

ประสิทธิภาพของยีน TEF ในการจัดจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ที่เพาะได้จากผู้ป่วยไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2566

TRANSLATION ELONGATION FACTOR GENE (TEF): A GOOD CANDIDATE FOR
Aspergillus CLASSIFICATION ISOLATED FROM THAI PATIENT



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 2023

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของยีน TEF ในการจัดจำแนกเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่เพาะได้จากผู้ป่วยไทย
โดย	ร.อ.หญิงประภาพร คชพงษ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.นวพร วรศิลป์ชัย

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงษ์จิรกุล)	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
.....	
(อาจารย์ ดร.นวพร วรศิลป์ชัย)	กรรมการ
.....	
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันท์ริ ชัยชนะวงศาโรจน์)	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
.....	
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐภาณี ถนนอมศรีเดชชัย)	

ประภาพร คชพงษ์ : ประสิทธิภาพของยีน TEF ในการจัดจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ที่เพาะได้จากผู้ป่วยไทย . (

TRANSLATION ELONGATION FACTOR GENE (TEF): A GOOD CANDIDATE FOR *Aspergillus* CLASSIFICATION ISOLATED FROM THAI PATIENT) อ.ที่ปรึกษาหลัก : อ. ดร. นวพร วรศิลป์ชัย

Aspergillosis เป็น โรคติดเชื้ออันตรายถึงแก่ชีวิต มีสาเหตุมาจากเชื้อราในجنัส *Aspergillus* การวินิจฉัยโรคในปัจจุบัน การเพาะแยกเชื้อและจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยายังคงเป็นวิธีมาตรฐาน การตรวจหา galactomannan มักใช้ตรวจวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงเท่านั้น ในขณะที่เทคนิคทางอณูชีววิทยาอาศัยข้อมูลสารพันธุกรรมของ “its region” ในการจำแนกกลุ่มเชื้อระดับสปีชีส์ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวถูกพิสูจน์ว่าสามารถจำแนกกลุ่มเชื้อราก่อโรคในคนในระดับสปีชีส์ได้ต่ำ ในด้านการรักษา สปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* มักไม่ถูกนำมาพิจารณาาร่วมเพื่อการเลือกกลุ่มยาแม้ว่ายังคงมีผู้ป่วยบางรายที่ตอบสนองต่อการรักษาไม่ดีเนื่องจากเชื้อสาเหตุคือต่อยาด้านเชื้อรา ด้วยเหตุดังกล่าวเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์และรูปแบบความไวรับต่อยา การค้นหายีนที่สามารถจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ในระดับสปีชีส์ได้อย่างแม่นยำจึงเป็นสิ่งจำเป็น ยีน “*tef-1A*” เป็นสารพันธุกรรมที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความสัมพันธ์สามารถจำแนกเชื้อราเส้นสายในระดับสปีชีส์ได้สูง ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบผลการจำแนกกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 227 ตัวอย่าง โดยใช้ข้อมูลสารพันธุกรรม “its region” และ “*tef-1A*” จากผลการศึกษาพบว่าสารพันธุกรรมจากยีน “*tef-1A*” ($D=0.8461$) มีความสามารถในการจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์สูงกว่าบริเวณ “its” ($D=0.796$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน section *Fumigati* ข้อมูลสารพันธุกรรมจาก “its region” สามารถแบ่งเชื้อกลุ่มดังกล่าวออกได้เพียง 1 สปีชีส์ คือ *A. fumigatus* ในขณะที่ยีน “*tef-1A*” สามารถแบ่งออกเป็น *A. fumigatus* และอีก 2 สปีชีส์ คือ *A. lentulus* และ *A. udagawa* ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา amphotericin B โดยกำเนิด โดยสรุป ผลจากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดยใช้ยีนทุติยภูมิ “*tef-1A*” สามารถบ่งชี้กลุ่มยาที่เหมาะสมต่อการรักษาได้

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2566	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6470006137 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: *Aspergillus* spp., Translation elongation factor 1 alpha, Internal transcribed spacer, intrinsic resistant, section *Fumigati*

P r a p a p o r n K o t c h a p o n g :
TRANSLATION ELONGATION FACTOR GENE (TEF): A GOOD CANDIDATE FOR *Aspergillus* CLASSIFICATION ISOLATED FROM THAI PATIENT. Advisor: NAVAPORN WORASILCHAI, Ph.D.

Aspergillosis is a life-threatening disease caused by fungi in the genus *Aspergillus*. To diagnose, cultivation is defined as a standard protocol. Detecting galactomannan usually use as a screening tool in high-risk group patient whereas molecular method based on “*its* region” plays the critical role in the species level identification. However it has been claimed low power of discrimination in the species level among human pathogenic fungi. In term of treatment. The species of *Aspergillus* has not been considered for antifungal selection even though the poor treatment response caused by strain resistant. To investigate the correlation across definite species and susceptibility profile, gene as secondary barcode of *Aspergillus* need to be proved. The “*tef-1 α* ” is one of the good candidates be approved as high power of discrimination gene in several group of hyaline septate fungi. In here, we compared the species identification obtained by molecular method based on “*its* region” and “*tef-1 α* gene” in Thai clinical *Aspergillus* 227 isolates. The higher power of discrimination of “*tef-1 α* gene” (0.8461) than “*its* region” (0.796) has been proved. Focusing on section *Fumigati*, were classified whereas only *A. fumigatus* by “*its* region” and classified by “*tef-1 α* gene” to be *A. fumigatus* and 2 species *A. lentulus* and *A. udagawae* that due to the intrinsic resistant against amphotericin B. In summary, based on this study, *Aspergillus* species identification using “*tef-1 α* gene” providing antifungal selection guidance is recommended in clinical practice.

Field of Study:	Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology	Student's Signature
Academic Year:	2023	Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ ดร. ทนพญ.นวพร วรศิลป์ชัย อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณามอบโอกาสในการเป็นนิสิตในความดูแลของท่าน คอยชี้แนะ ให้ความช่วยเหลือและแรงสนับสนุนในทุกด้าน ตลอดจนแนวทางแก้ปัญหาต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ ด้วยความตระหนักถึงความทุ่มเทของอาจารย์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อันได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร. ทนพญ.ปาหนัน รั้ววงศ์จิรกุล ประธานสอบ รองศาสตราจารย์ ดร.ทนพญ.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ กรรมการภายใน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนพญ. ณัฐภานินี ถนอมศรีเดชชัย อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา กรรมการภายนอก สำหรับคำแนะนำด้านวิชาการเพื่อให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการวิทยา หน่วยจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ในความอนุเคราะห์เชื้อราตัวอย่างในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนค่าเล่าเรียนนิสิต คณะสหเวชศาสตร์ ระดับบัณฑิตศึกษา ปีการศึกษา 2565

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ถ่ายทอดประสบการณ์และวิชาความรู้ในศาสตร์ต่างๆตั้งแต่วันแรกของการเป็นนิสิต จนกระทั่งสามารถนำความรู้เหล่านั้นมาทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงได้ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณทั้งเพื่อนและพี่น้อง คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา รวมถึงให้กำลังใจ และท้ายที่สุดขอขอบคุณบุพการีและสมาชิกครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุนทุกด้านในการศึกษานี้

ขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ประภาพร คชพงษ์

สารบัญ

	หน้า
.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูปภาพ	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์การวิจัย	5
3. ขอบเขตงานวิจัย.....	6
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
1. โรค aspergillosis	8
1.1 บทนิยาม	8
1.2 ระบาดวิทยา.....	8
1.3 เชื้อสาเหตุก่อโรค aspergillosis.....	9
1.4 ลักษณะอาการของโรค aspergillosis	12
1.5 การรักษาโรค aspergillosis	14
1.6 การตรวจวินิจฉัย.....	16

การเพาะแยกเชื้อ (cultivation)	17
การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (serology)	21
การตรวจด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (molecular)	22
2. เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อการจำแนกกลุ่มเชื้อ	24
2.1 การแยกสารพันธุกรรมออกจากเซลล์สิ่งมีชีวิต	24
2.2 การตรวจวิเคราะห์บริเวณหรือยีนเป้าหมาย (target region/gene analytic)	25
2.3 ยีน Translation elongation factors (<i>tef-1α</i>)	26
2.4 การศึกษาลำดับเบสของสารพันธุกรรม (DNA sequencing)	28
2.5 การแปลรหัสลำดับเบสของสารพันธุกรรม	28
2.6 การวิเคราะห์ความใกล้ชิดของสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตจากผลผลิตสารพันธุกรรม	28
2.7 การทำแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic trees)	29
3. การทดสอบความไวรับต่อยาต้านเชื้อราในเชื้อ <i>Aspergillus</i>	32
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	33
1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์	33
2. เครื่องมือ	33
3. วิธีการทดลอง	33
3.1 การคำนวณหากลุ่มตัวอย่าง (sample size)	33
3.2 การขอจริยธรรมการวิจัย	35
3.3 การเก็บตัวอย่างเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ใช้ในการศึกษา	35
3.4 การเก็บข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างเชื้อ	36
3.5 เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในงานวิจัย	36
3.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อ	37
3.7 การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ <i>Aspergillus</i>	37
3.8 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ DNA ที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง	38

3.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	38
3.10 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค real time PCR.....	38
3.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค sanger DNA sequencing	39
3.12 การสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Clustal Omega.....	41
3.13 การแปลผล phylogenetic tree.....	41
3.14 การคำนวณค่า discriminatory power (D)	47
3.15 การวิเคราะห์ร้อยละความคล้าย (%similarity)	47
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	48
1. ผลการเก็บตัวอย่าง	48
2. ผลการเพาะเชื้อ	49
3. ผลการสกัดตัวอย่าง.....	51
4. ผลการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ DNA ที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง.....	51
5. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ ที่ใช้ในงานวิจัย	52
6. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ <i>tef-1α</i> ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....	53
7. ผลการทดสอบหาปริมาณของ DNA template ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ <i>tef-1α</i>	54
8. ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสารพันธุกรรมบริเวณ <i>its</i> และ <i>tef-1α</i>	55
9. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม WIMP	56
10. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บนฐานข้อมูล NCBI.....	58
11. ผลการสร้าง phylogenetic tree.....	68
12. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์.....	88
13. ผลการคำนวณค่า discriminatory power (D).....	89
14. ผลการวิเคราะห์ร้อยละความคล้าย (%similarity).....	89
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	96

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	105
บรรณานุกรม	107
ภาคผนวก	108
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	109
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง	111
ประวัติผู้เขียน	153



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 โปรแกรมสำหรับสร้าง phylogenetic tree.....	31
ตารางที่ 2 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	38
ตารางที่ 3 ตัวอย่างการจัดกลุ่มข้อมูลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการจำแนกเชื้อ <i>Aspergillus</i> ด้วย บริเวณ <i>its</i> และ <i>tef-1α</i>	42
ตารางที่ 4 ตัวอย่างการคำนวณหาความสัมพันธ์ในการจำแนกเชื้อ <i>Aspergillus</i> ด้วยบริเวณ <i>its</i> และ <i>tef-1α</i> ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS.....	42
ตารางที่ 5 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จาก ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i> และผลความไวรับต่อยา amphotericin B.....	43
ตารางที่ 6 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จาก ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i> และผลความไวรับต่อยา amphotericin B ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS	43
ตารางที่ 7 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จาก ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i> และผลความไวรับต่อยา amphotericin B.....	44
ตารางที่ 8 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จาก ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i> และผลความไวรับต่อยา amphotericin B ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS	44
ตารางที่ 9 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จาก ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i> และลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานที่ได้จากการ เพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation).....	45
ตารางที่ 10 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i> และลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานที่ได้จากการ เพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS.....	45
ตารางที่ 11 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i> และลักษณะทางมหสังฐาน/จุลสังฐาน ที่ได้จากการ เพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation).....	46
ตารางที่ 12 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i> และลักษณะทางมหสังฐาน/จุลสังฐานที่ได้จากการ เพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS.....	46

ตารางที่ 13 ตัวอย่างการวิเคราะห์หิวเคราะห์ค่า %similarity จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ <i>its</i> ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> แต่ละสปีชีส์.....	47
ตารางที่ 14 จำนวนตัวอย่างแต่ละสายพันธุ์ที่ให้ค่า MIC ยา amphotericin B ตั้งแต่ 0.5-16 mg/L48	
ตารางที่ 15 ผลการตรวจสอบลักษณะทางมหัศจรรย์ของเชื้อตัวอย่างที่เพาะลงบนอาหาร SDA เป็นเวลา 7 วัน.....	50
ตารางที่ 16 รายละเอียดผลการ blast ไพรมเมอร์ <i>its</i> และ <i>tef-1α</i> ด้วยโปรแกรม NCBI.....	53
ตารางที่ 17 สรุปผลการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree จากบริเวณ <i>its</i> และยีน <i>tef-1α</i>	80
ตารางที่ 18 สรุปผลการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree จากบริเวณ <i>its</i> และยีน <i>tef-1α</i> กับค่า MIC ยา amphotericin B.....	85
ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson Chi-Square.....	88
ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ค่า %similarity จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ <i>its</i> ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> แต่ละสปีชีส์.....	90
ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์ค่า %similarity จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน <i>tef-1α</i> ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> แต่ละสปีชีส์.....	91
ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ค่า %similarity จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ <i>its</i> ของเชื้อรา ก่อโรคสายพันธุ์อื่นกับเชื้อ <i>Aspergillus</i>	92
ตารางที่ 23 ผลการวิเคราะห์ค่า %similarity จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน <i>tef-1α</i> ของเชื้อรา ก่อโรคสายพันธุ์อื่นกับเชื้อ <i>Aspergillus</i>	93
ตารางที่ 24 เปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ภายใน clade เดียวกันของเชื้อ <i>Aspergillus</i> แต่ละสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม bioedit.....	94
ตารางที่ 25 ผลการจำแนกเชื้อด้วยวิธี cultivation และผล MIC ยา amphotericin B.....	111
ตารางที่ 26 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบคุณภาพของ DNA.....	113
ตารางที่ 27 แสดงข้อมูลการทดสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer.....	114
ตารางที่ 28 แสดงค่า Ct การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค real time PCR ด้วยไพรมเมอร์ <i>its</i>	120
ตารางที่ 29 แสดงค่า Ct การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค real time PCR ด้วยไพรมเมอร์ <i>tef-1α</i>	124
ตารางที่ 30 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ <i>A. fumigatus</i> ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรมเมอร์ <i>its</i>	126

ตารางที่ 31 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ <i>A. flavus</i> ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ <i>its</i>	128
ตารางที่ 32 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ <i>A. niger</i> ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ <i>its</i>	130
ตารางที่ 33 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ <i>A. terreus</i> ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ <i>its</i>	132
ตารางที่ 34 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ <i>A. nidulans</i> ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ <i>its</i>	134
ตารางที่ 35 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ <i>A. fumigatus</i> ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย <i>tef-1α</i> ไพรเมอร์	135
ตารางที่ 36 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ <i>A. flavus</i> ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย <i>tef-1α</i> ไพรเมอร์	138
ตารางที่ 37 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ <i>A. niger</i> ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ <i>tef-1α</i>	140
ตารางที่ 38 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ <i>A. terreus</i> ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ <i>tef-1α</i>	142
ตารางที่ 39 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ <i>A. nidulans</i> ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ <i>tef-1α</i>	144
ตารางที่ 40 ผลการจัดกลุ่มข้อมูลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการจำแนกเชื้อ <i>Aspergillus</i> ด้วยบริเวณ <i>its</i> และ <i>tef-1α</i>	145
ตารางที่ 41 ผลการคำนวณหาความสัมพันธ์ในการจำแนกเชื้อ <i>Aspergillus</i> ด้วยบริเวณ <i>its</i> และ <i>tef-1α</i> ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS	145
ตารางที่ 42 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i> และผลความไวรับต่อยา amphotericin B	146
ตารางที่ 43 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i> และผลความไวรับต่อยา amphotericin B ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS	146
ตารางที่ 44 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i> และผลความไวรับต่อยา amphotericin B	147

ตารางที่ 45 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i> และผลความไวรับต่อยา amphotericin B ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS	147
ตารางที่ 46 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i> และลักษณะทางมหัศจรรย์และจุลสัญฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation).....	148
ตารางที่ 47 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i> และลักษณะทางมหัศจรรย์และจุลสัญฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS.....	148
ตารางที่ 48 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i> และลักษณะทางมหัศจรรย์/จุลสัญฐาน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation).....	149
ตารางที่ 49 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i> และลักษณะทางมหัศจรรย์/จุลสัญฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS.....	149

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงร้อยละความคล้าย (%similarity) ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ <i>its</i>	3
ภาพที่ 2 phylogenetic tree ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ที่สร้างจากข้อมูลสารพันธุกรรมยีน <i>tef-1α</i>	5
ภาพที่ 3 แผนผังแสดงขั้นตอนงานวิจัย	6
ภาพที่ 4 ลักษณะทางจุลสัณฐานของเชื้อรากลุ่ม <i>Aspergillus</i>	17
ภาพที่ 5 ลักษณะทางมหสัณฐานและจุลสัณฐานของเชื้อ <i>A. fumigatus</i>	18
ภาพที่ 6 ลักษณะทางมหสัณฐานและจุลสัณฐานของเชื้อ <i>A. flavus</i>	19
ภาพที่ 7 ลักษณะทางมหสัณฐานและจุลสัณฐานของเชื้อ <i>A. niger</i>	19
ภาพที่ 8 ลักษณะทางมหสัณฐานและจุลสัณฐานของเชื้อ <i>A. terreus</i>	20
ภาพที่ 9 ลักษณะทางมหสัณฐานและจุลสัณฐานของเชื้อ <i>A. nidulans</i>	20
ภาพที่ 10 หลักการตรวจวินิจฉัยด้วย anti-galactomannan	22
ภาพที่ 11 การเรียงตัวของ <i>its1</i> , <i>its2</i> และ ribosomal DNA genomic	23
ภาพที่ 12 ภาพโครงสร้าง DNA ของเชื้อราที่ใช้การตรวจหาด้วยไพรเมอร์ <i>its</i> และไพรเมอร์ <i>tef-1α</i>	27
ภาพที่ 13 การคำนวณขนาดตัวอย่างที่ต้องใช้ในงานวิจัยด้วยโปรแกรม G-Power.....	35
ภาพที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม WIMP.....	40
ภาพที่ 15 แสดงขั้นตอนการทดลองในการศึกษาสารพันธุกรรมของเชื้อ <i>Aspergillus</i>	41
ภาพที่ 16 แผนภูมิรูปแท่งแสดงร้อยละของตัวอย่างที่ให้ค่า MIC ของยา amphotericin B อยู่ในช่วง 0.5-16 mg/L	49
ภาพที่ 17 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราที่เพาะในอาหารเป็นเวลา 3 วัน.....	50
ภาพที่ 18 แผนภูมิวงกลมแสดงร้อยละของตัวอย่างที่มีค่า OD260/280 และความเข้มข้นของ DNA อยู่ในช่วงต่างๆ	52
ภาพที่ 19 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ <i>tef-1α</i> ที่เหมาะสม	54
ภาพที่ 20 ผลการทดสอบหาปริมาณ DNA ที่เหมาะสมในการทดสอบด้วยไพรเมอร์ <i>tef-1α</i>	55
ภาพที่ 21 แผนภูมิรูปแท่งแสดงร้อยละของตัวอย่างที่มีค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 และค่า Ct มากกว่า 30.....	56

ภาพที่ 22 ภาพผลของการจัดกลุ่มเชื้อจากบริเวณ <i>its</i> ด้วยโปรแกรม WIMP.....	57
ภาพที่ 23 ภาพผลของการจัดกลุ่มเชื้อจากยีน <i>tef-1α</i> ด้วยโปรแกรม WIMP.....	57
ภาพที่ 24 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ <i>its</i> ของเชื้อ <i>A. fumigatus</i>	59
ภาพที่ 25 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ <i>tef-1α</i> ของเชื้อ <i>A. fumigatus</i>	59
ภาพที่ 26 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ <i>its</i> ของเชื้อ <i>A. flavus</i>	61
ภาพที่ 27 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ <i>tef-1α</i> ของเชื้อ <i>A. flavus</i>	61
ภาพที่ 28 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ <i>its</i> ของเชื้อ <i>A. niger</i>	63
ภาพที่ 29 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ <i>tef-1α</i> ของเชื้อ <i>A. niger</i>	63
ภาพที่ 30 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ <i>its</i> ของเชื้อ <i>A. terreus</i>	65
ภาพที่ 31 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ <i>tef-1α</i> ของเชื้อ <i>A. terreus</i>	65
ภาพที่ 32 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ <i>its</i> ของเชื้อ <i>A. nidulans</i>	67
ภาพที่ 33 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ <i>tef-1α</i> ของเชื้อ <i>A. nidulans</i>	67
ภาพที่ 34 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ <i>its</i>	69
ภาพที่ 35 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ <i>its</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 1.....	70
ภาพที่ 36 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ <i>its</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 2.....	70
ภาพที่ 37 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ <i>its</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 3.....	71

ภาพที่ 38 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ <i>its</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 4	71
ภาพที่ 39 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ <i>its</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 5	72
ภาพที่ 40 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน <i>tef-1α</i>	74
ภาพที่ 41 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน <i>tef-1α</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 1	75
ภาพที่ 42 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน <i>tef-1α</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 2	75
ภาพที่ 43 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน <i>tef-1α</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 3.....	76
ภาพที่ 44 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน <i>tef-1α</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 4	77
ภาพที่ 45 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน <i>tef-1α</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 5	78
ภาพที่ 46 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน <i>tef-1α</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 6	79
ภาพที่ 47 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน <i>tef-1α</i> จำแนกเชื้อเป็น clade 7	79
ภาพที่ 48 ผลความสอดคล้องของการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree จากบริเวณ <i>its</i> และยีน <i>tef-1α</i>	81
ภาพที่ 49 phylogenetic tree จากบริเวณ <i>its</i> ร่วมกับผลความไวรับต่อยา amphotericin B.....	82
ภาพที่ 50 phylogenetic tree จากยีน <i>tef-1α</i> ร่วมกับผลความไวรับต่อยา amphotericin B.....	84
ภาพที่ 51 เปรียบเทียบร้อยละความสอดคล้องของการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree.....	86
ภาพที่ 52 phylogenetic tree ของ clade 5 เมื่อนำมาจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากบริเวณ <i>its</i> เป็น primary barcode และใช้ข้อมูลจากยีน <i>tef-1α</i> เป็น secondary barcode	87
ภาพที่ 53 ภาพแสดงลักษณะทางมหัศจรรย์ของเชื้อ <i>A. fumigatus</i> (ตัวอย่าง <i>A. fumigatus</i> หมายเลข 58 ATCC26934), <i>A. lentulus</i> (ตัวอย่าง <i>A. fumigatus</i> หมายเลข 20) และ <i>A. udagawae</i> (ตัวอย่าง <i>A. fumigatus</i> หมายเลข 45) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA	95

ภาพที่ 54 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ <i>its</i> กับเชื้อ <i>A. fumigatus</i>	116
ภาพที่ 55 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ <i>its</i> กับเชื้อ <i>A. flavus</i>	116
ภาพที่ 56 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ <i>its</i> กับเชื้อ <i>A. niger</i>	116
ภาพที่ 57 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ <i>its</i> กับเชื้อ <i>A. terreus</i>	116
ภาพที่ 58 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ <i>its</i> กับเชื้อ <i>A. nidulans</i>	117
ภาพที่ 59 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ <i>tef-1α</i> กับเชื้อ <i>A. fumigatus</i>	117
ภาพที่ 60 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ <i>tef-1α</i> กับเชื้อ <i>A. flavus</i>	117
ภาพที่ 61 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ <i>tef-1α</i> กับเชื้อ <i>A. niger</i>	117
ภาพที่ 62 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ <i>tef-1α</i> กับเชื้อ <i>A. terreus</i>	118
ภาพที่ 63 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ <i>tef-1α</i> กับเชื้อ <i>A. nidulans</i>	118
ภาพที่ 64 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ <i>its</i>	119
ภาพที่ 65 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ <i>tef-1α</i> ที่เหมาะสม	122
ภาพที่ 66 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA template ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ <i>tef-1α</i> ..	122
ภาพที่ 67 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ <i>tef-1α</i>	123
ภาพที่ 68 ผลการเปรียบเทียบที่คำนวณได้จากโปรแกรม bioedit แสดงค่าความเหมือนภายในกลุ่มเชื้อ <i>A. fumigatus</i> ที่จำแนกด้วยยีน <i>tef-1α</i> เป็น clade ที่ 5 (ภาพที่ 1).....	150
ภาพที่ 69 ผลการเปรียบเทียบที่คำนวณได้จากโปรแกรม bioedit แสดงค่าความเหมือนภายในกลุ่มเชื้อ <i>A. fumigatus</i> ที่จำแนกด้วยยีน <i>tef-1α</i> เป็น clade ที่ 5 (ภาพที่ 2).....	150
ภาพที่ 70 ผลการเปรียบเทียบที่คำนวณได้จากโปรแกรม bioedit แสดงค่าความเหมือนภายในกลุ่มเชื้อ <i>A. fumigatus</i> ที่จำแนกด้วยยีน <i>tef-1α</i> เป็น clade ที่ 5 (ภาพที่ 3).....	151

- ภาพที่ 71 ผลการเปรียบเทียบที่คำนวณได้จากโปรแกรม bioedit แสดงค่าความเหมือนภายในกลุ่ม
เชื้อ *A. fumigatus* ที่จำแนกด้วยยีน *tef-1 α* เป็น clade ที่ 5 (ภาพที่ 4)..... 151
- ภาพที่ 72 แสดงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *A. fumigatus* ATCC 269344,
A. lentulus และ *A. udagawae* ที่วิเคราะห์จากโปรแกรม bioedit..... 152



บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เมื่อปลายปี 2022 องค์การอนามัยโลก (world health organization; WHO) ได้ประกาศรายชื่อเชื้อราก่อโรคที่สำคัญในระบบสาธารณสุขและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชากรโลก หมวดยุคชีพกลุ่มที่มีรูปแบบการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น กลุ่มผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยมะเร็ง ผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะ หรือผู้ป่วยวัณโรค ซึ่งมีหลักฐานอุบัติการณ์บ่งชี้ชัดเจนว่าโรคติดเชื้อดังกล่าวกำลังกระจายตัวไปทั่วโลก โดยมีสภาวะโลกร้อนและการเดินทางระหว่างประเทศที่เพิ่มมากขึ้นเป็นสาเหตุหลักตามสมมติฐานของนักจุลชีววิทยา อุตสาหกรรมการเพิ่มขึ้นของโรคติดเชื้อราทำให้เกิดขึ้นชัดเจนในเวลาอันสั้นและถือได้ว่าเป็นหนึ่งในวิกฤตสาธารณสุขที่กระทบกับประชากรโลก โดยเฉพาะในช่วงที่มีการระบาดของโรคโควิด (covid-19) ภาวะการติดเชื้อซ้ำซ้อนด้วยโรคติดเชื้อรา นับเป็นสาเหตุการเสียชีวิตหลักประการหนึ่ง โดยมีเชื้อราสาเหตุก่อโรคที่สำคัญทั้งหมด 19 สปีชีส์ตามรายงาน และหนึ่งในนั้นคือเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. (1, 2) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุก่อโรค aspergillosis โดยแบ่งเป็นสปีชีส์ต่างๆ ตามอุบัติการณ์ที่มีรายงาน ดังนี้ *Aspergillus fumigatus* ร้อยละ 67, *Aspergillus flavus* ร้อยละ 24, *Aspergillus niger* ร้อยละ 4.7, *Aspergillus terreus* ร้อยละ 3.7 และ *Aspergillus* สปีชีส์อื่นๆ ร้อยละ 0.6 (3)

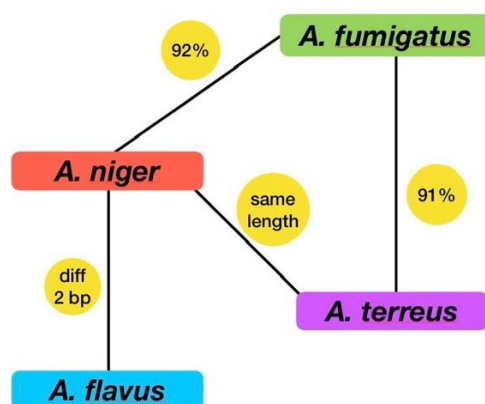
ในปัจจุบัน แม้การตรวจวินิจฉัยโรค aspergillosis จะเริ่มจากข้อมูลประวัติหรืออาการทางคลินิกของผู้ป่วยตาม criteria suspicious index แต่อย่างไรก็ตามการตรวจยืนยันโรค ก็ยังคงต้องอาศัยผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเป็นหลัก ซึ่งประกอบไปด้วย 3 หลักการใหญ่ๆ ได้แก่ การทดสอบทาง 1) น้ำเหลืองวิทยา (serology) โดยการตรวจหาสารชีวภาพชื่อ “galactomannan” ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อ 2) อนุชีวโมเลกุล (molecular) โดยการตรวจหาสารพันธุกรรม หรือ deoxyribonucleic acid (DNA) ของเชื้อ และ 3) การเพาะแยกเชื้อ (cultivation) เพื่อศึกษาลักษณะทางมหสังฐาน (macroscopic) และจุลสังฐาน (microscopic) ของตัวเชื้อ ซึ่งในปัจจุบันวิธีการเพาะแยกเชื้อนี้ยังคงถือเป็นวิธีมาตรฐานแม้ว่าจากรายงานอุบัติการณ์ทั่วโลกจะพบว่าผู้ป่วยโรค aspergillosis เพียงร้อยละ 50 เท่านั้นที่มีผลการเพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการเป็นบวกก็ตาม (4) วิธีการตรวจหาสาร galactomannan ในตัวอย่างน้ำเหลือง (serum) และน้ำล้างปอด bronchoalveolar lavage (BAL) โดยใช้เทคโนโลยี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) นับเป็นวิธีที่มีความไวสูง (high sensitivity) เมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นๆ และมีชุดทดสอบสำเร็จรูปจำหน่ายตามท้องตลาด (commercial kit available) ในราคาที่สมเหตุสมผลครอบคลุมโดยสิทธิพื้นฐานการรักษาของประชากรหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวนี้ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่เป็นสาเหตุได้ (5) ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญยิ่งต่อการเลือกยาด้านเชื้อราเพื่อการรักษาตามลักษณะ species-specific susceptibility profile ของเชื้อกลุ่มนี้ (6) อ้างอิงการศึกษาของ Rath และคณะ พบว่าเชื้อ *A. fumigatus* และ *A. niger* มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ต่อยา amphotericin B เพียง 0.5 mg/L ในขณะที่ *A. flavus* และ *A. nidulans* มีค่า MIC ต่อยาดังกล่าวสูงถึง 16 mg/L (7) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ

Iwan และคณะ ที่พบว่าเชื้อ *A. terreus* ต้องการรักษาด้วยยา amphotericin B สูงถึงร้อยละ 95 (8) ดังนั้น การตรวจหาสาร galactomannan ในปัจจุบันจึงมีประโยชน์ในแง่ของการคัดกรอง (screening) การติดเชื้อในประชากรกลุ่มเสี่ยง (high risk population) เป็นหลัก โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อแฝงในระยะแรกที่ยังไม่มีอาการ ซึ่งมีจำนวนของเชื้อจุลชีพในร่างกายน้อย โอกาสการเพาะแยกเชื้อเป็นบวกต่ำ ในผู้ป่วยกลุ่มนี้หากตรวจพบสาร galactomannan ในสิ่งส่งตรวจ ทีมแพทย์และทีมห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องวินิจฉัยสปีชีส์ของเชื้อสาเหตุด้วยเทคนิคอื่นเพื่อวางแผนใช้ยาต้านเชื้อราเพื่อการรักษาต่อไป

เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลเป็นเทคนิคหนึ่งที่ห้องปฏิบัติการนิยมนำมาใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* อย่างแพร่หลายมากขึ้นในปัจจุบัน โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของสารพันธุกรรมจากบริเวณ *internal transcribed spacer (its)* ซึ่งเป็น house-keeping region หรือ primary barcode เพื่อการจำแนกกลุ่มเชื้อรา แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องด้วยความหลากหลายของสารพันธุกรรมของเชื้อราก่อโรคในคนที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องรวมถึงวิวัฒนาการของตัวเชื้อเอง ทำให้ในปัจจุบันมีรายงานทางวิชาการระบุชัดเจนว่าข้อมูลสารพันธุกรรมจากบริเวณ *its* เพียงบริเวณเดียว สามารถจัดจำแนกสปีชีส์เชื้อราก่อโรคในคนได้เพียงร้อยละ 75 เท่านั้น (9) รวมถึงเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* ด้วย ซึ่งสาเหตุหลักประการหนึ่งที่ทำให้ข้อมูลบริเวณ *its* ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ได้ทั้งหมดนั้นมาจากความหลากหลายของบริเวณ *its* ของเชื้อ *Aspergillus* ภายในสปีชีส์เดียวกันที่เรียกว่า intra-species variation และความไม่คงที่ของสารพันธุกรรมจำเพาะสปีชีส์ที่เรียกว่า inter-species variation สอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาของ Travis และคณะที่พบว่าข้อมูลบริเวณ *its* มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* ได้ค่อนข้างต่ำ (low power of discrimination) เนื่องจากบริเวณ *its* ของเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์มีความคล้ายคลึงกันสูงมาก อธิบายในรายละเอียดโดยสังเขปคือ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *its* ซึ่งครอบคลุมภายใต้ universal primer “*its kit-1* และ *its kit-4*” ของเชื้อ *A. fumigatus* มีความคล้ายกับ *A. terreus* ถึงร้อยละ 91 และคล้ายกับ *A. niger* ถึงร้อยละ 92 และในบริเวณเดียวกันลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. niger* แตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. flavus* เพียง 2 ลำดับเบสเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าผลผลิต นิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวของ *A. niger* มีความยาวเท่ากับ *A. terreus* (ภาพที่ 1) (10) ด้วยข้อจำกัดของข้อมูลบริเวณ *its* นี้ ทำให้เชื้อ *Aspergillus* บางสปีชีส์ไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *its* เพียงบริเวณเดียว ส่งผลให้การเลือกใช้ยาตามทฤษฎี species-specific susceptibility profile ไม่สามารถทำได้ในทางปฏิบัติ

Strain	% Similarity with strain:				
	<i>A. flavus</i> ATCC 16883	<i>A. fumigatus</i> ATCC 36607	<i>A. nidulans</i> ATCC 10074	<i>A. niger</i> ATCC 16888	<i>A. terreus</i> sa <i>A. ustus</i> ATCC 201953
<i>A. flavus</i> ATCC 16883					
<i>A. fumigatus</i> ATCC 36607	87.6				
<i>A. nidulans</i> ATCC 10074 ^a	81.5	84.3			
<i>A. niger</i> ATCC 16888	89.6	91.7	84.0		
<i>A. terreus</i> ATCC 16792	87.0	91.1	83.0	90.6	
<i>A. ustus</i> ATCC 201953	82.7	80.7	91.4	80.5	79.3

^aAccepted into GenBank as *E. nidulans*.



ภาพที่ 1 แสดงร้อยละความคล้าย (%similarity) ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *its* ซึ่งครอบคลุมภายใต้ universal primer “its kit-1 และ its kit-4” ของเชื้อ *Aspergillus* สปีชีส์ต่างๆ ที่พบเป็นสาเหตุก่อโรค aspergillosis ในคนไทย (10)

โดยทั่วไปในธรรมชาติ การดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์มีสาเหตุแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ 1) การดื้อยาจากลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์นั้นๆ โดยกำเนิด (intrinsic resistant) และ 2) การดื้อยาของเชื้อที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมซึ่งพัฒนาขึ้นภายหลัง (extrinsic resistant) เช่น การรับยาฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลาานาน ซึ่งพบได้ในจุลินทรีย์หลายกลุ่ม รวมถึงเชื้อ *Aspergillus* ที่มีรายงานทางวิชาการพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน Cytochrome P450 Family 51 Subfamily A Member 1 (*Cyp51A*) อันเนื่องมาจากการรับยากลุ่ม azole ในความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมเป็นปัจจัยกระตุ้นการดื้อยาในกลุ่ม azole ของเชื้อ *A. fumigatus* ประการหนึ่ง (11) แต่อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์การดื้อยาแบบ extrinsic resistant นี้ พบน้อยมากเพียงร้อยละ 4-5 ในเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* โดยปกติการรักษาโรค aspergillosis ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่มีข้อจำกัดเรื่องการทำงานของไตเข้ามาเกี่ยวข้อง แพทย์จะใช้อาต้านเชื้อรา amphotericin B ในการรักษาเป็นหลัก ซึ่งในปัจจุบัน liposomal amphotericin B เป็นยารูปแบบใหม่ล่าสุดที่มีผลกระทบต่อไตลดน้อยลงแต่ยังคงประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อราที่ถูกผลิตออกมาจำหน่ายในท้องตลาดอย่างแพร่หลาย ในกรณีที่ผู้ป่วยมีความจำเป็นต้องใช้ยากลุ่ม azole แพทย์จะพิจารณาปริมาณยาที่เหมาะสมตามหลักการและนโยบายการใช้ยาอย่างสมเหตุสมผล (antimicrobial stewardship) ดังนั้น การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อเพื่อประโยชน์ของการทำนายลักษณะความไวรับต่อยาตามทฤษฎี species-specific susceptibility profile ในเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งในการเลือกยารักษาโรค

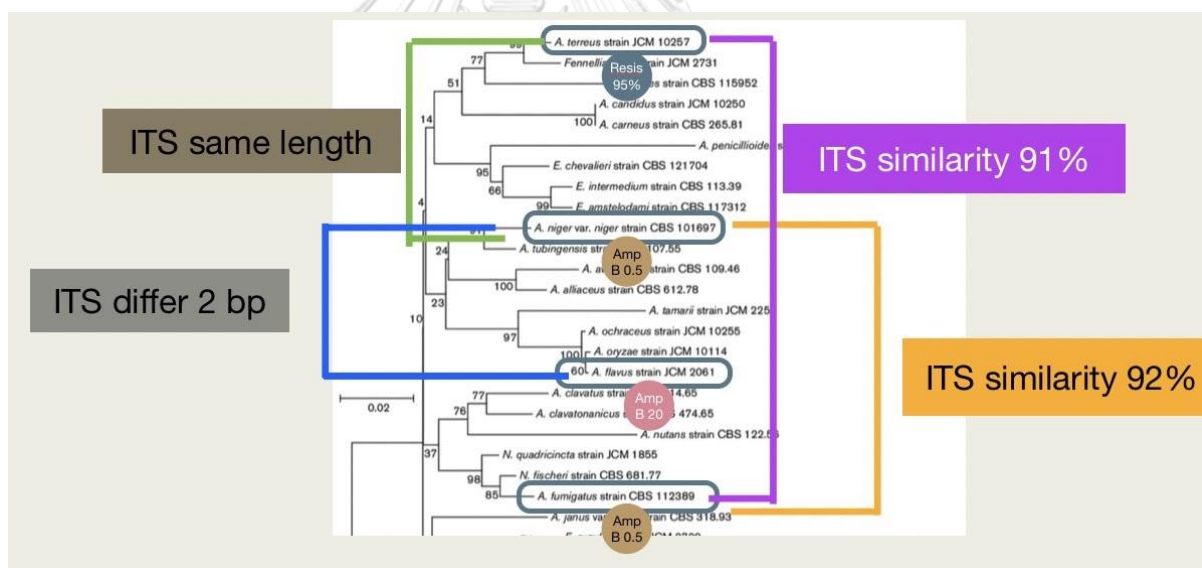
ด้วยข้อจำกัดของข้อมูลบริเวณ *its* ต่อการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ดังที่ได้กล่าวข้างต้น ปัจจุบันห้องปฏิบัติการหลายแห่งจึงมีนโยบายการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* โดยอ้างอิงผลประกอบกันระหว่างเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลและลักษณะทางมหัพฐฐาน/จุลสัณฐานของเชื้อ ซึ่งมากกว่าร้อยละ 99 มีความสัมพันธ์กัน อย่างไรก็ตามเชื้อ *Aspergillus* บางสปีชีส์ที่มีรูปแบบความไวรับต่อยาด้านเชื้อราต่างกันยังคงไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้ด้วย 2 วิธีดังกล่าว

จากงานวิจัยของ Van และคณะ ที่ศึกษาเกี่ยวกับการดื้อยาโดยกำเนิดของเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์พบว่าเชื้อที่มีลักษณะทางมหัสธฐานและ/หรือจุลธฐาน รวมถึงข้อมูลในบริเวณ *its* ที่เข้าได้กับเชื้อ *A. fumigatus* ในความเป็นจริงแล้วเชื้อกลุ่มนี้เมื่อจัดกลุ่มโดยอ้างอิงข้อมูลในระดับสารพันธุกรรมของยีนอื่น เช่น tubulin gene เชื้อกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 สปีชีส์ ได้แก่ *A. fumigatus*, *A. lentulus* (อุบัติการณ์พบเชื้อในโรงพยาบาลร้อยละ 2.7) และ *A. udagawae* (อุบัติการณ์พบเชื้อในโรงพยาบาลร้อยละ 2) ซึ่งใน 2 สปีชีส์หลัง พบมีความไวรับต่อยา amphotericin B ที่ต่ำกว่า (มีค่า MIC สูงกว่า) เชื้อ *A. fumigatus* ดังนั้น ในปัจจุบันกลุ่มเชื้อ *A. fumigatus* ที่จำแนกได้จากลักษณะทางมหัสธฐาน/จุลธฐานและ/หรือวิธีทางอณูชีวโมเลกุลตามข้อมูลบริเวณ *its* จะใช้ชื่อกลุ่มว่า *A. fumigatus* complex นอกจากนี้ ลักษณะดังกล่าวยังพบในเชื้อ *A. nidulans*, *A. terreus*, และ *A. niger* ซึ่งเมื่อจัดกลุ่มโดยอ้างอิงข้อมูลสารพันธุกรรมของ tubulin gene พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สปีชีส์ ได้แก่ *A. nidulans* และ *A. tetrazonus* (อุบัติการณ์พบเชื้อในโรงพยาบาลร้อยละ 1.2) *A. terreus* และ *A. alabamensis* (อุบัติการณ์พบเชื้อในโรงพยาบาลร้อยละ 1.5, *A. niger* และ *A. alabamensis* (อุบัติการณ์พบเชื้อในโรงพยาบาลร้อยละ 3.2) ตามลำดับ ซึ่งใน 6 สปีชีส์หลังนี้ ยังไม่พบรายงานทางวิชาการถึงความต่างของรูปแบบความไวรับต่อยาด้านเชื้อรา (12)

ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้นโดยศึกษาการจัดจำแนกกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* ด้วยยีนตำแหน่งที่สองหรือ secondary barcode โดยมียีนในกลุ่ม protein coding genes ซึ่งเป็นบริเวณที่สารพันธุกรรมของจุลชีพกลุ่มเชื้อราเส้นสายมีความแปรผันต่ำเป็นบริเวณเป้าหมาย (target region) จากการศึกษาของ Nouripour และคณะ โดยอ้างอิงข้อมูลสารพันธุกรรมของยีน translation elongation factor 1-alpha (*tef-1 α*) ซึ่งเป็น protein coding gene ชนิดหนึ่ง เพื่อการจัดจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ในระดับสปีชีส์ จำนวน 57 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานเพาะแยกจากสิ่งแวดล้อมจำนวน 49 ตัวอย่าง (*A. fumigatus* 6 ตัวอย่าง, *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus candidus*, *A. nidulans*, *A. flavus* สปีชีส์ละ 3 ตัวอย่าง, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus clavatonanicus*, *Aspergillus clavatus*, *Petromyces alliaceus*, *Aspergillus tubingensis* สปีชีส์ละ 2 ตัวอย่าง, และ *Eurotium intermedium*, *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus nutans*, *Neosartorya fischeri*, *Neosartorya quadricincta*, *Aspergillus unguis*, *Emericella rugulosa*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus janus vat janus*, *Aspergillus janus var brevis*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus carneus*, *Fistulinella nivea*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus deflectus*, *Aspergillus granulatus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus avenaceus*, *Aspergillus niger var.niger*, *Aspergillus ochraceus*, และ *Aspergillus varians* สปีชีส์ละ 1 ตัวอย่าง) และเชื้อที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 8 ตัวอย่าง (*A. nidulans*, *A. terreus*, *Aspergillus candidus* สปีชีส์ละ 2 ตัวอย่าง, *A. flavus* และ *Aspergillus sydowii* สปีชีส์ละ 1 ตัวอย่าง) พบว่ายีน *tef-1 α* นี้มีความสามารถในการจัดกลุ่มเชื้อ (power of discrimination) ในระดับสปีชีส์ ได้สูงถึงร้อยละ 94 (ภาพที่ 2) (13) แต่อย่างไรก็ตาม การพิสูจน์ประสิทธิภาพดังกล่าวเป็นการศึกษาในเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมเป็นหลักมีเพียง 8 สายพันธุ์เท่านั้นที่

เพาะแยกได้จากผู้ป่วย ซึ่งทั้งหมดเป็นผู้ป่วยที่ไม่ได้มีภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอเหมือนกับกลุ่มผู้ป่วยที่พบในประเทศไทย รวมถึงสายพันธุ์ที่ทำการศึกษาในยังไม่ครอบคลุม สปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่พบบ่อยในผู้ป่วยชาวไทย นั่นคือ *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, และ *A. terreus* อีกด้วย

ด้วยเหตุผลดังกล่าว ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายในการพิสูจน์ความสามารถของยีน *tef-1 α* เพื่อการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยชาวไทยเมื่อเปรียบเทียบกับผลการจัดกลุ่มที่ได้จากข้อมูลบริเวณ *its* พร้อมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของสปีชีส์ที่จัดกลุ่มได้จากข้อมูลยีน *tef-1 α* กับรูปแบบความไวรับต่อยาต้านเชื้อรา amphotericin B ซึ่งเป็นยาหลักในการรักษาโรค aspergillosis ภายใต้อาณัติฐานของผู้วิจัยว่าข้อมูลสารพันธุกรรมของยีน *tef-1 α* มีความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยชาวไทยได้ดีกว่าข้อมูลบริเวณ *its* และผลการจำแนกสปีชีส์ที่อ้างอิงจากข้อมูลสารพันธุกรรมของยีน *tef-1 α* นี้มีความสัมพันธ์กับรูปแบบความไวรับต่อยาต้านเชื้อรา amphotericin B ซึ่งหากผลการทดลองเป็นไปตามสมมุติฐานนี้ ในอนาคตผลการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ด้วยข้อมูลของยีน *tef-1 α* จะเป็นประโยชน์ยิ่งต่อการทำนายความไวรับต่อยาเพื่อช่วยแพทย์วางแผนการรักษาโรค aspergillosis ต่อไป



ภาพที่ 2 phylogenetic tree ของเชื้อ *Aspergillus* ที่สร้างจากข้อมูลสารพันธุกรรมยีน *tef-1 α* พร้อมข้อมูลเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากข้อมูลบริเวณ *its* (13)

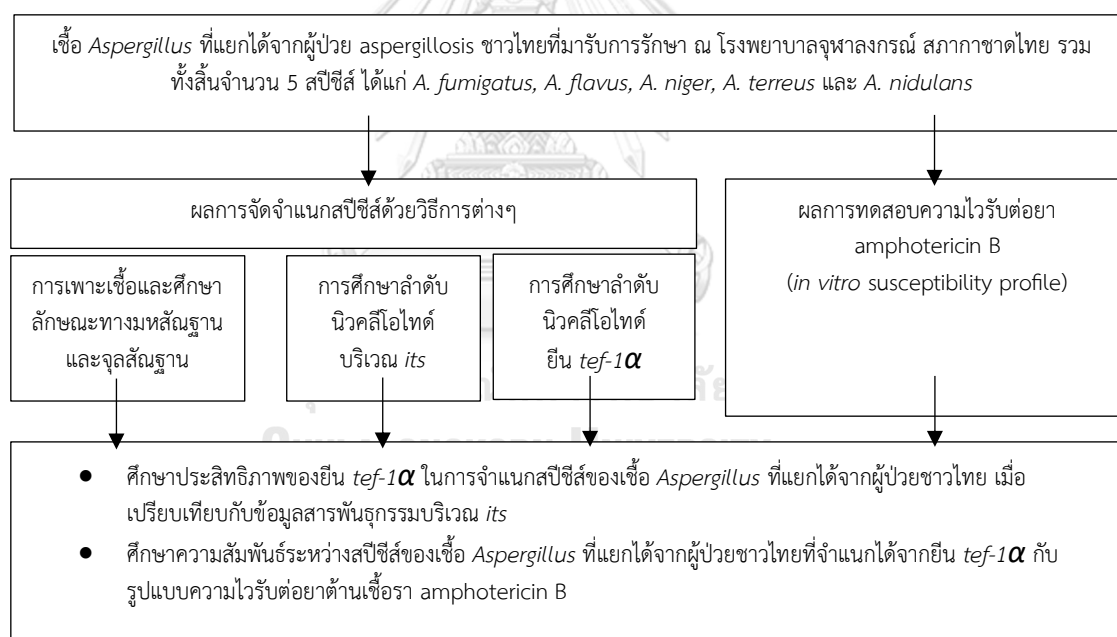
2. วัตถุประสงค์การวิจัย

2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของยีน *tef-1 α* ในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยชาวไทย เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรมบริเวณ *its*

2.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยชาวไทยที่จำแนกได้จากยีน *tef-1 α* กับรูปแบบความไวรับต่อยาต้านเชื้อรา amphotericin B

3. ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของยีน *tef-1 α* ในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่เป็นสาเหตุของโรค aspergillosis ที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยชาวไทย รวมทั้งสิ้นจำนวน 5 สปีชีส์ ได้แก่ *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* และ *A. nidulans* โดยเปรียบเทียบผลการจำแนกสปีชีส์ที่ได้กับวิธีมาตรฐาน (standard identification method) คือ วิธีการเพาะเชื้อและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (cultivation) และวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (molecular method) โดยอาศัยข้อมูลบริเวณ *its* รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลการจำแนกสปีชีส์ที่ได้จากยีน *tef-1 α* กับผลความไวรับ (susceptibility profile) ต่อยา amphotericin B ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อ *Aspergillus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย aspergillosis ชาวไทยที่มารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย เชื้อทั้งหมดที่นำมาศึกษาผู้วิจัยดำเนินการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนสกัดสารพันธุกรรมด้วยเครื่องอัตโนมัติ และทดสอบหา สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สนใจบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* ด้วยเทคนิค real time PCR ก่อนนำผลผลิตที่ได้ทั้งหมดส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์สร้าง phylogenetic tree ต่อไป (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แผนผังแสดงขั้นตอนงานวิจัย เริ่มจากการเก็บตัวอย่างเชื้อ *Aspergillus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย aspergillosis ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เก็บข้อมูลผลการจำแนกเชื้อด้วยวิธีต่างๆ และผลความไวรับต่อยา วิเคราะห์ข้อมูลตามวัตถุประสงค์ในงานวิจัย

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

หากผลการทดสอบเป็นไปตามสมมุติฐานว่าข้อมูลสารพันธุกรรมของยีน *tef-1 α* มี power of discrimination ในการจำแนกสปีชีส์เชื้อ *Aspergillus* สูงกว่าบริเวณ *its* จริง วงการแพทย์จะได้

องค์ความรู้พื้นฐาน alternative gene ชนิดใหม่ที่สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* กลุ่มก่อโรคในคนไทย นอกจากนี้ ข้อมูลสารพันธุกรรมดังกล่าวยังสามารถนำไปจัดสร้างฐานข้อมูล biobank ของกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* ที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยเพื่อต่อยอดไปถึงการศึกษagenome project ในอนาคต และหากผลการจัดจำแนกสปีชีส์เชื้อ *Aspergillus* โดยอาศัยข้อมูลสารพันธุกรรมของยีน *tef-1 α* นั้นสัมพันธ์กับความไวรับต่อยา amphotericin B จริง ผลการจำแนกสปีชีส์เชื้อ *Aspergillus* นี้ สามารถใช้ทำนายความไวรับต่อยา amphotericin B ได้ โดยไม่ต้องรอกระบวนการเพาะเชื้อซึ่งต้องใช้เวลายาวอย่างน้อย 48 ชั่วโมง นำไปสู่ประโยชน์ยิ่งต่อการวางแผนและตัดสินใจเลือกใช้ยาของแพทย์ในทางคลินิก



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรค aspergillosis

1.1 บทนิยาม

Aspergillosis เป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่ง มีสาเหตุจากเชื้อราชนิดเส้นสายกลุ่มไม่มีสีแบบมีผนังกัน (hyaline septate hyphae) ในจีนัส *Aspergillus* โดยในปัจจุบันมีรายงานว่าเชื้อ *Aspergillus* มากกว่า 50 สปีชีส์ สามารถก่อโรคในคนได้ (human pathogen) โดยมีความรุนแรงหลายระดับ ตั้งแต่อาการผื่นแพ้ ไอจาม คัดจมูก หายใจติดขัด ไปจนถึงการติดเชื้อในอวัยวะภายในเฉพาะตำแหน่ง (local infection) เช่น ปอด หรือการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย หรือ invasive aspergillosis (IA) ซึ่งระดับความรุนแรงนี้เป็นผลมาจาก 2 ปัจจัยหลัก ได้แก่ 1) สายพันธุ์ของตัวเชื้อ *Aspergillus* และ 2) ความแข็งแรงสมบูรณ์ของระบบภูมิคุ้มกันของตัวโฮสต์เอง (14) โดยมีข้อสังเกตที่น่าสนใจว่าเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ที่มักก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย มักเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C

1.2 ระบาดวิทยา

องค์การอนามัยโลก world health organization (WHO) รายงานว่าโรคติดเชื้อราเป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาส พบมากในประชากรกลุ่มที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำจากสาเหตุต่างๆ หรือมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยนอกจากปัจจัยของตัวโฮสต์เองแล้ว ถิ่นอาศัยและลักษณะการดำรงชีวิตก็มีส่วนเกี่ยวข้องด้วย นั่นคือ ประเทศที่มีรายงานอุบัติการณ์ผู้ป่วยติดเชื้อราสูงมักมีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อและเอื้ออำนวยต่อการดำรงอยู่ของสปอร์เชื้อในสิ่งแวดล้อม ประชากรมีสุขอนามัยที่ไม่ดี มีอาชีพเกษตรกรรมหรือใกล้ชิดกับธรรมชาติ เช่น หาของป่า รวมถึงมีความสัมพันธ์กับพื้นที่ที่มีรายได้อ่อนแอหรือประชากรต่ำอีกด้วย ซึ่งปัจจัยเหล่านี้สะท้อนให้เห็นว่าการสัมผัสกับเชื้อสาเหตุที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นจุดกำเนิดแรกของวงจรการติดเชื้อก่อนที่จะไปถึงวงจรปัจจัยสนับสนุนลำดับต่อมาคือสภาวะภูมิคุ้มกันของโฮสต์อันนำไปสู่การเกิดโรคในที่สุด

ในบรรดาโรคติดเชื้อราชนิดเส้นสาย (filamentous fungi) ทั่วโลก โรค aspergillosis เป็นโรคติดเชื้อราที่พบอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับหนึ่ง (3) และพบสูงที่สุดในพื้นที่ประเทศทวีปเอเชีย คิดเป็นร้อยละ 71 ของประชากรทั่วโลก รองลงมาคือทวีปแอฟริกา คิดเป็นร้อยละ 29 และที่เหลือพบรายงานผู้ป่วยกระจายทั่วไปทั้งในทวีปยุโรป อเมริกา และออสเตรเลีย ในอัตราส่วนที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งผลสำรวจดังกล่าวเป็นไปตามสมมติฐานของสภาพภูมิอากาศ ลักษณะการดำรงชีวิตและการประกอบอาชีพ (15) โดยในทวีปเอเชียประเทศไทยเป็นประเทศที่พบจำนวนผู้ติดเชื้อมากเป็นอันดับ 2 รองจากประเทศอินเดียซึ่งสาเหตุหนึ่งเชื่อว่าเป็นเพราะสถิติจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานในประเทศอินเดียที่มีจำนวนมากที่สุดในโลกเป็นปัจจัยสนับสนุนการติดเชื้อรารวมถึงสุขอนามัยของประชากร แม้ว่าประเทศไทยจะมีรายงานจำนวนผู้ติดเชื้อมากกว่าประเทศอื่นๆ ในเขตภูมิภาคเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามประเทศไทยเป็นประเทศที่ผู้ติดเชื้อมีอัตราการเสียชีวิตด้วยโรครดังกล่าว น้อยที่สุดในอัตราส่วนต่อจำนวนผู้ป่วยเมื่อเทียบกับประเทศอื่นๆ

สำหรับในประเทศไทยจากรายงานของกองระบาดวิทยากลุ่มพัฒนาระบบเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา โรคเอดส์ วัณโรค ไวรัสตับอักเสบ และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค กระทรวง

สาธารณสุข พบว่า ในปี พ.ศ. 2564 มีผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี human immunodeficiency virus (HIV) ที่มีภาวะติดเชื้อราร่วมจำนวนสูงถึง 453,991 คนหรือคิดเป็นร้อยละ 49 ของจำนวนผู้ติดเชื้อ HIV ทั้งหมด โดยในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อซ้ำซ้อนนี้กว่าร้อยละ 20 พบมีอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต (16) อุบัติการณ์เหล่านี้พบคล้ายกันในกลุ่มผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำทั่วโลกที่มีสาเหตุมาจากการรับยากดภูมิคุ้มกัน ระหว่างการปลูกถ่ายอวัยวะ (17) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chayakulkeeree และคณะ ที่ซึ่งศึกษาอุบัติการณ์ในผู้ป่วยชาวไทย พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันระหว่างการปลูกถ่ายอวัยวะ หรือเพื่อการรักษาโรคทางภูมิคุ้มกันอื่น มีภาวะติดเชื้อราสกุล *Aspergillus* ร่วมมากที่สุด นำไปสู่ 1) โรค allergic broncho pulmonary aspergillosis (ABPA) สูงถึง 38,009 รายต่อปี หรือคิดเป็น 58.4 รายต่อผู้ป่วย 100,000 ราย 2) โรค chronic pulmonary aspergillosis (CPA) สูงถึง 19,044 รายต่อปี คิดเป็น 29.2 รายต่อผู้ป่วย 100,000 ราย นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งและผู้ป่วยเรื้อรังที่จำเป็นต้องรักษาตัวในห้องผู้ป่วยวิกฤต (intensive care unit; ICU) มีอุบัติการณ์การติดเชื้อ Invasive aspergillosis (IA) มากถึง 276-666 รายต่อปี หรือคิดเป็น 1.4 รายต่อผู้ป่วย 100,000 ราย ตามลำดับ (18) ในขณะที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โรงพยาบาลโรงเรียนแพทย์ขนาดใหญ่ระดับตติยภูมิ พบจำนวนผู้ติดเชื้อ aspergillosis โดยเฉลี่ยปีละ 200 ราย จากจำนวนผู้ป่วยที่เข้ารับบริการทั้งหมด 51,707 ราย, 53,884 ราย, 55,780 ราย 51,805 ราย, และ 45,837 ราย ในปี 2560-2564 ตามลำดับ (19-24) หรือคิดเป็นปีละ 51,802 ราย โดยเฉลี่ย ดังนั้น จากสถิติของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย สัดส่วนผู้ป่วยโรค aspergillosis จึงคิดเป็นร้อยละ 0.38 รายของผู้ป่วยทั้งหมด

1.3 เชื้อสาเหตุก่อโรค aspergillosis

โรค aspergillosis เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราฉวยโอกาส (opportunistic fungi) ใน Kingdom Fungi, Division Ascomycota, Class Eurotiomycetes, Order Eurotiales, Family Trichocomaceae, Genus *Aspergillus* โดยปกติเชื้อ *Aspergillus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งบนพื้นผิวที่มีความชื้นและสารอินทรีย์ อาทิเช่น พื้นดิน ขอนไม้ เศษอาหาร ในรูปของเซลล์รูปร่างยาวแบบหลายหน่วย (multicellular) และในอากาศในรูปของสปอร์แบบหน่วยเดี่ยว (unicellular) ซึ่งเป็นหน่วยของสิ่งมีชีวิตเพื่อการสืบพันธุ์ หน่วยของสปอร์ที่ปลิวลอยในอากาศนี้หากตกลงบนพื้นผิวที่สมบูรณ์หรือมีปัจจัยสนับสนุนการเจริญของเชื้อ นั่นคือ บริเวณที่มีสารอินทรีย์และความชื้นเพียงพอ รวมถึงมีอุณหภูมิระหว่าง 25-35°C เช่น ปุ่มคอกในโรงเรือนเพาะชำ พืชผักที่มีการเน่าเสีย เปลือกไม้ที่มีความชื้น ขนมอบหรือเศษอาหารคั่งคั้น รวมถึงเสื้อผ้าที่มีคราบสกปรก เซลล์สปอร์เหล่านี้จะงอกกลายเป็นเชื้อราโครงสร้างยาวคล้ายหยากไย่ เรียกว่า “hyphae” ซึ่งมีความแข็งแรง ทนทาน ในการยึดเกาะและพร้อมที่จะสร้างสปอร์อีกจำนวนมากเพื่อการสืบพันธุ์ต่อไป เช่นเดียวกับในร่างกายมนุษย์เมื่อหน่วยสปอร์เหล่านี้เข้าสู่ร่างกายผ่านทางหายใจ สปอร์ก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนในร่างกาย เรียกว่า การ colonization ในกรณีที่มีการเพิ่มจำนวนนี้ถูกสนับสนุนด้วยสภาวะภูมิคุ้มกันของโฮสต์ที่อ่อนแอ เซลล์ของเชื้อราจะบุกรุกเข้าสู่อวัยวะภายในต่างๆ เช่น ปอด กระแสเลือด รวมถึงปล่อยสารพิษ (toxin) ก่อให้เกิดความผิดปกติในระดับต่างๆ ตั้งแต่เป็นไข้ หายใจไม่สะดวก เหนื่อยหอบ เวียนศีรษะ จนถึงภาวะหมดสติ (septic shock) ซึ่งเป็นลักษณะอาการของโรค aspergillosis

สำหรับในผู้ป่วยชาวไทย จากรายงานอุบัติการณ์ย้อนหลัง 10 ปี พบว่าเชื้อ *A. fumigatus* ร้อยละ 69, *A. flavus* ร้อยละ 20 และเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ประมาณร้อยละ 15 เป็นเชื้อสาเหตุในการก่อโรค aspergillosis โดยมีเชื้อ *Aspergillus* จำนวน 5 สปีชีส์ที่เป็นสายพันธุ์หลักประกอบด้วย (25)

a) สายพันธุ์ *A. fumigatus*

- เป็นเชื้อราที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น พื้นดิน พืชผักที่เน่าเสีย มีรายงานเป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคทั้งในปศุสัตว์และพืชผักทางการเกษตร (26, 27) เชื้อราสปีชีส์นี้เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องและเป็นเชื้อสาเหตุที่พบมากที่สุดของการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย (invasive aspergillosis)
- มีลักษณะทางมหสังฐานที่ คล้ายคลึงกับเชื้อ *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *A. udagavae*, *A. thermomutatus*, *A. pseudofisher* และ *A. fumigati*affinis ไม่สามารถแยกได้โดยการสังเกตด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำให้ในห้องปฏิบัติการหลายแห่งรายงานผลการจัดกลุ่มเชื้อเหล่านี้ซึ่งได้จากการสังเกตลักษณะทางมหสังฐาน (macroscopic examination) และจุลสังฐาน (microscopic examination) เท่านั้นว่า “*A. fumigatus* complex”
- เชื้อกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะไวต่อยา amphotericin B แต่ในกลุ่มของผู้ป่วย IA ที่มีความรุนแรงของโรคมก และการดำเนินของโรคเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จะทำให้มีอัตราการเสียชีวิตสูง (2, 28)

b) สายพันธุ์ *A. flavus*

- เป็นเชื้อราที่พบมากในพืชผักทางการเกษตร ก่อให้เกิดโรคระบาดในรากของพืชตระกูลหัวมัน รวมถึงโคนต้นของพืชตระกูลเห็ด สามารถสร้างสาร aflatoxin ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งในผลผลิตทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยวโดยเฉพาะการเก็บรักษาผลผลิตไว้ในสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการเจริญของเชื้อ นั่นคือ บริเวณที่มีสารอินทรีย์และความชื้น อุณหภูมิในช่วง 25-35°C สำหรับในคน เชื้อ *A. flavus* พบเป็นสาเหตุก่อโรคสูงเป็นอันดับสองรองจากเชื้อสายพันธุ์ *A. fumigatus* complex (29)
- ลักษณะทางมหสังฐานของเชื้อ *A. flavus* เมื่ออายุยังอ่อน (ไม่เกิน 5 วัน) เชื้อราสปีชีส์นี้จะมีลักษณะที่ค่อนข้างชัดเจนและมีเอกลักษณ์ นั่นคือ มีสีเหลืองเขียวหรือสีเขียวมะกอกแตกต่างจากสายพันธุ์อื่น แต่อย่างไรก็ตามสีดังกล่าวจะเข้มขึ้นเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นจนบางครั้งกลายเป็นสีเขียวเข้มหรือสีเขียวขี้ม้า ทำให้สับสนกับสายพันธุ์ *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *A. udagawae* และ *A. thermomutatus* ได้

c) สายพันธุ์ *A. niger*

- พบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป ทั้งในอากาศและพื้นดิน รวมถึงพื้นผิวในบ้านเรือนที่มีความชื้นสูง เชื้อ *A. niger* นี้มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วมากเมื่อเทียบกับเชื้อ *Aspergillus* สปีชีส์อื่นๆ ในวงการอุตสาหกรรม ด้วยคุณสมบัติของเชื้อ *A. niger* ที่สามารถสร้างกรดอะมิโน โปรตีนหรือสารประกอบทางชีวภาพหลายชนิด ทำให้เชื้อ *A. niger* นี้มีความสำคัญในการนำมาผลิตสาร citric acid และอุตสาหกรรมการผลิต

เชื้ออหิวต์ต่าง ๆ ในวงการเกษตรกรรม แม้ว่าเชื้อ *A. niger* จะเป็นเชื้อสาเหตุของโรค “black mold” ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากในผลิตผลทางการเกษตร แต่อย่างไรก็ตาม food and drug administration (FDA) ได้ให้การรับรองว่าเชื้อ *A. niger* เป็น generally recognized as safe (GRAS) ที่สามารถนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างปลอดภัยหากใช้ในปริมาณที่กำหนดและไม่ใช้สายพันธุ์ย่อย (subspecies) ที่เคยก่อโรคในคนและได้รับยาต้านเชื้อรามาก่อน มิเช่นนั้นเชื้ออาจสร้างสารพิษ (toxin) ที่เป็นอันตรายกับสุขภาพของมนุษย์ได้ (30)

- ด้วยลักษณะทางมหสังฐานของเชื้อ *A. niger* ที่มีสปอร์สีดำเข้ม หลายครั้งเชื้อ *A. niger* มักถูกวินิจฉัยผิดว่าเป็นราดำหรือกลุ่มเชื้อราที่มีการสร้างเม็ดสีเข้ม (dematiaceous fungi) ซึ่งมีวิธีการรักษาที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง

d) สายพันธุ์ *A. terreus*

- เชื้อ *A. terreus* พบได้ทั่วไปทั้งในเม็ดฝุ่น ชากพืช พื้นดินทั่วโลกหรือแม้กระทั่งในทะเลทราย แต่เจริญได้ดีในพื้นที่ที่มีอากาศอบอุ่นและร้อนชื้น เชื้อ *A. terreus* มีบทบาทอย่างมากและมีประโยชน์ยิ่งในวงการอุตสาหกรรมการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น itaconic acid, cis-aconitic acid และเอนไซม์ xylanase ที่ใช้ในการผลิตยาลดไขมันในเลือด แต่สำหรับในคน เชื้อ *A. terreus* พบเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อแบบฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งมีอุบัติการณ์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ ตัวเชื้อ *A. terreus* เองต่อต้านยา amphotericin B ซึ่งสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของโรคและพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (poor prognosis) ในผู้ป่วย (31)
- ลักษณะเด่นของเชื้อ *A. terreus* ที่แตกต่างจากสปีชีส์อื่นคือ เชื้อ *A. terreus* สามารถสร้างสปอร์ได้จำนวนมาก โดยสปอร์ที่สร้างจะมีก้านที่ยาวทำให้เพิ่มความสามารถในการแพร่กระจายของสปอร์ออกไปได้ไกลขึ้น สำหรับลักษณะทางมหสังฐานจะคล้ายกับสายพันธุ์ *A. nidulans* เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น

e) สายพันธุ์ *A. nidulans*

- เป็นเชื้อราที่สามารถสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศผ่านวงจรไมโอซิส (meiosis) ได้จึงนิยมถูกนำมาใช้เป็นโมเดลในการวิจัยเพื่อศึกษากระบวนการวิวัฒนาการต่างๆ (32) เชื้อ *A. nidulans* นี้สามารถพบได้ทั่วไปเช่นเดียวกับสปีชีส์อื่น ทั้งในเศษซากพืช ในดิน และอากาศ
- ลักษณะเด่นของเชื้อกลุ่มนี้คือสปอร์มีขนาดเล็ก สัมพันธ์กับอุบัติการณ์การก่อโรคที่มักเกิดในปอดส่วนลึก ลักษณะทางมหสังฐานจะคล้ายกับสายพันธุ์ *A. terreus* เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น
- พบเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในปอดของนก หรือทำให้เกิดโรคติดเชื้อราในถุงบริเวณลำคอในม้า (33) สำหรับในคน พบอุบัติการณ์การติดเชื้อ *A. nidulans* น้อยเมื่อเทียบกับสปีชีส์อื่น แต่ถ้าติดเชื้อแล้วจะรักษายากเนื่องจากเชื้อ *A. nidulans* พบมากในธรรมชาติเขตเมือง เช่น สวนสาธารณะ ซึ่งเชื้อมักมีการสัมผัสกับยาฆ่าแมลงทำให้ถึงแม้เชื้อ *A. nidulans* จะไม่ได้ต่อต้านยา amphotericin

B โดยกำเนิด แต่สายพันธุ์ที่พบทั่วไปในธรรมชาติมักต้องอาศัยผลกระทบอย่างยั่งยืนต่อการรักษา

1.4 ลักษณะอาการของโรค aspergillosis

โดยทั่วไปแม้ว่าเชื้อ *Aspergillus* จะพบได้ในสิ่งแวดล้อม แต่ในประชากรที่มีระบบภูมิคุ้มกันแข็งแรงสมบูรณ์ปกติจะสามารถป้องกันและกำจัดสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus* ไม่ให้บุกรุกเข้าสู่ระบบต่างๆ ของร่างกายจนนำไปสู่การก่อโรคได้ ทำให้ประชากรส่วนใหญ่ไม่ได้รับผลกระทบรุนแรงถึงขั้นจำเป็นต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลหรือถึงขั้นเสียชีวิต โดยส่วนใหญ่มักเป็นเพียงการเกิดภาวะภูมิแพ้ ไอจาม น้ำมูกไหล หายใจติดขัด ซึ่งอาการเหล่านี้จะบรรเทาไปได้เองเมื่อออกจากสภาวะแวดล้อมที่มีเซลล์สปอร์เหล่านั้น เช่น การเดินออกนอกอาคารที่มีสปอร์ของเชื้อจำนวนมาก แต่ในทางตรงกันข้าม การรับเอาสปอร์ดังกล่าวของประชากรในกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือภูมิคุ้มกันบกพร่องเข้าสู่ร่างกายจะนำไปสู่การเกิดโรค aspergillosis ซึ่งสามารถแบ่งย่อยตามกลุ่มอาการได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ (34)

a) กลุ่มอาการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection)

- Chronic pulmonary aspergillosis (CPA) เป็นโรคที่มีความผิดปกติของปอดโดยมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Aspergillus* spp. โดยชนิดที่พบบ่อยที่สุดคือ chronic cavitary pulmonary aspergillosis (CCPA) ที่หากไม่ได้รับการรักษาอาจทำให้อาการของโรคดำเนินไปเป็นการเกิดพังพืดขึ้นในเนื้อเยื่อปอด (chronic fibrosing pulmonary aspergillosis) (35)
- Keratitis aspergillosis เป็นการติดเชื้อที่บริเวณกระจกตา ส่งผลต่อความสามารถในการมองเห็นของผู้ป่วย ซึ่งถ้าสาเหตุของการติดเชื้อเกิดจากเชื้อราจะเรียกว่า fungal keratitis หรือ keratomycosis ซึ่งจำเป็นต้องวินิจฉัยแยกสาเหตุการติดเชื้อว่าไม่ได้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่พบว่าเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของการติดเชื้อบริเวณกระจกตา แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันพบอุบัติการณ์การเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราสูงขึ้นทั่วโลก โดยปัจจัยเสี่ยงของโรคอาจเกิดจากการที่ผิวกระจกตาได้รับการบาดเจ็บจากสาเหตุต่างๆ (cornea injury) การใช้ยาสเตียรอยด์ติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งเชื้อราที่เป็นสาเหตุอาจแตกต่างกันไปตามสัดส่วนสายพันธุ์ของเชื้อราในบริเวณนั้นๆ และสภาพภูมิอากาศ โดยพบว่าในบริเวณที่มีอากาศอบอุ่นรวมถึงประเทศไทย เชื้อสาเหตุส่วนใหญ่มักเกิดจากเชื้อราชนิดราสาย เช่น *Fusarium* spp. และ *Aspergillus* spp. (36)
- Otomycosis aspergillosis เป็นโรคติดเชื้อแบบเรื้อรังในช่องหูภายนอกและใบหูส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียร้อยละ 90 และเกิดจากเชื้อราร้อยละ 10 (37) ซึ่งในเชื้อราสาเหตุนั้นพบเป็นเชื้อ *Aspergillus* spp. สูงถึงร้อยละ 75 (38) โดยมีเชื้อ *A. niger* เป็นสปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุด โรคดังกล่าวสามารถป้องกันได้ด้วย การรักษาความสะอาดและดูแลป้องกันการอักเสบขึ้นของช่องหู (39) ส่วนใหญ่ก็มีอาการอักเสบแบบเรื้อรังคิดเป็นร้อยละ 3-5 ของจำนวนผู้ป่วย otomycosis aspergillosis ทั้งหมด ในขณะที่อาการ

อีกเสบแบบเฉียบพลันพบเพียงร้อยละ 0.04 ของจำนวนผู้ป่วย otomycosis aspergillosis เท่านั้น

- Onychomycosis หรือ non-dermatophyte mould onychomycosis (NDMO) aspergillosis เป็นการติดเชื้อบริเวณเล็บที่ไม่ได้มีสาเหตุจากเชื้อรากลุ่ม dermatophyte แต่มีสาเหตุจากเชื้อ *Aspergillus* spp. พบอุบัติการณ์สูงในผู้ป่วยเบาหวาน คิดเป็นร้อยละ 71 ในขณะที่อุบัติการณ์ในประชากรกลุ่มอื่นทั้งที่ภูมิคุ้มกันปกติและภูมิคุ้มกันต่ำ คิดเป็นเพียงร้อยละ 35 เท่านั้น โดยสายพันธุ์ที่พบว่าเป็นสาเหตุส่วนใหญ่คือ *A. flavus*, *A. terreus* และ *A. niger* (40)
- Saprophytic sinusitis aspergillosis เป็นการอักเสบของไซนัสที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตจำพวก saprophyte มักพบก่อโรคในคนที่อาการภูมิแพ้กำเริบหรือผู้ป่วยที่รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์เป็นระยะเวลานาน ผู้ป่วยเบาหวาน หรือมีการผ่าตัดเข้าไปในเนื้อเยื่อบริเวณโพรงจมูก (41)

b) กลุ่มอาการภูมิแพ้ (allergic)

- Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) เป็นภาวะภูมิแพ้ที่เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มากเกินไปจากการกระตุ้นโดยเชื้อราที่เข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ ผ่านการสร้างแอนติบอดีชนิด immunoglobulin E ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดอาการต่างๆ โดยมีอาการหอบหืดเป็นอาการหลักร่วมกับอาการต่างๆ แล้วแต่บุคคล เช่น ไอเรื้อรัง ไข้ หลอดลมอักเสบ น้ำหนักลด เหงื่อออกในเวลากลางคืน (42)
- Severe asthma with fungal sensitivity (SAFS) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการสุดตมสปอร์ของเชื้อราปริมาณมากในระยะเวลาหนึ่งทำให้เกิดการกระตุ้นอาการหอบหืดอย่างรุนแรง พบว่าสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* (43) โรคนี้มักพบในผู้ป่วยที่มีประวัติภูมิแพ้สปอร์ของเชื้อราอย่างรุนแรง และอาการจะมากขึ้นสัมพันธ์กับจำนวนสปอร์ของเชื้อราที่สูดหายใจเข้าไป
- Allergic fungal sinusitis (AFS) เป็นการอักเสบที่พบบริเวณโพรงไซนัสหลังสุดหายใจเอาสปอร์ของเชื้อราเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ (15) มักมีอาการหายใจลำบาก ปวดหัว ปวดใบหน้า มีน้ำมูกเป็นเมือกเขียวข้น สูญเสียการรับรู้อารมณ์หรือกลิ่นเนื่องจากเสมหะจากจมูกไหลลงช่องหลังคอ (postnasal drip) ส่วนใหญ่แพทย์มักให้การรักษาตามอาการ หลังวินิจฉัยโรคโดยการตรวจเลือด การฉายรังสี computerized tomography scan (CT scan) และ/หรือการส่องกล้องเข้าไปในโพรงจมูก (44)

c) กลุ่มอาการเฉียบพลัน (acute)

- Invasive aspergillosis (IA) เป็นการติดเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* ที่มีอาการรุนแรงที่สุดเนื่องจากเชื้อมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย มักพบในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ เช่น ผู้ป่วยรับยากดภูมิคุ้มกันระหว่างปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยโรกระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง (7) การเกิดโรคสามารถเกิดขึ้นได้ในหลายอวัยวะพร้อมกัน แต่พบว่ามีร้อยละ 80 จะเป็นการติดเชื้อในปอดเป็นหลัก เรียกว่าโรคติดเชื้อรา *Aspergillus* ที่ปอด

แบบรุกราน (invasive pulmonary aspergillosis: IPA) (45) กลุ่มอาการนี้เป็นกลุ่มอาการที่รักษายาก และผู้ป่วยมีอุบัติการณ์การเสียชีวิตสูงที่สุด

d) กลุ่มอาการอื่นๆ

- Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis (CNPA) มักพบในผู้ป่วยที่มีโรคปอดแบบเรื้อรังมาก่อนแล้ว เช่น ในผู้ป่วยวัณโรค หรือมะเร็งปอด
- Aspergilloma คือ การที่เชื้อรา *Aspergillus* เข้าสู่ร่างกายและเจริญเติบโตในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด สมอง โพรงงมูก เกิดเป็นก้อนเชื้อราในเนื้อเยื่อนั้น (fungus ball) ส่วนใหญ่แพทย์มักให้การรักษาด้วยการผ่าตัดเอาก้อนของเชื้อราออกเพื่อป้องกันการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นในภายหลัง (15)

โดยสรุป โรค aspergillosis สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มตามอาการและความรุนแรง โดยกลุ่มอาการเฉียบพลันหรือโรค IA คือ กลุ่มอาการที่มีความรุนแรงมากที่สุด สัมพันธ์กับอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่เพิ่มสูงขึ้นทุกปี สอดคล้องกับรายงานทางวิชาการของ Thammahong และคณะ ซึ่งได้รวบรวมข้อมูลจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ในช่วงปี ค.ศ. 2000-2010 แสดงให้เห็นถึงจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อ IA ที่มีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉลี่ยคิดเป็น 1.2 เท่าต่อปี (25) เช่นเดียวกับรายงานอุบัติการณ์ของศูนย์รับบริจาคอวัยวะสภากาชาดไทย ที่ทำการศึกษากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะในช่วงเวลาเดียวกัน ในด้านการรักษา จากการศึกษาของ Carolina และคณะ พบว่าการเสียชีวิตของผู้ป่วยกลุ่ม IA มีอัตราสูงถึงร้อยละ 60.5 โดยเสียชีวิตภายใน 14 วัน คิดเป็นร้อยละ 98 และเสียชีวิตภายใน 21 วัน คิดเป็นร้อยละ 87 ซึ่งหนึ่งในสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวนอกจากปัจจัยด้านระยะของโรคและความรุนแรงของตัวโรคเองแล้ว ชนิดของยาต้านเชื้อราที่ผู้ป่วยได้รับซึ่งไม่สอดคล้องกับสปีชีส์ของเชื้อสาเหตุนำไปสู่การตอบสนองการรักษาที่ไม่ดี ก็เป็นอีกสาเหตุหลักหนึ่งที่สำคัญเช่นเดียวกัน (2)

1.5 การรักษาโรค aspergillosis

การรักษาโรค aspergillosis โดยส่วนใหญ่จะใช้การผ่าตัดกรณี que เชื้ออาศัยอยู่ในร่างกายโฮสต์ โดยไม่ก่อโรค ณ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง (local colonization) ร่วมกับการให้ยาต้านเชื้อรากรณี que การติดเชื้อเป็นแบบแพร่กระจาย (disseminated infection)

a) การผ่าตัด จะใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรค aspergillosis ที่มีการสร้าง fungal ball หรือก้อนของเชื้อราตามเนื้อเยื่อหรือ ณ อวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง ซึ่งบางครั้งอาจใช้ในการรักษาผู้ป่วย IA หรือ allergic aspergillosis ได้ขึ้นอยู่กับอาการของผู้ป่วยในขณะนั้น แต่ไม่แนะนำให้ใช้ในการรักษา chronic pulmonary aspergillosis ในทางการแพทย์แม้ว่าการผ่าตัดจะดูเหมือนเป็นวิธีการรักษาที่ต้นเหตุและตรงจุดที่สุดเนื่องจากการนำเอาเชื้อสาเหตุออกจากร่างกาย แต่อย่างไรก็ตาม แพทย์เชื่อว่าในผู้ป่วยที่มีการ colonize ของเชื้อรา จะต้องมีการสปอร์หรือเศษซากของเชื้อกระจายอยู่ในร่างกาย ดังนั้น แม้ว่าผู้ป่วยจะได้รับการผ่าตัดแล้ว การให้ยาต้านเชื้อรายังคงเป็นสิ่งจำเป็น

b) การให้ยาต้านเชื้อรา ในปัจจุบันการรักษาโรค aspergillosis มักให้ยาต้านเชื้อรา 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) ยาในกลุ่ม azoles 2) กลุ่ม echinocandins และ 3) กลุ่ม polyene โดยมียา amphotericin B (กลุ่ม polyene) เป็น 1st drug of choice ทั้งในรูปแบบเปลือย (pure powder) และรูปแบบใหม่

ที่มีโมเลกุลไขมันหุ้ม (liposomal amphotericin B) เพื่อลดความเป็นพิษยา amphotericin B ดังกล่าวออกฤทธิ์ผ่านกลไกการเข้าจับโมเลกุล ergosterol ซึ่งเป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา ส่งผลให้โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเสียหายเกิดรูนำไปสู่การตายของเชื้อในที่สุด กลไกการฆ่าเชื้อราเช่นนี้ทำให้ยา amphotericin B ถูกจัดอยู่ในกลุ่มยาประเภท “fungicidal” สำหรับความเข้มข้นหรือปริมาณยาที่ใช้ในการรักษานั้น แม้ว่าในทางราวิทยาจะยังไม่มีกำหนดค่า MIC cut-off สำหรับเชื้อในกลุ่มราสายรวมถึงเชื้อ *Aspergillus* ในทางปฏิบัติแพทย์มักอ้างอิงจากค่า epidemiological cut-off (ECV) ในงานวิจัยต่างๆ ดังเช่นในงานของ Lass และคณะ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความไวรับต่อยา amphotericin B ของเชื้อสาเหตุและอัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยโรค aspergillosis จำนวน 29 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยที่มีเชื้อ *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. terreus* เป็นเชื้อสาเหตุ พบว่าผู้ป่วยที่เชื้อสาเหตุมีค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อยา amphotericin B น้อยกว่า 2 mg/mL มีการตอบสนองต่อการรักษาส่งผลถึงอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 100 (n=6/6) ในขณะที่ผู้ป่วยที่เชื้อสาเหตุมีค่า MIC ต่อยาชนิดเดียวกันมากกว่าหรือเท่ากับ 2 mg/mL มีการตอบสนองต่อการรักษาส่งผลถึงอัตราการรอดชีวิตเพียงร้อยละ 4.3 (n=1/23) จึงกำหนดค่า MIC cut-off ของยา amphotericin B ดังนี้ ค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 mg/mL จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อไวรับต่อยา (susceptible), ค่า MIC เท่ากับ 1 mg/mL จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อไวรับต่อยาแบบก้ำกึ่ง (intermediate) และค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 2 mg/mL จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อดื้อต่อยา (resistant) (46) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Elefanti และคณะ (47) ถึงแม้ว่าการใช้ยา amphotericin B นี้จะให้ผลการรักษาที่ดี แต่อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยบางรายยังคงพบอาการข้างเคียง (side effect) เช่น หนาวสั่น ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา amphotericin B ในรูปแบบเปลือย รวมถึงผลกระทบต่อไต (nephrotoxicity) (48) ในกรณีดังกล่าวแพทย์จะปรับไปใช้ยากกลุ่ม azoles ซึ่งเป็นยากกลุ่ม fungistatic มีผลข้างเคียงน้อยกว่า ออกฤทธิ์ผ่านกลไกการยับยั้งการสร้าง ergosterol ซึ่งเป็นโมเลกุลองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา ทำให้เชื้อราไม่สามารถแบ่งตัวได้ ยาในกลุ่ม azoles นี้ที่นิยมใช้ได้แก่ ยา voriconazole และยา isavuconazole แม้ว่าจากสถิติการรักษาพบว่ายา voriconazole ให้ผลการรักษาเทียบเท่ายา amphotericin B และดีกว่ายา isavuconazole แต่อย่างไรก็ตามยา voriconazole เป็นยาที่พัฒนาขึ้นใหม่ ต้นทุนสูง และไม่อยู่ภายใต้สิทธิการรักษา ดังนั้น การใช้ยาดังกล่าวในทางปฏิบัติยังคงต้องพิจารณารายบุคคลภายใต้เงื่อนไขที่ผู้ป่วยไม่สามารถใช้ยา amphotericin B (49) ยาในกลุ่ม echinocandins เป็นยาทางเลือกอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการใช้ในผู้ป่วยโรค aspergillosis โดยตัวยานี้นิยมใช้อย่างแพร่หลาย คือยา caspofungin ซึ่งเป็นยากกลุ่ม fungistatic ออกฤทธิ์ผ่านกลไกการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์สารชีวภาพ ชื่อ “ β -1, 3-glucan” ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อ *Aspergillus* อีกชนิดหนึ่ง แม้ว่ายา caspofungin จะมีรายงานว่าให้ผลการรักษาดีกว่ายา amphotericin B (50) แต่อย่างไรก็ตาม ด้วยกลไกการออกฤทธิ์แบบ fungistatic การใช้ยากกลุ่มนี้จะมีข้อจำกัดโดยเฉพาะในผู้ป่วย IA โดยสรุปยาต้านเชื้อราที่เป็น 1st drug of choice สำหรับโรค aspergillosis ในปัจจุบันคือยา amphotericin B ซึ่งถึงแม้ในอดีตจะมีปัญหาในเรื่องของผลข้างเคียง แต่ด้วยนวัตกรรมยาแบบใหม่ liposomal amphotericin B ทำให้สถิติการพบผลข้างเคียงจากการใช้ยา amphotericin B ต่ำมาก จนแทบจะไม่จำเป็นพึ่งยากกลุ่ม azoles และกลุ่ม echinocandin ซึ่งเป็น 2nd drug of choice

นอกจากกรณีผู้ป่วยมีข้อจำกัดของไตร่วมด้วย แพทย์ก็จะพิจารณาใช้ยา 2nd drug of choice ดังกล่าว ร่วมกับยาแก้อักเสบกลุ่ม corticosteroids เช่น prednisone, prednisolone และ methylprednisolone ซึ่งมีฤทธิ์บรรเทาอาการภูมิแพ้ (51)

1.6 การตรวจวินิจฉัย

เนื่องด้วยตามธรรมชาติของตัวโรค การติดเชื้อ IA ในระยะแรกจะไม่แสดงอาการหรือมีอาการน้อยมากและเป็นกลุ่มอาการที่ไม่จำเพาะ เช่น ไข้ ไอ หอบเหนื่อย ไอเป็นเลือด ทำให้ในบางครั้งแพทย์มองข้ามไปหรือหลงทางไม่สามารถแยกได้จากโรคปอดอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้ออื่นได้ ดังนั้นในปัจจุบันสมาคมโรคติดเชื้อราสากลจึงมีนโยบายให้ผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มเสี่ยงติดเชื้อสูงหรือมีไข้ที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านเชื้อรา ควรต้องได้รับการตรวจวินิจฉัยโรค aspergillosis เพิ่มเติมตามเกณฑ์การวินิจฉัยมาตรฐานสากลของ infectious diseases society of america (IDSA) ดังนี้ (33)

- ผลการตรวจหาสารชีวภาพ galactomannan ในตัวอย่างน้ำเหลือง (serum) และ BAL เป็นบวก 2 ครั้งติดต่อกันภายใน 1 สัปดาห์ เพื่อป้องกันผลบวกปลอมจากการตรวจครั้งแรก
- ผลการตรวจหาสารชีวภาพ (1 → 3)- β -D-glucan ในตัวอย่างน้ำเหลือง (serum) เป็นบวก ร่วมกับผลการตรวจอื่นๆ ที่จำเพาะกับโรค aspergillosis
- ผลการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ในช่องอก (chest computed tomographic scan, CT scan) พบก้อนต้องสงสัยในช่องอก
- ผลการเพาะเชื้อ *Aspergillus* จากตัวอย่างชิ้นเนื้อในปอด/หลอดลม น้ำล้างปอด/หลอดลม เป็นบวก

หรือใช้เกณฑ์วินิจฉัยที่กำหนดโดยองค์กร the european organization for research and treatment of cancer/ mycosis study group (EORTC/MSG) ก็ได้เช่นกัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ (52)

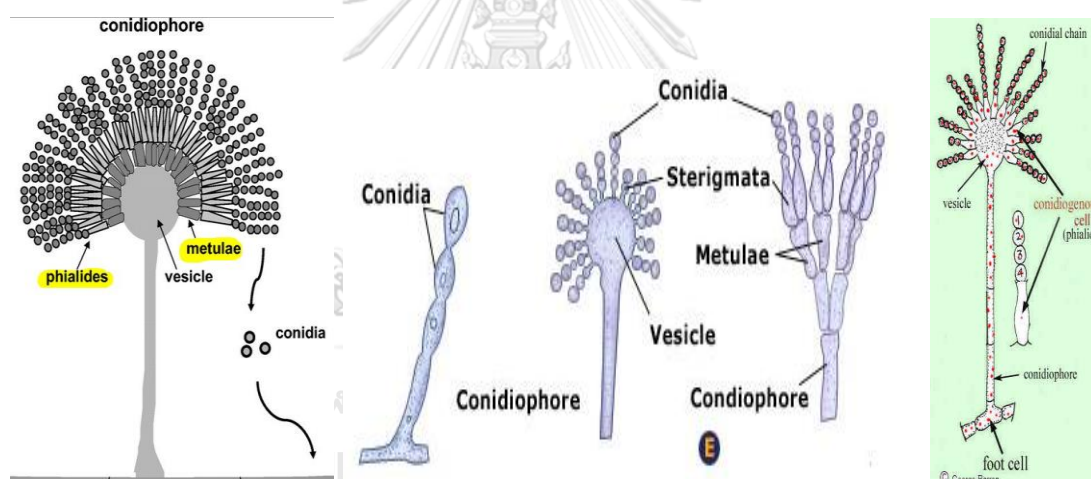
- Possible aspergillosis diagnosis เป็นการวินิจฉัยด้วยการตรวจทางรังสีวิทยา เช่น เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ของปอด (computed tomography หรือ CT scan) แล้วพบลักษณะเป็นโพรง (cavity) ร่วมกับปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อของผู้ป่วย เช่น เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำ แต่เนื่องด้วยการตรวจพบความผิดปกติของผล CT scan ไม่ได้มีความจำเพาะกับการเกิดโรค aspergillosis เท่านั้น อาจมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราชนิดอื่นได้ ดังนั้น การพบความผิดปกติดังกล่าวเป็นเพียงการทำนายโรค aspergillosis จากอุบัติการณ์ที่พบน้อยกว่าโรคอื่นเท่านั้น จำเป็นต้องมีการตรวจยืนยันเพื่อแยกสาเหตุของการติดเชื้อต่อไป
- Definite aspergillosis diagnosis เป็นการวินิจฉัยโดยการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา มักใช้กับสิ่งส่งตรวจบริเวณปลอดเชื้อ (sterile site) ด้วยวิธีดังกล่าวจะพบการรุกรานของเชื้อราสายเข้าสู่เนื้อเยื่อหรือเส้นเลือด การตรวจด้วยวิธีนี้มีความแม่นยำ แต่การเก็บชิ้น

เนื้อส่งตรวจถือเป็น invasive specimen มีความเสี่ยงเกิดการข้างเคียงในผู้ป่วยมากกว่าวิธีอื่น

- c) Probable aspergillosis diagnosis เป็นการวินิจฉัยจากการย้อมและ/หรือการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจบริเวณที่ไม่ปลอดเชื้อ (non-sterile site) ร่วมกับปัจจัยเสี่ยงการติดเชื้ออื่นๆ ของผู้ป่วย แต่เนื่องด้วยวิธีนี้ไม่สามารถแยกระหว่างการก่อนิคมของเชื้อ (colonization) และการติดเชื้อ (infection) ได้ ดังนั้น ผลดังกล่าวจึงจำเป็นต้องใช้วินิจฉัยร่วมกับอาการและความเสี่ยงของผู้ป่วยด้วยเสมอ

การเพาะแยกเชื้อ (cultivation)

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรค aspergillosis ในห้องปฏิบัติการยังคงถือว่าการเพาะแยกเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน วิธีการดังกล่าวใช้ลักษณะทางมหสังฐาน เช่น สี ลักษณะของโคโลนีเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญ และลักษณะทางจุลสังฐาน เช่น การมีผนังกันของเส้นใยเชื้อ การเรียงตัวและรูปร่างของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 4) เป็นข้อมูลอ้างอิงการจำแนกกลุ่มเชื้อถึงในระดับสปีชีส์



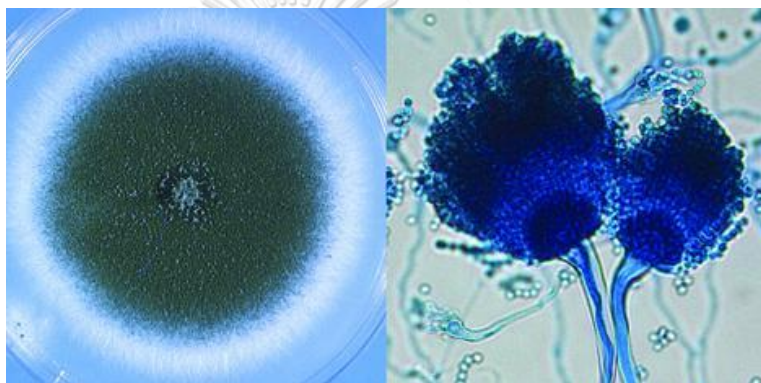
ภาพที่ 4 ลักษณะทางจุลสังฐานของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* (53)

โดยลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานของเชื้อ *Aspergillus* ทั้ง 5 สปีชีส์ที่พบก่อโรคในคนเป็นดังนี้

- 1) สายพันธุ์ *A. fumigatus* (ภาพที่ 5)
 - ลักษณะทางมหสังฐาน: เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ณ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 วัน โคโลนีจะสร้างเม็ดสี สีเขียวแกมน้ำเงิน พื้นผิวคล้ายหนังกลับ ซึ่งประกอบไปด้วยเส้นใยที่ทำหน้าที่ชูสปอร์ (conidiophores) จำนวนมาก (54) ข้อสังเกต ลักษณะทางมหสังฐานของ *A. fumigatus* ในช่วงแรกจะให้เส้นใยสีขาวและมีการสร้างเม็ดสีน้อย คล้ายกับเชื้อ *Neosartorya fisheri* แต่เชื้อ *N. fisheri* จะมีการสร้างถุงหุ้มสปอร์

ชนิดที่ไม่มีช่องเปิด (cleistothecial) ที่ผนังบางและกลมเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่บรรจุสปอร์ของเชื้อเพื่อสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ทำให้สามารถแยกออกจากเชื้อ *A. fumigatus* ได้จากลักษณะของจุลสัณฐานที่ต่างกัน (40) นอกจากนั้นลักษณะทางมหสัณฐานของ *A. fumigatus* เมื่อโตเต็มที่จะมีโคโลนีสีเขียวแกมน้ำเงินเหมือนกับ *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *A. udagawae* และ *A. thermomutatus* ไม่สามารถแยกออกจากกันได้เมื่อสังเกตโคโลนีด้วยตาเปล่า

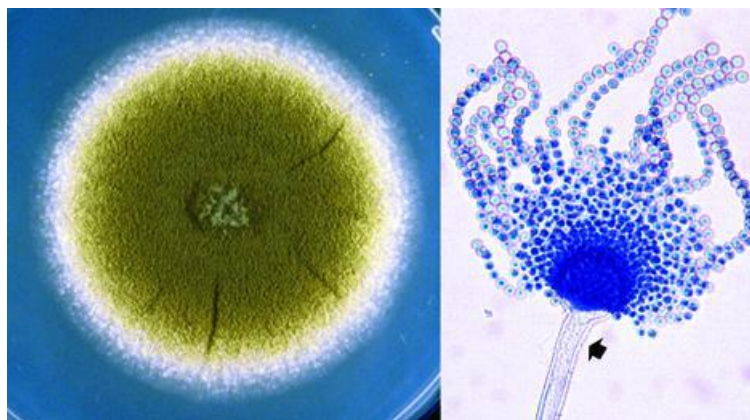
- ลักษณะทางจุลสัณฐาน: สปอร์ไม่มีถุงหุ้ม (conidia) เรียงตัวเป็นแถว ขนาดประมาณ 400×50 ไมครอน แผงของเส้นใยที่ทำหน้าที่ชูสปอร์ (conidiophore stripes) เรียงตัวเป็นแถวเดี่ยว ผนังเรียบ ต่อด้วย phialides 1 ชั้น และ conidia ทรงกลม (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-3.0 ไมครอน) เรียงตัวต่อเป็นโซ่ยาว (55)



ภาพที่ 5 ลักษณะทางมหสัณฐานและจุลสัณฐานของเชื้อ *A. fumigatus* (56)

2) สายพันธุ์ *A. flavus* (ภาพที่ 6)

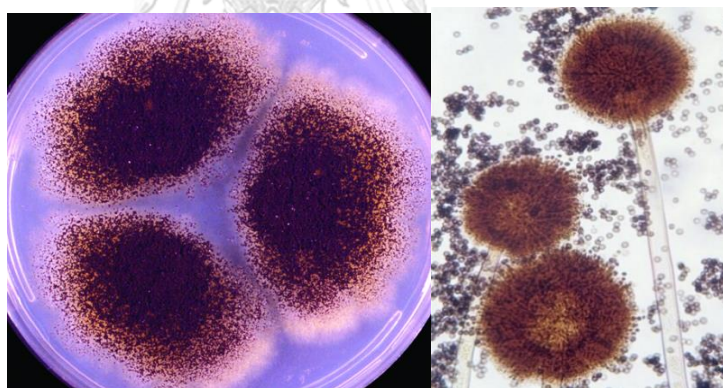
- ลักษณะทางมหสัณฐาน: โคโลนีแบนเรียบ มีสีเหลืองซึ่งจะเข้มขึ้นตามอายุ โดยปกติแล้วเชื้อ *A. flavus* จะมีการสร้างโคโลนีที่มีลักษณะต่างกัน 2 แบบ คือ S (small sclerotia) ที่มีการสร้าง sclerotia ขนาดเล็กจำนวนมาก แต่สร้าง conidia ได้ไม่ดี และ L (large sclerotia) ที่มีการสร้างทั้ง sclerotia ขนาดใหญ่และสร้าง conidia จำนวนมาก (41)
- ลักษณะทางจุลสัณฐาน: conidia เรียงตัวเป็นแถวกลมๆ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง $300-400 \mu\text{m}$ มี conidiophore stripes สีเขียวอ่อน ผิวสัมผัสหยาบ บางสายพันธุ์สามารถผลิตเม็ด sclerotia สีนํ้าตาลได้ด้วย (56)



ภาพที่ 6 ลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานของเชื้อ *A. flavus* (56)

3) สายพันธุ์ *A. niger* (ภาพที่ 7)

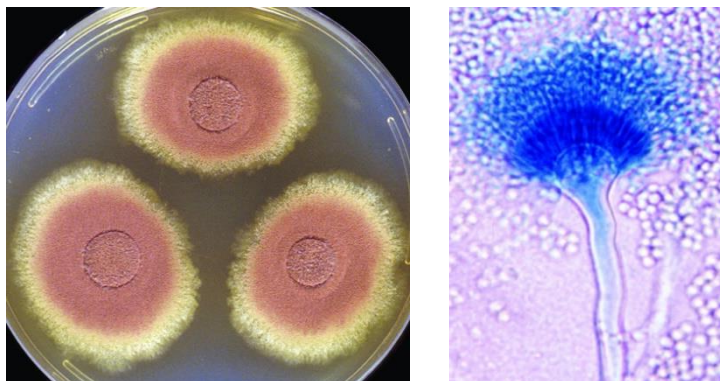
- ลักษณะทางมหสังฐาน: โคลนีสีขาวเหลือง ปกคลุมด้วย conidia สีน้ำตาลเข้มถึงดำ อย่างหนาแน่น เมื่อมีอายุมากขึ้นลักษณะของโคลนนี้จะคล้ายกับโคลนของ เชื้อ *Rhizopus* spp. เชื้อ *Mucor* spp. และ Zygomycetes หรือราดำ (42)
- ลักษณะทางจุลสังฐาน: conidia มีขนาดใหญ่ ทรงกลม สีน้ำตาลเข้ม conidiophore stripes ผนังเรียบ ตัดสี่จางๆ ไล่ถึงสี่เข็มทางส่วนหัว (56)



ภาพที่ 7 ลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานของเชื้อ *A. niger* (56)

4) สายพันธุ์ *A. terreus* (ภาพที่ 8)

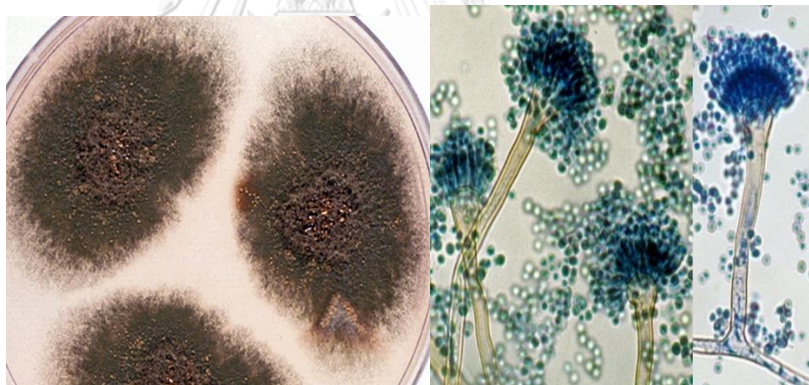
- ลักษณะทางมหสังฐาน: โคลนีสีเหลือง/สีน้ำตาลเข้ม มี conidia สีน้ำตาลอ่อน เรียงตัวอัดกันแน่น
- ลักษณะทางจุลสังฐาน: conidiophore stripes ตัดสี่จางๆ ผนังเรียบ conidia กลมหรือรูปไข่ ขนาด 1.5-2.5 ไมครอน ตัดสี่จางถึงเหลืองอ่อน ผนังเรียบ (57) ลักษณะ conidia ของเชื้อจะคล้ายกับ *Scedosporium apiospermum* ซึ่งอาจจะต้องใช้ระยะเวลาเพาะเชื้อไว้นานถึง 10 สัปดาห์เพื่อให้สามารถจำแนกความแตกต่างได้ (40)



ภาพที่ 8 ลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานของเชื้อ *A. terreus* (57)

5) สายพันธุ์ *A. nidulans* (ภาพที่ 9)

- ลักษณะทางมหสังฐาน: โคลนีสีเขียวถึงสีน้ำตาลแดงจากชั้นของ conidia ที่สร้างขึ้น
- ลักษณะทางจุลสังฐาน: conidia มีขนาดสั้น (70x30 ไมครอน) กลม (3-3.5 ไมครอน) เช่นเดียวกับ conidiophore stripes ที่มีขนาดสั้น สีน้ำตาล และผนังเรียบ (56)



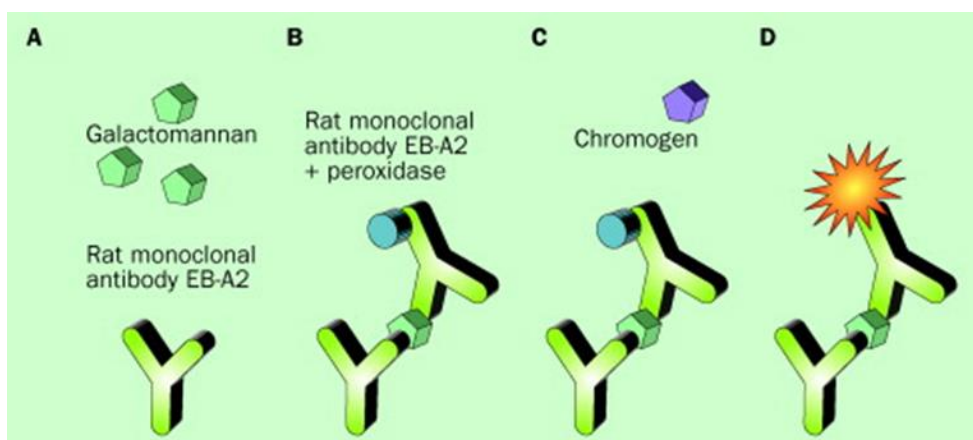
ภาพที่ 9 ลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานของเชื้อ *A. nidulans* (56)

ถึงแม้ว่า cultivation จะมีต้นทุนที่ต่ำ ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงขั้นสูงและมีขั้นตอนที่ไม่ซับซ้อนสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดที่ต้องอาศัยผู้ตรวจวินิจฉัยที่มีประสบการณ์ทั้งในด้านการเพาะเลี้ยงเชื้อให้มีการสร้างสปอร์ที่สมบูรณ์ชัดเจนเพียงพอต่อการจัดจำแนกสปีชีส์และการอ่านผลอีกด้วย นอกจากนี้ ในเชื้อราบางสปีชีส์มีอัตราการเจริญเติบโตช้า ต้องใช้เวลาเฉลี่ยอย่างน้อย 72 ชั่วโมงในการสร้างลักษณะที่จำเพาะสำคัญ รวมถึงการเพาะแยกเชื้อนี้จะไม่สามารถใช้ได้กับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจบางชนิด เช่น บล็อกชิ้นเนื้อ (paraffin block) ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวรวมถึงปัจจัยคุณภาพของสิ่งส่งตรวจทำให้วิธีการนี้มีความไวเพียงร้อยละ 27-57 เท่านั้น (58, 59)

การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (serology)

เนื่องด้วยข้อจำกัดของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี cultivation ข้างต้นที่ต้องใช้ระยะเวลาในการเจริญของเชื้อที่ค่อนข้างนานและมีความไวเพียงร้อยละ 27-57 เท่านั้น รวมถึงมีข้อจำกัดในเรื่องของความปลอดภัยทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเสี่ยงในการสูดหายใจเอาสปอร์ของเชื้อราเข้าไปในระบบทางเดินหายใจของผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้น ในระยะหลังจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยซึ่งมีความรวดเร็วและมีความไวมากขึ้น สามารถตรวจพบได้ก่อนที่ผู้ป่วยจะพบผล CT scan ผิดปกติประมาณ 1 สัปดาห์ (60) โดยอาศัยหลักการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี เพื่อการตรวจหาสาร galactomannan ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อรา ด้วยหลักการ double antibody sandwich ELISA คือ การเคลือบแอนติบอดีที่จำเพาะกับ galactomannan (rat monoclonal antibody EB-A2) ไว้ในหลุมที่จะทำการทดสอบและล้างแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่ติดกับหลุมออกไป หลังจากนั้นเมื่อใส่ตัวอย่างที่มี galactomannan ลงไป จะจับกับแอนติบอดี rat monoclonal antibody EB-A2 ที่ติดไว้บนหลุม เกิดเป็นองค์ประกอบของแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ หรือ antigen-antibody complex ก่อนทำการล้างแอนติเจนส่วนเกินออก หลังจากนั้นจะใส่แอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) ที่จำเพาะกับ galactomannan และถูกติดไว้ด้วย peroxidase คือ rat monoclonal antibody EB-A2+peroxidase เข้าไปจับกับ galactomannan เกิดเป็น antibody-antigen-antibody complex ก่อนล้างองค์ประกอบส่วนเกินอีกครั้ง แล้วตรวจจับสัญญาณด้วย chromogen-peroxidase (ภาพที่ 10) (61) วิธีการดังกล่าวนี้สามารถตรวจจับสารชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) ได้แม้ในปริมาณที่น้อยมาก ทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรคได้แม้เป็นการติดเชื้อในระยะแรก นอกจากนี้ ยังสามารถตรวจได้ในตัวอย่างน้ำเหลืองและ/หรือน้ำล้างปอดของผู้ป่วย ซึ่งเป็น less invasive specimen เมื่อเปรียบเทียบกับ การผ่าตัดตัวอย่างชิ้นเนื้ออีกด้วย

ในทางคลินิก ข้อบ่งใช้ของการตรวจวัดระดับสาร galactomannan มักใช้เพื่อการคัดกรองในผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงและใช้ในการตรวจติดตามการดำเนินไปของโรค โดยหากวัดค่าดัชนีคำนวณได้สูงกว่า 0.5 ในตัวอย่างน้ำเหลืองถือว่าผลเป็นบวก โดย ณ ค่า cut-off นี้การตรวจดังกล่าวจะมีความไวร้อยละ 70-82 และมีค่าความจำเพาะร้อยละ 81-92 (62) สำหรับการตรวจสาร galactomannan จากน้ำล้างปอด เมื่อใช้ค่า cut-off ผลบวก ณ ดัชนีคำนวณที่ 0.7 การตรวจดังกล่าวจะมีความไวร้อยละ 73 และมีค่าความจำเพาะร้อยละ 89 (63) ในทางหลักการความไวและความจำเพาะของการทดสอบนี้ ถือว่าดีมาก แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดหลักของเทคนิคนี้ คือ สาร galactomannan ไม่จำเพาะกับยีสและสปอร์ของเชื้อ ดังนั้น การตรวจพบสาร galactomannan ในสิ่งส่งตรวจจึงเป็นเพียงการทำนายตามอุบัติการณ์ในอดีตว่าผู้ป่วยน่าจะติดเชื้อ *Aspergillus* โดยไม่สามารถระบุสปอร์ของเชื้อสาเหตุได้ การทำนายนี้สอดคล้องกับข้อมูลในงานวิจัยของ Thammahong และคณะ ที่พบว่าวิธีการตรวจหาสาร galactomannan มีค่า positive predictive value (PPV) เพียงร้อยละ 40 ในการวินิจฉัยโรค aspergillosis หมายความว่า การทดสอบที่ให้ผลบวก 100 รายมีเพียง 40 รายเท่านั้นที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* (25) โดยมีค่า negative predictive value (NPV) ร้อยละ 100, ค่าความไว (sensitivity) อยู่ที่ร้อยละ 100, และค่าความจำเพาะ (specificity) มากกว่าร้อยละ 25 (36)



ภาพที่ 10 หลักการตรวจวินิจฉัยด้วย anti-galactomannan (61)

ด้วยเหตุข้อจำกัดดังกล่าว ในปัจจุบันตามแนวทางการตรวจวินิจฉัยของ european organization for research and treatment of cancer/mycoses study group (EORTC/MSG) จึงได้แนะนำให้ตรวจแอนติเจนอีกชนิดหนึ่งเพื่อใช้ร่วมในการวินิจฉัยโรค คือสาร β -d-glucan (BDG) ซึ่งสามารถพบได้บนส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อ *Aspergillus* แต่จะพบมีระดับต่ำมากในเชื้อรา กลุ่ม non-septate hyphae เพื่อใช้เป็นดัชนีการตัดเชื้อเชื้อกลุ่มดังกล่าวออกไป ณ ค่า cut-off ผลบวกที่ระดับ BDG มากกว่า 200 pg/ml โดย ณ ค่า cut-off ดังกล่าวจะคำนวณได้ค่า PPV ร้อยละ 55, NPV ร้อยละ 90, ค่าความไวร้อยละ 60, และค่าความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 88 (4)

การตรวจด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (molecular)

ด้วยเหตุที่การตรวจหาสาร galactomannan ไม่ได้จำเพาะกับเชื้อ *Aspergillus* ในปัจจุบัน เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลจึงเข้ามามีบทบาทในการตรวจวินิจฉัยโรค aspergillosis และจัดจำแนก สปีชีส์ของเชื้อสาเหตุอย่างแพร่หลายมากขึ้น โดยในจุลชีพกลุ่มเชื้อรา บริเวณ *its* หรือ internal transcribed spacer เป็นข้อมูลลำดับเบสบริเวณที่มีวิวัฒนาการและความหลากหลายสูง เหมาะแก่ การใช้อ้างอิงการจัดกลุ่มเชื้อ ดังนั้น ข้อมูลบริเวณ *its* จึงกลายเป็น primary fungal barcode ที่ใช้ กันอย่างแพร่หลายเรื่อยมา

Internal transcribed spacer region หรือ *its* คือ บริเวณ spacer บน DNA ที่คั่นอยู่ ระหว่าง small-subunit (SSU) ribosomal RNA (rRNA) และ large-subunit (LSU) ribosomal RNA ที่อยู่บนโครโมโซม ในสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรียหรือ archaea จะมี *its* เพียง 1 ตำแหน่งที่คั่น อยู่ระหว่าง 16S และ 23S rRNA แต่ในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต (eukaryotes) จะมี *its1* ที่อยู่ ระหว่าง 18S และ 5.8S และ *its2* ที่อยู่ระหว่าง 5.8S และ 28S (64) ในแบคทีเรียและ archaea จะมี สำเนาของ *its* หลายชุดที่อยู่ในบริเวณที่กระจายออกไปบนโครโมโซม ส่วนใน eukaryotes จะมี rRNA ที่มีรหัสยีนถูกคั่นด้วย spacers บนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดซ้ำๆ ต่อๆ กัน (tandem repeats) จำนวนหลายพันชุด ที่ถูกคั่นด้วยบริเวณที่ไม่มีการถอดรหัสบน DNA เรียกว่า intergenic spacer (IGS) หรือ non-transcribed spacer (NTS) (65, 66) โดยลักษณะ ribosomal ของ eukaryotes

จะเริ่มต้นด้วย ปลาย 5' external transcribed spacer (5' ETS), ยีน 18S rDNA, *its1*, ยีน 5.8S rDNA, *its2*, ยีน 26S หรือ 28S rDNA และสิ้นสุดที่ 3' ETS (ภาพที่ 11) (67)



ภาพที่ 11 การเรียงตัวของ *its1*, *its2* และ ribosomal DNA genomic (67)

ตามทฤษฎีของระบบ DNA barcode เพื่อการจำแนกสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ (68, 69) ระยะห่างระหว่างไพรเมอร์ 2 คู่ ควรมีความยาวประมาณ 400-800 นิวคลีโอไทด์ (70) ซึ่งบรรจุด้วยลำดับเบสที่มีความแตกต่างกันของลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ (interspecies variation) มากกว่าความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์เดียวกัน (intraspecies variation) ซึ่งเมื่อตรวจสอบพบว่าบริเวณ *its* มีคุณสมบัติดังกล่าวครบถ้วน ประกอบกับบริเวณ *its* นี้ มีสำเนาหลายชุดใน genome ของเชื้อรา ซึ่งเป็นข้อดีทำให้สามารถเพิ่มจำนวนได้ง่ายส่งผลต่อการเพิ่มความไว (sensitivity) ในปฏิกิริยา (71) จนกระทั่งในปี ค.ศ. 2007 ได้มีการประชุมโดยผู้เชี่ยวชาญด้านราวิทยาทั่วโลก เพื่อพิจารณาตำแหน่งบน DNA 6 ตำแหน่ง ได้แก่ small subunit (SSU), large subunit (LSU), internal transcribed spacer (*its*), DNA-directed RNA polymerase I subunit (RPB1), DNA-directed RNA polymerase II subunit (RPB2) และ mini chromosome maintenance protein (MCM7) เพื่อจัดทำข้อมูล DNA barcode ของเชื้อรา และมีมติให้ใช้ *its* เป็นตำแหน่งในการจัดทำ DNA barcode ให้เป็นฐานข้อมูลที่เหมือนกันเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป (72)

ปัจจุบันบริเวณ *its* กลายเป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงลำดับสารพันธุกรรมภายใต้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย White และคณะ ชื่อว่า “*its-kit1* และ *its-kit4* สำหรับเส้นไพรเมอร์ forward และ reverse ตามลำดับ” ซึ่งผ่านการทดสอบมาแล้วในเชื้อ *A. fumigatus* (ความยาวผลิตภัณฑ์ 463 คู่เบส), เชื้อ *A. flavus* (ความยาวผลิตภัณฑ์ 499 คู่เบส), เชื้อ *A. niger* (ความยาวผลิตภัณฑ์ 392 คู่เบส), เชื้อ *A. terreus* (ความยาวผลิตภัณฑ์ 464 คู่เบส) และเชื้อ *A. nidulans* (ความยาวผลิตภัณฑ์ 473 คู่เบส) (9)

แม้ว่าในปัจจุบัน การจำแนกเชื้อราในระดับสปีชีส์ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาจะยังคงนิยมอ้างอิงข้อมูลบริเวณ *its* แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยทางวิชาการหลายฉบับก็มีรายงานอย่างต่อเนื่องว่า ข้อมูลบริเวณ *its* นี้มีข้อจำกัดในการจำแนกเชื้อระดับสปีชีส์ในกลุ่ม *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* และ *Trichoderma* ที่เพาะแยกได้ในคน เนื่องจากบริเวณ *its* ของเชื้อเหล่านี้มีค่า intra-species variation ที่สูงขึ้น ทำให้การใช้ข้อมูลบริเวณ *its* เพียงชุดเดียวในการ

จำแนกสปีชีส์ของเชื้อไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร (72, 73) รวมถึงข้อมูลสารพันธุกรรมในฐานข้อมูลมาตรฐานหรือ GenBank มีรายงานความคลาดเคลื่อน (error data) ประมาณร้อยละ 27 (74) ส่งผลให้ ณ ปัจจุบัน การจำแนกเชื้อราในระดับสปีชีส์ด้วยข้อมูลบริเวณ *its* และอ้างอิงฐานข้อมูลดังกล่าว กำหนดค่าจุดตัดความคล้าย (% similarity cut-off) ในระดับสปีชีส์เพียงร้อยละ 85 (75) ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า ณ ค่า cut-off 85% similarity นี้ การจัดกลุ่มเชื้อในระดับสปีชีส์โดยอาศัยข้อมูลบริเวณ *its* มีความแม่นยำเพียงร้อยละ 75 ของเชื้อราทางการแพทย์ทั้งหมดเท่านั้น (9)

2. เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อการจำแนกกลุ่มเชื้อ

สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตคือข้อมูลทางชีวภาพที่ถูกส่งต่อระหว่างสิ่งมีชีวิตรุ่นต่อรุ่นโดยมีข้อมูลเฉพาะสำหรับสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่ม ในทางจุลชีววิทยาก็เช่นเดียวกันการจัดแบ่งเชื้อจุลชีพรวมถึงเชื้อราออกเป็นสปีชีส์ต่างๆ นักจุลชีววิทยาก็อ้างอิงข้อมูลทางชีวภาพเหล่านี้ ซึ่งในคำศัพท์เฉพาะเรียกว่า จีโนไทป์ (genotype) โดยข้อมูลเหล่านี้จะทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกต่างๆ อาทิเช่นรูปร่างหน้าตาของสิ่งมีชีวิต รวมถึงการทำงานของอวัยวะต่างๆ ด้วย ซึ่งเราเรียกลักษณะที่แสดงออกเหล่านั้นว่า ฟีนোটายป์ (phenotype) ดังนั้น ข้อมูลทางชีวภาพในสารพันธุกรรมจึงเปรียบเสมือนรหัสลับที่คอยควบคุมการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นสิ่งที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต้องอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อการถอดรหัส หรือที่เรียกว่าเทคนิคการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรม (DNA sequencing)

2.1 การแยกสารพันธุกรรมออกจากเซลล์สิ่งมีชีวิต

โดยธรรมชาติสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจะถูกบรรจุอยู่ในนิวเคลียส ดังนั้น กระบวนการแยกสารพันธุกรรมออกจากเซลล์สิ่งมีชีวิต จึงประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

a) การทำให้เซลล์แตก (lysis step)

ซึ่งโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 หลักการ ได้แก่ 1) physical methods เป็นการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อโดยกลไกทางกายภาพ เช่น การ freeze-thaw, การบดด้วยโกร่ง, การตีแตกด้วยเม็ด bead และ 2) chemical methods เป็นการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อโดยกลไกทางเคมี ส่วนใหญ่มักเร่งการแตกของเซลล์โดยใช้สารละลาย lysis buffer ที่มีส่วนผสมของสารกลุ่มไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2%

b) การแยก DNA ของเชื้อ (DNA isolation step)

เป็นขั้นตอนการแยกสารพันธุกรรมของเชื้อออกจากส่วนประกอบทางชีวภาพอื่นๆ ของเซลล์หลังเซลล์แตก โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 หลักการ ได้แก่ 1) phenol-chloroform-Isoamyl method เป็นการตกตะกอนสารประกอบจำพวกโปรตีนต่างๆ ออกจาก DNA ด้วยสาร phenol จากนั้นจึงล้าง phenol ออก ด้วย chloroform ก่อนที่จะตกตะกอน DNA ในสารละลายด้วย isoamyl alcohol 2) filter ion charge method เป็นการแยก DNA โดยอาศัยการตกตะกอนด้วยสารประกอบจำพวกแอลกอฮอล์ ก่อนแยกตะกอนดังกล่าวออกด้วยกระดาษกรองขนาดเล็ก และ 3) magnetic ion charge method คล้ายกับ filter ion charge method เพียงแต่เปลี่ยนการแยกตะกอน DNA โดยใช้ filter tube เป็นการดูดด้วยแรงแม่เหล็ก

2.2 การตรวจวิเคราะห์บริเวณหรือยีนเป้าหมาย (target region/gene analytic)

เพื่อการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction) เนื่องด้วยสารพันธุกรรมทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดหรือ whole genome มีขนาดใหญ่มากสัมพันธ์กับวิวัฒนาการและความซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ เช่น ในมนุษย์มีขนาดของสารพันธุกรรมใหญ่ถึงล้านล้านคู่เบส ในขณะที่เชื้อรา มีสารพันธุกรรมขนาดประมาณ 1 แสนคู่เบส ดังนั้น การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตอาจไม่ได้จำเป็นในหลายกรณี รวมถึงการศึกษาเพื่อการจำแนกกลุ่มเชื้อด้วย ที่มักนิยมศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริเวณใดบริเวณหนึ่งของยีนที่มีคุณสมบัติเหมาะสม นั่นคือ มีความอนุรักษ์ภายในในกลุ่มเชื้อสปีชีส์เดียวกัน (intra-species conservation) และมีความต่างจากเชื้อ สปีชีส์อื่นๆ ซึ่งในเชื้อราก็มีหลายบริเวณ/ยีน พร้อมคุณสมบัติที่แตกต่างกันไปดังอธิบายข้างต้น การกำหนดตำแหน่งบริเวณหรือยีนเป้าหมาย (target region/gene) นี้ทำได้โดยการออกแบบไพรเมอร์ (primer) ซึ่งก็คือนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ขนาดประมาณ 20-24 นิวคลีโอไทด์ ให้มีคู่เบสที่จำเพาะกับบริเวณปลาย 5' และปลาย 3' ของบริเวณที่สนใจ ก่อนนำไปสู่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคพื้นฐานในทางอณูชีววิทยา เพื่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ณ ตำแหน่งที่สนใจ โดยในปฏิกิริยาจะแบ่งการทำงานออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

- 1) Denaturation เป็นขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 95°C เพื่อแยกดีเอ็นเอสายคู่ ออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ก่อนที่ไพรเมอร์จะเข้าจับในขั้นตอนถัดไป
- 2) Annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับในตำแหน่งที่เราออกแบบไว้ ซึ่งการเข้าจับนี้จะมีความแม่นยำหรือคลาดเคลื่อน ส่วนหนึ่งเกิดจากปัจจัยของอุณหภูมิและสารเคมีในปฏิกิริยาด้วย
- 3) Extension เป็นขั้นตอนที่ deoxynucleotide triphosphates (dNTP) ททยอยเข้าจับกับเบสคู่สมโดยอิงลำดับตามสายของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

ภายใต้หลอดปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนผสมหลัก คือ

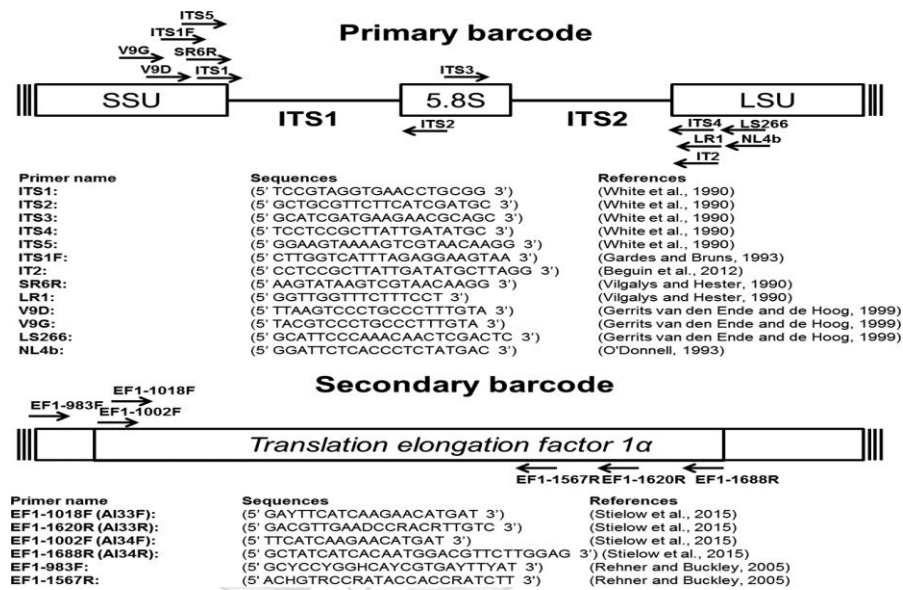
- 1) Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์หน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ DNA สายใหม่ ประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP
- 2) DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ DNA ทำหน้าที่เชื่อมต่อกับนิวคลีโอไทด์ เข้ากับไพรเมอร์ และเชื่อมต่อกับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวเข้าด้วยกัน
- 3) ไพรเมอร์ เป็นนิวคลีโอไทด์หรือ DNA ตั้งต้นสายสั้นๆ นิยมใช้ความยาวที่ 20-24 นิวคลีโอไทด์ และมีองค์ประกอบของ guanine (G) และ cytosine (C) อยู่ระหว่างร้อยละ 40-60 โดยทั่วไปในแต่ละปฏิกิริยาจะใช้ไพรเมอร์ 2 เส้น คือ ไพรเมอร์ forward และ reverse ซึ่งไพรเมอร์ ที่ดีควรมีค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature: T_m) ของทั้งสองเส้นเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด
- 4) DNA template คือ DNA ต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณในการทำ PCR
- 5) $MgCl_2$ ทำหน้าที่เป็น co-factor ของเอนไซม์ polymerase และส่งเสริมการเข้าจับของไพรเมอร์

โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยานี้จะอยู่ในรูปของดีเอ็นเอสายคู่หลังปฏิกิริยาเกิดวนเป็นรอบซ้ำๆ ประมาณ 30-40 รอบ ผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มจำนวนได้นี้ สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุคือ DNA (ประจุลบ) ในสารละลายนำไฟฟ้าคือ tris- borate หรือ TBE Buffer ไปยังขั้วบวกผ่านแผ่นเจลที่มีรูพรุน ก่อนจะนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยสารละลาย intercalating dye เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอสายคู่ต่อไป

2.3 ยีน Translation elongation factors (*tef-1 α*)

Translation elongation factors คือ ชุดของยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน ตั้งแต่การนำ aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) มาที่ไรโบโซมในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน รวมถึงการระบุตำแหน่งของโปรตีน ซึ่งทั้งในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต (prokaryotes) และยูคาริโอต (eukaryotes) จะมีโครงสร้างและหน้าที่ของยีน *tef* ไม่แตกต่างกัน แต่ใน eukaryotes จะมี *tef-1 α* เทียบเท่ากับ translation elongation factor thermo unstable (*tef-Tu*) ที่พบใน prokaryotes ทำหน้าที่จับกับ guanosine triphosphate (GTP) แล้วไปนำ aa-tRNA มาให้ไรโบโซม ในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน โดยทั้ง *tef-1 α* และ *tef-Tu* จะเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ หมายความว่าสามารถพบลำดับนิวคลีโอไทด์ลักษณะนี้ได้ในเชื้อราทุกสายพันธุ์ (76) ยีน *tef-1 α* เป็นหนึ่งใน protein-coding genes ที่ถูกนำมาใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ยีนที่ไม่สามารถแปลงรหัสเป็นโปรตีนได้ เรียกว่า intron ซึ่งมีวิวัฒนาการที่เร็วกว่า *its* ทำให้มีความหลากหลายที่สูงกว่าจึงมีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ได้ดีกว่า (77) และคาดว่า protein-coding genes นี้มีเพียงหนึ่งสำเนาในเชื้อรา ทำให้มีความแปรปรวนที่น้อยกว่าเนื่องจากมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์บริเวณยีนส่วนที่สามารถแปลงรหัสเป็นโปรตีนที่เรียกว่า exons ได้น้อยกว่ายีนบน rRNA ด้วยเหตุดังกล่าวนักวิทยาศาสตร์จึงเชื่อว่ายีน *tef-1 α* มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อราได้ดี (78) ซึ่งคุณสมบัตินี้ได้ถูกพิสูจน์แล้วในการจำแนกเชื้อราระดับสปีชีส์มากกว่า 1, 500 สายพันธุ์ (79)

อ้างอิงงานวิจัยของ Stielow และคณะ ที่ได้ศึกษาหา ยีนและไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมในการเป็น secondary barcode เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อราในระดับสปีชีส์จาก primary barcode นั่นคือ *its* region ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาลำดับสารพันธุกรรมรวม 6 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีนที่อยู่บน rDNA 2 ยีน (*its* region และ LSU: D1-D2 domains of 26/28S, ยีน β -tubulin2 (*tub2*), ยีน γ -actin (*act*), ยีน largest subunit of the RNA-polymerase II (*rpb2*), และยีน translation elongation factor 1- α (*tef-1 α*) จากข้อมูลสารพันธุกรรมของเชื้อรา 74 สายพันธุ์ ที่ครอบคลุมกลุ่มเชื้อราทางการแพทย์ พบว่าไพรเมอร์ *ef1-1018F* (A133F)/*ef1-1620R* สำหรับยีน *tef-1 α* มีความเที่ยงตรงสูงสุดในการจัดกลุ่มเชื้อในระดับสปีชีส์ ดังนั้น ไพรเมอร์คู่ *ef1-1018F* (A133F)/*ef1-1620R* นี้กับยีน *tef-1 α* จึงถูกประกาศให้เป็น secondary barcode สาธารณะสำหรับเชื้อรา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและตรวจสอบความถูกต้องผลของ primary barcode ในการระบุสปีชีส์ของเชื้อราเรื่อยๆ (80) ซึ่งผลการวิจัยนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษา whole genome sequence (WGS) (64) ของ Meyer และคณะอีกด้วย (ภาพที่ 12) (79)



ภาพที่ 12 ภาพโครงสร้าง DNA ของเชื้อราที่ใช้การตรวจหาด้วยไพรเมอร์ *its* และไพรเมอร์ *tef-1α*(79)

ปัจจุบันข้อมูลสารพันธุกรรมยีน *tef-1α* ถูกนำมาใช้เพื่อการจัดกลุ่มเชื้อราในระดับสปีชีส์อย่างแพร่หลาย อ้างอิงงานวิจัยของ Pakshir และคณะ ที่ได้ใช้ยีน *tef-1α* นี้ เพื่อการตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อ *Candida* สาเหตุการติดเชื้อในเล็บโดยทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน 17 สายพันธุ์จากทั้งหมด 5 สปีชีส์ และตัวอย่างขุยเล็บของผู้ป่วยจำนวน 137 ราย และในเล็บอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 10 ราย พบว่าการตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อ *Candida* ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาโดยอาศัยข้อมูลสารพันธุกรรมยีน *tef-1α* มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าการตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อด้วยวิธีการตรวจสอบโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธีการเพาะเชื้อ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคเดียวกันโดยอาศัยข้อมูลบริเวณ *its* พบว่า ยีน *tef-1α* มีความสามารถในการจำแนกเชื้อ *Candida* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ดีกว่าข้อมูลบริเวณ *its* คิดเป็น 0.02 เท่า (81) เช่นเดียวกัน ในงานวิจัยของ Mirhendi และคณะ ซึ่งได้นำข้อมูลสารพันธุกรรมยีน *tef-1α* มาใช้ในการจำแนกเชื้อราในกลุ่ม Dematophytes และสรุปว่ายีน *tef-1α* มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อราได้ดีกว่าบริเวณ *its* โดยพบว่า ในเชื้อกลุ่ม *Arthroderma benhamiae* complex ข้อมูลสารพันธุกรรมยีน *tef-1α* มีค่า inter-species variation สูงถึง 40-56 คู่เบส ซึ่งมากกว่าข้อมูลบริเวณ *its* อย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับผลการทดสอบในเชื้อกลุ่ม *Trichophyton erinaceid* ซึ่งไม่พบ intra-species variation ในข้อมูลสารพันธุกรรมยีน *tef-1α* เลย ในขณะที่บริเวณ *its* พบมีลักษณะ intra-species variation ประมาณ 1-3 คู่เบส (82) นอกจากนี้ จากการศึกษาแล้วยังพบว่าข้อมูลสารพันธุกรรมยีน *tef-1α* มีการแทรกหรือลบคู่เบส (insertions and deletions; indels) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะส่งเสริมความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ รวมถึงมีการเรียงตัวของคู่เบสที่มี

ความจำเพาะกับเชื้อเพียงสปีชีส์หนึ่งๆ เท่านั้นหรือที่เรียกว่า signature nucleotides ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะส่งเสริมความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อเช่นเดียวกัน (83)

2.4 การศึกษาลำดับเบสของสารพันธุกรรม (DNA sequencing)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมเป็นวิธีมาตรฐานทางจีโนมไทป์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการวิจัยซึ่งปัจจุบันการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวทำได้หลายวิธี โดยวิธี sanger DNA sequencing ซึ่งถูกค้นพบโดย Sanger ในปี 1951 เป็นวิธีหนึ่งในเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมที่ได้รับความนิยมมากที่สุด วิธีนี้อาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ทำหน้าที่สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ ร่วมกับ deoxynucleotide triphosphates (dNTP) ที่คอยทำหน้าที่ต่อสายดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) จากสายดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยที่ดีเอ็นเอสายเดี่ยวนี้ เริ่มต้นมาจากการแยกสายของดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) และการเข้าจับของไพรเมอร์ (primer) ซึ่งถูกออกแบบมาอย่างจำเพาะ ในปฏิกิริยาเอนไซม์ dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) จะทำหน้าที่หยุดการต่อสายดีเอ็นเอเมื่อมี ddNTP แต่ละชนิด ได้แก่ ddATP, ddCTP, ddGTP, หรือ ddTTP เข้าจับ และเกิดเป็นสายของดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวต่างกัน 1 เบส จากนั้นเมื่อนำผลผลิตทั้งหมดมาวิเคราะห์ก็จะทำให้ทราบลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอเหล่านั้นๆ

2.5 การแปลรหัสลำดับเบสของสารพันธุกรรม

ข้อมูลลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ DNA sequencing สามารถนำมาแปลผลได้หลายทาง หนึ่งในนั้นคือการแปลผลเพื่อหาสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตด้วยการทำ sequence alignment ซึ่งมี 2 ประเภทหลัก คือ 1) pair-wise sequence alignment ที่จะเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทีละ 2 ชุดข้อมูล ระหว่างชุดข้อมูลที่ศึกษาและชุดข้อมูลสารพันธุกรรมที่ทราบสปีชีส์อยู่แล้วซึ่งส่วนใหญ่จะถูกบรรจุอยู่ในฐานข้อมูล (database) ต่างๆ อาทิเช่น GenBank, ISHAM database และ 2) multiple sequence alignment ที่จะเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หลายชุดในเวลาเดียวกัน โดยมีชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบสปีชีส์อยู่แล้วอย่างน้อย 1 ชุดในการเปรียบเทียบ ตามหลักการของ algorithm Needleman-Wunsch และ Smith-Waterman ซึ่งบรรจุอยู่ในโปรแกรมสำเร็จรูปต่างๆ เช่น ClustalW, PROBCONS, MUSCLE, MAFFT, และ T-Coffee (88) จากนั้นผลความคล้ายคลึงของชุดข้อมูลจะถูกคำนวณออกมาเป็นค่า %similarity ซึ่งในทางปฏิบัติเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันอาจจะไม่ได้มี %similarity เท่ากับ 100% เสมอไปเนื่องด้วยคุณสมบัติของ intra-species variation แต่อย่างไรก็ตามควรจะต้องมี %similarity ที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อสปีชีส์อื่น ด้วยเหตุดังกล่าว ในทางปฏิบัติค่า cut-off ของ %similarity ที่จะชี้วัดว่าเชื้อจุลินทรีย์นั้นๆ จัดอยู่ในกลุ่มหรือสปีชีส์เดียวกันหรือไม่ จึงไม่มีค่าที่แน่นอนขึ้นกับว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรมตำแหน่งที่ศึกษาของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนั้นๆ มีความหลากหลายเพียงใด

2.6 การวิเคราะห์ความใกล้ชิดของสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตจากผลผลิตสารพันธุกรรม

การศึกษาคความใกล้ชิดของสายพันธุ์เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลประเภทหนึ่งสำหรับใช้ในการจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตหรือเพื่อการสืบหาแหล่งกำเนิดร่วม/วิวัฒนาการ ซึ่งในปัจจุบันมีหลายเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้น อาทิเช่น

- 1) เทคนิค multilocus sequence typing (MLST) เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากยีนพื้นฐาน (housekeeping genes) หลายๆ ตำแหน่งพร้อมกัน ซึ่งตามทฤษฎีจะให้ผลที่แม่นยำมากกว่า การศึกษาบนยีนเพียงตำแหน่งเดียว แต่ด้วยความซับซ้อนในขั้นตอน เทคนิคนี้จึงนิยมใช้เพื่อการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงไปแบบซับซ้อนหลายรุ่นมากกว่า (84, 85)
- 2) เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลที่อาศัยรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือที่เรียกว่า finger printing ซึ่งจะมีความจำเพาะกับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดทำให้สามารถระบุกลุ่มของสิ่งมีชีวิตได้ แต่เนื่องด้วยเทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัดในการใช้ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนั้น เทคนิคนี้ส่วนใหญ่มักนิยมใช้แยกกลุ่มเชื้อไม่เกิน 10 กลุ่มโดยเฉลี่ย และต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มอยู่แล้วเพื่อเลือกชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ (86)
- 3) เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นการประยุกต์หลักการเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ากับการเชื่อมต่อผลผลิตที่ได้เพื่อการวิเคราะห์รูปแบบของผลผลิตสุดท้าย เช่นเดียวกับเทคนิค RFLP ที่มีข้อจำกัดในเรื่องของตำแหน่งตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนั้น เทคนิคนี้ส่วนใหญ่มักนิยมใช้แยกกลุ่มเชื้อไม่เกิน 10 กลุ่มโดยเฉลี่ย และต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มอยู่แล้ว (86)
- 4) เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10-12 นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 คู่พร้อมกันในปฏิกิริยา ทำให้ได้ผลผลิตที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ข้อดีของเทคนิคนี้คือ ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย แต่ข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ ความแปรผันของผลการทดสอบที่ได้ซึ่งมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR, ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้น เทคนิคนี้จึงไม่เป็นที่นิยมเท่าใดนัก (87)
- 5) เทคนิค phylogenetic tree เป็นเทคนิคการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายทั้งเส้นของผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นจากบริเวณหรือยีนตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งที่ได้รับการพิสูจน์มาแล้วว่ามีคุณสมบัติที่เหมาะสม เนื่องด้วยเทคนิคนี้ไม่จำเป็นต้องเลือกตำแหน่งตัดจำเพาะหรือตำแหน่งไพรเมอร์ ทำให้ลดโอกาสเสี่ยงการมองข้ามการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งซึ่งอาจแสดงในรูปของ SNPs (single nucleotide polymorphism) ดังนั้น จึงเหมาะกับการศึกษาวิวัฒนาการหรือการจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตในเบื้องต้นที่การแบ่งกลุ่มยังไม่ชัดเจน นอกจากนี้ การสร้าง phylogenetic tree นี้ยังแสดงข้อมูลความใกล้ชิดระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิต เพื่อเป็นข้อมูลนักวิจัยได้ออกแบบการวิเคราะห์และจัดกลุ่มเชื้อให้ตรงตามวัตถุประสงค์การวิจัยอีกด้วย

2.7 การทำแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic trees)

แผนภูมิต้นไม้ เป็นการแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอรูปแบบหนึ่ง เพื่อหาความใกล้ชิดของสายพันธุ์สิ่งมีชีวิต ภายใต้สมมุติฐานการทำนายว่า

สิ่งมีชีวิตที่มีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่คล้ายกันน่าจะมีจุดกำเนิดทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงหรืออยู่กลุ่มเดียวกันนั่นเอง ซึ่งในปัจจุบันมีโปรแกรมอัตโนมัติมากมายที่รองรับการวิเคราะห์และการแสดงผลดังกล่าว (ตารางที่ 1) ที่นิยมและเป็นที่รู้จัก ได้แก่ Clustalw หรือ Muscle ซึ่งวิเคราะห์ผลภายใต้รูปแบบและหลักการต่างๆ ได้แก่ การแทนที่เพื่อเลือกตำแหน่งที่เหมาะสมที่สุด (best-fit substitution model), การวิเคราะห์รูปแบบความเป็นเนื้อเดียวกัน (test pattern homogeneity), การแสดงรูปแบบการทดแทนโดยประมาณ (estimate substitution pattern), การประมาณอัตราความผันแปรระหว่างตำแหน่ง (estimate rate variation among sites), การประมาณการ bias ของ transition/transversion (estimate transition/transversion bias), การประมาณอัตราระหว่างตำแหน่ง (estimate site-by-site rates) จากนั้นแสดงผลในรูปแบบของกิ่งก้านแผนภูมิต้นไม้ ที่เรียกว่า phylogenetic trees พร้อมค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ค่า bootstrap, branch-length, branch-and-bound exact, heuristic, nearest-neighbor-interchange, close-neighbor-interchange และ max-mini โดยมีการคำนวณระยะห่างภายในในกลุ่มและระหว่างกลุ่มด้วยทฤษฎี pairwise และ diversity (68) กล่าวเป็นขั้นตอนการวิเคราะห์โดยสังเขป คือ โปรแกรมสำเร็จรูปจะวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้ววางเชื้อที่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันไว้บนกิ่ง หรือ clade เดียวกัน ในขณะที่เชื้อที่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน ก็จะถูกจัดวางบนกิ่ง หรือ clade ต่างกัน ซึ่งความห่างของกิ่ง หรือ clade นี้จะสัมพันธ์กับจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันด้วย นั่นคือ สิ่งมีชีวิตที่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันมาก เมื่อนำมาจัดกลุ่มและแสดงผลด้วยแผนภูมิต้นไม้ก็จะมีตำแหน่งวางที่ห่างมากเช่นกัน การจำแนกกลุ่มเชื้อโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นี้เป็นเพียงการจัดระบบโดยอาศัยข้อมูลที่มี ณ ปัจจุบัน ในบางครั้งศาสตร์นี้จึงได้รับการขนานนามว่าเป็นศาสตร์แห่งการทำนายหรือคาดเดา [60]

a) การวิเคราะห์และแปลผลความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตจาก phylogenetic tree

การคำนวณระยะห่าง (distance) ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตจากผลแสดงแผนภูมิ phylogenetic tree นี้ เป็นการวิเคราะห์และแปลผลแบบ semi-quantitative อย่างหนึ่งซึ่งมีหลายวิธี แต่วิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือ distance-based method ซึ่งเป็นการทำนายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป (evolutionary distance matrix) และการทำนายความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตจากความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (phylogenetic tree construction) (89) โดยผลการทำนายทั้งหมดจะมีระบบของการทำ bootstrap เป็นดัชนีควบคุมความแม่นยำ หลักการโดยย่อคือ การปรับลำดับการวิเคราะห์ตัวอย่างแบบสุ่มโดยการทำซ้ำๆ ภายใต้สมมุติฐานว่าหากการวิเคราะห์ผลมีความแม่นยำและสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มีความสัมพันธ์กันจริง การปรับลำดับการวิเคราะห์ตัวอย่างจะไม่กระทบกับผลการวิเคราะห์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักทำซ้ำที่ 1,000 ครั้ง ซึ่งหากพบว่าผลการวิเคราะห์เป็นไปในทางเดียวกันทุกครั้งจากการสุ่ม 1,000 ครั้ง แสดงว่าข้อมูลนี้มีค่า bootstrap เป็นร้อยละ 100 แต่หากพบว่ามีการสร้าง trees ในลักษณะนี้เพียง 500 ครั้งจากการสุ่ม 1,000 ครั้ง แสดงว่าข้อมูลนี้มีค่า bootstrap ร้อยละ 50 [68]

ข้อมูลที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์เพื่อการสร้าง phylogenetic tree มีได้หลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมชนิด DNA, RNA หรือแม้กระทั่ง

โปรตีน (90) ทั้งจาก ribosomal genes และ protein coding genes (91) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ จะถูกวิเคราะห์ภายใต้หลักการเดียวกัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 โปรแกรมสำหรับสร้าง phylogenetic tree

ชื่อ โปรแกรม	ลักษณะ	วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล	อ้างอิง	ที่อยู่ URL
PAML	การวิเคราะห์ทางสรีรวิทยา โดยใช้ maximum likelihood	maximum likelihood และ bayesian inference	Z. Yang (92)	http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html
<u>PHYLIP</u>	Phylogenetic inference package	maximum parsimony, distance matrix, maximum likelihood	<u>J. Felsenstein</u> (93)	https://paup.phylosolutions.com/
<u>TREE-PUZZLE</u>	Maximum likelihood และการวิเคราะห์ทางสถิติ	maximum likelihood	Makarenkov (94)	http://www.tree-puzzle.de/
<u>MEGA</u>	การวิเคราะห์พันธุศาสตร์ วิวัฒนาการระดับโมเลกุล	distance, parsimony และ maximum composite likelihood methods	Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (95)	https://www.megasoftware.net
PAUP	การวิเคราะห์ทางสรีรวิทยา โดยใช้ parsimony	maximum parsimony, distance matrix, maximum likelihood	D. Swofford (96)	https://paup.phylosolutions.com/

b) ศาสตร์แห่ง phylogenetic tree กับการจัดกลุ่มเชื้อรา

ปัจจุบันการจำแนกกลุ่มเชื้อราโดยอาศัยศาสตร์แห่ง phylogenetic tree นี้ได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากเชื้อราเป็นจุลชีพที่มีวิวัฒนาการค่อนข้างเร็ว โดยเฉพาะเชื้อรากลุ่มที่ได้รับความนิยมด้านเชื้อราแล้ว หลายครั้งพบว่าเชื้อรากลุ่มโรคราหลายตัวมีวิวัฒนาการทางพันธุกรรม นั่นคือ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไปซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลง เช่น มีการดื้อยามากขึ้น เกาะเซลล์ของโฮสต์แน่นขึ้นและทนต่อกลไกการกำจัดเชื้อต่างๆ หรือแม้กระทั่งมีความสามารถในการแพร่กระจายได้รวดเร็วขึ้นรวมถึงมีพฤติกรรม การหลบหลีกภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในขณะที่ลักษณะทางมหัศจรรย์และ จุลสัณฐานยังคงไม่เปลี่ยนแปลง วิวัฒนาการของเชื้อราโดยการเปลี่ยนแปลงเฉพาะในระดับ genetic นี้ ส่งผลทำให้การจัดกลุ่มเชื้อโดยการดูเฉพาะลักษณะภายนอกตามวิธีมาตรฐาน ไม่เพียงพออีกต่อไป

งานวิจัยของ Maheux และคณะ ได้ศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 3 ตำแหน่ง คือ *ATP2*, *TEF1* และ *TUF1* ก่อนจะวิเคราะห์ทาง phylogenetic เพื่อทำนายความไวต่อยาของเชื้อ *Candida* กลุ่มโรครา โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มเชื้อที่จำแนกได้ด้วยเทคนิค phylogenetic กับความไวรับต่อยาต้านเชื้อราของเชื้อกลุ่มนั้นๆ โดยทำการศึกษาในเชื้อ *Candida* จำนวน 20 สายพันธุ์ และมีเชื้อ *Ascomycete* และ *Neurospora crassa* เป็นเชื้อนอกกลุ่มการศึกษา ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย phylogenetic สามารถแยกเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida*

viswanathii และ *Candida parapsilosis* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Candida kefyr*, *Candida sphaerica* และ *Candida glabrata* กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Candida krusei*, *Candida inconspicua* และ *Candida lambica* ซึ่งเชื้อที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มสัมพันธ์กับรูปแบบความไวรับต่อยา (97)

3. การทดสอบความไวรับต่อยาต้านเชื้อราในเชื้อ *Aspergillus*

ตามมาตรฐานของ clinical and laboratory standards institute (CLSI) ได้กำหนดวิธีการทดสอบความไวรับต่อยาของเชื้อในกลุ่มราสายก่อโรคในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ไว้ 2 วิธี ได้แก่ วิธี broth macro-/micro- dilution โดยอ้างอิงจากเอกสาร CLSI M38-A2 ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบมาตรฐานสากล และ disk diffusion โดยอ้างอิงจากเอกสาร CLSI M51-A (98) ซึ่งนิยมใช้เพื่อการ screening

เนื่องด้วยผลการทดสอบด้วยวิธี broth macro-/micro- dilution ที่สามารถบอกค่าความเข้มข้นของยาต้านเชื้อราที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ หรือค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ซึ่งมีประโยชน์ยิ่งในการเป็นแนวทางวางแผนการให้ยาต้านเชื้อรามากกว่าผลไวหรือดีของเชื้อ ณ ยาต้านเชื้อราความเข้มข้นหนึ่งๆ ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion ทำให้ในปัจจุบัน วิธี broth macro-/micro- dilution กลายเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและมีการทดสอบกันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีวิธีโดยสังเขปสำหรับเชื้อราประเภทเส้นสาย (filamentous fungi หรือ mold) กล่าวคือ การนับจำนวนเชื้อตั้งต้นในปฏิกิริยามักอาศัยการปรับความขุ่นของสารละลาย conidia ให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.09–0.3 ด้วยเครื่อง spectrophotometer ณ ความยาวคลื่นแสงที่ 530 nm ซึ่งตามทฤษฎีจะมีเซลล์ของเชื้ออยู่ประมาณ $0.4-5 \times 10^4$ colony forming unit (CFU)/mL จากนั้นจึงบ่มเชื้อดังกล่าวกับยาต้านเชื้อราที่ต้องการทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 35°C ณ ความเข้มข้นต่างๆ นั่นคือ การทดสอบในยา amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, ravuconazole ให้ทดสอบในช่วงความเข้มข้นยา 16–0.03 µg/mL และ echinocandins ให้ทดสอบในช่วงความเข้มข้นยา 8–0.016 µg/mL จากนั้นเมื่อครบเวลาบ่ม ให้อ่านค่าความเข้มข้นของยาที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ หรือ minimum inhibitory concentration (MIC) ซึ่งสังเกตได้จากหลุมปฏิกิริยาที่ไม่มีเชื้อเจริญ (98) วิธีการนี้เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง ปัจจุบันจึงมีชุดทดสอบความไวรับต่อยาต้านเชื้อราด้วยเทคนิค broth macro-/micro- dilution นี้ที่ผ่านการรับรองโดยสถาบันมาตรฐานต่างๆ วางจำหน่ายในท้องตลาดหลายยี่ห้อ เช่น Sensititre™ YeastOne™ YO9 AST Plate (บริษัท Thermo Scientific™, ประเทศอังกฤษ) (99)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในงานวิจัย มีรายละเอียด ดังนี้ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ประกอบด้วย sabouraud dextrose agar (SDA); บริษัท BD DIFCO ประเทศสหรัฐอเมริกา, sabouraud dextrose broth (SDB) ; บริษัท BD DIFCO ประเทศสหรัฐอเมริกา, plastic disposable items เช่น petridish plate, screw cap tube eppendorf ประเทศไทย, ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม ประกอบด้วย ชุดน้ำยา MagNA Pure 24 System™; บริษัท Roche Diagnostics ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, น้ำยา elution buffer; บริษัท QIAGEN ประเทศเยอรมนี, ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค real time PCR ประกอบด้วย ชุดน้ำยา LightCycler ® 480 SYBR Green I; บริษัท Roche Diagnostics ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, ไพรเมอร์ *its* และ *tef-1 α* ไพรเมอร์; บริษัท Ward Medic ประเทศมาเลเซีย

2. เครื่องมือ

เครื่องวัดปริมาณ DNA (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer); บริษัท Thermo scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา, เครื่องสกัดสารพันธุกรรม MagNA Pure 24 System™; บริษัท Roche Diagnostics ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค real time PCR CobasZ480; บริษัท Roche Diagnostics ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ เครื่องมือพื้นฐานต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex), เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยระบบความดันไอน้ำ (autoclave), และเครื่องปั่นเหวี่ยง (Spectrafuge™ Mini Laboratory centrifuge)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การคำนวณหากกลุ่มตัวอย่าง (sample size)

การคำนวณกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ อ้างอิงจากข้อมูลงานวิจัยของ Alshehri และคณะ พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *its* ของเชื้อราร้อยละ 30 ใน international nucleotide sequence database (INSD) มีข้อมูลไม่เพียงพอในการจำแนกเชื้อระดับสปีชีส์ ซึ่งสามารถคำนวณได้เป็นค่าความถูกต้องของการจำแนกเชื้อระดับสปีชีส์อยู่ที่ร้อยละ 70 (100) เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* จากข้อมูลงานวิจัยของ Nouripour และคณะ ที่ทำการศึกษา ยีน *tef-1 α* ซึ่งที่มีความยาวเฉลี่ย 526 นิวคลีโอไทด์ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง ภายในเชื้อ *Aspergillus* สปีชีส์เดียวกันมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 0-71 เบส (13) ดังนั้น ค่าความถูกต้องในการจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ระดับสปีชีส์เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย ยีน *tef-1 α* คำนวณได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{การคำนวณค่าความถูกต้องในการจำแนกเชื้อตรวจวิเคราะห์ด้วยยีน } tef-1\alpha \\ \text{accuracy} &= (TP+TN)/N \\ &= 455/526 \\ &= 0.86 \end{aligned}$$

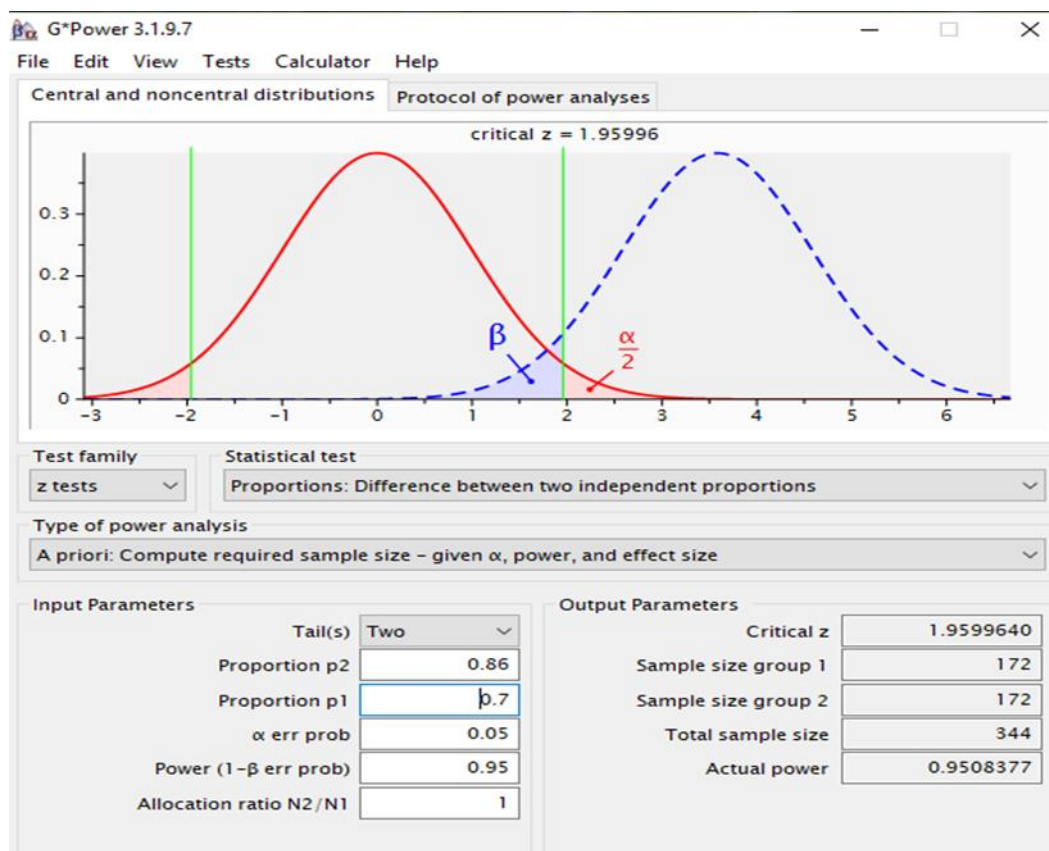
เมื่อ N คือ จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษาทั้งหมด 526 นิวคลีโอไทด์

- FN คือ การพบลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อตัวที่หนึ่งแต่ไม่พบในเชื้อตัวที่สอง กำหนดให้เป็นค่าผลลบปลอม (false negative)
- FP คือ การพบลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อตัวที่สองแต่ไม่พบในเชื้อตัวที่หนึ่ง กำหนดให้เป็นค่าผลบวกปลอม (false positive)
- แสดงว่าในกรณีที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 71 นิวคลีโอไทด์ คือ FN+FP
- TP คือ การพบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งในเชื้อตัวที่หนึ่งและเชื้อตัวที่สองจึง กำหนดให้เป็นค่าผลบวกจริง (true positive)
- TN คือ การไม่พบทั้งในเชื้อตัวที่หนึ่งและเชื้อตัวที่สองจึงกำหนดให้เป็นค่าผลลบจริง (true negative)
- แสดงว่าในกรณีที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 455 คือ TP+TN

จากการคำนวณตามสูตรข้างต้น ความถูกต้องในการจำแนกเชื้อตรวจวิเคราะห์ด้วยยีน *tef-1 α* เท่ากับ ร้อยละ 86 (5)

จากนั้นจึงเข้าสู่การคำนวณจำนวนตัวอย่างด้วยโปรแกรม G-Power โดยใช้ Z test (ภาพที่ 13) ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของการจำแนกเชื้อราด้วย *its region* โดยกำหนดรายละเอียด ดังนี้

- ร้อยละความถูกต้องในการจำแนกสปีส์ของเชื้อเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย *its* เท่ากับ 70
- ร้อยละความถูกต้องในการจำแนกสปีส์ของเชื้อเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย *tef-1 α* เท่ากับ 86



ภาพที่ 13 การคำนวณขนาดตัวอย่างที่ต้องใช้ในงานวิจัยด้วยโปรแกรม G-Power

จากการคำนวณตามสูตรข้างต้น จะได้จำนวนตัวอย่างของเชื้อ *Aspergillus* ขั้นต่ำที่ต้องใช้ในการตรวจวิเคราะห์แต่ละวิธีเท่ากับ 172 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมในด้านระยะเวลาในการทำงานวิจัย รวมถึงงบประมาณ จึงกำหนดขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ต่ำกว่า 190 ตัวอย่าง

3.2 การขอจริยธรรมการวิจัย

งานวิจัยนี้ผ่านการอนุมัติจริยธรรมการวิจัยหมายเลข IRB COA number 512/64 จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

3.3 การเก็บตัวอย่างเชื้อ *Aspergillus* ที่ใช้ในการศึกษา

เนื่องด้วยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นที่กลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้อ aspergillosis ชาวไทย ดังนั้น เชื้อ *Aspergillus* ที่ใช้ในการศึกษาจึงมาจากเชื้อที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยชาวไทยที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตั้งแต่เดือนมกราคม ปี 2560 จนถึงเดือนธันวาคม ปี 2565 ซึ่งเชื้อเหล่านั้นถูกเก็บรักษาไว้ในคลังเชื้อจุลชีพ (biobank) ณ หน่วยรพวิทยา ฝายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยมีเกณฑ์คัดเลือกเชื้อ *Aspergillus* ดังนี้

เกณฑ์คัดเข้า (inclusion criteria)

- 1) เป็นเชื้อ 1st isolate of *Aspergillus* spp. หลังผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค aspergillosis ตามหลักการของ IDSA โดยจะคัดเลือกเชื้อเข้างานวิจัยเพียง 1 isolate ต่อผู้ป่วย 1 รายเท่านั้น

เกณฑ์คัดออก (exclusion criteria)

- 1) เชื้อ *Aspergillus* spp. ที่เก็บรักษาไว้ในคลังเชื้อจุลชีพ มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลชีพสายพันธุ์อื่น
- 2) เชื้อ *Aspergillus* spp. ที่เก็บรักษาไว้ในคลังเชื้อจุลชีพ แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแล้วเชื้อไม่เจริญ

โดยเชื้อ *Aspergillus* spp. ตัวอย่างที่ถูกเลือกเข้าในงานวิจัย จะถูกนำมากำหนดหมายเลขแทนชื่อผู้ป่วยทั้งหมดโดยนักวิจัยที่ได้รับมอบหมายภายใต้ข้อปฏิบัติว่าด้วยคำประกาศสิทธิและข้อพึงปฏิบัติของผู้ป่วย (101)

3.4 การเก็บข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างเชื้อ

เชื้อ *Aspergillus* ทุกตัวที่ถูกคัดเข้ามาในงานวิจัย ผู้วิจัยจะสืบค้นข้อมูลต่างๆ ดังนี้

- 1) ผลการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ด้วยลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานจากหน่วยราวิทยา ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
- 2) ค่าความไวรับต่อยาต้านเชื้อราชนิด amphotericin B ที่ทดสอบได้จากชุดทดสอบ YeastOne (broth microdilution commercial kit)

โดยข้อมูลทั้งหมดจะสืบค้นในระบบ hospital information system (HIS) และ laboratory information system (LIS) ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

3.5 เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในงานวิจัย

เนื่องจากเชื้อ *Aspergillus* มีลักษณะทั้งทางมหสังฐานและจุลสังฐาน ที่คล้ายกับเชื้อราบางกลุ่ม รวมถึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรมที่คล้ายกับเชื้อราอีกบางกลุ่มเช่นกัน ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานทั้งกลุ่ม *Aspergillus* และ non-*Aspergillus* เป็นเชื้อกลุ่มควบคุมในงานวิจัย โดยเชื้อทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ดังนี้

- 1) เชื้อ *Aspergillus* ที่พบก่อโรค aspergillosis ในผู้ป่วยชาวไทย จำนวน 5 สปีชีส์ ได้แก่ *A. fumigatus* ATCC 26934, *A. flavus* ATCC 204304, *A. niger* ATCC 6275, *A. terreus* ATCC 20542, *A. nidulans* ATCC 38163
- 2) เชื้อ non-*Aspergillus* จำนวน 9 สปีชีส์ แบ่งเป็น
 - ก. กลุ่มเชื้อที่มีลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐาน และ/หรือ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *tef-1 α* ในสารพันธุกรรมที่คล้ายกับเชื้อ *Aspergillus* มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 70 ได้แก่ *Fusarium* spp. ATCC 60289, *Scedosporium* spp. ATCC 204059 และ *Penicillium* spp. ATCC 10106
 - ข. กลุ่มเชื้อที่มีลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐาน รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *tef-1 α* ในสารพันธุกรรมที่คล้ายกับเชื้อ *Aspergillus* น้อยกว่าร้อยละ 70 ได้แก่

Rhizopus spp. ATCC 52369, *Cladosporium* spp. ATCC 16022, *Histoplasma* spp. ATCC 26032, *Pythium insidiosum* ATCC 56843, *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045

3.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

ตามมาตรฐานความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ เพื่อลดการฟุ้งกระจายของสปอร์เชื้อในพื้นที่ปฏิบัติงาน เชื้อรา *Aspergillus* จะถูกจัดเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่แช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และเมื่อต้องการนำเชื้อออกมาเพาะเลี้ยง จะนำก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดดั่งกล่าวออกมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี SDA หรือใส่ในภาชนะที่มีอาหาร SDB เพื่อกระตุ้นการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นไปตามขั้นตอนมาตรฐาน กล่าวคือ หลังวางเชื้อบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อหรือใส่เชื้อลงในภาชนะบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ให้คลายฝาเกลียวของภาชนะเพาะเลี้ยงเพื่อให้เชื้อได้รับก๊าซออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโต บ่ม ณ อุณหภูมิ 30°C นาน 48-72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะพบการเจริญเป็นโคโลนีเส้นใยสีขาวขนาดเล็ก บางส่วนฝังเส้นใย (submerge hyphae) ลงในเนื้ออาหาร บางส่วนเจริญฟูขึ้นมาเหนือผิวหน้าอาหาร (aerial hyphae) หรืออาจพบเป็นลักษณะของเส้นใยคล้ายหยากไย่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเหลว โดยในช่วง 24 ชั่วโมงแรกจะยังไม่พบสีของสปอร์ ซึ่งเป็นช่วง log phase ดังนั้น ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกนี้ จึงเป็นช่วงที่เหมาะสมในการนำเชื้อ *Aspergillus* ไปสกัด DNA มากที่สุด เนื่องจากเหตุผลทั้งเป็นช่วงเวลาที่เชื้อกำลัง active มากที่สุดและในช่วงนี้เชื้อยังไม่สร้างเม็ดสี (pigment) ซึ่งมีรายงานว่าเม็ดสีเหล่านี้มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ taq polymerase ในกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction: PCR)

3.7 การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ *Aspergillus*

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการสกัด DNA ด้วยเครื่องอัตโนมัติและชุดน้ำยาสกัดตัวอย่าง (MAGNA Pure 24 System™, บริษัท Roche Diagnostics จำกัด, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ตามหลักการ magnetic glass particles ซึ่งมีขั้นตอนโดยสังเขป คือ เชื้อเชื้อ *Aspergillus* น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม ลงในน้ำยา elution buffer* (QIAGEN, ประเทศเยอรมนี) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ loop ตีเส้นใยของเชื้อสลับกับการ vortex ให้เส้นใยกลายเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อเร่งปฏิกิริยาการทำให้เซลล์แตก จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เส้นใยตกตะกอนประมาณ 15 นาที ก่อนดูดส่วนใสด้านบน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในตลับเพื่อนำเข้าเครื่องสกัดตัวอย่างอัตโนมัติ

* น้ำยา elution buffer คือ สารละลายสำหรับเตรียมตัวอย่างเชื้อ ชุดน้ำยาสกัดตัวอย่างประกอบด้วย 1) tris-HCl มีหน้าที่ทำปฏิกิริยากับ (lipopolysaccharide; LPS) บน cell membrane ของเชื้อ ทำให้เซลล์รั่วแตกและปล่อยสารพันธุกรรมออกมา นอกจากนี้ สารละลายดังกล่าวยังช่วยรักษา pH ในปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมนั่น คือ pH = 7-9 2) มี guanidine chloride และ proteinase K ช่วยย่อยและตกตะกอนโปรตีน

โมเลกุล DNA ที่ได้จะถูกแยกออกจากโมเลกุลอื่นๆ ด้วย magnetic glass particles (MGP) ซึ่งจะดูดจับโมเลกุล DNA ไว้ จากนั้นสารละลาย tris-HCl จะทำหน้าที่แยกโมเลกุล DNA จาก MGP อีกครั้งในขั้นตอนสุดท้าย โมเลกุล DNA ที่ได้นี้จะอยู่ในรูปของสารละลาย ซึ่งสามารถเก็บรักษาไว้ได้ ณ อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งพร้อมทดสอบในขั้นตอนถัดไป

3.8 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ DNA ที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง

โมเลกุล DNA ที่ได้ทั้งหมดจะถูกกำหนดหมายเลขเดียวกับเชื้อจุลชีพตัวอย่างที่นำมาสกัด จากนั้นนำไปตรวจสอบปริมาณ (วัดความเข้มข้นหน่วย ng/ μ L) และคุณภาพ (วัดความบริสุทธิ์ คำนวณจากอัตราส่วนค่า OD ณ ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร) ด้วยเครื่องวัดปริมาณ DNA โดยอาศัยหลักการการดูดกลืนแสง (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer, บริษัท Thermo scientific จำกัด, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยค่า OD 260 นาโนเมตร บ่งบอกถึงปริมาณโมเลกุล DNA ที่ตรวจพบในตัวอย่าง และค่า OD 280 นาโนเมตร บ่งบอกถึงปริมาณโปรตีนและโมเลกุลปนเปื้อนต่างๆ โดยในงานวิจัยนี้ โมเลกุล DNA ที่มีค่า OD 260/280 นาโนเมตร ในช่วง 1.8-2.0 คือ ตัวอย่าง DNA ที่มีคุณภาพ สามารถนำมาใช้ในงานวิจัยได้

3.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 บริเวณ คือ บริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* ซึ่งทั้ง 2 บริเวณมีไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบและได้รับการพิสูจน์ความเป็น primary และ secondary barcode เรียบร้อยแล้ว (ตารางที่ 2) โดยในงานวิจัยครั้งนี้เส้นไพรเมอร์เหล่านี้จะได้รับการสังเคราะห์โดย บริษัท Ward Medic จำกัด, ประเทศมาเลเซีย

ตารางที่ 2 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Region/Gene	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ที่มา
<i>its</i>	forward (ITS1)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White และคณะ (102)
	reverse (ITS4)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White และคณะ (102)
<i>tef-1α</i>	forward (A133)	GAYTTCATCAAGAACATGAT	Robert และคณะ (79)
	reverse (A133)	GACGTTGAADCCRACRTTGTC	Robert และคณะ (79)

3.10 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค real time PCR

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค real-time-PCR ในบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ด้วยเทคนิค real-time PCR และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (DNA binding fluorescent dyes) คือ สี SYBR Green I โดยปฏิกิริยาในงานวิจัยนี้ใช้น้ำยา master mix (LightCycler® 480 SYBR Green I, บริษัท Roach Diagnostic, ประเทศสวีเดน) สัดส่วนของน้ำยาอ้างอิงตามที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา โดยในหลอดปริมাত্রรวมเท่ากับ 50 μ L มีการเติมสารองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

- forwardไพรเมอร์ และ reverseไพรเมอร์ ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในช่วง 10, 20, 40, 60, 80, 100 ng/ μ L
- DNA template ทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมในช่วง 50, 60, 70, 80, 90, 100 ng (อ้างอิงตามเอกสารกำกับน้ำยา ปริมาณสารพันธุกรรม ที่แนะนำคือ 50-100 ng/

ปฏิกิริยา) โดยมีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ และ DNA ของเชื้อปฏิกิริยาทั้งหมดดำเนินการในเครื่อง real-time-PCR (Cobas 4800 System, บริษัท Roach Diagnostic, ประเทศสวีเดน) แบบ 96-Well Reaction Plate ปริมาตร 50 μ l/หลุม จำนวน 40 cycle ภายใต้สภาวะ ดังนี้

- pre-denaturation 95°C เป็นเวลา 5 นาที
- denaturation 95°C เป็นเวลา 1 นาที
- annealing ทดสอบช่วง 40-52°C เป็นเวลา 5-20 วินาที
(อ้างอิงตามเอกสารกำกับน้ำยาและคำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์)
- extension ทดสอบช่วง 72°C เป็นเวลา 5-30 วินาที
(อ้างอิงตามเอกสารกำกับน้ำยาและคำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์)
- final-extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที

ผลการทดสอบในแต่ละปฏิกิริยาจะพิจารณาความเหมาะสมจากการเกิดผลิตภัณฑ์ ณ ค่า cycle threshold (Ct) ที่ต่ำที่สุด

เมื่อได้สภาวะของปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์แต่ละคู่แล้ว จะดำเนินการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA ของเชื้อในงานวิจัยนี้ทั้งหมด จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนถัดไป

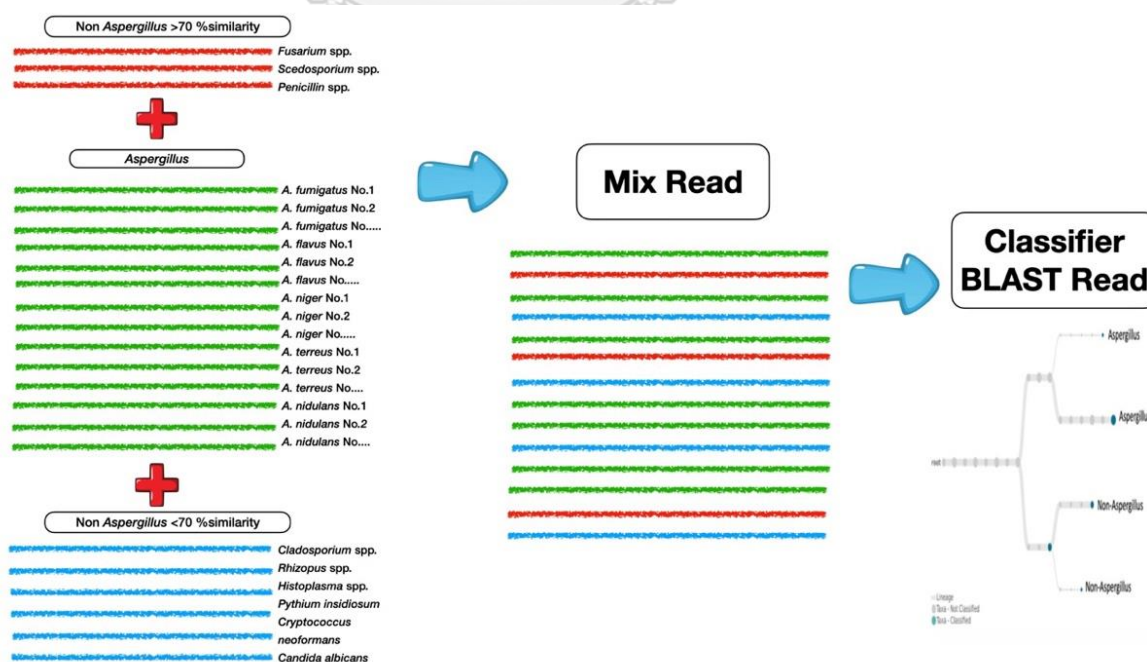
3.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค sanger DNA sequencing

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* ของตัวอย่างทั้งหมด โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค real time PCR ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของ DNA มากกว่าหรือเท่ากับ 40 ng/ μ l ณ ปริมาตรขั้นต่ำ 20 μ l พร้อมทั้งไพรเมอร์ forward และ reverse ของยีนนั้นๆ ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค sanger DNA sequencing โดยบริษัท Ward medic จำกัด ประเทศมาเลเซีย (103)

ผลการวิเคราะห์ที่ได้รับจากบริษัทจะอยู่ในรูปของ FASTA file แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์แยกเป็น 2 ชุด คือ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในทิศทาง 3' (ไพรเมอร์ forward) และทิศทาง 5' (ไพรเมอร์ reverse) อย่างละ 1 ชุด นำข้อมูล FASTA ของไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้นมาสร้างเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรับแก้ข้อมูลเรียบร้อยแล้ว (contiq sequence) ด้วยโปรแกรม MEGASync ver.4.7 <https://megasync.top> (104) หลักการโดยสังเขป คือ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ชุด ที่ละตำแหน่ง หากตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ใดที่ชนิดของนิวคลีโอไทด์จากข้อมูลแต่ละชุดไม่ตรงกัน จะต้องกลับไปดู peak sequence file เพื่อประกอบการตัดสินใจทำ sequence editing ณ ตำแหน่งนั้นๆ ด้วยโปรแกรม bioedit

เมื่อได้ contiq sequence ของเชื้อตัวอย่างแต่ละตัวแล้ว เพื่อการทดสอบความแม่นยำของ contiq sequence ที่ได้ว่าจะมีคุณสมบัติในการจำแนกเชื้อได้ตามสปีชีส์ที่ถูกต้อง จะต้องนำ contiq sequence ที่ได้นี้เข้าสู่กระบวนการทาง Bioinformatic ที่เรียกว่า WIMP (What's in my pot) <https://nanoporetech.com/resource-centre/whats-my-pot-wimp-quantitative-analysis-tool-real-time-species-identification> ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ถูกคิดค้นขึ้นเพื่อนำมาใช้กับเทคนิค long read technology หรือการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แบบต่อเนื่องทั้งเส้นแบบ real time

โดยเมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ WIMP จะจัดกลุ่มจากชุดข้อมูลที่มีลักษณะแตกต่างกันในบางตำแหน่งออกเป็นเชื้อกลุ่มต่างๆ โดยสามารถแสดงปริมาณเชื้อที่อยู่ในแต่ละกลุ่มให้เห็นได้ (105) การนำเทคโนโลยี WIMP เข้ามาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เพื่อตรวจสอบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการปรับข้อมูลในส่วนที่ให้กราฟไม่ชัดเจน ยังคงสามารถนำมาจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อได้อย่างถูกต้อง โดยการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ non-*Aspergillus* ที่เหมือนกับเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* มากกว่าร้อยละ 70 คือ *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. และ *Penicillium* spp. เชื้อกลุ่มที่มีลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานและลำดับนิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรมที่คล้ายกับเชื้อ *Aspergillus* น้อยกว่าร้อยละ 70 ได้แก่ *Rhizopus* spp., *Cladosporium* spp., *Histoplasma* spp., *Pythium insidiosum*, *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* และเชื้อในกลุ่ม *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ มารวมกันแล้วจัดกลุ่มใหม่ด้วยโปรแกรม WIMP และตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถจำแนกเชื้อออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้อย่างถูกต้อง โดยการนำ contig sequence ทั้งของ 1) เชื้อที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในงานวิจัยนี้ก็คือ contig sequence ของเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ clinical isolate และ 2) เชื้อกลุ่มควบคุม ซึ่งในงานวิจัยนี้ก็คือ เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานต่างๆ (ATCC) รายละเอียดดังข้างต้น มารวมกัน ก่อนที่จะทำการจัดกลุ่มของ contig sequence เหล่านั้น ซึ่งหากได้ผลการจัดกลุ่มออกมาว่า contig sequence ของเชื้อสปีชีส์เดียวกัน ยังคงถูกจัดในกลุ่มเดียวกัน แสดงว่า contig sequence ที่ได้ยังคงมีคุณสมบัติในการจำแนกเชื้อได้ตามสปีชีส์ที่ถูกต้อง สามารถนำข้อมูล contig sequence นี้ไปใช้ในขั้นตอนการสร้าง phylogenetic tree ต่อไป ในทางตรงกันข้ามถ้า contig sequence ถูกจัดกลุ่มผิด อาจเกิดได้จาก 2 สาเหตุ คือ 1) ในกระบวนการทำ sequence editing มีความผิดพลาด หรือ 2) contig sequence ของเชื้อมีวิวัฒนาการหรือมีการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมทำให้เกิดกลุ่มใหม่จริง (105) (ภาพที่ 14)

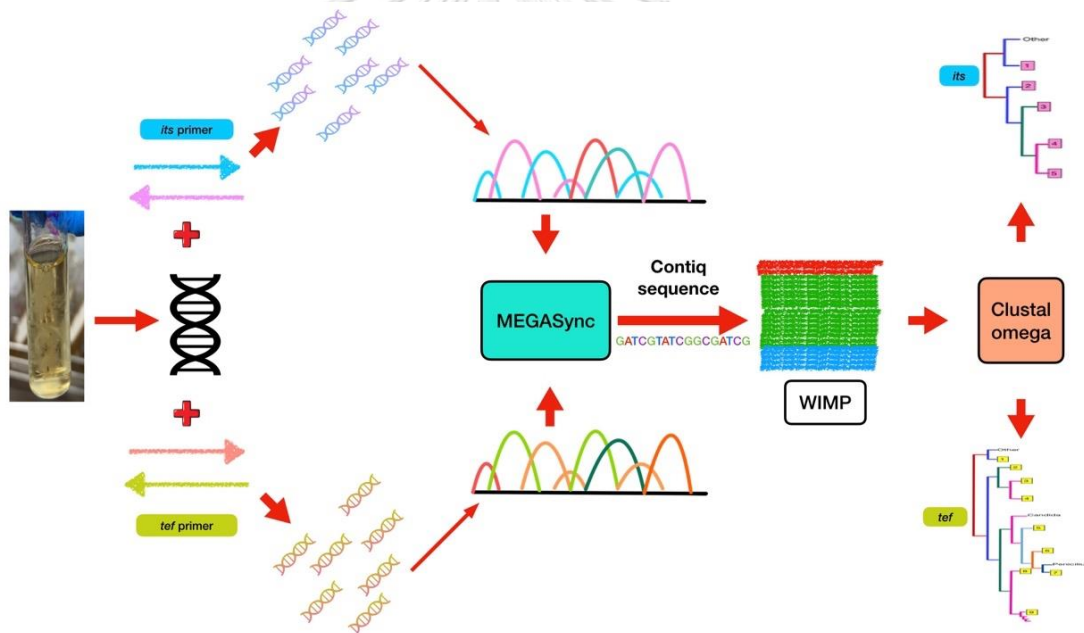


ภาพที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม WIMP

3.12 การสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Clustal Omega

ข้อมูล contig sequence ที่ได้รับการพิสูจน์ยืนยันคุณสมบัติด้วยเครื่องมือ WIMP แล้วจะสามารถนำมาสร้าง phylogenetic tree ได้ (106) และเพื่อความแม่นยำของผลการศึกษานี้เนื่องจากเชื้อตัวอย่างแต่ละสปีชีส์อาจจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียงไม่กี่เบส ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกค่าความเชื่อมั่น bootstrap เท่ากับ 1,000 ซ้ำ และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) analysis (95) โดยจัดกลุ่มเชื้อเป็น clade ต่างๆ ที่จำแนกได้ด้วย phylogenetic tree

ภาพรวมขั้นตอนการทดลองในการศึกษาสารพันธุกรรมของเชื้อ *Aspergillus* เริ่มจากการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB สกัดสารพันธุกรรม เพิ่มปริมาณยีนที่สนใจด้วยชุดไพรเมอร์ *its* และ *tef-1 α* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค sanger sequencing นำข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้จากไพรเมอร์ forward และ reverse มาวิเคราะห์เพื่อหา contig sequence ด้วยโปรแกรม MEGASync หลังจากนั้นนำ contig sequence มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม WIMP และนำข้อมูลที่ได้ไปสร้าง phylogenetic tree ของแต่ละยีนด้วยโปรแกรม Clustal Omega (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 แสดงขั้นตอนการทดลองในการศึกษาสารพันธุกรรมของเชื้อ *Aspergillus*

3.13 การแปลผล phylogenetic tree

ผลการจัดกลุ่มของเชื้อ *Aspergillus* ที่วิเคราะห์ได้จากการสร้าง phylogenetic tree จะถูกนำมาหาความสัมพันธ์ โดยใช้การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรด้วยวิธี Pearson Chi-square ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 และยอมรับ H_0 เมื่อมีค่าความน่าจะเป็น (P) มากกว่าระดับนัยสำคัญ (0.05) โดยมีข้อตกลงเบื้องต้น ดังนี้

- ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์อยู่ในรูปของความถี่ เช่น MIC<8, MIC>=8, clade 1, clade 2, clade 3 หรือสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อ

- กลุ่มตัวอย่างทั้งสองต้องเป็นอิสระต่อกัน กลุ่มตัวอย่างที่นำมาทดสอบการจำแนกเชื้อ ความไวรับต่อยา บริเวณ *its* และ *tef-1 α* เป็นอิสระต่อกัน

3.13.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ *its* และ *tef-1 α* (ตารางที่ 3-4)

สมมติฐานทางสถิติ

H₀ : การจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ในระดับสปีชีส์ โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลของยีน *tef-1 α* ไม่มีความสัมพันธ์กับข้อมูลที่ทดสอบในบริเวณ *its*

H₁ : การจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ในระดับสปีชีส์ โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลของยีน *tef-1 α* มีความสัมพันธ์กับข้อมูลที่ทดสอบในบริเวณ *its*

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการจัดกลุ่มข้อมูลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ด้วยบริเวณ *its* และ *tef-1 α*

<i>its</i> * <i>tef-1α</i> Crosstabulation					
Count					
		<i>tef-1α</i>			Total
		clade 1	clade 2	clade 3	
<i>its</i>	clade 1	a	b	c	n
	clade 2	d	e	f	o
	clade 3	g	h	i	p
Total		j	k	m	x

ตารางที่ 4 ตัวอย่างการคำนวณหาความสัมพันธ์ในการจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ด้วยบริเวณ *its* และ *tef-1 α* ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	11.873 ^a	4	.018 (P)
Likelihood Ratio	14.198	4	.007
N of Valid Cases	20		

3.13.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B (ตารางที่ 5-6)

สมมติฐานทางสถิติ

H_0 : ผลความไวรับต่อยา amphotericin B ไม่มีความสัมพันธ์ กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α*

H_1 : ผลความไวรับต่อยา amphotericin B มีความสัมพันธ์ กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α*

ตารางที่ 5 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B

amphotericin B susceptibility * <i>tef-1α</i> Crosstabulation					
Count					
		<i>tef-1α</i>			Total
		clade 1	clade 2	clade 3	
MIC ยา	<8	a	b	c	j
.....	>=8	d	e	f	k
Total		g	h	i	m

ตารางที่ 6 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.349 ^a	2	.509 (P)
Likelihood Ratio	1.346	2	.510
N of Valid Cases	20		

3.13.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *its* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B (ตารางที่ 7-8)

สมมติฐานทางสถิติ

H_0 : ผลความไวรับต่อยา amphotericin B **ไม่มีความสัมพันธ์** กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its*

H_1 : ผลความไวรับต่อยา amphotericin B **มีความสัมพันธ์** กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its*

ตารางที่ 7 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B

amphotericin B susceptibility * its Crosstabulation Count					
		<i>its</i>			Total
		clade 1	clade 2	clade 3	
MIC ยา	<8	a	b	c	k
.....	>=8	d	e	f	m
Total		g	h	i	n

ตารางที่ 8 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.349 ^a	2	.509 (P)
Likelihood Ratio	1.346	2	.510
N of Valid Cases	20		

3.13.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) (ตารางที่ 9-10)

สมมติฐานทางสถิติ

H₀ : การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ด้วยวิธี cultivation ไม่มีความสัมพันธ์ กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α*

H₁ : การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ด้วยวิธี cultivation มีความสัมพันธ์ กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α*

ตารางที่ 9 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation)

Identify by cultivation * <i>tef-1α</i> Crosstabulation				
Count				
	<i>tef-1α</i>			Total
	clade 1	clade 2	clade 3	
<i>A. fumigatus</i>	a	b	c	s
<i>A. flavus</i>	d	e	f	t
Iden <i>A. niger</i>	g	h	i	u
<i>A. terreus</i>	j	k	l	v
<i>A. nidulans</i>	m	n	o	x
Total	p	q	r	y

ตารางที่ 10 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.349 ^a	8	.608 (P)
Likelihood Ratio	7.432	8	.491
N of Valid Cases	20		

3.13.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และลักษณะทางมหสัณฐานและจุลสัณฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) (ตารางที่ 11-12)

สมมติฐานทางสถิติ

H_0 : การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ด้วยวิธี cultivation ไม่มีความสัมพันธ์ กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its*

H_1 : การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ด้วยวิธี cultivation มีความสัมพันธ์ กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its*

ตารางที่ 11 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และลักษณะทางมหสัณฐาน/จุลสัณฐาน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation)

Identify by cultivation * <i>its</i> Crosstabulation				
Count				
	<i>its</i>			Total
	clade 1	clade 2	clade 3	
<i>A. fumigatus</i>	a	b	c	u
<i>A. flavus</i>	d	e	f	v
Iden <i>A. niger</i>	g	h	i	x
<i>A. terreus</i>	j	k	m	y
<i>A. nidulans</i>	n	o	p	t
Total	w	r	s	z

ตารางที่ 12 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และลักษณะทางมหสัณฐาน/จุลสัณฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.349 ^a	8	.608 (P)
Likelihood Ratio	7.432	8	.491
N of Valid Cases	20		

3.14 การคำนวณค่า discriminatory power (D)

โดยใช้สูตรในการคำนวณ ดังนี้ (107)

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j - 1)$$

D คือ ค่า index of discriminatory power

N คือ จำนวนตัวอย่างที่ผลไม่ไปด้วยกัน

S คือ จำนวนของสายพันธุ์ที่ต่างกัน

X_j คือ จำนวนตัวอย่างในแต่ละสายพันธุ์

การแปลผล

D = 1.0 หมายความว่า การทดสอบนั้นสามารถที่จะจำแนกเชื้อแต่ละตัวอย่างในสายพันธุ์นั้น ออกจากสายพันธุ์อื่นๆ ได้

D = 0.0 หมายความว่า ตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาทดสอบเป็นสายพันธุ์เดียวกัน

D = 0.50 หมายความว่า กรณีที่สุ่มเลือกสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งมาแล้ว มีความน่าจะเป็นร้อยละ 50 ที่สายพันธุ์ต่อไปที่สุ่มเลือกจะแยกออกจากการสุ่มครั้งแรกไม่ได้

3.15 การวิเคราะห์ร้อยละความคล้าย (%similarity)

โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ *its* และ *tef-1 α* ระหว่างเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์ และเปรียบเทียบกับเชื้อก่อโรคสายพันธุ์อื่น บนฐานข้อมูล national center for biotechnology information (NCBI) และวิเคราะห์ค่า %similarity วิเคราะห์ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม bioedit (ตารางที่ 13) (108)

ตารางที่ 13 ตัวอย่างการวิเคราะห์วิเคราะห์ค่า %similarity จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ *its* ของเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์

Strain	% Similarity with strain: (<i>its</i> gene)				
	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	99.99%	-	-	-	-
<i>A. nidulans</i>	99.99%	99.99%	-	-	-
<i>A. niger</i>	99.99%	99.99%	99.99%	-	-
<i>A. terreus</i>	99.99%	99.99%	99.99%	99.99%	-

บทที่ 4

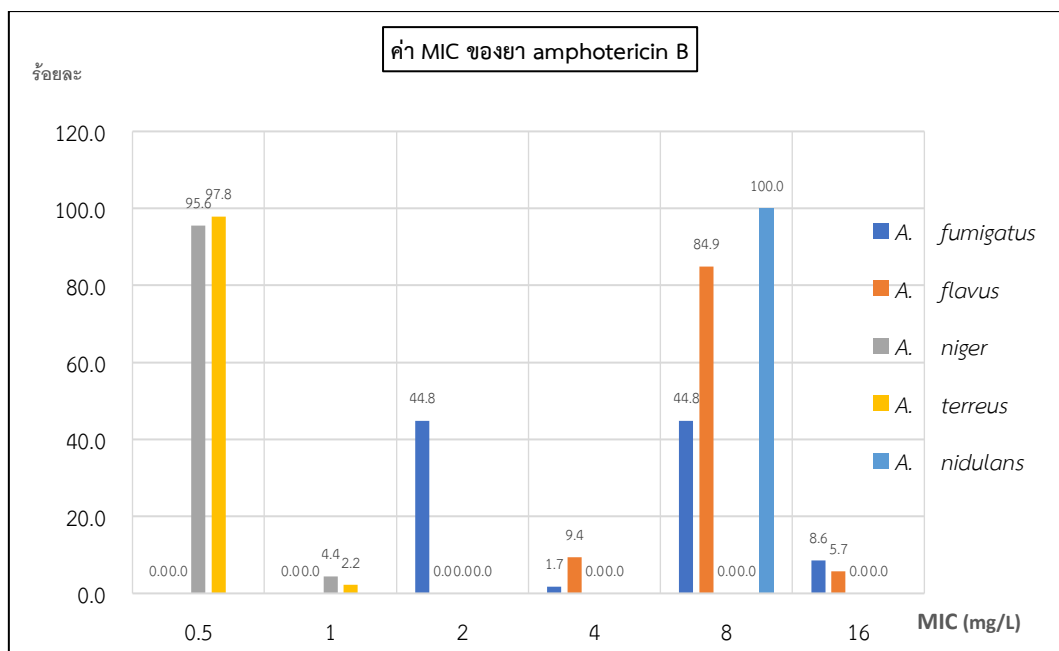
ผลการทดลอง

1. ผลการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเชื้อ *Aspergillus* จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ตั้งแต่เดือนมกราคม 2560 จนถึงเดือนธันวาคม 2565 โดยคัดเลือกตัวอย่างตามเกณฑ์คัดเข้าและเกณฑ์คัดออกที่กำหนดไว้ ได้จำนวน 227 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเชื้อ *A. fumigatus* 57 ตัวอย่าง, *A. flavus* 52 ตัวอย่าง, *A. niger* 44 ตัวอย่าง, *A. terreus* 45 ตัวอย่าง *A. nidulans* 29 ตัวอย่าง เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 5 ตัวอย่าง คือ *A. fumigatus* ATCC269344, *A. flavus* ATCC204304, *A. niger* ATCC6275, *A. terreus* ATCC20542 และ *A. nidulans* ATCC38163 รวมตัวอย่างทั้งหมด 232 ตัวอย่าง ซึ่งจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐาน พร้อมทั้งข้อมูลความไวรับต่อยา amphotericin B ของเชื้อแต่ละสปีชีส์ (ตารางที่ 14) และแผนภูมิแสดงผลเป็นร้อยละ (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 14 จำนวนตัวอย่างแต่ละสายพันธุ์ที่ให้ค่า MIC ยา amphotericin B ตั้งแต่ 0.5-16 mg/L ทดสอบด้วยชุดทดสอบ YeastOne™ โดยห้องปฏิบัติการหน่วยรพวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 232 ตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างที่พบ ในเชื้อแต่ละสายพันธุ์	ค่า MIC ของยา amphotericin B (mg/L)	0.5	1	2	4	8	16	Total
	<i>A. fumigatus</i>		0	0	26	1	26	5
<i>A. flavus</i>		0	0	0	5	45	3	53
<i>A. niger</i>		43	2	0	0	0	0	45
<i>A. terreus</i>		45	1	0	0	0	0	46
<i>A. nidulans</i>		0	0	0	0	30	0	30



ภาพที่ 16 แผนภูมิรูปแท่งแสดงร้อยละของตัวอย่างที่ให้ค่า MIC ของยา amphotericin B อยู่ในช่วง 0.5-16 mg/L แสดงผลเป็นร้อยละ จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 232 ตัวอย่าง






2. ผลการเพาะเชื้อ

เชื้อทุกตัวอย่างเจริญเติบโตได้ดีทั้งในอาหารชนิดแข็งและชนิดเหลว (ภาพที่ 17) และพบว่าเชื้อทุกตัวอย่างมีลักษณะทางมหสังฐานเมื่อเลี้ยงบนอาหาร SDA ตรงตามลักษณะของเชื้อแต่ละสปีชีส์ (ตารางที่ 15) สามารถเก็บเส้นใยของเชื้อราที่เจริญในอาหาร SDB มาสกัด DNA ได้ในวันที่ 3 หลังจากเพาะเชื้อ ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.7 การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ *Aspergillus*



ภาพที่ 17 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราที่เพาะในอาหารเป็นเวลา 3 วัน SDB พบลักษณะของเส้นใยคล้ายหยากไย่ และ SDA พบการเจริญเป็นโคโลนีเส้นใยสีขาวขนาดเล็ก บางส่วนฝังเส้นใยลงในเนื้ออาหาร (submerge hyphae) บางส่วนเจริญฟูขึ้นมาเหนือผิวหน้าอาหาร (aerial hyphae) โดยมีลักษณะแตกต่างกันตามปีชีส์ของเชื้อ

ตารางที่ 15 ผลการตรวจสอบลักษณะทางมหัศจรรย์ของเชื้อตัวอย่างที่เพาะลงบนอาหาร SDA เป็นเวลา 7 วัน

<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. nidulans</i>
โคโลนีสีเขียว แกมน้ำเงินพื้นผิว เป็นผงคล้ายหนังกลับ	โคโลนีเหลืองถึงเขียว พื้นผิวเป็นผงคล้าย หนังกลับ	โคโลนีสีน้ำตาลเข้ม ถึงดำพื้นผิวคล้าย ขนสัตว์	โคโลนีสีน้ำตาลอ่อน พื้นผิวเป็นผงคล้าย กำมะหยี่	โคโลนีสีเขียวเส้นใย สีขาวพื้นผิวคล้าย ขนสัตว์
				

จากผลการเก็บตัวอย่างสามารถเก็บตัวอย่างที่ตรงตามเกณฑ์การตัดเข้าได้ทั้งหมด 227 ตัวอย่าง โดยไม่มีตัวอย่างที่ถูกคัดออก และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 5 ตัวอย่าง รวมเป็นตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยทั้งหมด 232 ตัวอย่าง มีการรวบรวมข้อมูลการจำแนกเชื้อด้วยวิธีการ cultivation และผล MIC ที่ทดสอบด้วยชุด YeastOne โดยห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และเก็บรักษาเชื้อที่เจริญบนอาหาร SDA โดยตัดเป็นชิ้นเล็กแช่ไว้ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อป้องกันวุ้นแห้ง และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จากผลการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อทุกตัวอย่างสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร SDA และ SDB การเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA เพื่อใช้ในการสังเกตลักษณะทางมหัศจรรย์ของเชื้อ สามารถเห็นลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์หลังเพาะเลี้ยงตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป การเพาะเลี้ยงในอาหาร SDB เพื่อนำมาใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม สามารถเห็นเส้นใยในอาหารเหลวและนำมาสกัดสารพันธุกรรมได้หลังจากเพาะเชื้อตั้งแต่ 3 วันเป็นต้นไป

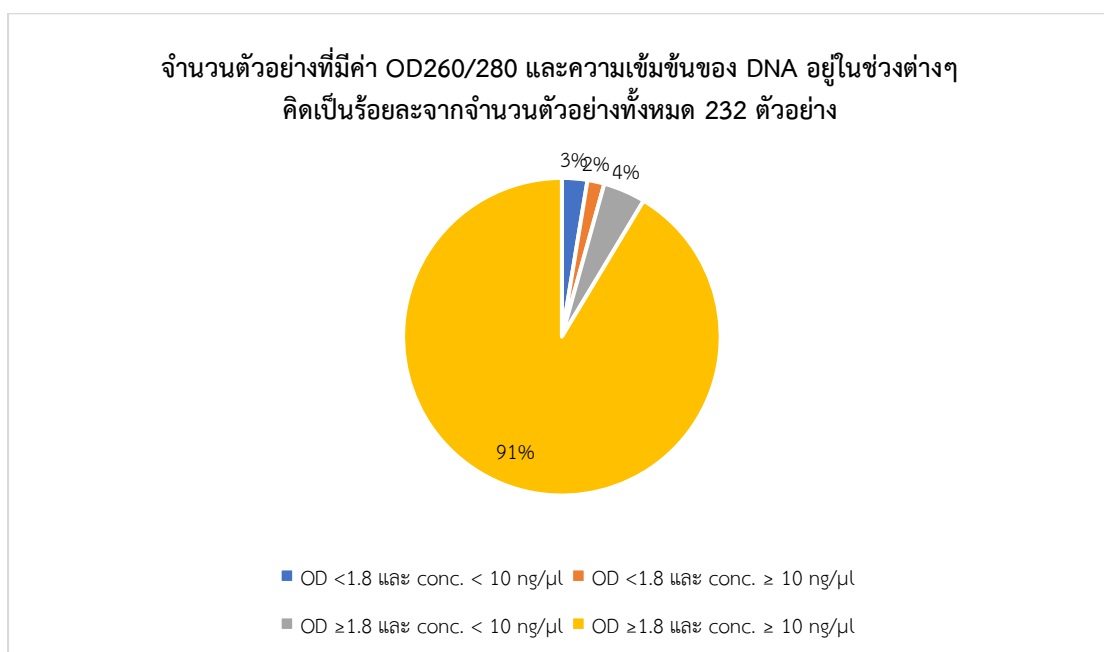
3. ผลการสกัดตัวอย่าง

ผลของการสกัดเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าวิธีที่ใช้ lysis buffer กับไม่ใช้ lysis buffer ให้ปริมาณและคุณภาพของ DNA ไม่แตกต่างกัน DNA ที่มีความบริสุทธิ์ที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 ซึ่งในเชื้อ *Aspergillus* ทั้งสองวิธีได้ค่าอยู่ที่ 2.3 และความเข้มข้นของ DNA ที่ได้จากวิธีการสกัด DNA แบบที่ใช้ lysis buffer ดีกว่าการสกัดแบบไม่ใช้เพียงเล็กน้อย ในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีการสกัดตัวอย่างแบบไม่ใช้ lysis buffer ในการสกัด DNA ของเชื้อรา โดยการสกัดตัวอย่างจากโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหารแข็งและสกัดจากเส้นใยของเชื้อราในอาหารเหลวให้ผลความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ DNA ไม่แตกต่างกัน แต่การสกัด DNA ในอาหารเหลวสามารถเขี่ยเส้นใยได้ง่าย และมีการฟุ้งกระจายของสปอร์เชื้อราน้อยกว่าอาหารแข็ง ในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อนำมาสกัด DNA ของเชื้อราด้วยเครื่องอัตโนมัติโดยไม่ใช้ lysis buffer

4. ผลการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ DNA ที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง

ผลการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ DNA ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer, บริษัท Thermo scientific Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา) มีจำนวนตัวอย่างที่มีค่า OD260/280 น้อยกว่า 1.8 และมีความเข้มข้นของ DNA น้อยกว่า 10 ng/μl จำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3, จำนวนตัวอย่างที่มีค่า OD260/280 น้อยกว่า 1.8 และมีความเข้มข้นของ DNA มากกว่าหรือเท่ากับ 10 ng/μl จำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2, จำนวนตัวอย่างที่มีค่า OD260/280 มากกว่าหรือเท่ากับ 1.8 และมีความเข้มข้นของ DNA น้อยกว่า 10 ng/μl จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4 และจำนวนตัวอย่างที่มีค่า OD260/280 มากกว่าหรือเท่ากับ 1.8 และมีความเข้มข้นของ DNA มากกว่าหรือเท่ากับ 10 ng/μl จำนวน 212 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 91 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 232 ตัวอย่าง (ภาพที่ 18) โดย DNA ที่มีคุณภาพที่ดีและมีการปนเปื้อนน้อยควรมีค่า OD260/280 อยู่ในช่วง 1.8-2.0 จากผลการทดสอบพบว่า มีจำนวน 12 ตัวอย่างที่ได้ค่าน้อยกว่า 1.8 ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงการมีโปรตีน ฟีนอลหรือสารปนเปื้อนอื่นๆ ในปริมาณมากและสามารถดูดกลืนแสงในช่วง 280 ได้ดี สารเหล่านี้อาจส่งผลให้เกิดการการรบกวนในปฏิกิริยา PCR ได้ ซึ่งสามารถทำให้ DNA มีความบริสุทธิ์ขึ้นได้โดยการใช้ชุด genomic purification แต่ในกระบวนการอาจทำให้มีการเสีย DNA ไปบางส่วน ในงานวิจัยครั้งนี้จึงไม่มีการ purify DNA ก่อนการทำ PCR และผลความเข้มข้นของ DNA มีจำนวนตัวอย่างที่มีความ

เข้มข้นของ DNA น้อยกว่า 10 ng/μl จำนวน 16 ตัวอย่าง ซึ่งต้องเพิ่มปริมาตรของ DNA template ในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยความเข้มข้นของ DNA ที่มีค่ามากกว่า 10 ng/μl มีความเข้มข้นที่หลากหลายจึงต้องมีขั้นตอนการปรับความเข้มข้นของ genomic DNA template เพื่อเตรียมตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอน PCR ต่อไป



ภาพที่ 18 แผนภูมิวงกลมแสดงร้อยละของตัวอย่างที่มีค่า OD260/280 และความเข้มข้นของ DNA อยู่ในช่วงต่างๆ คำนวณจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 232 ตัวอย่าง

5. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ ที่ใช้ในงานวิจัย

ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *its* ในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม NCBI primer blast พบว่าทั้ง forward และ reverse ไพรเมอร์ของ *its* สามารถจับกับเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ได้โดยมีค่า query cover ร้อยละ 100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 84.21-100 โดยจับกับเชื้อ *A. fumigatus* ได้ผลผลิตขนาด 597 คู่เบส จับกับเชื้อ *A. flavus* ได้ผลผลิตขนาด 595 คู่เบส จับกับเชื้อ *A. niger* ได้ผลผลิตขนาด 594 คู่เบส จับกับเชื้อ *A. terreus* ได้ผลผลิตขนาด 609 คู่เบส และจับกับเชื้อ *A. nidulans* ได้ผลผลิตขนาด 566 คู่เบส (ตารางที่ 16)

และผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *tef-1α* ในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม NCBI primer blast พบว่าทั้ง forward และ reverse ไพรเมอร์ของ *tef-1α* สามารถจับกับเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ได้โดยมีค่า query cover อยู่ระหว่างร้อยละ 76-100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 95-100 โดยจับกับเชื้อ เชื้อ *A. fumigatus* ได้ผลผลิตขนาด 642 คู่เบส จับกับเชื้อ *A. flavus* ได้ผลผลิตขนาด 642 คู่เบส จับกับเชื้อ *A. niger* ได้ผลผลิตขนาด

642 คู่เบส จับกับเชื้อ *A. terreus* ได้ผลผลิตขนาด 642 คู่เบส และจับกับเชื้อ *A. nidulans* ได้ผลผลิตขนาด 642 คู่เบส รายละเอียดดังแสดงใน (ตารางที่ 16)

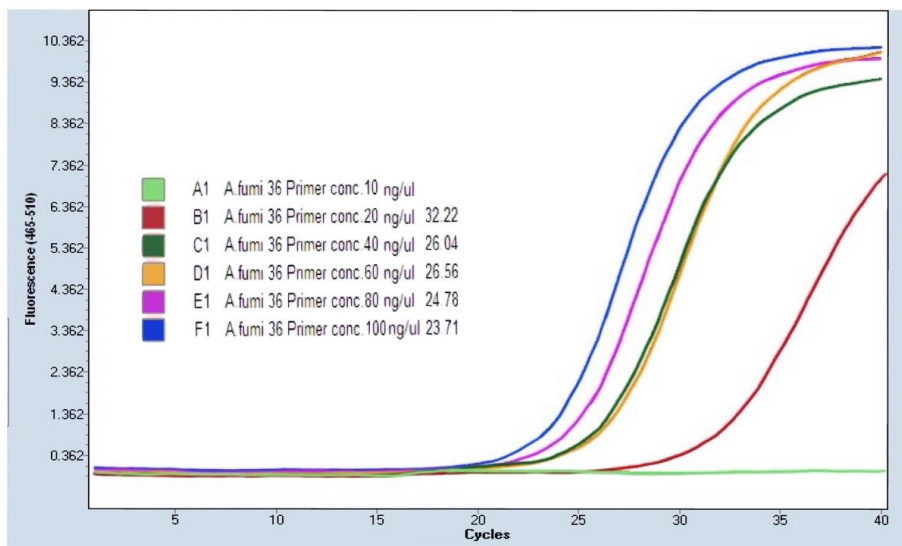
ตารางที่ 16 รายละเอียดผลการ blast โพรเมอร์ *its* และ *tef-1 α* ด้วยโปรแกรม NCBI

Primer blast	blast with <i>Aspergillus</i> (taxid:5052)				
		<i>its</i> forward	<i>its</i> reverse	<i>tef</i> forward	<i>tef</i> reverse
รายละเอียด	Query cover	100	100	100	76-100
	E value	0.021-81	0.005	0.005	0.11-6.9
	Percent identity	84.21-100	100	100	95-100
ความยาวของผลผลิต (คู่เบส)	<i>A. fumigatus</i>		597		642
	<i>A. flavus</i>		595		642
	<i>A. niger</i>		594		642
	<i>A. terreus</i>		609		642
	<i>A. nidulans</i>		566		642

6. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของโพรเมอร์ *tef-1 α* ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ใช้เชื้อ *A. fumigatus* หมายเลข 36 เป็นเชื้อตัวแทนในการทดสอบกับโพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ng/ μ l เตรียมจากโพรเมอร์ stock ที่ความเข้มข้น 2, 600 ng/ μ l โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับการทดสอบในบริเวณ *its* ดังนี้ pre incubation 95°C 5 นาที, amplification 40 cycle, denature 95°C 1 นาที, annealing 53°C 1 นาที, extension 72°C 2 นาที, post amplification 72°C 10 นาที และ cooling 40°C 10 วินาที ได้ค่า Ct จากการทำ real time PCR ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 10 ng/ μ l ได้ค่า Ct เป็น not detected ที่ความเข้มข้น 20 ng/ μ l ได้ค่า Ct 32.22 ที่ความเข้มข้น 40 ng/ μ l ได้ค่า Ct 26.04 ที่ความเข้มข้น 60 ng/ μ l ได้ค่า Ct 26.56 ที่ความเข้มข้น 80 ng/ μ l ได้ค่า Ct 24.78 และที่ความเข้มข้น 100 ng/ μ l ได้ค่า Ct 23.71 จากการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้นของโพรเมอร์ ในช่วง 40-100 ng/ μ l ให้ค่า Ct อยู่ในช่วง 23.71-26.04 จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของโพรเมอร์ที่น้อยที่สุดคือ 40 ng/ μ l ในการทำปฏิกิริยาของโพรเมอร์ *tef-1 α* เพื่อทดสอบในขั้นต่อไป (ภาพที่ 19)

กราฟผลการทำ real time PCR
เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ *tef-1α* ที่เหมาะสม

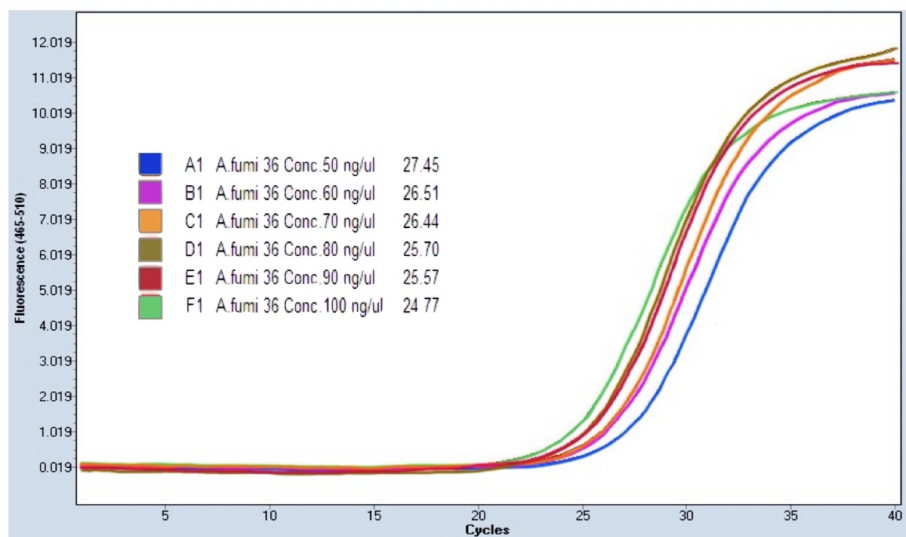


ภาพที่ 19 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ *tef-1α* ที่เหมาะสม
เลือกใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ 40 ng/μl

7. ผลการทดสอบหาปริมาณของ DNA template ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ *tef-1α*

ใช้ DNA ของเชื้อ *A. fumigatus* หมายเลข 36 เป็นตัวแทนในการทดสอบ โดยเตรียมให้ได้ปริมาณของ DNA ในปฏิกิริยาเท่ากับ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 ng จากการใช้ DNA ปริมาณ 10 ng ในปริมาตรที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ DNA ในปฏิกิริยาตามที่ระบุไว้ ใช้สถานะเช่นเดียวกับการทดสอบด้วยไพรเมอร์ *its* และความเข้มข้นของไพรเมอร์จากผลการทดลองในข้อ 6.1 คือ 40 ng/μl ได้ค่า Ct จากการทำ real time PCR ดังนี้ ที่ปริมาณ 50 ng ได้ค่า Ct 27.45 ที่ปริมาณ 60 ng ได้ค่า Ct 26.51 ที่ปริมาณ 70 ng ได้ค่า Ct 26.44 ที่ปริมาณ 80 ng ได้ค่า Ct 25.70 ที่ปริมาณ 90 ng ได้ค่า Ct 25.57 และที่ปริมาณ 100 ng ได้ค่า Ct 24.77 จากการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้นของ DNA template 100 ng ให้ค่า Ct ต่ำที่สุด คือ 24.77 จึงเลือกใช้ความปริมาณ DNA ที่ 100 ng ต่อปฏิกิริยา PCR 50 μl ในการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์ *tef-1α* เพื่อทดสอบในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 20)

กราฟผลการทำ real time PCR ด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α*
เพื่อทดสอบหาปริมาณ DNA ที่เหมาะสม

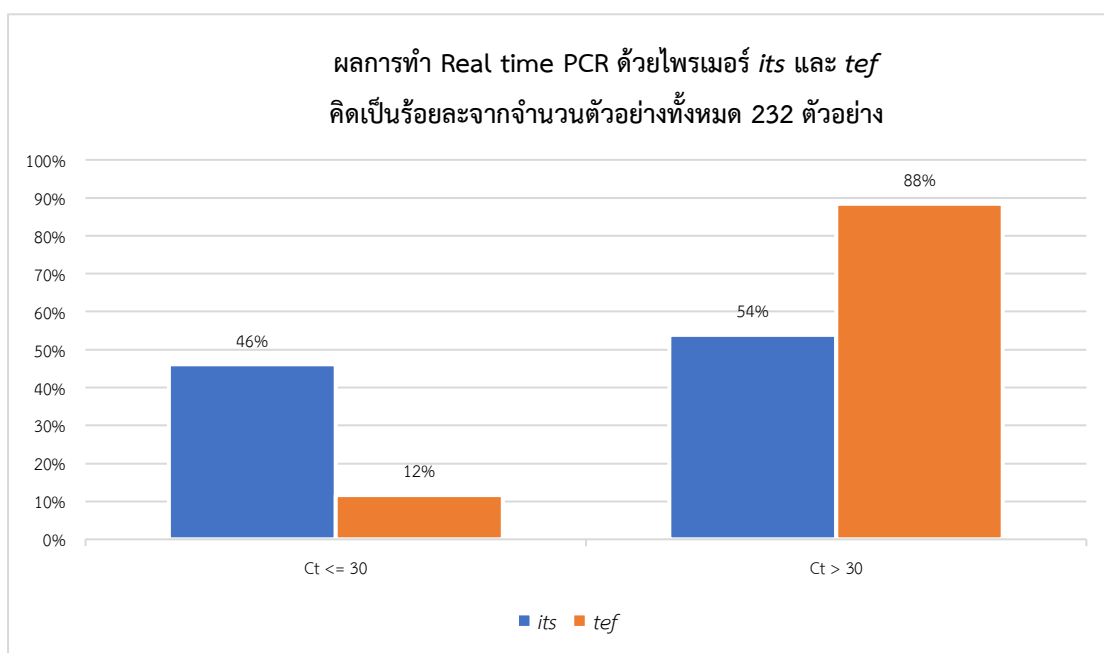


ภาพที่ 20 ผลการทดสอบหาปริมาณ DNA ที่เหมาะสมในการทดสอบด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α*
เลือกใช้ความปริมาณ DNA ที่ 100 ng ต่อปฏิกิริยา PCR 50 μ l

8. ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสารพันธุกรรมบริเวณ *its* และ *tef-1 α*

การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ *its1* และ *its4* ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ 10 ng/ μ l บริเวณยีน *tef-1 α* ใช้ไพรเมอร์ *tef* A133 forward และ A133 reverse ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ 40 ng/ μ l โดยใช้สัดส่วนของน้ำยาต่างๆ ตามเอกสารกำกับน้ำยา master mix (LightCycler® 480 SYBR Green I, บริษัท Roach Diagnostic, ประเทศสวีตเซอร์แลนด์) ดังนี้ water PCR grade 10 μ l, forward ไพรเมอร์ปริมาตร 2.5 μ l, reverse ไพรเมอร์ปริมาตร 2.5 μ l, master mix 2x conc. 25 μ l, DNA template ความเข้มข้น 10 ng/ μ l ปริมาตร 10 μ l และใช้ annealing ที่ 53°C โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ White และคณะ (102) ใช้สถานะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ pre incubation 95°C 5 นาที, amplification 40 cycle, denature 95°C 1 นาที, annealing 53°C 1 นาที, extension 72°C 2 นาที, post amplification 72°C 10 นาที และ cooling 40°C 10 วินาที กำหนดค่า Ct ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 และมากกว่า 30 ในการวิเคราะห์จำนวนสำเนาของแต่ละยีน ซึ่งในยีนที่มีสำเนามากกว่าจะส่งผลให้เพิ่มปริมาณยีนได้โดยใช้จำนวนรอบที่น้อยกว่า ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *its* ทำการทดสอบโดยใช้เชื้อ *A. fumigatus* ATCC269344 คือเชื้อ *A. fumigatus* ตัวอย่างที่ 58 เป็นเชื้อควบคุมบวก ผลการทดสอบได้ค่า Ct 30 ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบผล ผลการทดสอบได้ค่า Ct เป็น not detected พบว่าทุกตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้โดยมีค่า Ct อยู่ระหว่าง 23-36 พบเชื้อที่มีค่า Ct น้อยกว่าหรือ

เท่ากับ 30 จำนวน 107 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 46 มีค่า Ct มากกว่า 30 จำนวน 125 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 54 และผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *tef* ทำการทดสอบโดยใช้เชื้อ *A. fumigatus* ATCC269344 คือเชื้อ *A. fumigatus* ตัวอย่างที่ 58 เป็นเชื้อควบคุมบวก ผลการทดสอบได้ค่า Ct 25 ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบผล ผลการทดสอบได้ค่า Ct เป็น not detected พบว่าทุกตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้โดยมีค่า Ct อยู่ระหว่าง 24-36 พบเชื้อที่มีค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 จำนวน 27 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12 มีค่า Ct มากกว่า 30 จำนวน 205 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 88 จากทั้งหมด 232 ตัวอย่าง (ภาพที่ 21)



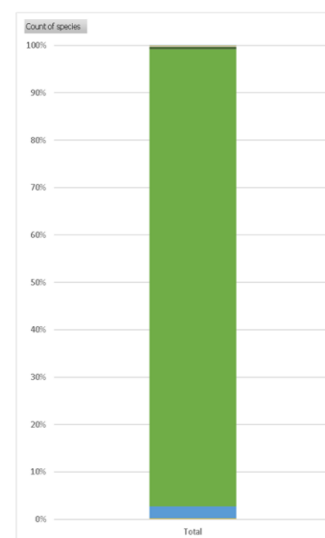
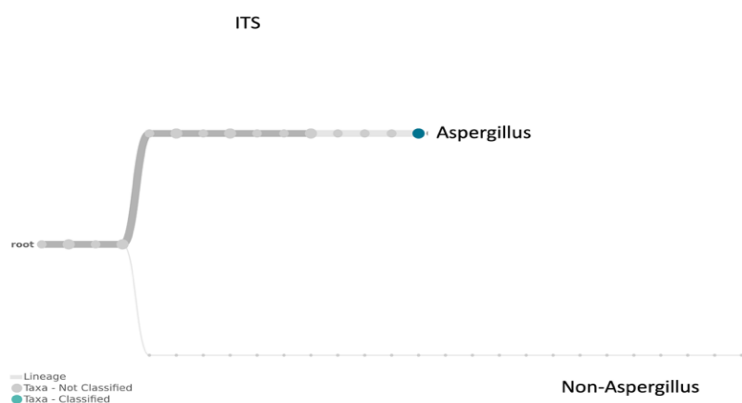
ภาพที่ 21 แผนภูมิรูปแท่งแสดงร้อยละของตัวอย่างที่มีค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 และค่า Ct มากกว่า 30 โดยแทนข้อมูลร้อยละของตัวอย่างที่ทดสอบด้วยไพรเมอร์ *its* เป็นสีฟ้า และทดสอบด้วยไพรเมอร์ *tef* เป็นสีส้ม จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 232 ตัวอย่าง

9. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม WIMP

จากขั้นตอนการเพาะเชื้อ สกัดสารพันธุกรรม เพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ และนำผลผลิตไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค sanger sequencing หลังจากนั้นจะนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรเมอร์ forward และไพรเมอร์ reverse มาวิเคราะห์เป็นลำดับเบสที่ให้ลักษณะของกราฟชัดเจน และตรวจสอบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย WIMP ผลของการจัดกลุ่มเชื้อจากบริเวณ *its* พบว่าสามารถจำแนกเชื้อในงานวิจัยครั้งนี้ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เชื้อในกลุ่ม *Aspergillus* และเชื้อในกลุ่ม non-*Aspergillus* คือ น้อยกว่าร้อยละ 10 เป็นเชื้อในกลุ่ม non-*Aspergillus* 1 กลุ่ม และมากกว่าร้อยละ 90 เป็นเชื้อในกลุ่ม *Aspergillus* 1 กลุ่ม (ภาพที่ 22) และผลการจำแนกเชื้อจากยีน *tef-1α* สามารถจำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ น้อยกว่าร้อยละ 10 เป็นเชื้อใน

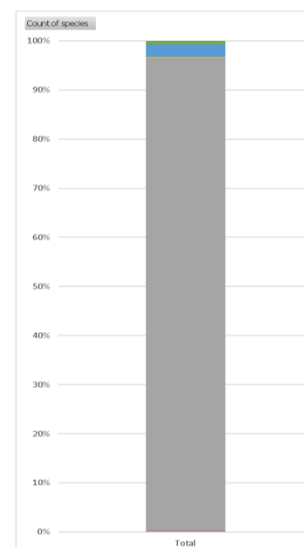
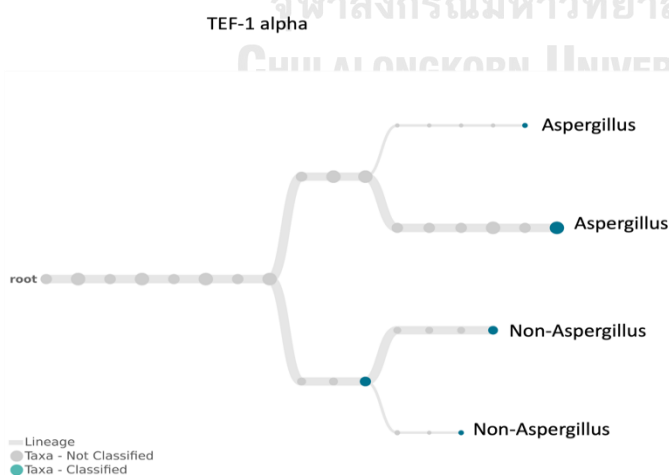
กลุ่ม non-*Aspergillus* 2 กลุ่ม และมากกว่าร้อยละ 90 เป็นเชื้อในกลุ่ม *Aspergillus* 2 กลุ่ม (ภาพที่ 23) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นด้วยโปรแกรม WIMP ได้แสดงให้เห็นว่ายีน *tef-1 α* มีความสามารถในการจำแนกกลุ่มของเชื้อได้มีความละเอียดกว่าจากจำนวน branch ที่มีการแตกแขนงมากกว่าการจำแนกด้วยข้อมูลสารพันธุกรรมบริเวณ *its*

BLAST result from raw data (percentage of classified reads)



ภาพที่ 22 ภาพผลของการจัดกลุ่มเชื้อจากบริเวณ *its* ด้วยโปรแกรม WIMP พบว่าสามารถจำแนกเชื้อในงานวิจัยครั้งนี้ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เชื้อในกลุ่ม *Aspergillus* และเชื้อในกลุ่ม non-*Aspergillus* โดยปริมาณของเชื้อแต่ละกลุ่มแสดงในกราฟรูปแท่งทางขวาของภาพ

BLAST result from raw data (percentage of classified reads)

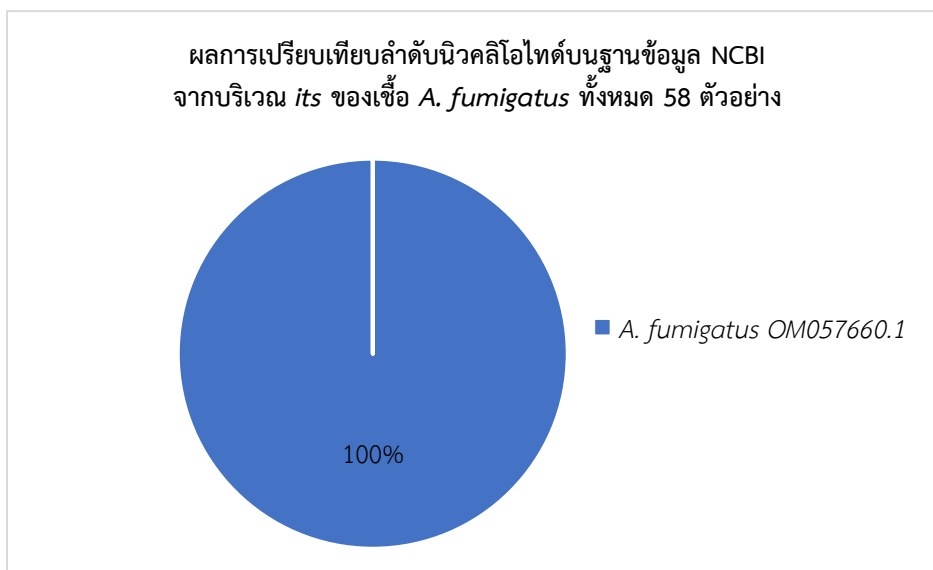


ภาพที่ 23 ภาพผลของการจัดกลุ่มเชื้อจากยีน *tef-1 α* ด้วยโปรแกรม WIMP พบว่าสามารถจำแนกเชื้อในงานวิจัยครั้งนี้ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ เชื้อในกลุ่ม *Aspergillus* 2 กลุ่ม และเชื้อในกลุ่ม non-*Aspergillus* 2 กลุ่ม โดยปริมาณของเชื้อแต่ละกลุ่มแสดงในกราฟรูปแท่งทางขวาของภาพ

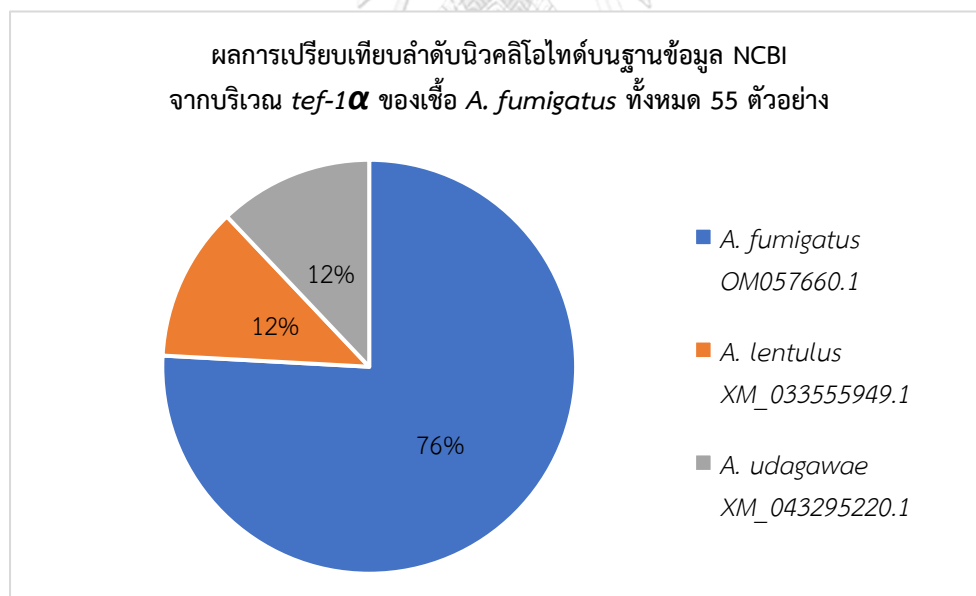
10. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บนฐานข้อมูล NCBI

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ผลผลิตของเชื้อ *A. fumigatus* ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *its* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดตั้งแต่ 510-578 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้ง 58 ตัวอย่างตรงกับเชื้อ *A. fumigatus* หมายเลข Accession OM057660.1 ที่มีขนาด 523 คู่เบส มีค่า query cover ตั้งแต่ร้อยละ 98-100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 99.04-100 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. fumigatus* ATCC26934 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วมี %similarity อยู่ระหว่าง 99.04-99.85 (ภาพที่ 24)

เชื้อ *A. fumigatus* ตัวอย่างที่ 7, 30 และ 55 ไม่มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์ในผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α* จึงมีผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมด 55 ตัวอย่าง ผลลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดตั้งแต่ 580-1388 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI พบว่า 41 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. fumigatus* หมายเลข Accession OM057660.1 มีขนาด 584 คู่เบส และเชื้อ *A. flavus* หมายเลข Accession KP054383.1 มีขนาด 596 คู่เบส และมี query coverage ร้อยละ 98-100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 98.12-100 เท่ากันทั้งสองสายพันธุ์ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. fumigatus* ATCC26934 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วมี %similarity อยู่ระหว่าง 73.33-100 พบว่า 7 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. lentulus* หมายเลข Accession XM_033555949.1 มีขนาด 1323 คู่เบส และมี query coverage ร้อยละ 99-100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 99.39-100 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. fumigatus* ATCC26934 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วมี %similarity อยู่ระหว่าง 73.33-81.82 และพบว่า 7 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. udagawae* หมายเลข Accession XM_043295220.1 มีขนาด 1383 คู่เบส และมีค่า query coverage ร้อยละ 99 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 99.56-100 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. fumigatus* ATCC26934 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วมี %similarity อยู่ระหว่าง 91.83-92.18 (ภาพที่ 25)



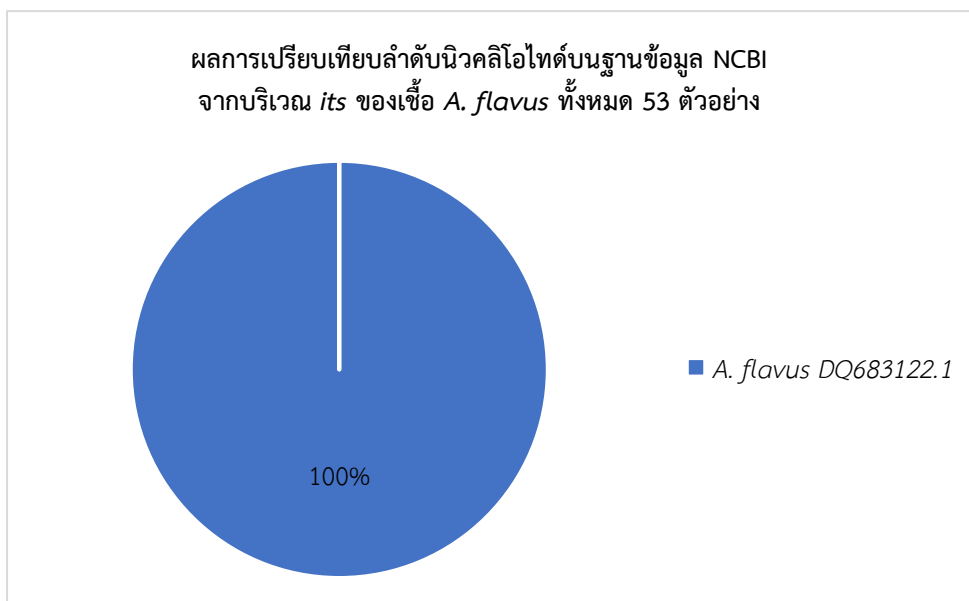
ภาพที่ 24 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ *its* ของเชื้อ *A. fumigatus* ทั้งหมด 58 ตัวอย่างตรงกับเชื้อ *A. fumigatus* หมายเลข Accession OM057660.1



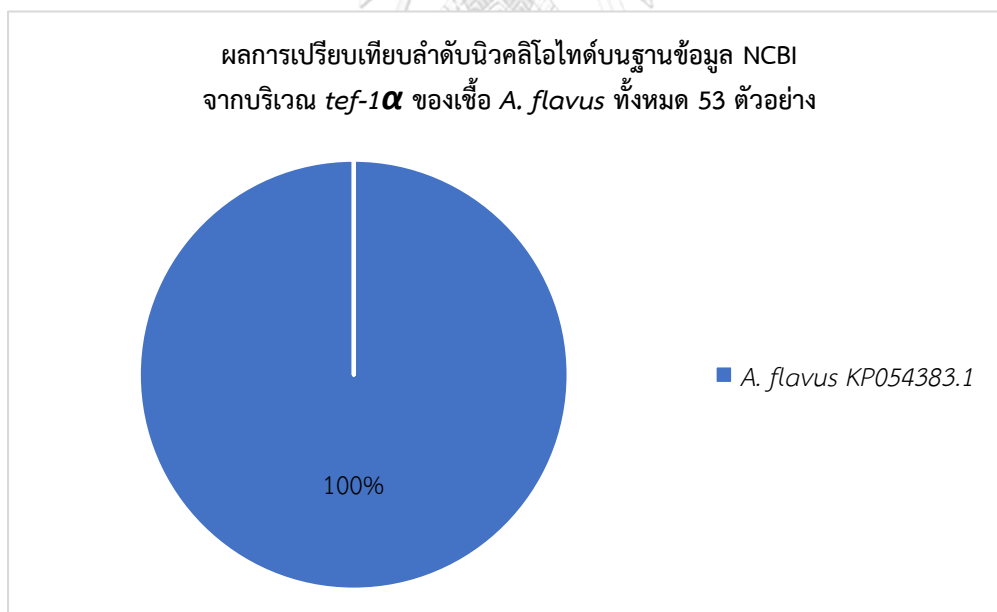
ภาพที่ 25 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ *tef-1 α* ของเชื้อ *A. fumigatus* ทั้งหมด 55 ตัวอย่าง พบว่า 41 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. fumigatus* หมายเลข Accession OM057660.1 พบว่า 7 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. lentulus* หมายเลข Accession XM_033555949.1 และ 7 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. udagawae* หมายเลข Accession XM_043295220.1

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของเชื้อ *A. flavus* ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *its* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดตั้งแต่ 575-576 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้ง 53 ตัวอย่างตรงกับเชื้อ *A. flavus* หมายเลข Accession DQ683122.1 มีขนาด 576 คู่เบส มีค่า query cover ตั้งแต่ร้อยละ 99-100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 99.65-100 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. flavus* ATCC204304 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วมี %similarity อยู่ระหว่าง 99.57-99.93 (ภาพที่ 26)

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของเชื้อ *A. flavus* ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดตั้งแต่ 584-590 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้ง 53 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. flavus* หมายเลข Accession KP054383.1 และ KP054376.1 มีขนาด 596 คู่เบส มีค่า query coverage ตั้งแต่ร้อยละ 99-100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 98.32-100 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. flavus* ATCC204304 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วมี %similarity อยู่ระหว่าง 97.79-100 (ภาพที่ 27)



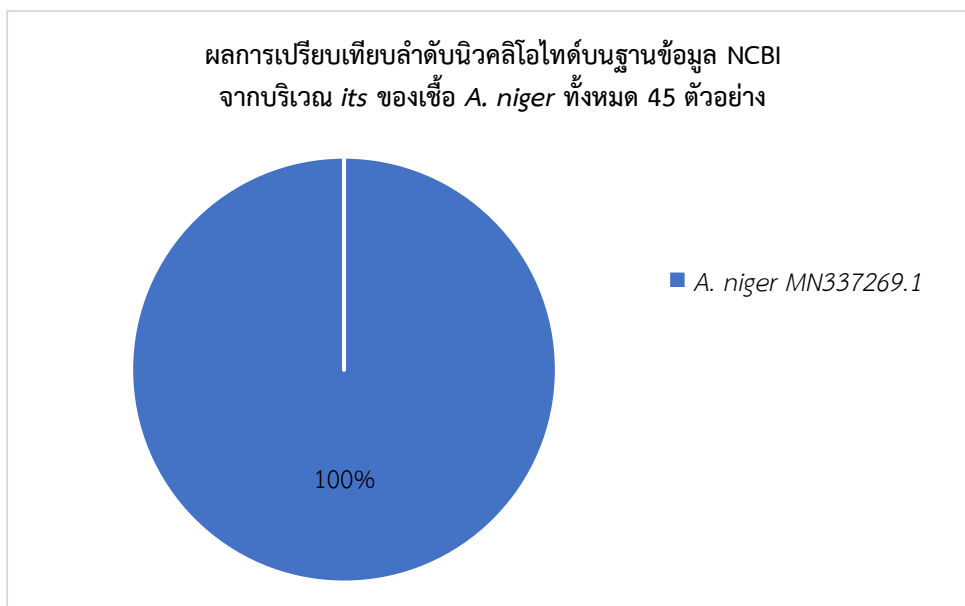
ภาพที่ 26 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ *its* ของเชื้อ *A. flavus* ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. flavus* หมายเลข Accession DQ683122.



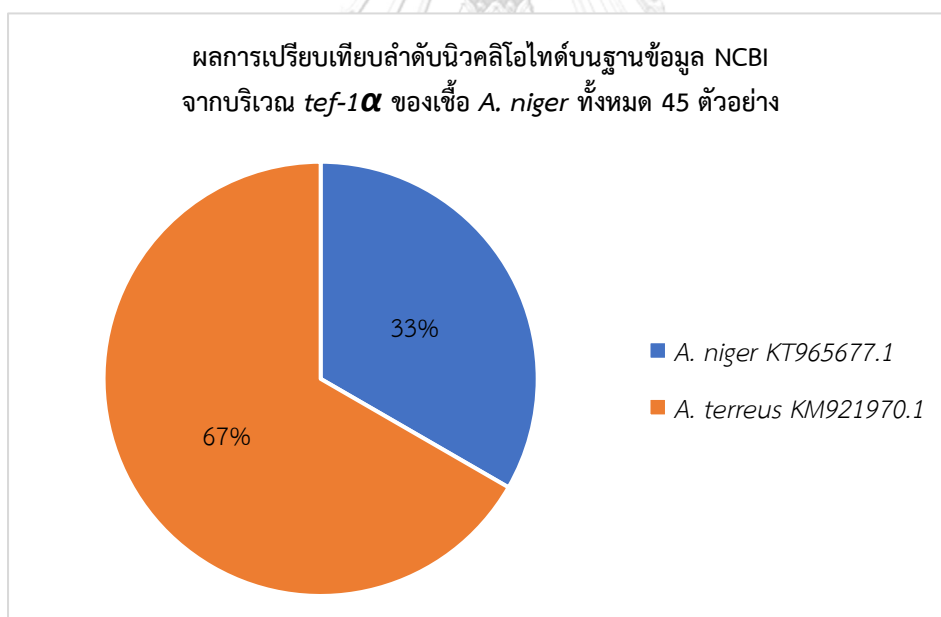
ภาพที่ 27 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ *tef-1 α* ของเชื้อ *A. flavus* ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. flavus* หมายเลข Accession KP054383.1

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของเชื้อ *A. niger* ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *its* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดตั้งแต่ 575-576 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้ง 45 ตัวอย่างตรงกับเชื้อ *A. niger* หมายเลข Accession MN337269.1 มีขนาด 582 คู่เบส มีค่า query cover ตั้งแต่ร้อยละ 99-100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 99.66-100 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. niger* ATCC6275 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วมี %similarity อยู่ระหว่าง 99.58-100 (ภาพที่ 28)

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของเชื้อ *A. niger* ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดตั้งแต่ 610-729 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI พบว่า 15 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. niger* หมายเลข Accession KT965677.1 มีขนาด 611 คู่เบส มีค่า query coverage ตั้งแต่ร้อยละ 98-100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 99.18-100 และพบว่ามี 30 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. terreus* หมายเลข Accession KM921970.1 มีขนาด 726 คู่เบส มีค่า query coverage ตั้งแต่ร้อยละ 99 มีค่าความเหมือนของข้อมูล percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 98.90-99.89 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. niger* ATCC6275 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วพบว่ามี %similarity อยู่ระหว่าง 90.86-100 (ภาพที่ 29)



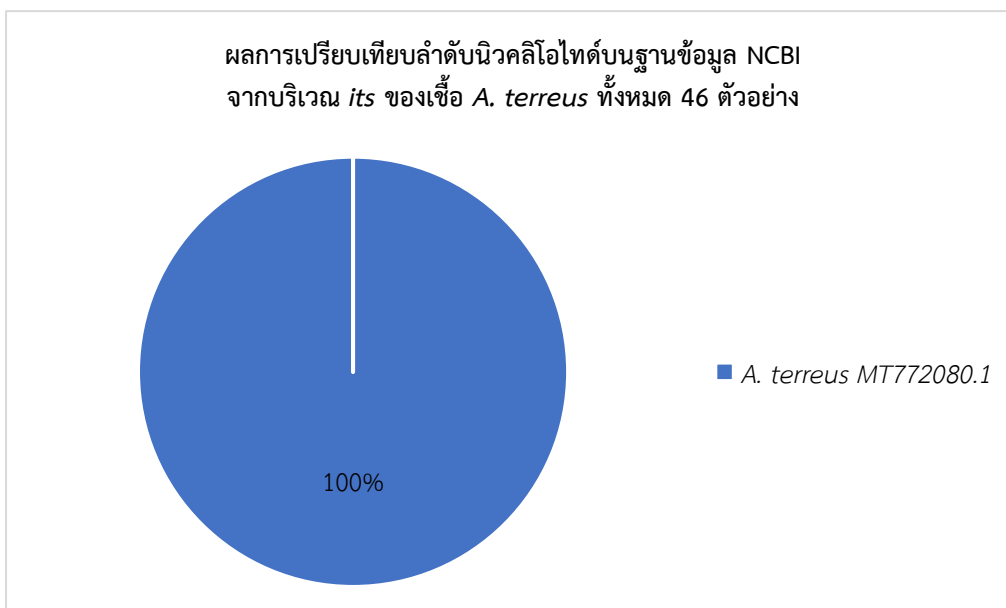
ภาพที่ 28 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ *its* ของเชื้อ *A. niger* ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง *A. niger* หมายเลข Accession MN337269.1



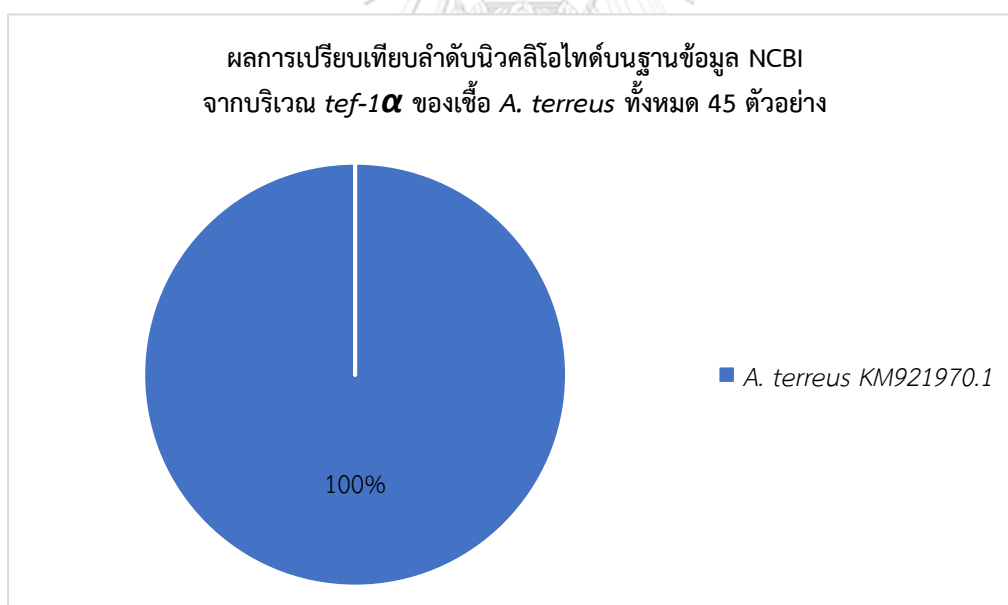
ภาพที่ 29 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ *tef-1 α* ของเชื้อ *A. niger* ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง พบว่า 15 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. niger* หมายเลข Accession KT965677.1 และมี 30 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. terreus* หมายเลข Accession KM921970.1

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของเชื้อ *A. terreus* ทั้งหมด 46 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *its* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดตั้งแต่ 573-588 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้ง 46 ตัวอย่างตรงกับเชื้อ *A. terreus* หมายเลข Accession MT772080.1 มีขนาด 578 คู่เบส มีค่า query cover ตั้งแต่ร้อยละ 99-100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 99.48-100 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. terreus* ATCC20542 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วพบว่ามี %similarity อยู่ระหว่าง 98.75-99.29 (ภาพที่ 30)

เชื้อ *A. terreus* ตัวอย่างที่ 30 ไม่มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์ในผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α* จึงมีผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมด 45 ตัวอย่าง ผลลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดตั้งแต่ 700-729 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้ง 45 ตัวอย่างตรงกับเชื้อ *A. terreus* หมายเลข Accession KM921970.1 มีขนาด 726 คู่เบส มีค่า query coverage ตั้งแต่ร้อยละ 99-100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 98.76-100 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. terreus* ATCC20542 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วพบว่ามี %similarity อยู่ระหว่าง 98.76-100 (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 30 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ *its* ของเชื้อ *A. terreus* ทั้งหมด 46 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. terreus* หมายเลข Accession MT772080.1

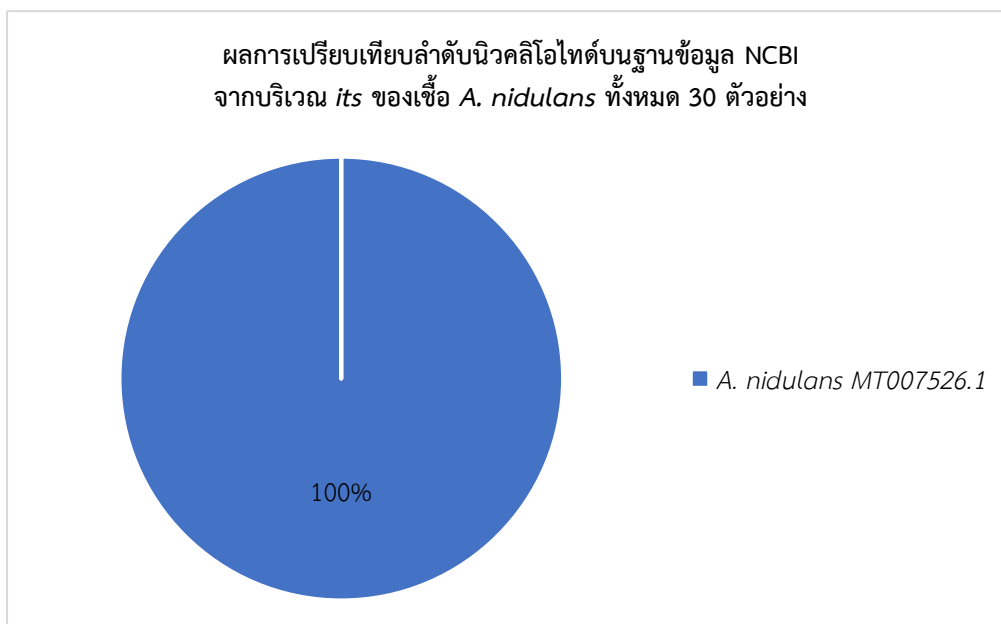


ภาพที่ 31 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ *tef-1 α* ของเชื้อ *A. terreus* ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. terreus* หมายเลข Accession KM921970.1

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของเชื้อ *A. nidulans* ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *its* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดตั้งแต่ 514-546 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้ง 46 ตัวอย่างตรงกับเชื้อ *A. nidulans* หมายเลข Accession MT007526.1 มีขนาด 578 คู่เบส มีค่า query cover ร้อยละ 100 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 99.62-100 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. nidulans* ATCC38163 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วมี %similarity อยู่ระหว่าง 99.43-99.81 (ภาพที่ 32)

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของเชื้อ *A. nidulans* ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดตั้งแต่ 700-716 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้ง 30 ตัวอย่างตรงกับเชื้อ *A. nidulans* หมายเลข Accession KM882998.1 มีขนาด 578 คู่เบส มีค่าความครอบคลุมข้อมูล query coverage ร้อยละ 99 มีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 99.14-100 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. nidulans* ATCC38163 สายพันธุ์มาตรฐานแล้วพบว่ามี %similarity อยู่ระหว่าง 99.14-100 (ภาพที่ 33)





ภาพที่ 32 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ *its* ของเชื้อ *A. nidulans* ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. nidulans* หมายเลข Accession MT007526.1

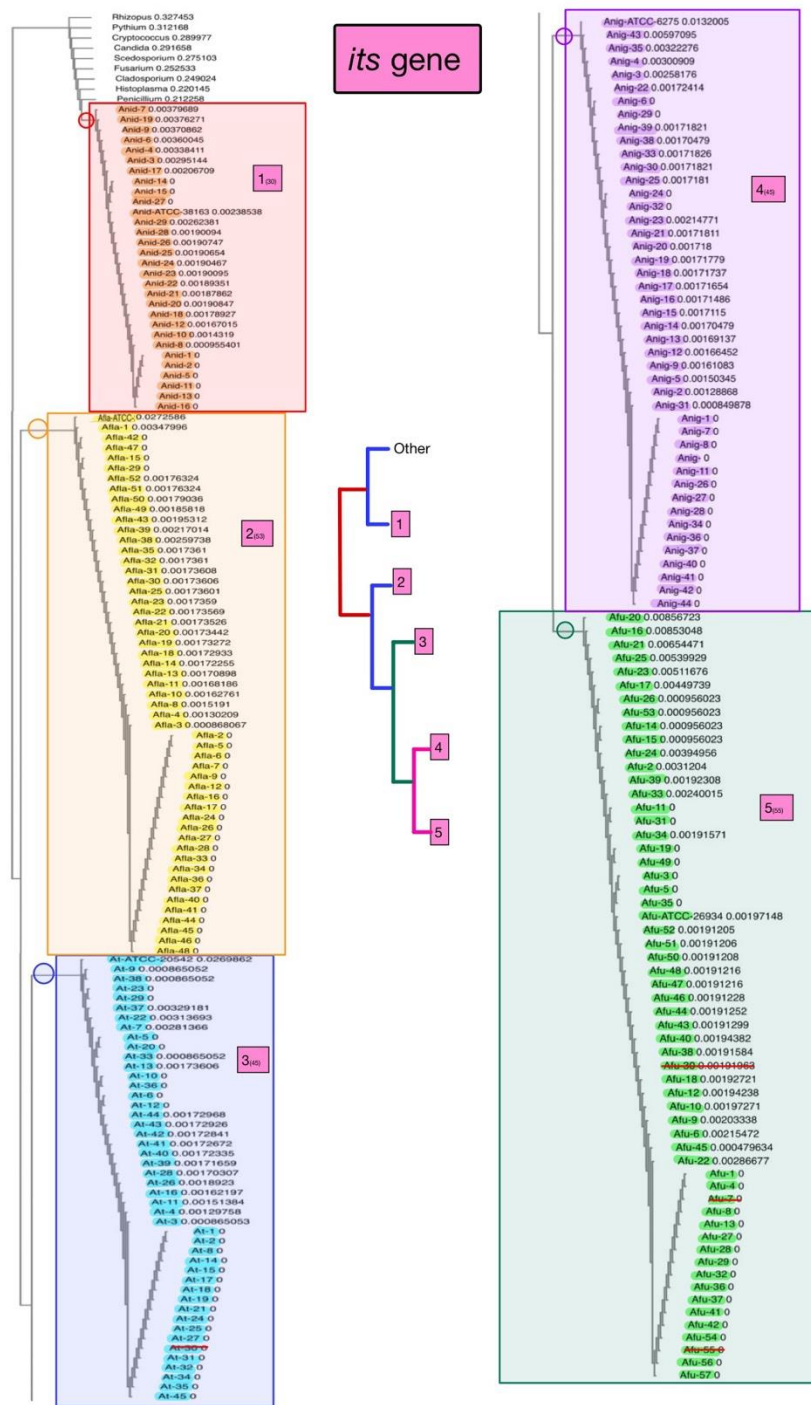


ภาพที่ 33 แผนภูมิวงกลมแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI จากบริเวณ *tef-1 α* ของเชื้อ *A. nidulans* ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ตรงกับเชื้อ *A. nidulans* หมายเลข Accession KM882998.1

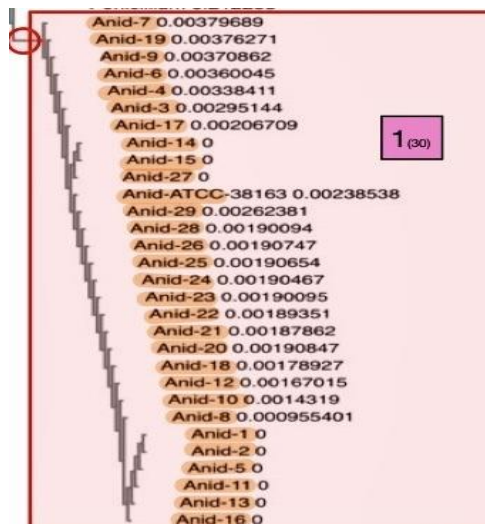
จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *tef-1 α* พบว่ามีเชื้อ *A. fumigatus* บางตัวอย่างมีผลใกล้เคียงกับเชื้อ *A. lentulus* และ *A. udagawae* มากกว่า ในขณะที่ข้อมูลจากบริเวณ *its* ให้ผลออกมาเป็นเชื้อ *A. fumigatus* ทุกตัวอย่าง และพบว่าข้อมูลจากยีน *tef-1 α* ในเชื้อ *A. niger* มีบางตัวอย่างที่ให้ผลใกล้เคียงกับเชื้อ *A. terreus* มากกว่า และในเชื้อ *A. fumigatus* บางตัวอย่างมีผลใกล้เคียงกับเชื้อ *A. flavus* มากกว่า

11. ผลการสร้าง phylogenetic tree

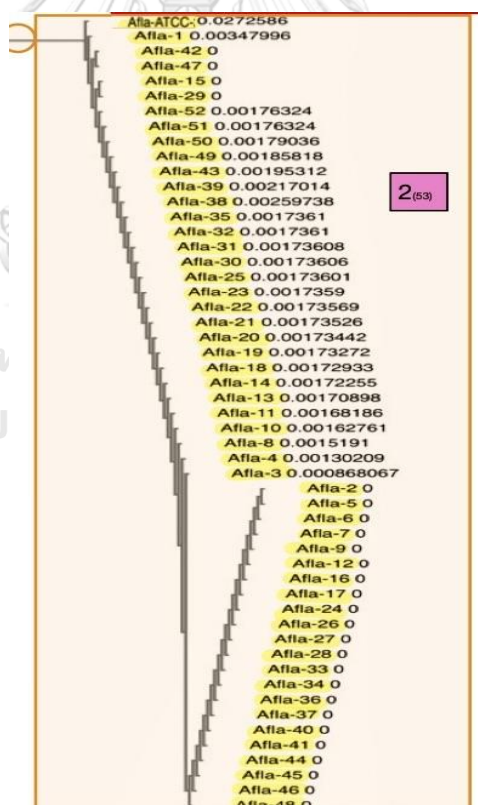
เนื่องจากมีเชื้อจำนวน 4 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 232 ตัวอย่าง ที่ไม่มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการวิเคราะห์ข้อมูลการจัดกลุ่มด้วย phylogenetic tree จึงเหลือตัวอย่างที่นำมาใช้วิเคราะห์ผล 228 ตัวอย่าง เมื่อนำผลการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากบริเวณ *its* มาสร้าง phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกเชื้อได้เป็น 5 กลุ่ม คือ clade 1 จำนวน 30 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. nidulans* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรงกับเชื้อ *A. nidulans* clade 2 จำนวน 53 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. flavus* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *A. flavus* clade 3 จำนวน 45 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. terreus* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *A. terreus* clade 4 จำนวน 45 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. niger* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *A. niger* และ clade 5 จำนวน 55 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. fumigatus* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *A. fumigatus* (ภาพที่ 34-39)



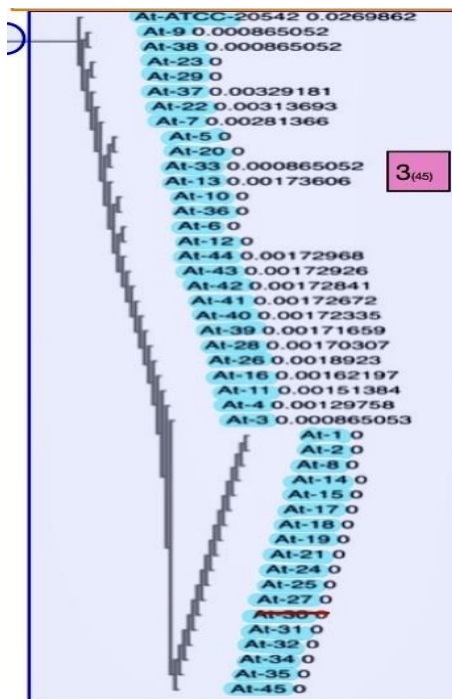
ภาพที่ 34 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ *its* สามารถจำแนกเชื้อได้เป็น 5 clade โดย clade 1 คือกลุ่มเชื้อ *A. nidulans*, clade 2 คือกลุ่มเชื้อ *A. flavus*, clade 3 คือกลุ่มเชื้อ *A. terreus*, clade 4 คือกลุ่มเชื้อ *A. niger* และ clade 5 คือกลุ่มเชื้อ *A. fumigatus*



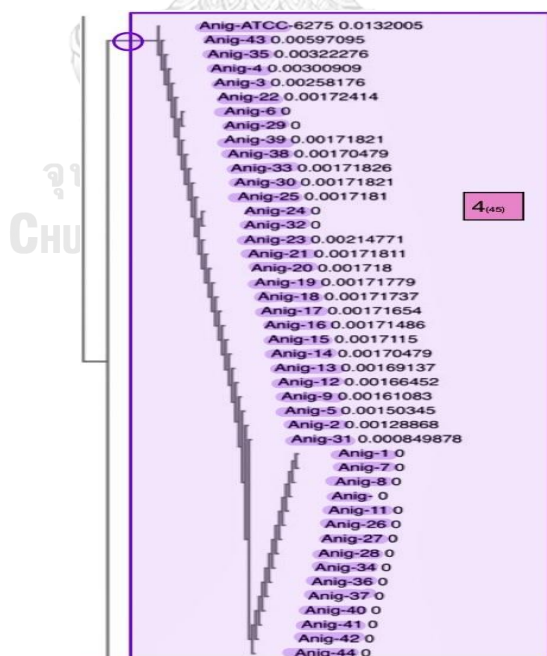
ภาพที่ 35 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ *its* จำแนกเชื้อเป็น clade 1 จำนวน 30 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. nidulans* จำนวน 30 ตัวอย่าง



ภาพที่ 36 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ *its* จำแนกเชื้อเป็น clade 2 จำนวน 53 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. flavus* จำนวน 53 ตัวอย่าง

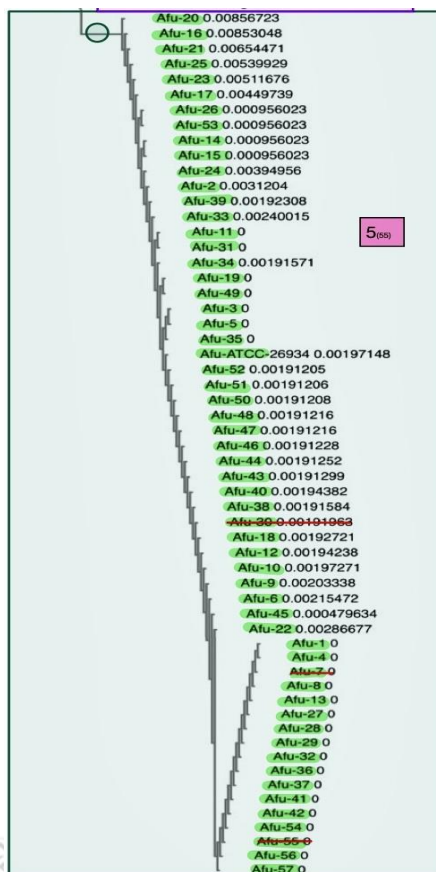


ภาพที่ 37 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ *its* จำแนกเชื้อเป็น clade 3 จำนวน 45 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. terreus* จำนวน 45 ตัวอย่าง



ภาพที่ 38 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ *its* จำแนกเชื้อเป็น clade 4

จำนวน 45 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. niger*
จำนวน 45 ตัวอย่าง



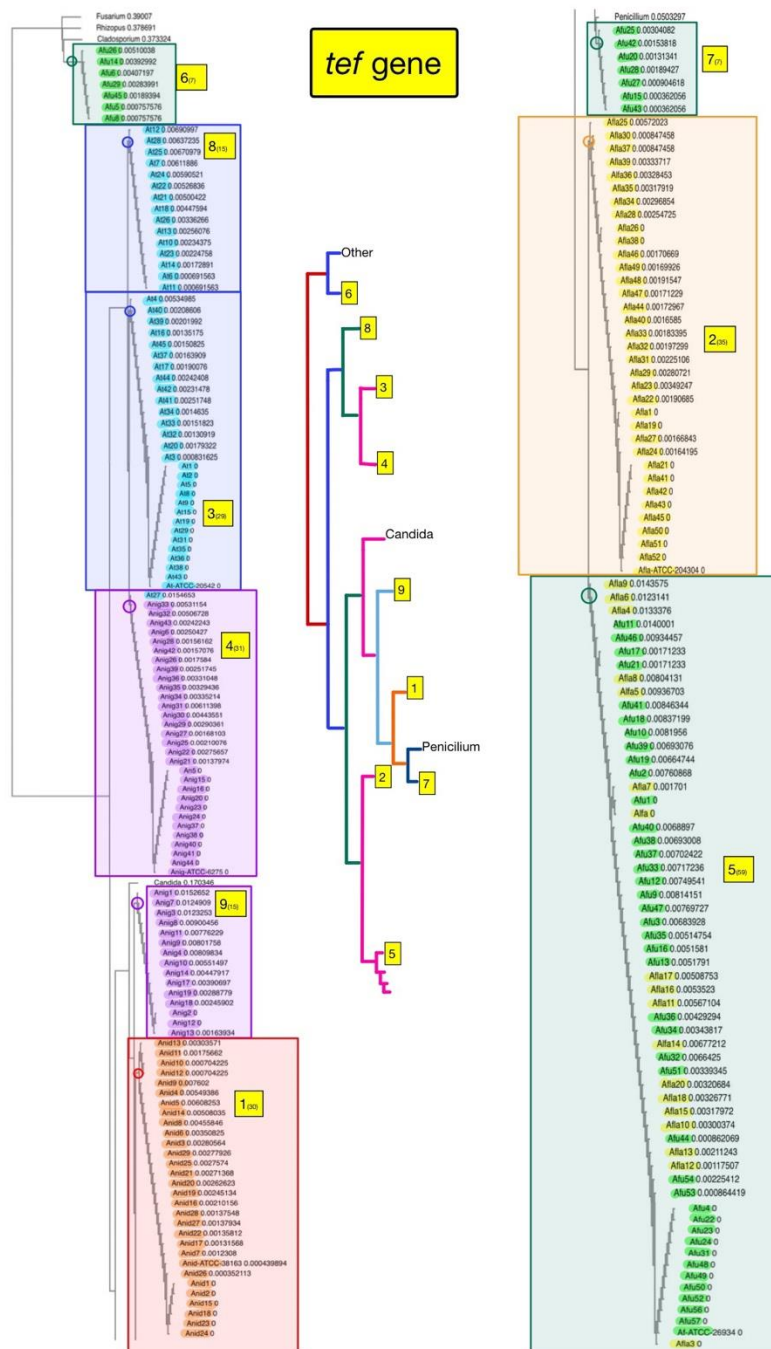
ภาพที่ 39 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากบริเวณ *its* จำแนกเชื้อ เป็น clade 5 จำนวน 55 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. fumigatus* จำนวน 55 ตัวอย่าง

เมื่อนำผลการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากบริเวณ *tef-1 α* มาสร้าง phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกเชื้อได้เป็น 9 กลุ่ม คือ clade 1 จำนวน 30 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. nidulans* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรงกับเชื้อ *A. nidulans* clade 2 จำนวน 35 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. flavus* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *A. flavus* clade 3 จำนวน 29 ตัวอย่าง และ clade 8 จำนวน 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. terreus* โดยทั้ง 2 clade มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *A. terreus* clade 4 จำนวน 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. niger* ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *A. niger* clade 9 จำนวน 30 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. niger* ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *A. terreus* clade 5 จำนวน 59 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. fumigatus*

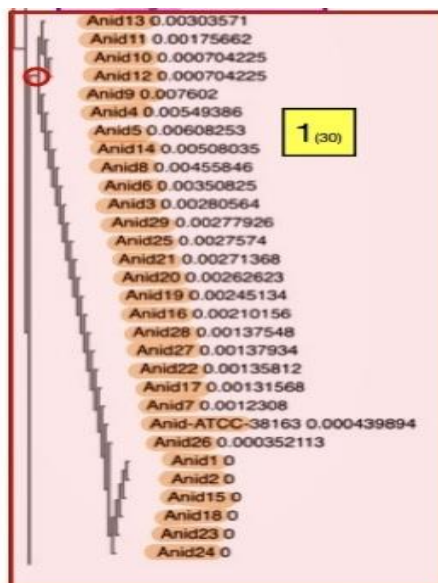
จำนวน 41 ตัวอย่าง และ *A. flavus* 18 ตัวอย่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *A. fumigatus* และเชื้อ *A. flavus* clade 6 ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. fumigatus* จำนวน 7 ตัวอย่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *A. lentulus* clade 7 ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. fumigatus* จำนวน 7 ตัวอย่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *A. udagawae* (ภาพที่ 40-47)

ซึ่งการจำแนกเชื้อด้วยยีน *tef-1 α* ให้ผลแตกต่างจากการจำแนกด้วยวิธี cultivation และ *its* ในหลายกลุ่ม เช่น เชื้อใน clade 6 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลได้ผลเป็น *A. lentulus* แตกต่างจากการจำแนกด้วยวิธี cultivation หรือ *its* ที่ได้ผลเป็น *A. fumigatus* เช่นเดียวกับเชื้อใน clade 7 ที่เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลได้ผลเป็น *A. udagawae* แตกต่างจากการจำแนกด้วยวิธี cultivation หรือ *its* ที่ได้ผลเป็น *A. fumigatus*

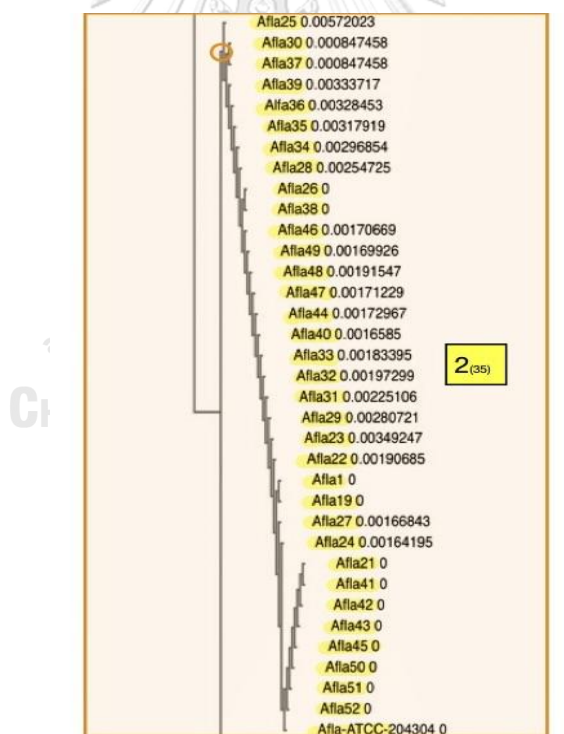




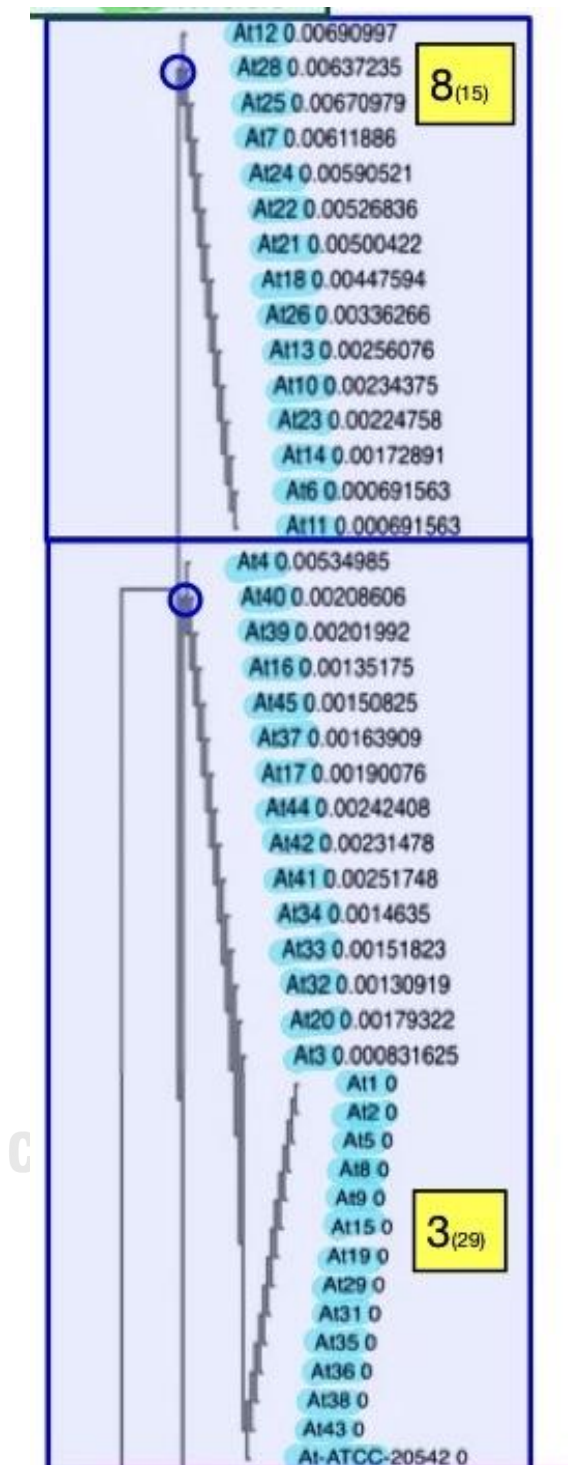
ภาพที่ 40 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน *tef-1α* ได้เป็น 9 clade โดย clade 1 คือกลุ่มเชื้อ *A. nidulans*, clade 2 คือกลุ่มเชื้อ *A. flavus*, clade 3 และ 8 คือกลุ่มเชื้อ *A. terreus*, clade 4 และ 9 คือกลุ่มเชื้อ *A. niger*, clade 5 คือกลุ่มเชื้อ *A. fumigatus*, clade 6 คือกลุ่มเชื้อ *A. lentulus* และ clade 7 คือกลุ่มเชื้อ *A. udagawae*



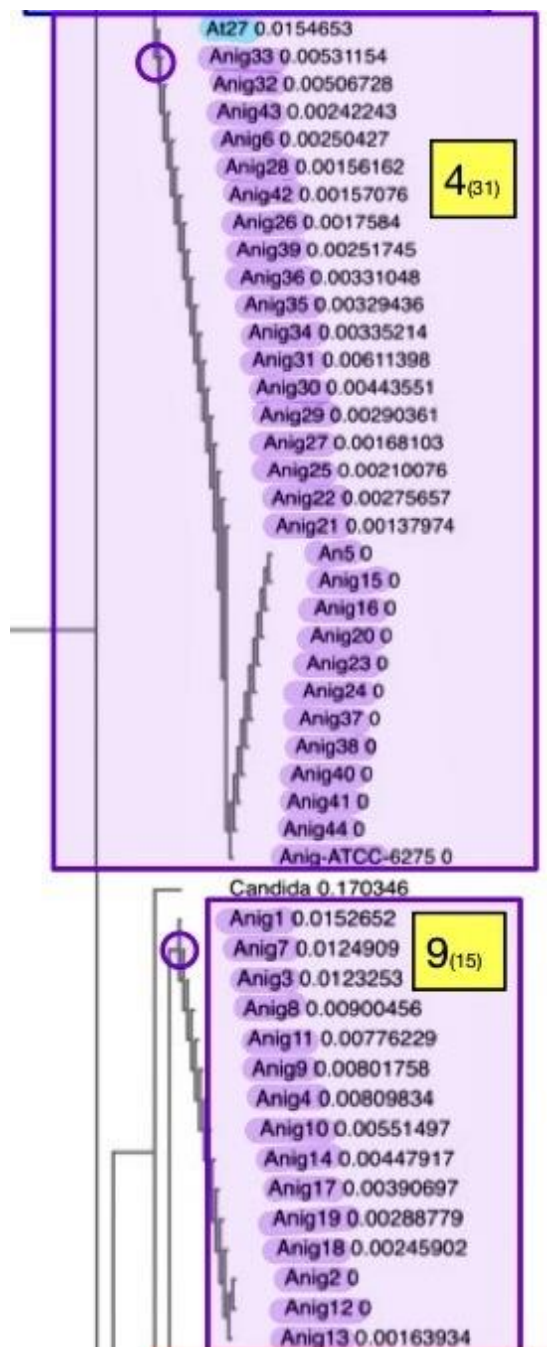
ภาพที่ 41 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน *tef-1 α* จำแนกเชื้อเป็น clade 1 จำนวน 30 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. nidulans* จำนวน 30 ตัวอย่าง



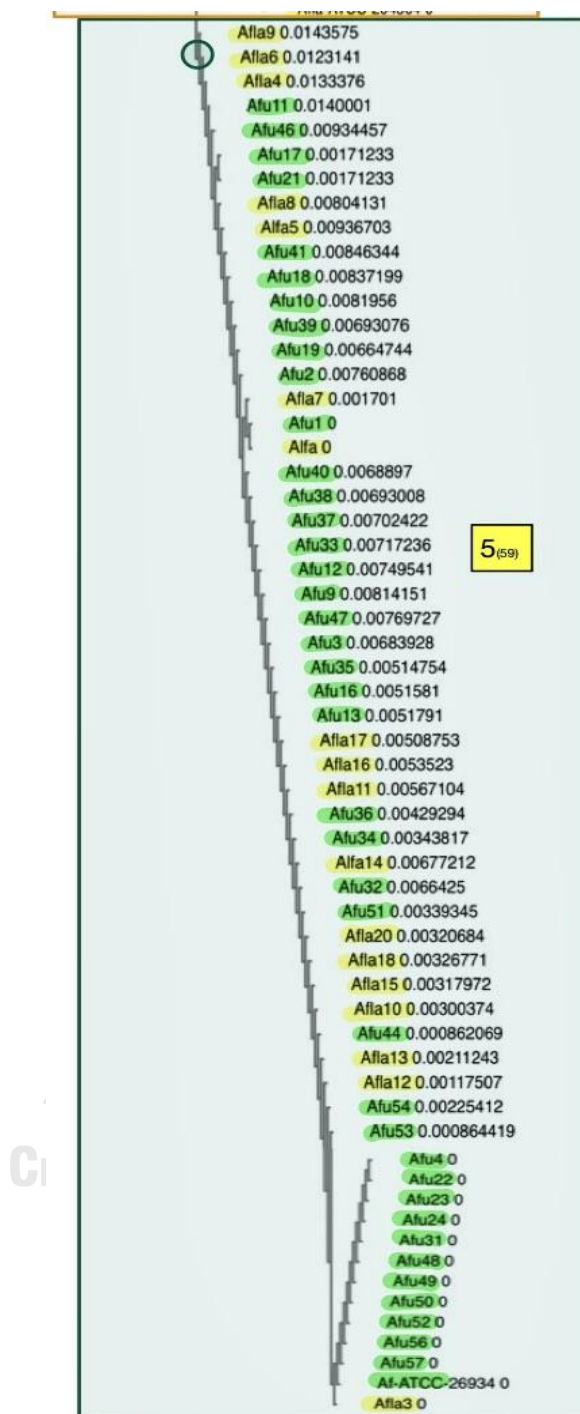
ภาพที่ 42 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน *tef-1 α* จำแนกเชื้อเป็น clade 2 จำนวน 35 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. flavus* จำนวน 35 ตัวอย่าง



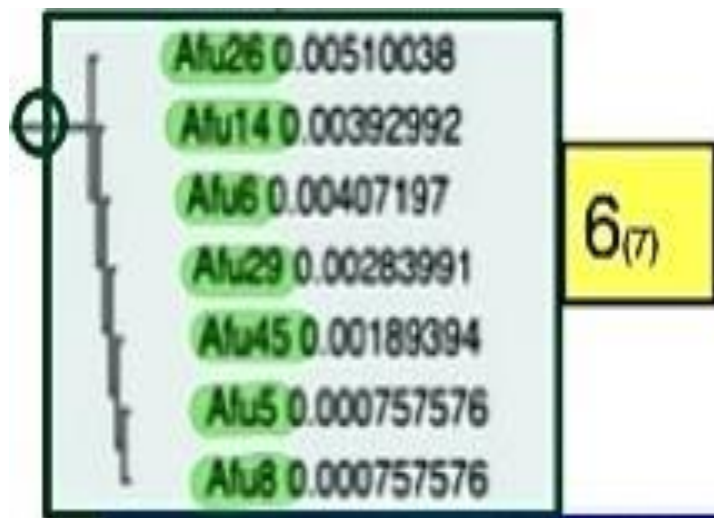
ภาพที่ 43 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน *tef-1α* จำแนกเชื้อเป็น clade 3 จำนวน 29 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. terreus* จำนวน 29 ตัวอย่าง และจำแนกเชื้อเป็น clade 8 จำนวน 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. terreus* จำนวน 15 ตัวอย่าง



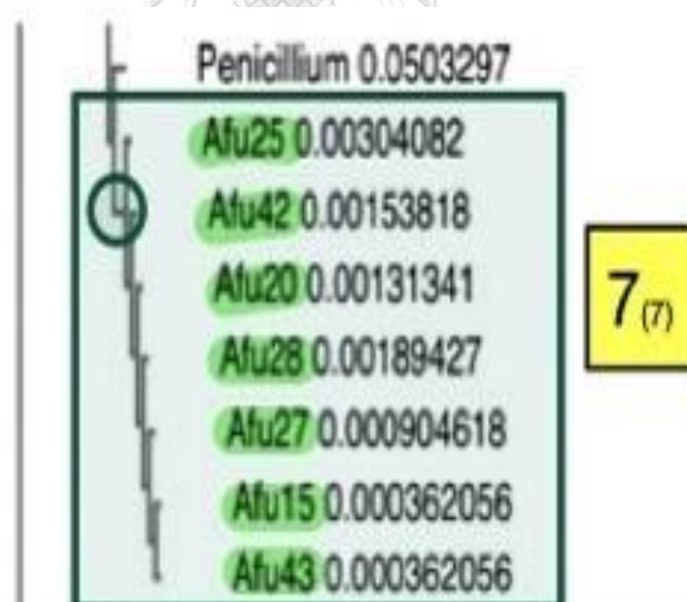
ภาพที่ 44 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน *tef-1 α* จำแนกเชื้อเป็น clade 4 จำนวน 31 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. niger* จำนวน 30 ตัวอย่าง แต่ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *tef-1 α* มีความเหมือนกับเชื้อ *A. terreus* และเป็นเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. terreus* 1ตัวอย่าง และจำแนกเชื้อเป็น clade 9 จำนวน 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. niger* จำนวน 15 ตัวอย่าง



ภาพที่ 45 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน *tef-1α* จำแนกเชื้อเป็น clade 5 จำนวน 59 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. fumigatus* จำนวน 41 ตัวอย่าง และ *A. flavus* 18 ตัวอย่าง



ภาพที่ 46 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน *tef-1 α* จำแนกเชื้อเป็น clade 6 จำนวน 7 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. fumigatus* จำนวน 7 ตัวอย่าง แต่ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *tef-1 α* มีความเหมือนกับเชื้อ *A. lentulus*

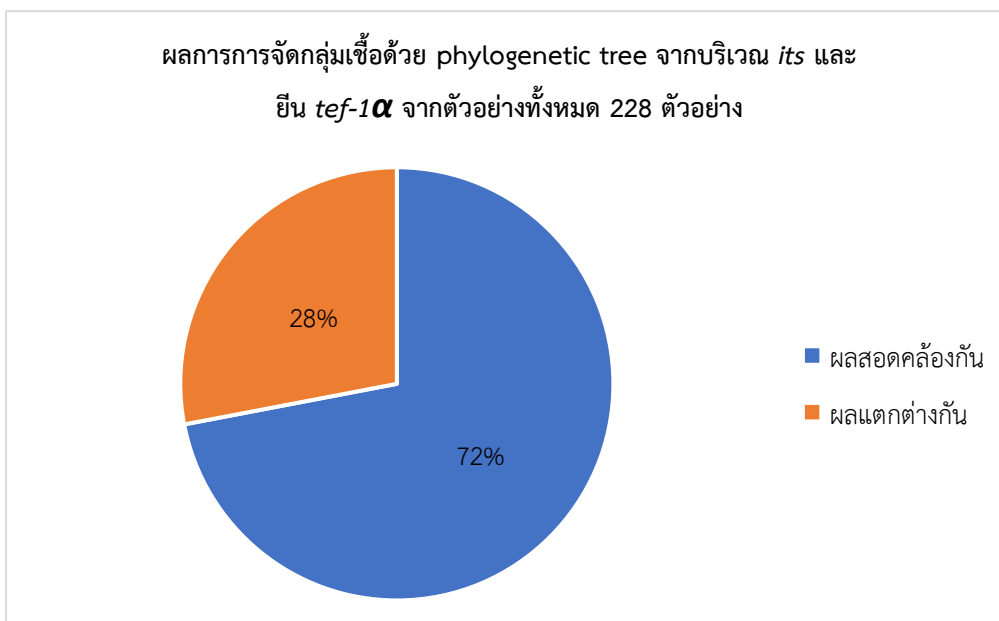


ภาพที่ 47 ผลการจัดกลุ่มเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่ได้จากยีน *tef-1 α* จำแนกเชื้อเป็น clade 7 จำนวน 7 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่ถูกจำแนกด้วยวิธี cultivation เป็นสายพันธุ์ *A. fumigatus* จำนวน 7 ตัวอย่าง แต่ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *tef-1 α* มีความเหมือนกับเชื้อ *A. udagawae*

ตารางที่ 17 สรุปผลการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree จากบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α*

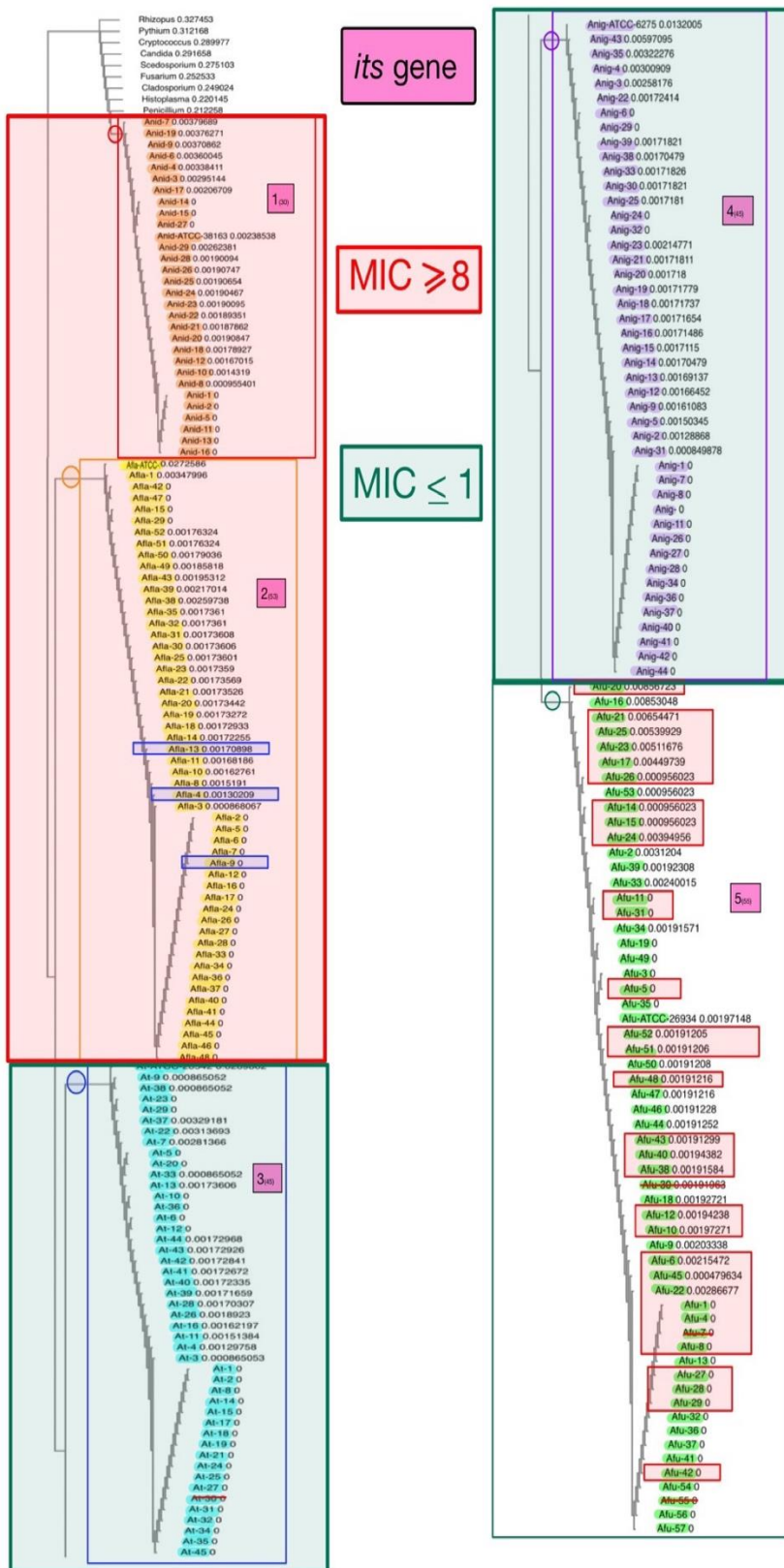
Phylogenetic tree clade	<i>its</i>		<i>tef-1α</i>	
	เชื้อ	จำนวนตัวอย่าง	เชื้อ	จำนวนตัวอย่าง
1	<i>A. nidulans</i>	30	<i>A. nidulans</i>	30
2	<i>A. flavus</i>	53	<i>A. flavus</i>	35
3	<i>A. terreus</i>	45	<i>A. terreus</i>	29
4	<i>A. niger</i>	45	<i>A. niger</i>	30
			<i>A. terreus</i>	1
5	<i>A. fumigatus</i>	55	<i>A. fumigatus</i>	41
			<i>A. flavus</i>	18
6	-		<i>A. lentulus</i>	7
7	-		<i>A. udagawae</i>	7
8	-		<i>A. terreus</i>	15
9	-		<i>A. niger</i>	15
รวม	228	228	228	228

จากข้อมูลการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree จากบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* (ตารางที่ 17) พบว่าใน clade 1 สามารถจัดกลุ่มเชื้อ *A. nidulans* ได้เหมือนกัน แต่เมื่อจัดกลุ่มจากข้อมูลของยีน *tef-1 α* พบว่าเชื้อ *A. flavus* จำนวน 18 ตัวอย่าง ถูกจัดกลุ่มรวมกับ *A. fumigatus* ใน clade 5, กลุ่มของ *A. terreus* จำนวน 15 ตัวอย่าง ถูกจัดกลุ่มแยกออกมาเป็น clade 8, กลุ่มของ *A. niger* จำนวน 15 ตัวอย่าง ถูกจัดกลุ่มแยกออกมาเป็น clade 9 และกลุ่มของ *A. fumigatus* จำนวน 7 ตัวอย่าง ถูกจัดกลุ่มแยกออกไปเป็น clade 6 และ 7 เป็น *A. lentulus* และ *A. udagawae* ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีเชื้อทั้งหมด 165 ตัวอย่าง ที่มีผลการจัดกลุ่มจากทั้งสองตำแหน่งสอดคล้องกัน คิดเป็นร้อยละ 72 และมีจำนวน 63 ตัวอย่างที่มีผลการจัดกลุ่มแตกต่างกัน คิดเป็นร้อยละ 28 (ภาพที่ 48)



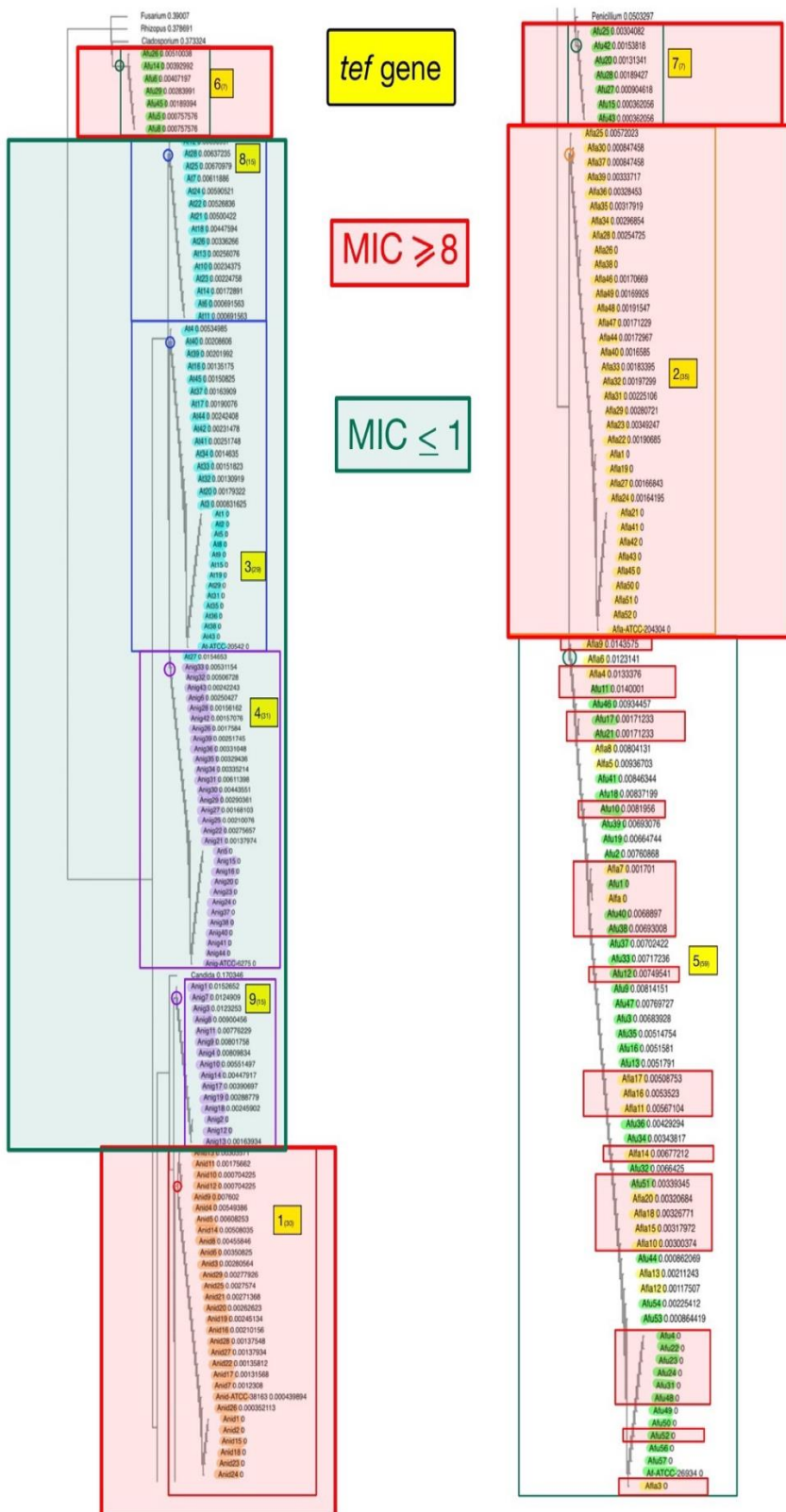
ภาพที่ 48 ผลความสอดคล้องของการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree จากบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α*

เมื่อพิจารณาผลการจำแนกเชื้อด้วย phylogenetic tree จากบริเวณ *its* ร่วมกับผลความไวรับต่อยา amphotericin B (ภาพที่ 49) ที่ค่า MIC น้อยกว่าเท่ากับ 1 พบว่าเชื้อใน clade ที่ 1 ทั้งหมด 30 ตัวอย่างมีค่า MIC mg/L มากกว่า 1 mg/L เชื้อใน clade ที่ 2 ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง มีค่า MIC mg/L มากกว่า 1 mg/L เชื้อใน clade ที่ 3 ทั้งหมด 45 ตัวอย่างมีค่า MIC น้อยกว่าเท่ากับ 1 mg/L เชื้อใน clade ที่ 4 ทั้งหมด 45 ตัวอย่างมีค่า MIC น้อยกว่าเท่ากับ 1 mg/L และเชื้อใน clade ที่ 5 ทั้งหมด 55 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่า 1 mg/L และที่ค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 8 พบว่าเชื้อใน clade ที่ 1 ทั้งหมด 30 ตัวอย่างมีค่า MIC mg/L มากกว่าเท่ากับ 8 mg/L เชื้อใน clade ที่ 2 ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง มีจำนวน 50 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่าเท่ากับ 8 mg/L มีจำนวน 3 ตัวอย่าง มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 mg/L เชื้อใน clade ที่ 3 ทั้งหมด 45 ตัวอย่างมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 mg/L เชื้อใน clade ที่ 4 ทั้งหมด 45 ตัวอย่างมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 mg/L และเชื้อใน clade ที่ 5 ทั้งหมด 55 ตัวอย่าง มีจำนวน 30 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่าเท่ากับ 8 mg/L มีจำนวน 25 ตัวอย่าง มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 mg/L



ภาพที่ 49 phylogenetic tree จากบริเวณ *its* ร่วมกับผลความไวรับต่อยา amphotericin B

เมื่อพิจารณาผลการจำแนกเชื้อด้วย phylogenetic tree จากยีน *tef-1 α* ร่วมกับผลความไวรับต่อยา amphotericin B (ภาพที่ 50) ที่ค่า MIC น้อยกว่าเท่ากับ 1 พบว่าเชื้อใน clade ที่ 1 ทั้งหมด 30 ตัวอย่างมีค่า MIC มากกว่า 1 mg/L เชื้อใน clade ที่ 2 ทั้งหมด 35 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่า 1 mg/L เชื้อใน clade ที่ 3 ทั้งหมด 29 ตัวอย่างมีค่า MIC น้อยกว่าเท่ากับ 1 mg/L เชื้อใน clade ที่ 4 ทั้งหมด 31 ตัวอย่างมีค่า MIC น้อยกว่าเท่ากับ 1 mg/L เชื้อใน clade ที่ 5 ทั้งหมด 59 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่า 1 mg/L เชื้อใน clade ที่ 6 ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่า 1 mg/L เชื้อใน clade ที่ 7 ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่า 1 mg/L เชื้อใน clade ที่ 8 ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง มีค่า MIC น้อยกว่าเท่ากับ 1 mg/L และเชื้อใน clade ที่ 9 ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง มีค่า MIC น้อยกว่าเท่ากับ 1 mg/L และที่ค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 8 พบว่าเชื้อใน clade ที่ 1 ทั้งหมด 30 ตัวอย่างมีค่า MIC mg/L มากกว่าเท่ากับ 8 mg/L เชื้อใน clade ที่ 2 ทั้งหมด 35 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่าเท่ากับ 8 mg/L เชื้อใน clade ที่ 3 ทั้งหมด 29 ตัวอย่างมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 mg/L เชื้อใน clade ที่ 4 ทั้งหมด 31 ตัวอย่างมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 mg/L เชื้อใน clade ที่ 5 ทั้งหมด 59 ตัวอย่าง มีจำนวน 29 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่าเท่ากับ 8 mg/ และจำนวน 30 ตัวอย่าง มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 mg/L เชื้อใน clade ที่ 6 ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่าเท่ากับ 8 mg/L เชื้อใน clade ที่ 7 ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง มีค่า MIC มากกว่าเท่ากับ 8 mg/L เชื้อใน clade ที่ 8 ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 mg/L และเชื้อใน clade ที่ 9 ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 mg/L



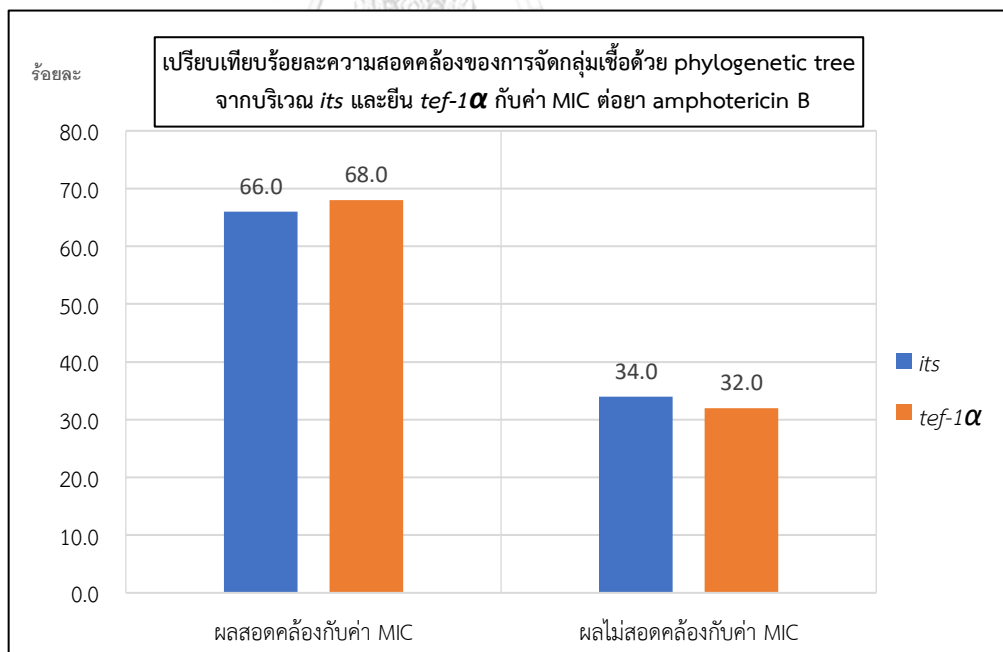
ภาพที่ 50 phylogenetic tree จากยีน *tef-1α* ร่วมกับผลความไวรับต่อยา amphotericin B

ตารางที่ 18 สรุปผลการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree จากบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* กับค่า MIC ยา amphotericin B

Phylogenetic tree clade	<i>its</i> (จำนวนตัวอย่าง)		<i>tef-1α</i> (จำนวนตัวอย่าง)		<i>its</i> (primary barcode) + <i>tef-1α</i> (secondary barcode) (จำนวนตัวอย่าง)	
	MIC \leq 1	MIC \geq 8	MIC \leq 1	MIC \geq 8	MIC \leq 1	MIC \geq 8
clade 1 <i>A. nidulans</i> (MIC \geq 8) (Rath, 1998)	-	30	-	30		
clade 2 <i>A. flavus</i> (MIC \geq 8) (Rath, 1998)	3	50	-	35		
clade 3 <i>A. terreus</i> (MIC \geq 8) (Iwan, 1998)	45	-	29	-		
clade 4 <i>A. niger</i> (MIC \leq 1) (Rath, 1998)	45	-	31	-		
clade 5 <i>A. fumigatus</i> (MIC \leq 1) (Rath, 1998)	25	30	30	29	25	16
clade 6 <i>A. lentulus</i> (MIC \geq 8) (Lamoth, 2016)	-	-	-	7	-	7
clade 7 <i>A. udagawae</i> (MIC \geq 8) (Lamoth, 2016)	-	-	-	7	-	7
clade 8 <i>A. terreus</i> (MIC \geq 8) (Iwan, 1998)	-	-	15	-		
clade 9 <i>A. niger</i> (MIC \leq 1) (Rath, 1998)	-	-	15	-		
รวม	118	110	120	108	25	30

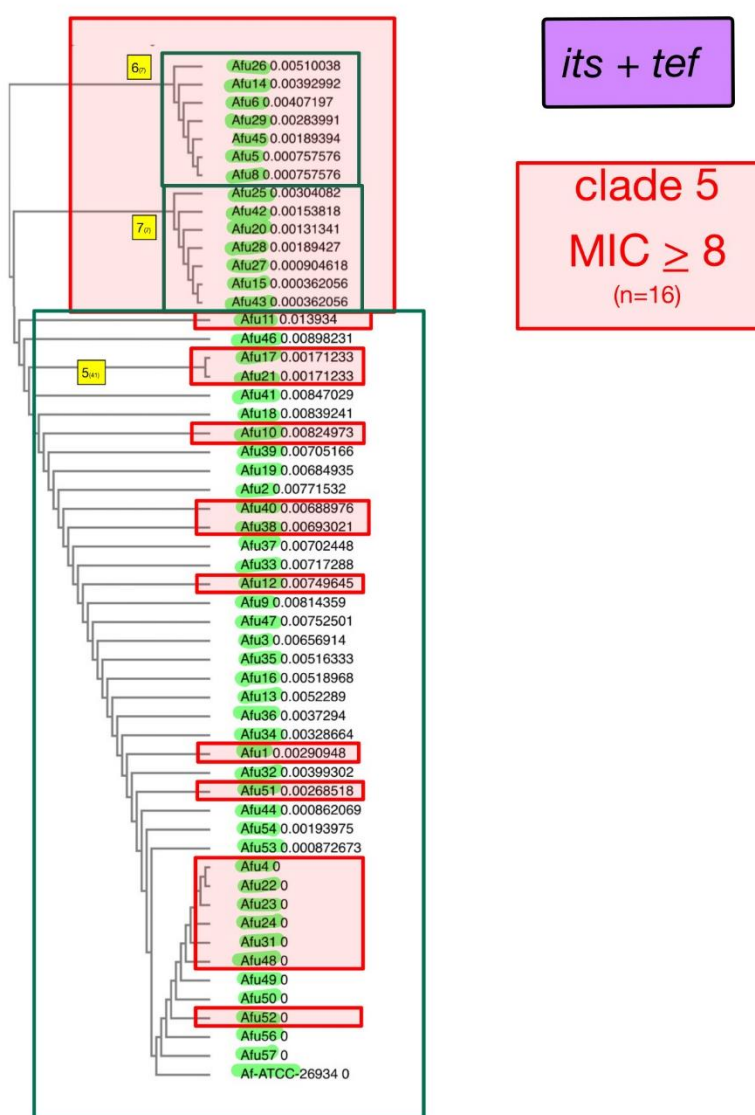
จากข้อมูลการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree จากบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* กับค่า MIC ยา amphotericin B (ตารางที่ 18) พบว่าใน clade 1 มีค่า MIC \geq 8 mg/L สอดคล้องกับสายพันธุ์ของเชื้อ *A. nidulans* ที่มีค่า MIC ต่อยา amphotericin B 16 mg/L (7) clade 2 เป็นเชื้อ *A. flavus* มีค่า MIC 16 mg/L (7) พบว่าบริเวณ *its* มีจำนวน 50 ตัวอย่างที่ค่า MIC \geq 8 mg/L และ 3 ตัวอย่าง ที่ค่า MIC \leq 1 mg/L ในขณะที่ยีน *tef-1 α* มีจำนวน 35 ตัวอย่างที่ค่า MIC \geq 8 mg/L clade 3 เป็นเชื้อ *A. terreus* มีค่า MIC 16 mg/L (8) พบว่าบริเวณ *its* มีจำนวน 45 ตัวอย่างที่ค่า MIC \leq 1 mg/L ในขณะที่ยีน *tef-1 α* มีจำนวน 29 ตัวอย่างที่ค่า MIC \leq 1 mg/L clade 4 เป็นเชื้อ *A. niger* มีค่า MIC 0.5 mg/L (7) พบว่าบริเวณ *its* มีจำนวน 45 ตัวอย่างที่ค่า MIC \leq 1 mg/L ในขณะที่ยีน *tef-1 α* มีจำนวน 31 ตัวอย่างที่ค่า MIC \leq 1 mg/L clade 5 เป็นเชื้อ *A. fumigatus* มีค่า MIC 0.5 mg/L (7) พบว่าบริเวณ *its* มีจำนวน 25 ตัวอย่างที่ค่า MIC \leq 1 mg/L และมีจำนวน 30

ตัวอย่างที่ค่า MIC ≥ 8 mg/L ในขณะที่ยีน *tef-1 α* มีจำนวน 30 ตัวอย่างที่ค่า MIC ≤ 1 mg/L และมีจำนวน 29 ตัวอย่างที่ค่า MIC ≥ 8 mg/L clade 6 เป็นเชื้อ *A. lentulus* มีค่า MIC 16 mg/L (109) พบว่าบริเวณ *its* ไม่พบเชื้อสปีชีส์นี้แต่ถูกจัดกลุ่มรวมกับ *A. fumigatus* ใน clade 5 ในขณะที่ยีน *tef-1 α* มีจำนวน 7 ตัวอย่างที่ค่า MIC ≥ 8 mg/L clade 7 เป็นเชื้อ *A. udagawae* มีค่า MIC 16 mg/L (109) พบว่าบริเวณ *its* ไม่พบเชื้อสปีชีส์นี้แต่ถูกจัดกลุ่มรวมกับ *A. fumigatus* ใน clade 5 ในขณะที่ยีน *tef-1 α* มีจำนวน 7 ตัวอย่างที่ค่า MIC ≥ 8 mg/L clade 8 เป็นเชื้อ *A. terreus* มีค่า MIC 16 mg/L (8) พบว่าบริเวณ *its* จัดกลุ่มรวมอยู่ใน clade 3 ในขณะที่ยีน *tef-1 α* มีจำนวน 15 ตัวอย่างที่ค่า MIC ≤ 1 mg/L และ clade 9 เป็นเชื้อ *A. niger* มีค่า MIC 0.5 mg/L (7) พบว่าบริเวณ *its* จัดกลุ่มรวมอยู่ใน clade 4 ในขณะที่ยีน *tef-1 α* มีจำนวน 15 ตัวอย่างที่ค่า MIC ≤ 1 mg/L จากผลการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree โดยใช้ข้อมูลบริเวณ *its* พบว่ามีความสอดคล้องกับค่า MIC ต่อยา amphotericin B ของแต่ละสายพันธุ์อยู่จำนวน 150 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66 ไม่สอดคล้องกับค่า MIC ต่อยา amphotericin B ของแต่ละสายพันธุ์อยู่จำนวน 78 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 34 ในขณะที่การจัดกลุ่มเชื้อจากข้อมูลบริเวณ *tef-1 α* พบว่ามีความสอดคล้องกับค่า MIC ต่อยา amphotericin B ของแต่ละสายพันธุ์อยู่จำนวน 154 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 68 ไม่สอดคล้องกับค่า MIC ต่อยา amphotericin B ของแต่ละสายพันธุ์อยู่จำนวน 74 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 32 (ภาพที่ 51)



ภาพที่ 51 เปรียบเทียบร้อยละความสอดคล้องของการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree จากบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* กับค่า MIC ต่อยา amphotericin B

จากข้อมูลในตารางที่ 18 จะพบว่า clade ที่มีความหลากหลายของค่า MIC คือ clade 5 *A. fumigatus* โดยการใช้บริเวณ *its* ตำแหน่งเดียวในการจัดกลุ่มจะพบว่ามีความสอดคล้องกับค่า MIC คิดเป็นร้อยละ 45 และการใช้ยีน *tef-1 α* ตำแหน่งเดียวในการจัดกลุ่มจะพบว่ามีความสอดคล้องกับค่า MIC คิดเป็นร้อยละ 51 ซึ่งหากพิจารณาว่าบริเวณ *its* มาใช้เป็น primary barcode ในการจัดกลุ่มร่วมกับยีน *tef-1 α* หรือ secondary barcode จะช่วยเพิ่มความสามารถในการจัดกลุ่มเชื้อได้สอดคล้องกับค่า MIC ของยา amphotericin B เป็นร้อยละ 71 (ภาพที่ 52)



ภาพที่ 52 phylogenetic tree ของ clade 5 เมื่อนำมาจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากบริเวณ *its* เป็น primary barcode และใช้ข้อมูลจากยีน *tef-1 α* เป็น secondary barcode โดยเชื้อ *A. lentulus* และ *A. udagawae* ถูกจัดกลุ่มใหม่เป็น clade 6 และ 7 ตามลำดับ และมีความสอดคล้องกับค่า MIC \geq 8

12. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์

นำข้อมูลการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson Chi-Square ได้ข้อมูลดังแสดงในตาราง (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson Chi-Square

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson Chi-Square	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
การจำแนกเชื้อ <i>Aspergillus</i> ในระดับสปีชีส์ โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลของยีน <i>tef-1α</i> และ ข้อมูลที่ทดสอบในบริเวณ <i>its</i>	796.530a	32	<.001
ผลความไวรับต่อยา amphotericin B cut-off MIC < 1 และ การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i>	168.853	8	<.001
ผลความไวรับต่อยา amphotericin B cut-off MIC > 8 และ การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i>	228.000a	8	<.001
ผลความไวรับต่อยา amphotericin B cut-off MIC < 1 และ การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i>	155.140a	4	<.001
ผลความไวรับต่อยา amphotericin B cut-off MIC > 8 และ การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i>	228.000a	4	<.001
การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ด้วยวิธี cultivation และ การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>tef-1α</i>	796.530a	32	<.001
การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> ด้วยวิธี cultivation และ การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ <i>Aspergillus</i> โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ <i>its</i>	912.000a	16	<.001

จากตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* ด้วยสถิติ Pearson Chi-square ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 พบว่ามีค่า $P < .001$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญ (0.05) จึงปฏิเสธ H_0 ยอมรับ H_1 คือ การจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ในระดับสปีชีส์ โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลของยีน *tef-1 α* มีความสัมพันธ์ กับข้อมูลที่ทดสอบในบริเวณ *its*

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B ที่ cut-off MIC

1 และ 8 ด้วยสถิติ Pearson Chi-square ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 พบว่ามีค่า $P < .001$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญ (0.05) จึงปฏิเสธ H_0 ยอมรับ H_1 คือ ผลความไวรับต่อยา amphotericin B cut-off MIC ≤ 1 และ ≥ 8 **มีความสัมพันธ์** กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α*

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมบริเวณ *its* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B ที่ cut-off MIC 1 และ 8 ด้วยสถิติ Pearson Chi-square ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 พบว่ามีค่า $P < .001$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญ (0.05) จึงปฏิเสธ H_0 ยอมรับ H_1 คือ ผลความไวรับต่อยา amphotericin B cut-off MIC ≤ 1 และ ≥ 8 **มีความสัมพันธ์** กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its*

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยสถิติ Pearson Chi-square ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 พบว่ามีค่า $P < .001$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญ (0.05) จึงปฏิเสธ H_0 ยอมรับ H_1 คือ การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ด้วยวิธี cultivation **มีความสัมพันธ์** กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α*

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และลักษณะทางมหสังฐานและจุลสังฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) ด้วยสถิติ Pearson Chi-square ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 พบว่ามีค่า $P < .001$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญ (0.05) จึงปฏิเสธ H_0 ยอมรับ H_1 คือ การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ด้วยวิธี cultivation **มีความสัมพันธ์** กับการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* โดย phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its*

13. ผลการคำนวณค่า discriminatory power (D)

เชื้อกลุ่มที่ผลการจำแนกต่างกันเมื่อจัดกลุ่มโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α* พบว่าเชื้อเหล่านี้ยังคงถูกจัดอยู่ใน main branch ของ phylogenetic tree เดียวกัน แต่ phylogenetic tree ของยีน *tef-1 α* ให้ผลการจำแนกในระดับกลุ่มย่อยที่ละเอียดกว่า โดยเมื่อจัดกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *tef-1 α* เชื้อที่ถูกจัดอยู่ใน main Branch จะถูกแยกออกเป็น sub-Branch ซึ่งสอดคล้องกับผลการคำนวณค่า discrimination power โดยใช้สูตรในการคำนวณดังกล่าว เพื่อหาประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อของบริเวณ *its* และ *tef-1 α* พบว่าบริเวณ *its* มีค่า discrimination power เท่ากับ 0.796 และยีน *tef-1 α* ให้ค่า discrimination power เท่ากับ 0.8461 จึงบ่งบอกว่ายีน *tef-1 α* มีความสามารถในการจำแนกเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* ได้ดีกว่าสารพันธุกรรมบริเวณ *its*

14. ผลการวิเคราะห์ร้อยละความคล้าย (%similarity)

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ *its* ระหว่างเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์ บนฐานข้อมูล NCBI และวิเคราะห์ค่า %similarity พบว่ามีค่า query cover อยู่ระหว่างร้อยละ

ละ 55-100 และมีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 81.4-99.62 โดยพบว่าเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดคือเชื้อ *A. udagawae* และ *A. lentulus* มีความคล้ายคลึงกับ *A. fumigatus* ร้อยละ 99.62 และ 99.43 ตามลำดับ และมีความคล้ายกันเองในสองสายพันธุ์นี้อยู่ที่ร้อยละ 99.43 และเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันน้อยที่สุดคือเชื้อ *A. terreus* และ *A. nidulans* โดยมีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 80.95 และมีค่า query cover เพียงร้อยละ 66 (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ค่า %similarity จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ *its* ของเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์

<i>its</i>	<i>A. flavus</i> ATCC 204304	<i>A. fumigatus</i> ATCC 269344	<i>A. nidulans</i> ATCC 38163	<i>A. niger</i> ATCC 6275	<i>A. terreus</i> ATCC 20542	<i>A. udagawae</i> (<i>A. fumigatus</i> No.15)	<i>A. lentulus</i> (<i>A. fumigatus</i> No.26)
Strain	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)
<i>A. flavus</i> ATCC 204304							
<i>A. fumigatus</i> ATCC 269344	89.17% (88%)						
<i>A. nidulans</i> ATCC 38163	81.4% (55%)	83.68% (73%)					
<i>A. niger</i> ATCC 6275	90.28% (94%)	92.72% (96%)	87.62% (74%)				
<i>A. terreus</i> ATCC 20542	88.32% (86%)	90.1% (99%)	80.95% (66%)	92.13% (80%)			
<i>A. udagawae</i> (<i>A. fumigatus</i> No.15)	88.66% (92%)	99.62% (100%)	81.99% (71%)	92.72% (88%)	89.35% (94%)		
<i>A. lentulus</i> (<i>A. fumigatus</i> No.26)	88.66% (92%)	99.43% (100%)	81.8% (71%)	92.72% (88%)	91.57% (94%)	99.43% (100%)	

NA-No significant similarity found

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *tef-1 α* ระหว่างเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์ บนฐานข้อมูล NCBI และวิเคราะห์ค่า %similarity พบว่ามีค่า query cover อยู่ระหว่างร้อยละ 40-100 และมีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 90-99.48 โดยพบว่าเชื้อที่มีค่า

%similarity สูงที่สุดคือ *A. fumigatus* กับ *A. flavus* โดยมี %similarity อยู่ที่ร้อยละ 99.48 เชื้ออีกคู่ที่มีค่า %similarity สูงคือ *A. terreus* กับ *A. niger* มี %similarity อยู่ที่ร้อยละ 99.45 และเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันน้อยที่สุดคือเชื้อ *A. lentulus* โดยไม่พบตำแหน่งที่มีความคล้ายกันอย่างมีนัยสำคัญตามเกณฑ์การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายกันอย่างมาก (Megablast) (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์ค่า %similarity จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *tef-1 α* ของเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์

<i>tef-1α</i>	<i>A. flavus</i> ATCC 204304	<i>A. fumigatus</i> ATCC 269344	<i>A. nidulans</i> ATCC 38163	<i>A. niger</i> ATCC 6275	<i>A. terreus</i> ATCC 20542	<i>A. udagawae</i> (<i>A. fumigatus</i> No.15)	<i>A. lentulus</i> (<i>A. fumigatus</i> No.26)
Strain	%similarity (Query cover)	%similarity (Query cover)	%similarity (Query cover)	%similarity (Query cover)	%similarity (Query cover)	%similarity (Query cover)	%similarity (Query cover)
<i>A. flavus</i> ATCC 204304							
<i>A. fumigatus</i> ATCC 269344	99.48% (100%)						
<i>A. nidulans</i> ATCC 38163	90.00% (80%)	90.52% (80%)					
<i>A. niger</i> ATCC 6275	91.62% (77%)	92.16% (70%)	92.12% (89%)				
<i>A. terreus</i> ATCC 20542	92.16% (77%)	92.69% (77%)	92.30% (89%)	99.45% (99%)			
<i>A. udagawae</i> (<i>A. fumigatus</i> No.15)	91.65% (40%)	92.18% (40%)	93.43% (91%)	92.88% (89%)	93.36% (89%)		
<i>A. lentulus</i> (<i>A. fumigatus</i> No.26)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	

NA-No significant similarity found

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ *its* ระหว่างเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์ กับเชื้อก่อโรคสายพันธุ์อื่นๆ บนฐานข้อมูล NCBI และวิเคราะห์ค่า %similarity พบว่ามีค่า query cover อยู่ระหว่างร้อยละ 7-94 และมีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 81.51-93.98 โดยพบว่าเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดคือเชื้อ *Histoplasma* spp. ATCC 26032 และ *A. niger* ATCC 6275 โดยมีค่า query cover ร้อยละ 94 และมีค่า percent identity ร้อยละ 81.51

และเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันน้อยที่สุดคือ *Pythium insidiosum* ATCC 56843 กับเชื้อ *A.nidulans* ที่พบว่ามียาค่า query cover เพียงร้อยละ 7 และในเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์อื่นๆ ไม่พบตำแหน่งที่มีความคล้ายกันอย่างมีนัยสำคัญตามเกณฑ์การเปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายกันอย่างมาก (Megablast) (ตารางที่ 22)

ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ค่า %similarity จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ *its* ของเชื้อราก่อโรคสายพันธุ์อื่นกับเชื้อ *Aspergillus*

<i>its</i>	<i>A. flavus</i> ATCC 204304	<i>A. fumigatus</i> ATCC 269344	<i>A. nidulans</i> ATCC 38163	<i>A. niger</i> ATCC 6275	<i>A. terreus</i> ATCC 20542
Strain	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	88.83% (41%)	90.32% (37%)	NA	89.89% (36%)	89.89% (30%)
<i>C. neoformans</i> ATCC 32045	89.94% (30%)	92.45% (27%)	90.51% (37%)	91.19% (32%)	91.19% (27%)
<i>Pythium insidiosum</i> ATCC 56843	NA	NA	90.00% (7%)	NA	NA
<i>Histoplasma spp.</i> ATCC 26032	83.08% (86%)	83.23% (78%)	87.94% (56%)	81.51% (94%)	82.17% (80%)
<i>Cladosporium spp.</i> ATCC 16022	93.98% (32%)	90.45% (46%)	92.02% (45%)	89.95% (45%)	89.19% (46%)
<i>Rhizopus spp.</i> ATCC 52369	NA	NA	90.74% (19%)	91.67% (22%)	91.67% (18%)
<i>Penicillium spp.</i> ATCC 10106	88.74% (88%)	92.19% (79%)	91.67% (49%)	88.48% (84%)	88.64% (77%)
<i>Scedosporium spp.</i> ATCC 204059	91.36% (31%)	93.83% (28%)	91.36% (29%)	92.59% (33%)	92.59% (27%)
<i>Fusarium spp.</i> ATCC 60289	90.96% (32%)	92.05% (30%)	89.62% (42%)	90.61% (37%)	90.61% (31%)

NA-No significant similarity found

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *tef-1 α* ระหว่างเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์ กับเชื้อก่อโรคสายพันธุ์อื่นๆ บนฐานข้อมูล NCBI และวิเคราะห์ค่า %similarity พบว่ามีค่า query cover อยู่ระหว่างร้อยละ 91-100 และมีค่า percent identity อยู่ระหว่างร้อยละ 89.52-91.47 โดยพบว่าเชื้อที่มีค่า %similarity สูงที่สุดคือ *Penicillium spp.* ATCC 10106 กับ *A. udagawae* โดยมี %similarity อยู่ที่ร้อยละ 91.47 และในเชื้ออื่นๆ ไม่พบตำแหน่งที่มีความ

คล้ายกันอย่างมีนัยสำคัญตามเกณฑ์การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายกันอย่างมาก (Megablast) (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 23 ผลการวิเคราะห์ค่า %similarity จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *tef-1 α* ของเชื้อรา ก่อโรคสายพันธุ์อื่นกับเชื้อ *Aspergillus*

<i>tef-1α</i>	<i>A. flavus</i> ATCC 204304	<i>A. fumigatus</i> ATCC 269344	<i>A. nidulans</i> ATCC 38163	<i>A. niger</i> ATCC 6275	<i>A. terreus</i> ATCC 20542	<i>A. lentulus</i> (<i>A. fumigatus</i> No.26)	<i>A. udagawae</i> (<i>A. fumigatus</i> No.15)
Strain	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)	%similarity (Query cover%)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Cladosporium</i> spp. ATCC 16022	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Rhizopus</i> spp. ATCC 52369	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Penicillium</i> spp. ATCC 10106	89.86% (94%)	89.52% (96%)	90.06% (91%)	91.02% (88%)	91.05% (88%)	NA	91.47% (98%)
<i>Fusarium</i> spp. ATCC 60289	NA	NA	NA	NA	NA	NA	90.78% (100%)

NA-No significant similarity found

ข้อมูลความเหมือนของเชื้อในกลุ่ม *A. fumigatus* หรือเชื้อใน clade ที่ 5 ของยีน *tef-1 α* ด้วยโปรแกรม bioedit พบว่าเชื้อที่มีความเหมือนกันร้อยละ 100 คือเชื้อ *A. fumigatus* หมายเลข 4, 22, 23, 24, 31, 48 และ 57 มีผลการเปรียบเทียบค่าความเหมือน เท่ากับ 1 และเชื้อที่มีค่าความเหมือน ตั้งแต่ 0.9 ขึ้นไปจะถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกัน จึงมีเชื้อถูกแบ่งกลุ่มเป็น 3 กลุ่ม คือ หมายเลข 5, 6, 8, 14, 26, 29 และ 45 ถูกจัดกลุ่มอยู่บน clade 6 และมีผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อ *A. lentulus* มากที่สุด กลุ่มหมายเลข 15, 20, 25, 27, 28, 42 และ 43 ถูกจัดกลุ่มอยู่บน clade 7 และมีผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อ *A. udagawae* มากที่สุด และความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *A. fumigatus* ATCC 269344, *A. lentulus* และ *A. udagawae* ที่วิเคราะห์จากโปรแกรม bioedit พบว่าเชื้อ *A. fumigatus* ATCC 269344 มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก *A. lentulus* จำนวน 1, 236

ตำแหน่ง และต่างจาก *A. udagawae* 1, 198 ตำแหน่ง โดยระหว่างเชื้อ *A. lentulus* และ *A. udagawae* มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 982 ตำแหน่ง

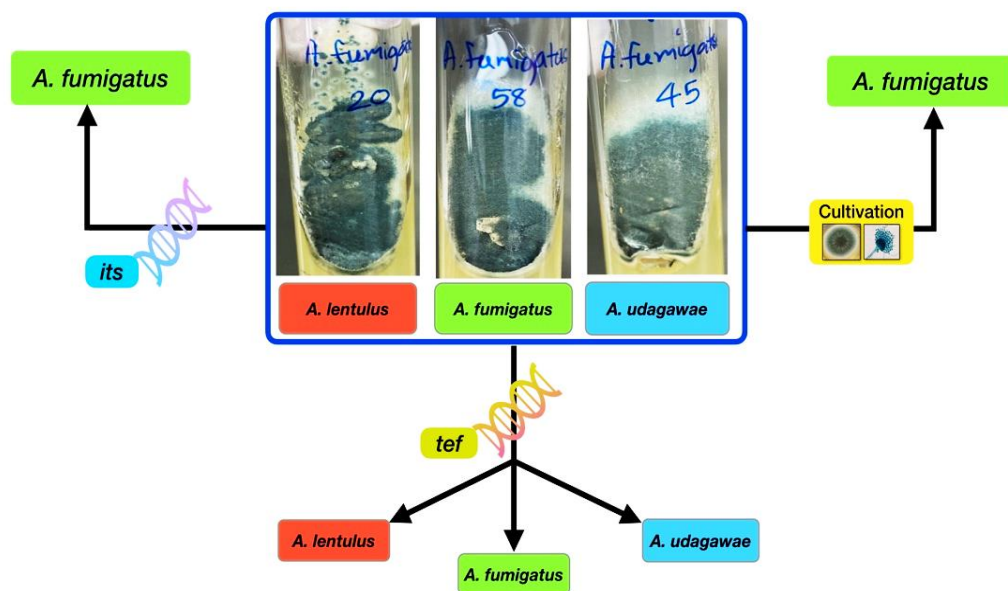
เปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ภายใน clade เดียวกัน พบว่าในบริเวณ *its* มีความแตกต่างกันภายในสายพันธุ์น้อยกว่ายีน *tef-1 α* โดยการจำแนกด้วยบริเวณ *its* พบว่า clade ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันภายใน clade เดียวกันมากที่สุดโดยเฉลี่ย 18 นิวคลีโอไทด์ คือ clade 4 มีผลการ blast กับ NCBI ตรงกับเชื้อ *A. niger* และพบว่า clade ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันภายใน clade เดียวกันน้อยที่สุดโดยเฉลี่ย 2 นิวคลีโอไทด์ คือ clade 2 ที่มีผลการ blast กับ NCBI ตรงกับเชื้อ *A. flavus* ส่วนการจำแนกด้วยยีน *tef-1 α* พบว่า clade ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันภายใน clade เดียวกันมากที่สุดโดยเฉลี่ย 180 นิวคลีโอไทด์ คือ clade 5 ที่มีผลการ blast กับ NCBI ตรงกับเชื้อ *A. fumigatus* และพบว่า clade ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันภายใน clade เดียวกันน้อยที่สุดโดยเฉลี่ย 8 นิวคลีโอไทด์ คือ clade 1 ที่มีผลการ blast กับ NCBI ตรงกับเชื้อ *A. nidulans* (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 เปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ภายใน clade เดียวกันของเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม bioedit

clade	blast NCBI Result	จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันภายใน clade เดียวกันเฉลี่ย	
		<i>its</i>	<i>tef-1α</i>
1	<i>A. nidulans</i>	4	8
2	<i>A. flavus</i>	2	16
3	<i>A. terreus</i>	3	17
4	<i>A. niger</i>	18	57
5	<i>A. fumigatus</i>	4	180
6	<i>A. udagawae</i>	-	9
7	<i>A. lentulus</i>	-	9
8	<i>A. terreus</i>	-	9
9	<i>A. niger</i>	-	11

จากข้อมูลการวิเคราะห์ค่า %similarity จากบริเวณ *its* ของเชื้อ *A. fumigatus*, *A. lentulus* และ *A. udagawae* พบว่ามีค่ามากกว่าร้อยละ 99 ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันภายใน clade ที่ 5 ของ *A. fumigatus* ที่มีความแตกต่างกันเพียงแค่ 4 นิวคลีโอไทด์ และเช่นเดียวกันกับผลการทดสอบด้วยวิธี cultivation ที่พบว่าเชื้อมีลักษณะทางมหัศจรรย์และจุลสังเคราะห์คล้ายกัน ทำให้การจำแนกเชื้อทั้งสองวิธีไม่สามารถแยกกลุ่มเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ออกจากกันได้ ในทางตรงกันข้ามข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *tef-1 α* พบว่ามี %similarity ระหว่างเชื้อ

A. fumigatus และ *A. udagawae* อยู่ที่ 92.18 ในขณะที่เชื้อ *A. lentulus* เหมือนกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ทำให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มาจากยีน *tef-1 α* สามารถนำมาจำแนกเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ออกจากกันได้ (ภาพที่ 53)



ภาพที่ 53 ภาพแสดงลักษณะทางมหสังฐานของเชื้อ *A. fumigatus* (ตัวอย่าง *A. fumigatus* หมายเลข 58 ATCC26934), *A. lentulus* (ตัวอย่าง *A. fumigatus* หมายเลข 20) และ *A. udagawae* (ตัวอย่าง *A. fumigatus* หมายเลข 45) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

โรค aspergillosis เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* ที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติ เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะประมาณร้อยละ 3-4 หรือในกลุ่มของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวประมาณร้อยละ 13.5 มักพบว่าการติดเชื้อ aspergillosis ชนิดลูกกลม (18) ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้เป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีความอ่อนแอจากตัวโรคอยู่ก่อนแล้วเมื่อมีการติดเชื้อร่วมด้วยจึงส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการแย่งหรือมีอัตราการเสียชีวิตค่อนข้างสูง และพบว่ามีระยะเวลาในการดำเนินโรคเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (2) นอกจากนี้ยังมียังมีลักษณะของ species-specific susceptibility profile คือ มีลักษณะความไวรับต่อยาที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (6) ดังนั้นการวินิจฉัยโรค aspergillosis ให้ได้รวดเร็วและหาสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุได้อย่างถูกต้องจะช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาได้อย่างรวดเร็วและเหมาะสมกับสายพันธุ์ของเชื้อ ซึ่งจะช่วยให้อัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยได้

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรค aspergillosis สามารถทำได้หลายวิธีตามแนวทางของ infectious diseases society of america (IDSA) เช่น การตรวจทางรังสีเพื่อดูก้อนในอวัยวะ การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาเพื่อหาสารชีวภาพที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อ หรือการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน เช่น การตรวจทางรังสีอาจให้ผลที่ไม่ชัดเจนทำให้ต้องมีการตัดชิ้นเนื้อเพื่อนำมาตรวจเพิ่มเติม ซึ่งอาจทำให้เกิดอาการแทรกซ้อนในภายหลังได้ (55) หรือการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาที่ถึงแม้ว่าจะให้ความไวที่สูง ได้ผลภายในเวลาอันรวดเร็วแต่มีความจำเพาะกับการติดเชื้อต่ำและไม่สามารถจำแนกเชื้อในระดับสายพันธุ์ได้ (62) หรือวิธี cultivation ที่ปัจจุบันใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยถึงระดับสายพันธุ์ของเชื้อ แต่เป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาและไม่สามารถจำแนกเชื้อสายพันธุ์ที่เป็นกลุ่มของ complex ได้เนื่องจากมีลักษณะทางมหสังฐานที่คล้ายกัน ซึ่งในปัจจุบันตามแนวทางของ the european organization for research and treatment of cancer/ mycosis study group (EORTC/MSG) ได้ระบุให้ใช้ผลการทดสอบ PCR ในพลาสมา ซีรัม เลือดหรือ BAL ที่มีผลเป็นบวกกับเชื้อ *Aspergillus* ในการวินิจฉัยโรค aspergillosis แบบลูกกลมได้ (110) แต่ยังไม่มีความมาตรฐานที่ชัดเจนในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทาง PCR เช่น บริเวณยีนเป้าหมายหรือชุดไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมที่สุด (111) ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการในประเทศไทยที่ตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus* นิยมตรวจวิเคราะห์บริเวณ *its* ซึ่งมีข้อมูลจากงานวิจัยที่มีข้อมูลว่าบริเวณ *its* มีความคล้ายคลึงกันในการจำแนกเชื้อโดยเฉพาะในกลุ่มเชื้อที่มีสายพันธุ์ย่อยที่มีความใกล้เคียงกัน เช่น *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* และ *Trichoderma* (72, 73) ทำให้การจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ในสายพันธุ์ย่อยที่มีความคล้ายคลึงกันเป็น complex เช่น *A. fumigatus* complex ประกอบด้วย *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. fischeri*, *A. viridinutans*, *A. felis* และ *A. udagawae* (112) ซึ่งเชื้อบางสายพันธุ์ในกลุ่มนี้พบว่าการดื้อยาโดยกำเนิด เช่น *A. lentulus* และ *A. udagawae* ดื้อต่อยา azole และ amphotericin B โดยกำเนิด (12) การตรวจวิเคราะห์ที่ไม่สามารถจำแนกเชื้อกลุ่มนี้ออกจากกันได้จึงนำไปสู่การเลือกยาที่ไม่เหมาะสมกับสายพันธุ์ของเชื้อและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการรักษาไม่เท่าที่ควร ในภายหลังจึงมีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษายีนบริเวณอื่นที่มีความสามารถในการจำแนกเชื้อได้ดีกว่า คือ

บริเวณ protein coding gene ที่มีวิวัฒนาการที่เร็วกว่าบริเวณ *its* จึงมีความหลากหลายมากกว่า หรือทำให้มีค่า inter species variation ที่มากกว่าและส่งผลให้มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ละเอียดกว่า *its* (77) ในทางตรงกันข้ามยังพบว่าบริเวณนี้มีเพียงหนึ่งสำเนาบน DNA ของเชื้อรา จึงทำให้มีความแปรปรวนที่น้อยกว่าบริเวณ *its* ที่มีข้อมูลมาจากหลายสำเนาและมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ได้มากกว่า ส่งผลให้บริเวณ protein coding gene มีค่า intra species variation ที่น้อยกว่าบริเวณ *its* (78) ซึ่งได้มีงานวิจัยที่ทำการศึกษายีนที่อยู่ในบริเวณ protein coding gene หลายชนิด เช่น ยีน β -tubulin2 (*tub2*) , ยีน γ -actin (*act*), ยีน largest subunit of the RNA-polymerase II (*rpb2*), และยีน translation elongation factor 1- α (*tef-1\alpha*) และพบว่าประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อราหลายสายพันธุ์ได้ดีกว่า *its* (80)

การศึกษารุ่นนี้เลือกบริเวณยีน translation elongation factor 1- α (*tef-1\alpha*) มาใช้ในการจำแนกเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* ใช้เทคนิค real time PCR ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณยีน *tef-1\alpha* และใช้ไพรเมอร์จากงานวิจัยของ Meyer และคณะ (79) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค sanger sequencing และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้าง phylogenetic tree เพื่อจัดจำแนกกลุ่มเชื้อโดยการแบ่ง clade เปรียบเทียบข้อมูลกับผลการจำแนกเชื้อที่ได้จากบริเวณ *its* ซึ่งเป็นยีนที่ห้องปฏิบัติการตรวจยืนยันปัจจุบันใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้งานวิจัยของ White และคณะ (102) และเปรียบเทียบกับผลการจัดจำแนกกลุ่มเชื้อด้วยวิธี cultivation ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการจำแนกสายพันธุ์ด้วยยีนทั้งสองชนิดร่วมกับผลความไวรับต่อยา

วิธีที่ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรมในงานวิจัยครั้งนี้ คือ การสกัดตัวอย่างด้วยเครื่องสกัดอัตโนมัติ MagNA Pure 24 ที่มีการใช้ magnetic particles เข้ามาจับกับสารพันธุกรรมในขั้นตอนสุดท้ายและล้างสิ่งปนเปื้อนออกเพื่อช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์ จึงพบว่ามีตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่างหรือคิดเป็นเพียงร้อยละ 5 เท่านั้นจากตัวอย่างทั้งหมด 232 ตัวอย่าง ที่ได้ค่า OD_{260/280} น้อยกว่า 1.8 ซึ่งบ่งบอกถึงการปนเปื้อนของโปรตีนหรือเศษซากของเชื้อที่อาจส่งผลกระทบต่อ real time PCR ในขั้นตอนต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ตามในการสกัดตัวอย่างได้ความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่มีความแตกต่างกันอยู่ในช่วง 4-6,570 ng/ μ l ทำให้ต้องมีการเตรียมความเข้มข้นของสารพันธุกรรมให้เหมาะสมก่อนการนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป สาเหตุอาจเกิดจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนนำเข้าเครื่องสกัดตัวอย่าง เช่น ปริมาณเชื้อที่นำมาสกัดไม่เท่ากัน หรือมีการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาปริมาณมากจึงมารบกวนค่า pH ของน้ำยาสกัดตัวอย่างและส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการทำงานลดลง

ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในยีน *tef-1\alpha* ด้วยเทคนิค real time PCR คือ 40 ng/ μ l ใช้เชื้อ *A. fumigatus* หมายเลข 56 เป็นตัวแทนของเชื้อ *Aspergillus* ในการทดสอบ จากผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ 40, 60, 80 และ 100 ng/ μ l ให้ค่า Ct ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้เกิดผลผลิตของสารพันธุกรรมได้ เพื่อลดโอกาสที่จะเกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ในกรณีที่มีความเข้มข้นในปฏิกิริยาสูงเกินไป ซึ่งที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 40 ng/ μ l ในปฏิกิริยา real time PCR ที่

มีปริมาตรรวม 50 μl จะมีความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละเส้นอยู่เพียง 10 ng/ μl หรือ 0.1 μM เท่านั้น ในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ 40 ng/ μl ในการทำปฏิกิริยาของ *tef-1 α* ไพรเมอร์ และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณของ DNA ที่เหมาะสมคือ 20 ng ในปฏิกิริยา real time PCR โดยการใช้ DNA ความเข้มข้น 10 ng/ μl ปริมาตร 10 ng/ μl ต่อปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวม 50 μl จากงานวิจัยของ Stielow และคณะได้ทำการศึกษาหาฮัยนและไพรเมอร์ ที่มีความเหมาะสมในการเป็น Secondary barcode เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อราจาก Primary Barcode ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละเส้นที่ 0.5 μM และ DNA ปริมาณ 0.1 ng ที่ปริมาตรรวม 20 μl (80) งานวิจัยของ Nouripour และคณะใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละเส้นที่ 0.4 μM (13) เนื่องจากการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค real time PCR และเป็นการใช้ชุดน้ำยา Master Mix จึงทำให้สัดส่วนความเข้มข้นของไพรเมอร์และปริมาณ DNA ที่เหมาะสมแตกต่างจากงานวิจัยในอดีตที่ใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *its* พบว่ามีจำนวน 107 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 46 ได้ค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 ในขณะที่ไพรเมอร์ *tef-1 α* พบว่ามีจำนวน 27 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12 เท่านั้น ที่มีค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการที่บริเวณ *its* มีหลายสำเนาบน DNA ของเชื้อราจึงสามารถเพิ่มปริมาณได้ง่ายกว่ายีน *tef-1 α* ที่พบว่ามีเพียงสำเนาเดียว จึงส่งผลให้การทำ real time PCR บนยีน *tef-1 α* มีค่า Ct ที่สูงกว่า อย่างไรก็ตามในงานวิจัยครั้งนี้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ *its* ด้วยไพรเมอร์ *its1* และ *its4* และยีน *tef-1 α* ด้วยไพรเมอร์ A133F และ A133R ได้ทุกตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละความสำเร็จในการทำ real time PCR อยู่ที่ร้อยละ 100

การทำ sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีบางตัวอย่างไม่มีผล sequencing เช่น เชื้อ *A. fumigatus* No.7, *A. fumigatus* No.30, *A. fumigatus* No.55 และ *A. terreus* No.30 สาเหตุอาจเกิดจากปริมาณของผลผลิต PCR น้อยกว่า 20 μl หรืออาจมีความเข้มข้นของ DNA น้อยกว่า 40 ng/ μl ตามที่บริษัท Ward medic กำหนดไว้ (103) ทำให้ไม่สามารถทำการทดสอบได้ หรืออาจมีการปนเปื้อนจากสารพันธุกรรมอื่นๆ และทำให้ได้กราฟการอ่านลำดับเบสไม่ชัดเจนทำให้ไม่สามารถแปลผลการทดสอบ sequencing ได้ จึงไม่มีการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างดังกล่าวและตัดตัวอย่างกลุ่มนี้ออกจากการเปรียบเทียบข้อมูลการจัดกลุ่มเชื้อระหว่างบริเวณ *its* และยีน *tef-1 α*

เชื้อ *Aspergillus* สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น sections *Flavi*, *Fumigati*, *Nigri*, *Udagawae*, *Circumdati*, *Versicolor*, *Usti*, *Terrei*, และ *Emericella* โดยร้อยละ 95 ของเชื้อที่ก่อโรคในมนุษย์ อยู่ใน sections *Flavi*, *Nigri* และ *Fumigati* (113) โดยเชื้อใน section *Fumigati* ประกอบด้วย *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. fumisynnematus*, *A. novofumigatus*, และ *A. lacinosus* (114) section *Flavi* ประกอบด้วย *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. tamarie*, และ *A. pseudotamari* (115) และเชื้อใน section *Nigri* ประกอบด้วย *A. niger*, *A. tubingensis*, และ *A. carbonarius* (116) จากผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่าบริเวณ *its* สามารถจำแนกเชื้อใน sections *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri* และ *Terrei* ออกจากกันได้ อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Henry และคณะที่พบว่า การจำแนกเชื้อด้วยบริเวณ *its*

มีความสามารถในการจำแนกเชื้อระหว่าง section ได้ดี เนื่องจากมีความผันแปรระหว่าง section แต่มีความผันแปรเพียงเล็กน้อยภายใน section เดียวกัน อย่างไรก็ตามในงานวิจัยของ Henry และคณะได้กล่าวถึงการพบความผันแปรสูงภายในสปีส์ของเชื้อ *A. fumigatus* (10) ส่วนหนึ่งอาจมาจากสายพันธุ์ย่อยที่อยู่ภายใน section *Fumigati* และถูกจำแนกเป็นเชื้อ *A. fumigatus* โดยใช้ข้อมูลบริเวณ *its* ประกอบกับข้อมูลผล MIC ของยา amphotericin B ในงานวิจัยครั้งนี้ที่พบว่ามีความหลากหลายในเชื้อกลุ่มนี้เช่นเดียวกัน จึงสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าเมื่อนำยีน *tef-1 α* มาจำแนกเชื้อกลุ่มนี้สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อ *A. lentulus* 7 ตัวอย่าง และ *A. udagawae* 7 ตัวอย่าง โดยพบเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ย่อยละ 6 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 232 ตัวอย่าง และคิดเป็นร้อยละ 25 จากกลุ่มของเชื้อที่ถูกจำแนกเป็น *A. fumigatus* ด้วยวิธี cultivation และบริเวณ *its* ทั้งหมด 55 ตัวอย่าง ซึ่งทั้งสองวิธีนี้มีผลการจำแนกเชื้อสอดคล้องกันร้อยละ 100 แต่ไม่สามารถจำแนกเชื้อทั้งสองสปีชีส์ออกมาจาก *A. fumigatus* ได้ ส่วนหนึ่งอาจมาจากเชื้อในแต่ละ sections มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง section ได้อย่างชัดเจน แต่มีความแตกต่างกันน้อยมากในเชื้อสายพันธุ์ย่อยที่อยู่ใน section *Fumigati* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Balajee และคณะที่พบว่าเชื้อ *A. fumigatus* ที่ถูกจำแนกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกด้วยเทคนิค RFLP ที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณยีน *rodA* ได้เป็นเชื้อ *A. fumigatus*, *A. lentulus* และ *A. udagawae* (117)

การจำแนกเชื้อด้วยวิธี cultivation เป็นวิธีที่ถูกใช้ในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่เนื่องจากไม่จำเป็นต้องมีเครื่องมือเฉพาะ และต้นทุนต่ำ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องความไม่คงที่ของผลการทดสอบ เช่น การสร้างสปอร์ เม็ดสี หรือการเจริญเติบโตในอุณหภูมิที่ต่างกัน โดยสามารถเกิดความคลาดเคลื่อนได้จากปัจจัยของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือสิ่งแวดล้อมภายในห้องปฏิบัติการ (109) จากการรวบรวมข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย พบว่าการจำแนกเชื้อด้วยวิธีการเพาะเชื้อร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางมหัณฐานและจุลสัณฐานสามารถจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ออกเป็น 5 สายพันธุ์ คือ *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* และ *A. nidulans* แต่ไม่สามารถจำแนกเชื้อสายพันธุ์ย่อยที่อยู่ในกลุ่มของเชื้อ *A. fumigatus* คือ *A. lentulus* และ *A. udagawae* ออกจากกลุ่มของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ เนื่องจากเชื้อทั้งสองมีลักษณะทางมหัณฐานและจุลสัณฐานที่คล้ายคลึงกันกับเชื้อ *A. fumigatus* (55, 118) จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ *A. fumigatus* complex ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Balajee ในปี 2005 ที่พบว่าเชื้อ *A. fumigatus* ที่ถูกจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางตัวอย่างมีการสร้างสปอร์ที่ผิดปกติ ร่วมกับมีความไวต่อยาต้านเชื้อราหลายชนิดลดลง ซึ่งเมื่อทำการศึกษาดูด้วยเทคนิค MLST ทำให้พบว่าเชื้อกลุ่มนี้ถูกจำแนกเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่คือ *A. lentulus* (119) และงานวิจัยในปี 2006 ที่พบเชื้อ *A. lentulus* และ *A. udagawae* ถูกจำแนกเป็นเชื้อสายพันธุ์ *A. fumigatus* เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน แต่เมื่อทำการศึกษาระดับนิวคลีโอไทด์ทำให้พบว่าเชื้อในกลุ่มนี้สามารถแยกออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ *A. fumigatus*, *A. udagawae* และ *A. lentulus* (117) จากข้อมูลงานวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าการจำแนกเชื้อกลุ่มนี้ด้วยลักษณะทางมหัณฐานเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะแยกเชื้อ *A. udagawae* และ *A. lentulus* ออกจากเชื้อ *A. fumigatus* ได้

การจำแนกเชื้อด้วยสารพันธุกรรมบริเวณ *its* พบว่าสามารถจำแนกเชื้อระหว่างสายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถจำแนกเชื้อสายพันธุ์ย่อยที่อยู่ใน section เดียวกันได้ ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากบริเวณ *its* มีการเกิดวิวัฒนาการที่ช้ากว่ายีน *tef-1 α* ส่งผลให้มีความหลากหลายบนบริเวณ *its* น้อยกว่า จึงไม่สามารถจำแนกเชื้อสายพันธุ์ย่อยที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบ %similarity ของเชื้อภายในสปีชีส์เดียวกันกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน พบว่าในเชื้อ *A. lentulus* และ *A. udagawae* มีค่า %similarity เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *A. fumigatus* ATCC 26934 มากกว่าร้อยละ 99 เช่นเดียวกับเชื้อตัวอย่างอื่นในกลุ่มของ *A. fumigatus* ในทางตรงกันข้าม พบว่า %similarity ของยีน *tef-1 α* ในเชื้อ *A. fumigatus* มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 98.11-100 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *A. fumigatus* ATCC 2693 ส่วนในตัวอย่างเชื้อ *A. fumigatus* ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *A. lentulus* และ *A. udagawae* มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 73.33-92.18 ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างภายในสปีชีส์ *A. fumigatus* ได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับวิธี cultivation ที่อาศัยการจำแนกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งความแตกต่างเพียงเล็กน้อย อาจทำให้เห็นความแตกต่างได้ไม่ชัดเจน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hoang และคณะ ที่ระบุว่าการใช้บริเวณ *its* ในการจำแนกเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรค aspergillosis มีความถูกต้องอยู่เพียงร้อยละ 75 จึงมีการศึกษาในตำแหน่งที่สองหรือ secondary barcode เพื่อช่วยเพิ่มความสามารถในการจำแนกเชื้อในกรณีที่ยีนตำแหน่งแรกไม่สามารถจำแนกเชื้อบางกลุ่มได้ (120) ในงานวิจัยของ Mirhendi และคณะพบว่าบริเวณ *its* ของเชื้อราในกลุ่ม dermatophytes มีค่าความผันแปรระหว่างสายพันธุ์น้อยกว่าบริเวณยีนที่ระบุรหัสของโปรตีน และยังพบว่าบริเวณ *its* มีการค่าความผันแปรภายในสายพันธุ์เดียวกันสูงกว่า (83) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Henry และคณะที่พบการผันแปรของบริเวณ *its* ภายในสายพันธุ์ *A. fumigatus* สูงเช่นเดียวกัน (10)

การจำแนกเชื้อด้วยยีนตำแหน่งที่สองหรือ secondary barcode เพื่อช่วยเพิ่มความถูกต้องในการจำแนกเชื้อ โดยเฉพาะในกลุ่มของสายพันธุ์ย่อย จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาขึ้นที่จะช่วยเพิ่มความสามารถในการจำแนกเชื้อในระดับสายพันธุ์ย่อย จากงานวิจัยของ Hoang และคณะได้เสนอแนวทางให้มีการใช้ยีนตำแหน่งที่สองในกรณีที่มีการจำแนกเชื้อด้วยยีนตำแหน่งแรกคือบริเวณ *its* มีค่า Query น้อยกว่าร้อยละ 98.5 เพื่อช่วยเพิ่มความเร็วและความถูกต้องในการจำแนกเชื้อราก่อโรค (120) Ashtiani และคณะพบว่ายีน beta-tubulin และ calmodulin มีความเหมาะสมในการจำแนกเชื้อใน sections *Flavi* และ *Nigri* (113) นอกจากนั้นงานวิจัยของ Balajee และคณะพบว่ายีน *beta-tubulin*, *rodlet A*, *salt-responsive*, *mitochondrial cytochrome b* และ *internal transcribed spacer* สามารถจำแนกเชื้อ *A. lentulus* ที่อยู่ใน section *Fumigati* ได้ด้วยเทคนิค MLST (119) ภายหลังได้มีงานวิจัยที่นำยีน *tef-1 α* มาใช้ในการจำแนกเชื้อราเพิ่มมากขึ้น ในงานวิจัยของ Mirhendi และคณะศึกษาการจำแนกเชื้อราในกลุ่ม dermatophytes ด้วยยีน *tef-1 α* เปรียบเทียบกับบริเวณ *its* พบว่ายีน *tef-1 α* มีความสามารถในการจำแนกเชื้อได้ดีกว่า (83) ในงานวิจัยของ Pakshir และคณะได้ใช้ยีน *tef-1 α* ในการตรวจหาเชื้อ *Candida* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในเล็บและพบว่ามีความไวที่สูงกว่าวิธีการเพาะเชื้อและการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (81) สอดคล้องกับผลการทดลองของวิจัยครั้งนี้โดยพบว่ายีน *tef-1 α* สามารถจำแนกเชื้อ

Aspergillus ในระดับสายพันธุ์ย่อยหรือ section ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าบริเวณ *its* และมีความสอดคล้องกับผลความไวรับต่อยา

การดื้อยาโดยกำเนิดของเชื้อ *Aspergillus* พบได้ในหลายสายพันธุ์ ซึ่งจะส่งผลให้เชื้อมีความไวต่อยาที่ลดลง จากงานวิจัยของ Lass และคณะพบว่าเชื้อ *A. terreus* มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อ ยา amphotericin B และส่งผลให้ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 96 (46) เช่นเดียวกับ งานวิจัยของ Iwen และคณะที่พบว่าเชื้อ *A. terreus* ดื้อต่อยา amphotericin B สูงถึงร้อยละ 95 (8) อย่างไรก็ตามจากข้อมูล MIC ของเชื้อ *A. terreus* ที่รวบรวมมาจากห้องปฏิบัติการเชื้อราของ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย พบว่าเชื้อกลุ่มนี้มีความไวต่อยา amphotericin B โดย พบว่าเชื้อทั้ง 45 ตัวอย่างที่ถูกจำแนกเป็นเชื้อ *A. terreus* ด้วยวิธี cultivation หรือการจัดกลุ่มจาก ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และ *tef-1 α* มีค่า MIC ต่อยา amphotericin B น้อยกว่า เท่ากับ 1 สาเหตุส่วนหนึ่งอาจมาจากพื้นที่การระบาดที่แตกต่างกันจึงมีเชื้อสายพันธุ์ที่ระบาดเป็นเชื้อ คนละกลุ่มและมีลักษณะความไวต่อยาที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pfaller และคณะ พบว่าเชื้อ *C. krusei* มีลักษณะความไวต่อยาที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ โดยพบว่า ละตินอเมริกา บราซิล เม็กซิโก และโคลอมเบีย มีค่าความไวต่อ voriconazole น้อยกว่าร้อยละ 70 ในขณะที่ ประเทศไทยและอีก 13 ประเทศ มีค่าความไวต่อ voriconazole มากกว่าร้อยละ 90 อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเชื้อ *A. terreus* ที่ระบาดในไทยและภูมิภาคใกล้เคียงเพิ่มเติม เพื่อทำความเข้าใจถึง สายพันธุ์ที่ระบาดในไทย ลักษณะความไวรับต่อยา และนำข้อมูลไปพิจารณาการรักษาให้เหมาะสมกับ สายพันธุ์ของเชื้อต่อไป (121)

ผลการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree พบว่าการจัดกลุ่มจากตำแหน่งทั้งสองมีความ สอดคล้องกันในเรื่องเชื้อ *A. nidulans* แต่ในการจัดกลุ่มจากข้อมูลของ *tef-1 α* พบว่าเชื้อ *A. terreus* และ *A. niger* ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ในขณะที่ *A. flavus* บางส่วนมีการจัดกลุ่มรวมกับ *A. fumigatus* และ *A. fumigatus* บางส่วนถูกจัดกลุ่มเป็นเชื้อ *A. lentulus* และ *A. udagawae* โดยพบว่าการจัดกลุ่มจากทั้งสองตำแหน่งมีความสอดคล้องกันร้อยละ 72 ไม่สอดคล้องกันร้อยละ 28 อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มจากข้อมูลทั้งสองตำแหน่งมีความสัมพันธ์กันทางสถิติและสัมพันธ์กับการจัด กลุ่มด้วยวิธี cultivation ที่เป็นวิธีมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Pearson Chi-Square ที่ค่า $P < 0.001$

การจำแนกเชื้อด้วยยีน *tef-1 α* ในเชื้อ *A. terreus* ถูกจัดกลุ่มเป็น 2 clade คือ clade 3 และ 8 ซึ่งพบว่าเชื้อทั้งสองกลุ่มมี %similarity ที่ใกล้เคียงกัน (98.76-100) แต่พบว่าเชื้อที่อยู่ใน clade 8 จำนวน 15 ตัวอย่าง มีลำดับเบสตำแหน่งที่ 514-515 เปลี่ยนจากเบส cytosine (C) เป็น adenine (A) โดยพบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันทั้ง 15 ตัวอย่าง จึงทำให้การวิเคราะห์ข้อมูล ด้วย maximum parsimony ในการสร้าง phylogenetic tree พิจารณาเป็นบริเวณ informative sequence หรือบริเวณที่มีเบสต่างกันอย่างน้อย 2 ตำแหน่งและพบลักษณะเดียวกันในเชื้อมากกว่า 2 ตัวอย่างขึ้นไป และทำการแบ่งกลุ่มเชื้อแยกออกมาเป็นอีก 1 clade นอกจากนั้นระหว่างเชื้อในกลุ่ม *A. terreus* และ *A. niger* มี %similarity สูง จึงทำให้ข้อมูลของเชื้อ *A. niger* จำนวน 30 ตัวอย่าง มี ผล blast ใกล้เคียงกับเชื้อ *A. terreus* มากกว่า และถูกจัดกลุ่มแยกออกมาจาก clade 9 (ผล blast เป็น *A. niger*) เป็น clade 4 (ผล blast เป็น *A. terreus*) ในขณะที่ผลการจำแนกเชื้อด้วยวิธี

cultivation และบริเวณ *its* ได้ผลเป็น *A. niger* แต่หากพิจารณาความสัมพันธ์กับค่า MIC แล้ว ยังคงพบว่าเชื้อทั้งสองสปีชีส์ ไวต่อยาที่ค่า MIC น้อยกว่าเท่ากับ 1 เช่นเดียวกัน ซึ่งในการระบุสปีชีส์ที่ถูกต้องควรทำการศึกษาด้วยยีนตำแหน่งอื่นเพิ่มเติมต่อไป และยังพบว่าระหว่างเชื้อ *A. fumigatus* และ *A. flavus* มี %similarity สูงเช่นเดียวกัน จึงทำให้เชื้อทั้งสองสปีชีส์บางส่วนถูกจัดกลุ่มรวมกันอยู่ใน clade 5 แต่อย่างไรก็ตามหากพิจารณานำ ยีน *tef-1 α* มาใช้เป็น secondary barcode จะเป็นการนำมาจำแนกเชื้อที่อยู่ภายใน clade ที่ได้จากการจำแนกเชื้อด้วย primary barcode หรือบริเวณ *its* ซึ่งจะลดข้อจำกัดของยีน *tef-1 α* ที่มี %similarity สูงระหว่าง section และเพิ่มความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อที่อยู่ภายใน section เดียวกันได้

ปัจจุบันมียาที่ใช้ในการรักษา aspergillosis อยู่ 3 ประเภท คือยาในกลุ่ม azoles, echinocandins และ polyene ซึ่งยาที่ทั่วโลกส่วนใหญ่นิยมใช้คือ azoles (6) แต่ในประเทศไทยเนื่องจากข้อจำกัดเรื่องการเบิกจ่ายค่ารักษาพยาบาล ได้มีการจำกัดให้ใช้ยาในกลุ่ม polyene หรือ amphotericin B เป็นยากลุ่มแรก และจะสามารถเข้าถึงยาในกลุ่ม azoles ได้เฉพาะในผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาหรือมีปัญหาเกี่ยวกับการทำงานของไตเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อบางสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มของ *A. fumigatus* complex ซึ่งรวมถึงเชื้อ *A. lentulus* และ *A. udagawae* มีการดื้อยาในกลุ่ม azoles และ amphotericin B โดยกำเนิด (109) ส่งผลให้มีความไวต่อยากลุ่มนี้ลดลง สอดคล้องกับผลการจัดกลุ่มเชื้อโดย phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *tef-1 α* ในการทดลองครั้งนี้ ที่พบว่าเชื้อ clade ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อ *A. lentulus* และ *A. udagawae* มีค่า MIC ของยา amphotericin B มากกว่าเท่ากับ 8 mg/L สอดคล้องกับงานวิจัยของ Alcazar และคณะ ที่พบว่าเชื้อ *A. lentulus* และ *A. fumigati*affinis มีค่า MIC มากกว่าเท่ากับ 4.5 mg/L (122) ในทางกลับกันพบว่า การจำแนกเชื้อด้วยวิธี cultivation หรือการจัดกลุ่มเชื้อโดย phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนบริเวณ *its* ไม่สามารถแยกเชื้อกลุ่มนี้ออกจากเชื้อ *A. fumigatus* ได้ อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มเชื้อจากข้อมูลทั้งสองตำแหน่งพบว่าให้ผลความสอดคล้องกับค่า MIC ของยา amphotericin B ตามสายพันธุ์ของเชื้อไม่ต่างกัน คือ *its* ร้อยละ 66 และ *tef-1 α* ร้อยละ 68 ซึ่งหากพิจารณาใช้บริเวณ *its* ร่วมกับ *tef-1 α* ในการจำแนกเชื้อแล้วจะพบว่าให้ผลการจัดกลุ่มเชื้อได้สอดคล้องกับค่า MIC ของยา amphotericin B ตามสายพันธุ์ของเชื้อเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 71

เมื่อพิจารณาค่าผลการวิเคราะห์ร้อยละความคล้าย (%similarity) ของบริเวณ *its* ระหว่างเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์ พบว่าเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดคือเชื้อ *A. udagawae*, *A. lentulus* และ *A. fumigatus* ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกเชื้อด้วย phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *its* ที่พบว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์นี้ถูกจัดกลุ่มอยู่บน clade 5 เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทั้งสามมีลักษณะทางมorfology ที่คล้ายคลึงกันและไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยวิธี cultivation (117) ส่วนเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บนบริเวณ *its* น้อยที่สุดคือเชื้อ *A. terreus* และ *A. nidulans* ส่งผลให้สามารถจำแนกออกจากกันด้วยบริเวณ *its* ได้ดี ในส่วนของเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าบริเวณ *its* มีความสามารถในการจำแนกเชื้อระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus* ได้ดี โดยพบว่าเชื้อที่มีค่า %similarity ต่ำ

กว่าร้อยละ 99 จะถูกจำแนกอยู่ใน clade ที่แตกต่างกันในการจัดจำแนกเชื้อด้วย phylogenetic tree เมื่อพิจารณาค่าผลการวิเคราะห์ร้อยละความคล้าย (%similarity) ของยีน *tef-1 α* ระหว่างเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์ พบว่าเชื้อที่มีค่า %similarity สูงที่สุดคือ *A. fumigatus* กับ *A. flavus* โดยมี %similarity อยู่ที่ร้อยละ 99.48 ซึ่งสอดคล้องกับผลการจัดจำแนกเชื้อด้วย phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *tef-1 α* ที่พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้บางส่วนถูกจัดกลุ่มรวมกันอยู่บน clade 5 และเชื้อ *A. terreus* กับ *A. niger* มี %similarity อยู่ที่ร้อยละ 99.45 และถูกจัดกลุ่มอยู่บน clade 4 ในส่วนของเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ พบว่ายีน *tef-1 α* มีความสามารถในการจำแนกเชื้อระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus* ได้ดี โดยพบว่าเชื้อที่มีค่า %similarity ต่ำกว่าร้อยละ 99 จะถูกจำแนกอยู่ใน clade ที่แตกต่างกันในการจัดจำแนกเชื้อด้วย phylogenetic tree นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม bioedit ยังพบว่าการจำแนกเชื้อด้วยยีน *tef-1 α* มีค่าความเหมือนระหว่างเชื้อ *A. fumigatus* กับ *A. lentulus* และ *A. udagawae* น้อยกว่า 0.2 และมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันมากกว่า 1,000 ตำแหน่ง ทำให้สามารถจัดแยกเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ออกจากกันได้โดยมีผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มเชื้อด้วย phylogenetic tree บนยีน *tef-1 α* อย่างไรก็ตามในการเปรียบเทียบความแตกต่างภายใน clade ของยีน *tef-1 α* พบว่ายังมีความแตกต่างมากกว่าบริเวณ *its* ส่วนหนึ่งเกิดจากการที่ยีน *tef-1 α* มีการจัดกลุ่มเชื้อต่างสายพันธุ์อยู่บน clade เดียวกัน คือ ใน clade ที่ 5 มีเชื้อสายพันธุ์ *A. fumigatus* จำนวน 41 ตัวอย่าง และ *A. flavus* 18 ตัวอย่าง ส่งผลให้มีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์สูงจากเชื้อที่ต่างสายพันธุ์กัน

จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าค่า %similarity ของบริเวณ *its* และ *tef-1 α* ในการจำแนกเชื้อระหว่างเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ถึงแม้ว่ายีน *tef-1 α* จะมีความสามารถในการจำแนกเชื้อได้มากกว่าจากการที่มีค่า discrimination power ที่สูงกว่า โดยพบว่าบริเวณ *its* มีค่าเท่ากับ 0.796 และยีน *tef-1 α* มีค่าเท่ากับ 0.8461 จึงบ่งบอกว่ายีน *tef-1 α* มีความสามารถในการจำแนกเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* ได้ดีกว่าบริเวณ *its* ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการที่เชื้อมีค่าความผันแปรภายในสายพันธุ์หรือระหว่างสายพันธุ์บนยีนทั้งสองไม่แตกต่างกัน แต่อาจเกิดจากการที่ยีน *tef-1 α* มีลักษณะการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับเชื้อในสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งหรือมีการลบหรือแทรกเบสที่จำเพาะบนยีน *tef-1 α* จึงเป็นข้อมูลช่วยเพิ่มความสามารถในการจำแนกเชื้อได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mirhendi และคณะที่พบลักษณะเช่นเดียวกันนี้บนยีน *tef-1 α* ของเชื้อในกลุ่ม dermatophytes (83)

ในส่วนของค่า %similarity ระหว่างเชื้อ *Aspergillus* แต่ละสปีชีส์กับเชื้อราก่อโรคสายพันธุ์อื่นๆ พบว่าไพรเมอร์ *its* ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เป็น universal primer ที่สามารถเพิ่มปริมาณบริเวณ *its* ของเชื้อราทุกสายพันธุ์ได้เนื่องจากบริเวณ *its* เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) ที่สามารถพบได้ในเชื้อราทุกชนิด แต่จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ที่พบบริเวณ *its* ในเชื้อราก่อโรคสายพันธุ์อื่นแต่มี %similarity ที่แตกต่างกันกับเชื้อ *Aspergillus* สปีชีส์ต่างๆ ในทางตรงกันข้ามพบว่าไพรเมอร์ *tef-1 α* ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้อาจไม่มีความเหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *tef-1 α* ของเชื้อบางสายพันธุ์จึงไม่พบผลผลิตในการการทดสอบ PCR และพบว่ายีน *tef-1 α* ของเชื้อ *Aspergillus* สปีชีส์ต่างๆ มีความแตกต่างกับเชื้อก่อโรค

สายพันธุ์อื่นอย่างมาก โดยส่วนใหญ่ไม่พบตำแหน่งที่มีความคล้ายกันอย่างมีนัยสำคัญตามเกณฑ์การเปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายกันอย่างมาก (megablast)



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การตรวจวินิจฉัยโรค aspergillosis ได้อย่างถูกต้องจะส่งผลให้แพทย์สามารถเลือกใช้ยาในการรักษาได้อย่างเหมาะสมกับลักษณะการดื้อยาตามธรรมชาติของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และการใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วจะทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาตั้งแต่ระยะแรกของการติดเชื้อซึ่งยังคงมีอัตราการรอดชีวิตสูง ส่งผลให้การรักษามีประสิทธิภาพและช่วยให้ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มมากขึ้น

การศึกษาในครั้งนี้ได้พบว่ายีน *tef-1 α* มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ในระดับสายพันธุ์ย่อยได้ดีกว่าบริเวณ *its* ที่ถูกใช้เป็นยีนตำแหน่งแรกในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus* ในปัจจุบัน โดยการจำแนกเชื้อสายพันธุ์ย่อยด้วยยีน *tef-1 α* สามารถจำแนกเชื้อที่พบว่ามีลักษณะการดื้อยาด้านเชื้อราที่ใช้ในการรักษาหลายชนิด โดยเฉพาะยา amphotericin B ที่ถูกใช้เป็นยาอันดับแรกในการรักษาผู้ป่วยในประเทศไทย ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเพิ่มปริมาณยีน *tef-1 α* โดยใช้ไพรเมอร์ forward A133 และ reverse A133 ด้วยเทคนิค real time PCR มีสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละเส้นที่ 10 ng/ μ l ปริมาณ DNA ที่ 20 ng นำไปทำการศึกษาต่อด้วยเทคนิค sanger sequencing แล้วนำข้อมูลมาสร้าง phylogenetic tree เพื่อแบ่งกลุ่มของเชื้อพบว่าบริเวณ *its* สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อได้สอดคล้องกับผล cultivation ร้อยละ 100 แต่ในกลุ่มของเชื้อ *A. fumigatus* พบว่ามีความหลากหลายของค่า MIC เมื่อเปรียบเทียบกับผลการจำแนกเชื้อด้วยยีน *tef-1 α* พบว่ามีความสามารถในการจำแนกเชื้อได้ดีกว่าบริเวณ *its* จากค่า discrimination power ที่สูงกว่า และยีน *tef-1 α* สามารถจำแนกเชื้อในกลุ่ม *A. fumigatus* ได้เป็นสายพันธุ์ย่อยเพิ่มเติมอีก 2 สายพันธุ์ คือ *A. lentulus* และ *A. udagawae* โดยมีผลการจำแนกเชื้อทั้งสองกลุ่มสอดคล้องกับค่า MIC ที่บ่งบอกว่าเชื้อสองสายพันธุ์นี้มีการดื้อยา amphotericin B โดยกำเนิด อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson Chi-Square ในการจำแนกเชื้อด้วยบริเวณ *its* ยีน *tef-1 α* และวิธี cultivation พบว่ามีความสัมพันธ์กันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เช่นเดียวกับผลความไวรับต่อยาของเชื้อที่มีความสัมพันธ์กับการจำแนกเชื้อด้วยบริเวณ *its* ยีน *tef-1 α* และวิธี cultivation ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าการใช้บริเวณ *its* ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อในกลุ่ม *Aspergillus* เพื่อเพิ่มความถูกต้องในการจำแนกเชื้อในระดับสายพันธุ์ด้วยวิธี cultivation อาจให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการพิจารณาเพื่อใช้ยีน *tef-1 α* ในการจำแนกเชื้อในระดับสายพันธุ์ย่อยให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้นทดแทนการตรวจวิเคราะห์ด้วยบริเวณ *its* โดยพิจารณาผลการจำแนกเชื้อด้วยวิธี cultivation แทนการตรวจวินิจฉัยด้วยบริเวณ *its* เนื่องจากการจำแนกเชื้อด้วยทั้งสองวิธีนี้ให้ผลสอดคล้องกันร้อยละ 100 เพื่อเป็นการลดต้นทุน ระยะเวลาการรอคอยผล และได้ผลการจำแนกเชื้อที่มีความละเอียด ถูกต้องและสอดคล้องกับผลความไวต่อยา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพิจารณาการรักษาของแพทย์ และส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่เหมาะสมต่อไป

อย่างไรก็ตามการจำแนกเชื้อด้วยยีน *tef-1 α* ยังพบว่ามีความคลุมเครือในเชื้อบางสายพันธุ์ที่มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับที่เท่ากันกับเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ ดังนั้นการพิจารณา

ใช้ยีน *tef-1 α* ในการจำแนกสายพันธุ์อาจมีความเหมาะสมนำมาใช้เป็นยีนลำดับที่สอง เพื่อช่วยเพิ่มความถูกต้องในการจำแนกสายพันธุ์ด้วยยีนลำดับที่หนึ่งหรือบริเวณ *its* ซึ่งอาจมีการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์จากเทคนิค real time PCR ให้สามารถจำแนกเชื้อด้วยเทคนิค high resolution melting (HRM) ที่สามารถจำแนกเชื้อได้จากอุณหภูมิการหลอมเหลวที่แตกต่างกันจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน เพื่อลดขั้นตอนของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุน และระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัย ส่งผลให้แพทย์ได้ผลการตรวจวินิจฉัยที่เร็วขึ้น และให้การรักษาผู้ป่วยในช่วงแรกของการติดเชื้อเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วย aspergillosis ได้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เนื่องจากเชื้อรา *Aspergillus* เป็นกลุ่มเชื้อราที่โตง่าย โตเร็ว และไม่ต้องการสารอาหารชนิดพิเศษเพื่อการเจริญ ดังนั้น ในการศึกษานี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน คือ SDB (BD™ Difco™, สหรัฐอเมริกา) ตลอดการศึกษา ทั้งเพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อและการจัดเก็บเชื้อ โดยขั้นตอนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA และ SDB มีขั้นตอน คือเตรียมผงอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป SDB (BD™ Difco™ sabouraud dextrose broth, สหรัฐอเมริกา) ปริมาณ 30 g โดยการเตรียมอาหารแบบแห้งจะเติมผงวุ้น (Biomedial™, Agar, india) เพิ่มในปริมาณ 20 g นำผงอาหารเลี้ยงเชื้อละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml (นำเข้าไมโครเวฟให้ความร้อนต่ำเพื่อช่วยการละลายของผงวุ้น จนกระทั่งได้สารละลายใส) หลังจากนั้นแบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 25x150 mm ปริมาตร 15 ml ต่อหลอด หากต้องการเตรียมอาหารชนิดแข็งแบบ slant และนำเข้าตู้อบฆ่าเชื้อ (autoclave) ณ อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที หากเป็นชนิดแข็งแบบหลอด slant หลังนำอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาจากตู้อบฆ่าเชื้อ ให้วางหลอดเอียงประมาณ 30 องศา รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว หรือหากต้องการเตรียมชนิดแข็งแบบจานเพาะเชื้อให้เทอาหารลงในจานเพาะเชื้อ ปริมาตร 25 ml ต่อจาน จากนั้นวางจานเพาะเชื้อในบริเวณปลอดเชื้อ บนพื้นระนาบเพื่อรอการแข็งตัวของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นกัน สำหรับชนิดเหลวสามารถตั้งรอจนอุณหภูมิลดลงก่อนนำเก็บในตู้เย็นต่อไป

- 1) เพื่อการทดสอบประสิทธิภาพ (QC) ของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งแบบ sterility test และ performance test อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชุดที่เตรียม จะมีการสุ่ม ร้อยละ 20 โดยจำนวนดังนี้

1.1 Sterility test เป็นการทดสอบความบริสุทธิ์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ว่าไม่มีการปนเปื้อนของจุลชีพ ขั้นตอนการทดสอบโดยสังเขป เป็นดังนี้

- สุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ ร้อยละ 10 ของจำนวนที่เตรียมในครั้งนั้นๆ เช่น เตรียม 100 หลอด/จาน สุ่มมาทำการทดสอบ 10 หลอด/จาน

- นำหลอด/จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่สุ่มได้ บ่ม ณ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเป็นอุณหภูมิและระยะเวลาที่ครอบคลุมการเจริญของเชื้อจุลชีพกว่าร้อยละ 99

- สังเกตการเจริญของเชื้อจุลชีพบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หากไม่มีเชื้อเจริญบน/ใน หลอด/จานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว แสดงว่า “pass QC” สามารถนำอาหารเลี้ยงเชื้อชุดดังกล่าวมาใช้ได้ แต่หากพบการเจริญของเชื้อแม้เพียง 1 หลอด/จานอาหารเลี้ยง อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมพร้อมกันทั้งหมดถือว่า “fail QC” ไม่สามารถนำมาใช้ได้ ต้องเตรียมใหม่ทั้งหมด

1.2 Performance test เป็นการทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลชีพ ซึ่งในที่นี้หมายถึงเชื้อราทั้งแบบเซลล์เดี่ยว (ยีสต์) และหลายเซลล์ (เชื้อราเส้นสาย) โดยขั้นตอนการทดสอบโดยสังเขป เป็นดังนี้

- สุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ ร้อยละ 10 ของจำนวนที่เตรียมในครั้งนั้นๆ เช่น เตรียม 100 หลอด/จาน สุ่มมาทำการทดสอบ 10 หลอด/จาน

- นำหลอด/จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่สุ่มได้ ครึ่งหนึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 และอีกครึ่งหนึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อราเส้นสาย *Aspergillus flavus* ATCC 24433

- นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าบ่ม ณ อุณหภูมิ 30°C จากนั้นสังเกตการณ์เจริญตามสายพันธุ์ของเชื้อ ดังนี้

ก. เชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 ให้สังเกต ณ เวลา

- 24 ชั่วโมง จะต้องพบการเจริญของเชื้อเป็นโคโลนีสีเหลืองครีมถึงขาว มันวาว ขนาดเล็กแต่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าอย่างชัดเจน เจริญทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อและ submerge pseudo hyphae ลงในอาหาร สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวการเจริญจะสังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (ให้ส่องตัวอย่างมาสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นยีสต์จริง)
- 48 ชั่วโมง จะต้องพบการเจริญของเชื้อเป็นโคโลนีสีเหลืองครีมถึงขาว เช่นเดิมแต่ขนาดใหญ่ขึ้น ไม่มีลักษณะของโคโลนีสีคล้ำหรือผิวหน้าขรุขระ และมีโคโลนีที่มีขนาดใหญ่กว่า 0.1 มิลลิเมตร มากกว่าร้อยละ 50 ของโคโลนีที่พบทั้งหมด สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวการเจริญจะสังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นเพิ่มขึ้นจากเดิมอย่างน้อย 2 เท่า (ให้ส่องตัวอย่างมาสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นยีสต์จริง)

ข. เชื้อราเส้นสาย *Aspergillus flavus* ATCC 24433 ให้สังเกต ณ เวลา

- 24 ชั่วโมง จะต้องพบการเจริญของเชื้อเป็นโคโลนีสายราสีขาว ขนาดเล็กแต่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าอย่างชัดเจน เชื้อมีการฝังเส้นใยลงในเนื้ออาหาร อาจพบ ลักษณะของเส้นใยเชื้อราที่ฟูขึ้นมาเหนือผิวหน้าอาหารได้บ้าง แต่จะยังไม่พบสีของสปอร์ สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวการเจริญจะสังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมีเศษปุยนุ่นลอยในของเหลว โดยที่ช่องเหลวต้องไม่ขุ่น (ไม่จำเป็นต้องส่องตัวอย่างออกมาดูใต้กล้องจุลทรรศน์)
- 72 ชั่วโมง จะต้องพบการเจริญของเชื้อเป็นโคโลนีสีทั้งการฝังเส้นใยลงในเนื้ออาหาร และลักษณะของเส้นใยเชื้อราที่ฟูขึ้นมาเหนือผิวหน้าอาหาร โดยอย่างน้อยร้อยละ 50 จะต้องแสดงสีของสปอร์เป็นสีเหลืองเขียวหรือสีเขียวมะกอก แต่ไม่เข้มเป็นสีเขียวขี้ม้าหรือสีดำ สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวการเจริญของเศษปุยนุ่นที่พบ ณ 24 ชั่วโมง จะลอยขึ้นมาที่ผิวน้ำ แล้วเจริญเป็นแพเตรียมสร้างเส้นใยเชื้อราที่ฟูขึ้นมาเหนือผิวหน้าอาหารสีขาวหรืออาจพบสีของสปอร์เป็นสีเหลืองเขียวหรือสีเขียวมะกอกได้บ้าง (ไม่จำเป็นต้องส่องตัวอย่างออกมาดูใต้กล้องจุลทรรศน์)

- หากพบลักษณะการเจริญของเชื้อตามด้านบน แสดงว่า “pass QC” สามารถนำอาหารเลี้ยงเชื้อชุดดังกล่าวมาใช้ได้ แต่หากพบการเจริญของเชื้อที่แตกต่าง ถือว่า “fail QC” จำเป็นต้องย้อนกลับไปพิจารณาคุณสมบัติของเชื้อที่นำมาทดสอบและคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อหาสาเหตุต่อไป

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ 25 ผลการจำแนกเชื้อด้วยวิธี cultivation และผล MIC ยา amphotericin B ทดสอบด้วยชุดทดสอบ YeastOne™ โดยห้องปฏิบัติการหน่วยรพวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

Isolation No.	Cultivation	MIC (mg/mL)	Cultivation	MIC (mg/mL)	Cultivation	MIC (mg/mL)	Cultivation	MIC (mg/mL)	Cultivation	MIC (mg/mL)
1	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
2	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
3	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
4	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
5	<i>A. fumigatus</i>	16	<i>A. flavus</i>	4	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
6	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	4	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
7	<i>A. fumigatus</i>	4	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
8	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	4	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
9	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
10	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	16	<i>A. niger</i>	1	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
11	<i>A. fumigatus</i>	16	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
12	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	4	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
13	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>A. flavus</i>	4	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
14	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
15	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
16	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
17	<i>A. fumigatus</i>	16	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
18	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
19	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
20	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
21	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
22	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
23	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
24	<i>A. fumigatus</i>	16	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
25	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
26	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	16	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
27	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
28	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
29	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5	<i>A. nidulans</i>	8
30	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	1	<i>A. nidulans</i> ATCC38163	8
31	<i>A. fumigatus</i>	8	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5		
32	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5		
33	<i>A. fumigatus</i>	2	<i>A. flavus</i>	8	<i>A. niger</i>	0.5	<i>A. terreus</i>	0.5		

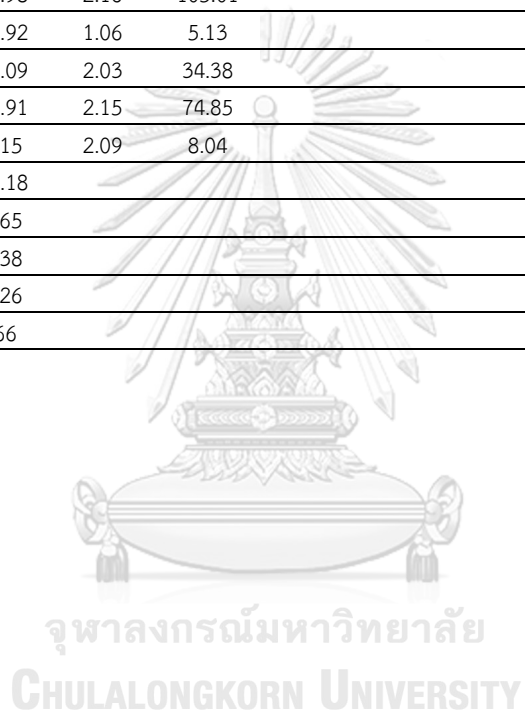
ตารางที่ 26 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบคุณภาพของ DNA ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างโดยใช้และ ไม่ใช้ lysis buffer ก่อนสกัดด้วยเครื่องอัตโนมัติ

Result Fungi	OD 260/280		Concentration (ng/ μ l)	
	No Lysis	Lysis	No Lysis	Lysis
<i>Chaetophialophira</i> spp.	2.833	1.362	4.986	4.555
<i>Tricosporon</i> spp.	1.571	1.347	9.517	3.211
<i>Cryptococcus</i> spp.	1.357	1.686	5.45	4.203
<i>Candida albicans</i>	1.363	1.399	128.18	179.838
<i>Acremonium</i> spp.	1.633	1.018	4.767	2.738
<i>Rhizopus</i> spp.	1.884	1.444	7.85	9.362
<i>Mucor</i> spp.	1.976	2.242	7.916	-10.71
<i>Curvularia</i> spp.	2.19	1.642	12.385	5.338
<i>Aspergillus flavus</i>	2.38	2.315	16.401	18.501
<i>Rhodotorula</i> spp.	1.487	1.346	16.563	20.654
<i>Fusarium</i> spp.	2.288	1.895	14.57	13.94

ตารางที่ 27 แสดงข้อมูลการทดสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer

ลำดับ	<i>A. fumigatus</i>		<i>A. flavus</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreuse</i>		<i>A. nidulans</i>	
	OD 260/280	ng/ μ L	OD 260/281	ng/ μ L	OD 260/282	ng/ μ L	OD 260/283	ng/ μ L	OD 260/284	ng/ μ L
1	2.07	74.92	1.74	16.91	2.24	38.89	1.97	12.98	1.93	4325.65
2	2.36	17.66	2.16	20.58	1.87	18.39	1.36	5.48	1.80	4364.33
3	2.08	62.79	2.16	44.84	2.02	15.29	1.42	5.63	1.89	3546.99
4	2.03	31.03	1.99	20.83	2.53	9.97	2.12	5.11	1.88	655.79
5	2.01	37.15	2.18	54.19	1.80	7.22	2.28	14.21	1.92	1945.68
6	2.22	189.53	2.31	24.34	2.01	25.66	2.16	141.60	1.94	1543.65
7	2.08	60.32	1.98	13.34	2.11	19.90	2.10	53.98	1.99	356.68
8	2.18	106.09	2.02	12.83	2.20	27.36	2.14	24.76	1.89	625.78
9	2.20	115.25	2.39	22.64	2.27	6.08	1.91	39.18	1.98	834.66
10	2.17	53.55	2.16	7.04	2.20	30.72	1.86	30.07	1.93	657.76
11	2.17	130.13	2.14	25.23	2.14	21.20	1.69	38.84	1.93	243.68
12	2.08	61.35	1.88	6.67	2.19	26.60	1.38	4.69	1.95	1576.95
13	2.22	98.94	2.37	42.98	2.30	44.32	2.79	20.92	1.87	1934.94
14	2.22	114.15	1.80	13.44	1.82	78.30	1.84	20.96	1.89	934.430
15	2.08	27.79	2.21	10.71	2.28	37.70	2.62	27.37	1.87	754.43
16	2.13	77.34	2.23	21.02	1.89	20.70	2.24	110.00	1.90	623.54
17	2.19	108.87	2.29	23.98	2.25	56.19	2.16	198.97	1.93	547.56
18	2.10	62.74	2.04	11.24	2.34	25.05	2.16	185.31	1.92	346.78
19	2.07	30.79	2.23	127.28	2.13	35.05	2.19	159.40	1.94	3462.54
20	2.09	43.39	2.34	64.89	2.39	19.42	2.23	127.88	1.87	946.65
21	2.22	94.02	1.85	98.60	2.28	364.59	2.18	75.78	1.85	723.67
22	2.15	163.92	1.94	17.35	2.16	81.96	2.18	83.95	1.80	994.12
23	2.13	58.28	1.73	10.07	2.61	73.84	2.20	119.55	1.84	573.17
24	2.10	74.24	2.10	94.94	1.54	16.91	2.19	84.43	1.90	674.23
25	2.16	108.06	2.19	110.40	2.17	56.19	2.64	34.39	1.94	573.76
26	1.96	25.30	2.18	159.53	2.08	46.92	2.32	39.51	1.95	865.23
27	1.86	21.56	2.19	103.78	2.02	55.05	2.39	42.70	1.97	689.98
28	2.34	29.01	2.03	52.53	2.08	82.46	2.16	222.89	1.93	665.98
29	2.24	37.83	2.16	74.07	2.22	191.46	2.26	122.30	1.95	1034.78
30	2.09	77.64	2.13	27.40	2.09	41.00	1.28	4.01	1.96	1023.59
31	2.11	72.45	1.38	3.54	2.03	55.29	1.93	299.80		
32	2.07	66.63	2.03	33.41	2.17	85.38	2.01	1040.60		
33	2.20	128.97	1.95	20.33	2.19	194.89	1.84	3418.92		
34	2.16	45.60	1.80	3.91	2.08	58.36	1.90	321.432		
35	2.37	42.07	2.19	106.39	2.13	41.47	1.92	3431.45		
36	2.15	297.76	3.03	17.20	2.85	31.85	1.86	4631.76		
37	2.15	166.81	2.15	20.28	2.40	16.50	1.87	3541.76		
38	1.81	38.28	2.24	96.65	1.97	65.91	1.88	4654.77		
39	2.25	170.12	2.18	40.13	2.18	141.85	1.79	3576.80		
40	1.89	78.22	2.13	39.64	2.01	9.56	1.84	1362.05		

ลำดับ	<i>A. fumigatus</i>		<i>A. flavus</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreuse</i>		<i>A. nidulans</i>	
	OD 260/280	ng/ μ L	OD 260/281	ng/ μ L	OD 260/282	ng/ μ L	OD 260/283	ng/ μ L	OD 260/284	ng/ μ L
41	2.05	97.49	2.17	204.10	2.05	85.34	1.90	763.56		
42	2.10	65.64	2.18	194.98	2.02	31.48	1.93	6576.12		
43	2.20	157.06	2.20	55.16	1.97	55.58	1.87	5687.564		
44	2.04	47.35	2.17	149.15	2.08	57.81	1.90	1234.32		
45	2.15	113.79	2.20	298.96	2.10	59.59	1.85	5673.75		
46	2.23	79.17	2.11	77.53			1.87	6567.30		
47	2.17	136.26	2.18	32.48						
48	2.23	55.10	2.17	242.44						
49	2.20	239.98	2.16	105.01						
50	2.20	119.92	1.06	5.13						
51	2.18	199.09	2.03	34.38						
52	2.17	179.91	2.15	74.85						
53	1.97	33.15	2.09	8.04						
54	2.09	114.18								
55	2.10	79.65								
56	2.18	76.38								
57	1.95	28.26								
58	1.94	7.66								



Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	61.64	63.16	10.00	10.00
Reverse primer	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	55.09	45.00	6.00	6.00

Products on target templates
 >OR053856.1 Aspergillus fumigatus isolate S1-31 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 597
 Forward primer 1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG 19
 Template 71 89
 Reverse primer 1 TCCTCCGCTTATTGATATGC 20
 Template 667 648

ภาพที่ 54 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *its* กับเชื้อ *A. fumigatus* ด้วยโปรแกรม NCBI blast

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	61.64	63.16	10.00	10.00
Reverse primer	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	55.09	45.00	6.00	6.00

Products on target templates
 >OR452733.1 Aspergillus flavus isolate Y.n.181.ahamir small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 595
 Forward primer 1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG 19
 Template 3 21
 Reverse primer 1 TCCTCCGCTTATTGATATGC 20
 Template 597 578

ภาพที่ 55 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *its* กับเชื้อ *A. flavus* ด้วยโปรแกรม NCBI blast

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	61.64	63.16	10.00	10.00
Reverse primer	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	55.09	45.00	6.00	6.00

Products on target templates
 >OR397993.1 Aspergillus niger strain Kar59 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 594
 Forward primer 1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG 19
 Template 36 54
 Reverse primer 1 TCCTCCGCTTATTGATATGC 20
 Template 629 610

ภาพที่ 56 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *its* กับเชื้อ *A. niger* ด้วยโปรแกรม NCBI blast

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	61.64	63.16	10.00	10.00
Reverse primer	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	55.09	45.00	6.00	6.00

Products on target templates
 >DP103935.1 Aspergillus terreus strain 555N small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 609
 Forward primer 1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG 19
 Template 3 21
 Reverse primer 1 TCCTCCGCTTATTGATATGC 20
 Template 611 592

ภาพที่ 57 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *its* กับเชื้อ *A. terreus* ด้วยโปรแกรม NCBI blast

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	61.64	63.16	10.00	10.00
Reverse primer	TCTCCGGCTATTGATATGC	20	55.09	45.00	6.00	6.00

Products on target templates
>OL772685.1 Aspergillus nidulans var. dentatus strain CBS 114.63 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 566
Forward primer 1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG 19
Template 116 134
Reverse primer 1 TCTCCGGCTATTGATATGC 20
Template 681 662

ภาพที่ 58 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *its* กับเชื้อ *A. nidulans* ด้วยโปรแกรม NCBI blast

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACTTCATCAAGAACATGAT	Plus	20	394	413	50.84	35.00	6.00	6.00
Reverse primer	GACGTTGAAACCAACGTTGTC	Minus	21	1035	1015	60.33	52.38	5.00	5.00

Products on intended targets
>XM_745295.2 Aspergillus fumigatus Af293 translation elongation factor EF-1 alpha subunit, putative (AFUA_1G06390), partial mRNA

product length = 642
Forward primer 1 GACTTCATCAAGAACATGAT 20
Template 394 413
Reverse primer 1 GACGTTGAAACCAACGTTGTC 21
Template 1035 1015

ภาพที่ 59 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *tef-1 α* กับเชื้อ *A. fumigatus* ด้วยโปรแกรม NCBI blast

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACTTCATCAAGAACATGAT	Plus	20	154	173	50.84	35.00	6.00	6.00
Reverse primer	GACGTTGAAACCAACGTTGTC	Minus	21	795	775	58.57	47.62	8.00	4.00

Products on intended targets
>OK634020.1 Aspergillus flavus strain NJC04 elongation factor 1 alpha (EF1alpha) gene, partial cds

product length = 642
Forward primer 1 GACTTCATCAAGAACATGAT 20
Template 154 173
Reverse primer 1 GACGTTGAAACCAACGTTGTC 21
Template 795 775

ภาพที่ 60 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *tef-1 α* กับเชื้อ *A. flavus* ด้วยโปรแกรม NCBI blast

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACTTCATCAAGAACATGAT	20	50.84	35.00	6.00	6.00
Reverse primer	GACGTTGAAACCAACGTTGTC	21	58.57	47.62	8.00	4.00

Products on target templates
>XM_025601974.1 Aspergillus niger CBS 101883 translation elongation factor (B096DRAFT_450312), partial mRNA

product length = 642
Forward primer 1 GACTTCATCAAGAACATGAT 20
Template 541 560
Reverse primer 1 GACGTTGAAACCAACGTTGTC 21
Template 1182 1162

ภาพที่ 61 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *tef-1 α* กับเชื้อ *A. niger* ด้วยโปรแกรม NCBI blast

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACTTCATCAAGAACATGAT	20	50.84	35.00	6.00	6.00
Reverse primer	GACGTTGAAACCAACGTTGTC	21	58.57	47.62	8.00	4.00

Products on target templates
 >XM_001212188.1 Aspergillus terreus NIH2624 elongation factor 1-alpha (ATEG_03010) partial mRNA

product length = 642
 Forward primer 1 GACTTCATCAAGAACATGAT 20
 Template 319 338

Reverse primer 1 GACGTTGAAACCAACGTTGTC 21
 Template 960 940

ภาพที่ 62 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *tef-1 α* กับเชื้อ *A. terreus* ด้วยโปรแกรม NCBI blast

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACTTCATCAAGAACATGAT	20	50.84	35.00	6.00	6.00
Reverse primer	GACGTTGAAACCAACGTTGTC	21	58.57	47.62	8.00	4.00

Products on target templates
 >DR189379.1 Aspergillus nidulans strain ZZ-04-1 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds

product length = 642
 Forward primer 1 GACTTCATCAAGAACATGAT 20
 Template 120 139

Reverse primer 1 GACGTTGAAACCAACGTTGTC 21
 Template 761 C..... 741

ภาพที่ 63 ผลการตรวจสอบความจำเพาะและขนาดของผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์ *tef-1 α* กับเชื้อ *A. nidulans* ด้วยโปรแกรม NCBI blast

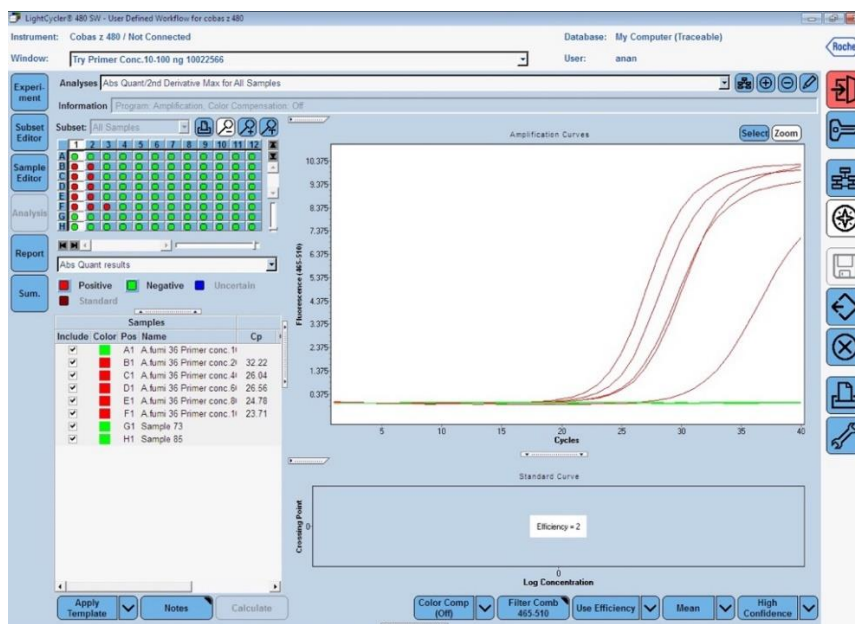


ภาพที่ 64 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *its* โดยใช้สัดส่วนน้ำยาและสภาวะในการทำ real time PCR ตามรายละเอียดจากผลการทดลองข้อที่ 5

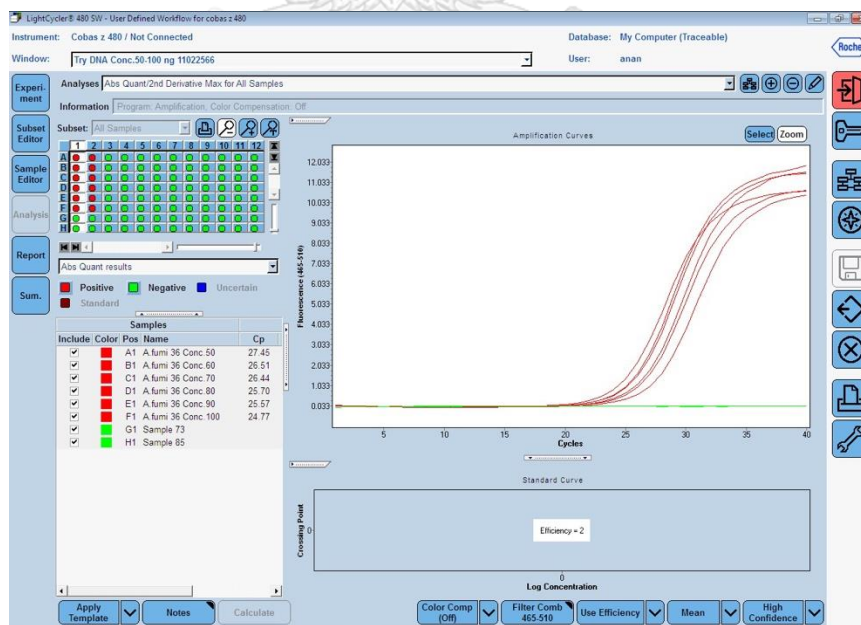
ตารางที่ 28 แสดงค่า Ct การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค real time PCR ด้วยไพรเมอร์ *its*

<i>its</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreuse</i>	<i>A. nidulans</i>
ลำดับ	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct
1	29	35	35	35	35
2	35	35	35	26	34
3	35	30	35	35	35
4	35	35	35	25	33
5	35	35	35	24	34
6	35	35	31	35	35
7	24	35	35	32	35
8	26	35	35	35	35
9	31	28	35	35	34
10	30	35	35	34	35
11	29	35	31	33	34
12	28	28	35	31	35
13	23	35	30	29	36
14	23	35	26	27	35
15	35	35	30	26	34
16	35	35	30	29	33
17	31	35	35	29	34
18	27	35	29	30	35
19	35	35	28	28	35
20	30	27	32	30	36
21	28	24	26	29	35
22	28	35	27	28	34
23	35	23	27	26	35
24	35	27	32	27	35
25	35	27	26	30	35
26	31	25	28	28	36
27	24	33	33	28	34
28	26	29	30	24	35
29	24	29	24	32	36
30	35	33	30	26	35
31	23	23	31	35	
32	30	25	39	34	
33	29	35	27	35	
34	26	24	30	36	
35	29	24	35	33	
36	28	35	30	32	
37	26	35	30	34	
38	31	27	26	35	
39	26	35	27	36	
40	28	29	33	32	
41	23	24	26	34	

<i>its</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreuse</i>	<i>A. nidulans</i>
ลำดับ	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct
42	28	29	31	35	
43	27	31	24	32	
44	28	25	27	35	
45	27	30	25	35	
46	27	28		36	
47	27	34			
48	35	31			
49	30	28			
50	27	35			
51	31	26			
52	29	33			
53	26	35			
54	27				
55	35				
56	28				
57	29				
58	30				



ภาพที่ 65 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ *tef-1 α* ที่เหมาะสม โดยใช้เชื้อ *A. fumigatus* หมายเลข 36 เป็นเชื้อตัวแทนในการทดสอบ ผลการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ความเข้มข้น 10 ng/ μ l ไม่พบกราฟผลผลิต และความเข้มข้นของไพรเมอร์ในช่วง 40-100 ng/ μ l ให้ค่า Ct อยู่ในช่วง 23.71-26.04 จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ 40 ng/ μ l ในการทำปฏิกิริยา



ภาพที่ 66 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA template ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ *tef-1 α* โดยใช้เชื้อ *A. fumigatus* หมายเลข 36 เป็นเชื้อตัวแทนในการทดสอบ ผลการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้นของ DNA template 100 ng ให้ค่า Ct ต่ำที่สุด คือ 24.77



ภาพที่ 67 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α* ใช้สัดส่วนน้ำยาและสภาวะในการทำ real time PCR ตามรายละเอียดจากผลการทดลองข้อที่ 6.1, 6.2 และ 6.3

ตารางที่ 29 แสดงค่า Ct การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค real time PCR ด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α*

<i>tef-1α</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreuse</i>	<i>A. nidulans</i>
ลำดับ	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct
1	29	33	35	35	34
2	35	32	35	35	35
3	31	35	29	35	35
4	35	35	35	35	35
5	35	35	35	35	34
6	35	35	35	34	32
7	35	31	35	35	32
8	35	31	35	35	33
9	31	35	35	35	34
10	33	35	35	35	34
11	31	35	35	35	33
12	35	35	35	35	34
13	35	33	33	35	32
14	35	35	35	33	34
15	35	35	35	35	35
16	35	30	35	35	34
17	30	31	35	35	32
18	30	30	35	35	34
19	33	35	35	35	35
20	35	29	35	35	34
21	35	35	34	35	34
22	35	35	35	35	34
23	35	35	35	35	34
24	35	29	35	34	32
25	29	30	35	35	33
26	27	30	35	35	32
27	35	32	35	35	33
28	35	30	35	35	34
29	35	32	34	35	35
30	35	32	35	35	32
31	35	35	35	33	
32	35	35	35	34	
33	29	35	34	35	
34	26	35	35	34	
35	35	30	35	35	
36	35	29	35	34	
37	35	31	35	33	
38	35	32	35	34	
39	35	32	35	35	

<i>tef-1α</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreuse</i>	<i>A. nidulans</i>
ลำดับ	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct	RT-PCR Ct
40	35	34	35	34	
41	27	24	34	35	
42	28	31	35	35	
43	35	30	35	34	
44	35	31	35	35	
45	35	29	35	36	
46	35	29		35	
47	35	31			
48	35	29			
49	29	31			
50	29	33			
51	35	33			
52	35	31			
53	35	35			
54	35				
55	35				
56	35				
57	27				
58	25				

ตารางที่ 30 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *A. fumigatus* ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *its*

<i>its</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. fumigatus</i>	No.1	99.8	510	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.2	99.43	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.62%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.3	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.4	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.5	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.6	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.7	99.81	522	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.8	99.8	510	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.9	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.10	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.11	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.12	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.13	99.81	520	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.14	99.43	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.62%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.15	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.16	98.85	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.04%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.17	99.24	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.43%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.18	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.19	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.20	99.05	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.24%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.21	99.04	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.24%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.22	99.81	528	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	98%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.23	99.24	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.43%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.24	99.24	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.43%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.25	99.23	522	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.43%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.26	99.43	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.62%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.27	99.81	520	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.28	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.29	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.30	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.31	99.62	520	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.32	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.33	99.62	521	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	99%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.34	99.62	522	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.35	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.36	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.37	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.38	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.39	99.62	520	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.40	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523

its		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. fumigatus</i>	No.41	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.42	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.43	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.44	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.45	99.81	521	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	99%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.46	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.47	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.48	99.62	524	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	99%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.49	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.50	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.51	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.52	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.53	99.62	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.54	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.55	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.56	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.57	99.81	523	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	523
<i>A. fumigatus</i>	No.58ATCC 26934	100	578	OM057660.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.81%	523



ตารางที่ 31 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *A. flavus* ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *its*

<i>its</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. flavus</i>	No.1	98.75	575	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.81%	576
<i>A. flavus</i>	No.2	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.3	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.4	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.5	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.6	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.7	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.8	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.9	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.10	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.11	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.12	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.13	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.14	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.15	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.16	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.17	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.18	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.19	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.20	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.21	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.22	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.23	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.24	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.25	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.26	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.27	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.28	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.29	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.30	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.31	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.32	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.33	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.34	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.35	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.36	98.93	574	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.37	98.93	580	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	99%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.38	98.57	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.65%	576
<i>A. flavus</i>	No.39	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.40	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576

<i>its</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. flavus</i>	No.41	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.42	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.43	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.44	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.45	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.46	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.47	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.48	98.93	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	576
<i>A. flavus</i>	No.49	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.50	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.51	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.52	98.75	576	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.83%	576
<i>A. flavus</i>	No.53 ATCC 204304	100	590	DQ683122.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.65%	576

ตารางที่ 32 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *A. niger* ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *its*

<i>its</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. niger</i>	No.1	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.2	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.3	99.58	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.66%	582
<i>A. niger</i>	No.4	99.58	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.66%	582
<i>A. niger</i>	No.5	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.6	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.7	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.8	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.9	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.10	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.11	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.12	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.13	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.14	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.15	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.16	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.17	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.18	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.19	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.20	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.21	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.22	99.79	580	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.23	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.24	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.25	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.26	100	580	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.27	100	580	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.28	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.29	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.30	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.31	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	99%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.32	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.33	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.34	100	579	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.35	99.58	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.66%	582
<i>A. niger</i>	No.36	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.37	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.38	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.39	99.79	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.40	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	99%	100.00%	582

<i>its</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. niger</i>	No.41	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.42	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.43	99.79	581	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	99.83%	582
<i>A. niger</i>	No.44	100	582	MN337269.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	582
<i>A. niger</i>	No.45			MN337269.1 <i>A. niger</i>			
<i>A. niger</i>	ATCC 6275	100	489		100%	100.00%	582



ตารางที่ 33 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *A. terreus* ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *its*

<i>its</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. terreus</i>	No.1	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.2	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.3	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.4	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.5	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.6	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.7	98.93	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.65%	578
<i>A. terreus</i>	No.8	99.29	580	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	99%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.9	98.93	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.65%	578
<i>A. terreus</i>	No.10	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.11	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.12	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.13	99.29	576	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.14	99.29	573	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.15	99.29	576	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.16	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.17	99.29	575	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.18	99.29	580	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	99%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.19	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.20	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.21	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.22	98.93	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.65%	578
<i>A. terreus</i>	No.23	98.93	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.65%	578
<i>A. terreus</i>	No.24	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.25	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.26	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.27	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.28	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.29	98.93	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.65%	578
<i>A. terreus</i>	No.30	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.31	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.32	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.33	98.93	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.65%	578
<i>A. terreus</i>	No.34	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.35	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.36	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.37	98.93	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.65%	578
<i>A. terreus</i>	No.38	98.75	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.48%	578
<i>A. terreus</i>	No.39	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.40	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578

<i>its</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. terreus</i>	No.41	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.42	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.43	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.44	99.11	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.83%	578
<i>A. terreus</i>	No.45	99.29	578	MT772080.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	578
<i>A. terreus</i>	No.46			MT772080.1 <i>A. terreus</i>			
<i>A. terreus</i>	ATCC 20542	100	588		100%	99.83%	578



ตารางที่ 34 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *A. nidulans* ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *its*

<i>its</i>		%similarity with ATCC	Product size	blastNCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. nidulans</i>	No.1	99.81	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	100.00%	550
<i>A. nidulans</i>	No.2	99.81	519	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	100.00%	550
<i>A. nidulans</i>	No.3	99.43	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.62%	550
<i>A. nidulans</i>	No.4	99.43	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.62%	550
<i>A. nidulans</i>	No.5	99.81	522	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	100.00%	550
<i>A. nidulans</i>	No.6	99.43	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.62%	550
<i>A. nidulans</i>	No.7	99.43	523	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.62%	550
<i>A. nidulans</i>	No.8	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.9	99.43	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.62%	550
<i>A. nidulans</i>	No.10	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.11	99.81	521	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	100.00%	550
<i>A. nidulans</i>	No.12	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.13	99.81	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	100.00%	550
<i>A. nidulans</i>	No.14	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.15	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.16	99.81	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	100.00%	550
<i>A. nidulans</i>	No.17	99.61	514	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.18	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.19	99.43	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.62%	550
<i>A. nidulans</i>	No.20	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.21	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.22	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.23	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.24	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100%	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.25	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.26	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.27	99.62	522	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.28	99.62	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100	99.81%	550
<i>A. nidulans</i>	No.29	99.43	524	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100	99.62%	550
<i>A. nidulans</i>	No.30 ATCC 38163	100	546	MT007526.1 <i>A. nidulans</i>	100	99.62%	550

ตารางที่ 35 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *A. fumigatus* ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย *tef-1 α* ไพรเมอร์

<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blastNCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. fumigatus</i>	No.1	99.66	580	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.66%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.2	99.31	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.31%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.3	99.48	582	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.48%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.4	100	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.5	73.33	1320	XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	100%	100.00%	1323
				XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	99%	96.44%	1323
<i>A. fumigatus</i>	No.6	73.33	1320	XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	100%	99.47%	1323
				XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	99%	96.44%	1323
<i>A. fumigatus</i>	No.7			ไม่มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์			
<i>A. fumigatus</i>	No.8	73.33	1325	XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	99%	99.85%	1323
				XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	99%	96.44%	1323
<i>A. fumigatus</i>	No.9	99.31	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.32%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.10	99.14	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.14%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.11	98.11	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	98.12%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.12	99.31	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.32%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.13	99.48	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.49%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.14	73.33	1320	XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	100%	99.39%	1323
				XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	100%	95.98%	1323
<i>A. fumigatus</i>	No.15	92.18	1383	XM_043295220.1 <i>A. udagawae</i>	99%	100.00%	1383
				XM_745295.2 <i>A. fumigatus</i>	99%	97.17%	1485
<i>A. fumigatus</i>	No.16	99.48	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.49%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.17	99.48	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.49%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.18	99.14	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.14%	584

<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blastNCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. fumigatus</i>	No.19	99.65	582	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	99%	99.66%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.20	91.83	1380	XM_043295220.1 <i>A. udagawae</i>	99%	99.85%	1383
				XM_745295.2. <i>A. fumigatus</i>	99%	97.02%	1485
<i>A. fumigatus</i>	No.21	99.14	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.14%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.22	100	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.23	100	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.24	100	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.25	92.01	1383	XM_043295220.1 <i>A. udagawae</i>	99%	99.56%	1383
				XM_745295.2. <i>A. fumigatus</i>	99%	96.73%	1485
<i>A. fumigatus</i>	No.26	81.82	1329	XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	99%	99.47%	1323
				XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	99%	96.06%	1323
<i>A. fumigatus</i>	No.27	92.18	1387	XM_043295220.1 <i>A. udagawae</i>	99%	99.85%	1383
				XM_745295.2. <i>A. fumigatus</i>	99%	97.02%	1485
<i>A. fumigatus</i>	No.28	91.83	1388	XM_043295220.1 <i>A. udagawae</i>	99%	99.85%	1383
				XM_745295.2. <i>A. fumigatus</i>	99%	97.02%	1485
<i>A. fumigatus</i>	No.29	73.33	1322	XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	99%	99.62%	1323
				XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	99%	96.36%	1323
<i>A. fumigatus</i>	No.30			ไม่มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์			
<i>A. fumigatus</i>	No.31	100	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.32	99.66	588	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	98%	99.66%	584
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. fumigatus</i>	No.33	99.31	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.32%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.34	99.66	580	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.66%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.35	99.48	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.49%	584

<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blastNCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. fumigatus</i>	No.36	99.66	582	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	99%	99.66%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.37	99.31	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.32%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.38	99.31	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.32%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.39	99.31	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.32%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.40	99.31	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.32%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.41	99.14	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.20%	590.9473684
<i>A. fumigatus</i>	No.42	92.18	1383	XM_043295220.1 <i>A. udagawae</i>	99%	99.85%	1383
				XM_745295.2 <i>A. fumigatus</i>	99%	97.02%	1485
<i>A. fumigatus</i>	No.43	92.01	1381	XM_043295220.1 <i>A. udagawae</i>	99%	99.93%	1383
				XM_745295.2 <i>A. fumigatus</i>	99%	97.09%	1485
<i>A. fumigatus</i>	No.44	99.83	580	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.83%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.45	74.03	1320	XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	99%	99.77%	1323
				XM_033555949.1 <i>A. lentulus</i>	99%	96.36%	1323
<i>A. fumigatus</i>	No.46	98.97	581	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	98.97%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.47	99.48	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	99%	99.48%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.48	100	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.49	100	580	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.50	100	5580	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.51	99.66	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.66%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.52	100	582	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.53	100	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	99.83%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.54	100	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.07%	591.2
<i>A. fumigatus</i>	No.55			ไม่มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์			
<i>A. fumigatus</i>	No.56	100	581	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.57	100	584	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584
<i>A. fumigatus</i>	No.58 ATCC 26934	100	581	KP054381.1 <i>A. fumigatus</i>	100%	100.00%	584

ตารางที่ 36 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *A. flavus* ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย *tef-1 α* ไพโรเมอร์

<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. flavus</i>	No.1	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.2	99.15	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.66%	596
<i>A. flavus</i>	No.3	99.49	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	100.00%	596
<i>A. flavus</i>	No.4	98.13	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	98.66%	596
<i>A. flavus</i>	No.5	98.47	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	98.99%	596
<i>A. flavus</i>	No.6	98.13	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	98.66%	596
<i>A. flavus</i>	No.7	98.81	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.33%	596
<i>A. flavus</i>	No.8	98.47	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	98.99%	596
<i>A. flavus</i>	No.9	97.79	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	98.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.10	99.15	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.66%	596
<i>A. flavus</i>	No.11	98.98	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.50%	596
<i>A. flavus</i>	No.12	99.49	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	100.00%	596
<i>A. flavus</i>	No.13	99.49	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	98%	100.00%	596
<i>A. flavus</i>	No.14	99.15	593	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.66%	596
<i>A. flavus</i>	No.15	99.15	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.66%	596
<i>A. flavus</i>	No.16	98.98	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.50%	596
<i>A. flavus</i>	No.17	98.98	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.50%	596
<i>A. flavus</i>	No.18	99.15	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.66%	596
<i>A. flavus</i>	No.19	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.20	99.15	596	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	100%	99.66%	596
<i>A. flavus</i>	No.21	100	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.22	99.66	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.23	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.24	100	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.25	99.83	589	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.26	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.27	100	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.28	99.66	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.15%	596
<i>A. flavus</i>	No.29	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.30	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.31	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.32	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.33	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.34	99.66	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.15%	596
<i>A. flavus</i>	No.35	99.66	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.15%	596
<i>A. flavus</i>	No.36	99.66	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.15%	596
<i>A. flavus</i>	No.37	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.38	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596

<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. flavus</i>	No.39	99.66	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.15%	596
<i>A. flavus</i>	No.40	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.41	100	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.42	100	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.43	100	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.44	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.45	100	584	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.48%	596
<i>A. flavus</i>	No.46	99.83	586	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.31%	596
<i>A. flavus</i>	No.47	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.48	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.49	99.83	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.32%	596
<i>A. flavus</i>	No.50	100	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.51	100	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.52	100	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596
<i>A. flavus</i>	No.53 ATCC 204304	100	590	KP054383.1 <i>A. flavus</i>	99%	99.49%	596

ตารางที่ 37 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *A. niger* ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α*

<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. niger</i>	No.1	90.86	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	98.20%	611
<i>A. niger</i>	No.2	92.79	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	611
<i>A. niger</i>	No.3	91.21	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	98.52%	611
<i>A. niger</i>	No.4	92.27	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	99.18%	611
<i>A. niger</i>	No.5	100	610	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.12%	758
<i>A. niger</i>	No.6	99.72	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.17%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.85%	758
<i>A. niger</i>	No.7	91.39	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	98.69%	611
<i>A. niger</i>	No.8	91.74	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	99.02%	611
<i>A. niger</i>	No.9	92.78	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	98%	100.00%	611
<i>A. niger</i>	No.10	91.56	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	98.85%	611
<i>A. niger</i>	No.11	92.09	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	98.18%	611
<i>A. niger</i>	No.12	92.79	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	100.00%	611
<i>A. niger</i>	No.13	92.44	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	99.67%	611
<i>A. niger</i>	No.14	92.79	600	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	99.50%	611
<i>A. niger</i>	No.15	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.12%	758
<i>A. niger</i>	No.16	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.12%	758
<i>A. niger</i>	No.17	92.44	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	99.51%	611
<i>A. niger</i>	No.18	92.79	610	KT965677.1 <i>A. niger</i>	99%	100.00%	611
<i>A. niger</i>	No.19	92.97	606	KT965677.1 <i>A. niger</i>	100%	99.67%	611
<i>A. niger</i>	No.20	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.12%	758
<i>A. niger</i>	No.21	99.72	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.12%	758
<i>A. niger</i>	No.22	99.59	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.03%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.71%	758
<i>A. niger</i>	No.23	100	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.11%	758
<i>A. niger</i>	No.24	100	710	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.44%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.06%	758
<i>A. niger</i>	No.25	99.86	714	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.30%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.86%	758
<i>A. niger</i>	No.26	99.86	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.31%	726
				FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.97%	758
<i>A. niger</i>	No.27	100	724	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726

<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. niger</i>	No.28	99.86	716	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.10%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.30%	726
<i>A. niger</i>	No.29	99.72	726	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.88%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.17%	726
<i>A. niger</i>	No.30	99.59	726	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.87%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.03%	726
<i>A. niger</i>	No.31	99.31	725	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.70%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.89%	726
<i>A. niger</i>	No.32	99.45	726	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.55%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	98.90%	726
<i>A. niger</i>	No.33	99.45	729	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.60%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	98.90%	726
<i>A. niger</i>	No.34	100	714	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.57%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.44%	726
<i>A. niger</i>	No.35	99.72	726	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	93.82%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.17%	726
<i>A. niger</i>	No.36	100	728	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.87%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
<i>A. niger</i>	No.37	100	726	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.10%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
<i>A. niger</i>	No.38	100	720	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.12%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.44%	726
<i>A. niger</i>	No.39	99.86	726	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.07%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.31%	726
<i>A. niger</i>	No.40	100	727	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.85%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
<i>A. niger</i>	No.41	100	724	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.98%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
<i>A. niger</i>	No.42	99.86	723	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.12%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.31%	726
<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. niger</i>	No.43	99.72	727	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.85%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.17%	726
<i>A. niger</i>	No.44	100	722	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	91.10%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726
<i>A. niger</i>	No.45 ATCC 6275	100	726	FN665403.1 <i>A. niger</i>	99%	90.98%	758
				KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.45%	726

ตารางที่ 38 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *A. terreus* ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α*

<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. terreus</i>	No.1	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.2	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.3	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.4	99.59	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.59%	726
<i>A. terreus</i>	No.5	100	720	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.6	99.45	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.45%	726
<i>A. terreus</i>	No.7	99.03	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.03%	726
<i>A. terreus</i>	No.8	100	710	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.9	100	700	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.10	99.17	720	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.17%	726
<i>A. terreus</i>	No.11	99.31	725	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.31%	726
<i>A. terreus</i>	No.12	98.89	722	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	98.89%	726
<i>A. terreus</i>	No.13	99.17	720	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.17%	726
<i>A. terreus</i>	No.14	99.31	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.31%	726
<i>A. terreus</i>	No.15	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.16	99.86	721	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.86%	726
<i>A. terreus</i>	No.17	99.86	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.86%	726
<i>A. terreus</i>	No.18	98.89	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	98.89%	726
<i>A. terreus</i>	No.19	100	700	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.20	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.21	98.89	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	98.89%	726
<i>A. terreus</i>	No.22	98.89	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	98.89%	726
<i>A. terreus</i>	No.23	99.17	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.17%	726
<i>A. terreus</i>	No.24	99.17	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	99.17%	726
<i>A. terreus</i>	No.25	98.76	723	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	98.76%	726
<i>A. terreus</i>	No.26	99.03	721	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.03%	726
<i>A. terreus</i>	No.27	98.76	724	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	98.76%	726
<i>A. terreus</i>	No.28	98.89	729	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	98.89%	726
<i>A. terreus</i>	No.29	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.30			ไม่มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์			
<i>A. terreus</i>	No.31	100	720	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.32	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.33	99.86	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.86%	726
<i>A. terreus</i>	No.34	99.86	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.86%	726
<i>A. terreus</i>	No.35	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.36	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.37	99.86	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.86%	726
<i>A. terreus</i>	No.38	100	716	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.39	99.72	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.72%	726
<i>A. terreus</i>	No.40	99.72	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.72%	726

<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. terreus</i>	No.41	100	725	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.42	100	725	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.43	100	716	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	99%	100.00%	726
<i>A. terreus</i>	No.44	99.86	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.86%	726
<i>A. terreus</i>	No.45	99.86	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	99.86%	726
<i>A. terreus</i>	No.46 ATCC 20542	100	726	KM921970.1 <i>A. terreus</i>	100%	100.00%	726



ตารางที่ 39 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *A. nidulans* ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ *tef-1 α*

<i>tef-1α</i>		%similarity with ATCC	Product size	blast NCBI result			
				Accession No.	Query cover	%identity	Accession length
<i>A. nidulans</i>	No.1	100	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	100.00%	714
<i>A. nidulans</i>	No.2	100	713	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	100.00%	714
<i>A. nidulans</i>	No.3	99.72	710	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.72%	714
<i>A. nidulans</i>	No.4	99.44	711	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.44%	714
<i>A. nidulans</i>	No.5	99.72	717	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.72%	714
<i>A. nidulans</i>	No.6	99.58	713	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.58%	714
<i>A. nidulans</i>	No.7	99.86	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.86%	714
<i>A. nidulans</i>	No.8	99.44	715	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.44%	714
<i>A. nidulans</i>	No.9	99.3	716	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.30%	714
<i>A. nidulans</i>	No.10	99.58	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.58%	714
<i>A. nidulans</i>	No.11	99.3	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.30%	714
<i>A. nidulans</i>	No.12	99.44	710	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.44%	714
<i>A. nidulans</i>	No.13	99.14	700	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.14%	714
<i>A. nidulans</i>	No.14	99.44	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.44%	714
<i>A. nidulans</i>	No.15	100	716	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	100.00%	714
<i>A. nidulans</i>	No.16	99.72	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.72%	714
<i>A. nidulans</i>	No.17	99.86	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.86%	714
<i>A. nidulans</i>	No.18	100	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	100.00%	714
<i>A. nidulans</i>	No.19	99.72	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.72%	714
<i>A. nidulans</i>	No.20	99.72	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.72%	714
<i>A. nidulans</i>	No.21	99.72	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.72%	714
<i>A. nidulans</i>	No.22	99.86	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	99.86%	714
<i>A. nidulans</i>	No.23	100	710	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	100.00%	714
<i>A. nidulans</i>	No.24	100	705	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99%	100.00%	714
<i>A. nidulans</i>	No.25	99.72	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99	99.72%	714
<i>A. nidulans</i>	No.26	100	710	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99	100.00%	714
<i>A. nidulans</i>	No.27	99.86	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99	99.86%	714
<i>A. nidulans</i>	No.28	99.86	710	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99	99.86%	714
<i>A. nidulans</i>	No.29	99.72	714	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99	99.72%	714
<i>A. nidulans</i>	No.30 ATCC 38163	100	712	KM882998.1 <i>A. nidulans</i>	99	100.00%	714

ตารางที่ 40 ผลการจัดกลุ่มข้อมูลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ด้วยบริเวณ *its* และ *tef-1 α*

clade <i>its</i> * clade <i>tef-1α</i> Crosstabulation											
Count											
		clade <i>tef-1α</i>									Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
clade <i>its</i>	1	30	0	0	0	0	0	0	0	0	30
	2	0	35	0	0	18	0	0	0	0	53
	3	0	0	0	30	0	0	0	0	15	45
	4	0	0	29	1	0	0	0	15	0	45
	5	0	0	0	0	41	7	7	0	0	55
Total		30	35	29	31	59	7	7	15	15	228

ตารางที่ 41 ผลการคำนวณหาความสัมพันธ์ในการจำแนกเชื้อ *Aspergillus* ด้วยบริเวณ *its* และ *tef-1 α* ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	796.530 ^a	32	<.001
Likelihood Ratio	643.434	32	<.001
Linear-by-Linear Association	73.239	1	<.001
N of Valid Cases	228		

a. 24 cells (53.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .92.

ตารางที่ 42 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปิซิสของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B

clade <i>tef-1α</i> * MIC (cut-off 8) Crosstabulation						
		Count				Total
		MIC (cut-off 8)		MIC (cut-off 1)		
		<8	\geq 8	\leq 1	>1	
clade <i>tef-1α</i>	1	0	30	0	30	30
	2	0	35	0	35	35
	3	29	0	29	0	29
	4	31	0	31	0	31
	5	30	29	0	59	59
	6	0	7	0	7	7
	7	0	7	0	7	7
	8	15	0	15	0	15
	9	15	0	15	0	15
Total		119	109	90	138	228

ตารางที่ 43 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปิซิสของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS

Chi-Square Tests					
	MIC (cut-off 8)		MIC (cut-off 1)		Asymptotic Significance (2-sided)
	Value	df	Value	df	
Pearson Chi-Square	168.853	8	228.000 ^a	8	<.001
Likelihood Ratio	233.669	8	305.894	8	<.001
N of Valid Cases	228		228		

a. 4 cells (22.2%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.35.

ตารางที่ 44 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปิซิสของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B

clade <i>its</i> * MIC (cut-off 8) Crosstabulation						
		Count				Total
		MIC (cut-off 8)		MIC (cut-off 1)		
		<8	≥8	≤1	>1	
clade <i>its</i>	1	0	30	0	30	30
	2	5	48	0	53	53
	3	45	0	45	0	45
	4	45	0	45	0	45
	5	25	30	0	55	55
Total		119	109	90	90	228

ตารางที่ 45 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปิซิสของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และผลความไวรับต่อยา amphotericin B ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS

Chi-Square Tests					
	MIC (cut-off 8)		MIC (cut-off 1)		Asymptotic Significance (2-sided)
	Value	df	Value	df	
Pearson Chi-Square	155.140 ^a	4	228.000 ^a	4	<.001
Likelihood Ratio	206.531	4	305.894	4	<.001
N of Valid Cases	228		228		

a. 0 cells (0.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 14.34.

ตารางที่ 46 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และลักษณะทางมหัศจรรย์และจุลทรรศน์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation)

clade <i>tef-1α</i> * cultivation Crosstabulation							
Count							
		cultivation					Total
		<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	
clade <i>tef-1α</i>	1	0	0	30	0	0	30
	2	35	0	0	0	0	35
	3	0	0	0	0	29	29
	4	0	0	0	30	1	31
	5	18	41	0	0	0	59
	6	0	7	0	0	0	7
	7	0	7	0	0	0	7
	8	0	0	0	0	15	15
	9	0	0	0	15	0	15
Total		53	55	30	45	45	228

ตารางที่ 47 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tef-1 α* และลักษณะทางมหัศจรรย์และจุลทรรศน์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	796.530 ^a	32	<.001
Likelihood Ratio	643.434	32	<.001
N of Valid Cases	228		

a. 24 cells (53.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .92.

ตารางที่ 48 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และลักษณะทางมหสังฐาน/จุลสังฐาน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation)

clade <i>its</i> * cultivation Crosstabulation							
Count							
		cultivation					Total
		A. <i>flavuss</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	
clade <i>its</i>	1	0	0	30	0	0	30
	2	53	0	0	0	0	53
	3	0	0	0	45	0	45
	4	0	0	0	0	45	45
	5	0	55	0	0	0	55
Total		53	55	30	45	45	228

ตารางที่ 49 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการจัดกลุ่มสปีชีส์ของเชื้อ *Aspergillus* ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *its* และลักษณะทางมหสังฐาน/จุลสังฐานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation) ด้วยคำสั่ง Pearson Chi-Square ด้วยโปรแกรม SPSS

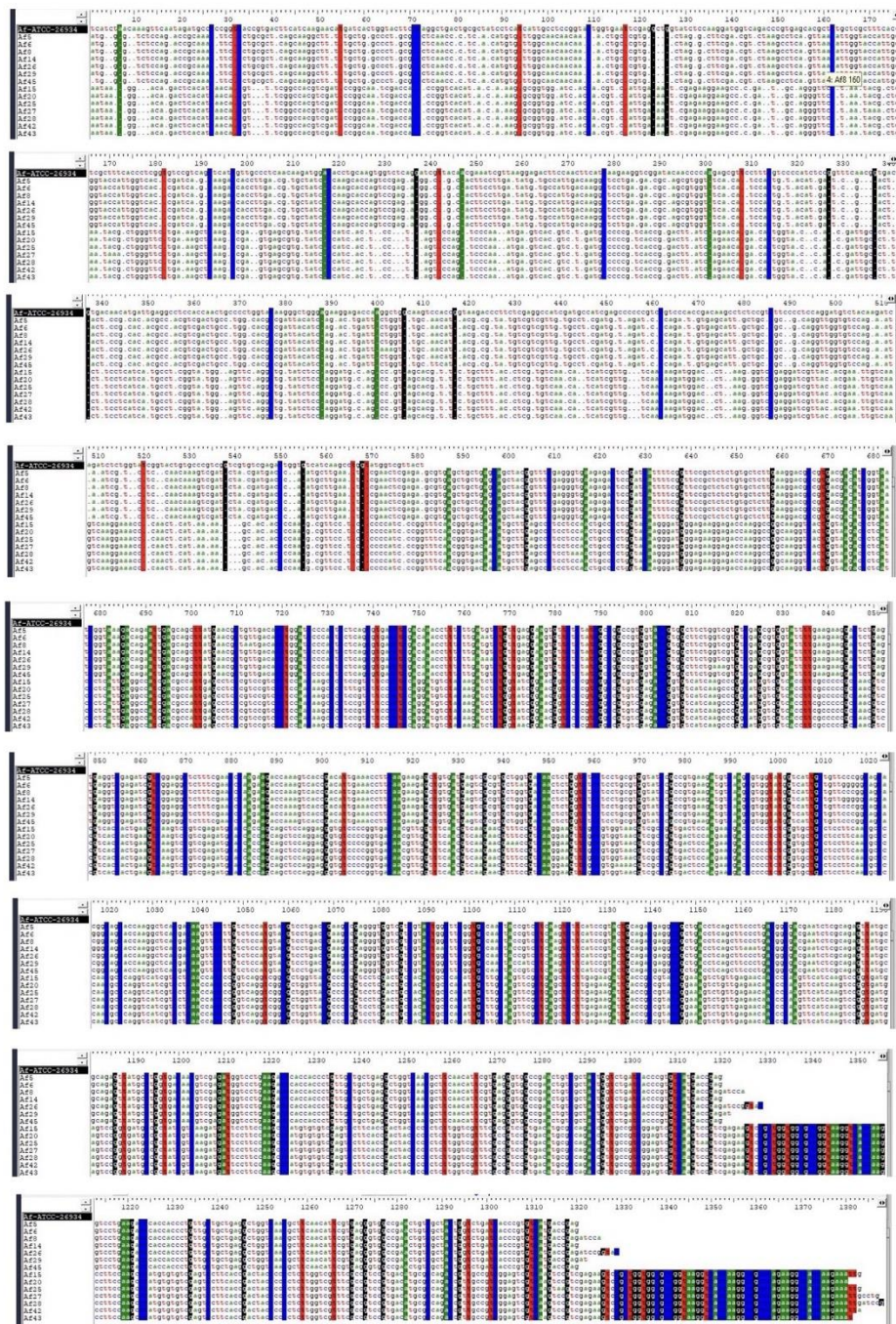
Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	912.000 ^a	16	<.001
Likelihood Ratio	724.853	16	<.001
N of Valid Cases	228		

a. 1 cells (4.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.95.

Seq->	Af1	Af2	Af3	Af4	Af5	Af6	Af8	Af9	Af10	Af11	Af12	Af13	Af14	Af15	Af16	Af17	Af18	Af19	Af20	Af21	Af22	Af23	Af24	Af25	Af26	Af27	Af28	Af29
Af1	0.982	0.987	0.989	0.096	0.096	0.096	0.982	0.981	0.97	0.982	0.984	0.096	0.106	0.984	0.984	0.981	0.986	0.106	0.981	0.989	0.989	0.989	0.106	0.096	0.105	0.105	0.096	
Af2	0.982	0.981	0.991	0.097	0.097	0.097	0.984	0.982	0.972	0.984	0.986	0.097	0.109	0.986	0.986	0.982	0.982	0.109	0.982	0.991	0.991	0.991	0.109	0.097	0.108	0.108	0.097	
Af3	0.987	0.981	0.988	0.098	0.098	0.098	0.981	0.979	0.969	0.981	0.982	0.098	0.107	0.982	0.982	0.979	0.984	0.107	0.979	0.988	0.988	0.988	0.107	0.097	0.106	0.106	0.098	
Af4	0.989	0.991	0.988	0.099	0.099	0.098	0.993	0.991	0.981	0.993	0.994	0.099	0.107	0.994	0.994	0.991	0.989	0.107	0.991	1	1	1	0.107	0.098	0.107	0.107	0.099	
Af5	0.096	0.097	0.098	0.099	0.099	0.994	0.994	0.097	0.1	0.1	0.1	0.099	0.993	0.29	0.099	0.099	0.098	0.098	0.291	0.098	0.099	0.099	0.287	0.987	0.289	0.289	0.994	
Af6	0.096	0.097	0.098	0.099	0.994	0.989	0.097	0.1	0.1	0.1	0.099	0.993	0.289	0.099	0.099	0.098	0.098	0.29	0.098	0.099	0.099	0.099	0.286	0.985	0.289	0.288	0.989	
Af8	0.096	0.097	0.098	0.098	0.994	0.989	0.097	0.099	0.1	0.1	0.098	0.988	0.289	0.098	0.098	0.098	0.098	0.29	0.098	0.098	0.098	0.287	0.989	0.289	0.288	0.992		
Af9	0.982	0.984	0.981	0.993	0.097	0.097	0.097	0.984	0.974	0.986	0.988	0.097	0.108	0.988	0.988	0.984	0.989	0.108	0.984	0.993	0.993	0.993	0.108	0.097	0.108	0.108	0.097	
Af10	0.981	0.982	0.979	0.991	0.1	0.1	0.099	0.984	0.972	0.984	0.986	0.1	0.109	0.986	0.986	0.982	0.981	0.109	0.982	0.991	0.991	0.991	0.109	0.099	0.108	0.108	0.099	
Af11	0.97	0.972	0.969	0.981	0.1	0.1	0.1	0.974	0.972	0.974	0.976	0.1	0.107	0.976	0.976	0.972	0.97	0.107	0.972	0.981	0.981	0.981	0.107	0.1	0.107	0.107	0.1	
Af12	0.982	0.984	0.981	0.993	0.1	0.1	0.1	0.986	0.984	0.974	0.988	0.1	0.108	0.988	0.988	0.984	0.982	0.108	0.984	0.993	0.993	0.993	0.108	0.1	0.108	0.108	0.1	
Af13	0.984	0.986	0.982	0.994	0.099	0.099	0.098	0.988	0.986	0.976	0.988	0.099	0.107	0.989	0.989	0.986	0.984	0.107	0.986	0.994	0.994	0.994	0.107	0.098	0.106	0.106	0.099	
Af14	0.096	0.097	0.098	0.099	0.993	0.993	0.988	0.097	0.1	0.1	0.099	0.993	0.29	0.099	0.099	0.098	0.098	0.291	0.098	0.099	0.099	0.287	0.981	0.289	0.289	0.988		
Af15	0.106	0.109	0.107	0.107	0.29	0.289	0.289	0.108	0.109	0.107	0.108	0.107	0.29	0.996	0.107	0.108	0.107	0.109	0.996	0.107	0.107	0.107	0.107	0.995	0.289	0.995	0.994	0.29
Af16	0.984	0.986	0.982	0.994	0.099	0.099	0.098	0.988	0.986	0.976	0.988	0.989	0.099	0.107	0.989	0.986	0.984	0.107	0.986	0.994	0.994	0.994	0.107	0.098	0.107	0.107	0.099	
Af17	0.984	0.986	0.982	0.994	0.099	0.099	0.098	0.988	0.986	0.976	0.988	0.989	0.099	0.108	0.989	0.986	0.984	0.108	0.996	0.994	0.994	0.994	0.108	0.098	0.108	0.108	0.099	
Af18	0.981	0.982	0.979	0.991	0.098	0.098	0.098	0.984	0.982	0.972	0.984	0.986	0.098	0.107	0.986	0.986	0.981	0.107	0.989	0.991	0.991	0.991	0.107	0.097	0.107	0.107	0.098	
Af19	0.986	0.982	0.984	0.989	0.098	0.098	0.098	0.989	0.981	0.97	0.982	0.984	0.098	0.109	0.984	0.984	0.981	0.109	0.981	0.989	0.989	0.989	0.109	0.097	0.108	0.108	0.098	
Af20	0.106	0.109	0.107	0.107	0.291	0.29	0.29	0.108	0.109	0.107	0.108	0.107	0.291	0.996	0.107	0.108	0.107	0.109	0.996	0.107	0.107	0.107	0.992	0.29	0.992	0.991	0.291	
Af21	0.981	0.982	0.979	0.991	0.098	0.098	0.098	0.984	0.982	0.972	0.984	0.986	0.098	0.107	0.986	0.996	0.989	0.981	0.107	0.991	0.991	0.991	0.107	0.097	0.107	0.107	0.098	
Af22	0.989	0.991	0.988	1	0.099	0.099	0.098	0.993	0.991	0.981	0.993	0.994	0.099	0.107	0.994	0.994	0.991	0.989	0.107	0.991	1	1	1	0.107	0.098	0.107	0.107	0.099
Af23	0.989	0.991	0.988	1	0.099	0.099	0.098	0.993	0.991	0.981	0.993	0.994	0.099	0.107	0.994	0.994	0.991	0.989	0.107	0.991	1	1	1	0.107	0.098	0.107	0.107	0.099
Af24	0.989	0.991	0.988	1	0.099	0.099	0.098	0.993	0.991	0.981	0.993	0.994	0.099	0.107	0.994	0.994	0.991	0.989	0.107	0.991	1	1	1	0.107	0.098	0.107	0.107	0.099
Af25	0.106	0.109	0.107	0.107	0.287	0.286	0.287	0.108	0.109	0.107	0.108	0.107	0.287	0.995	0.107	0.108	0.107	0.109	0.992	0.107	0.107	0.107	0.107	0.287	0.991	0.99	0.287	
Af26	0.096	0.097	0.097	0.098	0.987	0.985	0.989	0.097	0.099	0.1	0.1	0.098	0.981	0.289	0.098	0.098	0.097	0.097	0.29	0.097	0.098	0.098	0.098	0.287	0.289	0.288	0.985	
Af27	0.105	0.108	0.106	0.107	0.289	0.289	0.289	0.108	0.108	0.107	0.108	0.106	0.289	0.995	0.107	0.108	0.107	0.108	0.992	0.107	0.107	0.107	0.107	0.991	0.289	0.993	0.289	
Af28	0.105	0.108	0.106	0.107	0.289	0.288	0.288	0.108	0.108	0.107	0.108	0.106	0.289	0.994	0.107	0.108	0.107	0.108	0.991	0.107	0.107	0.107	0.99	0.288	0.993	0.289	0.289	
Af29	0.096	0.097	0.098	0.099	0.994	0.989	0.992	0.097	0.099	0.1	0.1	0.099	0.988	0.29	0.099	0.099	0.098	0.098	0.291	0.098	0.099	0.099	0.287	0.985	0.289	0.289	0.988	

ภาพที่ 68 ผลการเปรียบเทียบที่คำนวณได้จากโปรแกรม bioedit แสดงค่าความเหมือนภายในกลุ่มเชื้อ *A. fumigatus* ที่จำแนกด้วยยีน *tef-1α* เป็น clade ที่ 5 (ภาพที่ 1)

Seq->	Af1	Af2	Af3	Af4	Af5	Af6	Af8	Af9	Af10	Af11	Af12	Af13	Af14	Af15	Af16	Af17	Af18	Af19	Af20	Af21	Af22	Af23	Af24	Af25	Af26	Af27	Af28	Af29
Af31	0.989	0.991	0.988	1	0.099	0.099	0.098	0.993	0.991	0.981	0.993	0.994	0.099	0.107	0.994	0.994	0.991	0.989	0.107	0.991	1	1	1	0.107	0.098	0.107	0.107	0.099
Af32	0.979	0.979	0.977	0.986	0.101	0.101	0.101	0.979	0.977	0.967	0.979	0.981	0.101	0.109	0.981	0.981	0.977	0.979	0.109	0.977	0.986	0.986	0.986	0.109	0.1	0.108	0.108	0.101
Af33	0.982	0.984	0.981	0.993	0.099	0.099	0.098	0.986	0.984	0.974	0.986	0.988	0.099	0.108	0.988	0.988	0.984	0.982	0.108	0.984	0.993	0.993	0.993	0.108	0.098	0.108	0.108	0.099
Af34	0.993	0.982	0.987	0.989	0.099	0.099	0.098	0.982	0.981	0.97	0.982	0.984	0.099	0.105	0.984	0.984	0.981	0.986	0.105	0.981	0.989	0.989	0.989	0.105	0.098	0.105	0.105	0.098
Af35	0.984	0.986	0.982	0.994	0.1	0.1	0.1	0.988	0.986	0.976	0.988	0.989	0.1	0.109	0.989	0.989	0.986	0.984	0.109	0.986	0.994	0.994	0.994	0.109	0.099	0.108	0.108	0.1
Af36	0.989	0.982	0.991	0.989	0.098	0.098	0.098	0.982	0.981	0.97	0.982	0.984	0.098	0.106	0.984	0.984	0.981	0.986	0.106	0.981	0.989	0.989	0.989	0.106	0.097	0.105	0.105	0.098
Af37	0.982	0.984	0.981	0.993	0.099	0.099	0.098	0.986	0.984	0.974	0.986	0.988	0.099	0.107	0.988	0.988	0.988	0.982	0.107	0.984	0.993	0.993	0.993	0.107	0.098	0.107	0.107	0.099
Af38	0.982	0.984	0.981	0.993	0.1	0.1	0.099	0.986	0.984	0.988	0.986	0.988	0.1	0.106	0.988	0.988	0.984	0.982	0.106	0.984	0.993	0.993	0.993	0.106	0.099	0.105	0.105	0.099
Af39	0.982	0.986	0.981	0.991	0.1	0.1	0.099	0.984	0.982	0.972	0.991	0.986	0.1	0.107	0.986	0.986	0.982	0.982	0.107	0.982	0.991	0.991	0.991	0.107	0.099	0.107	0.107	0.099
Af40	0.982	0.984	0.981	0.993	0.099	0.099	0.098	0.986	0.984	0.974	0.986	0.988	0.099	0.107	0.988	0.988	0.984	0.982	0.107	0.984	0.993	0.993	0.993	0.107	0.098	0.107	0.107	0.099
Af41	0.981	0.982	0.979	0.991	0.098	0.098	0.098	0.984	0.982	0.972	0.984	0.986	0.098	0.107	0.986	0.986	0.982	0.981	0.107	0.982	0.991	0.991	0.991	0.107	0.097	0.107	0.107	0.098
Af42	0.106	0.109	0.107	0.107	0.29	0.289	0.289	0.108	0.109	0.107	0.108	0.107	0.29	0.997	0.107	0.108	0.107	0.109	0.994	0.107	0.107	0.107	0.107	0.993	0.289	0.993	0.992	0.29
Af43	0.106	0.109	0.107	0.107	0.291	0.291	0.291	0.108	0.109	0.107	0.108	0.107	0.291	0.997	0.107	0.108	0.107	0.109	0.997	0.107	0.107	0.107	0.107	0.993	0.291	0.993	0.992	0.291
Af44	0.994	0.984	0.989	0.991	0.099																							



ภาพที่ 72 แสดงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อ *A. fumigatus* ATCC 269344, *A. lentulus* และ *A. udagawae* ที่วิเคราะห์จากโปรแกรม bioedit

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ร.อ.หญิงประภาพร คชพงษ์
วัน เดือน ปี เกิด	10 กรกฎาคม 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพ
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาเทคนิคการแพทย์)
ที่อยู่ปัจจุบัน	130 หมู่ 9 ต.เขาพระงาม อ.เมือง จ.ลพบุรี 15160



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. World Health Organization. WHO releases first-ever list of health-threatening fungi World Health Organization2023 [Available from: <https://www.who.int/news/item/25-10-2022-who-releases-first-ever-list-of-health-threatening-fungi>].
2. Garcia-Vidal C, Peghin M, Cervera C, Gudiol C, Ruiz-Camps I, Moreno A, et al. Causes of Death in a Contemporary Cohort of Patients with Invasive Aspergillosis. *PLOS ONE*. 2015;10(3):e0120370.
3. Slavin MA, Chakrabarti A. Opportunistic fungal infections in the Asia-Pacific region. *Medical Mycology*. 2012;50(1):18-25.
4. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Prueller F, Raggam RB, et al. performance of galactomannan, beta-d-glucan, *Aspergillus* lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):2039-45.
5. McClenny N. laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Medical Mycology*. 2005;43(Supplement_1):S125-S8.
6. Toyotome T. causative Agents of Aspergillosis Including Cryptic *Aspergillus* Species and *A. fumigatus*. *Med Mycol J*. 2016;57(4):J149-j54.
7. Rath PM. Susceptibility of *Aspergillus* strains from culture collections to amphotericin B and itraconazole. *J Antimicrob Chemother*. 1998;41(5):567-70.
8. Iwen PC, Rupp ME, Langnas AN, Reed EC, Hinrichs SH. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 1998;26(5):1092-7.
9. Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, Arabatzis M, Desnos-Ollivier M, Vu D, et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database--the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol*. 2015;53(4):313-37.
10. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol*. 2000;38(4):1510-5.
11. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(7):1068-76.
12. Van Der Linden JWM, Warris A, Verweij PE. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Medical Mycology*. 2011;49(Supplement_1):S82-S9.

13. Nouripour-Sisakht S, Ahmadi B, Makimura K, Hoog S, Umeda Y, Alshahni MM, et al. characterization of the translation elongation factor 1- α gene in a wide range of pathogenic *Aspergillus* species. *J Med Microbiol*. 2017;66(4):419-29.
14. Denning DW. Aspergillosis. In: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 20e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Aspergillosis 2022 [Available from: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/index.html>].
16. System Aids Surveillance. การเฝ้าระวังโรคเอดส์จากรายงาน (EIS): AIDS Surveillance System; 2023 [Available from: http://aidsboe.moph.go.th/aids_system/].
17. Mei-Sheng Riley M. Invasive Fungal Infections Among Immunocompromised Patients in Critical Care Settings: Infection Prevention Risk Mitigation. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2021;33(4):395-405.
18. Chayakulkeeree M, Denning DW. Serious fungal infections in Thailand. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(6):931-5.
19. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. หนังสือรายงานประจำปีงบประมาณ 2564: Faculty of Medicine at Chulalongkorn University; 2023 [Available from: <https://www.md.chula.ac.th/annual-report/hospital-annual-report/>].
20. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. รายงานประจำปีงบประมาณ 2561 2023 [
21. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. รายงานประจำปีงบประมาณ 2560 2023 [Available from: https://www.md.chula.ac.th/wp-content/uploads/2019/06/Directory_Hospital_CU-2560.pdf].
22. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. รายงานประจำปีงบประมาณ 2562 2023 [
23. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. รายงานประจำปีงบประมาณ 2563 2023 [
24. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. รายงานประจำปีงบประมาณ 2564 2023 [
25. Thammahong A, Thayidathara, P., Suksawat, K. and Chindamporn, A. . Invasive *Aspergillus* Infections in a Thai Tertiary-Care Hospital during 2006-2011. *AiM*. 2015;5:298-306.
26. Wikipedia. *Aspergillus fumigatus* Wikipedia2023 [Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_fumigatus].
27. Seladi-Schulman DMaJ. *Aspergillus fumigatus*: healthline; 2018 [Available from: <https://www.healthline.com/health/Aspergillus-fumigatus>].
28. Fang W, Latgé JP. Microbe Profile: *Aspergillus fumigatus*: a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *Microbiology (Reading)*. 2018;164(8):1009-11.
29. Klich MA. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Mol Plant Pathol*. 2007;8(6):713-22.

30. Wikipedia. *Aspergillus niger*: Wikipedia; 2023 [Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_niger].
31. Wikipedia. *Aspergillus terreus*: Wikipedia; 2022 [Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_terreus].
32. Wikipedia. *Aspergillus nidulans*: Wikipedia; 2022 [Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_nidulans].
33. Bartlett DJ. *Aspergillus nidulans*: Microbe Wiki; 2020 [Available from: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus_nidulans].
34. NHS National Aspergillosis Centre CARES team. Aspergillosis Patient & Carer Support NHS National Aspergillosis Centre [Available from: <https://aspergillosis.org/>].
35. Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *ERJ*. 2016;47(1):45.
36. Brad H. Feldman MD, Luis G Alcaraz-Micheli M.D., Alex Kozak, Vatinee Y. Bunya, MD, MSCE, Maria A. Woodward, MD, Christina Moon, M.D., Bharat Gurnani MBBS,DNB,FCRS,FICO(UK), MRCS (Ed), MNAMS. Fungal Keratitis: AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY; August 2, 2022 [Available from: https://eyewiki.aao.org/Fungal_Keratitis].
37. Osguthorpe JD, Nielsen DR. Otitis externa: Review and clinical update. *Am Fam Physician*. 2006;74(9):1510-6.
38. Yehia MM, al-Habib HM, Shehab NM. Otomycosis: a common problem in north Iraq. *J Laryngol Otol*. 1990;104(5):387-9.
39. Chander J. *Aspergillus* Otomycosis: The Fungal Infection Trust; February, 2009 [Available from: https://www.Aspergillus.org.uk/new_treatment/Aspergillus-otomycosis/#:~:text=In%20about%2075%25%20cases%20of%20otomycosis%2C%20Aspergillus%20genus,al%2C%201985%3B%20Paulose%20et%20al%2C%201989%3B%20Lucente%2C%201993%29].
40. Bongomin F, Batac CR, Richardson MD, Denning DW. A Review of Onychomycosis Due to *Aspergillus* Species. *Mycopathologia*. 2018;183(3):485-93.
41. Kameswaran M, Nandhan R. Saprophytic Mycotic Infections of the Nose and Paranasal Sinuses. *Otorhinolaryngology Clinics An International Journal*. 2009;1:25-32.
42. NHS National Aspergillosis Centre. Allergic Broncho-Pulmonary Aspergillosis (ABPA): NHS National Aspergillosis Centre; 2023 [Available from: <https://aspergillosis.org/abpa/>].
43. Agarwal R, Gupta D. Severe asthma and fungi: current evidence. *Med Mycol*. 2011;49 Suppl 1:S150-7.

44. Evans S. Sinusitis: NHS National Aspergillosis Centre; Oct 10, 2022 [Available from: <https://aspergillosis.org/sinusitis/>].
45. Cadena J, Thompson GR, 3rd, Patterson TF. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(1):125-42.
46. Lass-Flörl C, Kofler G, Kropshofer G, Hermans J, Kreczy A, Dierich MP, et al. In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42(4):497-502.
47. Elefanti A, Mouton JW, Verweij PE, Zerva L, Meletiadis J. Susceptibility breakpoints for amphotericin B and *Aspergillus* species in an in vitro pharmacokinetic-pharmacodynamic model simulating free-drug concentrations in human serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2356-62.
48. Cordonnier C, Bresnik M, Ebrahimi R. Liposomal amphotericin B (AmBisome) efficacy in confirmed invasive aspergillosis and other filamentous fungal infections in immunocompromised hosts: a pooled analysis. *Mycoses*. 2007;50(3):205-9.
49. Maertens JA, Raad, II, Marr KA, Patterson TF, Kontoyiannis DP, Cornely OA, et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet*. 2016;387(10020):760-9.
50. Hiemenz JW, Raad, II, Maertens JA, Hachem RY, Saah AJ, Sable CA, et al. Efficacy of caspofungin as salvage therapy for invasive aspergillosis compared to standard therapy in a historical cohort. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(11):1387-94.
51. Euclid Avenue. Aspergillosis: Cleveland Clinic; 2023 [Available from: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/14770-aspergillosis>].
52. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813-21.
53. Medical Labs. Terminology Related to Morphologic Features of Molds: Medical Labs; 2015 [Available from: <http://www.medical-labs.net/terminology-related-to-morphologic-features-of-molds-2788/>].
54. Universe84a.com. *Aspergillus fumigatus* on SDA and Details About SDA: Universe84a.com; 2023 [Available from: <https://universe84a.com/collection/Aspergillus-fumigatus-sda/>].
55. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;5(2):a019786.

56. Head of Centre. *Aspergillus*: Mycology Online; 2022 [Available from: <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/hyphomycetes-conidial-moulds/Aspergillus#Aspergillus-fumigatus-complex>].
57. Shaw CG. The Fungi: The Genus *Aspergillus*. Kenneth B. Raper and Dorothy I. Fennell. With a chapter by Peter K. C. Austwick. Williams and Wilkins, Baltimore, 1965. xii + 686 pp. Illus. \$20. *Science*. 1965;150(3697):736-7.
58. Paugam A, Baixench MT, Lebuissou A, Dupouy-Camet J. [Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: value of bronchoalveolar lavage galactomannan for immunocompromised patients]. *Pathol Biol* (Paris). 2010;58(1):100-3.
59. Nguyen MH, Leather H, Clancy CJ, Cline C, Jantz MA, Kulkarni V, et al. Galactomannan testing in bronchoalveolar lavage fluid facilitates the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies and stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(7):1043-50.
60. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdoglu S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24 Suppl 1:e1-e38.
61. Mahoney C. Galactomannan testing: lessons from the last decade: Cameron Mahoney; 2014 [Available from: <https://slideplayer.com/slide/774295/>].
62. Miceli MH, Kauffman CA. *Aspergillus* Galactomannan for Diagnosing Invasive Aspergillosis. *Jama*. 2017;318(12):1175-6.
63. Zhou W, Li H, Zhang Y, Huang M, He Q, Li P, et al. Diagnostic Value of Galactomannan Antigen Test in Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Patients with Nonneutropenic Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(7):2153-61.
64. Lafontaine DLJ, Tollervey D. The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2:514-20.
65. Stewart FJ, Cavanaugh CM. Intragenomic Variation and Evolution of the Internal Transcribed Spacer of the rRNA Operon in Bacteria. *Journal of Molecular Evolution*. 2007;65:44-67.
66. Takada H, Shimada T, Dey D, Quyyum MZ, Nakano M, Ishiguro A, et al. Differential Regulation of rRNA and tRNA Transcription from the rRNA-tRNA Composite Operon in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2016;11(12):e0163057.
67. Yan J, Shi X, Mei M, Dai H, Ye H. Amplifying and Sequencing Analysis the Internal Transcribed Spacer (ITS) Regions of *Olpidium Viciae* Kusano's Ribosomal DNA in Broad Bean. *Advanced Materials Research*. 2011;271-273:507-13.

68. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci.* 2003;270(1512):313-21.
69. Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci.* 2003;270 Suppl 1(Suppl 1):S96-9.
70. Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: methods and protocols. *Methods Mol Biol.* 2012;858:3-8.
71. Vilgalys D, Gonzalez D. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Curr Genet.* 1990;18(3):277-80.
72. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(16):6241-6.
73. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014;78:141-73.
74. Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson K-H, Kõljalg U. taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLOS ONE.* 2006;1(1):e59.
75. Nilsson RH, Ryberg M, Abarenkov K, Sjökvist E, Kristiansson E. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS microbiology letters.* 2009;296 1:97-101.
76. Parker J. Elongation Factors; Translation. In: Brenner S, Miller JH, editors. *Encyclopedia of Genetics.* New York: Academic Press; 2001. p. 610-1.
77. Tkacz J, Lange L. Advances in Fungal Biotechnology for Industry, *Agriculture, and Medicine* 2004.
78. Einax E, Voigt K. Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organisms Diversity & Evolution.* 2003;3(3):185-94.
79. Meyer W, Irinyi L, Hoang MTV, Robert V, Garcia-Hermoso D, Desnos-Ollivier M, et al. database establishment for the secondary fungal DNA barcode translational elongation factor 1 α (TEF1 α). *Genome.* 2018;62(3):160-9.
80. Stielow B, Lévesque CA, Seifert K, Meyer W, Irinyi L, Smits D, et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi.* 2015;352417192427222628:242-63.

81. Pakshir K, Farazmand F, Ghasemi F, Mirhendi H, Zomorodian K, Kharazi M, et al. Translation elongation factor 1-alpha gene as a marker for diagnosing of candidal onychomycosis. *Curr Med Mycol*. 2020;6(1):15-21.
82. Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Satoh K, Najafzadeh MJ, et al. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. *Medical Mycology*. 2014;52(7):674-88.
83. Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Rezaei-Matehkolaei A, Najafzadeh MJ, Umeda Y, et al. Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Med Mycol*. 2015;53(3):215-24.
84. Wikipedia. Housekeeping gene - Wikipedia 2023 [Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Housekeeping_gene].
85. Glaeser SP, Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*. 2015;38(4):237-45.
86. Wikipedia. Amplified fragment length polymorphism - Wikipedia 2023 [Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Amplified_fragment_length_polymorphism].
87. Wikipedia. Random amplification of polymorphic DNA - Wikipedia 2023 [Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Random_amplification_of_polymorphic_DNA].
88. Wikipedia. Sequence analysis - Wikipedia 2023 [Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Sequence_analysis#cite_note-1].
89. Xia X. Distance-Based Phylogenetic Methods. In: Xia X, editor. *Bioinformatics and the Cell: Modern Computational Approaches in Genomics, Proteomics and Transcriptomics*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 343-79.
90. Vogler AP, Monaghan MT. recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2007;45(1):1-10.
91. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*. 2017;80(3):756-70.
92. Yang Z. Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood (PAML) 2023 [Available from: <http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>].
93. Felsenstein J. PHYLIP Home Page: code; 2023 [Available from: <https://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>].
94. Makarenkov V, Kevorkov D, Legendre P. Phylogenetic Network Construction Approaches. *Applied Mycology and Biotechnology*. 2004;6:61-97.

95. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731-9.
96. Wilgenbusch JC, Swofford D. Inferring evolutionary trees with PAUP*. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2003;Chapter 6:Unit 6.4.
97. Maheux AF, Sellam A, Piché Y, Boissinot M, Pelletier R, Boudreau DK, et al. Use of phylogenetical analysis to predict susceptibility of pathogenic *Candida* spp. to antifungal drugs. *Journal of Microbiological Methods.* 2016;131:51-60.
98. Espinel-Ingroff A, Cantón E, Pemán J. Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *Current Fungal Infection Reports.* 2012;6(1):41-50.
99. Scientific T. Sensititre™ YeastOne™ YO9 AST Plate 2023 [
100. Alshehri B, Palanisamy M. evaluation of molecular identification of *Aspergillus* species causing fungal keratitis. *Saudi J Biol Sci.* 2020;27(2):751-6.
101. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. คำประกาศของผู้ป่วยและคู่มือพิทักษ์และคุ้มครองสิทธิผู้ป่วย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 2014 [Available from: <https://chulalongkornhospital.go.th/kcmh/wp-content/uploads/2017/12/012-22-3-60.pdf>.
102. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* 1990;18(1):315-22.
103. WardMedic. ขั้นตอนในการสั่ง Sequencing 2023 [
104. Megasync.top. MEGAsync 4.7.1: Download Latest Version (UPDATED 2023) 2021 [Available from: <https://megasync.top/>.
105. Oxford Nanopore T. What's in my Pot? (WIMP), a quantitative analysis tool for real-time species identification 2017 [Available from: <https://nanoporetech.com/sites/default/files/s3/posters/pdf/p17014-wimp-web.pdf>.
106. Saengamnatdej S. Simple Steps in Reconstruction of Phylogenetic Trees. *Naresuan University Journal* 2008. 2008;16(2):181-8.
107. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol.* 1990;28(9):1903-5.
108. Hall T. Biological sequence alignment editor: CiteLine; 1997-2017 [Available from: <https://thalljscience.github.io>.
109. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Frontiers in Microbiology.* 2016;7.
110. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From

- the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1367-76.
111. Kanaujia R, Singh S, Rudramurthy SM. Aspergillosis: an Update on Clinical Spectrum, Diagnostic Schemes, and Management. *Curr Fungal Infect Rep*. 2023:1-12.
112. Shoham SMD. *Aspergillus*. 2020.
113. Ashtiani NM, Kachuei R, Yalfani R, Harchegani AB, Nosratabadi M. Identification of *Aspergillus* sections *Flavi*, *Nigri*, and *Fumigati* and their differentiation using specific primers. *Infez Med*. 2017;25(2):127-32.
114. Samson RA, Hong S-B, Frisvad JC. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*. 2006;44(Supplement_1):S133-S48.
115. Varga Jn, Frisvad JC, Samson RA. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*. 2011;69:57 - 80.
116. Abarca ML, Accensi F, Cano J, Cabañes FJ. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2004;86(1):33-49.
117. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell*. 2006;5(10):1705-12.
118. Nematollahi S, Permpalung N, Zhang SX, Morales M, Marr KA. *Aspergillus lentulus*: An Under-recognized Cause of Antifungal Drug-Resistant Aspergillosis. *Open Forum Infectious Diseases*. 2021;8(8):ofab392.
119. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2005;4(3):625-32.
120. Hoang MTV, Irinyi L, Chen SCA, Sorrell TC, Meyer W. Dual DNA Barcoding for the Molecular Identification of the Agents of Invasive Fungal Infections. *Front Microbiol*. 2019;10:1647.
121. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, et al. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(2):515-21.
122. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(4):1244-51.