บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ เชื้อที่ศึกษาทั้งหมดเจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ogawa medium) แล้วสกัด nucleic acid โดย digestion buffer (Protinase K.) ปรับความเข้มข้นของเชื้อในน้ำกลั่น มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No.5 เนื่องจากให้ PCR product มีความเข้มข้นสูงสุดผสมกับ digestion buffer ในอัตราส่วน 9:1 อบที่ 60° ซ นานอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ดูดมาปริมาตร 10 ul เพื่อทำ PCR ความเข้มข้นของ PCR producte ที่ได้ประมาณ 50 ug/ul Primer ที่ใช้ทำ PCR คือ pA และ pI ซึ่ง pI มีความจำเพาะกับ genus Mycobacteria เท่านั้น[45] ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้ศึกษาได้นำเชื้อ genus ต่าง ๆ ได้แก่ *E.coli, Klebsiella* species, *Staphylococcus* species และ *Streptococcus* species มาทำ PCR ผลการศึกษาพบว่าไม่สามารถขยายเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย Primer ดังกล่าว แต่เมื่อผสม genus ดังกล่าวกับ genus Mycobacteria พบว่าปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นหลังทำ PCR ดังนั้น จะเห็นว่าเชื้อ genus ต่าง ๆ ไม่สามารถเพิ่มขยายได้ และไม่มีผลรบกวนต่อการทำ PCR เมื่อใช้ Primer ดังกล่าว การหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene (16 S rDNA) 2 ช่วงคือ region A ที่ตำแหน่ง 129-214 และ region B ที่ตำแหน่ง 439-497 ในเชื้อมาตรฐาน 16 สายพันธุ์ มีลำดับเบสเหมือนกับได้มีผู้ศึกษาไว้ เป็นเทคนิคที่ให้ความถูกต้องและสามารถนำมาใช้ได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาใน clinical isolates จำนวน 71 isolates คือ *M.tuberculosis* , *M.avium* complex และ *Mycobacterium* species จำนวน 23 , 24 และ 24 isolates ตามลำดับที่แยกสปีชีส์แล้วด้วยวิธี conventional และ Gen-Probe, Inc.,San Diego,Calif. ผลจากการหาลำดับเบสให้ผลตรงกันจำนวน 68 isolates และ 3 isolates คือ isolate ที่ 69 และ 70 มีลำดับเบสเป็น *M.paraffinicum* ลักษณะเชื้อที่มีอัตราเจริญเติบโตช้า ให้โคโลนีสีเหลือง และ ให้ผลลบกับ Accuprobe ของ 4 สปีชีส์ การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ได้ และ stock culture เกิดการปนเปื้อนด้วย rapid grower และได้ทิ้งไปแล้วไม่สามารถหาลำดับเบสใหม่ได้ และ isolate ที่ 71 ลำดับเบสเป็น related *M.simiae* เมื่อผลการทดสอบด้วยวิธี conventional เป็น *M.simiae* มีลำดับเบสแตกต่างใน region A ดังได้มีผู้ศึกษาไว้[28]

อย่างไรก็ตามการหาลำดับเบสของ 16 S rRNA gene (16 S rDNA) 2 ช่วง คือ region A และ B พบว่าไม่สามารถแยกสปีชีส์ของมัยโคแบคทีเรียบางกลุ่มเช่น *M.tuberculosis* complex, *M.kanasii* กับ *M.gastri* ,M.avium กับ *M.paratuberculosis* และ *M.ulcerans* กับ *M.marinum* ต้องอาศัย phenotytic อย่างไรก็ตามลำดับเบสที่อยู่ระหว่าง 16S-23S rDNA สามารถแยก

M.kansasii กับ *M.gastri* [46] และที่ตำแหน่ง 135 บาง strain ของ *M.avium* แตกต่างจาก *M.paratuberculosis* โดยทั่วไปแล้วการจำแนกสปีชีส์ใช้ลำดับเบสของ 16S rDNA region A เท่านั้นก็เพียงพอ[28] แต่มีบางสปีชีส์เท่านั้น ต้องหาลำดับเบสใน region B ด้วย ได้แก่ *M.triviale*, *M.shimoidei*, *M.lepraemurium* เนื่องจาก *M.triviale* กับ *M.shinoidei* มีลำดับเบสในช่วง 129-214 ไม่แตกต่างกัน และ *M.lepraemurium* มีลำดับเบสดังกล่าวเหมือนกับ *M.avium* การศึกษาครั้งนี้ได้หาลำดับเบสทั้ง region A และ B เพื่อเป็นการยืนยันซึ่งกันและกัน

เวลาที่ใช้ทำ PCR ประมาณ 6 ชั่วโมง จึงนำมาหาลำดับเบสด้วยวิธี dideoxytermination method (Sanger) หลังจากนั้นนำมาแยกขนาดความยาวใน 6% Acrylamide / Bis-acrylamidegel เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำไปประกบฟิล์มอีก 36 ชั่วโมง เวลาที่ใช้ทำการทดสอบทั้งหมดประมาณ 50 ชั่วโมง ขณะที่ conventional method ใช้เวลา 4-8 สัปดาห์

เทคนิคทางชีวโมเลกุลได้มีผู้ทำการศึกษาจำแนกสปีชีส์เชื้อมัยโคแบคทีเรียไว้ดังนี้ 1) เทคนิค PCR และแยกสปีชีส์ด้วย hybridization, sequencing และ restriction enzyme 2) เทคนิค nucleic acid sequence based amplification(NASBA) และแยกสปีชีส์ด้วย enzyme linked gel essay(ELGA) และ 3) เทคนิค gas liquid chromatographic analysis(GLC) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้พยายามนำเทคนิค PCR มาใช้กับสิ่งส่งตรวจโดยตรง พบว่า ความไวเท่ากับ 84.5% และ ความจำเพาะเท่ากับ 99.5%[47] โดยจะตรวจวินิจฉัยได้รวดเร็วและจะเป็นพื้นฐานเพื่อช่วยวิจัยการตรวจเชื้อบางสปีชีส์ที่เจริญยาก หรือไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ มาจำแนกสปีชีส์ต่อด้วยการหาลำดับเบสของ 16S rDNA เช่น *M.genavense*[8] เมื่อพิจารณาข้อดีและข้อเสียแต่ละเทคนิค พบว่าค่าใช้จ่ายของเทคนิค hybridization และ sequencing ไม่แตกต่างกัน ประมาณ 700-900 บาท เทคนิค NASBA ค่าใช้จ่ายสูงที่สุด แต่ restrictione enzyme ต้องอาศัย gel ที่มีคุณภาพดีเพื่อแยกได้ชัดเจน และต้องใช้ PCR product หรือปริมาณ DNA extract ที่มีความเข้มข้นสูง ขณะที่ sequencing ใช้ปริมาณ DNA น้อย ความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ เทคนิค sequencing แยกได้สูง เนื่องจากลำดับเบสแต่ละสปีชีส์ มีความแตกต่างกันจึงทำการหาเพียง 1 ครั้ง ตรงกันข้ามเทคนิค GLC และ restriction enzyme ได้มีผู้ศึกษาไว้ประมาณ 10 สปีชีส์ เทคนิค hybridization ต้องอาศัย probe ขณะนี้ที่ใช้กันอยู่ประมาณ 4 สปีชีส์เท่านั้น ราคาของอุปกรณ์และเครื่องมือ เทคนิค GLC ราคาสูงมาก พร้อมกับต้องใช้สารชนิดต่าง ๆ ในการควบคุมคุณภาพ