจากประเทศกัมพูชาที่ตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR.....	54

สารบัญภาพ

รูป	หน้า
1 ปฏิกริยาเคมีของ fluorogenic 5' nuclease.....	13
2 N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่ม 1.....	22
3 N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่ม 1(ต่อ).....	23
4 N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่ม 1(ต่อ).....	24
5 N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่ม 2.....	26
6 N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่ม 3.....	28
7 N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่ม 4.....	30
8 N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่ม 5.....	32
9 N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่ม 6.....	34
10 N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่ม 7.....	36
11 N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่ม 8.....	38
12 การตรวจวินิจฉัย CVS ด้วยวิธี TaqMan real-time PCR	40
13 การวิเคราะห์ CVS ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis.....	40
14 กราฟแสดงผลการตรวจวัดค่า sensitivity ด้วยวิธี real-time PCR.....	41
15 กราฟแสดงค่า standard curve ระหว่าง crossing point และ log concentration.....	41
16 กราฟแสดงผลการตรวจวัดค่า specificity ด้วยวิธี real-time PCR.....	42
17 N gene sequence alignment ของ rabies virus ในประเทศพม่า.....	51
18 N gene sequence alignment ของ rabies virus ในประเทศกัมพูชา	53

รูป	หน้า
19 เปรียบเทียบระหว่าง NJ tree ของ Thai rabies N genes และเขตแพร่ระบาด	69
20 เปรียบเทียบระหว่าง NJ tree ของ TH1 rabies sequence และเขตแพร่ระบาด.....	70
21 เปรียบเทียบระหว่าง NJ tree ของ TH2A และ TH2B rabies sequences.....	71
และเขตแพร่ระบาด	
22 เปรียบเทียบระหว่าง NJ tree ของ TH2C, TH2D, TH2E และ TH2F.....	72
rabies sequences และเขตแพร่ระบาด	
23 เปรียบเทียบระหว่าง NJ tree ของ TH2G และ TH2H rabies sequences.....	73
และเขตแพร่ระบาด	



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATvsc	อ.วิเศษชัยชาญ จ. อ่างทอง
AYbt	อ. บางไทร จ. อโยธยา
AYsn	อ. เสนา จ. อโยธยา
BKbkn	เขตบางกอกน้อย จ. กรุงเทพมหานคร
BKds	เขตดุสิต จ. กรุงเทพมหานคร
BKdd	เขตดินแดง จ. กรุงเทพมหานคร
BKkt	เขตคลองเตย จ. กรุงเทพมหานคร
BKpv	เขตประเวศ จ. กรุงเทพมหานคร
BKpyt	เขตพญาไท จ. กรุงเทพมหานคร
BKrtv	เขตราษฎร์เทพราช จ. กรุงเทพมหานคร
BKsl	เขตสวนหลวง จ. กรุงเทพมหานคร
BRhr	อ. ห้วยราช จ. บุรีรัมย์
BRm	อ. เมือง จ. บุรีรัมย์
BRpk	อ. ปะคำ จ. บุรีรัมย์
BRppc	อ. พลับพลาชัย จ. บุรีรัมย์

CBbb	อ. บ้านบึง จ. ชลบุรี
CBbc	อ. บ้านฉาง จ. ชลบุรี
CBblm	อ. บางละมุง จ. ชลบุรี
CBkhm	อ. แก่งหางเมย จ. จันทบุรี
CBkj	อ. เกาะจันทน์ จ. ชลบุรี
CBkp	อ. เกาะโพธิ์ จ. ชลบุรี
CBm	อ. เมือง จ. ชลบุรี
CBny	อ. หนองใหญ่ จ. ชลบุรี
CBpnnk	อ. พนัสนิคม จ. ชลบุรี
CBpt	อ. พานทอง จ. ชลบุรี
CBsh	อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
CBsrc	อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี
CCbnp	อ. บางน้ำเปราย จ. ฉะเชิงเทรา
CCbpk	อ. บางปะกง จ. ฉะเชิงเทรา
CCm	อ. เมือง จ. ฉะเชิงเทรา
CCpy	อ. แปลงยาว จ. ฉะเชิงเทรา
CLblm	อ. บางละมุง จ. ชลบุรี
CMcd	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่
CMcp	อ. ชัยปราการ จ. เชียงใหม่

CMm	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
CMog	อ. อมก๋อย จ. เชียงใหม่
CNhk	อ. หังชะ จ. ชัยนาท
CNm	อ. เมือง จ. ชัยนาท
CNmnr	อ. มโนรมย์ จ. ชัยนาท
CNsbr	อ. สังขละบุรี จ. ชัยนาท
CNspy	อ. ชัยพยา จ. ชัยนาท
CPksb	อ. เกษตรสมบูรณ์ จ. ชัยภูมิ
CPm	อ. เมือง จ. ชัยภูมิ
CRp	อ. พาน จ. เชียงราย
HM65BK	เขตห้วยขวาง จ. กรุงเทพมหานคร (ตัวอย่างสมองคน)
HM88BKjj	เขตจตุจักร จ. กรุงเทพมหานคร (ตัวอย่างสมองคน)
HM208BKpv	เขตประเวศ จ. กรุงเทพมหานคร (ตัวอย่างสมองคน)
HMS241CL	อ. เมือง จ. ชลบุรี (ตัวอย่างสมองคน)
HMS223RY	อ. แกลง จ. ระยอง (ตัวอย่างสมองคน)
HMS152S	อ. โศกขันธ์ จ. ศรีสะเกษ (ตัวอย่างสมองคน)
JBm	อ. เมือง จ. จันทบุรี

KBkn	อ. เขาพนม จ. กระบี่
KBkt	อ. คลองถม จ. กระบี่
KBlt	อ. ลำทับ จ. กระบี่
KJpnt	อ. พนมทวน จ. กาญจนบุรี
KJtm	อ. ท่าเหมือง จ. กาญจนบุรี
KJtmk	อ. ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี
KKcp	อ. ชุมแพ จ. ขอนแก่น
KKksk	อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น
KKm	อ. เมือง จ. ขอนแก่น
KKnp	อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น
KKp	อ. พล จ. ขอนแก่น
KKppm	อ. ภูผาม่าน จ. ขอนแก่น
KKwn	อ. วังน้อย จ. ขอนแก่น
KPlkb	อ. ลานกระบือ จ. กำแพงเพชร
KSm	อ. เมือง จ. กาฬสินธุ์
KStkt	อ. ท่าคันโท จ. กาฬสินธุ์
Lack	อ. เชียงขวัญ จ. ร้อยเอ็ด

LAsp	อ. เศรษฐุมิ จ. ร้อยเอ็ด
LBtv	อ. ท่าวัง จ. ลพบุรี
LPAm	อ. เมือง จ. ลำปาง
LPm	อ. เมือง จ. ลำพูน
LPmt	อ. แม่ท่า จ. ลำพูน
LYtl	อ. ท่าลี่ จ. เลย
MDdt	อ. คอนตาล จ. มุกดาหาร
MDm	อ. เมือง จ. มุกดาหาร
MHms	อ. แม่สะเรียง จ. แม่ฮ่องสอน
MHsm	อ. สบเมย จ. แม่ฮ่องสอน
NBbbt	อ. บางบัวทอง จ. นนทบุรี
NBbk	อ. บางกรวย จ. นนทบุรี
NBby	อ. บางใหญ่ จ. นนทบุรี
NBm	อ. เมือง จ. นนทบุรี
NBpk	อ. ปากเกร็ด จ. นนทบุรี
NBtn	อ. ไทรน้อย จ. นนทบุรี
NKbk	อ. บึงกาฬ จ. หนองคาย
NKsps	อ. โสพิสัย จ. หนองคาย

NLns	อ. หนองสัง จ. หนองบัวลำภู
Nm	อ. เมือง จ. น่าน
NNm	อ. เมือง จ. นครนายก
NPbl	อ. บางเลน จ. นครปฐม
NPm	อ. เมือง จ. นครปฐม
NPncs	อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม
NPpmt	อ. พุทธมณฑล จ. นครปฐม
NPsp	อ. สามพัน จ. นครปฐม
NRbl	อ. บ้านเหลื่อม จ. นครราชสีมา
NRht	อ. ห้วยแถลง จ. นครราชสีมา
NRm	อ. เมือง จ. นครราชสีมา
NRpc	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
NRpm	อ. พิมาย จ. นครราชสีมา
NScs	อ. ชุมแสง จ. นครสวรรค์
NSly	อ. ลาดยาว จ. นครสวรรค์
NSm	อ. เมือง จ. นครสวรรค์

NStk	อ. ตาคลี จ. นครสวรรค์
NSstk	อ. ท่าตะโก จ. นครสวรรค์
NTcp	อ. จุฬาภรณ์ จ. นครศรีธรรมราช
NTcw	อ. ชวาง จ. นครศรีธรรมราช
NTht	อ. หัวไทร จ. นครศรีธรรมราช
NTlsk	อ. ลานสกา จ. นครศรีธรรมราช
NTrpb	อ. ร่อนพิบูลย์ จ. นครศรีธรรมราช
NTts	อ. ทุ้งสง จ. นครศรีธรรมราช
NYm	อ. เมือง จ. นครนายก
PBm	อ. เมือง จ. เพชรบุรี
PBnyp	อ. หนองหญ้าปล้อง จ. เพชรบุรี
PBm	อ. เมือง จ. ปราจีนบุรี
PBtp	อ. ทับปัด จ. ปราจีนบุรี
PCbmn	อ. บางมูนาก จ. พิจิตร
PCm	อ. เมือง จ. พิจิตร
PJsry	อ. สามร้อยยอด จ. ประจวบคีรีขันธ์
PJm	อ. เมือง จ. ประจวบคีรีขันธ์

PLkcs อ. เขาชัยสร จ. พัทลุง

PLm อ. เมือง จ. พัทลุง

PLpb อ. ป่าบอน จ. พัทลุง

PLppy อ. ป่าไผ่ จ. พัทลุง

Pm อ. เมือง จ. เพชร

PNbrk อ. บางระกำ จ. พิษณุโลก

PNnm อ. โนนมะปราง จ. พิษณุโลก

PRcd อ. ชนแดน จ. เพชรบูรณ์

PRls อ. หล่มสัก จ. เพชรบูรณ์

PRm อ. เมือง จ. เพชรบูรณ์

PTkl อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี

PTllk อ. ลำลูกกา จ. ปทุมธานี

PTm อ. เมือง จ. ปทุมธานี

PTns อ. หนองเสือ จ. ปทุมธานี

PTtyb อ. ชัยบุรี จ. ปทุมธานี

PYp อ. ป่ง จ. เพาะ

RBbp อ. บ้านโป่ง จ. ราชบุรี

RBm	อ.เมือง จ. ราชบุรี
RBpt	อ. ปากท่อ จ. ราชบุรี
RBptr	อ. โพธาราม จ. ราชบุรี
RNm	อ. เมือง จ. ระนอง
RYm	อ. เมือง จ. ระยอง
SBdc	อ. ค่ายช้าง จ. สุพรรณบุรี
SBm	อ.เมือง จ. สุพรรณบุรี
SBspn	อ. สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี
SEkh	อ. ขุนหาญ จ. ศรีสะเกษ
SEktr	อ. กันทรลักษ์ จ. ศรีสะเกษ
SHlb	อ. อินทร์บุรี จ. สิงห์บุรี
SKapt	อ.อรัญประเทศ จ. สระแก้ว
SKhy	อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
SKm	อ.เมือง จ. สงขลา
SKsd	อ. สะเดา จ. สงขลา
SLm	อ. เมือง จ. สกลนคร
SMm	อ. เมือง จ. สมุทรสงคราม

SNcb	อ. ชัยบุรี จ. สุราษฎร์ธานี
SNks	อ. เคียนสา จ. สุราษฎร์ธานี
SNps	อ. พระแสง จ. สุราษฎร์ธานี
SNws	อ. เวียงสะ จ. สุราษฎร์ธานี
SPbp	อ. บางพลี จ. สมุทรปราการ
SPm	อ. เมือง จ. สมุทรปราการ
SPppd	อ. พระประแดง จ. สมุทรปราการ
SPpsj	อ. พระสมุทรเจดีย์ จ. สมุทรปราการ
SRm	อ. เมือง จ. สตูล
SRrbr	อ. รัตนบุรี จ. สุรินทร์
SRskp	อ. สิงขรภูมิ จ. สุรินทร์
SRsn	อ. สนม จ. สุรินทร์
SSktb	อ. กระทุ่มแบน จ. สมุทรสาคร
SSm	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร
STm	อ. เมือง จ. สตูล
SUkkl	อ. คลองไทรทอง จ. สุโขทัย

SUkrm	อ. คีรีมาส จ. สุโขทัย
SUm	อ.เมือง จ. สุโขทัย
SUsk	อ. สวรรคโลก จ. สุโขทัย
SUsn	อ. ศรีนคร จ. สุโขทัย
SUssn	อ. ศรีสัชนาลัย จ. สุโขทัย
SUssr	อ. ศรีสำโรง จ. สุโขทัย
TRhy	อ. ห้วยยอด จ. ตรัง
TRkt	อ. กันตัง จ. ตรัง
TRpl	อ. ปะเหลียน จ. ตรัง
TRrd	อ. รัชฎา จ. ตรัง
UBbt	อ. บุณฑริก จ. อุบลราชธานี
UBdud	อ.เดชอุดม จ. อุบลราชธานี
UBvrc	อ.วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี
UDm	อ.เมือง จ. อุตรดิตถ์
UDts	อ.ทองแสนขัน จ. อุตรดิตถ์
UMhsp	อ.หัวตะพาน จ. อำนาจเจริญ

UMm	อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ
UTbr	อ. บ้านไร่ จ. อุทัยธานี
UThk	อ. ห้วยยอด จ. อุทัยธานี
UTth	อ. ทับทัน จ. อุทัยธานี
UTm	อ. เมือง จ. อุทัยธานี
YLbns	อ. บันนังสตา จ. ยะลา
YLm	อ. เมือง จ. ยะลา
YLrm	อ. รามัน จ. ยะลา
YSm	อ. เมือง จ. ยโสธร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคพิษสุนัขบ้าเกิดจากเชื้อ rabies virus จัดอยู่ใน family Rhabdoviridae, genus lyssavirus เป็น RNA virus ชนิด non-segmented negative single stranded RNA จัดอยู่ใน genotype1, serotype1 มีรูปร่างเป็น bullet-shaped และมี helical nucleocapsid (NC) หรือ ribonucleoprotein (RNP) อยู่ตรงกลาง ส่วนของ genome structure ประกอบด้วย nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G) และ RNA-dependent RNA polymerase(L) ²

โรคพิษสุนัขบ้าสามารถพบได้ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ที่เป็นพาหะนำโรคส่วนมากคือ สุนัข จำแนกโรคตามอาการได้ 2 ลักษณะ คือ กลุ่มอาการ classic rabies หรือ furious rabies พบได้ 80% โดยคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อจะแสดงอาการผิดปกติของการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ มีน้ำลายมากผิดปกติ ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อในระบบประสาทอัตโนมัติ เช่นใน hypothalamus, spinal cord และ autonomic ganglia ประมาณ 50-80% ของกลุ่มอาการ furious rabies จะมีอาการกลัวน้ำ (hydrophobia) เมื่อเข้าสู่ระยะ โคม่ามีอาการอัมพาต กล้ามเนื้ออ่อนแรง กลุ่มอาการ paralytic rabies คนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อมีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง วินิจฉัยอาการทางคลินิกทำได้ยากและมีอาการเส้นประสาทและไขสันหลังอักเสบแบบจับปล้น ในผู้ป่วย paralytic rabies พบว่า lymphocytes ไม่ตอบสนองต่อ rabies virus antigen และมี serum cytokines เช่น interleukin - 6 และ soluble interleukin - 2 receptor ต่ำกว่าปกติ ¹⁵

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าในคนและสัตว์สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การ การตรวจหาเชื้อ หรือ antigen โดยวิธี Direct fluorescent antibody technique (DFA), Mouse inoculation technique (MIT), Tissue culture infection technique (TCIT), RT-PCR และ NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) และ Real-time PCR โดยวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งเป็นศูนย์ชั้นสูงตรโรคในคนของกระทรวงสาธารณสุขได้แก่วิธีทางอณูชีววิทยา NASBA, RT-PCR และ Real - time PCR ที่มีการพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหา RNA จากตัวอย่างน้ำลาย ปัสสาวะ น้ำไขสันหลังและเนื้อสมอง ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าในคนขณะที่ผู้ป่วยยังมีชีวิตอยู่³⁶

ปัจจุบัน Real - time PCR สามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสอื่นๆ เช่น Dengue virus, Respiratory syncytial virus, Rift valley fever virus, ไวรัสใน genus lyssavirus รวมทั้งไวรัสพิษสุนัขบ้า^{2, 9, 10, 19} ทั้งนี้เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นคือ มีความรวดเร็วในการตรวจ (rapidity) ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี TaqMan real-time one step RT-PCR ใช้หลักการการทำงานของ TaqMan probe หรือ exonuclease probe ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้าง complementary strand DNA และเกิด การตัดสายของ probe ที่เกาะอยู่ในตำแหน่งคู่สมจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' ทำให้สาร fluorescence ที่เป็น reporter ซึ่งเคยถ่ายทอดพลังงานให้กับ quencher ถูกปลดปล่อยออกมา และปล่อยสัญญาณ (signal) จึงสามารถตรวจวัดได้ ในขณะที่มีการสร้าง DNA สายใหม่³¹

จากรายงานที่ผ่านมามีการตรวจวินิจฉัยเนื้อสมองสุนัขด้วยวิธี TaqMan real-time PCR มีความรวดเร็ว (rapidity) และความจำเพาะ (specificity) สูงกว่าวิธี hemi-nested PCR และ one step RT-PCR จึงเหมาะสำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าและไวรัสหลายชนิดในกลุ่ม negative-stranded RNA viruses และ lyssavirus เป็นต้น¹⁹

จากการศึกษาของ Hughes et al, 2004¹⁹ พบว่าวิธี TaqMan PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า เมื่อมีการผันแปรทางพันธุกรรมของ target sequence โดยเฉพาะในตำแหน่งที่เกิด mismatches ระหว่าง primer และ/หรือ probe กับ target sequence จะมีผลต่อปฏิกิริยา amplification การเกิด point mutation ในตำแหน่งกลางของ probe จะมีผลต่อการ binding อาจทำให้ผลการตรวจเป็นลบได้¹⁰

จากรายงานการศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล (Molecular epidemiology) ในตำแหน่ง nucleoprotein (N) gene ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ในเขตกรุงเทพมหานครและทั่วประเทศไทย โดยการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่างสมองคนและสัตว์จำนวน 239 ตัวอย่าง ที่แยกได้ระหว่างปี ค.ศ.1998-2002 และจัดกลุ่ม phylogenetic tree มีการกระจายของกลุ่มไวรัสต่างๆ มีความสัมพันธ์กับเขตภูมิประเทศจำเพาะ โดยที่สามารถจัดไวรัสได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือกลุ่ม TH1 และ TH2 โดยกลุ่ม TH1 แบ่งเป็น 3 subgroups พบในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ภาคเหนือ ภาคกลาง กลุ่ม TH2 แบ่งเป็น 8 subgroups พบในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ ภาคใต้⁹

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธี TaqMan real-time one step RT-PCR โดยออกแบบ primers และ probe จากข้อมูล sequence ของ N gene ของไวรัส 239 ตัวอย่าง ทั้งนี้มีการจำแนกกลุ่มตามความแตกต่างทางพันธุกรรมของ N gene⁹ จากนั้นทำการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับลักษณะของการเกิด mismatch ของลำดับเบสในตำแหน่งของ primer และ probe ที่ใช้ในปฏิกิริยา TaqMan real-time one step RT-PCR ประโยชน์ที่ได้รับคือสามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยร่วมกับวิธี DFA test ในตัวอย่างสมองสุนัข ที่มักจะเกิดปัญหาผลลบปลอมหากตัวอย่างเนื้อสมองมีสภาพเน่าหรือเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องนานเกินกว่า 24 ชั่วโมง

2. วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี TaqMan real – time one step RT- PCR

3. คำถามการวิจัย

Primers และ probe ในตำแหน่ง N gene ที่ออกแบบสำหรับวิธี TaqMan real – time one step RT- PCR สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าจากเนื้อสมองสุนัขในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านได้หรือไม่

4. สมมติฐาน

วิธี TaqMan real – time one step RT- PCR โดยใช้ primer และ probe ที่มีความจำเพาะในตำแหน่ง N gene สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าที่พบในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านได้

5. คำสำคัญ

rabies virus, diagnosis, real-time PCR, brain tissue, TaqMan probe

6. ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

- 6.1 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของ primer และ probe และข้อจำกัดของการตรวจเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค TaqMan Real-time PCR
- 6.2 เพื่อประเมินผลลบปลอม (false negative) หากใช้เทคนิค real-time PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าในประเทศไทย
- 6.3 พัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อสนับสนุนวิธีการตรวจมาตรฐาน DFA ที่ใช้ในการตรวจหัวสุนัขที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ที่อาจให้ผลลบหรือผลบวกปลอม

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคพิษสุนัขบ้า (Rabies)

โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคสมองอักเสบที่มีมาแต่โบราณ เกิดจากการติดเชื้อไวรัส ในกลุ่ม *Lyssavirus* ซึ่งประกอบด้วย 7 genotypes ได้แก่ rabies virus, lagos bat virus (LBV), Mokola virus (MOK), Duvenhage virus (DUV), European bat virus type 1 (EBV-1), European bat virus type 2 (EBV-2), and Australian bat virus (ABV)^{27, 37} โรคพิษสุนัขบ้าที่เกิดจากไวรัสใน genotype ที่ 1 หรือ classic rabies เป็นกลุ่มสำคัญและทำให้เกิดโรคมามากที่สุด ในประเทศด้อยพัฒนา ซึ่งขาดความรู้ในการป้องกันโรค โดยเฉพาะในเอเชีย²⁷ จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) ในปี พ.ศ. 2541 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคพิษสุนัขบ้า 32,451 ราย ต่อปี (เฉพาะในประเทศอินเดีย 30,000 คน) มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคพิษสุนัขบ้ามากกว่า โรคไข้เหลือง ไข้เลือดออก และ ไข้สมองอักเสบ ประชากรมากกว่า 7 ล้านคนทั่วโลกต้องได้รับการรักษาหลังจากถูกสุนัขติดเชื้อกัด ในประเทศที่ด้อยพัฒนา ความรุนแรงของโรคทวีมากขึ้นเนื่องจากขาดความตระหนักของสังคม ขาดการดูแลด้าน สุขอนามัยและการป้องกันโรค และรัฐบาลไม่ได้ตระหนักถึงแนวทางป้องกันโรค ข้อยกจำกัดในการตรวจวินิจฉัย ความซับซ้อนของโรค การอพยพของประชากรอย่างรวดเร็ว ไม่มีการเก็บบันทึกข้อมูลที่ถูกต้อง ทำให้ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาไม่น่าเชื่อถือ¹⁵

ไวรัสพิษสุนัขบ้า (Rabies Virus)

เชื้อ rabies virus อยู่ใน family Rhabdoviridae genus lyssavirus เป็น RNA virus ชนิด non - segmented negative single stranded RNA จัดอยู่ใน genotype1 serotype 1 มีรูปร่างเป็น bullet-shaped ที่มี helical nucleocapsid (NC) หรือ ribonucleoprotein (RNP) อยู่ตรงกลาง มีขนาด กว้าง 70 nm ยาว 200 nm ส่วนของ genome structure ประกอบด้วย nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G) และ RNA - dependent RNA polymerase (L)^{16,17} ซึ่ง rabies virus จะมีการ replication, transcription และ translation ใน cytoplasm และ release ส่วนของ virion ออกนอกเซลล์ มีองค์ประกอบในการ penetration อยู่บริเวณผิวและมี receptor หลายชนิดรวมทั้ง nicotinic acetylcholine, low-affinity nerve-growth-factor receptors และ gangliosides ไวรัสในจีนัส lyssaviruses สามารถนำมาเลี้ยงใน cell culture ในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ใต neuroblastoma cells และ Vero cells³⁰

อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกแบ่งเป็น 2 กลุ่มอาการคือ Classical rabies และ Nonclassical rabies ในกลุ่ม Classical rabies แบ่งเป็น Classical furious และ Paralytic rabies โดยพบหลังการติดเชื้อจากสุนัขและแมว (genotype 1) Nonclassical rabies พบหลังการติดเชื้อจากค้างคาว (genotype 1, 5, 6 หรือ 7)¹⁵ อาการทางคลินิกของกลุ่ม Classical rabies แบ่งเป็น 5 ระยะคือ 1. Incubation period 2. Prodrome 3. Acute neurological phase 4. Coma และ 5. Death^{14, 17, 20}

กลุ่มอาการ furious rabies พบได้ 80% ของทั้งหมด ระยะการดำเนินโรคโดยเฉลี่ย 5 วัน ในคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อจะมีน้ำลายมากผิดปกติ อาจมีน้ำตาไหล หายใจลำบาก มีอาการเกร็งที่กล้ามเนื้อคอ การติดเชื้อจะกระจายทั่วไปในระบบประสาทอัตโนมัติที่ตั้งแต่ใน hypothalamus, spinal cord

และ autonomic ganglia มีอาการกลัวน้ำ (hydrophobia) กลัวลม (aerophobia) เมื่อเข้าสู่ระยะ โคม่าจะมีอาการอัมพาตของกล้ามเนื้อ การวินิจฉัย furious rabies ต้องมีอาการครบทั้ง 3 ประการคือ

1. Fluctuation of consciousness ผู้ป่วยจะมีอาการสลับเปลี่ยนระหว่างสภาวะของการรู้ตัวที่ปกติ กับ อาการตื่นเต้นกระวนกระวายต่อสิ่งเร้าไม่ว่าจะเป็นแสง เสียง เมื่อโรคทวีความรุนแรงขึ้นผู้ป่วยอาจจะ อาละวาดได้ ระหว่างที่ผู้ป่วยกลับอยู่ในสภาวะปกติจะสามารถพูดคุยได้ สภาพเช่นนี้จะดำเนินไป ประมาณ 2-3 วัน แล้วผู้ป่วยจะมีอาการซึมจนต่อมาไม่รู้สีกตัว ในระยะ 24 ชั่วโมงสุดท้ายเริ่มมีความคัน โลहितดำ ช็อค และอาจอาเจียนเป็นเลือด
2. Phobic spasms ได้แก่ อาการกลัวน้ำ กลัวลม จะเห็นได้ ชัดขณะที่ผู้ป่วยรู้สึกตัวเท่านั้น เมื่อผู้ป่วยเริ่มซึมอาการนี้จะหายไป
3. อาการทาง Autonomic stimulation ได้แก่ อาการขนลุกเป็นบางส่วนหรือทั้งตัว รุ่มาตามีสภาพไม่ตอบสนองต่อแสง และอาจ ขยายเต็มที่หรือหดตัวเต็มที่ เป็นระยะสั้นๆ และที่สำคัญคือมี น้ำลายมากผิดปกติ^{15, 17, 20}

กลุ่มอาการ paralytic rabies มีอาการไม่จับปล้นระยะการดำเนินโรคช้า โดยเฉลี่ยผู้ป่วย เสียชีวิตใน 11 วัน ประมาณ 50 % ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีอาการกลัวน้ำ แขนขาอ่อนแรง หรือมีอาการ คล้าย Guillain Barre syndrome (GBS) ในกรณีที่ได้รับเชื้อจากการกัดที่ใบหน้า กล้ามเนื้อในตา และกล้ามเนื้อใบหน้าอ่อนแรง การวินิจฉัยอาการทางคลินิกทำได้ยาก โดยมีอาการเส้นประสาทและไข สันหลังอักเสบแบบเฉียบพลัน lymphocyte ไม่ตอบสนองต่อ rabies virus antigen รวมทั้งมี serum cytokines เช่น interleukin-6 และ soluble interleukin - 2 receptor ระดับต่ำกว่าปกติ^{15, 16, 17, 20}

ระบาดวิทยา

จากรายงานขององค์การอนามัยโลกพบว่ามีผู้เสียชีวิตด้วยโรคพิษสุนัขบ้าจากทั่วโลกประมาณ 50,000 รายต่อปี²⁴ ในประเทศไทยถึงแม้จะมีจำนวนผู้เสียชีวิตด้วยโรคพิษสุนัขบ้าลดลงจาก 200 คน ในปี พ.ศ. 2539 เหลือน้อยกว่า 26 คน ในปี พ.ศ. 2549 แต่มีจำนวนมากกว่า 500,000 คน ที่ถูก

สุนัขกัดและต้องได้รับวัคซีนเปรียบเทียบกับในปี พ.ศ. 2534 ที่มีผู้ได้รับวัคซีนเพียง 90,000 คน [Ministry of Public health (MOPH) report] ในประเทศไทยยังขาดการควบคุมสุนัขรวมทั้งการให้วัคซีนแก่สุนัขยังไม่เพียงพอ ดังเช่น แนวทางควบคุมและป้องกันโรคโดยการฉีดวัคซีนให้สุนัขในเขตตัวเมืองครอบคลุม 60-78% ในจำนวนประชากรสุนัขทั้งหมด 600,000 ตัว ซึ่งในปี พ.ศ. 2545 การสำรวจพบสุนัขจรจัดในเขตชุมชน เขตกรุงเทพฯ และปริมณฑลยังพบว่ามีจำนวนมากที่ไม่ได้รับวัคซีน⁹

จากรายงานการศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล (Molecular epidemiology) โดยใช้ตำแหน่ง N gene ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในเขตกรุงเทพมหานครและจากหลายพื้นที่ทั่วประเทศ จากการวิเคราะห์ nucleoprotein sequences ของเชื้อไวรัสจากคนและสัตว์ที่เสียชีวิตจากโรคพิษสุนัขบ้า จำนวน 239 ตัวอย่าง ระหว่างปี 2541-2545 และนำมาจัดกลุ่ม phylogenetic tree โดยสัมพันธ์กับภูมิประเทศที่ศึกษา พบว่าสามารถจัดกลุ่มไวรัสได้เป็น 2 กลุ่มคือ TH1 และ TH2 (รูปที่ 1) โดยกลุ่ม TH1 แบ่งเป็น 3 subgroups พบในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง กรุงเทพมหานครและปริมณฑล กลุ่ม TH2 แบ่งเป็น 8 subgroups พบในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้⁹

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย

1. Direct fluorescent antibody (DFA) เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจวินิจฉัยเนื้อสมองสุนัขโดยนำส่วน brain stem, spinal cord, cerebellum และ hippocampus มาทำ impressions smear บน glass slide, fixed ด้วย acetone และย้อมด้วย fluorescein isothiocyanate ที่ labeled ด้วย polyclonal หรือ monoclonal antibody¹

2. Mouse inoculation technique (MIT) เป็นวิธีที่ใช้ยืนยันผลจากวิธี DFA test ซึ่งจะใช้หนูในการทดสอบ โดยฉีด 20% tissue suspension เข้าสมองหนูอายุ 3-6 สัปดาห์ สังเกตอาการหลังจากฉีด หลังจากนั้นจึงตรวจหา viral antigen ในสมองหนูที่ติดเชื้อ วิธีนี้ใช้ในการตรวจหาไวรัสที่มีปริมาณน้อยและใช้กับตัวอย่าง DFA ที่ให้ผลเป็น weakly positive หรือ false-negative²⁹
3. Tissue culture infection technique (TCIT) พัฒนาสำหรับการตรวจหา viral antigen มีคุณสมบัติเหมือนกับวิธี MIT แต่ใช้เวลาน้อยกว่าแต่เสียค่าใช้จ่ายสูงกว่า พบว่าทั้งสองวิธีนี้มีข้อจำกัดที่ตัวอย่างต้องอยู่ในสภาพแช่แข็ง -80 °C และไม่มีสิ่งปนเปื้อนมิฉะนั้นจะให้ผลลบปลอม³⁹
4. วิธีทางอณูชีววิทยา โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (RNA) ของไวรัส เพื่อให้มีความไวในการตรวจมากขึ้น ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคหลายชนิดมาใช้ในการตรวจ เช่น Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)³⁸, Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)⁶ และ Real-time PCR^{19, 38} ซึ่งเทคนิคนี้มีข้อดีกว่าวิธี MIT และ TCIT คือใช้ระยะเวลาในการตรวจสั้นกว่าและสามารถตรวจหาไวรัสที่มีปริมาณน้อย และสามารถใช้กับตัวอย่างที่หลากหลาย เช่น เนื้อสมอง skin biopsy น้ำลาย น้ำไขสันหลัง ปมรากผม และน้ำปัสสาวะ^{6, 19, 38}

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าในผู้ป่วยทางห้องปฏิบัติการมีข้อจำกัดดังนี้

1. การหาระดับแอนติบอดี (antibody) ด้วยวิธี RFFIT ในตัวอย่าง เลือด EDTA และน้ำไขสันหลัง มีข้อจำกัดคือ มีความไวต่ำ โดยเฉลี่ยให้ผลบวกประมาณ 25% ของผู้ป่วยในประเทศไทยทั้งหมดที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า ซึ่งไม่มีประวัติการได้วัคซีน และให้ผลลบทั้งหมดในน้ำไขสันหลัง
2. การตรวจตัวเชื้อไวรัสด้วยวิธี virus isolation ในเซลล์เพาะเลี้ยง ในตัวอย่าง น้ำลาย และเนื้อสมอง (brain, biopsy, autopsy, necropsy) มีข้อจำกัดคือ ตัวอย่างตรวจจะต้องอยู่ในสภาพแช่แข็งตลอดเวลา แต่คนไข้ที่มีระดับ antibody ในเลือดมักให้ผลลบต่อการตรวจด้วยวิธีนี้ในน้ำลาย

3. การตรวจ antigen ด้วยวิธี fluorescent antibody technique (FAT) ในตัวอย่าง กระจกตา hair follicle ที่ได้จากการตัดจากชิ้นเนื้อบริเวณท้ายทอยที่ติดปรอทผสม (neck skin biopsy) และเนื้อสมอง มีข้อจำกัดคือ การตรวจตัวอย่างจากกระจกตามีความยุ่งยากในการเก็บตัวอย่าง มีความไวต่ำมาก และให้ผลบวกปลอมสูง การตรวจหา neck skin biopsy ให้ผลบวกสูง(ประมาณ 60-80%) แต่ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติเนื่องจากต้องใช้น้ำแข็งแห้งในการเก็บตัวอย่างและต้องใช้ frozen section และมีการอ่านผลโดยใช้ FAT ซึ่งต้องมีความระมัดระวัง และความชำนาญสูง, สำหรับการตรวจจากเนื้อสมองมีความแม่นยำและความจำเพาะสูงที่สุดแต่ต้องตรวจภายใน 24 ชั่วโมง สำหรับประเทศไทยซึ่งมีอาการร่วมของโรค

4. การตรวจด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา (molecular technique) โดยวิธี RT-PCR และ NASBA ในตัวอย่าง น้ำลาย น้ำไขสันหลัง น้ำปัสสาวะ เนื้อสมอง และ hair follicle มีข้อจำกัดคือ ต้องการความเชี่ยวชาญและความระมัดระวังมาก และไวรัสอาจมี sequence ไม่ตรงกับ primer และ probe ³⁷ ที่ใช้ในการตรวจ

หลักการ Real-time PCR

Real-time PCR หรือ Kinetics PCR เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ การพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหา PCR products ในสารละลายโดยการใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) และการพัฒนาเครื่อง Thermocycler มาเป็นเครื่อง real-time thermocycler โดยเป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR products และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR product ในหลอดปฏิกิริยา ดังนั้นการทำ real-time PCR จึงเป็นการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่สามารถตรวจวัดปริมาณ PCR product ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ

ซึ่งต่างจาก conventional PCR ซึ่งการตรวจวัด PCR products จะทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุดลง¹²

การตรวจวัด PCR product โดยใช้ probe ติดฉลากสาร fluorochrome

การใช้ probe ติดฉลากสาร fluorochrome โดยอาศัยเทคโนโลยีของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ในกรณีที่ต้องการความจำเพาะสูงเช่น การบ่งชี้ single nucleotide mutations ใน DNA เป้าหมาย ซึ่งไม่สามารถกระทำโดยการใช้ SYBR Green I Dye fluorochrome ตัวแรก เรียกว่า quencher จะดูดซับพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงานให้ fluorochrome ตัวที่สอง เรียกว่า reporter dye โดยไม่สูญเสียพลังงานออกสู่ระบบภายนอก เมื่อ reporter molecule ได้รับพลังงานจาก quencher จะปลดปล่อยพลังงานออกมาสู่ระบบภายนอกในรูปของแสง ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)^{32, 35} การติดฉลาก fluorochrome เข้ากับตัว probe เพื่อให้เครื่อง real-time PCR สามารถตรวจจับสัญญาณเรืองแสง อันเกิดจากปฏิกิริยา FRET สามารถทำได้หลายลักษณะเช่น

1. Hybridization probe

โดยการใช้ oligonucleotide probe สายสั้นสองสาย โดยสายแรกติดฉลากที่ปลาย 3' ด้วย fluorescein ทำหน้าที่เป็น quencher และสายที่สองติดฉลากด้วยสาร Red 640 หรือ Red 705 เข้าที่ปลาย 5' ของ oligonucleotide probe สายที่สองจะถูกปิดด้วย phosphate group เพื่อไม่ให้สามารถทำหน้าที่เป็น PCR primer ได้^{22, 41} hybridization probe สามารถนำมาตรวจสอบ amplified products เพื่อบ่งชี้ single point mutation หรือ single nucleotide polymerization (SNP) ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ SYBR Green I ไม่สามารถทำได้³²

2. TaqMan probe

ใช้คุณสมบัติ exonuclease activity ของเอนไซม์ *Taq polymerase* สามารถย่อยดีเอ็นเอสายเดี่ยว ขณะที่ เอนไซม์ *Taq polymerase* สร้างสายใหม่ของดีเอ็นเอจาก primer ในแต่ละ PCR cycle เมื่อสายใหม่ของดีเอ็นเอถูกสร้างเข้ามาถึงตำแหน่งที่ Probe จับกับ template DNA ส่วน 5' nuclease activity ที่อยู่ในเอนไซม์ *Taq polymerase* จะย่อยสายของ probe เนื่องจากเป็น exonuclease ของเอนไซม์ *Taq polymerase* จึงเรียกชื่อ probe นี้ว่า *TaqMan probes* ซึ่งในตอนแรกใช้ปิดผลลากด้วย radioisotope เช่น ^{32}P เมื่อ probe ถูกย่อยด้วย exonuclease จะทำให้ได้ชิ้นส่วนที่ถูกย่อยหลุดออกมา ตรวจพบได้ใน gel electrophoresis ต่อมากลุ่มนักวิจัยจาก Perkin-Elmer ได้ใช้ Fluorescent dye แทน radioisotope ในการปิดผลลาก TaqMan probe ที่ตำแหน่งปลาย 5' และที่ปลาย 3' ของ probe ถูกปิดผลลากด้วย Fluorescence quencher ซึ่งเป็นตัวบดบังการให้สัญญาณของ Fluorescence dye ที่ปลาย 5' ถ้า TaqMan probe นั้นมีความจำเพาะกับผลผลิต PCR ที่ได้ก็จะจับที่ตำแหน่งจำเพาะ เมื่อ *Taq polymerase* สร้างสายใหม่ของดีเอ็นเอจาก primer ในแต่ละ PCR cycle เมื่อสายใหม่ของดีเอ็นเอถูกสร้างเข้ามาถึงตำแหน่งที่ Taqman Probe จับอยู่ ส่วน 5' nuclease activity ที่มีอยู่ในเอนไซม์ *Taq polymerase* จะย่อยสายของ Taq-man probe ทำให้ส่วนของ quencher หลุดและ Fluorescence ที่ปลาย 5' สามารถส่งสัญญาณออกมาวัดได้ เมื่อไม่มี quencher ⁴¹

3. Molecular beacons

Molecular beacons real-time PCR เป็น oligonucleotide probe สามารถบอกความจำเพาะของ nucleic acid ³⁵ ใช้ในการตรวจหา genomic DNA sequences, single nucleotide polymorphisms (SNPs), messenger ribonucleotide acid (mRNA) expression levels และ DNA binding proteins ³² ส่วนของ fluorophore ติดอยู่ที่ปลาย 5' ของ stem และ non fluorescent quencher ติดอยู่ที่ปลาย 3' ของ stem โดย fluorophore และ quencher ใช้ในการ

label ส่วนของ probe ซึ่งประสิทธิภาพของ quencher วัดได้จาก quencher ที่ถ่ายทอดพลังงานและไม่ถ่ายทอดพลังงาน²²



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาเคมีของ fluorogenic 5' nuclease

(1) Polymerization (2) Strand displacement (3) Cleavage (4) Polymerization complete

การออกแบบ primer และ probe สำหรับใช้งานใน TaqMan real - time PCR

จากการศึกษาของ Hughes et al, 2004¹⁹ พบว่า TaqMan real - time PCR เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้า ซึ่งอาศัยความจำเพาะระหว่าง TaqMan primer และ probe ในการ binding กับ target sequence โดยการเกิด mismatches ระหว่าง TaqMan primer และ probe sequence กับ target sequence มากกว่า 4 ตำแหน่ง มีผลต่อปฏิกิริยา amplification ทำให้เกิด probe mismatches หรือ primer mismatches จากผลของ sequence variation จึงพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้ารวมทั้งไวรัสใน genus lyssavirus โดยวิธี TaqMan PCR¹⁹

ในส่วนของ N gene sequence ส่วน conserved ของ viral proteins เป็นบริเวณเป้าหมายที่ใช้ในการออกแบบ primer²¹ โดยเปรียบเทียบ sequence เพื่อดูความเหมือนและความแตกต่างของเบส ใน genotype 1 (rabies virus) กับ genotype 3 (mokola virus)³⁷ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน

ของเบส 80 เปอร์เซ็นต์ โดยขั้นตอนในการออกแบบ primer หรือ probe ต้อง hybridize กับ gene เป้าหมาย¹⁹ ซึ่งไม่มีการเกิด cross-hybridization ในการออกแบบสิ่งที่จะต้องพิจารณาคือ conserve sequence ซึ่งต้องมีความคงตัวของเบส, ค่า melting temperature (Tm) GC content ความยาว primer และ probe²¹

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้งาน TaqMan real-time PCR

TaqMan real-time one step RT-PCR เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสในตัวอย่างเนื้อเยื่อและของเหลวในร่างกาย ซึ่งมีความรวดเร็วและความจำเพาะ เป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม มีประโยชน์ในการแยก rabies virus (genotype 1) ออกจากไวรัส genotype อื่นๆ^{19, 37} Real-time PCR เป็นเทคโนโลยีที่พัฒนาจาก PCR โดยใช้ fluorescence ในการตรวจหาปริมาณของ nucleic acid ซึ่งปริมาณของ nucleic acid วัดได้จาก fluorescence ที่สูงขึ้นในช่วง exponential phase³¹ จากข้อมูลดังกล่าว TaqMan real-time PCR จึงน่าจะมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการบ่งชี้ไวรัสพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์ใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อน ดังเช่นในกรณีของ CVS strain⁹ ซึ่งเป็น laboratory fixed virus ซึ่งเพิ่มจำนวนใน culture cells เป็นจำนวนมากมาโดยพบว่ามีตำแหน่ง mismatch ทั้ง 3 ส่วนคือ forward primer 1 ตำแหน่ง, reverse primer 1 ตำแหน่ง และ probe 4 ตำแหน่ง แต่ก็สามารถ amplify ได้ ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งของ mutation จะพบน้อยมากในตำแหน่งของ primer จึงมีความเป็นไปได้ที่นำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่เป็น street strain ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและสามารถตรวจสอบขั้นต่อไปได้ โดยการนำ amplified product ที่ได้ไปทำ sequencing หรือ การใช้ variant-specific probe เป็นต้น

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการทดลอง

1. ประชากรเป้าหมาย

- 1.1 ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ได้แก่ RNA ของไวรัสที่สกัดแล้วและเนื้อสมองสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้จากสถานเสาวภา ซึ่งทราบข้อมูลพันธุกรรมจากผลงานวิจัยก่อนหน้าในปี พ.ศ. 2541-2545⁹ และ laboratory fixed CVS strain
- 1.2 ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เนื้อสมองสุนัขที่ผ่านการตรวจด้วย DFA ที่ได้จากกรมปศุสัตว์ในปี พ.ศ. 2548 – 2550
- 1.3 ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 3 ได้แก่ RNA ที่สกัดจากปมรากผม (S871) น้ำลาย (U71 และ U121) น้ำปัสสาวะ (U156) กระพุ้งแก้ม (U563) เนื้อสมอง (U640) ของผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ จากประเทศพม่าและกัมพูชาในปี พ.ศ. 2547 – 2549

2. ประชากรตัวอย่าง

- 2.1 กลุ่มศึกษา (case) คือ เนื้อสมองสุนัขที่สกัดแล้วและ RNA ของ fixed CVS strain
 - 2.1.1 ตัวอย่าง สมอง และ RNA ที่สกัดแล้วของศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมองจำนวน 74 ตัวอย่าง และ CVS strain
 - 2.1.2 ตัวอย่างชิ้นเนื้อสมองสุนัขจากกรมปศุสัตว์จำนวน 120 ตัวอย่าง

2.2 กลุ่มควบคุม (control)

- 2.2.1 ตัวอย่างจากเนื้อสมองสุนัขในกลุ่มที่ 1 ที่มี sequence ตรงกับ primer และ probe และให้ผลบวกด้วยวิธี real - time PCR ที่ค่า crossing point อยู่ระหว่าง 20-23 ที่ dilution 1:100
- 2.2.2 ตัวอย่าง negative control ได้แก่ น้ำกลั่นหรือเนื้อสมองสุนัขที่ไม่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

3. การเก็บชิ้นเนื้อ

ตัวอย่างชิ้นเนื้อสมองและ RNA ที่สกัดแล้ว จากสมองสุนัขเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกระทั่งนำมาทดลอง

4. วิธีดำเนินการวิจัย

- 4.1 ออกแบบ primer และ probe โดยใช้ program "Primer Express" ของ ABI system โดยอิงตามข้อมูลของ rabies sequence ที่ได้จาก street strain จากกลุ่มที่ 1
- 4.2 ประเมินความเป็นไปได้ในการนำ primer และ probe จากข้อ 4.1 นำมาใช้กับตัวอย่างที่ได้จากประเทศไทย
- 4.3 จำแนกกลุ่ม rabies virus จากตัวอย่างทั่วประเทศไทย⁹ ตามความเหมือนหรือแตกต่างของรหัสพันธุกรรมในตำแหน่ง primer และ probe ที่ได้จากข้อ 4.1
- 4.4 หา condition ที่เหมาะสมในการทำ TaqMan real - time one step RT- PCR
- 4.5 วิเคราะห์ผล real-time PCR ในตัวอย่างกลุ่มที่ 1 โดยเปรียบเทียบกับลักษณะความเหมือนและความแตกต่างของ nucleotide ในตำแหน่งของ primer และ probe ว่ามีผลต่อการจับของ primer และ hybridization กับ probe อย่างไร

- 4.6 ทดสอบ sensitivity โดยใช้ synthesized RNA ที่มี dilution ในระหว่างความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มที่ 8×10^5 cp/μl และทำ tenfold dilution ตั้งแต่ 8×10^5 ถึง 0.8 cp/μl หรือ 4×10^6 cp/ reaction ถึง 4 cp/ reaction
- 4.7 ทดสอบ specificity โดยใช้ตัวอย่าง RNA ของไวรัสชนิดอื่น (CMV, HSV, VZV, EBV, Enterovirus and Dengue virus) ที่ความเข้มข้น 1×10^3 cp/μl
- 4.8 วิเคราะห์ผล real-time PCR ในตัวอย่างกลุ่มที่ 2 เพื่อเปรียบเทียบกับผลของการตรวจด้วยวิธี DFA
- 4.9 วิเคราะห์ผล real-time PCR ในตัวอย่างกลุ่มที่ 3

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

- 5.1 ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 1 เปรียบเทียบผลการทดสอบกับรหัสพันธุกรรมในตำแหน่ง primer และ probe
- 5.2 ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 2 เปรียบเทียบผลการทดสอบกับผลการตรวจด้วยวิธี DFA
- 5.3 ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 3 เปรียบเทียบผลการทดสอบกับตัวอย่างในประเทศไทย
- 5.4 เปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของ rabies virus ที่พบในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน เพื่อประเมินความน่าจะเป็นไปได้ในการตรวจวัดด้วย primer และ probe ที่ทดสอบ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ออกแบบ primer และ probe โดยใช้ program "Primer Express" ของ ABI system

โดยอิงตามข้อมูลของ rabies sequence ที่ได้จาก street strain

เมื่อออกแบบ primer และ probe ในช่วง region 1211 ถึง 1300 ของ pasture RV N gene (GenBank accession no. M13215) มี sequence ที่ออกแบบดังนี้

forward primer (1129F 5'-CTGGCAGACGACGGAACC-3')

fluorescent probe (RB probe 5'-TCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGG-3')

reverse primers (1218R 5'-GGCTGTCTATACTCGAATCATG-3')

2. ประเมินความเป็นไปได้ในการนำ primer และ probe ใช้ทดสอบกับตัวอย่างที่ได้จากประเทศไทย

เมื่อศึกษา rabies sequence 239 ตัวอย่างทั่วประเทศจากรายงานการวิจัยก่อนหน้า⁹ โดยเปรียบเทียบกับ primer และ probe ที่ออกแบบเพื่อนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยในปฏิกิริยา real-time PCR พบว่า primer และ probe ที่ออกแบบสามารถใช้เป็นตัวแทนในการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างในแต่ละกลุ่มได้ ๑ ตัวอย่างจากผลบวกที่เกิดขึ้นจากการทำ real-time PCR agarose gel electrophoresis และค่า crossing point (C_T)

3. จำแนกกลุ่ม rabies virus จากตัวอย่างทั่วประเทศ⁹ ตามความเหมือนหรือแตกต่าง

ของรหัสพันธุกรรมในตำแหน่ง primer และ probe

จากผลการศึกษา N gene sequence alignment ของตัวอย่าง rabies sequence 239 ตัวอย่างทั่วประเทศ⁹ ทำให้สามารถจัดกลุ่ม rabies virus ตามความเหมือนหรือแตกต่างของรหัสพันธุกรรมในตำแหน่ง primer และ probe ได้เป็น 8 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 กลุ่มที่มีลำดับเบสเหมือนกัน (168 ตัวอย่าง

นำมาตรวจ 26 ตัวอย่าง) กลุ่ม 2 กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันในตำแหน่ง forward primer (25 ตัวอย่างนำมาตรวจ 22 ตัวอย่าง) กลุ่ม 3 กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันในตำแหน่ง probe (29 ตัวอย่างนำมาตรวจ 10 ตัวอย่าง) กลุ่ม 4 กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันในตำแหน่ง reverse primer (7 ตัวอย่างนำมาตรวจ 6 ตัวอย่าง) กลุ่ม 5 กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันในตำแหน่ง forward primer และ probe (2 ตัวอย่างนำมาตรวจ 2 ตัวอย่าง) กลุ่ม 6 กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันในตำแหน่ง forward primer และ reverse primer (2 ตัวอย่างนำมาตรวจ 2 ตัวอย่าง) กลุ่ม 7 กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันในตำแหน่ง probe และ reverse primer (6 นำมาตรวจ 6 ตัวอย่าง) และ กลุ่ม 8 กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันทั้งสามตำแหน่งคือ forward primer, probe และ reverse primer 2 ตัวอย่างคือ laboratory fixed CVS strain และ Pasteur virus strain (PV) นำมาตรวจ 1 ตัวอย่างคือ CVS ซึ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและไม่พบในประเทศไทย

4. Condition ที่เหมาะสมในการทำ TaqMan real - time one step RT- PCR

โดยทดสอบ condition ตาม Qiagen kit และศึกษาจากงานวิจัยก่อนหน้า^{19, 38}

มี condition ที่เหมาะสมดังนี้

Reverse transcription ที่ 50 °C เป็น เวลา 20 นาที จำนวน 1 รอบ,

HotStar Taq DNA polymerase activation (1) 95 °C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ,

Denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 0 วินาที จำนวน 45 รอบ,

Annealing ที่ 60 °C เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 45 รอบ,

Cooling ที่ 50 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ.

5. การวิเคราะห์ผล real-time PCR ในตัวอย่างกลุ่มที่ 1

มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินคุณภาพของ primer และ probe โดยนำ ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัข และ laboratory fixed CVS strain ซึ่งเป็นตัวแทนในการทดลองทั้งหมด 75 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มย่อย 1-7 จำนวน 74 ตัวอย่าง และอยู่ในกลุ่มย่อย 8 จำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งในตัวอย่างกลุ่มย่อย 1-8 จัดอยู่ใน genotype เดียวกันในการจัดกลุ่มย่อยดูได้จาก sequence mismatches ในตำแหน่ง primer และ probe ในกรณีของ CVS ที่ probe ไม่สามารถจับกับ sequence ของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ผลการทดลองที่ได้ให้ผลลบปลอมในการตรวจวินิจฉัย แต่อย่างไรก็ตามสามารถ amplify ได้จาก primer โดยให้ผลบวกในการทดสอบด้วยวิธี gel electrophoresis

1. กลุ่มที่มีลำดับเบสเหมือนกัน

	*	20	*	40	*	60	*	80	*
317SBspn	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
340SBspn	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
358CNsbr	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
389LBm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
425PN	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
354CNhk	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
332SBm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
381NSttk	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
356UTth	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
357UTm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
362CNm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
374CNspy	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
384SHib	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
393LBm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
380UTbr	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
376SHib	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
361NSly	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
363NScs	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
353CNmr	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
351N8m	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
295CPksb3	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
294CPm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
34/43	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
335KJpnt	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
326KJtm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
308KJm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
304NPbl	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
20788m	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
99Ptkl	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
404PLkcs	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAAACGAGAAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
411NTht	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAAACGAGAAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
195NBby	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGAAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
415PLtm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
412SKsd	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
400SKm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
414SKm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
333KJm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
5NBm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
79PTm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
80PTllk	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
81NBtn	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
108PTllk	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
235NBpk	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
C269PTm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
C274BKdd	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
51BKds	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
48BKpyt	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
HM75BK	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
HM88BKjj	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
HM208BKpv	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
21788m	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
218NBbk	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
315NPm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
324NPm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				
263NPm	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGT	GAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90				

CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG

Forward primer

Probe

Reverse primer

รูปที่ 2 แสดง N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่มย่อย 1

```

          *      20      *      40      *      60      *      80      *
465SRm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
466SRrbr : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
464SRskp : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
463SRsn : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
459KSm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
283NRpm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
487UMm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
486UMhsp : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
868Pm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
338xPJm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
302RBpt : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
3168Mm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
313PBnyp : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
355UThk : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
288NRbl : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
8152HM : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
473BRpk : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
485BRpk : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
319PBm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
151SBdc : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
306RBptr : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
282NRpc : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
281NRm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
301RBm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
352N8tk : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
329PBm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
307RBptr : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
349PBm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
406STm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
396YLm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
505KBlt : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
507TRrd : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
515KBlt : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
524KBkn : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
559TRpl : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
578KBkt : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
584TRkt : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
603KBlt : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
595Ylbns : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
656PLppy : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
676KSm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
589YLm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
608SRm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
599TRhy : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
510NTm : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
182CCbnp : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCGGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
87BKsl : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCGGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
270ATvsc : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCGGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
250AYb : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCGGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90
305RBbp : CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG : 90

```

CTGGCAGACGACGGAAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG

Forward primer

Probe

Reverse primer

รูปที่ 3 แสดง N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่มย่อย 1 (คย)

ตาราง 1 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่มย่อย 1 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 26 ตัวอย่าง

Sample No.	RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	C_T value	Results
86SPm	0.183	13.91	Positive
151SBdc	0.187	15.81	Positive
207 SSm	0.357	13.26	Positive
282 NRpc	0.206	13.93	Positive
283 NRpm	0.111	17.80	Positive
288 NRbl	0.146	21.78	Positive
294 CPm	0.065	15.58	Positive
295 CPksb3	0.056	20.96	Positive
303 KJtmk	0.120	13.00	Positive
304 NPbl	0.034	15.79	Positive
306 RBptr	0.041	14.03	Positive
307 RBptr	0.032	14.10	Positive
308 KJm	0.037	16.56	Positive
313 PBnyp	0.038	14.97	Positive
316 SMm	0.059	14.45	Positive
317 SBspn	0.016	16.97	Positive
318 KJtmk	0.028	15.96	Positive
319 PBm	0.053	14.03	Positive
332 SBm	0.061	15.43	Positive
408SKhy	0.051	13.09	Positive
511NTts	0.128	17.91	Positive
513PLM	0.098	13.23	Positive
603 KBlt	0.074	13.35	Positive
608 SRm	0.089	18.12	Positive
773 CMcp	0.066	12.75	Positive
774 NNm	0.136	13.52	Positive

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันในตำแหน่ง forward primer

	*	20	*	40	*	60	*	80	*
495RNm	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
501RNm	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
494RNm	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
493RNm	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
334PJery	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
C267BKbn	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
232NPsp	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
228NBtn	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
222NBbht	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
215NPncs	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
191AYs	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
HM65BK	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
89PTtb	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
95NBtn	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
112PTtyb	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
125ssktb	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
157PJery	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
176ssktb	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
187ssm	:	CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
238Pppd	:	CTGGCAGACGATGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
237NNm	:	CTGGCAGACGATGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
C276BKpv	:	CTGGCAGACGATGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
133ssm	:	CTTCGACGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
67PTtyb	:	ATGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					

CTGGCAGACGACGGGACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG

Forward primer

Probe

Reverse primer

รูปที่ 5 แสดง N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่มย่อย 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 2 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่มย่อย 2 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 22 ตัวอย่าง

Sample No.	RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	C_T value	Results	Mismatches
23SPppd	0.090	15.43	Positive	12(T), 15(G)
HM65BK	0.122	15.77	Positive	15(G)
67 PTtyb	0.040	15.59	Positive	1(A)
89 PTtb	0.091	15.13	Positive	15(G)
95 NBtn	0.036	14.64	Positive	15(G)
112 PTtyb	0.058	15.79	Positive	15(G)
125 SSktb	0.070	13.15	Positive	15(G)
133 SSm	0.162	13.85	Positive	3(T)
157 PJsry	0.076	15.69	Positive	15(G)
176 SSktb	0.027	15.56	Positive	15(G)
187 SSm	0.017	15.89	Positive	15(G)
191 AYs	0.041	12.62	Positive	15(G)
215 NPncs	0.021	16.83	Positive	15(G)
228 NBtn	0.071	14.88	Positive	15(G)
232 NPsp	0.072	15.77	Positive	15(G)
237 NNm	0.027	16.29	Positive	12(T)
C267 BKbkn	0.031	13.49	Positive	15(G)
276 BKpv	0.050	14.83	Positive	12(T)
334 PJsry	0.026	15.28	Positive	15(G)
493 RNm	0.113	12.61	Positive	15(G)
495 RNm	0.222	13.56	Positive	15(G)
501 RNm	0.338	14.17	Positive	15(G)

3. กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันในตำแหน่ง probe

	*	20	*	40	*	60	*	80	*
19/43	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
33/43	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
38/43	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
39/43	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
46/43	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
296CPk _{sb}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
815PB _{ls}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
816PB _{cd}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
769_cn ₄	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
766_cn ₄	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
762PR _m	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
691NK _{bk}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
690NK _{sps}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGACGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
424PN	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
426PN	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
785sU _{kl}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
796PN _{hrk}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
802KP _{lkb}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
811sU _{krm}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
813PN _{hrk}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
801sU _{sk}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAGACTAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
788sU _{sk}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
793sU _{sn}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
794sU _{ssr}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
808sU _{ssn}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCAGTGAACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
500SN _{ks}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
695L _{ack}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					
413sR _{hy}	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG	:	90					

CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG

Forward primer

Probe

Reverse primer

รูปที่ 6 แสดง N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่มย่อย 3

ตาราง 3 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่มย่อย 3 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 10 ตัวอย่าง

Sample No.	RNA($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	C_T value	Results	Mismatches
296CPksb	0.073	14.96	Positive	11(C)
413 SKhy	0.235	22.11	Positive	13(G)
424 PN	0.033	15.25	Positive	30(A)
426 PN	0.090	21.45	Positive	30(A)
500 SNks	0.367	14.99	Positive	23(T)
690 NKsps	0.267	17.77	Positive	11(C)
691 NKbk	0.311	16.72	Positive	11(C)
695 LAck	0.121	19.58	Positive	23(T)
766_cn4	0.110	14.75	Positive	11(C)
769_cn4	0.111	15.92	Positive	11(C)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันในตำแหน่ง reverse primer

	*	20	*	40	*	60	*	80	*
136CLblm :	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTTTATACTCGAATCATG : 90								
8241CL :	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTTTATACTCGAATCATG : 90								
22CBkkm :	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTTTATACTCGAATCATG : 90								
C271BRtv :	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCGAGACTGCTATACTCGAATCATG : 90								
C277BRkt :	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCGAAGCTGCTATACTCGAATCATG : 90								
628Pbp :	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCCGCTATACTCGAATCATG : 90								
26NFPmt :	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTAAGACGAGGAGCCCTAAGGCTGCTATACTGGAATCATG : 90								
	<u>CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGCCCTGAGGCTGCTATACTCGAATCATG</u>								
	Forward primer			Probe			Reverse primer		

รูปที่ 7 แสดง N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่มย่อย 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 4 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่มย่อย 4 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 6 ตัวอย่าง

Sample No.	RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	C_T value	Results	Mismatches
22CBkhm	0.050	15.35	Positive	7(T)
26NPpmt	0.047	16.14	Positive	14(G)
62 SPbp	0.075	16.12	Positive	4(C)
S241CL	0.050	25.87	Positive	7(T)
C271BKrtv	0.205	17.09	Positive	2(A)
277 BKkt	0.096	18.10	Positive	1(A)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันในตำแหน่ง forward primer และ probe

	*	20	*	40	*	60	*	80	*
538Pppd :	CTGGCAGACGAT	GGAACGGTCAATT	GTGATGACGAGGATTA	CTTCTCCGGTGAGAC	GAGGAGCCCT	GAGGCTGTCTATACTCGAATCATG			
156PTns :	CTGGCAGACGAC	GGGACCGTCAATT	CTGATGACGAGGATTA	TTTCTCTGGTGAGACA	AGGAGCCCT	GAGGCTGTCTATACTCGAATCATG			
<u>CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG</u>									
	Forward primer			Probe			Reverse primer		

รูปที่ 8 แสดง N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่มย่อย 5



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 5 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่มย่อย 5 นำตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 2 ตัวอย่าง

Sample No.	RNA($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	C_T value	Results	Mismatches	
				forward primer	probe
53SPppd	0.054	15.36	Positive	12(T),18(G)	P7(G)
156PTns	0.051	18.35	Positive	15(G),	23(T),29(T)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันตำแหน่ง forward primer และ reverse primer

91PTns : TGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTAGAAATCATG : 90
 807UDts : CTGGCAGACGATGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTACACTCGAATCATG : 90

CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG

Forward primer

Probe

Reverse primer

รูปที่ 9 แสดง N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่มย่อย 6



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 6 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่มย่อย 6 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 2 ตัวอย่าง

Sample No.	RNA($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	C_T value	Results	Mismatches	
				forward primer	reverse primer
91PTns	0.053	14.64	Positive	1(T)	14(A)
807UDts	0.058	14.56	Positive	12(T)	10(C)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. กลุ่มที่มีลำดับเบสต่างกันตำแหน่ง probe และ reverse primer

* 20 * 40 * 60 * 80 *
 806PNrm : CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGATGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTACACTCGAATCATG : 90
 814UDm : CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGATGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTACACTCGAATCATG : 90
 804UDm : CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGATGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTACACTCGAATCATG : 90
 800Udm : CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGATGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTACACTCGAATCATG : 90
 778LBtv : CTGGCAGACGACGGAACCGTTAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTTTATACTCGAATCATG : 90
 779N8ly : CTGGCAGACGACGGAACCGTTAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTTTATACTCGAATCATG : 90

CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG

Forward primer

Probe

Reverse primer

รูปที่ 10 แสดง N gene sequence alignment ของ rabies virus กลุ่มย่อย 7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 7 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่มย่อย 7 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 6 ตัวอย่าง

Sample No.	RNA($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	C_T value	Results	Mismatches	
				probe	reverse primer
778LBtv	0.115	21.20	Positive	2(T)	7(T)
779NSly	0.024	17.93	Positive	2(T)	7(T)
800 Udm	0.017	15.93	Positive	14(T)	10(C)
804 Udm	0.026	15.52	Positive	14(T)	10(C)
806 PNnm	0.090	18.24	Positive	14(T)	10(C)
814 Udm	0.064	15.27	Positive	14(T)	10(C)



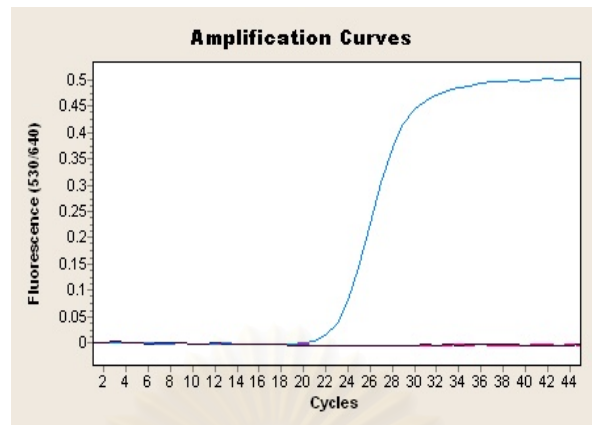
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 8 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขกลุ่มย่อย 8 นำมาตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR 1 ตัวอย่าง

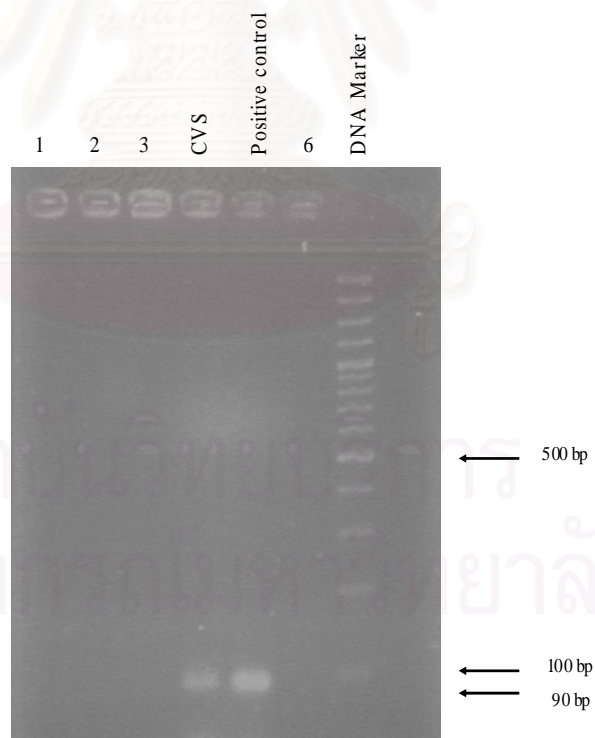
Sample	RNA (pg/ μ l)	Results	Mismatches		
			forward primer	probe	reverse primer
CVS	0.04	Negative	9(T)	5(C),20(C), 23(T),29(T)	1(A)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 การตรวจวินิจฉัย CVS ด้วยวิธี TaqMan real-time PCR ให้ผลลบ



รูปที่ 13 การวิเคราะห์ CVS ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

แสดงว่า primer สามารถจับ target gene ได้ และสามารถ amplify ได้จากปฏิกิริยา PCR

6. การตรวจวัด sensitivity

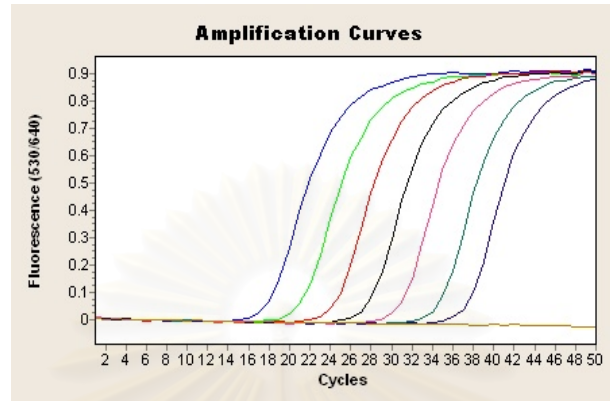
โดยเมื่อนำ standard rabies RNA(synthesized) ที่ความเข้มข้น 8×10^5 cp/ μ l ทำ tenfold dilution ตั้งแต่ 8×10^5 ถึง 0.8 cp/ μ l หรือ 4×10^6 cp/ reaction ถึง 4 cp/ reaction จากนั้นนำ standard ทั้งหมด 7 dilution ทำ real-time PCR ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 9, รูปที่ 14 และ 15

ตาราง 9 แสดงผลการตรวจวัด sensitivity

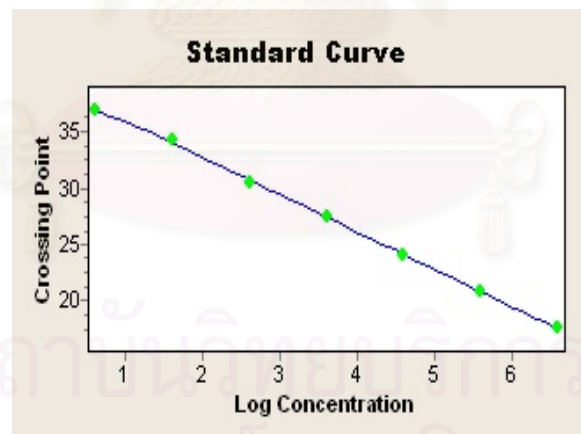
Rabies RNA synthesized(Conc)	Tenfold dilution	Crossing Point	Cal. copy	Standard
1. 4×10^6 cp/ reaction	undiluted	17.54	3.71E6	4.00E6
2. 4×10^5 cp/ reaction	1:10	20.74	4.11E5	4.00E5
3. 4×10^4 cp/ reaction	1:10 ²	24.08	4.06E4	4.00E4
4. 4×10^3 cp/ reaction	1:10 ³	27.36	4.15E3	4.00E3
5. 4×10^2 cp/ reaction	1:10 ⁴	30.56	4.51E2	4.00E2
6. 40 cp/ reaction	1:10 ⁵	34.23	3.52E1	4.00E1
7. 4 cp/ reaction	1:10 ⁶	36.96	4.00E0	4.00E0
9. Neg	-	-	-	-

ผลการวิเคราะห์

จากการทดสอบโดยใช้ standard rabies RNA(synthesized) พบว่าวิธีที่ใช้มีความไวในการตรวจวัดปริมาณไวรัสเท่ากับ 0.8 cp/ μ L หรือ 4 cp/reaction แสดงว่าการตรวจวินิจฉัย rabies virus ด้วยวิธี TaqMan real-time one step RT-PCR มีความไวในการตรวจวินิจฉัย rabies virus ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.8 cp/ μ L หรือ 4 cp/reaction ขึ้นไป และมีความไวสูงเพียงพอที่จะใช้ในการวินิจฉัยยืนยันการติดเชื้อไวรัสจากเนื้อสมองสุนัขเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีรายงาน (limit of detection $10^{5.6}$ dilution)¹⁹



รูปที่ 14 กราฟแสดงผลการตรวจวัดค่า sensitivity ด้วยวิธี Real – time PCR



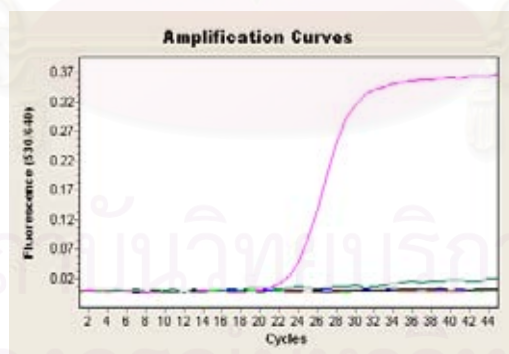
รูปที่ 15 กราฟแสดงค่า standard curve ระหว่าง crossing point และ log concentration

7. การตรวจวัด specificity

นำตัวอย่าง CMV, HSV, VZV, EBV, Enterovirus และ Dengue virus ทดสอบความจำเพาะกับ primer และ probe ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี TaqMan real-time one step RT-PCR ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 16

ผลการตรวจวัดค่า specificity

จากผลการทดลองพบว่า primer และ probe ที่ออกแบบมีความจำเพาะกับ rabies virus เท่านั้น สำหรับตัวอย่าง CMV, HSV, VZV, EBV, Enterovirus และ Dengue virus ให้ผลลบในการตรวจวินิจฉัย แสดงว่าชุดตรวจวินิจฉัย TaqMan real-time one step RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อ rabies virus โดยไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับไวรัสกลุ่มอื่นๆที่ทำให้เกิดโรคสมองอักเสบ (encephalitis)



รูปที่ 16 กราฟแสดงผลการตรวจวัดค่า specificity ด้วยวิธี Real – time PCR

- is CMV
- is HSV
- is VZV
- is EBV
- is Enterovirus
- is Dengue virus

8. วิเคราะห์ผล real-time PCR ในตัวอย่างกลุ่มที่ 2

มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ primer และ probe โดยการตรวจวินิจฉัยไวรัส พิชสู่น้ำในสมองของสัตว์ต่างๆที่ผ่านการตรวจด้วย DFA ทั่วประเทศไทย 120 ตัวอย่าง ตัวอย่างได้จากกรมปศุสัตว์ระหว่างปี พ.ศ. 2548-2550 โดยมีตัวอย่างจากภาคเหนือ 20 ตัวอย่าง ภาคใต้ 10 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 13 ตัวอย่าง และ ภาคตะวันออก 77 ตัวอย่าง ซึ่งผลการตรวจตรงกับผลการตรวจด้วย DFA โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกและลบ รวมถึงค่า C_T value ปรากฏในตารางที่ 10-15



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 10 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคเหนือ 20 ตัวอย่าง

Locate	Sample No.	Date	Host species	FAT result	C _T value
Northern Thailand	3LPmt	12/08/05	Dog	Negative	Negative
	6LPm	04/11/05	Cervine	Negative	Negative
	8SUsn	11/11/05	Elephant	Negative	Negative
	12 LPm	22/12/05	Cat	Negative	Negative
	21CRp	22/02/05	Dog	Negative	Negative
	22LPAm	06/03/06	Hamster	Negative	Negative
	25 LPm	11/04/06	Guinea pig	Negative	Negative
	28Pm	03/05/06	Cat	Negative	Negative
	41CMcd	04/08/06	Rabbit	Negative	Negative
	44CMm	14/09/06	Goat	Negative	Negative
	46LPm	22/09/06	Cow	Negative	Negative
	50MHms	15/11/05	Dog	Positive	20.95
	51 MHms	01/12/05	Dog	Positive	20.56
	52 MHsm	22/12/05	Dog	Positive	22.26
	53 MHsm	23/12/05	Dog	Positive	29.91
	54 MHms	23/01/06	Dog	Positive	17.73
	55CMog	29/01/06	Dog	Positive	19.31
	56 CMog	02/03/06	Dog	Positive	19.23
	57 CMog	01/06/06	Dog	Positive	20.17
	58 CMog	08/09/06	Dog	Positive	20.09

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 11 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคใต้ 10 ตัวอย่าง

Locate	Sample No.	Date	Host species	FAT result	C _T value
Southern Thailand	1TRhy	21/08/06	Dog	Negative	Negative
	2NTts	11/03/06	Dog	Negative	Negative
	3STws	26/03/06	Dog	Negative	Negative
	4NTcw	11/05/07	Dog	Negative	Negative
	5PLpb	12/06/06	Dog	Positive	17.96
	6NTcp	17/08/06	Dog	Positive	17.71
	7PLm	07/09/06	Dog	Positive	18.21
	8NTrpb	24/08/06	Dog	Positive	15.54
	9PLm	18/01/07	Dog	Positive	18.61
	10 NTrpb	06/03/07	Dog	Positive	17.23

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 12 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 13 ตัวอย่าง

Locate	Sample No.	Date	Host species	FAT result	C _T value
Northeast Thailand	1NLns	21/05/07	Dog	Negative	Negative
	2 NLns	21/05/07	Dog	Negative	Negative
	3 NLns	21/05/07	Dog	Negative	Negative
	4 NLns	21/05/07	Dog	Negative	Negative
	5LYtl	21/05/07	Dog	Negative	Negative
	6KKp	17/05/07	Dog	Negative	Negative
	7KKksk	17/05/07	Dog	Negative	Negative
	8KKwn	17/05/07	Dog	Negative	Negative
	9KKwn	17/05/07	Dog	Negative	Negative
	10KKppm	22/05/07	Dog	Negative	Negative
	11KKnp	22/05/07	Dog	Negative	Negative
	12KKubr	22/05/07	Dog	Negative	Negative
	13KKubr	22/05/07	Dog	Negative	Negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 13 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 77 ตัวอย่าง

Locate	Sample No.	Date	Host species	FAT result	C _T value
Eastern Thailand	1NNm	12/01/07	Dog	Positive	20.50
	4CCbpbk	18/01/07	Dog	Positive	22.05
	7RYm	26/01/07	Dog	Positive	20.34
	8CBsrc	30/01/07	Dog	Positive	22.30
	11CBpnnk	06/02/07	Dog	Positive	23.68
	16CBsh	06/03/07	Dog	Positive	16.08
	18CBpnnk	15/03/07	Dog	Positive	17.86
	21RYm	23/03/07	Cat	Positive	22.58
	23CBpnnk	26/03/06	Dog	Positive	21.62
	26RYm	16/02/06	Dog	Positive	22.75
	26CBsh	20/04/07	Dog	Positive	23.49
	27RYm	10/02/06	Dog	Positive	21.45
	27RYm	03/05/07	Dog	Positive	23.13
	28RYm	16/05/07	Dog	Positive	22.32
	31CBbc	25/05/07	Dog	Positive	21.97
	32CBblm	20/03/06	Dog	Positive	25.00
	33RYm	22/03/06	Dog	Positive	21.21
	34CBpnnk	23/03/06	Dog	Positive	19.25
	38RYm	25/04/06	Dog	Positive	22.91
	39SKapt	25/04/06	Dog	Positive	24.24
	42CBm	02/05/06	Dog	Positive	18.85
	46CBm	25/05/06	Dog	Positive	22.94
	52CBpnnk	24/08/06	Dog	Positive	21.31
	54CBpnnk	29/08/06	Cow	Positive	21.67
	55CBbc	04/09/06	Dog	Positive	22.99
	57CBkj	19/09/06	Dog	Positive	22.45
58CBpt	21/09/06	Dog	Positive	18.87	
59CBkp	25/09/06	Dog	Positive	19.02	
60NNm	29/09/06	Dog	Positive	20.38	

ตาราง 14 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคตะวันออก (ต่อ)

Locate	Sample No.	Date	Host species	FAT result	C _T value
Eastern Thailand	62CBpnnk	16/08/06	Cow	Positive	19.93
	64NNm	20/08/06	Dog	Positive	21.58
	68CBsh	28/11/06	Dog	Positive	20.62
	69CBpnnk	29/11/06	Dog	Positive	19.28
	72CBpnnk	13/12/06	Dog	Positive	19.16
	74CBm	20/12/06	Dog	Positive	22.31
	2CBpt	12/01/07	Dog	Negative	Negative
	3CBny	12/01/07	Dog	Negative	Negative
	5CBsh	19/01/07	Dog	Negative	Negative
	6CBsrc	22/01/07	Dog	Negative	Negative
	9JBm	01/02/07	Dog	Negative	Negative
	10NNm	02/02/07	Cat	Negative	Negative
	12CBsrc	09/02/07	Dog	Negative	Negative
	13CBkj	12/02/07	Dog	Negative	Negative
	14CBm	14/02/07	Dog	Negative	Negative
	15CBpt	23/02/07	Dog	Negative	Negative
	17CBsrc	12/03/07	Dog	Negative	Negative
	19RYm	16/03/07	Dog	Negative	Negative
	20PBm	20/03/07	Dog	Negative	Negative
	22CBm	23/03/07	Cat	Negative	Negative
	24CBm	28/03/07	Dog	Negative	Negative
	25CBm	02/04/07	Dog	Negative	Negative
	28CBblm	08/03/06	Dog	Negative	Negative
	29CBsrc	11/03/06	Dog	Negative	Negative
	29CBm	21/05/07	Dog	Negative	Negative
	30CBsh	14/03/06	Dog	Negative	Negative
	30CBm	23/05/07	Dog	Negative	Negative
	31CBm	20/03/06	Cat	Negative	Negative
	32CBpnnk	27/05/07	Dog	Negative	Negative

ตาราง 15 การตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในภาคตะวันออก (ต่อ)

Locate	Sample No.	Date	Host species	FAT result	C _T value
Eastern Thailand	35CCpy	03/04/06	Dog	Negative	Negative
	36RYm	04/04/06	Dog	Negative	Negative
	37CBm	07/06/06	Dog	Negative	Negative
	40CBsh	02/05/06	Dog	Negative	Negative
	41CBm	02/05/06	Cat	Negative	Negative
	44CBsrc	19/05/06	Dog	Negative	Negative
	45CCbpbk	19/05/06	Dog	Negative	Negative
	48CBblm	17/07/06	Dog	Negative	Negative
	49RYm	24/07/06	Dog	Negative	Negative
	50PBm	01/08/06	Cat	Negative	Negative
	51CBpnnk	04/08/06	Dog	Negative	Negative
	53CBsrc	28/08/06	Dog	Negative	Negative
	56CBbb	08/09/06	Dog	Negative	Negative
	61NNm	06/08/06	Dog	Negative	Negative
	65SPm	25/08/06	Dog	Negative	Negative
	67CBblm	02/11/06	Dog	Negative	Negative
	70CCM	04/12/06	Dog	Negative	Negative
	71CCM	12/12/06	Dog	Negative	Negative
73CBpnnk	13/12/06	Dog	Negative	Negative	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. วิเคราะห์ผล real-time PCR ในตัวอย่างกลุ่มที่ 3

มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของ sequence กับตัวอย่างในประเทศไทย และเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ primers และ probe ในตัวอย่างจากประเทศเพื่อนบ้าน ได้จากตัวอย่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าจากประเทศพม่าและกัมพูชา ได้แก่ RNA ที่สกัดจากปมรากผม (S871) น้ำลาย (U71) (U121) น้ำปัสสาวะ (U156) กระพุ้งแก้ม (U563) และ เนื้อสมอง (U640) ของผู้ป่วยในปี พ.ศ. 2547 – 2549 ผลของการเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างของ sequence จากตัวอย่างเหล่านี้จากประเทศพม่า (S871 region 1050-1513, U71 region 1051-1513, U87 region 1050-1513, U121 region 1061-1513, U640 region 1043-1513) และ ประเทศกัมพูชา (U563 region 1045-1432) มา alignment กับ sequence ของ ไวรัสพิษสุนัขบ้าในประเทศไทยจากกลุ่ม 1 และ sequence ของ primer และ probe ดังรูปที่ 17 และ 18 และ ตารางที่ 16 และ 17

ลำดับเบสของไวรัสพิษสุนัขบ้าในประเทศพม่า

	*	20	*	40	*	60	*	80	*		
9871	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG								:	90
U71	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG								:	90
U87	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG								:	90
Thai_RB	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG								:	90
U640	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG								:	90
U121	:	CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG								:	90

CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG

Forward primer	Probe	Reverse primer
----------------	-------	----------------

รูปที่ 17 แสดง N gene sequence alignment ของ rabies virus ในประเทศพม่าเทียบกับ street strain จากประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 16 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขจากประเทศพม่าที่ตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR

Sample No.	RNA($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)*	C_T value	Results	Mismatches	
				Forward primer	Probe
U71	ND	23.98	Positive	0	0
U87	ND	24.32	Positive	0	0
U640	ND	25.67	Positive	0	0
S871	ND	27.68	Positive	0	0
U121	ND	23.21	Positive	1(T)	16(T)

* ตัวอย่างไม่เพียงพอที่จะวัดได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับเบสของไวรัสพิษสุนัขบ้าในประเทศกัมพูชา

	*	20	*	40	*	60	*	80	*		
U563	:	<u>CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG</u>								:	90
Thai_RB	:	<u>CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACAAGGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG</u>								:	90
		<u>CTGGCAGACGACGGAACCGTCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGGTGAGACGAGCCCTGAGGCTGTCTATACTCGAATCATG</u>									
		Forward primer		Probe				Reverse primer			

รูปที่ 18 แสดง N gene sequence alignment ของ rabies virus ในประเทศกัมพูชาเทียบ street strain จากประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 17 ตัวอย่างเนื้อสมองสุนัขจากประเทศกัมพูชาที่ตรวจด้วยวิธี TaqMan real-time PCR

Sample No.	RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)*	C_T value	Results
U563	ND	25.05	Positive

* ตัวอย่างไม่เพียงพอที่จะวัดได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Extracted RNA ที่ได้จากไวรัสทั่วประเทศ และมี mismatch ในตำแหน่ง forward และ/หรือ reverse primer และ/หรือ probe พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR จำนวนตำแหน่งของการเกิด mismatch พบอยู่ระหว่าง 1-3 จุด ใน 2 ตำแหน่งของ primer หรือ probe เท่านั้น ไม่พบ mismatch ในทั้ง 3 ตำแหน่ง ยกเว้นในตัวอย่างไวรัสชนิด CVS งานวิจัยของต่างประเทศ¹⁹ พบว่าการมี mismatch มีผลต่อการจับของ primer และ probe ต่อเมื่อการเกิด mismatch อยู่ที่ตำแหน่งกลางของ probe จะมีผลทำให้เกิด false negative ได้และยังพบว่าจำนวนของการเกิด mismatch ลดประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยา โดยพบว่าถ้ามีจุดแตกต่างรวมมากกว่า 4 จุดในทั้ง 3 region (forward primer, probe และ reverse primer) จะทำให้มีโอกาสเกิด weakly positive หรือ false negative⁷

จาก Genetic data ในประเทศไทย และเพื่อนบ้านพบว่า mismatch ที่พบมีน้อยตำแหน่ง (1-2 ตำแหน่ง) ดังนั้นทำให้มีความเป็นไปได้ว่า จะสามารถนำ Protocol ดังกล่าวนี้ มาใช้เพื่อการยืนยันผลที่ได้จากการตรวจ DFA โดยเฉพาะในตัวอย่างที่ให้ผลลบ และเป็นการยืนยันมาตรฐานห้องปฏิบัติการที่ใช้การตรวจด้วย DFA ทั้ง ผลบวกและลบ ในกรณีที่ผล DFA เป็นบวกและ TaqMan real-time PCR ให้ผลลบ ในขณะที่ผลการตรวจ PCR product ให้ผลเป็นบวก (เกิด product แต่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วย probe) จะเป็นโอกาสอันดีในการค้นหาว่า sequence ในตำแหน่ง probe อาจจะมาจากรabies variant ใหม่ที่ไม่ใช่สุนัข

ตัวอย่าง extracted RNA จาก CVS ให้ผลลบปลอมในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี TaqMan real-time one step RT-PCR แต่ให้ผลบวกในการทดสอบด้วยวิธี gel electrophoresis แสดงว่าการ amplify เกิดขึ้นจากการจับของ primer ทั้งสอง แต่ไม่มีสัญญาณใน real-time PCR เนื่องจากเกิด probe mismatch ซึ่งเมื่อวิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับเบสที่ตำแหน่งของ probe พบว่ามี mismatch ถึง 4 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 5, 20, 23 และ 29 จากความยาว probe ทั้งหมด 31 เบส จากการพบข้อมูลการตรวจของ CVS ดังกล่าว วิธีการตรวจ TaqMan real-time one step RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความสามารถในการตรวจวัดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่มีความหลากหลายและมี mismatch ที่ตำแหน่ง primer และ probe ที่พบในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2541-2545⁹ ได้ทั้งหมด, มีความไว (sensitivity) ในการตรวจ 4 cp/reaction หรือ 0.8 cp/ μ l, มีความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจไวรัสพิษสุนัขบ้าเท่านั้นโดยไม่เกิด cross reaction กับกลุ่มไวรัสสมองอักเสบ (CMV, HSV, VZV, EBV, Enterovirus และ dengue virus) และมีความรวดเร็ว (rapidity) กว่าวิธี one step RT-PCR จากที่ใช้ระยะเวลาในการตรวจ 3 ชั่วโมง เมื่อตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี TaqMan real-time one step RT-PCR ใช้ระยะเวลา 1 ชั่วโมง 20 นาที 30 วินาที

การศึกษาการกลายพันธุ์ของไวรัสพิษสุนัขบ้าในตัวอย่างสมองสัตว์หลาย species ในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2548 – 2550 พบ primer mismatches และ probe mismatches น้อยกว่า 4 ตำแหน่ง (1 ตำแหน่ง) แสดงว่าไวรัสพิษสุนัขบ้าที่พบเป็นสายพันธุ์ที่มี genotype เดียวกันกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยและไม่พบ rabies variant ใหม่ที่ไม่ใช่สุนัข โดยไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญของตัวอย่างที่นำมาตรวจ ในช่วงความเข้มข้นของ RNA ประมาณ 0.1 μ g/ μ l

TaqMan real-time one step RT-PCR ที่ใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในตัวอย่างผู้ป่วยที่พบในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่าและกัมพูชา ระหว่างปี พ.ศ. 2547 – 2549 พบว่าตัวอย่างประเทศพม่า (U121) มีการเกิด probe mismatches ที่ตำแหน่งกลาง (ตำแหน่งที่ 16 ในความยาวทั้งหมด 31 bp) ไม่มีผลต่อ C_T value (23.21) ไวรัสพิษสุนัขบ้าที่พบเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับไวรัสพิษสุนัขบ้าในประเทศไทยไม่เกิดสายพันธุ์ใหม่ จัดกลุ่ม rabies virus อยู่ใน genotype 1

กล่าวได้ว่าวิธีนี้ใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสจากตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อ (เนื้อสมอง) และตัวอย่างที่เป็นของเหลวในร่างกาย (น้ำลาย น้ำไขสันหลัง ปัสสาวะ รวมทั้งสารคัดหลั่งในร่างกาย เป็นต้น) น่าจะสามารถใช้แทนวิธี Mouse inoculation technique เพื่อยืนยันผลเนื่องจากผลการตรวจให้ผลเป็นผลบวกจริง (true positive) และผลลบจริง (false positive) แต่ในกรณีที่ใช้ DFA เป็นบวกและ real-time PCR ให้ผลลบ จำเป็นต้อง run gel ทุกครั้ง เนื่องจากในปฏิกิริยาไม่มีสัญญาณใน real-time PCR เนื่องจากการเกิด probe mismatch แต่มีการ amplify เกิดขึ้นจากการจับของ primer ทั้งสอง

ดังนั้นวิธี TaqMan real-time one step RT-PCR จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าในสมองสัตว์ และ วิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้น อาจจะสามารถช่วยในการเฝ้าระวังการเกิดการกลายพันธุ์ของไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ หากพบรูปแบบของการตรวจเช่นเดียวกับการตรวจ CVS จึงอาจกล่าวได้ว่า TaqMan real-time one step RT-PCR อาจจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการบ่งชี้ไวรัสพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์ใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อน ดังเช่นในกรณีของ CVS strain ที่พบว่ามีความ mismatch ทั้ง 3 ส่วนคือ forward primer 1 ตำแหน่ง, reverse primer 1 ตำแหน่ง และ probe 4 ตำแหน่ง จึงมีความเป็นไปได้ที่นำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่เป็น street strain และมีความหลากหลายทางพันธุกรรม

รายการอ้างอิง

1. Bingham et al. 2002. Distribution of rabies antigen in infected brain material : Determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J Virol Methods*. 101: 85-94.
2. Black EM, Lowings JP, Smith J, Heaten PR and McElhinney LM. 2002. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *J Virol Methods*. 105: 25-35.
3. Bourhy H, Kissi B and Tordo N. 1993. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virol*. 194: 70-81.
4. Charlton KM, Casey GA, et al. 1996. Early events in rabies virus infection of the central nervous system in skunks (*Mephitis mephitis*). *Acta Neuropathol*. 91: 89-98.
5. Cleaveland S and Dye C. 1995. Maintenance of a microparasite infecting several host species : rabies in the Serengeti. *Parasitology*. 111: 33-47.
6. Compton et al. 1991. Nucleic acid sequence-base amplification. *Nature*. 350: 91-92.
7. Conzelmann KK. 1998. Nonsegmented negative-stranded RNA viruses. Genetics and manipulation of viral genome. *Ann Rev Genet*. 32: 123-162.
8. Crepin P, Audry L, et al. 1998. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 36: 1117-1121.
9. Denduangboripant J, Wachrapluesadee S, et al. 2005. Transmission dynamics of rabies virus in Thailand : implications for disease control. *BMC Infect Dis*. 2005; 5: 52.
10. Fedorko DP, Preuss JC, Fahle GA, Li L, Fischer SH, Hohman P and Cohen JI. Comparison of Methods for Detection of Vaccinia virus in Patient Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. 43: 4602-4606.
11. Geyer et al. 1997. Human rabies-Montana and Washington, 1997. *Morb Mortal Weekly Rep*. 46: 770-774.
12. Gelfand DH, Saiki RK, Stoffel et al. 1998. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491.

13. Hanlon et al. 1999. Laboratory diagnosis of rabies : report of the National Working Group on Prevention and Control of Rabies. *J AM Vet Med Assoc.* 215: 1444-1446.
14. Hemachudha T. 1994. Human rabies : Clinical aspects, pathogenesis and potential therapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 187: 121-43.
15. Hemachudha T, Laothamatas J and Rupprecht CE. 2002. Human rabies : a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurology.* 1: 101-09.
16. Hemachudha et al. 2003. Sequence analysis of rabies virus in humans exhibiting encephalitic or paralytic rabies-Human Rabies Virus Genes. 188: 960-966.
17. Hemachudha et al. 2006. Rabies. *Curr Neurol and Neurol Sci.* 6: 460-468.
18. Holmes EC, Woelk CH, et al. 2002. Genetic constraints and the adaptive evolution of rabies virus in nature. *Virology.* 292: 247-57.
19. Hughes GJ, Smith JS, et al. 2004. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA : Influence of Sequence Variation and application to quantification of viral loads. *J Clin Microbiol.* 42: 299-306.
20. Jackson AC and Wunner WH. Rabies. (2002). Amsterdam: Academic Press, 1-493 p.
21. Kurata K-I and Nakamura H. 2000. Novel method for Primer/Probe Design and Sequence analysis. *Genome Informatics.* 11: 331-332.
22. Livak KJ, Giusti W, et al. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4: 357-362.
23. Munoz et al. 1996. Human rabies-Connecticut, 1995. *Morb Mortal Weekly Rep.* 45: 207-209.
24. Nagaraj T, Vasanth JP, et al. 2006. Antemortem diagnosis of human rabies using saliva samples : Comparison of real-time and conventional RT-PCR techniques. *J Clin Virol.* 36: 17-23.
25. Noah et al. 1998. Epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996. *Ann Intern Med.* 128: 922-930.
26. Phuapradit P, Manatsathit S, et al. 1985. Paralytic rabies : some unusual clinical presentations. *J Med Assoc Thai.* 68: 106-10.
27. Phuapradit P and Hemachudha T. 1997. Rabies. *Curr Opin Neurol.* 10 : 260-7.

28. Prosniak M, Dietzschold B, et al. 2001. Effect of rabies virus infection on gene expression in mouse brain. *PNAS*. 98: 2756-2763.
29. Rudd RJ and Trimarchi CV. 1989. Development and evaluation of an In Vitro virus Isolation Procedure as a Replacement for the Mouse Inoculation test in rabies diagnosis. *J Clin Microbiol*. 27: 2522-2528.
30. Rupprecht CE, Hanlon CA and Hemachudha T. 2002. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis*. 2: 327-43.
31. Smith S, vigilant L and Morin PA. 2002. The effects of sequence length and oligonucleotide mismatches on 5' exonuclease assay efficiency. *Nucleic Acids Research*. 30: 20 -30.
32. Sokol DL, Zhang X, et al. 1998. Real time detection of DNA, RNA hybridization in living cells. *PNAS*. 95: 11538-11543.
33. Sow et al. 1996. Occipital cerebral aspiration ponction : Technical procedure to take a brain specimen for postmortem virological diagnosis of human rabies in Daker. *Med Malad Infect*. 26. 534-536.
34. Tong et al. 1999. Trucut needle biopsy through superior orbital tissue for diagnosis of rabies. *Lancet*. 354: 2137-2138.
35. Tyagi S and Kramer FR. 1996. Molecular beacons : probes that fluorescence upon hybridization. *Nat Biotechnol*. 14: 303-308.
36. Wacharapluesadee S, Hemachudha T. 2001. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. *Lancet*. 358:892-3.
37. Wacharapluesadee S. and Hemachudha T. 2005. Rabies Diagnosis in Human. *J Med Assoc Thai*. 88: 859-866.
38. Wakeley PR, Johnson N, et al. 2005. Development of a Real-time, TaqMan Reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of Lyssavirus Genotype 1,5, and 6. *J Clin Microbiol*. 43: 2786-2792.
39. Webster WA. 1987. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. *Can J Vet Res*. 51: 367-369.
40. Wiktor T and Koprowski H. 1978. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization : Detection of antigenic variants. *PNAS*. 75: 3938-42.
41. Wittwer CT and Pritham GH. 1998. Continuous fluorescent monitoring of PCR *J. Clin. Lig. Assay*. 21(4) : 404-412.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ใช้ตรวจวินิจฉัยโดยวิธี variant-specific TaqMan PCRs.

Variant	Sample no.	Date ^a	State ^b	Host ^c	Mismatches ^d				TaqMan result ^e			
					F	R	P	T	CASK	NCSK	RAC	SCSK
CASK	127	08/15/91	CA	SK	0	0	0	0	21.47	40.00	40.00	40.00
CASK	676	02/02/94	CA	SK	1	0	1	2	32.66	40.00	40.00	40.00
CASK	734	08/15/91	CA	SK	1	1	0	2	22.34	40.00	40.00	40.00
CASK	735	08/15/91	CA	SK	0	0	0	0	18.93	40.00	40.00	40.00
CASK	2446	08/12/94	CA	WD	0	1	0	1	26.31	40.00	40.00	40.00
CASK	2516	09/01/94	CA	SK	0	0	0	0	17.65	40.00	40.00	40.00
CASK	2518	09/02/94	CA	FX	0	1	0	1	22.46	40.00	40.00	40.00
CASK	2521	09/06/94	CA	SK	1	0	0	1	34.56	40.00	40.00	40.00
CASK	3024	01/29/98	CA	DG	0	0	0	0	22.95	40.00	40.00	40.00
NCSK	2403	02/14/95	TN	DG	0	0	0	0	22.31	19.33	40.00	40.00
NCSK	2572	02/15/95	KY	DG	0	1	0	1	27.09	40.00	40.00	40.00
NCSK	2865	06/12/95	TN	FX	1	1	0	2	32.98	40.00	40.00	40.00
NCSK	3602	08/18/97	OH	DG	2	0	0	2	25.44	24.03	40.00	40.00
NCSK	3603	01/29/98	AR	DG	0	1	1	2	32.28	29.40	40.00	40.00
NCSK	3606	01/21/97	AR	DG	1	1	0	2	29.18	26.74	40.00	40.00
NCSK	3761	02/12/98	KY	DG	0	0	1	1	35.59	28.70	40.00	40.00
NCSK	4341	04/15/99	MI	SK	0	0	0	0	18.14	17.41	40.00	40.00
NCSK	4363	05/17/99	KY	SK	0	0	1	1	26.91	16.23	39.15	40.00
NCSK	4366	05/17/99	KY	SK	0	0	0	0	19.73	18.04	40.00	40.00
NCSK	4367	05/17/99	KY	SK	0	0	1	1	24.22	18.47	40.00	40.00
NCSK	4370	05/17/99	KY	SK	0	0	0	0	22.64	18.45	40.00	40.00
NCSK	4374	06/25/99	VA	SK	0	1	0	1	17.11	40.00	40.00	40.00
NCSK	4375	06/25/99	KY	SK	0	1	0	1	19.64	40.00	40.00	40.00
NCSK	3652	11/22/97	TX	HR	0	0	0	0	26.00	24.19	40.00	40.00
RAC	498	01/12/96	FL	FX	0	0	1	1	40.00	40.00	19.21	40.00
RAC	502	01/12/96	FL	FX	0	0	1	1	40.00	40.00	19.94	40.00
RAC	700	10/12/94	FL	RC	1	1	0	2	40.00	40.00	19.52	40.00
RAC	2942	02/11/98	DE	DG	0	0	0	0	40.00	40.00	21.38	40.00
RAC	2988	01/28/98	AL	DG	0	0	2	2	40.00	40.00	25.72	40.00
RAC	3385	04/08/97	FL	DG	0	1	0	1	40.00	40.00	23.15	40.00
RAC	3489	01/28/98	WV	FX	0	0	0	0	40.00	40.00	16.26	40.00
RAC	3795	06/28/98	FL	FX	0	0	0	0	40.00	40.00	20.88	40.00
RAC	3803	05/22/98	FL	DG	0	1	0	1	40.00	40.00	17.23	40.00
RAC	3876	06/28/98	FL	FX	0	0	0	0	40.00	40.00	15.52	40.00
RAC	3877	06/28/98	FL	FX	0	0	0	0	40.00	39.44	16.78	40.00
RAC	3883	06/12/98	MD	BV	2	0	0	2	40.00	40.00	14.76	40.00
RAC	4085	12/17/98	AL	HR	0	0	1	1	40.00	40.00	15.88	40.00
RAC	4198	02/09/99	AL	RC	0	0	0	0	40.00	40.00	15.27	40.00
RAC	4501	09/09/99	VA	SK	0	0	0	0	40.00	40.00	15.33	40.00
SCSK	488	05/01/92	AZ	SK	3	1	0	4	40.00	40.00	40.00	40.00
SCSK	704	03/15/93	NM	FX	0	0	0	0	40.00	40.00	40.00	18.12
SCSK	705	03/11/93	NM	CT	1	0	0	1	40.00	40.00	40.00	18.29
SCSK	744	09/08/94	TX	SK	3	2	0	5	40.00	40.00	40.00	37.55
SCSK	749	09/08/94	TX	SK	3	2	0	5	40.00	40.00	40.00	40.00
SCSK	751	12/30/91	TX	SK	2	0	2	4	40.00	40.00	40.00	19.58
SCSK	752	12/30/91	TX	SK	1	0	1	2	40.00	40.00	40.00	17.84
SCSK	912	11/25/92	OK	BV	3	2	1	6	40.00	40.00	40.00	40.00
SCSK	977	09/16/92	MO	SK	0	0	0	0	40.00	40.00	40.00	17.82
SCSK	1001	09/16/02	KS	SK	0	0	0	0	40.00	39.27	40.00	21.89
SCSK	1004	02/01/94	KS	SK	0	0	0	0	40.00	40.00	40.00	26.38
SCSK	1236	12/29/91	TX	SK	1	1	0	2	40.00	40.00	40.00	24.21
SCSK	1425	01/03/91	CO	SK	1	1	1	3	40.00	40.00	40.00	26.93
SCSK	1426	01/03/91	CO	SK	1	1	1	3	40.00	40.00	40.00	30.11
SCSK	1522	11/28/92	KS	DG	0	0	1	1	40.00	40.00	40.00	20.24
SCSK	2205	01/08/94	LA	SK	0	0	1	1	40.00	40.00	40.00	16.81
SCSK	2221	02/03/94	NE	SK	1	1	2	4	40.00	40.00	40.00	28.09
SCSK	2222	02/13/94	NE	SK	1	1	2	4	40.00	40.00	40.00	23.89
SCSK	2523	09/08/94	TX	SK	2	0	2	4	40.00	40.00	40.00	23.05
SCSK	2524	09/08/94	TX	SK	2	1	2	5	40.00	40.00	40.00	28.94
SCSK	3461	01/29/98	AR	CT	0	0	0	0	40.00	40.00	40.00	18.25
SCSK	3604	01/29/98	AR	CT	3	1	1	5	40.00	40.00	40.00	37.73
SCSK	3607	01/29/98	AR	CT	0	0	0	0	40.00	40.00	40.00	16.24

^a Date of RNA extraction.

^b State from which the sample was submitted to CDC. AL, Alabama; AR, Arkansas; AZ, Arizona; CA, California; CO, Colorado; DE, Delaware; FL, Florida; KS, Kansas; KY, Kentucky; LA, Louisiana; MD, Maryland; MI, Michigan; MO, Missouri; NE, Nebraska; NM, New Mexico; OH, Ohio; OK, Oklahoma; TN, Tennessee; TX, Texas; VA, Virginia; WV, West Virginia.

^c Host species from which virus was isolated. BV, bovine; CT, cat; DG, dog; FX, fox; HR, horse; ML, mountain lion; RC, raccoon; SK, skunk; WD, wolf hybrid.

^d The number of sequence mismatches between the target sequence and that of the TaqMan primers and probe designated as the phylogenetic variant. Mismatches are shown as those in the sequences of the forward primers (F), reverse primers (R), and TaqMan probes (P). The total number (T) of mismatches is also shown.

^e Samples were tested with all four sets of TaqMan primers and probe. Numbers are C_t values.

ภาคผนวก ข ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ใช้ตรวจวินิจฉัยโดยวิธี single-tube TaqMan RT-PCR.

Isolate	Country of origin	Host species	Genotype	C_T value ^a			% Divergence ^b		
				FAM	HEX	Cy5	GT1	GT5	GT6
8	Finland	Human	6			15.86	11.1	26.9	0
9	Germany	Bat	5		15.73		19.8	0	17.6
11	Germany	Bat	5		13.94		19.8	0	17.6
19	Denmark	Bat	5		16.46		19.8	0	17.6
29	The Netherlands	Bat	6			12.12	15.3	26.9	0
31	The Netherlands	Bat	5		14.12		19.8	0	17.6
32	The Netherlands	Bat	5		13.62		19.8	0	17.6
33	The Netherlands	Bat	5		15.67		19.8	0	17.6
37	The Netherlands	Bat	5		12.95		19.8	0	17.6
38	The Netherlands	Bat	5		16.57		19.8	0	17.6
44	USA	Bat	1	11.72			3.6	18.9	12.0
47	USA	Bat	1	16.19			7.4	24.8	16.6
48	USA	Bat	1	44.67			11.2	24.8	21.3
49	USA	Bat	1	10.95			7.2	18.9	21.3
56	USA	Fox	1	7.39			7.3	25.7	12.0
57	USA	Skunk	1	7.91			3.6	31.5	16.6
58	USA	Skunk	1	12.27			7.2	37.8	12.2
66	Poland	Bat	5		15.08		19.8	0	17.6
68	Peru	Dog	1	10.12			3.6	24.8	16.6
73	Belize	Dog	1	8.95			3.6	24.8	12.0
100	Morocco	Unknown	1	20.27			3.6	31.5	16.6
114	Chile	Bat	1	15.36			7.4	18.9	12.0
144	Germany	Bat	5		29.13		19.8	0	17.6
193	Pakistan	Canine	1	9.25			3.6	31.5	16.6
202	Turkey	Canine	1	9.72			0	24.8	12.0
227	Nigeria	Canine	1	8.2			3.6	24.8	12.0
234	Russia	Canine	1	13.55			0	24.8	12.0
253	Russia	Wolf	1	12.31			3.5	25.7	7.8
264	Ukraine	Bat	5		24.78		15.3	26.9	0
266	France	Bat	5		8.07		24.9	0	17.6
303	Russia	Raccoon dog	1	32.49			0	24.8	12.0
305	Georgia	Dog	1	10.27			0	24.8	12.0
307	Georgia	Cattle	1	8.15			0	24.8	12.0
313	Germany	Fox	1	9.08			0	24.8	12.0
318	Germany	Fox	1	25.89			3.5	19.4	7.8
338	China	Cattle	1	9.88			3.6	24.8	12.0
341	China	Dog	1	11.09			0	24.8	12.0
342	China	Cattle	1	11.27			3.6	24.8	12.0
345	Germany	Bat	5		23.85		19.8	0	17.6
349	Germany	Bat	5		24.77		19.8	0	17.6
350	Germany	Bat	5		24.06		19.8	0	17.6
399	Botswana	Jackal	1	10.46			11.6	18.9	21.6
437	Estonia	Raccoon dog	1	12.58			0	24.8	12.0
447	Botswana	Dog	1	9.8			3.6	31.5	16.6
483	Botswana	Genet	1	13.55			11.6	18.9	21.6
484	Botswana	Cattle	1	12.62			11.6	18.9	21.6
498	S. Africa	Cat	1	8.25			3.6	24.8	16.6
519	Unknown	Cattle	1	9.29			0	24.8	12.0
594	Switzerland	Bat	6			16.22	15.3	26.9	0
621	Switzerland	Bat	6			10.78	19.8	20.3	0
628	England	Bat	6			12.75	15.3	26.9	0
634	Australia	Bat	7				24.9	31.5	33.4
758	Tanzania	Canine	1	10.06			0	24.8	12
759	Tanzania	Canine	1	29.35			0	24.8	12
889	Czech Republic	Fox	1	13.95			3.7	19.9	12.5
960	Estonia	Raccoon dog	1	13.7			NA	NA	NA
1124	Turkey	Fox	1	16.93			NA	NA	NA
1125	Turkey	Fox	1	19.08			NA	NA	NA
1176	Yugoslavia	Fox	1	13.92			NA	NA	NA
1177	Yugoslavia	Fox	1	17.65			3.6	31.5	16.6
1312	Poland	Badger	1	13.79			0	24.8	12.0
1333	Scotland	Human	6			13.05	19.8	26.9	3.8

^a For clarity, when no C_T value was recorded, this is indicated by the absence of a numerical value for that particular probe.

^b The divergence was calculated by using the Clustal V component of the MegAlign multiple alignment package (DNASTAR Inc.). NA, sequence data are not available for the probe binding region.

ภาคผนวก ค รายชื่อของ N-gene sequences ของ Thai rabies virus

GenBank Accession no.	Isolation number	Species	Locality (district/province)	Year
AY849022	5NBm	Dog	Mueang/Nonthaburi	2001
AY849023	26NPpmt	Dog	Phutthamonthon/Nakhon Pathom	2001
AY849024	53SPppd	Dog	Phra Pradaeng/Samut Prakan	1999
AY849025	67PTtyb	Dog	Thanyaburi/Pathum Thani	1999
AY849026	80PTilk	Dog	Lum Lukka/Pathum Thani	1999
AY849027	81NBtn	Dog	Sai Noi/Nonthaburi	2001
AY849028	99PTkl	Dog	Khlong Luang/Pathum Thani	1999
AY849029	79PTm	Dog	Mueang/Pathum Thani	1999
AY849030	125SSktb	Dog	Krathum Baen/Samut Sakhon	1999
AY849031	133SSm	Dog	Mueang/Samut Sakhon	1999
AY849032	176SSktb	Dog	Krathum Baen/Samut Sakhon	1999
AY849033	187SSm	Dog	Mueang/Samut Sakhon	1999
AY849034	207SSm	Dog	Mueang/Samut Sakhon	1999
AY849035	217SSm	Dog	Mueang/Samut Sakhon	1999
AY849036	218NBbk	Dog	Bang Kruai/Nonthaburi	2001
AY849037	222NBbbt	Dog	Bang Bua Thong/Nonthaburi	1999
AY849038	228NBtn	Dog	Sai Noi/Nonthaburi	1999
AY849039	304NPbl	Dog	Bang Len/Nakhon Pathom	2001
AY849040	315NPm	Dog	Mueang/Nakhon Pathom	2001
AY849041	324NPm	Dog	Mueang/Nakhon Pathom	2001
AY849042	91PTns	Dog	Nong Suea/Pathum Thani	1999
AY849043	95NBtn	Dog	Sai Noi/Nonthaburi	1999
AY849044	108PTilk	Dog	Lum Lukka/Pathum Thani	1999
AY849045	112PTtyb	Dog	Thanyaburi/Pathum Thani	1999
AY849046	195NBby	Dog	Bang Yai/Nonthaburi	1999
AY849047	215NPncs	Dog	Nakhon Chaisi/Nakhon Pathom	1999
AY849048	232NPsp	Dog	Sam Phran/Nakhon Pathom	1999
AY849049	235NBpk	Dog	Pak Kret/Nonthaburi	1999
AY849050	263NPm	Dog	Mueang/Nakhon Pathom	1999
AY849051	C267BKbkcn	Cat	Bangkok Noi/Bangkok	2000
AY849052	C269PTm	Cat	Mueang/Pathum Thani	2000
AY849053	C271BKrtv	Cat	Ratchathewi/Bangkok	2001
AY849054	C274BKdd	Cat	Din Daeng/Bangkok	1999
AY849055	C276BKpv	Cat	Prawet/Bangkok	1999
AY849056	C277BKkt	Cat	Khlong Toei/Bangkok	1999
AY849057	303KJtmk	Dog	Tha Maka/Kanchanaburi	2001
AY849058	308KJm	Dog	Mueang/Kanchanaburi	2001
AY849059	318KJtmk	Dog	Tha Maka/Kanchanaburi	2001
AY849060	326KJtm	Dog	ThaMuang/Kanchanaburi	2001
AY849061	333KJm	Dog	Mueang/Kanchanaburi	2001
AY849062	335KJpnt	Dog	Phanom Thuan/Kanchanaburi	2001
AY849063	89PTtb	Dog	Thanyaburi/Pathum Thani	1999
AY849064	38/43	Dog	Mueng/Chaiyaphum	2000
AY849065	39/43	Dog	Mueng/Chaiyaphum	2000
AY849066	46/43	Dog	Kaset Sombun/Chaiyaphum	2000
AY849067	23SPppd	Dog	Phra Pradaeng/Samut Prakan	2001
AY849068	33/43	Dog	Phakdi Chumphon/Chaiyaphum	2000
AY849069	34/43	Dog	Mueang/Chaiyaphum	2000
AY849070	19/43	Dog	Phakdi Chumphon/Chaiyaphum	2000
AY849071	51BKds	Dog	Dusit/Bangkok	1999

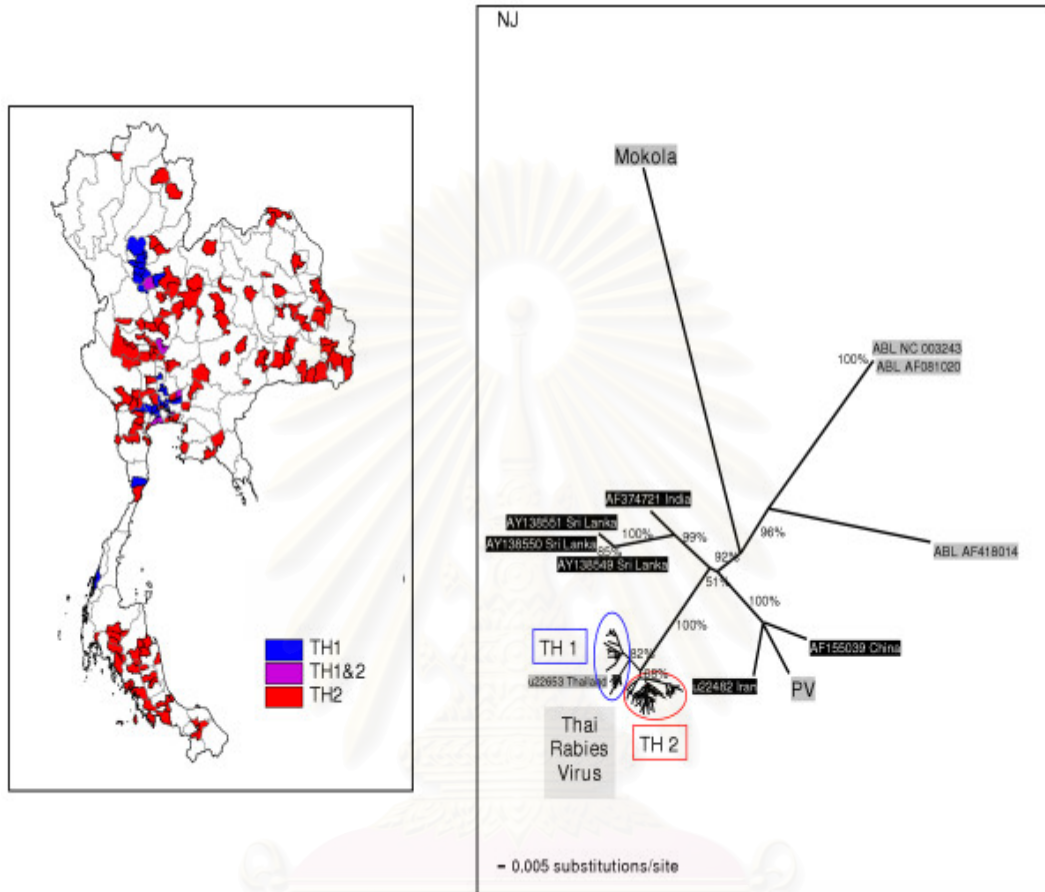
GenBank Accession no.	Isolation number	Species	Locality (district/province)	Year
AY849072	62SPbp	Dog	Bang Phli/Samut Prakan	1999
AY849073	48BKpyt	Dog	Phaya Thai/Bangkok	2001
AY849074	HM65BK	Human	Huai Khwang/Bangkok	1998
AY849075	HM75BK	Human	Ratchathewi/Bangkok	1998
AY849076	HM88BKjj	Human	Chatuchak/Bangkok	1999
AY849077	HM208BKpv	Human	Prawet/Bangkok	2001
AY849078	404PLkcs	Cattle	Khao Chaison/Phatthalung	2002
AY849079	355UThk	Dog	Huai Khot/Uthai Thani	2001
AY849080	415PLtm	Dog	Mueang/Phatthalung	2002
AY849081	294CPm	Dog	Mueang/Chaiyaphum	2002
AY849082	295CPksb3	Dog	Kaset Sombun/Chaiyaphum	2002
AY849083	351NSm	Dog	Mueang/Nakhon Sawan	2001
AY849084	353CNmnr	Dog	Manorom/Chai Nat	2001
AY849085	363NScs	Dog	Chumsaeng/Nakhon Sawan	2001
AY849086	412SKsd	Dog	Sadao/Songkla	2002
AY849087	414SKm	Dog	Mueang/Songkla	2002
AY849088	361NSly	Dog	Lat Yao/Nakhon Sawan	2001
AY849089	376SHib	Dog	In Buri/Sing Buri	2001
AY849090	380UTbr	Dog	Ban Rai/Uthai Thani	2001
AY849091	393LBm	Dog	Mueang/Lop Buri	2001
AY849092	384SHib	Dog	In Buri/Sing Buri	2001
AY849093	411NTht	Dog	Hua Sai/Nakhon Si Thammarat	2002
AY849094	374CNspy	Dog	Sapphaya/Chai Nat	2001
AY849095	362CNm	Dog	Mueang/Chai Nat	2001
AY849096	357UTm	Dog	Mueang/Uthai Thani	2001
AY849097	356UTth	Dog	Thap Than/Uthai Thani	2001
AY849098	381NSstk	Dog	Tha Tako/Nakhon Sawan	2001
AY849099	408SKhy	Dog	Yai/Songkla	2002
AY849100	332SBm	Dog	Mueang/Suphan Buri	2001
AY849101	354CNhk	Dog	Hankha/Chai Nat	2001
AY849102	425PN	Dog	Wang Thong/Phisanulok	2002
AY849103	389LBm	Dog	Mueang/Lop Buri	2001
AY849104	423PN	Dog	Bang Rakam/Phisanulok	2002
AY849105	424PN	Dog	Bang Rakam/Phisanulok	2002
AY849106	413SKhy	Cattle	Yai/Songkla	2001
AY849107	358CNsbr	Dog	Sankhaburi/Chai Nat	2001
AY849108	317SBspn	Dog	Song Phi Nong/Suphan Buri	2001
AY849109	334PJsry	Dog	Sam Roi Yot/Prachuap Khiri Khan	2001
AY849110	340SBspn	Dog	Song Phi Nong/Suphan Buri	2001
AY849111	400SKm	Dog	Mueang/Songkla	2001
AY849112	87BKsl	Dog	Suang Luang/Bangkok	2001
AY849113	156PTns	Dog	Nong Suea/Pathum Thani	1999
AY849114	182CCbnp	Dog	Bang Nam Prio/Chachoengsao	1999
AY849115	349PBm	Dog	Mueang/Phetchaburi	2001
AY849116	307RBptr	Dog	Photharam/Ratchaburi	2001
AY849117	329PBm	Dog	Mueang/Phetchaburi	2001
AY849118	406STm	Dog	Mueang/Satun	2002
AY849119	352NSTk	Dog	Takhli/Nakhon Sawan	2001
AY849120	301RBm	Dog	Mueang/Ratchaburi	2001
AY849121	157PJsry	Dog	Sam Roi Yot/Prachuap Khiri Khan	1999
AY849122	237NYm	Dog	Mueang/Nakhon Nayok	1999
AY849123	270ATvsc	Cat	Wiset Chai Chan/Ang Thong	2001
AY849124	281NRm	Dog	Mueang/Nakhon Ratchasima	2001
AY849125	282NRpc	Dog	Pak Chong/Nakhon Ratchasima	2001
AY849126	305RBbp	Dog	Ban Pong/Ratchaburi	2001

GenBank Accession no.	Isolation number	Species	Locality (district/province)	Year
AY849127	306RBptr	Dog	Photharam/Ratchaburi	2001
AY849128	191AYsn	Dog	Sena/Ayutthaya	1999
AY849129	151SBdc	Dog	Dan Chang/Suphan Buri	1999
AY849130	22CBkhn	Dog	Kaeng Hang Maeo/Chanthaburi	2001
AY849131	162PCm	Dog	Mueang/Phichit	1999
AY849132	319PBm	Dog	Mueang/Phetchaburi	2001
AY849133	86SPm	Dog	Mueang/Samut Prakan	2001
AY849134	136CLblm	Dog	Bang Lamung/Chon Buri	1999
AY849135	396Ylm	Dog	Mueang/Yala	2001
AY849136	250AYbt	Dog	Bang Sai/Ayutthaya	1999
AY849137	302RBpt	Dog	Pak Tho/Ratchaburi	2001
AY849138	316SMm	Dog	Mueang/Samut Songkhram	2001
AY849139	426PN	Dog	Mueang/Phisanulok	2002
AY849140	296CPksb	Dog	Kaset Sombun/Chaiyaphum	2002
AY849141	313PBnyp	Dog	Nong Ya Plong/Phetchaburi	2001
AY849142	288NRbl	Dog	Ban Lueam/Nakhon Ratchasima	2002
AY849143	505KBlt	Dog	Lham Thap/Krabi	2000
AY849144	507TRrd	Dog	Ratsada/Trang	2000
AY849145	511NTts	Dog	Thung Song/Nakhon Si Thammarat	2000
AY849146	515KBlt	Dog	Lam Thap/Krabi	2000
AY849147	524KBkn	Dog	Khao Phanom/Krabi	2000
AY849148	559TRpl	Cattle	Palian/Trang	2000
AY849149	578KBkt	Dog	Khong Thom/Krabi	2001
AY849150	584TRkt	Dog	Kantang/Satun	2001
AY849151	603KBlt	Dog	Lam Thap/Krabi	2001
AY849152	595Ylbns	Dog	Bangnang Sata/Yala	2001
AY849153	493RNm	Dog	Mueang/Ranong	2000
AY849154	656PLppy	Dog	Pa Phayom/Phatthalung	2002
AY849155	676KSm	squirrel	Mueng/Kalasin	2002
AY849156	513PLm	Dog	Mueang/Phatthalung	2000
AY849157	589Ylm	Dog	Mueang/Yala	2001
AY849158	608SRm	Dog	Mueang/Satun	2001
AY849159	HMS152S	Human	Khunkhan/Si Sa Ket	2001
AY849160	599TRhy	Dog	Huai Yot/Trang	2001
AY849161	473BRpk	Dog	Pa Kham/Surin	2001
AY849162	485BRpk	Dog	Pa Kham/Buri Ram	2002
AY849163	510NTm	Dog	Mueang/Nakhon Si Thammarat	2000
AY849164	486UMhsp	Dog	Hua Taphan/Amnat Chareon	2002
AY849165	487UMm	Dog	Mueang/Amnat Charoen	2002
AY849166	501RNm	Dog	Mueang/Nakhon Si Thammarat	2002
AY849167	283NRpm	Dog	Phimai/Nakhon Ratchasima	2001
AY849168	459KSm	Dog	Mueang/Kalasin	2002
AY849169	463SRsn	Dog	Sanom/Surin	2001
AY849170	464SRskp	Dog	Sikhoraphum/Surin	2001
AY849171	465SRm	Dog	Mueang/Surin	2001
AY849172	466SRrbr	Dog	Rattanaburi/Surin	2001
AY849173	528NTrpb	Dog	Ron Phibun/Nakhon Si Thammarat	2000
AY849174	548NTlsk	Dog	Lan Saka/Nakhon Si Thammarat	2000
AY849175	289NRht	Dog	Phimai/Nakhon Ratchasima	2001
AY849176	723KKm	Dog	Mueang/Khon Kaen	2001
AY849177	481BRhr	Dog	Huai Rat/Buri Ram	2002
AY849178	494RNm	Dog	Mueang/Ranong	2000
AY849179	503SNws	Dog	Wiang Sa/Surat Thani	2002
AY849180	553STdkl	Dog	Khuan Ka Long/Satun	2000

GenBank Accession no.	Isolation number	Species	Locality (district/province)	Year
AY849181	666STm	Cattle	Mueang/Satun	2002
AY849182	458LAm	Dog	Mueang/RoiEt	2001
AY849183	500SNks	Dog	Khian Sa/Surat Thani	2002
AY849184	454LAm	Dog	Mueang/Roi Et	2001
AY849185	495RNm	Dog	Mueang/Ranong	2001
AY849186	460LAm	Dog	Mueang/Roi Et	2002
AY849187	488UMm	Dog	Mueang/Amnat Charoen	1998
AY849188	489SEkh	Dog	Khun Han/Si Sa Ket	2000
AY849189	472BRm	Dog	Mueang/Buri Ram	2001
AY849190	502SNcb	Dog	Chai Buri/Surat Thani	2002
AY849191	499SNps	Dog	Phrasaeng/Surat Thani	2002
AY849192	HMS241CL	Human	Mueang/Chon Buri	2001
AY849193	694LAsp	Dog	Selaphum/Roi Et	2002
AY849194	690NKsps	Dog	So Phaisai/Nong Khai	2002
AY849195	689Umm	Dog	Mueang/Amnat Charoen	2001
AY849196	688Umm	Dog	Mueang/Amnat Charoen	2002
AY849197	691NKbk	Dog	Bueng Kan/Nong Khai	2002
AY849198	695Lack	Dog	Chiang Khwan/Roi Et	2002
AY849199	698KSm	squirrel	Mueang/Kalasin	2002
AY849200	700KStkt	Dog	Tha Khantho/Kalasin	2003
AY849201	708YSm	Dog	Mueang/Yasothon	2000
AY849202	568YLrm	Dog	Raman/Yala	2000
AY849203	725MDm	Dog	Mueang/Mukdahan	2001
AY849204	726UBbt	Dog	Buntharik/Ubol Ratchathani	2001
AY849205	738KKm	Dog	Mueang/Khon Kaen	2002
AY849206	742MDm	Dog	Mueang/Mukdahan	2002
AY849207	740MDdt	Dog	Don Tan/Mukdahan	2002
AY849208	711SLm	Dog	Mueang/Sakon Nakhon	2000
AY849209	709SEktr	Dog	Kantharak/Si Sa Ket	2000
AY849210	678cBRm	Cat	Mueang/Buri Ram	2000
AY849211	728UBm	Cattle	Mueang/Ubol Ratchathani	2001
AY849212	685BRppc	Dog	Phlapphla Chai/Buri Ram	2002
AY849213	714YSm	Dog	Mueang/Yasothon	2001
AY849214	715YSm	Water buffalo	Mueang/Yasothon	2001
AY849215	718YSikk	Dog	Kham Khuean Kao/Yasothon	2001
AY849216	705MDm	Dog	Mueang/Mukdahan	2000
AY849217	731UBvrc	Dog	Warin Chamrap/Ubol Ratchathani	2001
AY849218	704KKcp	Dog	Chum Phae/Khon Kaen	2000
AY849219	703KKm	Dog	Mueang/Khon Kaen	2000
AY849220	732KSm	Cattle	Mueang/Kalasin	2001
AY849221	741YSm	Dog	Mueang/Yasothon	2002
AY849222	744UBdud	Dog	Det Udom/Ubol Ratchathani	2002
AY849223	713KKcp	Dog	Chum Phae/Khon Kaen	2001
AY849224	717UBm	Dog	Mueang/Ubol Ratchathani	2001
AY849225	707LYm	Dog	Mueang/Loei	2000
AY849226	131SPpsj	Dog	Phra Samut Chedi/Samut Prakan	1999
AY849227	HMS223RY	Human	Klaeng/Rayong	2002
AY849228	747PGtp	Dog	Thap Put/Phangnga	2003
AY849229	766PRm	Dog	Mueang/Phetchabun	2003
AY849230	769PRcd	Dog	Chon Daen/Phetchabun	2003
AY849231	773CMcp	Dog	Chai Prakan/Chiang Mai	2002

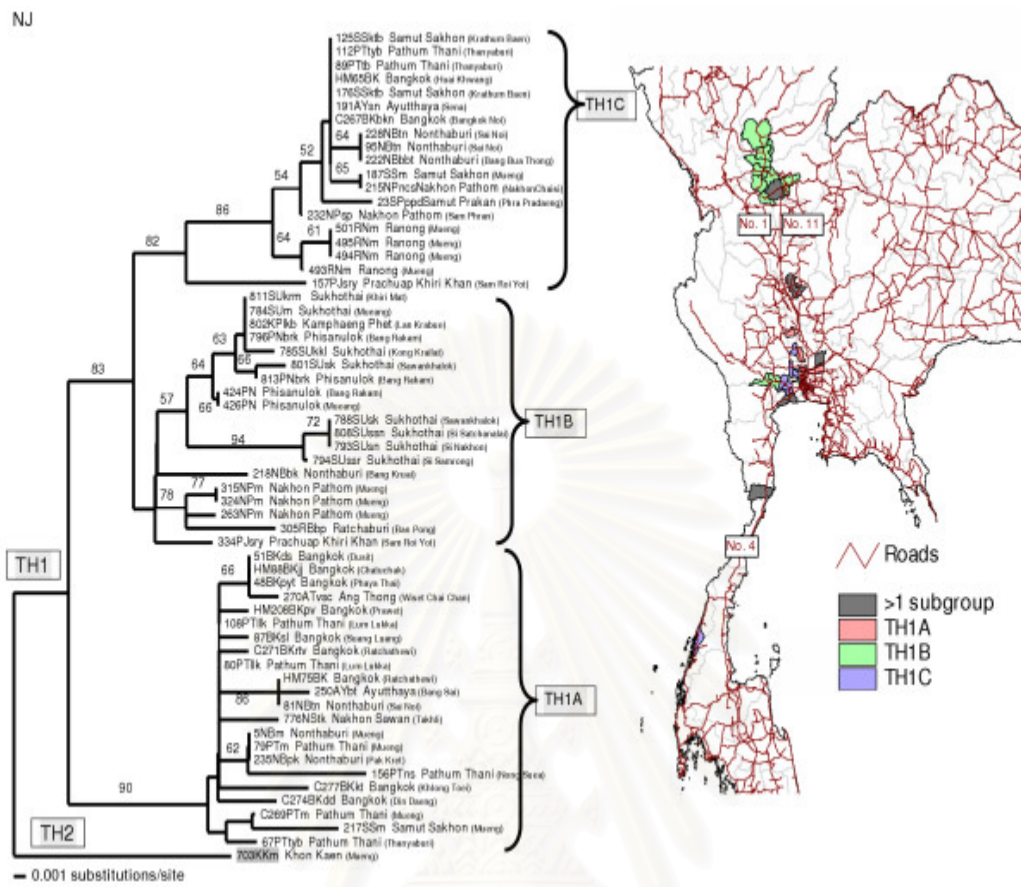
GenBank Accession no.	Isolation number	Species	Locality (district/province)	Year
AY849232	774NNm	Dog	Mueang/Nan	2002
AY849233	775PYp	Dog	Pong/Phayao	2003
AY849234	776NStk	Dog	Takhli/Nakhon Sawan	2002
AY849235	795NScs	Dog	Chumsaeng/Nakhon Sawan	2003
AY849236	801SUsk	Dog	Sawakhalok/Sukhothai	2002
AY849237	802KPIkb	Dog	Lan Krabue/Kamphaeng Phet	2002
AY849238	811SUkrm	Dog	Khiri Mat/Sukhothai	2002
AY849239	806PNnm	Dog	Noen Maprang/Phisanulok	2002
AY849240	814UDm	Dog	Mueang/Uttaradit	2002
AY849241	807UDts	Dog	Thong Saen Khan/Uttaradit	2002
AY849242	800Udm	Dog	Mueang/Uttaradit	2002
AY849243	815PRIs	Dog	Lom Sak/Phetchabun	2002
AY849244	805PCbmn	Dog	Bang Mun Nak/Phichit	2002
AY849245	780NSm	Dog	Mueang/Nakhon Sawan	2003
AY849246	762PRm	Dog	Mueang/Phetchabun	2003
AY849247	813PNbrk	Dog	Bang Rakam/Phisanulok	2002
AY849248	796PNbrk	Dog	Bang Rakam/Phisanulok	2003
AY849249	816PRcd	Dog	Chon Daen/Phetchabun	2002
AY849250	778LBtv	Dog	Tha Wung/Lop Buri	2003
AY849251	794SUssr	Dog	Si Samrong/Sukhothai	2003
AY849252	784SUm	Dog	Mueang/Sukhothai	2003
AY849253	785SUkkl	Dog	Kong Krailat/Sukhothai	2003
AY849254	788SUsk	Dog	Sawankhalok/Sukhothai	2003
AY849255	808SUssn	Dog	Si Satchanalai/Sukhothai	2002
AY849256	793SUsn	Dog	Si Nakhon/Sukhothai	2003
AY849257	777LBm	Dog	Mueang/Lop Buri	2003
AY849258	779NSly	Dog	Lat Yao/Nakhon Sawan	2003
AY849259	804UDm	Dog	Mueang/Uttaradit	2002
AY849260	338PJm	Dog	Mueang/Prachuap Khiri Khan	2001

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

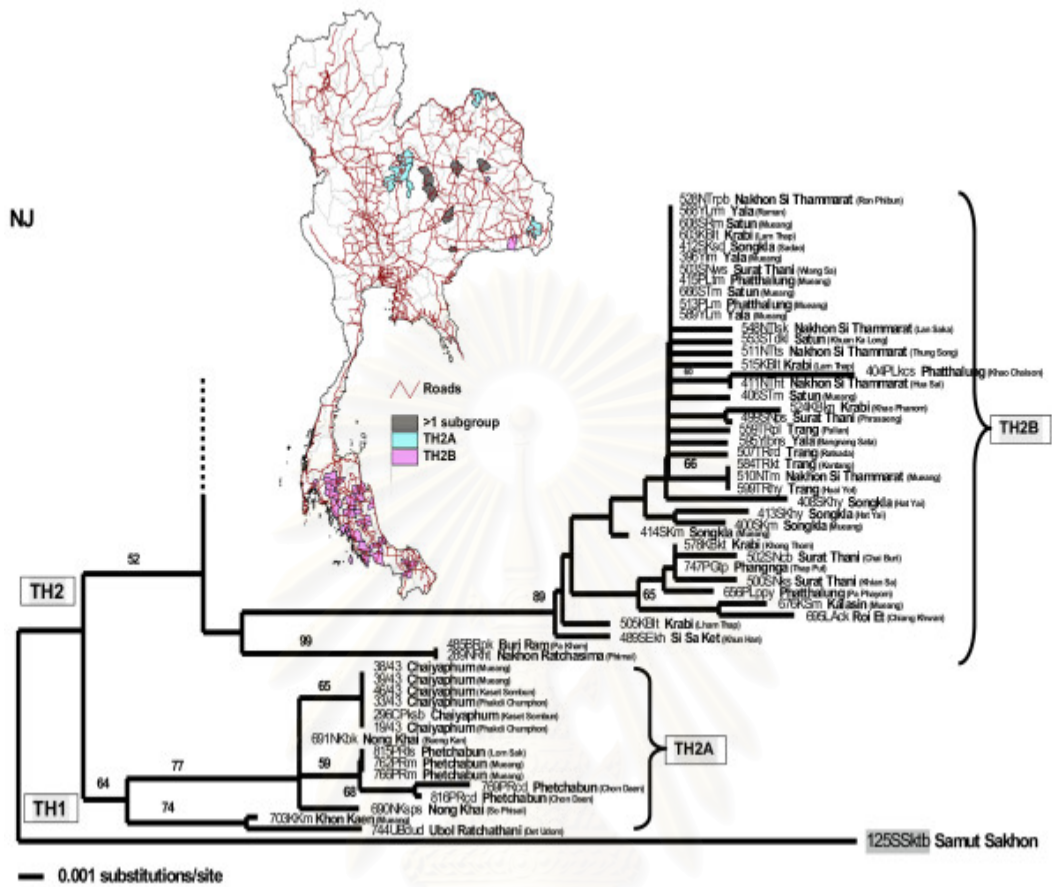


รูปที่ 19 เปรียบเทียบระหว่าง NJ tree ของ Thai rabies N genes และเขตแพร่ระบาด

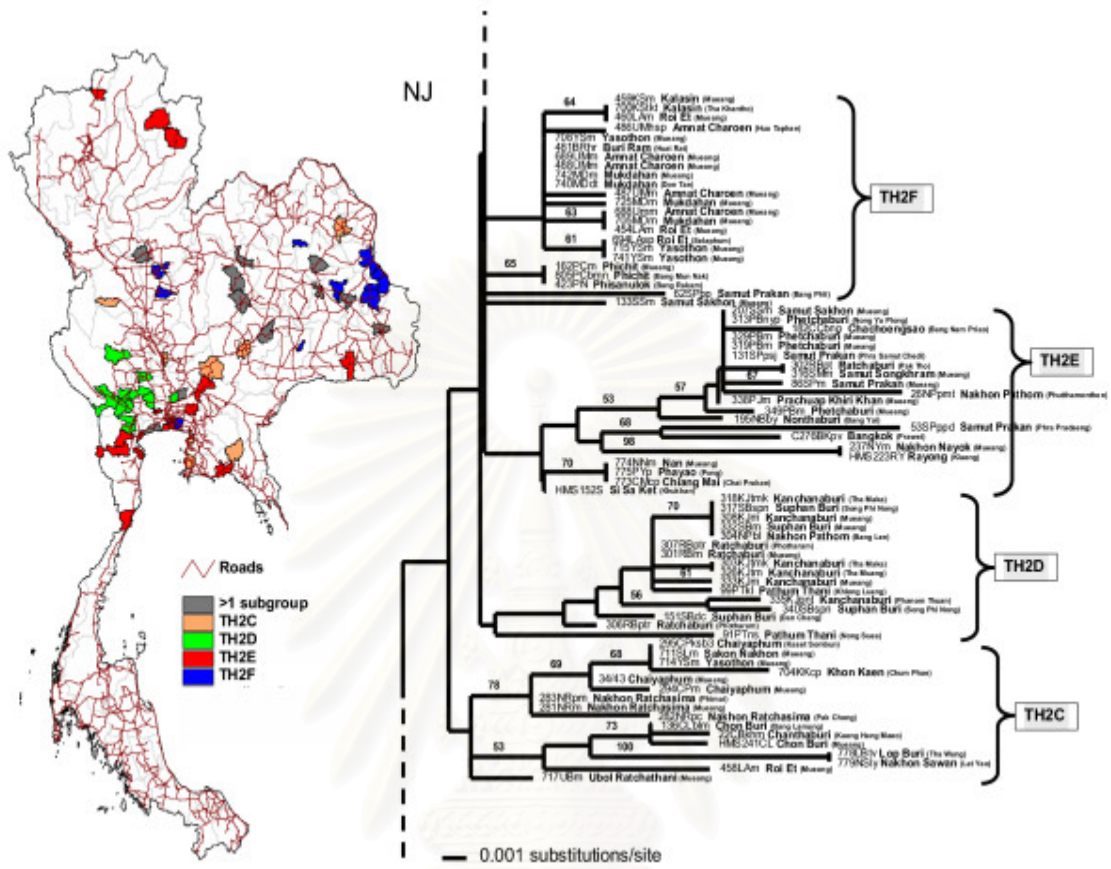
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



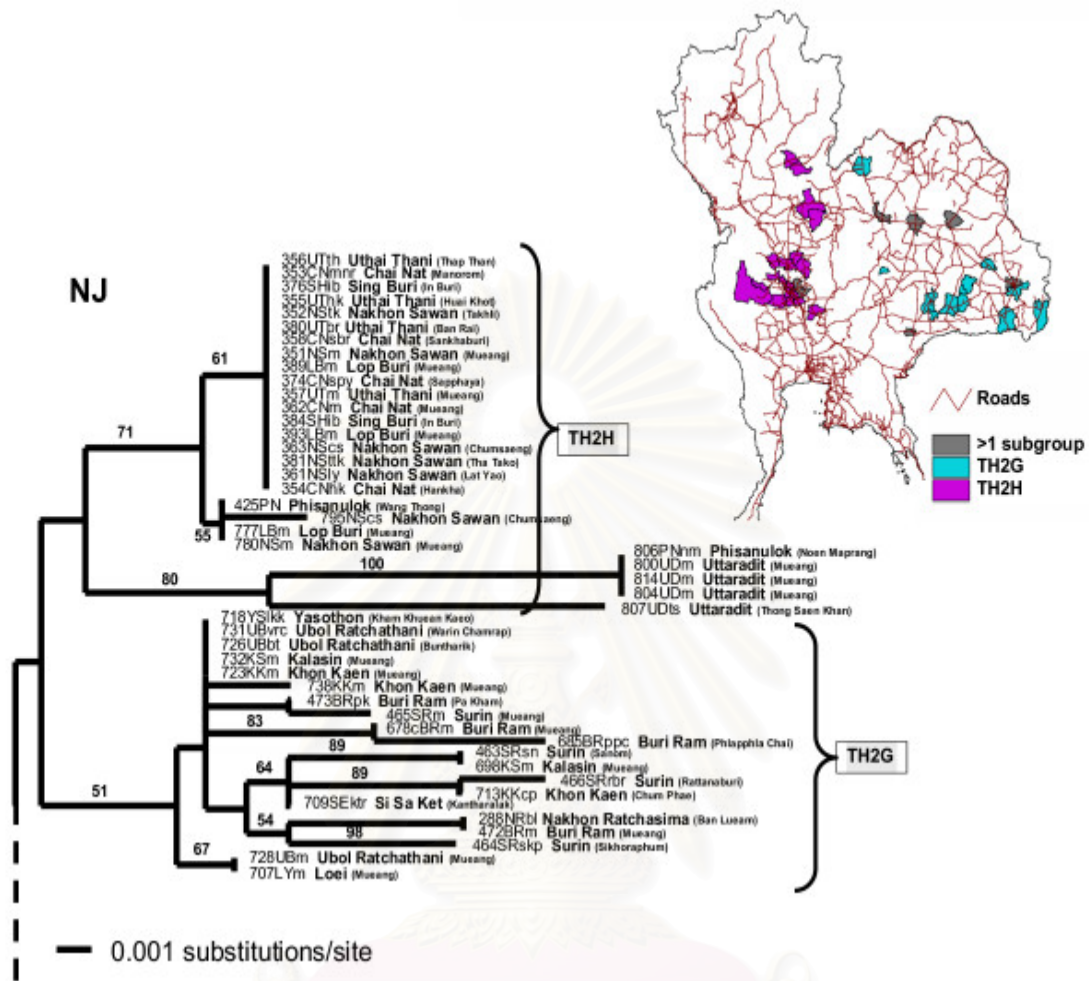
รูปที่ 20 เปรียบเทียบระหว่าง NJ tree ของ TH1 rabies sequence และเขตแพร่ระบาด



รูปที่ 21 เปรียบเทียบระหว่าง NJ tree ของ TH2A และ TH2B rabies sequences และเขตแพร่ระบาด



รูปที่ 22 เปรียบเทียบระหว่าง NJ tree ของ TH2C, TH2D, TH2E และ TH2F rabies sequences และเขตแพร่ระบาด



รูปที่ 23 เปรียบเทียบระหว่าง NJ tree ของ TH2G และ TH2H rabies sequences และเขตแพร่ระบาด

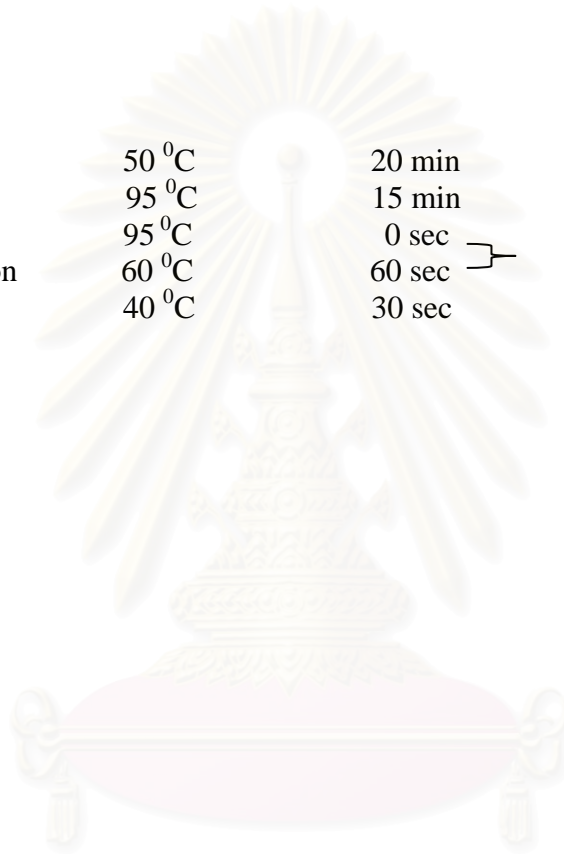
สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ปฏิบัติการ TaqMan real-time one step RT-PCR

<u>Master mix</u> (Qiagen)		1x
2 x master (probe RT-PCR)		10 μ L
20 μ M 1129 F		1 μ L
20 μ M 1218 R		1 μ L
10 μ M probe		0.4 μ L
quantitec RT mix		0.2 μ L
H ₂ O		2.4 μ L
template		5 μ L
total		20 μ L

Profile

RT	50 °C	20 min	1 cycle
Initial activation	95 °C	15 min	1 cycle
Denaturation	95 °C	0 sec	45 cycle
Annealing/Extension	60 °C	60 sec	
Cooling	40 °C	30 sec	1 cycle



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจิตตะภาวัลย์ สูดิปัญญา เกิดวันที่ 2 กันยายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2547 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปัจจุบันศึกษาปริญญาโท สาขาการแพทย์ สาขาอณูชีววิทยา และพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย