สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิค TaqMan based Real time PCR เพื่อใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* โดยออกแบบ Primer และ TaqMan Probe ให้จำเพาะต่อ *gdh* gene ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในการดำรงชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย มีความคงตัวสูง อัตราการเกิดการกลายพันธุ์ต่ำ เมื่อนำไปทดสอบหาความจำเพาะกับแบคทีเรียมาตรฐานจำนวน 37 สายพันธุ์ พบว่าให้ผลบวกต่อเชื้อ *S. suis* จำนวน 16 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความไวในการตรวจหาเชื้อ *S. suis* ในตัวอย่าง TSB เท่ากับ 15 cfu/ml และความไวในการตรวจหาเชื้อ *S. suis* ในตัวอย่าง EDTA Blood เท่ากับ 20 cfu/ml ตามลำดับ สำหรับการทดสอบการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility test) พบว่าเมื่อทดสอบกับตัวอย่างเชื้อ *S. suis* ในตัวอย่างที่เจือจางใน TSB ให้มีปริมาณเชื้อ 10^4 และ 10^7 cfu/ml พบว่าให้ค่า CV ที่ต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ (0.675 เปอร์เซ็นต์ และ 0.800 เปอร์เซ็นต์) ถือว่ามีความแปรปรวนที่ต่ำมาก ซึ่งจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเทคนิค TaqMan based Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโดยตรงต่อไปได้ ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนการตรวจดั้งเดิมที่ซับซ้อน และลดระยะเวลาในการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ ทำให้แพทย์สามารถจัดการ และวางแผนการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งสามารถช่วยเป็นข้อมูลให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องเข้าไปควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างรวดเร็วต่อไป

อภิปรายผล

การตรวจพิสูจน์เชื้อ *S. suis* ทางห้องปฏิบัติการคลินิก โดยทั่วไปสามารถทำได้โดยการย้อมสีแกรมจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีมาตรฐานจากตัวอย่างเลือด น้ำไขสันหลัง หรือน้ำจากข้อ (Staats, et al., 1997) เมื่อได้โคโลนีแยกเดี่ยวจึงนำไปทดสอบทางชีวเคมีเพื่อแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียต่อไป (Murray, et al., 2003) ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 2-3 วันจึงจะสามารถรายงานผลการตรวจพิสูจน์ได้ แต่สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างเลือดโดยตรง ด้วยเทคนิค TaqMan based Real-time PCR ที่ผู้วิจัยดำเนินการพัฒนาขึ้นนี้เป็นไปได้ว่าจะให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วกว่าโดยอาจใช้เวลาใน

การตรวจวินิจฉัยเพียง 4-6 ชั่วโมงก็สามารถรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ช่วยให้แพทย์ทราบข้อมูลผลการตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็วนำไปสู่การวางแผนการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาจช่วยลดอัตราการเสียชีวิต (Tang, et al., 2006; Yu, et al., 2006) หรือความพิการหูหนวกถาวรซึ่งเกิดจากภาวะแทรกซ้อนของโรคได้ (Huang, et al., 2005)

การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างเลือดโดยตรง ด้วยเทคนิค TaqMan based Real-time PCR โดยออกแบบ Primer และ TaqMan Probe ให้มีความจำเพาะต่อ *gdh* gene ของเชื้อ *S. suis* ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นนี้นั้น ถือเป็นงานวิจัยแรกที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *S. suis* ทางคลินิก ซึ่งก่อนหน้านี้มีนักวิจัยหลายท่านได้พัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการตรวจวินิจฉัยแยกชนิด และ serotype ของเชื้อ *S. suis* เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทั้งในคน และสัตว์ เช่น ในปี ค.ศ.1999 Hilde E. Smith, et al. ได้พัฒนาเทคนิค Conventional PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* serotype 1, serotype 2 และ serotype 9 strains ในตัวอย่างทอนซิลของหมู โดยได้ออกแบบ primers ให้มีความจำเพาะต่อยีน capsular polysaccharide (*cps*) ของ *S. suis* serotype 1, 2 และ 9 strains ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการตรวจวินิจฉัยโรคในหมู และเชิงระบาดวิทยาของ serotype (Hilde E. Smith, Veenbergen, et al., 1999) ขณะที่ในปี ค.ศ.2002 Wisselink และคณะก็ได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัย *S. suis* serotypes 1, 2, 7 และ 9 โดยได้ออกแบบ primers ให้มีความจำเพาะต่อยีน *cps* เพื่อใช้ตรวจในตัวอย่างทอนซิลของหมูเช่นกัน (Henk J. Wisselink, et al., 2002) ต่อมาในปี ค.ศ.2003 Ogi Okwumabua และคณะได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR โดยออกแบบ Primer ให้มีความจำเพาะต่อ glutamate dehydrogenase *(gdh)* gene ซึ่งยีนนี้จัดเป็นยีนที่มีความจำเป็นมากต่อการดำรงชีวิตของเชื้อ *S. suis* และเป็นยีนที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ต่ำ และออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะต่อ *cps* gene เพื่อใช้สำหรับแยกชนิดของเชื้อ และ serotype ของ *S. suis* ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางคลินิก และทางระบาดวิทยาได้ (Okwumabua, et al., 2003) ต่อมาในปี ค.ศ.2004 Marois ได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR โดยออกแบบ Primer ให้มีความจำเพาะต่อยีนที่ใช้สร้าง 16S rRNA ของเชื้อ *S. suis* และ Primer ที่มีความจำเพาะต่อ *cps2J* gene ซึ่งทำหน้าที่สร้าง capsule ของ *S. suis* serotypes 2 และ 1/2 สำหรับใช้ในการวินิจฉัย *S. suis* serotypes 2 และ 1/2 จากตัวอย่าง ทอนซิลของหมูที่มีอาการ และไม่มีอาการของโรคติดเชื้อ *S. suis* (Marois, et al., 2004) ต่อมาในปี ค.ศ.2007 Bao-Zheng, et al. ได้พัฒนาเทคนิค real-time fluorescent polymerase chain reaction (PCR) สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* serotype 2 โดยออกแบบ primers และ TaqMan probe ให้มี

ความจำเพาะต่อ *cps2I* (capsular polysaccharide 2I) gene สำหรับใช้ตรวจตัวอย่างเนื้อหมูเพื่อศึกษาทางระบาดวิทยา (Bao-Zheng, et al., 2007) และล่าสุดในปี ค.ศ.2010 Yang, et al. ได้พัฒนาเทคนิค TaqMan real-time quantitative PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* serotype 2 โดยออกแบบ primers และ TaqMan probe ให้จำเพาะต่อ glutamate dehydrogenase gene เพื่อใช้ศึกษาลักษณะการเพิ่มขึ้น ลดลงของเชื้อ bacteria ในเลือดของหมูทดลอง (Yang, et al., 2010) และถึงแม้ว่าปัจจุบันในประเทศไทย มีการนำเทคนิค Multiplex PCR ใช้ตรวจยืนยันเชื้อ *S. suis* และ serotype จากตัวอย่างโคโลนีแยกเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย แต่ยังคงต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 1-2 วัน นับตั้งแต่เจาะเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน จึงจะสามารถรายงานผลการตรวจยืนยันได้ เมื่อเทียบกับเทคนิค TaqMan based Real-time PCR ที่ผู้วิจัยจะพัฒนาขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าจะใช้เวลาในการตรวจวินิจฉัยเพียง 4-6 ชั่วโมงเท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค real-time PCR ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างเลือดมนุษย์ กับเทคนิค real-time PCR ที่ Yang, et al. (Yang, et al., 2010) พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ศึกษาติดตามพยาธิกำเนิดโรคติดเชื้อ *S. suis* ในหมูทดลองมีความคล้ายคลึงกันในส่วนของยีนที่ใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจคือ ยีน *gdh* การใช้ Probe ชนิด Taq® Man และการนำไปใช้ตรวจในตัวอย่างเลือด แต่สิ่งที่แตกต่างกันคือ วัตถุประสงค์ในการนำไปใช้งาน ลำดับเบสของ Primer และ Probe ชนิดของ quencher และผลการทดสอบความไวของวิธีวิเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบกับเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ที่ก่อโรคติดเชื้อในมนุษย์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ที่ก่อโรคและอาจทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบ หรือติดเชื้อในกระแสเลือดคล้ายกับ *S. suis* จำนวนรวมทั้งสิ้น 37 สายพันธุ์ ในขณะที่การศึกษาของ Yang, et al. ใช้เชื้อแบคทีเรียในการทดสอบความจำเพาะเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้น

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ของเทคนิค Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนั้นได้ทดสอบโดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล BLAST และทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงทั้งชนิดที่ติดสีแกรมบวก และแกรมลบ ซึ่งผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่า Primer และ Probe ที่ออกแบบขึ้นมีความจำเพาะมากต่อเชื้อ *S. suis* แต่ควรทดสอบกับเชื้อ *S. suis* serotype ที่พบในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียงเพิ่มเติมให้ครบถ้วน ได้แก่ *S. suis* serotype 7 และ *S. suis* serotype 9 เป็นต้น รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความใกล้เคียงกันทางด้านพันธุกรรม หรือการก่อโรคเพื่อเพิ่มความจำเพาะ และครอบคลุมยิ่งขึ้น

สำหรับการทดสอบความไว (Sensitivity) ของวิธีวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบระหว่างการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางอยู่ในตัวอย่างเลือด และ Tryptic soy broth ด้วยวิธี Spread Plate Technique กับการตรวจเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค TaqMan based Real-time PCR ซึ่งเป็นการหาความไวของวิธีวิเคราะห์เมื่อใช้ทดสอบกับตัวอย่างจริงในปริมาณเชื้อต่างๆ กัน โดยผลการทดสอบพบว่าวิธีวิเคราะห์มีความไวในการตรวจเชื้อที่เจือจางในตัวอย่างเลือดน้อยที่สุดเท่ากับ 20 cfu/ml นั้น แต่วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real-time PCR นี้เป็นการทดสอบ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดซึ่งแบคทีเรียที่ไม่มีชีวิตก็สามารถให้ผลบวกได้ ดังนั้นผู้วิจัยจะดำเนินการทดสอบความไวของวิธีวิเคราะห์เพิ่มเติม โดยการทดสอบกับ DNA ของเชื้อ *S. suis* ในความเข้มข้นต่างโดยตรง และคำนวณกลับว่าสามารถตรวจได้ปริมาณน้อยที่สุดเท่าใดต่อไป และพบว่าความไวของวิธีวิเคราะห์ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นดีกว่า เมื่อเทียบกับวิธีวิเคราะห์ที่ใช้หลักการ PCR อื่นๆ เช่น เทคนิค Multiplex PCR ของ Marois, et al. (Marois, et al., 2004) ที่ได้ออกแบบ Primer ให้มีความจำเพาะต่อยีน 16S rRNA และยีน *cps2J* สำหรับใช้ในการวินิจฉัย *S. suis* จากตัวอย่างทอนซิลของหมูนั้น ให้ความไวของการตรวจวิเคราะห์ที่ 280 cfu/ml ในการตรวจจากตัวอย่าง tonsil ของหมู เป็นต้น

สุดท้ายจากการทดสอบการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility test) พบว่าเมื่อทำการทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ซ้ำกับตัวอย่างเชื้อ *S. suis* ที่เจือจางใน TSB ปริมาณเชื้อ 10^4 และ 10^7 cfu/ml จำนวนตัวอย่างละ 5 ครั้ง พบว่าเมื่อนำค่า Ct มาคำนวณหาค่าหาสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficients of variation; CV) ได้ค่า CV น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสองตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการตรวจที่มีความแม่นยำมาก แต่หากเป็นไปได้ควรทำการทดสอบเพิ่มเติม โดยทำการเปลี่ยนผู้ทดสอบ แต่ทำการทดสอบตัวอย่างเดิม เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

ในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ หรือการตรวจวินิจฉัยโรคทางคลินิก นอกจากจะทำการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นคือ ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความไวของ (sensitivity) และทดสอบการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility test) แล้ว ยังต้องนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปทดลองใช้ตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยจริง เทียบกับวิธีมาตรฐาน เพื่อศึกษาค่า Diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, optimal cut-off point by Receiver Operator Characteristic (ROC) curve, positive predictive value (PPV) และ negative predictive value (NPV) เพื่อประเมินประสิทธิภาพ และความเหมาะสมในการนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นไปใช้งานจริงต่อไป