ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250016

การพัฒนาเทคนิค เรียล ไทม์ ที ซี อาร์ สำหรับตรวจเชื้อ สเตรปโตค็อกคัส ซูอีส ในตัวอย่างเลือดมนุษย์

เอกนี่ วันแต่ง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์
พฤษภาคม 2555
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

b00 254702

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250016

การพัฒนาเทคนิค เรียล ไทม์ พี ซี อาร์ สำหรับตรวจเชื้อ สเตร๊พโตค็อกคัส ซูอีส ในตัวอย่างเลือดมนุษย์

เจตน์ วันแต่ง

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์
พฤษภาคม 2555
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ เรื่อง "การพัฒนาเทคนิค เรียล ไทม์ พี ซี อาร์ สำหรับตรวจเชื้อ สเตร็พโตค็อกคัส ซูอีส ในตัวอย่างเลือดมนุษย์" ของ เจตน์ วันแต่ง เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยนเรศวร

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสกสรรค์ สโมสรสุข)

.....กรรมการ
(ดร.กาญจนา อู่สุวรรณทิม)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจนีย์ ศรีมาโนชญ์)

.....กรรมการ
(ดร.วัชนันท์ วงศ์เสนา)

อนุมัติ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คนึงนิจ ภู่พัฒน์วิบูลย์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
4 พฤษภาคม 2555

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การพัฒนาเทคนิค เรียล ไทม์ พี ซี อาร์ สำหรับตรวจเชื้อ สเตร็พโต ค็อกคัส ซูอีส ในตัวอย่างเลือดมนุษย์" เป็นผลงานวิจัยร่วมระหว่างกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นเจ้าของผลงาน (Ownership) และมหาวิทยาลัยนเรศวรเป็นเจ้าของผลงานร่วม (Co-Ownership) ตามข้อตกลงต่อท้ายบันทึกความร่วมมือทางวิชาการและการวิจัย ระหว่างมหาวิทยาลัยนเรศวร กับ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับลงวันที่ 3 มิถุนายน พ.ศ.2551 รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณในความกรุณาของ ดร.กาญจนา อู่สุวรรณทิม ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสกสรรค์ สโมสรสุข ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจนีย์ ศรีมาโนชญ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และดร.วัชนันท์ วงศ์เสนา กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้จัดสรรเงินงบประมาณเพื่อดำเนินโครงการวิจัย ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 (นครสวรรค์) ที่ให้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และสาธารณูปโภค เพื่อใช้ในการดำเนินงานวิจัยนี้จนสำเร็จ ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ในการวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ นางสาววรางคณา อ่อนทรวง หัวหน้ากลุ่มชันสูตรสาธารณสุข ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 (นครสวรรค์) เป็นอย่างสูง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางการดำเนินงานวิจัยทั้งด้านการบริหารจัดการ และด้านวิชาการ

เหนือสิ่งอื่นใดขอขอบคุณมารดา ครอบครัว และเพื่อนๆ ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Streptococcus suis* ทางห้องปฏิบัติการ ต่อไป

เจตน์ วันแต่ง

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเทคนิค เรียล ไทม์ พี ซี อาร์ สำหรับตรวจเชื้อ สเตร็พโตค็อกคัส ซูอีส ในตัวอย่างเลือดมนุษย์
ผู้วิจัย	เจตน์ วันแต่ง
ประธานที่ปรึกษา	ดร.กาญจนา อู่สุวรรณทิม
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจนีย์ ศรีมาโนชญ์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2554
คำสำคัญ	สเตร็พโตค็อกคัส ซูอีส เรียล ไทม์ พี ซี อาร์ ตัวอย่างเลือดมนุษย์

บทคัดย่อ

250016

เชื้อสเตร็พโตค็อกคัส ซูอีส สามารถก่อโรคติดเชื้อที่รุนแรงในมนุษย์ ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตภายในสองถึงสามวัน หรือหากหายจากโรคก็อาจมีภาวะแทรกซ้อน เช่น หูหนวกถาวร ทั้งนี้หากแพทย์ทราบผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการอย่างรวดเร็วก็จะนำไปสู่การรักษาถูกต้อง เหมาะสม อาจช่วยลดอัตราการเสียชีวิต หรือภาวะแทรกซ้อนได้ โดยการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาและพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อสเตร็พโตค็อกคัส ซูอีส ด้วยเทคนิค เรียล ไทม์ พี ซี อาร์ เพื่อการรายงายผลการตรวจอย่างถูกต้อง และรวดเร็ว

ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ออกแบบ ไพร์เมอร์ และโพรบ สำหรับพัฒนาวิธีตรวจ โดยใช้ยีน กลูตาเมทดีไฮโดรจิเนส เป็นยีนเป้าหมาย และใช้ลำดับเบสของยีนดังกล่าวจากเชื้อสเตร็พโตค็อกคัส ซูอีส สายพันธุ์ PY-2 เป็นแม่แบบ และทำการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีตรวจด้วยการทดสอบความจำเพาะ ความไว และความสามารถในการตรวจซ้ำ ของวิธีที่พัฒนาขึ้น

ผลการศึกษาพบว่าไพร์เมอร์ และโพรบ ที่ออกแบบขึ้นให้ผลการทดสอบความจำเพาะร้อยละ 100 เมื่อทดสอบกับเชื้อสเตร็พโตค็อกคัส ซูอีส สายพันธุ์ที่ก่อโรค จำนวน 16 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น จำนวน 21 สายพันธุ์ ในการทดสอบความไวของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น ให้ผลบวกต่อเชื้อสเตร็พโตค็อกคัส ซูอีส ที่ใส่ลงใน TSB และ EDTA Blood ปริมาณต่ำสุดที่ 15 cfu/ml และ 20 cfu/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ความสามารถในการตรวจซ้ำของวิธีทดสอบ ให้ค่าความแปรปรวนพบว่าให้ค่าต่ำมาก เท่ากับร้อยละ 0.68 และ 0.80 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อ 10^4 และ 10^7 cfu/ml ตามลำดับ (ค่าความแปรปรวนของ Ct ที่ยอมรับได้คือร้อยละ 5) สรุปได้ว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ มีศักยภาพพอที่จะสามารถนำไปตรวจเชื้อสเตร็พโตค็อกคัส ซูอีส โดยตรงจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วย และในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Title	DEVELOPMENT OF A REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY TO DETECT Streptococcus suis IN HUMAN BLOOD SAMPLE
Author	Jate Wantang
Advisor	Kanchana Usuwanthim, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Potjanee Srimanote, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M. S. in Biomedical Sciences, Naresuan University, 2011
Keyword	*Streptococcus suis*, real-time PCR, Human blood sample

ABSTRACT

250016

Streptococcus suis (*S. suis*) cause severe infection in human. In highly severe cases, patients suffered with septicemia and Streptococcal toxic shock syndrome, the disease progressed rapidly and all patients died within 24-48 hours. Moreover, the survivors among meningitis cases had persistent hearing loss and demonstrated vestibular impairment. An early diagnosis that supported clinical diagnosis of *S. suis* infection would facilitate administrator of proper antimicrobial agents which are essential for the reduction in mortality of patient with *S. suis* infection. This aims to develop a real-time PCR assay for early detect ion of *S. suis* in human blood sample. Specific set of primer and probe for amplification of the highly conserved of DNA sequence of *S. suis* glutamate dehydrogenase (*gdh*) gene were designed according to the respective gene from *S. suis* PY-2. Specificity, sensitivity and reproducibility of the assay were evaluated.

The *gdh*-real time PCR assay showed 100% specificity when assessed using 16 *S. suis* isolates and 21 other species of bacterial strains. The lowest limit of detection in *S. suis* spike-test showed lower limit of TSB and EDTA blood were 15 cfu/ml and 20 cfu/ml respectively. Moreover, in the intra-run reproducibility test, Ct coefficients of variation were very low at 0.68% and 0.80% in 10^4 and 10^7 cfu/ml of TSB spike sample. This study shown that the so-developed real-time PCR assay had a high potential for efficiently detect *S. suis* in human blood sample.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการวิจัย	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	3
	ขอบเขตของงานวิจัย	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	โรคติดเชื้อสเตร็พโตค็อคคัส ซูอิส *(S. suis)*	4
	ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคเรียลไทม์ พี ซี อาร์ (Real-time PCR)	33
	ความรู้เกี่ยวกับหลักการพัฒนาเทคนิค real-time PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลชีพ	39
3	**วิธีดำเนินงานวิจัย**	43
	ประชากร และกลุ่มตัวอย่าง	43
	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	43
	วิธีการ และการเก็บรวบรวมข้อมูล	44
4	**ผลการวิจัย**	54
	ผลการออกแบบ Primer และ Probe ที่จำเพาะต่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis*	54
	ผลการประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น	55

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

5 **บทสรุป** 70

สรุปผลการวิจัย 70

อภิปรายผล 70

ข้อเสนอแนะ 64

บรรณานุกรม 65

ภาคผนวก 79

อภิธานศัพท์ 87

ประวัติผู้วิจัย 89

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 แสดงข้อมูลรายงานอาการทางคลินิกของผู้ป่วยติดเชื้อ *Streptococcus suis*..... 6

2 แสดงผลการศึกษา virulence factors ที่น่าจะเป็นของเชื้อ *S. suis* serotype 2..... 12

3 แสดงสรุปรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* ในประเทศไทย..... 18

4 แสดงการพิสูจน์แยกชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ที่ให้ลักษณะการสลาย เม็ดเลือดแดงชนิด α-hemolysis บน Blood agar..... 23

5 แสดงการจำแนกเชื้อ *S. suis* serotype 1 และ 2..... 24

6 แสดงสรุปการศึกษา และพัฒนาวิธี Polymerase chain reaction สำหรับ ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* 28

7 แสดงรายชื่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา..... 43

8 แสดงองค์ประกอบน้ำยาสารเคมีของปฏิกิริยา Real-time PCR..... 46

9 แสดงการตั้งโปรแกรมกำหนดอุณหภูมิ ระยะเวลา และจำนวนรอบ บนเครื่อง Real time PCR รุ่น ABI 7500..... 47

10 แสดงชุด Primer และ Probe ออกแบบโดยใช้ *S. suis* strain PY-2 GenBank Accession No. GU253285.1 เป็นต้นแบบ..... 54

11 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค Real-time PCR..... 56

12 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค TaqMan based Real time PCR กับการตรวจนับจำนวนที่แท้จริงของเชื้อแบคทีเรีย ที่เจือจางลงใน TSB ด้วยวิธี Spread plate technique บน Blood Agar..... 59

13 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค TaqMan based Real time PCR กับการตรวจนับจำนวนที่แท้จริงของเชื้อแบคทีเรีย ที่เจือจางลงใน EDTA Blood ด้วยวิธี Spread plate technique บน Blood Agar..... 59

14 แสดงผลการทดสอบ Reproducibility ของเทคนิค real-time PCR..... 60

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา PCR โดยหนึ่งรอบปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ Denaturation, Annealing และ Elongation หรือ Extension.. 34

2 แสดงกราฟการเกิดสัญญาณ Fluorescence ของปฏิกิริยา Real-time PCR..... 38

3 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย..... 41

4 ผลการทดสอบความจำเพาะการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิค real-time PCR 56

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 ให้ผลบวกที่ตัวอย่างความเข้มข้นน้อยที่สุด 10^2 cfu/ml..... 58

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 ให้ผลบวกที่ตัวอย่างความเข้มข้นน้อยที่สุด 10^3 cfu/ml..... 58

7 กราฟผลการทดสอบ Reproducibility ของเทคนิค real-time PCR โดยการตรวจเชื้อ *S.suis* ที่เจือจางใน Tryptic soy broth (SS in TSB) ปริมาณ 10^4 และ 10^7 cfu/ml จำนวนตัวอย่างละ 5 การทดสอบ..... 60

อักษรย่อ

α	=	alpha
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
β	=	Beta
mL	=	มิลลิลิตร
g/dL	=	กรัม ต่อ เดซิลิตร
mmol/L	=	มิลลิโมล ต่อ ลิตร
NaCl	=	โซเดียมคลอไรด์
CPS	=	capsular polysaccharide
epf	=	extracellular protein factor
MRP	=	muraminidase-released protein
gdh	=	glutamate dehydrogenase
CFU/ml	=	Colony forming unit per milliliter
µl	=	ไมโครลิตร
MIC	=	minimal inhibitory concentration
PGS	=	เพนนิซิลิน จี โซเดียม
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
nM	=	Nano Molar
DW	=	Distil water
rpm	=	Revolutions per minute
Ct	=	Threshold cycle
TSB	=	Tryptic soy broth
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
dATP	=	Deoxyadenosine triphosphate
dTTP	=	Deoxythymidine triphosphate
dCTP	=	Deoxycytidine triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanosine triphosphate