

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### ประชากร และกลุ่มตัวอย่าง

ในการศึกษาวิจัยเพื่อทำการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Streptococcus suis* (*S. suis*) ในตัวอย่างเลือดครั้งนี้ ใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานในการทดสอบความจำเพาะ และความไวของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น ประกอบด้วยเชื้อ *S. suis* serotype ที่ก่อโรคที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *S. suis* serotype 1, 2 และ 14 จำนวน 16 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรคอื่นๆ อีกจำนวน 21 สายพันธุ์

ตัวอย่างเลือดมนุษย์ที่ใช้สำหรับใส่เชื้อ *S. suis* ปริมาณต่างๆ ลงไป เพื่อทดสอบความไวของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนั้น ได้รับบริจาคจากอาสาสมัครสุขภาพดี 1 ราย ปริมาณ 5 ml. โดยเจาะตัวอย่างเก็บใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA

#### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

##### 1. เครื่องมือหลัก

- 1.1 โปรแกรม Primer Express® Software version 3.0
- 1.2 ฐานข้อมูล Basic Local Alignment Search Tool
- 1.3 ชุดสกัด ดี เอ็น เอ สำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini kit
- 1.4 ชุดน้ำยา 2X TaqMan® Universal Master Mix
- 1.5 เครื่อง real-time PCR ยี่ห้อ ABI รุ่น 7500
- 1.6 โปรแกรม SDS versions 3.1.3

##### 2. เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน ที่ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ความไว (Specificity test) และทดสอบการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility test) ของเทคนิค TaqMan based Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนั้น ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประกอบด้วยเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในประเทศไทยจำนวน 16 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ จำนวน 21 สายพันธุ์ รายละเอียดของเชื้อแบคทีเรียแสดงในตาราง 7



ตาราง 7 รายชื่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ที่ใช้ในการศึกษา

| ลำดับ | รายชื่อเชื้อแบคทีเรีย                   | DMST <sup>1</sup> No. | Other Designation <sup>2,3</sup> |
|-------|-----------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 1     | <i>Acinetobacter baumannii</i>          | 10437                 | -                                |
| 2     | <i>Aeromonas hydrophila</i>             | 21250                 | ATCC 35654                       |
| 3     | <i>Burkholderia pseudomallei</i>        | 25426                 | -                                |
| 4     | <i>Escherichia coli</i>                 | 4212                  | ATCC 25922                       |
| 5     | <i>Haemophilus influenzae</i>           | 7943                  | ATCC 49247                       |
| 6     | <i>Klebsiella pneumoniae</i>            | 7592                  | ATCC 700603                      |
| 7     | <i>Neisseria meningitidis</i>           | 7949                  | ATCC 13077                       |
| 8     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>           | 4739                  | ATCC 27853                       |
| 9     | <i>Salmonella Enteritidis</i>           | 17368                 | -                                |
| 10    | <i>Vibrio cholerae non O1, non O139</i> | 2783                  | -                                |
| 11    | <i>Corynebacterium diphtheriae</i>      | 11935                 | -                                |
| 12    | <i>Enterococcus faecalis</i>            | 4736                  | -                                |
| 13    | <i>Staphylococcus aureus</i>            | 8013                  | -                                |
| 14    | <i>Staphylococcus epidermidis</i>       | 15505                 | -                                |
| 15    | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>       | 15509                 | ATCC 43809                       |
| 16    | <i>Streptococcus agalactiae</i>         | 17129                 | -                                |
| 17    | <i>Streptococcus mitis</i>              | 18776                 | ATCC 49456T                      |
| 18    | <i>Streptococcus mutans</i>             | 18777                 | ATCC 25175T                      |
| 19    | <i>Streptococcus oralis</i>             | 18778                 | ATCC 35037T                      |
| 20    | <i>Streptococcus pneumoniae</i>         | 7945                  | ATCC 49619                       |
| 21    | <i>Streptococcus pyogenes</i>           | 17020                 | -                                |
| 22    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 1    | 26745                 | -                                |
| 23    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2    | 18783                 | CCUG 7984                        |
| 24    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2    | 21386                 | -                                |
| 25    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2    | 21508                 | -                                |
| 26    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2    | 22714                 | -                                |

## ตาราง 7 (ต่อ)

| ลำดับ | รายชื่อเชื้อแบคทีเรีย                 | DMST <sup>1</sup> No. | Other Designation <sup>2,3</sup> |
|-------|---------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 27    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2  | 23161                 | -                                |
| 28    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2  | 24002                 | -                                |
| 29    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2  | 24004                 | -                                |
| 30    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2  | 24005                 | -                                |
| 31    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2  | 24009                 | -                                |
| 32    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 2  | 27567                 | -                                |
| 33    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 | 21928                 | -                                |
| 34    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 | 26012                 | -                                |
| 35    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 | 26753                 | -                                |
| 36    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 | 27071                 | -                                |
| 37    | <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 | 27578                 | -                                |

หมายเหตุ: <sup>1</sup>DMST: Culture Collection for Medical Microorganism Department of Medical Sciences Thailand.

<sup>2</sup>ATCC: American Type Culture Collection

<sup>3</sup>CCUG: Culture Collection, University of Göteborg

### วิธีการ และการเก็บรวบรวมข้อมูล

การศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเทคนิค real-time PCR สำหรับใช้ตรวจเชื้อ *S. suis* ในตัวอย่างเลือดมนุษย์ครั้งนี้ ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ การเลือกยีนเป้าหมาย การออกแบบ Primer และ Probe (Primer and Probe design) และผลิตชุดน้ำยา การหาสภาวะเหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR (Real-time PCR optimization) และการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น (Performance test) โดยมีรายละเอียดวิธีการ และการเก็บรวบรวมข้อมูลดังนี้

### 1. การเลือกยีนเป้าหมาย (Target Nucleic Acid Selection)

ในการพัฒนาเทคนิค real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *S. suis* ครั้งนี้ได้เลือกยีน NAD(P)H-dependent glutamate dehydrogenase (*gdh*) เป็นยีนเป้าหมายในการออกแบบ Primer และ Probe ซึ่งยีนนี้ที่มีความสำคัญในการดำรงชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย คือ กระบวนการ nitrogen metabolism นอกจากนี้ยังเป็นยีนอนุรักษ์ และมีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. suis* สูงมาก รวมทั้งมีอัตราการกลายพันธุ์ที่ต่ำ และก่อนหน้านี้ได้มีผู้ศึกษาวิจัยอื่นใช้ยีนนี้ในการออกแบบ Primer ในการตรวจหาเชื้อ *S. suis* ด้วยเช่นกัน

### 2. การออกแบบไพรเมอร์ และโพรบ (Primer and Probe design) และผลิตชุดน้ำยา

Primer และ Probe ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจหาเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค Real-time PCR นั้น ได้ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน NAD(P)H-dependent glutamate dehydrogenase (*gdh*) ของเชื้อ *S. suis* ทุกสายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information advances science (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ซึ่งในการศึกษาวิจัยนี้ได้เลือกลำดับเบสของ *S. suis* strain PY-2 (GenBank Accession No. GU253285.1) เป็นต้นแบบในการออกแบบ Primer และ TaqMan Probe จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสของ *S. suis* ที่ได้ไปออกแบบด้วยโปรแกรม Primer Express® Software version 3.0 เมื่อได้ชุด Primer และ TaqMan Probe ที่ต้องการแล้ว นำไปทดสอบความจำเพาะบนฐานข้อมูล Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ก่อนนำชุด Primer และ Probe ที่ออกแบบได้ไปสังเคราะห์เป็นชุดน้ำยา ได้เป็นชุดน้ำยา Primer และ Probe Mix สำหรับตรวจหาเชื้อ *S. suis* ชื่อ 20X Custom TaqMan® Assays

### 3. การหาสภาวะเหมาะสมของปฏิกิริยา เรียลไทม์ พี ซี อาร์ (Real-time PCR optimization)

ชุดน้ำยาสำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค Real-time PCR นั้น ประกอบด้วย ชุด Primer และ Probe ชุดน้ำยาเอ็นไซม์ DNA Polymerase สารเคมี รวมทั้ง บัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยา real-time PCR ขึ้นได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการให้บริษัทผลิตชุด Primer และ Probe Mix ชื่อ 20X Custom TaqMan® Assays ซึ่งมีองค์ประกอบของ Forward Primer, Reverse Primer โดย Primers แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 18  $\mu$ M และ TaqMan Probe มีความเข้มข้น 5  $\mu$ M และใช้ชุดน้ำยาลำเร็จรูปชื่อ 2X TaqMan® Universal Master Mix ที่ประกอบด้วยเอ็นไซม์ AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase UNG, dNTPs ที่มี

dUTP, Passive Reference และ buffer อื่น ๆ ที่ทำให้เหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยา PCR สำหรับการหาสภาวะเหมาะสมของปฏิกิริยานั้นผู้วิจัยได้ให้ทางบริษัทดำเนินการมาพร้อมด้วย

โดยกระบวนการเตรียมน้ำยา PCR Master Mix และการตั้งโปรแกรมบนเครื่อง Real-time PCR รุ่น ABI 7500 Real-Time PCR System ที่เหมาะสมแสดงดังตาราง 8 และตาราง 9 ซึ่งในการเตรียมน้ำยา PCR Master Mix สำหรับตรวจหาเชื้อ *S. suis* จำนวน 1 การทดลอง จะประกอบด้วย น้ำยา 20X Custom TaqMan® Assays ปริมาณ 1 µL น้ำยา 2X TaqMan® Universal Master Mix ปริมาณ 10 µL น้ำปราศจากเชื้อและไม่มีเอ็นไซม์ RNase (Sterile RNase-free water) ปริมาณ 5 µL และสุดท้ายคือ ดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ 4 µL เมื่อรวมส่วนผสมประกอบของ PCR Master Mix จะได้ปริมาณทั้งสิ้น 20 µL จากนั้นนำหลอดตัวอย่าง PCR Master Mix ไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง real-time PCR โดยตั้งโปรแกรม ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นตอนแรกตั้งอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่สองอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ และขั้นตอนที่สามอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที ต่อด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ

ตาราง 8 แสดงองค์ประกอบน้ำยาสารเคมีของปฏิกิริยา Real-time PCR

| น้ำยา                                 | ความเข้มข้น<br>ตั้งต้น | ปริมาณในหนึ่ง<br>ปฏิกิริยา(µL) | ความเข้มข้น<br>สุดท้าย |
|---------------------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Custom TaqMan® Gene Expression Assays | 20X                    | 1                              | 1X                     |
| - Forward Primer                      | 18 µM                  |                                | 900 nM                 |
| - Reverse Primer                      | 18 µM                  |                                | 900 nM                 |
| - Probe                               | 5 µM                   |                                | 250 nM                 |
| TaqMan® Universal Master Mix          | 2X                     | 10                             | 1X                     |
| Sterile RNase-free water              | N/A                    | 5                              | N/A                    |
| DNA Template                          | N/A                    | 4                              | N/A                    |
| ปริมาณรวมของ Real-time PCR Master Mix |                        | 20                             |                        |

ตาราง 9 แสดงการตั้งโปรแกรมกำหนดอุณหภูมิ ระยะเวลา และจำนวนรอบ  
บนเครื่อง Real time PCR รุ่น ABI 7500

| ขั้นตอนที่ | องศาเซลเซียส | เวลา (นาที : วินาที) | รอบ |
|------------|--------------|----------------------|-----|
| 1          | 50           | 02:00                | 1   |
| 2          | 95           | 10:00                | 1   |
| 3          | 95           | 00:15                | 40  |
|            | 60           | 01:00                |     |

#### 4. การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น (Performance test)

##### 4.1 ทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity test)

การทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ เป็นการทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถของ Primer และ Probe ที่ออกแบบขึ้นมาว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของเชื้อ *S. suis* ได้อย่างจำเพาะหรือไม่ เมื่อใช้ Primer และ Probe ที่ออกแบบขึ้นมาทดสอบกับเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์มาตรฐานที่ก่อโรคติดเชื้อ *S. suis* และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานกลุ่มอื่น ซึ่งบางสายพันธุ์อาจเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่แสดงอาการคล้ายกับการติดเชื้อ *S. suis* โดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่นำมาทดสอบนี้ได้แสดงดังตาราง 7

โดยกระบวนการทดสอบความจำเพาะ ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ การเตรียม 0.5 McFarland Standard การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน การสกัด DNA จากตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค Real-time PCR และการวิเคราะห์ผลการทดสอบ ซึ่งมีรายละเอียดของกระบวนการทดสอบความจำเพาะ ดังนี้

##### 4.1.1 เตรียม 0.5 McFarland Standard

เริ่มต้นดำเนินการด้วยการเตรียม 1% Barium chloride ปริมาณ 100 ml. โดยชั่ง Barium chloride 1 g. แล้วเติม DW ให้ครบ 100 ml. จากนั้นเตรียม 1% Sulfuric acid ปริมาณ 100 ml. โดยการดูด 95% Sulfuric acid ปริมาณ 1.025 ml. เติมนลงใน DW ปริมาณ 98.975 ml. สุดท้ายเตรียม 0.5 McFarland Standard ปริมาณ 20 ml. โดยการเติม 1% Barium chloride ปริมาณ 0.1 ml. กับ 1% Sulfuric acid ปริมาณ 19.9 ml. ก็จะได้ 0.5 McFarland Standard พร้อมใช้งาน

#### 4.1.2 เตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

Subculture เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 37 สายพันธุ์ จาก Deep tube stock agar ลง Blood agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการ Subculture เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานจาก Blood agar ลงใน Tryptic soy broth (TSB) จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard ซึ่งเทียบได้กับปริมาณเชื้อจำนวนประมาณ  $1 \times 10^8$  cfu/ml เก็บรักษาน้ำเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ทำการปรับความขุ่น แล้วไว้ใน collection tube ขนาด 2 ml ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัด ดีเอ็นเอต่อไป

4.1.3 สกัด DNA จากตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ทำการปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard แล้ว ด้วยชุดสกัด ดีเอ็นเอ สำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini kit

ขั้นตอนก่อนการสกัด ดีเอ็นเอ เริ่มต้นด้วย การนำตัวอย่างออกมาปรับอุณหภูมิให้เท่ากับอุณหภูมิห้อง เปิด Heat Block ไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นำ Buffer AE หรือ distilled water ออกมาปรับอุณหภูมิให้เท่ากับอุณหภูมิห้อง และต้องมั่นใจว่าน้ำยา AW1 และ AW2 ได้เตรียมตามวิธีที่ถูกต้อง หากน้ำยา Buffer ATL หรือ Buffer AL ตกตะกอน ให้นำไปละลายที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส

เมื่อเตรียมน้ำยาและอุปกรณ์พร้อมสำหรับการสกัด DNA แล้ว ให้เตรียม Microcentrifuge tube sterile ขนาด 1.5 ml. สำหรับใช้เตรียมตัวอย่าง และเก็บตัวอย่าง DNA ที่จะสกัดได้เท่ากับจำนวนตัวอย่างที่นำมาสกัด จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเหลวปริมาณ 1 ml. ลงใน 1.5 ml. microcentrifuge จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วย Microcentrifuge ที่ความเร็ว  $5000 \times g$  (7500 rpm) นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนน้ำทิ้งไป เติมสารละลายเอ็นไซม์ 20 mg/ml Lysozyme ปริมาณ 180  $\mu$ l Incubate ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม Proteinase K ปริมาณ 20  $\mu$ l และ Buffer AL ปริมาณ 200  $\mu$ l ผสมด้วยการ Vortex แล้วนำไป Incubate ไว้ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วย microcentrifuge จากนั้นเติม Ethanol (96-100%) ปริมาณ 200  $\mu$ l ผสมด้วยวิธี pulse-vortexing นาน 15 วินาที จากนั้นปั่นเพื่อไม่ให้หยดน้ำติดบนฝาหลอด ดูดส่วนผสมที่ได้ลงใน QIAamp Mini spin column ปิดฝา จากนั้นปั่นที่  $6000 \times g$  (8000 rpm) นาน 1 นาที ย้าย QIAamp Mini spin column ลงใน Collection tube ขนาด 2 ml. อันใหม่ และทิ้ง collection tube อันเก่า ปิดฝา QIAamp Mini spin column ด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Buffer AW1 ปริมาณ 500  $\mu$ l ปิดฝา และนำไปปั่นที่

6000 x g (8000 rpm) นาน 1 นาที จากนั้น ย้าย QIAamp Mini spin column ลงใน Collection tube ขนาด 2 ml. อันใหม่ และทิ้ง collection tube อันเก่า เปิดฝา QIAamp Mini spin column ด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Buffer AW2 ปริมาณ 500  $\mu$ l ปิดฝา และนำไปปั่นที่ 20,000 x g (14,000 rpm) นาน 3 นาที ย้าย QIAamp Mini spin column ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. และทิ้ง collection tube อันเก่า เปิดฝา QIAamp Mini spin column ด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Buffer AE หรือ Distilled Water ปริมาณ 200  $\mu$ l ปิดฝา Incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 6000 x g (8000 rpm) นาน 1 นาที เก็บรักษา DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

#### 4.1.4 ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

เมื่อทำการสกัด DNA จากตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเสร็จเรียบร้อยแล้ว ให้นำตัวอย่าง DNA ดังกล่าวออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดำเนินการเตรียมน้ำยา PCR Master Mix โดยรายละเอียดแสดงดังตาราง 8 จากนั้นนำหลอดตัวอย่าง PCR Master Mix ไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง real-time PCR โดยการตั้งโปรแกรม SDS ของเครื่อง real-time PCR แสดงดังตาราง 9 หลังจากทำปฏิกิริยา real-time PCR เสร็จสิ้น ดำเนินการวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยโปรแกรม SDS versions 1.3.1 ของเครื่อง real-time PCR เพื่อหาค่า Ct ของแต่ละตัวอย่าง โดยการศึกษาความจำเพาะนี้ผู้วิจัยกำหนดให้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *S. suis* ต้องให้ค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 35 หากค่า Ct มากกว่า 35 ถือว่าให้ผลลบต่อเชื้อ *S. suis* เนื่องจากปฏิกิริยา real-time PCR กำหนดให้ดำเนินการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งสิ้น 40 รอบ ทั้งนี้เพื่อให้เห็นผลการเพิ่มขึ้นของปริมาณแสง Fluorescence อย่างชัดเจนจึงกำหนดค่า cutoff ของค่า Ct ที่ 35

#### 4.1.5 การวิเคราะห์ผลการทดสอบความจำเพาะ

ภายหลังจากการเก็บรวบรวมข้อมูลผลการตรวจตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน ด้วยเทคนิค real-time PCR ให้แยกกลุ่มตัวอย่างเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มเชื้อ *S. suis* จำนวน 16 ตัวอย่าง กับกลุ่มเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ จำนวน 21 ตัวอย่าง จากนั้นคำนวณร้อยละผลการตรวจของแต่ละกลุ่ม

#### 4.2 ทดสอบความไวของวิธีวิเคราะห์ (Sensitivity test)

การทดสอบความไวของวิธีวิเคราะห์ เป็นการทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถของเทคนิค real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้ปริมาณน้อยที่สุดเท่าไร โดยกระบวนการทดสอบประกอบด้วย การเตรียมเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *S. suis* สำหรับใช้ทดสอบ Sensitivity test การเจือจางเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานลงในตัวอย่าง EDTA Blood และ TSB

การตรวจนับจำนวนที่แท้จริงของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่เจือจางลงใน TSB และ EDTA Blood ด้วยวิธี Spread plate technique บน Blood Agar การสกัด DNA จากเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ถูกเจือจางใน TSB และ EDTA Blood การตรวจเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค real-time PCR และการวิเคราะห์ผลการทดสอบความไว ซึ่งมีรายละเอียดของกระบวนการทดสอบความไว ดังนี้

#### 4.2.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *S. suis*

ดำเนินการเตรียมเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *S. suis* สำหรับใช้ทดสอบ Sensitivity test โดยทำการเพาะเลี้ยงบน Blood Agar plate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีแยกเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงใน TSB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ต่อด้วยการปรับปริมาณเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานให้ได้  $1 \times 10^8$  cfu/ml โดยเทียบกับ 0.5 McFarland Standard

#### 4.2.2 เจือจางเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

ทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานลงในตัวอย่าง EDTA Blood และ TSB ให้มีปริมาณเชื้อโดยประมาณเท่ากับ  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  และ  $1 \times 10^0$  cfu/ml ดังนี้

##### 1) การเจือจางเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานใน TSB

ดำเนินการโดยการเติม TSB ปริมาณ 1,800  $\mu$ L ลงใน collection tube ขนาด 2 ml. จำนวนทั้งสิ้น 8 หลอด จากนั้นทำการเจือจางแบบ 10-folds dilution โดยดูดเชื้อมาตรฐาน *S. suis* ที่ได้ปรับปริมาณเทียบกับ 0.5 McFarland Standard ซึ่งเทียบได้กับปริมาณเชื้อประมาณ  $1 \times 10^8$  cfu/ml ลงในหลอดที่ 1 ปริมาณ 200  $\mu$ L จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยวิธี Invert mixer ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อประมาณ  $1 \times 10^7$  cfu/ml จากนั้นดูดเชื้อจากหลอดที่ 1 ปริมาณ 200  $\mu$ L ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ  $1 \times 10^6$  cfu/ml จากนั้นเจือจางเช่นนี้จนครบทั้ง 8 หลอด จะได้ปริมาณเชื้อเรียงลำดับจากหลอดที่ 1-8 เป็น  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  และ  $1 \times 10^0$  cfu/ml ตามลำดับ

##### 2) การเจือจางเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานใน EDTA Blood

ดำเนินการโดยทำการดูด EDTA Blood ปริมาณ 900  $\mu$ L ลงใน collection tube ขนาด 2 ml. จำนวนทั้งสิ้น 8 หลอด จากนั้นทำการเจือจางแบบ 10-folds dilution โดยดูดเชื้อมาตรฐาน *S. suis* ที่ได้ปรับปริมาณเทียบกับ 0.5 McFarland Standard ซึ่งเทียบได้กับปริมาณเชื้อประมาณ  $1 \times 10^8$  cfu/ml ลงในหลอดที่ 1 ปริมาณ 100  $\mu$ L จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยวิธี Invert mixer ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อประมาณ  $1 \times 10^7$  cfu/ml ดูดเชื้อจากหลอดที่ 1 ปริมาณ 100  $\mu$ L ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ  $1 \times 10^6$  cfu/ml จากนั้นเจือจางเช่นนี้จน

ครบทั้ง 8 หลอด จะได้ปริมาณเชื้อเรียงลำดับจากหลอดที่ 1-8 เป็น  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  และ  $1 \times 10^0$  cfu/ml ตามลำดับ

#### 4.2.3 การตรวจนับจำนวนที่แท้จริงของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

ตรวจนับจำนวนที่แท้จริงของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่เจือจางลงใน TSB และ EDTA Blood ด้วยวิธี Spread plate technique บน Blood Agar โดยทำการเตรียม Blood Agar plate สำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์จำนวน 2 plate ต่อ 1 dilution จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานปริมาณ 100  $\mu$ L ลงบน Blood agar plate จากนั้นเกลี่ยให้เชื้อกระจายเต็มเพลทด้วย Spreader เมื่อทำการครบทุก Dilution จึงนำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สำหรับตัวอย่างเชื้อมาตรฐานที่เหลือนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัด DNA เพื่อตรวจหาเชื้อ *S. suis* ด้วยวิธี Real-time PCR ต่อไป เมื่อครบเวลาการอบเพาะเชื้อให้นำ Plate มา นับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาปริมาณที่แท้จริงของแต่ละ Dilution

#### 4.2.4 การสกัด DNA จากเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานจากเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ถูกเจือจางใน TSB และ EDTA Blood

ทำการสกัด DNA จากเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ถูกเจือจางใน TSB ทั้ง 8 dilution ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  และ  $1 \times 10^0$  cfu/ml) ด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป QIAamp® DNA Blood Mini kit โดยทำการดูดเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานจาก TSB ปริมาณ 1 ml. ลงใน 1.5 ml microcentrifuge จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วย Microcentrifuge ที่ความเร็ว  $5000 \times g$  (7500 rpm) นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนน้ำทิ้งไป จากนั้นเติม 20 mg/ml Lysozyme ปริมาณ 180  $\mu$ l Incubate ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม Proteinase K ปริมาณ 20  $\mu$ l และ Buffer AL ปริมาณ 200  $\mu$ l ผสมด้วยการ Vortex Incubate ไว้ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอน เติม Ethanol (96-100%) ปริมาณ 200  $\mu$ l จากนั้นผสมโดย pulse-vortexing นาน 15 วินาที ต่อด้วยนำไปปั่นเพื่อไม่ให้หยดน้ำติดบนฝาหลอดดูดส่วนผสมที่ได้ลงใน QIAamp® Mini spin column ปิดฝา จากนั้นปั่นที่  $6000 \times g$  (8000 rpm) นาน 1 นาที ย้าย QIAamp® Mini spin column ลงใน Collection tube ขนาด 2 ml. อันใหม่ และทิ้ง collection tube อันเก่า เปิดฝา QIAamp Mini spin column ด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Buffer AW1 ปริมาณ 500  $\mu$ l ปิดฝา และนำไปปั่นที่  $6000 \times g$  (8000 rpm) นาน 1 นาที จากนั้น ย้าย QIAamp® Mini spin column ลงใน Collection tube ขนาด 2 ml. อันใหม่ และทิ้ง collection tube อันเก่า เปิดฝา QIAamp® Mini spin column ด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Buffer AW2 ปริมาณ 500  $\mu$ l ปิดฝา และนำไปปั่นที่  $20,000 \times g$  (14,000 rpm) นาน 3 นาที ย้าย QIAamp® Mini spin column ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. และทิ้ง collection

tube อันเก่า เปิดฝา QIAamp® Mini spin column ด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Buffer AE หรือ Distilled Water ปริมาณ 200 µl ปิดฝา Incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 6000 x g (8000 rpm) นาน 1 นาที เก็บรักษา DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สำหรับการสกัด DNA จากเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ถูกเจือจางใน EDTA Blood ทั้ง 8 dilution ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  และ  $1 \times 10^0$  cfu/ml) ด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป QIAamp® DNA Blood Mini kit ให้ดำเนินการโดยเติม Proteinase K ปริมาณ 20 µl ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. เติมตัวอย่าง EDTA Blood (เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ถูกเจือจางใน EDTA Blood) ปริมาณ 200 µl จากนั้นเติม Buffer AL ปริมาณ 200 µl ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex นาน 15 วินาที นำไป Incubate ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอน เติม Ethanol (96-100%) ปริมาณ 200 µl จากนั้นผสมโดย pulse-vortexing นาน 15 วินาที ต่อด้วยนำไปปั่นเพื่อไม่ให้หยดน้ำติดบนฝาหลอดดูดส่วนผสมที่ได้ลงใน QIAamp® Mini spin column ปิดฝา จากนั้นปั่นที่ 6000 x g (8000 rpm) นาน 1 นาที ย้าย QIAamp® Mini spin column ลงใน Collection tube ขนาด 2 ml. อันใหม่ และทิ้ง collection tube อันเก่า เปิดฝา QIAamp® Mini spin column ด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Buffer AW1 ปริมาณ 500 µl ปิดฝา และนำไปปั่นที่ 6000 x g (8000 rpm) นาน 1 นาที จากนั้น ย้าย QIAamp® Mini spin column ลงใน Collection tube ขนาด 2 ml. อันใหม่ และทิ้ง collection tube อันเก่า เปิดฝา QIAamp® Mini spin column ด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Buffer AW2 ปริมาณ 500 µl ปิดฝา และนำไปปั่นที่ 20,000 x g (14,000 rpm) นาน 3 นาที ย้าย QIAamp® Mini spin column ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. และทิ้ง collection tube อันเก่า เปิดฝา QIAamp® Mini spin column ด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Buffer AE หรือ Distilled Water ปริมาณ 200 µl ปิดฝา Incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 6000 x g (8000 rpm) นาน 1 นาที เก็บรักษา DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 4.2.5 ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

เมื่อทำการสกัด DNA จากตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเสร็จเรียบร้อยแล้ว ให้นำตัวอย่าง DNA ดังกล่าวออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดำเนินการเตรียมน้ำยา PCR Master Mix โดยรายละเอียดแสดงดังตาราง 8 จากนั้นนำหลอดตัวอย่าง PCR Master Mix ไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง real-time PCR โดยการตั้งโปรแกรม SDS versions 1.3.1 ของเครื่อง real-time PCR แสดงดังตาราง 9 หลังจากทำปฏิกิริยา real-time PCR เสร็จสิ้น ดำเนินวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยโปรแกรม SDS versions 1.3.1 ของเครื่อง real-time PCR เพื่อหา

ค่า Ct ของแต่ละตัวอย่าง โดยการศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์นี้ผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลค่า Ct ที่ได้จากการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างโดยไม่กำหนดค่า cutoff เพื่อศึกษาปริมาณเชื้อ *S. suis* น้อยที่สุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถให้ผลบวกได้

#### 4.2.6 การวิเคราะห์ผลการทดสอบความไว

นำผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ที่เจือจางลงในตัวอย่าง EDTA Blood และ TSB ด้วยเทคนิค Real-time PCR มาเปรียบเทียบกับผลการตรวจนับจำนวนที่แท้จริงของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่เจือจางลงใน TSB และ EDTA Blood ด้วยวิธี Spread plate technique บน Blood Agar

#### 4.3 ทดสอบการทำการตรวจซ้ำ (Reproducibility test)

การทดสอบการทำการตรวจซ้ำ (Reproducibility test) ดำเนินการโดยตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง *S. suis* ที่เจือจางใน TSB ให้ได้ปริมาณเชื้อ  $10^4$  และ  $10^7$  เมื่อเทียบกับ 0.5 McFarland standard ด้วยเทคนิค real-time PCR ที่ได้พัฒนาขึ้น จำนวนตัวอย่างละ 5 การทดสอบ ในการตรวจครั้งเดียวกัน จากนั้นนำค่า Ct ที่ได้จากการวิเคราะห์ของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณเพื่อหาสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficients of variation; CV) ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

