

## บทที่ 4

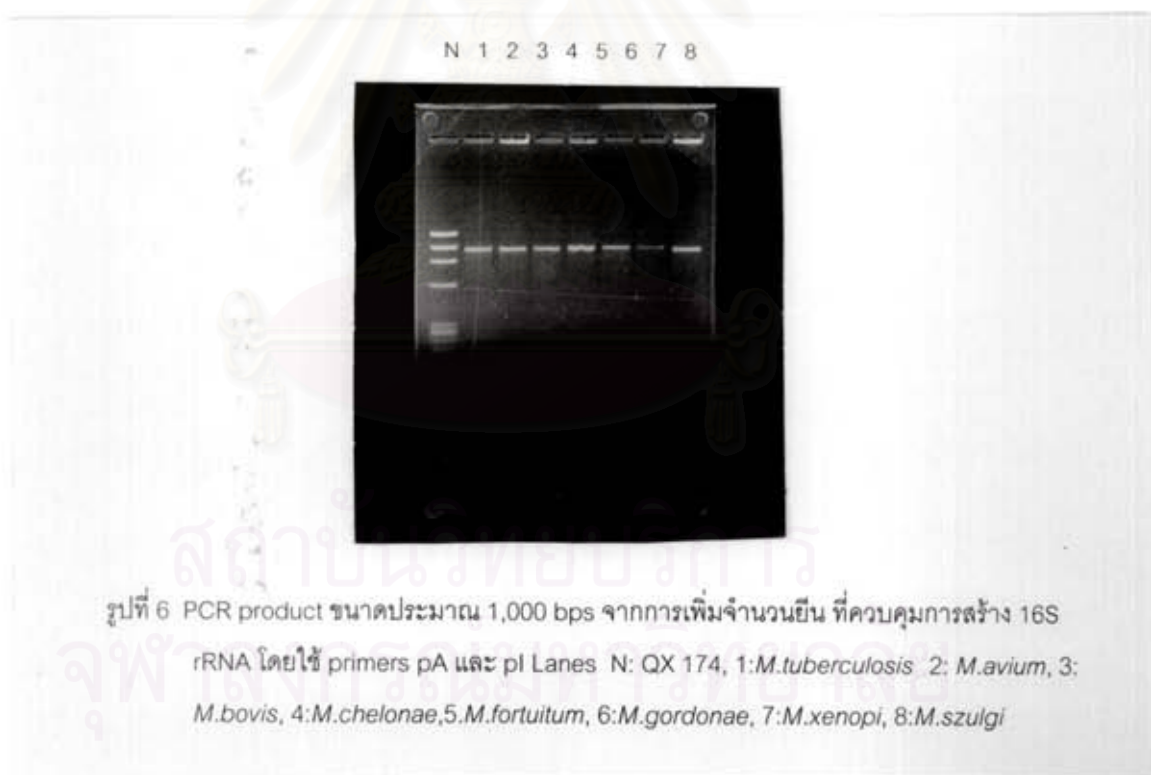
### ผลการทดลอง

#### 1. การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต (PCR product)

วิเคราะห์ DNA product จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ใน 1.5% agarose gel เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน คือ OX 171-Hae III จากผลการทดลองได้ตามความยาวประมาณ 1,000 เบส ปรากฏว่า PCR product ของ McFarland No. 5 ให้ความเข้มข้นสูงสุด ดังแสดงใน รูปที่ 6

2. การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อมาตรฐาน (reference strain) วิเคราะห์ลำดับเบส ด้วยวิธีของ Sanger ผลทดลองพบว่าเชื้อมาตรฐานทั้ง 16 สายพันธุ์ มีลำดับเหมือนกับที่ได้มีผู้รายงานไว้ดังแสดงในตารางที่ 18 และ แสดงรูปภาพ autoradiogram ของ *Mycobacterium* species บาง สปีชีส์ ดังแสดงใน รูปที่ 7 - 10

3. การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย (clinical isolates) วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธีของ Sanger เช่นกัน เปรียบเทียบกับ conventional method และการใช้ Accuprobe (Gen Probe : USA) ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *M.tuberculosis* 23 isolates ให้ผลตรงกันทั้ง 2 วิธี ดังแสดงรูปภาพ autoradiogram รูปที่ 11-14 เชื้อ *M.avium* complex 24 isolate ให้ผลตรงกันทั้ง 2 วิธี ดังแสดงรูปภาพ autoradiogram รูปที่ 15-20 เช่นกัน และเชื้อ *Mycobacterium* species 24 isolates ให้ผลตรงกัน 21 ราย และ 3 รายให้ผลแตกต่างกัน มี 2 รายลำดับเบสเป็น *M.paraffinicum* ผลทดลองด้วยวิธี conventional method เป็น Unidentified ดังแสดงรูปภาพ autoradiogram รูปที่ 21-22 และ 1 ราย ลำดับเบสที่ตำแหน่ง 129-214 เป็น *M.scrofulaceum* และ 439-497 เป็น *M.simiae* เมื่อแยกด้วยวิธี conventional method เป็น *M.simiae* ดังแสดงรูปภาพ autoradiogram รูปที่ 23-24 และผลการทดสอบหาลำดับเบสทั้งหมดที่แยกจากผู้ป่วย ดังแสดงในตารางที่ 19 และ 20



Nucleotide sequence, 5' to 3'		Species
129	175	
TGA TCT GCC CTG CAC TTC	CGG ATA GG-ACCA CGG GAT GCA TG TCT-TGT GGT GGA AAG C	<i>M.tuberculosis</i>
TGA TCT GCC CTG CAC TTC	CGG ATA GG-ACCA CGG GAT GCA TG TCT-TGT GGT GGA AAG C	<i>M.bovis</i>
TGA TCT GCC CTG CAC TTC	CGG ATA GG-ACCA CGG GAT GCA TG TCT-TGT GGT GGA AAG C	<i>M.bovis</i> BCG
TGA TCT GCC CTG CAC TTC	CGG ATA GG-ACCT CAA GAC GCA TG TCT-TCT GGT GGA AAG C	<i>M.avium</i>
TGA TCT GCC CTG CAC TTC	CGG ATA GG-ACCT TTA GGC GCA TG TCT-TTA GGT GGA AAG C	<i>M.intracellulare</i>
TGA TCT GCC CTG CAC TTC	CGG ATA GG-ACCT CTT GGC GCA TG CCT-TTA GGT GGA AAG C	<i>M.scrofulaceum</i>
TGA TCT GCC CTG CAC ACC	CGG ATA GG-ACCT CTT GGC GCA TG CCT-TTA GGT GGA AAG C	<i>M.kansasii</i>
TAA TCT GCC CTG CAC TTC	CGG ATA GG-ACCT CTT GGC GCA TG CCT-TTG GGT GGA AAG C	<i>M.azulgal</i>
TAA TCT GCC CTG CAC ATC	CGA ATA GG-ACCA CAG GAC ACA TG TCC-TGT GGT GGA AAG C	<i>M.gordonae</i>
CGA TCT GCC CTG CAC TTC	CGG ATA GG-ACCA CGG GAT TCA TG TCC-TGT GGT GGA AAG C	<i>M.marinum</i>
TGA TCT GCC CTG CAC TCC	CGG ATA GG-ACCA TGG GAT GCA TG TTC-TGT GGT GGA AAG C	<i>M.terrae</i>
TGA TCT GCC CTG CAC TTT	CGA ATA GG-ACCG CAT GCT GCA TG GTG-TGT GGT GGA AAG C	<i>M.nonchromogenicum</i>
TGA CCT GCC CTG CAC TTC	CGG ATA GG-ACCA TTC TGC GCA TG TGG-GGT GGT GGA AAG C	<i>M.xenopi</i>
TGA TCT GCC CTG CAC TTT	CGA ATATTOACCA CTN GNT GTC TG TGTCTGT AGG GGA AAG C	<i>M.flavescens</i>
TGA TCT GCC CTG CAC TCT	CGG ATA GG-ACCA CAC ACT TCA TG GTG-AGT GGT GCA AAG C	<i>M.chelonae</i>
TGA TCT GCC CTG CAC TTC	CGG ATA GGT ACCA CGC GCT TCA TG GTG-TGT GGT GGA AAG C	<i>M.fortitum</i>

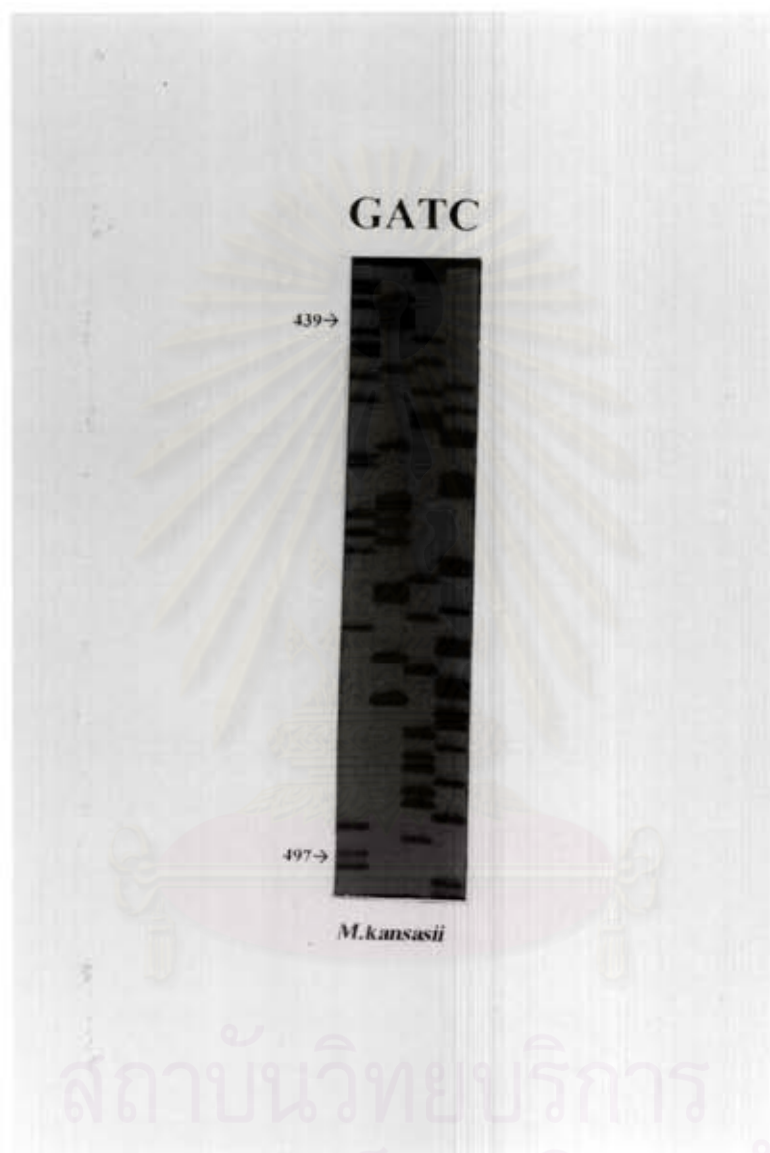
ตารางที่ 18 สรุปผลการทดสอบลำดับเบสของเชื้อมาตรฐานบน 16S rDNA ตำแหน่ง 129-214

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





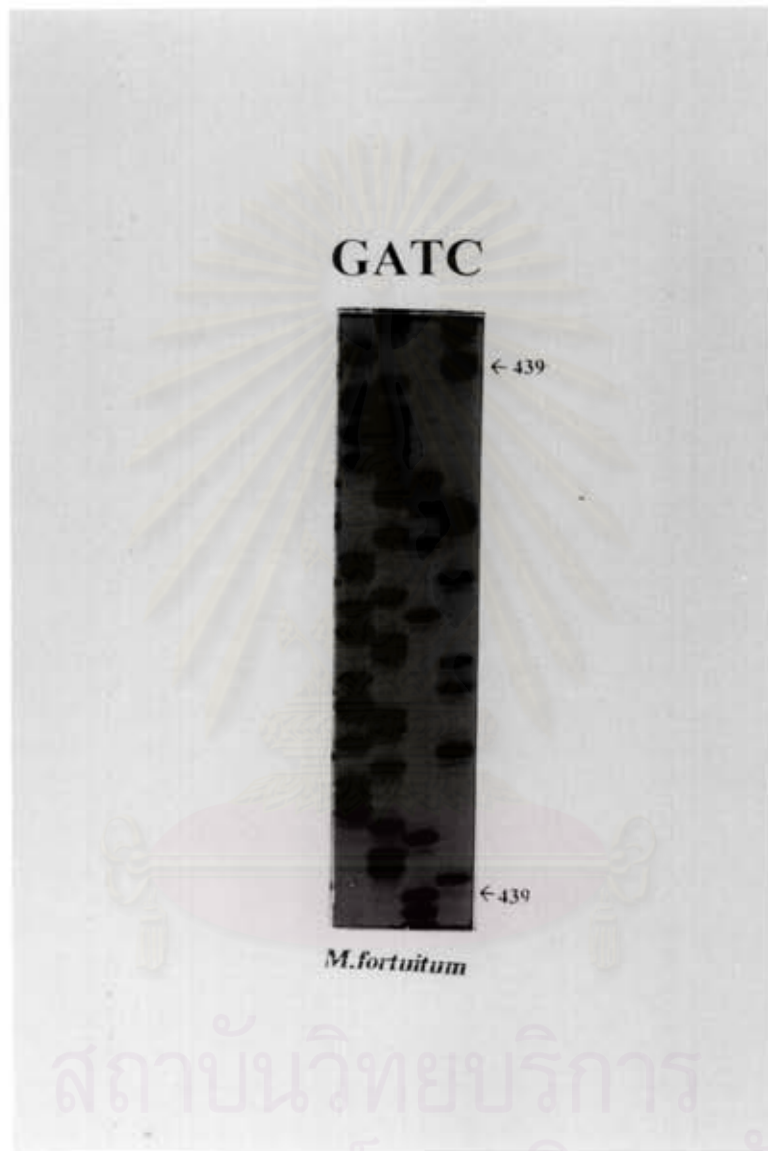
สถาบันวิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รูปที่ 7 Autoradiogram ของ *M.kansasii* ATCC 12478 region A



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รูปที่ 8 Autoradiogram ของ *M.kansasii* ATCC 12478 region B



รูปที่ 9 Autoradiogram ของ *M. fortuitum* ATCC 6841 region A

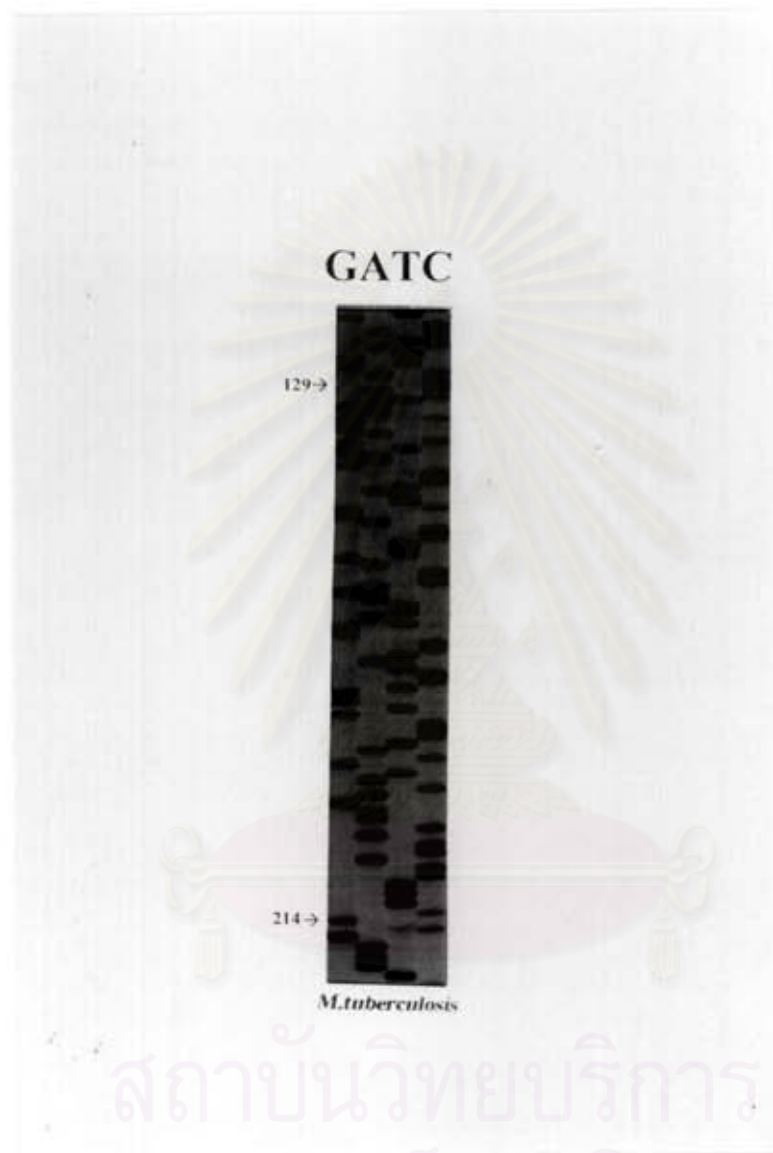


รูปที่ 10 Autoradiogram ของ *M. fortuitum* ATCC 6841 region B

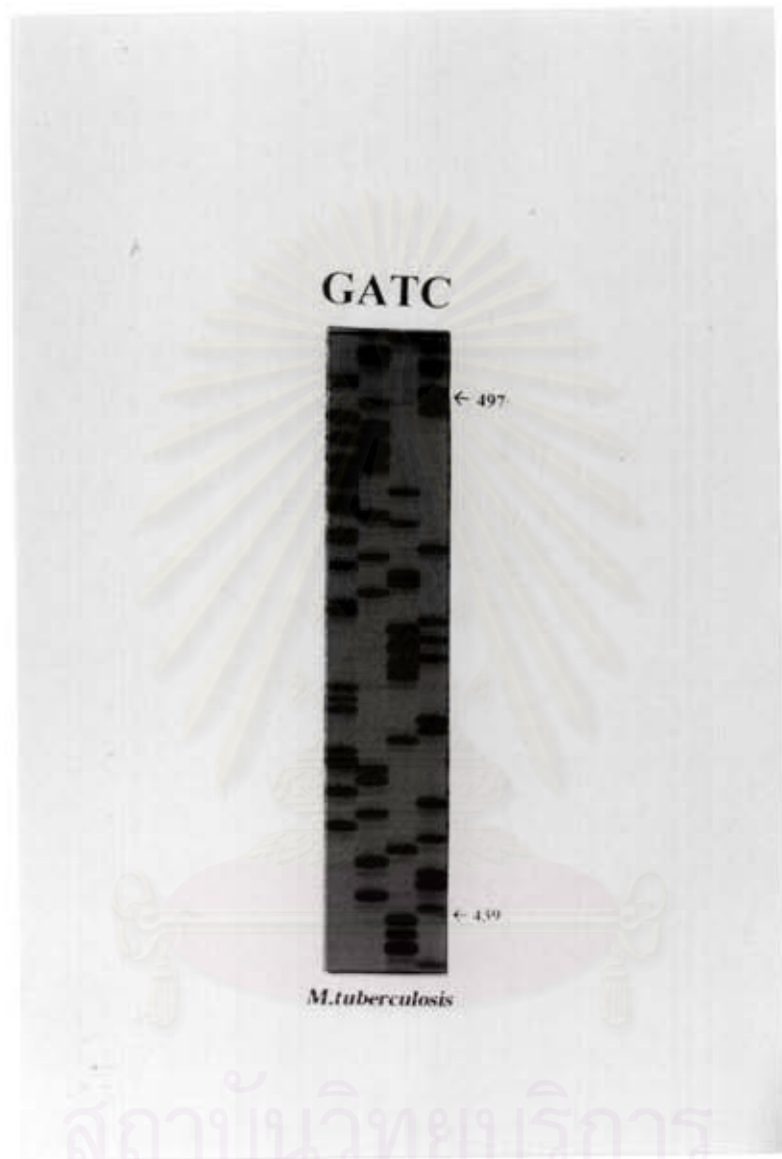




สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รูปที่ 11 Autoradiogram ของ *M.tuberculosis* region A by sequencing primer pB



รูปที่ 12 Autoradiogram ของ *M.tuberculosis* region A by sequencing primer pC



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 Autoradiogram ของ *M.tuberculosis* region B by sequencing primer pX

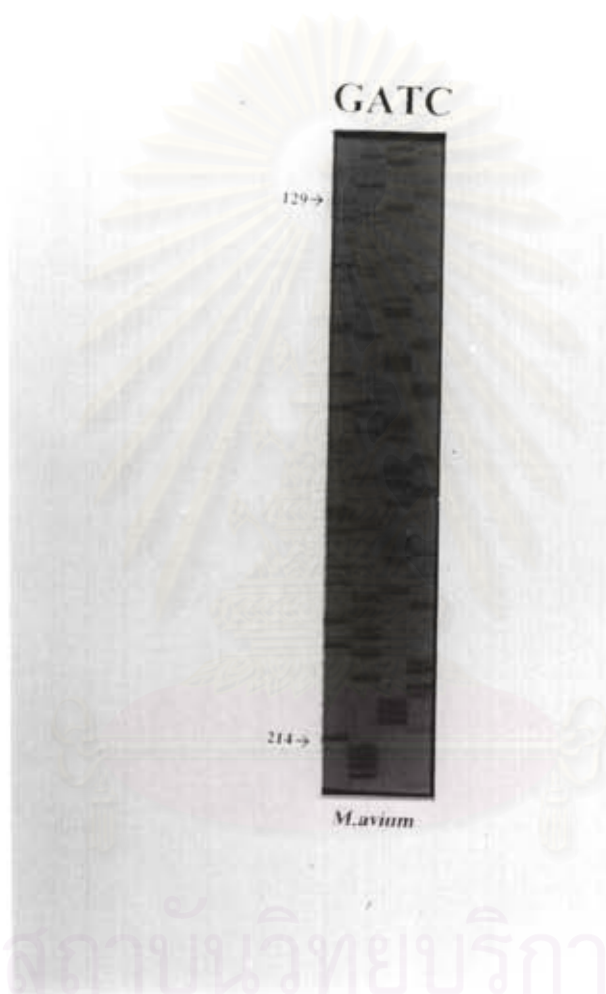


รูปที่ 14 Autoradiogram ของ *M.tuberculosis* region B by sequencing primer pY



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 Autoradiogram ของ *M.avium* region A by sequencing primer pB



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 Autoradiogram ของ *M. avium* region A by sequencing primer pC



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รูปที่ 17 Autoradiogram ของ *M. avium* region B by sequencing primer pX

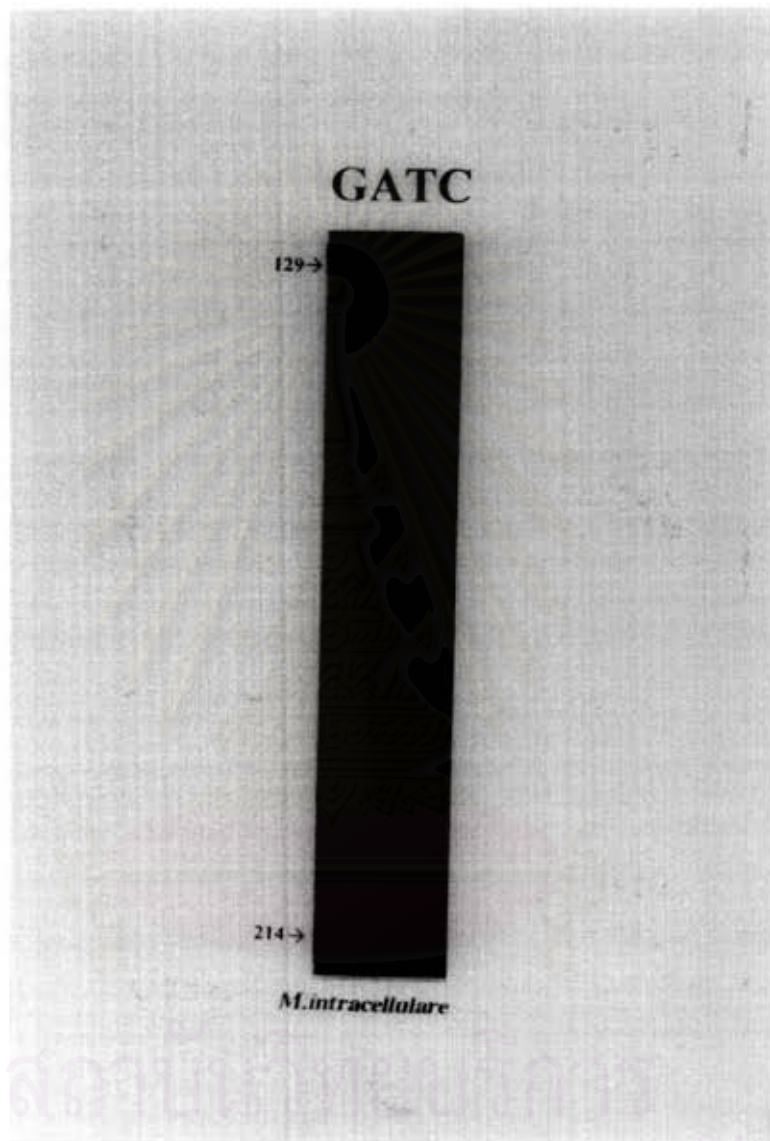


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รูปที่ 18 Autoradiogram ของ *M. avium* region B by sequencing primer pY

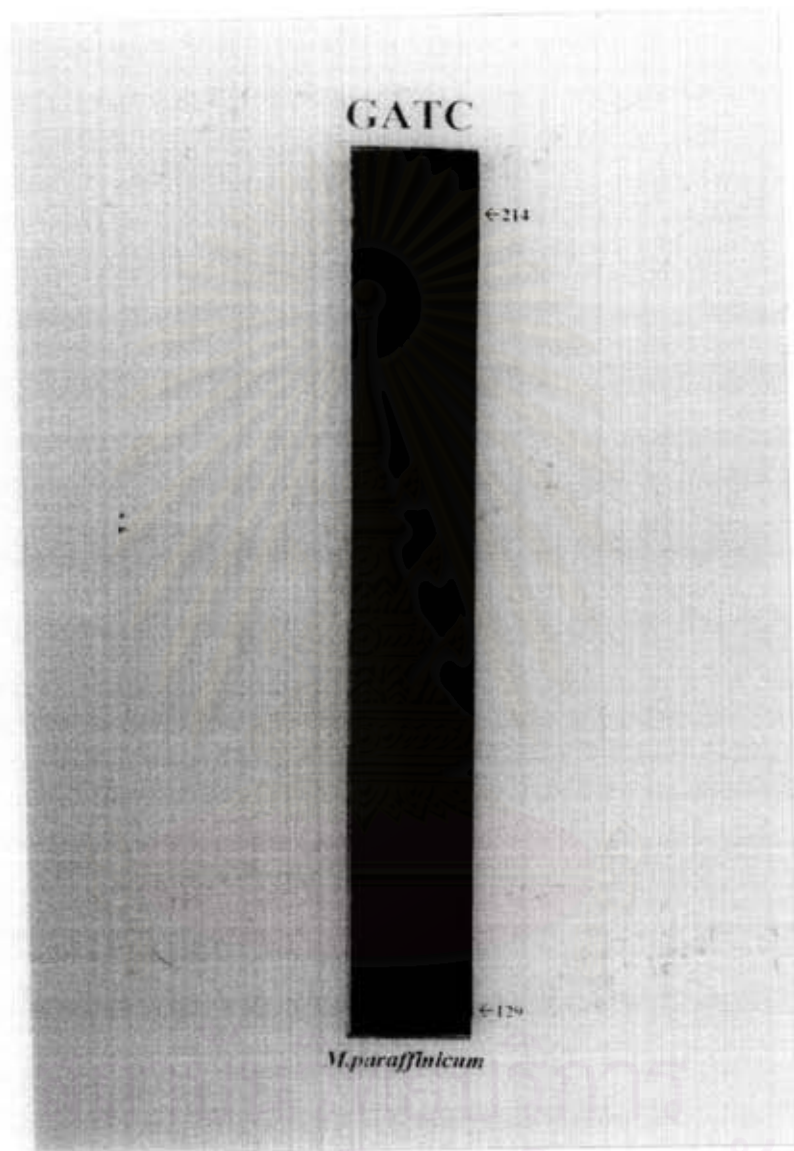




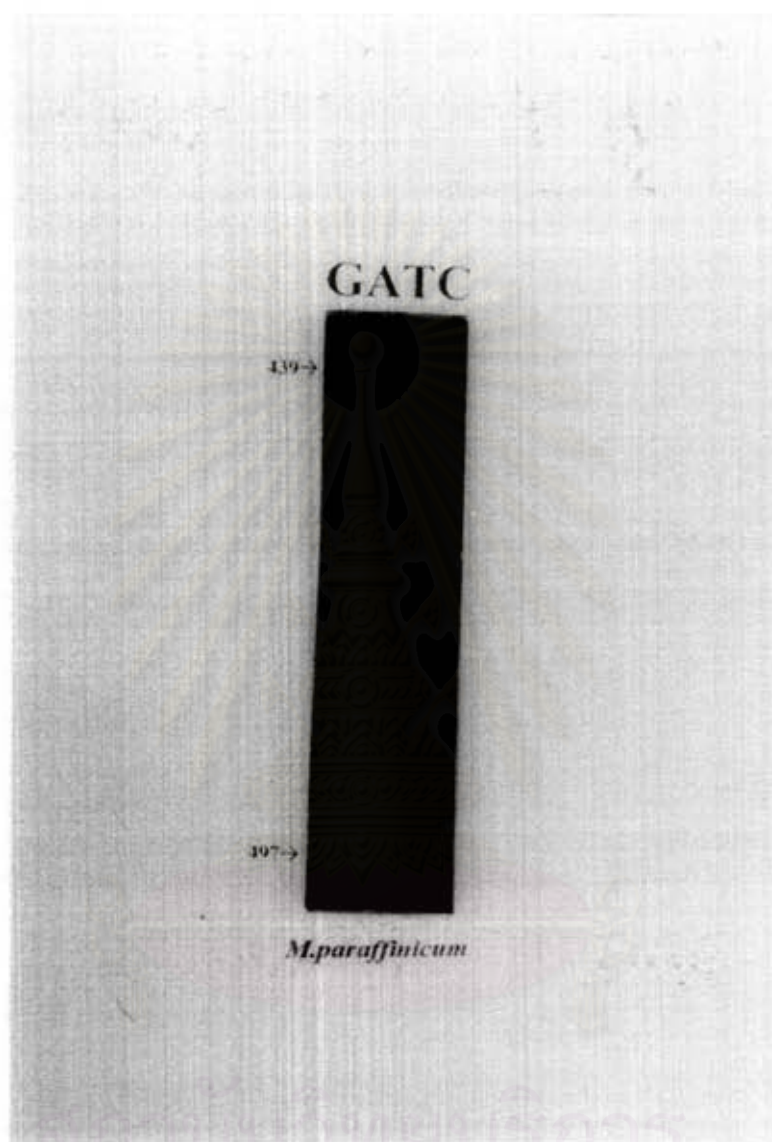
รูปที่ 19 Autoradiogram ของ *M.intracellulare* region A by sequencing primer pB



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รูปที่ 20 Autoradiogram ของ *M.intracellulare* region A by sequencing primer pC

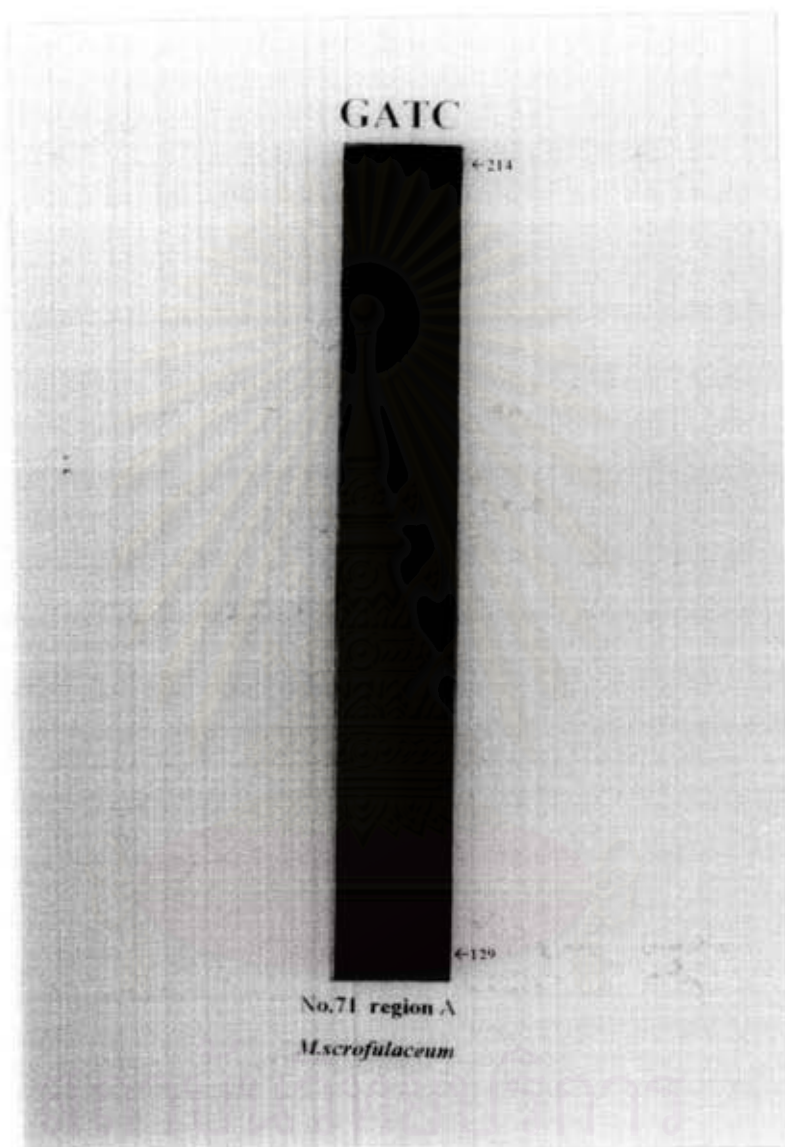


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รูปที่ 21 Autoradiogram ของ *M.paraffinicum* region A



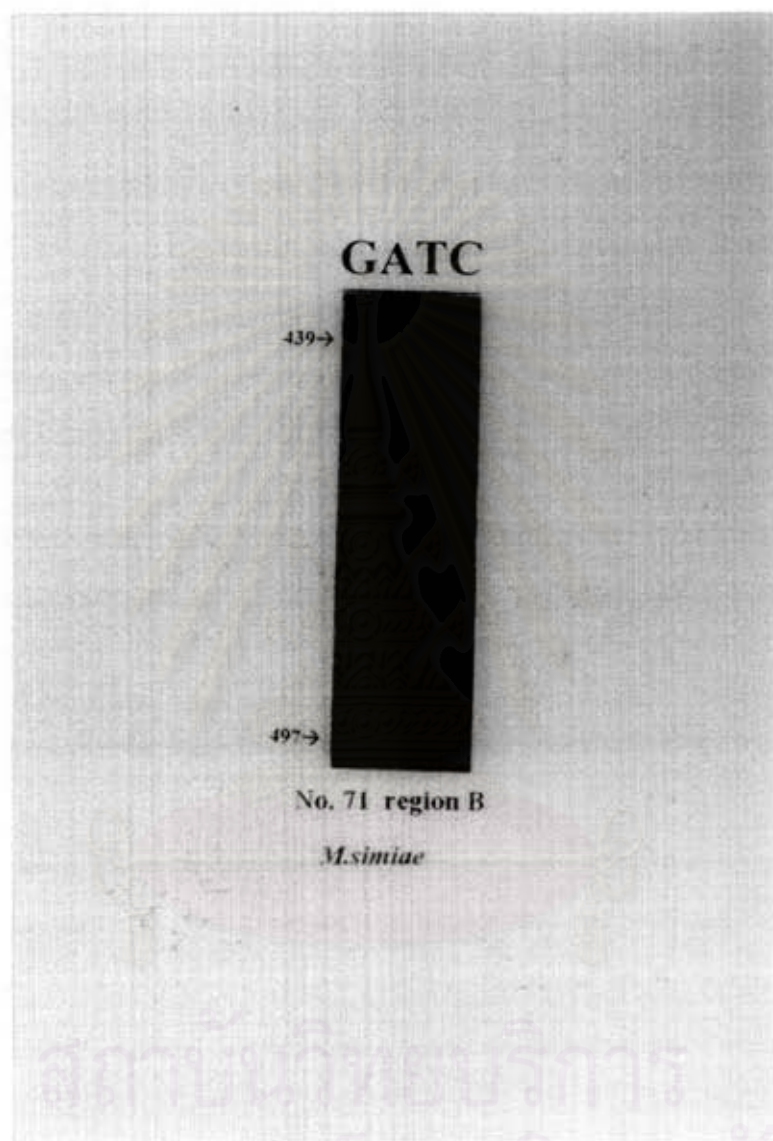
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 Autoradiogram ของ *M.paraffinicum* region B



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 Autoradiogram ของ Isolate No 71 region A



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
สถาบันวิจัยจุลชีววิทยา  
รูปที่ 24 Autoradiogram ของ Isolate No 71 region B

ตารางที่ 19 รูปผลการทดสอบหาลำดับเบสของ 16S rDNA

Isolated	Region A 129-214	Region B 439-497	Identification
1-23	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.tuberculosis</i>
24-44	<i>M.avium</i>	<i>M.avium</i>	<i>M.avium</i>
45-47	<i>M.intracellulare</i>	<i>M.intracellulare</i>	<i>M.intracellulare</i>
48-58	<i>M.kansasii</i>	<i>M.kansasii</i>	<i>M.kansasii</i>
59-63	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>
64-66	<i>M.chelonae</i>	<i>M.chelonae</i>	<i>M.chelonae</i>
67-68	<i>M.gordonae</i>	<i>M.gordonae</i>	<i>M.gordonae</i>
69-70	<i>M.paraffinicum</i>	<i>M.paraffinicum</i>	<i>M.paraffinicum</i>
71	<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M.simiae</i>	Slowly growing species related to <i>M.simiae</i>

ตารางที่ 20 สรุปผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี Accuprobe และ ลำดับเบสของ 16S rDNA

Isolate	Biochemical and Accuprobe*	16S rDNA sequencing result
1-23	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.tuberculosis</i>
24-44	<i>M.avium</i> complex	<i>M.avium</i>
45-47	<i>M.avium</i> complex	<i>M.intracellulare</i>
48-58	<i>M.kansasii</i>	<i>M.kansasii</i>
59-63	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>
64-66	<i>M.chelonae</i>	<i>M.chelonae</i>
67-68	<i>M.gordonae</i>	<i>M.gordonae</i>
69-70	Unidentified	<i>M.paraffinicum</i>
71	<i>M.simiae</i>	Slowly growing species related to <i>M.simiae</i>

\*Accuprobe ; *M.tuberculosis* complex, *M.avium* complex, *M.kansasii*  
*M.gordonae*

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยครั้งนี้

1. สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว ภายใน 50 ชั่วโมงหลังจากเพาะเชื้อขึ้น และทำการทดสอบหาลำดับเบสของ ribosomal DNA fragment เพียง 1 ครั้ง ก็สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อได้
2. เป็นพื้นฐานเพื่อการพัฒนาวิธีการที่สามารถนำมาใช้ทดสอบในสิ่งส่งตรวจโดยตรง จากผู้ป่วยต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย