บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

สเตร็พโตค็อคคัส ซูอิส (*Streptococcus suis*, *S. suis*) เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลม ย้อมติดสีแกรมบวก เรียงตัวเป็นคู่หรือต่อเป็นสาย (Staats, et al., 1997) เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดโรคติดเชื้อที่รุนแรงทั้งในหมู และมนุษย์ ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งทางเศรษฐกิจของผู้ประกอบการเลี้ยงหมู และผู้ป่วยที่ติดเชื้อแล้วรอดชีวิตอาจสูญเสียการได้ยิน จนถึงขั้นหูหนวกถาวรหรืออาจรุนแรงถึงแก่ชีวิต (Z.-R. Lun, et al., 2007) โรคติดเชื้อ *S. suis* จัดเป็นกลุ่มโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คน (Zoonosis) พบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อครั้งแรกที่ประเทศเดนมาร์ก เมื่อปี ค.ศ.1968 (Perch, Kristjansen and Skadhauge, 1968) จากนั้นมีรายงานผู้ป่วยติดเชื้ออีกหลายประเทศทั้งในยุโรป อเมริกาเหนือ ออสเตรเลีย และเอเชีย (Arends, et al., 1984; Kay, Cheng and Tse, 1995) ในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ.1987 (Teekakirikul and Wiwanitkit, 2003) ส่วนใหญ่พบรายงานการติดเชื้อในเขตภาคเหนือของประเทศ ซึ่งสาเหตุของการติดเชื้อส่วนใหญ่มาจากการรับประทานเนื้อหมู เลือดหมู หรือส่วนประกอบของหมูที่ปรุงไม่สุก เช่น ลาบหมูดิบ ลู่เลือด เป็นต้น (Wangsomboonsiri, et al., 2008) ระยะฟักตัวของโรคใช้เวลาตั้งแต่ชั่วโมงถึง 3 วัน ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ได้รับ และทางเข้าของเชื้อ ตลอดจนภาวะสุขภาพของผู้ป่วย ร้อยละ 85 ของผู้ป่วยมีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปวดข้อนำมาก่อน 1-2 วัน และ ร้อยละ 54-80 ของผู้ป่วยสูญเสียการได้ยินถึงขั้นหูหนวกถาวรภายใน 24 ชั่วโมง ในรายที่มีอาการรุนแรงถึงแก่ชีวิตมักมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อในกระแสเลือดทำให้เกิดภาวะช็อก(Streptococcal toxic shock syndrome, STSS) (Wangkaew, et al., 2006)

การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* ทางห้องปฏิบัติการ สามารถทำได้โดยการเพาะเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานจากสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ น้ำไขสันหลัง เลือด หรือน้ำจากข้อ และแยกชนิดของเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งเชื้อ *S. suis* ส่วนใหญ่ให้ลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงแบบ α-haemolysis บน sheep blood agar (Staats, et al., 1997) แต่มักไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยให้ถูกต้อง หรือมักรายงานผิดพลาดเป็นเชื้อ *Streptococcus* species, α-hemolytic หรือ viridans streptococci, *Enterococcus faecalis*, *Aerococcus* viridans หรือ *S. pneumoniae* (Donsakul, Dejthevaporn and Witoonpanich, 2003) เนื่องจากการแยกชนิดของเชื้อให้ถูกต้อง

จำเป็นต้องใช้การทดสอบทางชีวเคมีชนิดพิเศษ (Murray, et al., 2003) หรือชุดทดสอบสำเร็จรูปนอกเหนือจากที่ใช้ทดสอบในงานประจำ ซึ่งห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ไม่มีความพร้อมจึงไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อ *S. suis* ได้ และมีความจำเป็นต้องส่งต่อตัวอย่างเพื่อตรวจยืนยัน ณ ห้องปฏิบัติการอื่น ทำให้ต้องใช้เวลานานประมาณ 2-3 วันกว่าจะทราบผลการตรวจวิเคราะห์ได้ และที่สำคัญ กรณีที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพก่อนการเก็บตัวอย่าง การเพาะเชื้อเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. suis* อาจไม่สามารถพบเชื้อได้ ซึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยาจะมีความได้เปรียบในการตรวจวินิจฉัย เนื่องจากอาศัยหลักการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยได้ทั้งในกรณีที่เชื้อแบคทีเรียมีและไม่มีชีวิต โดยเทคนิคที่เป็นที่นิยมมีหลายแบบ เช่น เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือ Real-time PCR เป็นต้น

ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ด้วยเทคนิค Real-time PCR (Whiley, et al., 2002) การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Leptospira* speies ในผู้ป่วยติดเชื้อ Leptospirosis (Merien, et al., 2005) หรือ การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR สำหรับตรวจเชื้อ *S. pneumoniae* (Carvalho, et al., 2007) เป็นต้น ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ มีความไวสูง และใช้ระยะการตรวจสั้นเพียง 2-6 ชั่วโมงก็สามารถรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ได้ ในส่วนของการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ได้มีผู้พัฒนาวิธีการตรวจ เพื่อนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์การติดเชื้อศึกษาระบาดวิทยาในหมู และการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกในมนุษย์ ตัวอย่างเช่น Hilde E. Smith และคณะได้พัฒนาเทคนิค Conventional PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* serotype 1, serotype 2 และ serotype 9 strains ในตัวอย่างทอนซิลของหมู (Hilde E. Smith, Veenbergen, et al., 1999) Yang, et al. ได้พัฒนาเทคนิค TaqMan real-time quantitative PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* serotype 2 เพื่อใช้ศึกษาปริมาณของเชื้อในเลือดของหมูทดลอง (Yang, et al., 2010) หรือในประเทศไทยโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้พัฒนาเทคนิค Multiplex PCR สำหรับใช้ตรวจยืนยันเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างโคโลนีแยกเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น ดังนั้นเพื่อให้การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ในตัวอย่างส่งตรวจจากผู้ป่วยให้ได้ผลที่ถูกต้อง มีความไว และรวดเร็ว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทำการศึกษา และพัฒนาต้นแบบของเทคนิค Real-time PCR สำหรับนำไปใช้ตรวจตามเชื้อ *S. suis* โดยตรงในตัวอย่างเลือดมนุษย์ เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีมาตรฐานที่ต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน โดยในการศึกษานี้จะทำการออกแบบ Primer และ TaqMan® Probe ให้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. suis* จากนั้น ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ

วิธีที่พัฒนาขึ้น โดยทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ความไว (Sensitivity test) และทดสอบการทำการตรวจซ้ำ (Reproducibility test) ตามลำดับ

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิค real-time PCR และทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ในตัวอย่างเลือดมนุษย์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ได้ต้นแบบเทคนิค real-time PCR รวมทั้งทราบประสิทธิภาพของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น สำหรับนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่สงสัยติดเชื้อ *S. suis*

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยและพัฒนา (Research and Development) เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ลำดับเบสของยีนกลูตาเมทดีไฮโดรจิเนส เป็นยีนเป้าหมาย และใช้ลำดับเบสของยีนดังกล่าวจากเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ PY-2 (GenBank Accession No. GU253285.1) เป็นต้นแบบ ในการออกแบบ Primer และ TaqMan® Probe และใช้เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานสายพันธุ์ที่ก่อโรคติดเชื้อ *S. suis* และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ในการทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ความไว (Sensitivity test) และทดสอบการทำการตรวจซ้ำ (Reproducibility test) ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น