# บทที่ 2
# ทบทวนวรรณกรรม

Polymerase Chain Reaction (PCR) เริ่มต้นขึ้นในราวปลายปี 1985 เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาก โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ จนสามารถตรวจพบดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอที่มีปริมาณน้อยมาก ยากที่จะตรวจพบโดยวิธีอื่น ๆ จึงอำนวยประโยชน์ในงานทางด้านอณูชีววิทยาเป็นอย่างยิ่ง ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาวิจัยในแง่ต่าง ๆ ตลอดจนประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ การวิเคราะห์โรคหรือความผิดปกติทางพันธุกรรมของทั้งพืชและสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ในงานพิสูจน์หลักฐานทางโบราณคดีและทางนิติเวชวิทยาได้อีกด้วย

การใช้เทคนิค PCR เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ คือ อาศัยการตรวจหาชิ้นส่วนสารพันธุกรรม (nucleic acid sequence) ของต้นเหตุของโรคโดยตรง ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา หรือสารพันธุกรรมในร่างกาย เช่น โครโมโซมที่มีความผิดปกติ ฯลฯ

nested PCR เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะเพิ่มความจำเพาะของปฏิกริยา PCR โดยทำ PCR ซ้ำอีกครั้ง แต่ใช้ primers อีกคู่ซึ่งไม่ใช่คู่เดิม แต่มีตำแหน่งของการเกาะติด (anneal) บนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) อยู่ถัดเข้ามาจากตำแหน่งของ primers คู่นอก ดังนั้น ถ้า primers คู่นอกขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอมาแบบไม่จำเพาะ (non specific) ซึ่งไม่ใช่ target DNA จริง เมื่อเอา product มาทำ PCR ซ้ำ โดยใช้ primers คู่ในเข้าไป anneal จะไม่มี product ออกมา วิธีการนี้แม้ว่า การทำ PCR ในครั้งแรกจะมี non specific amplification ด้วย แต่ primers คู่ใน จะเพิ่มจำนวนเฉพาะ specific sequence วิธี nested PCR นอกจากจะเพิ่มความจำเพาะแล้ว ยังเพิ่มความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา PCR อีกประมาณ $10^3$ เท่า เพราะบางครั้ง ถ้า target DNA มีน้อยมาก การทำ PCR ครั้งเดียว อาจตรวจไม่พบ product ด้วยวิธี gel electrophoresis และ ethidium bromide staining ต้องทำ PCR ซ้ำ โดยวิธี nested PCR ซึ่งจะทำให้ตรวจพบ product ได้

seminested PCR มีหลักการคล้าย nested PCR เพียงแต่ primers คู่ใน เส้นหนึ่งใช้ primer เส้นใดเส้นหนึ่งจาก primers คู่นอก ส่วนคู่ในเส้นที่เหลือเป็น primer ที่มีตำแหน่งการ anneal บน target อยู่ถัดเข้ามาจากตำแหน่ง primers คู่นอกและมีทิศทางสวนกัน ดังนั้นเป็นการประหยัดการเตรียม primers

Polymerase Chain Reaction (PCR) technique เป็นเครื่องมือที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส เป็นวิธีการซึ่งใช้การขยายเพิ่มจำนวน (amplify) โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อลำดับดีเอ็นเอ [30] โดยใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของ CPV จีโนมทั้งหมด [31] ที่มีอยู่ใน Genbank accession number M19296
ออกแบบ primers ที่บริเวณ VP2 ซึ่งเป็นส่วนใหญ่ของ capsid protein ของ CPV VP2 gene มีผลต่อ host range ของ CPV [13, 32] ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตำแหน่งการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีความแตกต่างกันในบริเวณ VP2 gene ระหว่าง FPLV, CPV-2 และ CPV-2a/2b

| Amino acid difference (VP2) | Comparison | Associated function |
|---|---|---|
| 80 | FPLV vs CPV | Antigenicity, feline host range |
| 87 | CPV-2 vs CPV-2a/2b | Antigenicity |
| 93 | FPLV vs CPV | Antigenicity, canine host range |
| 101 | CPV-2 vs CPV-2a/2b | Unknown |
| 103 | FPLV vs CPV | Viability in presence of changes of residues 93 and 323 |
| 300 | CPV-2 vs CPV-2a/2b | Antigenicity |
| 305 | CPV-2 vs CPV-2a/2b | Antigenicity |
| 323 | FPLV vs CPV | Antigenicity, canine host range, pH of hemagglutination |
| 375 | CPV-2 vs CPV-2a/2b | pH of hemagglutination |
| 426 | CPV-2 vs CPV-2a/2b | Antigenicity |
| 564 | FPLV vs CPV | Feline host range (?) |
| 568 | FPLV vs CPV | Feline host range (?) |

CPV-2 ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในแมวได้ เป็นเพราะความแตกต่างของ nucleotides บริเวณ capsid gene (VP2) ของ CPV-2 และ FPLV [33] ดังแสดงในรูปที่ 4

| Nucleotide | 3025 | 3065 | 3094 | 3753 | 4477 | 4489 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FPLV | A | A | T | G | A | C |
| | Lys | Lys | Val | Asp | Asn | Ala |
| CPV-2 | G | C | C | A | G | G |
| | Arg | Asn | Ala | Asn | Ser | Gly |
| Amino acid In VP2 | 80 | 93 | 103 | 323 | 564 | 568 |

รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสและกรดอะมิโนบริเวณ VP2 gene ระหว่าง FPLV และ CPV-2

Mochizuki (1993) ได้นำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ CPV ในอุจจาระของสุนัข โดยการขยายเพิ่มจำนวน (amplifies) บริเวณ capsid gene (VP1 และVP2) ด้วยการทำปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน หรือ seminested PCR ขนาดผลผลิตจากปฏิกิริยามีความยาวประมาณ 1.2 กิโลเบส ผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อ CPV ด้วยวิธี virus isolation บน Crandell feline kidney (CRFK) หรือ Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells และ วิธี fecal haemagglutination (HA) ยืนยันผลโดยวิธี fecal haemagglutination inhibition (HI) พบว่ามีความไว (sensitivity) เท่ากับ virus isolation โดยใช้ MDCK cells และ มีความไวมากกว่า virus isolation โดยใช้ CRFK cells หรือ วิธี HA แม้ว่าจะได้ผลลัพธ์ลบปลอม (false-negative) 1 ใน 59 ราย (1.7%) ผลลัพธ์ลบปลอมที่ได้อาจเนื่องมาจากมีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR อยู่ในอุจจาระ [34]

ในปี 1995 Schunck และคณะ ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค simple touch-down PCR สำหรับการตรวจหา CPV และ FPLV ในอุจจาระ โดยการ pretreatment อุจจาระด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonification) และ ต้ม (boiling) เพื่อกำจัดสารที่ไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR เป็นการทำ PCR เพียงรอบเดียวได้ขนาดผลผลิตมีความยาว 221 เบส ซึ่งอยู่ภายใน VP2 ผลที่ได้มีความไว (sensitivity) มากกว่าวิธี EM 10-100 เท่า [27]

Parrish และคณะ (1991) ได้ศึกษาการแทนที่ทางแอนติเจน และ การวิวัฒนาการทางลำดับดีเอ็นเอของ CPV พบความแตกต่างบริเวณ VP2 gene ระหว่าง CPV-2, CPV-2a และ CPV-2b ดังแสดงในรูปที่ 5

| Nucleotide | 3045 | 3088 | 3685 | 3699 | 4062 | 4449 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CPV-2 | A | T | C | G | A | G |
| | Met | Ile | Ala | Asp | Asn | Val |
| CPV-2a | T | C | G | T | A | A |
| | Leu | Thr | Gly | Tyr | Asn | Ile |
| CPV-2b | T | C | G | T | G | G |
| | Leu | Thr | Gly | Tyr | Asp | Val |
| Amino acid In VP2 | 87 | 101 | 300 | 305 | 426 | 555 |

รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสและกรดอะมิโนบริเวณ VP2 gene ระหว่าง CPV-2, CPV-2a และ CPV-2b

Greenwood (1995) ได้ใช้ restriction enzymes 21 ชนิด ในการตัด Canine Parvoviral DNA ขนาด 5.3 กิโลเบส พบว่า *Mbo* I และ *Hph* I สามารถแยก CPV-2 ออกจาก CPV-2a และ CPV-2b ส่วน restriction enzymes *Hae* III, *Hinf* I, *Dra* I และ *Hha* I จะสามารถแยก CPV-2b ออกจาก CPV-2 และ CPV-2a [35]

ในปี 1998 Sagazio และคณะ ได้ใช้ restriction enzymes (RE) ได้แก่ *Rsa* I, *Hpa* II, *Hind* III และ *Pvu* II ตัด Canine Parvoviral DNA ขนาด 2.2 กิโลเบสซึ่งอยู่ในส่วน VP1 และ VP2 พบว่ามีเพียง *Rsa* I ชนิดเดียวที่สามารถแยก CPV-2 ออกจาก CPV-2a และ CPV-2b ประโยชน์ที่ได้คือ สามารถแยกการติดเชื้อ CPV ที่เกิดจากการให้วัคซีน (CPV-2) ออกจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ (CPV-2a หรือ CPV-2b) [36]