

การพัฒนาเทคนิค RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION เพื่อตรวจหาเชื้อ  
*Mycobacterium avium* COMPLEX ด้วยตาเปล่า



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช  
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก  
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2562  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION FOR NAKED EYE  
DETECTION OF *Mycobacterium avium* COMPLEX



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and  
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิค RECOMBINASE POLYMERASE  
AMPLIFICATION เพื่อตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium*  
*avium* COMPLEX ด้วยตาเปล่า

โดย

นายเทอดศักดิ์ สุธาทู

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์  
และวิทยาภูมิคุ้มกัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกูล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกูล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(อาจารย์ ดร.เทอดศักดิ์ พราหมณะนันท์)

เทิดศักดิ์ สุธาทู : การพัฒนาเทคนิค RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION เพื่อตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium avium* COMPLEX ด้วยตาเปล่า. ( DEVELOPMENT OF RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION FOR NAKED EYE DETECTION OF *Mycobacterium avium* COMPLEX) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

โรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *Mycobacterium avium* complex (MAC) มีอุบัติการณ์เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย เนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ การวินิจฉัยเชื้อ MAC ในปัจจุบันที่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี นอกจากใช้เวลานานแล้ว ยังไม่สามารถจำแนกเชื้อได้ถึงระดับสปีชีส์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Mycobacterium avium* และเชื้อ *Mycobacterium intracellulare* ซึ่งเป็นเชื้อ MAC ที่สำคัญและเพาะแยกได้บ่อยจากสิ่งส่งตรวจ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ คือการพัฒนาเทคนิค Recombinase Polymerase Amplification ร่วมกับการอ่านผลด้วยสี SYBR Green I (RPA/SYBR) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC ซึ่งอาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อกลุ่ม MAC เชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* และอ่านผลที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าได้ในทันทีภายหลังการเติมสี SYBR Green I ผลจากการทดสอบกับตัวอย่าง DNA ของเชื้อ MAC จำนวน 120 ตัวอย่าง พบว่าเทคนิค RPA/SYBR สามารถตรวจวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีความไว 100% และความจำเพาะตั้งแต่ 80.7% ขึ้นไป ซึ่งจัดว่ามีความสอดคล้องในเกณฑ์ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีหาลำดับเบส (สถิติ Kappa มีค่าตั้งแต่ 0.801 ขึ้นไป) ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR มีความไวตั้งแต่ 89.2% ขึ้นไป และความจำเพาะตั้งแต่ 97.5% ขึ้นไป และมีความสอดคล้องในเกณฑ์ดีมากเช่นเดียวกัน (สถิติ Kappa มีค่าตั้งแต่ 0.863 ขึ้นไป) นอกจากนี้เทคนิค RPA/SYBR ยังมีค่าความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบน้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้เท่ากับ 1 ng/ $\mu$ l และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อส่วนใหญ่ของ *Mycobacterium* แม้ว่าเทคนิค RPA/SYBR ที่ได้พัฒนาขึ้น มีขั้นตอนการทดสอบที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว และสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า และไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะ ซึ่งเหมาะสำหรับนำมาใช้ตรวจคัดกรองเบื้องต้นในการวินิจฉัยเชื้อ MAC ในห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลขนาดเล็ก หรือห้องปฏิบัติการภาคสนาม อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาพัฒนาความจำเพาะเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคดังกล่าวในอนาคต

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุล	ลายมือชื่อนิสิต .....
	ชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยา	
	ภูมิคุ้มกัน	
ปีการศึกษา	2562	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 5976660037 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Mycobacterium, MAC, Recombinase Polymerase Amplification, SYBR Green I,  
RPA/SYBR

Thertsuk Suthat : DEVELOPMENT OF RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION FOR  
NAKED EYE DETECTION OF *Mycobacterium avium* COMPLEX. Advisor: Asst. Prof. PANAN  
RATTHAWONGJIRAKUL, Ph.D.

Infections caused by *Mycobacterium avium* complex (MAC) has been increased globally, including Thailand, owing to the rising in immunocompromised patients. A current diagnosis, based on culture and biochemical tests, is time-consuming. Furthermore, it is not enabled to differentiate MAC in a species level, particularly between the most common isolated MAC, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. Thus, this study aimed to develop Recombinase Polymerase Amplification combined with a SYBR Green I, called RPA/SYBR, for diagnosis of MAC. The RPA/SYBR was depended on isothermal amplification directed by specific primers to MAC, *M. avium* and *M. intracellulare*, and was immediately read out by a naked eye after addition of a SYBR Green I. After examined with 120 DNA samples of MAC, RPA/SYBR was capable of differentiating between *M. avium* and *M. intracellulare* effectively. RPA/SYBR shown 100% and over 80.7% of sensitivity and specificity, respectively, and an excellent correlation ( $Kappa \geq 0.801$ ) when compared with nucleotide sequencing. While analyzing with PCR, RPA/SYBR shown over 89.2% and over 97.5% of sensitivity and specificity, respectively, and an excellent correlation ( $Kappa \geq 0.863$ ). Besides, a limit of detection of RPA/SYBR was 1 ng/ $\mu$ l, and there were no cross-reactions with most of the *Mycobacterium* species. Although, the developed RPA/SYBR was simple, rapid, easy for read out by a naked eye without the specific instruments, which is proper for a screening diagnosis of MAC in small healthcare settings or field laboratories. However, further development to improve a specificity should be concerned, in order to raise the efficiency of RPA/SYBR in future.

Field of Study: Molecular Science of Medical      Student's Signature .....

Microbiology and Immunology

Academic Year: 2019      Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากบุคคลต่างๆ ดังนี้ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้มอบความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในทุกด้านไม่ว่าจะเป็นเรื่องการเรียนรู้ สุขภาพ ตลอดจนการใช้ชีวิตในฐานะนิสิตปริญญาโทที่ทำงานไปด้วย

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ หัวหน้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ DNA ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้จากสิ่งส่งตรวจ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการสกัดตัวอย่าง DNA

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ที่กรุณาเป็นประธานสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.เทอดศักดิ์ พรหมฉะนันท์ ที่กรุณาเป็นกรรมการภายนอกในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. รัชนิพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สอนและถ่ายทอดวิชาความรู้ต่างๆ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัยทุน 90 ปี และคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในศึกษาต่อ และท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณเพื่อน พี่น้องทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ รวมถึงให้คำปรึกษาต่างๆ

จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เทิดศักดิ์ สุธาทู

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ท
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย .....	3
3. ขอบเขตงานวิจัย.....	3
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ .....	5
2. การติดต่อ.....	6
3. พยาธิสภาพและการก่อโรค.....	7
4. ปัจจัยในการก่อโรค.....	9
5. ระบาดวิทยา.....	10
6. การตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อทางห้องปฏิบัติการ .....	12
6.1 การวินิจฉัยเชื้อ MAC ด้วยวิธีดั้งเดิม .....	13
6.2 เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC).....	14

6.3	เทคนิค Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) .....	14
6.4	เทคนิคทางอณูชีววิทยา .....	15
7.	การรักษาและการดื้อยาของเชื้อ MAC .....	21
8.	เทคนิค Isothermal amplification .....	24
8.1	Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA).....	24
8.2	Loop-mediated- isothermal amplification (LAMP).....	25
8.3	Strand- displacement amplification (SDA).....	25
8.4	Rolling circle amplification (RCA).....	26
8.5	Helicase dependent amplification (HDA).....	26
9.	เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA).....	27
10.	การวินิจฉัยโรคติดเชื้อด้วยเทคนิค RPA.....	30
11.	การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA.....	32
11.1	วิธี Agarose gel electrophoresis.....	32
11.2	เทคนิค Realtime RPA.....	33
11.3	เทคนิค Lateral flow (LF) .....	33
12.	การตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมด้วยสี SYBR Green I.....	33
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....		36
1.	สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์.....	36
1.1	สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR .....	36
1.2	สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA .....	36
1.3	สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis.....	37



2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย .....	37
3. การออกแบบงานวิจัย .....	38
3.1 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยด้วยเทคนิค PCR.....	38
3.2 การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing .....	38
3.3 การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR.....	38
3.4 การพัฒนาเทคนิค Recombinase polymerase amplification ร่วมกับ SYBR green I (RPA/SYBR) สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC.....	39
3.5 การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR .....	39
3.6 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค RPA/SYBR ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC.....	39
4. วิธีการทดลอง .....	40
4.1 การคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่าง.....	40
4.2 การพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์.....	41
4.3 ตัวอย่าง DNA ที่ใช้ในงานวิจัย .....	41
4.4 การสกัด DNA .....	41
4.5 การออกแบบไพรเมอร์.....	42
4.6 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย .....	49
4.7 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์สำหรับเทคนิค PCR.....	51
4.8 การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR .....	53
4.9 การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>gyrB</i> ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing.....	54
4.10 การพัฒนาเทคนิค RPA/SYBR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC .....	54
4.11 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค RPA/SYBR.....	59
4.12 การทดสอบความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุด ที่เทคนิค RPA/SYBR สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC.....	59
4.13 การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR .....	60

4.14 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค RPA/SYBR.....	60
4.15 การคำนวณค่าความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยสถิติ Kappa.....	63
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย.....	66
1. ตัวอย่าง DNA ที่ใช้ในงานวิจัย.....	66
2. การวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA.....	67
3. การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย .....	68
3.1 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> , ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> และไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	68
3.2 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA, ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA และไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ด้วยเทคนิค PCR .....	70
4. การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์สำหรับเทคนิค PCR .....	71
4.1 การทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสม.....	71
4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม.....	74
5. การจำแนกพีซีดีของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR.....	77
6. การจำแนกพีซีดีของเชื้อ MAC ด้วยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>gyrB</i> ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing .....	81
7. การพัฒนาเทคนิค RPA/SYBR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC.....	84
7.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA และ ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ที่เหมาะสม.....	86
7.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นที่เหมาะสม.....	91
7.3 การทดสอบหาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม .....	97
7.4 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม.....	102
7.5 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี SYBR Green I.....	107

8. สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค RPA/SYBR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC .....	109
9. การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค RPA/SYBR.....	113
10. การทดสอบความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดที่เทคนิค RPA/SYBR สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC.....	117
11. การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR.....	122
12. การคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค RPA/SYBR และการคำนวณค่าความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยสถิติ Kappa .....	131
13. ผลการวินิจฉัยจำแนกเชื้อ <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> และเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบกับเทคนิคการหาลำดับเบส และเทคนิค PCR .....	139
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย.....	146
บทที่ 6 สรุปผลการดำเนินการ.....	165
บรรณานุกรม.....	167
ประวัติผู้เขียน.....	183

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2. 1 การเปรียบเทียบเทคนิค Isothermal amplification.....	29
ตารางที่ 3. 1 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	49
ตารางที่ 3. 2 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RPA/AGE.....	61
ตารางที่ 3. 3 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing.....	61
ตารางที่ 3. 4 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing.....	62
ตารางที่ 3. 5 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR.....	62
ตารางที่ 3. 6 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ..	63
ตารางที่ 3. 7 การวิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC จากเทคนิคต่างๆ ด้วยค่าสถิติ Kappa .....	64
ตารางที่ 3. 8 เกณฑ์ความสอดคล้องกันของสถิติ Kappa ตามแนวทางของ Landis และ Koch (112) .....	65
ตารางที่ 4. 1 จำนวนสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดที่ถูกส่งเข้ามาเพื่อรับการวินิจฉัยเชื้อ MAC (N=121).....	67
ตารางที่ 4. 2 ผลการวัดความบริสุทธิ์ของ DNA ด้วยเครื่อง Nanodrop (N = 121).....	68
ตารางที่ 4. 3 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาสำหรับการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR....	77
ตารางที่ 4. 4 ขั้นตอนในปฏิกิริยาสำหรับการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR .....	78
ตารางที่ 4. 5 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR กับไพรเมอร์ MAC gyrB ไพรเมอร์ MAV gyrB และไพรเมอร์ MIN gyrB.....	79

ตารางที่ 4. 6 การแปลผลเพื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% .....	80
ตารางที่ 4. 7 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ MAC ในระดับสปีชีส์เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน <i>M. avium subsp. avium</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25291 และ <i>M. intracellulare</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 13950 .....	83
ตารางที่ 4. 8 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ MAC ในระดับสปีชีส์เปรียบเทียบกับเชื้อ MAC สายพันธุ์อื่นๆ .....	84
ตารางที่ 4. 9 ส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค RPA/SYBR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC .....	110
ตารางที่ 4. 10 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วยไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA ตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เปรียบเทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis.....	125
ตารางที่ 4. 11 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วยไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA ตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เปรียบเทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis.....	127
ตารางที่ 4. 12 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วยไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เปรียบเทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis.....	129
ตารางที่ 4. 13 การแปลผลเพื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X .....	130
ตารางที่ 4. 14 การแปลผลเพื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% .....	131
ตารางที่ 4. 15 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบเทคนิค RPA/AGE .....	132
ตารางที่ 4. 16 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing .....	133

ตารางที่ 4. 17 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วย  
 เทคนิค Sanger DNA sequencing ..... 135

ตารางที่ 4. 18 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR  
 ..... 136

ตารางที่ 4. 19 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR  
 ..... 138

ตารางที่ 4. 20 ผลเปรียบเทียบการวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium*, *M. intracellulare* และเชื้อสาย  
 พันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบส เทคนิค PCR เทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค  
 RPA/AGE..... 139

ตารางที่ 4. 21 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa  
 ของเทคนิคต่างๆ เมื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium* ..... 140

ตารางที่ 4. 22 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa  
 ของเทคนิคต่างๆ เมื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. intracellulare* ..... 142

ตารางที่ 4. 23 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa  
 ของเทคนิคต่างๆ เมื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อสายพันธุ์อื่นๆในกลุ่ม MAC..... 144

## สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2. 1 การเกิดพยาธิสภาพของเชื้อ MAC ในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (19).....	8
รูปที่ 2. 2 วัฏจักรการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA (91).....	28
รูปที่ 3. 1 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAC <i>gyrB</i> F ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	44
รูปที่ 3. 2 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAC <i>gyrB</i> R ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	44
รูปที่ 3. 3 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAV <i>gyrB</i> F ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	45
รูปที่ 3. 4 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAV <i>gyrB</i> R ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	45
รูปที่ 3. 5 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MIN <i>gyrB</i> F ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	45
รูปที่ 3. 6 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MIN <i>gyrB</i> R ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	46
รูปที่ 3. 7 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAC <i>gyrB</i> F RPA ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับ เบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	46
รูปที่ 3. 8 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAC <i>gyrB</i> R RPA ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับ เบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	47
รูปที่ 3. 9 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAV <i>gyrB</i> F RPA ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับ เบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	47
รูปที่ 3. 10 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAV <i>gyrB</i> R RPA ภายหลังจากเปรียบเทียบ ลำดับเบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign .....	48

รูปที่ 3. 11 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MIN <i>gyrB</i> F RPA ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับเบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	48
รูปที่ 3. 12 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MIN <i>gyrB</i> R RPA ภายหลังจากเปรียบเทียบลำดับเบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ <i>Mycobacterium</i> สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	48
รูปที่ 4. 1 ผลประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> (A), ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> และไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> (B) ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	69
รูปที่ 4. 2 ผลการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA (A), ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA (B) และไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA (C) ด้วยเทคนิค PCR.....	70
รูปที่ 4. 3 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% .....	72
รูปที่ 4. 4 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% .....	73
รูปที่ 4. 5 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% .....	73
รูปที่ 4. 6 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	74
รูปที่ 4. 7 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	75
รูปที่ 4. 8 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	76
รูปที่ 4. 9 ตัวอย่างเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR กับไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> (A) ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> (B) และไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> (C) เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% .....	79



รูปที่ 4. 10 ตัวอย่างการวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อจำแนกและยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ MAC ในระดับสปีชีส์ด้วยโปรแกรม MegAlign.....	81
รูปที่ 4. 11 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> เบื้องต้นด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA (A), ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA (B) และไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA (C) เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	85
รูปที่ 4. 12 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X ....	87
รูปที่ 4. 13 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	88
รูปที่ 4. 14 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X ....	89
รูปที่ 4. 15 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	89
รูปที่ 4. 16 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X ....	90
รูปที่ 4. 17 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	91
รูปที่ 4. 18 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X .....	92
รูปที่ 4. 19 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	93

รูปที่ 4. 20 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X .....	94
รูปที่ 4. 21 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	95
รูปที่ 4. 22 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X .....	95
รูปที่ 4. 23 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	96
รูปที่ 4. 24 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X .....	97
รูปที่ 4. 25 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	98
รูปที่ 4. 26 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X .....	99
รูปที่ 4. 27 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	100
รูปที่ 4. 28 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X .....	100

รูปที่ 4. 29 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	101
รูปที่ 4. 30 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X.....	102
รูปที่ 4. 31 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	103
รูปที่ 4. 32 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR GreenI ความเข้มข้น 375X.....	104
รูปที่ 4. 33 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	105
รูปที่ 4. 34 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR GreenI ความเข้มข้น 375X.....	105
รูปที่ 4. 35 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%.....	106
รูปที่ 4. 36 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	107
รูปที่ 4. 37 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	108
รูปที่ 4. 38 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>gyrB</i> ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	109

รูปที่ 4. 39 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ..... 110

รูปที่ 4. 40 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%..... 112

รูปที่ 4. 41 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ..... 114

รูปที่ 4. 42 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ..... 114

รูปที่ 4. 43 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ..... 114

รูปที่ 4. 44 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ..... 115

รูปที่ 4. 45 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ..... 116

รูปที่ 4. 46 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ..... 116

รูปที่ 4. 50 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ..... 118

รูปที่ 4. 51 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดของไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ..... 119

รูปที่ 4. 49 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%..... 120

รูปที่ 4. 50 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดของไฟรเมอร์ MAV *gyrB* และไฟรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%..... 121

รูปที่ 4. 51 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไฟรเมอร์ MAC *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ..... 123

รูปที่ 4. 52 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไฟรเมอร์ MAC *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%..... 124

รูปที่ 4. 53 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไฟรเมอร์ MAV *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ..... 125

รูปที่ 4. 54 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไฟรเมอร์ MAV *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%..... 126

รูปที่ 4. 55 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไฟรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ..... 127

รูปที่ 4. 56 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไฟรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%..... 128

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อ *Mycobacterium* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางคลินิก สามารถก่อโรคติดเชื้อได้ทั้งในคนและสัตว์ อาทิเช่น วัณโรค ซึ่งเป็นการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ในขณะที่เชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์ที่ไม่ใช่เชื้อก่อวัณโรค (Nontuberculous mycobacteria: NTM) สามารถก่อให้เกิดโรคปอด (Pulmonary disease) ต่อม น้ำเหลืองอักเสบ (Lymphadenitis) การก่อโรคแบบแพร่กระจาย (Disseminated disease) รวมถึงการก่อโรคบริเวณผิวหนัง เนื้อเยื่ออ่อน และกระดูก (1) ปัจจุบันพบว่าการติดเชื้อกลุ่ม NTM มีอุบัติการณ์เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทย (2-4) พบการติดเชื้อกลุ่ม NTM ส่วนใหญ่ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำโดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเอดส์ และผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันของร่างกาย เชื้อกลุ่ม NTM ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อและเพาะแยกได้บ่อยจากสิ่งส่งตรวจ คือเชื้อ *Mycobacterium avium* complex (MAC) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ที่สำคัญ ได้แก่ *Mycobacterium avium* และ *Mycobacterium intracellulare* ซึ่งไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อด้วยผลการทดสอบทางชีวเคมี และจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการจำแนก (5) โดยเชื้อทั้งสองสปีชีส์สามารถก่อโรคได้เกือบทุกระบบของร่างกาย ซึ่งการก่อโรคที่พบได้บ่อยที่สุด คือ การก่อโรคติดเชื้อในปอด (MAC-associated lung diseases) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ *M. avium* มักก่อโรคแบบแพร่กระจาย ขณะที่เชื้อ *M. intracellulare* มักก่อโรคที่ปอด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับบริเวณที่เชื้อเข้าสู่ร่างกาย โดยส่วนใหญ่จะพบการติดเชื้อแบบฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เช่น ผู้ป่วยโรค

เอดส์ โรคมะเร็งทางโลหิตวิทยา ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เด็กทารก เป็นต้น ซึ่งผู้ป่วยสามารถติดเชื้อดังกล่าวได้จากการหายใจเอาละอองที่มีเชื้อเข้าไปทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ปอด มีลักษณะเหมือนการติดเชื้อวัณโรค หากมีการติดเชื้อที่รุนแรงและไม่ได้รับการรักษา เชื้อ MAC อาจแพร่กระจายเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองและระบบโลหิต ส่งผลให้เกิดอาการที่รุนแรงตามมา การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในปัจจุบันต้องอาศัยผลการตรวจอาการทางคลินิกประกอบกับผลการเอ็กซเรย์ปอด การย้อมเชื้อด้วยสีทนกรด การเพาะเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่เทคนิคทางอณูชีววิทยาได้เข้ามามีบทบาทในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีความไว และความเร็วที่สูงกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ(1, 2)

วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจำเป็นต้องอาศัยระยะเวลาในการทดสอบประมาณ 1-3 เดือน เนื่องจากเป็นเชื้อที่เจริญเติบโตช้า และจำกัดอยู่ในเฉพาะโรงพยาบาลขนาดใหญ่ที่มีความพร้อมเท่านั้น แม้ว่าในปัจจุบันโรงพยาบาลบางแห่งได้ใช้เครื่องมือทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยในการวินิจฉัยเชื้อและความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ แต่เครื่องมือดังกล่าวมีราคาแพง จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับโรงพยาบาลขนาดเล็กหรือโรงพยาบาลในพื้นที่ที่ห่างไกลความเจริญ อาทิเช่น ตามแนวชายแดนของประเทศหรือตามชนบท ส่งผลให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการวินิจฉัยเพื่อการรักษาอย่างเหมาะสมและทันเวลาที่ จึงเป็นสาเหตุของการเพิ่มอุบัติการณ์เชื้อ MAC ในปัจจุบัน

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของงานวิจัยที่ต้องการพัฒนาเทคนิค Recombinase Polymerase Amplification ร่วมกับการอ่านผลด้วยสี SYBR Green I (RPA/SYBR) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือเพิ่มสารพันธุกรรมหรือเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า ทั้งนี้เทคนิคที่พัฒนาอาศัยหลักการของการออกแบบ Primer (6) ที่จำเพาะต่อตำแหน่งของแต่ละสปีชีส์บนสายของ DNA และทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ด้วยเทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) จากนั้นทำการ

ตรวจสอบสารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นด้วยตาเปล่าภายหลังการเติมสี SYBR Green I (SYBR) (6-8) โดยดูจากการเรืองแสงที่เกิดขึ้น ซึ่งเทคนิค RPA/SYBR ที่พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC ได้ภายในเวลาไม่เกิน 40 นาที โดยอาศัยเครื่องมือที่มีใช้อยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ อาทิเช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (Heating block) และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจแบบ Point of care หรือในงานภาคสนามได้ จึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับประเทศที่กำลังพัฒนา หรือในพื้นที่ที่ห่างไกลความเจริญและไม่มีเครื่องมือที่ทันสมัยเข้าถึง เพื่อประโยชน์ในการรักษาการติดเชื้อที่เหมาะสมอย่างทันท่วงที และช่วยควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ MAC ได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 เพื่อพัฒนาเทคนิค RPA/SYBR สำหรับการวินิจฉัยจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MAC
- 2.2 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค RPA/SYBR ในการวินิจฉัยจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MAC กับเทคนิค PCR และเทคนิคการหาลำดับเบส

## 3. ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิค RPA/SYBR ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิเดียว และตรวจสอบสารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มขึ้นด้วยตาเปล่าจากการอ่านสีของ SYBR green I ซึ่งจะใช้เทคนิค RPA/SYBR ที่พัฒนาขึ้นในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MAC จำนวนทั้งสิ้น 121 ตัวอย่าง โดยใช้ DNA ของเชื้อที่เหลือจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ผลของการวินิจฉัยจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค PCR และเทคนิคการหาลำดับเบส เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค RPA/SYBR ที่ถูกพัฒนาขึ้น



#### 4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาเทคนิค RPA/SYBR ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว ไม่ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิม อีกทั้งเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นยังมี ความไว และความจำเพาะสูง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบส เทคนิค RPA/SYBR สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจแบบ Point of care สำหรับการวินิจฉัยเชื้อ MAC ในโรงพยาบาลที่อยู่ห่างไกล หรือที่มีห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่ไม่มีเครื่องมือที่มีราคาแพง นอกจากนี้ยังเหมาะกับการนำไปตรวจวินิจฉัยในการออกภาคสนาม ทำให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว ทันทีที่มีประสิทธิภาพในการรักษา เป็นการลดความสูญเสีย และการแพร่กระจายของเชื้อ อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ในงานระบาดวิทยาได้อีกด้วย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

เชื้อ *Mycobacterium avium* complex (MAC) เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ Nontuberculous mycobacteria (NTM) หรือเชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์ที่ไม่ใช่เชื้อก่อวัณโรค จัดอยู่ในสกุล *Mycobacterium* วงศ์ *Mycobacteriaceae* เชื้อ MAC เป็นเชื้อที่เจริญได้ช้า และไม่มีการสร้างเม็ดสี (Slow-growing nonchromogen mycobacteria) ตามการจัดกลุ่มแบบ Runyon ประกอบไปด้วย 2 สปีชีส์ที่มีความสำคัญทางคลินิก คือ *Mycobacterium avium* และ *Mycobacterium intracellulare* โดยทั่วไปแล้วเชื้อทั้งสองสปีชีส์ให้ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เหมือนกัน หากจำเป็นต้องแยกสปีชีส์ของเชื้อจึงต้องอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา อาทิเช่น การใช้ DNA probe ที่จำเพาะต่อ 16S rRNA เป็นต้น เมื่อเทคนิคทางอณูชีววิทยาได้ถูกพัฒนาขึ้นทำให้สามารถแยกเชื้อ *M. avium* ออกเป็น 4 ซับสปีชีส์ ได้แก่ *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, และ *M. avium* subsp. *silvaticum* รวมไปถึงสามารถพบสปีชีส์ใหม่ๆ ของเชื้อ MAC ที่มีความใกล้เคียงกับ *M. intracellulare* เพิ่มขึ้น ได้แก่ *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. vulneris*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. bouchedurhonense*, *M. mantenii*, *M. yongonense*, และ *M. indicus pranii* (5, 9-12) เชื้อ MAC เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง ไม่มีการสร้างสปอร์ เซลล์มีขนาดระหว่าง 0.2-0.6x1-10 µm พบลักษณะการติดสีย้อมแกรมเป็นแกรมบวกโดยติดสีไม่สม่ำเสมอ หากมีการย้อมสีทึบกรด

พบว่าเชื้อจะติดสีแดงของ Carbol fuchsin เนื่องจากมีผนังเซลล์ด้านนอกที่ถัดจากชั้น Peptidoglycan ประกอบไปด้วยชั้นไขมัน Peptidoglycolipid mycolic acid ที่สูง นอกจากนี้ผนังเซลล์ยังประกอบไปด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ เช่น Arabinogalactan และโมเลกุลของ Lipopolysaccharides (LPS) ทำให้เชื้อมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้สูง (13, 14)

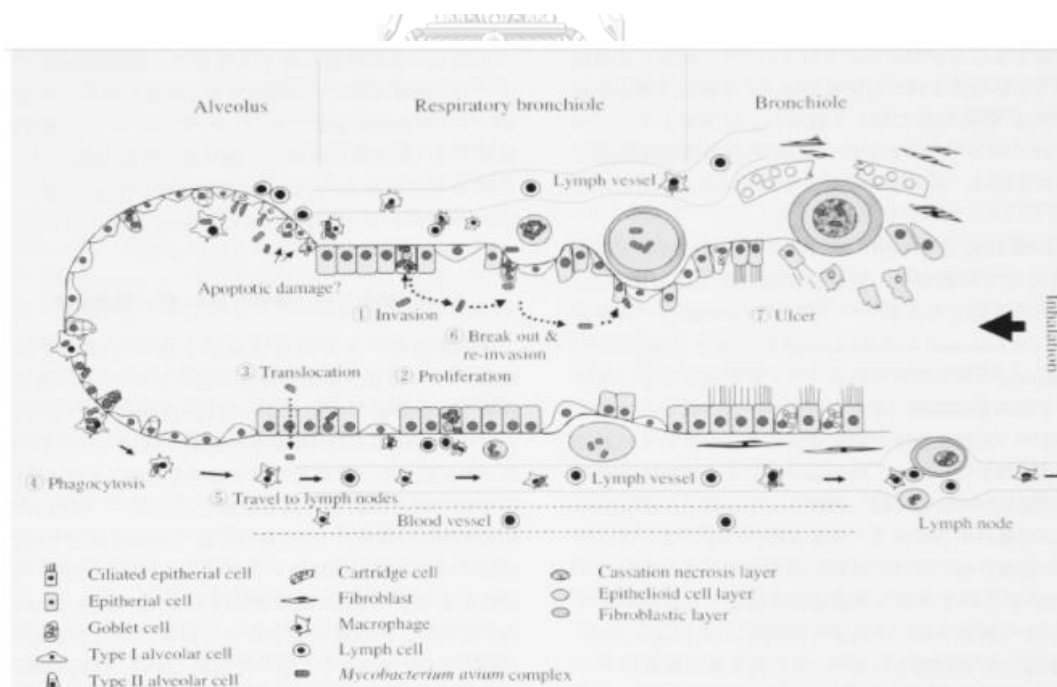
## 2. การติดต่อ

เชื้อ MAC เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น แหล่งน้ำธรรมชาติ สระน้ำ ระบบน้ำภายในอาคาร และอ่างน้ำร้อน รวมถึงพบการปนเปื้อนในดิน ในสัตว์ เช่น หมู นก เป็นต้น (2, 15, 16) เชื้อสามารถแพร่กระจายได้ในอากาศ (Aerosol transmission) และติดต่อสู่คนผ่านทางระบบทางเดินหายใจ (Respiratory route) เมื่อหายใจเอาละอองของเชื้อเข้าไป เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายทางจมูกผ่านหลอดลมที่อยู่ในระบบทางเดินหายใจส่วนบน สู่หลอดลม หลอดลมฝอยและถุงลมปอดซึ่งอยู่ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง โดยพบว่าเชื้อจะบุกรุกเข้าไปในเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจ ถ้าหากร่างกายแข็งแรง ระบบภูมิคุ้มกันจะสามารถทำลายเชื้อได้ แต่หากเมื่อร่างกายอ่อนแอจากภูมิคุ้มกันต่ำหรือบกพร่อง เชื้อจะไม่ถูกทำลายแล้วยังสามารถแบ่งตัวและเจริญจนก่อพยาธิสภาพกับปอดได้ในที่สุด นอกจากนี้เชื้อยังสามารถติดต่อผ่านระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal route) เข้าสู่ร่างกายโดยผ่านทาง การรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไป ซึ่งเชื้อสามารถทนต่อกรดที่อยู่ในกระเพาะอาหารได้ที่ pH น้อยกว่า 3 จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่เซลล์เยื่อผนังลำไส้ไปยังชั้นมิวโคซา แล้วเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด และระบบน้ำเหลือง รวมไปถึงติดต่อผ่านทางบาดแผลตามที่เกิดขึ้นตามผิวหนังได้เช่นกัน (17-21)

### 3. พยาธิสภาพและการก่อโรค

เชื้อ MAC เป็นเชื้อฉวยโอกาส โดยปกติเชื้อจะไม่ก่อโรคในคนที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง แต่ มักก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เช่น ผู้ป่วยโรคทางระบบภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไขกระดูก มะเร็งทางโลหิตวิทยา โรคในกลุ่มอโตอิมมูน เด็ก และคนชรา (1, 22) ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MAC โดยที่ไม่ได้ติดเชื้อ Human immunodeficiency virus (HIV) ร่วมด้วย มักพบในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างหรือมี Auto-antibody ต่อ Interferon gamma และ Interleukin 12 (IL-12) ที่ผิดปกติ รวมไปถึงการตอบสนองต่างๆ ในระหว่างการสร้างสารชีวโมเลกุลดังกล่าว ซึ่งมักพบว่าเป็นภาวะที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (23, 24) เชื้อสามารถก่อโรคได้ในหลายระบบของร่างกาย โดยการก่อโรคที่พบมากที่สุดคือการก่อพยาธิสภาพที่ปอด (Pulmonary disease) ที่มีลักษณะการก่อโรคล้ำกับเชื้อวัณโรค เกิดจากการที่หายใจเอาเชื้อเข้าไป แล้วเชื้อบุกรุกเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจ (Lung epithelial alveolar cells) เข้าสู่เนื้อเยื่อส่วนซับมิวโคซา จากนั้นจึงถูกจับกินด้วยเซลล์ฟาโกไซติก เช่น แมคโครฟาจ เป็นต้น จากนั้นแมคโครฟาจจะเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำเหลืองในปอดบริเวณ Bronchiole ในขณะที่เชื้อมีกลไกต้านการถูกทำลายโดยแมคโครฟาจ และยังสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเชื้อภายในแมคโครฟาจ เมื่อเซลล์ตายและแตกออก เชื้อจึงแพร่กระจายไปสู่เซลล์ถัดไป ทำให้มีการกระตุ้นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในระบบภูมิคุ้มกัน เกิดการรวมตัวระหว่างเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและเซลล์ข้างเคียงที่ตายแล้วเกิดเป็น Granulomas ซึ่งจะพบเชื้อในบริเวณดังกล่าว และพัฒนาไปเป็น Granulomas ที่ตายแล้ว มีลักษณะเป็นจุดพังผืดเกิดขึ้นได้ในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง สามารถสังเกตเห็นลักษณะเป็นจุดได้จากฟิล์มเอกซเรย์ปอด (รูปที่ 2.1) (19) ส่วนการติดต่อผ่านระบบทางเดินอาหารเชื้อสามารถผ่านกระเพาะอาหารลงมาสู่ลำไส้ แล้วเข้าบุกรุกเข้าเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กส่วนปลายบริเวณ Peyer's

patches ที่เป็นต่อมน้ำเหลืองในลำไส้เล็กและเข้าสู่ชั้นมิวโคซ่าต่อไป (19, 20, 25) กรณีที่เชื้อมีการแพร่กระจายไปตามอวัยวะต่างๆ (Disseminated disease) มักพบว่ามีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยโรคเอดส์ที่มีค่า CD4+ T lymphocyte ต่ำกว่า 50 cells/ $\mu$ L ซึ่งจะมีความเสี่ยงในการติดเชื้อเพิ่มขึ้น ในขณะที่ผู้ป่วยโรคเรื้อรัง เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ป่วยมะเร็ง และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย สามารถพบความเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบบแพร่กระจายได้เช่นกัน การแพร่กระจายของเชื้อจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพในระบบน้ำเหลือง เกิดเป็นต่อมน้ำเหลืองอักเสบ (Lymphadenitis) มักพบในเด็กเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้เชื้อยังสามารถก่อพยาธิสภาพในผิวหนัง เนื้อเยื่ออ่อน และกระดูก โดยส่วนใหญ่พบว่าเชื้อ *M. avium* มักก่อโรคแบบแพร่กระจายไปตามอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย ในขณะที่เชื้อ *M. intracellulare* มักพบการก่อพยาธิสภาพส่วนใหญ่ในระบบทางเดินหายใจ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับบริเวณที่เชื้อเข้าสู่ร่างกายและภาวะภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย (1, 22, 26)



รูปที่ 2.1 การเกิดพยาธิสภาพของเชื้อ MAC ในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (19)

#### 4. ปัจจัยในการก่อโรค

เชื้อ MAC สามารถก่อโรคได้โดยอาศัย 3 ปัจจัยหลัก ได้แก่ ตัวเชื้อ ผู้ป่วย และสิ่งแวดล้อม (27) 1). เชื้อ MAC มีผนังเซลล์ที่ประกอบไปด้วย Mycolic acid จำนวนมาก ทำให้ผนังเซลล์มีลักษณะเป็นชั้นไขมันที่หนา และมีคุณสมบัติคล้ายแว็กซ์ รวมถึงความสามารถในการสร้าง Biofilm ของเชื้อซึ่งช่วยลดโอกาสที่ยาปฏิชีวนะจะแพร่เข้าสู่เซลล์ (14, 28) จากการศึกษาที่ผ่านมายังอธิบายถึงความสามารถของเชื้อ MAC ในการยึดเกาะและบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งพบว่าเชื้อมีการสร้าง Adhesion protein เพื่อช่วยในการยึดเกาะกับผนังเซลล์ของ Gastrointestinal epithelial cell line เช่น HT-29 cell จากนั้นเชื้อจะบุกรุกเข้าไปอยู่ในเซลล์ และอาจพบการบุกรุกถึงชั้น Mucosa และ Submucosa ซึ่งสัมพันธ์กับกลไกการติดเชื้อผ่านระบบทางเดินอาหาร (29) การศึกษาที่ผ่านมายังพบว่าเชื้อสามารถทนต่อปฏิกิริยาการแตกตัวเป็นอิสระของออกซิเจน (Reactive oxygen intermediates: ROIs) และไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide: NO) โดยเมื่อเชื้อถูกจับกินโดยเซลล์แมโครฟาจหรือโมโนไซต์ ผ่านทาง Complement receptor และ Fc receptor แล้วเกิดการสร้างฟาโกโซมซึ่งมีเชื้ออยู่ภายใน เชื้อสามารถอยู่รอดและเจริญได้ในเซลล์ดังกล่าว โดยอาศัยกลไกการยับยั้งการรวมตัวกันระหว่างไลโซโซมและฟาโกโซมในกระบวนการฟาโกไซโตซิส ทำให้เชื้อได้รับการป้องกันจากการถูกทำลายด้วย Proteolytic enzyme นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อใช้ Vacuolar proton-ATPase ในการลดความเป็นกรดภายในเซลล์แมโครฟาจ และสร้าง Superoxide dismutase ที่สามารถทำลาย Superoxide anion รวมถึงพบการสร้าง Heat shock protein บางชนิด ที่สามารถยับยั้งการสร้าง Superoxide anion เช่น 65-kDa heat shock protein เป็นต้น (30, 31) 2). ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ โดยมีระดับ CD4+ T lymphocyte ต่ำกว่า 50 เซลล์/ $\mu$ L จนไม่สามารถทำลายเชื้อได้ จะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ MAC ที่ปอดเพิ่มขึ้น และพบว่าอาจเกิดการติดเชื้อชนิดอื่นร่วมด้วย (Co-infection)

ได้แก่ Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Pseudomonas aeruginosa* และ *Aspergillus* spp. (31) ทั้งนี้ยังพบว่าโอกาสเสี่ยงจากการติดเชื้ออาจสัมพันธ์กับเชื้อชาติ จากการทดสอบ *M. avium* sensitin skin พบว่าผู้ป่วยที่เป็นคนผิวดำมีโอกาสติดเชื้อ MAC ได้มากกว่าคนทั่วไป (32) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพที่ปอด เช่น Nodular bronchiectatic disease อาจเสี่ยงต่อการกลับมาติดเชื้อซ้ำภายหลังการรักษาได้มากกว่าผู้ป่วยกลุ่มอื่น (33) 3). สำหรับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมพบว่า เชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน จะเป็นสาเหตุของการติดเชื้อจากการสัมผัสกับดิน เช่น ทำการเกษตร การทำกิจกรรมในสวน ได้มากกว่าการสัมผัสกับสัตว์ หรือการใช้น้ำ เช่น การอาบน้ำ ล้างจาน ว่ายน้ำ รวมไปถึงการดื่มน้ำ เป็นต้น (32, 34)

## 5. ระบาดวิทยา

การติดเชื้อกลุ่ม NTM พบว่าส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อ MAC มากที่สุด และมักมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยติดเชื้อ HIV (35) ซึ่งพบอัตราการก่อโรคเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากรายงานของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ศูนย์การแพทย์แลนเกนัว ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2539-2553 พบอัตราการติดเชื้อ MAC ที่เกิดขึ้นใหม่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการติดเชื้อวัณโรค ซึ่งในปี พ.ศ. 2553 พบอัตราการติดเชื้อ MAC ที่เพิ่มขึ้นเป็น 2-3 เท่าจากปีแรกที่มีการเก็บข้อมูล ขณะที่เชื้อวัณโรคกลับมีอัตราที่เพิ่มขึ้นน้อยกว่า โดยพบว่าการติดเชื้อ HIV เป็นความเสี่ยงหลักที่นำไปสู่การติดเชื้อ MAC นอกจากนี้ยังพบว่าหากมีพยาธิสภาพที่ปอดอยู่ก่อนแล้ว เช่น การเป็นมะเร็งปอด และ/หรือการสูบบุหรี่ จะเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ MAC อีกทางหนึ่ง (36) รายงานของหน่วยงานสาธารณสุขของประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2548-2556 พบการติดเชื้อ MAC ในผู้ป่วยรายใหม่มากถึง 30 คนต่อประชากร 100,000 คน โดยเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าจากปี พ.ศ. 2548 เช่นเดียวกับรายงานของ

โรงพยาบาล 6 แห่ง ในประเทศไต้หวัน ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2557 ที่พบการติดเชื้อ MAC ในผู้ป่วย รายใหม่ซึ่งมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้น สวนทางกลับผู้ป่วยวัณโรคที่มีจำนวนลดลง (37)

การติดเชื้อ MAC พบได้ในทุกภูมิภาคของโลกรวมถึงในประเทศไทย จากการสำรวจข้อมูล รายงานการติดเชื้อกลุ่ม NTM ของประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชียในปี พ.ศ. 2514-2550 พบว่าเชื้อ MAC เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในกลุ่ม NTM โดยประเทศญี่ปุ่นมีการรายงานพบเชื้อ MAC มาก ที่สุดถึง 81% รองลงมาคือประเทศเกาหลีใต้ 73 % ประเทศไต้หวัน 42 % ประเทศไทย 41% ประเทศสิงคโปร์ 39% ประเทศอินเดีย 20 % และในประเทศจีนมีรายงานเพียง 13% ของการติดเชื้อ ในกลุ่ม NTM ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ MAC ก่อพยาธิสภาพในปอดได้มากถึง 43-81% ของ เชื้อกลุ่ม NTM ทั้งหมด และพบการติดเชื้อกลุ่ม NTM ส่วนใหญ่ในผู้ป่วยเพศชายประมาณ 79% และ ในผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นวัณโรคร่วมด้วยประมาณ 37% (38)

จากข้อมูลรายงานการติดเชื้อกลุ่ม NTM ของ NTM-Network European Trials Group (NET) ในปี พ.ศ. 2551 ซึ่งทำการศึกษาเชื้อกลุ่ม NTM ที่คัดแยกและเพาะเลี้ยงได้จากสิ่งส่งตรวจที่มา จากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยในห้องปฏิบัติการ 62 แห่ง จาก 30 ประเทศ ซึ่งแต่ละ ห้องปฏิบัติการได้ใช้วิธีการทดสอบที่แตกต่างกันในการจำแนกชนิดของเชื้อ ได้แก่ การใช้ชุดตรวจ DNA ของ Mycobacteria การใช้ Probe ตรวจสอบยีนที่จำเพาะ การเพิ่มจำนวน DNA แล้วใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ การหาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA ของเชื้อ พบว่าสามารถจำแนกเชื้อ MAC จำนวน 9,421 สายพันธุ์ จากเชื้อกลุ่ม NTM ทั้งหมด 20,182 สายพันธุ์ หรือคิดเป็น 47% โดย เชื้อ MAC ที่แยกได้สามารถจำแนกได้เป็น *M. avium* 47%, *M. intracellulare* 38% และเชื้อ MAC ที่ไม่ได้จำแนกสปีชีส์อีก 15% (39) จากการเก็บข้อมูลในประเทศไทยในเดือนมกราคม พ.ศ. 2541 ถึง เดือนกันยายน 2543 ของโรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพมหานคร พบว่าในบรรดาผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ HIV จำนวน 169 คน มีผู้ป่วยเด็กจำนวน 10 คนที่ติดเชื้อ MAC ร่วมด้วย และมีผู้ป่วยเด็ก 9 คนที่มี



อาการรุนแรงทำให้มีอัตราการตายถึง 60% (22) รายงานอุบัติการณ์ของการติดเชื้อกลุ่ม NTM ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร ตั้งแต่ มกราคม พ.ศ. 2543 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2546 ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อ MAC 48.5% (จำนวน 50 สายพันธุ์ จากเชื้อกลุ่ม NTM ทั้งหมด 103 สายพันธุ์) ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV มากถึง 44 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อ MAC ในกระแสเลือดได้มากกว่าเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุของวัณโรค (Tuberculosis: TB) โดยจากรายงานการติดเชื้อในกระแสเลือดของผู้ป่วยเอดส์ทั้งหมด 334 คน พบว่า 58 คนติดเชื้อ MAC ซึ่งคิดเป็น 17.4% ในขณะที่ 34 คนติดเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งคิดเป็น 10.2% (26) การศึกษาล่าสุดของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช ร่วมกับศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติในปี พ.ศ. 2546 - 2551 สามารถเพาะแยกเชื้อ MAC จากผู้ป่วยได้ทั้งหมด 218 สายพันธุ์ โดยวินิจฉัยเป็นเชื้อ *M. avium* จำนวนทั้งสิ้น 171 สายพันธุ์ คิดเป็น 78% และเชื้อ *M. intracellulare* จำนวนทั้งสิ้น 47 สายพันธุ์ คิดเป็น 22% ของเชื้อ MAC ทั้งหมด (40)

## 6. การตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากเชื้อ MAC สามารถก่อโรคติดเชื้อได้ในหลายระบบของร่างกาย สิ่งส่งตรวจที่นำมาใช้ในการเพาะแยกหรือวินิจฉัยเชื้อจึงมีหลายประเภท ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของการติดเชื้อ กรณีผู้ป่วยมีพยาธิสภาพที่ปอด แพทย์จะทำการวินิจฉัยด้วยผลเอ็กซเรย์ปอด หรือการทำ CT scan ประกอบกับการเก็บเสมหะเพื่อใช้เป็นสิ่งส่งตรวจสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อ อย่างไรก็ตาม สิ่งส่งตรวจจากระบบอื่นๆ ที่นิยมเก็บเพื่อนำส่งห้องปฏิบัติการ ได้แก่ น้ำล้างปอด เลือด หนอง กระดุกและชิ้นเนื้อ (1, 14) การเก็บสิ่งส่งตรวจจำเป็นต้องใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนน้ำจากสิ่งแวดล้อม เนื่องจากอาจจะมีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น หรือเชื้อ *Mycobacteria* ตามสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนเข้ามาได้ โดยต้องมีการติดฉลากให้เรียบร้อยก่อนนำส่ง ทั้งนี้ควรนำส่งสิ่งส่งตรวจภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเก็บ

ถ้าหากเวลานำส่งเกิน 1 ชั่วโมงควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยไม่จำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการขนส่งหรือ Transport media และสามารถใช้น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแช่ไม้พันสำหรับเก็บสิ่งส่งตรวจที่เป็นหนองหรือชิ้นเนื้อเพื่อป้องกันสิ่งส่งตรวจแห้ง สำหรับสิ่งส่งตรวจที่มาจากอวัยวะที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น เช่น เสมหะ จะต้องนำไปผสมกับ N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) ร่วมกับ 5% oxalic acid เพื่อลดการปนเปื้อนและย่อยสลายเยื่อเมือกก่อนการนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป (1, 41, 42)

กรณีสิ่งส่งตรวจที่สงสัยเชื้อ MAC สามารถนำมาวินิจฉัยแยกเชื้อได้ ด้วยวิธีต่างๆ ต่อไปนี้

### 6.1 การวินิจฉัยเชื้อ MAC ด้วยวิธีดั้งเดิม

#### 6.1.1 การย้อมเชื้อจากสิ่งส่งตรวจด้วยสีทนกรด (Acid fast stain)

โดยเชื้อ MAC จะติดสีแดงของ Carbol fuchsin เนื่องจากเชื้อมีปริมาณชั้นไขมันที่ผนังเซลล์จำนวนมากจึงทนต่อการถูกชะล้างด้วย Acid alcohol ซึ่งวิธีดังกล่าวมีความจำเพาะสูงกับเชื้อ Mycobacteria แต่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ และยังมีข้อจำกัดเรื่องความไวในการวินิจฉัย (1)

#### 6.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อกลุ่ม Mycobacteria อาทิเช่น Löwenstein-Jensen media, Middlebrook 7H10 และ 7H11 แม้ว่าวิธีดังกล่าวจะเป็นวิธีมาตรฐาน สามารถจำแนกเชื้อได้จากการสังเกตลักษณะและอัตราการเจริญของโคโลนี และนำเชื้อมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีได้ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 1-3 สัปดาห์ เนื่องจากเชื้อมีอัตราการเจริญที่ช้า ประกอบกับเชื้อ MAC บางสายพันธุ์ให้ลักษณะโคโลนีและผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่คล้ายกัน จึงไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ (1)

## 6.2 เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC)

ที่อาศัยหลักการแยกสารภายใต้ Stationary phase และ Mobile phase ทำให้สารเคลื่อนที่แยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลาย องค์ประกอบทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างของสารที่ศึกษาและสารที่เป็นองค์ประกอบภายในคอลัมน์ สามารถตรวจสอบผลการแยกของสารผสมโดยใช้กราฟ Chromatogram ที่มีลักษณะเป็น Peak เทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (43) เทคนิค HPLC สามารถตรวจวินิจฉัยสปีชีส์ของเชื้อ Mycobacteria ได้โดยการวิเคราะห์รูปแบบ Chromatogram ของ Mycolic acid ซึ่งอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อ และมีความจำเพาะสูงในเชื้อกลุ่มดังกล่าว โดยเทคนิค HPLC สามารถแยกเชื้อก่อวัณโรคและเชื้อกลุ่ม NTM ในระดับสปีชีส์จากการเพาะเลี้ยงได้มากถึง 99.5% และ 95.6% ตามลำดับ (44) แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัด คือไม่สามารถแยกเชื้อบางสายพันธุ์ที่มีรูปแบบของ Mycolic acid ที่มีความใกล้เคียงกัน เช่น เชื้อ *M. abscessus* กับเชื้อ *M. chelonae* (45)

## 6.3 เทคนิค Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

อาศัยหลักการทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนจากการผสมสารลงในแมทริกซ์ แล้วยิงด้วยแสงเลเซอร์ จากนั้นสารจะเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศและวิเคราะห์มวลต่อประจุของสารโปรตีนนั้นเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล (46) การศึกษาก่อนหน้าได้ประยุกต์ใช้เทคนิค MALDI-TOF MS ในการจำแนกเชื้อ Mycobacteria พบว่าสามารถให้ผลความถูกต้องของรูปแบบ Score value (SV) peak ของเชื้อก่อวัณโรคและเชื้อกลุ่ม NTM ในระดับสปีชีส์ได้มากถึง 94.9% และ 94.6% ตามลำดับ และให้ความถูกต้องในการจำแนกในระดับจีนัสถึง 99.4% เมื่อเปรียบเทียบกับ

เพาะเลี้ยง (47) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาใช้เทคนิค MALDI-TOF MS เปรียบเทียบกับวิธีการลำดับเบสของยีน 16S rRNA และยีน *hsp65* ของเชื้อ NTM พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน 118 ใน 125 สายพันธุ์ คิดเป็น 94.4% (48) สำหรับข้อจำกัดของวิธีนี้คือ อย่างไรก็ตามเทคนิค MALDI-TOF MS ไม่สามารถแยกเชื้อที่มีความใกล้เคียงกันทางสายพันธุ์ เช่น เชื้อ *M. abscessus* และเชื้อ *M. massiliense* ซึ่งให้ผลการทดสอบ MALDI spectra ไม่แตกต่างกัน (49)

แม้ว่าเทคนิค HPLC และ MALDI-TOF MS เป็นเทคนิคที่ให้ผลการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะที่สูงสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรค แต่ยังมีข้อจำกัด คือไม่สามารถแยกเชื้อในระดับสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกันหรือมีการสร้างสารชีวโมเลกุลที่เหมือนกันได้อีกทั้งการทดสอบดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ทำให้การทดสอบมีอัตราราคาที่สูงและยังต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ

#### 6.4 เทคนิคทางอณูชีววิทยา

ด้วยข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเชื้อ Mycobacteria ที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ในปัจจุบันเทคนิคทางอณูชีววิทยาได้เข้ามามีบทบาทในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อกลุ่ม Mycobacteria ทั้งเชื้อ *M. tuberculosis* และเชื้อ MAC เป็นอย่างสูง เนื่องมาจากเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธีมาตรฐานดั้งเดิม ตัวอย่างของเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ MAC ได้แก่

#### 6.4.1 เทคนิค DNA specific probe

6.4.1.1 AccuProb assay เป็นเทคนิคที่ใช้ชุดตรวจ AccuProbe Culture Identification (บริษัท Hologic Canada ULC จำกัด, ประเทศแคนาดา) นิยมใช้ในการแยกเชื้อ MAC โดยอาศัยหลักการของ Nucleic acid hybridization ประเภท DNA:RNA hybrid ซึ่งเป็นการจับกันอย่างจำเพาะระหว่าง Single-stranded DNA probe ที่ติดฉลากด้วย Acridinium-ester ซึ่งเป็นสาร Chemiluminescence กับ Ribosomal RNA ซึ่งเป็นเป้าหมายที่อยู่ในเซลล์ของเชื้อ การรายงานผลการทดสอบเป็นค่า Relative light units (RLUs) จากการวัดค่าด้วย Luminometer (50) วิธีการทดสอบนี้สามารถจำแนกสปีชีส์ระหว่างเชื้อ MAC ได้ โดยที่ชุดการทดสอบแยกชนิดกัน ประกอบไปด้วย ชุดทดสอบเชื้อ MAC ชุดทดสอบเชื้อ *M. avium* และชุดทดสอบเชื้อ *M. intracellulare* การทดสอบให้ผลค่อนข้างรวดเร็ว คือประมาณ 1 ชั่วโมง มีความไวเท่ากับ 99.9, 99.3 และ 100 % ตามลำดับ ในขณะที่ทั้ง 3 ชุดทดสอบมีความจำเพาะ 100 % เมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวินิจฉัยสปีชีส์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและแข็งได้ สำหรับข้อจำกัดของเทคนิค AccuProb คือไม่สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อได้โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ จำเป็นต้องใช้เชื้อที่เพิ่งเจริญจากอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น และต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษในการอ่านผลของปฏิกิริยา (51-53)

6.4.1.2 Line probe assay เป็นอีกหนึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่นำมาใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacteria ชนิดต่างๆ ทั้งกลุ่มของเชื้อก่อวัณโรคและเชื้อกลุ่ม NTM โดยอาศัยหลักการ Reverse hybridization เพื่อตรวจหา DNA ของเชื้อบนแผ่น Nitrocellulose ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณ DNA ยีนบริเวณ 16S-23S ribosomal RNA (rRNA) spacer region ของเชื้อด้วยไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย Biotin จะนำผลผลิตไปทำการ Hybridization กับ DNA probe ที่ถูกตรึงอยู่

บนแผ่น Nitrocellulose อ่านผลปฏิกิริยาจากการย่อยยับสเตรตของ Alkaline phosphatase ที่ติดกับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Biotin กับ Streptavidin ปัจจุบันมีการผลิตชุดตรวจที่ใช้เทคนิค Line probe assay ที่ได้รับการรับรองจาก WHO จำนวน 2 ยี่ห้อ ได้แก่ INNO-LiPA® MYCOBACTERIA (บริษัท Innogenetics จำกัด, ประเทศเบลเยียม) และ Genotype *Mycobacterium* (CM) (บริษัท Hain Lifescience จำกัด, ประเทศเยอรมนี) ซึ่งมีความไวเท่ากับ 98.8% และ 98.4% ตามลำดับ และมีความจำเพาะเท่ากับ 100 และ 94.6% ตามลำดับ (54, 55) เมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวินิจฉัยสปีชีส์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี และการยืนยันสปีชีส์ของเชื้อด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาอื่นๆ เทคนิคของ INNO-LiPA® MYCOBACTERIA สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ได้เป็น *M. avium* *M. intracellulare* และ *M. chimaera* ในขณะที่เทคนิคของ Genotype *Mycobacterium* ไม่สามารถแยก *M. intracellulare* ออกจาก *M. chimaera* ได้ เนื่องจากเชื้อมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมาก ข้อจำกัดของทั้งสองเทคนิค จำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ก่อน และต้องนำผลผลิต PCR ไปทำการแยกสาย DNA ก่อนนำมาทดสอบด้วยเทคนิค Line probe จึงใช้เวลานานกว่าเทคนิค AccuProb และจำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษที่มีราคาแพง บุคลากรจำเป็นต้องมีความเชี่ยวชาญเนื่องจากมีขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก และข้อควรระวังหลายข้อ รวมไปถึงถ้าหากมีเชื้อมากกว่า 2 สปีชีส์ หรือพบสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกันแต่พบได้น้อยอาจจะให้รูปแบบการเกิดแถบสีเปลี่ยนไป ทำให้ยากต่อการแปลผล (56-58)

#### 6.4.2 เทคนิคการหาลำดับเบส (DNA sequencing)

เทคนิคการหาลำดับเบส คือวิธีการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ Adenine (A), Guanine (G), Cytosine (C) และ Thymine (T) ของสาย DNA มีการพัฒนาเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1977 โดย Alan Maxam และ Walter Gilbert ได้นำเสนอวิธีการหาลำดับเบสด้วยสารเคมี

(Chemical degradation หรือ Maxam-Gilbert method) ที่มีการติดฉลากสารรังสีคือ  $^{32}\text{P}$  แทน 5' Phosphate ก่อนจะมีการย่อยเป็น Fragment DNA ด้วยสารเคมี (59) ขณะเดียวกัน Fred Sanger ได้นำเสนอวิธีการหาลำดับเบสด้วยการเติม Dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) ลงในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA ได้แก่ ddATP, ddTTP, ddGTP และ ddCTP ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ dNTPs แต่มีความแตกต่างที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาล Deoxyribose จะมี H แทนที่ OH ซึ่งคุณสมบัตินี้ทำให้ไม่สามารถเกิดพันธะ Phosphodiester กับนิวคลีโอไทด์ตัวต่อไปได้ เมื่อมีการสังเคราะห์ DNA ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase แล้วมีการหับ ddNTP มาต่อแล้วจึงหยุดการเกิดปฏิกิริยา เทคนิคดังกล่าวมีชื่อเรียกว่า Chain-terminating inhibitors หรือ Sanger method (60) ปัจจุบันวิธี Sanger method ได้รับความนิยมมากกว่าวิธีของ Maxam-Gilbert เนื่องจากสามารถติดฉลาก ddNTPs ด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกัน จึงทำให้ทำปฏิกิริยาได้ภายในหลอดเดียวกัน แล้วยังสามารถประยุกต์พัฒนาต่อเป็นเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ด้วยการใช้หลักการ Capillary electrophoresis ร่วมด้วย จากนั้นวิเคราะห์ผลผ่านซอฟต์แวร์ในรูปแบบตัวหนังสือและ Electropherogram อย่างไรก็ตาม Sanger method มีข้อจำกัด คือสามารถวิเคราะห์ลำดับเบสได้เพียง 800 bp ต่อการทำปฏิกิริยาในหนึ่งครั้งโดยใช้เวลานานถึง 3 ชั่วโมง (61) ในปัจจุบันมีเทคนิคการหาลำดับเบสรุ่นใหม่ Next-generation sequencing (NGS) ที่ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อหาลำดับเบสที่มีความยาวเพิ่มมากขึ้นในเวลาที่น้อยลง อาทิเช่น Pyrosequencing อาศัยเครื่อง Roche 454 GSFLX (บริษัท Hoffmann-La Roche จำกัด, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์), Reverse terminator อาศัยเครื่อง Illumina Solexa (บริษัท Illumina จำกัด, สหรัฐอเมริกา), Sequencing โดยการ Ligation อาศัยเครื่อง SOLid (บริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด, สหรัฐอเมริกา), Ion torrent sequencing อาศัยเครื่อง Ion GeneStudio S5 (บริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด, สหรัฐอเมริกา) และ Single molecule sequencing อาศัยเครื่อง Helicos (บริษัท Helicos

BioSciences Corporation จำกัด, สหรัฐอเมริกา) เทคนิค NGS เหมาะสำหรับการหาลำดับเบสที่มีขนาดใหญ่ เช่น การหาลำดับเบส Whole genome ของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น (62)

เทคนิคการหาลำดับเบสได้เข้ามามีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ เนื่องจากให้ผลการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะสูง จึงถูกใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางอณูชีววิทยาในการจำแนกชนิดของเชื้อ อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวต้องอาศัยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่จำเพาะที่มีราคาแพง และต้องมีผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญสูง จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก หรือห้องปฏิบัติการที่อยู่ในพื้นที่ชนบท

ในการตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคการหาลำดับเบส นิยมวิเคราะห์ความแตกต่างลำดับเบสของยีน Housekeeping ที่มีอัตราการเปลี่ยนแปลงต่ำ ตัวอย่างเช่น ยีน 16S ribosomal RNA (rRNA) ที่นิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้ทั่วไปซึ่งให้ผลความถูกต้องในระดับจีโนมและระดับสปีชีส์ถึง 96% และ 87.5% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงและวินิจฉัยสปีชีส์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (63) การศึกษาที่ผ่านมาได้จำแนกเชื้อกลุ่ม Mycobacteria โดยใช้ชุดทดสอบ Commercial 16S Ribosomal DNA Sequencing Kit (บริษัท Applied Biosystems จำกัด, สหรัฐอเมริกา) และยีน *hsp65* ในการหาลำดับเบสของเชื้อ พบว่าให้ผลความถูกต้องในระดับสปีชีส์ที่ 87% และ 99.1% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเทคนิค AccuProbe (64, 65) ในขณะที่การทดสอบการหาลำดับเบสของยีน Internal Transcribed Spacer (ITS) ribosomal RNA (16-23S rRNA) เพื่อจำแนกเชื้อกลุ่ม Mycobacteria ให้ผลความเหมือนถึง 94% เมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน และพบว่ายีน ITS ดังกล่าวให้ผลการจำแนกเชื้อที่ดีกว่ายีน 16S rRNA (66) นอกจากนี้ยังมีการใช้ยีน *rpoB* ในการจำแนกวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม MAC และพบว่าสามารถใช้จำแนกเชื้อ *M. avium* *M. intracellulare* และ *M. chimaera* ได้เมื่อใช้



ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของยีน *rpoB* ของแต่ละสปีชีส์ (67) ในขณะที่ยีน *gyrB* ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* และพบว่าเชื่อดังกล่าวทั้งสองมีลำดับเบสที่คล้ายกันเพียง 91% ซึ่งหมายถึงเชื้อมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก จึงสามารถนำยีนดังกล่าวมาใช้ในการจำแนกเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ออกจากกันได้ (68)

#### 6.4.3 เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เป็นการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ DNA ต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ในการดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermocycle เริ่มจากการ Denature แยกสายคู่ของ DNA ให้เป็นสายเดี่ยวด้วยอุณหภูมิประมาณ 95°C จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาประมาณ 55-72°C ขึ้นกับอุณหภูมิที่ไพรเมอร์ใช้จับได้อย่างเหมาะสม เพื่อให้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเข้าไปจับกับ DNA ต้นแบบ เรียกขั้นตอนนี้ว่า Annealing และขั้นตอนสุดท้าย Extension โดยเพิ่มอุณหภูมิขึ้นประมาณ 72°C เพื่อให้เอนไซม์ DNA polymerase เข้ามาจับกับ DNA ต้นแบบแล้วสังเคราะห์ DNA สายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis นอกจากนี้เทคนิค PCR ยังถูกพัฒนาเป็นเทคนิค Real-time PCR ที่สามารถตรวจสอบผลผลิตด้วย SYBR green I หรือ Specific probe ได้

การศึกษาที่ผ่านมาของ Tran และคณะ ใช้เทคนิค Real-time PCR ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ 16S-23S rRNA ที่จำเพาะต่อเชื้อ MAC พร้อมกับการตรวจติดตามสารพันธุกรรมที่เพิ่มจำนวนด้วย Specific probe ซึ่งให้ผลการทดสอบมีค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับ 71.1% และ 99.5% ตามลำดับ พบว่าสามารถจำแนกเชื้อ MAC ในระดับซัพสปีชีส์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (69) จากงานวิจัยของ Prammananan และคณะ ใช้เทคนิค PCR-Restriction

Enzyme ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *hsp65* ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อศึกษารูปแบบของแถบ DNA ที่เกิดขึ้นภายหลังการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่าสามารถจำแนกเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (70) ทั้งนี้เทคนิคทั้งสองดังกล่าวข้างต้น อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR จึงจำเป็นต้องใช้เครื่อง Thermocycler ในการดำเนินปฏิกิริยา

## 7. การรักษาและการดื้อยาของเชื้อ MAC

การรักษาการติดเชื้อ MAC ในระบบทางเดินหายใจ นิยมใช้ยาในกลุ่ม Macrolides เป็นยาหลัก และมักให้ร่วมกับยา Rifampin และยา Ethambutol ซึ่งเรียกรวมกันว่ายาขนานที่ 1 เป็นระยะเวลา 18-24 เดือน ซึ่งยาในกลุ่ม Macrolides ที่ใช้ ได้แก่ ยา Clarithromycin หรือยา Azithromycin โดยพบว่าประสิทธิภาพในการรักษาด้วยยาดังกล่าวทั้งสองไม่มีความแตกต่างกัน (71) จากการรวบรวมข้อมูลรายงานการรักษาการติดเชื้อ MAC ด้วยยาปฏิชีวนะหลายชนิดร่วมกันทั้งในผู้ป่วยที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ HIV ระหว่างปี พ.ศ. 2537-2550 พบว่าหากไม่ใช้ยาในกลุ่ม Macrolides ร่วมในการรักษาจะพบอัตราการรักษาที่สำเร็จเฉลี่ยเพียง 28% ขณะที่หากใช้ยาในกลุ่ม Macrolides ร่วมในการรักษาด้วยจะทำให้อัตราการรักษาที่สำเร็จเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 42% และการติดเชื้อซ้ำเหมือนเดิม (Relapse) การตาย และการละลายการรักษา คิดเป็น 6%, 17%, และ 12% ตามลำดับ (72) อย่างไรก็ตามหากการรักษาด้วยยาขนานที่ 1 ล้มเหลว อาจเพิ่มยา Moxifloxacin เข้าไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา หรือเพิ่มการใช้ยาในกลุ่ม Aminoglycoside เป็นระยะเวลาสั้นต่อเนื่องในกรณีที่เชื้อ MAC ดื้อต่อการรักษาด้วยยาขนานที่ 1 (71)

ยา Clarithromycin หรือยา Azithromycin มีกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย โดยเมื่อยาผ่านทางผนังเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ยาจะเข้า

ไปจับบริเวณ P-site ของ 50S ribosomal subunit การจับของยาเกิดขึ้นตรงบริเวณที่เรียกว่า Hairpin 35 ของ Domain II และส่วนที่เรียกว่า Peptidyl transferase loop ของ domain V ใน 23S rRNA ซึ่ง Peptidyl transferase นี้ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายเปปไทด์ของ Aminoacyl transfer-RNA นำไปสู่การนำกรดอะมิโนมาเชื่อมต่อกันเป็นสายโพลีเพปไทด์ที่ยาวขึ้น ดังนั้นเมื่อยาเข้าไปจับกับ Peptidyl- transferase จึงเกิดการยับยั้งการสร้างสายโพลีเพปไทด์ ทำให้การถอดรหัสโปรตีนของเชื้อ จาก Messenger RNA หยุดชะงักลง (73-75)

ในปัจจุบันพบปัญหาการติดเชื้อ MAC ที่ล้มเหลวซึ่งเกิดจากเชื้อดื้อยา ส่งผลให้ต้องเปลี่ยนยาที่ใช้ในการรักษาเป็นยากลุ่มอื่น หรือเกิดการรักษาที่ล้มเหลวอันจะนำมาซึ่งการเสียชีวิตของผู้ป่วย กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยา (Drug target alteration) เนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์แบบตำแหน่งเดียว (Single point mutation) ในบริเวณที่ยาเข้าไปจับตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2274 หรือ 2275 ของยีน 23S rRNA (76, 77) ถือเป็นกลไกการดื้อยาหลักที่สำคัญและพบได้บ่อยมากกว่า 90-95 % ของการดื้อยาในกลุ่ม Macrolides ของเชื้อ MAC (78) การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อลำดับเบสจากเบส Adenine (A) ไปเป็นได้ทั้งเบส Guanine (G) หรือเบส Thymine (T) หรือเบส Cytosine (C) ของตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2274 หรือ 2275 ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง โดยจากการศึกษาของ Griffith และคณะ ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสของยีน 23S rRNA พบการกลายพันธุ์บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2274 หรือ 2275 รวมกันได้มากถึง 49 ใน 51 ตัวอย่าง ที่ถูกเพาะแยกได้จากผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อ MAC ในปอด (79) จากการศึกษาของ Supinya และคณะ ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสควบคู่กับการทำ Multiplex PCR พบว่าการกลายพันธุ์ของเชื้อ MAC 31 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลายพันธุ์บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2274 และ 2275 ของเชื้อ *M. avium* จำนวน 12 และ 6 ตัวอย่างตามลำดับ ขณะที่การกลายพันธุ์บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่

2274 และ 2275 ของเชื้อ *M. intracellulare* จำนวน 5 และ 8 ตัวอย่างตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังพบว่าเชื้อจำนวน 4 ตัวอย่างที่ติดต่อยา Macrolides แต่ไม่มีการกลายพันธุ์บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ทั้งสอง (40) ภายหลังจากเกิดการกลายพันธุ์ดังกล่าว ทำให้โปรตีนที่เชื้อสร้างขึ้นมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ยาไม่สามารถเข้าไปจับได้ เชื้อจึงไม่ตอบสนองต่อยาและเกิดการรักษาล้มเหลวตามลำดับ ทั้งนี้การใช้ยาในกลุ่ม Macrolides เพียงชนิดเดียวในการรักษาโรคติดเชื้อ MAC จะส่งผลต่อการกระตุ้นให้เกิดเชื้อดื้อยาที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จึงทำให้ในปัจจุบันมีแนวทางในการรักษาการติดเชื้อ MAC ด้วยการใช้ยาหลายชนิดร่วมกันดังที่ได้อธิบายข้างต้น (1)

สถานการณ์การติดเชื้อ MAC ที่ติดต่อยาปฏิชีวนะมีแนวโน้มที่สูงขึ้นในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา พบเชื้อ *M. intracellulare* มีอัตราการติดต่อยา Macrolides ที่สูงกว่าเชื้อ *M. avium* (40, 80, 81) มีรายงานเชื้อ MAC จำนวน 96% ที่ติดต่อยา Macrolides ด้วยกลไกการกลายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อ *M. intracellulare* จำนวน 62% และเชื้อ *M. avium* จำนวน 38% ซึ่งพบว่าเชื้อดื้อยาในกลุ่ม Macrolides หลังจากที่มีการรักษาโดยใช้ยาชนิดเดียวคือยา Clarithromycin เพียง 3-6 เดือน ซึ่งพบได้ถึง 46% ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (82) ในขณะที่ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาครบ 4 เดือน พบว่ามีจำนวน 58% ของผู้ป่วยทั้งหมดที่ตรวจไม่พบเชื้อจากเสมหะหลังจบการรักษา และอีก 21% ตรวจพบเชื้อในเสมหะอีกครั้งซึ่งบ่งบอกถึงการรักษาล้มเหลว (83) จากข้อมูลที่มีการรายงานในปี พ.ศ. 2548-2557 ของโรงพยาบาลระดับตติยภูมิของประเทศญี่ปุ่น ทั้ง 3 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลฟูกุจิจิ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยไคโอะ หน่วยงานสาธารณสุขแห่งชาติ พบเชื้อ MAC ที่ติดต่อยา Clarithromycin ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 102 คน จากทั้งหมด 565 คน หรือคิดเป็น 18% (84) จากการพัฒนาเทคนิค Bridge nucleic acid ในการตรวจเชื้อ MAC พบว่ามีเชื้อ 12 ตัวอย่างที่ติดต่อยา Macrolides ด้วยการกลายพันธุ์ จากเชื้อทั้งหมด 199 ตัวอย่าง คิดเป็น 5% จากโรงพยาบาลไซตะ

มะ ประเทศญี่ปุ่น (78) การศึกษาของโรงพยาบาลศิริราช ประเทศไทย ในปี พ.ศ.2546-2551 ซึ่งพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ในการวินิจฉัยเชื้อ MAC ทั้งหมด 218 ตัวอย่าง พบว่าดื้อต่อยา Clarithromycin จำนวนทั้งสิ้น 35 ตัวอย่าง คิดเป็น 16% (40) การกลายพันธุ์บริเวณ 23S rRNA ของเชื้อ MAC นอกจากจะเป็นกลไกหลักที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา Clarithromycin แล้ว (79, 85) ยังส่งผลต่อการดื้อยาชนิดอื่นในกลุ่ม Macrolides ทั้งหมด เนื่องจากมีเป้าหมายการของยาบริเวณเดียวกัน ในขณะที่การดื้อยาด้วยกลไกการได้รับยีน *erm* ซึ่งพบได้ในเชื้อกลุ่ม NTM บางสายพันธุ์ เช่น *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, และ *M. abscessus subsp. abscessus* แต่กลับไม่พบว่าเป็นสาเหตุของการดื้อยา Macrolides ของเชื้อ MAC (86)

## 8. เทคนิค Isothermal amplification

เทคนิค Isothermal amplification คือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยการใช้เพียงอุณหภูมิเดียวคงที่ตลอดในปฏิกิริยา โดยสามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้ง DNA และ RNA และไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่อง Thermal cycle เหมือนการทำปฏิกิริยา PCR ทั่วไป ด้วยเหตุนี้เทคนิค Isothermal amplification จึงสามารถนำมาพัฒนาต่อสำหรับการวินิจฉัยแบบ Point-of-care testing (POCT) สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก หรือสำหรับใช้ในการออกภาคสนามในพื้นที่ห่างไกลได้ เนื่องจากไม่ต้องการเครื่องมือที่ราคาแพงและต้องใช้กระแสไฟฟ้า สามารถทำการทดสอบได้ง่าย สะดวก และให้ผลการทดสอบได้อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างเทคนิคที่ใช้หลักการของ Isothermal amplification อาทิเช่น

### 8.1 Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)

เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ 3 ชนิดได้แก่ Reverse transcriptase, RNase H และ T7 RNA polymerase ในการเพิ่มปริมาณ RNA มีหลักการคือ โพรโมเตอร์ที่จำเพาะต่อ T7 Promoter sequence

จะเข้าไปจับกับสาย RNA ต้นแบบ จากนั้นเอนไซม์ Reverse transcriptase จะสังเคราะห์สาย cDNA จากสาย RNA ต้นแบบ ตามด้วยการย่อยสลายสาย RNA ต้นแบบด้วยเอนไซม์ RNase H ต่อมาเอนไซม์ T7 RNA polymerase จะจับกับ T7 Promoter sequence แล้วทำการสังเคราะห์ RNA สายใหม่โดยใช้สาย cDNA เป็นต้นแบบ (87-89)

## 8.2 Loop-mediated- isothermal amplification (LAMP)

เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA โดยอาศัยไพรมเมอร์ 4 หรือ 6 ชุด ที่จำเพาะต่อสาย DNA ต้นแบบ และอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการแยกสายคู่ของ DNA (Strand displacement) และสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยเริ่มจากการสร้าง Stem-loop บริเวณทั้งสองด้านของ DNA ต้นแบบ จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอน Cycle amplification ทำให้ได้สายของ DNA Product ที่มีลักษณะยาวต่อเนื่องกัน (87-89)

## 8.3 Strand- displacement amplification (SDA)

เป็นเทคนิคที่อาศัยไพรมเมอร์ 2 ชุด ชุดที่หนึ่งประกอบไปด้วยไพรมเมอร์ S1 และ S2 โดยส่วนปลายด้าน 5' มีลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งเป็นส่วนที่ยื่นออกมาและไม่ได้จับกับ DNA ต้นแบบ ชุดที่สองประกอบไปด้วยไพรมเมอร์ B1 และ B2 โดยที่ไพรมเมอร์ B1 จับกับตำแหน่งทางด้าน 5' ของ DNA ต้นแบบ บริเวณตำแหน่งเหนือไพรมเมอร์ S1 ขณะที่ไพรมเมอร์ B2 จับกับตำแหน่งทางด้าน 3' ของ DNA ต้นแบบ บริเวณตำแหน่งเหนือไพรมเมอร์ S2 จากนั้น DNA polymerase จะเข้าทำการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ เมื่อไพรมเมอร์ B2 เข้าจับกับ DNA สายใหม่ที่มี S1 ขณะที่ไพรมเมอร์ B1 เข้าจับกับ DNA สายใหม่ที่มี S2 เกิดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่อีกรอบ ซึ่งเมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้จะได้ DNA product สายคู่ ที่มีลำดับเบสตรงปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ (87-89)

#### 8.4 Rolling circle amplification (RCA)

เป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากต้นแบบที่มีลักษณะเป็นวงกลม ซึ่งอาจเป็น DNA หรือ RNA ด้วยไพรเมอร์ขนาดสั้นๆ และ DNA polymerase หรือ RNA polymerase ตามลำดับ ซึ่ง Product ที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะของลำดับเบสที่ซ้ำกัน (Tandem-repeat) (87-89)

#### 8.5 Helicase dependent amplification (HDA)

เป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA ต้นแบบที่มีลำดับเบสที่ยาวโดยการแยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวด้วยเอนไซม์ Helicase เมื่อไพรเมอร์เข้ามาจับกับ DNA เป้าหมายจะเกิดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Polymerase ร่วมกับ Single strand binding protein ที่ช่วยป้องกันไม่ให้ DNA จับกันเป็นสายคู่ (87-89)

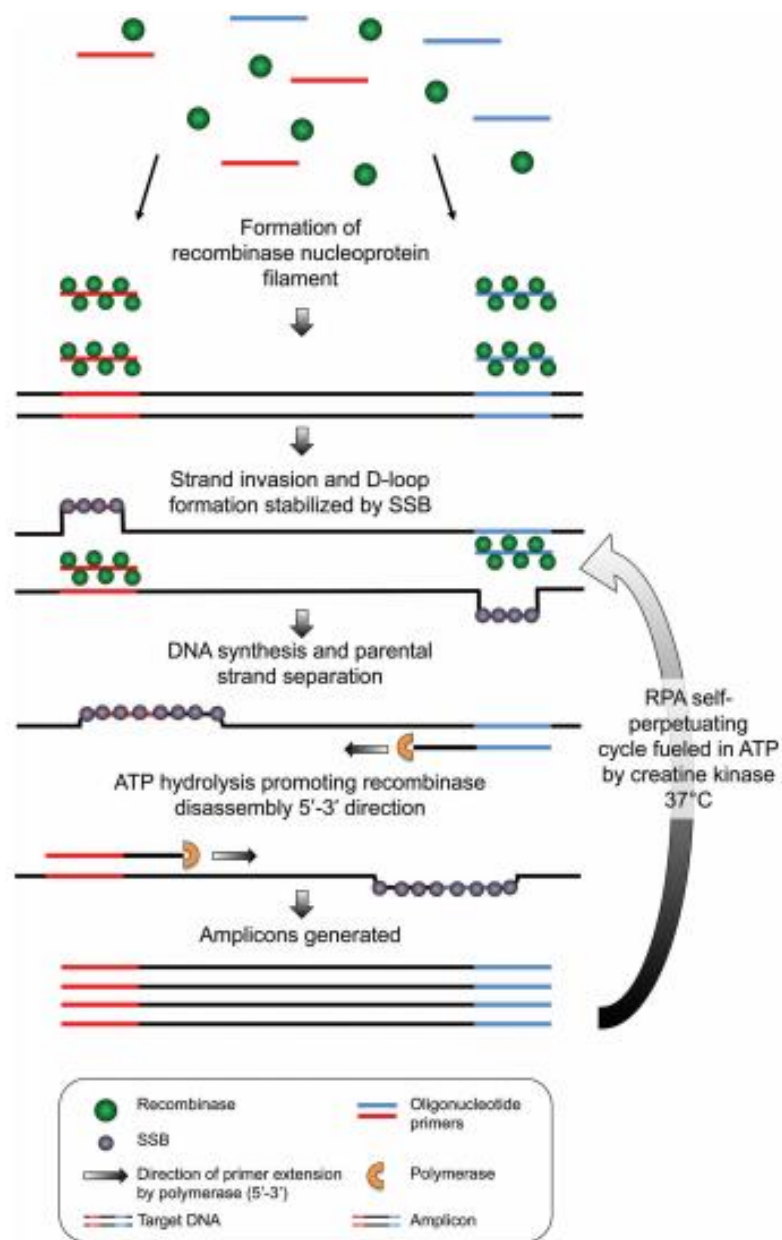
ปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้เทคนิค Isothermal amplification สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacteria เพิ่มมากขึ้น อาทิเช่น การพัฒนาเทคนิค LAMP สำหรับการวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* และเชื้อ MAC จากเสมหะโดยตรง ซึ่งออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *gyrB* และใช้อุณหภูมิระหว่างการทำปฏิกิริยาที่ 63 °C พร้อมกับตรวจสอบ LAMP product ด้วยสี SYBR Green I เปรียบเทียบกับการทำ Gel electrophoresis ซึ่งพบว่าเทคนิคดังกล่าวมีระยะเวลาสั้นที่สุดที่สามารถอ่านปฏิกิริยาได้เท่ากับ 35 นาที สำหรับ DNA ต้นแบบที่ได้มาจากโคลนเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง และมีระยะเวลาสั้นที่สุดที่สามารถอ่านปฏิกิริยาได้เท่ากับ 60 นาที สำหรับ DNA ต้นแบบที่ได้มาจากโคลนเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวและจากเสมหะโดยตรง และพบว่าขีดต่ำสุดที่สามารถตรวจหาเชื้อ (Limit of detection: LOD) มีค่าเท่ากับ 5-50 Copies ของ DNA ที่เวลา 60 นาที (90) การประยุกต์ใช้เทคนิค NASBA ในการเพิ่มสารพันธุกรรมสำหรับตรวจเชื้อ Mycobacteria ร่วมกับการใช้ Probe ที่จำเพาะ และพัฒนาออกมาเป็นชุดตรวจที่จำหน่ายตาม

ห้องตลาด ได้แก่ GenoType Mycobacteria Direct (GTMD) (บริษัท Hain Lifescience GMBH จำกัด, ประเทศเยอรมนี) ซึ่งเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไป ทั้งนี้เพื่อลดการใช้เครื่อง Themocycler ที่มีราคาแพง โดยพบว่าชุดตรวจ GTMD มีความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 92% และ 100% ตามลำดับ (57) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันชุดตรวจได้ถูกพัฒนาเพิ่มเติม เพื่อเป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม Mycobacteria อาทิเช่น GenoType CMdirect VER 1.0, GenoType Mycobacterium CM VER 2.0, GenoType Mycobacterium AS VER 1.0 และ GenoType NTM-DR VER 1.0 เป็นต้น

## 9. เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA)

เทคนิค Recombinase polymerase amplification หรือ RPA เป็นเทคนิคเพิ่มสารพันธุกรรมโดยใช้อุณหภูมิเดียว ซึ่งอาศัยการทำงานร่วมกันของโปรตีน 3 ชนิดเป็นหลัก ได้แก่ เอนไซม์ Recombinase, Single strand binding DNA protein (SSB) และเอนไซม์ DNA polymerase โดยมีกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนี้ ในขั้นตอนแรก เอนไซม์ Recombinase จะเข้าไปจับกับไพรเมอร์ เกิดรูปร่างเป็น Nucleoprotein filament ซึ่งจะตรงเข้าไปจับบริเวณที่เป็นเบสคู่สมกันระหว่างไพรเมอร์และ DNA ต้นแบบ โดยเอนไซม์ Recombinase ที่จับอยู่กับไพรเมอร์ จะทำหน้าที่แยกสาย DNA ต้นแบบ ทำให้เกิดลักษณะ D-loop จากนั้นโปรตีนตัวที่สองคือ SSB จะเข้ามาจับ DNA ต้นแบบที่ถูกแยกสาย และป้องกันไม่ให้สายของ DNA กลับเข้ามาจับกัน ลำดับถัดมาเอนไซม์ DNA polymerase จะเข้าจับบริเวณไพรเมอร์เพื่อต่อสาย DNA สายใหม่จาก DNA ต้นแบบ เมื่อได้ DNA สายใหม่แล้วเอนไซม์ต่างๆ จะหยุดการทำงานชั่วคราว และจะกลับมาทำงานได้ใหม่เมื่อมีการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ Creatine kinase ที่ใช้ Phosphocreatine ในการสร้าง ATP เพื่อเป็นพลังงานให้กับระบบ (รูปที่ 2.2) (91)





รูปที่ 2.2 วัฏจักรการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA (91)

อย่างไรก็ตามเทคนิค RPA มีข้อได้เปรียบมากกว่าเทคนิค Isothermal amplification อื่นๆ ได้แก่ เทคนิค RPA เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ทั้ง DNA และ RNA สามารถทำการทดสอบได้ง่าย ไม่ยุ่งยากหรือซับซ้อน สามารถใช้ไพรเมอร์ทั่วไปเหมือนกับการทำปฏิกิริยา PCR แบบดั้งเดิม นอกจากนี้เทคนิค RPA ยังสามารถประยุกต์ใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่หลากหลาย

เป้าหมาย (Multiple RPA) ในเวลาเดียวกัน ใช้อุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยาต่ำประมาณ 25-42 °C มีระยะเวลาการทดสอบที่สั้น และมีความจำเพาะและความไวที่สูง สามารถนำมาพัฒนาใช้ร่วมกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ เช่น Microfluidic devices และพัฒนาเป็น POCT ได้ (91) (ตารางที่ 2.1) (87-89, 92) จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยต่างๆ ในโรงพยาบาลขนาดเล็ก และการออกภาคสนามในพื้นที่ที่ห่างไกลความเจริญ

ตารางที่ 2. 1 การเปรียบเทียบเทคนิค Isothermal amplification

	PCR	NASBA	LAMP	SDA	RCA	HDA	RPA
การเพิ่มปริมาณ DNA	+	+	+	+	+	+	+
การเพิ่มปริมาณ RNA	+	+	+	+	+	+	+
	(RT-PCR)		(RT-LAMP)	(RT-SDA)	(RT-RCA)	(RT-HDA)	(RT-RPA)
ผลผลิต (Amplicon)	DNA	RNA,DNA	DNA	dsDNA	DNA	DNA	DNA
อุณหภูมิในปฏิกิริยา (°C)	94, 55-60, 72	37-42	60-65	37	37	RT*, 37, 60-65	25-42
การออกแบบไพรเมอร์	พื้นฐาน	พื้นฐาน	ซับซ้อน	ซับซ้อน	พื้นฐาน	พื้นฐาน	พื้นฐาน
จำนวนไพรเมอร์ในปฏิกิริยา	2	2	6 หรือ 4	4	2	2	2
จำนวนเอนไซม์	1	2-3	1	2	2	2	3
เวลาในการทำปฏิกิริยา	1.5-2.5	1.5-2	< 1	2	1.5	0.5-2	0.3-1.5
ขั้นตอนการ Denature	+	+	-	+	-	-	-

	PCR	NASBA	LAMP	SDA	RCA	HDA	RPA
สิ่งที่ช่วย Denaturing	Heat	RnaseH, DMSO	Btaine	Restriction enzymes, bumper primers	Strand- displacem ent property of $\Phi$ 29 DNA polymerase	Helicase	Recombin ase SSB
การหยุดปฏิกิริยา (Inhibition tolerance)	-	-	+	-	-	+	+
วิธีการตรวจสอบผลผลิต	GE, ELISA, real-time	GE, ELISA, real-time, ECL	GE, turbidity, real-time	GE, real- time	GE	GE, ELISA, real-time	GE, turbidity, real-time
การประยุกต์ใช้กับ Multiplex	+	+	-	-	-	+	+
การประยุกต์เป็น POCT	-	+	+	+	-	+	+

RT=reverse transcriptase; \*Room=22–24°C; GE= gel electrophoresis; ELISA=enzyme-linked

immunosorbent assay; ELOSA=enzyme-linked oligosorbent assay; ECL=electrochemiluminescence

## 10. การวินิจฉัยโรคติดเชื้อด้วยเทคนิค RPA

ปัจจุบันมีการศึกษาพัฒนาเทคนิค RPA เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อหรือตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ อย่างแพร่หลาย ทั้งการตรวจเชื้อไวรัส เชื้อรา พยาธิ และเชื้อแบคทีเรียต่างๆ การศึกษาของ

Euler และคณะ ทำการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส Rift Valley fever, Ebola, Sudan, และ Marburg ด้วยการสกัด RNA ของเชื้อโดยตรงจากพลาสมา และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Reverse transcriptase RPA (RT-RPA) ร่วมกับการตรวจติดตามแบบ Real time ด้วยโพรบ fpg พบว่าสามารถตรวจสารพันธุกรรมของไวรัสได้ตั้งแต่ 16-21 Copies ในเวลาเพียง 4-8 นาที (93) ในขณะที่ Amer และคณะ ได้ทำการตรวจวินิจฉัย Bovine coronavirus โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจอุจจาระและสิ่งส่งตรวจบริเวณโพรงจมูก ด้วยเทคนิค RT-RPA ร่วมกับการตรวจติดตามแบบ Real time ด้วยโพรบ Exo พบว่าสามารถตรวจสารพันธุกรรมของไวรัสได้ตั้งแต่ 21 copies ในเวลาเพียง 10-20 นาที (94) การประยุกต์ใช้เทคนิค RPA ในการตรวจเชื้อไวรัสจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าปริมาณของไวรัสมีผลต่อความไวของการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค RPA โดยปริมาณของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ถูกตรวจจะแปรผกผันตรงกับเวลาในการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นของการทำปฏิกิริยา RPA ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส อาทิเช่น บริเวณลำดับเบสเป้าหมายที่ไพรเมอร์เข้าไปจับ ขนาดของผลผลิต RPA และประเภทของตัวอย่างที่นำมาสกัดสารพันธุกรรม รวมไปถึงวิธีการตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้น เป็นต้น (91) Sakai และคณะ ได้ศึกษาวินิจฉัยเชื้อราก่อโรคด้วยเทคนิค Microarray ร่วมกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA เนื่องจากเป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว และไม่ต้องอาศัยเครื่อง Thermocycle ที่มีราคาแพง (95) Crannell และคณะได้ทำการวินิจฉัยโรค Cryptosporidiosis ด้วยเทคนิค RPA โดยใช้ DNA ของเชื้อ *Cryptosporidium spp.* ที่สกัดได้จากอุจจาระของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่มีอาการท้องเสีย (Diarrheal illness) พบว่าใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 30 นาที และเมื่อทำการตรวจติดตามผลผลิต RPA ด้วยหลักการ Lateral flow strips พบว่าความเข้มข้นของ Oocysts ที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจได้คือ  $10^3$  Oocysts/ml (96) ในขณะที่ Kersting และคณะ ได้พัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่เป็นสาเหตุหลักและพบได้บ่อยที่สุดของโรคมาลาเรีย ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ

Lateral flow strips โดยใช้เวลาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพียง 10 นาที และสามารถตรวจ DNA ปริมาณต่ำสุดได้เท่ากับ 100 fg (97)

เทคนิค RPA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA เป้าหมายหลายตำแหน่งพร้อมกัน หรือเรียกว่า Multiplex RPA พบว่าสามารถใช้วินิจฉัยเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella enterica* และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์และทำปฏิกิริยาพร้อมกัน ภายหลังตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่าความเข้มข้นของสารพันธุกรรมต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ของเชื้อ *N. gonorrhoeae*, *S. enterica* และ MRSA เท่ากับ 100, 10 และ 10 Copies ตามลำดับ (98)

ในปี พ.ศ. 2561 Singpanomchai และคณะ ได้ทำการพัฒนาเทคนิค RPA เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน IS6110 และ IS1081 แล้วตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยตาเปล่าจากการเติมสี SYBR green I พบว่า มีความไวในการทดสอบยีนดังกล่าวคือ 97.95% และ 99.32% ตามลำดับ ขณะที่มีความจำเพาะของทั้งสองยีน คือ 100% (8)

## 11. การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA

ผลผลิตที่ได้จากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิค RPA หรือ RPA product สามารถนำมาตรวจสอบได้ด้วยหลายวิธี อาทิเช่น

### 11.1 วิธี Agarose gel electrophoresis

ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในงานทางอณูชีววิทยา อาศัยหลักการแยก DNA ผ่านตัวกลางค้ำจุนที่เป็นวุ้นภายใต้กระแสไฟฟ้า โดยความสามารถในการเคลื่อนที่ของ DNA ขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA และขนาดรูพรุนของวุ้น Agarose โดยที่ DNA ขนาดเล็กจะสามารถ

เคลื่อนเร็วกว่า DNA ขนาดใหญ่ ในขณะที่ความเข้มข้นของวุ้น Agarose จะแปรผกผันกับขนาดของรูพรุน แถบของ DNA ที่เคลื่อนที่จะสามารถสังเกตได้ภายหลังจากการย้อม DNA ด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ เช่น สี Ethidium bromide สี Pyronin Y และสี Gelstar เป็นต้น และตรวจสอบแถบของ DNA ที่ถูกย้อมภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (33, 99, 100)

### 11.2 เทคนิค Realtime RPA

อาศัยการวัดผลผลิตในระหว่างการดำเนินปฏิกิริยาโดยใช้ Probe ที่จำเพาะ เช่น Exo probe และ Fpg probe เป็นต้น เมื่อสายของ DNA ต้นแบบแยกแล้ว Probe เข้าไปจับอย่างจำเพาะกับตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมกัน แล้ว Exonuclease III จะตัดบริเวณ Tetrahydrofuran (THF) ของ Exo probe ขณะที่ Fpg probe จะใช้เอนไซม์ Fpg nuclease ตัด เมื่อตำแหน่ง Quencher กับ Fluorophore ห่างกัน สามารถวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องตรวจวัด ซึ่งความเข้มของแสงที่วัดได้จะแปรผันตรงกับปริมาณ RPA product ที่ถูกเพิ่มจำนวน (91)

### 11.3 เทคนิค Lateral flow (LF)

โดยใช้ LF probe ซึ่งมีลักษณะเหมือน Exo probe เมื่อ Probe จับกับ DNA ต้นแบบแล้ว endonuclease IV (Nfo) จะทำการตัด DNA สายคู่เมื่อสร้างมาถึงบริเวณที่ Probe จับ จากนั้นทำการติดฉลากบริเวณปลาย 5' ของ Probe ด้วยสี FAM อีกปลายด้านหนึ่งติดฉลากด้วย Biotin ซึ่งจะจับกับ Anti-biotin ที่ถูกตรึงบนแผ่น Nitrocellulose โดยตรวจสอบสัญญาณด้วย Anti-FAM ควบคู่ไปกับการขยายสัญญาณด้วย Gold nanoparticle (91)

## 12. การตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมด้วยสี SYBR Green I

สี SYBR Green I เป็นสีฟลูออเรสเซนต์ในกลุ่มของ Cyanine dye ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในงานทางอณูชีววิทยา ด้วยคุณสมบัติของสีที่ตรงเข้าจับกับ Double strand DNA เกิดเป็น

DNA-dye-complex ที่ดูดกลืนแสงสีน้ำเงินที่มีความยาวคลื่นสูงสุด 497 nm และปล่อยแสงสีเขียวที่มีความยาวคลื่นสูงสุด 520 nm ทำให้สามารถมองเห็นเป็นสีเขียวด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ หรือเกิดการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสี SYBR Green I และความเข้มข้นของ DNA ที่ถูกตรวจวัด สี SYBR Green I นิยมใช้ในขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นภายหลังการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR เนื่องจากมีราคาที่ไม่แพง สามารถใช้ตรวจวัด DNA ได้ง่าย อย่างไรก็ตามสี SYBR Green I มีข้อจำกัดบางประการ อาทิเช่น สีสามารถจับกับ Double-strand DNA สายคู่ได้อย่างไม่จำเพาะ ไม่ว่าจะเป็นในลักษณะของการเกิด Primer-dimer หรือ Non-specific DNA อื่นๆ ซึ่งนำไปสู่ผลบวกปลอม จึงจำเป็นต้องเลือกใช้ DNA ต้นแบบที่มีความบริสุทธิ์ปราศจากความเสียหายจากการเสื่อมสภาพของ DNA รวมไปถึงการออกแบบไพรเมอร์ที่ต้องมีความจำเพาะ หลีกเลี่ยงบริเวณที่ทำให้เกิดการจับกันเองแบบ Primer-dimer เพื่อป้องกันการเกิดผลบวกปลอมที่อาจจะเกิดขึ้น (101, 102)

ในปฏิกิริยา Real-time PCR นิยมนำสี SYBR Green I ไปใช้ในการตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มขึ้นตลอดเวลาในปฏิกิริยา ซึ่งการแยกปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้นออกจาก Non-specific product อาศัยการวิเคราะห์ Melting curve หรือ อุณหภูมิที่ทำให้ Double-strand DNA แยกออกจากกันครั้งหนึ่ง สัญญาณของฟลูออเรสเซนซ์จึงลดลงอย่างฉับพลัน โดยอุณหภูมินี้จะขึ้นกับความยาวและปริมาณ G และ C ของ DNA พบว่าส่วนใหญ่ PCR product มักจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 80°C (103) นอกจากนี้ สี SYBR Green I ยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบต่างๆ เพื่อวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย อาทิเช่น การตรวจเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนล่าง ซึ่งจากการทดสอบการแยกเชื้อด้วยยีน 16S rRNA จากปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่า สี SYBR green I สามารถใช้ตรวจติดตามปริมาณของ PCR

product และให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกับการตรวจติดตามด้วย TaqMan probe (104) ขณะที่การตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacteria ในน้ำล้างปอดด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR ซึ่งจำเพาะต่อยีน 16S rRNA หรือยีน ITS ร่วมกับ Genus specific primers และใช้สี SYBR Green I ตรวจติดตามปริมาณของ PCR product ร่วมกับการวิเคราะห์ Melting curve พบว่าสามารถแยกเชื้อ Mycobacteria ได้ 25 สายพันธุ์จากตัวอย่างทั้งหมด 26 สายพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือเทคนิคการหาลำดับเบส (105) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้สี SYBR Green I กับเทคนิค Isothermal amplification เช่น เทคนิค LAMP โดยเติมสี SYBR Green I ลงไปในหลอดภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เพื่อตรวจสอบ DNA product และเปรียบเทียบกับการทำ Agarose gel electrophoresis เพื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* complex, *M. avium* และ *M. intracellulare* โดยตรงจากเสมหะ จากการทดสอบพบว่า เทคนิค LAMP/SYBR green I สามารถวินิจฉัยเชื้อทั้งสามได้อย่างมีประสิทธิภาพ และให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน ความไวของการทดสอบขึ้นอยู่กับปริมาณ DNA product ที่เกิดขึ้น และปริมาณของสี SYBR Green I กล่าวคือสามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อดังกล่าวโดยให้ผลการทดสอบเป็นสีเขียวชัดเจนที่สุดภายหลังทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 35 นาที กับ DNA ต้นแบบที่ได้มาจากโคลนเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง จำนวน 50 Copies ขึ้นไป และที่เวลา 60 นาที กับ DNA ต้นแบบที่ได้มาจากโคลนเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว จำนวน 1,000 Copies ขึ้นไป ขณะที่ความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจนที่สุดคือ ความเข้มข้นของสีตั้งต้นที่ไม่มีการเจือจางสี แต่หากมีการเจือจางของสีจะพบสีของปฏิกิริยาที่อ่อนลงจนกลายเป็นสีส้ม ตามลำดับ (90)



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์

##### 1.1 สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย

###### เทคนิค PCR

ประกอบด้วยชุดน้ำยาเอนไซม์ *Taq* polymerase สั่งซื้อจากบริษัท New England BioLabs จำกัด สหรัฐอเมริกา, ไพริเมอร์สั่งสังเคราะห์จากบริษัท Bioneer Corporation จำกัด ประเทศเกาหลีใต้, Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา, หลอด PCR ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สั่งซื้อจากบริษัท Wuxi NEST Biotechnology จำกัด สาธารณรัฐประชาชนจีน

##### 1.2 สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย

###### เทคนิค RPA

ประกอบด้วยชุดน้ำยา RPA TwistAmp® Basic สั่งซื้อจากบริษัท TwistDx™ จำกัด สหราชอาณาจักร, Primer สั่งสังเคราะห์จากบริษัท Bioneer Corporation จำกัด ประเทศเกาหลีใต้, UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา, สี SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain สั่งซื้อจากบริษัท TaKaRa Bio จำกัด ประเทศญี่ปุ่น, ชุด FavorPrep Gel/PCR purification สั่งซื้อจากบริษัท Favorgen Biotech Corporation จำกัด ประเทศไต้หวัน

### 1.3 สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณ

#### สารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

ประกอบด้วย Agarose สั่งซื้อจากบริษัท Serva จำกัด ประเทศเยอรมนี, UltraPower™ DNA/RNA safe dye สั่งซื้อจากบริษัท Gellex International จำกัด ประเทศญี่ปุ่น, 6X Loading dye สั่งซื้อจากบริษัท Biotechrabbit จำกัด ประเทศเยอรมนี, ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา, Tris base สั่งซื้อจากบริษัท Amresco จำกัด สหรัฐอเมริกา, Acetic acid สั่งซื้อจากบริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา

#### 2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer) จากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา, เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermocycler Tprofessional Basic Gradient 96) จากบริษัท Biometra GmbH ประเทศเยอรมนี, เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (Dry Bath Incubator) จากบริษัท Hangzhou Allsheng Instruments จำกัด สาธารณรัฐประชาชนจีน, เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Gel Doc™ XR ChemiDoc™ XRS) จากบริษัท Bio-Rad Laboratories จำกัด สหรัฐอเมริกา, เครื่องแยกดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า (Electrophoresis Tank), เครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้า (Power Supply) เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex), เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง (Spectrafuge™ 16M High Speed Microcentrifuge) และเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spectrafuge™ Mini Laboratory Centrifuge) จากบริษัท Labnet International จำกัด สหรัฐอเมริกา

### 3. การออกแบบงานวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้ได้แบ่งการทดสอบออกเป็นทั้งหมด 6 ส่วนได้แก่

#### 3.1 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยด้วยเทคนิค PCR

เพื่อประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ สำหรับไพรเมอร์ PCR ทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม ขณะที่ไพรเมอร์ RPA ทดสอบความสามารถในการจับกับ DNA ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis

#### 3.2 การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

เพื่อยืนยันสปีชีส์ของเชื้อ MAC ว่าเป็นเชื้อ *M. avium* หรือ *M. intracellulare* หรือเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC ด้วยวิธีมาตรฐานทางอณูชีววิทยา ทำการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gyrB* ของเชื้อ MAC เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นหาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing แล้วจึงวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม MegAlign จาก DNA star Lasergene program ver. 7.1

#### 3.3 การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR

เพื่อจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *M. avium* หรือ *M. intracellulare* หรือเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gyrB* ของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

### 3.4 การพัฒนาเทคนิค Recombinase polymerase amplification ร่วมกับ SYBR

#### green I (RPA/SYBR) สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC

เพื่อพัฒนาเทคนิค RPA/SYBR ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ด้วยเทคนิค RPA และอ่านผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าด้วยสี SYBR Green I โดยใช้ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ที่ถูกวินิจฉัยยืนยันสปีชีส์ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสจากยีน *gryB* เป็นตัวควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ จากนั้นเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

### 3.5 การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR

เพื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *M. avium* หรือ *M. intracellulare* หรือเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ทางคลินิกที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ด้วยเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบกับการตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

### 3.6 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค RPA/SYBR ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC

เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค RPA/SYBR ที่พัฒนาขึ้น โดยนำผลการทดสอบที่ได้จากเทคนิค RPA/SYBR มาคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value; PPV) และ ค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value; NPV) โดยทำการเปรียบเทียบกับผลของเทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้กันทั่วไป และ Sanger DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางอณูชีววิทยา

#### 4. วิธีการทดลอง

##### 4.1 การคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่าง

การกำหนดระดับความเชื่อมั่นของการวิจัยและคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ อาศัยข้อมูลผลการทดสอบการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC ด้วยวิธีหาลำดับเบสจากงานวิจัยก่อนหน้าร่วมกับการคำนวณตัวอย่างจากความไวของวิธีการทดสอบด้วยสูตรของ N.M.

Buderer (106)

$$TP + FN = Z_{\alpha/2}^2 \frac{SN(1-SN)}{W^2} \quad \text{โดยที่} \quad N = \frac{TP+FN}{P}$$

เมื่อ

$N$  คือ จำนวนตัวอย่าง

$TP$  คือ ผลบวกจริง

$FN$  คือ ผลลบปลอม

$Z_{\alpha/2}$  คือระดับความเชื่อมั่นที่ 95% หรือระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า 1.96

$SN$  คือค่าความไวของวิธีการหาลำดับเบสทั้งจีโนมของเชื้อ MAC มีค่าเท่ากับ 94.8% (107)

$W$  คือระดับความคลาดเคลื่อนของการสุ่มตัวอย่างที่ยอมรับได้มีค่า 0.05

$P$  คือชุกความของเชื้อ MAC เมื่อเทียบกับเชื้อกลุ่ม NTM ทั่วโลกมีค่าเท่ากับ 47% (39)

จากการคำนวณจะได้ตัวอย่างของเชื้อ MAC จำนวน 160 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาร่วมกับงานวิจัยก่อนหน้า (90) ที่มีลักษณะใกล้เคียงกันกับการศึกษาวิจัยครั้งนี้และใช้ตัวอย่างของเชื้อ MAC จำนวน 68 ตัวอย่าง จึงทำการใช้ตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด จำนวนทั้งสิ้น 121 ตัวอย่าง

## 4.2 การพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เลขที่รับรองโครงการ COA. MURA2020/265

## 4.3 ตัวอย่าง DNA ที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้เป็น DNA ที่เหลือใช้ (Left-over DNA) ซึ่งสกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ MAC ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจในเดือนพฤษภาคม- พฤศจิกายน พ.ศ. 2562 จำนวนทั้งสิ้น 121 ตัวอย่าง โดยเชื้อที่นำมาสกัด DNA ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อกลุ่ม MAC โดยไม่ได้ทำการระบุสายพันธุ์ในระดับสปีชีส์ ด้วยการหาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

## 4.4 การสกัด DNA

ตัวอย่าง DNA ทั้งหมดถูกสกัดจากโคลนนิ่งของเชื้อ MAC ด้วยวิธีการต้ม โดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย โดยการเขี่ยโคลนนิ่งของเชื้อมา 1 loop ผสมกับ Lysis buffer (10mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 1% SDS) ปริมาตร 400  $\mu$ l ต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 20 นาที ปั่นที่ความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณ DNA (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer) เก็บ DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

#### 4.5 การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วย ไพรเมอร์ MAC *gyrB* ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อกลุ่ม MAC (Group specific primer) ทั้งหมด ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ *M. avium* และ *M. intracellulare* (Species specific primer) ตามลำดับ

ในขณะที่ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา RPA ประกอบไปด้วย ไพรเมอร์ MAC, MAV และ MIN *gyrB* RPA โดยไพรเมอร์ทั้งหมดสำหรับปฏิกิริยา RPA ถูกออกแบบให้มีความยาวประมาณ 29-32 bp มีค่า GC content อยู่ในช่วง 57.9-71.9 % เพื่อให้มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RPA ด้วยน้ำยา RPA TwistAmp® Basic ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตน้ำยา และออกแบบให้สามารถเพิ่มผลผลิตปริมาณสารพันธุกรรมที่มีขนาด 188-224 bp ซึ่งเป็นขนาดของสารพันธุกรรมที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I (108, 109)

ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR และ RPA ทั้งหมดถูกออกแบบโดยใช้ลำดับเบสของยีน *gyrase B subunit* ของเชื้อดังต่อไปนี้ เป็นต้นแบบการออกแบบ

##### 4.5.1 ลำดับเบสของกลุ่มเชื้อ *M. avium* และซัพสปีชีส์ ได้แก่ *M. avium* subsp. *avium*

ATCC 25291 (GenBank accession No. NZ\_ACFI01000001.1), *M. avium* subsp. *silvaticum*

ATCC 49884 (GenBank accession No. AYOC01000741.1), *M. avium* subsp. *hominissuis*

strain MAC 109 (GenBank accession No. CP029332.1), *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

strain k10 (GenBank accession No. AE016958.1), *M. avium* strain HJW (GenBank

accession No. NZ\_CP028731.1) และ *M. avium* strain 104 (GenBank accession No.

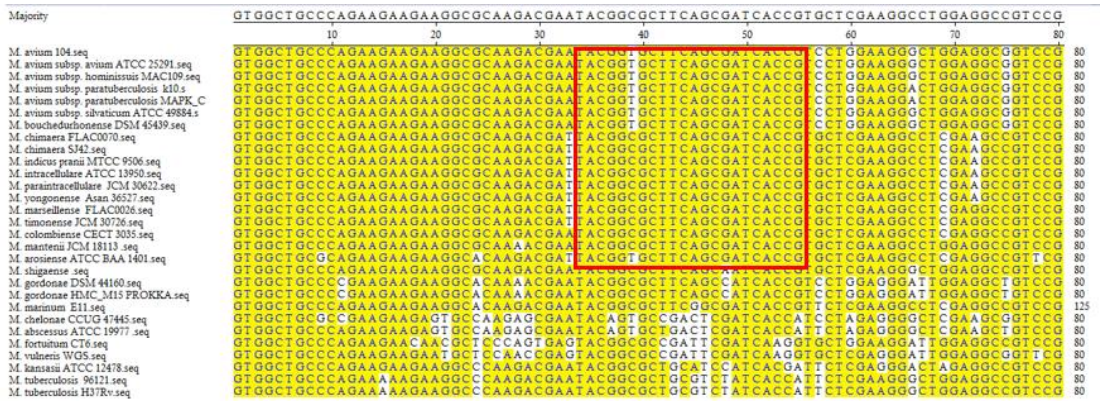
CP000479.1) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA โดยเลือกลำดับเบสของยีน *gyrase* B subunit ที่พบเฉพาะในเชื้อ *M. avium* และไม่พบในเชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์อื่น

4.5.2 ลำดับเบสของกลุ่มเชื้อ *M. intracellulare* ATCC 13950 (GenBank accession No.

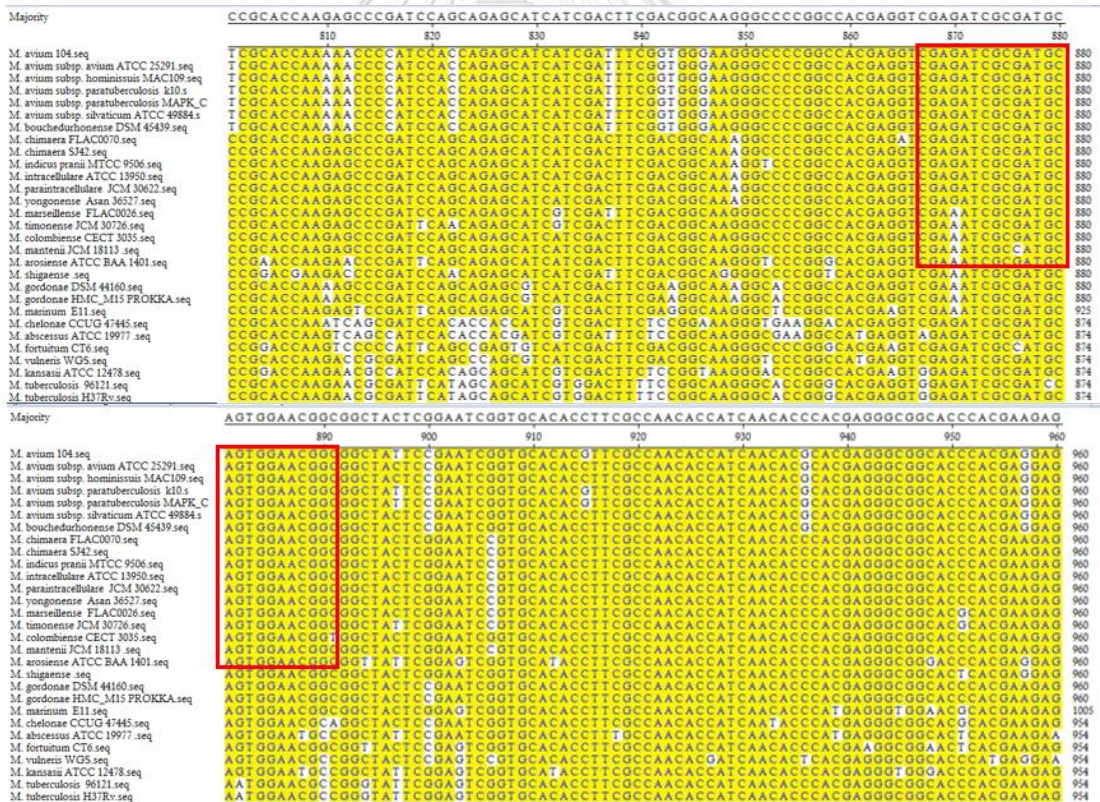
CP003322.1) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA โดยเลือกลำดับเบสของยีน *gyrase* B subunit ที่พบเฉพาะในเชื้อ *M. intracellulare* และไม่พบในเชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์อื่น

โดยในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR และ RPA ได้ทำการนำลำดับเบสในข้อ 4.5.1 และ 4.5.2 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสด้วยโปรแกรม MegAlign (DNA star Lasergene program ver. 7.1, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เลือกบริเวณลำดับเบสที่ต้องการเพื่อใช้เป็นไพรเมอร์สำหรับการทดสอบ ตามรูปที่ 3.1-3.12 ซึ่งหากเป็นไพรเมอร์ MAC *gyrB* และ MAC *gyrB* RPA จะเลือกบริเวณลำดับเบสที่พบเฉพาะเชื้อในกลุ่ม MAC และไม่พบในเชื้อนอกกลุ่ม MAC หากเป็นไพรเมอร์ MAV *gyrB* และ MAV *gyrB* RPA จะเลือกบริเวณลำดับเบสที่พบเฉพาะเชื้อในกลุ่ม *M. avium* เท่านั้นและไม่พบในเชื้อสายพันธุ์อื่น หากเป็นไพรเมอร์ MIN *gyrB* และ MIN *gyrB* RPA จะเลือกบริเวณลำดับเบสที่พบเฉพาะเชื้อในกลุ่ม *M. intracellulare* เท่านั้นและไม่พบในเชื้อสายพันธุ์อื่น หากเป็นไพรเมอร์จะจากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติ และความจำเพาะของไพรเมอร์ทั้งหมดด้วยโปรแกรม OligoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) และ Basic local alignment search tool จากฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) ตามลำดับ รายละเอียดของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ดังแสดงในตารางที่ 3.1





รูปที่ 3. 1 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAC gyrB F ภายหลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ Mycobacterium สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign



รูปที่ 3. 2 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAC gyrB R ภายหลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ Mycobacterium สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign



Majority	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
	490 500 510 520 530 540 550 560
M. avium 104.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. avium subsp. avium ATCC 25291.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. avium subsp. hominissuis MAC109.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. avium subsp. paratuberculosis k10.s	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. avium subsp. paratuberculosis MAPK_C	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. avium subsp. subvaticum ATCC 49884.s	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. bochadhurionense DSM 45439.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. chimera FLAC0070.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. chimera S142.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. indicus pranii MTCC 9506.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. intracellulare ATCC 13950.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. paraitracellulare JCM 30622.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. yongonense Asan 36527.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. marseillense FLAC0026.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. timonense JCM 30726.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. colombiense CECT 3035.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. manteni JCM 18113.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. arvensis ATCC BAA 1401.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. shigense seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. gordonae DSM 44160.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. gordonae HMC_M15 FROKKA.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. minimum E11.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. chelonae CCUG 47445.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. abscessus ATCC 19977.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. fortuitum CT6.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. vulneris WGS.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. kansasii ATCC 12478.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. tuberculosis 96121.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA
M. tuberculosis H37Rv.seq	AAGCAGGGCGAGGGCCACCAAGCGGACCCGGCCACCCAGTCCGGTTCCTGGGCCACCCCGACATCTTCGAGACCCACCGAGTA

รูปที่ 3. 3 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAV gyrB F ภายหลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ Mycobacterium สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign

Majority	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTGTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
	1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
M. avium 104.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. avium subsp. avium ATCC 25291.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. avium subsp. hominissuis MAC109.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. avium subsp. paratuberculosis k10.s	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. avium subsp. paratuberculosis MAPK_C	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. avium subsp. subvaticum ATCC 49884.s	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. bochadhurionense DSM 45439.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. chimera FLAC0070.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. chimera S142.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. indicus pranii MTCC 9506.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. intracellulare ATCC 13950.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. paraitracellulare JCM 30622.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. yongonense Asan 36527.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. marseillense FLAC0026.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. timonense JCM 30726.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. colombiense CECT 3035.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. manteni JCM 18113.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. arvensis ATCC BAA 1401.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. shigense seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. gordonae DSM 44160.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. gordonae HMC_M15 FROKKA.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. minimum E11.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. chelonae CCUG 47445.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. abscessus ATCC 19977.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. fortuitum CT6.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. vulneris WGS.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. kansasii ATCC 12478.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. tuberculosis 96121.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA
M. tuberculosis H37Rv.seq	AACCCCGCGGACGCCAAAGTTCGTTGTCAACAAGCGGTTTCGTGGCGCAGGCCCGCATCGCCGCGCGCAAGGGCGGAGA

รูปที่ 3. 4 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAV gyrB R ภายหลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ Mycobacterium สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign

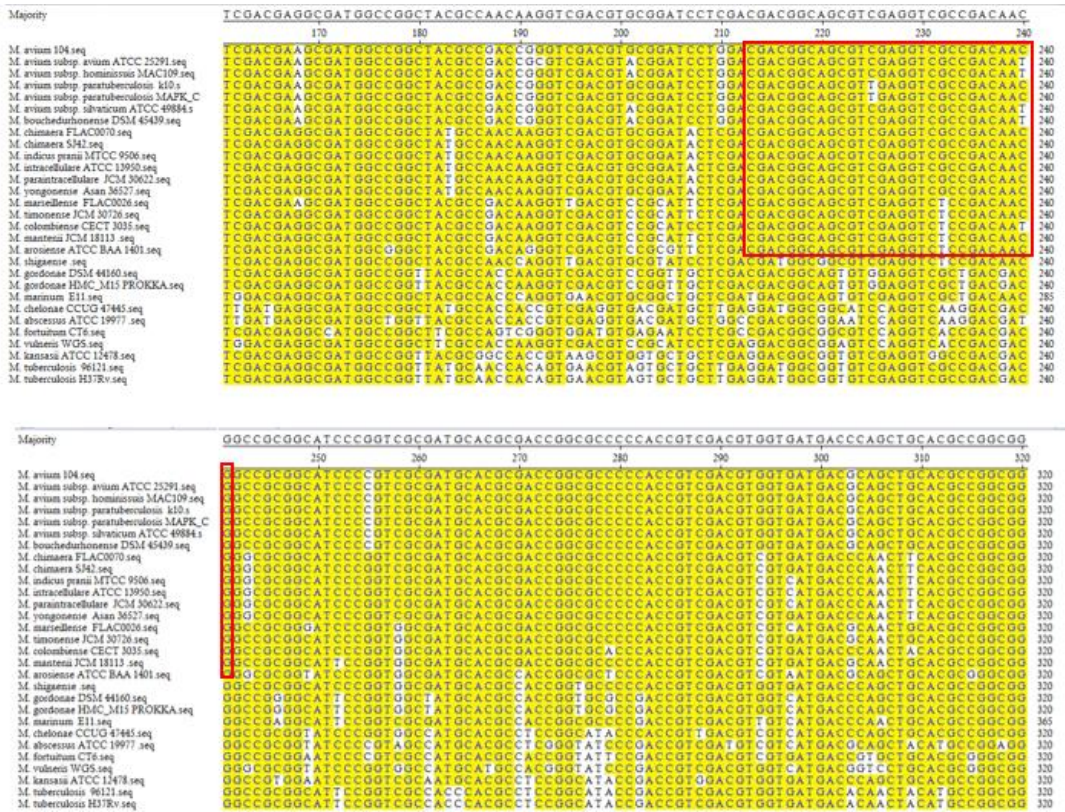
Majority	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
	650 660 670 680 690 700 710 720
M. avium 104.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. avium subsp. avium ATCC 25291.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. avium subsp. hominissuis MAC109.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. avium subsp. paratuberculosis k10.s	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. avium subsp. paratuberculosis MAPK_C	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. avium subsp. subvaticum ATCC 49884.s	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. bochadhurionense DSM 45439.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. chimera FLAC0070.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. chimera S142.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. indicus pranii MTCC 9506.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. intracellulare ATCC 13950.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. paraitracellulare JCM 30622.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. yongonense Asan 36527.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. marseillense FLAC0026.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. timonense JCM 30726.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. colombiense CECT 3035.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. manteni JCM 18113.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. arvensis ATCC BAA 1401.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. shigense seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. gordonae DSM 44160.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. gordonae HMC_M15 FROKKA.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. minimum E11.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. chelonae CCUG 47445.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. abscessus ATCC 19977.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. fortuitum CT6.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. vulneris WGS.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. kansasii ATCC 12478.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. tuberculosis 96121.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC
M. tuberculosis H37Rv.seq	GGGTGACCAACGAGAGGTCGTGCAGGAGGTCGTGACGACACCCGGCGACGCCACCAAGTTCGGCCAGGAGAAAGGGCGGC

รูปที่ 3. 5 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MIN gyrB F ภายหลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบส เชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ Mycobacterium สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign









รูปที่ 3. 8 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAC gyrB R RPA ภายหลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ Mycobacterium สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3. 9 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAV gyrB F RPA ภายหลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ Mycobacterium สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign

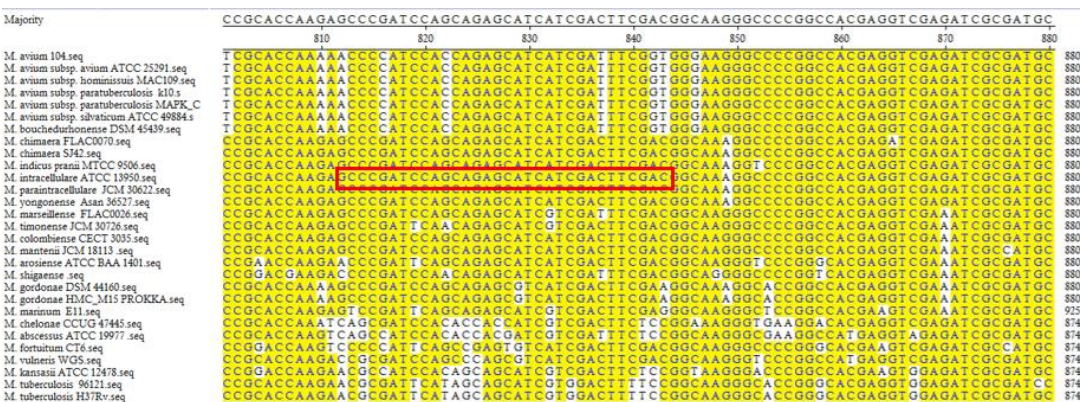




รูปที่ 3. 10 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MAV gyrB RPA ภายหลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ Mycobacterium สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign



รูปที่ 3. 11 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MIN gyrB F RPA ภายหลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ Mycobacterium สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign



รูปที่ 3. 12 ตำแหน่งลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบ MIN gyrB R RPA ภายหลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบสเชื้อกลุ่ม MAC และเชื้อ Mycobacterium สปีชีส์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม MegAlign

ตารางที่ 3. 1 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อไพรเมอร์	จุดประสงค์	วิธี	ลำดับเบส (5' - 3')	ขนาด (bp)
MAC <i>gyrB</i> F	MAC group identification & sequencing	PCR	34-TACGGYGCTTCRGCATCACCG-55	858
MAC <i>gyrB</i> R			867-CCGTTCCACTGCATCGCATYTCG-891	
MAV <i>gyrB</i> F	<i>M. avium</i> identification		489-CGAGGCCACCAAGCGCACCGGCACCACCATCC-520	764
MAV <i>gyrB</i> R			1221-CTGATGAAACCGCCTTGTGACAATG-1252	
MIN <i>gyrB</i> F	<i>M. intracellulare</i> identification		651-CGAGGAGGTCGTGACGAGGTCAGCGAC-681	600
MIN <i>gyrB</i> R			1221-GCGCCGACGACACCGCCTTGTGACCACCACC-1249	
MAC <i>gyrB</i> F RPA	MAC group identification	RPA	18-GAAGGCGCAAGACGAWTACGGYGCTTCAGCG-48	224
MAC <i>gyrB</i> R RPA			213-CRTTGTCTGGMGACCTCRACGCTGCCGTCG-241	
MAV <i>gyrB</i> F RPA	<i>M. avium</i> identification		489-CGAGGCCACCAAGCGCACCGGCACCACCATCC-520	188
MAV <i>gyrB</i> R RPA			647-CTGACCACCTCGTCGACGACCTCTTCGTTGG-675	
MIN <i>gyrB</i> F RPA	<i>M. intracellulare</i> identification		643-GTGAGCAACGAGGAGGTYGTCGACGAGGTC-672	202
MIN <i>gyrB</i> R RPA			812-GTCGAAGTCGATGATGCTCTGCTGGATCGGGC-843	

#### 4.6 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

##### จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพื่อประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ในงานวิจัยนี้ ไพรเมอร์ทั้งหมดที่แสดงใน

ตาราง 3.1 ถูกนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR และการตรวจสอบผลผลิตปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

##### 4.6.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR

นำ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ในหลอดปฏิกิริยา ประกอบไปด้วย 1x PCR buffer (1x Buffer : 7.5 mM Tris-Hcl pH=8.75, 25 mM KCl, 1 mM

MgCl<sub>2</sub>), 200 μM Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 1.25 U *Taq* DNA polymerase, Forward primer และ Reverse primer อย่างละ 0.20 μM, DNA ต้นแบบความเข้มข้น 20 ng/μl ปริมาตร 1 μl และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25 μl ทำปฏิกิริยา PCR ในสภาวะดังต่อไปนี้ เริ่มต้นจาก Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 40 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับ Denaturation อุณหภูมิ 68°C ในทุกคู่ไพรเมอร์ ยกเว้น MAC *gyrB* primer ใช้อุณหภูมิ 66 °C เป็นเวลา 50 วินาที สำหรับ Annealing ซึ่งตั้งค่าอุณหภูมิดังกล่าวจากการคำนวณ Melting temperature (T<sub>m</sub>) ของไพรเมอร์แต่ละคู่ และอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับ Extension และปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายคือ Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้น เก็บผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

#### 4.6.2 การตรวจสอบผลผลิตปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของแต่ละไพรเมอร์ จากขั้นตอนที่ 4.6.1 ปริมาตร 5 μl ผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6 เท่า ปริมาตร 1 μl นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ที่ผสมสีย้อม UltraPower DNA/RNA Safedye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้น

#### 4.7 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์สำหรับเทคนิค PCR

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ที่จำเพาะต่อเชื้อกลุ่ม MAC เชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare*

##### 4.7.1 การทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสม

ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* กับ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสเป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ในหลอดปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 1x PCR buffer (1x Buffer : 7.5 mM Tris-Hcl pH=8.75, 25 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>), 200 μM Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 1.25 U *Taq* DNA polymerase, Forward primer และ Reverse primer อย่างละ 0.20 μM, DNA ต้นแบบความเข้มข้น 20 ng/μl ปริมาตร 1 μl และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25 μl ทำปฏิกิริยา PCR ในสภาวะดังต่อไปนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 40 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับ Denaturation อุณหภูมิ 60, 61, 62, 63, 64, 65 และ 66 °C สำหรับไพรเมอร์ MAC *gyrB* และอุณหภูมิ 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 และ 72°C สำหรับไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* เป็นเวลา 50 วินาที สำหรับ Annealing และอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับ Extension และปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายคือ Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของแต่ละไพรเมอร์ โดยนำผลผลิตผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6 เท่า ปริมาตร 1 μl นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel



electrophoresis ความเข้มข้น 2% ที่ผสมสีย้อม UltraPower DNA/RNA Safedye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้น เลือกอุณหภูมิที่สามารถเห็นแถบ DNA ได้ชัดเจนโดยไม่พบแถบของ Primer-dimer เพื่อใช้ในการทดสอบสถานะขั้นต่อไป

#### 4.7.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20  $\mu\text{M}$  ในหลอดปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 1x PCR buffer (1x Buffer : 7.5 mM Tris-HCl pH=8.75, 25 mM KCl, 1mM  $\text{MgCl}_2$ ), 200  $\mu\text{M}$  Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 1.25 U *Taq* DNA polymerase, DNA ต้นแบบความเข้มข้น 20 ng/ $\mu\text{l}$  ปริมาตร 1  $\mu\text{l}$  และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25  $\mu\text{l}$  ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สภาวะที่ได้จากข้อ 4.7.1

ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของแต่ละไพรเมอร์ โดยนำผลผลิตผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6 เท่า ปริมาตร 1  $\mu\text{l}$  นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ที่ผสมสีย้อม UltraPower DNA/RNA Safedye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้น เลือกความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สามารถเห็นแถบ DNA ได้ชัดเจนโดยไม่พบแถบของ Primer-dimer เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

#### 4.8 การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR

นำ DNA ทั้งหมด 121 ตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR ตามสภาวะในข้อ 4.7 โดย DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสเป็น ตัวควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ในปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 1x PCR buffer, 200  $\mu$ M dNTPs, 1.25 U *Taq* DNA polymerase, Forward primer และ Reverse primer ความเข้มข้นตามข้อ 4.7.2, DNA ต้นแบบความเข้มข้น 20 ng/ $\mu$ l ปริมาตร 1  $\mu$ l และเติมน้ำกลั่น ปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ทำปฏิกิริยา PCR ในสภาวะดังต่อไปนี้ เริ่มต้นจาก Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 40 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับ Denaturation อุณหภูมิสำหรับ Annealing เลือกใช้อุณหภูมิตามข้อ 4.7.1 เป็นเวลา 50 วินาที และอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับ Extension และปฏิกิริยาขั้นตอน สุดท้ายคือ Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของแต่ละไพรเมอร์ โดยนำผลผลิตผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6 เท่า ปริมาตร 1  $\mu$ l นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ที่ผสมสีย้อม UltraPower DNA/RNA Safedye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้น

#### 4.9 การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *gyrB* ด้วยเทคนิค

##### Sanger DNA sequencing

นำผลผลิต PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAC *gyrB* ทั้งหมด มาวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อจำแนกและยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ MAC ในระดับสปีชีส์ โดยเตรียมผลผลิตให้มีปริมาณความเข้มข้นของ DNA มากกว่าหรือเท่ากับ 50 ng/μl พร้อมทั้งไพรเมอร์ MAC *gyrB* forward ความเข้มข้น 5 μM ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค DNA Sanger sequencing โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นนำผลลำดับเบสมาวิเคราะห์ โดยการเปรียบเทียบกับ *M. avium* subsp. *avium* ATCC 25291 (GenBank accession No. NZ\_ACFI01000001.1) และ *M. intracellulare* ATCC 13950 (GenBank accession No. CP003322.1) ที่เป็นลำดับเบสของเชื้อมาตรฐาน ด้วยโปรแกรม MegAlign

ในกรณีตัวอย่างเชื้อที่ไม่สามารถจำแนกถึงระดับสปีชีส์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน 2 สายพันธุ์ข้างต้น ให้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบเพิ่มเติมกับลำดับเบสของเชื้อในฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST

#### 4.10 การพัฒนาเทคนิค RPA/SYBR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC

พัฒนาเทคนิค RPA เพื่อวินิจฉัยเชื้อ MAC โดยใช้ไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA, ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA และ ใช้ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* เป็นตัวควบคุมบวก และ DNA ของ *M. tuberculosis* H37Rv และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ การทำปฏิกิริยา RPA ใช้ชุดน้ำยา TwistAmp®Basic Kit (บริษัท Twist Dx จำกัด,

สทราซาอามาจักร) ในแต่ละหลอดปฏิกิริยา ซึ่งปริมาตรรวมสุดท้ายทั้งหมด 50  $\mu\text{l}$  จะใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ต่อปฏิกิริยา RPA ใน 1 หลอด ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้ Forward primer และ Reverse primer ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  อย่างละ 2.4  $\mu\text{l}$ , Rehydration buffer ปริมาตร 29.5  $\mu\text{l}$  และ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (บริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด, สหรัฐอเมริกา) ปริมาตร 12.2  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Autopipette ดูดขึ้นลง เติม DNA 1  $\mu\text{l}$  ตามด้วย MgOAc ปริมาตร 2.5  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากัน บ่มทันทีที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที

เมื่อปฏิกิริยา RPA เสร็จสิ้น เติมสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้น 375x ใส่ในหลอดปฏิกิริยา 1  $\mu\text{l}$  อ่านผลด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติทันที สี SYBR green I ซึ่งจะเข้าจับบริเวณ Minor groove ของ DNA สายคู่ที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นภายหลังการเข้าจับอย่างจำเพาะของไพรเมอร์กับ DNA ต้นแบบ และสามารถเห็นหลอดปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นสีเขียวด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ (หรือเกิดการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต) แต่หากไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับกับ DNA ต้นแบบ จะไม่เกิดการเพิ่มปริมาณของ DNA ส่งผลให้มองเห็นหลอดปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นสีส้มด้วยตาเปล่า ภายใต้แสงธรรมชาติ (หรือไม่เกิดการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต) ในขั้นตอนการอ่านผล ใช้การอ่านผลแบบอำพราง (Blind test) โดยให้ผู้ที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการวิจัยอย่างน้อย 1 คน อ่านผลคู่ขนานไปกับการอ่านผลโดยผู้วิจัยเพื่อป้องกันอคติที่อาจเกิดขึ้น หากการอ่านผลจากทั้งสองฝ่าย สอดคล้องกัน จึงบันทึกผลการทดลอง ในกรณีที่การอ่านผลจากทั้งสองฝ่ายไม่สอดคล้องกัน ต้องทำการทดสอบและอ่านผลใหม่ บันทึกผลที่เกิดขึ้น

ลักษณะของการตรวจสอบปฏิกิริยา RPA ด้วยสี SYBR Green I ที่สามารถสังเกตได้ด้วย

ตาเปล่ามีดังนี้

- หากเป็นเชื้อ *M. avium* จะต้องมองเห็นหลอดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA (จำเพาะต่อเชื้อกลุ่ม MAC) และไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA (จำเพาะต่อเชื้อ *M. avium*) เป็นสีเขียว ในขณะที่หลอดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA จะมองเห็นเป็นสีส้ม

- หากเป็นเชื้อ *M. intracellulare* จะต้องมองเห็นหลอดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA (จำเพาะต่อเชื้อกลุ่ม MAC) และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA (จำเพาะต่อเชื้อ *M. intracellulare*) เป็นสีเขียว ในขณะที่หลอดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA จะมองเห็นเป็นสีส้ม

- หากเป็นเชื้อ MAC สายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *M. avium* และ *M. intracellulare* จะต้องมองเห็นหลอดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA (จำเพาะต่อเชื้อกลุ่ม MAC) เป็นสีเขียว และมองเห็นหลอดปฏิกิริยาไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เป็นสีส้ม

นำผลผลิต PRA ที่ถูกตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I เสรีจลิน มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep Gel/PCR purification (บริษัท Favorgen Biotech Corporation จำกัด, ประเทศไต้หวัน) โดยใช้ขั้นตอนตามที่บริษัทแนะนำดังนี้ เติม FADF buffer ลงในผลผลิต RPA ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ความเร็วรอบ 11,000 g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง เติม Wash buffer ปริมาตร 750  $\mu$ l ปั่นที่ความเร็วรอบ 11,000 g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง ปั่นให้แห้งที่ความเร็วรอบ 18,000 g เป็นเวลา 3 นาที 5). นำ FADF column ที่ปั่นแห้งแล้วมาใส่ใน Microcentrifuge tube ใหม่ จากนั้นเติม Elution Buffer ปริมาตร 40  $\mu$ l ทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นที่ความเร็วรอบ 18,000 g เป็นเวลา 1 นาที นำให้ผลผลิต RPA ปริมาตร 5  $\mu$ l ผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6 เท่า ปริมาตร 1  $\mu$ l นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความ

เข้มข้น 2% ที่ผสมสีย้อม UltraPower DNA/RNA Safedye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับผลการตรวจสอบปฏิกิริยา RPA ด้วยสี SYBR green I

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยา RPA/SYBR ดังรายละเอียดต่อไปนี้

#### 4.10.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ทดสอบปฏิกิริยาของ RPA โดยใช้ DNA ความเข้มข้น 10 ng/ $\mu$ l ด้วยไพรเมอร์ที่ถูกการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu$ M บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจนที่สุดเมื่ออ่านผลด้วย SYBR Green I และเกิด Primer-dimer น้อยที่สุด มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

#### 4.10.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นที่เหมาะสม

ทำการเจือจาง DNA ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/ $\mu$ l นำมาทดสอบปฏิกิริยา RPA โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่จากข้อ 4.10.1 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจนที่สุดเมื่ออ่านผลด้วย SYBR Green I และเกิด Primer-dimer น้อยที่สุด มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

#### 4.10.3 การทดสอบหาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ทดสอบปฏิกิริยาของ RPA โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ และ DNA ตั้งต้นที่ให้ผลปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.10.1 และ 4.10.2 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 นาที ตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis เลือกระยะเวลาที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดเมื่ออ่านผลด้วย SYBR Green I และเกิด Primer-dimer น้อยที่สุด มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

#### 4.10.4 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทดสอบปฏิกิริยาของ RPA โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ และ DNA ตั้งต้นที่ให้ผลปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.10.1 และ 4.10.2 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ได้แก่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C เป็นเวลาที่ให้ผลปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.10.3 ตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis เลือกอุณหภูมิที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดเมื่ออ่านผลด้วย SYBR Green I และเกิด Primer-dimer น้อยที่สุด มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

#### 4.10.5 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี SYBR Green I

ทำการเจือจางสี SYBR Green I ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100X, 200X, 300X, 400X, 500X และ 600X นำมาทดสอบปฏิกิริยาของ RPA โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ และ DNA ตั้งต้นที่ให้ผลปฏิกิริยาชัดที่สุดจากข้อ 4.10.1 และ 4.10.2 ตามลำดับ บ่มที่ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุด จากข้อ 4.10.3 และ 4.10.4 ตามลำดับ ตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นที่

เหมาะสมของสี SYBR Green I ที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดเมื่ออ่านผลด้วย SYBR Green I และเกิด Primer-dimer น้อยที่สุด มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

#### 4.11 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค RPA/SYBR

นำสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค RPA/SYBR ที่ทดสอบได้จากข้อ 4.10 ทดสอบความจำเพาะของเทคนิค กับ DNA ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ได้แก่ *M. tuberculosis* H37Rv, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. goodsonae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* และ *Moraxella catarrhalis* (8) โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบของปฏิกิริยา เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา RPA ทำการตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยสี SYBR green I และอ่านผลทันที บันทึกผลที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบการอ่านผลด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

#### 4.12 การทดสอบความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุด ที่เทคนิค RPA/SYBR

สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC

นำ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* มาปรับความเข้มข้นและเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นลำดับ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นของ DNA เท่ากับ 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng/ $\mu$ l จากนั้นนำ DNA ในแต่ละระดับความเจือจางไปใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับการทำปฏิกิริยา RPA/SYBR โดยใช้สภาวะใน



การทำปฏิกิริยาตามขั้นตอน 4.10 เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา RPA ทำการตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยสี SYBR green I และอ่านผลทันที บันทึกผลที่เกิดขึ้น ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดของเทคนิค RPA/SYBR (Limit of detection) คือความเข้มข้นสุดท้ายที่สามารถสังเกตเห็นหลอดปฏิกิริยา RPA/SYBR เป็นสีเขียว เปรียบเทียบการอ่านผลด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

#### 4.13 การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR

เมื่อได้สถานะที่เหมาะสมของเทคนิค RPA/SYBR ที่ทดสอบได้จากข้อ 4.10 สถานะดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC โดยนำเทคนิค RPA/SYBR ทดสอบกับ DNA ของเชื้อ MAC ที่ผ่านการจำแนกสปีชีส์ด้วยการหาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing ในข้อ 4.9 โดยใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสเป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา RPA ทำการตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยสี SYBR green I และอ่านผลทันที บันทึกผลที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบการอ่านผลด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

#### 4.14 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนาย

ผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value)

ของเทคนิค RPA/SYBR

นำผลการวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA ที่ถูกตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I (RPA/SYBR) เปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis (RPA/AGE) (ตารางที่ 3.2) และนำผลของเทคนิค RPA/SYBR และ RPA/AGE มาเปรียบเทียบกับผลของเทคนิค Sanger DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางอณูชีววิทยา (ตารางที่ 3.3 และตารางที่ 3.4 ตามลำดับ) และเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีทางอณู

ชีววิทยาที่นิยมใช้ทั่วไป (ตารางที่ 3.5 และตารางที่ 3.6 ตามลำดับ) เพื่อคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% ด้วยโปรแกรม MEDCALC® ([https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)) (110)

ตารางที่ 3. 2 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RPA/AGE

	พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/AGE	ไม่พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/AGE
พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/SYBR	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/SYBR	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 3. 3 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

	พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing	ไม่พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing
พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/SYBR	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/SYBR	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 3. 4 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

	พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing	ไม่พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing
พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/AGE	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/AGE	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 3. 5 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR

	พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค PCR	ไม่พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค PCR
พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/SYBR	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/SYBR	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 3. 6 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR

	พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค PCR	ไม่พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค PCR
พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/AGE	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบเชื้อเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RPA/AGE	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

สูตรคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ (110)

$$\text{ความไวของการทดสอบ} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{ความจำเพาะของการทดสอบ} = \frac{d}{b+d}$$

$$\text{ค่าทำนายผลบวก} = \frac{a}{a+b}$$

$$\text{ค่าทำนายผลลบ} = \frac{d}{c+d}$$

#### 4.15 การคำนวณค่าความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยสถิติ Kappa

ค่าสถิติ Kappa (Cochan's Kappa Coefficient : **K**) เป็นการวัดสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรโดยวิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC จากเทคนิคต่างๆ ได้แก่ เทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบกับเทคนิค RPA/AGE เทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing เทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing

เทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR

โดยใช้ค่าสถิติ Kappa กำหนดความเชื่อมั่นที่ 95% ที่ระดับนัยสำคัญ  $\alpha$  เท่ากับ 0.05 วิเคราะห์

ด้วยโปรแกรม GraphPad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>)

ตารางที่ 3. 7 การวิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC จากเทคนิคต่างๆ ด้วยค่าสถิติ Kappa

	ผลบวกจากเทคนิค 1	ผลลบจากเทคนิค 1	รวม
ผลบวกจากเทคนิค 2	a	b	a+b
ผลลบจากเทคนิค 2	c	d	c+d
รวม	a+c	b+d	a+b+c+d

สูตรคำนวณค่าสถิติ Kappa (111)

$$K = \frac{Pr_a - Pr_e}{1 - Pr_e}$$

เมื่อ  $Pr_a$  แทนค่าความสอดคล้องที่สังเกตได้จริง หรือผลรวมของสัดส่วนในแต่ละช่องด้านแนวทแยง ซึ่งเป็นสัดส่วนของค่าสังเกต หรือจำนวนข้อมูลเทคนิคการตรวจคู่ที่จัดอันดับความสอดคล้องกัน

$$\text{หรือ } Pr_a = \left[ \frac{a}{(a+b+c+d)} \right] + \left[ \frac{d}{(a+b+c+d)} \right]$$

และ  $Pr_e$  แทนค่าโอกาสของความสอดคล้องกัน หรือผลรวมแบบเดียวกับค่า  $Pr_a$  แต่เป็นสัดส่วนกับค่าคาดหวัง

$$\text{หรือ } Pr_e = \left[ \frac{a+c}{(a+b+c+d)} \right] \left[ \frac{a+b}{(a+b+c+d)} \right] + \left[ \frac{b+d}{(a+b+c+d)} \right] \left[ \frac{c+d}{(a+b+c+d)} \right]$$

ค่าที่ได้จะมีค่าระหว่าง 0-1 แล้วนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับระดับความสอดคล้องกันตามตาราง

ที่ 3.8

ตารางที่ 3. 8 เกณฑ์ความสอดคล้องกันของสถิติ Kappa ตามแนวทางของ Landis และ Koch (112)

ค่าสถิติ Kappa	ระดับความสอดคล้องกัน
0.81-1.00	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (Almost perfect)
0.61-0.80	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดี (Substantial)
0.41-0.60	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ปานกลาง (Moderate)
0.21-0.40	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์พอใช้ (Fair)
0.00-0.20	มีความสอดคล้องกันเล็กน้อย (Slight)
น้อยกว่า 0.00	ไม่มีความสอดคล้องกัน (Poor)

## บทที่ 4

### ผลการดำเนินการวิจัย

#### 1. ตัวอย่าง DNA ที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้เป็น DNA ซึ่งสกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ MAC ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย จำนวนทั้งสิ้น 121 ตัวอย่าง เชื้อที่นำมาสกัด DNA ทั้งหมดได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อกลุ่ม MAC โดยไม่ได้วินิจฉัยระบุสายพันธุ์ถึงในระดับสปีชีส์ ด้วยการหาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MAC แบ่งเป็นเพศชายจำนวน 28 ราย เพศหญิงจำนวน 27 ราย และไม่ถูกระบุเพศจำนวน 66 ราย ในกลุ่มผู้ป่วยที่ถูกระบุอายุมีเพียงจำนวน 27 ราย มีอายุอยู่ในช่วงระหว่าง 41-88 ปี คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 69.52 ปี ในขณะที่ผู้ป่วยจำนวน 94 รายไม่ถูกระบุอายุ ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดที่ถูกส่งเข้ามาเพื่อรับการวินิจฉัย แบ่งเป็นสิ่งส่งตรวจที่ทราบแหล่งที่มาจำนวน 45 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย เสมหะ 16 ตัวอย่าง Bronchoalveolar lavage 14 ตัวอย่าง เลือด 12 ตัวอย่าง ต่อม้ำเหลือง 2 ตัวอย่าง ไช้กระดูก 1 ตัวอย่าง และสิ่งส่งตรวจที่ไม่ทราบแหล่งที่มาจำนวน 76 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4. 1 จำนวนสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดที่ถูกส่งเข้ามาเพื่อรับการวินิจฉัยเชื้อ MAC (N=121)

ชนิดสิ่งส่งตรวจ	จำนวน
เสมหะ	16
Bronchoalveolar lavage	14
เลือด	12
ต่อมน้ำเหลือง	2
ไขกระดูก	1
ไม่ทราบข้อมูล	76
รวม	121

## 2. การวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA

ภายหลังจากนำตัวอย่าง DNA ที่ได้จากการสกัดโดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย นำมาวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nanodrop พบตัวอย่าง DNA ทั้งหมด 121 ตัวอย่าง มีปริมาณ DNA อยู่ในช่วงระหว่าง 6.0-271.4 ng/ $\mu$ l มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 64.9 ng/ $\mu$ l ความบริสุทธิ์ของ DNA ถูกวัดจากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 nm พบว่าตัวอย่าง DNA ที่มีอัตราส่วน 260/280 เท่ากับ 1.6-2.0 มีจำนวน 48 ตัวอย่าง (39.7%) ที่อัตราส่วน 260/280 น้อยกว่า 1.6 มีจำนวน 17 ตัวอย่าง (14.0%) และที่อัตราส่วน 260/280 มากกว่า 2.0 มีจำนวน 56 ตัวอย่าง (46.3%) ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 4.2



ตารางที่ 4. 2 ผลการวัดความบริสุทธิ์ของ DNA ด้วยเครื่อง Nanodrop (N = 121)

260/280 ratio	จำนวน	%
น้อยกว่า 1.6	17	14.0
1.6-2.0	48	39.7
มากกว่า 2.0	56	46.3
รวม	121	100.0

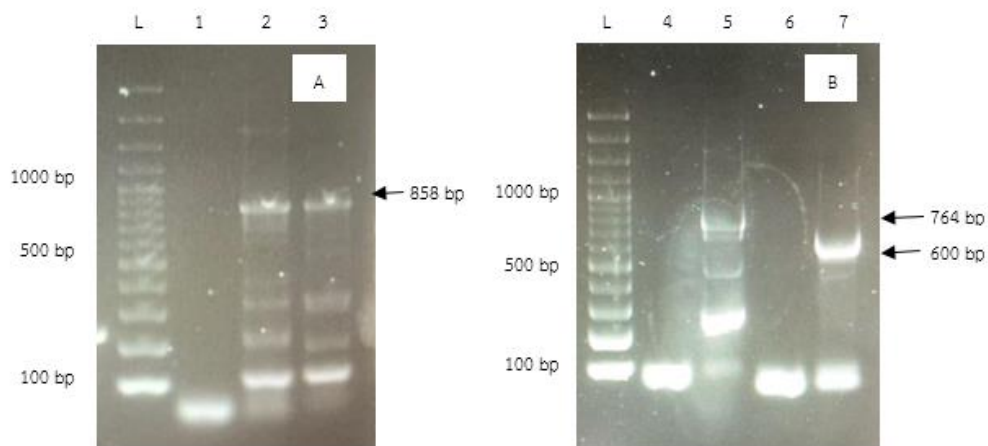
### 3. การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ในงานวิจัยนี้ ไพรเมอร์ทั้งหมดที่แสดงในตารางที่ 3.1 ในบทวิธีดำเนินการวิจัย ถูกนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR และการตรวจสอบผลผลิตปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ตามขั้นตอนที่อธิบายในบทวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 4.6.1 และข้อ 4.6.2 ตามลำดับ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* เป็นตัวควบคุมบวก

#### 3.1 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ MAC *gyrB*, ไพรเมอร์ MAV *gyrB*

และไพรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR

ภายหลังประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ MAC *gyrB*, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 2% พบว่าไพรเมอร์ทั้งหมดสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



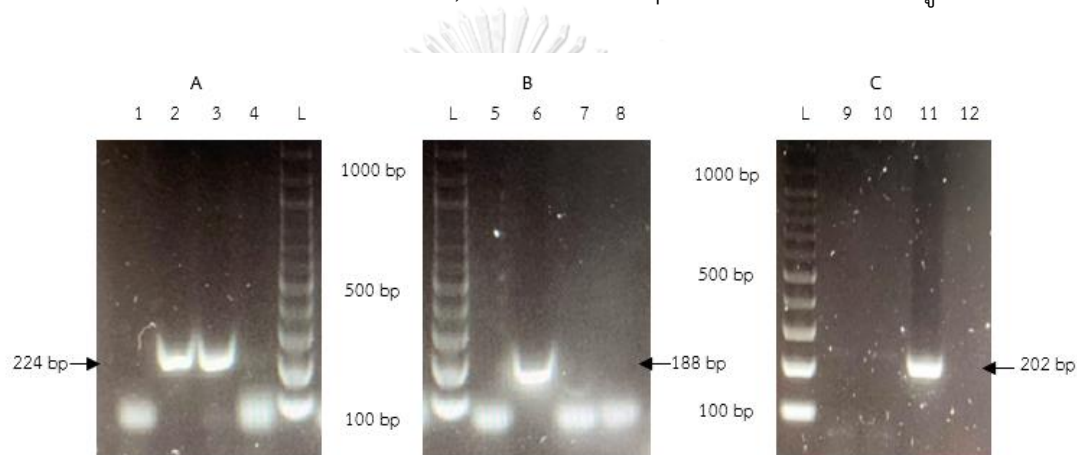
รูปที่ 4. 1 ผลประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ MAC *gyrB* (A), ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* (B) ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.1A แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAC *gyrB* บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2 และ 3 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 858 bp ตามลำดับ รูปที่ 4.1B แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 4 และ 6 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 5 และ 7 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 764 และ 600 bp ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังพบแถบผลผลิตที่ไม่จำเพาะ และการจับกันระหว่างไพรเมอร์เกิดขึ้น

### 3.2 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA, ไพรเมอร์ MAV

#### *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยเทคนิค PCR

ภายหลังประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 2% พบว่าไพรเมอร์ทั้งหมดสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ และพบแถบของผลผลิตขนาดเท่ากับ 224, 188 และ 202 bp ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4. 2 ผลการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA (A), ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA (B) และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA (C) ด้วยเทคนิค PCR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูป 4.2A แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 และ 4 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv ตามลำดับ แถวที่ 2 และ 3 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 224 bp ตามลำดับ รูปที่ 4.2B แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 5, 7 และ 8 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่น

ปราศจาก DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. intracellulare* และ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ตามลำดับ ขณะที่แถวที่ 6 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 188 bp รูปที่ 4.2C แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 9, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. avium* และ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ตามลำดับ ขณะที่แถวที่ 11 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 202 bp

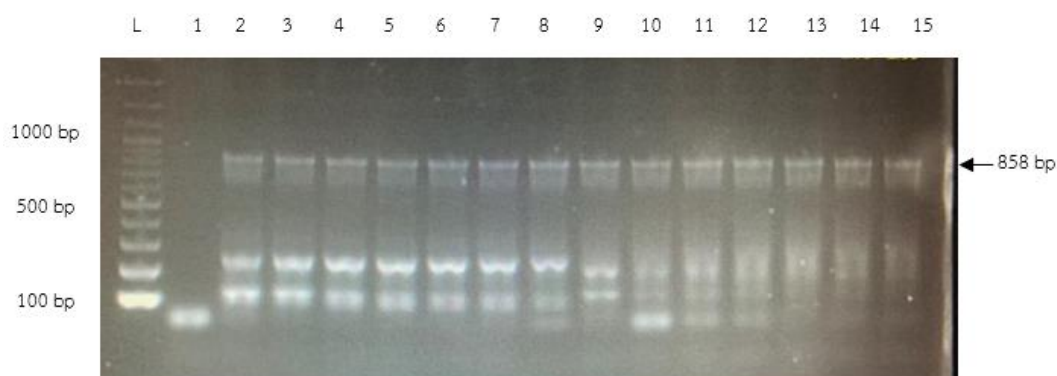
#### 4. การทดสอบสถานะที่เหมาะสมของไพรเมอร์สำหรับเทคนิค PCR

ทำการหาสถานะที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB*, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* สำหรับเทคนิค PCR โดยทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม ตรวจสอบผลผลิตปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ตามขั้นตอนที่อธิบายในบทวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 4.7.1 และ 4.7.2 ตามลำดับ โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* เป็นตัวควบคุมบวก

##### 4.1 การทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสม

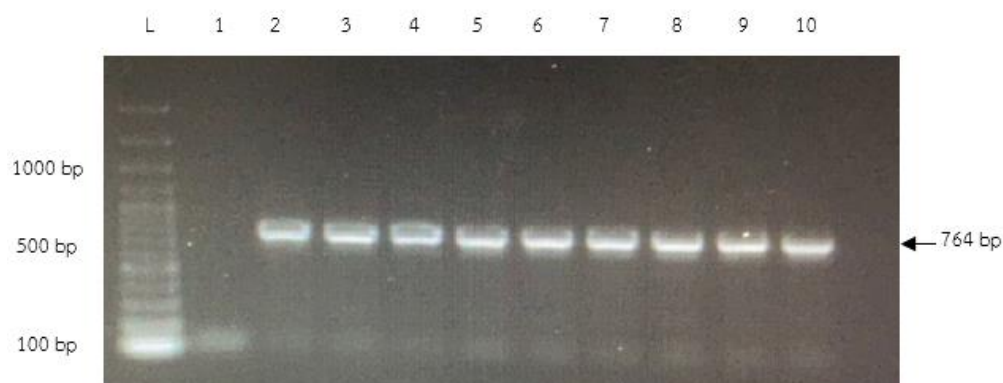
จากการทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB*, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* สำหรับเทคนิค PCR และตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 2% พบว่าอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ MAC *gyrB*, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสาร

พันธุกรรมและพบแถบผลผลิตที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นน้อยที่สุด เท่ากับ 66 °C 70 °C และ 68 °C ดังแสดงในรูปที่ 4.3 รูปที่ 4.4 และรูปที่ 4.5 ตามลำดับ



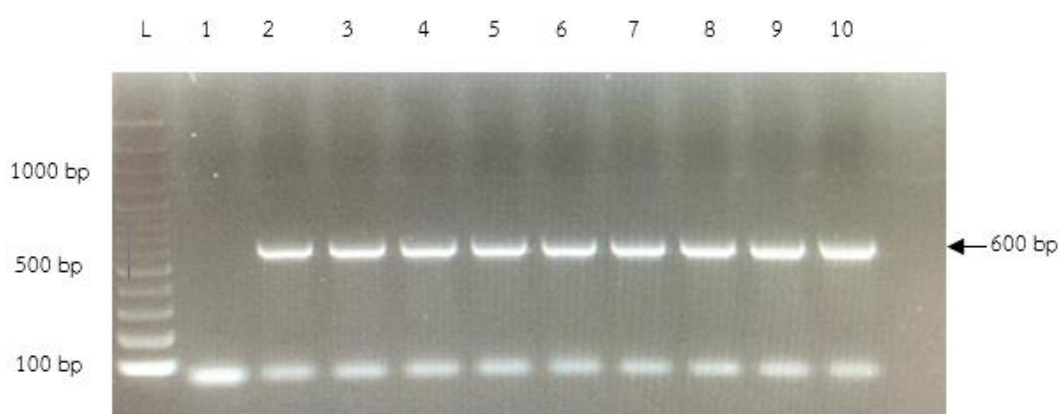
รูปที่ 4. 3 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.3 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAC *gyrB* บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2-8 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และทำปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 60, 61, 62, 63, 64, 65 และ 66 °C ตามลำดับ แถวที่ 9-15 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. intracell lulare* อุณหภูมิ 60, 61, 62, 63, 64, 65 และ 66 °C ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 858 bp โดยเลือกอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB* ที่ 66 °C



รูปที่ 4. 4 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAV *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.4 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAV *gyrB* บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2-10 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และทำปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 และ 72°C ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 764 bp โดยเลือกอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAV *gyrB* ที่ 70 °C



รูปที่ 4. 5 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.5 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MIN *gyrB* บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2-10 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยีนย่นด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* และทำปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 และ 72°C ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 600 bp โดยเลือกอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MIN *gyrB* ที่ 68 °C

#### 4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม

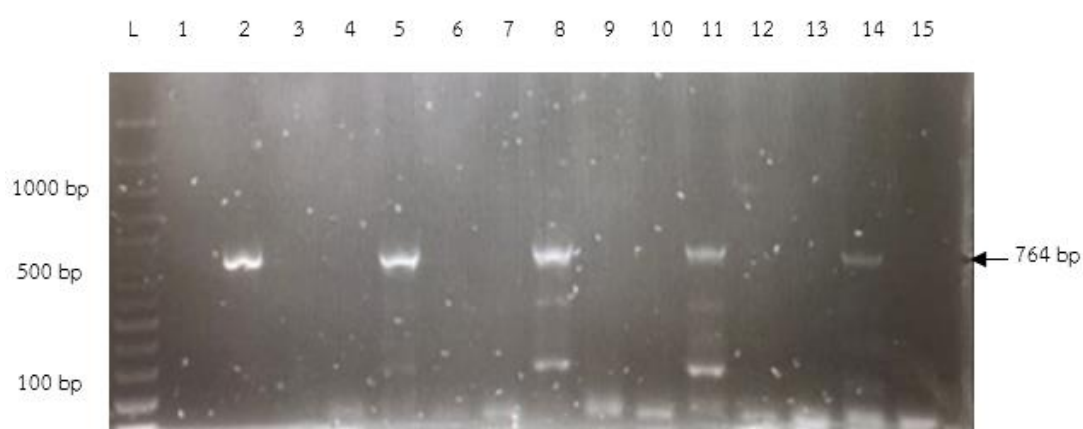
จากการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB*, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* สำหรับเทคนิค PCR และตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 2% พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ MAC *gyrB*, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และพบแถบผลผลิตที่ไม่จำเพาะน้อยที่สุด เท่ากับ 0.08  $\mu$ M 0.04  $\mu$ M และ 0.08  $\mu$ M ดังแสดงในรูปที่ 4.6 รูปที่ 4.7 และรูปที่ 4.8 ตามลำดับ



รูปที่ 4. 6 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%



จากรูปที่ 4.6 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAC *gyrB* บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 4, 7, 10 และ 13 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ แถวที่ 2, 5, 8, 11 และ 14 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ แถวที่ 3, 6, 9, 12 และ 15 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 858 bp

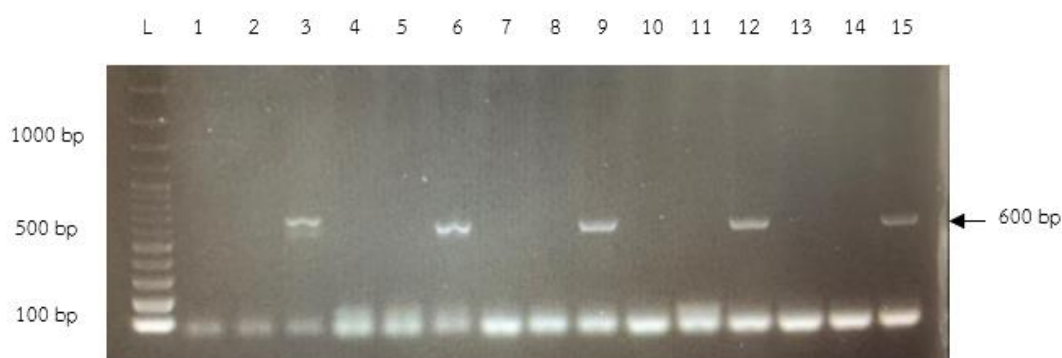


รูปที่ 4. 7 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAV *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.7 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAV *gyrB* บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 4, 7, 10 และ 13 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 3, 6, 9, 12 และ 15 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่



ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ แถวที่ 2, 5, 8, 11 และ 14 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 764 bp



รูปที่ 4. 8 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.8 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MIN *gyrB* บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 4, 7, 10 และ 13 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2, 5, 8, 11 และ 14 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ แถวที่ 3, 6, 9, 12 และ 15 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 600 bp

## 5. การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR

เมื่อได้อุณหภูมิ Annealing และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค PCR และนำสภาวะดังกล่าวไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมกับ DNA ทั้งหมด 121 ตัวอย่างเพื่อจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และใช้ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* เป็นตัวควบคุมบวก ส่วนประกอบและขั้นตอนสำหรับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ ถูกสรุปในตารางที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4. 3 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาสำหรับการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR

	MAC <i>gyrB</i>	MAV <i>gyrB</i>	MIN <i>gyrB</i>
buffer	1X	1X	1X
dNTPs ( $\mu$ M)	200	200	200
F primer ( $\mu$ M)	0.08	0.04	0.08
R primer ( $\mu$ M)	0.08	0.04	0.08
Taq Polymerase	1.25 U/ 50 $\mu$ l PCR	0.625 U/ 25 $\mu$ l PCR	0.625 U/ 25 $\mu$ l PCR
20 ng DNA ( $\mu$ l)	1	1	1
Distilled water	เติมจนครบ 50 $\mu$ l	เติมจนครบ 25 $\mu$ l	เติมจนครบ 25 $\mu$ l

ตารางที่ 4. 4 ขั้นตอนในปฏิกิริยาสำหรับการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR

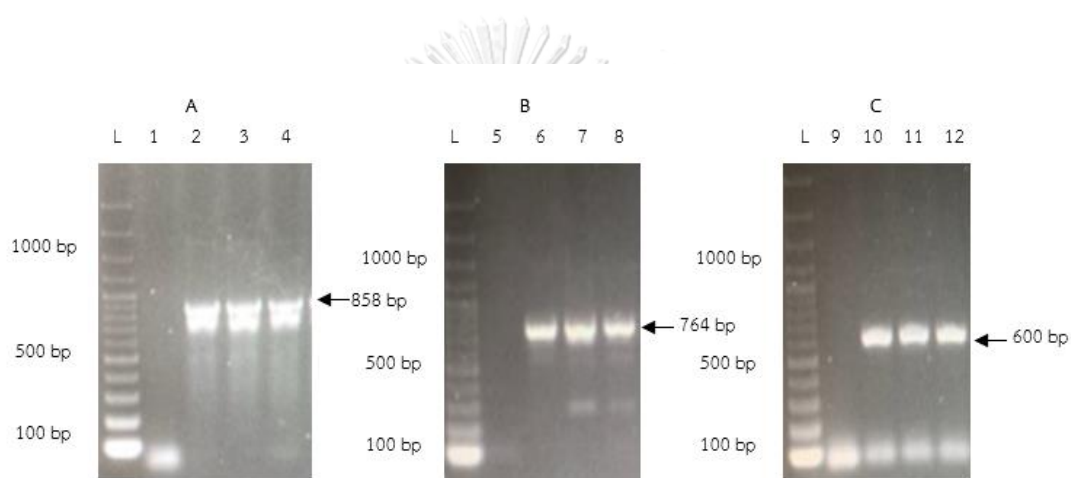
ขั้นตอน/ไพรมเมอร์	MAC <i>gyrB</i>	MAV <i>gyrB</i>	MIN <i>gyrB</i>	เวลา
Pre-denature (°C)	95	95	95	10 นาที
Denature (°C)	95	95	95	1 นาที
Annealing (°C)	66	70	68	50 วินาที
Extension (°C)	72	72	72	1 นาที
Post-extension (°C)	72	72	72	15 นาที

จากการทดสอบเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR พบว่าเชื้อจำนวน 120 ตัวอย่าง ถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรมเมอร์ MAC *gyrB* ในขณะที่เชื้อจำนวน 1 ตัวอย่าง ไม่สามารถถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ ด้วยไพรมเมอร์ MAC *gyrB* โดยเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวไม่พบแถบของผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% เมื่อทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ดังนั้นเชื้อทั้งหมดจำนวน 120 ตัวอย่าง จึงถูกนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อจำแนกสายพันธุ์ในลำดับถัดไป

จากการทดสอบเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR กับไพรมเมอร์ MAV *gyrB* และไพรมเมอร์ MIN *gyrB* พบว่าเชื้อจำนวน 41 ตัวอย่างถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรมเมอร์ MAV *gyrB* และเชื้อจำนวน 75 ตัวอย่างถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรมเมอร์ MIN *gyrB* ในขณะที่เชื้อจำนวน 80 และ 46 ตัวอย่าง ให้ผลการทดสอบเป็นลบกับไพรมเมอร์ทั้งสองชนิดตามลำดับ

ตารางที่ 4. 5 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR กับไพรเมอร์ MAC *gyrB* ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB*

ผลการทดสอบ	MAC <i>gyrB</i>	MAV <i>gyrB</i>	MIN <i>gyrB</i>
ผลบวก	120	41	75
ผลลบ	1	80	46
รวม	121	121	121



รูปที่ 4. 9 ตัวอย่างเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR กับไพรเมอร์ MAC *gyrB* (A) ไพรเมอร์ MAV *gyrB* (B) และไพรเมอร์ MIN *gyrB* (C) เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.9A แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAC *gyrB* บน

Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2, 3 และ 4 คือ DNA ต้นแบบของเชื้อ MAC ที่ถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 858 bp

รูปที่ 4.9B แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAV *gyrB* บน

Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 5 ตัวควบคุมลบซึ่ง

เป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 6, 7 และ 8 คือ DNA ต้นแบบของเชื้อที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *M. avium* ซึ่งถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและพบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 764 bp

รูปที่ 4.9C แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 9 คือ ตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 10, 11 และ 12 คือ DNA ต้นแบบของเชื้อที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *M. intracellulare* ซึ่งถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและพบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 600 bp

ตารางที่ 4. 6 การแปลผลเพื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

ผลการตรวจเมื่อทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ต่างๆ และตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis			การแปลผล	จำนวน (ตัวอย่าง)
ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i>	ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i>	ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i>		
บวก	บวก	ลบ	ตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>M. avium</i>	39
บวก	ลบ	บวก	ตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>M. intracellulare</i>	74
บวก	ลบ	ลบ	ตรวจพบ DNA ของเชื้อในกลุ่ม MAC สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจาก <i>M. avium</i> และ <i>M. intracellulare</i>	6
บวก	บวก	บวก	ไม่สามารถแปลผลได้	1
ลบ	บวก	ลบ	ไม่สามารถแปลผลได้	1*
รวม				121

หมายเหตุ \* ตัวอย่างเชื้อดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* จึงไม่มีผลการหาลำดับเบส และไม่ถูกนำไปทดสอบต่อในขั้นตอนต่อไป

## 6. การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *gyrB* ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

นำผลผลิต PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAC *gyrB* จำนวนทั้งหมด 120 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อจำแนกและยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ MAC ในระดับสปีชีส์ โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ นำผลลำดับเบสมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *M. avium* subsp. *avium* ATCC 25291 และ *M. intracellulare* ATCC 13950 และลำดับเบสของเชื้อ MAC สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจาก *M. avium* และ *M. intracellulare* เชื้อ NTM และเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยโปรแกรม MegAlign ดังตัวอย่างผลการเปรียบเทียบที่แสดงในรูปที่ 4.10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
1	█	91.9	91.7	92.0	92.0	92.2	91.8	91.7	91.3	92.4	92.9	92.4	91.8	99.4	100.0	98.2	91.7	99.4	98.9	91.9	91.7	91.7	91.8	99.2	99.2	83.9	1	Mycobacterium intracellulare ATCC 13950
2	8.6	█	99.9	99.1	99.5	99.4	99.5	99.9	90.3	90.5	91.1	90.4	99.7	91.5	91.6	90.8	99.9	91.8	91.7	99.9	98.8	99.1	99.9	92.0	92.0	83.5	2	Mycobacterium avium subsp. avium ATCC 2
3	8.8	0.1	█	99.2	99.7	99.5	99.6	100.0	90.4	90.7	91.2	90.5	99.9	91.6	91.7	90.9	100.0	91.5	91.6	100.0	98.8	99.2	99.9	91.0	91.0	77.9	3	52-AIMACPCRPrimer.seq
4	8.5	0.9	0.8	█	99.5	99.7	99.4	99.2	90.3	90.3	91.2	90.3	99.4	91.8	92.0	90.9	99.2	91.7	91.8	99.2	99.4	100.0	99.1	91.0	91.0	77.8	4	53-AIMACPCRPrimer.seq
5	8.5	0.4	0.5	0.5	█	99.7	99.9	99.7	90.7	90.7	91.5	90.7	99.9	91.8	92.0	91.1	99.7	91.7	91.8	99.7	99.1	99.5	99.6	91.2	91.2	78.2	5	54-AIMACPCRPrimer.seq
6	8.2	0.7	0.5	0.3	0.3	█	99.6	99.5	90.5	90.5	91.3	90.5	99.6	92.1	92.2	91.1	99.5	92.0	92.1	99.5	99.1	99.7	99.4	91.4	91.4	77.9	6	55-AIMACPCRPrimer.seq
7	8.7	0.5	0.4	0.7	0.1	0.4	█	99.6	90.5	90.5	91.3	90.5	99.7	91.7	91.8	90.9	99.6	91.6	91.7	99.6	99.0	99.4	99.5	91.0	91.0	78.2	7	56-AIMACPCRPrimer.seq
8	8.8	0.1	0.0	0.8	0.3	0.5	0.4	█	90.4	90.7	91.2	90.5	99.9	91.6	91.7	90.9	100.0	91.5	91.6	100.0	98.8	99.2	99.9	91.0	91.0	77.9	8	57-AIMACPCRPrimer.seq
9	9.2	10.4	10.3	10.4	10.0	10.1	10.1	10.3	█	93.4	92.2	91.5	90.5	91.6	91.3	91.5	90.4	91.5	91.6	90.4	90.3	90.3	90.3	91.2	91.2	77.0	9	58-AIMACPCRPrimer.seq
10	8.1	10.1	10.0	10.4	10.0	10.1	10.1	10.0	6.9	█	93.5	92.5	90.8	92.5	92.4	93.3	90.7	92.4	92.5	90.7	90.0	90.3	90.5	91.6	91.6	77.8	10	59-AIMACPCRPrimer.seq
11	7.5	9.5	9.4	9.4	9.1	9.2	9.2	9.4	8.2	6.8	█	94.4	91.3	92.7	92.9	93.0	91.2	92.6	92.7	91.2	91.1	91.2	91.1	92.1	92.1	78.5	11	60-AIMACPCRPrimer.seq
12	8.1	10.3	10.1	10.4	10.0	10.1	10.1	10.1	9.1	7.9	5.8	█	90.5	92.2	92.4	91.7	90.5	92.1	92.2	90.5	90.3	90.3	90.4	91.4	91.4	77.2	12	61-AIMACPCRPrimer.seq
13	8.7	0.3	0.1	0.7	0.1	0.4	0.3	0.1	10.1	9.8	9.2	10.1	█	91.7	91.8	90.9	99.9	91.6	91.7	99.9	99.0	99.4	99.7	91.2	91.2	78.1	13	62-AIMACPCRPrimer.seq
14	0.7	9.1	9.0	8.7	8.7	8.4	8.8	9.0	9.0	7.9	7.6	8.2	8.8	█	99.4	97.8	91.6	99.9	100.0	91.6	91.6	91.8	91.5	99.1	99.1	78.1	14	63-AIMACPCRPrimer.seq
15	0.0	9.0	8.8	8.5	8.5	8.2	8.7	8.8	9.2	8.1	7.5	8.1	8.7	0.7	█	98.2	91.7	99.2	99.4	91.7	91.7	92.0	91.6	99.4	99.4	77.9	15	64-AIMACPCRPrimer.seq
16	1.8	9.8	9.7	9.7	9.5	9.5	9.7	9.7	9.1	7.1	7.3	8.8	9.7	2.2	1.8	█	90.9	97.7	97.8	90.9	90.9	90.9	90.8	97.4	97.4	78.2	16	65-AIMACPCRPrimer.seq
17	8.8	0.1	0.0	0.8	0.3	0.5	0.4	0.0	10.3	10.0	9.4	10.1	0.1	9.0	8.8	9.7	█	91.5	91.6	100.0	98.8	99.2	99.9	91.0	91.0	77.9	17	66-AIMACPCRPrimer.seq
18	0.6	8.7	9.1	8.8	8.8	8.5	9.0	9.1	9.1	8.1	7.8	8.4	9.0	0.1	0.8	2.4	9.1	█	99.1	91.8	91.6	91.6	91.7	99.3	99.3	83.9	18	Mycobacterium chimaera strain FLAC0070
19	1.1	8.8	9.0	8.7	8.7	8.4	8.8	9.0	9.0	7.9	7.6	8.2	8.8	0.0	0.7	2.2	9.0	0.9	█	91.7	91.6	91.5	91.6	99.0	99.0	84.2	19	Mycobacterium yongonense strain Asan 36
20	8.6	0.1	0.0	0.8	0.3	0.5	0.4	0.0	10.3	10.0	9.4	10.1	0.1	9.0	8.8	9.7	0.0	8.7	8.8	█	98.8	99.1	99.9	91.9	91.9	83.6	20	Mycobacterium avium subsp. hominissuis
21	8.8	1.2	1.2	0.7	0.9	0.9	1.0	1.2	10.4	10.7	9.5	10.4	1.0	9.0	8.8	9.7	1.2	8.9	8.9	1.2	█	99.3	98.8	91.8	91.8	83.3	21	Mycobacterium avium subsp. paratubercul
22	8.8	0.9	0.8	0.0	0.5	0.3	0.7	0.8	10.4	10.4	9.4	10.4	0.7	8.7	8.5	9.7	0.8	8.9	9.0	0.9	0.7	█	99.0	91.6	91.6	83.3	22	Mycobacterium avium 104, complete genom
23	8.7	0.1	0.1	0.9	0.4	0.7	0.5	0.1	10.4	10.1	9.5	10.3	0.3	9.1	9.0	9.8	0.1	8.8	8.9	0.1	1.2	1.0	█	91.9	91.9	83.4	23	Mycobacterium avium subsp. silvaticum A
24	0.8	8.5	9.6	9.6	9.4	9.2	9.6	9.6	9.4	8.9	8.3	9.1	9.4	0.9	0.6	2.7	9.6	0.7	1.0	8.6	8.7	8.9	8.6	█	100.0	83.1	24	AB014188.1 Mycobacterium intracellulare
25	0.8	8.5	9.6	9.6	9.4	9.2	9.6	9.6	9.4	8.9	8.3	9.1	9.4	0.9	0.6	2.7	9.6	0.7	1.0	8.6	8.7	8.9	8.6	0.0	█	83.1	25	AB014188.1 Mycobacterium intracellulare
26	18.2	18.7	26.3	26.5	25.9	26.3	25.9	26.3	27.5	26.4	25.4	27.3	26.1	26.0	26.2	25.8	26.3	18.2	17.8	18.6	18.9	18.9	18.8	19.2	19.2	█	26	Mycobacterium tuberculosis H37Rv, compl

รูปที่ 4. 10 ตัวอย่างการวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อจำแนกและยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ MAC ในระดับสปีชีส์ด้วยโปรแกรม MegAlign

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อจำนวน 120 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อจำนวน 40 ตัวอย่าง (33.33%) ถูกวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *M. avium* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเฉลี่ยเมื่อเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* subsp. *avium* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25291 อยู่ที่ 99.45% (ค่า

เปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำสุด-สูงสุด: 98.7-99.9%) ในขณะที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเฉลี่ยเมื่อเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 13950 ต่ำเพียง 91.81% (ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำสุด-สูงสุด: 91.4-92.3%)

เชื้อจำนวน 58 ตัวอย่าง (48.33%) ถูกวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *M. intracellulare* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเฉลี่ยเมื่อเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 13950 อยู่ที่ 98.60% (ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำสุด-สูงสุด: 96.6-100%) ในขณะที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเฉลี่ยเมื่อเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* subsp. *avium* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25291 ต่ำเพียง 91.18% (ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำสุด-สูงสุด: 89.9-91.7%) อย่างไรก็ตามเชื้อจำนวน 22 ตัวอย่าง (18.33%) ไม่สามารถวินิจฉัยจำแนกได้ในระดับสปีชีส์ โดยถูกวินิจฉัยได้เพียงเป็นเชื้อกลุ่ม MAC โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเฉลี่ยเมื่อเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* subsp. *avium* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25291 และเชื้อ *M. intracellulare* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 13950 เท่ากับ 90.30% (ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำสุด-สูงสุด: 86.1-92.2%) และ 91.58% (ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำสุด-สูงสุด: 85.9-93.9%) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4. 7 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ MAC ในระดับสปีชีส์เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *M. avium subsp. avium* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25291 และ *M. intracellulare* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 13950

<i>M. avium subsp. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	ผลการวิเคราะห์ ลำดับเบส	จำนวน	%
ATCC 25291	ATCC 13950			
ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเฉลี่ย (ต่ำสุด-สูงสุด)	ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเฉลี่ย (ต่ำสุด-สูงสุด)			
99.45 (98.7-99.9)	91.81 (91.4-92.3)	<i>M. avium</i>	40	33.33
91.18 (89.9-91.7)	98.60 (96.6-100)	<i>M. intracellulare</i>	58	48.33
90.30 (86.1-92.2)	91.58 (85.9-93.9)	MAC	22	18.33
		รวม	120	100

เมื่อนำเชื้อจำนวน 22 ตัวอย่างที่ถูกวิเคราะห์ลำดับเบสว่าเป็นเชื้อกลุ่ม MAC ข้างต้นมาทำการวิเคราะห์ลำดับเบสเพิ่มเติมด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าเชื้อจำนวน 3 ตัวอย่าง (2.50%) ซึ่งมีความเหมือนของลำดับเบสใกล้เคียงกับ *M. marseillense* (ค่าความเหมือนของลำดับเบสอยู่ในช่วง 97.7% - 98.0%) เชื้อจำนวน 6 ตัวอย่าง (5.00%) ซึ่งมีความเหมือนของลำดับเบสใกล้เคียงกับ *M. colombiense* (ค่าความเหมือนของลำดับเบสอยู่ในช่วง 97.8% - 99.5%) เชื้อจำนวน 13 ตัวอย่าง (10.83%) ที่สามารถระบุได้เพียงว่าเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม MAC โดยไม่สามารถระบุกลุ่มสปีชีส์ได้ (ค่าความเหมือนของลำดับเบสอยู่ในช่วง 85.6% - 93.9%) รายละเอียดตามตารางที่ 4.8

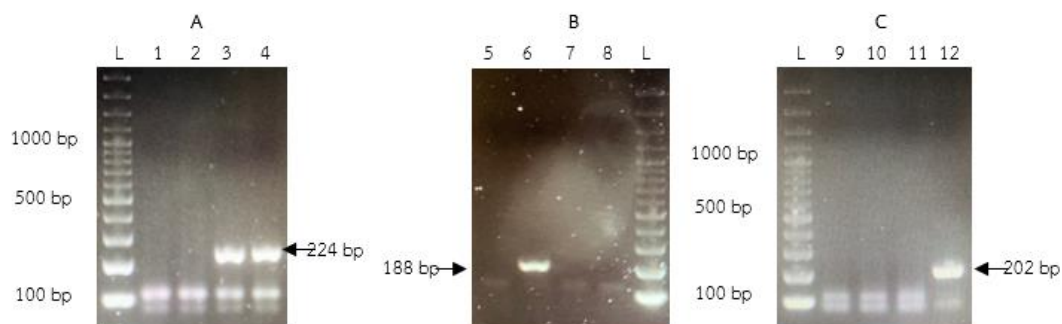


ตารางที่ 4. 8 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ MAC ในระดับสปีชีส์เปรียบเทียบกับเชื้อ MAC สายพันธุ์อื่นๆ

เชื้อ	ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน	รวม	%
	ต่ำสุด-สูงสุด		
<i>M. marseillense</i>	97.7% - 98.0%	3	2.50
<i>M. colombiense</i>	97.8% - 99.5%	6	5.00
MAC	85.6% - 93.9%	13	10.83
รวม		22	18.33

## 7. การพัฒนาเทคนิค RPA/SYBR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC

วินิจฉัยเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ใช้ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* เป็นตัวควบคุมบวก และ DNA ของ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ดำเนินปฏิกิริยา RPA ด้วยชุดน้ำยา RPA TwistAmp® Basic ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังรายละเอียดที่อธิบายในบทวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 4.10 ตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยการเติมสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X และอ่านผลด้วยตาเปล่าทันทีภายใต้แสงธรรมชาติ เปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 2%



รูปที่ 4. 11 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* เบื้องต้นด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA (A), ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA (B) และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA (C) เมื่อตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.11A แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAC *gyrB* บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 และ 2 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv ตามลำดับ แถวที่ 3 และ 4 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 224 bp

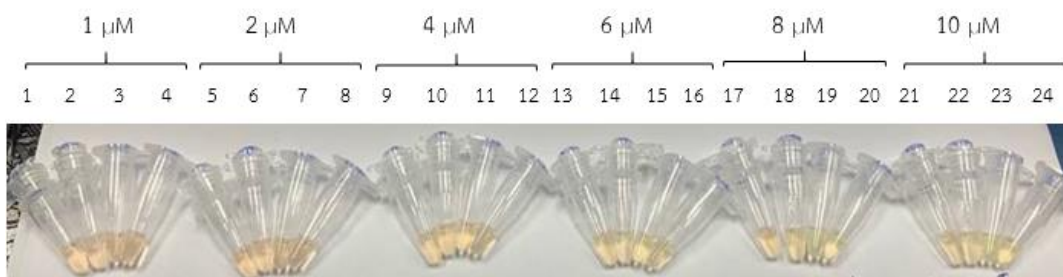
รูปที่ 4.11B แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 5 และ 8 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv ตามลำดับ แถวที่ 6 ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 188 bp และแถวที่ 7 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. intracellulare* ไม่พบแถบของผลผลิต

รูปที่ 4.11C แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 9 และ 10 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ มาตรฐาน H37Rv ตามลำดับ แถวที่ 11 ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. avium* ไม่พบแถบผลผลิต และแถวที่ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาดเท่ากับ 202 bp

ภายหลังทดสอบหาสภาวะเหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยา RPA/SYBR ได้รายละเอียดผลการทดสอบดังต่อไปนี้

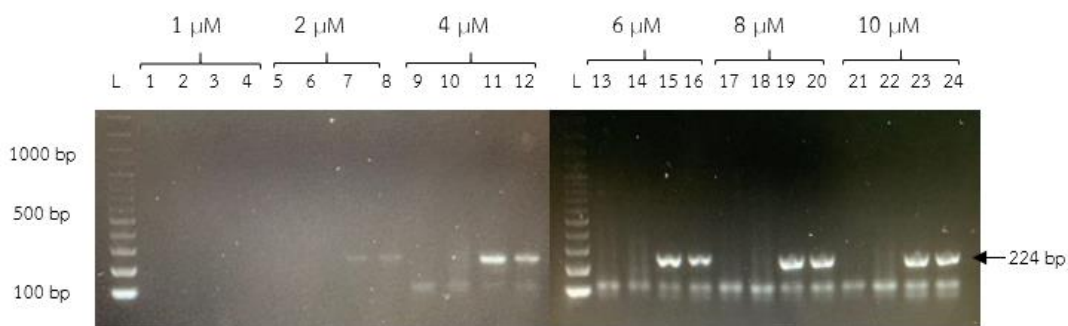
### 7.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่เหมาะสม

ทดสอบปฏิกิริยาของ RPA โดยใช้ DNA ความเข้มข้น 10 ng/ $\mu$ l ด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu$ M บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR green I ความเข้มข้น 375X เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละชนิดที่สามารถให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจนที่สุดเมื่ออ่านผลด้วย SYBR Green I ได้แก่ ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้น 8  $\mu$ M ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้น 4  $\mu$ M และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้น 6  $\mu$ M โดยความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละชนิดดังกล่าว ถูกนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



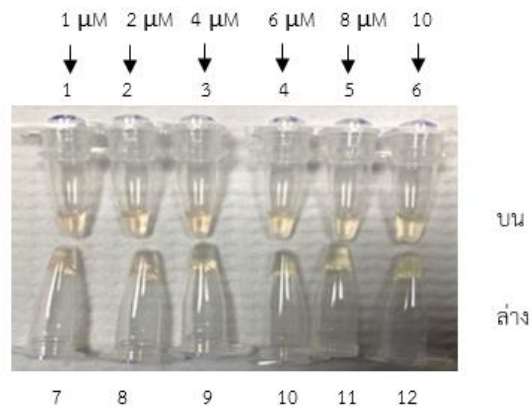
รูปที่ 4. 12 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X

รูปที่ 4.12 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA ที่มีไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 5, 9, 13, 17 และ 21 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 6, 10, 14, 18 และ 22 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 3, 7, 11, 15, 19 และ 23 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ไพรเมอร์ความเข้มข้น 8  $\mu\text{M}$  (หลอดที่ 19) และ 10  $\mu\text{M}$  (หลอดที่ 23) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว หลอดปฏิกิริยาที่ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ไพรเมอร์ความเข้มข้น 8  $\mu\text{M}$  (หลอดที่ 20) และ 10  $\mu\text{M}$  (หลอดที่ 24) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



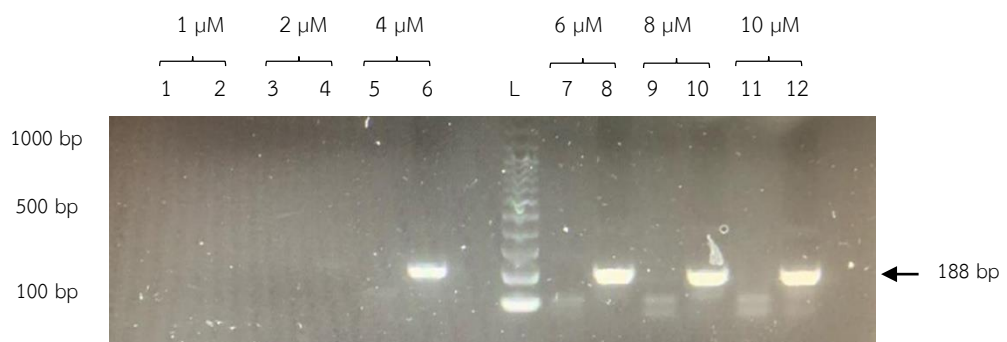
รูปที่ 4. 13 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

รูปที่ 4.13 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAC *gyrB* ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 5, 9, 13, 17 และ 21 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2, 6, 10, 14, 18 และ 22 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv เชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 3, 7, 11, 15, 19 และ 23 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ที่ไพรเมอร์ความเข้มข้นตั้งแต่ 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  (แถวที่ 7, 11, 15, 19 และ 23 ตามลำดับ) แถวที่ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ที่ไพรเมอร์ความเข้มข้นตั้งแต่ 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  (แถวที่ 8, 12, 16, 20 และ 24 ตามลำดับ)



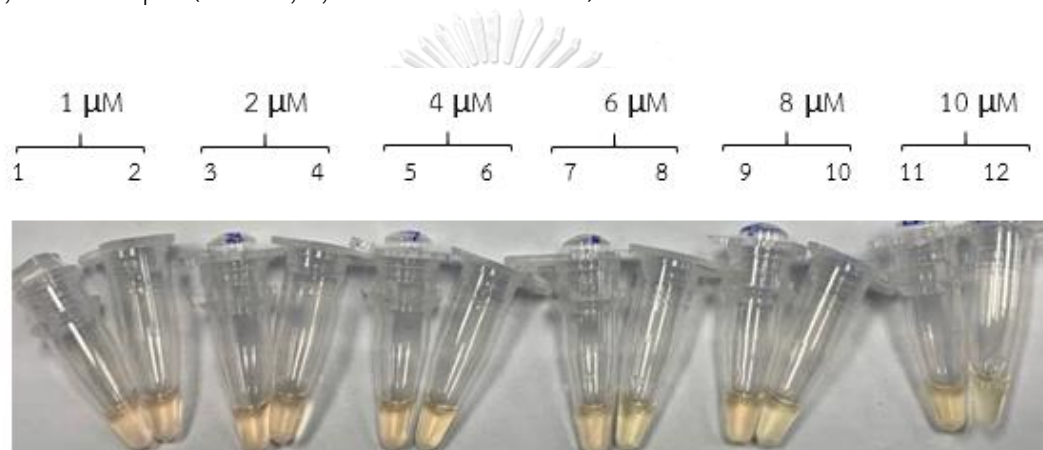
รูปที่ 4. 14 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X

รูปที่ 4.14 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA ที่มีไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ไพรเมอร์ความเข้มข้นตั้งแต่ 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  (หลอดที่ 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



รูปที่ 4. 15 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

รูปที่ 4.15 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAV *gyrB* ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาด 188 bp ที่ไพรเมอร์ความเข้มข้น ตั้งแต่ 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  (แถวที่ 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ)

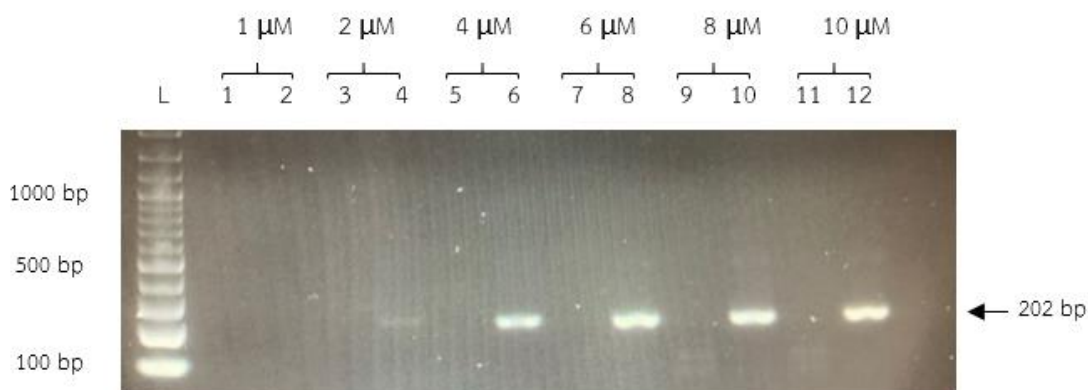


รูปที่ 4. 16 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.16 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA ที่มีไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ไพรเมอร์ความเข้มข้นตั้งแต่ 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  (หลอดที่ 8, 10 และ 12 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว





รูปที่ 4. 17 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

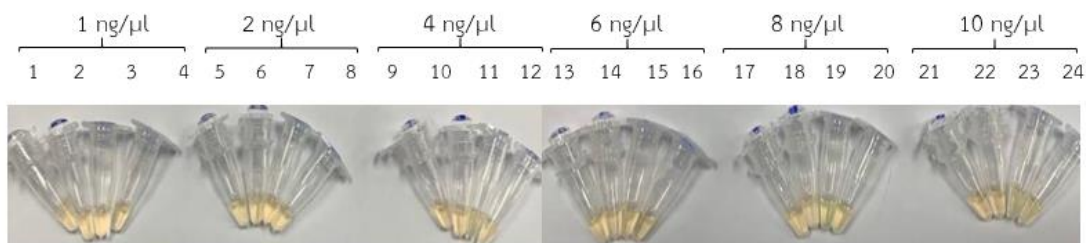
รูปที่ 4.17 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่เกิดจากไพรเมอร์ MIN *gyrB* ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยีนย่นด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาด 202 bp ที่ไพรเมอร์ความเข้มข้นตั้งแต่ 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{M}$  (แถวที่ 4, 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ)

## 7.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นที่เหมาะสม

ทำการเจือจาง DNA ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/ $\mu\text{l}$  นำมาทดสอบปฏิกิริยา RPA โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ 8  $\mu\text{M}$  ความเข้มข้นของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ 4  $\mu\text{M}$  และความเข้มข้นของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ 6  $\mu\text{M}$  บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR green I ความเข้มข้น 375X เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% พบว่าความเข้มข้นของ

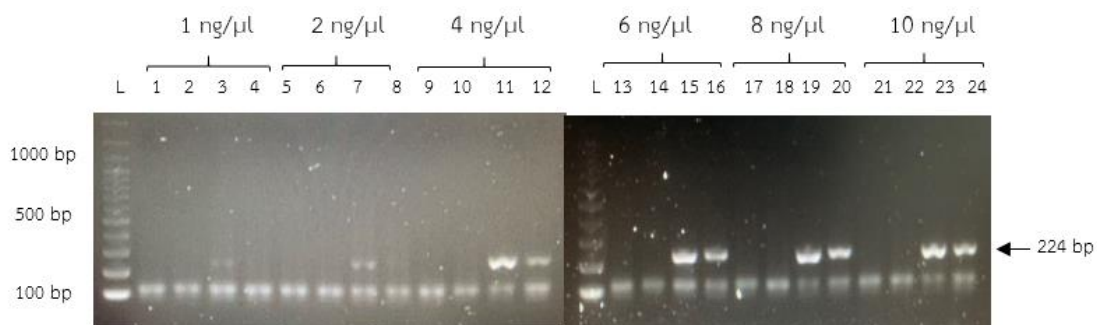


DNA ต้นแบบที่เหมาะสมเท่ากับ 8 ng/ $\mu$ l โดยความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นดังกล่าว ถูกนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



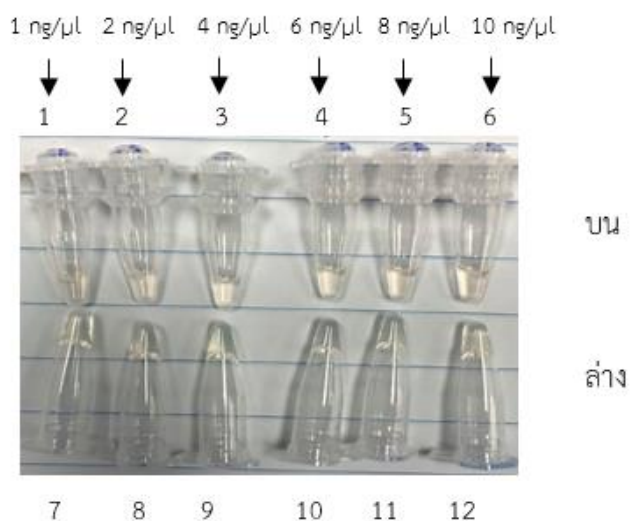
รูปที่ 4. 18 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X

รูปที่ 4.18 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/ $\mu$ l ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 5, 9, 13, 17 และ 21 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 6, 10, 14, 18 และ 22 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอดเนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 3, 7, 11, 15, 19 และ 23 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้น 8 ng/ $\mu$ l (หลอดที่ 19) และ 10 ng/ $\mu$ l (หลอดที่ 23) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว หลอดปฏิกิริยาที่ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้น 8 ng/ $\mu$ l (หลอดที่ 20) และ 10 ng/ $\mu$ l (หลอดที่ 24) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



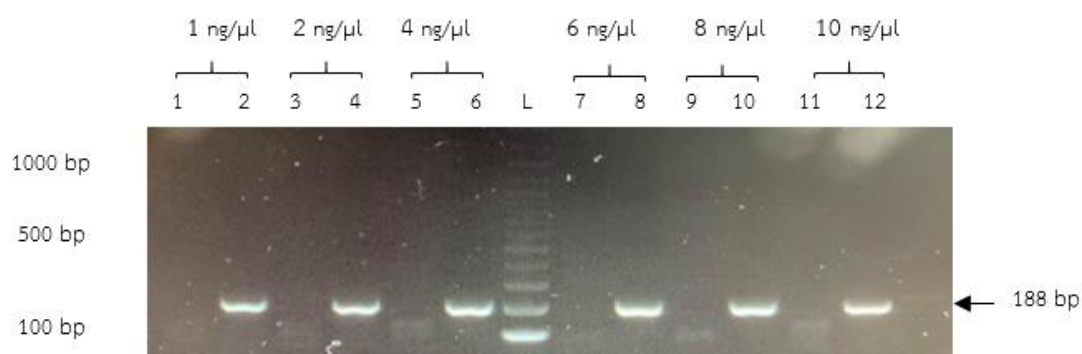
รูปที่ 4. 19 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

รูปที่ 4.19 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAC *gyrB* ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/μl บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 5, 9, 13, 17 และ 21 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2, 6, 10, 14, 18 และ 22 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv เชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 3, 7, 11, 15, 19 และ 23 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นตั้งแต่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/μl (แถวที่ 3, 7, 11, 15, 19 และ 23 ตามลำดับ) แถวที่ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นตั้งแต่ 4, 6, 8 และ 10 ng/μl (แถวที่ 12, 16, 20 และ 24 ตามลำดับ)



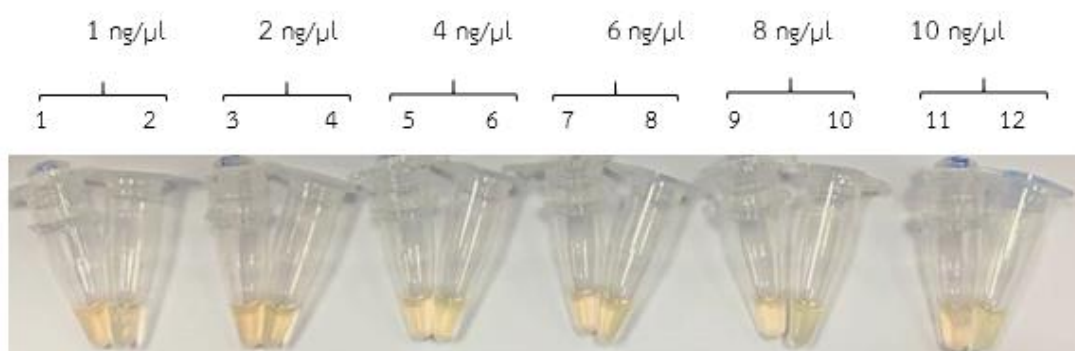
รูปที่ 4. 20 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X

รูปที่ 4.20 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/μl ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นตั้งแต่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/μl (หลอดที่ 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



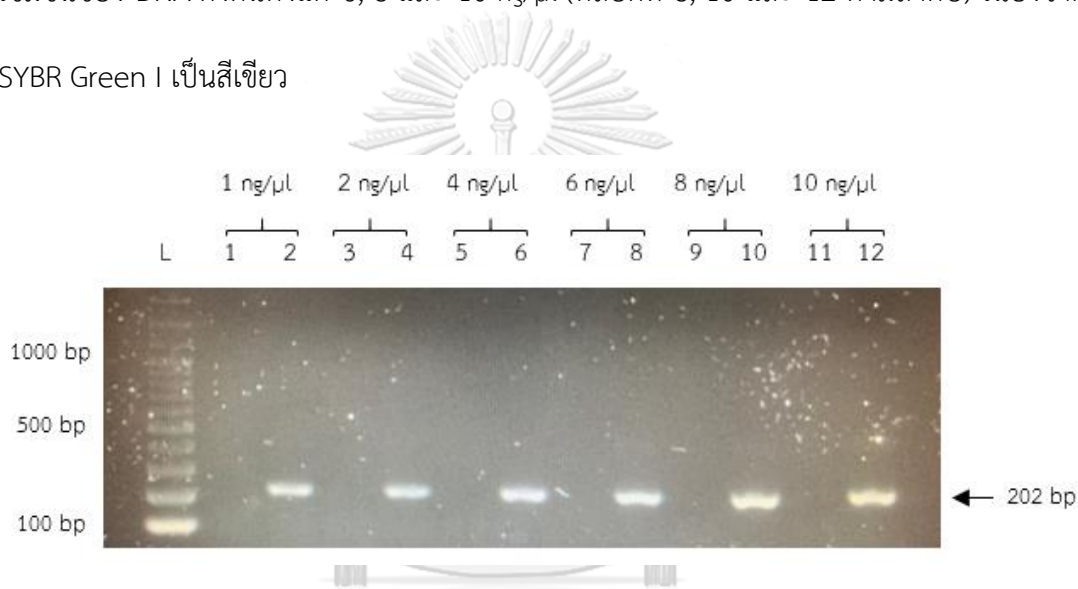
รูปที่ 4. 21 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

รูปที่ 4.21 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAV *gyrB* ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/μl บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาด 188 bp ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นตั้งแต่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/μl (แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ)



รูปที่ 4. 22 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X

รูปที่ 4.22 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/ $\mu$ l ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นตั้งแต่ 6, 8 และ 10 ng/ $\mu$ l (หลอดที่ 8, 10 และ 12 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



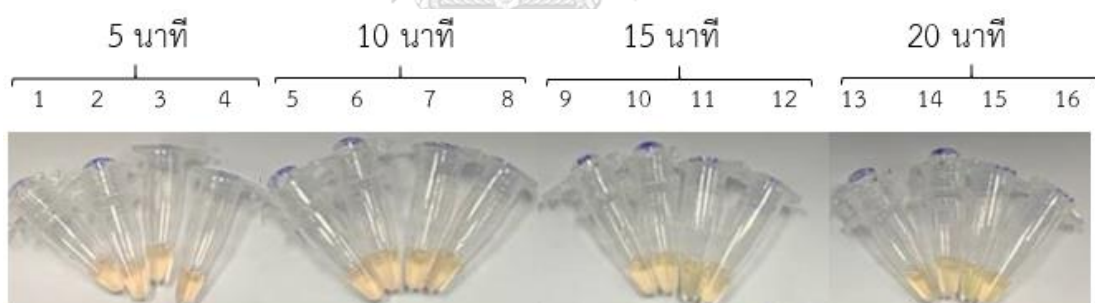
รูปที่ 4. 23 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

รูปที่ 4.23 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/ $\mu$ l บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA

ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาด 202 bp ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นตั้งแต่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ng/ $\mu$ l (แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ)

### 7.3 การทดสอบหาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ทดสอบปฏิกิริยาของ RPA โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ 8  $\mu$ M ความเข้มข้นของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ 4  $\mu$ M และความเข้มข้นของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ 6  $\mu$ M ร่วมกับ และ DNA ต้นแบบที่ให้ผลปฏิกิริยาชัดที่สุดคือ 8 ng/ $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 นาที ตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR green I ความเข้มข้น 375X เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% พบว่าระยะเวลาการทำปฏิกิริยา ที่เหมาะสมเท่ากับ 20 นาที โดยระยะเวลาทำปฏิกิริยา ดังกล่าว ถูกนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

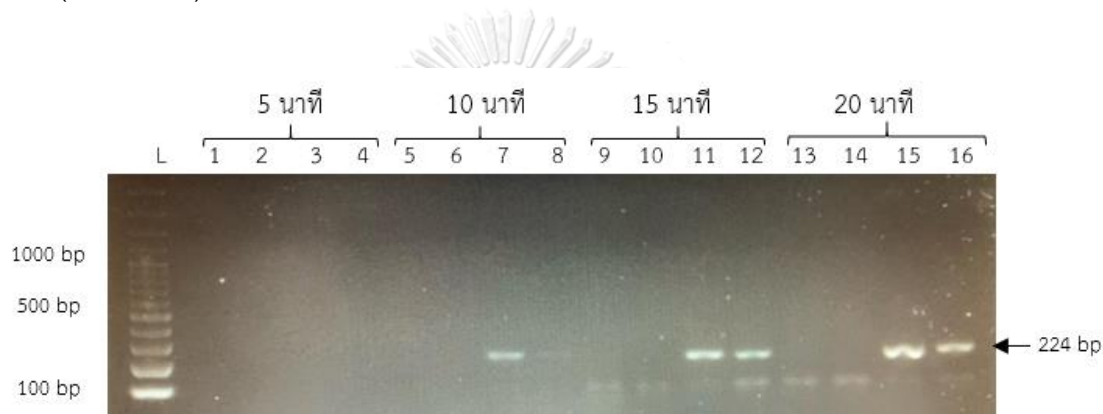


รูปที่ 4.24 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X

รูปที่ 4.24 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 15 และ 20 นาที ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 5, 9 และ 13 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 6, 10 และ 14 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR



Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 3, 7, 11 และ 15 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยีนย่นด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 15 นาที (หลอดที่ 11) และ 20 นาที (หลอดที่ 15) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว หลอดปฏิกิริยาที่ 4, 8, 12 และ 16 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยีนย่นด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 20 นาที (หลอดที่ 16) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว

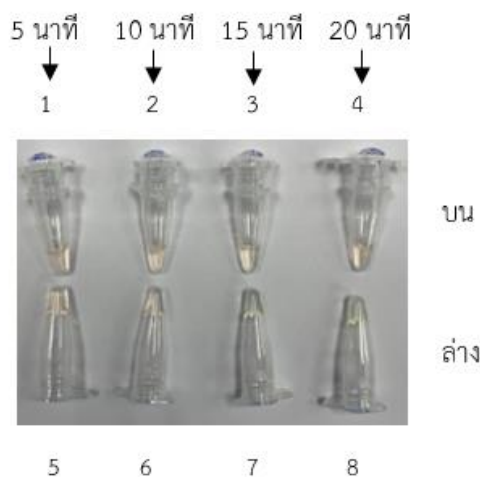


รูปที่ 4. 25 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.25 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 15 และ 20 นาที บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 5, 9 และ 13 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2, 6, 10 และ 14 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 3, 7, 11 และ 15 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยีนย่นด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 10, 15 และ 20 นาที (แถวที่ 7, 11 และ 15 ตามลำดับ) แถวที่ 4, 8, 12 และ 16 คือ ตัวควบคุมบวก

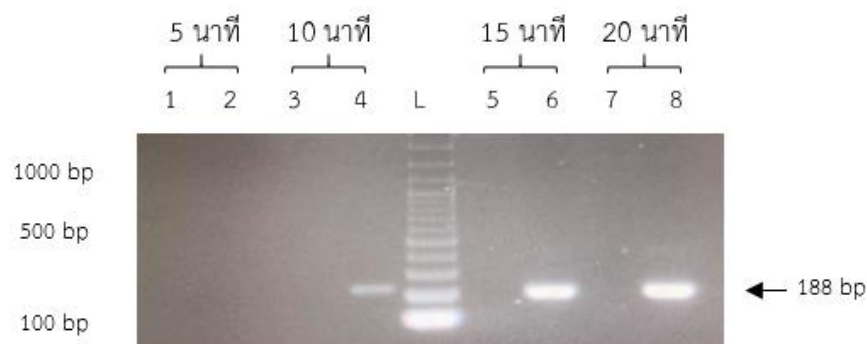
ซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยึดยีนด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 15 และ 20 นาที (แถวที่ 12 และ 16 ตามลำดับ)



รูปที่ 4. 26 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มขึ้น 375X

รูปที่ 4.26 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 15 และ 20 นาที ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ ตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 5, 6, 7 และ 8 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยึดยีนด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 15 นาที (หลอดที่ 7) และ 20 นาที (หลอดที่ 8) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว





รูปที่ 4. 27 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

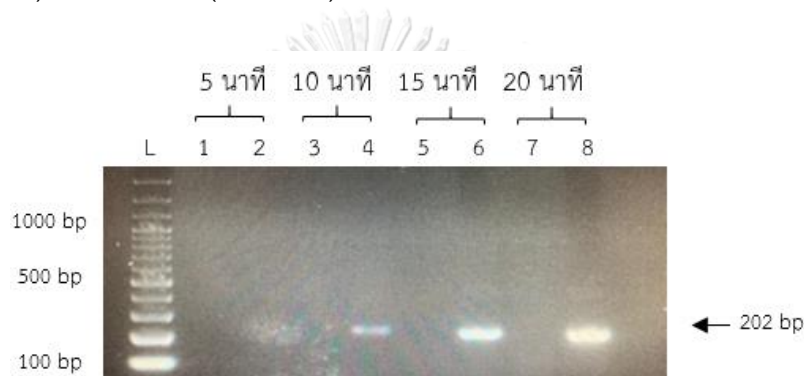
รูปที่ 4.27 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 15 และ 20 นาที บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 3, 5 และ 7 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2, 4, 6 และ 8 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาด 188 bp ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 10, 15 และ 20 นาที (แถวที่ 4, 6 และ 8 ตามลำดับ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4. 28 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X

รูปที่ 4.28 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 15 และ 20 นาที ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 3, 5 และ 7 คือ ตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 4, 6 และ 8 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยีนย่นด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 15 นาที (หลอดที่ 6) และ 20 นาที (หลอดที่ 8) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



รูปที่ 4. 29 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

รูปที่ 4.29 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 15 และ 20 นาที บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 3, 5 และ 7 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2, 4, 6 และ 8 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยีนย่นด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาด 202 bp ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 10, 15 และ 20 นาที (แถวที่ 4, 6 และ 8 ตามลำดับ)

#### 7.4 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

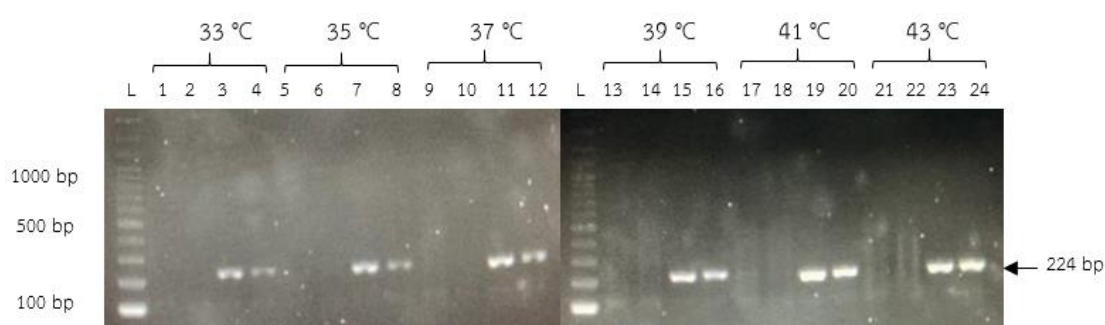
ทดสอบปฏิกิริยาของ RPA โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ 8  $\mu\text{M}$  ความเข้มข้นของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ 4  $\mu\text{M}$  และความเข้มข้นของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ 6  $\mu\text{M}$  ร่วมกับ DNA ต้นแบบที่ให้ผลปฏิกิริยาชัดที่สุดคือ 8 ng/ $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ได้แก่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR green I ความเข้มข้น 375X เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% พบว่าอุณหภูมิการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมเท่ากับ 37  $^{\circ}\text{C}$  โดยอุณหภูมิสำหรับทำปฏิกิริยาดังกล่าว ถูกนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



รูปที่ 4.30 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X

รูปที่ 4.30 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43  $^{\circ}\text{C}$  ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 5, 9, 13, 17 และ 21 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 6, 10, 14, 18 และ 22 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 3, 7, 11, 15, 19 และ 23 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบผลของ

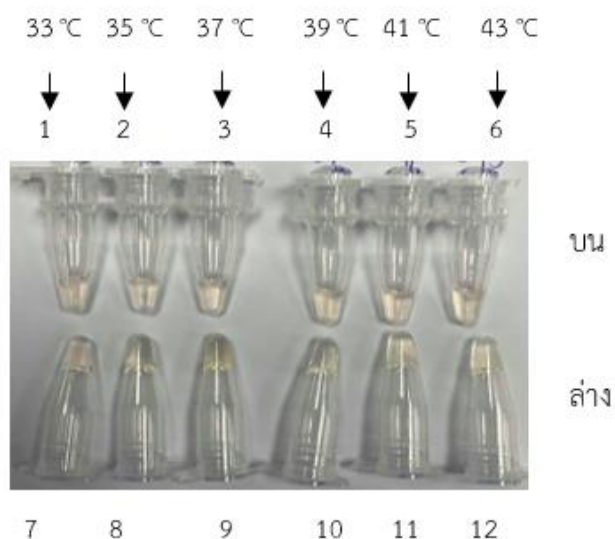
ปฏิกิริยาเป็นบวกที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยา 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C (หลอดที่ 3, 7, 11, 15, 19 และ 23 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว หลอดปฏิกิริยาที่ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยา 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C (หลอดที่ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



รูปที่ 4. 31 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

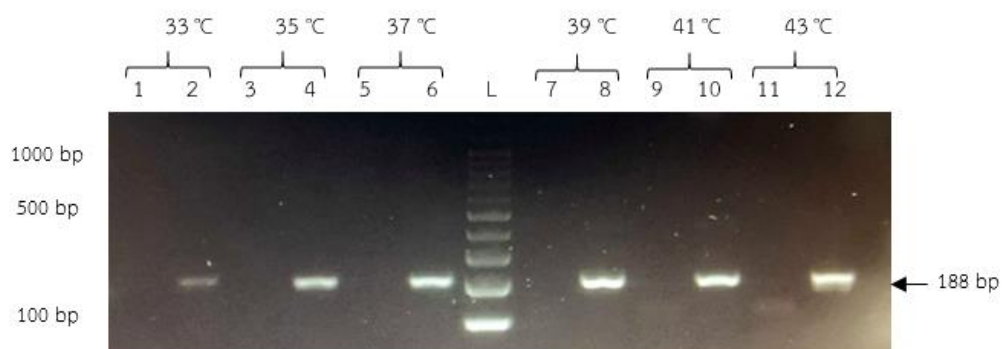
รูปที่ 4.31 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAC *gyrB* ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 5, 9, 13, 17 และ 21 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2, 6, 10, 14, 18 และ 22 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 3, 7, 11, 15, 19 และ 23 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C (แถวที่ 3, 7, 11, 15, 19 และ 23 ตามลำดับ) แถวที่ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วย

วิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยา ตั้งแต่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C (แถวที่ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ตามลำดับ)



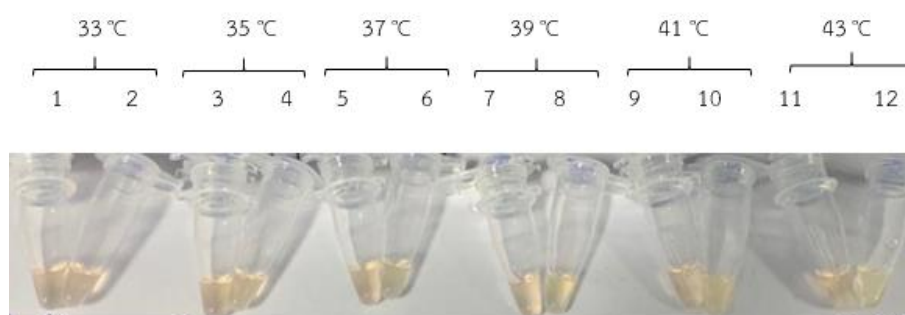
รูปที่ 4. 32 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 375X

รูปที่ 4.32 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยา 35, 37, 39, 41 และ 43 °C (หลอดที่ 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



รูปที่ 4. 33 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

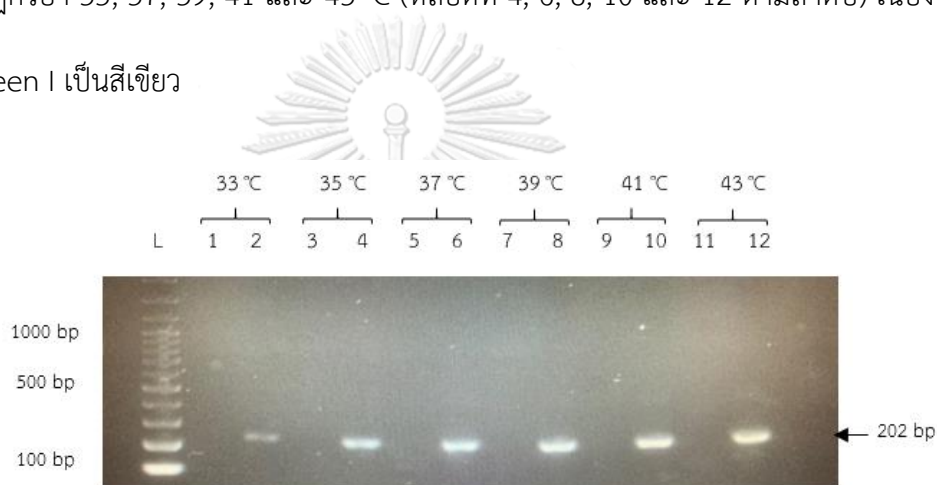
รูปที่ 4.33 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAV *gyrB* ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบแถบผลผลิตขนาด 188 bp ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C (แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ)



รูปที่ 4. 34 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR GreenI ความเข้มข้น 375X



รูปที่ 4.34 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยา 35, 37, 39, 41 และ 43 °C (หลอดที่ 4, 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว

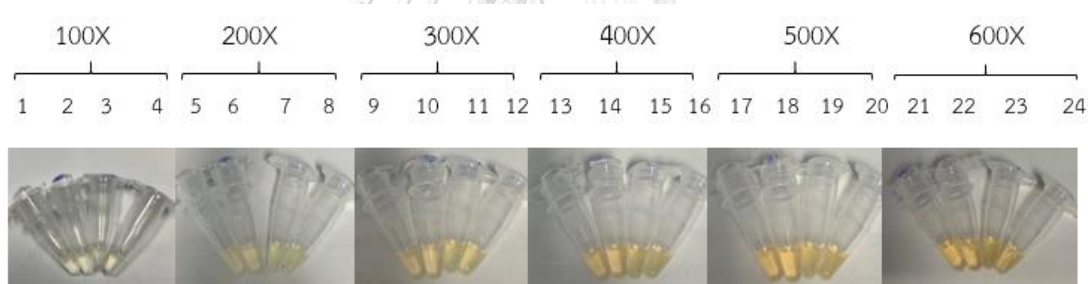


รูปที่ 4.35 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

รูปที่ 4.35 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MIN *gyrB* ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C บน Agarose gel ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบแถบผลผลิตขนาด 202 bp ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 33, 35, 37, 39, 41 และ 43 °C (แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ)

## 7.5 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสี SYBR Green I

ทดสอบปฏิกิริยาของ RPA โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ที่ 8  $\mu\text{M}$  ความเข้มข้นของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ที่ 4  $\mu\text{M}$  และความเข้มข้นของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ 6  $\mu\text{M}$  ร่วมกับ DNA ต้นแบบที่ให้ผลปฏิกิริยาชัดที่สุดคือ 8 ng/ $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นด้วยสี SYBR green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ เท่ากับ 100X, 200X, 300X, 400X, 500X และ 600X เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% พบว่าความเข้มข้นของสี SYBR Green I ที่เหมาะสมเท่ากับ 400X คือให้ผลปฏิกิริยาชัดที่สุด โดยความเข้มข้นของสี SYBR Green I ดังกล่าว ถูกนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

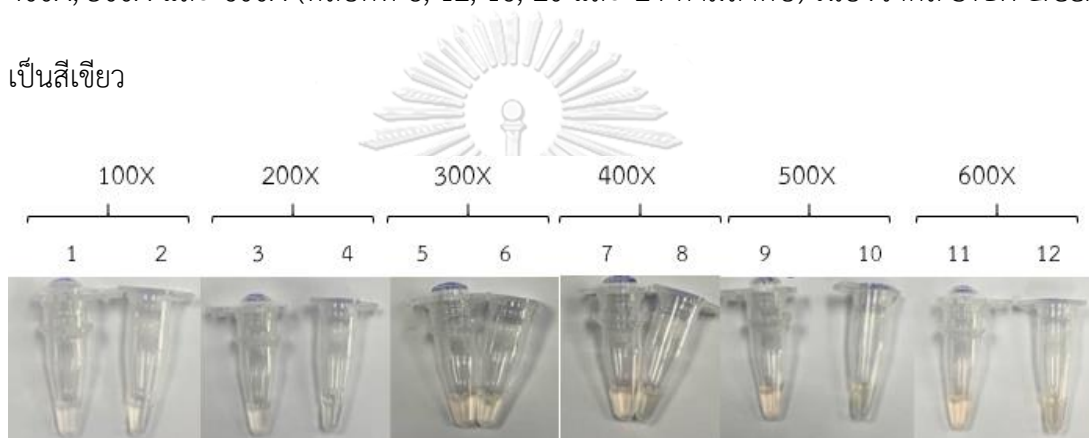


รูปที่ 4.36 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ

รูปที่ 4.36 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 100X, 200X, 300X, 400X, 500X และ 600X ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 5, 9, 13, 17 และ 21 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 6, 10, 14, 18 และ 22 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็น DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้หลอดปฏิกิริยาที่ 3, 7, 11, 15, 19 และ 23 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วย

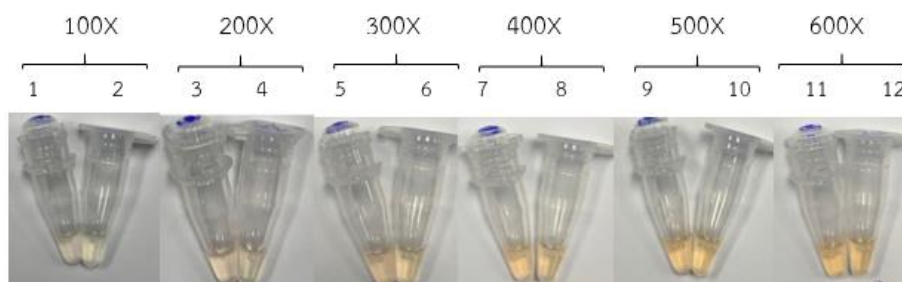


วิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกเมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้น 200X, 300X, 400X, 500X และ 600X (หลอดที่ 7, 11, 15, 19 และ 23 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว หลอดปฏิกิริยาที่ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกเมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้น 200X, 300X, 400X, 500X และ 600X (หลอดที่ 8, 12, 16, 20 และ 24 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



รูปที่ 4. 37 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ

รูปที่ 4.37 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 100X, 200X, 300X, 400X, 500X และ 600X ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกเมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้น 300X และ 400X (หลอดที่ 6 และ 8 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



รูปที่ 4. 38 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ

รูปที่ 4.38 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA กับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 100X, 200X, 300X, 400X, 500X และ 600X ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในทุกหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกเมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ที่ความเข้มข้น 100X, 200X, 300X และ 400X (หลอดที่ 2, 4, 6 และ 8 ตามลำดับ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว

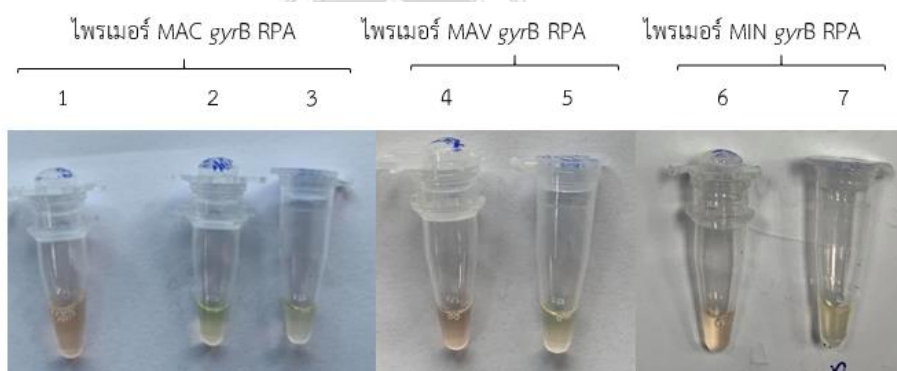
#### 8. สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค RPA/SYBR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC

ภายหลังการพัฒนาเทคนิค RPA/SYBR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC และได้ผลการทดสอบต่างๆตามรายละเอียดในข้อที่ 7 สามารถสรุปส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค RPA/SYBR ได้ ดังที่แสดงในตารางที่ 4.9 ในขณะที่รูปที่ 4.42 และ 4.43 แสดงการอ่านผลของปฏิกิริยา RPA เมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น

400X และ Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ตามลำดับ โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ถูก  
ยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare*

ตารางที่ 4. 9 ส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค RPA/SYBR สำหรับวินิจฉัยเชื้อ MAC

Primer	MAC <i>gyrB</i> RPA	MAV <i>gyrB</i> RPA	MIN <i>gyrB</i> RPA
Primer conc. ( $\mu\text{M}$ )	8	4	6
DNA conc. ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )	8	8	8
Reaction time (min)	20	20	20
Reaction Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	37	37	37
SYBR green I (X)	400	400	400



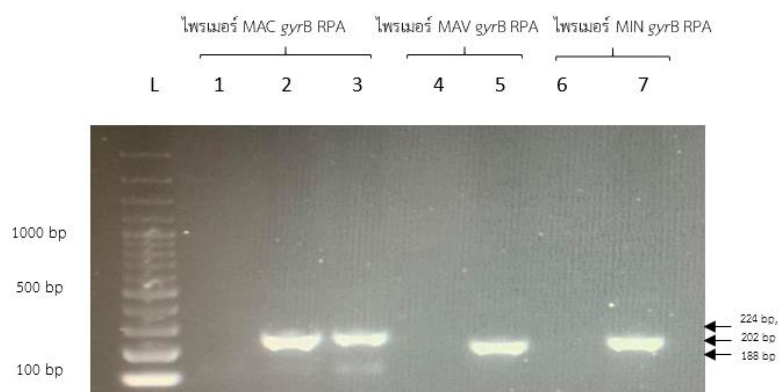
รูปที่ 4. 39 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ *MAC gyrB* RPA ไพรเมอร์ *MAV gyrB* RPA และ ไพรเมอร์ *MIN gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X

จากรูปที่ 4.39 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA ที่มีส่วนประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยาตาม  
ตารางที่ 4.9 ภายหลังจากตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green ความเข้มข้น 400X หลอดปฏิกิริยาที่ 1,  
2 และ 3 ใช้ไพรเมอร์ *MAC gyrB* RPA ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบ

ในหลอดที่ 1 ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม ในขณะที่พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกในหลอดที่ 2 และ 3 ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ได้แก่ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ตามลำดับ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว

หลอดปฏิกิริยาที่ 4 และ 5 ใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในหลอดที่ 4 ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม ในขณะที่พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกในหลอดที่ 5 ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ได้แก่ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว

หลอดปฏิกิริยาที่ 6 และ 7 ใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบในหลอดที่ 6 ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม ในขณะที่พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกในหลอดที่ 7 ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ได้แก่ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



รูปที่ 4. 40 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.40 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่เกิดจากส่วนประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 4.7 ภายหลังจากตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1, 2 และ 3 ใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ไม่พบแถบผลผลิตที่แถวที่ 1 ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ที่แถวที่ 2 และ 3 ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ได้แก่ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ตามลำดับ

แถวที่ 4 และ 5 ใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ไม่พบแถบผลผลิตที่แถวที่ 4 ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) พบแถบผลผลิตขนาด 188 bp ที่แถวที่ 5 ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ได้แก่ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium*

แถวที่ 6 และ 7 ใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ไม่พบแถบผลผลิตที่แถวที่ 6 ซึ่งเป็นตัวควบคุมลบ (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) พบแถบผลผลิตขนาด 202 bp ที่แถว

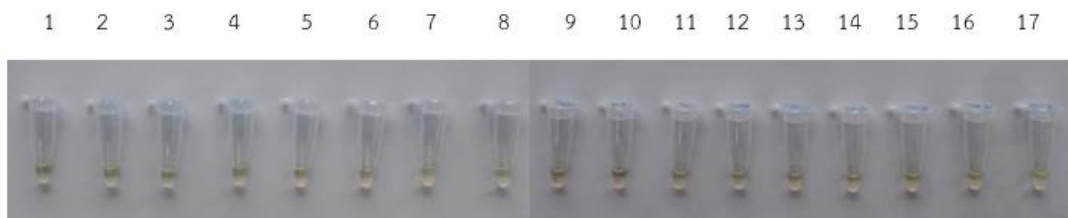
ที่ 7 ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ได้แก่ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare*

## 9. การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค RPA/SYBR

เมื่อนำเทคนิค RPA/SYBR ที่พัฒนาได้ มาทดสอบความจำเพาะกับ DNA ต้นแบบของเชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจาก *M. avium* และ *M. intracellulare* และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น จำนวนทั้งสิ้น 13 สปีชีส์ ได้แก่ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. gordonae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae*, *A. baumannii*, *M. catarrhalis* และ *E. coli* ภายหลังจากตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา RPA ด้วยสี SYBR green I ความเข้มข้น 400X และ Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% พบว่าเทคนิค RPA/SYBR ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross reaction) กับเชื้อทุกสปีชีส์ (ยกเว้นเชื้อ *M. kansasii* และ *M. gordonae*) โดยไม่พบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA กับ DNA ต้นแบบของเชื้อดังกล่าวข้างต้น ทั้งในการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR green I และ Agarose gel electrophoresis

ในขณะที่ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ให้ผลบวกปลอมเมื่อทดสอบกับ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. kansasii* เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ให้ผลบวกปลอมเมื่อทดสอบกับ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. kansasii* และ *M. gordonae* เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis และยังให้ผลบวกปลอมเมื่อทดสอบกับ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. gordonae* เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I รายละเอียดของผลการทดสอบความจำเพาะเทคนิค RPA/SYBR กับ DNA ต้นแบบ

ของเชื้อทั้งหมด 13 สปีชีส์ ที่ถูกตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR green I และ Agarose gel electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 4.41-4.46



รูปที่ 4. 41 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X



รูปที่ 4. 42 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X



รูปที่ 4. 43 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X

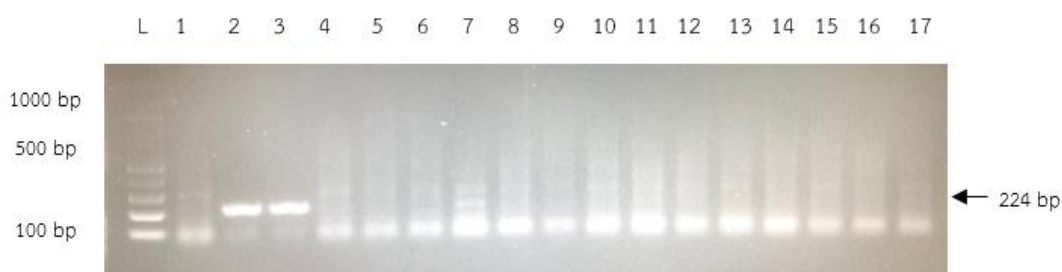
จากรูปที่ 4.41, 4.42 และ 4.43 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA ที่มีไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ ในแต่ละรูปประกอบไปด้วยหลอดปฏิกิริยาที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลอดปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ตามลำดับ หลอดปฏิกิริยาที่ 4-17 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv, *M.*



*abscessus*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. goodii*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* และ *M. catarrhalis* ตามลำดับ

หลอดปฏิกิริยาที่ 1 (ตัวควบคุมลบ) พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 (ตัวควบคุมบวกของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ตามลำดับ) พบผลของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เป็นบวกทั้งในสองหลอด ผลของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA เป็นบวกในหลอดที่มี DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และผลของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ในหลอดที่มี DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* เป็นบวก เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว

หลอดปฏิกิริยาที่ 4-17 พบผลของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ทั้งหมดเป็นลบ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม ยกเว้นหลอดปฏิกิริยาที่ 8 (DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. goodii*) ของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกเนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



รูปที่ 4. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อเมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%





รูปที่ 4. 45 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อเมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%



รูปที่ 4. 46 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อเมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.44, 4.45 และ 4.46 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่มีไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ ในแต่ละรูปประกอบไปด้วย แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2 และ 3 คือ ตัวควบคุมบวกซึ่งเป็น DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ตามลำดับ แถวที่ 4-17 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *M. catarrhalis* และ *M. gordonae* ตามลำดับ

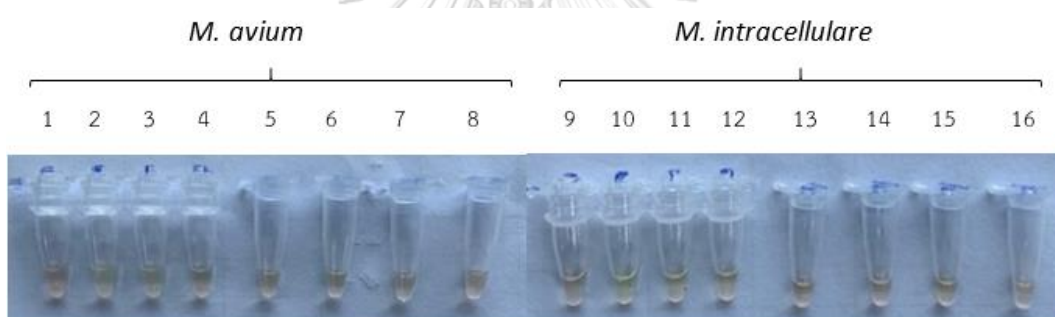
แถวที่ 1 (ตัวควบคุมลบ) ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2 และ 3 (ตัวควบคุมบวกของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ตามลำดับ) พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ทั้งในสองแถว พบแถบผลผลิตขนาด 188 bp ของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ในแถวที่ 2 ที่มี DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และพบแถบผลผลิตขนาด 202 bp ของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ในแถวที่ 3 ที่มี DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare*

แถวที่ 4-17 ไม่พบแถบผลผลิตของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ยกเว้นแถวที่ 7 (DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. kansasii*) ที่สามารถพบแถบของผลผลิตขนาด 224, 188 และ 202 bp ของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ และแถวที่ 17 (DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. gordonae*) พบแถบของผลผลิตขนาด 202 bp ของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ไพรเมอร์

#### 10. การทดสอบความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดที่เทคนิค RPA/SYBR สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC

เมื่อนำเทคนิค RPA/SYBR มาทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุด หรือ Limit of detection (LOD) ที่เทคนิคดังกล่าวสามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ได้ โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นลำดับ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นของ DNA เท่ากับ 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng/ $\mu$ l และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำปฏิกิริยา RPA ด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA และตรวจสอบ

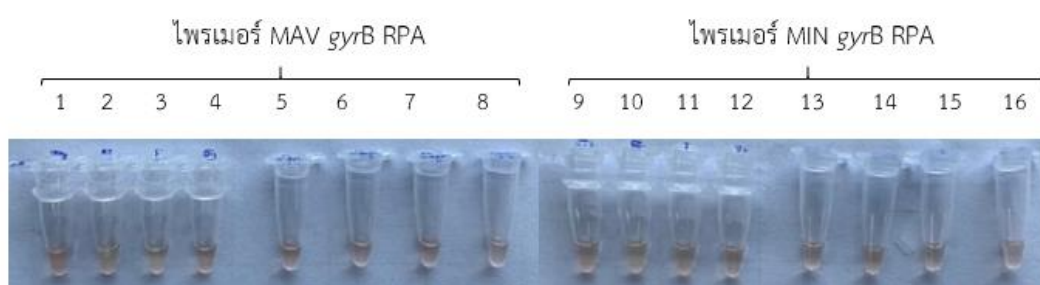
ผลผลิตด้วยสี SYBR green I ความเข้มข้น 400X และ Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA ต้นแบบของทั้งเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ด้วยเทคนิค RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เทคนิคดังกล่าวมีค่า LOD เท่ากับ 10, 1 และ 1 ng/ $\mu$ l เมื่อทดสอบกับ ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ (รูปที่ 4.50 และ 4.51) ในขณะที่เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% เทคนิคดังกล่าวมีค่า LOD เท่ากับ 1, 0.1 และ 0.1 ng/ $\mu$ l เมื่อทดสอบกับ ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ (รูปที่ 4.52 และ 4.53)



รูปที่ 4. 47 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X

จากรูปที่ 4.50 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA ที่มีไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA หลอดปฏิกิริยาที่ 1 และ 9 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลอดปฏิกิริยาที่ 2-8 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ในขณะที่หลอดปฏิกิริยาที่ 10-16 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ

หลอดปฏิกิริยาที่ 1 และ 9 (ตัวควบคุมลบ) พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ความเข้มข้น 10 ng/ $\mu$ l และหลอดปฏิกิริยาที่ 10 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ความเข้มข้น 10 ng/ $\mu$ l พบผลของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เป็นบวกทั้งในสองหลอด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว ดังนั้นค่า LOD ของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เมื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* มีค่าเท่ากับ 10 ng/ $\mu$ l เมื่อตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ในขณะที่หลอดปฏิกิริยาที่ 3-8 และหลอดปฏิกิริยาที่ 11-16 พบผลของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เป็นลบ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม

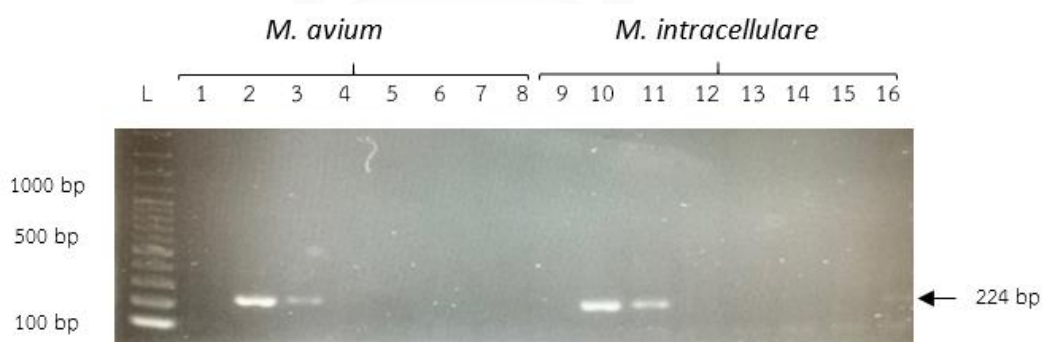


รูปที่ 4. 48 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดของไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X

จากรูปที่ 4.51 แสดงหลอดปฏิกิริยา RPA ที่มีไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA (หลอดปฏิกิริยาที่ 1-8) และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA (หลอดปฏิกิริยาที่ 10-16) หลอดปฏิกิริยาที่ 1 และ 9 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลอดปฏิกิริยาที่ 2-8 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ในขณะที่หลอดปฏิกิริยาที่ 10-16 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธี

หาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng/μl ตามลำดับ

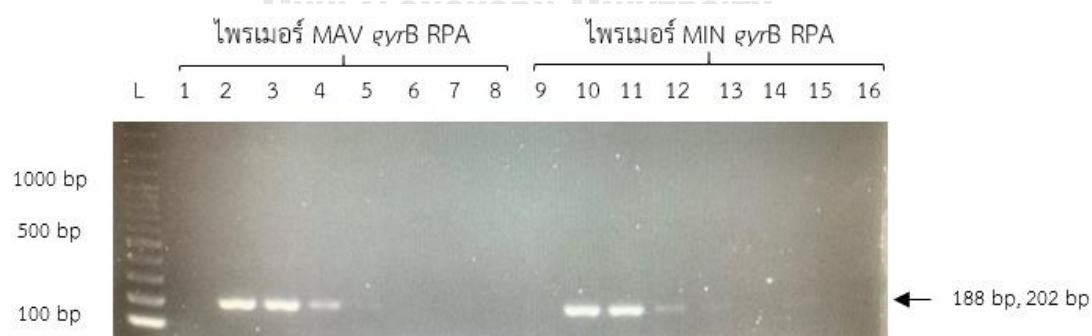
หลอดปฏิกิริยาที่ 1 และ 9 (ตัวควบคุมลบ) พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ความเข้มข้น 10 และ 1 ng/μl ตามลำดับ และหลอดปฏิกิริยาที่ 10 และ 11 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ความเข้มข้น 10 และ 1 ng/μl ตามลำดับ พบผลของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เป็นบวก เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว ดังนั้นค่า LOD ของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ MIN *gyrB* RPA เมื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 1 ng/μl เมื่อตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ในขณะที่หลอดปฏิกิริยาที่ 4-8 และหลอดปฏิกิริยาที่ 12-16 พบผลของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เป็นลบ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม



รูปที่ 4. 49 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.49 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่มีไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 และ 9 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2-8 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ในขณะที่แถวที่ 10-16 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ

แถวที่ 1 และ 9 (ตัวควบคุมลบ) ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2 และ 3 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ความเข้มข้น 10 และ 1 ng/ $\mu$ l และแถวที่ 10 และ 11 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ความเข้มข้น 10 และ 1 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp ของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ดังนั้น ค่า LOD ของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เมื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* มีค่าเท่ากับ 1 ng/ $\mu$ l เมื่อตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ในขณะที่แถวที่ 4-8 และแถวที่ 12-16 ไม่พบแถบผลผลิตของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA



รูปที่ 4. 50 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่น้อยที่สุดของไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.50 แสดงแถบของผลผลิตปฏิกิริยา RPA ที่มีไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA (แถวที่ 1-8) และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA (แถวที่ 10-16) แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 และ 9 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 2-8 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ในขณะที่แถวที่ 10-16 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ

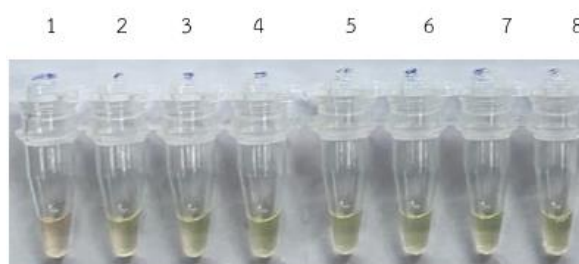
แถวที่ 1 และ 9 (ตัวควบคุมลบ) ไม่พบแถบผลผลิตของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ แถวที่ 2-4 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* ความเข้มข้น 10, 1, 0.1 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาด 188 bp ของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ในขณะที่แถวที่ 5-8 ไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 10-12 คือ DNA ต้นแบบที่ถูกยืนยันด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. intracellulare* ความเข้มข้น 10, 1, 0.1 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ พบแถบผลผลิตขนาด 202 bp ของปฏิกิริยาของไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ในขณะที่แถวที่ 13-16 ไม่พบแถบผลผลิต ดังนั้นค่า LOD ของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ MIN *gyrB* RPA เมื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 0.1 ng/ $\mu$ l เมื่อตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

#### 11. การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR

นำ DNA ต้นแบบของเชื้อกลุ่ม MAC จำนวน 120 ตัวอย่าง ที่ผ่านการจำแนกสปีชีส์ด้วยการหาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing มาวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ด้วยเทคนิค RPA/SYBR ที่ถูกพัฒนาขึ้น ดำเนินปฏิกิริยา RPA ด้วยชุดน้ำยา RPA TwistAmp® Basic ตามคำแนะนำของ



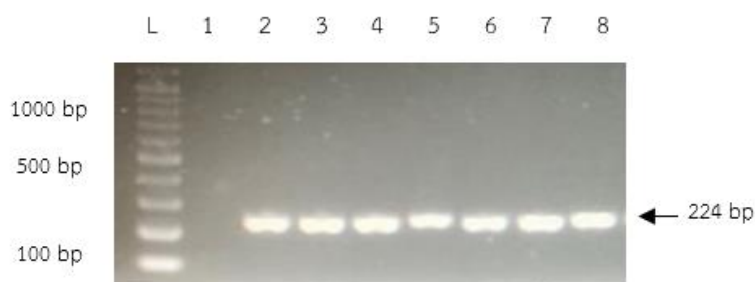
บริษัทผู้ผลิต โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ความเข้มข้นอย่างละ 8, 4 และ 6  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ ใช้ DNA ต้นแบบความเข้มข้น 8 ng/ $\mu\text{l}$  ผสมกับชุดน้ำยา RPA และใช้ส่วนประกอบของปฏิกิริยา RPA/SYBR ตามที่แสดงในตารางที่ 4.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 20 นาที โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ถูกยีนย่นด้วยวิธีหาลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบของปฏิกิริยา เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา RPA ทำการตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยสี SYBR green I ความเข้มข้น 400X และอ่านผลทันที บันทึกผลที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบการอ่านผลด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%



รูปที่ 4. 51 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X

จากรูปที่ 4.51 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบผลของปฏิกิริยาเป็นลบเนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2-8 คือ ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ MAC พบผลของปฏิกิริยาเป็นบวกทั้งหมด เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว





รูปที่ 4. 52 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.52 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2-8 คือ ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ MAC พบแถบผลผลิตขนาด 224 bp

ผลการทดสอบพบว่า เมื่อทำเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อได้ทั้งหมด 119 ตัวอย่าง ในขณะที่เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อได้ทั้งหมด 120 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4. 10 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เปรียบเทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis

ผลการตรวจเมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วย ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA	ตัวอย่างที่ให้ผลบวก	ตัวอย่างที่ให้ผลลบ	รวม
ตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X	119	1	120
ตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%	120	0	120



รูปที่ 4. 53 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X

จากรูปที่ 4.53 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ผลของปฏิกิริยาเป็นลบ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2-8 คือ ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ MAC พบว่า หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 4, 5, 6 และ 7 ให้ผลของปฏิกิริยาเป็นลบ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม ขณะที่หลอดปฏิกิริยาที่ 3 และ 8 ให้ผลของปฏิกิริยาเป็นบวก เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



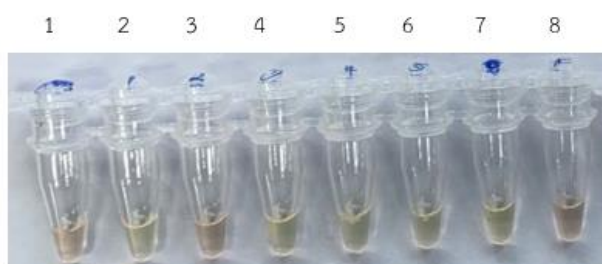
รูปที่ 4. 54 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.54 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2-8 คือ ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ MAC ในแถวที่ 2, 4, 5, 6 และ 7 ไม่พบแถบผลผลิต ขณะที่แถวที่ 3 และ 8 พบแถบผลผลิตขนาด 188 bp

ผลการทดสอบพบว่า เมื่อทำเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อได้ทั้งหมด 46 ตัวอย่าง ในขณะที่เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อได้ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4. 11 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เปรียบเทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis

ผลการตรวจเมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วย ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA	ตัวอย่างที่ให้ผลบวก	ตัวอย่างที่ให้ผลลบ	รวม
ตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X	46	74	120
ตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%	53	67	120



รูปที่ 4. 55 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X

CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากรูปที่ 4.55 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ในหลอดปฏิกิริยาที่ 1 คือ ตัวควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ผลของปฏิกิริยาเป็นลบ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม หลอดปฏิกิริยาที่ 2-8 คือ ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ MAC พบว่า หลอดปฏิกิริยาที่ 3 และ 8 ให้ผลของปฏิกิริยาเป็นลบ เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีส้ม ขณะที่หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 4, 5, 6 และ 7 ให้ผลของปฏิกิริยาเป็นบวก เนื่องจากสี SYBR Green I เป็นสีเขียว



รูปที่ 4. 56 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

จากรูปที่ 4.56 แสดงผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MIN *gyrB* ด้วยปฏิกิริยา RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ ตัวควบคุมซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งไม่พบแถบผลผลิต แถวที่ 2-8 คือ ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ MAC ในแถวที่ 3 และ 8 ไม่พบแถบผลผลิต ขณะที่แถวที่ 2, 4, 5, 6 และ 7 พบแถบผลผลิตขนาด 202 bp

ผลการทดสอบพบว่า เมื่อทำเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ ได้ทั้งหมด 75 ตัวอย่าง ในขณะที่เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อได้ทั้งหมด 78 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4. 12 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ MAC เมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วยไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เปรียบเทียบกับการตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis

ผลการตรวจเมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วย ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA	ตัวอย่างที่ให้ผลบวก	ตัวอย่างที่ให้ผลลบ	รวม
ตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X	75	45	120
ตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%	78	42	120

ผลการวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X ด้วยการแปลผลไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA พร้อมกัน พบว่า มี DNA จำนวน 40 ตัวอย่าง ที่สามารถแปลผลเป็นเชื้อ *M. avium* ขณะที่ มี DNA จำนวน 70 ตัวอย่าง ที่สามารถแปลผลเป็นเชื้อ *M. intracellulare* มี DNA จำนวน 4 ตัวอย่าง ที่สามารถแปลผลเป็นเชื้อในกลุ่ม MAC สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจาก *M. avium* และ *M. intracellulare* นอกจากนี้ยังมี DNA จำนวนอีก 6 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถแปลผลได้ตามรายละเอียดในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4. 13 การแปลผลเพื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X

ผลการตรวจเมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วยไพรเมอร์ต่างๆ และตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ความเข้มข้น 400X			การแปลผล	จำนวน (ตัวอย่าง)
ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA	ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA	ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA		
บวก	บวก	ลบ	ตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>M. avium</i>	40
บวก	ลบ	บวก	ตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>M. intracellulare</i>	70
บวก	ลบ	ลบ	ตรวจพบ DNA ของเชื้อในกลุ่ม MAC สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจาก <i>M. avium</i> และ <i>M. intracellulare</i>	4
บวก	บวก	บวก	ไม่สามารถแปลผลได้	5
ลบ	บวก	ลบ	ไม่สามารถแปลผลได้	1
รวม				120

ผลการวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ด้วยการแปลผลไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ ไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA พร้อมกัน พบว่า มี DNA จำนวน 41 ตัวอย่างที่สามารถแปลผลเป็นเชื้อ *M. avium* ขณะที่ มี DNA จำนวน 66 ตัวอย่าง ที่สามารถแปลผลเป็นเชื้อ *M. intracellulare* มี DNA จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่สามารถแปลผลเป็นเชื้อในกลุ่ม MAC สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจาก *M. avium* และ *M. intracellulare* นอกจากนี้ยังมี DNA จำนวนอีก 12 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถแปลผลได้ ตามรายละเอียดในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4. 14 การแปลผลเพื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

ผลการตรวจเมื่อทำปฏิกิริยา RPA ด้วยไพรเมอร์ต่างๆ และตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%			การแปลผล	จำนวน (ตัวอย่าง)
ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA	ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA	ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA		
บวก	บวก	ลบ	ตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>M. avium</i>	41
บวก	ลบ	บวก	ตรวจพบ DNA ของเชื้อ <i>M. intracellulare</i>	66
บวก	ลบ	ลบ	ตรวจพบ DNA ของเชื้อในกลุ่ม MAC สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจาก <i>M. avium</i> และ <i>M. intracellulare</i>	1
บวก	บวก	บวก	ไม่สามารถแปลผลได้	12
รวม				120

12. การคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค RPA/SYBR และการคำนวณค่าความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยสถิติ Kappa

ภายหลังการวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC จำนวน 120 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RPA ที่ถูกตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I (RPA/SYBR) และเทคนิค Agarose gel electrophoresis (RPA/AGE) นำผลการจำแนกที่ได้จากการตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิคดังกล่าวทั้งสองมาเปรียบเทียบกัน และเปรียบเทียบกับผลการจำแนกสปีชีส์ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางอณูชีววิทยา และเทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่นิยมใช้ทั่วไป เพื่อ



คำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% ผลของการเปรียบเทียบทั้งหมดดังกล่าว ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 4.15 – 4.19

ตารางที่ 4. 15 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบเทคนิค RPA/AGE

ผลการทดสอบด้วย เทคนิค RPA/SYBR	ผลการทดสอบด้วย เทคนิค RPA/AGE		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	บวก	ลบ					
ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA							
บวก	119	0	99.2%	-*	100%	-*	-*
ลบ	1	0	(95.4-99.8)		(-*)		
ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA							
บวก	46	0	86.8%	100%	100%	90.5%	0.880
ลบ	7	67	(74.7-94.5)	(94.6-100)	(-*)	(82.8- 95.0)	(0.794- 0.966)
ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA							
บวก	75	0	96.2%	100%	100%	93.3%	0.946
ลบ	3	42	(89.2-99.2)	(91.6-100)	(-*)	(82.2- 97.7)	(0.886-1.000)

\* หมายถึง ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 4.15 เมื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ MAC ด้วยปฏิกิริยา RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis พบว่าเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เทคนิค RPA/SYBR ให้ผลลบปลอม 1 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 99.2% (95% CI: 95.4-99.8) และค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% (95% CI: -) ในขณะที่ไม่สามารถคำนวณค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ได้

เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA เทคนิค RPA/SYBR ให้ผลลบปลอม 7 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 86.8% (95% CI: 74.7-94.5) ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% (95% CI: 94.6-

100) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% (95% CI: -) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 90.5% (95% CI: 82.8-95.0) และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.880 (95% CI: 0.794- 0.966)

เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เทคนิค RPA/SYBR ให้ผลลบปลอม 3 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 96.2% (95% CI: 89.2-99.2) ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% (95% CI: 91.6-100) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% (95% CI: -) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 93.3% (95% CI: 82.2-97.7) และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.946 (95% CI: 0.886-1.000)

จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมากทั้งคู่ (สถิติ Kappa มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81-1.00)

ตารางที่ 4. 16 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

ผลการทดสอบด้วย เทคนิค RPA/SYBR	ผลการทดสอบด้วย เทคนิค Sanger DNA sequencing		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	พบเชื้อ	ไม่พบเชื้อ					
	ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA						
พบเชื้อ	119	0	99.2%	-*	100%	-*	-*
ไม่พบเชื้อ	1	0	(95.4-99.8)		(-*)		
ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA							
พบเชื้อ	40	6	100%	92.5%	87.0%	100%	0.892
ไม่พบเชื้อ	0	74	(91.2-100)	(84.4-97.2)	(75.5-93.5)	(-*)	(0.807-0.976)
ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA							
พบเชื้อ	57	18	98.3%	71.0%	76.0%	97.8%	0.686
ไม่พบเชื้อ	1	44	(90.8-100)	(58.1-81.8)	(68.2-82.4)	(86.2-99.7)	(0.562-0.810)

\* หมายถึง ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 4.16 เมื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ MAC ด้วยปฏิกิริยา RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เปรียบเทียบกับ เทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เทคนิค RPA/SYBR ให้ผลลบปลอม 1 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 99.2% (95% CI: 95.4-99.8) และค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% (95% CI: -) ในขณะที่ไม่สามารถคำนวณค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ได้

เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA เทคนิค RPA/SYBR ให้ผลบวกปลอม 6 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 100% (95% CI: 91.2-100) ค่าความจำเพาะเท่ากับ 92.5 (95% CI: 84.4-97.2) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 87.0% (95% CI: 75.5-93.5) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100% (95% CI: -) และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.892 (95% CI: 0.807-0.976)

เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เทคนิค RPA/SYBR ให้ผลลบปลอม 1 ตัวอย่าง และให้ผลบวกปลอม 18 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 98.3% (95% CI: 90.8-100) ค่าความจำเพาะเท่ากับ 71.0% (95% CI: 58.1-81.8) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 76.0% (95% CI: 68.2-82.4) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 97.8% (95% CI: 86.2-99.7) และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.686 (95% CI: 0.562-0.810)

จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค Sanger DNA sequencing เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81-1.00) และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดี (สถิติ Kappa มีค่าอยู่ระหว่าง 0.61-0.80)

ตารางที่ 4. 17 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

ผลการทดสอบด้วยเทคนิค RPA/AGE	ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing		ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนายผลบวก (95% CI)	ค่าทำนายผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	พบเชื้อ	ไม่พบเชื้อ					
	ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA						
พบเชื้อ	120	0	100%	-*	100%	-*	-*
ไม่พบเชื้อ	0	0	(97.0-100)		(-*)		
ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA							
พบเชื้อ	40	13	100%	83.8%	75.5%	100%	0.775
ไม่พบเชื้อ	0	67	(91.2-100)	(73.8-91.1)	(65.2-83.5)	(-*)	(0.662-0.887)
ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA							
พบเชื้อ	58	20	100%	67.7%	74.4%	100%	0.670
ไม่พบเชื้อ	0	42	(93.8-100)	(54.7-79.1)	(66.9-80.6)	(-*)	(0.675-0.795)

\* หมายถึง ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 4.17 เมื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ MAC ด้วยปฏิกิริยา RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เทคนิค RPA/AGE มีค่าความไวเท่ากับ 100% (95% CI: 97.0-100) และค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% (95% CI: -) ในขณะที่ไม่สามารถคำนวณค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ได้

เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA เทคนิค RPA/AGE ให้ผลบวกปลอม 13 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 100% (95% CI: (91.2-100) ค่าความจำเพาะเท่ากับ 83.8% (95% CI: 73.8-91.1) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 75.5% (95% CI: 65.2-83.5) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100% (95% CI: -) และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.775 (95% CI: 0.662-0.887)

เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เทคนิค RPA/AGE ให้ผลบวกปลอม 17 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 100% (95% CI: (93.8-100) ค่าความจำเพาะเท่ากับ 67.7% (95% CI: 54.7-79.1) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 74.4% (95% CI: 66.9-80.6) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100% (95% CI: -) และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.670 (95% CI: 0.675-0.795)

จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/AGE และเทคนิค Sanger DNA sequencing เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีทั้งคู่ (สถิติ Kappa มีค่าอยู่ระหว่าง 0.61-0.80)

ตารางที่ 4. 18 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/SYBR เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR

ผลการทดสอบด้วย เทคนิค RPA/SYBR	ผลการทดสอบด้วย เทคนิค PCR		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	พบเชื้อ	ไม่พบเชื้อ					
ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA							
พบเชื้อ	119	0	99.2%	-*	100%	-*	-*
ไม่พบเชื้อ	1	0	(95.4-99.8)		(-*)		
ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA							
พบเชื้อ	40	6	97.6%	92.4%	87.0%	98.7%	0.874
ไม่พบเชื้อ	1	73	(87.1-99.9)	(84.2-97.2)	(75.5-93.5)	(91.3-99.8)	(0.784-0.964)
ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA							
พบเชื้อ	69	6	93.2%	87.0%	92.0%	88.9%	0.805
ไม่พบเชื้อ	5	40	(84.9-97.8)	(73.7-95.1)	(84.5-96.1)	(77.3-95.0)	(0.696-0.815)

\* หมายถึง ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 4.18 เมื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ MAC ด้วยปฏิกิริยา RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่าเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เทคนิค RPA/SYBR ให้ผลลบปลอม 1 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 99.2% (95% CI: 95.4-99.8) และค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% (95% CI: -) ในขณะที่ไม่สามารถคำนวณค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ได้

เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA เทคนิค RPA/SYBR ให้ผลลบปลอม 1 ตัวอย่าง และให้ผลบวกปลอม 6 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 97.6% (95% CI: 87.1-99.9) ค่าความจำเพาะเท่ากับ 92.4% (95% CI: 84.2-97.2) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 87.0% (95% CI: 75.5-93.5) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 98.7% (95% CI: 91.3-99.8) และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.874 (95% CI: 0. 0.784-0.964)

เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เทคนิค RPA/SYBR ให้ผลลบปลอม 5 ตัวอย่าง และให้ผลบวกปลอม 6 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 93.2% (95% CI: 84.9-97.8) ค่าความจำเพาะเท่ากับ 87.0% (95% CI: 73.7-95.1) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 92.0% (95% CI: 84.5-96.1) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 88.9% (95% CI: 77.3-95.0) และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.805 (95% CI: 0.696-0.815)

จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค PCR เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมากทั้งคู่ (สถิติ Kappa มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81-1.00)

ตารางที่ 4. 19 ความสัมพันธ์ของเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR

ผลการทดสอบด้วย เทคนิค RPA/AGE	ผลการทดสอบด้วย เทคนิค PCR		ความไว (95% CI)	ความ จำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	พบเชื้อ	ไม่พบเชื้อ					
ไพรเมอร์ MAC <i>gyrB</i> RPA							
พบเชื้อ	120	0	100%	-*	100%	-*	-*
ไม่พบเชื้อ	0	0	(97.0-100)		(-)		
ไพรเมอร์ MAV <i>gyrB</i> RPA							
พบเชื้อ	40	13	97.6%	83.5%	75.5%	98.5%	0.758
ไม่พบเชื้อ	1	66	(87.1-99.9)	(73.5-90.9)	(65.1-83.5)	(90.5-99.8)	(0.641-0.874)
ไพรเมอร์ MIN <i>gyrB</i> RPA							
พบเชื้อ	72	6	97.3%	87.0%	92.3%	95.2%	0.857
ไม่พบเชื้อ	2	40	(90.6-99.7)	(73.7-95.1)	(85.0-96.2)	(83.5-98.6)	(0.761-0.952)

\* หมายถึง ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 4.19 เมื่อวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ MAC ด้วยปฏิกิริยา RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่าเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เทคนิค RPA/AGE มีค่าความไวเท่ากับ 100% (95% CI: 97.0-100) และค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% (95% CI: -) ในขณะที่ไม่สามารถคำนวณค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ได้

เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA เทคนิค RPA/AGE ให้ผลลบปลอม 1 ตัวอย่าง และให้ผลบวกปลอม 13 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 97.6% (95% CI: (87.1-99.9) ค่าความจำเพาะเท่ากับ 83.5% (95% CI: 73.5-90.9) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 75.5% (95% CI: 65.1-83.5) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 98.5% (95% CI: 90.5-99.8) และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.758 (95% CI: 0.641-0.874)

เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA เทคนิค RPA/AGE ให้ผลลบปลอม 2 ตัวอย่าง และให้ผลบวกปลอม 6 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 97.3% (95% CI: (90.6-99.7) ค่าความจำเพาะ

เท่ากับ 87.0% (95% CI: 73.7-95.1) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 92.3% (95% CI: 85.0-96.2) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 95.2% (95% CI: 83.5-98.6) และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.857 (95% CI: 0.761-0.952)

จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า การวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA/AGE และเทคนิค PCR เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดี (สถิติ Kappa มีค่าอยู่ระหว่าง 0.61-0.80) และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81-1.00)

### 13. ผลการวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium*, *M. intracellulare* และเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE เปรียบเทียบกับเทคนิคการหาลำดับเบส และเทคนิค PCR

เมื่อนำผลจากการวินิจฉัยเชื้อจำนวน 120 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค PCR เทคนิคการหาลำดับเบส เทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE ตามรายละเอียดในตารางที่ 4.5, 4.6, 4.12 และ 4.13 ตามลำดับ มาเปรียบเทียบกัน ได้รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4. 20 ผลเปรียบเทียบการวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium*, *M. intracellulare* และเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบส เทคนิค PCR เทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE

การแปลผล/เทคนิค	การหาลำดับเบส	PCR	RPA/SYBR	RPA/AGE
<i>M. avium</i>	40	39	40	41
<i>M. intracellulare</i>	58	74	70	66
MAC	22	6	4	1
แปลผลไม่ได้	0	1	6	12
รวม	120	120	120	120



ตารางที่ 4. 21 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ของเทคนิคต่างๆ เมื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium*

ผลการทดสอบ/ เทคนิค	RPA/SYBR เปรียบเทียบกับ RPA/AGE	RPA/SYBR เปรียบเทียบกับ การหาลำดับ เบส	RPA/AGE เปรียบเทียบกับ การหาลำดับ เบส	RPA/SYBR เปรียบเทียบกับ PCR	RPA/AGE เปรียบเทียบกับ PCR
ความไว	97.6% (87.1-99.9)	100% (91.2-100)	100% (91.2-100)	100% (91.0-100)	100% (91.0-100)
ความจำเพาะ	100% (95.4-100)	100% (95.5-100)	98.8% (93.2-99.8)	98.8% (93.3-100)	97.5% (91.4-99.7)
ค่าทำนาย ผลบวก	100% (-*)	100% (-*)	97.6% (85.1-99.6)	97.5% (84.8-99.6)	95.1% (83.2-98.7)
ค่าทำนายผลลบ	98.8% (91.9-99.8)	100% (-*)	100% (-*)	100% (-*)	100% (-*)
ค่าสถิติ Kappa	0.981 (0.945-1.000)	1.000 (-*)	0.981 (0.945-1.000)	0.981 (0.944-1.000)	0.963 (0.911-1.000)

\* หมายถึง ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 4.21 การวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium* ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคต่างๆ พบค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ และสถิติ Kappa ดังนี้

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/SYBR กับเทคนิค RPA/AGE มีค่า 97.6% (95% CI: 87.1-99.9), 100% (95% CI: 95.4-100), 100% (95% CI: -) และ 98.8% (95% CI: 91.9-99.8) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.981 (95% CI: 0.945-1.000)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/SYBR กับเทคนิคการหาลำดับเบส มีค่า 100% (95% CI: 91.2-100), 100% (95% CI: 95.5-100), 100% (95% CI: -) และ 100% (95% CI: -) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 1.000 (95% CI: -)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/AGE กับเทคนิคการหาลำดับเบส มีค่า 100% (95% CI: 91.2-100), 98.8% (95% CI: 93.2-99.8), 97.6% (95% CI: 85.1-99.6) และ 100% (95% CI: -) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.981 (95% CI: 0.945-1.000)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/SYBR กับเทคนิค PCR มีค่า 100% (95% CI: 91.0-100), 98.8% (95% CI: 93.3-100), 97.5% (95% CI: 84.8-99.6) และ 100% (95% CI: -) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.981 (95% CI: 0.944-1.000)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/AGE กับเทคนิค PCR มีค่า 100% (95% CI: 91.0-100), 97.5% (95% CI: 91.4-99.7), 95.1% (95% CI: 83.2-98.7) และ 100% (95% CI: -) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.963 (95% CI: 0.911-1.000)

จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า เทคนิค RPA/SYBR มีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium* ใกล้เคียงกับเทคนิค RPA/AGE และมีความสอดคล้องในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81-1.00) นอกจากนี้เทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE ยังมีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium* ใกล้เคียงกับเทคนิคการหาลำดับเบสและเทคนิค PCR และมีความสอดคล้องในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81-1.00) เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4. 22 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ของเทคนิคต่างๆ เมื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. intracellulare*

ผลการทดสอบ/ เทคนิค	RPA/SYBR เปรียบเทียบกับ RPA/AGE	RPA/SYBR เปรียบเทียบกับ การหาลำดับ เบส	RPA/AGE เปรียบเทียบกับ การหาลำดับ เบส	RPA/SYBR เปรียบเทียบกับ PCR	RPA/AGE เปรียบเทียบกับ PCR
ความไว	100% (94.6-100)	100% (93.8-100)	100% (93.8-100)	94.6% (86.7-98.5)	89.2% (79.8-95.2)
ความจำเพาะ	92.6% (82.1-97.9)	80.7% (68.6-89.6)	87.1% (76.2-94.3)	100% (92.3-100)	100% (92.3-100)
ค่าทำนายผลบวก	94.3% (86.5-97.7)	84.9% (74.4-88.9)	87.9% (79.2-93.3)	100% (-*)	100% (-*)
ค่าทำนายผลลบ	100% (-*)	100% (-*)	100% (-*)	92.0% (81.6-96.8)	85.2% (74.9-91.7)
ค่าสถิติ Kappa	0.932 (0.867-0.997)	0.801 (0.696-0.906)	0.862 (0.771-0.953)	0.931 (0.864-0.997)	0.863 (0.773-0.954)

\* หมายถึง ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 4.22 การวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. intracellulare* ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคต่างๆ พบค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ และสถิติ Kappa ดังนี้

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/SYBR กับเทคนิค RPA/AGE มีค่า 100% (95% CI: 94.6-100), 92.6% (95% CI: 82.1-97.9), 94.3% (95% CI: 86.5-97.7) และ 100% (95% CI: -) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.932 (95% CI: 0.867-0.997)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/SYBR กับเทคนิคการหาลำดับเบส มีค่า 100% (95% CI: 93.8-100), 80.7% (95% CI: 68.6-89.6), 84.9% (95% CI: 74.4-88.9) และ 100% (95% CI: -) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.801 (95% CI: 0.696-0.906)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/AGE กับเทคนิคการหาลำดับเบส มีค่า 100% (95% CI: 93.8-100), 87.1% (95% CI: 76.2-94.3), 87.9% (95% CI: 79.2-93.3) และ 100% (95% CI: -) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.862 (95% CI: 0.771-0.953)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/SYBR กับเทคนิค PCR มีค่า 94.6% (95% CI: 86.7-98.5), 100% (95% CI: 92.3-100), 100% (95% CI: -) และ 92.0% (95% CI: 81.6-96.8) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.931 (95% CI: 0.864-0.997)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/AGE กับเทคนิค PCR มีค่า 89.2% (95% CI: 79.8-95.2), 100% (95% CI: 92.3-100), 100% (95% CI: -) และ 85.2% (95% CI: 74.9-91.7) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.863 (95% CI: 0.773-0.954)

จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า เทคนิค RPA/SYBR มีความไวในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. intracellulare* ใกล้เคียงกับเทคนิค RPA/AGE ในขณะที่มีความจำเพาะเล็กน้อย อย่างไรก็ตามทั้งสองเทคนิคมีความสอดคล้องในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81-1.00) นอกจากนี้เทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE ยังมีความไวในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อ เชื้อ *M. intracellulare* ใกล้เคียงกับเทคนิคการหาลำดับเบส แต่มีความจำเพาะต่ำกว่า ในขณะที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเทคนิค PCR และมีความสอดคล้องในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81-1.00)

ตารางที่ 4. 23 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ของเทคนิคต่างๆ เมื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อสายพันธุ์อื่นๆในกลุ่ม MAC

ผลการทดสอบ/ เทคนิค	RPA/SYBR เปรียบเทียบกับ RPA/AGE	RPA/SYBR เปรียบเทียบกับ การหาลำดับ เบส	RPA/AGE เปรียบเทียบกับ การหาลำดับ เบส	RPA/SYBR เปรียบเทียบกับ PCR	RPA/AGE เปรียบเทียบกับ PCR
ความไว	100% (2.5-100)	18.2% (5.2-40.3)	4.6% (0.1-22.8)	66.7% (22.3-95.7)	16.7% (0.4-64.1)
ความจำเพาะ	97.5% (92.8-99.5)	100% (96.3-100)	100% (96.3-100)	100% (96.8-100)	100% (96.8-100)
ค่าทำนาย ผลบวก	25.0% (9.8-50.5)	100% (-*)	100% (-*)	100% (-*)	100% (-*)
ค่าทำนายผลลบ	100% (-*)	84.5% (81.7-86.9)	82.4% (81.0-83.6)	98.3% (94.8-99.4)	95.8% (94.1-97.0)
ค่าสถิติ Kappa	0.392 (-0.148-0.931)	0.266 (0.054-0.479)	0.072 (-0.062-0.207)	0.792 (0.512-1.000)	0.275 (-0.153-0.704)

\* หมายถึง ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 4.23 การวินิจฉัยจำแนกเชื้อสายพันธุ์อื่นๆในกลุ่ม MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคต่างๆ พบค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ และสถิติ Kappa ดังนี้

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/SYBR กับเทคนิค RPA/AGE มีค่า 100% (95% CI: 2.5-100), 97.5% (95% CI: 92.8-99.5), 25.0% (95% CI: 9.8-50.5) และ 100% (95% CI: -) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.392 (95% CI: 0.148-0.931)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/SYBR กับเทคนิคการหาลำดับเบส มีค่า 18.2% (95% CI: 5.2-40.3), 100% (95% CI: 96.3-100), 100% (95% CI: -) และ 84.5% (95% CI: 81.7-86.9) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.266 (95% CI: 0.054-0.479)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/AGE กับเทคนิคการหาลำดับเบส มีค่า 4.6% (95% CI: 0.1-22.8), 100% (95% CI: 96.3-100), 100% (95% CI: -) และ 82.4% (95% CI: 81.0-83.6) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.072 (95% CI: 0.062-0.207)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/SYBR กับเทคนิค PCR มีค่า 66.7% (95% CI: 22.3-95.7), 100% (95% CI: 96.8-100), 100% (95% CI: -) และ 98.3% (95% CI: 94.8-99.4) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.792 (95% CI: 0.512-1.000)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RPA/AGE กับเทคนิค PCR มีค่า 16.7% (95% CI: 0.4-64.1), 100% (95% CI: 96.8-100), 100% (95% CI: -) และ 95.8% (95% CI: 94.1-97.0) ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.275 (95% CI: 0.153-0.704)

จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า เทคนิค RPA/SYBR มีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC ใกล้เคียงกับเทคนิค RPA/AGE ยกเว้นมีค่าทำนายผลบวกที่ต่ำกว่าเทคนิค RPA/AGE (สถิติ Kappa มีค่า 0.210-0.400) นอกจากนี้เทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE มีความไวต่ำในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการหาลำดับเบสและเทคนิค PCR โดยมีความสอดคล้องในเกณฑ์พอใช้ (สถิติ Kappa มีค่า 0.210-0.400) และเล็กน้อย (สถิติ Kappa มีค่า 0.000-0.020) ตามลำดับ สำหรับเทคนิค RPA/SYBR และมีความสอดคล้องในเกณฑ์ดี (สถิติ Kappa มีค่า 0.610-0.800) และพอใช้ (สถิติ Kappa มีค่า 0.210-0.400) ตามลำดับ สำหรับเทคนิค RPA/AGE

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย

เชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดวัณโรค หรือ NTM เป็นสาเหตุของการติดเชื้อฉวยโอกาส โดยมักพบการก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ อาทิเช่น ผู้ป่วยเอดส์ ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไขกระดูก มะเร็งทางโลหิตวิทยา โรคในกลุ่มอโตอิมมูน เด็ก และคนชรา (1) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ MAC ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย โดยไม่มีข้อมูลเชื่อมโยงไปที่ผู้ป่วย จึงไม่สามารถระบุได้ว่า เชื้อ MAC ทั้งหมดที่ถูกนำมาสกัด DNA เป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกประเภทใด ตัวอย่าง DNA ทั้งหมด 121 ตัวอย่าง เพาะแยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 121 ราย พบว่ามีกลุ่มผู้ป่วยที่สามารถระบุอายุได้จำนวน 27 ราย มีอายุอยู่ในช่วงระหว่าง 41-88 ปี คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 69.5 ปี เป็นที่น่าสังเกตว่าการติดเชื้อ MAC มักพบการติดเชื้อในผู้ป่วยวัยกลางคนจนถึงผู้ป่วยสูงอายุ การศึกษาของ Roland Diel และคณะ ได้รวบรวมข้อมูลจากงานวิจัยต่างๆ จากฐานข้อมูล PubMed® และ ProQuest Dialog™ ในปี พ.ศ. 2516-2560 ที่ศึกษาจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ MAC บริเวณปอด ซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในเวลาต่อมา พบว่ามีข้อมูลจากงานวิจัยทั้งหมด 17 งาน ซึ่งมีจำนวนผู้ป่วยรวม 9,035 ราย โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้สูงอายุและมีค่าเฉลี่ยของอายุอยู่ระหว่าง 60.0-72.0 ปี (113)

เชื้อ MAC เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป ซึ่งสามารถแพร่กระจายได้ในอากาศ โดยติดต่อสู่คนผ่านทางระบบทางเดินหายใจ และก่อให้เกิดพยาธิสภาพหลักที่ปอด ซึ่งมีลักษณะของ

รอยโรคคล้ายกับวัณโรค ในกลุ่มของสิ่งส่งตรวจที่ทราบแหล่งที่มาจำนวน 45 ตัวอย่าง เป็นสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจมากที่สุด จำนวน 30 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย เสมหะ 16 ตัวอย่าง และ Bronchoalveolar lavage 14 ตัวอย่าง ในขณะที่เป็นสิ่งส่งตรวจนอกระบบทางเดินหายใจอีก 25 ตัวอย่าง ได้แก่ เลือด 12 ตัวอย่าง ต่อม้ำน้ำเหลือง 2 ตัวอย่าง ไชกระดูก 1 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อ MAC สามารถติดต่อในระบบทางเดินอาหารผ่านการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไป ซึ่งเชื้อสามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารที่มีค่า pH น้อยกว่า 3 ได้ จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ไปยังชั้นมิวโคซา แล้วเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดและระบบน้ำเหลือง ซึ่งเป็นการก่อโรคแบบแพร่กระจาย การติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (Bacteremia) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* พบว่าเป็นเชื้อ MAC ประมาณ 54.9% เชื้อ *M. tuberculosis* ประมาณ 38.0% และเชื้อ *Mycobacterium* สปีชีส์อื่นพบได้ประมาณ 7% โดยเฉพาะผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่มีระดับ CD4+ T lymphocyte ต่ำกว่า 50 เซลล์/ $\mu$ L จะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ MAC ในกระแสเลือดเพิ่มมากขึ้น (114) นอกจากนี้เชื้อ MAC ยังสามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อนได้อีกด้วย จึงมักเพาะแยกเชื้อได้จากสิ่งส่งตรวจที่มีความหลากหลายทั้งในและนอกระบบทางเดินหายใจ แตกต่างจากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เป็นสาเหตุของวัณโรค ซึ่งส่วนใหญ่ประมาณ 85% ก่อโรคในปอด และมีเพียง 15% ที่ก่อโรคนอกปอด จึงมักพบสิ่งส่งตรวจที่มาจากระบบทางเดินหายใจเป็นหลัก (115) อย่างไรก็ตาม มีสิ่งส่งตรวจที่ไม่ทราบแหล่งที่มาอีกจำนวน 76 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงอาจไม่สะท้อนสัดส่วนของประเภทสิ่งส่งตรวจทั้งหมดที่ทำให้การเพาะแยกเชื้อ MAC จากการศึกษารั้งนี้ได้

การตรวจวินิจฉัยติดเชื้อ MAC ในปัจจุบันต้องอาศัยผลการตรวจอาการทางคลินิกประกอบกับผลการเอ็กซเรย์ปอด หรือ CT scan ในกรณีมีพยาธิสภาพที่ปอด ร่วมกับการวินิจฉัยด้วยวิธีดั้งเดิม ได้แก่ การย้อมเชื้อด้วยสีทึนกรด การเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี อย่างไรก็ตาม



มีข้อจำกัดที่ต้องอาศัยระยะเวลาและไม่สามารถจำแนกเชื้อระหว่าง *M. avium* และ *M. intracellulare* ออกจากกันได้ ส่งผลให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการวินิจฉัยเพื่อรับการรักษาที่เหมาะสมและทันที่ และเป็นหนึ่งในสาเหตุของการเพิ่มอุบัติการณ์การติดเชื้อของ MAC ในปัจจุบัน เทคนิคทางอณูชีววิทยาจึงได้เข้ามามีบทบาทในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากมีความรวดเร็วที่สูงกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ และสามารถจำแนกเชื้อได้ถึงระดับสปีชีส์ ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาสำหรับตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อ MAC โดยใช้ตัวอย่าง DNA จำนวน 121 ตัวอย่าง ที่ถูกสกัดจากโคโลนีของเชื้อด้วยวิธีการต้ม พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีปริมาณ DNA อยู่ในช่วงระหว่าง 6.0-271.4 ng/ $\mu$ l ในขณะที่มีความบริสุทธิ์ของ DNA ซึ่งถูกวัดจากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 nm โดยที่ Nucleic acid ส่วนที่เป็นเบส Adenine จะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm กรดอะมิโนส่วนที่เป็น Tryptophane จะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm พบว่าตัวอย่าง DNA ที่มีอัตราส่วน 260/280 เท่ากับ 1.6-2.0 มีจำนวน 48 ตัวอย่าง (39.7%) ซึ่งหมายถึงมีโปรตีน หรือ RNA เจือปนน้อย และเป็น DNA ที่มีความบริสุทธิ์เหมาะสม ในขณะที่ตัวอย่าง DNA ที่มีอัตราส่วน 260/280 น้อยกว่า 1.6 มีจำนวน 17 ตัวอย่าง (14.0%) ซึ่งอาจมีการเจือปนของโปรตีน และตัวอย่าง DNA ที่มีอัตราส่วน 260/280 มากกว่า 2.0 มีจำนวน 56 ตัวอย่าง (46.3%) ซึ่งอาจมีการเจือปนของ RNA (116) ความแตกต่างของปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง อาจขึ้นอยู่กับขั้นตอนการสกัด DNA ตั้งแต่ปริมาณของโคโลนีเชื้อที่ถูกขูดเพื่อนำมาสกัด DNA ความเหมาะสมของ Lysis buffer อุณหภูมิและระยะเวลาของการต้ม ตลอดจนความเร็วรอบของการปั่นตกตะกอน และขั้นตอนการดูดส่วนใสที่เป็น DNA เพื่อนำไปใช้ การทำ DNA ให้บริสุทธิ์ก่อนการนำไปใช้ สามารถทำได้ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การทำให้แยกชั้นด้วย Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol ที่อัตราส่วน 25:24:1 การตกตะกอนและล้างด้วย Ethanol การบ่มด้วยเอนไซม์ Protease K เพื่อย่อยสลายโปรตีน หรือเอนไซม์ RNase

เพื่อย่อยสลาย RNA ที่เจือปน เป็นต้น (117) อย่างไรก็ตามก็ตีตัวอย่าง DNA ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้ DNA บริสุทธิ์ จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ตัวอย่าง DNA บางตัวอย่าง มีอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ 260/280 อยู่ในช่วง 1.6-2.0

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้กับเทคนิค PCR ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่นิยมใช้กันทั่วไป และเทคนิค RPA ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้ถูกพัฒนาสำหรับการศึกษาค้นคว้านี้ ถูกออกแบบให้จำเพาะกับลำดับเบสของยีน *gyrB* หรือ ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II ที่ทำหน้าที่คลายเกลียวของ DNA สายคู่ ด้วยการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างเบส และเชื่อมต่อด้านที่ปลายเกลียวของ DNA สายคู่ ด้วยการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างเบส และเชื่อมต่อด้านที่ปลายเกลียวของ DNA สายคู่ เพื่อลดการขดตัวกันแน่น (Supercoil) ของ DNA ภายหลังจากการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบส ที่อยู่ต่างสายโพลีนิวคลีโอไทด์ เพื่อให้เกิดการแยกสายของ DNA ด้วยเอนไซม์ Helicase ในกระบวนการ DNA replication (118) การวินิจฉัยจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ MAC ที่ผ่านมานิยมใช้ยีน 16S rRNA แต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถจำแนกเชื้อสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม เช่น *M. intracellulare* และ *M. chimaera* ออกจากกันได้ ในขณะที่การใช้ยีน 16S-23S rRNA internal spacer (ITS) ไม่สามารถจำแนกเชื้อ MAC ออกจากเชื้อบางสายพันธุ์ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) (119) จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการใช้ยีน *gyrB* ในการทดสอบด้วยเทคนิค LAMP เพื่อจำแนกสปีชีส์เชื้อ MTBC, *M. avium* และ *M. intracellulare* ตามลำดับ (90) ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเลือกใช้ยีน *gyrB* ซึ่งจัดเป็น Housekeeping gene ที่มีลำดับเบสอนุรักษ์และมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ รวมไปถึงเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* มาใช้ในการจำแนกเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare*

การนำลำดับเบสยีน *gyrB* จากเชื้อในกลุ่ม MAC และเชื้อ *Mycobacterium* อื่นๆ มาเปรียบเทียบกับกันด้วยการ Alignment จากนั้นเลือกลำดับเบสบริเวณที่มีความจำเพาะกับเชื้อ MAC

เชื้อ *M. avium* หรือเชื้อ *M. intracellulare* มีความยาวเบสที่เหมาะสม และสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค RPA สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้จำแนกเชื้อกลุ่ม MAC ถูกออกแบบสามารถจับกับลำดับเบสคู่สมที่ครอบคลุมเชื้อที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม MAC ให้ได้มากที่สุด สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้จำแนกเชื้อ *M. avium* หรือเชื้อ *M. intracellulare* ถูกออกแบบให้เบสตัวสุดท้ายที่อยู่ส่วนปลายของไพรเมอร์ทางด้าน 3' จับได้อย่างจำเพาะกับเบสคู่สมที่พบเฉพาะเชื้อ *M. avium* หรือเชื้อ *M. intracellulare* ตัวใดตัวหนึ่งเท่านั้น จากการทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค PCR พบว่าอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB* ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* เท่ากับ 66, 70 และ 68 °C ตามลำดับ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับการทำเทคนิค PCR ทั่วไป อุณหภูมิ Annealing เป็นอุณหภูมิที่ไพรเมอร์เข้ามาจับกับ DNA ต้นแบบสายเดี่ยวบริเวณที่เป็นเบสคู่สมกัน หลังจากที่ DNA ต้นแบบสายคู่ถูกแยกเป็นสายเดี่ยวภายหลังขั้นตอน Denature ที่ 95 °C อุณหภูมิขั้นตอน Annealing แปรผันตรงกับความยาวไพรเมอร์ และปริมาณเบส Guanine และเบส Cytosine (GC content) ของไพรเมอร์ ซึ่งโดยทั่วไปตามธรรมชาติ ลำดับเบสของเชื้อกลุ่ม *Mycobacterium* มีค่า GC content ประมาณ 66% ซึ่งสูงกว่าเชื้อแบคทีเรียทั่วไป ทำให้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบมามีค่า GC content ที่สูงตามไปด้วย ส่งผลให้มีโอกาสเพิ่มการเกิดการจับกันแบบไม่พึงประสงค์ของไพรเมอร์ประเภทต่างๆ ได้ เช่น Self-dimer ซึ่งเป็นการจับกันเองระหว่างไพรเมอร์ในเส้นเดียวกัน Hetero-dimer ซึ่งเป็นการจับกันระหว่างไพรเมอร์ต่างเส้น และ Hairpin loop ซึ่งเกิดจากการจับกันระหว่างเบสคู่สมกัน (Complementary) ภายในเส้นไพรเมอร์ การจับกันดังกล่าวทั้งหมดสามารถยับยั้งปฏิกิริยา PCR ทำให้ไม่เกิดผลผลิต หรือเกิดผลผลิตที่น้อยกว่าความเป็นจริง นอกจากนี้ GC content ของ DNA ต้นแบบที่สูง ยังส่งผลให้อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน Annealing มีค่าสูงตามไปด้วย (120)

ความเข้มข้นของไพรเมอร์เป็นหนึ่งอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยา PCR หากมีความเข้มข้นของไพรเมอร์สูง อาจทำให้มีผลผลิตที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น รวมไปถึงเพิ่มโอกาสในการจับกันเองระหว่างไพรเมอร์ ในทางตรงกันข้ามหากไพรเมอร์มีความเข้มข้นน้อยเกินไป อาจทำให้เกิดผลผลิตน้อย และไม่สามารถถูกตรวจพบได้ภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR (121) จากการทดสอบพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB* ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* ที่ 0.08 0.04 และ 0.08  $\mu\text{M}$  ใกล้เคียงกับช่วงความเข้มข้นที่บริษัทผู้ผลิตน้ำยาแนะนำที่ความเข้มข้น 0.05–1  $\mu\text{M}$  (122) และเมื่อใช้ทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับอุณหภูมิขั้นตอน Annealing ข้างต้น สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยพบแถบของผลผลิตที่ชัดเจน และพบการจับกันเองระหว่างไพรเมอร์บางส่วน แต่ไม่พบผลผลิตที่ไม่จำเพาะ

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค PCR กับ DNA ต้นแบบจากเชื้อทั้งหมด 121 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อจำนวน 120 ตัวอย่าง ถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* ได้ ในขณะที่เชื้อจำนวน 1 ตัวอย่าง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แม้ว่าทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้อาจเกิดจากเป็นเชื้อนอกกลุ่ม MAC หรือตัวอย่าง DNA อาจถูกทำลาย ตัวอย่างดังกล่าวจึงไม่ถูกนำไปทดสอบต่อในการทดลองถัดไป ไพรเมอร์ MAV *gyrB* และไพรเมอร์ MIN *gyrB* ยังสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อจำนวน 41 และ 75 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อจำนวน 6 ตัวอย่าง ไม่สามารถถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ด้วยไพรเมอร์ MAV *gyrB* หรือไพรเมอร์ MIN *gyrB* ทั้งนี้อาจเกิดจากมีการกลายพันธุ์บริเวณตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์บนตัวอย่าง DNA ต้นแบบ ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับได้ (123) หรือมีการปนเปื้อนสารบางอย่างที่ยับยั้งปฏิกิริยา PCR (124)

วิธีมาตรฐานทางอนุชีววิทยาสำหรับการวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC คือ การวิเคราะห์ ลำดับเบส อาทิเช่น การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing ร่วมกับเทคนิค Capillary Electrophoresis ซึ่งวิเคราะห์ลำดับเบสได้ประมาณ 800 bp (125) การวิเคราะห์ผลผ่าน ซอฟแวร์ในรูปแบบตัวหนังสือที่แสดงเบสและ Electropherogram ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงผลการแยก ของแต่ละเบสที่มีสีแยกแตกต่างกัน (126) เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิต PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ MAC *gyrB* ของเชื้อจำนวน 120 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าเชื้อ จำนวน 40 ตัวอย่าง (33.33%) ถูกวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *M. avium* ในขณะที่เชื้อจำนวน 58 ตัวอย่าง (48.33%) ถูกวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *M. intracellulare* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเฉลี่ย เมื่อเทียบกับ ลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* subsp. *avium* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25291 และเชื้อ *M. intracellulare* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 13950 อยู่ที่ 99.45% และ 98.60% ตามลำดับ การ วิเคราะห์ผลลำดับเบสเพื่อจำแนกสปีชีส์เชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ในการศึกษา ครั้งนี้ พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่มากกว่า 98.7% และ 96.6% ขึ้นไป ตามลำดับ จึงจะสรุป ได้ว่ามีความเหมือนและเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกับสายพันธุ์มาตรฐานที่ถูกนำมาเปรียบเทียบ เกณฑ์ ดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Adrian และคณะ ที่ทำการศึกษาการวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์เชื้อ *Mycobacterium* ด้วยการหาลำดับเบสยีน *secA1* โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ความเหมือน ลำดับเบสที่อยู่ระหว่าง 96.0-100% (127) อย่างไรก็ตามเชื้อจำนวน 22 ตัวอย่าง (18.33%) ไม่ สามารถวินิจฉัยจำแนกได้ถึงระดับสปีชีส์ โดยถูกวินิจฉัยได้เพียงเป็นเชื้อกลุ่ม MAC โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ ความเหมือนเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* subsp. *avium* สายพันธุ์ มาตรฐาน ATCC 25291 และเชื้อ *M. intracellulare* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 13950 เพียง 90.30% และ 91.58% ตามลำดับ

ทั้งนี้เมื่อนำลำดับเบสของเชื้อทั้ง 22 ตัวอย่าง ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อทั้ง 22 ตัวอย่าง มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเฉลี่ยใกล้เคียงกับเชื้อ *M. Marseillense* และ *M. colombiense* เชื่อดังกล่าวเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม MAC มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง และมีความเหมือนของลำดับที่ใกล้เคียงกันมากกับเชื้อ *M. intracellulare* อย่างไรก็ตาม พบเชื้อจำนวน 13 ตัวอย่างที่สามารถเพียงระบุได้เป็นเชื้อกลุ่ม MAC เท่านั้น (128) ดังนั้นการวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ในกลุ่ม MAC โดยวิเคราะห์ลำดับเบสจากยีนเพียงยีนเดียว อาจไม่มีความละเอียดเพียงพอที่จำแนกเชื้อในกลุ่มดังกล่าวออกจากกันได้ และต้องใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสของหลายยีนพร้อมกัน (Multilocus sequence typing) หรือการใช้เทคนิค Whole genome sequencing ทำการศึกษาแทน

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* พบว่าในยีน *gyrB* มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 90.30% ขึ้นไป ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของยีนอื่นๆ ที่มักถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้ออกจากกัน ได้แก่ ยีน *hsp65* ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 91.1% ยีน *rpoB* ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 94.20% และยีน 16s rRNA ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 96.7% ลำดับเบสที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมาก แสดงว่าเชื้อยังมีความใกล้ชิดกันมาก ดังนั้นยีนที่มีลำดับเบสที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* มาก อาจมีประสิทธิภาพต่ำในการใช้จำแนกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้ออกจากกันด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบส และไม่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับวินิจฉัยสปีชีส์ที่จำเพาะของเชื้อ (11)

วิธีทางอณูชีววิทยา ได้แก่ เทคนิค PCR ซึ่งนิยมใช้โดยทั่วไป หรือเทคนิคการลำดับเบสซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ ล้วนจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะที่มีราคาแพง ต้องการ

ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ จึงมักจำกัดอยู่ในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยต่างๆ เท่านั้น เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าวของวิธีทางอณูชีววิทยาข้างต้น ทำให้มีการพัฒนาเทคนิค Isothermal amplification ที่อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยการใช้เพียงอุณหภูมิเดียวคงที่ตลอดในปฏิกิริยา เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อมากขึ้น อาทิเช่น NASBA LAMP SDA RCA HDA และ RPA เป็นต้น แต่ละเทคนิคมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป

เทคนิค Isothermal อื่นๆ ที่ได้เคยได้พัฒนานำมาวินิจฉัยเชื้อ MAC ในงานวิจัยของ Yukiko และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค LAMP สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. avium* จากแหล่งน้ำต่างๆ โดยใช้ ยีน 16S rRNA พบว่ามีจำนวนตัวอย่างประมาณ 88% ที่ผลของเทคนิค LAMP สอดคล้องไปในแนวทางเดียวกันกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (129) ขณะทำงานวิจัยของ Cui และคณะ ได้การพัฒนาเทคนิค NASBA ในรูปแบบของ Real-time simultaneous amplification เพื่อตรวจหาเชื้อ MAC ด้วยยีน 16S rRNA โดยอาศัยการสังเคราะห์ RNA สายใหม่ด้วย T7 RNA polymerase ร่วมกับการออกแบบ RNA probes และ Reverse transcription primer ที่มีส่วนของ T7 promoter พบว่าให้ผลสอดคล้องกับวิธีการหาลำดับเบสถึง 100% (130)

การศึกษาครั้งนี้เลือกนำเทคนิค RPA มาพัฒนา เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถทำการทดสอบได้ง่าย สะดวก ให้ผลการทดสอบได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถนำมาพัฒนาต่อสำหรับการวินิจฉัยแบบ POCT สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก หรือสำหรับใช้ใน ห้องปฏิบัติการภาคสนามได้ (91, 131)

ในการพัฒนาเทคนิค RPA สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ MAC จำเป็นต้องอาศัยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อตัวเชื้อ และเป็นไพรเมอร์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา RPA โดยควรมี

ความยาว 30- 35 เบส หากไพรเมอร์มีความยาวสั้นอาจมีผลทำให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเกิดขึ้นได้ช้า ขณะที่หากมีความยาวมากเกินไป 45 เบสทำให้เกิด โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) ซึ่งรบกวนปฏิกิริยาได้ ไพรเมอร์ RPA ควรีค่า GC content ระหว่าง 30-70% และควรหลีกเลี่ยงการออกแบบไพรเมอร์บริเวณที่มีเบสซ้ำกันหลายเบส แม้ว่าปฏิกิริยา RPA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ขนาดสูงสุดถึง 1500 bp อย่างไรก็ตามความยาวของผลผลิตที่เหมาะสมโดยทั่วไปไม่ควรเกิน 500 bp โดยขนาดความยาวผลผลิตที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 100-200 bp (7, 109) ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิค RPA ในการศึกษาครั้งนี้ มีความยาวอยู่ในช่วงระหว่าง 29-32 bp ประกอบไปด้วย ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ซึ่งใช้จำแนกเชื้อกลุ่ม MAC และให้ขนาดของผลผลิตเท่ากับ 224 bp ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* ซึ่งใช้จำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* และให้ขนาดของผลผลิตเท่ากับ 188 และ 202 bp ตามลำดับ

การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดจากปฏิกิริยา RPA สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบโดยใช้ Exo probe หรือ Fpg probe ซึ่งต้องอาศัยเครื่องมือ Twista® real-time fluorometer การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Agarose gel electrophoresis ซึ่งต้องอาศัยเครื่อง Power supply สำหรับจ่ายกระแสไฟฟ้าและเครื่อง Gel tank สำหรับวางแผ่นเจล การตรวจสอบด้วยเทคนิค Lateral flow (LF) ซึ่งต้องอาศัยการออกแบบแผ่นตรวจวัดที่ใช้หลักการ Immunoassay และการตรวจสอบด้วยเทคนิคการเติมสีเพื่อจับกับ DNA ที่เป็นผลผลิต เช่น สี SYBR Green I หรือสี Eva Green เป็นต้น ซึ่งสามารถอ่านผลการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะ (91, 131) ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้การตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยา RPA ด้วยสี SYBR Green I เนื่องจากสามารถอ่านผลได้ทันทีภายหลังการเติมสี โดยไม่ต้องมีขั้นตอนการบ่มไม่ต้องอาศัยเครื่องมือเพิ่มเติม และอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ จึงมีความเหมาะสมที่



นำมาพัฒนาร่วมกับเทคนิค RPA เพื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อ MAC สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบของการทดสอบที่ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือวิทยาศาสตร์จำเพาะ (Specific instrumentation-free) และสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก ห้องปฏิบัติการภาคสนาม หรือห้องปฏิบัติการที่อยู่ห่างไกล

สี SYBR green I เป็นสีฟลูออเรสเซนต์ มีคุณสมบัติเข้าจับกับ Double-strand DNA บริเวณ Minor groove ดูดกลืนแสงสีน้ำเงินที่มีความยาวคลื่นสูงสุด 497 nm และเมื่อเข้าจับกับ Double-strand DNA จะปล่อยแสงสีเขียวที่มีความยาวคลื่นสูงสุด 520 nm ทำให้สามารถมองเห็นเป็นสีเขียวด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ หรือเกิดการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสี SYBR Green I และความเข้มข้นของ DNA ที่ถูกตรวจวัด อย่างไรก็ตามสี SYBR Green I มีข้อจำกัดบางประการ อาทิเช่น สีสามารถจับกับ Double-strand DNA สายคู่ได้อย่างไม่จำเพาะ ไม่ว่าจะอยู่ในลักษณะของการเกิด Primer-dimer หรือ Non-specific DNA อื่นๆ ซึ่งอาจนำไปสู่ผลบวกปลอม จึงจำเป็นต้องเลือกใช้ DNA ต้นแบบที่มีความบริสุทธิ์ปราศจากความเสียหายจากการเสื่อมสภาพของ DNA รวมไปถึงการออกแบบไพรเมอร์ที่ต้องมีความจำเพาะ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด Primer-dimer และเพื่อป้องกันการเกิดผลบวกปลอมที่อาจจะเกิดขึ้น (101, 102)

เมื่อนำไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบ ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I จนได้เทคนิค RPA/SYBR สำหรับการตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อ MAC ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA คือ 8, 4, และ 6  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ โดยที่ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ทำปฏิกิริยากับ DNA ต้นแบบที่ 8 ng/ $\mu\text{l}$  ส่วนไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA สามารถทำปฏิกิริยากับ DNA ต้นแบบได้ตั้งแต่ที่ 1 และ 6 ng/ $\mu\text{l}$  ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเพื่อความ

สะดวกในการทำการทดสอบขั้นต่อไปของทั้ง 3 ไพรเมอร์ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบ เท่ากันที่ 8 ng/μl ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่สามารถมองเห็นผลผลิตได้ชัดเจนของไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 20 นาที การศึกษาก่อนหน้าพบว่าเทคนิค RPA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ภายในระยะเวลาที่มีแตกต่างกัน งานวิจัยของ Zhao และคณะ ทำการ ตรวจเชื้อ *Pasteurella multocida* ด้วยเทคนิค RPA พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ ตั้งแต่ 7.5 นาที แต่พบผลผลิตที่ชัดเจนเมื่อทำปฏิกิริยา RPA ตั้งแต่ 30 นาทีขึ้นไป (132) ในขณะที่ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบพบว่าผลผลิตเกิดขึ้นตั้งแต่ที่ 33 °C โดยพบปฏิกิริยาชัดเจนที่อุณหภูมิสูง ตั้งแต่ที่ 35, 37, 39, 41 และ 43 °C การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 37 °C สำหรับบ่มปฏิกิริยา RPA เนื่องจากให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจน และเป็นอุณหภูมิของกล่องควบคุมอุณหภูมิที่มักถูกตั้งไว้ สำหรับใช้ในงานทั่วไปในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามจากการงานวิจัยของ Crannell และคณะ ได้ ทำการทดสอบการเพิ่มปริมาณของ HIV-1 DNA ด้วยเทคนิค RPA โดยใช้อุณหภูมิของร่างกายใน ปฏิกิริยา ได้แก่ บริเวณรักแร้นอกเสื้อ หน้าท้อง กระเป๋ากางเกง และการกำมือ พบว่าสามารถเกิด ผลผลิต RPA โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือควบคุมอุณหภูมิ (133) งานวิจัยของ Lillis และคณะ ทำ การทดสอบการเพิ่มปริมาณ HIV-1 DNA ด้วยเทคนิค RPA โดยใช้อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 15-44 °C พบว่าผลผลิตเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 31-43 °C เมื่อทำปฏิกิริยานาน 20 นาที (134) นอกจากนี้ปฏิกิริยา RPA ยังสามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิตั้งที่ 25 °C แต่เกิดผลผลิตค่อนข้างน้อย และต้องใช้เวลาาน เป็นชั่วโมงเพื่อทำปฏิกิริยา (135)

สำหรับการตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้น พบว่าที่ความเข้มข้นสี SYBR green I ที่ 400X มีความ เหมาะสมในการแยกหลอดปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก (สารละลายเป็นสีเขียว) และลบ (สารละลายเป็นสี ส้ม) ได้อย่างชัดเจน ภายหลังจากอ่านผลด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ ความเข้มข้นสี SYBR Green I

ที่ใช้ในการศึกษารังนี้ ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Singpanomchai และคณะ ที่ศึกษาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นโดยใช้สี SYBR green I ที่ความเข้มข้น 375X (8) ในขณะที่งานวิจัยของ Iwamoto และคณะ ที่ศึกษาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* เชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ในเสมหะด้วยเทคนิค LAMP โดยตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นโดยใช้สี SYBR green I ที่ความเข้มข้นสูงถึง 1000X (90)

เทคนิค RPA/SYBR ที่พัฒนาได้มีความจำเพาะที่ดี โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ทั้งเชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์นอกเหนือจากเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มักพบก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ อย่างไรก็ตามพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *M. kansasii* และเชื้อ *M. gordonae* โดยไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด ให้ผลบวกปลอมกับ *M. kansasii* เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ให้ผลบวกปลอมกับเชื้อ *M. gordonae* เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I และ Agarose gel electrophoresis ทั้งเชื้อ *M. kansasii* และเชื้อ *M. gordonae* เป็นเชื้อกลุ่ม NTM ที่เจริญเติบโตช้าและมีความใกล้เคียงกันของลำดับเบสจากการวิเคราะห์ลำดับเบสยีน *gyrB* ด้วยโปรแกรม MegAlign พบว่าเชื้อ *M. kansasii* สายพันธุ์ ATCC 12478 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสของยีน *gyrB* ที่เหมือนกับเชื้อ *M. avium subsp. avium* สายพันธุ์ ATCC 25921 และเชื้อ *M. intracellulare* สายพันธุ์ ATCC 13950 เท่ากับ 85.5% และ 84.8% ตามลำดับ ขณะที่เชื้อ *M. gordonae* สายพันธุ์ DSM 44160 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสของยีน *gyrB* ที่เหมือนกับเชื้อ *M. avium subsp. avium* สายพันธุ์ ATCC 25921 และเชื้อ *M. intracellulare* สายพันธุ์ ATCC 13950 เท่ากับ 87.6% และ 87.1% ตามลำดับ เทคนิค RPA อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ ซึ่งอาจมีข้อจำกัดในการจำแนกเชื้อ

กรณีตำแหน่งของลำดับเบสเป้าหมายมีความใกล้เคียงกันมาก ทำให้ไพรเมอร์เกิดการจับแบบไม่จำเพาะได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของเทคนิค RPA ที่ในการศึกษาครั้งนี้

ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบน้อยที่สุด หรือ Limit of detection (LOD) ที่เทคนิค RPA สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ MAC เมื่อทดสอบกับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA, ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA และตรวจตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I และ Agarose gel electrophoresis มีค่าเท่ากับ 10, 1 และ 1 ng/μl และ 1, 0.1 และ 0.1 ng/μl ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าค่า LOD เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I มีค่าสูงกว่าการตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ประมาณ 10 เท่า สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้เทคนิค RPA เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน IS6110 และยีน IS1081 เพื่อวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่ามีค่า LOD เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I เท่ากับ 0.5 และ 0.05 ng ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ที่มีค่า LOD เท่ากับ 0.05 และ 0.00005 ng ตามลำดับ (8) การเปลี่ยนแปลงของสี SYBR Green I ขึ้นอยู่กับปริมาณผลผลิตสารพันธุกรรมที่สีเข้าจับ หากมีปริมาณผลผลิตสารพันธุกรรมน้อย อาจส่งผลให้สีของสารละลายไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียว หรือเปลี่ยนเป็นสีเขียวที่ค่อนข้างจาง จนสายตาไม่สามารถอ่านสีที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I มีค่า LOD สูง เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า ค่า LOD ของยีน IS6110 และยีน IS1081 มีค่าต่ำกว่าค่า LOD ของยีน *gyrB* ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากยีน Insertion sequence (IS) สามารถพบได้หลายตำแหน่ง (ประมาณ 5-25 ตำแหน่ง) บน Genome ของเชื้อ *M. tuberculosis* (136) ในขณะที่ยีน *gyrB* พบได้เพียงตำแหน่งเดียวบน Genome ทำให้ต้องใช้ DNA ต้นแบบปริมาณมาก ส่งผลให้ค่า LOD สูงขึ้น จึงจะเห็นผลการทดสอบที่เป็นบวกเมื่อทดสอบด้วย

เทคนิค RPA และตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I ในขณะที่บางงานวิจัยพบว่าต้องใช้ตัวอย่าง DNA ต้นแบบไม่ต่ำกว่า 300 ng ไปจนถึง 2 µg จึงจะสามารถเห็นปฏิกิริยาเป็นบวกที่ชัดเจน (137) คุณภาพของสี SYBR Green I เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการอ่านปฏิกิริยา เนื่องมาจากโดยทั่วไปสี SYBR Green I สามารถเชื่อมได้หากเก็บในระยะยาว และพบกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิขณะนำเข้า-ออก จากตู้เย็นเป็นประจำ (138)

การตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วย Agarose gel electrophoresis มีค่า LOD ที่ต่ำกว่าการตรวจสอบด้วยสี SYBR green I ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สีย้อมสารพันธุกรรม UltraPower DNA/RNA safe dye ในขั้นตอนการทำ Agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นสีที่มีความไวสูงกว่าสี Ethidium bromide และสามารถตรวจสอบผลผลิตที่มีความเข้มข้นได้ตั้งแต่ 20 pg (139)

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA กับ DNA ต้นแบบจากเชื้อทั้งหมด 120 ตัวอย่าง และตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I พบว่าเชื้อจำนวน 119 ตัวอย่าง ถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ได้ ในขณะที่เชื้อจำนวน 1 ตัวอย่าง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ยังสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อจำนวน 46 และ 75 ตัวอย่าง แต่เมื่อทำการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis พบจำนวนเชื้อที่ถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพิ่มสูงขึ้น มากกว่าการตรวจสอบด้วยสี SYBR Green I โดยพบเชื้อจำนวน 120, 53 และ 78 ตัวอย่าง ถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ เนื่องจากเทคนิค Agarose gel electrophoresis อาจมีความไวในการตรวจวัดผลผลิตมากกว่าการตรวจสอบด้วยสี SYBR green I ตามที่ได้อธิบายข้างต้น จึงสามารถตรวจสอบผลผลิตที่อาจมีในปริมาณน้อยได้และทำให้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกมีจำนวนที่สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค

RPA/SYBR กับ RPA/AGE พบว่ามีความไว 99.2% สำหรับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA มีความไวและความจำเพาะ 86.8% และ 100% สำหรับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ 96.2% และ 100% สำหรับไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าทั้ง RPA/SYBR กับ RPA/AGE มีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.880 และ 0.946 สำหรับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก อย่างไรก็ตามในการศึกษาคั้งนี้ไม่สามารถคำนวณค่าสถิติ Kappa ของไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคต่างๆ ได้ เนื่องจากตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลลบจริงในการทดสอบมีค่าเท่ากับ 0

เมื่อเปรียบเทียบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยเทคนิค RPA กับเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าเมื่อใช้การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I มีความไว 99.2% สำหรับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA มีความไวและความจำเพาะ 100% และ 92.5% สำหรับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ 98.3% และ 71.0% สำหรับไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.892 และ 0.686 สำหรับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ MIN *gyrB* RPA ซึ่งถือว่ามีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมากและดี ตามลำดับ ในขณะที่หากใช้การตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่าไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA มีความจำเพาะที่ลดลง ในขณะที่เดียวกันไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA มีความไวและความจำเพาะที่เพิ่มขึ้น กล่าวคือ มีความไว 100% สำหรับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA มีความไวและความจำเพาะ 100% และ 83.8% สำหรับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ 100% และ 67.7% สำหรับไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ ส่งผลให้มีค่าสถิติ Kappa ลดลงเท่ากับ 0.775 และ 0.670 สำหรับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดี

เมื่อเปรียบเทียบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ด้วยเทคนิค RPA กับเทคนิค PCR พบว่าเมื่อใช้การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I มีความไว 99.2% สำหรับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA มีความไวและความจำเพาะ 97.6% และ 92.4% สำหรับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ 93.2% และ 87.0% สำหรับไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ และมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.874 และ 0.805 สำหรับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก ในขณะที่หากใช้การตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่าไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA มีความจำเพาะที่ลดลง ในขณะที่เดียวกันไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA มีความไวที่เพิ่มขึ้น กล่าวคือ มีความไว 100% สำหรับไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA มีความไวและความจำเพาะ 97.6% และ 83.5% สำหรับไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และ 97.3% และ 87% สำหรับไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ตามลำดับ ส่งผลให้มีค่าสถิติ Kappa ของไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA ลดลงเท่ากับ 0.758 ซึ่งถือว่ามีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดี แต่ค่าสถิติ Kappa ของ MIN *gyrB* RPA ใกล้เคียงเดิมเท่ากับ 0.857 ซึ่งถือว่ามีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก จากข้อมูลข้างต้นสังเกตได้ว่าไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA นั้นมีความไวที่สูง ขณะที่ความจำเพาะมีค่าลดลง เนื่องจากไพรเมอร์สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อกลุ่ม MAC ที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *M. intracellulare* โดยเป็นผลมาจากความเหมือนกันมากของลำดับเบส

เมื่อพิจารณาภาพรวมของประสิทธิภาพของเทคนิค RPA ที่ใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมขึ้นด้วยไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีถึงดีมากกับเทคนิค Sanger DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และเทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้ทั่วไป เมื่อตรวจสอบผลผลิตของเทคนิค RPA ด้วยสี SYBR

Green I ให้ผลการทดสอบในภาพรวมมีความไวเท่ากับหรือต่ำกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis เพียงเล็กน้อย เนื่องจากเทคนิค Agarose gel electrophoresis ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถตรวจสอบผลผลิตที่มีปริมาณน้อยเพียง 20 pg (139) ในขณะที่การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I จำเป็นต้องมีสารพันธุกรรมปริมาณที่มากกว่า 60 pg ขึ้นไป จึงจะตรวจพบได้ (140) อย่างไรก็ตามพบว่า การตรวจสอบผลผลิตของเทคนิค RPA ด้วยสี SYBR Green I มีความจำเพาะที่สูงกว่าเทคนิค Agarose gel electrophoresis ปัจจัยที่ทำให้ Agarose gel electrophoresis มีความจำเพาะต่ำ อาจมาจากจำนวนผลบวกปลอมที่พบมากกว่าการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ทั้งที่เกิดจากความไวในการตรวจสอบผลผลิตที่มากกว่า และผลผลิตที่อาจเกิดจากปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของไพรเมอร์กับเชื้อ MAC สปีชีส์อื่นที่นอกเหนือจาก *M. avium* และ *M. Intracellulare* ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกันมาก ในขณะที่ผลบวกปลอมจากการตรวจสอบด้วยสี SYBR green I มีโอกาสเกิดขึ้นได้จากการเข้าจับของสี SYBR Green I กับ Minor groove ของสายคู่ของ DNA ที่เกิดขึ้นอย่างไม่จำเพาะ เช่น การจับกันเองของไพรเมอร์ เป็นต้น (141) การลดผลบวกปลอมที่เกิดจากสี SYBR Green I สามารถทำได้โดยใช้สี EvaGreen ในขั้นตอนการตรวจวัดผลผลิต เนื่องจากมีความจำเพาะสูงกว่าในการจับกับ Double-strand DNA (142)

เทคนิค RPA เมื่อใช้ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I และ Agarose gel electrophoresis พบว่ามีประสิทธิภาพดีในการจำแนกเชื้อและมีความสอดคล้องในเกณฑ์ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีหาลำดับเบสและเทคนิค PCR การวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการหาลำดับเบส มีความไวตั้งแต่ 100% ขึ้นไป ความจำเพาะตั้งแต่ 80.7% ขึ้นไป ค่าทำนายผลบวกตั้งแต่ 84.9% ขึ้นไป ค่าทำนายผลลบตั้งแต่ 100% ขึ้นไป และสถิติ Kappa ตั้งแต่ 0.801 ขึ้นไป ในขณะที่



เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR มีความไวตั้งแต่ 89.2% ขึ้นไปความจำเพาะตั้งแต่ 97.5% ขึ้นไป ค่าทำนายผลบวกตั้งแต่ 95.1% ขึ้นไป ค่าทำนายผลลบตั้งแต่ 85.2% ขึ้นไป และสถิติ Kappa ตั้งแต่ 0.863 ขึ้นไป ในขณะที่เมื่อวินิจฉัยจำแนกได้เชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC พบว่าเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE มีความไวและค่าทำนายผลบวกที่ค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการหาลำดับเบสและเทคนิค PCR โดยมีความไวตั้งแต่ 4.6% ขึ้นไป ความจำเพาะตั้งแต่ 100% ขึ้นไป ค่าทำนายผลบวกตั้งแต่ 100% ขึ้นไป ค่าทำนายผลลบตั้งแต่ 82.4% ขึ้นไป และมีสถิติ Kappa อยู่ในช่วง 0.792 ขึ้นไป ซึ่งถือว่ามีความสอดคล้องตั้งแต่เกณฑ์เล็กน้อยถึงดี

การนำเทคนิค RPA/SYBR และ RPA/AGE ไปใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ MAC หากวินิจฉัยได้ว่าเป็นเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* จึงมีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากมีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ที่สูง ในขณะที่หากวินิจฉัยได้เป็นเชื้อสายพันธุ์อื่นที่อยู่ในกลุ่ม MAC ควรนำไปวินิจฉัยยืนยันด้วยเทคนิคอื่นที่มีความน่าเชื่อถือสูงกว่าและมีความสามารถในการจำแนกเชื้อที่ละเอียดกว่า เช่น เทคนิคการหาลำดับเบส เป็นต้น

## บทที่ 6

### สรุปผลการดำเนินการ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยา ที่อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ภายใต้อุณหภูมิคงที่ร่วมกับการอ่านผลด้วยตาเปล่า เพื่อวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ซึ่งเป็นเชื้อสองสายพันธุ์หลักที่ก่อโรคของเชื้อกลุ่ม MAC ได้สำเร็จ เทคนิคที่พัฒนาขึ้น มีชื่อว่า เทคนิค RPA/SYBR ซึ่งเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา RPA และตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยการเติมสี SYBR Green I โดยดำเนินปฏิกิริยา RPA ด้วยชุดน้ำยา RPA TwistAmp® Basic ร่วมกับไพรเมอร์ที่ถูกรออกแบบมาให้จำเพาะกับเชื้อกลุ่ม MAC เชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ได้แก่ ไพรเมอร์ MAC *gyrB* RPA ไพรเมอร์ MAV *gyrB* RPA และไพรเมอร์ MIN *gyrB* RPA ที่ความเข้มข้น 8, 4 และ 6  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ ใช้ DNA ต้นแบบความเข้มข้น 8 ng/ $\mu\text{l}$  บ่มด้วย อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลา 20 นาที และใช้สี SYBR green I ที่ความเข้มข้น 400X อ่านผล ปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติ ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน จะสังเกตเห็นสารละลายในหลอดปฏิกิริยาเป็นสีเขียว ในขณะที่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสาร พันธุกรรมของยีน จะสังเกตเห็นสารละลายในหลอดปฏิกิริยาสีส้ม

การวินิจฉัยจำแนกเชื้อ MAC ด้วยเทคนิค RPA ที่พัฒนาขึ้นร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วย สี SYBR และ Agarose gel electrophoresis พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีและมีความสอดคล้องใน เกณฑ์ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีหาลำดับเบสและเทคนิค PCR การวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE เมื่อเปรียบเทียบกับ เทคนิคการหาลำดับเบส มีความไวตั้งแต่ 100% ขึ้นไป ความจำเพาะตั้งแต่ 80.7% ขึ้นไป ค่าทำนาย

ผลบวกตั้งแต่ 84.9% ขึ้นไป ค่าทำนายผลลบตั้งแต่ 100% ขึ้นไป และสถิติ Kappa ตั้งแต่ 0.801 ขึ้นไป ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR มีความไวตั้งแต่ 89.2% ขึ้นไป ความจำเพาะตั้งแต่ 97.5% ขึ้นไป ค่าทำนายผลบวกตั้งแต่ 95.1% ขึ้นไป ค่าทำนายผลลบตั้งแต่ 85.2% ขึ้นไป และสถิติ Kappa ตั้งแต่ 0.863 ขึ้นไป ในขณะที่การวินิจฉัยจำแนกเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม MAC ด้วยเทคนิค RPA/SYBR และเทคนิค RPA/AGE มีความไวและค่าทำนายผลบวกที่ค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีหาลำดับเบสและเทคนิค PCR การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพและจำเพาะมากขึ้นต่อเชื้อกลุ่ม MAC จึงมีความจำเป็นในอนาคต

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของเทคนิค RPA/SYBR ประกอบกับข้อได้เปรียบของเทคนิค ได้แก่ ความรวดเร็วในการทดสอบ ไม่ซับซ้อน ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่จำเพาะในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและการอ่านผล จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ตรวจคัดกรองเบื้องต้นในการวินิจฉัยเชื้อ MAC โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* อย่างไรก็ตามควรนำไปทดสอบเพิ่มเติมกับสิ่งส่งตรวจโดยตรง ก่อนการนำไปใช้จริงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเหมาะสมโรงพยาบาลขนาดเล็ก หรือห้องปฏิบัติการภาคสนาม ทำให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว ส่งผลต่อการรักษาอย่างทันเวลาที่ เป็นการลดความสูญเสียและการแพร่กระจายของเชื้อ อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ร่วมในการศึกษาระบาดวิทยาได้อีกด้วย

## บรรณานุกรม

1. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175(4):367-416.
2. Parker BC, Ford MA, Gruft H, Falkinham JO, 3rd. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. IV. Preferential Aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from Natural Waters. *The American Review of Respiratory Disease*. 1983;128(4):652-6.
3. Horsburgh CR. Epidemiology of *Mycobacterium avium* Complex Disease. *The American Journal of Medicine*. 1997;102(5, Supplement 3):11-5.
4. Saritsiri S, Udomsantisook N, Suankratay C. Nontuberculous Mycobacterial Infections in King Chulalongkorn Memorial Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2006;89(12):2035-46.
5. Kim SY, Shin SH, Moon SM, Yang B, Kim H, Kwon OJ, et al. Distribution and Clinical Significance of *Mycobacterium avium* Complex Species Isolated from Respiratory Specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2017;88(2):125-37.
6. Gaudet M, Fara AG, Beritognolo I, Sabatti M. Allele-specific PCR in SNP Genotyping. *Methods in Molecular Biology*. 2009;578:415-24.
7. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biology*. 2006;4(7):e204.
8. Singpanomchai N, Akeda Y, Tomono K, Tamaru A, Santanirand P, Ratthawongjirakul P. Naked Eye Detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Recombinase Polymerase Amplification-SYBR Green I Assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019;33(2):e22655.
9. Shin SJ, Lee BS, Koh WJ, Manning EJ, Anklam K, Sreevatsan S, et al. Efficient Differentiation of *Mycobacterium avium* Complex Species and Subspecies by Use of Five-target Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(11):4057-62.

10. Ben Salah I, Cayrou C, Raoult D, Drancourt M. *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* Complex. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2009;59(Pt 11):2803-8.
11. Ben Salah I, Adekambi T, Raoult D, Drancourt M. *rpoB* Sequence-based Identification of *Mycobacterium avium* Complex Species. Microbiology (Reading, England). 2008;154(Pt 12):3715-23.
12. Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault W. Numerical Taxonomy of Mycobactin-dependent Mycobacteria, Emended Description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 1990;40(3):254-60.
13. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2008;72(1):126-56, table of contents.
14. Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LE. The *Mycobacterium avium* Complex. Clinical Microbiology Reviews. 1993;6(3):266-310.
15. Du Moulin GC, Stottmeier KD, Pelletier PA, Tsang AY, Hedley-Whyte J. Concentration of *Mycobacterium avium* by Hospital Hot Water Systems. The Journal of the American Medical Association. 1988;260(11):1599-601.
16. Von Reyn CF, Maslow JN, Barber TW, Falkinham JO, 3rd, Arbeit RD. Persistent Colonisation of Potable Water as a Source of *Mycobacterium avium* Infection in AIDS. Lancet (London, England). 1994;343(8906):1137-41.
17. Bermudez LE, Wagner D, Sosnowska D. Mechanisms of *Mycobacterium avium* Pathogenesis. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 2000;48(6):521-7.
18. Whiley H, Keegan A, Giglio S, Bentham R. *Mycobacterium avium* Complex-the Role of Potable Water in Disease Transmission. Journal of Applied Microbiology. 2012;113(2):223-32.
19. Hibiya K, Higa F, Tateyama M, Fujita J. The Pathogenesis and the Development Mechanism of *Mycobacterium avium* Complex Infection. Tuberculosis. 2007;82(12):903-18.

20. Reddy VM. Mechanism of *Mycobacterium avium* Complex Pathogenesis. *Frontiers in Bioscience* 1998;3:d525-31.
21. Bodmer T, Miltner E, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* Resists Exposure to the Acidic Conditions of the Stomach. *Federation of European Microbiological Societies*. 2000;182(1):45-9.
22. Phongsamart W, Chokephaibulkit K, Chaiprasert A, Vanprapa N, Chearskul S, Lolekha R. *Mycobacterium avium* Complex in HIV-infected Thai Children. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2002;85 Suppl 2:S682-9.
23. Dorman SE, Holland SM. Interferon-gamma and Interleukin-12 pathway Defects and Human Disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2000;11(4):321-33.
24. Ishii T, Tamura A, Matsui H, Nagai H, Akagawa S, Hebisawa A, et al. Disseminated *Mycobacterium avium* Complex Infection in a Patient Carrying Autoantibody to Interferon-gamma. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013;19(6):1152-7.
25. Bermudez LE, Petrofsky M, Kolonoski P, Young LS. An Animal Model of *Mycobacterium avium* Complex Disseminated Infection after Colonization of the Intestinal Tract. *The Journal of Infectious Diseases*. 1992;165(1):75-9.
26. Chuchottaworn C, Sathapatayawongs B, Tansuphsawadikul S, Suwanagool S, Kantipong P, Pornchaipoonthavee S. Prevalence of Disseminated *Mycobacterium avium* Complex Infection in Thai AIDS Patients. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 1999;82(7):643-7.
27. CDC. Principles of Epidemiology in Public Health Practice, Third Edition An Introduction to Applied Epidemiology and Biostatistics 2012 [updated May 18, 2012; cited 2020 May, 23]. Available from: [www.cdc.gov/ophss/csels/dsepd/ss1978/lesson1/section8.html](http://www.cdc.gov/ophss/csels/dsepd/ss1978/lesson1/section8.html).
28. Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Hidaka E, Katsuyama T, Stang B, et al. The Ability to form Biofilm Influences *Mycobacterium avium* Invasion and Translocation of Bronchial Epithelial Cells. *Cellular Microbiology*. 2006;8(5):806-14.
29. Bermudez LE, Young LS. Factors Affecting Invasion of HT-29 and HEP-2 Epithelial Cells by Organisms of the *Mycobacterium avium* Complex. *Infection and Immunity*. 1994;62(5):2021-6.

30. Li YJ, Danelishvili L, Wagner D, Petrofsky M, Bermudez LE. Identification of Virulence Determinants of *Mycobacterium avium* that Impact on the Ability to Resist Host Killing Mechanisms. *Journal of Medical Microbiology*. 2010;59(Pt 1):8-16.
31. Fujita K, Ito Y, Hirai T, Kubo T, Togashi K, Ichiyama S, et al. Prevalence and Risk Factors for Chronic co-infection in Pulmonary *Mycobacterium avium* Complex Disease. *BMJ Open Respiratory Research*. 2014;1(1):e000050.
32. Reed C, von Reyn CF, Chamblee S, Ellerbrock TV, Johnson JW, Marsh BJ, et al. Environmental Risk Factors for Infection with *Mycobacterium avium* Complex. *American Journal of Epidemiology*. 2006;164(1):32-40.
33. Lee BY, Kim S, Hong Y, Lee SD, Kim WS, Kim DS, et al. Risk Factors for Recurrence after Successful Treatment of *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(6):2972-7.
34. Maekawa K, Ito Y, Hirai T, Kubo T, Imai S, Tatsumi S, et al. Environmental Risk Factors for Pulmonary *Mycobacterium avium*- *intracellulare* Complex Disease. *Chest*. 2011;140(3):723-9.
35. Chayakulkeeree M, Naksanguan T. Epidemiology and Clinical Characteristic of Mycobacterial Infections in Human Immunodeficiency Virus- infected Patients in Siriraj Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2015;98(3):238-44.
36. Lande L, Peterson DD, Gogoi R, Daum G, Stamper K, Kwait R, et al. Association between Pulmonary *Mycobacterium avium* Complex Infection and Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2012;7(9):1345-51.
37. Huang HL, Cheng MH, Lu PL, Shu CC, Wang JY, Wang JT, et al. Epidemiology and Predictors of NTM Pulmonary Infection in Taiwan a Retrospective, Five-Year Multicenter Study. *Scientific reports*. 2017;7(1):16300.
38. Simons S, van Ingen J, Hsueh P-R, Van Hung N, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ, et al. Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Tract Infections, Eastern Asia. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(3):343-9.
39. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The Geographic Diversity of Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Pulmonary Samples: an NTM-NET Collaborative Study. *The European Respiratory Journal*. 2013;42(6):1604-13.

40. Iamsawat S, Surawut S, Prammananan T, Leelaporn A, Jearanaisilavong J. Multiplex PCR for Detection of Clarithromycin Resistance and Simultaneous Species Identification of *Mycobacterium avium* Complex. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2010;41(3):590-601.
41. Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum Digestion and Decontamination with N- acetyl- L- cysteine- sodium Hydroxide for Culture of Mycobacteria. The American Review of Respiratory Disease. 1963;87:775-9.
42. Yajko DM, Nassos PS, Sanders CA, Gonzalez PC, Reingold AL, Horsburgh CR, et al. Comparison of Four Decontamination Methods for Recovery of *Mycobacterium avium* Complex from Stools. Journal of Clinical Microbiology. 1993;31(2):302-6.
43. Bird IM. High Performance Liquid Chromatography: Principles and Clinical Applications. British Medical Journal. 1989;299(6702):783-7.
44. Jeong J, Kim S-R, Lee SH, Lim J-H, Choi JI, Park JS, et al. The Use of High Performance Liquid Chromatography to Speciate and Characterize the Epidemiology of Mycobacteria. Laboratory Medicine. 2011;42(10):612-7.
45. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic Acid Analysis by High- Performance Liquid Chromatography for Identification of *Mycobacterium* Species. Clinical Microbiology Reviews. 2001;14(4):704-26.
46. Angeletti S. Matrix Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI- TOF MS) in Clinical Microbiology. Journal of Microbiological Methods. 2017;138:20-9.
47. Niitsuma K, Saito M, Koshiba S, Kaneko M. Identification of Mycobacteria by Matrix-assisted Laser Desorption- ionization Time-of-flight Mass Spectrometry- using Reference Strains and Clinical Isolates of *Mycobacterium*. Tuberculosis. 2014;89(5):555-63.
48. Rodriguez-Sanchez B, Ruiz-Serrano MJ, Marin M, Lopez Roa P, Rodriguez-Creixems M, Bouza E. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nontuberculous Mycobacteria from Clinical Isolates. Journal of Clinical Microbiology. 2015;53(8):2737-40.



49. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(5):1790-4.
50. Evans KD, Nakasone AS, Sutherland PA, de la Maza LM, Peterson EM. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium- M. intracellulare* directly from primary BACTEC Cultures by Using Acridinium-ester-labeled DNA Probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30(9):2427-31.
51. Hologic. AccuProbe® *Mycobacterium avium* Complex Culture Identification Test. San Diego, CA, USA. 2016 [updated Jun, 2016; cited 2020 May, 23]. Available from: [https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/102902-IFU-PI\\_001.pdf](https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/102902-IFU-PI_001.pdf).
52. Hologic. AccuProbe® *Mycobacterium avium* Culture Identification Test. San Diego, CA, USA. 2016 [updated Jun, 2016; cited 2020 May, 23]. Available from: [https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/102899-IFU-PI\\_001.pdf](https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/102899-IFU-PI_001.pdf).
53. Hologic. AccuProbe® *Mycobacterium intracellulare* Culture Identification Test. San Diego, CA, USA. 2016 [updated Jun, 2016; cited 2020 May, 23]. Available from: [https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/102901-IFU-PI\\_001.pdf](https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/102901-IFU-PI_001.pdf).
54. Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: Improved Reverse Hybridization Multiple DNA Probe Assay for Mycobacterial Identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(9):4418-20.
55. HainLifescience GmbH. GenoType *Mycobacterium* CM VER 1.0 2014 [updated Oct, 2014; cited 2020 May, 23]. Available from: [www.hain-lifescience.de/kundenmodule/packungsbeilage/download/pdf](http://www.hain-lifescience.de/kundenmodule/packungsbeilage/download/pdf).
56. García-Agudo L, Jesús I, Rodríguez-Iglesias M, García-Martos P. Evaluation of INNO-LiPA Mycobacteria v2 Assay for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42(3):1220-6.
57. Franco-Álvarez de Luna F, Ruiz P, Gutiérrez J, Casal M. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Four Atypical Mycobacterial Species in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(8):3025-7.

58. Lecorche E, Haenn S, Mougari F, Kumanski S, Veziris N, Benmansour H, et al. Comparison of Methods available for Identification of *Mycobacterium chimaera*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24(4):409-13.
59. Maxam AM, Gilbert W. A New Method for Sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(2):560-4.
60. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.
61. Karger BL, Guttman A. DNA sequencing by CE. *Electrophoresis*. 2009;30 Suppl 1(Suppl 1):S196-S202.
62. Mardis ER. Next-generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2008;9:387-402.
63. Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, et al. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PloS One*. 2015;10(2):e0117617.
64. Dai J, Chen Y, Lauzardo M. Web-accessible Database of *hsp65* Sequences from *Mycobacterium* Reference Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(6):2296-303.
65. Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY, Jama M, Hillyard DR, et al. Identification of *Mycobacterium* spp. by Using a Commercial 16S ribosomal DNA Sequencing kit and Additional Sequencing Libraries. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(2):400-6.
66. Mohamed AM, Kuyper DJ, Iwen PC, Ali HH, Bastola DR, Hinrichs SH. Computational Approach Involving Use of the Internal Transcribed Spacer 1 Region for Identification of *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(8):3811-7.
67. De Zwaan R, van Ingen J, van Soolingen D. Utility of *rpoB* gene Sequencing for Identification of Nontuberculous Mycobacteria in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(7):2544-51.
68. Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria by Their *gyrB* Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(1):301-8.

69. Tran AC, Halse TA, Escuyer VE, Musser KA. Detection of *Mycobacterium avium* Complex DNA Directly in Clinical Respiratory Specimens: Opportunities for Improved Turn-around Time and Cost Savings. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014;79(1):43-8.
70. Prammananan T, Phunpruch S, Tingtoy N, Srimuang S, Chaiprasert A. Distribution of hsp65 PCR-restriction Enzyme Analysis Patterns Among *Mycobacterium avium* Complex Isolates in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(10):3819-21.
71. Ryu YJ, Koh W-J, Daley CL. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 2016;79(2):74-84.
72. Xu HB, Jiang RH, Li L. Treatment Outcomes for *Mycobacterium avium* Complex: a Systematic Review and Meta-analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2014;33(3):347-58.
73. Retsema J, Fu W. Macrolides: Structures and Microbial Targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001;18 Suppl 1:S3-10.
74. Nakajima Y. Mechanisms of Bacterial Resistance to Macrolide Antibiotics. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 1999;5(2):61-74.
75. Bryskier A. New Research in Macrolides and Ketolides Since 1997. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 1999;8(8):1171-94.
76. Nakajima Y. Mechanisms of Bacterial Resistance to Macrolide Antibiotics. *Journal of Infection and Chemotherapy* 1999;5(2):61-74.
77. Jamal MA, Maeda S, Nakata N, Kai M, Fukuchi K, Kashiwabara Y. Molecular Basis of Clarithromycin-resistance in *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex. *Tubercle and Lung Disease* 2000;80(1):1-4.
78. Hiramata T, Shiono A, Egashira H, Kishi E, Hagiwara K, Nakamura H, et al. PCR-Based Rapid Identification System Using Bridged Nucleic Acids for Detection of Clarithromycin-Resistant *Mycobacterium avium-M. intracellulare* Complex Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54(3):699-704.

79. Griffith DE, Brown-Elliott BA, Langsjoen B, Zhang Y, Pan X, Girard W, et al. Clinical and Molecular Analysis of Macrolide Resistance in *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;174(8):928-34.
80. Cho EH, Huh HJ, Song DJ, Moon SM, Lee SH, Shin SY, et al. Differences in Drug Susceptibility Pattern between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* Isolated in Respiratory Specimens. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2018;24(4):315-8.
81. Choi H, Kim SY, Lee H, Jhun BW, Park HY, Jeon K, et al. Clinical Characteristics and Treatment Outcomes of Patients with Macrolide-Resistant *Mycobacterium massiliense* Lung Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(2).
82. Chaisson RE, Benson CA, Dube MP, Heifets LB, Korvick JA, Elkin S, et al. Clarithromycin Therapy for Bacteremic *Mycobacterium avium* Complex Disease. A Randomized, Double-blind, Dose-ranging Study in Patients with AIDS. AIDS Clinical Trials Group Protocol 157 Study Team. *Annals of Internal Medicine*. 1994;121(12):905-11.
83. Wallace RJ, Jr., Brown BA, Griffith DE, Girard WM, Murphy DT, Onyi GO, et al. Initial Clarithromycin Monotherapy for *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1994;149(5):1335-41.
84. Morimoto K, Namkoong H, Hasegawa N, Nakagawa T, Morino E, Shiraishi Y, et al. Macrolide-Resistant *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease: Analysis of 102 Consecutive Cases. *Annals of the American Thoracic Society*. 2016;13(11):1904-11.
85. Moon SM, Park HY, Kim SY, Jhun BW, Lee H, Jeon K, et al. Clinical Characteristics, Treatment Outcomes, and Resistance Mutations Associated with Macrolide-Resistant *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(11):6758-65.
86. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ, Jr. Antimicrobial Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012;25(3):545-82.
87. Fakruddin M, Mannan KSB, Chowdhury A, Mazumdar RM, Hossain MN, Islam S, et al. Nucleic Acid Amplification: Alternative Methods of Polymerase Chain Reaction. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2013;5(4):245-52.

88. Karami A, Gill P, Motamedi M, Saghafinia M. A Review of the Current Isothermal Amplification Techniques: Applications, Advantages and Disadvantages. 2011.
89. Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chemical Reviews*. 2015;115(22):12491-545.
90. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in Sputum Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(6):2616-22.
91. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clinical Chemistry*. 2016;62(7):947-58.
92. Zaghloul H, El-shahat M. Recombinase Polymerase Amplification as a Promising Tool in Hepatitis C Virus Diagnosis. *World Journal of Hepatology*. 2014;6(12):916-22.
93. Euler M, Wang Y, Heidenreich D, Patel P, Strohmeier O, Hakenberg S, et al. Development of a Panel of Recombinase Polymerase Amplification Assays for Detection of Biothreat Agents. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(4):1110-7.
94. Amer HM, Abd El Wahed A, Shalaby MA, Almajhdi FN, Hufert FT, Weidmann M. A New Approach for Diagnosis of Bovine Coronavirus Using a Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Journal of Virological Methods*. 2013;193(2):337-40.
95. Sakai K, Trabasso P, Moretti ML, Mikami Y, Kamei K, Gono T. Identification of Fungal Pathogens by Visible Microarray System in Combination with Isothermal Gene Amplification. *Mycopathologia*. 2014;178(1-2):11-26.
96. Crannell ZA, Castellanos-Gonzalez A, Irani A, Rohrman B, White AC, Richards-Kortum R. Nucleic Acid Test to Diagnose Cryptosporidiosis: Lab Assessment in Animal and Patient Specimens. *Analytical Chemistry*. 2014;86(5):2565-71.
97. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Roseneck M. Rapid Detection of *Plasmodium falciparum* with Isothermal Recombinase Polymerase Amplification and lateral Flow Analysis. *Malaria Journal*. 2014;13:99.
98. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Roseneck M. Multiplex Isothermal Solid-phase Recombinase Polymerase Amplification for the Specific and Fast DNA-based Detection of Three Bacterial Pathogens. *Mikrochim Acta*. 2014;181(13-14):1715-23.

99. Aaij C, Borst P. The Gel Electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 1972;269(2):192-200.
100. White HW, Vartak NB, Burland TG, Curtis FP, Kusakawa N. GelStar Nucleic Acid Gel Stain: High Sensitivity Detection in Gels. *BioTechniques*. 1999;26(5):984-8.
101. Sigmaaldrich. Quantitative PCR and Digital PCR Detection Methods 2018 [updated May 2, 2018. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr-and-digital-pcr-detection-methods.html>.
102. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, et al. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*. 2012;22(4):1189-99.
103. A P. Introduction to Real-time PCR and its Applications.
104. Malinen E, Kassinen A, Rinttila T, Palva A. Comparison of Real-time PCR with SYBR Green I or 5'-Nuclease Assays and Dot-blot Hybridization with rDNA-targeted Oligonucleotide Probes in Quantification of Selected Faecal Bacteria. *Microbiology (Reading, England)*. 2003;149(Pt 1):269-77.
105. Keerthirathne TP, Magana-Arachchi DN, Madegedara D, Sooriyapathirana SS. Real time PCR for the Rapid Identification and Drug Susceptibility of Mycobacteria Present in Bronchial Washings. *BMC Infectious Diseases*. 2016;16(1):607.
106. Buderer NM. Statistical Methodology: I. Incorporating the Prevalence of Disease into the Sample Size Calculation for Sensitivity and Specificity. *Academic Emergency Medicine*. 1996;3(9):895-900.
107. Quan TP, Bawa Z, Foster D, Walker T, Del Ojo Elias C, Rathod P, et al. Evaluation of Whole-Genome Sequencing for Mycobacterial Species Identification and Drug Susceptibility Testing in a Clinical Setting: a Large-Scale Prospective Assessment of Performance against Line Probe Assays and Phenotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018;56(2).
108. Debode F, Marien A, Janssen E, Bragard C, Berben G. Influence of the Amplicon Length on Real-time PCR Results. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 2017;21:3-11.

109. TwistAmp. TwistAmp® DNA Amplification Kits Assay Design Manual 2018 [cited 2020 May, 23]. Available from: <https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/RPA-assay-design/twistamp-assay-design-manual-v2-5.pdf?sfvrsn=29>.
110. Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. Understanding and Using Sensitivity, Specificity and Predictive Values. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2008;56(1):45-50.
111. McHugh ML. Interrater Reliability: the Kappa Statistic. *Biochemia Medica (Zagreb)*. 2012;22(3):276-82.
112. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
113. Diel R, Lipman M, Hoefsloot W. High Mortality in Patients with *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease: a Systematic Review. *BMC Infectious Diseases*. 2018;18(1):206.
114. Tan CK, Lai CC, Liao CH, Chou CH, Hsu HL, Huang YT, et al. Mycobacterial Bacteraemia in Patients Infected and Not Infected with Human Immunodeficiency Virus, Taiwan. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(6):627-30.
115. WHO. Global Tuberculosis Report 2019 France2019 [updated 2019; cited 2020 May, 23]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>.
116. Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S. Quantitative and Qualitative Assessment of DNA extracted from Saliva for its Use in Forensic Identification. *Journal of Forensic Dental Sciences*. 2014;6(2):81-5.
117. Radomski N, Kreitmann L, McIntosh F, Behr MA. The Critical role of DNA Extraction for Detection of Mycobacteria in Tissues. *PloS One*. 2013;8(10):e78749.
118. Lodish H BA, Zipursky SL. The Role of Topoisomerases in DNA Replication New York: W. H. Freeman; 2000 [cited 2020 05,23]. 4th [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21703/>].
119. Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H. Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria Based on 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(1):139-47.

120. Kumar A, Kaur J. Primer Based Approach for PCR Amplification of High GC Content Gene: *Mycobacterium* Gene as a Model. *Molecular Biology International*. 2014;2014:937308.
121. Ruiz-Villalba A, van Pelt-Verkuil E, Gunst QD, Ruijter JM, van den Hoff MJ. Amplification of Nonspecific Products in Quantitative Polymerase Chain Reactions (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*. 2017;14:7-18.
122. NEB. PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (M0273) [cited 2020 May, 23]. Available from: <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273>.
123. Liu Q, Thorland EC, Sommer SS. Inhibition of PCR Amplification by a Point Mutation Downstream of a Primer. *BioTechniques*. 1997;22(2):292-4, 6, 8, passim.
124. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR Inhibitors- occurrence, Properties and Removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012;113(5):1014-26.
125. Karger BL, Guttman A. DNA sequencing by CE. *Electrophoresis*. 2009;30 Suppl 1(Suppl 1):S196-202.
126. s.r.o. S. How Do You Work With .ab1 Files? 2020 [cited 2020 05,23]. Available from: <https://www.seqme.eu/en/magazine/sanger-data-analysis>.
127. Zelazny AM, Calhoun LB, Li L, Shea YR, Fischer SH. Identification of *Mycobacterium* Species by *secA1* Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(3):1051-8.
128. Van Ingen J, Turenne CY, Tortoli E, Wallace RJ, Jr., Brown-Elliott BA. A Definition of the *Mycobacterium avium* Complex for Taxonomical and Clinical Purposes, a Review. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*. 2018;68(11):3666-77.
129. Nishiuchi Y, Tamaru A, Suzuki Y, Kitada S, Maekura R, Tateishi Y, et al. Direct Detection of *Mycobacterium avium* in Environmental Water and Scale Samples by Loop-mediated Isothermal Amplification. *Journal of Water and Health*. 2014;12(2):211-9.
130. Cui Z, Li Y, Cheng S, Yang H, Lu J, Zhu H, et al. Direct Identification and Discernment of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* Using a Real-



time RNA Isothermal Amplification and Detection Method. *Tuberculosis* 2015;95(6):764-9.

131. Lobato IM, O'Sullivan CK. Recombinase Polymerase Amplification: Basics, Applications and Recent Advances. *Trends in Analytical Chemistry* 2018;98:19-35.

132. Zhao G, He H, Wang H. Use of a Recombinase Polymerase Amplification Commercial Kit for Rapid Visual Detection of *Pasteurella multocida*. *BMC Veterinary Research*. 2019;15(1):154.

133. Crannell ZA, Rohrman B, Richards-Kortum R. Equipment-free Incubation of Recombinase Polymerase Amplification Reactions Using Body Heat. *PloS One*. 2014;9(11):e112146.

134. Lillis L, Lehman D, Singhal MC, Cantera J, Singleton J, Labarre P, et al. Non-instrumented Incubation of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Rapid and Sensitive Detection of Proviral HIV-1 DNA. *PloS One*. 2014;9(9):e108189.

135. TwistDx. Recombinase Polymerase Amplification, or RPA, is the Breakthrough, Isothermal Replacement to PCR [cited 2020 May, 23]. Available from: <https://www.twistdx.co.uk/en/rpa>.

136. Boyle DS, McNerney R, Teng Low H, Leader BT, Pérez-Osorio AC, Meyer JC, et al. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by Recombinase Polymerase Amplification. *PloS One*. 2014;9(8):e103091.

137. Liu Y, Lei T, Liu Z, Kuang Y, Lyu J, Wang Q. A Novel Technique to Detect EGFR Mutations in Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(5).

138. Karsai A, Müller S, Platz S, Hauser MT. Evaluation of a Homemade SYBR green I Reaction Mixture for Real-time PCR Quantification of Gene Expression. *BioTechniques*. 2002;32(4):790-2, 4-6.

139. Galex. UltraPower DNA/RNA safe dye [cited 2020 May, 23]. Available from: [http://www.gellex.jp/item/ultrapower\\_safedye](http://www.gellex.jp/item/ultrapower_safedye).

140. TaKaRa. SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain [cited 2020 May, 23]. Available from: [http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/5760A\\_5761A\\_5770A\\_5771A\\_j.pdf](http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/5760A_5761A_5770A_5771A_j.pdf).

141. Bustin S, Huggett J. qPCR Primer Design Revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2017;14:19-28.

142. Mao F, Leung WY, Xin X. Characterization of EvaGreen and the Implication of Its Physicochemical Properties for qPCR Applications. BMC Biotechnology. 2007;7:76.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	เทิดศักดิ์ สุธาทู
วัน เดือน ปี เกิด	13 มกราคม 2533
สถานที่เกิด	ศรีสะเกษ
วุฒิการศึกษา	จบการศึกษาระดับปริญญาตรี จากคณะสหเวชศาสตร์ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	6 หมู่ 7 ตำบลโพนยาง อำเภอวังหิน จังหวัดศรีสะเกษ 33270



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY