บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเทคนิค real-time PCR สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* โดยตรงจากตัวอย่างเลือดมนุษย์ โดยผู้วิจัยได้ทบทวนวรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง คือ โรคติดเชื้อสเตร็พโตค็อคคัส ซูอิส เทคนิค real-time PCR และหลักการพัฒนาเทคนิค real-time PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลชีพ โดยมีรายละเอียดของแต่ละเรื่อง ดังนี้

โรคติดเชื้อสเตร็พโตค็อคคัส ซูอิส (*S. suis*)

1. ลักษณะทางชีวภาพของเชื้อสเตร็พโตค็อคคัส ซูอิส (*S. suis*)

สเตร็พโตค็อคคัส ซูอิส (*S. suis*) เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลม ย้อมติดสีแกรมบวก เรียงตัวเป็นคู่หรือต่อเป็นสาย (Lee, et al., 2008) เมื่อเพาะเชื้อลงบน Blood agar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นานประมาณ 8-10 ชั่วโมง ทุกสายพันธุ์จะให้ลักษณะโคโลนีขนาดเล็กประมาณ 0.5-1 mm. และเกิดการสลายเม็ดเลือดแดงชนิดอัลฟ่า (α-hemolysis) แต่บางสายพันธุ์อาจเกิดการสลายเม็ดเลือดแดงชนิดเบต้า (β-hemolysis) (Kay, et al., 1995) และบางสายพันธุ์ก็อาจพบเมือกบนโคโลนีเนื่องจากการสร้างแคปซูลของตัวเชื้อ

S. suis จัดอยู่ใน Lancefield group D เมื่อจำแนกโดยใช้แอนติเจนบนผนังเซลล์ และปัจจุบันสามารถจำแนก serotype ตามคุณสมบัติการเรียงตัวกันของชนิดของน้ำตาลที่ประกอบเป็นแคปซูลออกได้เป็น 35 serotype (M. Gottschalk, et al., 1991a, 1991b; M. Gottschalk, et al., 1989; M. Gottschalk, Lacouture and Odierno, 1999; Higgins, et al., 1995) แต่เดิมเชื้อสเตร็พโตค็อกคัส ที่ก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปอดบวม ข้ออักเสบ โลหิตเป็นพิษ และแท้งในหมู ถูกจัดกลุ่มเป็น Lancefield กลุ่ม R, S, RS และ T (de Moor, 1963) ต่อมามีผู้ศึกษาโดยสกัดแอนติเจนออกจากส่วนของ capsule พบว่า polysaccharide ที่เป็นส่วนกำหนด serotype เป็นส่วนของ capsule ไม่ใช่ส่วนประกอบของผนังเซลล์ และได้ตรวจยืนยัน lipoteichoic acid บนผนังเซลล์พบว่าทุกสายพันธุ์ทำปฏิกิริยากับ group D antiserum (S. D. Elliott, McCarty and Lancefield, 1977) จึงแยกเชื้อนี้ออกมาเป็น species ใหม่ ให้ชื่อว่า *Streptococcus suis* จัดอยู่ใน Lancefield กลุ่ม D และเปลี่ยน Lancefield กลุ่ม R, S และ RS เป็น serotype 2, 1 และ 1/2 ตามลำดับ (S D Elliott and Tai, 1978) ต่อมามีผู้รายงาน serotype ใหม่เพิ่มขึ้น จนปัจจุบันมี

ทั้งสิ้น 34 serotype หากรวม serotype 1/2 ด้วยรวมเป็น 35 serotype (Facklam, 2002; Tarradas, et al., 2001)

2. **สัตว์รังโรคของเชื้อ *S. suis***

โดยธรรมชาติเชื้อ *S. suis* จะอาศัยและเป็นเชื้อประจำถิ่นอยู่บริเวณทางเดินหายใจส่วนบน ทอนซิล และช่องโพรงจมูกของหมู นอกจากนี้ยังอาจพบได้ที่ช่องคลอด หรือลำไส้ได้เช่นกัน (M. Gottschalk and Segura, 2000) เมื่อหมูมีอาการป่วยเชื้อ *S. suis* จะเจริญที่ palatine tonsils ซึ่งระยะนี้หมูจะดูเหมือนสุขภาพแข็งแรงดี แต่จะเป็นตัวแพร่เชื้อโดยการกระจายออกทางจมูกและปากของหมูได้ง่าย (Arends, et al., 1984) โดยหมูที่เป็นพาหะของเชื้อ *S. suis* เหล่านี้มีบทบาทสำคัญมากที่จะก่อให้เกิดการระบาดของโรคในฝูงสัตว์ทั้งหลาย (Higgins, et al., 1990)

3. **ทางติดต่อของเชื้อ *S. suis* สู่คน**

การติดเชื้อ *S. suis* ในคน ส่วนใหญ่เกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับหมูที่เป็นพาหะของโรค หมูที่ป่วย หรือการรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของหมูที่ปรุงไม่สุก หรือดิบ เช่น ลาบหมูดิบ ลู่เลือด เป็นต้น โดยเชื้อจะเข้าทางแผลบริเวณผิวหนัง หรือเยื่อเมือกบริเวณโพรงจมูก และปาก เป็นต้น (Francois, et al., 1998) ดังนั้นผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ติดเชื้อมักประกอบอาชีพที่เกี่ยวข้องกับหมูหรือเนื้อหมู เช่น ผู้ประกอบการฟาร์มเลี้ยงหมู คนงานโรงฆ่าสัตว์ ผู้ชำแหละเนื้อหมู ปศุสัตว์ และสัตวแพทย์ เป็นต้น (Arends and Zanen, 1988; Mazokopakis, et al., 2005)

4. **อาการทางคลินิกของการติดเชื้อ *S. suis* ในคน**

เชื้อ *S. suis* เป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อในอวัยวะของคนได้หลายระบบ เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบทั้งชนิดที่เป็นหนอง หรือ ไม่เป็นหนอง (purulent or non-purulent meningitis) ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) และเกิดภาวะ streptococcal toxic shock syndrome ซึ่งเหล่านี้เป็นอาการทางคลินิกที่พบได้เสมอในการติดเชื้อ *S. suis* (Arends and Zanen, 1988; Wangkaew, et al., 2006; Yu, et al., 2006) ดังแสดงในตาราง 1

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. suis* จะพบอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Meningitis) บ่อยที่สุด อาการแสดงของเยื่อหุ้มสมองอักเสบจะมาด้วย การอักเสบของสมอง ปวดศีรษะ เป็นไข้ อาเจียน และอาการทางสมอง ส่วนใหญ่มักเกิดอาการมา 2-5 วัน ก่อนเข้ารักษาในโรงพยาบาล (Z.-R. Lun, et al., 2007; Mai, et al., 2008) ลักษณะเด่นของผู้ติดเชื้อที่เกิดอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบคือ เกิดภาวะสูญเสียการได้ยิน ซึ่งมักเกิดภายหลังแสดงอาการเพียงไม่กี่วัน (Donsakul, et al., 2003; Huang, et al., 2005; Suankratay, et al., 2004)

ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างรุนแรง ร่วมกับการเกิดภาวะ Toxic shock syndrome (severe septicemia with toxic shock syndrome) มีความสัมพันธ์มากกับการเสียชีวิตของผู้ป่วย ซึ่งอาการทางคลินิกของผู้เกิดภาวะนี้จะพบ erythematous blanching rash บน extremities ซึ่งจะทำให้เกิดจุดเลือดออก และ petechia (Tang, et al., 2006; Yu, et al., 2006)

อาการ Petechiae, purpura และ ecchymoses ก็เป็นอาการทางคลินิกที่สามารถเกิดขึ้นได้และสามารถแพร่กระจายทั่วทั้งตัว รวมทั้งอาจเกิด hemorrhagic bullae และ skin necrosis ซึ่งเป็นลักษณะของ purpura fulminans ภาวะนิ้วมือ และนิ้วเท้าเน่าตายก็สามารถเกิดขึ้นได้บ้างในขั้นสุดท้ายของการเกิดโรค (Mai, et al., 2008)

ส่วนอาการที่พบได้แต่ไม่บ่อยนักในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. suis* ได้แก่ Acute และ subacute endocarditis, spondylodiscitis (Vilaichone, et al., 2002), acute pyogenic arthritis (Kay, et al., 1995), endophthalmitis และ uveitis (Huang, et al., 2005; McLendon, Bron and Mitchell, 1978), brain stem ophthalmoplegia (Meecham and Worth, 1992) และ epidural abscess (Ibaraki, et al., 2003) แต่ที่น่าสังเกตคือ รายงานที่จังหวัดเชียงใหม่ประเทศไทยว่าพบผู้ป่วยเกิดภาวะ infective endocarditis มากว่าภาวะ meningitis (Wangkaew, et al., 2006)

ตาราง 1 แสดงข้อมูลรายงานอาการทางคลินิกของผู้ป่วยติดเชื้อ *Streptococcus suis*

	ไทย [d] (*n* = 32)	เวียดนาม [b] (*n* = 151)	จีน [c] (*n* = 204)	เนเธอร์แลนด์ [a] (*n* = 30)
ข้อมูลผู้ป่วย				
เพศชาย	23 (71.9)	117 (77.5)	171 (83.8)	26 (86.7)
อายุ	49 ปี (1 เดือน ถึง 75 ปี)	46.5 ปี (19–84 ปี)	54 ปี (NA)	49 ปี (26–76 ปี)
ลักษณะทางคลินิก				
ระยะเวลาป่วยก่อนเข้ารักษาในโรงพยาบาล, วัน	4.5 (1–14)	4 (1–21)	NA	2 (1–5)
ไข้	NA	151 (100)	204 (100)	NA
ปวดศีรษะ	NA	142 (94.0)	164 (80.4)	NA
อาเจียน	NA	NA	117 (57.4)	NA
Glasgow Coma Scale	NA	12 (5–15)	NA	NA
คอแข็ง	NA	142 (94.0)	NA	NA
พบพยาธิสภาพที่ผิวหนัง	8 (25.0)	9 (6.0)	56 (27.5)	5 (16.7)

ตาราง 1 (ต่อ)

	ไทย [d] (*n* = 32)	เวียดนาม [b] (*n* = 151)	จีน [c] (*n* = 204)	เนเธอร์แลนด์ [e] (*n* = 30)
ผลตรวจ CSF	925	2100	NA	1500
Total WBC count, cells/mL	(0–21,800)	(1–64,000)		(50–110,000)
Neutrophils (%)	65 (0–99)	84 (1–99)	NA	NA
Total protein level, g/dL	1.76	2.06	NA	3 (0.8–9.8)
	(0.75–4.56)	(0.2–10.19)		
Glucose level, g/dL	5 (0–67)	NA	NA	27 (1.8–58.5)
Lactate level, mmol/L	NA	11.2 (2–17)	NA	NA
CSF:blood glucose level, %	NA	13.76 (0.7–71)	NA	NA
ผลตรวจเลือด	16.4 (5.6–47.3)	16.8	14.3	
Total WBC count, cells/mL		(3.8–57.0)	(9.4–31.1)	NA
Platelet count, cells/mL	224 (22.9–515)	159 (18–933)	NA	NA
ผลการรักษา				
ระยะเวลาในการเข้ารักษา	NA	14 (1–43)	15.1[a]	NA
ในโรงพยาบาล, วัน				
เสียชีวิตในโรงพยาบาล	2 (6.3)	4 (2.6)	38 (18.6)	2 (6.7)
สูญเสียการได้ยิน	22/32 (68.8)	93/140 (66.4)	NA	15/28 (54)

หมายเหตุ: NA, ไม่สามารถสรุปได้ หรือไม่มีข้อมูล

[a] ค่าที่ได้จากการประมาณการณ์

[b] ข้อมูลผู้ป่วยประเทศเวียดนามจาก Mai, et al. (Mai, et al., 2008)

[c] ข้อมูลผู้ป่วยประเทศจีนจาก Tang, et al. (Tang, et al., 2006)

[d] ข้อมูลผู้ป่วยประเทศไทยจาก Suankratay, et al. (Suankratay, et al., 2004)

[e] ข้อมูลผู้ป่วยประเทศเนเธอร์แลนด์จาก Arends, et al. (Arends and Zanen, 1988)

ที่มา: Heiman, F. L., Wertheim, et al., 2009

5. พยาธิกำเนิดของโรคติดเชื้อ *S. suis*

การศึกษาการกำเนิดโรคติดเชื้อ *S. suis* ส่วนใหญ่จะศึกษาในสัตว์ทดลองเช่น หมู และหนู เป็นต้น ซึ่งการกำเนิดโรคในคนยังมีองค์ความรู้ที่น้อยมาก ต้องเทียบเคียงองค์ความรู้ที่ได้จากสัตว์ทดลองดังกล่าว

การทดลองในสุกรพบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถแพร่กระจายเข้าระบบร่างกายจาก nasopharynx จนกระทั่งทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) และตายในที่สุด (M. Gottschalk and Segura, 2000; Madsen, et al., 2002) ซึ่งการติดเชื้อในมนุษย์ จะแตกต่างที่การติดต่อของเชื้อสู่ร่างกายที่ไม่เหมือนกัน

ขณะนี้ยังมีข้อมูลไม่เพียงพอที่จะรู้ว่าเชื้อ *S. suis* สามารถผ่านด่านป้องกันด่านแรกของ host เข้าไปก่อโรคได้อย่างไร ซึ่งมีการศึกษาที่น้อยมากเกี่ยวกับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเชื้อ *S. suis* กับ epithelial cells ของ host (Benga, et al., 2004; Lalonde, et al., 2000; Norton, et al., 1999; Valentin-Weigand, 2004)

เชื้อที่สามารถรอดเข้าไปในร่างกายโดยเฉพาะในกระแสเลือดจะใช้ CPS ในการขัดขวางการกลืนกินของ phagocyte โดยมีการศึกษาล่าสุด (Van Calsteren, et al., 2010) แสดงให้เห็นว่า sialic acid เป็นองค์ประกอบที่มีบทบาทสำคัญของ CPS ในการต่อต้านกระบวนการกลืนกินของ phagocyte ซึ่งการศึกษานี้ได้ข้อสรุปที่เพิ่มเติมจากการศึกษาเมื่อสิบปีที่แล้วว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่รอดโดยการล่องลอยไปกับกระแสเลือดหรือการเกาะติดอยู่กับผิวของ monocytes (Benga, et al., 2008; Segura and Gottschalk, 2002)

นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า suilysin ก็มีบทบาทสำคัญในการป้องกันตัวเชื้อแบคทีเรีย ในการต่อต้านการเกิด complement-mediated uptake และป้องกันการถูกฆ่าด้วย neutrophils, macrophages และ dendritic cells (Benga, et al., 2008; Chabot-Roy, et al., 2006) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. suis* น่าจะเป็นเชื้อก่อโรคประเภท extracellular systemic pathogen

นอกจากเชื้อ *S. suis* จะก่อให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดแล้ว ยังสามารถเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางได้ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต โดยกระบวนการเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางยังไม่ทราบแน่ชัด ทั้งนี้ระบบประสาทส่วนกลางจะมี Brain microvascular endothelial cells (BMEC) และ choroid plexus epithelial cells (CPEC) เป็นโครงสร้างหลักในระบบ blood-brain barrier (BBB) ซึ่งพบว่าเชื้อ *S. suis* จะมีผลต่อการทำงานของ CPEC barrier และสามารถทำให้เกิด cell apoptosis และ necrosis ได้ จากการศึกษาบน BMEC ที่มาจากมนุษย์ หรือของหมู พบว่าเชื้อ *S. suis* จะทำปฏิกิริยาเกาะติดบนเซลล์ที่มาจากมนุษย์และเกิดปฏิกิริยาเกาะติดและบุกรุกเซลล์ที่มาจากหมู โดยอาจก่อให้เกิดหรือไม่เกิดความเป็นพิษกับ

เซลล์ดังกล่าวนั้นจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ *S. suis* ที่ใช้ว่ามาจากที่ไหน (Eurasian หรือ North American) โดยเชื่อกันว่าความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นกระบวนการทำให้เชื้อ *S. suis* สามารถผ่าน BBB เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางได้ส่วนหนึ่ง (Benga, Friedl and Valentin-Weigand, 2005; Charland, et al., 2000; Vanier, et al., 2004) ทั้งนี้ยังอาจมีกระบวนการอื่นๆ อีกที่ช่วยให้เชื้อ *S. suis* เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางได้อีก (Tenenbaum, et al., 2005; Tenenbaum, et al., 2006; Tenenbaum, et al., 2008; Tenenbaum, et al., 2009)

การเกิดปฏิกิริยาระหว่างเชื้อ *S. suis* กับเม็ดเลือดขาวของมนุษย์เหมือนกันกับของหมู หรือของหนูทดลอง (Graveline, et al., 2007; Segura, Stankova and Gottschalk, 1999; Segura, Vadeboncoeur and Gottschalk, 2002) ถึงแม้ว่าทางเข้าของเชื้อ *S. suis* จะแตกต่างกันระหว่างมนุษย์ (แผลบริเวณผิวหนัง และเยื่อบุบริเวณปาก หรือทางเดินอาหาร) กับหมู (ส่วนใหญ่ติดต่อทางระบบทางเดินหายใจ) แต่จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเชื่อว่ากระบวนการเกิดโรคของทั้งในมนุษย์ และหมูน่าจะคล้ายคลึงกัน

6. **ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค**

การศึกษาปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค พยาธิกำเนิดของโรค และกระบวนการป้องกันต่อเชื้อโรคส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในเชื้อ *S. suis* serotype 2 strains ล่าสุด Baums และ Valentin-Weigand (Baums and Valentin-Weigand, 2009) ได้ทำการทบทวนวรรณกรรมและตีพิมพ์ข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคติดเชื้อ *S. suis* โดยปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคที่ทำการศึกษามากที่สุดคือ capsular polysaccharide (CPS) ซึ่งเป็นตัวป้องกันเชื้อ *S. suis* จากการกำจัดของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Charland, et al., 1998; Hilde E. Smith, Damman, et al., 1999) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคก็มี encapsulated ได้เช่นกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายังมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคอื่นๆ ที่มีความสำคัญอีกหลายชนิด (Gottschalk and Segura, 2000) องค์ประกอบบนผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียก็มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกระบวนการการอักเสบ (M. Gottschalk and Segura, 2000; M. Gottschalk, Segura and Xu, 2007) นอกจากนี้ N-deacetylation ของ peptidoglycan และ D-alanylation ของ lipoteichoic acid ยังมีบทบาทสำคัญในการทำให้เชื้อแบคทีเรียรอดชีวิตอยู่ในกระแสเลือดเช่นกัน (Baums and Valentin-Weigand, 2009)

ปัจจัยก่อความรุนแรงอีกชนิดหนึ่งที่พบเมื่อเร็วๆ นี้ในกลุ่มของเชื้อ Streptococcus species คือ Pilus formation ซึ่งจากการศึกษาในเชื้อ *S. suis* serotype 2 พบอย่างน้อยสี่กลุ่มของยีนที่เป็นไปได้ว่าสามารถสังเคราะห์เป็น pilus ได้ (Takamatsu, et al., 2009) หนึ่งในนั้นมีชื่อว่า ictalicise cluster ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับ pilus island 2b ของ group B Streptococcus ประกอบด้วย signal peptidase-like และ class C sortase-encoding genes และ สอง genes ที่สังเคราะห์ ancillary และ major pilin subunits (Fittipaldi, et al., 2007; Takamatsu, et al., 2009) เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการทดลองแสดงให้เห็นการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่สร้าง pili ของ *S. suis* โดยการกลายพันธุ์บริเวณ 5' end ของ gene ที่ coding เป็น ancillary subunit ทำให้สังเคราะห์ได้เฉพาะ major pilin subunit อย่างเดียว ดังนั้นยีนบริเวณนี้น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ adhesin (Fittipaldi, et al., 2010) และมีรายงานล่าสุดชี้ให้เห็นว่า ancillary subunit ของ pili สามารถใช้ในการป้องกัน immunogen ได้ (Garibaldi, et al., 2010)

นอกจากนี้ โปรตีนในกลุ่มที่มี LPXTG motif บริเวณปลายอะมิโนและเป็น surface protein ก็เป็นอีกกลุ่มที่จัดเป็นปัจจัยก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค ได้แก่ muramidase-released protein (MRP), surface protein 1 และ serum opacity-like factor ซึ่งจะเหมือนในกลุ่มของ group A streptococci (M. Gottschalk and Segura, 2000; M. Gottschalk, et al., 2007) ซึ่งกลไกการก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคอย่างจำเพาะในเชื้อ *S. suis* แต่ละสายพันธุ์นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด หากแต่เมื่อทำการทดลองโดยการผ่าเหล่าโดยการตัดยีนที่กำหนดการสร้าง housekeeping sortase A ซึ่งจะเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เชื่อมต่อ LPXTG motif ของ surface protein ติดกับผนังเซลล์ออกไป ผลที่ได้คือเชื้อที่ถูกผ่าเหล่าจะลดความรุนแรงลง (Osaki, et al., 2003; Vanier, et al., 2008; Wang, et al., 2009)

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อีกหลายชนิดที่มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค ได้แก่ กลุ่มที่เกี่ยวกับระบบ arginine deiminase, DNase, hyaluronidase และ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Baums and Valentin-Weigand, 2009) เป็นต้น สำหรับยีนที่สังเคราะห์ subtilisin like protease ที่พบบริเวณผิวเซลล์ของเชื้อ *S. suis* นั้น ก็มีผลทำให้เกิดความรุนแรงของโรคเช่นกัน เนื่องจากเมื่อทำการทดลองกลายพันธุ์ยีนนี้ ทำให้ความรุนแรงของโรคลดลงเนื่องจากเมื่อนำไปทดลองในหนูพบว่าเชื้อถูกกำจัดออก จากกระแสเลือดได้ง่ายกว่า wild type (Bonifait, et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนในกลุ่ม surface-exposed proteins อีกสองชนิดที่มีบทบาทก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคคือ fibronectin-binding proteins ซึ่งประกอบด้วย fibrinogen-binding protein และ enolase (Baums and Valentin-Weigand, 2009) สำหรับกลุ่มของ

secreted factors ที่มีบทบาทก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคที่มีความสำคัญมากในหมูคือ suilysin (M. Gottschalk and Segura, 2000; M. Gottschalk, et al., 2007) ซึ่ง Suilysin นั้นจะมีผลทั้งก่อให้เกิดพิษในเซลล์หลากหลายชนิด และยังรบกวนระบบ complement-mediated phagocytosis และการฆ่าเชื้อด้วย (Benga, et al., 2008; Chabot-Roy, et al., 2006; M. Gottschalk and Segura, 2000; Segura, et al., 2006)

Extracellular protein factor (EF) ก็จัดเป็นปัจจัยก่อความรุนแรงของโรคที่สำคัญอีกชนิด (H. E. Smith, et al., 1996) ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตมาก เนื่องจาก EF พบได้ทั้งเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อความรุนแรง และสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงก็พบได้ ทั้งนี้ควรทำการศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนชนิดนี้กับเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อความรุนแรงโดยการกลายพันธุ์ตำแหน่งยีนไม่ให้สามารถแสดงออกว่าจะสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคหรือไม่เนื่องจากยังมีเชื้อบางสายพันธุ์ที่รุนแรงแต่ยังไม่ได้ทำการศึกษา (M. Gottschalk, et al., 2007)

จากรายงานการศึกษาข้อมูลมีความขัดแย้งกันระหว่าง virulence factors แต่ละชนิดและยังขาดข้อมูลที่แน่ชัดว่า virulence factors ชนิดไหนที่มีบทบาทสำคัญก่อให้เกิดความรุนแรงที่แท้จริง แต่ควรที่จะศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลลักษณะการแสดงออกของยีนที่ปรากฏทั้งในสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง กับสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค ซึ่งอาจได้ virulence markers ที่แท้จริง

ทั้งนี้จากการศึกษาดูเหมือนว่า MRP และ EF proteins (Silva, et al., 2006; Vecht, et al., 1991) รวมทั้ง suilysin อาจใช้เป็น virulence markers ได้ในหมู (M. G. Gottschalk, Lacouture and Dubreuil, 1995; Jacobs, et al., 1994) ถึงแม้จะยังไม่สามารถแสดงให้เห็นว่าทั้งสามชนิดนี้เป็นปัจจัยก่อให้เกิดความรุนแรงอย่างแท้จริง (Allen, et al., 2001; S. Lun, et al., 2003; H. E. Smith, et al., 1996) แต่จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายีนทั้งสามชนิดมักให้ผลบวกกับเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อโรคในหมู จากการศึกษาเชื้อในประเทศบางประเทศ ของทวีปยุโรป และเอเชีย (Silva, et al., 2006; Vecht, et al., 1991; H. J. Wisselink, et al., 2000) พบว่าเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดความรุนแรงก็ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีนที่ผลิตเป็น MRP, EF และ suilysin เช่นกัน แต่ในทางตรงกันข้ามก็กลับมีการพบว่าการขาดหายของโปรตีนดังกล่าวหนึ่งหรือสองชนิดก็ไม่ได้ทำให้ความรุนแรงของโรคน้อยลง

ตาราง 2 แสดงผลการศึกษา virulence factors **ที่น่าจะเป็นของเชื้อ** *S. suis* serotype 2

ชื่อ virulence factor ที่น่าจะเป็น	ปรากฏเฉพาะสายพันธุ์ที่รุนแรง	ผลการกลายพันธุ์ยีนที่ก่อความรุนแรง	เอกสารอ้างอิง
Capsule	No	Reduced	Charland, et al., 1998; Smith, et al., 1999
Muramidase-released protein (MRP)	Variable	Unaffected	Smith, et al., 1997; Gottschalk, et al., 1998
Extracellular factor (EF)	Variable	Unaffected	Smith, et al., 1997; Gottschalk, et al., 1998
Suilysin	Variable	Unaffected	Gottschalk, et al., 1998; Allen, et al., 2001; Tarradas, et al., 2001a; Lun, et al., 2003
Fibronectin-binding	No	Partially reduced	protein de Greeff, et al., 2002
Serum opacity factor	No	Reduced	Baums, et al., 2006
Proteases	No	Unavailable	Jobin and Grenier, 2003; Jobin, et al., 2005b
Hyaluronate lyase tested	No	Not	Allen, et al., 2004
Arginine deiminase tested	No	Not	Winterhoff, et al., 2002
Albumin-binding protein	No	Not tested	Quessy, et al., 1997; Brassard, et al., 2001
IgG-binding protein	No	Unavailable	Benkirane, et al., 1997, 1998
38-kDa unknown protein	No	Unavailable	Okwumabua and Chinnapapakkagari, 2005
2-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	No	Unavailable	Brassard, et al., 2004
DNAse	No	Unavailable	Fontaine, et al., 2004

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 18 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 250016
เลขเรียกหนังสือ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตาราง 2 (ต่อ)

ชื่อ virulence factor ที่น่าจะเป็น	ปรากฏเฉพาะสายพันธุ์ที่รุนแรง	ผลการกลายพันธุ์ยีนที่ก่อความรุนแรง	เอกสารอ้างอิง
Elongation factor	No	Unavailable	TS Martinez, et al., 2003
Proliprotein signal peptidase	No	Unaffected	de Greeff, et al., 2003
Sortases	No	Unaffected	Osaki, et al., 2002; unpublished observations
Glutamate dehydrogenase	Different protein profile	Unavailable	Okwumabua, et al., 2001
O-acetylserine lyase	No	Unavailable	Osaki, et al., 2000
Heat-shock protein	No	Unavailable	Benkirane, et al., 1997
1-4 Gal-binding adhesin	No	Unavailable	Haataja, et al., 1996
52-kDa, IgG-binding protein	No	Unavailable	Serhir, et al., 1993
Superoxide dismutase	No	Unavailable	Langford, et al., 1991

ที่มา: M. Gottschalk, et al., 2007

7. สถานการณ์โรคติดเชื้อ *S. suis* ในมนุษย์

7.1 รายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* ทั่วโลก

พบรายงานการเกิดโรคติดเชื้อ *S. suis* ในมนุษย์รายแรก ที่ประเทศเดนมาร์ก เมื่อปี พ.ศ. 2511 เป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบ 2 ราย และติดเชื้อในกระแสเลือด 1 ราย (Perch, et al., 1968) ต่อมามีรายงานค่อนข้างน้อย พบเพียงประมาณ 200 ราย จากประเทศ เนเธอร์แลนด์ เดนมาร์ก อิตาลี เยอรมัน เบลเยี่ยม สหราชอาณาจักร ฝรั่งเศส สเปน สวีเดน ไอร์แลนด์ ออสเตรีย ฮังการี นิวซีแลนด์ อาร์เจนตินา ฮ่องกง โครเอเชีย ญี่ปุ่น สิงค์โปร์ ฮ่องกง ไทย เวียดนาม (Charland, et al., 1998; Fongcom, et al., 2001; M. Gottschalk, 2004;

M. Gottschalk, et al., 1989; M. Gottschalk, et al., 2010; Leelarasamee, et al., 1997; Vilaichone, Mahachai and Nunthapisud, 2000; Vilaichone, et al., 2002; H. F. L. Wertheim, et al., 2009) จนกระทั่งช่วงฤดูร้อนระหว่างปี พ.ศ.2541 ถึงปี พ.ศ.2542 ได้เกิดการระบาดใหญ่ของการติดเชื้อในคนขึ้นสองครั้งที่มณฑลเจียงสู ประเทศจีน โดยมีรายงานผู้ติดเชื้อจำนวน 25 ราย เสียชีวิตจำนวน 14 ราย ด้วยภาวะ septic shock syndrome และ meningitis จากนั้น ระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึงสิงหาคม พ.ศ.2548 ที่มณฑลเสฉวน ประเทศจีน เกิดการระบาดใหญ่ขึ้น โดยพบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อจำนวน 204 ราย เสียชีวิต 38 ราย ส่วนใหญ่มาด้วยอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ติดเชื้อในกระแสเลือด และมีอาการช็อกจากพิษของเชื้อ (Toxic shock syndrome, TSS) และสาเหตุของการเสียชีวิตส่วนใหญ่มาจาก การไม่สามารถรับการรักษาได้ไม่ทันท่วงที ผลการให้การรักษาไม่เหมาะสม นอกจากนี้ในระยะเวลาเดียวกัน ยังพบรายงานการติดเชื้อในมนุษย์ในบางประเทศ เช่น ที่เมืองกวางตุ้ง ประเทศฮ่องกง มีรายงานพบผู้ป่วยติดเชื้อจำนวน 4 ราย เสียชีวิต 1 ราย (Z.-R. Lun, et al., 2007)

7.2 รายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* ในประเทศไทย

ในประเทศไทยพบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* รายแรกตั้งแต่ปี พ.ศ.2530 และมีรายงานเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน

พบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* พบครั้งแรกที่โรงพยาบาลรามาธิบดี เมื่อปี พ.ศ. 2530 จำนวน 1 ราย และต่อมามีรายงานการติดเชื้อระหว่างปี พ.ศ.2530 ถึง ปี พ.ศ.2542 รวมทั้งสิ้น 8 ราย ซึ่งมาด้วยอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบจำนวน 6 ราย (ร้อยละ 75) และ 2 รายมาด้วยอาการ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (ร้อยละ 25) เป็นเพศชาย 7 คน หญิง 1 คน อายุระหว่าง 19 ถึง 75 ปี โดยผู้ป่วยจำนวน 4 ราย (ร้อยละ 50) อาศัยอยู่ในภาคกลางของประเทศ นอกจากนั้นมากจากภูมิภาคอื่น มีผู้ป่วยเพียง 2 รายที่มีประวัติสัมผัสหมู หรือ ผลิตภัณฑ์จากหมู ผู้ป่วยทั้ง 8 ราย ไม่มีรายงานการเสียชีวิต แต่พบผู้ป่วยจำนวน 6 รายที่สูญเสียการได้ยิน (Donsakul, et al., 2003)

ที่โรงพยาบาลศิริราช ในปี พ.ศ.2540 มีรายงานพบผู้ป่วย 3 รายติดเชื้อ *S. suis* ทั้งที่ติดเชื้อในกระแสเลือด และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โดยผู้ป่วยรายแรกเพศชาย อายุ 23 ปี อาชีพชำแหละหมู มีประวัติดื่มสุราเป็นประจำ น่าจะติดเชื้อบริเวณผิวหนังทางบาดแผลขนาดเล็กบริเวณข้อมือขวา โดยผู้ป่วยรายนี้เกิดภาวะ streptococcal toxic-shock syndrome แต่รักษาหายไม่พบภาวะแทรกซ้อนหลงเหลือ รายที่สอง เพศหญิง อายุ 49 ปี อาชีพกรรมกร มีประวัติดื่มสุรานาน 20 ปี มาด้วยอาการไข้ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ผู้ป่วยรายนี้ไม่ตอบสนองต่อการรักษา และเสียชีวิตในเวลาต่อมา สุดท้ายผู้ป่วยรายที่สาม เพศชาย อายุ 45 ปี อาชีพช่างทาสีรถยนต์ มีประวัติดื่มสุราเป็นประจำ เข้ามารักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการฟกช้ำบริเวณทรวงอกด้านซ้าย จากการหกล้ม

แต่ต่อมาเกิดอาการไข้ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ รักษาโดยให้ยา ceftriaxone แต่เกิดภาวะสูญเสียการได้ยินหลังจากนั้น 48 ชั่วโมง สุดท้ายหลังจากหายจากโรคเกิดภาวะหูหนวกถาวรหลงเหลืออยู่ ซึ่งผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ จากการเพาะเชื้อจากเลือด และน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยทั้งสามราย ถูกรายงานว่าพบ viridians group of streptococci จากนั้นตรวจยืนยันว่าเป็นเชื้อ *S. suis* (Leelarasamee, et al., 1997)

ต่อมาในปี พ.ศ.2544 ที่จังหวัดลำพูน มีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* จำนวนทั้งสิ้น 10 ราย โดยเป็นผู้ป่วยที่เข้ารักษาในโรงพยาบาลลำพูน ช่วงปี พ.ศ.2542 ถึง 2543 ทั้งหมดมาด้วยอาการไข้สูง ถ่ายเหลว ปวดเมื่อย และมีจ้ำเลือดออกตามตัว การดำเนินของโรคดำเนินไปอย่างรวดเร็ว โดยผู้ป่วยเสียชีวิตภายใน 24-48 ชั่วโมง ภายหลังเข้ารับการรักษา เนื่องจากเกิดภาวะ disseminated intravascular coagulation (DIC), acute renal failure (ARF) หรือ acute respiratory distress syndrome (ARDS) ข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าทั้ง 10 ราย เป็นเพศชาย อายุอยู่ระหว่าง 40-49 ปี มีที่อยู่อาศัยอยู่ในพื้นที่จังหวัดเดียวกัน มีประวัติรับประทานอาหารที่ประกอบจาก เนื้อหมู หรือเลือดหมูที่ปรุงไม่สุก ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ และผลการตรวจยีน 16s rRNA ด้วยเทคนิค PCR และตัดด้วยเอนไซม์ *PstI* ยืนยันว่าติดเชื้อ *S. suis* (Fongcom, et al., 2001)

ที่ศูนย์วิจัยเชื้อ *S. suis* แห่งประเทศไทย ได้ทำการศึกษาย้อนหลัง ผู้ติดเชื้อ *S. suis* ในช่วงปี พ.ศ.2537 – 2544 พบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* จำนวน 17 ราย เพศชาย 11 ราย เพศหญิง 6 ราย อายุเฉลี่ย 46.24 ปี (อายุระหว่าง 1 เดือน ถึง 75 ปี) จากประวัติพบว่า ในหมู่เพศชาย พบ 2 รายมีอาชีพ และพฤติกรรมที่ต้องสัมผัส หมู หรือเนื้อหมู ในหมู่เพศหญิง 1 ราย ประกอบอาชีพขายหมู และอีก 3 รายเป็นแม่บ้าน สำหรับประวัติการเจ็บป่วยก่อนการติดเชื้อ *S. suis* พบว่า 1 รายมีประวัติ congenital hydrocephalus 3 ราย มีประวัติเป็น rheumatic heart disease 3 ราย มีประวัติพิษสุราเรื้อรัง และ 2 รายมีประวัติเกิดบาดแผลบริเวณผิวหนังก่อนการติดเชื้อ ส่วนอาการทางคลินิกที่พบ 9 ราย acute bacterial meningitis 4 ราย infective endocarditis 2 ราย sepsis syndrome และอีก 2 รายพบ pneumonia และ spontaneous bacterial peritonitis (Vilaichone, et al., 2002)

ต่อมาในปี พ.ศ.2547 มีรายงานการศึกษาผู้ป่วยติดเชื้อ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวนทั้งสิ้น 12 รายที่เป็นโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากการติดเชื้อ *S. suis* ในช่วงระยะเวลา 6 ปี ระหว่าง พ.ศ.2540 ถึงปี พ.ศ.2545 โดยผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* 12 ราย เป็นเพศชาย 9 ราย เพศหญิง 3 ราย อายุเฉลี่ย 49.5 ปี จากประวัติพบว่าผู้ป่วย 9 ราย ดื่มสุราเป็นประจำ และพบ 5 รายมีประวัติ

บริโภค หรือสัมผัสเนื้อหมู อาการทางคลินิกสามารถแบ่งได้สามประเภท คือ ผู้ป่วยกลุ่มอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบเพียงอย่างเดียว 5 ราย กลุ่มอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบร่วมกับการแสดงอาการทางระบบประสาท 5 ราย ผู้ป่วยข้ออักเสบและกล้ามเนื้ออักเสบ และกลุ่มอาการติดเชื้อเข้ากระแสโลหิต 2 ราย ในผู้ป่วยทั้งหมดมีผู้ป่วยเพียง 1 รายที่ถึงแก่กรรม (Suankratay, et al., 2004)

ในปี 2549 โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รายงานผลการศึกษาผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* ในเขตภาคเหนือ ย้อนหลัง 3 ปี ระหว่างเดือนเมษายน พ.ศ.2543 ถึง ธันวาคม พ.ศ.2545 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* ทั้งสิ้น 41 ราย ผู้ป่วยมาจากหลายจังหวัดในเขตภาคเหนือ คือ เชียงใหม่ (25 ราย) ลำพูน (8) เชียงราย (3) ลำปาง (2) แพร่ (1) พะเยา (1) และตาก (1) เป็นเพศชายจำนวน 32 ราย หญิง 9 ราย อายุเฉลี่ย 51 ปี (ช่วงอายุ 27-77 ปี) ในกลุ่มเพศชาย มีผู้ป่วยจำนวน 2 รายที่มีประวัติประกอบอาชีพ และสัมผัสเนื้อหมู อีก 1 รายมีประวัติบริโภคเนื้อหมูที่ปรุงไม่สุก ในกลุ่มเพศหญิงมีผู้ป่วยรายเดียวที่มีประวัติสัมผัสเนื้อหมู นอกจากนี้ผู้ป่วยทั้งหมดไม่มีประวัติมีบาดแผลบริเวณผิวหนัง อาการทางคลินิกที่พบประกอบด้วย Endocarditis 16 ราย (เสียชีวิต 3 รายด้วยภาวะหัวใจเต้นไม่เป็นจังหวะ (arrhythmias) Meningitis 13 ราย เกิดภาวะแทรกซ้อน คือ การได้ยินเสียงลดลง หรือสูญเสียการได้ยินรวม 6 ราย และเสียชีวิตจำนวน 2 ราย ระหว่างการรักษาในโรงพยาบาลด้วยภาวะ septic shock 1 ราย และ brain herniation ภายหลังจากการเจาะน้ำไขสันหลัง Septicemia 10 ราย เสียชีวิต 3 ราย จากภาวะ septic shock developed multiple organ failure Endophthalmitis 1 ราย และ Spondylodiscitis 1 ราย (Wangkaew, et al., 2006)

ที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก มีการศึกษาย้อนหลังผู้ป่วยเยื้อหุ้มสมองอักเสบ จากการติดเชื้อ *S. suis* ระหว่างปี พ.ศ.2544-2549 จำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 41 ราย เป็นเพศชาย 28 ราย (ร้อยละ 68) หญิง 13 ราย (ร้อยละ 32) อายุอยู่ในช่วง 21-80 ปี ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค ได้แก่ ติดแอลกอฮอล์ 8 ราย เบาหวาน 5 ราย และอีก 28 รายไม่พบปัจจัยเสี่ยง ภาวะแทรกซ้อนที่น่าสังเกต คือ ภาวะสูญเสียการได้ยิน โดยพบผู้ป่วยสูญเสียการได้ยินจำนวน 38 ราย (ร้อยละ 93) ซึ่งมีผู้ป่วย จำนวน 3 รายที่เกิดภาวะสูญเสียการได้ยินอย่างรวดเร็วภายใน 0-3 วัน หลังจากเข้ารับการรักษา (Rusmeechan and Sribusara, 2008)

ในปีเดียวกันที่โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ได้รายงานการศึกษาย้อนหลัง ผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* ที่เข้ามารักษาในโรงพยาบาลระหว่างปี พ.ศ.2548-2550 โดยศึกษาเกี่ยวกับประวัติ อาการทางคลินิก และปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค และเสียชีวิต โดยผลการศึกษาพบผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 66 ราย อายุเฉลี่ย 52.9 ปี 39 ราย (ร้อยละ 59) มีประวัติรับประทานเนื้อหมู หรือส่วนประกอบของหมู เช่น เลือด หรือเครื่องในหมู ที่ปรุงไม่สุก 7 ราย

(ร้อยละ 11) มีประวัติเป็นโรคตับเนื่องจากดื่มสุรา 4 ราย (ร้อยละ 6) ประกอบอาชีพที่ต้องสัมผัสเนื้อหมู ได้แก่ ขายหมู หรือชำแหละหมู นอกจากนั้นไม่มีประวัติเสี่ยง ผู้ป่วยมาด้วยอาการ acute meningitis, sepsis without localized infection, septic shock, endocarditis และ septic arthritis ภาวะแทรกซ้อนประกอบด้วย hearing loss (19 ราย; ร้อยละ 29), disseminated intravascular coagulation (DIC 4 ราย; ร้อยละ 6), congestive heart failure (3 ราย; ร้อยละ 5), intracerebral hemorrhage (2 ราย; ร้อยละ 3) และ endophthalmitis, subdural empyema, peritonitis และ intervertebral discitis อย่างละ 1 ราย ผู้ป่วยเสียชีวิตจำนวน 11 ราย (ร้อยละ 17) ซึ่ง 2 ใน 3 เสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมงแรกที่เข้ามารับการรักษา ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า ภาวะ septic shock เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wangsomboonsiri, et al., 2008)

และจากรายงานการเฝ้าระวังโรคประจำปี ของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ได้รายงานการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อ *S. suis* ตั้งแต่ปี พ.ศ.2550 ถึง 2553 โดยสำนักระบาดวิทยาได้รับรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* จากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด และสำนักป้องกันควบคุมโรค รวมทั้งหมด 150, 230, 158 และ 185 ราย ตามลำดับ เสียชีวิต 23, 11, ไม่มีข้อมูล และ 12 ราย ตามลำดับ อัตราป่วย 0.22, 0.36, 0.25 และ 0.29 ต่อประชากรแสนคน ตามลำดับ อัตราตาย 0.04, 0.02, ไม่มีข้อมูล และ 0.02 ต่อประชากรแสนคน ตามลำดับ และอัตราป่วยตายร้อยละ 17.97, 4.78, ไม่มีข้อมูล และ 6.49 ตามลำดับ โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในเขตจังหวัดภาคเหนือ พบว่า โรคนี้เกิดได้ตลอดทั้งปี สาเหตุส่วนใหญ่ที่ได้รับจากรายงานการสอบสวนโรคเกิดจากพฤติกรรมเสี่ยงในการบริโภคอาหารสุกๆ ดิบๆ และผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่หายจากโรคจะมีความพิการทางหูอย่างถาวร ซึ่งจำนวนผู้ป่วยโรคติดเชื้อ *S. suis* ในประเทศไทยอาจมีจำนวนมากกว่านี้ แต่เนื่องจากยังไม่อยู่ในระบบเฝ้าระวังและมีข้อจำกัดในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งไม่สามารถตรวจได้ทุกแห่ง และยังขาดการประสานงานระหว่างเจ้าหน้าที่ระบาดวิทยา และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการรายงานผู้ป่วย รวมทั้งแพทย์ที่ยังไม่คุ้นเคยกับโรคนี้ ทำให้ขาดการตระหนักในการวินิจฉัยโรค (สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2551, หน้า 60-61; สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2552, หน้า 122; สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2553, หน้า 77; สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2554, หน้า 74) รายละเอียดแสดง ดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงสรุปรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* ในประเทศไทย

ปี รายงาน (พ.ศ.)	พื้นที่ที่รายงาน	จำนวนผู้ป่วย (ราย)	อาการแสดง (ราย)	เสียชีวิต (ราย)	สูญเสียการได้ยิน (ราย)
2530-2542	โรงพยาบาลรามาธิบดี	8	Meningitis (6) Endocarditis (2)	No	6
2540	โรงพยาบาลศิริราช	3	Septicemia (1) Meningitis (2)	NA	NA
2542-2543	โรงพยาบาลลำพูน	10	high fever watery diarrhea, severe myalgia ecchymosis rashes.	10	No
2537-2544	ศูนย์วิจัยเชื้อ *S. suis* แห่งประเทศไทย	17	Meningitis (9) Endocarditis (4) Septicemia (2) pneumonia and peritonitis (2)	NA	NA
2540- 2545	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	12	Meningitis (12)	1	7
2543-2545	โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่	41	Meningitis (13) Endocarditis (16) Septicemia (10) Endophthalmitis (1) Spondylodiscitis(1)	8	6
2544-2549	โรงพยาบาลพุทธชินราช	41	Meningitis (41)	No	38
2548-2550	โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์	66	Meningitis (34) Sepsis (18) Septic shock (18) Endocarditis (5) Septic arthritis (1)	11	19
2551	สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค	150	ไม่มีข้อมูล	23	ไม่มีข้อมูล
2552	สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค	230	ไม่มีข้อมูล	11	ไม่มีข้อมูล
2553	สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค	158	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
2554	สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค	185	ไม่มีข้อมูล	12	ไม่มีข้อมูล

หมายเหตุ: NA; Not available

8. การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *S. suis* ทางคลินิก

ส่วนใหญ่อาการของผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากการติดเชื้อ *S. suis* จะคล้ายกับการติดเชื้อจาก *S. pneumoniae* หรืออาการแบบกึ่งเฉียบพลัน (subacute meningitis) จะคล้ายกับผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากวัณโรค นอกจากนั้นผู้ป่วยยังอาจมีลักษณะทางคลินิกอื่นๆ ได้แก่ การติดเชื้อในกระแสโลหิตคล้ายกับที่พบในการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ โดยเฉพาะ *S. aureus* และ β-hemolytic streptococci ที่เป็น group A, B หรืออื่นๆ ได้แก่ C, F และ G การติดเชื้อของผิวหนัง และเนื้อเยื่ออ่อน เช่น เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังอักเสบ (cellulitis) กล้ามเนื้ออักเสบ (myositis) และ necrotizing fasciitis การติดเชื้อในเยื่อบุช่องท้องแบบปฐมภูมิ (primary peritonitis) การติดเชื้อในข้อ การเกิดกลุ่มอาการ toxic shock และลิ้นหัวใจอักเสบ (endocarditis) (Huang, et al., 2005; Leelarasamee, et al., 1997; Vilaichone, et al., 2000; Wangkaew, et al., 2006; Yu, et al., 2006) มักเกิดในผู้ป่วยตับแข็งหรือดื่มสุราจัดเป็นประจำ ลักษณะคลินิกที่สำคัญและต้องการการวินิจฉัยและเป็นปัญหาทางคลินิก ได้แก่ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งมีข้อมูลที่ช่วยให้สงสัยและช่วยการวินิจฉัยดังนี้

8.1 ข้อมูลทางคลินิก (Yu, et al., 2006)

8.1.1 อาการและอาการแสดงของระบบประสาท

ผู้ป่วยอาจมาพบแพทย์ ด้วยอาการและอาการแสดงของเยื่อหุ้มสมองอักเสบแบบเฉียบพลันหรือกึ่งเฉียบพลันได้ ซึ่งจะมีอาการคล้ายกับผู้ป่วยที่สงสัยเยื่อหุ้มสมองอักเสบเฉียบพลันจาก *S. pneumoniae* หรือผู้ป่วยสงสัยเยื่อหุ้มสมองอักเสบกึ่งเฉียบพลันจากวัณโรค ดังนั้นจึงควรนึกถึงการติดเชื้อจากเชื้อ *S. suis* ไว้ด้วย

ลักษณะทางคลินิกของระบบประสาทที่ช่วยในการวินิจฉัย ได้แก่ ความผิดปรกติของเส้นประสาทสมองคู่ที่ 8 ได้แก่ การได้ยินลดลง การคลื่นเหียนวิงเวียน (vertigo) ลูกตากระตุก (nystagmus) จะช่วยทำให้สงสัย *S. suis* มากขึ้น ในบางรายงานอาจพบมีภาวะแทรกซ้อนหลังเยื่อหุ้มสมองอักเสบ 2 สัปดาห์เหมือนที่พบในเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากวัณโรค ได้แก่ arachnoiditis

8.1.2 อาการและอาการแสดงนอกระบบประสาท

ประมาณหนึ่งในสามของผู้ป่วยที่มีอาการและอาการแสดงนอกระบบประสาทที่สำคัญ ได้แก่ การติดเชื้อของผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน เช่น Cellulitis, myositis และ fasciitis หรือมีข้ออักเสบ (arthritis) ร่วมด้วย มีบางรายงานที่มีการตรวจพบ uveitis ร่วมด้วย และอาจมีอาการแสดงที่ผิวหนัง เช่น petchiae หรือ ecchymosis ร่วมด้วย

8.2 ข้อมูลทางบุคคลและโรคประจำตัว

เกือบร้อยละ 90 ของผู้ป่วยเป็นเพศชาย ในวัยทำงาน มีประวัติดื่มสุราจัดเป็นประจำ มีอาชีพเกี่ยวข้องกับการสัมผัสหมูป่วย เช่น ชำแหละหมู หรืออยู่โรงฆ่าสัตว์ เป็นต้น โดยมีระยะฟักตัวหลังสัมผัสเชื้อแบคทีเรียจากหมูประมาณ 1-14 วัน

8.3 ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการพยาธิคลินิก

8.3.1 การตรวจ น้ำไขสันหลัง

1) มีลักษณะความดันเปิด สูงมากกว่า 20 เซนติเมตรน้ำ

2) พบเซลล์เม็ดเลือดขาว จำนวนปรกติ (น้อยกว่า 5 cell/μL) จนสูงถึงระดับ 1,000-2,000 cell/μL ส่วนใหญ่อยู่ประมาณ 900 cell/μL โดยมีลักษณะเป็นชนิด neutrophils หรือ lymphocytes เด่น

3) ระดับน้ำตาลในน้ำไขสันหลัง อยู่ในระดับต่ำๆ มีค่าปกติ ประมาณ 20 mg/dl

4) ระดับโปรตีนสูง โดยมีค่าปกติประมาณ 170 mg/dl

5) การย้อมสีแกรม พบแบคทีเรียแกรมบวกทรงกลมของ *S. suis* ร้อยละ 56 อาจเรียงเป็นสาย ซึ่งพบได้น้อยมาก สำหรับ *S. pneumoniae* มีลักษณะเป็นคู่แบบ lancet shape จำเป็นต้องเชี่ยวชาญในการดู ควรรักษาแบบครอบคลุมการรักษา *S. pneumoniae* ในระหว่างรอผลการเพาะเชื้อแบคทีเรีย

8.3.2 การตรวจเลือด

Complete blood count (CBC) พบจำนวนเม็ดเลือดขาว 5,000-30,000 cell/μL แต่ส่วนใหญ่ของผู้ป่วยมีระดับเม็ดเลือดขาวสูงมากกว่า 10,000 cell/μL และส่วนใหญ่เป็นชนิด polymorphnuclear cells

9. การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *S. suis* ทางห้องปฏิบัติการ

9.1 การตรวจจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ด้วยการย้อมแกรม (direct gram stained examination) (Staats, et al., 1997)

การย้อมแกรมจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงเป็นวิธีที่ช่วยวินิจฉัยเบื้องต้นได้เร็ว หากได้น้ำไขสันหลังในปริมาณที่มากพอ (1 - 2 ml.) ควร centrifuge เพื่อให้ได้ตะกอนมาทำการย้อมและเพาะเชื้อ ซึ่งจะมีโอกาสพบเชื้อได้ดีขึ้น สำหรับ hemoculture หลังบ่ม หากมีสัญญาณว่าน่าจะมีเชื้อ ก็ควรย้อมเช่นกัน ในการย้อมใช้ Pasteur pipette ดูดตัวอย่างละ 1 หยด บน slide วางให้แห้ง โดยไม่ต้อง smear จากนั้น fix ด้วย methanol แทนการ fix ด้วยความร้อน โดยหยด methanol 2-3 หยด วางทิ้งไว้ 1 นาทีให้แห้งโดยไม่ต้องล้างหรือลนไฟ (heat fix) ก่อนทำการย้อมแกรม

ซึ่งในผู้ป่วยที่มีอาการ sepsis หรือ meningitis ที่มีประวัติสัมผัส หรือบริโภค เนื้อหมู หรือเลือดหมูดิบ เมื่อพบ cocci ติดสีแกรมบวก เรียงกันเป็นสายสั้นๆ (short chain) บ่งชี้ว่าสงสัยจะมีการติดเชื้อ *S. suis*

9.2 การเพาะเชื้อ

การตรวจวินิจฉัยโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่าง เลือด น้ำไขสันหลัง หรือน้ำในข้อ เป็นวิธีที่ใช้ในงานประจำวัน ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการเพาะหาเชื้อก่อโรคจาก hemoculture, CSF และน้ำเจาะจากรอยโรค คือ sheep blood agar, Chocolate agar และ MacConkey โดยทำการ streak ตัวอย่างบนอาหารด้วยเทคนิคทั่วไปทางจุลชีววิทยา และบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี CO_2 5-7 % (*S. suis* ขึ้นได้ที่บรรยากาศทั่วไป แต่จะเจริญได้ดีขึ้นในบรรยากาศที่มี CO_2) เชื้อที่เจริญบน sheep blood agar (SBA) จะสามารถสังเกตการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงซึ่งมีความสำคัญในการแยกชนิดเชื้อ *S. suis* ออกจาก *Streptococcus* species อื่น โคโลนีของ *S. suis* จะมีขนาดเล็กประมาณ 0.5-1.0 mm. สีเทาขุ่น มีเมือกเล็กน้อย เชื้อ *S. suis* ส่วนใหญ่จะให้ลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงเป็น α-haemolysis บน sheep blood agar plates แต่มีรายงานการศึกษาว่า *S. suis* serotype 2 ให้ลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงชนิด α-haemolysis บน sheep blood agar plates และ β-haemolysis บน horse blood agar plates (Staats, et al., 1997)

ถึงแม้การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจะถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ผลการตรวจอาจผิดพลาด หรือบางครั้งไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (M. Gottschalk, 2004; Lütticken, et al., 1986) ซึ่งโดยส่วนใหญ่ที่พบบ่อยมักรายงานผลผิดการตรวจ *S. suis* ผิดเป็น *Streptococcus* species, α-hemolytic หรือ viridans streptococci, *Enterococcus faecalis*, *Aerococcus* viridans, หรือบ่อยครั้งที่รายงานเป็น *S. pneumoniae* (Donsakul, et al., 2003; Lütticken, et al., 1986) และที่สำคัญการตรวจวินิจฉัยด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้ออาจไม่ได้ผล หรือให้ผลลบลวง ในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะก่อนการเก็บสิ่งส่งตรวจเพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการ

9.3 การพิสูจน์ชนิดเชื้อ

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. suis* ที่เจริญบน sheep blood agar หรือ human blood agar ทุกสายพันธุ์ จะให้ลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงแบบ α-hemolysis และเมื่อทำการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นพบว่าเชื้อนี้ให้ผล oxidase ลบ catalase ลบ ไม่เคลื่อนที่ ดื้อต่อ optochin และไม่เจริญในอาหารที่มี 6.5 % NaCl

การแยกชนิดเชื้อ *S. suis* ออกจาก เชื้อ Streptococci อื่นที่ให้ลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงแบบ α-hemolysis หรือ viridans streptococci สามารถแยกได้โดยการทดสอบทางชีวเคมี ดังแสดงใน ตาราง 4 (Murray, et al., 2003) ส่วนการจำแนกเชื้อ *S. suis* เป็น type 1 และ 2 ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 4 แสดงการพิสูจน์แยกชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ที่ให้ลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงชนิด α-hemolysis บน Blood agar

Species/group	Antigen [1]	Opt	BS	BE	Na	Pyr	Esc	Vp	Man	Sbl	Tre	St	Dx	Origin
S. pneumoniae	pn	+	+	-	-	-	v	-	-	-	v	-	-	human
S. equinus	D	-	-	+	-	-	+	+	-	-	v	-	-	equine
(S. bovis)														bovine
S. gallolyticus	D	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	human
(S. bovis I)	D	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	koala
(S. bovis II/2)														bovine
S. infantarius	D(v)	-	v	-	-	-	v	+	-	-	-	+	-	human
(S. bovis II/1)	D(v)	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	v	-	bovine
subsp. infantarius ,subsp. coli														
S. suis	Type 1-35 (R,S,T)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	swine, human
viridans streptococci	A,C,G, F, none	-	-	-	-	-	v	v	v	v	v	v	v	human
Other streptococci and genera	unknown	-	-	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	Animals , human

Note: [1] คำย่อ: Antigen; pn, pneumococcal typing antiserum หรือ Omni serum, ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่, Lancefield group antigen; Opt, optochin; BS, bile solubility; BE, bile-esculin reaction; Na, growth in 6.5% NaCl broth; Pyr, pyrrolidonyarlyamidase reaction; Esc, hyrolysis of esculin; Vp, Voges-Proskauer reaction; Man, Sbl, Tre, acidification of mannitol, sorbitol และ trehalose broths; St, hydrolysis of starch; Dx, production of extracellular polysaccharide.

ตาราง 5 แสดงการจำแนกเชื้อ *S. suis* serotype 1 และ 2

Characteristic	*S. suis* serotype 1 (%)	*S. suis* serotype 2 (%)
Hemolysis, SBA	α	α
Growth, 10 °C	-	-
Growth, 45 °C	-	-
Leucine aminopeptidase (LAP)	100	100
Pyrrolidonylarylamidase (PYR)	53	41
Growth, Bile Esculin agar	-	-
Growth, 6.5% NaCl	-	-
Esculin hydrolysis	82	70
ADH	91	95
Hippurate hydrolysis	-	-
Urease	-	-
Acetoin (VP)	0	0
Motility	-	-
Acid produced from:		
Glucose	+	+
Maltose	+	+
Sucrose	+	+
Lactose	94	99
Mannitol	0	1
Melibiose	-	-
Inulin	75	63
Arabinose	0	0
Sorbitol	0	1
Starch	100	99
Raffinose	0	93
Ribose	0	0
Trehalose	100	98
Production of		
α-galactosidase (α-GAL)	80	91
β-galactosidase (β-GAL)	76	52
β-glucosidase (β-GLU)	V (60)	V (85)
β-galactosidase (β-GUR)	94	91
Alkaline phosphatase (PAL)	1	3

นอกจากการแยกชนิดเชื้อโดยวิธีดั้งเดิม (Conventional method) ในปัจจุบันยังมีชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับแยกชนิดเชื้อ *S. suis* ได้แก่ API Strep System test (BioMerieux, France), BBL Crystal Gram-positive ID kit (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD), Vitek GPI Card (BioMerieux, Durham, NC) และ Phoenix System PID (Becton-Dickinson) เป็นต้น แต่ถึงอย่างไรก็ตามจากการศึกษาทดลองยังพบว่าบางสายพันธุ์ของเชื้อ *S. suis* ยังไม่สามารถตรวจได้จากชุดทดสอบสำเร็จรูปเหล่านี้ (Huang, et al., 2005; Ip, et al., 2007)

9.4 การทดสอบความไวของเชื้อ *S. suis* ต่อยาต้านจุลชีพ

จากผลการทดสอบความไวของ Penicillin ต่อเชื้อ *S. suis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มารักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 12 คน ระหว่าง พ.ศ.2540-2545 พบว่า ไวต่อ penicillin ทุกราย (Suankratay, et al., 2004) อย่างไรก็ตาม ควรมีการเฝ้าระวังการดื้อยา และทดสอบความไวของเชื้อ *S. suis* ทุกรายที่พบในผู้ป่วย โดยวิธีมาตรฐานตามข้อกำหนดของ Clinical and Laboratory Standards Institute (Diekema, et al., 2001)

9.5 การตรวจด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา (Immunological diagnostic method)

มีการศึกษา และพัฒนาวิธีการตรวจทางเซรุ่มวิทยา เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. suis* เช่น ในปี พ.ศ.2538 Tikkanen, et al. ได้พัฒนาวิธี immunoblot analysis เพื่อจำแนกชนิด (Type-secific) ของ *S. suis* โดยอาศัยคุณสมบัติของ capsular polysaccharides บนตัวเชื้อเป็นแอนติเจน ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว แต่ยังคงต้องศึกษาเพิ่มเติมเรื่อง cross-reaction (Tikkanen, et al., 1995)

นอกจากนี้ ในปีต่อมา Martin del Campo Sepulveda ได้ตีพิมพ์บทความที่ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *S. suis* โดยศึกษาเปรียบเทียบวิธี capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA (CPS-ELISA) กับวิธี whole cell antigen-based ELISA (WCA-ELISA) ซึ่งผลการศึกษาพบว่าเมื่อทดลองกับเซรุ่มของกระต่าย วิธี WCA-ELISA มีความจำเพาะที่ต่ำมาก และเกิด Cross-reactions กับโปรตีนทั่วๆ ไป ส่วนวิธี CPS-ELISA ให้ผลที่น่าพอใจ โดยสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ดีที่ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ 0.1 pg/well และเกิด Cross-reactions น้อย โดยสามารถนำไปใช้ตรวจหมูที่ติดเชื้อ *S. suis* ได้ (Martin del Campo Sepulveda, et al., 1996)

9.6 การตรวจด้วยวิธี พี ซี อาร์ (Polymerase chain reaction assay; PCR)

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยหรือ จำแนกชนิดของเชื้อ *S. suis* ได้อย่างจำเพาะ และรวดเร็ว ซึ่งมีผู้ศึกษาวิจัย และพัฒนาเทคนิคดังกล่าวเพื่อใช้ตรวจทั้งในหมู และผู้ป่วยสงสัยติดเชื้อ *S. suis* รวมทั้งใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้ออีกด้วย ซึ่งสรุปไว้ดัง ตาราง 6

โดยในปี พ.ศ.2543 Hilde E. Smith, et al. ได้พัฒนาเทคนิค PCR สำหรับใช้จำแนกชนิด (Type) ของเชื้อ *S. suis* จำนวน 3 ชนิด คือ *S. suis* serotype 1 (และ 14), serotype 2 (และ 1/2) และ serotype 9 โดยศึกษาจากตัวอย่างทอลซิล ของหมู สำหรับการออกแบบ Primer ของ PCR นั้นได้ออกแบบให้จำเพาะต่อ capsular genes ของตัวเชื้อ ซึ่งสามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านการตรวจวินิจฉัยหมูที่ติดเชื้อ ระบาดวิทยาของเชื้อ และการติดต่อของเชื้อ *S. suis* (Hilde E. Smith, Veenbergen, et al., 1999)

ต่อมาในปี พ.ศ.2545 Wisselink, et al. ได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับจำแนก serotypes 1 (และ 14) 2 (และ 1/2) 7 และ 9 โดยการออกแบบ Primer ให้จำเพาะต่อ capsular polysaccharide (*cps*) genes และ *epf* gene สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัย และจำแนก serotype ของเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างทอลซิล ของหมู (Henk J. Wisselink, Joosten and Smith, 2002)

ปี พ.ศ.2546 Ogi Okwumabua, et al. ได้พัฒนาวิธี multiplex PCR โดยออกแบบ Primer ให้จำเพาะต่อ *gdh* gene และ capsular (*cps*) gene สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยตัวเชื้อ *S. suis* และจำแนก serotype ของเชื้อ ได้แก่ serotypes 1/2, 1, 2, 7 และ 9 ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่ติดเชื้อ และการศึกษาทางระบาดวิทยา (Okwumabua, O'Connor and Shull, 2003)

เช่นเดียวกันในปี พ.ศ.2547 Marois, et al. ได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ และจำแนกชนิดของเชื้อ *S. suis* โดยใช้ 16S rRNA gene ของ *S. suis* เป็นยีนเป้าหมายในการออกแบบ Primer และออกแบบ Primer โดยอาศัยความแตกของ *cps2J* gene ซึ่งเป็นยีนที่มีหน้าที่สังเคราะห์ capsule ของเชื้อ *S. suis* สำหรับจำแนก serotypes 2 และ 1/2 ของเชื้อ *S. suis* serotypes 2 และ 1/2 โดยการศึกษานี้ได้นำไปใช้ตรวจวินิจฉัยจากตัวอย่างทอลซิล หมูที่ติดเชื้อ หรือที่เป็นพาหะ ทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ (Marois, et al., 2004)

ต่อมาในปี พ.ศ.2550 Bao-Zheng, et al. ได้พัฒนาเทคนิค real-time fluorescent polymerase chain reaction สำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ *S. suis* serotype 2 โดยการออกแบบ primers และ TaqMan probe จาก *cps2I* (capsular polysaccharide 2I) gene สำหรับศึกษาทางระบาดวิทยาในการส่งออก และนำเข้าหมู (Bao-Zheng, et al., 2007)

และล่าสุดในปี พ.ศ.2553 Yang, et al. ได้พัฒนาเทคนิค TaqMan real-time quantitative PCR สำหรับตรวจวินิจฉัย *S. suis* serotype 2 โดยออกแบบ primers และ TaqMan probe ให้จำเพาะต่อ glutamate dehydrogenase (GDH) gene เพื่อใช้สำหรับศึกษาการเพิ่มขึ้นลดลงของปริมาณเชื้อในเลือดหมูทดลอง (Yang, et al., 2010)

ตาราง 6 สรุปการศึกษา และพัฒนาวิธี Polymerase chain reaction สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis*

เทคนิค	การตรวจวินิจฉัยเชื้อ	ตำแหน่งยีนที่จำเพาะ	ความไวของวิธี	ตัวอย่างวินิจฉัย	เอกสารอ้างอิง
Conventional PCR	*S. suis* serotype 1, 14, 2, 1/2, and 9	Capsular polysaccharide (*cps*) genes	ไม่รายงาน	Tonsillar specimens from pigs	Hilde E. Smith, et al., 1999
Multiplex PCR	*S. suis* serotypes 1 (and 14), 2(and 1/2-), 7, and 9	*cps* genes	10 fg of chromosomal DNA	Tonsillar specimens from pigs	Henk J. Wisselink, Joosten and Smith, 2002
Multiplex PCR	*S. suis* strains and a serotypes 1/2, 1, 2, 7, and 9	Glutamate dehydrogenase (*gdh*) gene and *cps* genes	Not report	pure colony	Okwumabua, O'Connor and Shull, 2003
Multiplex PCR	*S. suis* strains and serotypes 2 and 1/2	16S rRNA gene and *cps2J* gene	280 CFU/ml of tonsil sample for serotypes 2 or 1/2 28 CFU/ml of tonsil sample for all *S. suis* serotypes	Tonsillar specimens from pigs	Marois, et al., 2004
Real-time PCR	Serotype 2	*cps2I* gene	10 copies of chromosomal DNA	swine tissue	Bao-Zheng, et al., 2007
Real-time quantitative PCR	Serotype 2	*gdh* gene	10 copies/µl of template DNA	blood of infectious pigs	Yang, et al., 2010

10. การรักษา

การรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* นั้นจะแตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยแต่ละคนขึ้นอยู่กับอาการทางคลินิกที่เกิดขึ้น ซึ่งภายหลังจากถูกวินิจฉัยและยืนยันว่าติดเชื้อ *S. suis* ปกติแพทย์จะรักษาโดยให้ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin G ร่วมกับยาปฏิชีวนะอื่นอีกหนึ่ง หรือมากว่าหนึ่งชนิด เช่น ceftriaxone, gentamicin, chloramphenicol และ ampicillin โดยปริมาณการให้ยาจะแตกต่างกันไป ซึ่งอาจจำแนกตามความรุนแรงของโรค ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคน้อยจะให้ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin G ปริมาณ 4 ล้านยูนิต ทุกๆ 6 ชั่วโมง ทางหลอดเลือดดำ หรือให้ยาปฏิชีวนะชนิด ceftriaxone 2 g. ทุกๆ 12 ชั่วโมง ซึ่งหากให้การรักษาต่อเนื่องอย่างน้อย 10 วัน จะให้ผลการรักษาที่ดี (Halaby, et al., 2000; Mazokopakis, et al., 2005) สำหรับผู้ป่วยที่อาการรุนแรง จะให้ยาปฏิชีวนะชนิด ceftriaxone 2 g. ทุกๆ 6 ชั่วโมง หรือ ceftriaxone 2 g. ทุกชั่วโมง ซึ่งก็ไม่ได้ผลเสมอไป (Francois, et al., 1998; Watkins, et al., 2001) ซึ่งอาจต้องให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะหลายๆ ชนิดร่วมกัน สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงร่วมกับเกิดภาวะ septic shock syndrome การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะจะให้ผลการรักษาที่ไม่ดี ซึ่งอาจต้องมีการรักษาด้วยวิธีการอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น รักษาระดับปริมาณน้ำตาล Glucose ในเลือดให้อยู่ที่ระดับ 4–6 mmol/L รักษาอาการติดเชื้อของระบบทางเดินอาหาร พยายามไม่ให้เกิดการติดเชื้อในระบบอื่นๆ และอาจต้องให้ immunoglobulin ทางหลอดเลือดดำ เพื่อรักษาภาวะช็อก (Annane, Bellissant and Cavaillon, 2005) ซึ่งภาวะ Septic shock syndrome จะนำไปสู่ความเสียหายของหลายๆ อวัยวะ เช่น ตับ ไต และระบบหมุนเวียนโลหิต เป็นต้น โดยผู้ป่วยที่เกิดภาวะ Septic shock syndrome จะมีอัตราการเสียชีวิตสูงมาก ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้จะได้รับการรักษาที่เพียงพอก็ตาม

นอกจากนี้ การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. suis* ที่มีรายงานในประเทศไทยยังสามารถดำเนินการรักษาได้อีกแนวทาง คือ การรักษาเฉพาะโรค (specific treatment) และการดูแลรักษาแบบทั่วไป (general care) ดังนี้

10.1 การรักษาเฉพาะโรค (Specific treatment)

สำหรับการรักษาเฉพาะ นั้น ขึ้นกับตำแหน่งของโรค ดังนี้

10.1.1 เยื่อหุ้มสมองอักเสบ

ยาปฏิชีวนะเป็นตัวเลือกอันดับแรก (Antibiotic of first choice) คือ เพนนิซิลิน จี โซเดียม (PGS) ในขนาด 12-16 ล้านยูนิตต่อวัน ซึ่งการให้สเตียรอยด์สำหรับการป้องกันหรือการรักษาภาวะแทรกซ้อนจากเยื่อหุ้มสมองอักเสบจาก *S. suis* ไม่มีข้อมูลทางคลินิก ว่าจะได้ประโยชน์ หรือเกิดผลเสียมากกว่า แต่ในกรณีที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ด้วยอาการและอาการแสดงของเยื่อหุ้มสมองอักเสบแบบเฉียบพลัน และผลการย้อมสีแกรมของน้ำไขสันหลัง

ซึ่งอาจพบหรือไม่พบแกรมบวกทรงกลม แต่สงสัยการติดเชื้อ *S. pneumoniae* ซึ่งให้อัตราตายสูงกว่าจาก *S. suis* ซึ่งผู้เชี่ยวชาญแนะนำให้ใช้สเตียรอยด์ในกรณีที่อยู่ในพื้นที่ที่มี *S. pneumoniae* ดื้อยาปฏิชีวนะประเภท เพนนิซิลิน และเซฟลาสปอร์ลิน ในอัตราต่ำ ในกรณีเช่นนี้จะมีผลต่อการรักษาเยื่อหุ้มสมองอักเสบเฉียบพลันจาก *S. suis* หรือไม่ ยังไม่สามารถสรุปได้ในขณะนี้ แต่เชื่อว่าจากข้อมูลทางเภสัชวิทยาไม่น่ามีผลลดระดับเพนนิซิลิน หรือ third-generation cephalosporin ในน้ำไขสันหลังจนทำให้การรักษาไม่ได้ผล เนื่องจากค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อเพนนิซิลิน และเซฟลาสปอร์ลินของ *S. suis* อยู่ในระดับต่ำมาก จึงไม่น่ามีปัญหาทางคลินิก สำหรับภาวะแทรกซ้อนโดยเฉพาะหูไม่ได้ยิน บทบาทของสเตียรอยด์ไม่สามารถสรุปได้ว่าสามารถป้องกันหรือรักษาภาวะแทรกซ้อนนี้ได้หรือไม่

10.1.2 การติดเชื้อของผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อนและภาวะ sepsis

เช่นเดียวกันกับการรักษาเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ยาปฏิชีวนะที่เป็นตัวเลือกอันดับแรก ได้แก่ เพนนิซิ-ลิน จี โซเดียม แต่ต้องรวมกับการมี debridement ถ้ามีข้อบ่งชี้ เหมือนกรณีการติดเชื้อของเนื้อเยื่ออ่อนจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ซึ่งมีความสำคัญมากโดยเฉพาะใน necrotizing fasciitis การให้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มเพนนิซิลิน (penicillins) ร่วมกับคลินดาไมซิน (clindamycin) ยังไม่มีข้อมูลทางคลินิกว่าจะได้ผลเสริมฤทธิ์กันหรือไม่ เหมือนกรณีเป็นการติดเชื้อจาก group A *Streptococcus*

10.1.3 การติดเชื้อของลิ้นหัวใจ

มีรายงานการติดเชื้อของลิ้นหัวใจจาก *S. suis* หลายรายงานในประเทศไทย ยังไม่สามารถให้ข้อสรุปได้ว่าการให้ เพนนิซิลิน จี โซเดียม (PGS) เดี่ยวๆ หรืออาจให้ร่วมกับอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) จะดีกว่ากัน จึงควรยึดหลักการรักษาลิ้นหัวใจติดเชื้อจาก viridians streptococci โดยให้ดูค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของเชื้อเป็นหลักจะให้ยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดร่วมกัน โดยให้ PGS ในขนาด 18-30 ล้านยูนิตต่อวัน ร่วมกับเจนตาไมซิน (gentamicin) ในขนาด 1-1.5 mg/kg ทุก 8 ชั่วโมงในกรณีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 µg/ml. และระยะเวลาก็ควรเป็น 4-6 สัปดาห์ ในขณะที่ถ้าค่า MIC ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 0.1 µg/ml ให้ PGS เดี่ยวๆ ในขนาด 12-18 ล้านยูนิต ต่อวันนาน 2 สัปดาห์ ถ้ากรณีค่า MIC เท่ากับ 0.25 µg/ml ให้ PGS 18 ล้านยูนิตต่อวัน ร่วมกับ เจนตาไมซิน (gentamicin) ในขนาด 1-1.5 mg/kg ทุก 8 ชั่วโมง โดยให้ PGS นาน 4 สัปดาห์ และให้เจนตาไมซิน (gentamicin) นาน 2 สัปดาห์

10.2 การดูแลรักษาผู้ป่วยโดยทั่วไป (General care)

เป็นการดูแลรักษาผู้ป่วยตามอาการเพื่อให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น ประกอบด้วย การรักษาแบบประคับประคอง เช่น มีไข้ ให้ยาพาราเซตตามอลลดไข้ โดยหลีกเลี่ยงการใช้แอสไพริน โดยเฉพาะในเด็ก การให้อาหารและน้ำ กรณีที่ผู้ป่วยไม่สามารถรับประทานอาหารได้ หรือมีอาการคลื่นไส้อาเจียนมาก นอกจากนี้ ควรเฝ้าติดตาม Vital signs อย่างใกล้ชิด

11. การป้องกัน

โรคติดเชื้อ *S. suis* มักไม่ค่อยเป็นปัญหาในหมูที่มีการจัดการสุขาภิบาล สุขลักษณะทั้งอาหารและความสะอาดของคอกที่ดี เชื้อโรคนี้มักพบในหมูที่อยู่กันแออัด หรืออยู่ในคอกที่ไม่ถูกสุขลักษณะ โดยเฉพาะหมูวัยรุ่น ซึ่งจะพบเชื้อในระบบทางเดินหายใจ แต่ไม่แสดงอาการ โดยที่หมูบางตัวก็ตรวจไม่พบว่ามีเชื้อนี้ หมูเหล่านี้จึงมักเป็นพาหะนำโรคมาสู่คนได้ ทั้งจากการสัมผัส การรับประทานเนื้อ เลือด อวัยวะภายในของสัตว์ที่เป็นโรค หรือปนเปื้อนจากกระบวนการฆ่าสัตว์ ขนส่งสัตว์ ตลอดจนถึงการจำหน่ายในตลาด ดังนั้น การควบคุมโรคจึงจะต้องมุ่งเน้นทั้งการควบคุมป้องกันโรคในสัตว์ และในคน เพื่อตัดวงจรการเกิดโรค

การติดต่อโรคในคนส่วนใหญ่จะเกิดจากการบริโภคเนื้อหมู เลือด อวัยวะภายในจากการปรุงไม่สุกเท่าที่ควรหรือบริโภคต่างๆ ดังนั้นการป้องกันควบคุมต้องเริ่มต้นจากกลุ่มเสี่ยง คือ กลุ่มผู้เลี้ยงหมู กลุ่มผู้ทำงานในโรงงานฆ่าสัตว์ กลุ่มผู้จำหน่ายเนื้อหมู และผู้บริโภค

11.1 กลุ่มผู้เลี้ยงสัตว์

เนื่องจากเชื้อโรคติดเชื้อ *S. suis* ส่วนใหญ่พบในหมูและไม่แสดงอาการไม่มีข้อบ่งชี้ หรืออาการในสัตว์ที่บ่งบอกว่าสัตว์มีเชื้อนี้ ผู้เลี้ยงสัตว์ควรป้องกันและระวังตนเองในการเลี้ยง หรือจับหมู จึงมีความเสี่ยงจากการติดเชื้อจากหมูที่เป็นพาหะได้ ควรป้องกันดังนี้

11.1.1 การทำความสะอาดคอก ควรใส่รองเท้า และถุงมือทุกครั้งเพื่อป้องกันการสัมผัสกับของเสีย มูล หรือน้ำจากคอกหมู หรือเมื่อต้องเข้าไปทำงานในคอกหมู

11.1.2 หลีกเลี่ยงจากการจับซากหมูที่ตายด้วยมือเปล่า และหมูควรได้รับการวินิจฉัยสาเหตุการตายจากสัตวแพทย์ประจำฟาร์ม

11.1.3 การทำลายซาก ควรฝังให้ลึกประมาณ 2 เมตร และโรยปูนขาวทั้งก้นหลุมและบนตัวสัตว์ก่อนทำการกลบดิน

11.1.4 ไม่ควรนำซากหมูที่ตายออกนอกบริเวณฟาร์มเพื่อจำหน่ายหรือบริโภคล้างมือทุกครั้งเมื่อสัมผัสกับหมู หรือทำความสะอาดคอกสัตว์

11.2 กลุ่มผู้ทำงานในโรงงานฆ่าสัตว์

ผู้ทำงานโรงงานฆ่าสัตว์จะเป็นผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับซาก หมู ถ้าหมูมีเชื้อโรคนี้อยู่ หากไม่ตระหนัก หรือมีการป้องกันที่ดี อาจจะทำให้มีโอกาสติดเชื้อสูง ดั้งนั้นกลุ่มผู้ทำงานโรงงานฆ่าสัตว์จึงจำเป็นจะต้องมีการป้องกันอย่างดี โดย

11.2.1 ใส่รองเท้าบู๊ต และถุงมือเพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหมูโดยตรงขณะทำงาน

11.2.2 ใส่เสื้อกางเกงปกปิดมิดชิด เพื่อป้องกันการกระเด็นจากของเสียจากซากหมูที่ชำแหละกระเด็นเข้าสู่ปาก หรือเยื่อเมือกและผิวหนัง

11.2.3 ล้างทำความสะอาดมือ เท้า และส่วนไม่มีการปกปิดบ่อยๆ และไม่ควรหยิบหรือจับต้องอาหารเข้าปากขณะปฏิบัติงาน

11.2.4 ไม่ควรเหยียบย่ำบนซากหมู

11.3 กลุ่มผู้จำหน่ายเนื้อสัตว์

ผู้จำหน่ายเนื้อหมูนับว่าเป็นจุดแรกที่มีความสำคัญต่อผู้บริโภค ดังนั้นจึงต้องป้องกันการนำเชื้อโรคนี้สู่ผู้บริโภค

11.3.1 เนื้อหมูที่นำมาจำหน่ายควรมาจากโรงฆ่าสัตว์ที่ได้มาตรฐาน มีการตรวจรับรองจากพนักงานตรวจเนื้อโดยปกติแล้วเนื้อหมูที่ผ่านจากโรงงานฆ่าสัตว์จะมีตราประทับรับรองที่ซากสัตว์ทุกซากที่จะนำสู่การจำหน่าย

11.3.2 แผงจำหน่ายควรทำความสะอาด และล้างด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อทุกวันหลังเลิกจำหน่าย

11.3.3 ควรเก็บเนื้อที่จะขายในอุณหภูมิที่มีความเย็นต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส (ตามคำแนะนำของกรมอนามัย) ในระหว่างจำหน่าย และหากเก็บค้างคืนควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส

11.3.4 ควรจำหน่ายเนื้อที่สดทุกวัน หากเหลือค้างคืนควรนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อจำหน่าย

11.3.5 ผู้จำหน่ายเนื้อหมูควรมีสุขภาพแข็งแรง ไม่เป็นโรคติดต่อ และไม่ควรมีบาดแผลที่ฝ่ามือ

11.4 กลุ่มผู้บริโภค

ผู้บริโภคเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความเสี่ยงในการติดต่อจากโรคนี้ ควรจะต้องป้องกันเริ่มตั้งแต่การเลือกซื้อเนื้อจนถึงการปรุงบริโภคทุกขั้นตอนดังนี้

11.4.1 การเลือกซื้อเนื้อหมูเพื่อบริโภคควรเป็นเนื้อหมูที่สด ไม่มีสีแดงคล้ำ หรือมีเลือดคั่งมากๆ หรือเนื้อแดงมีเลือดปนผิดปกติ

11.4.2 ร้านค้าควรมีใบรับรองการนำเนื้อหมูจากโรงงานฆ่าสัตว์ที่มีมาตรฐาน ไม่เป็นเนื้อหมูที่ตายเอง และนำมาชำแหละขาย

11.4.3 เลือกซื้อเนื้อที่เก็บอยู่ในความเย็นตลอดเวลา

11.4.4 การปรุงอาหาร ควรนำเนื้อหมูมาปรุงสุกเท่านั้น ไม่ควรบริโภคเนื้อหมู เลือด และอวัยวะภายในที่ดิบๆ หรือปรุงสุกๆ ดิบๆ เช่น ลาบ ลู่ เป็นต้น

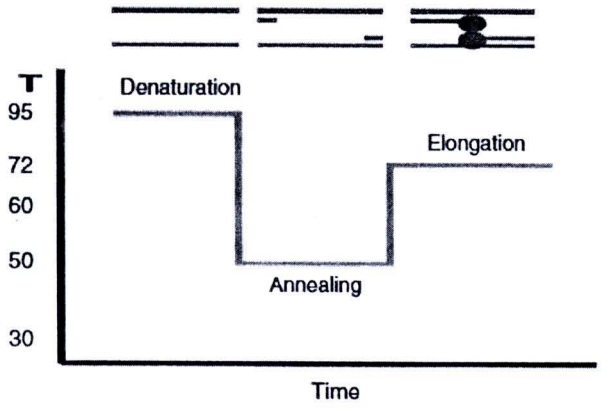
11.4.5 ล้างมือก่อน และหลังสัมผัสเนื้อ หรืออวัยวะของหมูที่จำหน่าย โดยเฉพาะหากมีบาดแผลบริเวณที่สัมผัส

ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคเรียลไทม์ พี ซี อาร์ (Real-time PCR)

1. **ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส** (Polymerase chain reaction; PCR)

ปฏิกิริยา PCR ถูกคิดค้นโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ.1986 เป็นวิธีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่ในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสชนิดทนความร้อน ซึ่งส่วนประกอบสำคัญของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) คือ ดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ซึ่งอาจเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือสายคู่ก็ได้ โอลิโกนิวคลิโอไทด์ Primer (oligonucleotide primers) คือ สายดีเอ็นเอ ที่เป็น single strand จำนวน 2 เส้นซึ่งเป็น nucleotide สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 5' และปลาย 3' เอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส คือ เอ็นไซม์สำหรับใช้ต่อสายดีเอ็นเอ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxy nucleotide triphosphate; dNTPs) ที่ประกอบด้วย nucleotide tri-phosphates ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) ใช้สำหรับต่อเป็นสายดีเอ็นเอ สายใหม่ และโคแฟกเตอร์ของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ ได้แก่ แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) โดยความเข้มข้นของ Mg^{2+} จะมีผลต่อปฏิกิริยาอย่างมาก คือ หากความเข้มข้นเปลี่ยนไปจะทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่มีปริมาณแตกต่างกัน (Kubista, et al., 2006)

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 3 ขั้นตอนวนเป็นวัฏจักร จนกว่าจะได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงพอ ดังแสดงในภาพ 1



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพ 1 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา PCR โดยหนึ่งรอบปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ Denaturation, Annealing และ Elongation หรือ Extension

ปฏิกิริยา PCR มีกระบวนการสำคัญ 3 ขั้นตอนดังนี้

1.1 **ขั้นตอนการทำลายสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ** (Denaturation step)

เป็นการขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงเพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ระหว่างสายดีเอ็นเอ ทำให้ได้ดีเอ็นเอแม่แบบสายเดี่ยวสองสาย โดยอุณหภูมิดังกล่าวประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่ให้ต้องสามารถทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์เนื่องจากดีเอ็นเอสายคู่จะกลับมาจับกันเหมือนเดิมเร็วมากเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง

1.2 **ขั้นตอนการเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอแม่แบบกับโอลิโกนิวคลิโอไทด์** Primer (Annealing step)

เป็นขั้นตอนที่ทำให้ Primer ทั้งสองเส้น ไปเข้าคู่กับดีเอ็นเอ เป้าหมายที่คู่สมกัน (Complementary) โดยลดอุณหภูมิจากขั้นตอนแรกลงมา ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับค่า melting temperature (Tm) ของสายดีเอ็นเอ Primer

1.3 **ขั้นตอนต่อสายยาวของดีเอ็นเอ** (Extension step)

เป็นขั้นตอนที่เอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจาก Primer โดยที่ปลาย 3' ของ Primer มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ ทำให้เอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสามารถต่อสายดีเอ็นเอโดยเลือกใช้ dNTP ชนิดที่มีเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ เข้าเชื่อมกับ Primer ที่ปลาย 3' ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ทำให้ได้พอลินิวคลิโอไทด์สายใหม่ยาวขึ้น และมีเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ โดยเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้มักเป็น Taq DNA polymerase ซึ่งได้จากแบคทีเรียที่ทนความร้อนชื่อ Thermus aquaticus เอ็นไซม์นี้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส และทนความร้อนได้มากกว่า 90 องศาเซลเซียส แต่สำหรับเทคนิค

Real-time PCR นั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับต่อสายยาวของ Taqman probes คือที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส (Holland, et al., 1991)

กระบวนการ PCR จะดำเนินไปเป็นรอบ ๆ เป็นวัฏจักร Denaturation-Annealing-Extension โดยแต่ละรอบจะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว แบบทวีคูณ (Exponential) ปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้เมื่อสิ้นสุดรอบสุดท้ายของปฏิกิริยาสามารถคำนวณได้จากสูตร 2^n เมื่อ n คือจำนวนรอบของปฏิกิริยา เช่น ถ้าจำนวนเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจำนวน 20 รอบจะได้ดีเอ็นเอทั้งหมด เท่ากับ 2^{20} หรือ 1,048,576 คู่ แต่ทางปฏิบัติพบว่า การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในรอบท้ายๆ จะไม่เป็นแบบทวีคูณตามทฤษฎี เรียกว่า amplification plateau

ปรากฏการณ์ Amplification plateau มีสาเหตุจากการที่ปฏิกิริยา PCR ดำเนินไปถึงระยะหนึ่ง ปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีจำนวนมากขึ้น จนมากกว่าประมาณ Primer ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยา ดังนั้นสายดีเอ็นเอต้นแบบที่มีมากขึ้นจะจับคู่กันเองมากกว่าจับกับ Primer ในขณะเดียวกันปริมาณของ dNTP และ Primer อาจถูกใช้หมดในปฏิกิริยา และเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ก็จะเสื่อมไปตามเวลา ซึ่งเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส มีครึ่งชีวิต ประมาณ 40 นาที ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จึงทำให้เกิด plateau effect ขึ้น คือ product ที่ไม่จำเพาะจาก mispriming จะมาแข่งขันในปฏิกิริยา และเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งวิธีป้องกันคือการปรับจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม

2. **ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณ (Real-time Polymerase Chain Reaction; Real-time PCR)**

เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นมาจากเทคนิค PCR ซึ่งจะแตกต่างที่วิธี Real-time PCR สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ เป้าหมายได้ในทุกช่วงเวลาของปฏิกิริยา โดยจะทำการวัดประมาณสาร Fluorescence (Fluorescent reporter) ซึ่งสัญญาณนี้จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณผลิตผลของ PCR ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ แต่ในขณะที่วิธี PCR แบบดั้งเดิมจะวัดปริมาณผลผลิต PCR ที่เพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดกระบวนการ PCR ขั้นสุดท้ายด้วยการตรวจสอบจากการใช้กระแสไฟฟ้าผ่านเจล (Agarose gel electrophoresis) และย้อมด้วยสี Ethidium bromide ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะใช้เวลานาน และผลที่ได้จะขึ้นอยู่กับการแยกขนาดโดยเจล ซึ่งอาจมีความแม่นยำไม่พอ และมีความไวต่ำกว่าวิธี Real-time PCR ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายของเทคนิค Real-time PCR สามารถแบ่งตามหลักการตรวจวัดได้ดังนี้

2.1 SYBR Green

เป็นสารเรืองแสงที่สามารถตรวจจับกับช่องระหว่างคู่สายดีเอ็นเอ (Minor groove) (Nielsen, 1991) โดยในช่วงการ denature ของปฏิกิริยา PCR เพื่อคลายสายดีเอ็นเอจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวนั้น SYBR Green จะยังไม่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอได้ แต่เมื่อเข้าสู่กระบวนการ annealing และ extension สี SYBR Green จะแทรกตัวเข้าไปจับกับสายคู่ดีเอ็นเอ และเปล่งแสงในช่วงคลื่นประมาณ 530 นาโนเมตร เมื่อรอบของ PCR กลับเข้าสู่ช่วง denature อีกครั้ง SYBR Green ก็จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ ทำให้การเรืองแสงลดลง ในกรณีที่มีดีเอ็นเอหลายชนิดปนกันอยู่ในตัวอย่าง สามารถแยกสัญญาณของ Fluorescence ได้จากการเปรียบเทียบ Tm เพราะ Tm เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสาย ซึ่งแปรผันตรงกับเปอร์เซ็นต์ของเบส G และ C ที่อยู่ในสายดีเอ็นเอ (% GC content)

2.2 Hydrolysis หรือ TaqMan probe

เป็น oligonucleotide probe ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ มีลักษณะเป็น dual-labeled probe คือ ปลาย 5' ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่มีพลังงานสูง เรียกว่า Reporter dye หรือ Reporter fluorophore และที่ปลาย 3' จะติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่มีพลังงานต่ำ เรียกว่า Quencher dye หรือ Quencher fluorophore โดยขณะที่ Probe อยู่ในสภาพสมบูรณ์ และถูกกระตุ้นด้วยแสง Reporter และ Quencher fluorophore จะอยู่ใกล้กัน ทำให้การปล่อยแสง Fluorescence ของ Reporter dye จะถูกดูดกลืนด้วย quencher dye แต่เมื่อมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายในขั้นตอน Extension เอ็นไซม์ Taq Polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติ 5'-exonucleases activity จะย่อยสลาย Probe ทำให้เกิดการแยกตัวของ Reporter และ Quencher fluorophore ออกห่างจากกันทำให้การปล่อยแสง Fluorescence ของ reporter เพิ่มขึ้น และผลของ Quencher ลดลง ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR ปริมาณแสง Fluorescence จะเพิ่มขึ้นเพราะมีจำนวน Reporter fluorophore ที่อิสระสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ

2.3 Hybridization probes

Probe ชนิดนี้จะมีลักษณะเป็น oligonucleotide probe 2 เส้น โดยเส้นแรกที่ปลายด้าน 3' จะติดไว้ด้วย donor fluorophore และเส้นที่สองจะมี acceptor fluorophore ติดอยู่ที่ปลาย 5' และทั้งสองเส้นเมื่อจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในขั้นตอน annealing จะอยู่ใกล้กันซึ่งห่างกันประมาณ 1-5 nucleotide โดยแสงที่เปล่งออกมาจาก donor fluorophore จะไปกระตุ้น acceptor fluorophore ทำให้เกิดสัญญาณ Fluorescence (FRET; Fluorescent Resonance Energy Transfer) ที่สามารถวัดได้ในช่วง annealing phase และช่วงแรกของ extension phase ของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบ

2.4 Molecular Beacons

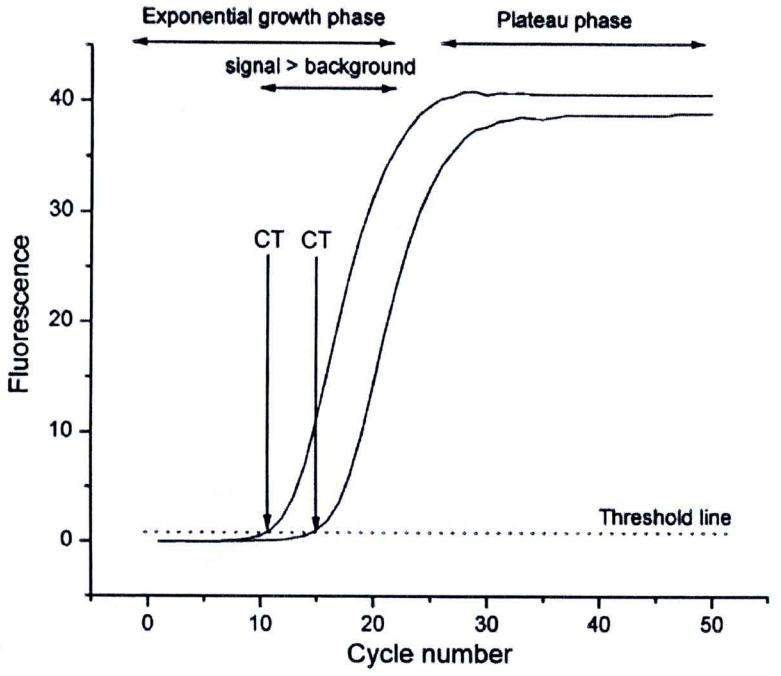
เป็น oligonucleotide probes ปลายด้านหนึ่งของ probe ติดด้วยสารเรืองแสง reporter dye อีกด้านหนึ่งติดด้วย quencher dye และบริเวณปลายของ probe มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกัน ทำให้ probe มีลักษณะเป็นรูปบ่วง (Loop) และทำให้สารเรืองแสงอยู่ใกล้กัน quencher dye ซึ่งเป็นตัวกดสารเรืองแสงไม่ให้ปล่อยแสง Fluorescence ออกมาก บริเวณบ่วงของ Probe มีลำดับเบสจำเพาะกับลำดับเบสของดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอเป้าหมาย เมื่อมีการจับกันระหว่าง probe และดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอเป้าหมาย จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Probe ซึ่งจะแยก quencher ออกจากสารเรืองแสง ทำให้สารเรืองแสงสามารถปล่อยแสง Fluorescence ออกมาได้

2.5 Scorpions

เป็น Probe ที่มีรูปร่างเป็นรูปตัวยู (hairpin loop) ซึ่งเกิดจากลำดับเบสบริเวณปลายทั้งสองข้างที่เป็นคู่สมกันจับอย่างจำเพาะ probe มีสารเรืองแสงซึ่งเป็นตัวให้สัญญาณแสง Fluorescence ติดอยู่ที่ปลายด้าน 5' และมี quencher ทางด้านปลาย 3' โดยการปล่อยแสง Fluorescence ของสารเรืองแสงจะถูกกดโดย quencher เมื่อ probe อยู่ในรูปตัวยู probe นี้จะถูกเชื่อมต่อที่ปลายด้าน 5' ของ Primer ในขบวนการเพิ่มจำนวน PCR product จะมีการต่อเบสที่ปลายของ primer เพื่อให้ได้ PCR product ที่สมบูรณ์ โดย probe ที่ติดอยู่ที่ปลายด้าน 5' ของ primer จะมีลำดับเบสจำเพาะที่สามารถจับกับลำดับเสที่เป็นคู่สมภายในดีเอ็นเอสายเดียวกัน การจับนี้เป็นสาเหตุทำให้ hairpin loop ถูกเปิดออก ทำให้สารเรืองแสงสามารถให้สัญญาณได้

3. **การติดตามผลการตรวจของเทคนิค** Real-time PCR

เทคนิค Real-time PCR ต้องอาศัยสาร Fluorescence ที่ติดกับชิ้นส่วน PCR product ที่เกิดขึ้น เพื่อติดตามดูปริมาณของสัญญาณ Fluorescence ที่เกิดเพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR ดังนั้นในปฏิกิริยาต้องมีประมาณของ Probe และสาร Fluorescence ที่เหมาะสม โดยปริมาณสัญญาณสาร Fluorescence ที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งในรอบแรกๆ ของปฏิกิริยา PCR สัญญาณ Fluorescence จะน้อยกว่า background จึงไม่สามารถตรวจจับสัญญาณได้ จากนั้นปริมาณสัญญาณก็จะเพิ่มขึ้น และมากเป็นทวีคูณในระยะ Exponential growth phase ของปฏิกิริยา PCR หลังจากนั้น ระดับสัญญาณก็จะคงที่ เนื่องจากองค์ประกอบของปฏิกิริยา เช่น Primer, Probe, dNTPs หรือ Enzyme DNA polymerase ถูกใช้หมดไป ไม่เพียงพอต่อการผลิต PCR product (Kubista, Stahlberg and Bar, 2001) ไม่มีการเพิ่มแบบทวีคูณต่อไป ซึ่งจะเรียกระยะนี้ว่า Plateau phase แสดงดังภาพ 2



ภาพ 2 แสดงกราฟการเกิดสัญญาณ Fluorescence **ของปฏิกิริยา** Real-time PCR

สำหรับการตรวจสอบผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่อง real-time PCR เริ่มด้วยการกำหนดค่า Baseline และ Threshold ตรวจสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพ และดูลักษณะกราฟของการเพิ่มปริมาณ PCR product ที่เกิดขึ้น ว่าเป็นอย่างไร ต่อจากนั้นก็ตรวจสอบตัวอย่างวิเคราะห์ โดยดูที่ค่า threshold cycle หรือเรียกว่าค่า Ct ซึ่งหมายถึง จำนวนรอบที่ปฏิกิริยา PCR ให้สัญญาณ Fluorescence สูงกว่า threshold โดยการกำหนดค่า Threshold และ Baseline นั้นจะขึ้นอยู่กับโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ผลของแต่ละเครื่องโดยอาจเลือกให้วิเคราะห์แบบอัตโนมัติหรือแบบทำเองก็ได้ ค่า Ct ที่ได้นี้จะเป็นค่าตัวเลขจำนวนรอบ ซึ่งหากพบสัญญาณก็แสดงว่ามีการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ตรวจวิเคราะห์ในปฏิกิริยา PCR โดยค่า Ct ที่ได้จะแปรผันตามปริมาณตั้งต้นของ DNA ที่วิเคราะห์ คือ หากปริมาณ DNA มาก สัญญาณ Fluorescence ที่เกิดขึ้นก็จะเพิ่มสูงกว่า threshold เร็วทำให้ได้ค่า Ct ที่น้อย แต่หากมีประมาณ DNA น้อย สัญญาณ Fluorescence ที่เกิดขึ้นก็จะเพิ่มสูงกว่า threshold ช้าทำให้ได้ค่า Ct ที่มาก หรือหากไม่มี DNA ที่ตรวจวิเคราะห์ก็จะไม่มีสัญญาณ Fluorescence เกิดขึ้น เป็นต้น

ความรู้เกี่ยวกับหลักการพัฒนาเทคนิค real-time PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลชีพ

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลชีพด้วยเทคนิค real-time PCR นั้น เริ่มด้วยการเลือก Nucleic Acid เป้าหมายที่จำเพาะต่อเชื้อจุลชีพที่ต้องการตรวจ จากนั้นทำการออกแบบ Probe และ Primer สุดท้ายคือการหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. **การเลือก Nucleic Acid เป้าหมาย**

ลำดับเบสของ DNA ที่จะใช้เป็นเป้าหมายในการจับของ Primer ที่จะออกแบบขึ้นมาต้องมีลักษณะจำเพาะต่อตัวเชื้อจุลชีพ หรือกลุ่มของเชื้อจุลชีพที่ต้องการตรวจวินิจฉัย ตัวอย่างเช่น จำเพาะต่อ group A streptococcus หรือ *Mycobacterium* genus หรือจำเพาะต่อ virulence genes เช่น verotoxin genes หรืออาจจำเพาะต่อ genes ที่กลายพันธุ์ หรือ genes ที่ดื้อยา เช่น *mecA* gene หรือการกลายพันธุ์ของ *rpoB* gene ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการดื้อต่อยา rifampin และมากไปกว่านั้น PCR primer ต้อง สามารถใช้ตรวจได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความจำเพาะสูงในการใช้ตรวจจากตัวอย่างที่สนใจตรวจ เช่น เชื้อจุลชีพในตัวอย่างอุจจาระ หรือตัวอย่าง perianal swab สำหรับตรวจหาการดื้อยา vancomycin-resistant enterococci เป็นต้น โดยสามารถค้นหา primer sequence ที่สนใจได้จากฐานข้อมูล DNA database เช่น National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ซึ่งจะสามารถตรวจสอบได้ด้วยว่า primer ที่ออกแบบขึ้นเกิดปฏิกิริยาข้าม cross-reactivity กับเชื้อจุลชีพ หรือลำดับเบสที่สนใจหรือไม่จากฐานข้อมูลดังกล่าว แต่ถึงอย่างไรก็ตามข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลเป็นการรวบรวม nucleic acid sequences ของเชื้อจุลชีพบางส่วนเท่านั้นไม่ได้รวบรวมครบทุกสายพันธุ์ ดังนั้นหากต้องการออกแบบ Primer เพื่อใช้ตรวจเชื้อจุลชีพในตัวอย่างที่มีเชื้อจุลชีพปนกันอยู่หลายชนิด เช่น ตัวอย่างอุจจาระ จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม cross-reactivity กับเชื้อจุลชีพในตัวอย่างจริง ซึ่งลำดับกรดนิวคลิอิกที่ใช้เป็นแม่แบบก็ควรเป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อจุลชีพนั้นๆ หรือสิ่งที่สนใจโดยเฉพาะ

2. **การออกแบบ PCR Primer และ Probe**

การออกแบบ PCR primers เป็นกระบวนการสำคัญลำดับแรกที่จะทำให้การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR ได้ผลการตรวจอย่างจำเพาะ (Specificity) และหาก primers สามารถเพิ่มจำนวนลำดับเบสที่สนใจได้อย่างเดียวก็จะทำให้วิธีการตรวจวิเคราะห์มีความไว (Sensitivity) สูงขึ้นเช่นเดียวกัน โดยสรุป PCR Primer และ probe ที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ ต้องมีความจำเพาะกับ target sequence และไม่สามารถจับกับบริเวณอื่นใน sequence นั้น หรือ sequence อื่น สามารถที่จะจับและทำให้เกิด stable complex กับ target sequence ที่ต้องการในสภาวะที่เหมาะสม

ซึ่งขึ้นกับ salt concentration และอุณหภูมิ ต้องไม่สามารถ anneal กับตนเอง (Hairpin) หรือกับ copy อื่นของตนเอง (Self-dimer) และในกรณีของ PCR primer ต้องไม่สามารถ anneal กับ primer อีกสายได้ (Heterodimer) และนอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ต้องคำนึงด้วย เช่น ความยาวของ Primer ปริมาณและสัดส่วนของ G+T base, melting temperature (Tm) ของ primer ซึ่งจะมีผลต่อ annealing temperature ที่ใช้และขนาดความยาวของ region ที่ต้องการเพิ่มจำนวน เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันคอมพิวเตอร์มีบทบาทอย่างสูงที่จะช่วยอำนวยความสะดวกและลดเวลาในการออกแบบและเลือก Primer และ Probe ที่ต้องการ โดยทั่วไปสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

2.1 ผู้ออกแบบเป็นผู้เลือกด้วยตนเอง โดยอาศัยหลักการดังกล่าว แล้วใช้คอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ เช่น Tm โอกาสที่จะเกิด hairpin หรือ dimer โอกาสที่จะ anneal กับส่วนอื่นๆ ของ target sequence หรือโอกาสที่จะจับกับ sequence อื่นๆ โดยเทียบกับ nucleotide sequence ที่มีอยู่ใน database เช่น GenBank หลังจากนั้นจึงพิจารณาว่าใช้ probe/primer สายนั้นหรือชุดนั้นหรือไม่

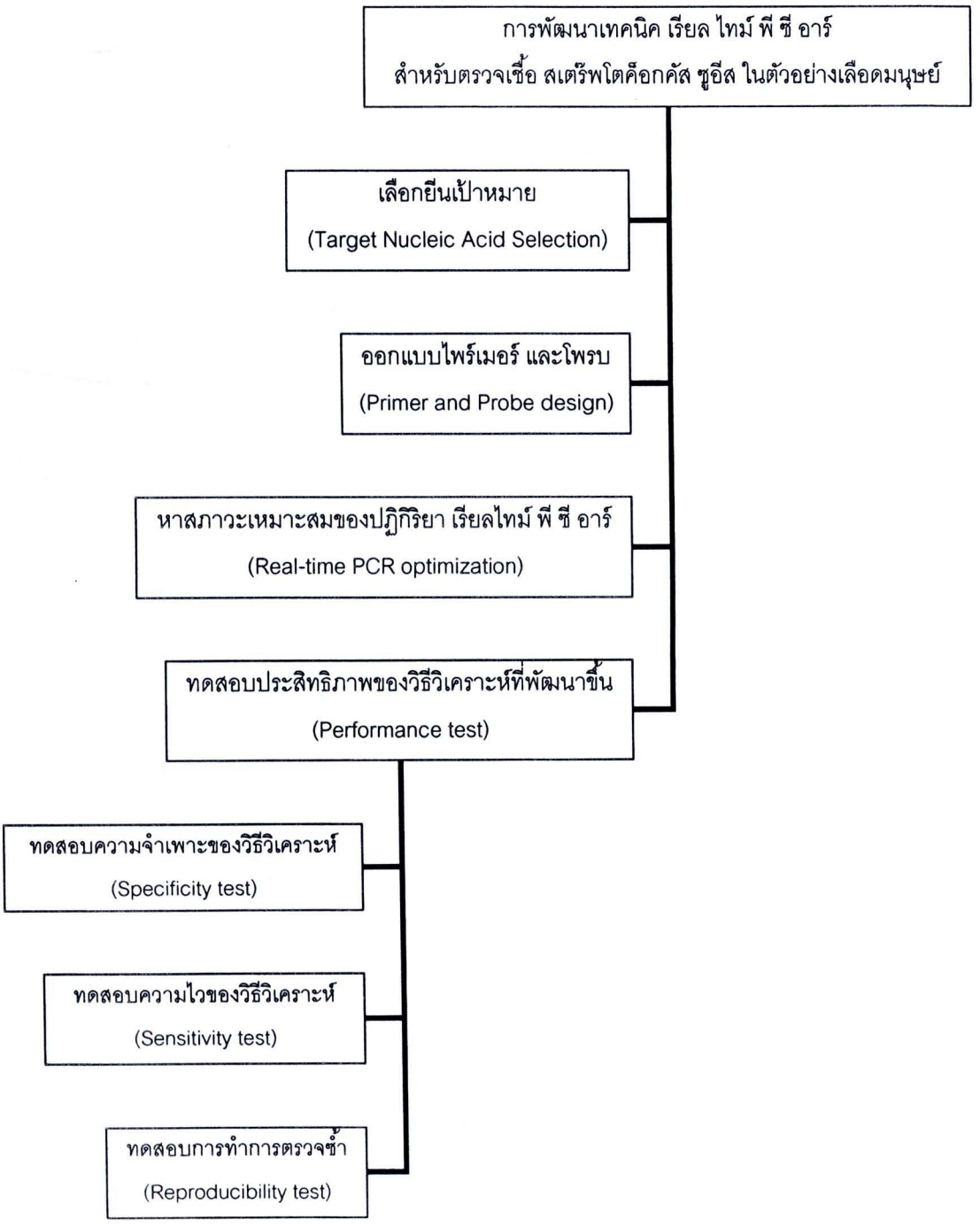
2.2 การใช้ Automatic design program ซึ่งทำหน้าที่เลือกส่วน หรือบริเวณที่จะเป็น primer/probe กำหนดตำแหน่ง primer/probe แล้วจึงดำเนินการต่างๆ เหมือนวิธีข้างต้นโดยอัตโนมัติ ผู้ออกแบบทำหน้าที่ให้ข้อมูลของ sequence และสามารถกำหนดเกณฑ์ (Criteria) ของ primer/probe ที่ดีหรือไม่ดี รวมทั้งยังสามารถกำหนดช่วงของ Tm, ขนาดสาย และขนาดของ product ที่ต้องการด้วย (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และคณะ, 2536, หน้า 47-48)

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR (Assay Optimization)

การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาแบบดั้งเดิมนั้นเป็นสิ่งที่ท้าทายและค่อนข้างยาก เนื่องจากมีหลายขั้นตอน และต้องใช้ระยะเวลาในการทดลองที่นาน กระบวนการทดลองก็ยุ่งยาก เริ่มตั้งแต่การคัดเลือก และออกแบบ primer/probe การหาความเข้มข้นของเอนไซม์ Taq DNA polymerase, magnesium ion และ dNTPs ที่เหมาะสม รวมทั้งองค์ประกอบอื่นๆ ในปฏิกิริยา PCR และที่สำคัญคือการหาสภาวะพอเหมาะของขั้นตอนต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR คือ จำนวนรอบ อุณหภูมิและระยะเวลาของขั้นตอน Denaturation, primer annealing และ primer extension เป็นต้น (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และคณะ, 2536, หน้า 156-162)

สำหรับเทคนิค real-time PCR ที่ส่วนใหญ่ใช้เครื่องอัตโนมัติในการดำเนินการ ทำให้การทดสอบต่างๆ ใช้เวลาที่น้อยกว่า และง่ายกว่า ซึ่งการหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยาบางชนิดอาจใช้เวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง เป็นต้น โดยองค์ประกอบที่สำคัญที่จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมใน real-time PCR นั้นมีน้อยแต่ก็มีผลต่อปฏิกิริยา PCR ค่อนข้างมาก (Boeckh, et al., 2004; Knutsson, et al., 2002; Templeton, et al., 2004) ได้แก่ magnesium concentration ซึ่งมีบทบาท

สำคัญในการทำงานของ polymerase enzyme สำหรับความเข้มข้นของ primer และ probe ก็จะมีผลต่อ sensitivity และ specificity ของวิธีวิเคราะห์ เป็นต้น



ภาพ 3 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย