

## การตรวจเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จากตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจ ด้วยวิธี real-time PCR

กัญญ์ณิส ลิ้มวิบูลพงศ์\* ชัยยงค์ สาก้า ฤชดา กาญจนเพ็ญ ชัยวลัญช์ ตุนาค

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 844 ม.9 ต.คลองกาว อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี 20220

\*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ : โทรศัพท์ 0-3874-2116 โทรสาร 0-3874-2120 email : kanthanis.l@dld.go.th

### บทคัดย่อ

*Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดก่อโรคที่พบในดิน เป็นสาเหตุให้เกิด Melioidosis ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่พบในคนและสัตว์หลายชนิด โรคนี้มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขและการปศุสัตว์ วิธีเพาะเชื้อเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* แต่มีขั้นตอนยุ่งยากและต้องอาศัยความชำนาญในการสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อ และการวินิจฉัยยืนยันว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* ต้องทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* โดยตรงจากตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจด้วยวิธีที่รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้บริเวณ type III secretion system (TTS1) gene cluster ของ open reading frame 2 (orf2) ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *B. pseudomallei* และสามารถแยกความแตกต่างกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ผลการทดสอบความจำเพาะให้ผล 100% ไม่มีปฏิกิริยาปนเปื้อนข้ามเกิดขึ้น ผลการทดสอบความไว สามารถหาปริมาณต่ำสุดของ DNA ได้ 124 copies/μl และผลการทดสอบความถูกต้องให้ผลสอดคล้องกับวิธีวิธีมาตรฐาน มีความถูกต้อง 100% วิธีการตรวจที่รวดเร็วนี้สามารถนำไปใช้ในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อ *B. pseudomallei* และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* ในคนและสิ่งแวดล้อมได้

คำสำคัญ : *Burkholderia pseudomallei*, Melioidosis, real-time PCR, Taqman probe

## บทนำ

*Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) ทำให้เกิด Melioidosis เป็นโรคติดเชื้อที่พบทั้งคนและสัตว์ เชื้อ *B. pseudomallei* จัดอยู่ในประเภท facultative intracellular gram-negative bacilli ในประเทศไทยพบได้ทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งสัมพันธ์กับการระบาดของโรคในคนที่พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Vuddhakul et al., 1990, Leelarasamee et al. 2005) และในสัตว์หลายชนิด ได้แก่ อูฐ ม้า แพะ แกะ สุกร โคอาล่า และสัตว์น้ำ (Forbes-Faulkner et al., 1992, Hicks et al., 2000, Ladds et al. 1990) โรคนี้จัดเป็นโรคประจำถิ่น สามารถติดเชื้อได้ทางบาดแผลที่ผิวหนัง การหายใจ และการกิน โดยการติดเชื้อทางบาดแผลที่ผิวหนังเป็นกลไกการติดเชื้อที่สำคัญที่สุดจากเชื้อที่อยู่ในดิน โคลน และแหล่งน้ำตามธรรมชาติ เชื้อที่แยกได้จากคน สัตว์และสิ่งแวดล้อมมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีการติดต่อจากสัตว์สู่คน มีรายงานการติดต่อจากคนสู่คนทางเพศสัมพันธ์และผ่านทางรกจากแม่สู่ลูก (สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์, 2015) การติดต่อจากสัตว์สู่คนอาจเกิดจากการสัมผัสเลือดหรือของเหลวจากร่างกายสัตว์เช่น ปัสสาวะ หรือน้ำนม โรคนี้เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข ผู้ป่วยมักมีความเสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ การติดเชื้อในสัตว์มีทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง การติดเชื้อแบบเฉียบพลันทำให้เกิดภาวะโลหิตเป็นพิษ ส่วนใหญ่สัตว์จะเป็นโรคแบบเรื้อรัง มักพบตุ่มหนองกระจายตามอวัยวะภายในและต่อมน้ำเหลืองบริเวณต่างๆ เช่น ม้าม ปอด ตับ ในสัตว์ที่ตายเฉียบพลันมักพบจุดเนื้อตายสีขาวกระจายที่ตับและม้าม และพบฝีกระจายอยู่ทั่วไปที่ปอด (CFSPH, 2007)

การเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกที่มีการปนเปื้อนเชื้อประจำถิ่นหรือเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น เสมหะ บาดแผล โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อพิเศษที่เรียกว่า Ashdown's medium ซึ่งมี crystal-violet glycerol และ gentamicin เป็นส่วนประกอบช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ ที่ปนเปื้อนมาทำให้สามารถสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ชัดเจนขึ้น ลักษณะโคโลนีของเชื้อนี้จะมี ความจำเพาะคือ จะมีลักษณะเหี่ยวยุบ ผิวขรุขระคล้ายดอกกะหล่ำและจะมีกลิ่นเฉพาะคล้ายกลิ่นไอระเหยจากดินหลังฝนตกใหม่ๆ เมื่อนำเชื้อมาย้อมสีแกรมจะมีลักษณะคล้ายเข็มกลัดซ้อนปลายเนื่องจากเชื้อจะติดสีบริเวณหัว-ท้าย การวินิจฉัยยืนยันว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* ต้องทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยทั่วไปเชื้อนี้ถูกจัดอยู่ในเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม non-lactose fermenter จะให้ผลบวกต่อ catalase และ oxidase เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้โดยอาศัยกระบวนการ oxidation อย่างไรก็ตามต้องตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่นๆ ของเชื้ออีกหลายอย่างเช่น ความสามารถในการรีดิวซ์สารไนเตรต การ

สร้างกรดโดยใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การเคลื่อนไหว การ hydrolyze สารต่างๆ เป็นต้น เพื่อการวินิจฉัยยืนยันว่าเป็นเชื้อนี้ เชื้อที่พบในธรรมชาติมีทั้งที่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose ได้ ( $Ara^+$ ) และไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดนี้ได้ ( $Ara^-$ ) เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose ได้ ต่อมาจึงมีการแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose ได้ซึ่งไม่ก่อโรคในมนุษย์ขึ้นเป็นสายพันธุ์ใหม่คือ *B. thailandensis* (ศิริลักษณ์, 2006)

Complete sequence genome ของเชื้อ *B. pseudomallei* ประกอบด้วยยีนต่างๆ เช่น 16S rRNA genes, *fliC*, *rpsU* และ type III secretion (TTS) gene cluster ซึ่งจากการศึกษาของ Kaestli et al. (2012) ได้ทำการทดสอบและเปรียบเทียบการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* โดยตรงจากตัวอย่างส่งตรวจ 50 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย เสมหะ 22 ตัวอย่าง เลือด 20 ตัวอย่าง และปัสสาวะ 8 ตัวอย่าง ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ genomic target หลายๆ ส่วน พบว่า genomic target TTS1-orf2 ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด โดยที่ให้ค่าความไวและความจำเพาะสูงที่สุด และให้ค่าปริมาณ DNA ต่ำสุดที่ตรวจได้ (limit of detection, LOD) ต่ำที่สุด

ปัจจุบันศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก ทำการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ทางซีรัมวิทยาโดยวิธี Indirect Haemagglutination (CFSPH, 2007) ซึ่งใช้คัดกรองโรคในระดับฝูง แต่อาจไม่เหมาะสมสำหรับพื้นที่ ที่เป็น endemic area เพราะอาจพบผลบวกในเลือดจากการที่สัตว์สัมผัสเชื้อในสิ่งแวดล้อมตั้งแต่เกิด (Wuthiekanun et al., 2009) และทำการทดสอบ Melioidosis จากซากสัตว์ป่วยและตาย โดยการเพาะแยกหาเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจ เช่น ปอด ตับ ม้าม ไต หัวใจ หลอดลม ต่อมเหงื่อ ต่อมทอนซิล และต่อมหนอง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (conventional method) (Quinn et al., 1994) ในกรณีที่อวัยวะส่งตรวจมีการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆ เป็นจำนวนมาก อาจมาจากตัวสัตว์หรือสิ่งแวดล้อม ถึงแม้จะมีการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อพิเศษแล้ว เชื้ออื่นๆที่ปนเปื้อนมาก็ยังสามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนเชื้อ *B. pseudomallei* จะเจริญเติบโตช้ากว่า ทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเฉพาะกรณีที่ตัวอย่างมีเชื้อในปริมาณน้อยมากๆ หรือเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการไม่มีความชำนาญในการตรวจเชื้อนี้ อาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการวินิจฉัยโรคได้ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคด้านชีวโมเลกุล มาใช้ในการทดสอบโรค เช่น conventional PCR, real-time PCR ซึ่งทั้งสองวิธีนี้จะมีค่าความจำเพาะสูงกว่า conventional method แต่ conventional PCR มีข้อด้อยคือความไวต่ำกว่า real-time PCR มีขั้นตอนยุ่งยากและใช้เวลามากกว่า วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เป็นการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* โดยใช้ Hydrolysis probe

หรือ Taqman probe ซึ่งเป็น dual-label probe คือมีทั้งตัวระงับสัญญาณ (quencher fluorophore) และ ตัวส่งสัญญาณ (reporter fluorophore) อยู่บน probe เส้นเดียวกัน ทำให้สามารถติดตามดูผลของปฏิกิริยา ได้ทุกระยะ ซึ่งวิธี real-time PCR เป็นวิธีที่ง่าย ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง และแม่นยำ สามารถตรวจโรค โดยตรงจากตัวอย่างส่งตรวจ ช่วยลดขั้นตอนและระยะเวลาในการทดสอบโรค สามารถตอบผลได้ภายใน เวลาอันรวดเร็ว

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ประวัติสัตว์

ซากสัตว์ป่วยและตาย ถูกส่งมาชันสูตรโรคที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก จากการผ่าซากสงสัย Melioidosis จำนวน 52 ตัวอย่าง ประกอบด้วยนกแก้วพันธุ์แอฟริกัน เกรย์ (African Grey) 10 ตัวอย่าง นกแก้วพันธุ์อิเล็กตัส (Electus) 5 ตัวอย่าง สุนัขพันธุ์สามสาย 7 ตัวอย่าง และจะเข้ 30 ตัวอย่าง

### ตัวอย่างสำหรับการ validate วิธี real-time PCR

- plasmid ของเชื้อ *B. pseudomallei* สำหรับทดสอบความไว
- เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จำนวน 30 ตัวอย่าง สำหรับทดสอบความจำเพาะ
- เชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะได้จากตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจ จำนวน 20 ตัวอย่าง และตัวอย่าง อวัยวะที่ตรวจโดยวิธีทางพยาธิวิทยาไม่พบการใดๆ และตรวจยืนยันด้วยวิธีเพาะเชื้อ ไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 50 ตัวอย่าง สำหรับทดสอบความถูกต้อง

### ตัวอย่างอวัยวะสำหรับทดสอบ real-time PCR

- ตัวอย่างอวัยวะกลุ่มที่พบการ แต่ผลเพาะเชื้อไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 30 ตัวอย่าง

### ตัวอย่างอวัยวะสำหรับทดสอบเปรียบเทียบระหว่าง real-time PCR กับวิธีการเพาะเชื้อ

- ตัวอย่างอวัยวะที่พบการจำนวน 22 ตัวอย่าง ประกอบด้วย นกแก้วพันธุ์ African Grey 10 ตัวอย่าง นกแก้วพันธุ์ Electus 5 ตัวอย่าง และสุนัขพันธุ์สามสาย 7 ตัวอย่าง

### primer และ probe

primer และ probe ที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้ออกแบบมาจากเชื้อ *B. pseudomallei* (GenBank accession no. AF074878) genomic target TTS1-orf2 (Novak et al., 2006) forward primer BpTT 4176F: 5'-CGTCTCTATACTGTCGAGCAATCG-3' reverse primer BpTT4290R: 5'-GTGCACACC GGTCAGTATC-3' probe BpTT4208P: 5'-FAM-CCGGAATCTGGATCACCACCACTTTCC-BHQ-3'

### การเตรียม plasmid standards

ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะได้จากตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจ โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับ genomic target TTS1-orf2 (BpTT4176F: 5'-CGTCTCTATACTGTCGAGCAATCG-3', BpTT4290R: 5'-GTGCACACCGGTCAGTATC-3') PCR product 115 bp ทำการแยกชิ้นส่วนของ DNA ด้วย gel Electrophoresis บน 1.5% agarose gel เมื่อนำ agarose gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation จะเห็นแถบ DNA ทำการตัดแถบ DNA ที่ขนาด 115 bp นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick gel purification kit (QIAGEN, Germany) วิธีการตามคู่มือของชุดสกัด จากนั้นนำ DNA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการโคลนนิ่งโดยนำชิ้นส่วนของ DNA เชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T easy vector system (Promega, USA) เมื่อได้ recombinant plasmid แล้วจึงทำการ transform เข้าสู่ competent cells *E. coli* สายพันธุ์ JM109 (Promega, USA) spread cell suspension ลงใน IPTG and X-gal for blue/white selection agar plates แล้วบ่มที่ 37°C นาน 14-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือก white colony และทำ colony PCR โดยใช้คู่ primer SP6 และ T7 promoter เลือกลำดับ DNA ที่มี insert เลี้ยงใน LB broth+Ampicillin 100 µg/ml บ่มที่ 37°C นาน 14-16 ชั่วโมง เก็บ cell โดยนำมาปั่นตกตะกอน 3-5 มิลลิลิตร นำส่วนที่เป็น pellet มาสกัด plasmid โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN, Germany) วิธีการตามคู่มือของชุดสกัด นำ plasmid ที่ได้มาทำการหาลำดับเบส โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer (Applied Biosystem, Solgent) ซึ่งข้อมูลที่ได้จะออกมาในรูปของ text file หรือ chromatogram นำผล sequencing ที่ได้ มาทำการวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.2 โดยนำลำดับ DNA ทั้งหมดมาจัดเรียง (align) เข้าด้วยกันจนกระทั่งมีความเหมือน (homology) สูงสุดด้วย ClustalW จากนั้นนำลำดับ DNA ไป blast ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่ามีความคล้ายกับเชื้อ *B. pseudomallei* strain sequence type III secretion system protein (ttsS) gene (97% identity) ซึ่งใช้เป็น reference เชื้อ *B. pseudomallei*

### การทดสอบหา condition ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR

ทำการหา condition ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real-time PCR โดยนำ plasmid ที่ได้มาวัด concentration โดยใช้ spectrophotometer (NanoDrop Lite, ThermoScientific) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 nm อ่านค่าได้ 22.4 ng/µl หา condition ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen life technologies, USA) master mix ประกอบด้วย Platinum Taq DNA Polymerase 2 Unit, 10X PCR buffer minus Mg 2.0 µl, dNTP mixture 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, forward primer : BpTT4176F 0.2 µM, reverse primer : BpTT4290R 0.2 µM, probe : BpTT4208P 0.2 µM, DNA template 5 µl และ DW PCR grade ปรับปริมาตรให้ได้ 20 µl ทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้เครื่อง LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche, Germany) software version. 2.0

real-time PCR condition ประกอบด้วย initial denaturation 95°C 2 นาที amplification 95°C 5 วินาที 60°C 40 วินาที จำนวน 45 รอบ cooling 40°C 30 วินาที เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์ ทำการวิเคราะห์ผลโดยเลือก format absolute quantification เพื่อคำนวณหาค่า crossing point (Cp)

#### การทำ standard curves

เจือจาง plasmid แบบ 10-fold serial dilution ที่ระดับ  $10^{-1}$ – $10^{-10}$  แล้วนำมาทำปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้คู่ primers และ probe genomic target TTS1-orf2 ชุดนี้ยาและ condition ตามที่ได้ทำการทดสอบไว้ดังกล่าวข้างต้น นำค่า Cp มาเขียนกราฟเส้นตรงแสดงจำนวนรอบและความเข้มข้นของ plasmid ที่ตำแหน่งใน exponential phase ของปฏิกิริยา ค่าที่ได้จากการเขียนกราฟ แสดงความน่าเชื่อถือ (reliability) และความคงทน (robustness) ของการทดสอบ (Pestana et al., 2010) และค่า  $R^2$  ควรมีค่ามากกว่า 0.95 (ประภาส, 2554)

#### การทดสอบความไว (sensitivity)

หาปริมาณ DNA ต่ำสุดที่ตรวจได้ (limit of detection, LOD) โดยนำ plasmid ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ได้เจือจางแบบ 10-fold serial dilution ให้มีระดับความเข้มข้น  $6.53 \times 10^9$  ถึง 6.53 copies/μl แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี real-time PCR genomic target TTS1-orf2 โดยแต่ละระดับทำการทดสอบซ้ำ 10 ครั้ง นำค่า Cp สุดท้ายที่ได้ในแต่ละรอบมาคำนวณเทียบกับ standard กราฟ และหาค่า 2 SD ซึ่งเป็นค่า LOD ตาม verification requirement ของ องค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration, FDA) (Espy et al., 2006)

#### การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

เพื่อทดสอบหาความจำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยทำการทดสอบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยวิธี real-time PCR genomic target TTS1-orf2 (Novak et al., 2006) โดยนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ (Table 1) มาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNA mini Kit (QIAGEN, Germany) วิธีการตามคู่มือของชุดสกัด

#### การทดสอบความถูกต้อง (accuracy)

เพื่อทดสอบหาความถูกต้องของวิธี real-time PCR genomic target TTS1-orf2 ดำเนินการทดสอบโดยนำตัวอย่างเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะเชื้อได้จากตัวอย่างส่งตรวจ จำนวน 20 ตัวอย่าง และตัวอย่างอวัยวะที่ตรวจโดยวิธีทางพยาธิวิทยาไม่พบการใดๆ และตรวจยืนยันด้วยวิธีเพาะเชื้อ ไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 50 ตัวอย่าง ตามที่ FDA กำหนด (Espy et al., 2006) มาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด

สำเร็จรูป DNA mini Kit (QIAGEN, Germany) วิธีการตามคู่มือของชุดสกัด และทำการทดสอบด้วยวิธี real-time PCR ซึ่งผลที่ได้จะต้องสอดคล้องกับวิธีอ้างอิงมากกว่า 90%

#### การเตรียมตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจสำหรับสกัดสารพันธุกรรม DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei*

ตัดอวัยวะส่งตรวจให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกรสำหรับตัดเนื้อเยื่อ โดยเลือกบริเวณที่มีวิธีการหรือบริเวณที่มีรอยโรค ตัวอย่างละประมาณ 25 มิลลิกรัม จำนวน 52 ตัวอย่าง

#### การสกัดสารพันธุกรรม DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei*

นำอวัยวะส่งตรวจที่ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ มาสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy blood & tissue kit (QIAGEN, Germany) โดยทำการย่อยด้วย ATL buffer 180  $\mu$ l ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 2-3 ชั่วโมงหรือจนกว่าเนื้อเยื่อจะย่อยจนหมด ทำการ vortex เป็นระยะ จากนั้นปฏิบัติตามวิธีของคู่มือของชุดสกัด เก็บรักษา DNA ที่อุณหภูมิ -20°C

#### การทดสอบตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจด้วยวิธี real-time PCR

นำ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจ จำนวน 52 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบโดยวิธี real-time PCR genomic target TTS1-orf2

### ผลการทดลอง

ผลการทำ standard curve ทำการวิเคราะห์แบบ absolute quantification ที่ dilution  $10^{-1}$  Cp = 11.83,  $10^{-2}$  Cp = 15.19,  $10^{-3}$  Cp = 19.16,  $10^{-4}$  Cp = 23.05,  $10^{-5}$  Cp = 23.05,  $10^{-6}$  Cp = 30.12 (Figure 1) จากนั้นทำการสร้าง standard curve โดยในแกน X จะเป็นค่า log ของความเข้มข้น dilution ต่างๆ และแกน Y เป็นค่า Cp ค่า Slope ที่ได้จาก standard curve (Figure 2) จะมีการคำนวณเป็นค่า Efficiency (E) เพื่อแสดงถึงความถูกต้องและประสิทธิภาพในการดำเนินไปของปฏิกิริยาโดย standard curve ที่ดีจะต้องใกล้เคียง -3.33 ซึ่งค่า E จะมีค่าเป็น 2 ตามสูตร  $E = 10^{-1/\text{slope}}$  ซึ่งผลจากการคำนวณของเครื่อง LightCycler 480 คำนวณได้ Slope = -3.910 ค่า Efficiency = 1.802 Error = 0.0752 Y Intercept = 6.284 และเมื่อนำค่า Cp มา plot กราฟเส้นตรงแสดงจำนวนรอบและความเข้มข้นของ plasmid ที่ตำแหน่งใน exponential phase ของปฏิกิริยา กราฟที่ได้เป็นเส้นตรงและความสัมพันธ์ในเชิงถดถอย  $R^2$  หรือสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination) เท่ากับ 0.999 (Figure 3.)

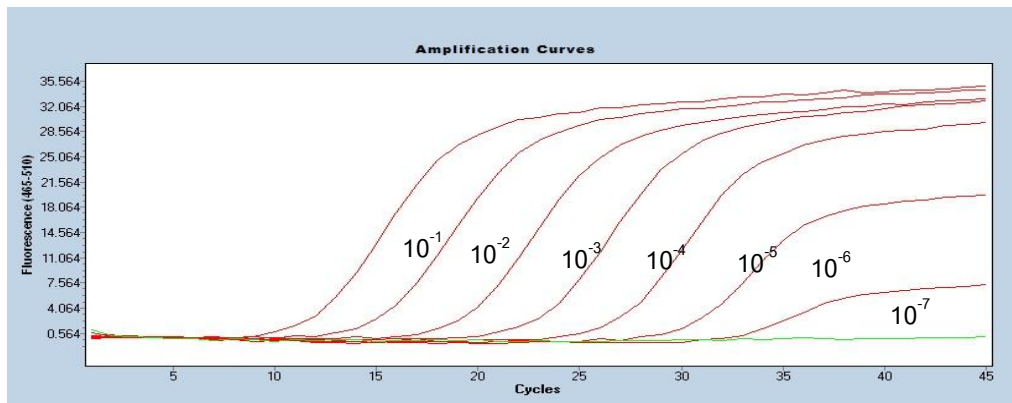


Figure 1. Fluorograph 10-fold serial dilutions used to determine limit of detection of real-time PCR assay

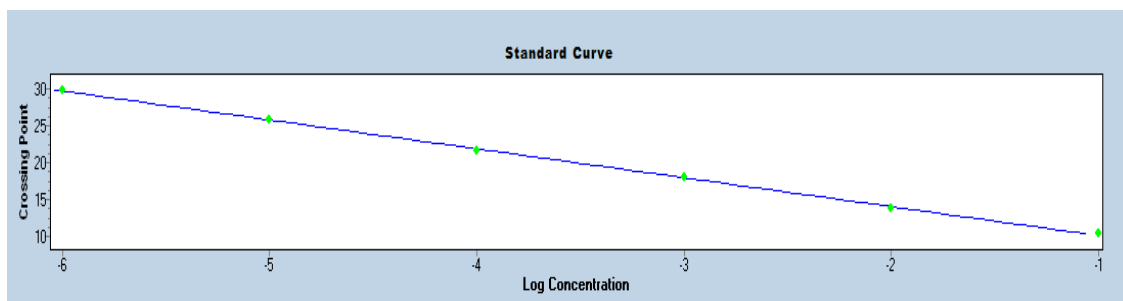


Figure 2. Standard curves of the 10-fold dilution plasmid *B. pseudomallei*

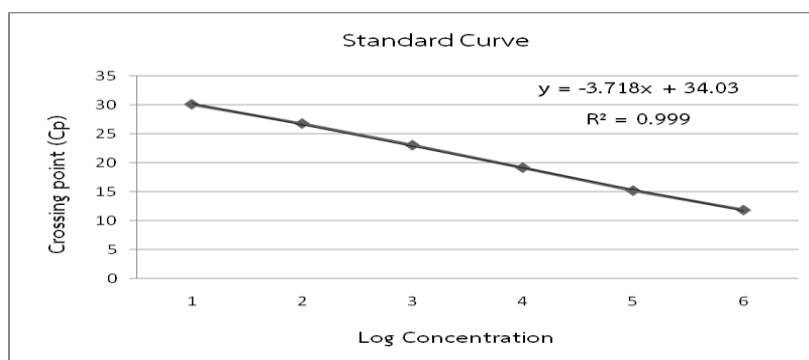


Figure 3. Linear dynamic range of the real-time PCR genomic target TTS1-orf2

สูตรคำนวณ copy number (Staroscik, 2011)

$$\text{number of copies (molecules)} = \frac{X \text{ ng} * 6.0221 \times 10^{23} \text{ molecules/mole}}{(N * 660 \text{ g/mole})^{\dagger} * 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

เมื่อ X = amount of amplicon (ng)

N = length of dsDNA amplicon (\*660 g/mole = average mass of 1 bp dsDNA)

ค่า OD ของ plasmid ที่วัดได้เท่ากับ 22.4 ng/μl ขนาดของ vector เท่ากับ 3015 bp และ pcr product 115 bp คำนวณ copy number ของ plasmid ได้เท่ากับ  $6.53 \times 10^9$  copies/μl



### ผลการทดสอบความไว (sensitivity)

จากการทดสอบซ้ำ 10 ครั้ง พบว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจได้ของเชื้อ *B. pseudomallei* อยู่ในช่วง  $10^{-7}$  ถึง  $10^{-8}$  = 326 ถึง 3,265 copies/reaction ซึ่งค่าที่ได้จาก standard กราฟ แสดงปริมาณต่ำสุดของ DNA ที่ตรวจได้เท่ากับ 326 copies/reaction ( $65 \text{ copies}/\mu\text{l} \times 5 \mu\text{l}/\text{reaction} = 326 \text{ copies}$ ) คำนวณหาค่า LOD จากค่า 2SD ได้เท่ากับ 2,478.38 copies/reaction คิดเป็น 124 copies/ $\mu\text{l}$

### ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity)

จากการทดสอบเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยวิธี real-time PCR genomic target TTS1-orf2 ให้ผลลบทั้ง 30 ตัวอย่าง ไม่พบผลบวกปลอม และการปนเปื้อนข้าม (Table 1.)

Table 1. Microorganisms (n=30) used to test specificity of the TTS1-orf2 real-time PCR assay

| gram     | species, strain                                       | No. test | real-time PCR result |
|----------|-------------------------------------------------------|----------|----------------------|
| negative | <i>Achromobacter xylosoxidans</i>                     | 1        | negative             |
|          | <i>Actinobacillus pleuroneumoniae</i>                 | 1        | negative             |
|          | <i>Aeromonas</i> spp.                                 | 1        | negative             |
|          | <i>Bacillus cereus</i>                                | 1        | negative             |
|          | <i>Brucella abortus</i>                               | 1        | negative             |
|          | <i>Coxiella burnetii</i>                              | 2        | negative             |
|          | <i>Escherichia coli</i>                               | 2        | negative             |
|          | <i>Haemophilus parasuis</i> , <i>Haemophilus</i> spp. | 2        | negative             |
|          | <i>Leptospira</i> spp.                                | 3        | negative             |
|          | <i>Moraxella</i> spp.                                 | 1        | negative             |
|          | <i>Morganella morganii</i>                            | 1        | negative             |
|          | <i>Pasteurella</i> spp.                               | 4        | negative             |
|          | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                         | 1        | negative             |
|          | <i>Salmonella</i> spp.                                | 2        | negative             |
|          | <i>Yersinia</i> spp.                                  | 1        | negative             |
| positive | <i>Listeria innocua</i> , <i>L.monocytogenes</i>      | 2        | negative             |
|          | <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>                 | 1        | negative             |
|          | <i>Staphylococcus aureus</i>                          | 1        | negative             |
|          | <i>Streptococcus suis</i> , <i>Streptococcus</i> spp. | 2        | negative             |

### ผลการทดสอบความถูกต้อง (accuracy)

จากการทดสอบเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะได้ จำนวน 20 ตัวอย่างด้วยวิธี real-time PCR ให้ผลบวกทั้ง 20 ตัวอย่าง โดยค่า  $C_p$  ที่ได้อยู่ในช่วง 15 ถึง 20 และทดสอบตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจที่ไม่มีเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 50 ตัวอย่าง ด้วยวิธี real-time PCR ให้ผลลบทั้ง 50 ตัวอย่าง ซึ่งผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับวิธีอ้างอิงและมีความถูกต้อง 100%

### ผลการทดสอบตัวอย่างอวัยวะด้วยวิธี real-time PCR

ผลการทดสอบตัวอย่างอวัยวะจะเห็นที่พบการแต้ผลเพาะเชื้อไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* ให้ผลลบต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี real-time PCR ทั้งหมดจำนวน 30 ตัวอย่าง

### ผลการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างวิธี real-time PCR กับวิธีการเพาะเชื้อ

จากการทดสอบด้วยวิธี real-time PCR เปรียบเทียบวิธีการเพาะเชื้อ พบว่าตัวอย่างนกแก้วพันธุ์ African Grey ให้ผลบวกต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี real-time PCR จำนวน 10 ตัวอย่าง ส่วนผลการเพาะเชื้อ พบเชื้อ *B. pseudomallei* 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างนกแก้วพันธุ์ Electus ให้ผลบวกต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี real-time PCR จำนวน 5 ตัวอย่าง ส่วนผลการเพาะเชื้อ พบเชื้อ *B. pseudomallei* 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างสุกรให้ผลบวกต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี real-time PCR จำนวน 7 ตัวอย่าง ส่วนผลการเพาะเชื้อ พบเชื้อ *B. pseudomallei* 1 ตัวอย่าง ดังนั้นผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเพาะเชื้อ กับวิธี real-time PCR พบว่าวิธีเพาะเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* 11 ตัวอย่าง ส่วนวิธี Real-time PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* 22 ตัวอย่าง (Table 2)

Table 2. comparative between cultural *B. pseudomallei* and real-time PCR

| Animal                 | No. of sample | No. of cultural positive | No. of real-time PCR positive |
|------------------------|---------------|--------------------------|-------------------------------|
| Parrots (African Grey) | 10            | 5                        | 10                            |
| Parrots (Electus)      | 5             | 5                        | 5                             |
| Pigs                   | 7             | 1                        | 7                             |
| Total                  | 22            | 11                       | 22                            |

### สรุปและวิจารณ์

เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเมลลิออยด์ (Meliodosis) ซึ่งเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขและการปศุสัตว์ สัตว์ที่ป่วยจะแสดงอาการได้หลากหลาย จากการศึกษาของเนตรชนก และคณะ. (2548) พบว่าส่วนใหญ่มักแสดงอาการป่วยแบบเรื้อรัง มีอาการซึม ไม่กินอาหาร ขาไม่มีแรง ไอ่ หอบ

หายใจลำบาก และมีน้ำมูกขึ้น การติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการป่วย (subclinical infections) พบได้ทั่วไปจากการตรวจทางพยาธิวิทยาทั้งในสัตว์ที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ ลักษณะรอยโรคที่พบบ่อยจะอยู่ในรูปแบบการเกิดฝี (abscess formation) และเกิดจุดเนื้อตายสีขาวในอวัยวะเดียว และกระจายในหลายๆ อวัยวะ การเพาะเชื้อจากอวัยวะต่างๆ จะพบเชื้อจากบริเวณที่มีรอยโรคเป็นส่วนใหญ่ แต่บริเวณที่ไม่พบรอยโรคก็พบเชื้อได้เช่นกัน บางอวัยวะที่มีรอยโรคแต่ไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* มักพบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Arcanobacterium pyrogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งทำให้การเพาะเชื้อ *B. pseudomallei* ทำได้ยากขึ้น จึงได้มีการนำวิธี real-time PCR มาใช้ในการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* โดยตรงจากอวัยวะส่งตรวจ โดยเลือกใช้ genomic target TTS1-orf2 ซึ่ง Kaestli et al (2012) ได้ทำการทดสอบและเปรียบเทียบการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* โดยตรงกับตัวอย่างจากคนไข้ 50 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เสมหะ 22 ตัวอย่าง เลือด 20 ตัวอย่าง และปัสสาวะ 8 ตัวอย่าง โดยใช้ genomic target หลายๆ ตำแหน่งที่มีผู้ทำการศึกษาออกแบบไว้ก่อนหน้านี้ ประกอบด้วย genomic target TTS1 - orf2 ซึ่ง Novak et al. (2006) ได้พัฒนาการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะแยกได้จากคนไข้ ด้วยวิธี real-time PCR genomic target orf11, orf13 และ BpSCU2 ซึ่ง Thibault et al. (2004) ได้พัฒนาวิธี Identify เชื้อ *B. pseudomallei*, *B. mallei* และ *B. thailandensis* ด้วยเทคนิค real-time PCR genomic target lpxO ในขณะที่ Merrite et al. (2006) ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะแยกได้จากคนไข้ จากวิธี PCR ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ มาเป็น real-time PCR genomic target 8653 และ 9438 ต่อมา Supaprom et al. (2007) ได้พัฒนาการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* จากตัวอย่างเลือดของคนไข้ด้วยเทคนิค TaqMan real-time PCR โดยออกแบบ primer และ probe ให้จับที่ตำแหน่ง 8653 และ 9438 ของยีน genomic target metalloprotease gene (mprA) ซึ่ง Neubauer et al. (2007) ได้พัฒนาการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยเทคนิค PCR จาก block paraffin เนื้อเยื่อปอดของอูฐได้สำเร็จ genomic target genes clusters Yersinia-like fimbrial/ *Burkholderia thailandensis*-like flagellum และ chemotaxis (YLF/BTFC) ในขณะที่ Tuanyok et al. (2007) ได้พัฒนาวิธีการแยกความแตกต่างของ *B. pseudomallei* กับ *B. thailandensis* ด้วย multiplex real-time PCR โดยใช้ SYBR green Dye ผลจากการทดสอบพบว่า genomic target TTS1-orf2 ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด โดยที่ให้ค่าความไวและความจำเพาะสูงที่สุด และให้ค่าปริมาณ DNA ต่ำสุดที่ตรวจได้ต่ำที่สุด

จากการประยุกต์นำวิธีการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วย real-time PCR genomic target TTS1 - orf2 มาใช้ในการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* โดยตรงจากอวัยวะสัตว์ส่งตรวจ ทำให้ต้องมีการ

validate วิธีเพื่อประเมินวิธีการว่าเหมาะสมที่จะนำมาใช้หรือไม่ ซึ่งผลจากการทดสอบหาค่าความไว โดยปริมาณต่ำสุดของ DNA เชื้อ *B. pseudomallei* ที่สามารถตรวจได้จากการทดลองนี้เท่ากับ 124 copies/μl การทดสอบความจำเพาะ โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ด้วยวิธี real-time PCR genomic target TTS1-orf2 จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลลบต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้ง 30 ตัวอย่างคิดเป็น 100% ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Novak et al. (2006) ที่ทำการทดสอบความจำเพาะ ของวิธี real-time PCR genomic target TTS1-orf2 ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยทำการทดสอบเชื้อที่มี genetic relatives กับเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย *B. mallei* 23 ตัวอย่าง *B. thailandensis* 5 ตัวอย่าง และ *Burkholderia* 35 ตัวอย่าง ผลการทดสอบให้ผลลบต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้ง 63 ตัวอย่าง และทดสอบความถูกต้อง ซึ่งผลที่ได้จะต้องสอดคล้องกับวิธีอ้างอิงมากกว่า 90% โดยทำการทดสอบกับเชื้อ *B. pseudomallei* 20 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อ *B. pseudomallei* 50 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลถูกต้อง 100% จึงสรุปได้ว่าวิธีการนี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei*

จากการทดสอบตัวอย่างอวัยวะกลุ่มตัวอย่างที่พบมีการ แต่ผลเพาะเชื้อไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี real-time PCR ให้ผลลบต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้งหมดจำนวน 30 ตัวอย่างซึ่งผลเพาะเชื้อ สอดคล้องกับผล real-time PCR และจากการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างวิธี real-time PCR กับวิธีการ เพาะเชื้อในกลุ่มตัวอย่างเปรียบเทียบ พบว่าวิธีเพาะเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* 11 ตัวอย่าง ส่วนวิธี real-time PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* 22 ตัวอย่าง ดังนั้นผลการ เปรียบเทียบระหว่างวิธีการเพาะเชื้อกับ real-time PCR พบว่าวิธีเพาะเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ 50% (11/22) ของวิธี real-time PCR สาเหตุอาจมาจากข้อจำกัดของวิธีการเพาะเชื้อ ซึ่ง ปัจจุบันศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกได้ทำการเพาะเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยอาหาร เลี้ยงเชื้อ Blood agar (Quinn et al., 1994) ซึ่งอาจไม่สามารถเพาะเชื้อจากตัวอย่างที่มีเชือน้อยๆ หรือ ตัวอย่างที่มีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ปนเปื้อน ส่วนผลจากการตรวจด้วยวิธี real-time PCR ให้ผลบวกทั้ง 22 ตัวอย่างเนื่องจากวิธี real-time PCR มีความไวสูง ซึ่งจากการ validate วิธี real-time PCR genomic target TTS1-orf2 สามารถตรวจพบได้ 124 copies/μl ซึ่งถือว่ามีความไวสูงมากๆ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี เพาะเชื้อ

การตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี real-time PCR สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *B. pseudomallei* ระหว่าง ชนิดก่อโรค และชนิดไม่ก่อโรคได้ ได้ในระดับหนึ่งโดยจากการศึกษาของ Novak et

al., 2006 พบว่าวิธี real-time PCR genomic target TTS1-orf2 จะให้ผลบวกเฉพาะกับเชื้อ *pseudomallei* ชนิดที่ก่อโรค ส่วนเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิดไม่ก่อโรคจะให้ผลเป็นลบ และที่สำคัญคือ ผู้ปฏิบัติงานมีความเสี่ยงจากการสัมผัสเชื้อน้อยลง จากเดิมที่จะต้องทำการเพาะเชื้อจากตัวอย่างอวัยวะก่อน ซึ่งการเพาะเชื้อเป็นการเพิ่มปริมาณของเชื้อขึ้น ทำให้เชื้อมีโอกาสแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมได้สูง การตรวจด้วยวิธี real-time PCR สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อได้เนื่องจากไม่ต้องทำการเพาะเชื้อ และในขั้นตอนการสกัด DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* จากตัวอย่างอวัยวะส่งตรวจจะต้องใช้ Lysis buffer ซึ่งในขั้นตอนนี้จะสามารถฆ่าเชื้อได้ ทำให้ผู้ทดสอบค่อนข้างปลอดภัย ข้อดีการตรวจเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี real-time PCR คือสามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ทำให้ควบคุมโรคได้รวดเร็ว ลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์และเกษตรกร สามารถวางแผนบริหารจัดการ ไข่ระวัง ป้องกันการแพร่กระจาย และการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ระหว่างสัตว์ในฝูง หรือการแพร่กระจายไปยังสัตว์ฝูงอื่นในบริเวณใกล้เคียง รวมถึงการติดเชื้อจากการสัมผัสและได้รับเชื้อโดยตรงต่อสิ่งแวดล้อมมาสู่ตัวเกษตรกร และสามารถนำเทคนิคการตรวจนี้ไปประยุกต์ใช้ตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* ในคนและสิ่งแวดล้อมได้

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และคุณนิมิตร เชื้อเงิน ที่ช่วยสนับสนุนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

- ประกาศ พ.ช. 2554. สถิติวิเคราะห์ทางสัตวแพทย์. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. โรงพิมพ์สุทินการพิมพ์. หน้า 170-187.
- ศิริลักษณ์ อนันต์ณัฐศิริ. 2006. โรคเมลิออยโดสิส (Meliodosis), ภาควิชาอายุรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. [Online]. Available: [http://med.md.kku.ac.th/e-resume/cv/view\\_profile.php.viewpid](http://med.md.kku.ac.th/e-resume/cv/view_profile.php.viewpid). [1 มกราคม 2015]
- สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์. โรคมวงคล่อเทียม (Meliodosis). [Online]. Available: <http://pvlo-pkk.dld.go.th/th/images/stories/report/Livestock/meliodosis.pdf>. [1 มกราคม 2015]
- CFSPH (The Center for Food Security and Public Health). 2007. "Meliodosis". [Online]. Available: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/meliodosis.pdf>. Accessed September 9, 2014.

- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R. and Smith, T.F. 2006. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *J. Clin. Microbiol.* p. 165-256.
- Forbes-Faulkner, J.C., Townsend, W.L. and Thomas, A.D. 1992. *Pseudomonas pseudomallei* infection in camels. *Aust. Vet. J.* 69(6): 148.
- Hicks, C.L., Kinoshita, R. and Ladds, P.W. 2000. Pathology of melioidosis in captive marine mammals. *Aust Vet J.* 78: 193-195.
- Kaestli, M., Richardson, L.J., Colman, R.E., Tuanyok, A., Price, E.P., Bowers, J.R., Mayo, M., Kelly E., Seymour M.L., Sarovich, D.S., Pearson, T., Engelthaler, D.M., Wangner, .DM., Keim, P.S., Schupp, J.M. and Currie, B.J. 2012. Comparison of TaqMan PCR Assay for Detection of the Melioidosis Agent *Burkholderia pseudomallei* in Clinical Specimens. *J Clin. Microbiol.* 50(6): 2059.
- Ladds, P.W., Thomas, A.D., Speare, R. and Brown, A.S. 1990. Melioidosis in a koala. *Aust. Vet. J.* 67: 304-305.
- Leelarasamee, A., Suwanna, T., Kusum, M. and Dejsirilert, S. 1997. Isolation rates of *Burkholderia pseudomallei* among the four region in Thailand. *Southeast J. Trop. Med. Pub. Hlth.* 28(1): 107-113.
- Merritt, A., Inglis, T.J.J., Chidlow, G. and Harnett, G. 2006. PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 48(5): 239-244.
- Neubauer, H., Sprague, L.D., Tomaso, H., Dahouk, A.S., Witte, A., Kinne, J., Hensel, A., Wernery, R., Wernery, U. and Scholz, H.C. 2007. Development and clinical evaluation of a PCR assay targeting the metalloprotease gene (mprA) of *B. pseudomallei*. *Zoonoses Public Health.* 54: 44 -50.
- Novak, R.T., Glass, M.B., Gee, J.E., Gal, D., Mayo, M.J., Currie, B.J. and Wilkins, P.P. 2006. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 44: 85-90.

- Pestana, E.A., Belak, S., Diallo, A., Crowther, J.R. and Viljoen, G.J. 2010. Early rapid and sensitive veterinary molecular diagnostic-real time PCR applications. Springer science. London, U.K. 31 p.
- Quinn, P.J., Carter, P.J., Markey, B. and Carter, G.R. 1994. Clinical veterinary microbiology. Wolfe Publishing. Grafos, Spain. p. 237-241.
- Supaprom, C., Wang, D., Leelayuwat, C., Thaewpia, W., Susaengrat, W., Koh, V., Ooi, E.E., Lertmemongkolchai, G. and Liu, Y. 2007. Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens. J. Clin. Microbiol. 45: 2894 –2901.
- Thibault, F.M., Valade, E. and Vidal, D.R. 2004. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by realtime PCR targeting type III secretion system genes. J. Clin. Microbiol. 42: 5871–5874.
- Tuanyok, A., Auerbach, R.K., Brettin, T.S., Bruce, D.C., Munk, A.C., Detter, J.C., Pearson, T., Hornstra, H., Sermswan, R.W., Wuthiekanun, V., Peacock, S.J., Currie, B.J., Keim, P. and Wangner, D.M. 2007. A horizontal gene transfer event defines two distinct groups within *Burkholderia pseudomallei* that have dissimilar geographic distributions. J. Bacteriol. 189: 9044 –9049.
- Vuddhakul, V., Tharavichitkul, P., Na-Eng, N., Jitsurong, S., Kunthawa, B., Noimay, P., Binka, A. and Thamkikitkul, V. 1990. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60(3): 458-461
- Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Chantratita, N., Feil, E.J., Day, N.P.J. and Peacock, S.J. 2009. *Burkholderia pseudomallei* is genetically diverse in agricultural land in northeast Thailand. PLoS Negl Trop Dis. 3(8): e496.

## Detection of *Burkholderia pseudomallei* directly on clinical samples with real-time PCR

Kanthanis Limwibulpong<sup>\*</sup> Chaoyong Sakam Ruchuda Kanjanapen Chaiwalun Tunak

Veterinary Research and Development Center (Eastern Region), 844 M.9 Banbueng Chonburi 20220, Thailand

<sup>\*</sup>Corresponding author; Tel. 0-3874-2116 Fax. 0-3874-2120 email: [kanthanis.l@dld.go.th](mailto:kanthanis.l@dld.go.th)

### Abstract

A gram-negative, soil bacterium, *Burkholderia pseudomallei* is the causative agent of Melioidosis, which is an important disease in public health and livestock. Culture method remains the conventional standard for diagnosis of *B. pseudomallei*, but It is difficult and need more experience to observe colonies and confirm with biochem test. The aim of this study was development on rapid tool for identification of *B. pseudomallei* directly on clinical samples which is high sensitivity and specificity. TaqMan real-time PCR assay targets a 115 base-pair region within orf2 of the *B.pseudomallei* type III secretion system gene cluster was chosen and distinguishes *B. pseudomallei* from other microbial species. The assays performed with 100% specificity, no cross-reactivity occurred. The sensitivity assays were performed the limit of detection was found to be 124 copies/μl. The accuracy assays was performed 100% agreement with conventional method. This rapid assay is a valuable tool for identification of *B. pseudomallei* and may improve diagnosis in regions endemic for Melioidosis.

**Key words:** *Burkholderia pseudomallei*, Melioidosis, real-time PCR, TaqMan probe