

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR สำหรับตรวจหาเชื้อ *S. suis* นั้น ได้ดำเนินการพัฒนาตามกระบวนการที่ได้ออกแบบไว้ ประกอบด้วย การออกแบบ Primer และ Probe การทดสอบความจำเพาะ ความไว และการทดสอบซ้ำของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น โดยผลการศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีดังนี้

ผลการออกแบบ Primer และ Probe ที่จำเพาะต่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis*

การออกแบบ Primer และ Probe สำหรับใช้ในเทคนิค Real-time PCR สำหรับตรวจหาเชื้อ *S. suis* นั้นออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน NAD(P)H-dependent glutamate dehydrogenase (*gdh*) ของเชื้อ *S. suis* ทุกสายพันธุ์ ซึ่งจากการออกแบบ Primer และ Probe ด้วยโปรแกรม Primer Express® Soft version 3.0 นั้นได้คู่ Primer SS\_F และ SS\_R ซึ่งให้ความยาวของ PCR product เท่ากับ 79 base pair และเมื่อนำ Primer และ Probe ไปทดสอบความจำเพาะด้วยฐานข้อมูล Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่า Primer และ Probe ที่ออกแบบนี้มีความจำเพาะต่อยีน NAD(P)H-dependent glutamate dehydrogenase (*gdh*) ของเชื้อ *S. suis* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

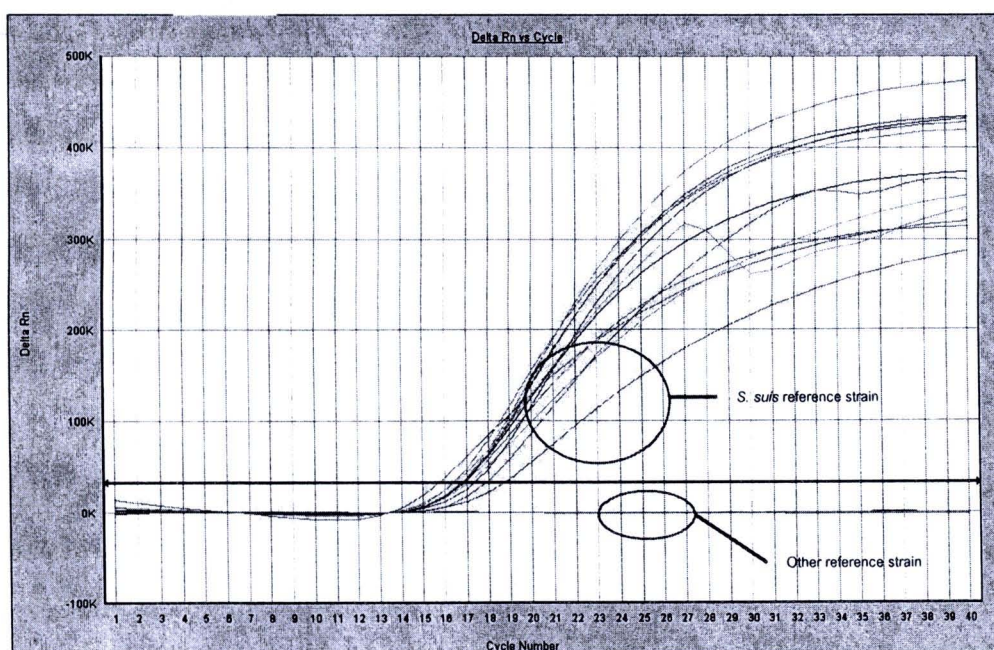
ตาราง 10 แสดงชุด Primer และ Probe ออกแบบโดยใช้ *S. suis* strain PY-2 GenBank Accession No. GU253285.1 เป็นต้นแบบ

| Name | Sequence(5'→3')           | Stand       | Length | Start | Stop | Tm   | GC% |
|------|---------------------------|-------------|--------|-------|------|------|-----|
|      |                           | on template |        |       |      |      |     |
| SS_F | GCACACCCAGAATACATCGAAGAAA | Plus        | 25     | 130   | 154  | 62.2 | 44  |
| SS_R | ATGGAACACGGAAGCTGATGAT    | Minus       | 22     | 208   | 187  | 59.4 | 45  |
| SS_P | FAM-ACGCTCAGGCTCAACG-NFQ  | Minus       | 16     | 186   | 171  | 73.0 | 63  |

## ผลการประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

### 1. ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity test)

เมื่อนำชุดน้ำยา Primer และ Probe ชุดนี้ไปทดสอบกับ DNA ของเชื้อแบคทีเรียอ้างอิง จำนวน 37 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค TaqMan based Real-time PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นพบว่า เมื่อใช้ตรวจ DNA ของเชื้อ *S. suis* จำนวน 16 สายพันธุ์ ให้ผลบวกทั้งหมด 16 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 100 สำหรับ DNA ของเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงสายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *S. suis* จำนวน 21 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียย้อมติดสีแกรมลบจำนวน 10 สายพันธุ์ และย้อมติดสีแกรมบวกจำนวน 11 สายพันธุ์ ให้ผลลบทุกสายพันธุ์ โดยผลการตรวจวิเคราะห์แสดงดังภาพ 4 และตาราง 11 ซึ่งจากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าวิธี TaqMan based Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความจำเพาะในการตรวจแยกชนิดเชื้อ *S. suis* จากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น



ภาพ 4 ผลการทดสอบความจำเพาะการตรวจวินิจฉัย  
เชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

ตาราง 11 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะการตรวจวินิจฉัย  
เชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

| เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน                      | DMST No. | Other<br>Designation | ผลการตรวจ<br>วิเคราะห์ (ค่า Ct) | การแปลผล |
|--------------------------------------------|----------|----------------------|---------------------------------|----------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i>             | 10437    | -                    | Undet. <sup>1</sup>             | Negative |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                | 21250    | ATCC 35654           | Undet.                          | Negative |
| <i>Burkholderia pseudomallei</i>           | 25426    | -                    | Undet.                          | Negative |
| <i>Escherichia coli</i>                    | 4212     | ATCC 25922           | Undet.                          | Negative |
| <i>Haemophilus influenzae</i>              | 7943     | ATCC 49247           | Undet.                          | Negative |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>               | 7592     | ATCC 700603          | Undet.                          | Negative |
| <i>Neisseria meningitidis</i>              | 7949     | ATCC 13077           | Undet.                          | Negative |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>              | 4739     | ATCC 27853           | Undet.                          | Negative |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis              | 17368    | -                    | Undet.                          | Negative |
| <i>Vibrio cholerae</i> non O1, non<br>O139 | 2783     | -                    | Undet.                          | Negative |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i>         | 11935    | -                    | Undet.                          | Negative |
| <i>Enterococcus faecalis</i>               | 4736     | -                    | Undet.                          | Negative |
| <i>Staphylococcus aureus</i>               | 8013     | -                    | Undet.                          | Negative |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>          | 15505    | -                    | Undet.                          | Negative |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i>          | 15509    | ATCC 43809           | Undet.                          | Negative |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>            | 17129    | -                    | Undet.                          | Negative |
| <i>Streptococcus mitis</i>                 | 18776    | ATCC 49456T          | Undet.                          | Negative |
| <i>Streptococcus mutans</i>                | 18777    | ATCC 25175T          | Undet.                          | Negative |
| <i>Streptococcus oralis</i>                | 18778    | ATCC 35037T          | Undet.                          | Negative |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>            | 7945     | ATCC 49619           | Undet.                          | Negative |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>              | 17020    | -                    | Undet.                          | Negative |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 1       | 26745    | -                    | 17.11                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 2       | 18783    | CCUG 7984            | 16.73                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 2       | 21386    | -                    | 16.45                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 2       | 21508    | -                    | 16.87                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 2       | 22714    | -                    | 18.71                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 2       | 23161    | -                    | 16.81                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 2       | 24002    | -                    | 16.81                           | Positive |

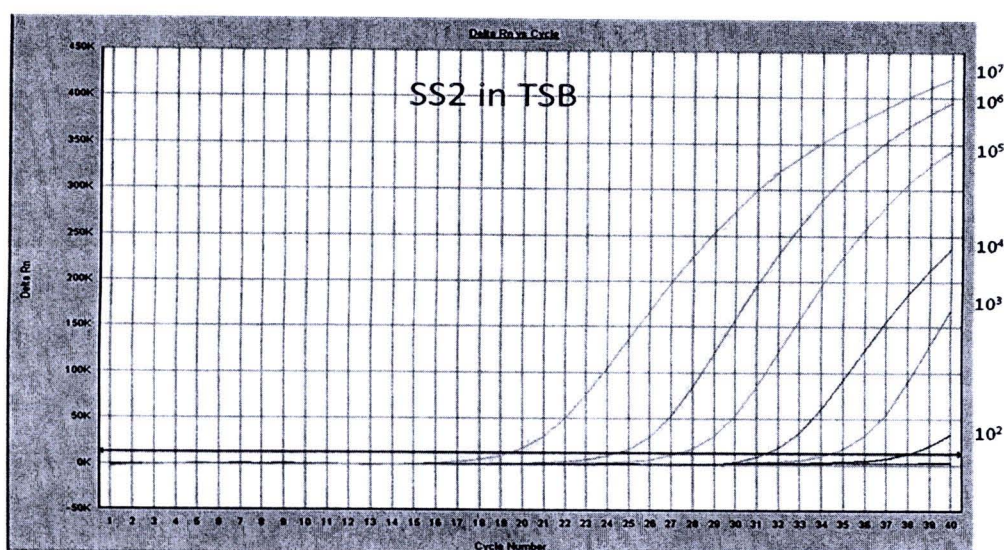
ตาราง 11 (ต่อ)

| เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน                 | DMST No. | Other<br>Designation | ผลการตรวจ<br>วิเคราะห์ (ค่า Ct) | การแปลผล |
|---------------------------------------|----------|----------------------|---------------------------------|----------|
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 2  | 24004    | -                    | 17.36                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 2  | 24005    | -                    | 16.39                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 2  | 24009    | -                    | 16.91                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 2  | 27567    | -                    | 17.86                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 | 21928    | -                    | 16.31                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 | 26012    | -                    | 16.17                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 | 26753    | -                    | 16.21                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 | 27071    | -                    | 15.84                           | Positive |
| <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 | 27578    | -                    | 16.47                           | Positive |

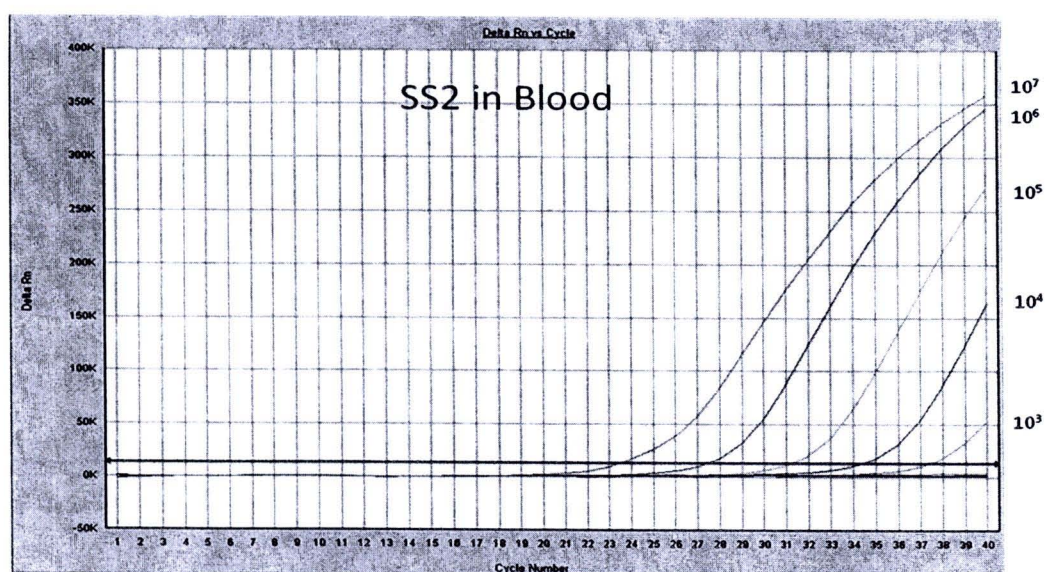
หมายเหตุ: <sup>1</sup>Undetecable

2. ผลการทดสอบความไว (Sensitivity test)

การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค TaqMan based Real time PCR โดยทำการทดลองเทียบกับการตรวจนับจำนวนที่แท้จริงของเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางลงใน TSB และ EDTA Blood ด้วยวิธี Spread plate technique บน Blood Agar พบว่าความไวในการตรวจหาเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค real-time PCR ในตัวอย่าง TSB เท่ากับ 15 cfu/ml ขณะที่ความไวในการตรวจหาเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค real-time PCR ในตัวอย่าง EDTA Blood เท่ากับ 20 cfu/ml ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการตรวจนับจำนวนที่แท้จริงด้วยวิธี Spread plate technique ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพ 5 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *S. suis* serotype 2 ที่เจือจางลงใน TSB ภาพ 6 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *S. suis* serotype 2 ที่เจือจางลงใน EDTA Blood ตาราง 12 และตาราง 13



ภาพ 5 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *S. suis* serotype 2 ที่เจือจางลงใน Tryptic soy broth (SS2 in TSB) ให้ได้ปริมาณเท่ากับ  $10^0$  ถึง  $10^7$  cfu/ml เมื่อเทียบกับ 0.5 McFarland Standard ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น ให้ผลบวกที่ต่ำอย่างความเข้มข้นน้อยที่สุด  $10^2$  cfu/ml



ภาพ 6 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *S. suis* serotype 2 ที่เจือจางลงใน EDTA Blood (SS2 in blood) ให้ได้ปริมาณเท่ากับ  $10^0$  ถึง  $10^7$  cfu/ml เมื่อเทียบกับ 0.5 McFarland Standard ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น ให้ผลบวกที่ต่ำอย่างความเข้มข้นน้อยที่สุด  $10^3$  cfu/ml

ตาราง 12 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค TaqMan based Real time PCR กับการตรวจนับจำนวนที่แท้จริงของเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางลงใน TSB ด้วยวิธี Spread plate technique บน Blood Agar

| ลำดับ | ชื่อตัวอย่าง              | Spread plate technique (cfu/ml) | Real-time PCR (Ct value) |
|-------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 1     | SS in TSB 10 <sup>0</sup> | 0                               | Undetectable             |
| 2     | SS in TSB 10 <sup>1</sup> | 0                               | Undetectable             |
| 3     | SS in TSB 10 <sup>2</sup> | 15                              | 38.10                    |
| 4     | SS in TSB 10 <sup>3</sup> | 70                              | 34.38                    |
| 5     | SS in TSB 10 <sup>4</sup> | 660                             | 31.44                    |
| 6     | SS in TSB 10 <sup>5</sup> | 3,385                           | 27.36                    |
| 7     | SS in TSB 10 <sup>6</sup> | >10,000                         | 24.47                    |
| 8     | SS in TSB 10 <sup>7</sup> | >100,000                        | 19.39                    |

ตาราง 13 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค TaqMan based Real time PCR กับการตรวจนับจำนวนที่แท้จริงของเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางลงใน EDTA Blood ด้วยวิธี Spread plate technique บน Blood Agar

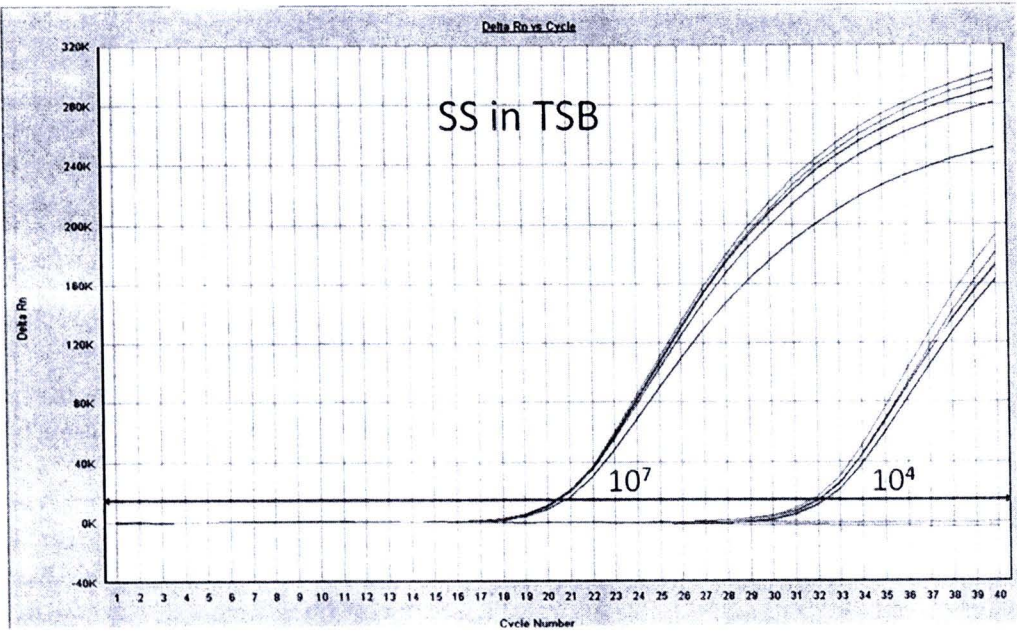
| ลำดับ | ชื่อตัวอย่าง                | Spread plate technique (cfu/ml) | Real-time PCR (Ct value) |
|-------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 1     | SS in Blood 10 <sup>0</sup> | 0                               | Undetectable             |
| 2     | SS in Blood 10 <sup>1</sup> | 0                               | Undetectable             |
| 3     | SS in Blood 10 <sup>2</sup> | 0                               | Undetectable             |
| 4     | SS in Blood 10 <sup>3</sup> | 20                              | 37.31                    |
| 5     | SS in Blood 10 <sup>4</sup> | 340                             | 34.34                    |
| 6     | SS in Blood 10 <sup>5</sup> | 1,820                           | 31.17                    |
| 7     | SS in Blood 10 <sup>6</sup> | >10,000                         | 27.39                    |
| 8     | SS in Blood 10 <sup>7</sup> | >100,000                        | 23.49                    |

3. ผลการทดสอบการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility test)

การทดสอบ Reproducibility ของเทคนิค real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น ดำเนินการ โดยทดสอบตัวอย่างเชื้อ *S. suis* ที่เจือจางใน TSB ให้มีปริมาณเชื้อ  $10^4$  และ  $10^7$  cfu/ml โดยทำทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 5 การทดสอบ และนำผลค่า Ct ของแต่ละครั้งหาค่า coefficients of variation (CV) ให้ค่าเท่ากับ 0.675 เปอร์เซนต์ และ 0.800 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งได้ค่าที่ น้อยกว่า 5 เปอร์เซนต์ ผลการทดสอบแสดงดังตาราง 14 และภาพ 7

ตาราง 14 แสดงผลการทดสอบ Reproducibility ของเทคนิค real-time PCR

| ชื่อตัวอย่าง     | ค่า Ct ของการทดสอบตัวอย่างที่ |       |       |       |       | Mean  | SD   | CV    |
|------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
|                  | 1                             | 2     | 3     | 4     | 5     |       |      |       |
| SS in TSB $10^4$ | 32.34                         | 32.03 | 32.06 | 32.06 | 31.73 | 32.04 | 0.22 | 0.675 |
| SS in TSB $10^7$ | 20.77                         | 20.47 | 20.35 | 20.46 | 20.40 | 20.49 | 0.16 | 0.800 |



ภาพ 7 กราฟผลการทดสอบ Reproducibility ของเทคนิค real-time PCR โดยการตรวจ เชื้อ *S.suis* ที่เจือจางใน Tryptic soy broth (SS in TSB) ปริมาณ  $10^4$  และ  $10^7$  cfu/ml จำนวนตัวอย่างละ 5 การทดสอบ