



การตรวจหาเชื้อ *Brucella melitensis* โดยวิธี Real-time PCR และวิธีการเพาะแยกเชื้อ จากตัวอย่างอวัยวะของแพะเนื้อในประเทศไทย

ลัษณา รามริน¹ เรขา คณิตพันธ์² มนยา เอกทัตร์² และองอาจ เลหาวิณี^{1, #}

¹ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

²สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพมหานคร 10900

บทคัดย่อ: *Brucella melitensis* เป็นสาเหตุหลักของโรค布鲁เซลโลซิสในแพะ ทำให้แพะเกิดการแท้งลูก นอกจากนี้โรค布鲁เซลโลซิสยังเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่สำคัญ วิธีมาตรฐานสำหรับการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสคือวิธีการเพาะแยกเชื้อ แต่เชื้อ布鲁เซลลาเป็นเชื้อที่ก่ออันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน และต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินความสามารถวิธีการตรวจหาเชื้อ *B. melitensis* โดยวิธี Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างอวัยวะจากแพะเนื้อที่ให้ผลบวกและผลลบทางซีรัมวิทยา liver, spleen, mammary/inguinal lymph node, mandibular lymph node, popliteal lymph node, parotid lymph node, pre-femoral lymph node และ pre-scapular lymph node ทั้งหมด 320 ตัวอย่าง โดย primers และ probe ที่ใช้มีความจำเพาะต่อยีน IS711 ของโรค布鲁เซลโลซิส ผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่วิธี Real-time PCR สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 2 เฟมโตกรัม ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น และวิธี Real-time PCR มีค่าความไว 92.45% ความจำเพาะ 92.88% และค่าความถูกต้อง 92.81% ดังนั้นวิธี Real-time PCR สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิสที่มีความจำเพาะ ความไว รวดเร็ว และปลอดภัย

คำสำคัญ: เชื้อ *Brucella melitensis* วิธี Real-time PCR วิธีการเพาะแยกเชื้อ แพะเนื้อ

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2559. 11(1): 35-46.

E-mail address: fvetonl@ku.ac.th

Detection of *Brucella melitensis* Using Real-time PCR and Isolation from Organs of Meat Goat in Thailand

Luckana Ramrin¹, Reka Kanitpun², Monaya Ekgatat² and Ongard Lawhavinit^{1,#}

¹Department of Veterinary Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900

²National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Bangkok 10900

Abstract: *Brucella melitensis* is the most prevalent causative agent of goat brucellosis: one of the most important zoonotic diseases related to the reproductive losses and abortion. Conventional culture method is considered the gold standard for brucellosis diagnosis. However, this method is hazardous, labor-intensive and time-consuming. Therefore, the present study aims to evaluate an efficiency of Real-time PCR diagnosis method: the more convenient and less time consuming method by comparing to culture method. Total 320 samples of liver, spleen, mammary/inguinal lymph node, mandibular lymph node, popliteal lymph node, parotid lymph node, pre-femoral lymph node and pre-scapular lymph node were collected from seropositive and suspicious meat goats. Primer and probe specific for the insertion sequence (*IS711*) gene of *B. melitensis* were used. The limit of detection (LoD) of Real-time PCR assay is 2 femtogram (fg) with no cross reactions with other 20 related pathogens. Compared to the gold standard method, Real-time PCR assay contains 92.45% sensitivity, 92.88% specificity and 92.81% accuracy. In conclusion, Real-time PCR assay is sensitivity and specificity method for the rapid and safe detection of brucellosis diagnosis.

Keywords: *Brucella melitensis*, Real-time PCR, Isolation, Meat goat

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(1): 35-46.

E-mail address: fvetonl@ku.ac.th

บทนำ

โรค布鲁เซลโลสิส (Brucellosis) มีสาเหตุมาจากเชื้อ布鲁เซลลา พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด รวมทั้งในปศุสัตว์ เช่น โค กระบือ สุกร แพะ

แกะ และสัตว์ป่า (Lapaque *et al.*, 2005)

โดยเฉพาะโรค布鲁เซลโลสิสในแพะ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Brucella melitensis* ที่มีการระบาดทั่วโลก แพะที่เป็นโรคจะเกิดความล้มเหลวของระบบ

สืบพันธุ์ เช่น ทำให้เกิดการแท้งลูก มดลูกอักเสบ อัมพาตอักเสบ ทำให้แพะเป็นหมัน ผสมไม่ติด หรือ ผสมติดยาก เกิดข้ออักเสบ และให้ผลผลิตลดลง (Blood and Henderson, 1968) โดยแพะมักจะแท้งในระยะสุดท้ายของการตั้งท้อง แต่ในรายที่ไม่เกิดการแท้ง แพะจะปล่อยเชื้อมาพร้อมกับน้ำนม รก หรือน้ำคร่ำเวลาคลอด แพะที่เป็นโรคสามารถแพร่เชื้อต่อไปยังสัตว์อื่นได้ (Nielsen, 2002) นอกจากนี้โรค布鲁เซลโลสิสยังเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน พบว่าโรค布鲁เซลโลสิส ที่เกิดจากเชื้อ *B. melitensis* เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงมากที่สุดในคน โดยจะแสดงอาการคล้ายไข้หวัด ทำให้คนที่ติดเชื้อมีอาการปวดศีรษะ ไข้สูงๆ ต่ำๆ (undulant fever) ปวดตามข้อ สั่นและอ่อนแรง หรือมีการติดเชื้อเฉพาะที่ เช่น กระดูก เนื้อเยื่อ และอวัยวะในระบบต่างๆ แต่ในรายที่รุนแรงจะมีผลกับระบบประสาทและหัวใจ การรักษาต้องต่อเนื่องและใช้เวลานาน (Pellicer *et al.*, 1988) โรค布鲁เซลโลสิสจึงจัดเป็นโรคสำคัญที่สร้างความสูญเสียทั้งระบบสาธารณสุขและเศรษฐกิจ (Godfreid *et al.*, 2005; Pappas *et al.*, 2006)

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลสิสทางห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ ใช้การตรวจทางซีรัมวิทยาโดยวิธี Rose bengal test (RBT), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ Complement fixation test (CFT) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ布鲁เซลลา แต่การตรวจทางซีรัมวิทยาจะมีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ได้ เช่น *Yersinia enterocolitica* O:9 (Bounaadjia *et al.*, 2009) วิธีการขั้นสูง โรค布鲁เซลโลสิสที่ได้รับการยอมรับว่าสมบูรณ์ที่สุดในปัจจุบัน คือ วิธีการเพาะแยกเชื้อ ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับขั้นสูงโรค布鲁เซลโลสิส (Alton *et al.*, 1975) แต่การปฏิบัติการ

เกี่ยวกับเชื้อ布鲁เซลลามีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อของผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ รวมทั้งผู้ปฏิบัติงานต้องมีทักษะในการใช้เครื่องมือและต้องปฏิบัติตามมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการระดับ 3 เพื่อลดความเสี่ยงของผู้ปฏิบัติงาน (OIE, 2012) นอกจากนี้การเพาะแยกเชื้อตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง จนทราบผลการจำแนกเชื้อต้องใช้เวลานาน (Bounaadjia *et al.*, 2009) ต่อมาจึงได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยวิธี conventional PCR มาใช้ในการพิสูจน์เชื้อ布鲁เซลลา ออกจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (Kanitpun *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามก็มีข้อจำกัดของวิธีคือไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ นอกจากนั้นยังก่อให้เกิดการฟุ้งกระจายและการปนเปื้อนของ PCR products จากการกระบวนการทำ PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดการปนเปื้อนแบบ carry over contamination ทำให้เกิดผลบวกเท็จได้ (false positive) (Kwok and Higuchi, 1989) วิธี Real-time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่าง โดยสามารถตรวจวัดปริมาณ PCR products ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ มีวิธีทำสะดวก ไม่ยุ่งยาก มีอันตรายน้อย และมีความไวสูง (Bricker, 2002) สามารถตรวจโรคโดยตรงจากตัวอย่างส่งตรวจ

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินความสามารถวิธีการตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลสิสสำหรับใช้ตรวจหาเชื้อ *B. melitensis* โดยวิธี Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อในแพะที่เลี้ยงในประเทศไทย เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีความปลอดภัย รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และสามารถนำไปใช้ตรวจในห้องปฏิบัติการได้

ตารางที่ 1 รายละเอียดลำดับเบส (sequence) ของ primers และ probe

Name	Primer sequence 5'-3'	Location
Forward-primer	CGCTCGCGCGGTGGAT	421
Reverse-primer	CTTGAAGCTTGCGGACAGTCACC	511
Probe	FAM-ACGACCAAGCTGCATGCTGTTGTCGATG-TAMRA	438

ที่มา: Bounaadja *et al.* (2009)

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างสำหรับการทดสอบความใช้ได้

(Validation) ของวิธี Real-time PCR

- เชื้ออ้างอิง (reference strain) ใช้เชื้อ *B. melitensis* biovar 1 ref 16M ATCC 23456 สำหรับทดสอบความไว (Analytical Sensitivity, ASe หรือค่า Limit of Detection, LoD)
- เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (non-*Brucella* spp.) จำนวน 20 ตัวอย่าง สำหรับทดสอบความจำเพาะ (Analytical Specificity, ASp)

ตัวอย่างอวัยวะสำหรับทดสอบเปรียบเทียบวิธีการ

เพาะแยกเชื้อกับวิธี Real-time PCR

เป็นตัวอย่างอวัยวะจากแพะเนื้อที่ให้ผลบวก และผลสงสัยทางซีรัมวิทยา โดยวิธี Rose bengal test (RBT), Complement fixation test (CFT) และวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จากตัวอย่างแพะเนื้อ จำนวน 40 ตัว โดยเก็บในระหว่างปี พ.ศ. 2557 ทำการเก็บตัวอย่างจากต่อมน้ำเหลืองและตัวอย่างอวัยวะ ได้แก่ liver, spleen, mammary/inguinal lymph node, mandibular lymph node, popliteal lymph node, parotid lymph node, prefemoral lymph node และ pre-scapular lymph node

ทั้งหมด 8 ตัวอย่างต่อตัว รวมตัวอย่างทั้งหมด 320

ตัวอย่าง

Primers และ probe

Primers และ probe ที่ใช้มีความจำเพาะต่อยีน *IS711* ของโรค布鲁เซลโลซิส ซึ่ง probe ที่ใช้เป็นชนิด hydrolysis probe ที่ติดฉลากด้วย FAM (6-carboxyfluorescein) ที่ด้านปลาย 5' ทำหน้าที่เป็น reporter dye และ TAMRA (6-carboxy-tetra-methyl-rhodamine) ที่ปลาย 3' เป็น quencher โดยมีรายละเอียดลำดับเบสแสดงในตารางที่ 1

การเตรียมดีเอ็นเอของเชื้ออ้างอิง

เลี้ยงเชื้อ *B. melitensis* biovar 1 ref 16M ATCC 23456 บนอาหาร selective media จากนั้นนำไปบ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน นำโคโลนีปริมาณ 1 ลูปมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIA® DNA Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 51306) วิธีการและขั้นตอนตามข้อบ่งใช้ของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (SmartSpec™ Plus, Biorad) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real-time PCR

นำดีเอ็นเอของเชื้ออ้างอิง *B. melitensis* biovar 1 ref 16M ATCC 23456 ทำเป็นตัวควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase และ DNase แทนดีเอ็นเอ เป็นตัวควบคุมลบ มาทำปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้เครื่อง LightCycler®480 (Roche, Germany) แต่ละปฏิกิริยามีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำยา LightCycler®480 Probes Master (Roche, Germany) (2x) 10 ไมโครลิตร Forward-primer Reverse-primer และ Probe (Sigma-Proligo, Singapore) เข้มข้น 10 ไมโครโมล อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 3.5 ไมโครลิตร และ DNA template 5 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ Pre-incubation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที Amplification 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที จำนวน 45 รอบ และ Cooling ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์จะได้ค่า Crossing point (Cp) ซึ่งเป็นจำนวนรอบที่แสดงผลเป็นบวก ที่ตรวจวัดสัญญาณได้ด้วย Software ของเครื่อง LightCycler®480 ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก จะให้ค่า Cp น้อยกว่า 45 รอบ

การทำ Standard curve

เจือจางดีเอ็นเอของเชื้ออ้างอิง *B. melitensis* biovar 1 ref 16M ATCC 23456 ด้วยน้ำกลั่นแบบ 10-fold dilution ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-10} จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นมาทำปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ primers และ probe ชุดน้ำยา และวิธีการทดสอบโดยวิธี Real-time PCR ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ค่า Cp ที่ได้ถูกคำนวณโดย Software

ของเครื่อง LightCycler®480 ซึ่งพิจารณาจากค่า Efficiency; E คือการที่ได้จำนวนเพิ่มเป็น 2 copy ต่อรอบ (อโนทัย, 2549) เพื่อแสดงถึงปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

การทดสอบความไว (Analytical Sensitivity; ASe หรือค่า Limit of Detection; LoD)

ความไวจะต้องพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่วิธี Real-time PCR สามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection; LoD) โดยนำดีเอ็นเอของเชื้ออ้างอิง *B. melitensis* biovar 1 ref 16M ATCC 23456 ที่ทราบค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นแบบ 10-fold dilution จากนั้นนำมาทดสอบโดยวิธี Real-time PCR ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination; R^2) ซึ่งค่า R^2 ควรมีค่ามากกว่า 0.99

การทดสอบความจำเพาะ (Analytical Specificity, ASp)

ทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (non-*Brucella* spp.) จำนวน 20 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIA® DNA Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 51306) วิธีการและขั้นตอนตามข้อบ่งใช้ของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (SmartSpec™ Plus, Biorad) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากันทุกตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบผล หลังจากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ primers และ probe ชุดน้ำยาและวิธีการทดสอบ

โดยวิธี Real-time PCR ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น เพื่อทดสอบหาความจำเพาะต่อเชื้อ *Brucella* spp. ผลการทดสอบพิจารณาจากค่า Cp ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบและตัวควบคุมลบ จะให้ค่า Cp มากกว่า 45 รอบ

ขั้นตอนการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเพาะแยกเชื้อกับวิธี Real-time PCR

การทดสอบตัวอย่างอวัยวะ โดยวิธีการเพาะแยกเชื้อ

ตัดตัวอย่างอวัยวะเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 5 กรัม ใส่ใน Tissue grinder เติมน้ำสารละลาย phosphate-buffer saline (PBS) pH 7.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บดเนื้อเยื่อ ประมาณ 5-10 นาที นำส่วนของ suspension จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดไว้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) และดูส่วนของ suspension จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ selective media จำนวน 2 เพลท โดยวิธี Spread plate หลังจากนั้นนำไปบ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-10 วัน ทำการพิสูจน์เชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี และวิธี conventional PCR

การทดสอบตัวอย่างอวัยวะ โดยวิธี Real-time PCR

นำตัวอย่างจากการเตรียมตัวอย่างข้างต้น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy® Blood&Tissue Kit (Qiagen, Germany, Cat. No. 69506) วิธีการและขั้นตอนตามข้อบ่งใช้ของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง มาทำการทดสอบโดยวิธี Real-time PCR ตามที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อการทดสอบ โดยวิธี Real-time PCR ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกและตัวควบคุมบวก จะให้ค่า Cp น้อยกว่า 45 รอบ

การวิเคราะห์ผลการทดสอบหาค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องของวิธีทดสอบ

หลังจากทำการตรวจหาเชื้อ *B. melitensis* โดยวิธีการเพาะแยกเชื้อ และวิธี Real-time PCR เสร็จแล้ว นำข้อมูลจากผลการทดลองมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กัน โดยใช้ผลการทดลองโดยวิธี Real-time PCR เทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อ แล้วหาค่าความไวของวิธีทดสอบ (Sensitivity) ความจำเพาะของวิธีทดสอบ (Specificity) และค่าความถูกต้องของวิธีทดสอบ (Accuracy) ของวิธี Real-time PCR เทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อที่สัมพันธ์กัน โดยวิธี chi-square และใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ผลการทดลอง

การทำ Standard curve

จากการทำ Standard curve ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-10} นำมาวิเคราะห์ตามสภาวะที่กำหนดของวิธี Real-time PCR เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบ 45 รอบ ได้ค่า Crossing point (Cp) ดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} Cp = 14.04, 10^{-2} = 17.80, 10^{-3} = 21.47, 10^{-4} = 25.09, 10^{-5} = 28.89, 10^{-6} = 32.73 และ 10^{-7} = 36.41 ตามลำดับ ผลการคำนวณค่า Efficiency; E จากเครื่อง LightCycler® 480 สามารถหาค่า E ได้เท่ากับ 1.857 (รูปที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า primers และ probe ที่ออกแบบให้ปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพ

การทดสอบความไว (Analytical Sensitivity; ASe หรือค่า Limit of Detection; LoD)

จากการวัดปริมาณดีเอ็นเอของเชื้ออ้างอิง *B. melitensis* biovar 1 ref 16M ATCC 23456 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (SmartSpec™ Plus,

Biorad) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร นำดีเอ็นเอที่วัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่า 20 นาโนกรัม/ปฏิกิริยา จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นแบบ 10-fold dilution พบว่าปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด (Limit of Detection; LoD) ที่วิธี Real-time PCR สามารถวิเคราะห์ได้คือ 2 เฟมโตกรัม (รูปที่ 2) เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่า C_p กราฟที่ได้เป็นเส้นตรงสามารถวิเคราะห์ได้คือ 2 เฟมโตกรัม (รูปที่ 2) เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่า C_p กราฟที่ได้เป็นเส้นตรงและความสัมพันธ์ในเชิงถดถอย หรือสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination; R^2) เท่ากับ 0.999 แสดงดังรูปที่ 3

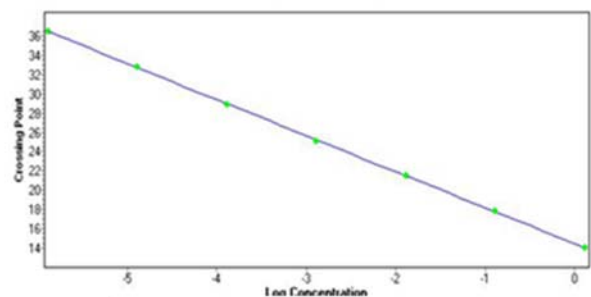
การทดสอบความจำเพาะ (Analytical Specificity, ASp)

จากการทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (non-*Brucella* spp.) จำนวน 20 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 2 นาโนกรัม/ปฏิกิริยา พบว่าให้ผลลบทุกตัวอย่าง ซึ่งให้ค่า C_p มากกว่า 45 รอบ แสดงดังตารางที่ 2

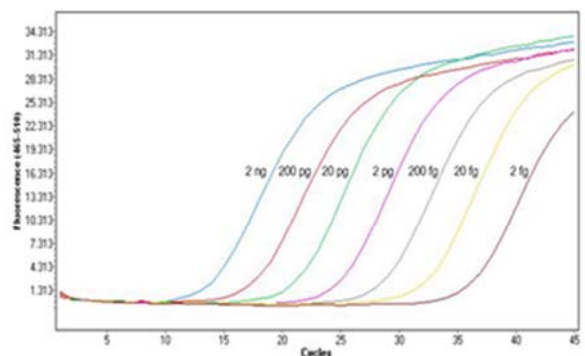
การทดสอบเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเพาะแยกเชื้อกับวิธี Real-time PCR

จากการตรวจหาเชื้อ *B. melitensis* จากตัวอย่างอวัยวะของแพะเนื้อ วิทยา liver, spleen, mammary/inguinal lymph node, mandibular lymph node, popliteal lymph node, parotid lymph node, pre-femoral lymph node และ pre-scapular lymph node จำนวน 320 ตัวอย่าง โดยวิธี Real-time PCR เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ

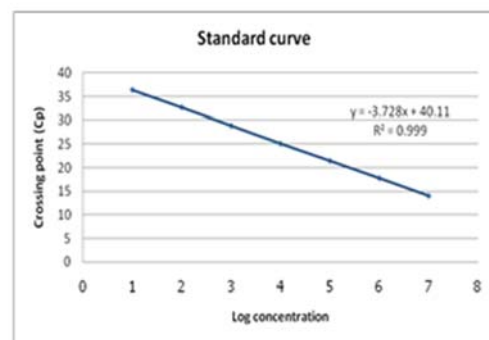
เพาะแยกเชื้อ พบว่าให้ผลบวกทั้งวิธี Real-time PCR และวิธีการเพาะแยกเชื้อ จำนวน 49 ตัวอย่าง ให้ผลบวกโดยวิธีการเพาะแยกเชื้อ แต่ให้ผลลบโดยวิธี Real-time PCR จำนวน 4 ตัวอย่าง ให้ผลลบต่อวิธีการเพาะแยกเชื้อ แต่ให้ผลบวกต่อวิธี Real-time PCR จำนวน 19 ตัวอย่าง และให้ผลลบต่อการตรวจทั้งวิธี Real-time PCR และวิธีการเพาะแยกเชื้อ จำนวน 248 ตัวอย่าง และพบว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อ *B. melitensis* ได้ 53 ตัวอย่าง ส่วนวิธี Real-time PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *B. melitensis* ได้ 68 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3)



รูปที่ 1 แสดงค่า Efficiency (E) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 2 แสดงค่า Limit of Detection (LoD) ของปฏิกิริยา Real-time



รูปที่ 3 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination; R^2)

ตารางที่ 2 เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (non-*Brucella* spp.) ที่ใช้ทดสอบความจำเพาะ

Species	Source	Real-time PCR result
<i>Burkholderia cepacia</i>	DMST 15507	negative
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	DMST 19919	negative
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	DMST 25426	negative
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	IMM/NIAH	negative
<i>Burkholderia thailandensis</i>	DMST 6431	negative
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	IMM/NIAH	negative
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	negative
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	BACT/NIAH	negative
<i>Listeria monocytogenes</i>	BACT/NIAH	negative
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	IMM/NIAH	negative
<i>Mycobacterium ovis</i>	IMM/NIAH	negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BACT/NIAH	negative
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	negative
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	negative
<i>Staphylococcus aureus</i>	BACT/NIAH	negative
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BACT/NIAH	negative
<i>Streptococcus agalactiae</i>	BACT/NIAH	negative
<i>Vibrio cholerae</i>	BACT/NIAH	negative
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BACT/NIAH	negative
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610	negative

วิจารณ์การทดลอง

จากผลการศึกษา พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่วิธี Real-time PCR สามารถวิเคราะห์ได้คือ 2 เฟมโตกรัม ผลการทดสอบความจำเพาะ ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น และวิธี Real-time PCR มีค่าความไว 92.45% ความจำเพาะ 92.88% และค่าความถูกต้อง 92.81% พบว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อ *B. melitensis* ได้

53 ตัวอย่าง ส่วนวิธี Real-time PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *B. melitensis* ได้ 68 ตัวอย่าง

จากการศึกษาของ Bounaadja *et al.* (2009) โดยศึกษาการตรวจหาเชื้อบรูเซลลาด้วยวิธี Real-time PCR ใช้ยีน *IS711* ยีน *bcs31* และยีน *per* เป็นยีนเป้าหมาย กับเชื้อ *B. melitensis* 16 M พบว่ายีน *IS711* เป็นยีนที่ให้ค่าความไวดีกว่า ยีน *bcs31* และยีน *per* และพบว่าได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด (LoD) เท่ากับ 2 เฟมโตกรัม ซึ่งในการวิจัย

ครั้งนี้ใช้ยีน *IS711* เช่นเดียวกันพบว่าให้ผลเหมือนกัน ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Probert *et al.* (2004) ที่ให้ค่า LoD สูงกว่ามาก ส่วนการศึกษาที่ใช้ ยีนเป้าหมายที่แตกต่างกัน โดย Sohrabi *et al.* (2014) ได้ศึกษาโรค布鲁เซลโลสิสในคนที่ติดเชื้อ *B. melitensis* จากตัวอย่างซีรัมโดยวิธี Real-time PCR ใช้ยีน *bcs31* และ Bogdanovich *et al.* (2004) ที่ ใช้ยีน *per* ในการตรวจหาเชื้อ布鲁เซลลาพบว่า ได้ค่าดี เอ็นเอต่ำสุด (LoD) ของเชื้อ *B. melitensis* ที่มีค่าสูง กว่าการศึกษาครั้งนี้ และจากการศึกษาการทดสอบ ความจำเพาะกับเชื้อ *non-Brucella* spp. พบว่า ให้ผลลบต่อเชื้อ *Brucella* spp. คิดเป็น 100% เหมือนกับการศึกษาของ Bogdanovich *et al.* (2004) Probert *et al.* (2004) Bounaadja *et al.* (2009) และ Sohrabi *et al.* (2014) ดังนั้นวิธี Real-time PCR สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *B. melitensis* ได้จากผลการเปรียบเทียบวิธีการ ตรวจหาเชื้อ *B. melitensis* โดยวิธี Real-time PCR กับวิธีการเพาะแยกเชื้อ จากตัวอย่างอวัยวะของแพะ เนื้อครั้งนี้ พบว่าได้ค่าความไว (Sensitivity) ค่า ความจำเพาะ (Specificity) และค่าความถูกต้อง

(Accuracy) ค่อนข้างสูง ส่วนวิธีการเพาะแยกเชื้อ สามารถตรวจพบเชื้อ *B. melitensis* ได้น้อยกว่าวิธี Real-time PCR อาจเนื่องมาจากเชื้อ布鲁เซลลาเป็น เชื้อที่โตช้าและเพาะเลี้ยงเชื้อมาก (Seleem *et al.*, 2010) และอาจเกิดจากผลลบเท็จ (false negative) จากการเพาะแยกเชื้อ เนื่องจากตัวอย่างที่ทดสอบมี การปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่น ทำให้ไม่สามารถดูโคโลนี ของเชื้อ布鲁เซลลาได้อย่างชัดเจนหรืออาจเป็นผลมา จาก เกิดการยับยั้งเชื้อของยาบางตัวที่อยู่ในอาหาร selective agar ที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *B. melitensis* (Blasco, 1992) วิธี Real-time PCR เป็นวิธีที่ สามารถเพิ่มจำนวนผลบวกของสัตว์ที่ติดเชื้อได้ใน กรณีที่ตรวจด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาหรือวิธีการเพาะ แยกเชื้อแล้วให้ผลการตรวจเป็นลบ (Hinic *et al.*, 2009) จากการศึกษการตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโล สิสโดยวิธี Real-time PCR ในครั้งนี้ สามารถใช้ตรวจ โรคจากสิ่งส่งตรวจได้โดยตรง โดยไม่ต้องใช้วิธีการ เพาะแยกเชื้อ ทำให้ลดการสัมผัสเชื้อและลดความ เสี่ยงในการติดเชื้อจากการปฏิบัติงานได้ การตรวจ วินิจฉัยโรค布鲁เซลโลสิสที่มีความถูกต้อง มี ความสำคัญมากในการควบคุม และกำจัดเชื้อ วิธี

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *B. melitensis* จากตัวอย่างอวัยวะ ระหว่างวิธี Real-time PCR กับวิธีการเพาะแยกเชื้อ โดยวิธี chi-square

		Isolation		
		+	-	Total
Real-time PCR	+	49	19	68
	-	4	248	252
Total		53	267	320
ความ ไว (Sensitivity)	=	$49/(49+4) \times 100$		= 92.45%
ความจำเพาะ (Specificity)	=	$248/(248+19) \times 100$		= 92.88%
ความถูกต้อง (Accuracy)	=	$(49+248)/(49+19+4+248) \times 100$		= 92.81%

Real-time PCR เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว มีความไวเป็นที่ยอมรับ สำหรับตรวจวินิจฉัยโรค布鲁เซลโลซิส ความถูกต้อง แม่นยำ และความจำเพาะ ค่อนข้างสูง รวมทั้งลด ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ได้ ปัจจุบันราคา ค่อนข้างถูก สามารถนำมาใช้ตรวจในบริเวณที่เป็น endemic area ได้ และแนะนำใช้เป็นทางเลือกใน การตรวจเชื้อ布鲁เซลลา (Probert *et al.*, 2004; Redkar *et al.*, 2001)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ พบว่าวิธี Real-time PCR สามารถตรวจหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต่ำมาก ซึ่งใช้ primers และ probe ที่มีความจำเพาะต่อยีน IS711 ของโรค布鲁เซลโลซิส พบมีค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) และค่า ความถูกต้อง (Accuracy) ค่อนข้างสูง สามารถ นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีความปลอดภัย รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ ได้อีกวิธีหนึ่ง เพื่อให้เพิ่ม ประสิทธิภาพในการชันสูตรโรค布鲁เซลโลซิสได้ถูกต้อง และรวดเร็วมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มอิมมูน และซีรัมวิทยา และเจ้าหน้าที่กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อ รา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ทุกๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ และขอขอบคุณ Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang, Gyeonggi do, สาธารณรัฐเกาหลีที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- อโณทัย โกศาภิกรณ์. 2549. เอกสารประกอบประชุม เชิงปฏิบัติการ เรื่อง Introduction to Real time-PCR and its applications. ภาควิชา พยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietz, D.E. 1975. Laboratory techniques in brucellosis, second ed. Monograph Series No. 55 World Health Organisation, Geneva.
- Blasco, J.M. 1992. Diagnosis of *Brucella melitensis* infection in small ruminants. In: Plommet, M. (Ed.), Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries. Puduc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands. 272-278.
- Blood, D.C. and Henderson, J.A. 1968. Veterinary medicine. Bailliere Tindal Cassel Ltd. London, England.
- Bogdanovich, T., Skurnik, M., Lubeck, P.S., Ahrens, P. and Hoorfar, J. 2004. Validated 5' Nuclease PCR Assay for Rapid Identification of the Genus *Brucella*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2261-2263.
- Bounaadja, L., Albert, D., Chenais, B., Henault, S., Zygmunt, M.S., Poliak, S. and Garin-Bastuji, B. 2009. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. *Vet. Microbiol.* 137:156-164.

- Bricker, B.J. 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90: 435-446.
- Godfroid, J., Cloeckart, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B. and Letesson, J.J. 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 36: 313-326.
- Hinic, V., Brodard, I., Thomann, A., Holub, M., Miserez, R. and Abril, C. 2009. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC Vet. Res.* 5:22.
- Kanitpun, R., Ekgatat, M., Thammasart, S. and Nokdhes, C. 2006. Identification of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *J. Regional Bureau Anim. Health Sanitary.* 6. 3: 1-9.
- Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positive with PCR. *Nature.* 339: 273-8.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Microbiology.* 8: 60-66.
- Nielsen, K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* 90: 447-459.
- Office International Des Epizooties. 2012. (cited 18 July 2013). Terrestrial Manual. Biosafety and biosecurity in the veterinary microbiology laboratory and animal facilities. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY.pdf.
- Pappas, G., Panagopoulou, P., Akritidis, N., Christou, L. and Tsianos, E.V. 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* 6: 91-99.
- Pellicer, T., Ariza, J., Foz, A., Pallares, R. and Gudiol, F. 1988. Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. *J. Infect. Dis.* 157: 918-924.
- Probert, W.S., Schrader, K.N., Khuong, N.Y., Bystrom, S.L. and Graves, M.H. 2004. Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1290-1293.
- Redkar, R., Rose, S., Bricker, B. and DelVecchio, V. 2001. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probe.* 15: 43-52.
- Seleem, M.N., Boyle, S.M. and Sriranganathan, N. 2010. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Vet. Microbiol.* 140: 392-398.
- Sohrabi, M., Mobarez, A.M., Khoramabadi, N., Doust, R.H. and Behmanesh, M. 2014. Efficient diagnosis and treatment

follow-up of human brucellosis by a novel quantitative TaqMan real-time PCR assay: A human clinical survey. *J. Clin. Microbiol.* 52: 4239-4243.

