RESEARCH ARTICLE

Development of *Burkholderia pseudomallei* Detection Kit by Paper Chromatography Dot Blot Hybridization Technique

Wonganun Narongwanichgarn[1*], Wacharachai Narongsak[2], Ubonrat Thanklang[2]

Abstract

Objective—This study has developed a rapid test kit based on hybridization and chromatography technique for detection *Burkholderia pseudomallei*.

Materials and Methods—Firstly selected primers were tested for specificity to *B. pseudomallei*. Then biotin-labeled probe and non-labeled PCR product were synthesized. After that test strip was prepared by blotting DNA of *B. pseudomallei* DMST 21791 or negative reference control group, non-labeled PCR product and probe onto nylon membrane and fixed the nylon membrane by UV crosslink. Then the tested strip was placed into 25 µL of hybridization solution containing biotin-labeled probe. By using chromatography technique which performed at 70°C in waterbath, probe migrated speedily on nylon membrane and hybridized to a complementary DNA immobilized on a nylon strip. After washing out and blocking the excess probe, the strip was dipped to streptavidin-alkaline phosphatese and NBT/BCIP solution respectively to develop the signal.

Results—Negative reference control group were presented nothing at the blot position, while the spot of *B. pseudomallei* DMST 21791 DNA which trapped the probe showed violet or blue color, like the spot of control and non-labeled PCR product dot for control the probe that showed the same color.

Conclusion—This test kit offered a fast, convenient and simple tool for *B. pseudomallei* detection. However, additional work should be performed to simplify the methods for direct detection of this bacterium in clinical samples.

KKU Vet J. 2013;23(1):51-60. http://vmj.kku.ac.th/

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*; Hybridization; Test kit

[1]Biochemistry and toxicology section, [2] Bacteriology section, National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development

[*]**Correspondence author** Tel. 02-5798908-14 E-mail: rhchu@hotmail.com

การพัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจหาเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยเทคนิค Paper Chromatography Dot Blot Hybridization

วงศ์อนันต์ ณรงค์วาณิชการ[1*], วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์[2], อุบลรัตน์ แทนกลาง[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจหาเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชั่นร่วมกับโครมาโตกราฟี

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ ขั้นแรกทำการทดสอบไพรเมอร์ที่เลือกใช้ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* เท่านั้น จากนั้นจึงสังเคราะห์ตัวติดตามที่ติดและไม่ติดฉลากสารปลอดรังสี Biotin ขึ้น ต่อมาเตรียมแผ่นทดสอบด้วยการหยดดีเอ็นเอสายเดี่ยวของเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน ตัวติดตามที่ติดและไม่ติดฉลากสารปลอดรังสีลงไปบนแผ่นไนล่อนก่อนตรึงด้วยการฉายแสงอุลตร้าไวโอเลต จากนั้นนำแผ่นทดสอบใส่ในหลอดที่แช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 70°C ซึ่งภายในหลอดมีตัวติดตามที่ติดฉลากผสมกับสารละลายไฮบริไดเซชั่นอยู่ 25 μL และจะถูกดูดซึมขึ้นไปบนแผ่นทดสอบอย่างรวดเร็วด้วยหลักการโครมาโตกราฟีที่มีความร้อนเป็นตัวเร่ง ตัวติดตามที่ติดฉลากที่ถูกดูดซึมขึ้นไปนั้น จะทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นกับดีเอ็นเอที่ติดบนแผ่นทดสอบ จากนั้นป้องกันพื้นผิวส่วนอื่นของแผ่นทดสอบโดยล้างตัวติดตามที่ติดฉลากที่มากเกินออกไป ภายหลังจากนำแผ่นทดสอบไปแช่ในสารละลาย streptavidin-alkaline phosphatase และ NBT/BCIP ตามลำดับ จึงสามารถสังเกตผลการทดสอบได้

ผลการศึกษา ในกรณีที่เป็นเชื้ออ้างอิงมาตรฐานอื่นๆ จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆบนแผ่นทดสอบ แต่ถ้าเป็นเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *B. pseudomallei* DMST 21791 จะเห็นสีม่วงหรือน้ำเงินติดอยู่ตรงตำแหน่งที่หยดดีเอ็นเอเชื้อตัวอย่าง เช่นเดียวกับตำแหน่งที่หยดตัวติดตามที่ติดฉลากลงไปเพื่อควบคุมปฏิกิริยาการเกิดสี และตำแหน่งที่หยดตัวติดตามที่ไม่ติดฉลากลงไปเพื่อควบคุมตัวติดตามที่ติดฉลากที่ผสมอยู่ในสารละลายไฮบริไดเซชั่น

ข้อสรุป ชุดทดสอบที่ได้รับการพัฒนาขึ้นนี้ มีวิธีใช้ที่ง่าย สะดวก ให้ผลรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม ชุดทดสอบนี้สามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อให้เหมาะกับการทดสอบเชื้อที่อยู่ในตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือรอยโรคต่างๆโดยตรง

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2556;23(1):51-60. http://vmj.kku.ac.th/

คำสำคัญ: ชุดทดสอบ *Burkholderia pseudomalei* Hybridization

[1]กลุ่มชีวเคมีและพิษวิทยา [2] กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** โทร. 02-5798908-14 E-mail: rhchu@hotmail.com

บทนำ

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน โคลน และแหล่งน้ำนิ่งในพื้นที่เขตร้อน เช่น ในกลุ่มประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศออสเตรเลีย โดยเฉพาะประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อกระจายทั่วประเทศ และพบมากใน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ [1] เชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิสในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด เช่น โค กระบือ อูฐ เนื้อทราย จิงโจ้ กระต่าย หนูตะเภา [2] สุกร แพะ และแกะ [3, 4] และจัดเป็นเชื้ออันตรายใน List B ของ CDC ซึ่งสามารถใช้เป็นอาวุธชีวภาพที่ยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค [5] การติดโรคเกิดจากการหายใจเอาฝุ่นผงหรือกินอาหารและน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน หรือทางผิวหนังที่มีบาดแผล [6] สัตว์ป่วยมักแสดงอาการไม่เด่นชัดแม้จะป่วยแบบเรื้อรังที่มักพบรอยโรคฝีหนองในอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด ตับ ไต การควบคุมการระบาดของโรคสามารถทำได้โดยการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มต่อกันโรคโดยวิธี indirect haemagglutination test (IHA) แล้วคัดแยกสัตว์ที่มีระดับภูมิคุ้มต่อโรคสูงออกจากฝูงเพื่อทำลาย

การตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ทำได้โดยการเพาะแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อสัตว์ป่วยตายที่มีรอยโรคด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ร่วมกับการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมี ซึ่งโคโลนี ของเชื้อจะมีลักษณะและกลิ่นที่จำเพาะ [7] ส่วนเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแกรมลบ เมื่อย้อมด้วยสี Gram หรือ Wayson จะติดสีเข้มหัวท้ายดูคล้ายเข็มกลัดซ่อนปลาย แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดในด้านความรวดเร็ว และความชำนาญ ปัจจุบัน มีการใช้เทคนิคอณูชีวโมเลกุลในการตรวจวินิจฉัยแยกเชื้อดังกล่าว เช่น Polymerase chain reaction (PCR) และ Hybridization [8-10] และ real time PCR [11, 12] เพราะเป็นเทคนิคที่มีความไว ความจำเพาะและความแม่นยำสูง สามารถตรวจหาเชื้อที่มีจำนวนเล็กน้อย หรือในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนสูง หรือในสภาวะที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ เช่น เชื้อที่เป็นสาเหตุก่อโรคตายหรือมีการใช้ยาปฏิชีวนะก่อนเก็บตัวอย่างส่งตรวจ แต่เทคนิคเหล่านี้ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และผู้ปฏิบัติการต้องมีทักษะและความชำนาญ

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาชุดทดสอบด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุลสำหรับตรวจวินิจฉัยแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ให้มีวิธีใช้ที่ง่ายเหมาะสำหรับบุคลากรในห้องปฏิบัติการทั่วไป ไม่จำเป็นต้องมีประสบการณ์และใช้เครื่องมือพิเศษที่มีราคาแพง นอกจากนี้ ยังให้ผลการตรวจวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและรวดเร็ว เพื่อการป้องกันควบคุมและรักษาโรคอย่างทันเหตุการณ์ด้วย

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อ *B. pseudomallei* ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ได้จากการรวบรวมเชื้อก่อโรคที่เพาะแยกได้ จากสัตว์ป่วยตายที่ส่งชันสูตรโรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช) และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาค (ศวพ) 7 แห่ง จำนวน 20 ตัวอย่าง เชื้อที่เพาะแยกได้จากดิน 1 ตัวอย่าง [1] และเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน DMST 21791 Lot. 892 (NIH 140/49), *Burkholderia cepacia* DMST 21723 Lot897 และ ATCC 17759 (DMST 15500 Lot896), *Burkholderia thailandensis* ATCC 700388 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเชื้ออ้างอิงมาตรฐานชนิดอื่น ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยเพาะเชื้อทุกชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง ใช้สำหรับทำการสกัดดีเอ็นเอในขั้นต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

เขี่ยเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *B. pseudomallei* DMST 21791 เชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะแยกได้จากสัตว์ป่วยตายและดิน 21 ตัวอย่าง และเชื้ออ้างอิงมาตรฐานชนิดอื่นที่กล่าวไว้ข้างต้น ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) pH 7.5 ปริมาตร 1 mL ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 25 mM NaOH 100 µL ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100°C 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดทดลองใหม่เก็บที่ -20°C สำหรับการทดลองต่อไป

การสังเคราะห์ตัวติดตาม (Probe synthesis)

เลือกยีน Type III secretion system (TTS1) (GenBank accession no. AF074878) ซึ่งมีรายงานว่าเป็นยีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* เท่านั้น (13) โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสที่ 4176-4290 เป็นแบบสำหรับสังเคราะห์ตัวติดตามด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ Forward ที่ติดและไม่ติดฉลากสารปลอดรังสี Biotin บริเวณปลาย 5' คือ BpTTF-B (5-Biotin-CGTCTCTATACTGTCGAGCAATC G-3) หรือ BpTTF (5-CGTCTCTATACTGTCGAGCAATCG-3) และ BpTTR (5-CGTGCACACC GGTCAG-TATC-3) (11) ซึ่งในขั้นตอนแรกทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ BpTTF/R โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 10 x PCR buffer 2.5 µL 2.5 mM dNTPs 2.0 µL ไพรเมอร์ BpTTF/R 20 µM 0.25 µL Hotstart Taq DNA polymerase 0.2 µL และดีเอ็นเอเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *B. pseudomallei* DMST 21791 หรือเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะแยกได้จากสัตว์ป่วยตายและดิน 21 ตัวอย่าง หรือเชื้ออ้างอิงมาตรฐานชนิดอื่น 2.0 µL เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 µL ในขณะเดียวกัน มีหลอดที่ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอเพื่อควบคุมผลบวกเท็จ ส่วนในปฏิกิริยาพีซีอาร์สังเคราะห์ตัวติดตาม ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* DMST 21791 และไพรเมอร์ BpTTF-B/R แทน นำหลอดตัวอย่างทั้งหมด

ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 95°C 15 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ 95°C 30 วินาที 62°C 30 วินาที และ 72°C 30 วินาที 40 รอบ และ 72°C 10 นาที 1 รอบ และควบคุมอุณหภูมิสุดท้ายที่ 4°C หลังจากนั้นตรวจผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธี Gel electrophoresis และใช้ Qiagen gel extraction kit (QIAGEN, Germany) ในการขจัดสารตั้งต้นที่เหลือเพื่อให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์

การวัดความเข้มข้นของตัวติดตาม

ทำการหยดตัวติดตาม (ผลผลิตพีซีอาร์ : BpTTF-B/R) ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ปริมาตร 0.5, 1, 2, 3 และ 4 µL ลงบนแผ่นไนล่อน ทิ้งให้แห้ง แล้วตรึงดีเอ็นเอด้วยวิธี UV crosslink โดยฉายแสงอุลตร้าไวโอเลตแผ่นไนล่อนที่วางใต้หลอด UV 20 ซม. นาน 4 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย Streptavidin-Alkaline phosphatase : Blocking solution (0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl) 1: 2,000 µL 10 นาที ล้างด้วย Blocking solution แล้วนำไปแช่ใน PBS pH 9.5 สุดท้ายจึงนำไปแช่ในสารละลาย NBT/BCIP เก็บไว้ในที่มืด สังเกตผลภายใน 10 – 30 นาที จะเห็นจุดสีม่วงหรือน้ำเงินที่มีความเข้มของสีแตกต่างกันตามปริมาตรตัวติดตามที่หยดตรงตำแหน่งนั้น

การเตรียมเชื้อที่ต้องการทดสอบด้วยปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่น

เขี่ยเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *B. pseudomallei* DMST 21791 และเชื้ออ้างอิงมาตรฐานชนิดอื่น ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งชนิดละหนึ่งโคโลนีใส่ในน้ำกลั่น 20 µL แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาทีและแช่อยู่ในน้ำเย็น 4°C เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยว

การเตรียมแผ่นทดสอบ

ในการศึกษานี้ ใช้แผ่นไนล่อน (S & S Nytran® Supercharge, Schleicher & Schuell, Germany) ขนาด กว้าง x ยาว เท่ากับ 0.4 x 4 ซม. เป็นตัวกลางสำหรับดูดซับดีเอ็นเอ นำแผ่นไนล่อนดังกล่าววางบนกระดาษกรองและหยดผลผลิตพีซีอาร์และดีเอ็นเอตามตำแหน่งที่กำหนดสามจุด คือ จุดที่หนึ่งอยู่ด้านบนสุดหยดสารละลายตัวติดตามที่บริสุทธิ์ BpTTF-B/R 0.5 µL จุดที่สองและสามที่อยู่ถัดลงมาหยดสารละลายพีซีอาร์ปกติ BpTTF/R และดีเอ็นเอสายเดี่ยวของเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *B. pseudomallei* DMST 21791 เท่านั้น หรือเชื้ออ้างอิงมาตรฐานชนิดอื่น จากนั้นทำการตรึงดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต

การทำปฏิกิริยา Hybridization

เมื่อทราบความเข้มข้นของตัวติดตามที่ผลิตได้ เติมตัวติดตามที่บริสุทธิ์ BpTTF-B/R 2 µL ลงในสารละลาย Prehybridization (DIG Easy Hyb, Roche, Germany) 23 µL ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาทีและแช่น้ำเย็น 4°C ทันที ใส่แผ่นทดสอบที่ตรึงดีเอ็นเอไว้ลงไป แล้วย้ายหลอดไปแช่ในน้ำร้อน 70°C รอจนสารละลายซึมขึ้นไปบนแผ่นทดสอบจนหมด จึงย้ายแผ่นทดสอบไปไว้ในหลอด Washing buffer อุ่น 70°C (2 x SSC, 1% SDS) เขย่าแรงๆ แล้วย้ายไปแช่ในหลอด Blocking solution 1 mL จากนั้นย้ายไปแช่ในหลอด Streptavidin-Alkaline phosphatase :

Blocking solution 1: 2,000 µL นาน 10 นาที ย้ายไปแช่ใน Washing buffer และ Blocking solution อย่างละ 5 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปแช่ใน PBS pH 9.5 สุดท้ายจึงนำไปแช่ในสารละลาย NBT/BCIP เก็บไว้ในที่มืด 10 – 30 นาที สังเกตผลที่ได้เป็นจุดสีม่วงหรือน้ำเงิน

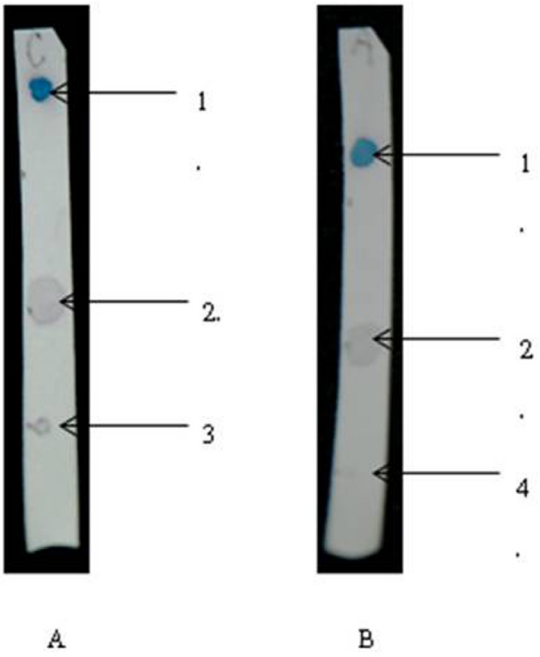
ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ BpTTF/R ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 115 bp จากเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *B. pseudomallei* DMST 21791 และเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะแยกได้จากสัตว์ป่วยตายและดิน 21 ตัวอย่าง เท่านั้น ส่วนเชื้ออ้างอิงมาตรฐานชนิดอื่นให้ผลลบ เมื่อทำการสังเคราะห์ตัวติดตามโดยวิธีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ BpTTF-B/R พบว่าได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดเดียวกับที่ได้จากไพรเมอร์ BpTTF/R จากการวัดความเข้มข้นของตัวติดตามเพื่อหาปริมาตรที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไปพบว่า ตัวติดตาม BpTTFB/R ปริมาตร 2 µL ขึ้นไปจะให้สีม่วงหรือน้ำเงินชัดเจนภายใน 10 นาที เมื่อวางแผ่นทดสอบที่มีดีเอ็นเอทดสอบตรึงอยู่ลงในหลอดทดลองบรรจุสารละลายตัวติดตามที่วางอยู่ในน้ำร้อน 70°C สารละลายจะถูกดูดซึมผ่านแผ่นทดสอบจากด้านล่างสู่ด้านบนจนหมดโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี ภายในระยะเวลาเพียง 15 นาที ภายหลังขั้นตอนการล้างตัวติดตามที่มากเกินไป การป้องกันการเกาะของตัวติดตามบนพื้นผิวบริเวณอื่นของแผ่นทดสอบ และการติดตามตัวติดตามโดยใช้ Streptavidin – Alkaline phosphatase และ NBT/BCIP จะพบสีม่วงหรือน้ำเงินสามจุดเรียงจากด้านบนลงล่างบนแผ่นทดสอบที่ใช้ดีเอ็นเอของเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *B. pseudomallei* DMST 21791 เท่านั้น (**Figure 1**) ส่วนแผ่นทดสอบที่ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐานชนิดอื่นจะพบสีม่วงน้ำเงินเพียงสองจุด คือ จุดที่หยดตัวติดตาม BpTTF-B/R ที่อยู่ด้านบนและจุดที่หยดผลผลิตพีซีอาร์ BpTTF/R ตรงกลางของแผ่นทดสอบเท่านั้น

วิจารณ์

เชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากเนื้อเยื่อสัตว์ป่วยตายที่ส่งตรวจยัง สสช. และ ศวพ. ต่างๆ ส่วนการเพาะแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อที่มีรอยโรคหรือฝีหนองจากสัตว์ที่ถูกทำลายเพราะมีระดับความคุ้มโรคที่ตรวจด้วยวิธี IHA สูงนั้น มักไม่พบเชื้อในทุกราย และยังไม่สามารถเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างดินที่เก็บจากฟาร์มที่มีสัตว์ป่วยได้ ทำให้เชื้อที่ใช้การศึกษานี้มีจำนวนน้อย ทั้งนี้ มีรายงานว่า สามารถเพาะแยกเชื้อ *B. pseudomallei* จากสัตว์ป่วยที่มีระดับไตเตอร์ 1:40 แต่ไม่พบเชื้อในสัตว์ที่มีระดับไตเตอร์ 1:1,280 [14] แสดงว่า ระดับภูมิคุ้มโรคที่ตรวจโดยวิธี IHA นั้นไม่สัมพันธ์กับการเพาะแยกเชื้อ ดังนั้นในฟาร์มที่เคยมีประวัติสัตว์ป่วยตายด้วย โรคเมลิออยโดซีสนั้น ไม่ควรละเลยสัตว์ที่มีระดับความคุ้มโรคต่ำเมื่อตรวจด้วยวิธี IHA ในขณะที่ มีรายงานว่า *B. pseudomallei* สามารถอยู่รอดใน macrophage ได้ [15, 16] ข้อมูลดังกล่าวนี้จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่สามารถอธิบายได้

Figure 1. The Test Kits for Detection of *B. pseudomallei* DMST 21791[a]



[a]The test kits for detection of *B. pseudomallei* DMST 21791 had shown in Fig 1A and Fig 1B with *S. aureus* ATCC 25923 as a negative control. The positive result showed blue or purple color (1 = BpTTF-B/R probe, 2 = non-labeled single strand PCR product BpTTF/R and 3 = *B. pseudomallei* DMST 21791 single strand DNA), while no signal as negative result shown (4 = *S. aureus* ATCC 25923 single strand DNA).

ว่า การเพาะแยกเชื้อไม่ได้ผลในสัตว์ที่สงสัยว่าติดเชื้อได้ ส่วนการค้นหาข้อมูลพันธุกรรม พบว่า *B. pseudomallei* มีรหัสพันธุกรรมที่จำเพาะ [13] และ สามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวออกแบบไพรเมอร์จำเพาะในการตรวจวินิจฉัยแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยเทคนิค Real time PCR [11] ซึ่งข้อมูลพันธุกรรมและไพรเมอร์จำเพาะดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้สังเคราะห์ตัวติดตามที่ติดฉลากด้วย Biotin ในการศึกษานี้ด้วย

การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้และการสังเคราะห์ตัวติดตามนั้น เลือกเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่างโดยวิธีต้มในสารละลาย 25 mM NaOH เพราะง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความปลอดภัยเพราะไม่ได้ใช้สารเคมีอันตรายมากและเชื้อยังถูกทำลาย ดีเอ็นเอที่ได้เหมาะสำหรับใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์และไฮบริไดเซชั่นด้วย การศึกษาครั้งนี้พบว่าไพรเมอร์ BpTTF/R มีความจำเพาะต่อเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *B. pseudomallei* DMST 21791 เชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะแยกได้จากสัตว์ป่วยตายและดิน 21 ตัวอย่าง เท่านั้น จากผลการศึกษาข้างต้น จึงทำการติดฉลากสารปลอดรังสี Biotin ไพรเมอร์ดังกล่าว แล้วนำมาใช้สังเคราะห์ตัวติดตามจากเชื้ออ้างอิง

มาตรฐาน *B. pseudomallei* DMST 21791 ด้วยวิธีพีซีอาร์ เนื่องจากมีข้อดีคือ ปลอดภัย ราคาถูก และได้ปริมาณตัวติดตามมาก [11] โดยใช้เพียง 2 μL เท่านั้นในปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่น อย่างไรก็ตาม จำเป็นจะต้องวัดความเข้มข้นของตัวติดตามที่สกัดให้บริสุทธิ์แล้วทุกครั้ง จึงจะได้ผลการทดลองที่ดีในขั้นตอนต่อไป

ส่วนการเตรียมแผ่นทดสอบนั้น มีปัจจัยหลักสองประการ คือ การเลือกใช้ตัวกลางซึ่งมีหลายชนิด และการตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนตัวกลาง ซึ่งมีอยู่สองวิธี คือ การอบด้วยความร้อนที่ 80^0C นาน 2 ชั่วโมง และการฉายด้วยแสง UV นาน 4 – 5 นาที การศึกษานี้เลือกตรึงดีเอ็นเอด้วยแสง UV จึงช่วยให้การเตรียมแผ่นทดสอบเร็วขึ้น และเลือกใช้แผ่นไนล่อนเพราะมีความทนทานและสามารถเก็บไว้ได้นานก่อนทำการทดสอบ นอกจากนี้ หลังจากทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นกับตัวติดตาม BpTTF-B/R แล้ว สามารถล้างตัวติดตามที่ติดอยู่นั้นออกไป แล้วนำแผ่นทดสอบนั้นกลับมาใช้กับตัวติดตามที่จำเพาะต่อลำดับเบสอื่นของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ และในการศึกษานี้ใช้แผ่นทดสอบที่มีขนาด กว้าง x ยาว เพียง 0.4 x 4 ซม. เพราะสามารถทำการทดลองในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL ได้ เหมาะกับสารละลายปริมาตร 25 μL ทำให้สะดวกต่อการทดลองและลดต้นทุนการผลิตชุดทดสอบด้วย ส่วนการหยดดีเอ็นเอลงบนแผ่นทดสอบนั้น จุดที่อยู่ด้านบนหยดตัวติดตาม BpTTF-B/R เพื่อควบคุมผลการทดสอบภายหลังจากใช้สารละลาย Streptavidin – Alkaline phosphatase และ NBT/BCIP และจุดตรงกลางจะเป็นผลผลิตพีซีอาร์ปกติ BpTTF/R ที่เป็นสายเดี่ยว เพื่อตรวจสอบว่าตัวติดตาม มีการเคลื่อนที่จากด้านล่างขึ้นมายังด้านบนตามหลักการโครมาโตกราฟฟีหรือไม่ และจุดสุดท้ายที่อยู่ด้านล่าง หากดีเอ็นเอตัวอย่างและตัวติดตามเป็นชนิดเดียวกัน ปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นจะเกิดขึ้นเป็นลำดับแรก จะพบสีม่วงหรือน้ำเงินที่ตำแหน่งดังกล่าวภายหลังปฏิกิริยาสิ้นสุด หากดีเอ็นเอตัวอย่างและตัวติดตามเป็นคนละชนิดกัน สารละลายจะพาตัวติดตามซึมผ่านขึ้นไปโดยไม่เกิดปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่น และไม่พบสีม่วงหรือน้ำเงินที่ตำแหน่งดังกล่าว

ส่วนปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นนั้น โดยทั่วไปตัวติดตามจะอยู่ในสารละลายและเข้าไปจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ติดอยู่บนตัวกลาง ซึ่งต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 12 ชั่วโมง การศึกษานี้จึงใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีและไฮบริไดเซชั่นรวมอยู่ในขั้นตอนเดียวกันที่อุณหภูมิ 70^0C เพื่อลดข้อด้อยดังกล่าว คือ เมื่อวางแผ่นทดสอบลงในหลอดที่มีสารละลายตัวติดตามอยู่ สารละลายที่ถูกดูดซึมขึ้นไปบนแผ่นทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟฟี จะพาตัวติดตามขึ้นไปด้วย ซึ่งปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นจะเกิดขึ้นเมื่อตัวติดตามผ่านไปยังจุดที่ดีเอ็นเอตัวอย่างถูกตรึงไว้และอุณหภูมิ 70^0C นั้น นอกจากจะช่วยเร่งการดูดซึมเร็วขึ้น ยังทำให้ตัวติดตามคงสภาพเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวก่อนที่จะจับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอที่ถูกตรึงอยู่บนแผ่นไนล่อนได้ ทำให้ปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นเสร็จภายในเวลา 15 นาที และลดปริมาตรของสารละลายตัวติดตามที่ใช้ด้วย ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ได้พัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเทคนิค Paper chromatography dot blot hybridization ขึ้น ซึ่งมีวิธี

ใช้ที่ง่าย รวดเร็ว ให้ผลที่ถูกต้อง และราคาถูก สามารถใช้ผลการทดลองนี้เป็นต้นแบบสำหรับพัฒนาชุดทดสอบสำหรับเชื้ออื่นๆ ได้

แม้ว่าการศึกษานี้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ในการนำเทคนิคอณูชีวโมเลกุลมาพัฒนา ชุดทดสอบสำหรับตรวจวินิจฉัยแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ อย่างไรก็ตาม ชุดทดสอบนี้ยังมีข้อจำกัดคือ ตัวอย่างที่ใช้เป็นโคโลนีสงสัยที่ได้จากการเพาะเชื้อ แต่ไม่สามารถนำดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือฝีหนองมาทดสอบโดยตรง เพราะโปรตีนต่างๆ จะขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา ไฮบริไดเซชั่นได้ จึงเป็นประเด็นสำหรับการวิจัยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหัวหน้ากลุ่มแบคทีเรียวิทยาประจำศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาค ทั้ง 7 แห่ง และ รศ. น.สพ. นริศ นางาม ที่เอื้อเฟื้อเชื้อสายพันธุ์ท้องถิ่นที่ใช้ในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. Nangma N, Noimay P, Munlapai C. Incident of *Burkholderia pseudomallei* isolated from soil in northeast, north and south of Thailand. *J Nongkai Campus*. 1999;2(1):10-18.
2. Uppatum N, Leesirikul N. 1993. Lung lesion and causative agent in cattle and buffalo in northeast of Thailand. *Yearly Animal Health Report.* 1993;1-19.
3. Srinantapun S, Chanudom S, Suksaithaichana P, Sangsuwan W. Meliodosis in goat and pig in southern of Thailand. *Proceeding of the 5th Conference of Livestock.* 1986. p 314-324.
4. Witurakul C, Throngwongsa L, Chumnanpod C, Chaichanapunpol I. 1990. Melioidosis in lamp. *28th Veterinary Conference;* 1990 Jan 30. Kasetsart University. 1990. p. 171.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2002. “Melioidosis (Burkholderia pseudomallei.” Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/melioidosis_g.htm.
6. Barnes JL, Ketheesan N. 2005. “Route of infection in melioidosis. Emerging Infectious Diseases.” Available from: www.cdc.gov/eid.
7. Ashdown LR, Clarke SG. Evaluation of culture techniques for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:4011-4015.
8. Chen YS, David S, Chen SC, Chye SM, Chen YL. Recombinant truncated flagellin of *Burkholderia pseudomallei* as a molecular probe for diagnosis of melioidosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10:423-425.
9. Dhrarakul T, Songsivilai S, Viriyachitra S, Luangwedchakarn V, Tassaneetritap B, Chaowagul W. Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in patients with septicemic melioidosis. *J Clin Microbiol*. 1996;34: 609-614.
10. Gee JE, Sacchi CT, Glass MB, De BK, Weyant RS, Levett PN, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4647-4654.
11. Novak RT, Glass MB, Gee JE, Gal D, Mayo MJ, Currie BJ, et al. Development and evaluation of a real-

time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:85- 90.

12. Thibault FM, Valade E, Vidal DR. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5871-5874.
13. Winstanley C, Hart CA. Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara- phenotypes. *J Clin Microbiol.* 2000;38:883-885.
14. Sombatchaisak P, Sakdinun P, Titirak P. The titer level of *Burkholderia pseudomallei* infection in goat in Ratchaburi and Petchaburi province. *The Upper Northern Animal Health Newsletter*. 2003;2:6-12.
15. Pruksachartvuthi S, Aswapokee N, Thankerngpol K. Survival of *Pseudomonas pseudomallei* in human phagocytes. *J Med Microbiol*. 1990;31:109-114.
16. Jones AL, Beveridge TJ, Woods DE. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei. Infect Immun*. 1996;64:782-790.