



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ พัฒนวิธีการตรวจวินิจฉัยยืนยันสร้างสารพิษของเชื้อ

Clostridium perfringens ด้วยเทคนิค

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

โดย ผศ. ดร. ณฐารินทร์ งามวงศ์สถิต และคณะ

31 สิงหาคม พ.ศ. 2563

สัญญาเลขที่ TRG5380005

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยยืนยันสร้างสารพิษของเชื้อ

Clostridium perfringens ด้วยเทคนิค

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ผศ. ดร. ฐาปนันท์ งามวงศ์สถิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.มหิดล

ศ. ดร. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

และมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยโครงการนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเพราะความร่วมมือของทีมผู้วิจัยและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน คณะผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งใจในความมีน้ำใจและความช่วยเหลือในทุกด้าน ขอขอบคุณ เจ้าของฟาร์มสุกร ที่เล็งเห็นความสำคัญของการวิจัยในครั้งนี้และอนุญาตให้เข้าพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง รศ. ดร. น.สพ. กัมพล แก้วเกษ และ อ. ส.พญ. สิริพร ตันทเวส สำหรับการติดต่อประสานงานฟาร์มสุกรและเก็บตัวอย่างจากลูกสุกร นางสาวสุกัญญา อภิรัตน์วรสกุล นางมลฤดี ผิวสุข ศูนย์ตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการสนับสนุนด้านการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ Prof. Joachim Frey มหาวิทยาลัยเบิร์น ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ สำหรับความเอื้อเฟื้อเชื้อ *Clostridium perfringens* สายพันธุ์มาตรฐาน ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ให้ความเมตตาและคำแนะนำตลอดโครงการ ขอขอบคุณคณะผู้บริหารคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ส่งเสริมและสนับสนุนในการทำวิจัย ที่สำคัญที่สุด ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยมหิดล ที่มอบโอกาสและให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

Abstract

Project code : TRG5380005

Project Title : Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique for detection of toxin gene in *Clostridium perfringens*

Investigator : Assist. Prof. Dr. Natharin Ngamwongsatit and Prof. Dr. Watanalai Panbangred,
Mahidol University

E-mail Address : natharin.nga@mahidol.ac.th

Project Period : May 31st, 2010 – August 31st, 2020

The specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and multiplex PCR (mPCR) for rapid detection of *C. perfringens* in swine feces was developed and evaluated. A set of specific LAMP and mPCR primers was designed for recognizing four distinct regions on *cpa* gene for LAMP primer and seven specific genes for toxinotyping of *C. perfringens* including 16s specific *C. perfringens* *cpa* *cpb* *etx* *iap* *cpe* and *cpb2* for mPCR. The result showed that both primer sets was specific to five *C. perfringens* reference strains but did not amplify other 17 non-*C. perfringens* strains. The target DNA could be amplified under LAMP optimized condition at 63°C within 30 to 60 minute in a water bath and visualized turbidity by naked eye. The sensitivity between LAMP and mPCR using DNA template extracted from *C. perfringens* ATCC 13124 strains were compared. The detection limit of mPCR was ranging from 100 fg to 10 ng depend on the *C. perfringens* type strains whereas LAMP was able to detect DNA at 10 ng. Moreover the efficacy of LAMP and mPCR was compared with reference culture method using fifty swine feces samples. It was very high 100% sensitivity and specificity in which 30 samples were positive among three methods. The obtained results revealed that LAMP and mPCR methods targeting specific *C. perfringens* toxin genes has a great potential use as a rapid screening molecular method in the detection of *C. perfringens* in animal specimens and identifying up to the toxinotyping level.

Keywords: *Clostridium perfringens*, LAMP, toxin

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5380005

ชื่อโครงการ: พัฒนาวีธีตรวจวินิจฉัยยืนยันสร้างสารพิษของเชื้อ *Clostridium perfringens* ด้วยเทคนิค
loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

ชื่อนักวิจัย: ผศ. ดร. ณฐารินทร์ งามวงศ์สถิต และ ศ.ดร.วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : natharin.nga@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2553 ถึง 31 สิงหาคม พ.ศ. 2563

การพัฒนาและประเมินเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) และ multiplex PCR (mPCR) ที่มีความไวและความจำเพาะเพื่อตรวจหาเชื้อ *C. perfringens* ในตัวอย่างมูลสุกร โดยทำการออกแบบชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *cpa* สำหรับ LAMP และยีนที่จำเพาะอีก 7 ยีน ประกอบไปด้วย 16s specific *C. perfringens cpa cpb etx iap cpe* และ *cpb2* เพื่อป้องกันสายพันธุ์ของ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค mPCR ซึ่งผลการทดสอบพบว่า ชุดไพรเมอร์ทั้งสองชุดมีความจำเพาะต่อเชื้อ *C. perfringens* สายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 5 สายพันธุ์ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียทั้งในกลุ่ม *Clostridium* และ enteric อื่นๆที่ใช้ทดสอบจำนวน 17 สายพันธุ์ การเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค LAMP ในสภาวะที่เหมาะสมทำได้โดยใช้อุณหภูมิเดียวที่ 63 องศาเซลเซียสเป็นเวลาตั้งแต่ 30-60 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิและสามารถตรวจสอบผลโดยการสังเกตความขุ่นได้ด้วยตาเปล่า ในการศึกษาได้เปรียบเทียบความไวระหว่าง LAMP และ mPCR โดยใช้ DNA template ที่สกัดจากเชื้อ *C. perfringens* ATCC 13124 พบว่า เทคนิค mPCR มีความไว ตั้งแต่ 100 เฟมโตกรัม ถึง 10 นาโนกรัม ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ ในขณะที่ LAMP มีความไวในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอที่ 10 นาโนกรัม นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ LAMP และ mPCR ในการตรวจหาเชื้อ *C. perfringens* จากมูลสุกรโดยตรงจำนวน 50 ตัวอย่าง เทียบกับการเพาะเชื้อแบบมาตรฐานพบว่า เทคนิค LAMP และ mPCR ให้ผลบวก 30 ตัวอย่างโดยที่ความไวและความจำเพาะอยู่ในระดับที่สูงมากถึงร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน จากผลการศึกษาบ่งชี้ว่าเทคนิค LAMP และ mPCR ที่ออกแบบให้ตรวจหาการสร้างสารพิษที่จำเพาะต่อ *C. perfringens* มีแนวโน้มที่จะนำไปใช้พัฒนาในการตรวจหาเชื้อ *C. perfringens* ในตัวอย่างจากสัตว์ได้โดยสามารถระบุได้ถึงระดับสายพันธุ์

คำหลัก: คลอสติดิเทียม เพอร์ฟิงเจนส์ LAMP สารพิษ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	4
สารบัญตาราง	7
สารบัญภาพ	8
บทที่ 1 บทนำ	9
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	11
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	14
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 วิเคราะห์และสรุปข้อเสนอแนะ	30
บรรณานุกรม	31

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ชนิดสารพิษที่ <i>C. perfringens</i> ผลิตขึ้น	12
ตารางที่ 2 ไพรมเมอร์สำหรับปฏิกิริยา multiplex PCR และ LAMP	16
ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบวิธีการตรวจ toxin genes ของเชื้อ <i>C. perfringens</i> ด้วยเทคนิค multiplex PCR และ LAMP โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจกับวิธีเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน	29

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 ลักษณะเชื้อ <i>C. perfringens</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC agar	17
รูปที่ 2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ <i>C. perfringens</i> ใน Motility nitrate medium และ Iron milk medium	18
รูปที่ 3 2% agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์จาก multiplex PCR ที่ใช้ตรวจแยกเชื้อ <i>C. perfringens</i>	20
รูปที่ 4 ผลการตรวจหายีนสร้างสารพิษจากเชื้อ <i>C. perfringens</i> ที่เพาะแยกจากสุกรในฟาร์มของประเทศไทย	21
รูปที่ 5 ความไวของชุด mPCR primer ในการตรวจระบุยีนสร้างสารพิษของ <i>C. perfringens</i>	22
รูปที่ 6 ความจำเพาะของชุด mPCR primer ในการตรวจระบุยีนสร้างสารพิษของ <i>C. perfringens</i> จากตัวอย่าง DNA ต้นแบบจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์อื่นๆ	23
รูปที่ 7 ผลการทดสอบความจำเพาะของ LAMP F3/B3 primer ต่อ DNA ของเชื้อ <i>C. perfringens</i> ATCC 13124	24
รูปที่ 8 ผลการทดสอบปฏิกิริยา LAMP ต่อ DNA ของเชื้อ <i>C. perfringens</i> ATCC 13124	25
รูปที่ 9 ผลการทดสอบระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของ LAMP ในการตรวจหา <i>cpa</i> ของ <i>C. perfringens</i> ณ เวลาต่างๆ	26
รูปที่ 10 ความไวของ LAMP primer ในการตรวจหายีน <i>cpa</i> ของเชื้อ <i>C. perfringens</i>	27
รูปที่ 11 ความจำเพาะของ LAMP ในการตรวจระบุยีนสร้างสารพิษ <i>cpa</i> ของ <i>C. perfringens</i> จากตัวอย่าง DNA ต้นแบบจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์อื่นๆ	28

บทที่ 1

บทนำ

Clostridium perfringens เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งที่สามารถสร้างสปอร์ได้และไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (anaerobic bacteria) แบคทีเรียจำพวกนี้พบกระจายทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทั้งดิน อากาศ ฝุ่นละออง น้ำ อุจจาระของคน สัตว์ ตลอดจนอาหารชนิดต่างๆ ทั้งอาหารดิบและอาหารที่ผ่านกระบวนการแล้วซึ่งเกิดการปนเปื้อนในภายหลัง หรืออาหารที่อยู่ในสภาพไร้ออกซิเจน ซึ่งผ่านความร้อนไม่เพียงพอ เช่น อาหารกระป๋อง หน่อไม้บรรจุป๊อป ไส้กรอก เป็นต้น ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเชื้อสามารถสร้างสปอร์ ซึ่งสปอร์จะงอกและเจริญเติบโตเป็นเซลล์เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและเข้าสู่ระยะพักตัว เพิ่มจำนวน และสร้างสารพิษ เชื้อจะเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าทุกๆ 20-30 นาที ดังนั้นถ้าอาหารมีเชื้อปนเปื้อนเพียง 1 เซลล์ ภายใน 10 ชั่วโมง เชื้อจะมีจำนวนมากกว่าหนึ่งล้านเซลล์ นอกจากนี้เชื่อยังต้องการสารอาหารเพียงเล็กน้อย ทำให้เจริญเติบโตง่าย สามารถพบการปนเปื้อนเชื้อ *C. perfringens* แม้แต่ในหน่อไม้บรรจุป๊อปที่มีแหล่ง carbon และ nitrogen ที่จำกัด ในระหว่างการเจริญเติบโต เชื้อ *C. perfringens* ผลิตสารพิษจำนวนหลายชนิดที่มีความจำเพาะทั้งต่อคนและสัตว์ โดยแบ่งเชื้อ *C. perfringens* เป็น 5 ชนิด ตามคุณสมบัติการสร้างสารพิษ พบว่าสารพิษชนิด alpha toxin พบใน *C. perfringens* ทุกสายพันธุ์ (Hatheway, 1990) และมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในคนและสัตว์ และยังเกี่ยวข้องกับการเกิดอาหารเป็นพิษด้วย

ข้อมูลเกี่ยวกับการระบาดของเชื้อ *Clostridium* ในประเทศไทยมีรายงานน้อยเมื่อเทียบกับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ อาจเนื่องมาจากการตรวจวินิจฉัยเชืที่ยาก มีข้อจำกัดในเรื่องการเพาะแยกเชื้อซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม anaerobe การเก็บส่งตรวจที่ไม่ดีพอทำให้เชื้อตาย เป็นต้น จากรายงานของโรงพยาบาลศิริราชในช่วงปี พ.ศ. 2541-2542 พบผู้ป่วยที่มีเชื้อ *C. difficile* ถึง 77 ราย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ช่วงปี พ.ศ. 2545-2548 มีผู้ป่วยติดเชื้อนี้ถึง 88 ราย สำหรับเชื้อ *C. botulinum* มีรายงานการเสียชีวิตจำนวน 1 รายจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อจำนวน 6 ราย ในโรงพยาบาลแม่สอด จ. ตาก เมื่อปี พ.ศ. 2540 รายงานการเสียชีวิต 2 รายจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ 13 ราย ในปี พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดน่าน และการระบาดครั้งล่าสุดในจังหวัดน่าน เมื่อปี พ.ศ. 2549 มีผู้ป่วยติดเชื้อจำนวนสูงถึง 167 ราย จากการรับประทานหน่อไม้ป๊อปที่มีการปนเปื้อนสารพิษครอสติเดียมชนิดเอ จากเชื้อ *C. botulinum* ถึงแม้ว่าทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดหลักเกณฑ์มาตรฐานทางด้านจุลินทรีย์สำหรับอาหารแต่ละประเภท แต่ก็ยังพบรายงานการติดเชื้อจากการรับประทานอาหารอยู่เสมอ ด้วยเหตุนี้การตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคที่รวดเร็วจึงมีความสำคัญยิ่งที่จะช่วยลดการระบาด การวินิจฉัย การควบคุม และมีข้อมูลเพื่อป้องกันการเกิดโรคซ้ำซ้อน

วิธีการตรวจและวินิจฉัยที่ใช้ในห้องปฏิบัติการในการตรวจหาเชื้อคลอสทริเดียมในตัวอย่างทางคลินิกและอาหารคือการเพาะเชื้อในอาหารเพาะเชื้อ การหาความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์สายพันธุ์ต่างๆ และการหาความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองเช่น หนูทดลอง เป็นต้น ปัญหาของวิธีการวินิจฉัยดังกล่าวคือการใช้เวลานานประมาณ 8-12 วัน ก่อนจะทราบผลการตรวจ อีกทั้งต้องอาศัยความชำนาญเชี่ยวชาญของผู้ทำการทดลอง และยังมีข้อจำกัดในกรณีที่ต้องวินิจฉัยหลายๆ ตัวอย่างพร้อมกัน ปัญหาเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อการรักษาคนและสัตว์ที่ป่วย นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหารซึ่งต้องการการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพภายในระยะเวลาอันสั้น ถึงแม้ว่าในปัจจุบัน นักวิจัยต่างประเทศได้พัฒนาชุดตรวจที่ให้ผลได้เร็วขึ้น โดยใช้หลักการทางอิมมูโนวิทยา ซึ่งมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อการจับกับสารพิษที่สร้างมาจากเชื้อคลอสทริเดียม แต่ชุดตรวจเหล่านี้มีราคาค่อนข้างสูง (ตัวอย่างเช่นแอนติบอดีต่อ Toxin A ของเชื้อ *C. perfringens* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีราคาประมาณ 5,000 บาท) รวมถึงต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ และผลการตรวจไม่แม่นยำเท่าที่ควร นำมาซึ่งผลตรวจที่เป็นลบ ทั้งๆที่มีแบคทีเรียอยู่ในตัวอย่าง เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาชิ้นที่จำเพาะต่อเชื้อในกลุ่ม *Clostridium* วิธีนี้มีความไวและความแม่นยำสูง สามารถตรวจหาชิ้นก่อโรคหลายชิ้นได้ในเวลาพร้อมกัน ช่วยลดต้นทุนในการตรวจ แต่มีข้อจำกัดในด้านเครื่องมือ ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูงและจำเพาะ ต้องการนักวิจัยที่เชี่ยวชาญในการวินิจฉัย การปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกันในตัวอย่าง ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้เทคนิค PCR สามารถใช้ได้เฉพาะบางห้องปฏิบัติการเท่านั้น เมื่อเร็ว ๆ นี้ Notomi และคณะ (2000) ได้พัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว มีความแม่นยำ ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่พิเศษ โดยการตรวจหาชิ้นก่อโรคเหมือนกับวิธี PCR

เห็นได้ว่า การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเป็นสิ่งจำเป็นยิ่ง ซึ่งต้องการวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง เพื่อนำไปใช้ในการวินิจฉัยผู้ติดเชื้อทั้งคนและสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการรักษา การเฝ้าระวังโรค รวมไปถึงการตรวจในกลุ่มที่ไม่มีอาการ เพื่อป้องกันการแพร่กระจายและระบาดของโรค

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้

1. เพื่อพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วสำหรับตรวจหา toxin genes ของเชื้อ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค multiplex PCR และ LAMP
2. เปรียบเทียบวิธีการตรวจ toxin genes ของเชื้อ *C. perfringens* จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ด้วยเทคนิค multiplex PCR และ LAMP

บทที่ 2

เนื้อเรื่อง

Clostridium perfringens เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งที่สามารถสร้างสปอร์ได้และไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (anaerobic bacteria) ซึ่งพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดินและน้ำ พบอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญทั้งในคนและสัตว์ (Songer, 1996) *C. perfringens* สามารถแยกออกได้เป็น 5 ชนิด คือ ชนิด A B C D และ E โดยอาศัยความสามารถของเชื้อในการสร้างสารพิษที่จำเพาะในแต่ละชนิด ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ alpha (α ; CPA) beta (β ; CPB) epsilon (ϵ ; ETX) และ iota (ι ; ITX) (Hatheway, 1990) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดย *C. perfringens* ชนิด A และ C จะก่อโรคในคน แต่ชนิด B D และ E จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญเฉพาะในสัตว์ (Joshy et al., 2006)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดสารพิษที่ *C. perfringens* ผลิตขึ้น (ที่มา: Hatheway et al., 1990)

Toxinotype of <i>C. perfringens</i>	Major toxin produced			
	Alpha	Beta	Epsilon	Iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

สารพิษเหล่านี้เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ สารพิษชนิด alpha เป็นสาเหตุหลักในการทำให้เกิด gas gangrene ในคน โรคลำไส้อักเสบที่มีการตายของเนื้อลำไส้ (necrotic enteritis) และ ลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง (enterotoxaemia) มีภาวะเลือดออกในลำไส้ของสัตว์ (Katayama et al., 1993) และพบในเชื้อ *C. perfringens* ทุกสายพันธุ์ สารพิษชนิด beta เป็นสาเหตุของโรคลำไส้อักเสบในคนและสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Smith, 1979; Uzal and Songer, 2008) สารพิษชนิด epsilon เป็นสารพิษที่ก่อให้เกิด acute

enterotoxaemia ในสัตว์ (Petit, 1999) และยังจัดเป็นสารพิษอันตราย หรือ Bioterrorism (Clarke, 2005) สำหรับสารพิษชนิด iota เป็นสารพิษที่ก่อโรคเฉพาะในสัตว์โดยเฉพาะลูกวัวและแกะโดยทำให้เกิด enterotoxaemia (Petit, 1999).

C. perfringens ยังจัดเป็นแบคทีเรียตัวหลักที่ก่อโรคเกี่ยวกับอาหารเป็นพิษในคน (Food-poisoning) เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างสปอร์ ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนไปกับอาหาร เมื่อบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อหรือสปอร์ *C. perfringens* ที่บริโภคเข้าไปหรือสปอร์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการงอกและเจริญเติบโต จะมีการปล่อยสารพิษออกมาในลำไส้เล็ก ทำให้มีอาการท้องเดินอย่างแรง เกิดตะคริวที่ท้องแต่จะไม่ค่อยพบอาการคลื่นไส้อาเจียน ด้วยคุณสมบัติของสปอร์ที่ทนต่อความร้อนสูง และทนต่อสารเคมีที่ใช้ในการระบเชื้อจึงยากที่จะกำจัด เนื่องจาก *C. perfringens* เป็นเชื้อที่ก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ และมีความสามารถในการสร้างสารพิษหลายชนิดที่เป็นอันตราย ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *C. perfringens* จึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง

การวินิจฉัยเชื้อในกลุ่ม *Clostridium* spp. ด้วยการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นทำได้ยากและมีข้อจำกัดหลายอย่าง อาทิเช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน เครื่องมืออุปกรณ์ที่เฉพาะ ความชำนาญเชี่ยวชาญของผู้ปฏิบัติงาน เป็นต้น ส่วนวิธีการหาความเป็นพิษต่อเซลล์หรือสัตว์ทดลองนั้นใช้ต้นทุนสูง ระยะเวลาประมาณ 8-12 วัน (Lindstrom and Korkeala, 2006) ทั้งสองวิธีที่กล่าวมานี้ใช้เวลานานในการทราบผลการวินิจฉัย ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการรักษาของผู้ป่วย ต่ออุตสาหกรรมอาหาร จึงได้มีการพัฒนาการตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยาโดยการตรวจหาสารพิษที่จำเพาะต่อเชื้อ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะทราบผลเร็วขึ้น (Peterson et al., 1996) แต่ผลการตรวจไม่แม่นยำเท่าที่ควร จำต้องนำเข้าสู่ตรวจจากต่างประเทศซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง เพื่อให้ทราบผลการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำ การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยจึงจำเป็นอย่างยิ่ง เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมแพร่หลายในการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัย เนื่องจากมีความรวดเร็ว แม่นยำสูง โดยตรวจหาชิ้นที่จำเพาะต่อเชื้อต่างๆ อาทิเช่น การตรวจหา enterotoxin genes ในเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วย multiplex PCR (Ngamwongsatit et al., 2008) การตรวจหา toxin gene ในเชื้อกลุ่ม *Clostridium* และการแยกชนิดเชื้อ *C. perfringens* (Persson et al., 2008; Gurjar et al., 2008; Heikinheimo et al., 2005; Yoo et al., 1997) ด้วยเทคนิค multiplex PCR หรือ real time PCR เทคนิคเหล่านี้อาศัยความจำเพาะระหว่าง primer กับยีนของเชื้อ ทำให้ผลที่ได้มีความแม่นยำ ความถูกต้องค่อนข้างสูง และสามารถตรวจหาชิ้นก่อโรคหลายๆชนิดในเวลาเดียวกันได้ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดในเรื่องเครื่องมือ thermocycler ที่มีความเฉพาะและราคาแพง

ความชำนาญเชี่ยวชาญของนักวิจัย ทำให้ PCR สามารถใช้ในบางห้องปฏิบัติการเท่านั้น จากปัญหาดังกล่าว Notomi และคณะ (2000) ได้พัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งวิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างรวดเร็ว (น้อยกว่า 1 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิเดียว โดยใช้ primer ที่ออกแบบพิเศษและมีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก primer ทั่วไปที่ใช้ใน PCR ด้วยคุณสมบัติของ primer และคุณสมบัติของเอนไซม์ในปฏิกิริยา ทำให้ LAMP สามารถทำปฏิกิริยาโดยใช้ water bath เป็นเครื่องมือในการช่วยควบคุมอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวเป็นเครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ มีราคาถูกกว่า thermocycler ในการวิเคราะห์ LAMP product สามารถอ่านผลการทดสอบโดยดูความขุ่นที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่าง LAMP product และmagnesium pyrophosphate ในสารละลาย หรือดูการเรืองแสงที่เกิดขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อน ซึ่งช่วยลดความยุ่งยากในการอ่านผล ลดอัตราเสี่ยงต่อการสัมผัสสารก่อมะเร็ง (ethidium bromide) (Parida et al., 2008) ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยในหลายแขนง โดยเฉพาะการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรค ได้นำเทคนิค LAMP มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคต่างๆ ทั้งแบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต ในคนและสัตว์ อาทิเช่นเชื้อ *Salmonella* (Okamura et al., 2008) *Brucella* (Ohtsuki et al., 2008) *Trypanosoma brucei* (Njiru et al., 2008) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Rovira et al., 2009) *Clostridium botulinum* (Sakuma et al., 2009) เป็นต้น วิธีนี้เหมาะสมอย่างยิ่งในการนำมาใช้ทางวิทยาศาสตร์วินิจฉัย เพราะเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะในห้องปฏิบัติการ โดยเป็นวิธีการที่มีความรวดเร็วและแม่นยำสูง ใช้งานง่าย ไม่ต้องการผู้ปฏิบัติงานที่มีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษในการตรวจสอบ

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. การเพาะแยกเชื้อ *C. perfringens* จากลูกสุกรและเก็บรวบรวมเชื้อ

การเพาะแยกเชื้อ *C. perfringens* จากลูกสุกรท้องเสียในฟาร์มเลี้ยงสุกรในเขตจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรีและราชบุรี ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ MUVS-2011-06 ซึ่งได้ทำการเก็บตัวอย่างมูลสุกร จากลูกสุกรตุนม จำนวน 60 ตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างจากฟาร์มสุกรทั้งสิ้น 6 ฟาร์ม จำนวนละ 10 ตัวอย่าง โดยเก็บมูลสุกรด้วยวิธีป้าย รูทวารด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ โดยเก็บใส่ใน Carry-Blair transport medium เพื่อทำการเพาะแยกเชื้อ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose-sulfite-cycloserine (TSC) agar บ่มที่ 37°C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน นาน 48 ชั่วโมง เลือกลักษณะโคโลนีสีดำจำเพาะ อย่างน้อย 3-6 โคโลนี เพื่อย้อมสีแกรม ย้อมสปอร์ และทดสอบทางชีวเคมี ประกอบไปด้วย ทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test) การใช้ไนเตรท (nitrate reduction) การหมักน้ำตาลแลคโทส (lactose fermentation) การย่อยสลายเจลาติน (gelatinase production) การย่อยสลายนม (stormy fermentation in litmus milk) เชื้อ *C. perfringens* ทุกตัวที่เพาะแยกได้จะถูกเลี้ยงใน cooked meat เพื่อเก็บรักษาเชื้อไว้

สำหรับ *C. perfringens* สายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ NCTC 10239 (type A) NCTC 8084 (type E) ATCC 3626 (type B) และ Ue2130/06 (type C) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Joachim Frey, University of Bern, Switzerland

2. การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนและออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อการตรวจหา toxin gene ของเชื้อ *C. perfringens*

ดำเนินการรวบรวมข้อมูลยีนสร้างสารพิษจำนวน 6 ยีนประกอบไปด้วย *cpa* *cpb* *etx* *iap* *cpb2* และ *cpe* ของเชื้อ *C. perfringens* ในฐานข้อมูล NCBI งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *cpa* *cpb* *etx* *cpb2* และ *cpe* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลจำนวน 8 7 12 32 และ 12 สายพันธุ์ ตามลำดับ รายละเอียดไพรเมอร์สรุปในตารางที่ 2

สำหรับการตรวจหายีน *cpa* ด้วยเทคนิค LAMP ได้ดำเนินการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer V4 รายละเอียดไพรเมอร์สรุปในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา multiplex PCR และ LAMP

Reaction	Target genes	Primer name	5' – 3' sequence	Product size (bp)	References
mPCR	16s rRNA	CIPER-F	AGATGGCATCATCATTCAAC	793	Kikuchi et al., 2002
		CIPER-R	GCAAGGGATGTCAAGTGT		
	cpa	F1Cpa	GATGGAACAGGAACTCATGCTATG	661	This study
		R1Cpa	CTAAAGTTACCTTTGCTGCATAATCC		
	etx	F1Etx	GGAAAAATATTATCCTAATGCTATGGC	516	
		R1Etx	GCTAAATAACTAGGTATCTCTCCCCATT		
	cpe	F1Cpe	GGAGATGGTTGGATATTAGGGGA	410	
		R1Cpe	CCAGTTTCAATTAATGAACCTTGATC		
	cpb2	CPBeta2F	AAATATGATCCTAACCAAMAA	301	
		CPBeta2R	CCAAATACTYTAATYGATGC		
	iap	CPIotaF2	AATGGTCCTTTAAATAATCC	272	van Asten et al., 2009
		CPIotaR	TTAGCAAATGCACTCATATT		
	cpb	CPBetaF3	GCGAATATGCTGAATCATCTA	195	
		CPBetaR3	GCAGGAACATTAGTATATCTTC		
LAMP	cpa	F3	TTTCTCAAAGGATAATAGTTGGT		This study
		B3	ATGTCCTGCGCTATCAAC		
		FIP	TTGCCATTCATATCTAGCTAATGCTCTATACCTGAC ACAGGGGA		
		BIP	CAAGCTACATTCTATCTTGGAGAGGATTAGCAGGA TGATATGGAGTA		

3. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา toxin gene ของเชื้อ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค multiplex PCR

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ toxin gene ทั้ง 6 ชนิด ได้สกัด DNA จากเชื้อ *C. perfringens* สายพันธุ์มาตรฐาน จำนวนรวม 7 ตัว โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน 10 ml cooked meat medium บ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง เตรียม template DNA โดยปั่นตกตะกอน culture broth ที่ได้ ปริมาตร 1.5 ml ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE buffer และนำตะกอนเหลวที่ได้ไป ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เก็บส่วนใสที่มี DNA โดยการปั่นที่ 10,000 rpm นาน 2 นาที เก็บ DNA ที่สกัด ได้ที่ -20°C และนำมาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา โดยปรับความเข้มข้นของสารต่างๆใน

ปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ความเข้มข้นของ PCR buffer primer ที่ใช้ในแต่ละคู่ dNTP และ Taq DNA polymerase นอกจากนี้ มีการทดสอบสภาวะ PCR condition โดยปรับอุณหภูมิในการจับของ primer ตั้งแต่ 52-60°C และทดสอบความไวของชุดตรวจ ด้วย DNA ของ *C. perfringens* สายพันธุ์มาตรฐาน

ทดสอบความจำเพาะของ primer โดยการทดสอบกับเชื้อก่อโรคที่เจอได้ในระบบทางเดินอาหาร จำนวน 17 สายพันธุ์ ได้แก่ *Citrobacter diversus* *Citrobacter freundii* *Clostridium difficile* *Escherichia coli* *Enterobacter cloacae* *Enterococcus faecium* *Enterococcus fecalis* *Klebsiella pneumonia* *Morganella morganii* *Proteus mirabilis* *Proteus vulgaris* *Salmonella Choleraesuis* *Salmonella* Typhimurium *Salmonella* Enteritidis *Shigella boydii* *Shigella flexneri* และ *Shigella sonnei*

4. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา *cpa* gene ของเชื้อ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค

LAMP

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาของ LAMP จะใช้ DNA template ชุดเดียวกับการทดสอบ mPCR โดยใช้ความเข้มข้นของสารแต่ละตัวตามมาตรฐาน ดังนี้ 1.6 μ M ของ FIP และ BIP 0.2 μ M ของ F3 และ B3 primer 1X LAMP buffer 1M Betaine 1.6 mM dNTPs 6 mM of $MgSO_4$ 8U Bst DNA polymerase และ DNA template 5 μ l ทดสอบภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตั้งแต่ 60-65°C ทดสอบความไวและความจำเพาะของ LAMP primer เช่นเดียวกับ mPCR primer

5. เปรียบเทียบวิธีการตรวจ toxin genes ของเชื้อ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค multiplex PCR และ

LAMP โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจกับวิธีเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน

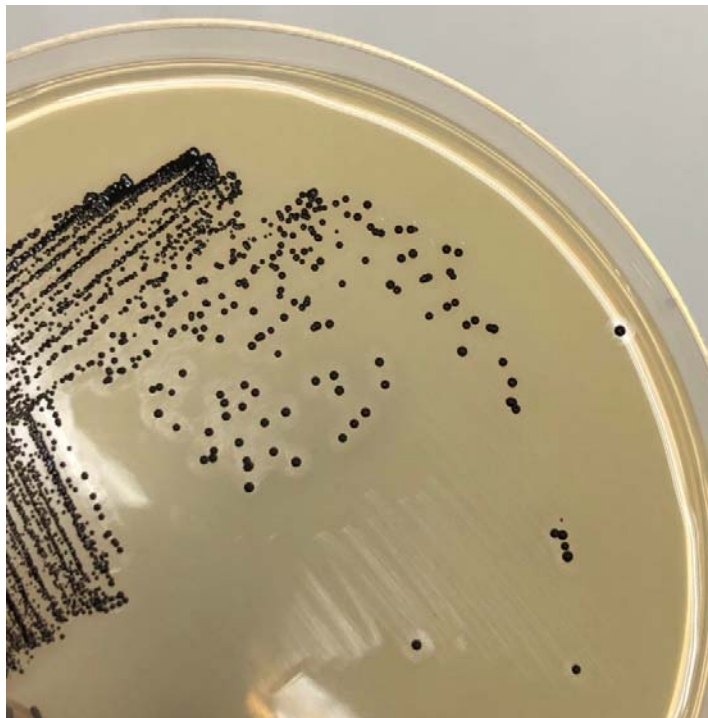
ทำการเก็บตัวอย่างมูลสุกรหรือ rectal swab จำนวนทั้งสิ้น 50 ตัว โดยสุ่มเลือกสุกรที่มีอาการท้องร่วงจากฟาร์มสุกรในเขตจังหวัดนครปฐม ราชบุรี และกาญจนบุรี การเก็บตัวอย่างจะดำเนินการภายใต้การดูแลและคำแนะนำจากสัตวแพทย์ นำอุจจาระที่ได้มาเพาะหาเชื้อทันที (ภายใน 24 ชั่วโมง) โดยนำอุจจาระไปต้มที่ 80°C นาน 20 นาทีเพื่อทำการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอุจจาระ หลังจากนั้นแบ่งอุจจาระเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก นำไปเพาะแยกหาเชื้อ *C. perfringens* โดยวิธีมาตรฐานตามข้อ ที่ 1 ส่วนที่ 2 นำไป pre enrichment ใน TSC broth บ่มที่ 37°C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน นาน 4 ชั่วโมง นำ pre enrichment broth มาสกัดแยก DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Puregene Qiagen, Germany) เพื่อตรวจหา toxin genes ของเชื้อ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค mPCR และ LAMP เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการเพาะเชื้อวิธี multiplex PCR และ LAMP

บทที่ 4

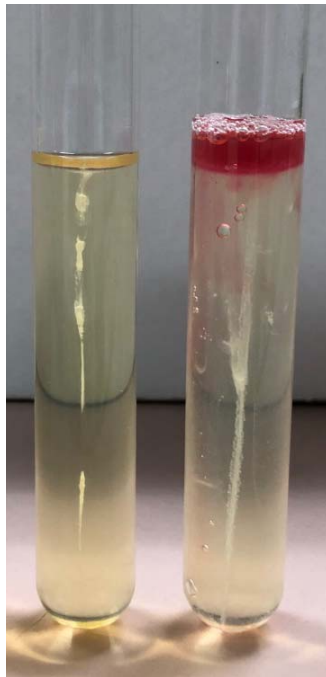
ผลการทดลอง

4.1 การเพาะแยกเชื้อ *C. perfringens* จากฟาร์มสุกร

ตัวอย่างมูลสุกรหรือ rectal swab จำนวน 60 ตัวอย่าง จากฟาร์มสุกร 6 แห่ง ทำการแยกเพาะหาเชื้อ *C. perfringens* บน TSC plate จะให้โคโลนีสีดำที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 – 4 มิลลิเมตร (รูปที่ 1) ผลการทดสอบทางชีวเคมี จะให้ Gram positive rod ไม่เคลื่อนที่ (non-motile, รูปที่ 2A) สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตส ย่อยเจลาติน ย่อย nitrate (รูปที่ 2B) และเกิดปรากฏการณ์ stormy fermentation (รูปที่ 2C-2D) จากตัวอย่าง rectal swab ที่เก็บจากลูกสุกรที่แสดงอาการถ่ายเหลว จำนวน 60 ตัวอย่าง พบเชื้อ *C. perfringens* จำนวน 48 ตัวอย่าง คิดเป็น 80 %



รูปที่ 1 ลักษณะเชื้อ *C. perfringens* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC agar



2A

2B



2C

2D

รูปที่ 2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *C. perfringens* ใน Motility nitrate medium (2A-2B) และ Iron milk medium (2C-2D) มีรายละเอียดดังนี้

2A คือ non-motile ของเชื้อ *C. perfringens* ใน Motility nitrate medium

2B คือ Nitrate reduction positive ของเชื้อ *C. perfringens* ใน Motility nitrate medium

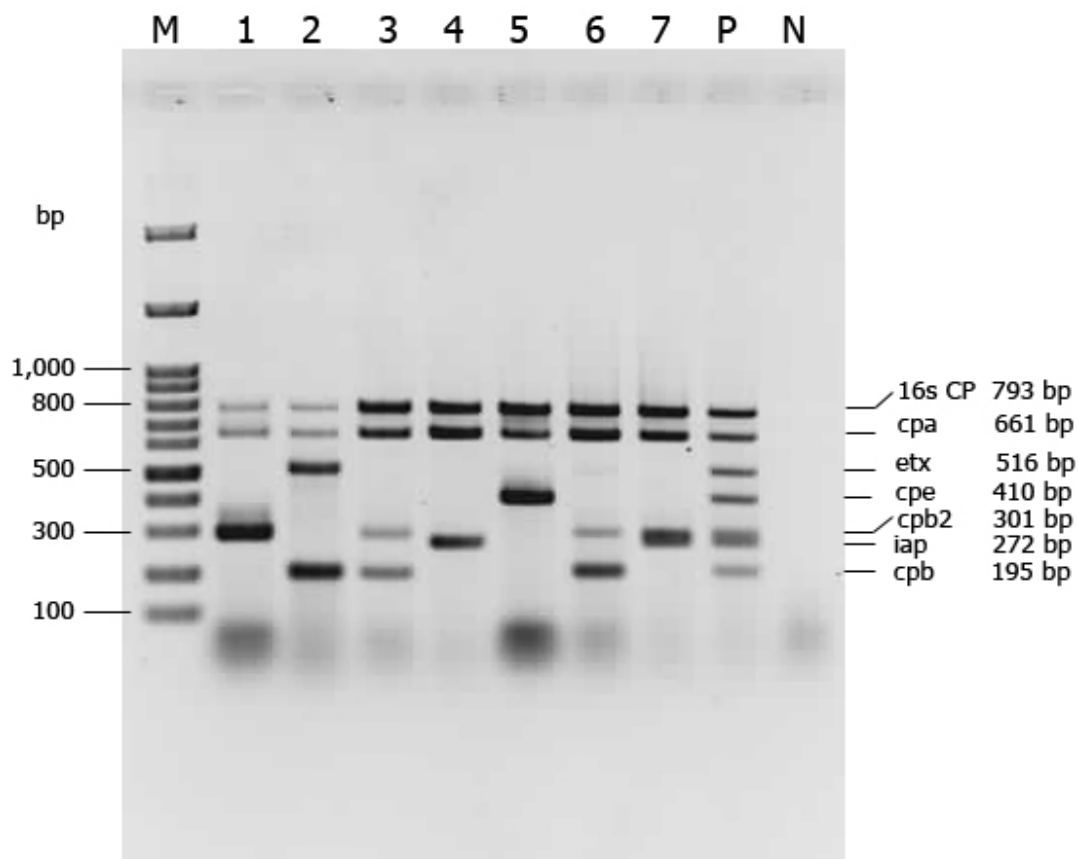
2C คือ uninoculum iron milk medium

2D คือ stormy fermentation ของเชื้อ *C. perfringens* ใน iron milk medium

4.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา toxin gene ของเชื้อ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค multiplex PCR

จากการทดลอง พบว่า ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีที่สุดภายใต้สภาวะที่ denaturing 94°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturing 94°C นาน 30 วินาที annealing 54°C นาน 30 วินาที และ extension 72°C นาน 50 วินาที โดยทำปฏิกิริยาซ้ำ 30 รอบ และ 72°C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ โดยมีความเข้มข้นของ PCR reagent ดังนี้ 1X PCR buffer 2.5 mM MgCl₂ 0.4 mM dNTPs 0.3 µM 16s และ CPA primer 0.2 µM CPB ETX IAP CPE Primer 0.1 µM CPB2 primer และ 1U Taq DNA polymerase วิเคราะห์ PCR product ที่ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย GelRed และอ่านผลภายใต้ UV transilluminator (รูปที่ 3)

เมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อ *C. perfringens* ที่แยกจากตัวอย่างในฟาร์ม ในข้อ 4.1 พบว่า เชื้อ *C. perfringens* ทั้งหมด เป็นสายพันธุ์ A ที่มียีน *cpa* และ *cpb2* (รูปที่ 4) เมื่อนำมาทดสอบความไวของชุดตรวจ โดยการใช้ DNA ที่สกัดจาก *C. perfringens* type ต่างๆ เป็น DNA template ซึ่งได้ทำการเจือจางความเข้มข้นของ DNA template แบบ 10-fold dilution ตั้งแต่ 10 ng ถึง 0.1 pg มาทำปฏิกิริยา พบว่า ความเข้มข้นของ DNA template ในการตรวจแยก type A และ B จะมีความเข้มข้นน้อยสุดที่ 100 pg (รูปที่ 5A, AE และ B) ส่วน type E และ C จะมีความเข้มข้นน้อยสุดที่ 1 ng (รูป 5E) และ 10 ng (รูป 5C) ตามลำดับ นอกจากนี้ ได้ทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นกับ DNA ที่สกัดจากเชื้อชนิดต่างๆ จำนวน 17 สายพันธุ์ จากการทดสอบพบว่า ไม่มีปฏิกิริยาข้ามของปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อ *C. perfringens* กับเชื้อชนิดอื่นๆ (รูปที่ 6)



รูปที่ 3 2% agarose gel electrophoresis ของผลิตภัณฑ์จาก multiplex PCR ที่ใช้ตรวจแยกเชื้อ

C. perfringens

Lane M: 100 bp DNA ladder

Lane 1: *C. perfringens* ATCC 13124 (type A; 16s RNA⁺ cpa⁺ cpb2⁺)

Lane 2: *C. perfringens* ATCC 3626 (type B; 16s RNA⁺ cpa⁺ etx⁺ cpb⁺)

Lane 3: *C. perfringens* Ue2130/06 (type C; 16s RNA⁺ cpa⁺ cpb2⁺ cpb⁺)

Lane 4: *C. perfringens* NCTC 8084 (type E; 16s RNA⁺ cpa⁺ iap⁺)

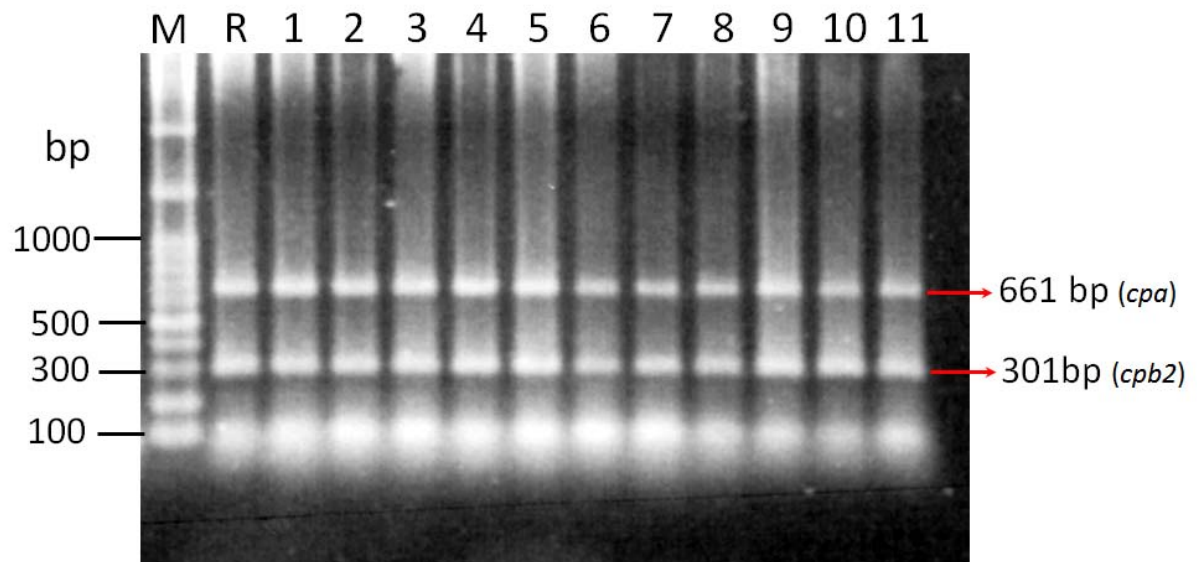
Lane 5: *C. perfringens* NCTC 10239 (type A; 16s RNA⁺ cpa⁺ cpe⁺)

Lane 6: *C. perfringens* S1 (type C; 16s RNA⁺ cpa⁺ cpb2⁺ cpb⁺)

Lane 7: *C. perfringens* SF1 (type E; 16s RNA⁺ cpa⁺ iap⁺ cpb2⁺)

Lane P: Mixed DNA template

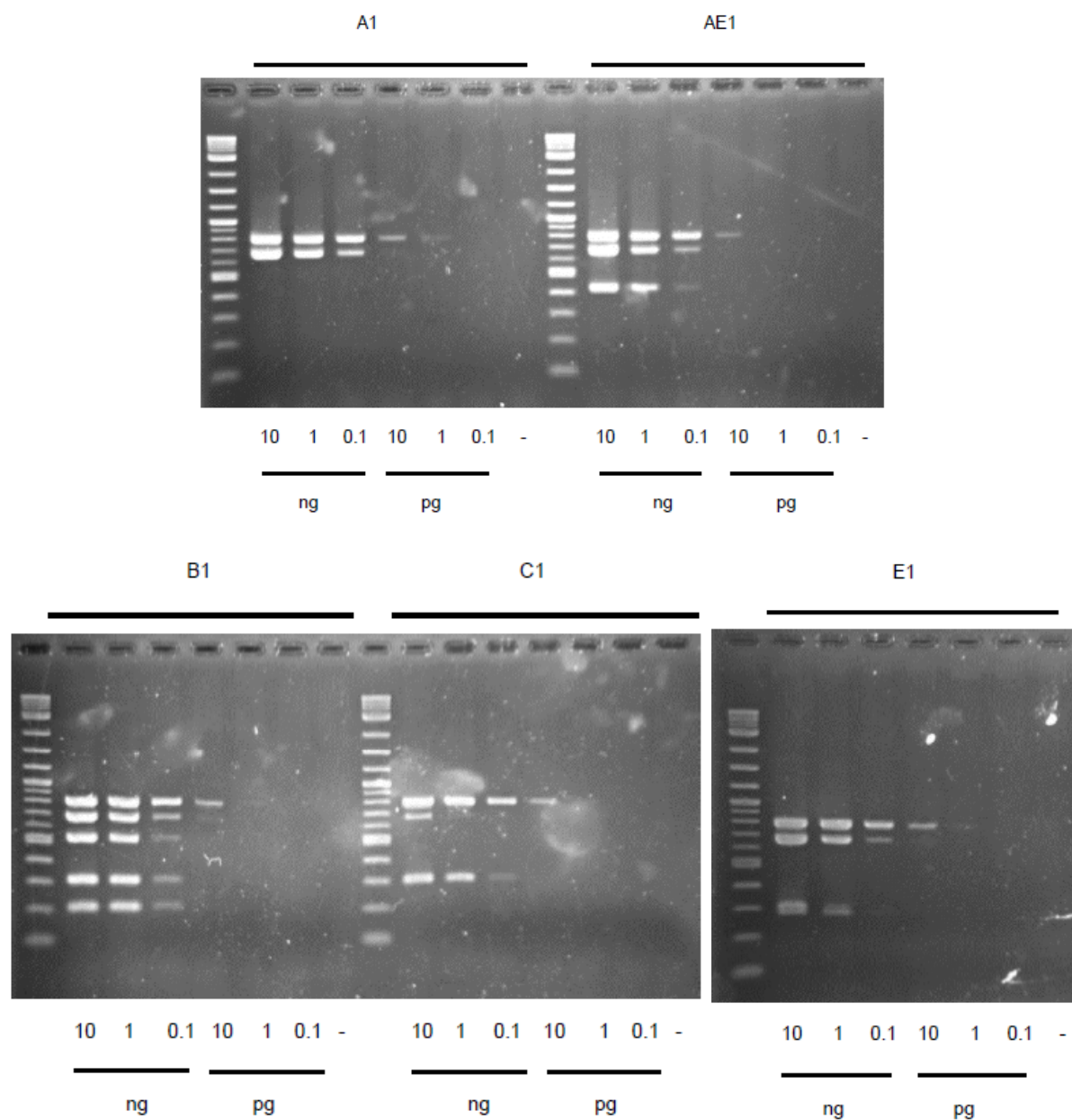
Lane N: Negative control



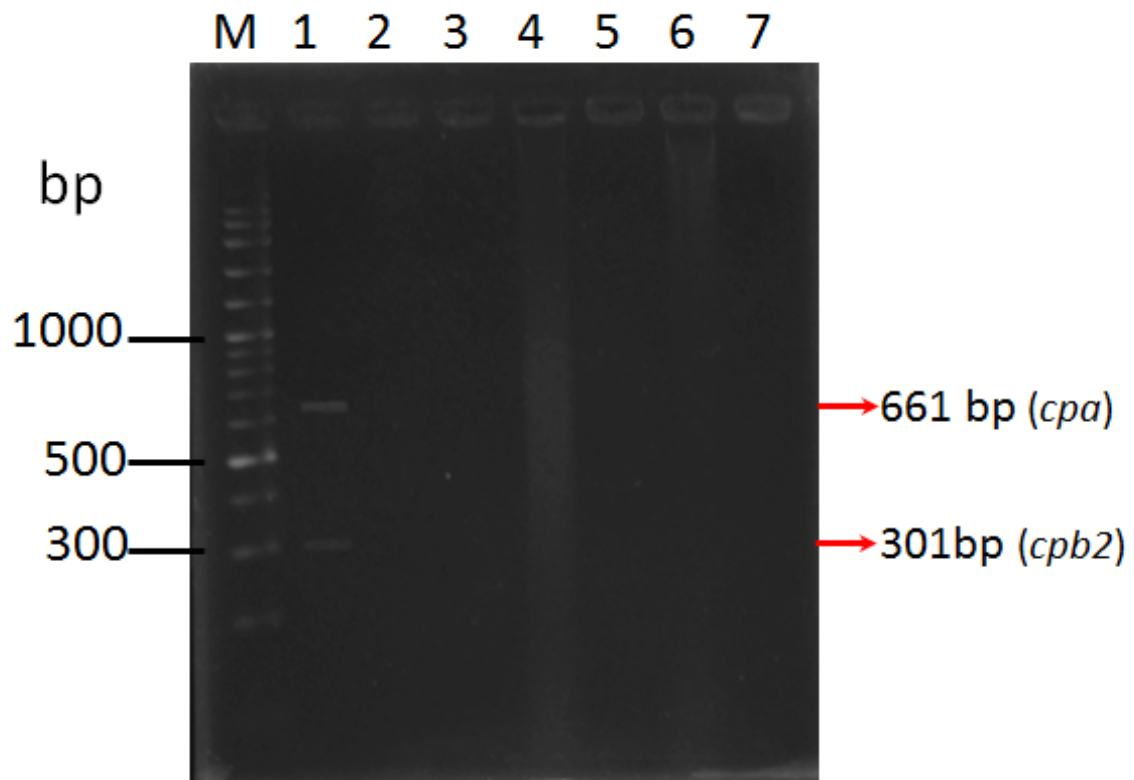
รูปที่ 4 ผลการตรวจหาชิ้นสร้างสารพิษจากเชื้อ *C. perfringens* ที่เพาะแยกจากตัวอย่างสุกรในฟาร์มของประเทศไทย

lane R คือ DNA ต้นแบบจาก *C. perfringens* ATCC 13124

lane 1-11 คือ DNA ต้นแบบ ที่สกัดจากเชื้อ *C. perfringens* ที่แยกจากตัวอย่างสุกร



รูปที่ 5 ความไวของชุด mPCR primer ในการตรวจระบุยีนสร้างสารพิษของ *C. perfringens* โดยใช้ DNA ที่สกัดจาก *C. perfringens* ATCC 13142 (A1) NCTC 10239 (AE1) ATCC 3626 (B1) Ue2130/06 (C1) และ NCTC 8084 (E1) ที่ระดับความเข้มข้นของ DNA ตั้งแต่ 10 ng จนถึง 0.1 pg โดยมี sterile distilled water เป็น negative control (-)



รูปที่ 6 ความจำเพาะของชุด mPCR primer ในการตรวจระบุยีนสร้างสารพิษของ *C. perfringens* จากตัวอย่าง DNA ต้นแบบจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์อื่นๆ

Lane M: 100 bp DNA ladder

Lane 1: DNA ต้นแบบจาก *C. perfringens* ATCC 13124

Lane 2: DNA ต้นแบบจาก *C. difficile*

Lane 3: DNA ต้นแบบจาก *E. coli*

Lane 4: DNA ต้นแบบจาก *Salmonella* Typhimurium

Lane 5: DNA ต้นแบบจาก *Shigella flexneri*

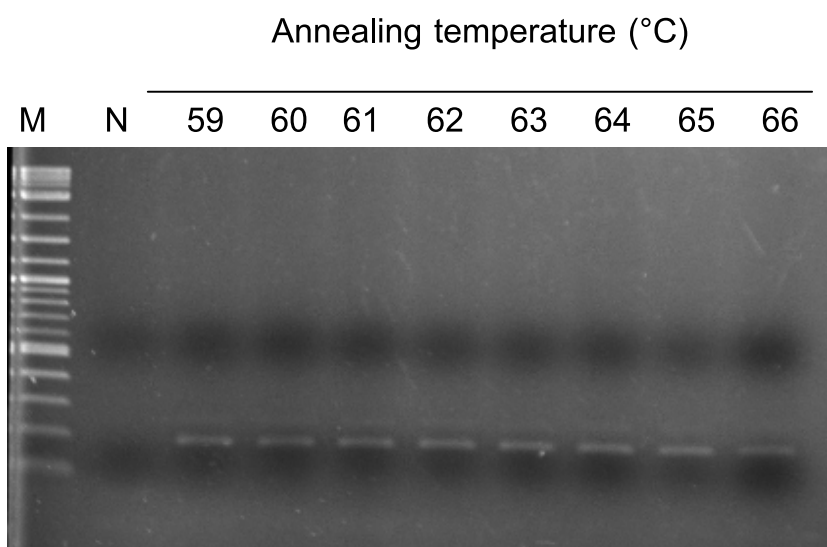
Lane 6: DNA ต้นแบบจาก *E. fecalis*

Lane 7: negative control โดยใช้ น้ำกลั่น

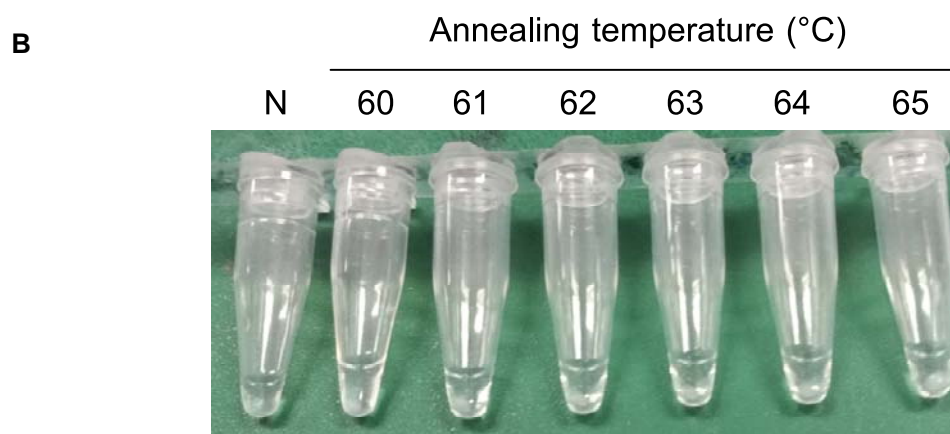
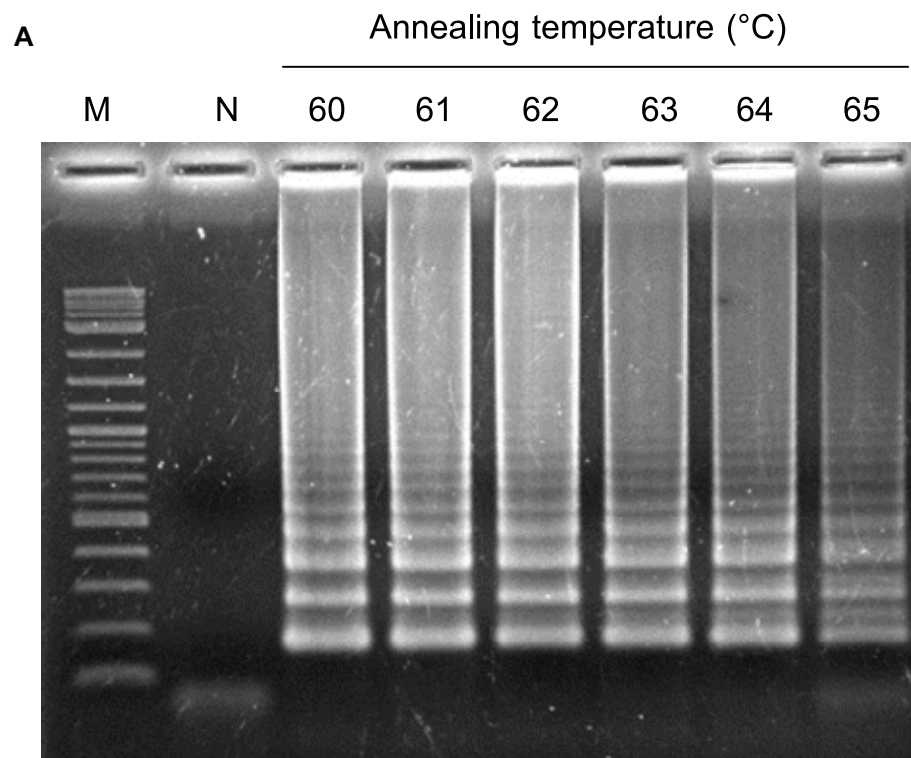
4.3 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา *cpa* gene ของเชื้อ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค LAMP

ทำการทดสอบความจำเพาะของ primer F3 และ B3 กับ DNA ของ *C. perfringens* ATCC 13124 ความเข้มข้น 20 ng ภายใต้สภาวะ initial denaturing 94°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturing 94°C นาน 30 วินาที annealing ตั้งแต่ 59 - 66°C นาน 30 วินาที และ extension 72°C นาน 50 วินาที โดยทำปฏิกิริยาซ้ำ 30 รอบ และ 72°C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ผลการทดสอบ พบว่า primer F3/B3 สามารถให้ผลผลิตที่จำเพาะ ที่ annealing temperature ตั้งแต่ 59-65°C (รูปที่ 7)

เมื่อทดสอบชุด LAMP primer (F3/B3 และ FIP/BIP) จากตารางที่ 2 โดยมีความเข้มข้นของ สาร 1.6 μ M ของ FIP และ BIP 0.2 μ M ของ F3 และ B3 primer 1X LAMP buffer 1M Betaine 1.6 mM dNTPs 6 mM of $MgSO_4$ 8U *Bst* DNA polymerase และ DNA ของ *C. perfringens* ATCC 13124 ปริมาณ 20 ng ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 60-65°C ระยะเวลา 1 ชั่วโมง ตามมาตรฐาน ผลการทดสอบ พบว่า มี LAMP product เกิดขึ้นที่ทุกอุณหภูมิของการทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 8 เมื่อดูผลการทดสอบด้วย agarose gel electrophoresis จะพบผลเป็น ladder LAMP product (รูปที่ 8A) หากดูด้วยตาเปล่าของหลอดทดสอบ จะเห็นว่ามีความขุ่นเกิดขึ้น เมื่อนำหลอดไปปั่นตกตะกอน จะพบเห็นก้อนตะกอนของ LAMP product ดังแสดงในรูปที่ 8B

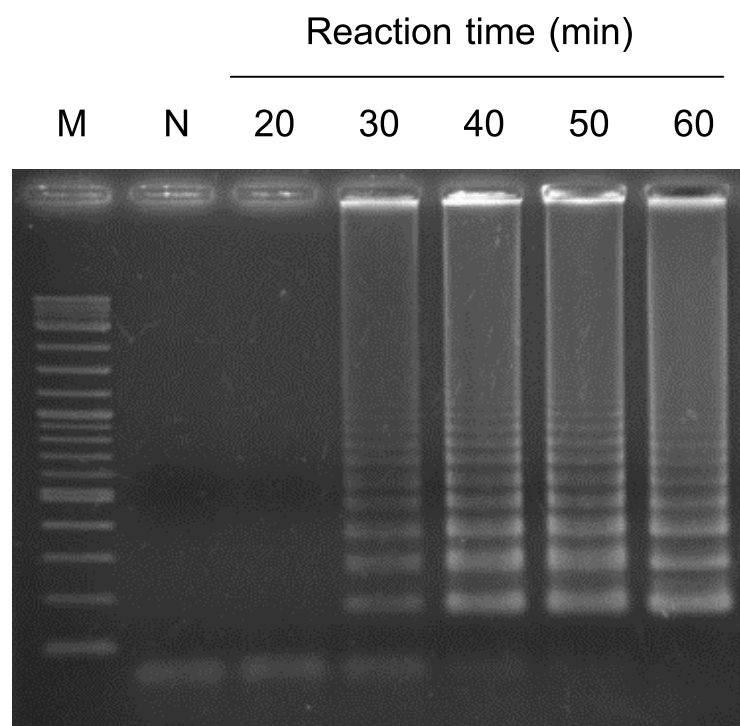


รูปที่ 7 ผลการทดสอบความจำเพาะของ LAMP F3/B3 primer ต่อ DNA ของเชื้อ *C. perfringens* ATCC 13124 ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 59 ถึง 66°C M คือ 100 bp DNA marker N คือ negative control



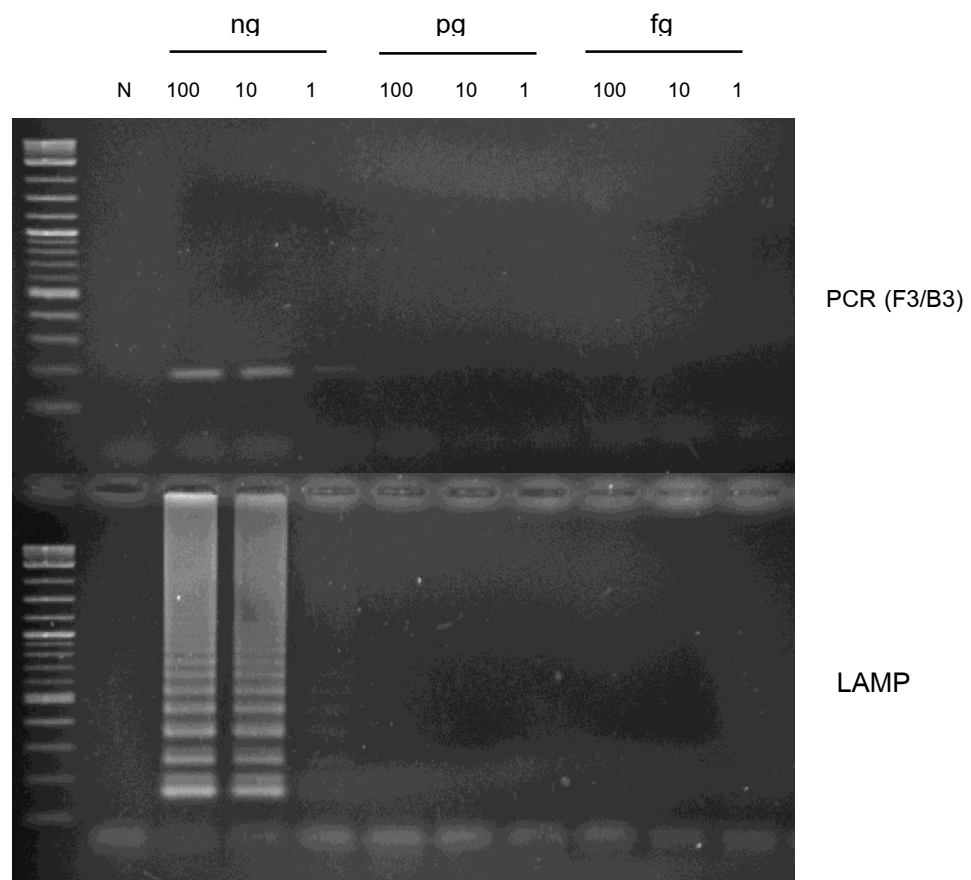
รูปที่ 8 ผลการทดสอบปฏิกิริยา LAMP ต่อ DNA ของเชื้อ *C. perfringens* ATCC 13124 โดย 8A) gel electrophoresis 8B) ดูตะกอนความขุ่น ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 60 ถึง 65°C
M คือ 100 bp DNA marker N คือ negative control

ทำการทดสอบระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของ LAMP กับ DNA ของเชื้อ *C. perfringens* ATCC 13124 โดยการทดสอบที่เวลา 20 30 40 50 และ 60 นาที ผลการทดสอบ พบว่า หลังจาก 30 นาที ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ โดยไม่พบความแตกต่างของ LAMP product ระหว่าง 40 50 หรือ 60 นาที ดังแสดงในรูปที่ 9

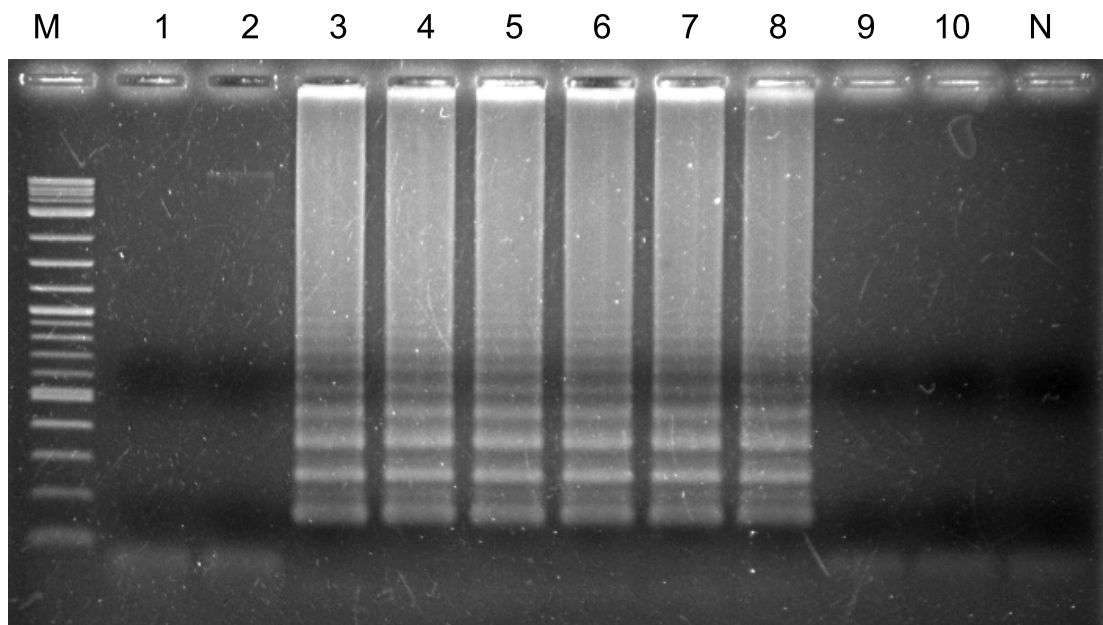


รูปที่ 9 ผลการทดสอบระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของ LAMP ในการตรวจหา *cpa* ของ *C. perfringens* ณ เวลาต่างๆ

เมื่อทดสอบความไวของ LAMP primer โดยใช้ DNA ต้นแบบจาก *C. perfringens* ATCC 13124 ที่ความเข้มข้น 100 ng ถึง 1 fg ผลการทดสอบ พบว่า LAMP มีความไวในการทดสอบอยู่ที่ 1 ng ดังแสดงในภาพที่ 10 และทดสอบความจำเพาะของ LAMP กับ *C. perfringens* สายพันธุ์ต่างๆ และเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ จำนวน 17 สายพันธุ์ จากการทดสอบพบว่า ไม่มีปฏิกิริยาข้ามของปฏิกิริยาที่จำเพาะกับเชื้อชนิดอื่นๆ (รูปที่ 11)



รูปที่ 10 ความไวของ LAMP primer ในการตรวจหา *cpa* ของเชื้อ *C. perfringens*



รูปที่ 11 ความจำเพาะของ LAMP ในการตรวจระบุยีนสร้างสารพิษ *cpa* ของ *C. perfringens* จากตัวอย่าง DNA ต้นแบบจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์อื่นๆ

Lane M: 100 bp DNA ladder

Lane 1: DNA ต้นแบบจาก *C. difficile*

Lane 2: DNA ต้นแบบจาก *E. coli*

Lane 3: DNA ต้นแบบจาก *C. perfringens* type A

Lane 4: DNA ต้นแบบจาก *C. perfringens* type Ae

Lane 5: DNA ต้นแบบจาก *C. perfringens* type B

Lane 6: DNA ต้นแบบจาก *C. perfringens* type C

Lane 7: DNA ต้นแบบจาก *C. perfringens* type E

Lane 8: DNA ต้นแบบจาก *C. perfringens* S1

Lane 9: DNA ต้นแบบจาก *Salmonella* Typhimurium

Lane 10: DNA ต้นแบบจาก *Proteus mirabilis*

Lane N: negative control โดยใช้ น้ำกลั่น

4.4 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจ toxin genes ของเชื้อ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค multiplex PCR และ LAMP โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจกับวิธีเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน

ตัวอย่างมูลสุกรที่เก็บจากฟาร์มสุกรในเครือข่ายจำนวน 5 ฟาร์ม รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่ให้ผลการเพาะเชื้อ *C. perfringens* จำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อทำตัวอย่างเดียวกันไปสกัด DNA เพื่อตรวจหา *C. perfringens* ด้วยเทคนิค mPCR และ LAMP พบว่า ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับการเพาะเชื้อ คือ พบผลบวก *C. perfringens* type A จำนวน 30 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 60 หากทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบทั้ง 3 วิธี จะมีค่า diagnostic sensitivity diagnostic specificity positive predictive value และ negative predictive value คือ 100% ซึ่งบ่งให้เห็นว่า วิธี multiplex PCR และ LAMP สามารถตรวจหาเชื้อ *C. perfringens* ได้อย่างถูกต้องแม่นยำเทียบเท่าวิธีการเพาะเชื้อ

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการทดสอบการเพาะแยกหาเชื้อ *C. perfringens* จากวิธีมาตรฐานกับการตรวจหาเชื้อ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค multiplex PCR และ LAMP

Culture method	Multiplex PCR		LAMP		Total
	Positive	Negative	Positive	Negative	
Positive	30	0	30	0	30
Negative	0	20	0	20	20
Total	30	20	30	20	50

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจเพาะแยกเชื้อ *C. perfringens* ที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิดอาการท้องเสียในลูกสุกร มีความชุกอยู่ที่ร้อยละ 60-80 โดยการเพาะแยกเชื้อแบบมาตรฐานที่ต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษในการเพาะแยกเชื้อ และต้องมีความชำนาญในการคัดเลือกลักษณะโคโลนี การระบุชนิดของ *C. perfringens* ที่เพาะแยกเชื้อได้ มีความสำคัญต่อความรุนแรงของโรคและการประเมินสุขภาพของสัตว์ป่วย พบว่า *C. perfringens* ที่เพาะแยกได้ ส่วนใหญ่เป็น สายพันธุ์ A ซึ่งมียีนสร้างสารพิษ *cpa* ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ พัฒนาวิธีตรวจที่รวดเร็วโดยอาศัยหลักการการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่จำเพาะ โดยใช้เทคนิค multiplex PCR และ LAMP ซึ่งสามารถทำให้การบ่งชี้ชนิดของ *C. perfringens* ทำได้อย่างรวดเร็ว จากการตรวจโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจหลังจากการ pre-enrichment อย่างน้อย 4 ชั่วโมง โดยเทคนิค multiplex PCR สามารถแยก *C. perfringens* ได้ทั้ง 4 ชนิดในคราวเดียว และยังสามารถระบุสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ enterotoxin (*cpe*) ซึ่งสัมพันธ์กับการเหนี่ยวนำให้เกิดการท้องเสียได้ด้วย ซึ่งความไวของ multiplex PCR จะสามารถตรวจระดับ DNA ที่ความเข้มข้นน้อยสุดที่ 100 pg โดยขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ที่พบ ในขณะที่ LAMP จะใช้เวลาในการตรวจที่สั้นกว่า พบว่า LAMP สามารถเพิ่มจำนวนยีน *cpa* ภายใน 30 นาที สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่าโดยสังเกตดูตะกอนความขุ่นที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา แต่ความไวของ LAMP เมื่อเปรียบเทียบกับ multiplex PCR พบว่า มีความไวในการตรวจหา DNA ที่ความเข้มข้น 10 ng ซึ่งควรมีการพัฒนาโดยสามารถปรับเปลี่ยนชุดไพรเมอร์หรือวิธีการอ่านผลให้มีความไวเพิ่มขึ้นเทียบเท่า multiplex PCR

บรรณานุกรม

- Clarke SC. Bacteria as potential tools in bioterrorism, with an emphasis on bacterial toxins. Br J Biomed Sci 2005; 62(1): 40-6.
- Gurjar AA, Hegde NV, Love BC, Jayarao BM. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. Mol Cell Probes 2008; 22(2): 90-5.
- Hatheway CL. Toxigenic clostridia. Clin Microbiol Rev 1990; 3(1): 66-98.
- Heikinheimo A, Korkeala H. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. Lett Appl Microbiol 2005; 40(6): 407-11.
- Joshy L, Chaudhry R, Dhawan B, Kumar L, Das BK. Incidence and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from antibiotic-associated diarrhoeal patients: a prospective study in an Indian hospital. J Hosp Infect 2006; 63(3): 323-9.
- Katayama S, Matsushita O, Minami J, Mizobuchi S, Okabe A. Comparison of the alpha-toxin genes of *Clostridium perfringens* type A and C strains: evidence for extragenic regulation of transcription. Infect Immun 1993; 61(2): 457-63.
- Kikuchi E, Miyamoto Y, Narushima S, Itoh K. Design of species-specific primers to identify 13 species of *Clostridium* harbored in human intestinal tracts. Microbiol Immunol 2002; 46(5): 353-8.
- Lindstrom M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. Clin Microbiol Rev 2006; 19(2): 298-314.
- Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Ohba M, Assavanig A, et al. Broad Distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. Int J Food Microbiol 2008; 121(3): 352-6.
- Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Rapid Detection of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2(1): e147.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated

- isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(12): E63.
- Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol* 2008; 104(6): 1815-23.
- Okamura M, Ohba Y, Kikuchi S, Suzuki A, Tachizaki H, Takehara K, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid, sensitive, and specific detection of the O9 group of *Salmonella* in chickens. *Vet Microbiol* 2008; 132(1-2): 197-204.
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol* 2008; 18(6): 407-21.
- Peterson LR, Kelly PJ, Nordbrock HA. Role of culture and toxin detection in laboratory testing for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15(4): 330-6.
- Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* 1999; 7(3): 104-10.
- Persson S, Torpdahl M, Olsen KE. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(11): 1057-64.
- Rovira A, Abrahante J, Murtaugh M, Munoz-Zanzi C. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21(3): 350-4.
- Sakuma T, Kurosaki Y, Fujinami Y, Takizawa T, Yasuda J. Rapid and simple detection of *Clostridium botulinum* types A and B by loop-mediated isothermal amplification. *J Appl Microbiol* 2009; 106(4): 1252-9.
- Smith LD. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Rev Infect Dis* 1979; 1(2): 254-62.
- Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(2): 216-34.
- Uzal FA, Songer JG. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20(3): 253-65.

van Asten AJAM, van der Wiel CW, Nikolaou G, Houwers DJ, Grone A. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. Vet Microbiol 2009; 136(3-4): 411-2.

Yoo HS, Lee SU, Park KY, Park YH. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1997; 35(1): 228-32.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

Srungboonmee K and Ngamwongsatit B. A peltier-based dry block heater for DNA isothermal amplification. In 5th Thai-Nichi Institute of Technology Academic Conference 2019. May 31 2019, Bangkok, Thailand.

A Peltier-Based Dry Block Heater for DNA Isothermal Amplification

*

Kakanand Srungboonmee

Center of Data Mining and Biomedical Informatics, Faculty of
Medical Technology, Mahidol University
Nakornpathom, Thailand
kakanand.sru@mahidol.edu

Bhunika Ngamwongsatit

Department of Clinical Sciences and Public Health, Faculty of
Veterinary Science, Mahidol University
Nakornpathom, Thailand
bhunika.nga@mahidol.edu

Abstract—The cost-effectiveness of the LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) assay can be improved by developing a more affordable incubator. The purpose of this study was to develop an affordable incubator and test its efficiency compared to a commercial one. A thermoelectric module or peltier was used in the incubator that simplified the design, making it a more affordable incubator, was developed. The efficiency of the developed heater was evaluated by comparing the obtained LAMP products with those from a commercial laboratory incubator. The LAMP assay was the amplification of *cpa* gene of *Clostridium perfringens* and incubated at 63°C for 60 minutes in the developed dry block heater and a commercial one. The reaction products were analyzed by turbidity and gel electrophoresis. The amplification products of *cpa* gene were similar when incubated in both the developed dry block heater and the commercial one. It was then concluded that the developed peltier-based dry block heater was able to be used equivalently to the commercial one with more affordable price.

Keywords—DNA amplification, *Clostridium perfringens*, thermoelectric module, dry-block heater

I. INTRODUCTION

Food-borne pathogenic bacteria contaminating food and causing food-borne illness is one of the major issue in the public health sector all over the world [1]. Due to the high economic cost of these food-borne pathogen [2], the study on these pathogen themselves and their detection is of a very high interest. One of such food-borne pathogen that is being studied is the *Clostridium perfringens*.

Clostridium perfringens is a Gram-positive, anaerobic rod-shaped and spore-forming pathogens, found in various microbiota including intestinal tracts of humans and domestic animals, as well as in the environments including soil, marine sediment, and in decaying vegetation [3]. It can cause foodborne gastrointestinal diseases in human and also other illnesses, including non-foodborne gastrointestinal illness, antibiotic associated diarrhea, gas gangrene, septicemia and enteric diseases in animal [4, 5]. The species is classified into five toxinotypes (A to E) according to the production of four major toxins, alpha (α), beta (β), epsilon (ϵ) and iota (ι) [6]. Furthermore, different biotypes of *C. perfringens* can cause different diseases in human and animals, but all *C. perfringens* toxinotype produce a *cpa* gene as a common virulence factor. As such, the detection of *cpa* gene in *C. perfringens* is valuable to rapid identification of *C. perfringens* in food stuff and for human and animal diagnose with *C. perfringens* infection. The underlying

detection mechanism is to specifically amplify the amount of targeted gene. One of the most well-known amplification techniques is polymerase chain reaction (PCR) method which requires a thermocycler to complete the reaction with different temperatures. Additionally, since detection of the food-borne pathogen is better done on-site, developing a method that is affordable and portable is a highly important aspect for a timely and efficient detection of this pathogen.

One of such method is loop-mediated isothermal amplification (LAMP). LAMP is a popular DNA isothermal amplification technique, often developed for the cost-effective purpose [7, 8]. Although the LAMP method is not as reliable as polymerases chain reaction (PCR) method, it is more cost effective as the heater is much more convenient and available in comparison to a thermocycler. A key element to facilitate the LAMP reaction is to maintain the constant temperature (60-65°C, depending on the reaction) for approximately 30 minutes. Stability of the temperature is also a critical factor for a successful LAMP reaction since an enzyme can work optimally in a particular temperature.

The cost-effectiveness of the assay can be improved further by developing a more affordable incubator. This is because most of the incubators, either the dry block heater or water bath incubator, utilize the metal sheet or coils as the heating element which could make the thermal design more complicated with more components in the device, causing it to also be more expensive. Hence, the thermoelectric or peltier module could be an alternative heating element that makes the design much simpler, leading to a more affordable and portable incubator. This method of detection should also be rather reliable because similar experiment has been done [9] in which *cpa* gene in lamb fecal sample was detected using LAMP. The sensitivity was reported to be equivalent to PCR, even though they used a water bath incubator instead of a dry block heater. This is also further supported by another study which reports similar sensitivity between LAMP and PCR in bone marrow assay [10].

The primary aim of this study was therefore to develop a portable and affordable dry block heater that can specifically be used for DNA isothermal amplification using thermoelectric or peltier module as the heating element. This was further done to test with an already developed LAMP platform that can detect *Clostridium perfringens* outside the laboratory or in the resource-limited setting. The efficiency of the developed heater was evaluated to see if the obtained LAMP products were similar to those obtained from a commercial laboratory incubator.

II. METHODS

A. Development of the dry block heater

The thermoelectric or peltier module was used as a heating element. The temperature control module consisted of a microcontroller (Arduino Mega 2560), connected to a digital temperature sensor (model DS18B20) via pin 4 (digital input), and a peltier module (TEC1-12706) through a peltier driving circuit (Fig.1) via pin 5 (the PWM output with a duty cycle of 50%). A high power MOSFET (IRFP450, Vishay Siliconix) in the driving circuit was used as the switch for a simple ON/OFF control to the 12V peltier module supply voltage.

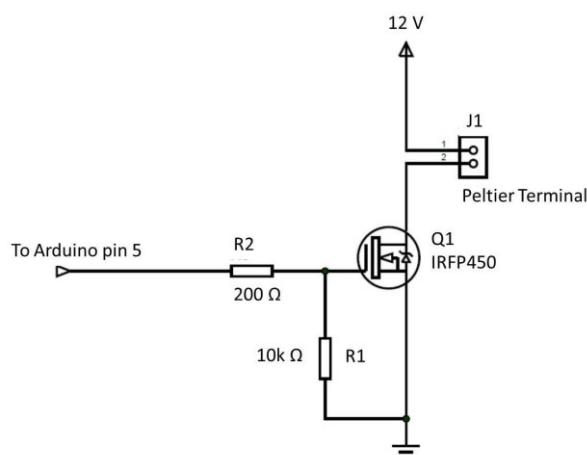


Fig. 1. Peltier driving circuit

The temperature sensor was inserted in the central hole the Aluminum alloy heat block (Fig. 2) of size 40x40x40 mm (Thermal conductivity = 121 W/m·K) which was insulated with Aeroflex® No. M09010 (thermal conductivity = 0.04 W/m·K). The heat block was designed to hold nine 1.5-ml Eppendorf tubes in the 3 by 3 arrangement, with the peltier module heating underneath. Temperature characteristics of the dry block heater were tested including rising time and stability over the period of 30 minutes, which is a typical incubation time for LAMP reaction, in order to determine the acceptable heat load of the system. The tested temperatures were 60 °C and 65 °C at the ambient room temperature of approximately 25 °C.

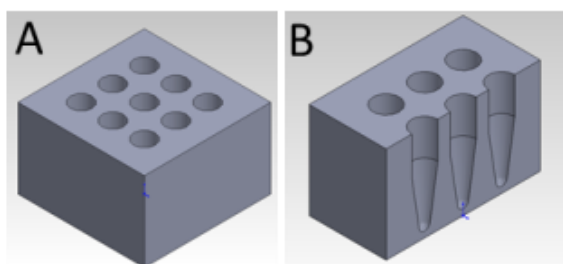


Fig. 2. The Alluminium alloy heat block designed to hold nine 1.5-ml Eppendorf tubes which are the typical test tube for LAMP reaction.

B. Bacterial strains and DNA preparation

C. perfringens ATCC13124 was used as reference DNA template for the LAMP reaction and extracted with simple boiling method. A loopful of cultured cells was suspended in 0.2 ml of 10mM Tris-EDTA buffer (pH 8.0) and boiled for 10 minutes. The cell debris was centrifuged at 8,000 x g for 2 minutes and the supernatant containing DNA was collected and used for LAMP assay.

C. LAMP oligonucleotide primer

The oligonucleotide primers used for the LAMP assay were designed using the conserve *cpa* genes of *C. perfringens*. A set of four primers consisting of two outer primers (F3 and B3) and two inner primers (FIP and BIP) were designed with the PrimerExplorer V4 software [11].

D. LAMP assay

The LAMP reaction was carried out using the following reaction compositions: 2 µl of *C. perfringens* DNA, 1X of LAMP reaction buffer mixture, 1.6 µM each of FIP and BIP, 0.2 µM F3 and B3, 1.4 mM each dNTPs, 0.8 M betaine, 8 U of *Bst* DNA polymerase large fragment (NEB, England). The mixture in the reaction tube was incubated isothermally at 63 °C for 60 minutes in the developed peltier-based dry block heater and a commercial one (C1000 thermal cyclor: BioRAD). The reaction products were analyzed by turbidity and gel electrophoresis. Distilled water was used in the negative control.

III. RESULTS

A. Temperature characteristics at selected set temperatures of the developed dry-block heater

The overall thermal characteristics of the developed dry-block heater are shown in Table 1. The measured temperature error was approximately within ± 0.5 °C, suggesting its reliability for using in LAMP reaction.

TABLE I. TEMPERATURE CHARACTERISTICS OF THE DEVELOPED DRY-BLOCK HEATER

	Temperatures	
	60 °C	65 °C
Rising time (seconds)	552	630
Stability (max/min)	59.5/60.4	64.3/65.3
Average temperature (°C)	59.9	64.9

The temperature after reaching the set temperatures of 60 °C and 65 °C were quite stable over the period of approximately 30 minutes (Fig. 2). There was no sign of heat accumulation or heat loss as there was no trend of either increasing or decreasing temperature. The overall characteristics were considered sufficient for a LAMP reaction.

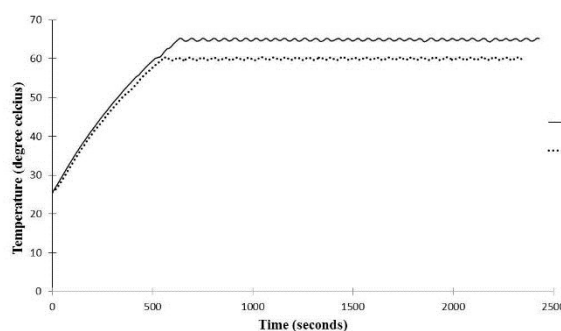


Fig. 3. Temperature profile for the set temperature of 60 °C and 65 °C

B. LAMP products comparison

Detection of LAMP amplification products can be either quickly determined by naked eye or strongly confirmed by gel electrophoresis. For naked eye observation, the positive LAMP result is showed as turbid solution in the reaction tube. This phenomenon occurs during the amplification by pyrophosphate ion was released from the amplification reaction and bound to the magnesium ion in the mixture to form the magnesium pyrophosphate complex. This complex is the insoluble white precipitate LAMP product which can be observed as turbidity in the reaction tube (tube 1 and 2 in Fig. 4C and 4D). The turbid solution from magnesium pyrophosphate complex thus indicates the presence of the targeted gene, which was the *cpa* genes of *C. perfringens*, being multiplied. The more concentration of magnesium pyrophosphate complex, the more turbid was observed. The turbidity was increased as the amplification process was progressing at the stable set temperature of 63°C. The reaction was limited by the amount of oligonucleotide primer added. LAMP reaction products from both the developed heater and commercial heater were similar by naked eye observation of turbidity (Fig. 4). The most left tube was the LAMP product of *C. perfringens* ATCC 13124 which was the DNA template, the middle tube was LAMP product of animal isolate *C. perfringens* and the right tube was negative control (distilled water).

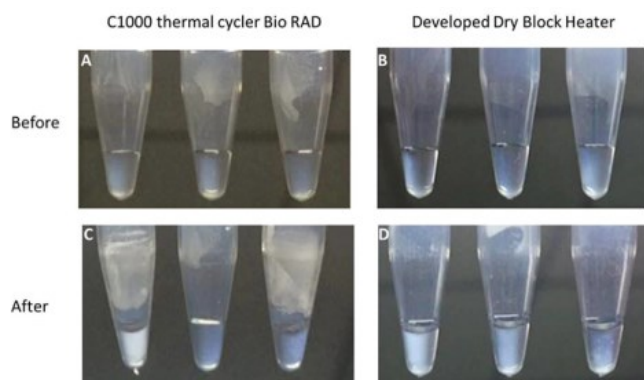


Fig. 4. LAMP products for detection of *C. perfringens cpa* gene. Visual inspection prior LAMP reaction (A-B) shows clear solution in all tubes whereas after LAMP reaction (C-D) shows turbidity in tube 1 and 2. Tube 3 is negative control.

The LAMP product results were also confirmed with the gel electrophoresis (Fig. 5). The agarose gel electrophoresis was used to confirm the positive turbid tube of LAMP. The four specific LAMP primers and *Bst* polymerase activity produced the various size of LAMP product via the auto-cycling strand displacement DNA synthesis. The stem-loop DNA product with various stem lengths and cauliflower-like structure with multiple loops formed showed as the ladder pattern in gel electrophoresis. The specific characteristic of positive gel electrophoresis LAMP result was shown as ladder pattern of multiple bands (Fig. 5). The most left lane, Lane M, was the 100bp molecular weight marker. Next to Lane M, Lane 1, was the result of LAMP product of *C. perfringens* ATCC 13124, the positive control, and next to that was Lane 2 which was the LAMP product of animal isolate *C. perfringens*. These two lanes presented similar bands patterns, while Lane 3, which was the negative

control, had shown no bands as there was no LAMP product.

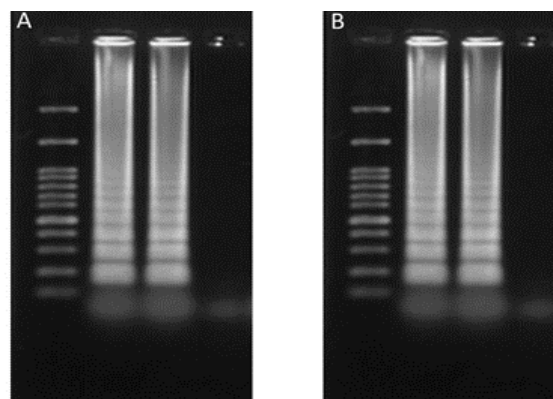


Fig. 5. A 1.5% agarose gel electrophoresis of LAMP products for detection of *C. perfringens cpa* gene using commercial (A) and developed (B) incubators. Lane M indicated 100 bp molecular weight marker; Lane 1 was LAMP product of *C. perfringens* ATCC 13124; Lane 2 was LAMP product of animal isolate *C. perfringens*; Lane 3 was negative control.

IV. CONCLUSION

From the result, the dry block heater had shown a stable and accurate temperature over the testing period, acceptable for LAMP reaction. Furthermore, the LAMP product from the developed dry block heater was similar to the one from commercial incubator; in both the visually observed turbidity and in the bands pattern present in the agarose gel electrophoresis.

The result suggested that it was possible to use the developed dry block heater as an affordable and more portable alternative to commercial incubator for the detection of *C. perfringens* in the field. Also, there is a possibility that we can use this affordable dry block heater for detection of other pathogenic bacteria with LAMP method as well especially the more well-known and more wide spread one such as *Salmonella enterica*, *Campylobacter spp.*, and *Listeria monocytogenes* [2]. This made it possible for the future outside-laboratory diagnostic products.

We have demonstrated that the developed dry block heater can be used equivalently to the commercial one with more affordable price in the detection of *C. perfringens*. However, further experiment may be needed to test their effectiveness in the detection of other pathogenic bacteria.

ACKNOWLEDGMENT

This work is supported by Mahidol University to KS and the TRG5380005 Grant of the Thailand Research Fund (TRF) to BN. We would like to also thank Ms. Thanita Suwanmalai for her work in conducting the LAMP assay.

REFERENCES

- [1] D. G. White, S. Zhao, S. Simjee, D. D. Wagner, and P. F. McDermott, "Antimicrobial resistance of foodborne pathogens," *Microbes Infect*, vol. 4, pp. 405-12, Apr 2002.
- [2] S. Hoffmann, M. B. Batz, and J. G. Morris, Jr., "Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens," *J Food Prot*, vol. 75, pp. 1292-302, Jul 2012.

- [3] J. G. Songer and F. A. Uzal, "Clostridial enteric infections in pigs," *J Vet Diagn Invest*, vol. 17, pp. 528-36, Nov 2005.
- [4] L. Petit, M. Gibert, and M. R. Popoff, "Clostridium perfringens: toxinotype and genotype," *Trends Microbiol*, vol. 7, pp. 104-10, Mar 1999.
- [5] G. S. Myers, D. A. Rasko, J. K. Cheung, J. Ravel, R. Seshadri, R. T. DeBoy, et al., "Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*," *Genome Res*, vol. 16, pp. 1031-40, Aug 2006.
- [6] J. R. Theoret and B. A. McClane, "Toxins of *Clostridium perfringens*," *Clostridial Diseases of Animals*, 2016/06/21 2016.
- [7] E. C. Oriero, J. Jacobs, J. P. Van Geertruyden, D. Nwakanma, and U. D'Alessandro, "Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination," *J Antimicrob Chemother*, vol. 70, pp. 2-13, Jan 2015.
- [8] S. Wang, F. Xu, and U. Demirci, "Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings," *Biotechnol Adv*, vol. 28, pp. 770-81, Nov-Dec 2010.
- [9] B. Radhika, N. V. Kumar, and D. Sreenivasulu, "Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin gene in lambs by loop mediated isothermal amplification," *Veterinary world*, vol. 9, pp. 60-64, 2016.
- [10] Z. Yang, W. Liu, H. Liang, R. Wen, and Y. Zhang, "Development and evaluation of LAMP, CPA and IMSA methods for rapid detection of the AML1/ETO fusion gene in acute myeloid leukemia," *Exp Ther Med*, vol. 16, pp. 3353-3362, Oct 2018.
- [11] Fujitsu Limited. LAMP primer designing software Primer Explorer. <https://primerexplorer.jp/>