การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยตรงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยวิธีพีซีอาร์และตัดด้วยเอ็นไซม์

Identification of Mycobacteria Directly in Liquid Media by PCR and Restriction Enzyme (PCR-REA)

เสกสิทธิ์ สังคีรี (Seksit Sungkeeree)[1]* *พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์ (Pipat Sribenjalux)*[1]
อรุณนี สังกา (Arunnee Sangka)[1] *พรทิพย์ ปิ่นละออ (Porntip Pinlaor)*[1]
วีระพงศ์ ลุลิตานนท์ (Wirapong Lulitanond)[2] *อมร อุ่นเจริญ (Amorn Ooncharern)*[3]

บทคัดย่อ

เทคนิค PCR-Restriction enzyme analysis ได้นำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S rDNA spacer sequence และตัด PCR products ด้วย restriction enzymes 3 ชนิด คือ *Hae* III, *Bst* XI และ *Msp* I โดยทดสอบกับเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว MGIT 200 ตัวอย่าง เปรียบเทียบผลกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีความไวในการตรวจเท่ากับ 92.73 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะเท่ากับ 95.23 เปอร์เซ็นต์ มีค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 99.40 เปอร์เซ็นต์ และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 60.60 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกเชื้อได้ 2 กลุ่ม คือ Slow grower mycobacteria 161 ตัวอย่าง และกลุ่ม Rapid grower mycobacteria 5 ตัวอย่าง ในกลุ่ม Slow growers แยกได้เชื้อ *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare* และ *kansasii* /หรือ *M. gordonae* เป็นจำนวน 142, 5, 1 และ 3 ตัวอย่างตามลำดับ ไม่สามารถแยกสปีชีส์ได้ 10 ตัวอย่าง ในกลุ่ม Rapid growers แยกได้เชื้อ *M. duvalii* และ *M. flavescens* เป็นจำนวน 2 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ ไม่สามารถแยกสปีชีส์ได้ 2 ตัวอย่าง จากผลการศึกษาพบว่า เทคนิค PCR-Restriction enzyme analysis เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว สามารถใช้ตรวจหาและแยกเชื้อมัยโคแบคทีเรียในอาหารเหลวได้ อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR-REA ควรใช้เป็นวิธีทดสอบที่นำมาใช้ร่วมกับ conventional method และอาการทางคลินิก เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจวินิจฉัยและการจำแนกเชื้อมัยโคแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการต่อไป

Abstract

PCR and restriction enzyme analysis (PCR-REA) based on 16S-23S rDNA spacer sequence was used for detection and identification of mycobacteria in species level. The method was tested against 200 MGIT positive samples. The sensitivity and specificity of the assay compared with culture results were 92.73 and 95.23%, respectively. The positive predictive value and negative predicted value were 99.40 and 60.60%

[1]*ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
**corresponding author, e-mail: sseksi@kku.ac.th*

respectively. Base on PCR-REA assay, these were classified into 161 slow growing mycobacteria and 5 rapid growing mycobacteria. Among the 161 slow growers, 142 were identified as *M. tuberculosis*, five were *M. avium*, one was *M. intracellulare*, three were *M. kansasii* /or *gordonaer* and ten were identified as slow growing mycobacteria. From the 5 rapid growers, two were identified as *M. duvali*, one was *M. flavescens* and two were identified as rapid growing mycobacteria. The PCR-REA assay was easy to perform and could be used for differential identification of mycobacteria directly in liquid media. Overall, PCR-REA assay for mycobacteria should be used in combination with conventional methods and clinical findings for effective diagnosis.

คำสำคัญ: การพิสูจน์เอกลักษณ์ มัยโคแบคทีเรีย พีซีอาร์และตัดด้วยเอ็นไซม์ อาหารเหลว
Keywords: Identification, Mycobacteria, PCR and restriction enzyme analysis, liquid media

บทนำ

เชื้อ *M. tuberculosis* สาเหตุของวัณโรค นับเป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรง เป็นสาเหตุการเจ็บป่วยและตายที่สำคัญทั่วโลก องค์การอนามัยโลกคาดการณ์ไว้ว่าในระหว่างปี พ.ศ. 2545-2563 จะมีผู้ติดเชื้อใหม่ 1000 ล้านคน ผู้ป่วยใหม่ 150 ล้านคน และจะเสียชีวิตประมาณ 36 ล้านคน (WHO, 2000) และมีรายงานการพบเชื้อมัยโคแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ และพบเชื้อที่มีการดื้อต่อยาและใช้ยารักษาแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ (Wolinsky, 1992; Iseman, 1993) ทำให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมีความยุ่งยากมาก การตรวจหาและการแยกสปีชีส์ที่แม่นยำ มีความสำคัญในการรักษาผู้ป่วยที่ถูกต้อง และรวดเร็ว ช่วยตัดวงจรการแพร่เชื้อไปสู่คนอื่นได้ การจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีดั้งเดิมอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบทางชีวเคมี ต้องใช้เวลานาน และมีวิธีการที่ยุ่งยาก (Roberts et al., 1991) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGIT ถูกนำมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติ ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้มากกว่าและเร็วกว่าวิธีเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง (Pfyffer et al., 1997; Chitra et al., 2001) อย่างไรก็ตามต้องเสียเวลาเพิ่มขึ้นอีกในการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อในอาหารชนิดแข็งนานอีกหลายสัปดาห์ก่อนนำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีอีกหลายวัน ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิควิธีการใหม่ๆ ใช้ความรู้และเทคโนโลยีด้านอณูชีววิทยามาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์มัยโคแบคทีเรียในอาหารเหลว เช่น Gas liquid chromatography (Chou et al., 1996) High performance chromatography (Gary, 1994; Duffey et al., 1996) และ DNA probe Hybridization (Evans et al., 1992; Reisner et al., 1994) แต่มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น มีเทคนิคที่ยุ่งยาก ใช้เครื่องมือและวัสดุราคาแพง หรือต้องการผู้มีความรู้ความสามารถสูง เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกเทคนิค PCR-REA ซึ่งมีราคาถูก รวดเร็ว และง่ายกว่า น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยตรงในอาหารเหลวได้ โดยการใช้ Primer 16SA และ 23SA เพิ่มจำนวน DNA บริเวณ 16S-23S rDNA spacer sequence แล้วตัด PCR product ด้วย Restriction enzyme ได้แก่ *Hae* III, *Msp* I และ *Bst* XI นำมาทดสอบกับตัวอย่างขวด MGIT ที่ให้ผลบวกในหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เปรียบเทียบผลกับการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. เชื้ออ้างอิง 15 ชนิด ได้แก่ *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis* H37 Ra, *M. bovis* ATCC 35733, *M. africanum* LCDC 50) Slow growing

mycobacteria (*M. avium* ATCC 25291, *M. intracellulare* ATCC 18950, *M. gordonae* 330, *M. kansaii* ATCC 12478, *M. xenopi* ATCC 19250) และเชื้อ Rapid growing mycobacteria (*M. asuafricanum* 3005, *M. phlei*, *M. fortuitum*, *M. duvalii* MNC 442, *M. chelonae*, *M. neolactis* S152, *M. flavescens* ATCC 23035) ทำการสกัดดีเอ็นเอ และทดสอบกับวิธี PCR- REA

2. ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างขวดเพาะเลี้ยงเชื้ออาหารเหลว Mycobacteria growth indicator tube (MGIT) ที่ให้ผลบวกจำนวน 200 ตัวอย่าง จากหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำไปย้อมสีชนิดทนกรด (Acid fast bacilli staining) และเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร LJ medium และทำการสกัดดีเอ็นเอจากการประยุกต์วิธีของ Wilson และคณะ (Wilson et al., 1993) เพื่อทดสอบกับวิธี PCR-REA

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR-REA เทคนิค PCR-REA (เสกสิทธิ์, 2000) เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของจีน 16S-23S rRNA spacer region ด้วย Primer 16SA (5'-TCGAAGGTGGGATAGGC-3') และ 23SA (5'-GCGCCCTTAAACACTTAC-3') โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อมัยโคแบคทีเรียอ้างอิง 15 ชนิด และดีเอ็นเอของเชื้อในอาหารเหลว MGIT โดยนำส่วนผสมของ PCR reaction mixture นำหลอดเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งอุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ จากนั้นตามด้วยขั้นตอนดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ (PCR product) ด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าใน 2.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose และย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (UV-Trans illuminator) วัดขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับ Standard marker DNA (50 bp) และทำการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอ็นไซม์ *Hae* III (0.5 unit) ถ้ายังไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อมัยโคแบคทีเรียได้ ต้องตัดด้วยเอ็นไซม์ *Msp* I และ/หรือ *Bst* XI ตามลำดับ โดยใช้ PCR product ปริมาตร 17.5 ไมโครลิตร เติม 10X reaction buffer 2 ไมโครลิตร และเอ็นไซม์ 0.5 ไมโครลิตร (นำ PCR product ของเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hae* III ทุกครั้ง) และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าใน 3% NuSieve agarose 3:1 และย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต จะได้จำนวนชิ้น และรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ พร้อมทั้งบันทึกและถ่ายรูปเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ผล

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบ PCR-REA กับเชื้ออ้างอิง

ผลการทดสอบ PCR กับเชื้ออ้างอิง พบว่าสามารถแยกเชื้อมัยโคแบคทีเรียออกได้ 2 กลุ่ม ตามจำนวนและขนาดของ PCR product คือ 1) กลุ่ม Slow growing mycobacteria ได้แก่ เชื้อ *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* ATCC 35733, *M. africanum* LCDC 501) มี amplified product จำนวน 1 band ขนาด 380 bp ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่ม Slow growing mycobacteria อื่น ๆ เช่น *M. avium* ATCC 25291, *M. intracellulare* ATCC 18950, *M. gordonae* 330, *M. kansasii* ATCC 12478 พบว่ามีขนาด 380-390 bp ยกเว้น *M. xenopi* ATCC 19250 มีขนาด 360 bp 2) กลุ่ม Rapid growing mycobacteria มีจำนวนและขนาดของ amplified product ต่างกันดังนี้ คือ *M. fortuitum* มี amplified product จำนวน 4 bands ขนาดประมาณ 530, 510, 470, 440 bp, *M. flavescens* ATCC 23035 จำนวน 3 bands ขนาดประมาณ 550, 520, 470 bp, *M. asuafricanum* 3005 จำนวน 3 bands ขนาดประมาณ 610, 530, 490 bp, *M. duvalii* มี product 1 band ขนาดประมาณ 500 bp ส่วน *M. phlei*, *M. chelonae* และ *M. neolactis* S152 มี amplified product จำนวน 1 band ขนาด

ใกล้เคียงกันประมาณ 470 bp (ดังแสดงในรูปที่ 1 และตารางที่ 1) เมื่อนำ amplified product ของเชื้อ *M. tuberculosis* complex, Slow growing mycobacteria และเชื้อ Rapid grower ที่มี amplified product จำนวน 1 band ทดสอบกับเทคนิค REA โดยนำไปตัดกับเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ตามด้วย *Msp* I หรือ *Bst* XI พบว่ามีจำนวนและขนาดของ bands แตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 2, 3, 4)

ผลการศึกษากับตัวอย่าง MGIT

ตัวอย่างขวด MGIT ที่ให้ผลบวกจำนวน 200 ตัวอย่าง เมื่อนำมาศึกษาด้วยการย้อมสีทนกรด (AFB staining) และเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร LJ media พบว่ามี 179 ตัวอย่างพบการเจริญของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย MGIT 4 ตัวอย่างมีการเจริญของเชื้อ Nocardia (ย้อมสีทนกรด AFB ให้ผลเป็นลบ ย้อมสี Modified AFB ให้ผลเป็นบวก) MGIT 17 ตัวอย่าง มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ได้แก่ เชื้อ *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาศึกษาด้วยเทคนิค PCR โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อมัยโคแบคทีเรียบริเวณ 16S-23S rDNA spacer sequence ด้วย Primers 16SA และ 23SA พบว่ามี MGIT 167 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก 33 ตัวอย่างให้ผล เป็นลบ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าเทคนิค PCR มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 92.73 และ 95.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบเท่ากับ 99.40 และ 60.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี PCR เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิงพบว่ามี 161 ตัวอย่างที่มี PCR product จำนวน 1 band ขนาดประมาณ 380-390 bp ตรงกับเชื้อกลุ่ม Slow grower อีก 6 ตัวอย่างมี PCR product ขนาดตรงกับเชื้อกลุ่ม Rapid grower ซึ่งมีขนาดประมาณ 500 bp 2 ตัวอย่าง และขนาดประมาณ 460-470 bp จำนวน 3 ตัวอย่าง (ผลบวกกับเชื้อ Nocardia 1 ตัวอย่าง) อีก 1 ตัวอย่างมี PCR product 2 bands ที่มีขนาด 500/470 bp เมื่อนำ PCR product ที่มีจำนวน 1 band มาศึกษาต่อด้วยวิธี restriction enzyme analysis พบว่า 161 ตัวอย่างของกลุ่ม Slow growing mycobacteria สามารถแยกได้เชื้อ *M. tuberculosis complex*, *M. avium*, *M. intracelulare* และ *M. kansasii/M. gordonae* เป็นจำนวน 142, 5, 1 และ 3 ตัวอย่างตามลำดับ ไม่สามารถแยกสปีชีส์ได้ 10 ตัวอย่าง ในกลุ่ม Rapid growing mycobacteria แยกได้เชื้อ *M.duvalii*, *M. flavescens* เป็นจำนวน 2 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ ไม่สามารถแยกสปีชีส์ได้ 2 ตัวอย่าง อีกหนึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมก็ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ด้วยเทคนิค PCR-REA

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการศึกษากับตัวอย่างขวด MGIT ที่ให้ผลบวก เมื่อย้อมสีทนกรด (AFB) และเพาะเลี้ยงเชื้อต่อใน LJ media สามารถแยกได้เชื้อ mycobacteria จำนวน 179 ตัวอย่าง มีเชื้อ Nocardia 4 ตัวอย่าง และพบเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ 17 ตัวอย่าง (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) เมื่อนำตัวอย่างมาศึกษากับเทคนิค PCR พบว่าให้ผล PCR บวก 167 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบผลกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าได้ผลบวกจริงทั้งหมด 166 ตัวอย่าง และผลบวกปลอม กับเชื้อ Nocardia 1 ตัวอย่าง ทั้งนี้เป็นเพราะว่าเชื้อ Nocardia มีลักษณะของจีนที่คล้ายคลึงหรือสัมพันธ์กับเชื้อในกลุ่ม mycobacteria จากการศึกษาครั้งก่อนของเรา (เสกสิทธิ์, 2000) พบว่า primer 16SA และ primer 23SA สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S rDNA spacer region ของเชื้อ Nocardia ได้เช่นกัน ซึ่งเหมือนกับการศึกษาของ อรุณนี และคณะ (Sansila et al., 1998) และได้ผลลบกับวิธี PCR จำนวน 33 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบผลกับวิธีดั้งเดิม เทคนิค PCR ได้ผลลบจริงกับเชื้ออื่นทั้งหมด 20 ตัวอย่าง และผลลบปลอม (วิธีดั้งเดิมพบเชื้อมัยโคแบคทีเรีย จำนวน 13 ตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเกิดจากว่ามีจำนวนเชื้อปริมาณเล็กน้อยในขวด MGIT บวก ทำให้การสกัดดีเอ็นเอได้จำนวนที่ไม่เพียงพอในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ จากการ

ศึกษาครั้งก่อนพบว่า primer 16SA และ 23SA มีความไวของ PCR สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อมัยโคแบคทีเรียได้อย่างน้อย 20 พิโคแกรม (pg) หรือมีจำนวนเชื้อต่ำสุด 4000 เซลล์ในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (เสกสิทธิ์, 2000) อีกสาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากการสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณน้อย

เมื่อนำเทคนิค PCR-REA มาทดสอบเพื่อแยกสปีชีส์ของเชื้อ พบว่า Primer 16SA และ 13SA อาจนำมาใช้แยกเชื้อมัยโคแบคทีเรียระหว่าง Slow grower และ Rapid grower ตามจำนวนชิ้นและขนาดของ PCR product และพบว่าการใช้ Restriction enzyme *Hae* III เพียงอย่างเดียวสามารถแยกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียได้หลายสปีชีส์ ในตัวอย่างที่พบว่าเป็น *M. gordonae* และ *M. kansasii* จำนวน 3 ตัวอย่างนั้น เมื่อนำเอา PCR product ไปทำการตัดอีกด้วยเอนไซม์ *Bst* XI ก็ไม่สามารถแยกออกจากกันได้เนื่องจากว่ามีขนาดและรูปแบบของ fragment ใกล้เคียงกันจึงรายงานเป็น *M. gordonae/M. kansasii* ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกสปีชีส์ได้ จำนวน 12 ตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากว่า มีรูปแบบและขนาดของ Restriction fragment เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hae* III ไม่ตรงกับเชื้อมาตรฐานอ้างอิง 15 ชนิด ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไปโดยใช้เชื้ออ้างอิงหลายชนิดเพื่อให้ครอบคลุมสปีชีส์ได้มากที่สุด หรืออาจใช้วิธีอื่นเพื่อแยกสปีชีส์ต่อไป เช่น การทำ probe hybridization (Enrico et al., 2001; Miller et al., 2000) หรือการทำ DNA sequencing (Roth et al., 1998)

จากผลการการศึกษา เทคนิค PCR-REA สามารถแยกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยตรงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGIT ได้หลายสปีชีส์ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว สามารถแยกเชื้อได้ภายใน 2-3 วัน ดังนั้นจึงควรนำเทคนิค PCR-REA มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์โดยตรงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGIT ที่ให้ผลบวกและย้อมสีทนกรดพบ Acid fast bacilli เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล จะทำให้ผู้ป่วยได้รับการดูแลรักษาด้วยระบบยาที่ถูกต้องและรวดเร็ว และนำไปสู่การควบคุมโรคได้ผลเร็วขึ้นและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น การระบาดของเชื้อจากผู้ป่วยไปสู่บุคคลอื่นก็จะลดน้อยลง เป็นผลให้สามารถควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพในที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจาก ทุนอุดหนุนโครงการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ 2547 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างสำหรับงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

เสกสิทธิ์ สังคีรี. 2000. **การตรวจหาและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ในจังหวัดขอนแก่น.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Chitra, C. and Prasad, C.E. 2001. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for primary isolation of Mycobacteria form clinical specimens. **Ind J tub** 48: 155-157

Chou, S., Chedore, P., Hadded, A., Paul, N.R. and Kasatiya, S. 1996. Direct identification of *Mycobacteria* species in Bactec 7H12B medium by gas-liquid chromatography. **J Clin Microbiol** 34: 1317-1320

Duffey, P.S., Guthertz, L.S. and Evans, G.C. 1996. Improved rapid identification of mycobacteria by combining Solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography analysis of BACTEC cultures. **J Clin Microbiol** 34: 1939-1943

Enrico, T., Anna, N., Claudio, P., Paola, C., Claudio, F., Giorgio, M., Claudio, S. et al. 2001. Performance Assessment of New Multiplex Probe Assay for Identification of Mycobacteria. **J Clin Microbiol** 39(3): 1079-1084.

Evans, K.D., Nakasune, A.S., Sutherland, P.A., de la Maza, L.M. and Peterson, E.M. 1992. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-M. intracellulare* directly from primary BACTEC cultures by using acridinium-ester labelled DNA probes. **J Clin Microbiol** 30: 2427-2431.

Gary, D.C. 1994. Derect identification of *Mycobacteria* species in Bactec 7H12B medium by high-performance liquid chromatography. **J Clin Microbiol** 32: 521-524

Iseman, M.D. 1993. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **New Engl J Med** 329: 784-791.

Miller, N., Infante, S. and Cleary, T. 2000. Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. **J Clin Microbiol** 38: 1915-1919.

Pfyffer, G.E., Welscher, H.W., Kissling, P., Cieslak, C., Casal, M.J., Gutierrez, J. and Rusch-Gerdes, S. 1997. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. **Clin Microbiol** 35(2): 364-368.

Reisner, B.S., Gatson, A.M. and Woods, G.L. 1994. Use of Gen-Probes to Identify *Mycobacterium avium* Complex, *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae* Directly from BACTEC TB Broth Cultures. **J Clin Microbiol** 32: 2995-2998.

Roberts, G.D., Koneman, E.W. and Kim, Y.K. 1991. *Mycobacterium*. In: **Manual of Clinical Microbiology**. A. Balows, W.J. Hausler Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg and H.J. Shadomy (Eds.), pp. 304-399. Washington, D.C.: American society of Microbiology.

Roth, A., Fischer, M., Hamid, M.E., Michalke, S., Ludwig, W. and Mauch, H. 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. **J Clin Microbiol** 36: 139-147.

Sansila, A., Hongmanee, P., Chuchottaworn, C., Rienthong, S., Rienthong, D. and Palittapongarnpim, P. 1998. Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* by Amplification of the 16S-23S Ribosomal DNA Spacer. **J Clin Microbiol** 36: 2399-2403.

Wilson, S.M., McNerney, R., Nye, P.M., Godfrey-Fausett, G., Stoker, N.G. and Voller, A. 1993. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. **J Clin Microbiol** 31: 776-782

Wolinsky, E. 1992. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. **Clin Infect Dis** 15: 1-12.

World Health Organization. 2000. **Tuberculosis Fact Sheet No. 104.** Revised August 2002.

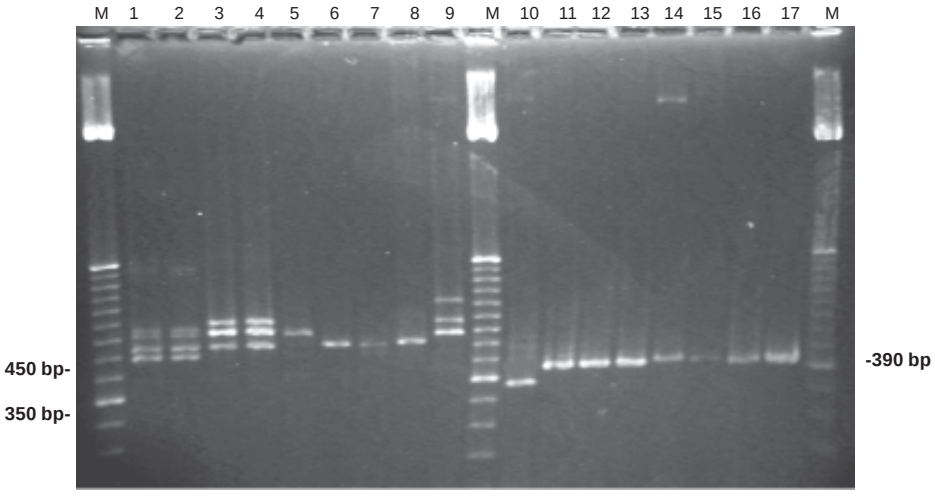
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบเทคนิค PCR-REA กับเชื้อมัยโคแบคทีเรียอ้างอิงเพื่อใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงในการแยกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย

PCR-product (bp)	***Hae* III digestion (bp)**	***Msp* I digestion (bp)**	***Bst* XI digestion (bp)**	**Identification (species level)**
Slow grower				
380-390	210/130/55	ND	ND	*M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis* *M. bovis* *M. africanum*)
	160/120/70/45	ND	ND	*M. avium*
	200/160/45	240/110/55	ND	*M. intracellulare*
	No digestion	ND	240/140	*M. gordonae*
	No digestion	ND	245/140	*M. kansasii*
360	210/150	ND	ND	*M. xenopi*
Rapid grower				
530/510/470/440	ND	ND	ND	*M. fortuitum*
550/520/470	ND	ND	ND	*M. fravescens*
610/530/490	ND	ND	ND	*M. austroafricanum*
500	No digestion	ND	ND	*M. duvalii*
470	240/180/50	ND	ND	*M. neolactis*
470	260/210	ND	ND	*M. phlei*
470	250-130/90	ND	ND	*M. chelonae*

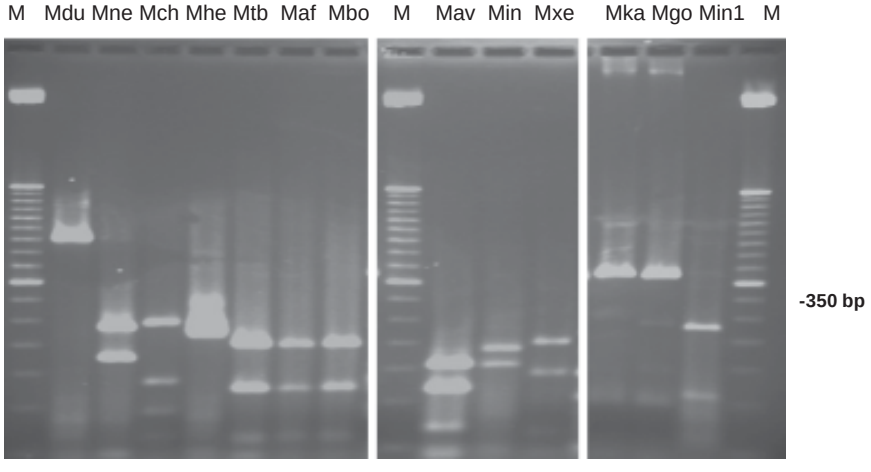
ND = Not determine

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลเพาะเลี้ยงเชื้อมัยโคแบคทีเรียและการทดสอบ PCR

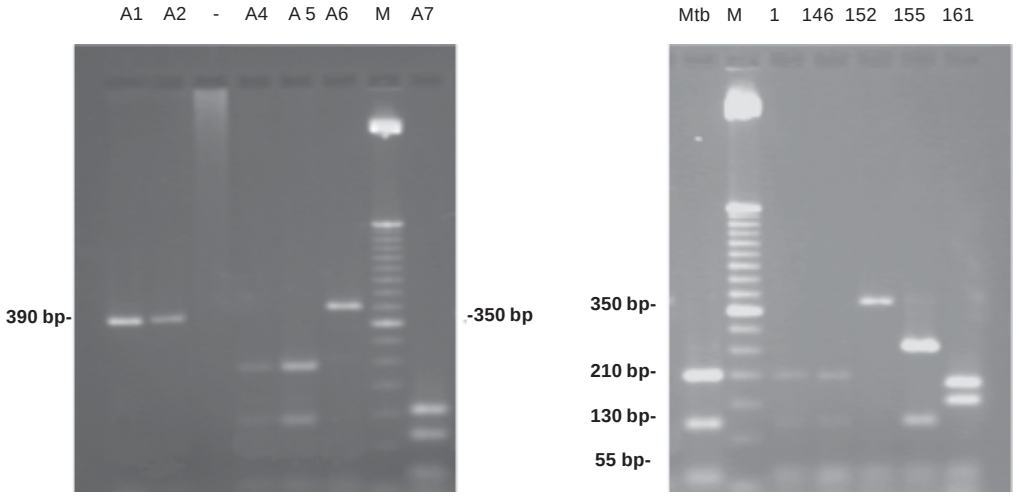
PCR (ตัวอย่าง)	**ผลการเพาะเลี้ยง (ตัวอย่าง)**		**รวม**
	ผลบวก	**ผลลบ**	
ผลบวก	166	1	167
ผลลบ	13	20	33
รวม	179	21	200



รูปที่ 1 ขนาดของ DNA ผลิตภัณฑ์ (PCR product) จากการเพิ่มดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S rDNA spacer region ของเชื้ออ้างอิง Mycobacterial reference strains ด้วย Primer 16SA และ 23SA strains ของเชื้อ rapid growing mycobacteria เลน 1, 2: *M. fortuitum*; 3, 4: *M. flavescens*; 5: *M. duvalii*; 6: *M. phlei*; 7: *M. neolactis*; 8: *M. chelonae*; 9: *M. asuafricanum* และเชื้อ slow growing mycobacteria เลน 10: *M. xenopi*; 11: *M. tuberculosis*; 12: *M. bovis*; 13: *M. africanum*; 14: *M. intracellulare*; 15: *M. avium*; 16: *M. gordonae*; 17: *M. kansasii*; และเลน M: 50 bp ladder

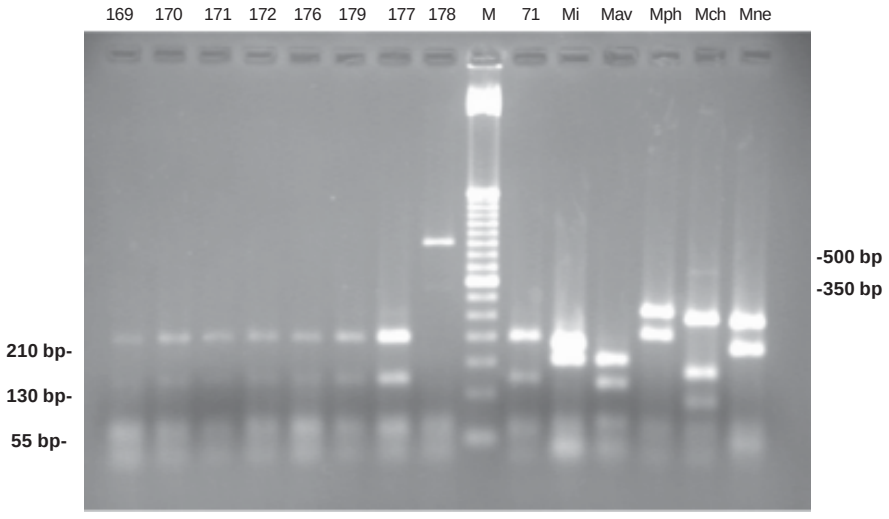


รูปที่ 2 จำนวนชิ้น ขนาดและรูปแบบของ PCR ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ (Restriction pattern of enzyme digested amplified products) ของเชื้ออ้างอิง; **2A**) เลน Mdu: *Hae* III-undigested *M. duvalii*; Mne: *Hae*III-digested *M. neolactis*; Mch: *Hae*III-digested *M. chelonae* Mph: *Hae*III-digested *M. phlei*; Mtb: *Hae*III-digested *M. tuberculosis*; Maf: *Hae*III-digested *M. africanum*; Mbo: *Hae*III-digested *M. bovi;* **2B**) เลน Mav: *Hae*III-digested *M. avium*; Min: *Hae* III-undigested *M. intracellulare*; Mxe: *Hae*III-digested *M. xenopi*; **2C**) Mka: *Hae*III-undigested *M. kansaii*; Mgo: *Hae* III-undigested *M. gordonae*; Min1: *Msp*I-digested *M. intracellulare* และเลน M: 50 bp ladder



3A **3B**

รูปที่ 3 จำนวนชิ้น ขนาดและรูปแบบของ PCR ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ (Restriction pattern of enzyme digested amplified products) ของเชื้ออ้างอิงและเชื้อที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGIT บวกบางส่วน; **3A**) เลน A1&A4: *Hae* III-undigested และ *Bst* XI-digested *M. gordonae*; เลน A2&A5: *Hae* III-undigested และ *Bst* XI-digested *M. kansasii*; เลน 82: *Hae* III-undigested ของเชื้อที่ตรวจพบใน MGIT; เลน A6: *Hae* III-digested *M .avium*; **3B**) เลน 1, 146, 152, 155 และ 161 เป็น *Hae* III-digested ของเชื้อที่ตรวจพบใน MGIT เลน Mtb เป็น *Hae* III-undigested *M. tuberculosis*; เลน M: 50 bp ladder



รูปที่ 4 รูปแบบและขนาดของ PCR ผลิตภัณฑ์ จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hae* III (Restriction pattern of *Hae* III-digested amplified products) ของเชื้อที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGIT บวกบางส่วน หมายเลข 169, 170, 171, 172, 176, 179, 177 และ 71 มีรูปแบบและขนาด 210, 130, 50 bp หมายเลข 178 PCR product ไม่ถูก ตัดด้วย เอ็นไซม์ *Hae* III และเชื้ออ้างอิง เลน Mi: digested *M. intracellulare*, Mav: digested *M. avium*, Mph: digested *M. phlei*, Mch: digested *M. chelonae*, Mne: digested *M. neolactis*, เลน M: 50 bp ladder