

---

# การพัฒนาวิธีตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส คางทูมในตัวอย่างส่งตรวจด้วยวิธี Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

---

พัชชา อินคำสืบ อัจฉริยา ลูกบัว อธิวัฒน์ ปริมสิริคุณาวุฒิ ประสพชัย อร่ามรุ่งโรจน์  
เพียงใจ อามีนเจริญ จารุวรรณ ใจอ้าย ญัฐทนิษฐ์ อากาศภูมิพัทธ์ และศิริมา ปัทมดิลก  
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

**บทคัดย่อ** การติดเชื้อไวรัสคางทูมก่อให้เกิดอาการอักเสบของต่อมน้ำลายและอาจเกิดอาการแทรกซ้อน เช่น อัมพาตอักเสบ เยื่อสมองอักเสบ หรือหากมารดาติดเชื้อในช่วงไตรมาสแรกของการตั้งครรภ์อาจมีโอกาสแท้งบุตรได้ จากความสำคัญตามที่กล่าวนี้คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมในตัวอย่างส่งตรวจด้วยวิธี RT-PCR โดยปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี RT-PCR ที่พัฒนานี้สามารถตรวจพบได้คือปริมาณ 10 copies หรือ 40 ag ( $10^{-18}$ g) และมีความจำเพาะ (specificity) โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reaction) กับไวรัสที่จัดอยู่ในวงศ์ (family) เดียวกับไวรัสคางทูม ผลจากการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าวิธี RT-PCR นี้สามารถนำไปใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมได้ทั้งในตัวอย่างน้ำลาย, สวอบคอ (throat swab), สวอบกระพุ้งแก้ม (buccal swab), น้ำอสุจิ (semen) และน้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid, CSF) รวมทั้งใน cell lysate ที่ได้จากการแยกเชื้อไวรัสคางทูมในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยผลการทดสอบที่ได้จากวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความสอดคล้องกับผลการแยกเชื้อไวรัสคางทูมในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งเป็นวิธี gold standard ร้อยละ 100 จึงกล่าวได้ว่าวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคคางทูมทางห้องปฏิบัติการและยังสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาจีโนไทป์ (genotype) ไวรัสคางทูมที่ระบาดในประเทศต่อไป

---

Accepted for publication, 29 November 2013



## บทนำ

โรคคางทูม (Mumps/Epidemic Parotitis) เกิดจากการติดเชื้อไวรัสคางทูม (Mumps Virus) ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่ม Paramyxoviridae<sup>(1)</sup> ทำให้เกิดอาการอักเสบของต่อมน้ำลายและอาจก่อให้เกิดอาการแทรกซ้อนรุนแรง เช่น เป็นหมัน หรือถึงแก่ชีวิตได้ นอกจากนี้ 15% ของผู้ติดเชื้อไวรัสคางทูมอาจมีอาการเยื่อหูสมองอักเสบ และยังมีรายงานของการติดเชื้อไวรัสในสตรีตั้งครรภ์ช่วงไตรมาสแรกอาจทำให้เกิดการแท้งได้<sup>(2)</sup> สำหรับสถานการณ์ของโรคคางทูมในประเทศไทย แม้ว่าอัตราการระบาดของโรคคางทูมมีแนวโน้มลดลง โดยอัตราป่วยต่อแสนคนมีแนวโน้มลดลงสังเกตได้จากอัตราป่วย 66.84 ในปี พ.ศ. 2539 ลดลงเป็น 11.17 ในปี พ.ศ. 2555 แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถกวาดล้างโรคนี้ให้หมดไปจากประเทศได้ ซึ่งกลุ่มเสี่ยงมักเป็นกลุ่มผู้ใหญ่ที่เกิดก่อนที่จะมีการให้วัคซีน MMR ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศไทยปี 2540 รวมถึงเด็กอายุต่ำกว่า 7 ปี ซึ่งเป็นกลุ่มที่เคยได้รับวัคซีนเพียงหนึ่งครั้งหรือยังไม่เคยได้รับวัคซีนซึ่งพบจากรายงานการระบาดของโรคคางทูมที่มีอยู่อย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังมีสถานการณ์การระบาดของโรคคางทูมปรากฏให้เห็นเรื่อยมา<sup>(3)</sup> แม้กระทั่งประเทศที่พัฒนาแล้วอย่างประเทศอังกฤษ สหรัฐอเมริกา และแคนาดาโดยพบการระบาดใหญ่ของโรคคางทูมในประเทศอังกฤษช่วงปี พ.ศ. 2547 ถึง 2548 พบผู้ป่วยประมาณ 50,000 ราย<sup>(4)</sup> หลังจากนั้นพบการระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกาในช่วงปลายปี 2548 ถึงกลางปี 2549 พบผู้ป่วยมากกว่า 2,500 ราย<sup>(5)</sup> และในปี 2550 พบผู้ป่วยประมาณ 900 คนในประเทศ แคนาดา<sup>(6)</sup> ดังนั้น การเฝ้าระวังและการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการยังคงเป็นสิ่งที่ต้องกระทำและพัฒนาต่อไป

การตรวจวินิจฉัยโรคคางทูมทางห้องปฏิบัติการสามารถทำได้หลายวิธี ไม่ว่าจะเป็นการตรวจทางน้ำเหลือง (Serological diagnosis) เช่น การตรวจหาภูมิคุ้มกันชนิด IgM ต่อไวรัสคางทูมด้วยวิธี Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA)<sup>(7)</sup> การแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งสามารถแยกเชื้อไวรัสคางทูมได้ 65% จากสวอบน้ำลาย (salivary swab) ที่เก็บภายในระยะเวลา 5 วันหลังป่วย<sup>(1)</sup> ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่สนใจมาใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยระดับโมเลกุล (molecular diagnosis) ที่มีความไวสูง เช่นวิธี Nested PCR, Reverse Transcription-PCR (RT-PCR), real-time PCR จนถึงการใช้อย่าง micro array โดยในการพัฒนาวิธีดังกล่าวศึกษาจากตัวอย่างหลายชนิด เช่น น้ำลาย น้ำไขสันหลัง ปัสสาวะ และสวอบคอ (throat swab)<sup>(8-12)</sup> ซึ่งสามารถนำไปสู่การศึกษาทางพันธุกรรมเพื่อรองรับการระบาดของโรค และเป็นฐานข้อมูลเฝ้าระวังและสอบสวนโรค รวมถึงการพัฒนาสายพันธุ์วัคซีนต่อไป

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นชี้ให้เห็นว่าวิธี PCR เป็นวิธีที่น่าสนใจที่จะนำมาประยุกต์ใช้ทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคคางทูมและโรคสมองอักเสบอันเนื่องมาจากการติดเชื้อไวรัสคางทูม

## วัสดุและวิธีการ

### ตัวอย่าง

ตัวอย่างส่งตรวจที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจำนวน 70 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประกอบด้วย Throat swab 34 ตัวอย่าง, น้ำลาย 17 ตัวอย่าง, Buccal swab 11 ตัวอย่าง, ซีรัม 4 ตัวอย่าง, ปัสสาวะ 2 ตัวอย่าง, CSF และ Semen อย่างละ 1 ตัวอย่าง

### ไวรัส

ในการทดสอบ Specificity ของวิธี RT-PCR ใช้ตัวอย่างส่งตรวจของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ได้รับการตรวจยืนยันด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ และ RT-PCR แล้วว่ามีการติดเชื้อไวรัสคางทูมเนื่องจากไวรัสที่ติดถูกจัดอยู่ใน Family *Paramyxoviridae* ซึ่งเป็น family เดียวกับ mumps virus โดยตัวอย่างจะถูกนำมาสกัดสารพันธุกรรมตามขั้นตอนที่จะกล่าวต่อไปและเก็บสารพันธุกรรมดังกล่าวไว้ที่  $-70^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะใช้งาน

### การเตรียม SH-recombinant plasmid

เตรียม SH-recombinant plasmid เพื่อใช้ในการหา limitation of detection และ positive control ของวิธี RT-PCR โดยการโคลนยีน (gene cloning) ยีนส่วน SH ความยาว 674 bp เข้าสู่ vector ด้วยชุดโคลนสำเร็จรูป pCR 8/GW/TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, USA) และ vector ที่ใช้คือ pCR 8/GW/TOPO ขึ้นตอนตามคู่มือของบริษัท<sup>(13)</sup>

### การสกัดสารพันธุกรรม

การสกัด RNA ใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Germany) โดยใช้ตัวอย่าง 140  $\mu$ l ผสม lysis buffer 560  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม ethanol 560  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน เติมนลงใน column นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นล้าง column ด้วย washing buffer จำนวน 2 ครั้งและ eluted ด้วยน้ำกลั่น 30  $\mu$ l โดยปั่น column ที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 3 นาที ทำการหาปริมาณสารพันธุกรรมที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น (wave length) 260 และ 280 nm จากนั้นเก็บสารพันธุกรรมดังกล่าวที่  $-70^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำไปใช้งาน

### การทำ RT-PCR

เป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมในส่วน SH gene ความยาว 674bp โดยใช้ forward และ reverse primers ดังนี้ 5'-AGTAGTGTTCGATGATCTCAT-3' และ 5'-GCTCAAGCCTTGATCATTGA-3' การเตรียม PCR mixture ใช้ชุดน้ำยา OneStep RT-PCR (QIAGEN, Germany) ดังนี้ 5x buffer 10  $\mu$ l, dNTP 2  $\mu$ l, Enzyme solution 2  $\mu$ l, RNase inhibitor 20 U, primer 0.6  $\mu$ M ต่อเส้นและน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 45  $\mu$ l หลังจากนั้นเติมสารพันธุกรรมตัวอย่าง 5  $\mu$ l โดยมีปริมาตรรวม 50  $\mu$ l และ ใช้ PCR cycle ดังนี้  $50^{\circ}\text{C}$  30 นาที จำนวน 1 รอบ,  $95^{\circ}\text{C}$  15 นาที จำนวน 1 รอบและ 40 รอบของ  $94^{\circ}\text{C}$  1 นาที,  $55^{\circ}\text{C}$  1 นาที และ  $72^{\circ}\text{C}$  1 นาที หลังจากนั้นเข้าสู่  $72^{\circ}\text{C}$  10 นาที และ  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $\alpha$  โดยใช้ SH-recombinant plasmid และสารพันธุกรรมที่สกัดจาก supernatant ของน้ำเลี้ยงเซลล์ Vero/hSLAM เป็น positive และ negative control ตามลำดับ

### การหาลำดับสารพันธุกรรม

ใช้ Bigdye V3.1 (Applied BioSystem; USA) โดยใช้ DNA template 1-3 ng, 5x buffer 2  $\mu$ l, Bigdye 2  $\mu$ l, primer 3.2 pmol เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 20  $\mu$ l นำเข้าเครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยมีขั้นตอนดังนี้  $95^{\circ}\text{C}$  5 นาที 1 รอบ เข้าสู่ 30 รอบของ  $96^{\circ}\text{C}$  10 วินาที,  $50^{\circ}\text{C}$  10 วินาทีและ  $60^{\circ}\text{C}$  10 วินาที หลังจากนั้นนำไปหาลำดับสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง DNA sequence genetic analyzer 3130XL (Applied BioSystem; USA) เมื่อได้ลำดับสารพันธุกรรมที่ต้องการ จึงนำไปตรวจสอบว่าลำดับสารพันธุกรรมที่ได้นั้นเป็นสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมที่ต้องการโดยใช้โปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

### การแยกเชื้อไวรัสคางทูมในเซลล์เพาะเลี้ยง

นำตัวอย่างส่งตรวจปริมาตร 1 มล. ลงเพาะเชื้อในเซลล์ vero/hSLAM ซึ่งเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยง (tissue culture flask) ขนาด 25 cm<sup>2</sup> ด้วย 10% FBS-DMEM ที่  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 5 วัน อ่านผลทุกวัน หากพบความผิดปกติจากพยาธิสภาพของเซลล์ (Cytopathic effect) ให้แบ่งส่วนหนึ่งไปทำการตรวจพิสูจน์เชื้อและ ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่  $-70^{\circ}\text{C}$  ถือเป็น passage ที่ 1 (#1) หาก #1 ไม่พบเชื้อ ทำการเพาะเชื้อตามขั้นตอนที่กล่าวมาเป็นครั้งที่ 2 (#2) หากไม่พบเชื้อถือว่าเป็นผลลบ (Negative)<sup>(14)</sup>

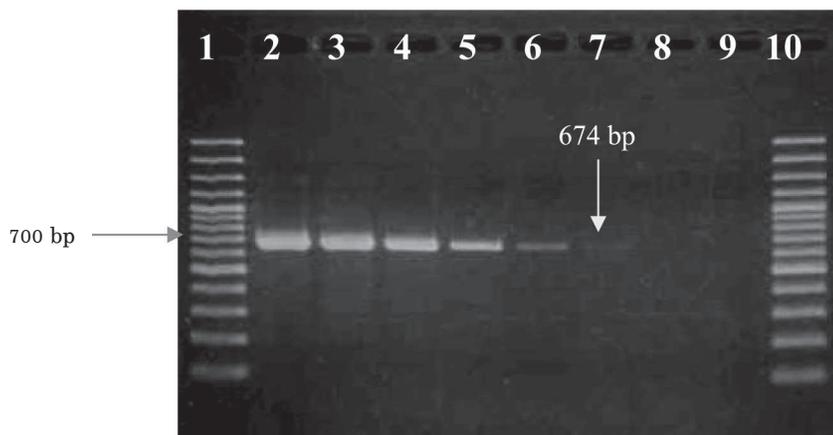
### การตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสคางทูมโดยการย้อมด้วยวิธี **Fluorescent antibody test (FAT)**

ทำการ fixed infected cell ด้วย acetone แล้วหยดด้วย monoclonal antibody ต่อไวรัสคางทูมตามด้วย Rabbit anti- Mouse Immunoglobulin และอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 200 เท่า (200 x) โดยการอ่านผลว่าเป็นบวกเมื่อพบการเรืองแสงสีเขียว (apple green)<sup>(14)</sup>

### ผล

#### การหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดโดยวิธี **RT-PCR** ที่สามารถตรวจพบได้ (**limitation of detection, LOD**)

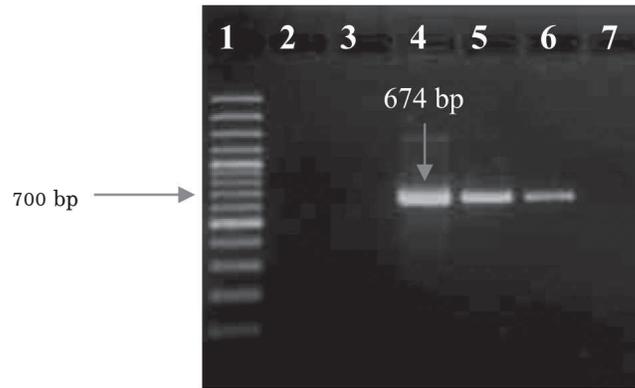
การหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดโดยวิธี RT-PCR ที่สามารถตรวจพบได้ โดยทำ ten- fold serial dilution ของ SH-recombinant plasmid จากความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  ถึง 0 copy หรือ  $4 \times 10^{-12}$  ถึง  $4 \times 10^{-19}$  g พบว่าปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้คือ 10 copies หรือ  $4 \times 10^{-17}$  g (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาได้ โดยทำ ten fold-dilution ของ SH-recombinant plasmid จากช่วง  $1 \times 10^6$  ถึง 0 copy หรือ  $4 \times 10^{-12}$  ถึง  $4 \times 10^{-19}$  g โดยช่องที่ 1 และ 10 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2 - 9 คือ SH-recombinant plasmid ปริมาณ  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^3$ ,  $1.0 \times 10^2$ , 10, 1 และ 0 copy หรือ  $4 \times 10^{-12}$ ,  $4 \times 10^{-13}$ ,  $4 \times 10^{-14}$ ,  $4 \times 10^{-15}$ ,  $4 \times 10^{-16}$ ,  $4 \times 10^{-17}$ ,  $4 \times 10^{-18}$ ,  $4 \times 10^{-19}$  g ตามลำดับ

#### การหาความจำเพาะ (**Specificity**) ของวิธี **RT-PCR**

ดำเนินการทดสอบความจำเพาะของวิธี RT-PCR โดยนำตัวอย่างเชื้อไวรัสคางทูมที่แยกได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง รวมทั้งสารพันธุกรรมมาตรฐาน mumps RNA ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Center for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta และตัวอย่างเชื้อไวรัสหัดที่แยกได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง มาทำการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น พบว่าวิธีนี้สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมจากตัวอย่างเชื้อไวรัสคางทูมที่แยกได้เซลล์เพาะเลี้ยง รวมทั้งสารพันธุกรรมมาตรฐาน mumps RNA และตัวควบคุมบวก (positive control) โดยไม่พบ specific band ในตัวอย่างที่ติดเชื้อ measles virus และตัวควบคุมลบ (negative control) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การหาความจำเพาะของวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาจากตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อไวรัสคางทูมได้, mumps RNA ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก CDC และตัวอย่างที่ติดเชื้อ measles virus โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2 - 7 คือ 2: DW, 3: negative control, 4: positive control, 5: ตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อไวรัสคางทูมได้, 6: mumps RNA มาตรฐาน, 7: ตัวอย่างติดเชื้อไวรัส measles ตามลำดับ

**การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมด้วยวิธี RT-PCR ในตัวอย่างส่งตรวจ**

ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมด้วยวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นในตัวอย่างส่งตรวจจำนวน 70 ตัวอย่าง ประกอบด้วยสวอบคอ (Throat swab) 34 ตัวอย่าง, น้ำลาย 17 ตัวอย่าง, สวอบกระพุ้งแก้ม (Buccal swab) 11 ตัวอย่าง, ซีรัม 4 ตัวอย่าง, ปัสสาวะ 2 ตัวอย่าง, น้ำไขสันหลัง (CSF) และน้ำอสุจิ (Semen) อย่างละ 1 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมความยาว 674 bp ได้จากตัวอย่างดังกล่าวจำนวน 41 (59%) ตัวอย่างโดยตรวจพบใน throat swab จำนวน 20/34 (59%), น้ำลาย 8/17 (47%), buccal swab 7/11 (64%), CSF 1/1 (100%) และ Semen 1/1 (100%) แต่ไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมในตัวอย่างปัสสาวะ (0/2) ดังแสดงในรูปที่ 3 และเมื่อนำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับสารพันธุกรรมและทำการ Blast ด้วยโปรแกรม (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ทางอินเทอร์เน็ต พบว่า PCR product ที่ได้ คือสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมในส่วนของ SH gene



ภาพที่ 3 การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมด้วยวิธี RT-PCR ในตัวอย่างส่งตรวจชนิดต่างๆ ช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2, 3 และ 4 คือ Nuclease-free water, negative และ positive control ตามลำดับ ช่องที่ 5 - 9 คือตัวอย่าง throat swab, CSF, cell lysate, buccal swab และ saliva ตามลำดับ

### การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี RT-PCR และการแยกเชื้อไวรัสคางทูมในเซลล์เพาะเลี้ยง

จากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 70 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมด้วยวิธี RT-PCR จำนวน 41 ตัวอย่าง ซึ่งในจำนวนนี้สามารถแยกเชื้อไวรัสคางทูมได้ 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 41.5 แต่ที่เหลืออีก 24 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 58.5 ที่ไม่สามารถแยกเชื้อได้ อย่างไรก็ตามทุกตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อได้จะสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมด้วยวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า วิธี RT-PCR มีความไว (sensitivity) และค่าความเชื่อถือได้เมื่อค่าเป็นลบ (Negative Predictive Value) เป็น 100% ในขณะที่ความจำเพาะ (specificity) และความเชื่อถือได้เมื่อค่าเป็นบวก (Positive Predictive Value) เป็นร้อยละ 54.7 และ 41.46 ตามลำดับ เนื่องจากมี 24 ตัวอย่าง ซึ่ง RT-PCR ให้ผลบวก แต่การแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell isolation) ให้ผลลบ (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ PCR product ของทั้ง 24 ตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมแล้ว ทำการ Blast ผ่านเว็บไซต์ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)) พบว่าทั้ง 24 ตัวอย่างมีความเหมือนกับ SH gene ของไวรัสคางทูม 98 - 99% (ข้อมูลไม่ได้นำมาแสดง)

ตารางที่ 1 การคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าความเชื่อถือได้เมื่อค่าเป็นบวกและลบ

		Cell isolation	
		+	-
RT-PCR	+	17	24
	-	0	29

Sensitivity =  $[17/(17+0)] \times 100 = 100\%$   
 Specificity =  $[29/(29+24)] \times 100 = 54.7\%$   
 Positive predictive value =  $[17/(17+24)] \times 100 = 41.5\%$   
 Negative predictive value =  $[29/(29+0)] \times 100 = 100\%$

### วิจารณ์

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพ โดยปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจพบได้คือ 10 copies หรือ 40 ag ( $10^{-18}$ g) ซึ่งสอดคล้องกับที่ Jin Li และคณะที่ได้รายงานไว้<sup>(15)</sup> และไม่พบ cross reaction จากตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสคางทูม ซึ่งเป็นไวรัสในวงศ์ family เดียวกัน ถือว่าวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความจำเพาะและความไวสูง

นอกจากนี้ จากการศึกษาดังกล่าว พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี RT-PCR ให้ผลตรงกับผลการแยกเชื้อไวรัสคางทูมในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งถือเป็นวิธี gold standard ทุกตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 100 และสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ RNA มาตรฐานของไวรัสคางทูมที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก CDC ประเทศสหรัฐอเมริกา จึงกล่าวได้ว่าผลการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR นี้มีความเชื่อถือได้ รวมทั้งด้วยวิธี RT-PCR นี้สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมในตัวอย่างส่งตรวจจำนวน 24 ตัวอย่างจากผู้ป่วยคางทูมที่ไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสคางทูมในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ซึ่ง PCR product จากตัวอย่างดังกล่าวนี้ถูกนำหาลำดับสารพันธุกรรมหลังจากทำการ blast และเปรียบเทียบกับไวรัสคางทูมสายพันธุ์อ้างอิงตามท้องที่การอนามัยโลกกำหนด<sup>(16)</sup> แล้วพบว่าเป็นไวรัสคางทูมทุกตัวอย่างแสดงให้เห็นว่าวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้นอกจากจะให้ผลที่เชื่อถือได้แล้วยังมีประสิทธิภาพมากกว่าการแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งสอดคล้องกับที่นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้รายงานไว้<sup>(17-20)</sup>

อย่างไรก็ตามสำหรับทุกตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมเป็นตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงได้เช่นกัน ดังนั้นปัจจัยที่ควรคำนึงถึงสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคคางทูมทางห้องปฏิบัติการ คือการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีที่ถูกต้องในช่วงเวลาที่เหมาะสม เก็บรักษาและนำส่งห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกวิธี<sup>(21)</sup> โดยไวรัสคางทูมจะถูกปลดปล่อยออกมาในน้ำลายช่วง 6 วันก่อนมีอาการ จนถึงประมาณ 5 วัน หลังแสดงอาการ<sup>(22-23)</sup> แต่หากผู้ป่วยเคยได้รับวัคซีน Measles-Mumps-Rubella vaccine (MMR vaccine) มาก่อน จะสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมจากสารคัดหลั่งในช่องปาก (oral fluid) ได้ในช่วงเวลา 1 - 3 วันแรกของการแสดงอาการ<sup>(24)</sup>

การศึกษาแสดงให้เห็นถึงความไว ความจำเพาะ และความเชื่อถือได้ของผลการทดลองของวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำวิธีการนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคคางทูมทางห้องปฏิบัติการ โดยสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR นี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาจีโนมของไวรัสคางทูมซึ่งข้อมูลที่ได้รับจะสนับสนุนงานสอบสวน ควบคุม และกวดล้างโรคต่อไปในอนาคต

## สรุป

วิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดได้ที่ 10 copies หรือ 40 ag ( $10^{-18}$  a) และมีความจำเพาะโดยไม่พบ cross reaction กับไวรัสหัด ซึ่งถูกจัดอยู่ใน family เดียวกับไวรัสคางทูม นอกจากนี้วิธี RT-PCR นี้สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสคางทูมได้ทั้งในตัวอย่าง throat swab, buccal swab, CSF, cell lysate, semen และ saliva โดยผลการทดสอบที่ได้จากวิธี RT-PCR มีความสอดคล้องกับผลการแยกเชื้อไวรัสคางทูมในเซลล์เพาะเลี้ยงร้อยละ 100 รวมทั้งให้ผลบวกต่อ RNA มาตรฐานของไวรัสคางทูมที่ได้รับ ความอนุเคราะห์จาก CDC ประเทศสหรัฐอเมริกา ถือว่าผลการทดสอบที่ได้วิธีนี้มีความน่าเชื่อถือ จึงกล่าวได้ว่าวิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น มีประสิทธิภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคคางทูมทางห้องปฏิบัติการ

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการศึกษาขอขอบคุณสำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับการเก็บและส่งต่อตัวอย่าง รวมทั้งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์สำหรับการสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งชาติ สหรัฐอเมริกา (CDC) ที่ให้ความอนุเคราะห์ RNA positive control ทำให้การศึกษานี้สำเร็จได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

1. Carbone KM, Wolinsky JS. Mumps virus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al. Field Virology vol. 1. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams&Wilkins; 2001. p. 1381-1400.
2. Weekly epidemiology record No. 45. 2001; 76(45): 345-356. [Online]. 2001; [12 screens]. Available from: URL: <http://www.who.int/docstore/wer/pdf/2001/wer7645.pdf>
3. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์. ข้อมูลโรคที่เฝ้าระวังทางระบาดวิทยา จากบัตรรายงาน 506 พ.ศ. 2548. นนทบุรี: สำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
4. Centers for Disease Control and Prevention. Mumps epidemic-United Kingdom, 2004-2005. MMWR Morbidity Mortality Weekly Report 2006; 55(7): p. 173-175.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Mumps epidemic-Iowa, 2006. MMWR Morbidity Mortality Weekly Report 2006; 55(Dispatch): p. 1-3.

6. Public Health Agency of Canada. Information for Health Professional, National Summary, November 9, 2007 [Online]. Available from: URL: <http://phac-aspc.gc.ca>
7. Mumps. In: WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. WHO/V&B/03.01. Geneva, Switzerland: Vaccines and Biologicals, World Health Organization; 2003. p. 18-20.
8. Palacios G, Jabado O, Cisterna D, *et al.* Molecular identification of mumps virus genotype from clinical sample: standardized method of analysis. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1869-78.
9. Boriskin YS, Rice PS, Stabler RA, *et al.* DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12): 5811-8.
10. Watson-Crees G, Saunders A, Scott J, Lowe L, Pettipas J, Hatchette TF. Two successive outbreaks of mumps in Nova Scotia among vaccinated adolescents and young adults. *CMAJ* 2006; 175(5): 483-8.
11. Poggio GP, Rodriguez C, Cisterna D, Freire MC, Cello J. Nested PCR for rapid detection of mumps virus in cerebrospinal fluid from patients with neurological diseases. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1): 274-8.
12. Krause CH, Eastick K., Ogilvie MM. Real-time PCR for mumps diagnosis on clinical specimens--comparison with results of conventional methods of virus detection and nested PCR. *J Clin Virol* 2006; 37(3): 184-9.
13. User manual pCR8/GW/TOPO TA cloning kit. Version E. USA: Invitrogen; 2006.
14. Standard Protocols for RT-PCR for Molecular Epidemiology of Mumps Virus. Measles, Mumps, Rubella and Herpes Branch, Atlanta: CDC.
15. Jin L, Beard S, Brown DW. Genetic heterogeneity of mumps virus in the United Kingdom: identification of two new genotypes. *J Infect Dis* 1999; 180(3): 829-33.
16. Boddicker JD, Rota PA, Kreman T, Wangeman A, Lowe L, Hummel KB, *et al.* Real-time reverse transcription-PCR assay for detection of mumps virus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9): 2902-8.
17. Cusi MG, Bianchi S, Valassina M, Santini L, Arnetoli M, Valensin PE. Rapid detection and typing of circulating mumps virus by reverse transcription/polymerase chain reaction. *Res Virol* 1996; 147(4): 227-32.
18. Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Doi R, Gotoh A. *et al.* Rapid and sensitive detection of mumps virus RNA directly from clinical samples by real-time PCR. *J Med Virol* 2005; 75(3): 470-4.
19. WHO/IVB/07.01. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 2<sup>nd</sup> ed. Geneva: World Health Organization; 2007.
20. Henle G, Henle W, Wendell KK, Rosenberg P. Isolation of mumps virus from human beings with induced apparent or inapparent infections. *J Exp Med* 1948; 88(2): 223-32.
21. Carbone KM, Rubin S. Mumps virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Field virology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2007. p. 1527-50.
22. Bitsko RH, Cortese MM, Dayan GH, Rota PA, Lowe L, Iversen SC. *et al.* Detection of RNA of mumps virus during an outbreak in a population with a high level of measles, mumps, and rubella vaccine coverage. *J Clin Microbiol* 2008; 46(3): 1101-3.

---

# Establishment of Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Detection of Mumps Nucleic Acid from Clinical Specimens

---

Patcha Incomserb Atchariya Lukebua Athiwat Primsirikunawut  
Prasopchai Aramrunroj Phiengjai Armeencharoen Jaruwan Jai-ai  
Nutthanitt Arpaphrommipath and Sirima Pattamadilok

*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000 Thailand*

**ABSTRACT** Infection with mumps virus results in swelling of salivary glands and further complications such as orchitis, meningitis or abortion within the first-trimester of pregnancy may occur. We, therefore, developed an RT-PCR method for detection of mumps genetic materials in clinical specimens. It was found that the limit of detection for our in-house RT-PCR method is 10 copies or 40 ag ( $10^{-18}$  g) and there is no cross – reactivity with measles virus, the other virus within the same family. It was demonstrated that the developed RT-PCR method is able to detect the genetic materials of mumps virus in saliva, throat swab, buccal swab, CSF, semen and mumps-infected cell lysate. The in-house RT-PCR technic showed 100% correlation with the gold standard method, i.e., viral isolation. The result from our study indicated that the developed RT-PCR method is useful for laboratory diagnosis as well as genetic characterization of mumps virus for the outbreak investigation in Thailand.

**Key words: Mumps, RT-PCR**